

Aus der Kinderklinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Direktor Professor Dr. med. C. Speer

Expression von Adhäsionsmolekülen in/auf humanen

Synovialzellen *in vitro* nach Exposition mit *Borrelia*

*burgdorferi sensu stricto B31* und *Geha*

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Verena Baar aus Presseck

Würzburg, Mai 2006

**Referent: Prof. Dr. Girschick**

**Koreferent: Prof. Dr. Vogel**

**Dekan: Prof. Dr. Ertl**

**Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2006**

**Die Promovendin ist Ärztin**

## **Inhaltsangabe**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Borreliose</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Geschichte</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Erreger</b>	<b>2</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Übertragung und Epidemiologie</b>	<b>4</b>
<b>1.1.4</b>	<b>Klinik</b>	<b>6</b>
<b>1.1.5</b>	<b>Diagnose</b>	<b>8</b>
<b>1.1.6</b>	<b>Therapie, Prophylaxe und Impfung</b>	<b>9</b>
<b>1.2</b>	<b>Pathogenese</b>	<b>11</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Abwehrreaktion des Wirts</b>	<b>12</b>
<b>1.2.1.1</b>	<b>Immunantwort</b>	<b>12</b>
<b>1.2.1.2</b>	<b>Pathologische Immunantwort/Autoimmunität</b>	<b>15</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Modulierung der Immunantwort durch Speichel</b>	<b>18</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Erregerbedingte Pathogenitätsfaktoren</b>	<b>18</b>
<b>1.2.3.1</b>	<b>Dissemination und Invasion</b>	<b>18</b>
<b>1.2.3.2</b>	<b>Proteinexpression</b>	<b>19</b>
<b>1.2.3.3</b>	<b>Regulierung der Proteinexpression durch genetische Veränderung</b>	<b>20</b>
<b>1.2.3.4</b>	<b>Adaptionsmöglichkeiten der Borrelien an veränderte Umgebungsbedingungen</b>	<b>22</b>
<b>1.2.3.5</b>	<b>Intrazelluläres Vorkommen und Persistenz</b>	<b>24</b>
<b>1.2.4</b>	<b>Adhäsionsmoleküle</b>	<b>27</b>

1.3	Fragestellung	34
2	Material und Methoden	35
2.1	Zellkultur	35
2.1.1	<i>In-vitro</i> -Zellkultur	35
2.1.2	Inkubationsbedingungen	35
2.1.3	Subkultivierung der Zellen	36
2.1.4	Bestimmung der Zellzahl	37
2.1.5	Einfrieren und Auftauen der Zellen	37
2.2	Bakterienkultur	38
2.2.1	Inkubationsbedingungen	38
2.2.2	Überimpfen der Bakterien	39
2.2.3	Bestimmung der Bakterienzahl	39
2.2.4	Einfrieren und Auftauen der Bakterien	39
2.3	Expositionsversuche	40
2.3.1	Zellen ernten	41
2.4	Semiquantitative Reverse Transkription- Polymerasekettenreaktion	42
2.4.1	RNA-Isolierung	44
2.4.2	Reverse Transkription	45
2.4.3	$\beta$ -Aktin Abgleich	45
2.4.4	Polymerasekettenreaktion	46

2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	48
2.4.6	Vakuumkonzentration	49
2.5	Semi-nested Polymerasekettenreaktion	49
2.6	Southern Blot	50
2.6.1	Blotten	51
2.6.2	Prähybridisierung	51
2.6.3	Markierung der Oligonukleotide	52
2.6.4	Hybridisierung	52
2.6.5	Detektion	53
2.7	FACScan Durchflusszytometrie	53
2.7.1	Vorbereitung der Zellen	55
2.7.2	Fluoreszenzfärbung	55
2.7.3	Auswertung	56
2.8	Statistik	57
2.8.1	Die zweifaktorielle Varianzanalyse	57
2.8.2	Die Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis	58
2.8.3	Der ungepaarte t-Test	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Semiquantitative Reverse Transkription- Polymerasekettenreaktion	59

3.1.1	ICAM-1-mRNA-Expression in mit <i>B. burgdorferi</i> <i>B31</i> -exponierten Synovialzellen	59
3.1.2	ICAM-1-mRNA-Expression in mit <i>B. burgdorferi</i> <i>Geho</i> -exponierten Synovialzellen	61
3.1.3	ICAM-2-mRNA-Expression in mit <i>B. burgdorferi</i> <i>B31</i> -exponierten Synovialzellen	64
3.1.4	ICAM-2-mRNA-Expression in mit <i>B. burgdorferi</i> <i>Geho</i> -exponierten Synovialzellen	66
3.1.5	NCAM-1-mRNA-Expression in mit <i>B. burgdorferi</i> <i>B31</i> -exponierten Synovialzellen	69
3.1.6	NCAM-1-mRNA-Expression in mit <i>B. burgdorferi</i> <i>Geho</i> -exponierten Synovialzellen	71
3.1.7	VCAM-1-mRNA-Expression in mit <i>B. burgdorferi</i> <i>B31</i> -exponierten Synovialzellen	74
3.1.8	VCAM-1-mRNA-Expression in mit <i>B. burgdorferi</i> <i>Geho</i> -exponierten Synovialzellen	76
3.2	Semi-nested Polymerasekettenreaktion	79
3.2.1	ICAM-3-mRNA-Expression in mit <i>B. burgdorferi</i> <i>B31</i> -exponierten Synovialzellen	79
3.3	FACScan Durchflusszytometrie	80
3.3.1	ICAM-1-Oberflächenexpression auf mit <i>B.</i> <i>burgdorferi B31</i> -exponierten Synovialzellen	81

3.3.2	Prüfung der Hypothese: Die ICAM-1-Oberflächenexpression auf Synovialzellen vermindert sich signifikant nach Exposition mit <i>B. burgdorferi</i> B31	85
3.3.3	ICAM-1-Oberflächenexpression auf mit <i>B. burgdorferi</i> Geho-exponierten Synovialzellen	87
4	Diskussion	91
5	Zusammenfassung	100
6	Verwendete Lösungen, Reagenzien, Materialien und Geräte	104
7	Literaturverzeichnis	108

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Borreliose

Die Borreliose - eine multisystemische entzündliche Erkrankung - ist in Europa und Nordamerika die häufigste von Arthropoden übertragene Krankheit (1).

### 1.1.1 Geschichte

Erste Beschreibungen der klinischen Manifestation der Haut wie dem Erythema chronicum migrans (2) und der Acrodermatitis chronica atrophicans (3) erfolgten bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts. 1975 häuften sich in der amerikanischen Stadt Lyme auffallend oft Oligoarthritis. Diese wurden nach Untersuchungen von Dr. Alan Steere und Aufklärung der infektiologischen Pathogenese als Lyme-Arthritis beschrieben (4). Dass darüber hinaus auch Erkrankungen wie die lymphozytäre Meningitis (5) und die Radikuloneuritis (6) eine Erscheinungsform der Borreliose sind, wurde erst später deutlich. Allen gemeinsam ist der Erreger *Borrelia burgdorferi*, welcher erstmals 1981 von Willi Burgdorfer im Darm der Zecken *Ixodes ricinus* und *Ixodes dammini* entdeckt wurde (7). Zusammen mit Alan Barbour isolierte und kultivierte er die Spirochäten (8). Dass Borrelien wirklich die Ursache der Borreliose sind, stand 1983 mit ihrem kulturellen Nachweis aus dem Blut eines an Borreliose erkrankten Patienten sowie mit ihrem Nachweis aus einer Erythema

chronicum migrans-Gewebeprobe (9) zweifelsfrei fest. Bis heute sind die pathogenetischen Mechanismen, die bei der geringen Erregerzahl zur klinischen Vielfalt der Borreliose führen, noch nicht ausreichend geklärt.

### 1.1.2 Erreger

*Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*), der Erreger der Borreliose, ist ein gramnegatives, mikroaerophiles Bakterium, das zur Familie der Spirochäten gehört. Borrelien sind etwa 20-30 µm lang, 0,2-0,5 µm breit und haben eine spiralgewundene Form (10). Der protoplasmatische Zylinder wird von einer inneren Zellmembran bedeckt. Eine zweite, äußere Zellmembran umgibt das Periplasma, in dem Flagellen zur Fortbewegung verankert sind (11) (siehe Abbildung 1). *B. burgdorferi* besitzt zahlreiche Proteine, darunter Oberflächenproteine wie die outer surface proteins (OspA, OspB, OspC, OspD, OspE, OspF, OspG) (12, 13, 14), OspE/F-related proteins (Erps) (15), Flagellin A und B (16), Hitzeschockproteine (17) und andere. Viele dieser Proteine sind auf Plasmiden kodiert. *B. burgdorferi* hat neben den Plasmiden und weiteren extrachromosomalen DNA-Elementen ein lineares Chromosom mit einer Länge von 950 kb (18). Das Genom ist mit 1,5 mb relativ klein (19). Der Stamm *B. burgdorferi sensu lato* wird anhand klinischer und molekularbiologischer Unterscheidungen in Subtypen unterteilt, von denen die Genospezies *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* und *B.*

*valaisiana* von klinischer Bedeutung sind (20). Je nach Genospezies variiert die Klinik: So ist eine Infektion mit *B. burgdorferi sensu stricto* häufig mit Arthritiden assoziiert, eine Infektion mit *B. garinii* dagegen eher mit neurologischen Symptomen und eine Infektion mit *B. afzelii* und *B. valaisiana* mit Hauterscheinungen (21, 22, 23). Die Genospezies zeigen auch eine unterschiedliche geographische Verteilung: *B. burgdorferi sensu stricto* ist bislang der einzige Erreger der Borreliose in den USA, kommt daneben noch in Europa, Nordafrika und Asien vor. Dahingegen sind die anderen drei Genospezies nur in Europa, Nordafrika und Asien vertreten, was erklären könnte, dass sich die Borreliose in den USA häufiger als Arthritis manifestiert und dass, anders als in Europa, das Erythema chronicum migrans dort oft multipel auftritt (20, 24). Die Heterogenität der einzelnen Borrelien-Stämme bezüglich ihres Geno- und Phänotyps ist bemerkenswert. Das wiederum könnte als Hinweis auf Unterschiede in der Pathogenese der einzelnen Subtypen gedeutet werden. Wir verwendeten für die Expositionsversuche die beiden Stämme *B. burgdorferi sensu stricto* B31 und *B. burgdorferi sensu stricto* Geho.

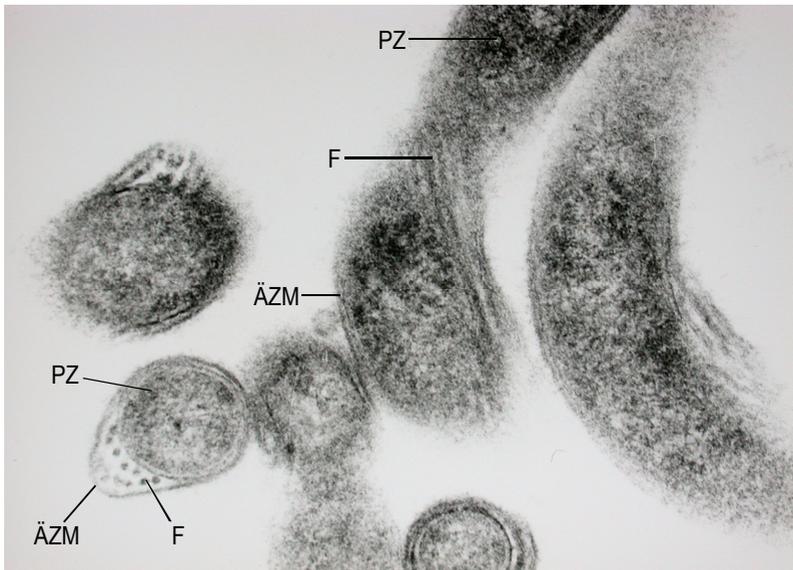


Abbildung 1: *Borrelia burgdorferi* (Transmissionselektronenmikroskopie).  
 ÄZM = äußere Zellmembran, F = Flagelle, PZ = protoplasmatischer Zylinder.

### 1.1.3 Übertragung und Epidemiologie

*B. burgdorferi* wird durch einen „Stich“ infizierter Zecken übertragen. In Europa und Asien ist *Ixodes ricinus* die häufigste übertragende Zeckenart, in Osteuropa und Asien *Ixodes persulcatus* und in den USA *Ixodes scapularis* und *Ixodes pacificus* (20). Zecken durchlaufen eine 2-jährige Entwicklung vom Ei, über Larve und Nymphe zur adulten Zecke, wobei sie in jedem Stadium eine Blutmahlzeit benötigen (25). Zecken halten sich hauptsächlich im Unterholz und Gras auf. Sie erkennen ihren Wirt, gewöhnlich kleinere Säugetiere und Vögel, aber auch größere Säuger und Menschen (26, 27), mit dem Haller'schen Organ an den vorderen Beinen, das auf thermi-

sche und chemische Reize reagiert. Die Zecke klettert am Wirt zu einer geeigneten Saugstelle, ritzt die Haut auf, steckt ihr Hypostom, der mit Widerhaken versehen ist, in die offene Stelle und beginnt die Blutmahlzeit (28). Borrelien, die gewöhnlich im Darm der Zecke sitzen, durchwandern 12-72 Stunden später das Darmepithel und gelangen in die Speicheldrüsen der Zecke, von wo aus sie mit dem Speichel in den Wirt sezerniert werden (29). Besonders adulte Zecken und Nymphen übertragen die Krankheitserreger (30). Die Durchseuchungsrate für Deutschland liegt im Durchschnitt bei 20 %, in Hochrisikogebieten wie in Bayern kann sie bei 30-50 % infizierter Zecken liegen (31). Nach Zeckenstich zeigt sich eine Infektionsrate mit einer Serokonversion von immerhin 10 % und einem klinischen Manifestationsindex von 2-4 % (32). In einer Studie mit Einwohnern aus Süd- und Ostbayern (ab 16 Jahren) wurde eine Gesamtinzidenz der Borreliose von 1,5 % festgestellt (33). Der Wirt reagiert gegen die Zecke und *B. burgdorferi* mit Abwehrmechanismen von einer lokalen Hautreaktion bis hin zu angeborenen und erworbenen Immunreaktionen. Dennoch kann das die Manifestation der Borreliose oft nicht verhindern.

### 1.1.4 Klinik

Zunächst steht bei der Borreliose der an der Eintrittsstelle lokalisierte Gewebeschaden im Vordergrund. Jedoch können nach Dissemination der Borrelien auch zahlreiche andere Organe betroffen sein. Daneben existieren einzelne Fallberichte von seltenen Manifestationen wie der Augen oder der Leber (34, 35). Ein Beweis, ob mit der Borreliose im Erwachsenenalter in seltenen Fällen auch eine Fibromyalgie (36) oder Sklerodermie (37) assoziiert ist, steht noch aus. Die Borreliose wird in der Regel in drei Stadien eingeteilt (38). Im Folgenden sind die typischen Manifestationen aufgeführt:

**Stadium 1:** Als Leitsymptom des frühen, lokalisierten Stadiums entwickelt sich an der Eintrittsstelle das Erythema chronicum migrans, eine Rötung, die sich zentrifugal ausbreitet und meist zentral abblasst (39) (siehe Abbildung 2). Die seltenere Lymphadenosis cutis benigna variiert stark in der Klinik, so können zum Beispiel blaurote Knoten am Ohrläppchen oder an der Mamille erscheinen (40, 41). Beide Frühmanifestationen heilen auch unbehandelt spontan ab. Darüber hinaus können unspezifische Symptome wie Myalgien, Kopfschmerzen oder Fieber auftreten.

**Stadium 2:** Wochen bis Monate nach dem Zeckenstich können in der frühen generalisierten Phase kardiale Symptome wie Karditiden und Erregungsleitungsstörungen (38) sowie neurologische Symptome auftreten, unter anderem eine lymphozytäre Meningitis, Radi-

kuloneuritis (6) oder eine Fazialisparese (42). Auch Arthralgien und intermittierende Arthritiden werden beobachtet (43).

**Stadium 3:** Als Spätform nach Monaten bis Jahren manifestiert sich vor allem in Europa die Hauterkrankung Acrodermatitis chronica atrophicans (44). Eine tertiäre Neuroborreliose äußert sich als Enzephalopathie (45). Daneben kann es zur eigentlichen Lyme-Arthritis kommen. Typischerweise tritt sie als rezidivierende Mono- und Oligoarthritis, hauptsächlich der großen Gelenke der unteren Extremität in Erscheinung. Nach einer Studie in den USA entwickelten 60 % der unbehandelten Patienten mit Erythema chronicum migrans eine Lyme-Arthritis (46). Durch adäquate antibiotische Therapie werden in der Regel 70-90 % der Patienten geheilt. Bei etwa 10 % der Patienten ist die antibiotische Therapie jedoch nicht erfolgreich, was als therapieresistente Lyme-Arthritis bezeichnet wird (47).

Da die klinischen Manifestationen auch stadienunabhängig in Erscheinung treten können und die Übergänge teilweise fließend sind, spricht man häufig nur noch von einer Frühform und einer Spätform der Borreliose (48).



Abbildung 2: Erythema chronicum migrans mit zentralem „Histiozytom“ am Arm eines 10-jährigen Patienten.

### 1.1.5 Diagnose

Die Diagnose der Borreliose basiert in der Regel auf einer typischen Anamnese, einer klassischen Klinik sowie dem serologischen Nachweis von Antikörpern gegen Borrelien mittels Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) als Suchtest und Western Blot zur Bestätigung. Dennoch ist die Diagnosestellung nicht immer einfach: Weniger als die Hälfte aller Borreliose-Patienten erinnern sich an einen Zeckenstich (49). Klinische Leitsymptome können fehlen. Es gibt keine standardisierten, alle Stämme gleich erfassenden, kommerziellen Testverfahren. Kreuzreaktionen mit anderen Erregern

(50) können zu falsch-positiven Testergebnissen führen. Man vermutet, dass eine Seronegativität, zum Beispiel infolge verzögerter Antikörperbildung (51) oder Immunkomplexbildung (52) verursacht werden könnte, der Begriff „seronegative Borreliose“ bleibt aber weiter umstritten. Seltener Nachweismethoden, zum Beispiel eine Polymerasekettenreaktion (PCR) oder ein kultureller Erregernachweis, werden hauptsächlich zu Forschungszwecken durchgeführt.

### **1.1.6 Therapie, Prophylaxe und Impfung**

Die Behandlung einer manifesten Borreliose besteht in der oralen beziehungsweise parenteralen Gabe von Antibiotika. Dabei gelten Borrelien als grundsätzlich empfindlich gegen Betalaktam-Antibiotika und Tetracycline (53, 54). Einen möglichen Behandlungsplan zeigt folgende Tabelle 1.

Klinik	Applikation	Therapie	Alternative
Erythema migrans, Lymphadenosis cutis benigna	oral	Amoxicillin (50 mg/kg/d in 3 ED über 14 d)	Doxycyclin (2 x 100 mg/d über 14 d, wenn Patient älter als 9 J)
Neuroborreliose, Lyme-Arthritis, Borrelien-Karditis	parenteral	Ceftriaxon (50 mg/kg/d (max. 2 g/d) in 1 ED über 14 d)	Cefotaxim (200 mg/kg/d (max. 6 g/d) in 2-3 ED über 14 d)
			Penicillin G (500.000 IE/kg/d (max. 12 Mega/d) in 4-6 ED über 14 d)

Tabelle 1: Antibiotikatherapie der Borreliose im Kindesalter (33).

d = Tag, ED = Einzeldosis, g = Gramm, IE = internationale Einheit, J = Jahre, kg = Kilogramm, max. = maximal, mg = Milligramm.

Für einen allgemein akzeptierten Behandlungsplan fehlen zurzeit randomisierte Langzeitstudien. Jedoch kann es trotz adäquater Antibiotikagabe zu therapierefraktären Verläufen kommen. Wegen der hohen Infektionsrate sowie der diagnostischen und therapeutischen Schwierigkeiten sind prophylaktische Maßnahmen besonders wichtig. Einfache und wirksame Methoden sind: Tragen langärmeliger Kleidung, sorgfältiges Absuchen nach Zecken am Abend und eine rasche Entfernung der Zecken mit der Pinzette, da sich das Infektionsrisiko mit der Dauer des Saugakts, vor allem aber nach 12 Stunden, erhöht (55). Ein Impfstoff bestehend aus rekombinantem *B. burgdorferi*-Oberflächenprotein OspA und einem Adju-

vans wurde 1998 in den USA nach Prüfung auf Wirksamkeit und Verträglichkeit zugelassen (56, 57). Wegen der unterschiedlichen Genospezies mit entsprechenden OspA-Varianten in Europa ist die Wirksamkeit des Impfstoffes hier umstritten und auch nicht geprüft (58). Die OspA-Antikörper gelangen beim Saugakt mit dem Blut in die Zecke und attackieren die Borrelien bereits außerhalb des menschlichen Körpers. Nach fraglichen Impfschäden und einer Veröffentlichung über einen theoretischen Zusammenhang zu Autoimmunerkrankungen (59), wurde der Impfstoff bei sinkender Nachfrage 2002 vom Hersteller zurückgezogen. Bis heute lassen sich diese Verdächtigungen nicht erhärten.

## **1.2 Pathogenese**

Nach Übertragung der Borrelien greift das Immunsystem des Betroffenen den Erreger an. Das verursacht das Auftreten einiger klinischer Manifestationen der Borreliose. Andererseits verfügt *B. burgdorferi* selbst über verschiedene Pathogenitätsfaktoren. Trotz vieler Forschungsergebnisse ist die Pathogenese der Borreliose auch heute noch nicht vollständig geklärt.

### **1.2.1 Abwehrreaktion des Wirts**

Der erste Kontakt zwischen *B. burgdorferi* und Wirt erfolgt durch die Übertragung der Borrelien mit dem Speichel der Zecke während der Blutmahlzeit. Darauf reagiert der Betroffene mit einer angeborenen unspezifischen Immunantwort sowie mit einer erworbenen spezifischen T- und B-Zell-Immunantwort.

#### **1.2.1.1 Immunantwort**

Die Folge dieser Infektion ist eine lokale Entzündungsreaktion, in die B-Zellen, T-Zellen, Phagozyten und Fibroblasten verwickelt sind. Fibroblasten wie Synovialzellen vom Typ B sind fähig, eine Reihe von Proteinen zu exprimieren, unter anderem Adhäsionsmoleküle (60, 61), die eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielen (siehe 1.2.4).

Schließlich kommt es durch Vermittlung von Komplementfaktoren und Entzündungsmediatoren in der Gewebeläsion zur Vasodilatation und erhöhten Kapillarpermeabilität. Leukozyten und Phagozyten strömen ins geschädigte Gewebe ein. Daraufhin werden mikrobielle Proteine von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) des Wirts in Endosomen aufgenommen, proteolytisch verdaut und gebunden an HLA (human leucocyte antigen)-Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche der APZ den T-Helferzellen (TH-Zellen) präsentiert (62, 63). Das HLA-System ist wichtig für die Regulierung der Immunabwehr des Organismus. Beim Menschen liegen die Gene, die als major

histocompatibility complex (MHC) bezeichnet werden, auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (64). Neben der konventionellen Phagozytose wird bei *B. burgdorferi* auch eine „coiling phagocytosis“ durch Makrophagen beschrieben (62, 65). Dabei erfolgt kein endosomaler Einschluss, sondern *B. burgdorferi* wird von Pseudopodien eingerollt und im Zytosol von HLA-Klasse-I-Zellen in Peptide zerlegt (66) (siehe Abbildung 3).

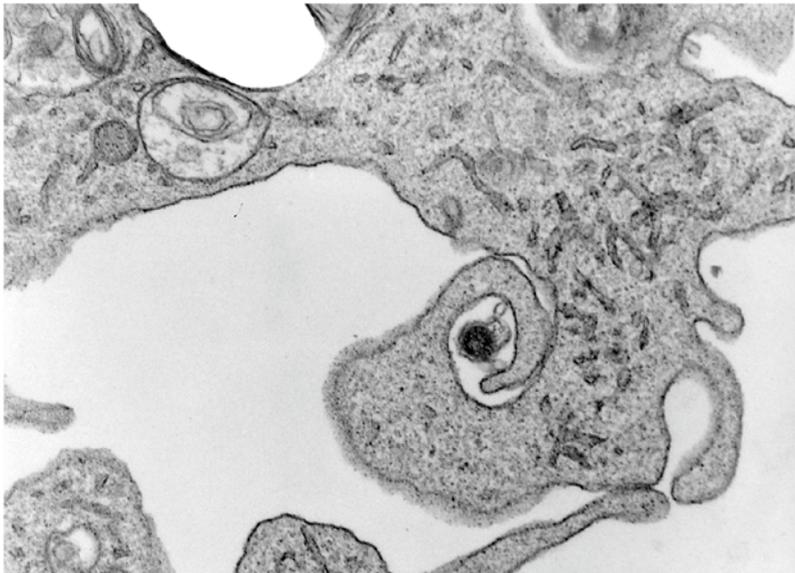


Abbildung 3: „Coiling phagocytosis“ von *B. burgdorferi* durch humane Monozyten (zentraler Einschluss, Transmissionselektronenmikroskopie).

Das Komplementsystem ist ein weiterer wesentlicher Bestandteil der Immunabwehr. Nach antikörperabhängiger Aktivierung trägt es zur Entzündungsreaktion bei. In einer enzymatischen Kaskade

greift es gramnegative Bakterien wie Borrelien an und führt zu deren Lyse. Die Interaktion von *B. burgdorferi* mit dem Immunsystem ruft in der Mehrzahl der Patienten eine Antikörperantwort hervor (36). Die serologische Aktivität, einschließlich des IgM-Titers, kann trotz Antibiotikagabe lange persistieren, so dass eine anhaltende Seropositivität möglicherweise nicht alleine als Marker einer anhaltenden Infektion genutzt werden kann (67, 68).

T-Helferzellen beeinflussen den Verlauf von Infektionskrankheiten durch ihre Produktion von Zytokinen (69). Zytokine sind körpereigene Peptide wie Interleukine (IL), Interferone (IFN) und Tumornekrose-Faktoren (TNF), die von aktivierten T-Zellen und anderen Zellen während der Immunantwort freigesetzt werden. Sie haben vielfältige Funktionen: beispielsweise als Mediator der systemischen Entzündungs- und Immunreaktion, bei der Aktivierung von B-Lymphozyten oder der Stimulierung von T-Helferzellen (70). Anhand der Zytokinproduktion können die TH-Zellen in TH1- und TH2-Zellen unterteilt werden. TH1-Zellen produzieren IFN-gamma, TNF-alpha und IL-2. Sie sind für das Überwinden intrazellulärer Infektionen wichtig, aber auch für die Gewebszerstörung bei chronisch entzündlichen Krankheiten. TH2-Zellen produzieren IL-4 und IL-5, was bei der Parasitenabwehr und bei Allergien bedeutsam ist (71). Wie viele Studien zeigen, überwiegt bei der Lyme-Arthritis eine TH1-Antwort mit entsprechender Zytokinproduktion (72, 73). Es gibt Hinweise auf eine vermehrte Beteiligung einer TH2-Immunantwort

einige Tage später (74, 75). Eine zytokinreiche Umgebung verstärkt die Pathogenität von *B. burgdorferi* (76), unter anderem durch eine Expressionssteigerung von Adhäsionsmolekülen (siehe 1.2.4). *B. burgdorferi* ist in der Lage, die Bildung von IL-1 und TNF-alpha zu stimulieren (77, 78). TNF-alpha (79), IL-1 (80) und IL-6 (81) wurden im Serum (79) sowie zum Teil in der Synovialflüssigkeit (82) und im Liquor (81) erkrankter Personen entdeckt.

Der Betroffene versucht also mit Hilfe des Immunsystems die Borrelien zu eliminieren. Dagegen stehen die Bemühungen des Erregers den Immunangriff unbeschadet zu überstehen.

### **1.2.1.2 Pathologische Immunantwort/Autoimmunität**

Inwiefern bei der Borreliose ein Zusammenhang zwischen Infektion und pathologischer Immunantwort/Autoimmunität besteht, versucht das Modell der molekularen Mimikry zu erklären (68) (siehe Abbildung 4). Demnach sind kreuzreaktive T-Zellen für die Induktion von Autoimmunität verantwortlich. Sie erkennen sowohl Fremd- als auch Selbstantigene. Diese Kreuzreaktivität kommt durch ähnliche (sogenannte Sequenzhomologien) oder gleiche Fremd- und Selbstantigene zustande. Patienten mit Lyme-Arthritis entwickeln anti-OspA Antikörper mit dem Beginn der Arthritis, was bedeuten könnte, dass das Oberflächenprotein OspA der Borrelien eine Rolle im Autoimmunprozess spielt (83). Das immundominante Epitop (immunodominant heißt, dass ein wesentlicher Teil der Immunantwort

gegen dieses Antigen gerichtet ist) innerhalb von OspA weist eine starke Homologie zum Adhäsionsmolekül LFA-1 (human lymphocyte function associated antigen-1) auf. LFA-1 wird auf allen Leukozyten und besonders auf T-Zellen exprimiert (59) und ist Rezeptor für das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (siehe 1.2.4).

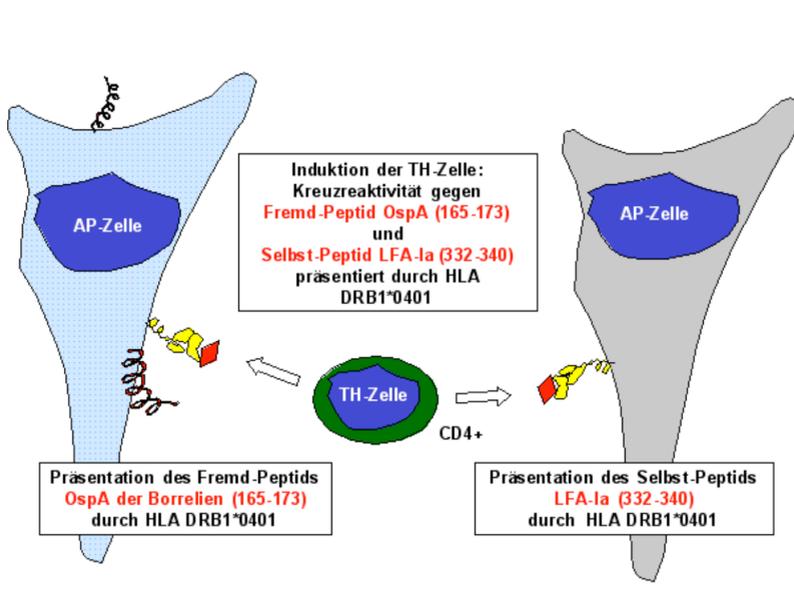


Abbildung 4: Molekulare Mimikry am Beispiel der Lyme-Arthritis.

AP-Zelle = antigenpräsentierende Zelle, HLA = human leucocyte antigen, LFA-Ia = human leucocyte function antigen, OspA = outer surface protein der Borrelien, TH-Zelle = T-Helferzelle.

In einer Studie zeigte das Serum bei Patienten mit behandlungsresistenter Lyme-Arthritis Kreuzreaktivität mit gereinigtem LFA-1, nicht jedoch bei Patienten mit anderen Formen einer Arthritis. Aller-

dings ist die Expression von LFA-1 nicht auf ein Gelenk beschränkt, so kann dieser Befund die Entstehung der Lyme-Arthritis nicht vollständig erklären (59).

In einem Modell der Lyme-Arthritis stellte *Kamradt* fest, dass Kreuzreaktivität sehr häufig auftritt, was allein jedoch noch keine Rückschlüsse auf einen pathogenetischen Zusammenhang zulässt (59, 84).

Alternativ zur Kreuzreaktivität wird die Induktion eines proinflammatorischen Milieus, zum Beispiel durch Zytokinimbalance („Bystanderaktivierung“), als Ursache von Autoimmunität diskutiert. So verstärkt *B. burgdorferi* die Produktion von IL-17 in TH-Zellen (85). Diese bilden auch IFN-gamma (86). IL-17 kann in chronisch entzündeten Geweben nachgewiesen werden (87, 88). Das legt nahe, dass Borrelien antigenunspezifisch TH-Zellen induzieren, die durch Koexpression von IL-17 und IFN-gamma stark entzündlich wirken und am Entstehen von Autoimmunität beteiligt sein könnten (89).

Beide Mechanismen, eine Kreuzreaktivität von T-Zellen (molekulare Mimikry) und eine Induktion proinflammatorischer Zytokine („Bystanderaktivierung“), könnten auch gemeinsam von der Infektion zur letztendlichen Autoimmunität führen (89, 90). Offensichtlich ist *B. burgdorferi* dabei fähig, eine solche pathologische Immunreaktion zu induzieren (91), was eine mögliche Erklärung vor allem

der therapieresistenten Verläufe und der späten entzündlichen Veränderungen der Borreliose darstellt.

### **1.2.2 Modulierung der Immunantwort durch Speichel**

Bei einer Modulierung der Immunantwort zugunsten der Borrelien spielt der von den Zecken injizierte Speichel eine wichtige Rolle. So verlassen die Borrelien die Einstichstelle und damit den Speichel erst, wenn die Zecke vom Wirt ablässt (20). Im Speichel sind nämlich zahlreiche Komponenten enthalten, die die lokale Immunreaktion des Wirts abschwächen können, indem sie antikoagulativ, antiinflammatorisch und immunsuppressiv wirken (92). Sie können die Komplementaktivierung inhibieren (93) und es *B. burgdorferi* erleichtern, ins Gewebe einzudringen (20, 94).

### **1.2.3 Erregerbedingte Pathogenitätsfaktoren**

*B. burgdorferi* besitzt weder klassische Toxine (95) noch Lipopolysaccharide (96) – dennoch können Borrelien eine multisystemische Erkrankung verursachen. Und mehr noch, sie sind in der Lage, der Eliminierung durch das Immunsystem oder auch durch Antibiotikagabe zu entkommen.

#### **1.2.3.1 Dissemination und Invasion**

*B. burgdorferi* richtet nicht nur lokal Schaden an (71), sondern breitet sich in verschiedenen Geweben aus (97). Eine Voraussetzung

hierfür ist die Fähigkeit, sich an extrazelluläre Matrixbestandteile zu binden, wie beispielsweise an epitheliale Proteoglykane (98), Glykosaminoglykane (99), Fibronectin (100) oder Glykosphingolipide auf der Oberfläche von Nervenzellen (101). Mit Eintritt der Borrelien in das Blut können sie durch Interaktion mit OspA, einem Oberflächenprotein der Borrelien (102, 103), an Thrombozyten, Erythrozyten (104) und humanes Plasminogen (105) binden und so zu einer multifokalen Infektion führen (36, 106).

### **1.2.3.2 Proteinexpression**

Die Pathogenität der Borrelien wird zumindest teilweise von ihrer Proteinexpression bestimmt, was die folgenden Beispiele verdeutlichen. Ein Verlust bestimmter Plasmide, auf denen wichtige Proteine kodiert werden, ist mit einem Verlust an Infektiosität und Virulenz assoziiert (107).

Das Oberflächenprotein OspA gehört zu den am häufigsten untersuchten Proteinen. *B. burgdorferi* setzt sich während der Blutmahlzeit mit Hilfe des Ankerproteins OspA an der Innenseite des Zeckendarms fest. Frühestens 24 Stunden später wird OspA herunterreguliert, die Bindung löst sich und *B. burgdorferi* gelangt schließlich in die Speicheldrüsen der Zecke (15, 108). Bei der Invasion der Speicheldrüsen scheint OspC eine Rolle zu spielen, da es in diesem Zeitraum hochreguliert wird (109, 110). OspC ist ein immunodominantes Protein, das in einer Vielzahl von Sequenzen vor-

kommt. Immunodominante Proteine variieren von Stamm zu Stamm. Diese Vielfalt wird Antigenvariation genannt. Für das spezifische Immunsystem des Betroffenen bedeutet das, dass eine einmal aufgebaute Immunantwort eventuell gegen andere Borrelien-Stämme unwirksam ist oder noch während einer Infektion in seiner Wirkung abschwächt (111).

Mittels CRASPs (complement regulator-acquiring surface proteins) können sich einige Borrelien, hauptsächlich des Stammes *B. afzelii* (112), vor der Vernichtung durch das Komplementsystem schützen. Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche sogenannte CRASP-Moleküle, mit deren Hilfe sie Komplementregulatoren, nämlich Faktor H und FHL-1 (factor H like protein-1) binden (113). Diese Eiweiße setzt der menschliche Körper normalerweise ein, um seine eigenen Zellen vor der Zerstörung durch das Komplementsystem zu schützen. Somit ist die Immunabwehr nicht mehr in der Lage, *B. burgdorferi* als fremd zu erkennen und zu vernichten (114).

### **1.2.3.3 Regulierung der Proteinexpression durch genetische Veränderung**

Um den Abwehrmechanismen des Immunsystems zu entgehen, können bei *B. burgdorferi* eine Reihe von Überlebensstrategien beobachtet werden, die auf genetische Veränderungen zurückzuführen sind. Mutationen und Rekombinationen in der DNA des *vlsE*-Gens (variable protein like sequences (*vls*)) führen zur Antigenvari-

ation, indem sie eine Veränderung der VlsE-Proteine und damit der Oberflächenstruktur der Borrelien bewirken (115). Da der äußere Teil des vlsE-Proteins aus variablen Regionen besteht, könnte eine Variation dort die Proteine maskieren. Vor allem während der Zeckenmahlzeit wird die Rekombination am vls-Lokus stimuliert (116). Ein weiterer Mechanismus der zu Antigenvielfalt führt, ist der laterale Gentransfer durch Bakteriophagen wie er für OspC (117) bekannt ist. Häufiger Genaustausch könnte es *B. burgdorferi* erleichtern, effektiv auf den Selektionsdruck im Wirtsorganismus zu reagieren (118).

Wie beschrieben wird die Expression von OspA im Lauf der Blutmahlzeit herabreguliert. Das OspA/B Operon liegt auf einem Plasmid in der Nähe der Gene, die für Enzyme kodieren, die in den Guanin-Metabolismus involviert sind (119). Während *B. burgdorferi* im Darm der Zecke hohen Guaninkonzentrationen ausgesetzt ist, was die GMP-Synthetase und IMP-Dehydrogenase anregt und vielleicht auch die OspA/B Produktion (120), ist im Wirt die Guaninkonzentration sehr viel niedriger. Diese Umgebung stimuliert die guaninmetabolisierenden Enzyme nicht länger, was somit gleichsam zu einer Abregulierung von OspA und OspB führen könnte.

„Supercoiling“ - das bezeichnet eine Art Verpackung der DNA, in der die Achse selbst und nicht nur die DNA-Stränge einen helikalen Verlauf einnehmen - kann als Signalübermittler zwischen einem Erspüren der Umgebungsbedingungen und einer Änderung der

Genexpression dienen (121). So waren temperaturabhängige Veränderungen der Expression der Gene, die für OspA und OspC kodieren, das Ergebnis eines solchen „Supercoiling“ (122).

#### **1.2.3.4 Adaptionenmöglichkeiten der Borrelien an veränderte Umgebungsbedingungen**

Um die Proteinexpression den Bedürfnissen anzupassen, muss *B. burgdorferi* in der Lage sein, die Umgebungsbedingungen zu erspüren und dem entsprechend seine Genexpression zu regulieren (123). „Quorum sensing“ ist ein Verständigungsmechanismus, bei dem Bakterien Signalmoleküle, sogenannte Autoinducer, freisetzen und empfangen (124). Somit können sie die Anwesenheit anderer Bakterien feststellen. Bei der Borreliose spielt der Autoinducer-2 (AI-2) eine Schlüsselrolle. Das Borrelien-Gen BB0377 genannt luxS weist Homologien zu einem Quorum sensor auf (123). Mithilfe des LuxS Enzyms kann *B. burgdorferi* AI-2 herstellen.

Borrelien sind in besonderem Maße fähig, sich an unterschiedliche Lebensbedingungen zu adaptieren. In verschiedenen Studien spiegeln Faktoren wie Temperaturerhöhung (125) oder pH-Reduzierung Bedingungen wieder, wie sie *B. burgdorferi* auch *in vivo* beim Übertritt vom Kaltblütler Zecke hin zum Warmblütler Säugtier erfährt (118). Sie alle resultierten unter anderem in einer Herabregulierung von OspA und einer Hochregulierung von OspC (126).

*Kraiczy und Kollegen* beobachteten eine temperaturabhängige Hochregulierung von CRASP-1, CRASP-2 und CRASP-5. Sie führten die Hochregulierung und den damit verbundenen Schutz vor dem Komplementsystem auf eine überlebensnotwendige Adaption der Borrelien im wärmeren Säugermilieu zurück (113).

Auffällig ist, dass *B. burgdorferi* keine Gene besitzt, die für Aminosäuren- oder Fettsäurenproduktion kodieren und somit von einer nährstoffreichen Umgebung abhängig ist. Zudem scheint das Genom der Borrelien nur für wenige Oligopeptid Transporter zu kodieren (Opp). *Bono und Kollegen* berichteten, dass die Expression von oppA-II und oppA-IV (oligopeptide permease system) in Zeiten guter Nährstoffversorgung und bei höheren Temperaturen hochreguliert wird (127). Unterschiede in der Expression der OppA Proteine haben sich herausgebildet und erlauben es *B. burgdorferi*, sich an unterschiedliche Umgebungsbedingungen und Nischen anzupassen.

Bestimmte Umgebungsbedingungen wie Temperaturerhöhung, die Anwesenheit von Komplementfaktoren oder Antibiotikagabe, führen bei *B. burgdorferi* zu morphologischen Änderungen, nämlich zur Bildung von Blebs (96) (siehe Abbildung 5). Blebs sind Zysten, die sich an der Oberfläche der Borrelien bilden (128) und Borrelien-DNA (129) enthalten. In dieser Form hat *B. burgdorferi* eine unvollständige Zellwand, kann an Endothelzellen binden (130), ist jedoch nicht fähig, sich in bewegliche Borrelien zurückzuverwandeln. Die

Bleb-Bildung könnte einen Überlebensmechanismus der Borrelien darstellen und darüber hinaus den Austausch genetischer Information erleichtern (129).

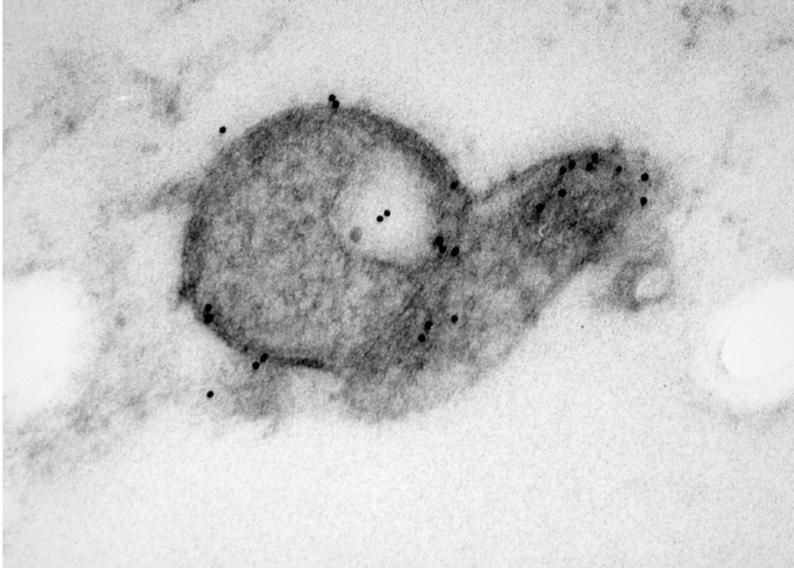


Abbildung 5: Bleb-Bildung von *B. burgdorferi* (Immuntransmissionselektronenmikroskopie) mit Darstellung von OspA in der Membran von *B. burgdorferi*.

### 1.2.3.5 Intrazelluläres Vorkommen und Persistenz

Wie kommt eine therapierefraktäre Borreliose zustande? Durch eine von Borrelien induzierte pathologische Immunreaktion des Betroffenen oder durch Erregerpersistenz, beispielsweise in intrazellulären Lokalisationen oder in Nischen? Die Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass mehrere Faktoren am Auftreten der späten entzündlichen Reaktionen und der Therapieresistenz beteiligt sind

(131). Es existieren viele experimentelle Beweise über eine intrazelluläre Persistenz der Borrelien *in vivo* und *in vitro*. Girschick berichtete, dass Borrelien fähig sind, intrazellulär in humanen Synovialzellen zu persistieren, nachdem sie die Endothelbarriere passiert haben (60, 65) (siehe Abbildung 6). Es gibt auch Veröffentlichungen über eine intrazelluläre Lokalisation der Spirochäten in Makrophagen (132), Fibrozyten (133), Lymphozyten (134), Herzmuskelzellen (135) sowie in humanen Endothelzellen. Darin wird angedeutet, dass die Borrelien über eine zeitweise Expression von noch nicht genauer definierten Rezeptoren und nicht durch Interaktion mit Adhäsionsmolekülen internalisiert werden könnten (136). Außerdem kann *B. burgdorferi* auch nach Antibiotikagabe aus verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten isoliert werden (66, 137, 138, 139, 140, 141, 142). Trotzdem sind Berichte von persistierenden Borrelien bei Patienten sehr selten (143). Ein extrazelluläres Vorkommen von *B. burgdorferi* in bradytrophem Gewebe wird dagegen häufig gefunden (144, 145). Demnach scheinen sich Borrelien gewöhnlich extrazellulär aufzuhalten. Dennoch werden weitere Studien gebraucht, um die Pathogenesemechanismen der Borrelien weiter aufzuklären (118). Angesichts der geringen Erregerzahl und der diagnostischen und therapeutischen Schwierigkeiten, ermöglicht erst ein Verständnis der Pathogenese, geeignete Diagnostik und Therapiestrategien für den chronisch Erkrankten zu finden.

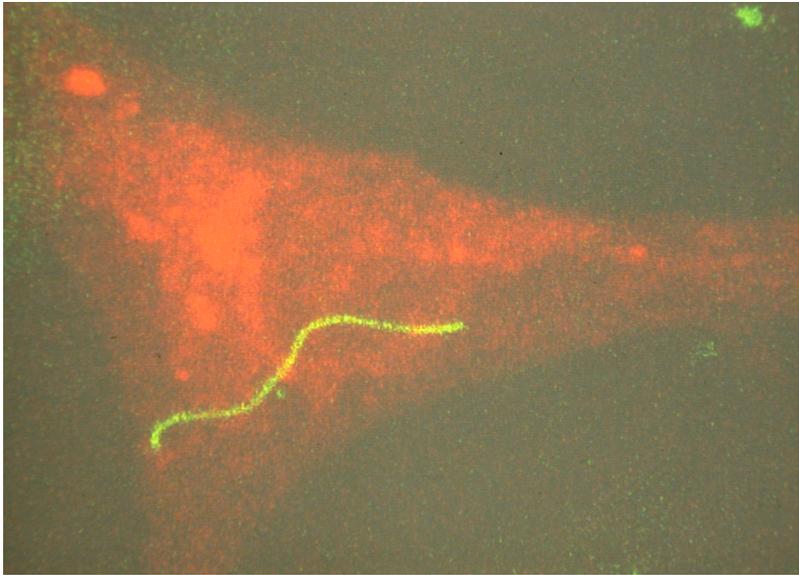


Abbildung 6: Intrazelluläre Persistenz von *B. burgdorferi* in humanen Synovialzellen.

### **1.2.4 Adhäsionsmoleküle**

In der Pathogenese der Borreliose spielen die eben genannten Aspekte eine wichtige Rolle – Adhäsionsmoleküle sind dabei in vielerlei Hinsicht involviert (siehe 1.2). Adhäsionsmoleküle sind integrale Membranproteine, die auf der Oberfläche zahlreicher Zellen - zum Teil zeitlich begrenzt - exprimiert werden (146). Sie ermöglichen über eine Rezeptor-Ligand-Bindung Zell-Zell-Kontakte und sind somit von großer Bedeutung für die Kommunikation verschiedener Zellen. Aufgrund struktureller Unterschiede lassen sich Adhäsionsmoleküle in mehrere Familien, nämlich Selektine, Addressine, Integrine, Immunglobulin-Superfamilie und Cadherine einteilen (86, 147) (siehe Tabelle 2).

<b>Familie</b> Vertreter	<b>Vorkommen</b>	<b>Ligand</b>	<b>Funktion</b>
<b>Selektine</b> E-Selektin P-Selektin L-Selektin	Endothelzellen Thrombozyten Leukozyten	Addressine, Glykoproteine	Leukozyten- Endothelzell- Adhäsion
<b>Addressine, Glykoproteine</b> GlyCAM sLeA sLeX	Endothelzellen Endothelzellen Endothelzellen	Selektine	Leukozyten- Endothelzell- Adhäsion
<b>Integrine</b> VLA-1 bis VLA-6 LFA-1 MAC-1	Leukozyten und weitere Zellen Leukozyten Granulozyten	Immunglobulin- Superfamilie, Adhäsionsmoleküle, extrazelluläre Matrix	Leukozyten- Endothelzell- Adhäsion, Zell-Matrix- Interaktion
<b>Immunglobulin- Superfamilie</b> ICAM-1 ICAM-2 ICAM-3 NCAM-1 VCAM-1	Synovialzellen Endothelzellen Endothelzellen AP-Zellen Nervenzellen Endothelzellen	Integrine	Leukozyten- Endothelzell- Adhäsion, Zelladhäsion
<b>Cadherine</b> E-Cadherin N-Cadherin P-Cadherin	Epithelzellen Nervenzellen Plazenta, Haut	Adhäsionsmoleküle	Zelladhäsion

Tabelle 2: Einteilung der Adhäsionsmoleküle (nicht vollständig).

GlyCAM = glycolised cell adhesion molecule, ICAM = intercellular adhesion molecule, LFA = leucocyte function antigen, MAC = macrophage antigen alpha polypeptide, NCAM = neural cell adhesion molecule, sLeA = Sialyl-Lewis-A, sLeX = Sialyl-Lewis-X, VCAM = vascular cell adhesion molecule, VLA = very late antigen.

Vor allem für den wesentlichen Schritt bei einer Entzündungsreaktion (148), dem Auswandern der zirkulierenden Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe, sind Adhäsionsmoleküle unersetzlich. Nach einer Freisetzung chemotaktischer Substanzen werden sie verstärkt auf der Oberfläche der Leukozyten und Endothelzellen exprimiert und führen zu einer leukozytär-endothelialen Interaktion. Zunächst kommt es bei der initialen Adhäsion über Selektine und Addressine zu einer schwachen Bindung zwischen diesen beiden Zelltypen, dem „Rolling“ der Leukozyten auf dem Endothel. „Stoppsignale“ aktivieren die Leukozyten und Endothelzellen, was zu einer Vermehrung der Adhäsionsmoleküle und einer stabileren Adhäsion führt. Vor allem Integrine ermöglichen es den Leukozyten fest an den Endothelzellen zu haften (86). Die Leukozyten können so durch das Gefäßendothel ins Gewebe auswandern (149). Auch dort sind Adhäsionsmoleküle für das Anlocken von Neutrophilen und Monozyten sowie die Interaktion zwischen den Entzündungszellen und den ortsständigen Gewebezellen von großer Bedeutung (150).

Bei Lyme-Arthritis-Patienten könnte eine Invasion der Leukozyten in das Synovialgewebe einen entzündlichen Gewebeschaden und eine Vaskulopathie verursachen (151). Die Expression der Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und Synovialzellen wie den Fibroblasten (siehe 1.2.1.1) scheint zu dieser Entzündung beizutragen.

Hochreguliert wird die Expression der Adhäsionsmoleküle von Entzündungsmediatoren, hauptsächlich den Zytokinen, die bei einer Entzündung freigesetzt werden (siehe 1.2.1.1). Daraufhin wandern Leukozyten aus den Gefäßen aus und T-Zellen binden verstärkt an Synovialzellen (152, 153, 154), was eine wichtige Voraussetzung für die Entzündungsreaktion ist. Darüber hinaus könnte die Entzündungsreaktion durch eine Invasion der Borrelien selbst unterhalten werden (siehe 1.2.3.1). Hierfür ist, nach Stimulierung der Endothelzellen durch *B. burgdorferi* (155), die Bindung der Borrelien an die Endothelzellen mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen der erste Schritt (156). Selbst bei dem Phänomen der Autoimmunität, das zumindest die späten entzündlichen Veränderungen der Borreliose erklären könnte, scheinen Adhäsionsmoleküle eine Rolle zu spielen. So weist das immunodominante Epitop innerhalb von OspA eine starke Homologie zum Adhäsionsmolekül LFA-1 auf, das wiederum als Rezeptor für das Adhäsionsmolekül ICAM-1 dient (siehe 1.2.1.2). Somit tragen Adhäsionsmoleküle gemeinsam mit Zytokinen und Chemokinen zur Entzündungsreaktion bei (siehe Abbildung 7).

In den Expositionsversuchen untersuchten wir, welche Rolle die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), ICAM-2 (intercellular adhesion molecule 2), ICAM-3 (intercellular adhesion molecule 3), NCAM-1 (neural cell adhesion molecule 1) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) in der frühen Lyme-Arthritis spielen. ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, NCAM-1 und

VCAM-1 sind Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie. Sie lassen sich auf Endothelzellen, Epithelzellen und Stromazellen nachweisen (148). Durch eine entsprechende Stimulierung im Rahmen von Entzündungsprozessen werden diese Adhäsionsmoleküle mit Ausnahme von ICAM-2 vermehrt gebildet. Ihr Bindungspartner sind Integrine des Typs CD11/CD18, die vor allem auf Leukozyten exprimiert werden.

ICAM-1 (CD54) besteht aus fünf extrazellulären Domänen, einer transmembranären Region und einem zytoplasmatischen Schwanz (157). Es wird von vielen Zellen exprimiert, beispielsweise von hämatopoetischen Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten, darunter auch von Synovialzellen (158). Sein Ligand ist das Integrin LFA-1 (leucocyte function antigen 1, CD11/CD18) auf der Oberfläche der Leukozyten (159). Diese ICAM-1/LFA-1-Bindung ermöglicht die Auswanderung der Leukozyten. Darüber hinaus ist ICAM-1 sowohl als Vermittler von nicht-Antigen-spezifischen Zell-Zell-Interaktionen (160) und für die Lymphozyten-vermittelte Zytotoxizität (159) von Bedeutung, als auch bei spezifischen Immunreaktionen (161) wie der T-Zell-abhängigen B-Zell-Aktivierung (162). Weiterhin vermittelt ICAM-1 die Adhäsion von T-Zellen an Monozyten (163) und ist ein wichtiger Kostimulus für die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung ruhender T-Zellen (164).

ICAM-2 (CD102) kann ICAM-1-unabhängig eine Adhäsion von Leukozyten über LFA-1 an Endothelzellen vermitteln (165). Es

besteht aus zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen und wird von Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten exprimiert. Seine Funktion besteht in der Zell-Zell-Adhäsion, der Bindung an Integrine und Proteine.

ICAM-3 (CD50) beinhaltet 5 Immunglobulin-ähnliche Domänen, wird ständig von Leukozyten exprimiert und könnte der wichtigste Ligand für LFA-1 in der Initiierung der Immunantwort sein. Es ist nicht nur Adhäsionsmolekül, sondern auch ein potentes Signalmolekül.

NCAM-1 (CD56) wird auf verschiedenen Zellen exprimiert. Seine Proteinfamilie Fibronectin III kommt in löslicher Form im Plasma und in nicht-löslicher Form im Gewebe und in Membranen vor. Die Proteinfamilie kann eine Vielzahl von Substanzen binden, einschließlich Heparin, Kollagen, DNA, Aktin und Fibrin. So ist NCAM-1 in viele Zellinteraktionen, unter anderem Wundheilung, Zelladhäsion, Blutgerinnung und Tumormetastasierung, involviert (166, 167). NCAM-1 trägt zur Entwicklung des Nervensystems und der Entwicklung und Regeneration von Muskelgewebe bei (168).

VCAM-1 (CD106) wird neben Endothelzellen auch auf nicht vaskulären Zellen wie dendritischen Zellen, Myoblasten oder Synovialzellen exprimiert (169). VCAM-1 bindet an das Integrin VLA-4 (very late antigen 4), das von Lymphozyten und Monozyten exprimiert wird (170). Es vermittelt Leukozyten-Endothelzell-Adhäsion,

Signaltransduktion und könnte eine Rolle in der Entstehung von Arteriosklerose und Rheumatoider Arthritis spielen (160).

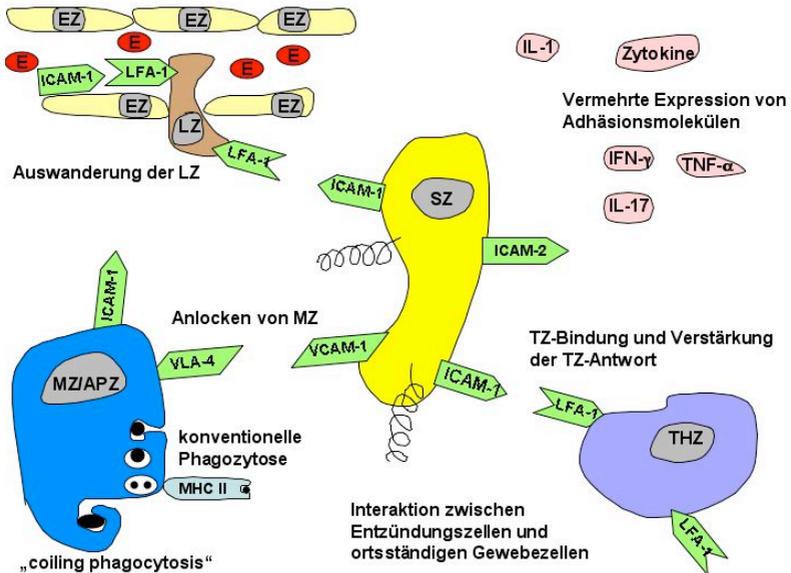


Abbildung 7: Interaktion der Adhäsionsmoleküle auf Synovialzellen mit Leukozyten, T-Helferzellen, Monozyten und antigenpräsentierenden Zellen.

APZ = antigenpräsentierende Zelle, E = Erythrozyt, EZ = Endothelzelle, ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1, ICAM-2 = intercellular adhesion molecule 2, IFN-g = Interferon-gamma, IL-1 = Interleukin 1, IL-17 = Interleukin 17, LFA-1 = leucocyte function antigen 1, LZ = Leukozyt, MHC-II = major histocompatibility complex II, MZ = Monozyt, SZ = Synovialzelle, THZ = T-Helferzelle, TNF-a = Tumornekrosefaktor-alpha, VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule 1, VLA-4 = very late antigen 4.

### 1.3 Fragestellung

Folgende Fragen sollten nach den Expositionsversuchen mit *B. burgdorferi sensu stricto* B31- und *Geho*-exponierten Synovialzellen im Vergleich zu nicht exponierten Synovialzellen für die frühe Lyme-Arthritis beantwortet werden:

1. Ändert sich die Genexpression der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, NCAM-1 und VCAM-1) in Synovialzellen nach Exposition mit *B. burgdorferi* auf mRNA-Ebene?
2. Ändert sich die Proteinexpression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf der Synovialzelloberfläche nach Exposition mit *B. burgdorferi*?
3. Differiert die Expression der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, NCAM-1 und VCAM-1) zwischen den Stämmen *B. burgdorferi sensu stricto* B31 und *Geho*?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 *In-vitro*-Zellkultur**

Für die Expositionsversuche wurden humane Synovialzellen vom Typ B aus orthopädischem Operationsgewebe von infektiologisch gesunden Patienten gewonnen. Sie wurden zwischen der zehnten und zwölften Passage in Zellkultur verwendet (171). Sämtliche Schritte zur Bearbeitung der Synovialzellen wurden unter einer Laminar-air-Sicherheitswerkbank (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA) durchgeführt.

#### **2.1.2. Inkubationsbedingungen**

Die Synovialzellen wurden in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) sowie in Gewebekulturschalen (60/15 mm und 94/16 mm) (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) kultiviert. Als Kulturmedium diente RPMI mit Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe) und einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin) (RPMI-komplett). Die Inkubation erfolgte in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid in einem Zellkulturschrank (Nuair, Plymoth, Minnesota, USA).

### **2.1.3 Subkultivierung der Zellen**

Etwa einen Tag nachdem die Synovialzellen in Zellkultur gebracht worden waren, hefteten sie sich am Boden des Kulturbehältnisses an. Damit sich die Synovialzellen nach Erreichen dieses stationären Zustands weiter vermehren konnten, wurden sie 14 Tage später wie folgt passagiert und verdünnt wieder ausgesät/subkultiviert. Das Medium wurde mit einem Pipetboy accu (Schubert & Weiss GmbH, München) abgesaugt und die Kultur mit phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gewaschen. Nach Überspülen des Zellrasens mit 2 ml Trypsin (0,005 %)/Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA) (0,02 %) (Biochrom AG) wurden die Synovialzellen bei 37 °C abgelöst, solange bis die Trypsin/EDTA-Lösung flockig trüb erschien. Durch seitliches Klopfen an die Kulturflaschen konnten noch adhärente Synovialzellen abgelöst werden. Um den Eiweißverdau zu stoppen, wurde das zehnfache Volumen an RPMI-komplett (20-30 ml) zugegeben und das Medium mit den abgelösten Zellen auf Falcon-Röhrchen (50 ml) (Greiner Bio-One GmbH) aufgeteilt. Diese wurden fünf Minuten bei 21 °C und 1500 rcf in einer Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet mit RPMI-komplett resuspendiert und auf die doppelte Anzahl an Kulturflaschen verteilt. RPMI-komplett-Medium wurde bis zu 50 ml in den Kulturflaschen aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellkulturen im Zellkulturschrank weiter inkubiert.

#### **2.1.4 Bestimmung der Zellzahl**

Zum Zählen der Synovialzellen wurden die Zellen wie unter 2.1.3 beschrieben abgelöst, abzentrifugiert und das Pellet in einem definierten Volumen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau (Merck, Darmstadt) gefärbt und dabei im Verhältnis 1:10 verdünnt, um unter einem Lichtmikroskop (Hund, Wetzlar-Nauborn) die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer (Superior, Marienfeld) bestimmen zu können. Es wurden die Zellen gezählt, die kein Trypanblau aufgenommen hatten und somit als intakt anzusehen waren. Aus dieser Zahl ließ sich die ursprüngliche Gesamtzellzahl des Kulturbedältnisses errechnen.

#### **2.1.5 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Synovialzellen wie unter 2.1.3 beschrieben abgelöst und auf Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Diese wurden zehn Minuten bei 21 °C und 1500 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 8 ml Einfrierlösung (6 ml Ro+ (500 ml RPMI mit Glutamin, 5 ml Hespuffer (Biochrom AG)), 2 ml 10 % FCS, 0,45 ml 33 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (SERVA, Heidelberg)) resuspendiert und auf Einfrieröhrchen (Greiner Bio-One GmbH) zu je 1 ml verteilt. Diese wurden für eine Woche bei –80 °C in einer Einfrierbox (Nalgene, Rochester, NY, USA) und später im Stickstofftank eingefroren. Zum Auftauen der Synovialzellen wurden die

Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank geholt, auf Eis gesetzt und dabei langsam aufgetaut. In ein Falcon-Röhrchen wurden 5 ml RPMI-komplett-Medium vorgelegt, gefolgt von der aufgetauten Zellsuspension. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation und Re-suspension wie unter 2.1.3 beschrieben. Die Zellkulturen wurden im Zellkulturschrank aufbewahrt.

## **2.2 Bakterienkultur**

Für die Infektionsversuche wurden die Borrelienstämme *B. burgdorferi sensu stricto* B31 und *Geho* (Geschenk von Prof. Dr. M. Frosch, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg) in der sechsten bis achten Passage verwendet. Der Stamm B31 wurde aus einem Gelenk eines Patienten mit Lyme-Arthritis, der Stamm *Geho* aus einer Hautbiopsie eines Patienten isoliert.

### **2.2.1 Inkubationsbedingungen**

Zur Kultivierung wurden die Borrelien in Falcon-Röhrchen (12 ml) (Greiner Bio-One GmbH) mit flüssigem BSK-H-Medium und 6 % Kaninchenserumzusatz (RS) (Sigma-Aldrich) pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 35 °C und 5 % Kohlendioxid in einem Zellkulturschrank (Heraeus Sepatech, Hanau).

### **2.2.2 Überimpfen der Bakterien**

Eine starke Gelbfärbung des Indikatorzusatzes des BSK-H-RS-Mediums zeigte eine zunehmende Versäuerung an und damit indirekt einen abnehmenden Nährstoffgehalt. Mit einem Phasenkontrastmikroskop (Leitz, Wetzlar-Nauborn) wurde die Vitalität der Borrelien überprüft. Ließen die typischen korkenzieherartigen Bewegungen der Borrelien nach und zeigten sich stattdessen Blebs (siehe 1.2.3.4), wurden 500 µl der ursprünglichen Borreliensuspension in ein neues 12 ml Falcon-Röhrchen mit frischem BSK-H-RS-Medium pipettiert. Den sich vermehrenden Borrelien standen so wieder ausreichend Nährstoffe zur Verfügung.

### **2.2.3 Bestimmung der Bakterienzahl**

Ein Tropfen der Bakteriensuspension wurde auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter einem Phasenkontrastmikroskop wurden die Borrelien gezählt. Daraus wurde die Anzahl der Borrelien errechnet, die der Menge in 1 ml BSK-H-RS-Medium entsprach.

### **2.2.4 Einfrieren und Auftauen der Bakterien**

Zum Einfrieren wurde die Borreliensuspension in Falcon-Röhrchen zehn Minuten bei 14 °C und 4000 U/min in einer Zentrifuge (Heraeus Sepatech) zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde verworfen, die restliche Borreliensuspension auf Eis gesetzt und mit 0,45 ml DMSO vermischt. Aufgeteilt in Einfrierröhrchen zu je 1 ml

wurden diese erst bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer Einfrierbox und später im Stickstofftank eingefroren. Zum Auftauen wurde das Einfrierröhrchen in ein warmes Wasserbad gegeben. Daraufhin wurde die angetaute Bakteriensuspension in 10 ml BSK-H-RS-Medium aufgenommen und anschließend im Zellkulturschrank kultiviert.

### **2.3 Expositionsversuche**

Für die Exposition der Synovialzellen mit Borrelien wurden nur Zellkulturschalen verwendet, in denen die Synovialzellen bereits einen dichten Zellrasen gebildet hatten. Das RPMI-komplett-Medium wurde bis auf eine dünne Schicht (2 ml verbleibend) abgesaugt. In sechs Kulturschalen wurden die Synovialzellen mit Borrelien kokultiviert. Die dafür benötigte Menge an BSK-H-RS-Medium mit Borrelien wurde berechnet, so dass in jeder Schale ein Verhältnis von 10 Borrelien pro Synovialzelle herrschte (Multiplicity of infection = Mol 10). Sechs weitere Zellkulturschalen dienten als Kontrolle. In diese wurde die gleiche Menge an BSK-H-RS-Medium ohne Borrelien zugegeben. Der pH-Wert des BSK-H-RS-Mediums wurde an den der exponierten Schalen angepasst, um mögliche Einflüsse eines unterschiedlichen pH-Werts oder eines unterschiedlichen Mediums zu vermeiden. Für 30 Minuten wurden die zwölf Schalen im Zellkulturschrank inkubiert. Danach wurde das Volumen jeder Zellkulturschale mit RPMI-Medium (im Verhältnis 1:1 zum BSK-H-RS-Medium) auf insgesamt etwa 5 ml aufgefüllt. Die Zell-

kulturschalen wurden in den Zellkulturschrank gestellt. Nach 12 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 120 Stunden wurden Synovialzellen je einer Kontrollschale (BSK-pH-Kontrolle) und einer Schale mit *B. burgdorferi*-exponierten Synovialzellen geerntet. Als Ausgangskontrolle (Kontrolle) dienten nicht exponierte Synovialzellen ohne Zusatz eines Mediums.

### **2.3.1 Zellen ernten**

Vor dem Ernten wurden die Synovialzellen im Phasenkontrastmikroskop auf Vitalität und Pilz- oder zusätzliche Bakterienkontamination überprüft. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, Trypsin wie beschrieben hinzupipettiert und die Kulturbehältnisse für zehn Minuten im Zellkulturschrank inkubiert. Mit einem Zellschaber (Schubert & Weiss GmbH) wurden die Zellen vorsichtig abgelöst. Um die Trypsinwirkung zu stoppen, wurde RPMI-komplett-Medium hinzugegeben, die Lösung in Falcon-Röhrchen umgefüllt und auf Eis gestellt. 1/4 der Zellen wurde unmittelbar für eine Analyse mittels FACScan Durchflusszytometrie verarbeitet, 3/4 der Zellen wurden in 600 µl RLT-Puffer (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) bei -80 °C eingefroren, um später daraus die gesamte RNA zu isolieren und eine Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion durchzuführen.

## **2.4 Semiquantitative Reverse Transkription- Polymerasekettenreaktion**

Mit einer Reversen Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist es möglich, spezifische RNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Hierzu wird zunächst mRNA aus den Zellen isoliert (siehe 2.4.1). Die mRNA dient als Matrize bei der Proteinsynthese und kodiert in Form von Basentriplets die Aminosäuresequenz der verschiedenen Proteine. Die mRNA-Moleküle werden mittels Reverser Transkription (RT) in cDNA aus Gründen der Molekülstabilität umgeschrieben (siehe 2.4.2). Das Enzym Reverse Transkriptase ist eine Polymerase, die vor allem RNA-, aber auch DNA-Einzelstränge als Matrize verwenden kann. Die umgeschriebene cDNA dient letztlich als Ausgangsmaterial für die Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Dabei können geringe Mengen spezifischer DNA-Sequenzen *in vitro* vervielfältigt werden. Das entscheidende Prinzip dabei ist die zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte Denaturierung der DNA, Anheften der Oligonukleotide und Extension zu neuen Doppelsträngen, wodurch die DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert wird. Zuerst wird die doppelsträngige DNA-Lösung durch Erhitzen auf etwa 90 °C denaturiert, d.h. in zwei komplementäre Einzelstränge getrennt. Nach Abkühlen des Gemisches auf etwa 50 °C werden als „Startermoleküle“ zwei kurze Oligonukleotide (Primer) verwendet, die an die beiden 5'-Enden der spezifischen Sequenz der komplementären DNA-Einzelstränge binden (Anneal-

ling). Durch Zusatz der hitzestabilen Taq-Polymerase werden bei 72 °C die an den DNA-Einzelsträngen heftenden Primer nun jeweils zum Doppelstrang verlängert. Zur exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz wird dieser Zyklus mehrfach wiederholt. Das Ziel einer quantitativen RT-PCR besteht darin, anhand der Menge des detektierten PCR-Produkts auf die Ausgangsmenge an gesuchter cDNA/RNA zurück zu schließen. Auf diese Weise kann beispielsweise die RNA-Expressionsrate von Zellkulturen quantitativ verglichen werden. Als semiquantitative RT-PCR wird eine Vorgehensweise bezeichnet, die keine absoluten Konzentrationen sondern relative Werte liefert, indem die Menge des PCR-Produkts in verschiedenen Proben verglichen wird. Die semiquantitative RT-PCR ist sehr sensitiv, so dass geringe Mengenunterschiede feststellbar sind. Eine Voraussetzung für die Anwendung quantitativer PCR ist, dass mit jedem Zyklus auch tatsächlich eine Verdopplung der DNA-Moleküle einhergeht. Nur in diesem sogenannten linearen Bereich der PCR ist eine Quantifizierung des Ausgangs-cDNA-Gehalts möglich und sinnvoll. In der Regel ist dies bei etwa 20 - 38 Amplifikations-Zyklen der Fall. Verwendet man höhere Zykluszahlen für die PCR, dann verringert sich die ursprünglich exponentielle und im Verlauf dann lineare Rate der Vervielfältigung zusehends durch Verbrauch der „Zutaten“, was als Plateau-Phase der PCR bezeichnet wird. Die Plateau-Phase ist durch einen weiteren Verbrauch/Aufbrauch an Primern, dNTP und abnehmender Taq-

Polymeraseaktivität charakterisiert. Daher nimmt das PCR-Produkt letztendlich nicht mehr zu. Der lineare Bereich der PCR hingegen ist unter anderem auch von der Menge an eingesetzter cDNA abhängig. Demnach muss die Zykluszahl während der semi-quantitativen PCR so gewählt werden, dass eine Detektion des Produkts bereits möglich ist, jedoch die Amplifikation der Ausgangs-cDNA noch im linearen Bereich erfolgt. In diesem linearen Bereich zeigen die Gelbanden bei der Auswertung (siehe 2.5.5) größte Unterschiede zwischen den einzelnen Banden. Je näher die Amplifikation im Bereich der Plateau-Phase läuft, desto ähnlicher werden die Banden, da eine Sättigung der Produktion auftritt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Vergleich der Expression mit einem konstitutiv exprimierten Gen, dem  $\beta$ -Aktin Abgleich (siehe 2.4.3).

### **2.4.1 RNA-Isolierung**

Bei einem Teil der Zellen wurde eine RT-PCR durchgeführt (siehe 2.3.1). Dazu wurden die gefrorenen Proben im warmen Wasser aufgetaut. Unmittelbar danach wurde die RNA der Synovialzellen mit dem RNeasy RNA isolation kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Kontaminierende DNA wurde mittels RQ1 RNAse-free DNase (Qiagen) nach Angaben des Herstellers entfernt.

### **2.4.2 Reverse Transkription**

Anschließend wurde die mRNA in cDNA mittels Superscript II RNAse H-RT (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers umgeschrieben. Durch die RNAse H-Aktivität wird die restliche mRNA entfernt. Hierfür wurden nach dem Starten der Reversen Transkription, d.h. nach Hybridisierung mit einem Oligonukleotid (Promega, Madison, WI, USA) an den poly-A-Schwanz der mRNA für 15 Minuten bei 70 °C im Thermoblock, alle Proben auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. 17 µl der RT-Reaktionsmischung (5 x First-Strand Buffer, DTT 0,1 M (Invitrogen), dNTP 10 mM (Sigma-Aldrich), Superscript II RNAse H-RT und RNAsin (Promega)) wurden pro Probe hinzupipettiert. Die RT wurde für 50 Minuten bei 42 °C durchgeführt, mit einer anschließenden Hitzeinaktivierung für 15 Minuten bei 70 °C. Zuletzt wurden die cDNA-Proben zehn Minuten auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert, um bei –80 °C eingefroren zu werden.

### **2.4.3 $\beta$ -Aktin Abgleich**

Zur Quantifizierung des Ausgangs-cDNA-Gehalts einer Probe können interne Standarts, wie z.B.  $\beta$ -Aktin verwendet werden.  $\beta$ -Aktin ist ein sogenanntes „housekeeping gene“, das in jeder Zelle vorhanden ist und dessen Menge unter den gewählten Bedingungen bis zu einem gewissen Maß konstant bleibt. Zur präzisen Adjustierung des cDNA-Gehalts wurde zuerst die Expression von  $\beta$ -Aktin untersucht. Hierfür erfolgte je dreimal eine PCR zur  $\beta$ -Aktin-

Amplifikation mit 25, 30 und 35 Zyklen. Dadurch wurde der lineare Bereich der PCR bestimmt (siehe 2.4). Der Mittelwert dieser drei PCRs im linearen Bereich wurde errechnet. Je nach Ergebnis wurden die Ausgangsvolumina an cDNA entsprechend verändert, so dass letztlich jede Probe den gleichen relativen Gehalt an  $\beta$ -Aktin-cDNA aufwies. Anschließend wurden weitere PCR-Amplifikationen für spezifische cDNA einiger Adhäsionsmoleküle (siehe 1.2.4) durchgeführt. Aufgrund des  $\beta$ -Aktin Abgleichs konnte so auf den relativen Gehalt an spezifischer cDNA geschlossen werden. Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mit Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.4.5).

#### **2.4.4 Polymerasekettenreaktion**

Nach  $\beta$ -Aktin Abgleich wurde die cDNA der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 und NCAM-1 amplifiziert. Hierfür wurden 25  $\mu$ l des PCR-Reaktionsgemisches (destilliertes Wasser (Eppendorf), 10 x Buffer,  $MgCl_2$  25 mM, dNTP 10 mM, 5'Primer, 3'Primer, Taq-Polymerase (Promega)) auf Cups verteilt. In jeden Cup wurde 1  $\mu$ l cDNA dazugegeben. Die Primerpaare sind unten aufgelistet. Sie wurden mittels der Gen-Datenbank der National library of Medicine (NCBI) ermittelt. Um unspezifische Vervielfältigung zu vermeiden, wurde im Thermocycler (Eppendorf) eine hot-start PCR gestartet. Erst nach Erhitzen des Deckels auf 103 °C und des Reaktionsblocks auf 95 °C, wurden die Proben in den

Block plaziert. Bei 94 °C erfolgte die Denaturierung zu Einzelsträngen für eine Minute, bei 60 °C das Anheften der Oligonukleotide für zwei Minuten und schließlich erfolgte bei 72 °C mittels Taq-Polymerase die Extension zu neuen Doppelsträngen für drei Minuten. Diese Amplifikationszyklen wurden 28mal (VCAM-1), 33mal (ICAM-1, ICAM-2), 40mal (NCAM-1, ICAM-3) jeweils im linearen Bereich durchgeführt. Nach Abkühlung der Proben auf 4 °C wurden diese entweder direkt gelelektrophoretisch analysiert (siehe 2.4.5) oder bei -20 °C gelagert. Negative Kontrollproben ohne Einsatz von cDNA, sowie Tonsillen-cDNA als Positivkontrolle wurden bei jeder PCR mitgeführt (Daten sind hier nicht aufgeführt).

<b>β-Aktin</b>	sense	5' GTC CTC TCC CAA GTC CAC ACA 3'
	antisense	5' CTG GTC TCA AGT CAG TGT ACA GCT AA 3'
<b>ICAM-1</b>	sense	5' TGA TGG GCA GTC AAC AGC TA 3'
	antisense	5' GAA ATT GGC TCC ATG GTG AT 3'
<b>ICAM-2</b>	sense	5' AAC TGC AGC ACC ACC TGT AA 3'
	antisense	5' CTG CAC TCA ATG GTG AAG GA 3'
<b>ICAM-3</b>	sense	5' TTC TTG GAG GTG GAA ACG TC 3'
	antisense	5' TGA GGT TCA CAA TGG GTC CT 3'
<b>NCAM-1</b>	sense	5' GGA GGA CTT CTA CCC GGA AC 3'
	antisense	5' GGA TAG GCA AAT ACC TCG CA 3'
<b>VCAM-1</b>	sense	5' CCA TTT GAC AGG CTG GAG AT 3'
	antisense	5' TTC TTG CAG CTT TGT GGA TG 3'

Tabelle 3: Primerpaare (hergestellt von MWG-Biotech AG, Ebersberg).

ICAM = intercellular adhesion molecule, NCAM = neural cell adhesion molecule, VCAM = vascular cell adhesion molecule.

### 2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Detektion der amplifizierten cDNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wandert die nach außen hin negativ geladene DNA in einem Agarosegel, an welches Spannung angelegt ist, zum Pluspol. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt der Größe nach. Ein sogenannter „Ladder“, d.h. DNA Fragmente definierter Größe, dienen als Größenstandart. Dem Gel wird Ethidiumbromid beigefügt, welches als interkalierender (DNA-bindender) Fluoreszenzfarbstoff die doppelsträngige DNA sichtbar macht. Das Gel wurde aus 1,8 % Agarosezusatz (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in 0,5 x Tris-Borat-EDTA (TBE) (Eppendorf) hergestellt. Nach dem Aufkochen wurden 2  $\mu\text{l}$ /100 ml Ethidiumbromid (1 %) (Merck) beigefügt. Die Flüssigkeit wurde in eine Elektrophoresekammer (Fisher Scientific GmbH, Nidderau) gegossen. Nach Abkühlen des Gels wurde es in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Gelkammer (Pharmacia Biosystems, Freiburg) gelegt und mit 5  $\mu\text{l}$  „Ladder“ (DNA-Fragmente mit aufsteigender Größe im Abstand von 50 bp oder 123 bp, Invitrogen) beladen. Anschließend wurden 8  $\mu\text{l}$  der cDNA-Proben mit 2  $\mu\text{l}$  Loading Buffer (Eppendorf) auf Parafilm (American National Can, Menasha, WI, USA) vermischt. Damit wurden die Gelkammern befüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur und einer Spannung von ca. 120 Volt. Unter UV-Licht wurden die fluoreszierenden Banden fotografiert. Die Auswertung der Messung der Intensität der einzelnen

Banden erfolgte mit dem Gel Doc 2000 Auswertesystem (Biorad, München).

#### **2.4.6 Vakuumkonzentration**

Bei Bedarf wurden einzelne Proben für 20 Minuten mit einem Concentrator 5301 (Eppendorf) vakuumzentrifugiert, um den cDNA-Gehalt der Proben zu konzentrieren, bevor diese in die PCR eingesetzt wurden.

#### **2.5 Semi-nested Polymerasekettenreaktion**

Bei einer semi-nested PCR erfolgen zwei PCR-Amplifikationen nacheinander. Sie zeichnet sich durch eine höhere Spezifität aus, da unspezifische Nebenprodukte der ersten PCR nicht mehr vervielfältigt werden. Die erste PCR erfolgt wie unter 2.4.4 beschrieben. Das erhaltene PCR-Produkt dient in der zweiten PCR als Matrizen-DNA. Dabei wird ein Primer aus der ersten PCR beibehalten, der zweite „innere“ Primer weist eine Bindungsstelle innerhalb des ersten PCR-Produkts auf. 5  $\mu$ l des ersten PCR-Produkts wurden zur semi-nested PCR benutzt. Der relative Gehalt der für ICAM-3 kodierenden cDNA in den  $\beta$ -Aktin-adjustierten Proben wurde so bestimmt. Allerdings verliert man durch den Einsatz der nested PCR die lineare Abbildung der cDNA in das Endprodukt. Es sind lediglich qualitative Aussagen zum Vorhandensein spezifischer cDNA möglich.

## 2.6 Southern Blot

Mit Hilfe eines Southern Blots können Nukleinsäuresequenzen identifiziert werden. Folgende Reaktionsschritte werden durchlaufen: Gelelektrophorese, Blotten, Markierung von Oligonukleotiden, Prähybridisierung, Hybridisierung und Detektion. Dabei werden gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkte auf eine Nylonmembran transferiert (Blotten). Mit Digoxigenin können die als „Sonden“ verwendeten Nukleinsäuren nicht-radioaktiv am 3'-Ende mit dem Enzym Terminaltransferase markiert werden (Oligonucleotide Tailing). Zum Auffinden der gesuchten, markierten Nukleinsäuresequenz wird die Nylonmembran in einer Lösung inkubiert, die eine Sonde enthält. Während der Hybridisierung bindet die Sonde komplementär und lässt sich anhand der spezifischen Markierung nachweisen. Als Sonde dienen beispielsweise Fab-Fragmente von Anti-Digoxigenin-AP, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind und an Digoxigenin binden. Das chemilumineszente Substrat CSPD wird durch die alkalische Phosphatase enzymatisch dephosphoryliert, was zu einer Lichtemission führt, die auf Röntgenfilmen detektiert werden kann.

### **2.6.1 Blotten**

Zuerst wurde ein Agarosegel 15 Minuten in 0,25 M HCl (Sigma-Aldrich) geschwenkt (Shaking Platform, Hybaid, Ashford, Middlesex, UK), zweimal mit destilliertem Wasser gespült und 30 Minuten in 0,5 M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaOH) (Merck) geschwenkt, um die im Gel enthaltene DNA zu denaturieren. Zur Vorbereitung des Vakuublots wurde die Nylonmembran (Biorad) fünf Minuten in destilliertes Wasser und anschließend in 10 x Natrium Citrat-(SSC) Puffer (Eppendorf) gelegt. Auch das Filterpapier (Eppendorf) wurde in 10 x SSC-Puffer getaucht. Das Vakuublottgerät (Biorad) wurde zusammengebaut, so dass Filter, Membran und Gel möglichst luftblasenfrei aufeinander lagen. Das Gel wurde mit einem Liter 10 x SSC-Puffer in der Oberkammer bedeckt. Bei einem Vakuum von 5 mmHg wurde die DNA aus dem Gel für 90 Minuten auf die Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde für fünf Minuten in 2 x SSC-Puffer (Eppendorf) gelegt, zwischen zwei Filterpapieren luftgetrocknet und anschließend im Vakuumtrockner (Binder, Tuttlingen) für 30 Minuten bei 80 °C getrocknet. Daraufhin wurde die DNA auf die Membran in einem UV-Linker (Hybaid) fixiert.

### **2.6.2 Prähybridisierung**

Zur Prähybridisierung wurde die Membran in einer Hybridisierungsflasche (Hybaid) mit 40 ml DIG-EASY-HYB, 400 µl poly A und

80 µl poly dA (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mindestens sechs Stunden bei 50 °C inkubiert. Unspezifische Bindungen der Sonde an die Membran konnten so blockiert werden.

### **2.6.3 Markierung der Oligonukleotide**

Währenddessen erfolgte parallel die Markierung von spezifischen Oligonukleotiden nach dem DIG Oligonukleotide Tailing kit (Roche). Hierfür wurden 20 µl des Reaktionsgemisches (8 µl destilliertes Wasser, 2 µl Oligonukleotid 50 pmol/µl, 4 µl Reaktionspuffer, 4 µl COCl<sub>2</sub>-Lösung, 1 µl DIG-1 dUTP/ATP Markierungsmix, 1 µl Terminaltransferase) in ein Cup pipettiert, kurz geschüttelt und zentrifugiert. Dieser Ansatz wurde für 15 Minuten bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Auf Eis wurde diese Reaktion mit 2 µl EDTA (0,2 M, pH 8) gestoppt. Die Cups wurden bei -20 °C aufbewahrt.

### **2.6.4 Hybridisierung**

Die Hybridisierung der Membran mit den markierten Oligonukleotiden erfolgte für 15 Stunden bei 50 °C. Daraufhin wurde die Membran 30 Minuten mit 2 x SSC-Puffer und schließlich 30 Minuten mit 0,5 x SSC-Puffer bei Hybridisierungstemperatur gewaschen.

### **2.6.5 Detektion**

Zur Detektion wurde das DIG Wash and Block Buffer Set (Roche) verwendet. Die Membran wurde eine Minute in Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Oligonukleotidsonden zu entfernen. Anschließend wurde sie bei Raumtemperatur für 30 Minuten in 1 x Blockierungslösung (mit Maleinsäure 1:10 verdünnt) inkubiert. Für weitere 30 Minuten wurde die Membran in 15 ml Antikörperlösung (15 ml Blockierungslösung, 1,5 µl Anti-DIG Oxigenin-AP) inkubiert. Daraufhin wurde die Membran zweimal 15 Minuten in Waschpuffer gewaschen und zur pH-Wert-Einstellung fünf Minuten in Detektionspuffer gelegt. Abschließend wurde die Membran in einer Plastikfolie mit 1 ml CSPD für fünf Minuten inkubiert. Nach Einlegen der Folie in die Filmkassette wurde ein Röntgenfilm zwischen 60 Minuten und 180 Minuten aufgelegt.

### **2.7 FACScan Durchflusszytometrie**

Mittels FACS-(Fluoreszenz-aktivierter Cell Sorter) Analyse kann eine Expression von Zelloberflächenmolekülen nachgewiesen werden. Dazu werden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gefärbt (siehe 2.7.2). Diese Antikörper binden spezifisch an Oberflächenproteine der Zelle. Die Auswertung der fluoreszenzgefärbten Zellen erfolgt mit einem Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Ein Durchflusszytometer kann gleichzeitig mehrere Eigenschaften einer Zelle

messen. Das sind die relative Zellgröße, die relative Oberflächenbeschaffenheit (Granularität) und die Fluoreszenzintensität der Zellen bzw. der gebundenen fluoreszierenden Antikörper. Dazu werden die gefärbten Zellen in einer Pufferlösung einzeln durch einen Laserstrahl geführt. Das Laserlicht trifft auf die Zellen oder deren Bestandteile. Dadurch wird die Lichtenergie in verschiedene Richtungen gestreut, was mit Detektoren gemessen werden kann. Das meiste Licht wird entlang des einfallenden Laserlichts gestreut. Dieses Vorwärtsstreulicht (forward scatter) (FCS) ist proportional der Zellgröße. Je größer die Zelle ist, desto mehr Vorwärtsstreulicht wird detektiert. Ein Teil des Lichts wird in 90 °-Richtung gestreut (side scatter) (SSC). Dieses Seitwärtsstreulicht ist proportional zur Zellkomplexität/Granularität. Zellen mit vielen Granulas weisen eine hohe Seitwärtsstreuung auf. Zur gleichen Zeit werden auch die Fluoreszenzsignale der an die Oberflächenmoleküle der Zelle gebundenen Antikörper gemessen. Diese Antikörper sind mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, so dass von der Intensität des Fluoreszenzsignals auf das Vorhandensein der Oberflächenmoleküle geschlossen werden kann. Auch hier ist das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge der gebundenen Antikörper. Je höher das Signal ist, desto mehr Antikörper haben an die Zelle gebunden und desto mehr Oberflächenmoleküle sind exprimiert.

### **2.7.1 Vorbereitung der Zellen**

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, um Adhärenz und Aggregation von Synovialzellen zu vermeiden. Die Synovialzellen wurden fünf Minuten bei 5 °C und 1500 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde mittels FACS-Puffer (PBS-Puffer, 1 % Bovines Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)) in Cups/Plastikröhrchen (Eppendorf) überführt. Die Zellsuspension wurde zwei Minuten bei 5 °C und 1500 rcf zentrifugiert. Zur Aufreinigung wurden die Zellen zweimal wie eben beschrieben gewaschen.

### **2.7.2 Fluoreszenzfärbung**

Anschließend wurden die Zellen mit verdünnten fluoreszenzmarkierten Antikörpern (siehe Tabelle 4) gefärbt. Hierfür wurde das Pellet mit 3  $\mu$ l Antikörperlösung resuspendiert und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zwei Minuten bei 5 °C und 1500 rcf zentrifugiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit 100  $\mu$ l FACS-Puffer je Cup gewaschen. Nach Vorlegen von 2 ml FACS-Puffer in FACS-Röhrchen (Becton Dickinson), wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l dieses Puffers in die FACS-Röhrchen überführt. Bis zur Auswertung am Durchflusszytometer blieben die Zellen auf Eis. Folgende Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper standen zur Verfügung:

Bindungsstelle	<b>Anti-ICAM-1</b> (Maus Anti-Human IgG-2a, monoklonal)	<b>Isotypkontrolle</b> (Maus IgG-2a, monoklonal)
Konjugation	Phycoerythrin (PE)	Phycoerythrin (PE)
Chargen-Bezeichnung	07010403	17020903
Katalog-Nummer	MHCD5404	MG2a04

Tabelle 4: Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper (Caltag, Burlingame, CA, USA).

ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1, Isotypkontrolle = ein Antikörper, der unspezifische Bindungen aufdeckt, wie sie durch Anheften des glykosylierten Fc-Teils eines Antikörpers an wiederum glykosylierte Zellstrukturen vorkommen.

### 2.7.3 Auswertung

Pro FACS-Röhrchen werden die Fluoreszenzsignale von 10 000 Zellen mit dem Durchflusszytometer gemessen. Eine Grafik zeigt das Ergebnis, indem die Intensität der gemessenen Fluoreszenz in Pixel gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen ist. So gibt die Grafik die Verteilung der Zellen in Bezug auf die Fluoreszenzintensität wieder. Dabei werden die Fluoreszenzintensitäten in der Grafik des Durchflusszytometers in einer logarithmischen Skala, das Vorwärtsstreulicht und das Seitwärtsstreulicht in einer linearen Skala angegeben. Mit Hilfe einer Isotyp-Färbung wurde in der Grafik ein Bereich gekennzeichnet, in dem per Definition nur positiv gefärbte Zellen eingeschlossen sind (zwei Standardabweichungen). Aus den Werten, die innerhalb dieses definierten Bereichs lagen, wurde ein Mittelwert gebildet (Mean Fluorescence Intensity of Cells Being

Positive) (MFI). Aus diesen Mittelwerten sind die Tabellen aufgebaut (siehe 3).

## **2.8 Statistik**

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe statistischer Tests ausgewertet, um die einzelnen Ergebnisse der Versuche vergleichen zu können.

### **2.8.1 Die zweifaktorielle Varianzanalyse**

Nach Absprache mit Frau Dr. Haubitz (Würzburg) und Herrn Dr. Mäder (Biometrie, Universität Würzburg) wurde bei der Auswertung der Versuche die zweifaktorielle Varianzanalyse verwendet, wobei folgende Fragestellungen berücksichtigt wurden:

1. Besteht ein Unterschied in der mRNA-Expression/in der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen zwischen *B. burgdorferi*-exponierten Synovialzellen und gleich behandelten, nicht exponierten Kontrollzellen? (Gruppenunterschied)
2. Ändert sich die mRNA-Expression/die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen der untersuchten Synovialzellen im Laufe der Expositionszeit? (Unterschied der Messungen)
3. Bleibt der Unterschied, bzw. kein Unterschied zwischen den exponierten Synovialzellen und den Kontrollzellen über die Dauer der Exposition erhalten, d.h. ist ein paralleler Verlauf der Kurven über die Zeit zu erkennen? (Interaktion)

Dieser Test liefert drei Ergebnisse in Hinblick auf die Fragestellungen (Gruppenunterschied, Unterschied der Messungen, Interaktion). Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

Neben der ZF-Analyse über die gesamte Zeit (12 bis 120 Stunden) wurden zusätzlich eine Frühphase (12 bis 48 Stunden) und eine Spätphase (72 bis 120 Stunden) unterschieden.

### **2.8.2 Die Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis**

Da die Messungen aus den Versuchsreihen 3.3.2 keine Normalverteilung zeigten, wurde zum Beweis der Hypothese eine Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis durchgeführt (siehe 3.3.2).

### **2.8.3 Der ungepaarte t-Test**

Des Weiteren wurde zur genaueren Untersuchung der Messzeitpunkte ein ungepaarter t-Test verwendet. Er entspricht einer Varianzanalyse mit nur zwei Ausprägungen und untersucht somit die Expression von Zelloberflächenmolekülen auf nicht exponierten und exponierten Synovialzellen getrennt nach Zeiten.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Semiquantitative Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion

Mittels semiquantitativer RT-PCR (siehe 2.4) erfolgte der relative Nachweis der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, NCAM-1 und VCAM-1 auf mRNA-Ebene (angegeben in Prozent), dargestellt als Anteil der einzelnen Zeitpunkte an der Gesamtexpression (Summe aller Expressionen). Die folgenden Expositionsversuche wurden jeweils dreimal durchgeführt. Als Ausgangswert (Kontrolle) diente die mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle nicht exponierter Synovialzellen ohne Zusatz eines Mediums. Die statistische Auswertung der folgenden Expositionsversuche erfolgte mit der ZF-Analyse und dem ungepaarten t-Test (siehe 2.8).

#### 3.1.1 ICAM-1-mRNA-Expression in *B. burgdorferi* B31-exponierten Synovialzellen

Als Ausgangswert (Kontrolle) diente die relative ICAM-1-mRNA-Expression von 15 %. Nach Exposition mit *B. burgdorferi* B31 blieb die ICAM-1-mRNA-Expression stets unter diesem Wert (Tiefstwert: 4 % bei 120 Stunden und Maximalwert: 13 % bei 48 Stunden). Noch geringer war die ICAM-1-mRNA-Expression der BSK-pH-Kontrolle. Hier lag der Tiefstwert bei 24 Stunden (0 %) (siehe Abbildung 7), was jedoch einem Artefakt entsprechen könnte.

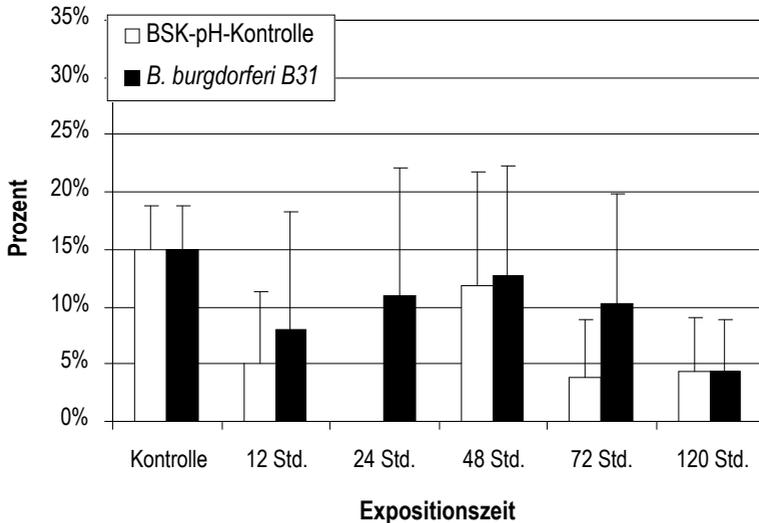


Abbildung 7: ICAM-1-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit exponierten Synovialzellen (*B. burgdorferi* B31).

Die ICAM-1-mRNA-Expression in Synovialzellen wurde durch semiquantitative RT-PCR nach 12 Std., 24 Std., 72 Std. und 120 Std. festgestellt. Der Mittelwert aus sechs gleich aufgebauten Versuchsreihen ist hier dargestellt.

*B. burgdorferi* B31 = *B. burgdorferi* B31-exponierte Synovialzellen, BSK-pH-Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen unter identischen Versuchsbedingungen, ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1, Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen ohne Zusatz von Medium, RT-PCR = Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion, Std. = Stunden.

Die Auswertung mit der ZF-Analyse über die gesamte Zeit ergab in keinem der untersuchten Parameter einen statistisch signifikanten Wert (Gruppenunterschied:  $p=0,42$ , Unterschied der Messungen:  $p=0,18$ , Interaktion:  $p=0,68$ ). Auch nach Unterteilung in Frühphase und Spätphase errechnete sich kein signifikanter Wert (Frühphase: Gruppenunterschied:  $p=0,37$ , Unterschied der Messungen:  $p=0,26$ ,

Interaktion:  $p=0,57$ ; Spätphase: Gruppenunterschied  $p=0,18$ , Unterschied der Messungen:  $p=0,6$ , Interaktion:  $p=0,67$ ) (siehe Tabelle 5). Selbst im ungepaarten t-Test lag der p-Wert stets über dem Signifikanzniveau (siehe Tabelle 6).

### **3.1.2 ICAM-1-mRNA-Expression in *B. burgdorferi* Geho-exponierten Synovialzellen**

Die ICAM-1-mRNA-Expression der Kontrolle lag bei 7 %. Nach Starten des Expositionsversuchs beobachteten wir zu Beginn eine annähernd gleiche ICAM-1-mRNA-Expression sowohl der BSK-pH-Kontrolle als auch der *B. burgdorferi* Geho-exponierten Zellen. Erst bei dem Messzeitpunkt 72 Stunden differierten beide Versuchsgruppen auseinander. Die ICAM-1-mRNA-Expression der BSK-pH-Kontrolle blieb bei 7 %, bei den exponierten Zellen stieg sie auf 11 % (siehe Abbildung 8).

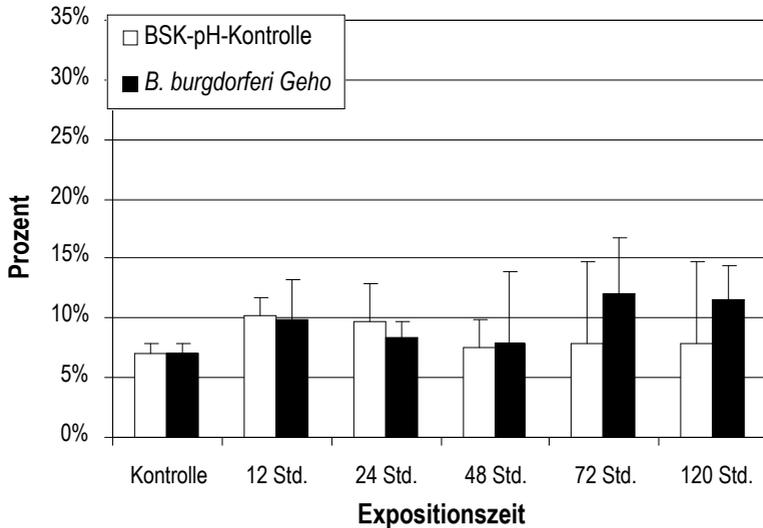


Abbildung 8: ICAM-1-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit exponierten Synovialzellen (*B. burgdorferi* Geho).

Die ICAM-1-mRNA-Expression in Synovialzellen wurde durch semiquantitative RT-PCR nach 12 Std., 24 Std., 72 Std. und 120 Std. festgestellt. Der Mittelwert aus drei gleich aufgebauten Versuchsreihen ist hier dargestellt.

*B. burgdorferi* Geho = *B. burgdorferi* Geho-exponierte Synovialzellen, BSK-pH-Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen unter identischen Versuchsbedingungen, ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1, Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen ohne Zusatz von Medium, RT-PCR = Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion, Std. = Stunden.

Diese Tendenz war zu gering um sich in der ZF-Analyse signifikant wiederzuspiegeln (Gruppenunterschied:  $p=0,91$ , Unterschied der Messungen:  $p=0,52$ , Interaktion:  $p=0,80$ ). Die Ergebnisse der Frühphase (Gruppenunterschied:  $p=0,56$ , Unterschied der Messungen:  $p=0,74$ , Interaktion:  $p=0,91$ ) und der Spätphase (Gruppenunterschied:  $p=0,78$ , Unterschied der Messungen:  $p=0,35$ , Interaktion:

p=0,84) zeigten bezüglich der ICAM-1-mRNA-Expression keine Signifikanz (siehe Tabelle 5).

ICAM-1-mRNA-Expression	Gruppenunterschied		Unterschied der Messungen		Interaktion	
	Stamm	<i>B31</i>	<i>Geho</i>	<i>B31</i>	<i>Geho</i>	<i>B31</i>
p (ZF) (gesamt)	0,42	0,91	0,18	0,52	0,68	0,8
p (ZF) (Frühphase)	0,37	0,56	0,26	0,74	0,57	0,91
p (ZF) (Spätphase)	0,18	0,78	0,6	0,35	0,67	0,84

Tabelle 5: Zweifaktorielle Varianzanalyse (ZF-Analyse) der ICAM-1-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit *B. burgdorferi* *B31*- und *Geho*-exponierten Synovialzellen. Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ). ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1, Frühphase = 12 bis 48 Stunden, Spätphase = 72 bis 120 Stunden Expositionszeit.

Der ungepaarte t-Test fiel zu keinem Messzeitpunkt signifikant aus (siehe Tabelle 6).

<b>ICAM-1-mRNA-Expression</b>	12 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.	120 Std.
p (t) <i>B31</i>	0,68	0,14	0,93	0,34	0,72
p (t) <i>Geho</i>	0,76	0,51	0,93	0,46	0,46

Tabelle 6: Ungepaarter t-Test (t) der ICAM-1-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit *B. burgdorferi* B31- und *Geho*-exponierten Synovialzellen.

Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet (p<0,05\*, p<0,01\*\*, p<0,001\*\*\*). ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1, Std. = Stunden.

### **3.1.3 ICAM-2-mRNA-Expression in *B. burgdorferi* B31-exponierten Synovialzellen**

Die ICAM-2-mRNA-Expression der Kontrolle lag im Mittel bei 7 %. Nach Exposition mit *B. burgdorferi* B31 war zu allen Messzeitpunkten der Prozentwert der ICAM-2-mRNA-Expression höher als der der Ausgangskontrolle und höher als der der BSK-pH-Kontrolle. Auffällig wiederum war der 24-Stunden-Wert von 0 % der BSK-pH-Kontrolle (siehe Abbildung 9), der so nicht erklärbar ist.

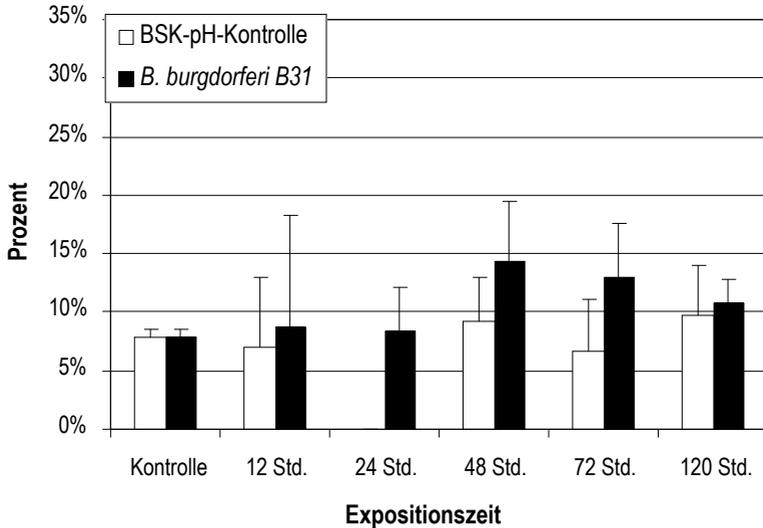


Abbildung 9: ICAM-2-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit exponierten Synovialzellen (*B. burgdorferi* B31).

Die ICAM-2-mRNA-Expression in Synovialzellen wurde durch semiquantitative RT-PCR nach 12 Std., 24 Std., 72 Std. und 120 Std. festgestellt. Der Mittelwert aus drei gleich aufgebauten Versuchsreihen ist hier dargestellt.

*B. burgdorferi* B31 = *B. burgdorferi* B31-exponierte Synovialzellen, BSK-pH-Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen unter identischen Versuchsbedingungen, ICAM-2 = intercellular adhesion molecule 2, Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen ohne Zusatz von Medium, RT-PCR = Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion, Std. = Stunden.

Die ZF-Analyse über die gesamte Zeit ergab keinen signifikanten Wert (Gruppenunterschied:  $p=0,16$ , Unterschied der Messungen:  $p=0,059$ , Interaktion:  $p=0,46$ ). Weder die ZF-Analyse der Frühphase (Gruppenunterschied:  $p=0,087$ , Unterschied der Messungen:  $p=0,079$ , Interaktion:  $p=0,62$ ) noch die der Spätphase (Gruppenunterschied:  $p=0,41$ , Unterschied der Messungen:  $p=0,21$ , Interaktion:

$p=0,27$ ) fielen bezüglich der ICAM-2-mRNA-Expression statistisch signifikant aus (siehe Tabelle 12). Der ungepaarte t-Test erbrachte einen statistisch signifikanten Wert ( $p=0,023$ ) für die ICAM-2-mRNA-Expression bei 24 Stunden (siehe Tabelle 7). Allerdings könnte der Ausfall des Signals einem technischen Artefakt entsprechen.

### **3.1.4 ICAM-2-mRNA-Expression in *B. burgdorferi* Geho-exponierten Synovialzellen**

Die ICAM-2-mRNA-Expression in der Synovialzellkontrolle lag bei 7 %. Die ICAM-2-mRNA-Expression der BSK-pH-Kontrolle verlief wellenförmigen um diesen 7 %-Wert. Den gleichen Verlauf allerdings mit einer stärkeren ICAM-2-mRNA-Expression zeigten die *B. burgdorferi* Geho-exponierten Zellen (Maximalwert: 16 % bei 72 Stunden) (siehe Abbildung 10).

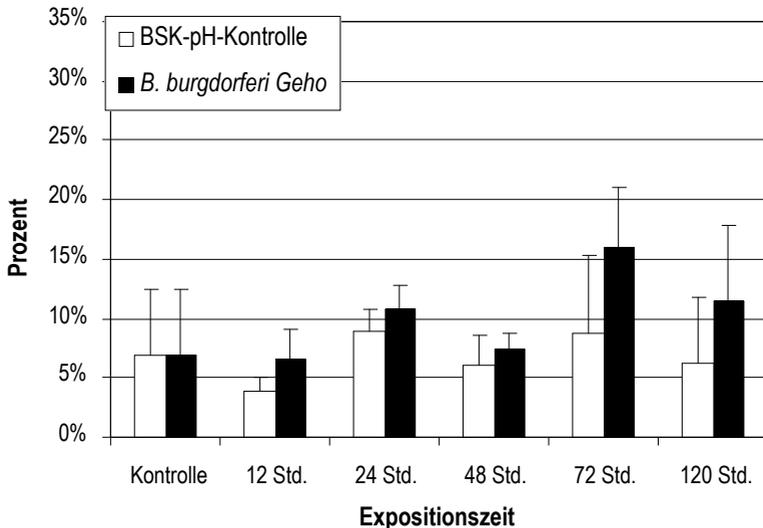


Abbildung 10: ICAM-2-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit exponierten Synovialzellen (*B. burgdorferi* Geho).

Die ICAM-2-mRNA-Expression in Synovialzellen wurde durch semiquantitative RT-PCR nach 12 Std., 24 Std., 72 Std. und 120 Std. festgestellt. Der Mittelwert aus drei gleich aufgebauten Versuchsreihen ist hier dargestellt.

*B. burgdorferi* Geho = *B. burgdorferi* Geho-exponierte Synovialzellen, BSK-pH-Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen unter identischen Versuchsbedingungen, ICAM-2 = intercellular adhesion molecule 2, Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen ohne Zusatz von Medium, RT-PCR = Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion, Std. = Stunden.

Nach Auswertung mit der ZF-Analyse über die gesamte Zeit fanden wir keinen signifikanten Gruppenunterschied ( $p=0,055$ ). Im Lauf der Zeit jedoch änderte sich die ICAM-2-mRNA-Expression signifikant ( $p=0,023$ ). Die Interaktion war nicht signifikant ( $p=0,7$ ). In der Frühphase fiel der Gruppenunterschied für die ICAM-2-mRNA-Expression signifikant aus ( $p=0,0051$ ), im Gegensatz zu den beiden

übrigen Parametern (Unterschied der Messungen:  $p=0,061$ , Interaktion:  $p=0,89$ ). In der Spätphase der ZF-Analyse ging der signifikante Gruppenunterschiede der Frühphase verloren ( $p=0,21$ ). Auch der Unterschied der Messungen ( $p=0,07$ ) und die Interaktion ( $p=0,63$ ) blieben über dem Signifikanzniveau (siehe Tabelle 7).

ICAM-2-mRNA-Expression	Gruppenunterschied		Unterschied der Messungen		Interaktion	
	Stamm	<i>B31</i>	<i>Geho</i>	<i>B31</i>	<i>Geho</i>	<i>B31</i>
p (ZF) (gesamt)	0,16	0,055	0,059	0,023*	0,46	0,7
p (ZF) (Frühphase)	0,087	0,0051**	0,079	0,061	0,62	0,89
p (ZF) (Spätphase)	0,41	0,21	0,21	0,07	0,27	0,63

Tabelle 7: Zweifaktorielle Varianzanalyse (ZF-Analyse) der ICAM-2-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit *B. burgdorferi* B31- und *Geho*-exponierten Synovialzellen. Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet ( $p<0,05^*$ ,  $p<0,01^{**}$ ,  $p<0,001^{***}$ ). ICAM-2 = intercellular adhesion molecule2, Frühphase = 12 bis 48 Stunden, Spätphase = 72 bis 120 Stunden Expositionszeit.

Der ungepaarte t-Test der ICAM-2-mRNA-Expression war nicht signifikant (siehe Tabelle 8).

<b>ICAM-2-mRNA-Expression</b>	12 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.	120 Std.
p (t) <i>B31</i>	0,76	0,023 *	0,25	0,13	0,6
p (t) <i>Geho</i>	0,17	0,32	0,37	0,18	0,33

Tabelle 8: Ungepaarter t-Test (t) der ICAM-2-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit *B. burgdorferi B31*- und *Geho*-exponierten Synovialzellen.

Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ). ICAM-2 = intercellular adhesion molecule 2, Std. = Stunden.

### **3.1.5 NCAM-1-mRNA-Expression in *B. burgdorferi B31*-exponierten Synovialzellen**

Als Ausgangswert für NCAM-1 diente die 12 %ige mRNA-Expression der Kontrolle. Die NCAM-1-mRNA-Expression der BSK-pH-Kontrolle bei 24 Stunden war erneut sehr niedrig (0,2 %). Bei den mit *B. burgdorferi B31*-exponierten Zellen lag der 24 Stunden-Wert, nach einem niedrigen 12-Stunden-Wert (1 %), sehr hoch (22 %). Ab dem Messzeitpunkt 48 Stunden zeigten beide Versuchsgruppen eine abnehmende Tendenz der NCAM-1-mRNA-Expression (6 % bei den exponierten Zellen und 4 % bei der BSK-pH-Kontrolle jeweils bei 120 Stunden) (siehe Abbildung 11).

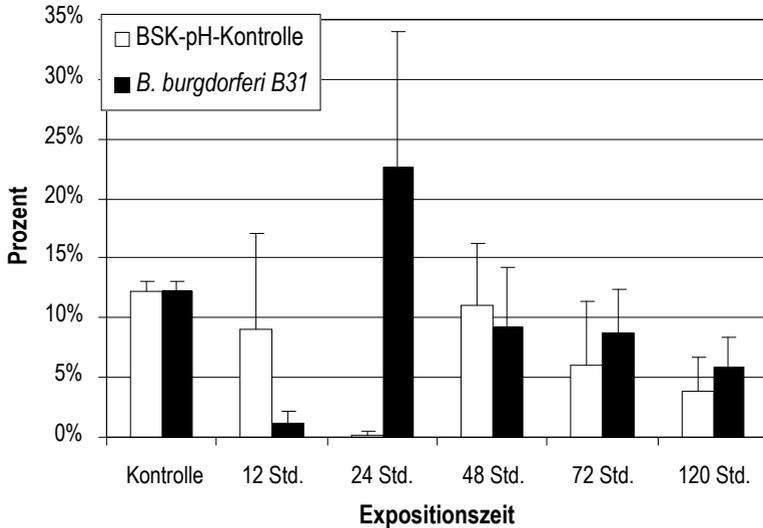


Abbildung 11: NCAM-1-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit exponierten Synovialzellen (*B. burgdorferi* B31).

Die NCAM-1-mRNA-Expression in Synovialzellen wurde durch semiquantitative RT-PCR nach 12 Std., 24 Std., 72 Std. und 120 Std. festgestellt. Der Mittelwert aus drei gleich aufgebauten Versuchsreihen ist hier dargestellt.

*B. burgdorferi* B31 = *B. burgdorferi* B31-exponierte Synovialzellen, BSK-pH-Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen unter identischen Versuchsbedingungen, NCAM-1 = neural cell adhesion molecule 1, Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen ohne Zusatz von Medium, RT-PCR = Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion, Std. = Stunden.

Die Auswertung der NCAM-1-mRNA-Expression mit der ZF-Analyse erbrachte folgendes Ergebnis: Weder der Gruppenunterschied ( $p=0,12$ ) noch der Unterschied über die Zeit ( $p=0,16$ ) verliefen signifikant. Dahingegen fanden wir eine signifikante Interaktion ( $p=0,002$ ). Die genauere Betrachtung getrennt in Früh- und Spätphase zeigte für die Frühphase: Gruppenunterschied  $p=0,22$  und

Unterschied der Messungen:  $p=0,2$ . Der signifikante Wert der Interaktion trat noch deutlicher hervor ( $p=0,0036$ ). In der Spätphase gab es keine Signifikanz (siehe Tabelle 9). Der auffällige 24-Stunden-Wert machte sich auch im ungepaarten t-Test bemerkbar. Die Expression der NCAM-1-mRNA war hier signifikant ( $p=0,029$ ) (siehe Tabelle 10).

### **3.1.6 NCAM-1-mRNA-Expression in *B. burgdorferi* Geho-exponierten Synovialzellen**

Die NCAM-1-mRNA-Expression der Kontrolle zu Beginn lag bei 8 %. Nach 12 Stunden war die NCAM-1-mRNA-Expression der *B. burgdorferi* Geho-exponierten Zellen auf 7 % abgesunken. Danach ließ sich zu allen übrigen Zeitpunkten nur eine äußerst geringe Expression nachweisen. Im Gegensatz dazu war die NCAM-1-mRNA-Expression der BSK-pH-Kontrolle zu jedem Messpunkt hoch (bis 15 % bei 24 Stunden, mit einem Tiefstwert von 5 % bei 12 Stunden) (siehe Abbildung 12).

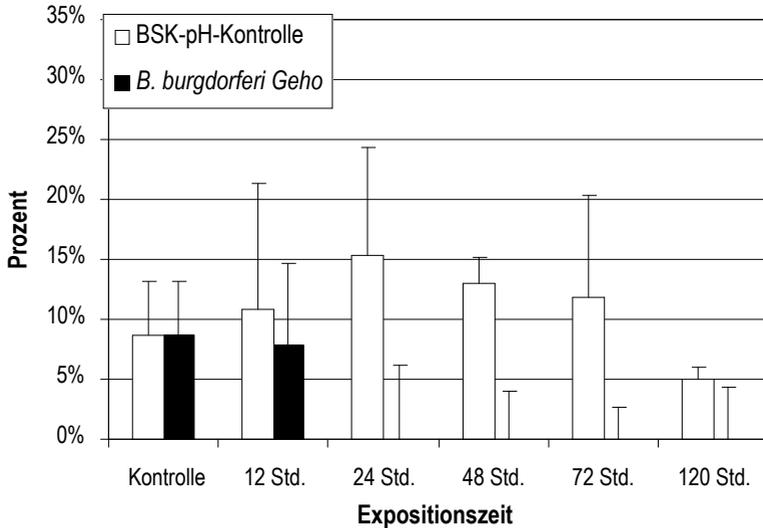


Abbildung 12: NCAM-1-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit exponierten Synovialzellen (*B. burgdorferi* Geho).

Die NCAM-1-mRNA-Expression in Synovialzellen wurde durch semiquantitative RT-PCR nach 12 Std., 24 Std., 72 Std. und 120 Std. festgestellt. Der Mittelwert aus drei gleich aufgebauten Versuchsreihen ist hier dargestellt.

*B. burgdorferi* Geho = *B. burgdorferi* Geho-exponierte Synovialzellen, BSK-pH-Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen unter identischen Versuchsbedingungen, NCAM-1 = neural cell adhesion molecule 1, Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen ohne Zusatz von Medium, RT-PCR = Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion, Std. = Stunden.

Die Auswertung des Gruppenunterschied für die NCAM-1-mRNA-Expression ( $p=0,51$ ) mit der ZF-Analyse war nicht signifikant. Der NCAM-1-Expression im Verlauf über die Zeit ergab einen signifikanten Unterschied ( $p=0,019$ ). Die Interaktion war nicht signifikant ( $p=0,7$ ). In der Frühphase beobachteten wir keine Signifikanz (Gruppenunterschied:  $p=0,81$ , Unterschied über die Zeit:  $p=0,063$ ,

Interaktion:  $p=0,72$ ). Auch die ZF-Analyse der Spätphase zeigte weder einen signifikanten Gruppenunterschied ( $p=0,36$ ) noch eine signifikante Interaktion ( $p=0,22$ ). Der Unterschied der Messungen jedoch war signifikant ( $p=0,013$ ) (siehe Tabelle 9).

NCAM-1-mRNA-Expression	Gruppenunterschied		Unterschied der Messungen		Interaktion	
	<i>B31</i>	<i>Geho</i>	<i>B31</i>	<i>Geho</i>	<i>B31</i>	<i>Geho</i>
p (ZF) (gesamt)	0,12	0,51	0,16	0,019 *	0,002 **	0,7
p (ZF) (Frühphase)	0,22	0,81	0,2	0,063	0,0036 **	0,72
p (ZF) (Spätphase)	0,078	0,36	0,92	0,013 *	0,71	0,22

Tabelle 9: Zweifaktorielle Varianzanalyse (ZF-Analyse) der NCAM-1-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit *B. burgdorferi* *B31*- und *Geho*-exponierten Synovialzellen. Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet ( $p<0,05^*$ ,  $p<0,01^{**}$ ,  $p<0,001^{***}$ ). NCAM-1 = neural cell adhesion molecule 1, Frühphase = 12 bis 48 Stunden, Spätphase = 72 bis 120 Stunden Expositionszeit.

Im ungepaarten t-Test war die NCAM-1-mRNA-Expression bei 48 Stunden signifikant ( $p=0,023$ ) (siehe Tabelle 10).

<b>NCAM-1-mRNA-Expression</b>	12 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.	120 Std.
p (t) <i>B31</i>	0,68	0,14	0,93	0,34	0,72
p (t) <i>Geho</i>	0,68	0,24	0,023 *	0,16	0,8

Tabelle 10: Ungepaarter t-Test (t) der NCAM-1-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit *B. burgdorferi* B31- und *Geho*-exponierten Synovialzellen.

Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ). NCAM-1 = neural cell adhesion molecule 1, Std. = Stunden.

### **3.1.7 VCAM-1-mRNA-Expression in *B. burgdorferi* B31-exponierten Synovialzellen**

Die VCAM-1-mRNA-Expression in der Kontrolle erreichte 7 %. Die *B. burgdorferi* B31-exponierten Zellen exprimierten VCAM-1-mRNA stärker, bis hin zu maximal 17 % bei 48 Stunden. Während der gesamten Zeit blieb die VCAM-1-mRNA-Expression der BSK-pH-Kontrolle unter diesem Wert. Der Tiefpunkt lag erneut bei 24 Stunden (1 %) (siehe Abbildung 13).

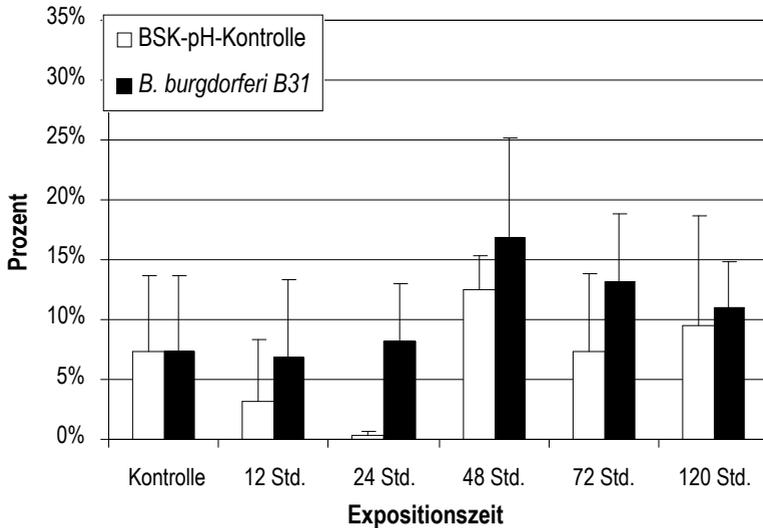


Abbildung 13: VCAM-1-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit exponierten Synovialzellen (*B. burgdorferi* B31).

Die VCAM-1-mRNA-Expression in Synovialzellen wurde durch semiquantitative RT-PCR nach 12 Std., 24 Std., 72 Std. und 120 Std. festgestellt. Der Mittelwert aus drei gleich aufgebauten Versuchsreihen ist hier dargestellt.

*B. burgdorferi* B31 = *B. burgdorferi* B31-exponierte Synovialzellen, BSK-pH-Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen unter identischen Versuchsbedingungen, VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule 1, Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen ohne Zusatz von Medium, RT-PCR = Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion, Std. = Stunden.

Die ZF-Analyse der VCAM-1-mRNA-Expression ergab einen signifikanten Gruppenunterschied ( $p=0,048$ ). Die VCAM-1-mRNA-Expression über die Zeit ( $p=0,08$ ) und die Interaktion ( $p=0,72$ ) zeigten keine Signifikanz. Der signifikante Gruppenunterschied kam noch deutlicher zum Ausdruck bei der Betrachtung der Frühphase (Gruppenunterschied:  $p= 0,008$ ). Auch der Unterschied der Mes-

sungen war signifikant ( $p=0,05$ ), nicht jedoch die Interaktion ( $p=0,77$ ). In der Spätphase fiel keine weitere Signifikanz auf (Gruppenunterschied:  $p=0,27$ , Unterschied der Messungen:  $p=0,39$ , Interaktion:  $p=0,61$ ) (siehe Tabelle 11). Wie schon bei der ICAM-2-mRNA- und NCAM-1-mRNA-Expression bestätigte sich der optische Eindruck im ungepaarten t-Test mit einem signifikanten Unterschied der VCAM-1-mRNA-Expression bei 24 Stunden ( $p=0,041$ ) (siehe Tabelle 12). Allerdings ist der Einbruch der Genexpression bei 24 Stunden pathophysiologisch nicht zu erklären.

### **3.1.8 VCAM-1-mRNA-Expression in *B. burgdorferi* Geho-exponierten Synovialzellen**

Die VCAM-1-mRNA-Expression der Kontrolle betrug 7 %. Diese 7 % erreichte die BSK-pH-Kontrolle zu den Messzeitpunkten 48 Stunden, 72 Stunden und 120 Stunden. Bei 12 Stunden (1 %) und 24 Stunden (4 %) war die VCAM-1-mRNA-Expression geringer. Zu jedem Messzeitpunkt lag die VCAM-1-mRNA-Expression in *B. burgdorferi* Geho-exponierten Zellen höher. Sie stieg von 12 Stunden (4 %) über 24 Stunden (9 %) und 48 Stunden (10 %) bis zum Höchstwert bei 72 Stunden (22 %) an, um danach bei 120 Stunden wieder leicht zu sinken (13 %) (siehe Abbildung 14).

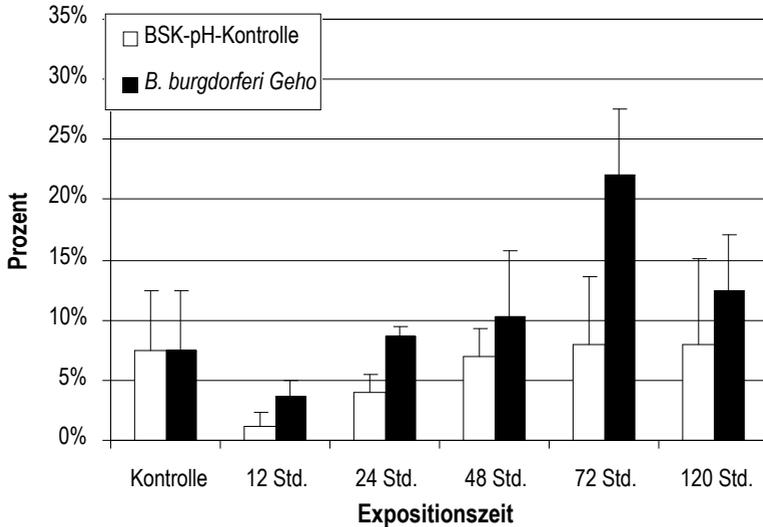


Abbildung 14: VCAM-1-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit exponierten Synovialzellen (*B. burgdorferi* Geho).

Die VCAM-1-mRNA-Expression in Synovialzellen wurde durch semiquantitative RT-PCR nach 12 Std., 24 Std., 72 Std. und 120 Std. festgestellt. Der Mittelwert aus drei gleich aufgebauten Versuchsreihen ist hier dargestellt.

*B. burgdorferi* Geho = *B. burgdorferi* Geho-exponierte Synovialzellen, BSK-pH-Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen unter identischen Versuchsbedingungen, VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule 1, Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen ohne Zusatz von Medium, RT-PCR = Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion, Std. = Stunden.

Deutlich signifikant waren der Gruppenunterschied ( $p=0,001$ ) und der Unterschied der Messungen ( $p=0,0012$ ) in der ZF-Analyse über die gesamte Zeit. Die Interaktion zeigte keine Signifikanz ( $p=0,15$ ). Dass der größte signifikante Unterschied zu Versuchsbeginn festzustellen war, bestätigte das Ergebnis der Frühphase. Auch hier waren der Gruppenunterschied ( $p=0,0048$ ) und der Unterschied der

Messungen ( $p=0,019$ ) signifikant. Die Interaktion ergab:  $p=0,87$ . In der Spätphase war der Gruppenunterschied ( $p=0,17$ ) und die Interaktion ( $p=0,2$ ) nicht signifikant. Der Unterschied der Messungen jedoch verlief statistisch signifikant ( $p=0,013$ ) (siehe Tabelle 11).

VCAM-1-mRNA-Expression	Gruppenunterschied		Unterschied der Messungen		Interaktion	
	Stamm	<i>B31</i>	<i>Geho</i>	<i>B31</i>	<i>Geho</i>	<i>B31</i>
p (ZF) (gesamt)	0,048 *	0,001 **	0,08	0,0012 **	0,72	0,15
p (ZF) (Frühphase)	0,008 **	0,0048 **	0,05 *	0,019 *	0,77	0,87
p (ZF) (Spätphase)	0,27	0,17	0,39	0,013 *	0,61	0,2

Tabelle 11: Zweifaktorielle Varianzanalyse (ZF-Analyse) der VCAM-1-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit *B. burgdorferi* *B31*- und *Geho*-exponierten Synovialzellen. Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet ( $p<0,05^*$ ,  $p<0,01^{**}$ ,  $p<0,001^{***}$ ). VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule 1, Frühphase = 12 bis 48 Stunden, Spätphase = 72 bis 120 Stunden Expositionszeit.

Die VCAM-1-mRNA-Expression im ungepaarten t-Test fiel sowohl bei 24 Stunden ( $p=0,01$ ) als auch bei 72 Stunden ( $p=0,036$ ) signifikant aus (siehe Tabelle 12).

<b>VCAM-1-mRNA-Expression</b>	12 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.	120 Std.
p (t) <i>B31</i>	0,43	0,041*	0,41	0,28	0,8
p (t) <i>Geho</i>	0,065	0,01*	0,37	0,036*	0,38

Tabelle 12: Ungepaarter t-Test (t) der VCAM-1-mRNA-Expression in nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit *B. burgdorferi* B31- und *Geho*-exponierten Synovialzellen.

Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ). VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule 1, Std. = Stunden.

## 3.2 Semi-nested Polymerasekettenreaktion

Eine semi-nested Polymerasekettenreaktion (siehe 2.5) ermöglicht rein qualitative Aussagen über das Vorhandensein spezifischer cDNA.

### 3.2.1 ICAM-3-mRNA-Expression in *B. burgdorferi* B31-exponierten Synovialzellen

Bei der Frage nach einer ICAM-3-mRNA-Expression in exponierten Synovialzellen wurde zunächst eine semiquantitative PCR (siehe 2.4) durchgeführt. Bereits der  $\beta$ -Aktin-Abgleich (siehe 2.4.3) war nicht möglich, da nicht zu jedem Messzeitpunkt  $\beta$ -Aktin-cDNA nachweisbar war. Dies sprach im Vergleich zu obigen Werten für ein technisches Problem der RNA-Gewinnung. Dennoch wurde eine Vervielfältigung der cDNA mittels semi-nested PCR versucht. Sie zeichnet sich durch eine höhere Spezifität aus. So können mögli-

cherweise auch geringere Mengen an ICAM-3 nachgewiesen werden. Bei der Auswertung erwies sich sowohl das Auftreten uncharakteristischer Mehrfachbanden in der Agarose-Gelelektrophorese als auch das erneute Fehlen von Banden zu bestimmten Messzeitpunkten als Problem. Somit war eine stringente Auswertung der Versuche nicht möglich. Prinzipiell war zwar ICAM-3-mRNA nachweisbar, aber ein Zeitverlauf war nicht schlüssig definierbar. Es wurde noch versucht, eine weitere Sensitivitätserhöhung mittels Southern-Blot durchzuführen, was jedoch sowohl bei einer Auflegezeit von 60 Minuten als auch bei einer Auflegezeit von 180 Minuten ein unspezifisches Bandenmuster ergab. Weiterhin war zu bestimmten Messzeitpunkten keine Bande nachweisbar. Wiederum erwiesen sich uncharakteristische Mehrfachbanden als Problem bei der Auswertung. Möglicherweise liegt eine Ursache dafür in einer fehlerhaften RNA-Isolierung und einer fehlerhaften Reversen Transkription. Verschiedene Primerpaare waren versucht worden.

### **3.3 FACScan Durchflusszytometrie**

Auf Proteinebene kann mittels FACScan Durchflusszytometrie (siehe 2.7) eine Expression von Eiweissmolekülen auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, gemessen als mittlere Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity, MFI). Wir untersuchten die ICAM-1-Oberflächenexpression auf exponierten Synovialzellen (*B. burgdorferi*) im Vergleich mit nicht exponierten Synovialzellen (BSK-

pH-Kontrolle) wie unter 2 beschrieben. Als Ausgangswert dienten nicht exponierte Synovialzellen ohne Zusatz eines Mediums, als Kontrolle bezeichnet. In den folgenden Abbildungen wurde die Standardabweichung vom Mittelwert als Strichbalken nach oben eingezeichnet. Um dem sich abzeichnenden Trend einer Frühphase sowie einer Spätphase des Versuchs gerecht zu werden, wurde die ZF-Analyse auch hier getrennt nach den Zeiten 12 Stunden bis 48 Stunden (Frühphase) und 72 Stunden bis 120 Stunden (Spätphase) durchgeführt.

### **3.3.1 ICAM-1-Oberflächenexpression auf *B. burgdorferi* B31-exponierten Synovialzellen**

Um die ICAM-1-Oberflächenexpression auf *B. burgdorferi* B31-exponierten Synovialzellen zu bestimmen, wurde der Expositionsversuch sechsmal durchgeführt. Vor der eigentlichen Antikörperfärbung wurden die Synovialzellen pur, d.h. ohne Antikörperfärbung, mit dem FACScan Durchflusszytometer ausgewertet, um eine Aussage über ihre Eigenfluoreszenz treffen zu können (siehe 2.7). Dabei zeigten die Synovialzellen eine geringe Eigenfluoreszenz (MFI=4-16). Auch nach Isotyp-Färbung, die unspezifische Bindungen abdeckt, war die Eigenfluoreszenz gering (MFI=150). Dagegen fiel die ICAM-1-Oberflächenexpression der Kontrolle nach Antikörperfärbung deutlich höher aus (MFI=700). Die ICAM-1-Oberflächenexpression sowohl der BSK-pH-Kontrolle als auch der

mit *B. burgdorferi* B31-exponierten Synovialzellen lag ähnlich hoch (MFI=750 bei 12 Stunden). Über 24 Stunden und 48 Stunden nahm die ICAM-1-Oberflächenexpression bei beiden Versuchsgruppen gleichsinnig ab (MFI=400). Danach beobachteten wir ein gegenläufiges Verhalten: Die ICAM-1-Oberflächenexpression der exponierten Synovialzellen zeigte eine starke Abnahme über 72 Stunden bis zu 120 Stunden (MFI=200 bei 120 Stunden), wohingegen die ICAM-1-Oberflächenexpression der BSK-pH-Kontrolle zunahm (MFI=750 bei 120 Stunden) (siehe Abbildung 15).

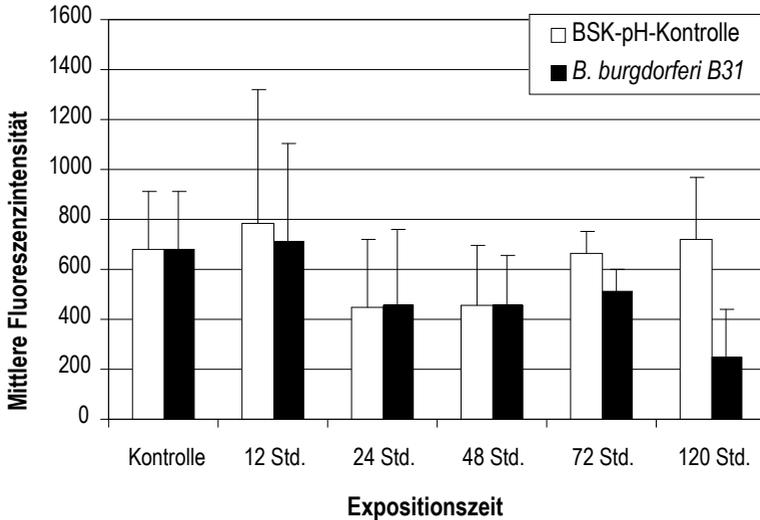


Abbildung 15: ICAM-1-Oberflächenexpression auf nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit exponierten Synovialzellen (*B. burgdorferi* B31).

Die ICAM-1-Oberflächenexpression auf Synovialzellen wurde mittels Durchflusszytometrie nach 12 Std., 24 Std., 72 Std. und 120 Std. festgestellt. Der Mittelwert aus sechs gleich aufgebauten Versuchsreihen ist hier dargestellt.

*B. burgdorferi* B31 = *B. burgdorferi* B31-exponierte Synovialzellen, BSK-pH-Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen unter identischen Versuchsbedingungen, ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1, Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen ohne Zusatz eines Mediums, Std. = Stunden.

Die Auswertung mit der ZF-Analyse über die gesamte Zeit ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der BSK-pH-Kontrolle und den *B. burgdorferi* B31-exponierten Synovialzellen (Gruppenunterschied:  $p=0,073$ , Unterschied der Messungen:  $p=0,068$ , Interaktion  $p=0,25$ ). Die Ergebnisse der ZF-Analyse der Frühphase ergaben weder einen statistisch signifikanten Gruppenunterschied ( $p=0,071$ ), noch einen statistisch signifikanten Unterschied der

Messungen ( $p=0,85$ ) oder eine statistisch signifikante Interaktion ( $p=0,96$ ). Dagegen fiel in der Spätphase der ZF-Analyse ein statistisch signifikanter Unterschied sowohl der Interaktion ( $p=0,016$ ) als auch im Zeitverlauf ( $p=0,0023$ ) auf. Das bedeutet, dass sich die ICAM-1-Oberflächenexpression im Lauf der Zeit deutlich änderte und dass es einen bedeutenden Unterschied in der Säulenhöhe gab. Der Gruppenunterschied lag bei  $p=0,21$  (siehe Tabelle 13).

<b>ICAM-1-Oberflächenexpression</b>	Gruppenunterschied	Unterschied der Messungen	Interaktion
p (ZF) (gesamt)	0,073	0,068	0,25
p (ZF) (Frühphase)	0,071	0,85	0,96
p (ZF) (Spätphase)	0,21	0,0023 **	0,016 *

Tabelle 13: Zweifaktorielle Varianzanalyse (ZF-Analyse) der ICAM-1-Oberflächenexpression auf nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit *B. burgdorferi* B31-exponierten Synovialzellen. Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet ( $p<0,05^*$ ,  $p<0,01^{**}$ ,  $p<0,001^{***}$ ). ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1, Frühphase = 12 bis 48 Stunden, Spätphase = 72 bis 120 Stunden Expositionszeit.

Der durchgeführte t-Test, der die ICAM-1-Oberflächenexpression von exponierten Synovialzellen und nicht exponierten Kontrollzellen getrennt nach Zeiten untersucht, bestätigte die Ergebnisse der ZF-Analyse. Während die Werte der ersten Messzeitpunkte statistisch

nicht signifikant waren, zeigte der t-Test Signifikanz bei 72 Stunden ( $p=0,015$ ) und bei 120 Stunden ( $p=0,0043$ ) (siehe Tabelle 14).

<b>ICAM-1-Oberflächenexpression</b>	12 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.	120 Std.
p (t)	0,82	0,97	0,97	0,015*	0,0043**

Tabelle 14: Ungepaarter t-Test (t) der ICAM-1-Oberflächenexpression auf nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit *B. burgdorferi* B31-exponierten Synovialzellen.

Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet ( $p<0,05^*$ ,  $p<0,01^{**}$ ,  $p<0,001^{***}$ ). ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1, Std. = Stunden.

### **3.3.2 Prüfung der Hypothese: Die ICAM-1-Oberflächenexpression auf Synovialzellen vermindert sich signifikant nach Exposition mit *B. burgdorferi* B31**

In unserem Labor ergab 1997 eine gleich aufgebaute Versuchsreihe (183) nach Auswertung mit der ZF-Analyse für den Zeitraum 0 Stunden bis 120 Stunden bezüglich der ICAM-1-Oberflächenexpression auf *B. burgdorferi* B31-exponierten Synovialzellen sowohl einen signifikanten Unterschied der Messungen ( $p=0,00001$ ) als auch einen signifikanten Gruppenunterschied ( $p=0,00033$ ), der über den Zeitverlauf erhalten blieb (Formunterschied:  $p=0,83$ ). So stellten wir folgende Hypothese: Die ICAM-1-Oberflächenexpression auf Synovialzellen vermindert sich signifikant nach Exposition mit *B. burgdorferi* B31. Um das zu überprüfen, wurde der Expositionsversuch sechsmal durchgeführt. Da die Messungen aus den

Versuchsreihen keine Normalverteilung zeigten, wurde eine Auswertung mit der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis durchgeführt. Hiermit wurde die Hypothese bewiesen. Die ICAM-1-Oberflächenexpression der Synovialzellen verminderte sich signifikant ( $p=0,046$ ) nach Exposition mit *B. burgdorferi* B31 (siehe Tabelle 15).

Zeit (Stunden)	Mittelwert	Streuung	p (R-Analyse)
0	682,383	226,2	0,046*
12	711,483	393,9	
24	455,250	307,4	
48	453,017	203,2	
72	510,2	93,7	
120	247,5	192,8	
<b>gesamt</b>	509,972	283,5	

Tabelle 15: Rangvarianzanalyse (R-Analyse) nach Kruskal und Wallis. Beweis der Hypothese:

Die ICAM-1-Oberflächenexpression auf Synovialzellen vermindert sich signifikant nach Exposition mit *B. burgdorferi* B31.

Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet ( $p<0,05^*$ ,  $p<0,01^{**}$ ,  $p<0,001^{***}$ ).

### **3.3.3 ICAM-1-Oberflächenexpression auf *B. burgdorferi* Geho-exponierten Synovialzellen**

Um die ICAM-1-Oberflächenexpression auf *B. burgdorferi* Geho-exponierten Synovialzellen zu untersuchen, wurde der Expositionsversuch dreimal durchgeführt. Dabei zeigte die ICAM-1-Oberflächenexpression auf *B. burgdorferi* Geho-exponierten Synovialzellen die gleiche Tendenz wie die des Stammes *B. burgdorferi* B31. Wiederum war die Eigenfluoreszenz der ungefärbten Synovialzellen gering (mit MFI=4,2 bei 24 Stunden bis zu MFI=8,1 bei 120 Stunden). Auch die Isotyp-Färbung wies eine niedrige MFI (MFI=180) auf. Als Ausgangswert diente die ICAM-1-Oberflächenexpression der Kontrolle (MFI=800). Nach 12 Stunden fanden wir sowohl bei der BSK-pH-Kontrolle (MFI=1110) als auch bei den mit *B. burgdorferi* Geho-exponierten Zellen (MFI=1280) eine stärkere ICAM-1-Oberflächenexpression. Bereits nach 24 Stunden ging die Expression beider Versuchsgruppen wieder zurück (MFI=400), so auch bei 48 und 72 Stunden. Bei 120 Stunden verlief die ICAM-1-Oberflächenexpression der beiden Versuchsgruppen gegenläufig: sie stieg bei der BSK-pH-Kontrolle (MFI=500), die Expression der exponierten Zellen dagegen sank noch weiter (MFI=300) (siehe Abbildung 16).

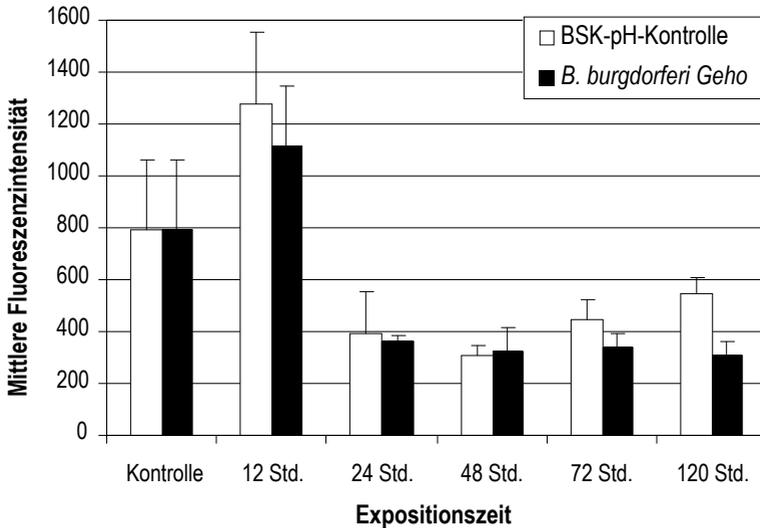


Abbildung 16: ICAM-1-Oberflächenexpression auf nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit exponierten Synovialzellen (*B. burgdorferi* Geho).

Die ICAM-1-Oberflächenexpression auf Synovialzellen wurde mittels Durchflusszytometrie nach 12 Std., 24 Std., 72 Std. und 120 Std. festgestellt. Der Mittelwert aus drei gleich aufgebauten Versuchsreihen ist hier dargestellt.

*B. burgdorferi* Geho = *B. burgdorferi* Geho-exponierte Synovialzellen, BSK-pH-Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen unter identischen Versuchsbedingungen, ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1, Kontrolle = nicht exponierte Synovialzellen ohne Zusatz von Medium, Std. = Stunden.

Die Auswertung mit der ZF-Analyse über die gesamte Zeit erbrachte einen signifikanten Gruppenunterschied ( $p=0,000005$ ). Auch der Unterschied der Messungen war signifikant ( $p=0,047$ ). Die Interaktion ergab:  $p=0,53$ . Die Unterteilung in Frühphase und Spätphase verdeutlichte die Unterschiede noch weiter. So zeigte die ZF-Analyse der Frühphase einen signifikanten Gruppenunterschied ( $p=0,000005$ ). Für den Zeitverlauf ( $p=0,47$ ) und die Interaktion

( $p=0,65$ ) fanden wir keinen signifikanten Unterschied. Betrachtet man die Spätphase des Versuchs, dann war neben dem Gruppenunterschied ( $p=0,028$ ) und dem Unterschied der Messungen ( $p=0,0041$ ) auch die Interaktion ( $p=0,02$ ) signifikant (siehe Tabelle 16).

<b>ICAM-1-Oberflächen-expression</b>	Gruppenunterschied	Unterschied der Messungen	Interaktion
p (ZF) (gesamt)	0,000005 ***	0,047 *	0,53
p (ZF) (Frühphase)	0,000005 ***	0,47	0,65
p (ZF) (Spätphase)	0,028 *	0,0041 **	0,02 *

Tabelle 16: Zweifaktorielle Varianzanalyse (ZF-Analyse) der ICAM-1-Oberflächenexpression auf nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit *B. burgdorferi* Geho-exponierten Synovialzellen. Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet ( $p<0,05^*$ ,  $p<0,01^{**}$ ,  $p<0,001^{***}$ ). ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1, Frühphase = 12 bis 48 Stunden, Spätphase = 72 bis 120 Stunden Expositionszeit.

Der ungepaarte t-Test zeigte bei 120 Stunden statistische Signifikanz ( $p=0,006$ ) (siehe Tabelle 17).

<b>ICAM-1-Oberflächenexpression</b>	12 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.	120 Std.
p (t)	0,46	0,72	0,8	0,11	0,006 **

Tabelle 17: Ungepaarter t-Test (t) der ICAM-1-Oberflächenexpression auf nicht exponierten Synovialzellen (BSK-pH-Kontrolle) im Vergleich mit *B. burgdorferi* G<sub>h</sub>o-exponierten Synovialzellen. Signifikante p-Werte wurden mit Sternen gekennzeichnet (p<0,05\*, p<0,01\*\*, p<0,001\*\*\*). ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1, Std. = Stunden.

## 4 Diskussion

Adhäsionsmoleküle ermöglichen eine Kommunikation verschiedener Zellen untereinander. Sie werden auf Endothelzellen, Synovialzellen und Leukozyten exprimiert und vermitteln Zell-Zell-Kontakte über Rezeptor-Ligand-Bindungen. Entzündungsmediatoren, hauptsächlich Zytokine, regulieren die Expression der Adhäsionsmoleküle (siehe 1.2.4). Bei lokalen Entzündungsreaktionen, wie bei der Lyme-Arthritis im Kniegelenk, konnten verschiedene Zelltypen nachgewiesen werden: T-Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen, Endothelzellen und Fibroblasten (172, 173). Ein Zusammenspiel zwischen diesen unterschiedlichen Zellen wird erst durch Adhäsionsmoleküle möglich. Diese erleichtern eine Auswanderung der Leukozyten ins Gewebe, sie locken Monozyten und neutrophile Zellen an und bewirken eine Interaktion von Entzündungszellen mit ortsständigen Gewebezellen sowie eine verstärkte Bindung und Aktivierung von T-Zellen (100, 101, 109, 111, 174) (siehe Abbildung 7).

Zur beschriebenen Leukozytenwanderung in das Kniegelenk kommt es erst Monate bis Jahre nach Übertragung der Borrelien durch die Zecke. Zum Zeitpunkt der Diagnose konnte Borrelien-DNA und in wenigen Fällen auch Borrelien aus dem Gewebe oder der Gelenkflüssigkeit isoliert werden (175). Vom Zeitraum zwischen der Übertragung bis zur Diagnose der Lyme-Arthritis gibt es nur wenige Daten. Und obwohl die Regulierung der Adhäsionsmoleküle auf

Endothelzellen und Leukozyten im Detail analysiert wurde, existieren nur wenige Studien über eine Expression von Adhäsionsmolekülen auf Synovialzellen, die mit *B. burgdorferi* exponiert wurden (176).

Ob Adhäsionsmoleküle die frühen Stadien der Borreliose beeinflussen, ist unklar. Deshalb untersuchten wir die Expression der ICAM-1-mRNA, ICAM-2-mRNA, ICAM-3-mRNA, NCAM-1-mRNA und VCAM-1-mRNA sowie die ICAM-1-Oberflächenexpression der Synovialzellen nach Exposition mit zwei unterschiedlichen Stämmen von *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, nämlich *Geho* und *B31*. Unsere Ergebnisse über die Genexpression von ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, NCAM-1 und VCAM-1 in Synovialzellen auf mRNA-Ebene zeigen, dass die Interaktion der Adhäsionsmoleküle in der Pathogenese der Borreliose komplex ist, ein eindeutiges „Muster“ mit statistisch signifikanter Hoch- oder Herunterregulierung der Adhäsionsmoleküle lässt sich jedoch nicht erkennen.

Gewöhnlich wird ICAM-1 auf bestimmten Zellen ständig exprimiert, auf anderen Zellen wird die Expression beispielsweise während einer Entzündung durch Zytokine und Interferone induziert (177). In unseren Expositionsversuchen änderte sich die ICAM-1-mRNA-Expression in Synovialzellen jedoch weder nach Exposition mit *B31* noch nach Exposition mit *Geho* signifikant. Im Gegensatz dazu berichteten *Schaible und Kollegen* über eine signifikante Hochregulierung der ICAM-1-Genexpression auf Blutgefäßen betroffener

Gelenke und Herzmuskelgewebe von *B. burgdorferi*-infizierten Mäusen (178).

Ebenso wird die ICAM-2-Expression gewöhnlich von Entzündungsmediatoren hochreguliert (179). Doch wie schon bei ICAM-1, änderte sich in unseren Versuchen auch die ICAM-2-mRNA-Expression nach Exposition mit *B31* nicht signifikant. Erst nach Exposition mit *Geho* änderte sich die ICAM-2-mRNA-Expression signifikant im Lauf der Expositionszeit. Hier fiel in den ersten 48 Stunden zudem der Unterschied des ICAM-2-mRNA-Gehalts signifikant im Vergleich zu nicht exponierten Synovialzellen aus.

Eine stringente Auswertung der ICAM-3-mRNA-Expression in Synovialzellen war nicht möglich (siehe 3.2.1).

NCAM-1 vermittelt nicht nur Zelladhäsion, sondern ist darüber hinaus auch in die Signaltransduktion involviert (180, 181). Bezüglich der NCAM-1-mRNA-Expression blieb der Unterschied zwischen den *B31*-exponierten Synovialzellen im Vergleich zu nicht exponierten Synovialzellen erhalten, vor allem in den ersten 48 Stunden des Versuchs. Nach Exposition mit *Geho* änderte sich die NCAM-1-mRNA-Expression im Lauf der Expositionszeit, hier jedoch vorrangig in der Spätphase (72 bis 120 Stunden).

Inwieweit diese Ergebnisse für die Situation *in vivo* von Bedeutung sind, müssen weitere Studien zeigen.

VCAM-1 wurde zunächst als ein Zytokin-induzierbares endotheliales Adhäsionsmolekül beschrieben, das jedoch auch auf nicht-

vaskulären Zellen exprimiert wird. In unseren Versuchen unterschieden sich die *B31*-exponierten Synovialzellen in der VCAM-1-mRNA-Expression von den nicht exponierten Synovialzellen. Dieser Unterschied in der VCAM-1-mRNA-Expression blieb über die Dauer der Exposition erhalten, am deutlichsten in den ersten 48 Stunden des Versuchs. Ebenso trat ein Unterschied der VCAM-1-mRNA-Expression bei den *Geho*-exponierten Synovialzellen auf, besonders in den ersten 48 Stunden. Ausserdem änderte sich hier die VCAM-1-mRNA-Expression im Lauf der Expositionszeit noch ausgeprägter und zwar sowohl in der Früh- als auch in der Spätphase des Versuchs. *Koch und Kollegen* sowie *Rice und Kollegen* beschrieben eine Hochregulierung von VCAM-1 auf entzündetem synovialen Gewebe (173, 182). Auch *Schaible und Kollegen* beobachteten eine gesteigerte Expression von VCAM-1, E-Selektin und P-Selektin auf Blutgefäßen betroffener Gelenke und Myokardgewebe immundefizienter (SCID) und immunkompetenter Mäuse nach Infektion mit *B. burgdorferi* (178). In einem weiteren Experiment kultivierte *Sellati* humane Endothelzellen der Nabelvene. Nach Exposition mit *B. burgdorferi* produzierten diese vermehrt VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin. *In vitro* Studien haben ausserdem gezeigt, dass eine VCAM-1-Expression auf Zellen, die mit Lymphozyten interagieren, die Lymphozytenproliferation und Aktivierung erleichtert (183, 184). Bereits bei anderen Infektionskrankheiten, wie zum

Beispiel der Cytomegalievirusinfektion oder Malaria, wurde vermehrt lösliches VCAM-1 gefunden (185, 186).

Die Beobachtungen implizieren, dass eine Änderung der Expression von Adhäsionsmolekülen eine Ausbreitung der Borrelien begünstigen kann (133). Wie die Beispiele der Literatur zeigen, scheint eine verstärkte Genexpression und damit in der Regel auch eine verstärkte Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle nach Infektion einherzugehen mit einer verstärkten Aktivierung und erleichterten Interaktion von Entzündungszellen.

Unsere Ergebnisse der Expositionsversuche *in vitro* deuten an, dass die Immunantwort mit einer Regulierung der Adhäsionsmoleküle nach Infektion mit *B. burgdorferi* und die folgenden Interaktionen der beteiligten Zellen ein komplexer Vorgang sind - ohne eindeutiges, statistisch signifikantes „Muster“ der mRNA-Expression - und zumindest in der frühen Lyme-Arthritis nicht einfach mit gesteigerter Genexpression, gesteigerter Proteinexpression und gesteigerter Entzündungsreaktion zu beantworten sind.

Besonders auffällig in unseren Versuchen ist, dass sich die ICAM-1-Oberflächenexpression nicht parallel zur ICAM-1-mRNA-Expression verhielt. So fand sich kein Unterschied in der ICAM-1-mRNA-Expression von exponierten im Vergleich zu nicht exponierten Synovialzellen, die Oberflächenexpression von ICAM-1 verminderte sich jedoch signifikant nach Exposition mit B31. Auch nach Exposition mit *Geh* war der Unterschied der ICAM-1-Oberflächen-

expression im Vergleich zu nicht exponierten Synovialzellen signifikant und blieb über die Dauer der Exposition erhalten. Ebenso änderte sich im Lauf der Expositionszeit die ICAM-1-Oberflächenexpression der untersuchten Synovialzellen signifikant. Bereits *Tomescu und Kollegen* berichteten, dass das Kaposi Sarkom assoziierte Herpesvirus (KSHV) die ICAM-1-Oberflächenexpression auf infizierten Zellen herunterregulieren kann (187). Die Beobachtung einer Herunterregulierung der ICAM-1-Oberflächenexpression deckt sich auch mit einem bereits veröffentlichten Bericht aus unserem Labor über eine Suppression von Oberflächen-ICAM-1 auf Synovialzellen, die mit *B. burgdorferi in vitro* infiziert wurden (60). Das wiederum könnte zu einer verminderten Auswanderung und Aktivierung von Entzündungszellen und somit zu einem Überlebensvorteil der Borrelien führen.

Der fehlenden Übereinstimmung der ICAM-1-Oberflächenexpression und der ICAM-1-mRNA-Expression könnte der Mechanismus des „alternativen Splicing“ zugrunde liegen. „Alternatives Splicing“ stellt einen weiteren Regulationsmechanismus der Genexpression dar (siehe 1.2.3.3). Das bedeutet, dass aus einer DNA-Sequenz, beziehungsweise derselben prä-mRNA mehrere verschiedene mRNAs und nach deren Translation auch unterschiedliche Polypeptide gebildet werden. Erst beim „Splicing“ entscheidet sich, welche DNA-Sequenzen Introns und welche Exons sind. Änderungen im Bereich der mRNA beeinträchtigen deren Stabilität

und somit auch die Expression des Proteins. So kann die Informationsdichte der DNA deutlich erhöht werden und eine schnelle Anpassung an veränderte Umweltbedingungen wird möglich. Beispielsweise wird die Vielfalt von Antikörpern oder eine Herunterregulierung des T-Zellrezeptors durch „alternatives Splicing“ erklärt (188, 189). Ein weiteres Beispiel für „alternatives Splicing“ sind die Isoformen von Zytokinrezeptoren (190). Sie stellen häufig lösliche Rezeptoren dar, die im Gegensatz zum „Shedding“ ihren hydrophoben Membrananker durch diesen Vorgang verlieren. Dagegen stellt „Shedding“ einen Mechanismus dar, bei dem, durch regulierte proteolytische Abspaltung extrazellulärer Domänen membranständiger Proteine, die Interaktion von verschiedensten Zellen im Organismus mit ihrer Umgebung geregelt wird (191, 192). „Shedding“ wurde für viele Proteine, unter anderem TNF-alpha und Kollagen XVII, dem Transferrinrezeptor sowie Adhäsionsmolekülen wie L-Selektin beschrieben. Meist erfolgt die Abspaltung der Membranproteine in relativ konstantem Verhältnis zur Plasmamembran, wird häufig durch Aktivatoren der Proteinkinase C ausgelöst und kann oft durch Metalloproteinaseinhibitoren blockiert werden. Die Freisetzung von löslichen Faktoren und Zytokinen kann die biologische Aktivität modulieren. Darüber hinaus kann durch „Shedding“ von Transmembranrezeptoren die Fähigkeit der Zellen, bestimmte Liganden zu binden, reguliert werden. Es existieren bereits Berichte über „Shedding“ von E-Selektin auf umbilikalen Gefäßendothelzellen.

Daneben wurde beobachtet, dass es aufgrund der Wirkung proinflammatorischer Zytokine wie IFN-gamma und TNF-alpha und ebenso durch proteolytische Aktivität von extrazellulären Proteinaseasen zum „Shedding“ von ICAM-1 kommen kann (193). Eine Herunterregulierung der ICAM-1-Oberflächenexpression könnte so die ICAM-1-abhängige Adhäsion der Leukozyten an Zielzellen vermindern. Abgespaltenes ICAM-1 wiederum könnte in Wettstreit mit dem Oberflächen-ICAM-1 der Synovialzellen treten und somit zu einer Reduktion effektiv gebundener Entzündungszellen führen (97). Exponierte und infizierte Zellen könnten damit der Immunabwehrreaktion des Wirts entkommen (194).

Eine verminderte Oberflächenexpression von ICAM-1 nach Exposition mit *B31* und *Geho* könnte wie eben beschrieben, die lokale Umgebung so verändern, dass eine Erregerpersistenz in der frühen Lyme-Arthritis möglich wird. Im Gegensatz dazu ist die langfristige Interaktion der Borrelien mit verschiedenen Zelltypen einschließlich Makrophagen, Endothelzellen und Synovialzellen *in vitro* von einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF-alpha, IL-1 beta und IL-6 geprägt. Das wiederum führt zu einer Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle (195). Verschiedene Studien führen dies auf eine direkte Bindung der Borrelien an Endothelzellen und auch an Synovialzellen zurück (65, 196).

Bemerkenswert ist, dass weder eine Exposition mit dem Stamm *B. burgdorferi sensu stricto B31* noch mit dem Stamm *Geho* einen

signifikanten Einfluss auf die ICAM-1-mRNA-Expression in den Synovialzellen hatte. Dagegen differierte die Expression von ICAM-2, NCAM-1 und VCAM-1 zwischen den beiden Stämmen *B31* und *Geho*. Diese Beobachtung stimmt überein mit der Tatsache, dass die einzelnen Borrelien-Stämme eine große Heterogenität in Bezug auf Genotyp und Phänotyp aufweisen. Bei unterschiedlicher geographischer Verteilung der Stämme und Unterschieden in der klinischen Manifestation (siehe 1.1.2) wären Unterschiede in der Pathogenese der einzelnen Borrelien-Stämme nicht verwunderlich.

## 5 Zusammenfassung

Adhäsionsmoleküle spielen unter anderem bei Entzündungsreaktionen und somit auch in der Pathogenese der Borreliose eine wichtige Rolle (siehe 1.2.4). Welche Bedeutung die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, NCAM-1 und VCAM-1 auf Synovialzellen nach Exposition mit den beiden Stämmen *B. burgdorferi sensu stricto B31 (B31)* und *Geho (Geho)* in der frühen Lyme-Arthritis hat, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Mittels semiquantitativer Reverser Transkription-Polymerasekettenreaktion wurde die Genexpression von ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, NCAM-1 und VCAM-1 auf mRNA-Ebene in nicht exponierten Synovialzellen im Vergleich mit *B31*- und *Geho*-exponierten Synovialzellen (bis zu 120 Stunden) *in vitro* bestimmt.

Die ICAM-1-mRNA-Expression in Synovialzellen änderte sich weder nach Exposition mit *B31* noch nach Exposition mit *Geho* signifikant (siehe Abbildung 9 und 10, Tabelle 10 und 11).

Die ICAM-2-mRNA-Expression der *B31*-exponierten Synovialzellen zeigte lediglich im ungepaarten t-Test bei 24 Stunden einen signifikanten Wert ( $p=0,023$ ) (siehe Abbildung 11, Tabelle 12 und 13). Nach Exposition mit *Geho* fiel dagegen ein signifikanter Unterschied der Messungen der ICAM-2-mRNA-Expression ( $p=0,023$ ) sowie ein signifikanter Gruppenunterschied in der Frühphase auf ( $p=0,0051$ ) (siehe Abbildung 12, Tabelle 12 und 13).

Eine stringente Auswertung der ICAM-3-mRNA-Expression in Synovialzellen war nicht möglich (siehe 3.2.1).

Die NCAM-1-mRNA-Expression der *B31*-exponierten Synovialzellen war signifikant in der Interaktion ( $p=0,002$ ), vor allem in der Frühphase ( $p=0,0036$ ) (siehe Abbildung 13, Tabelle 14 und 15). Nach Exposition mit *Geho* zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Messungen der NCAM-1-mRNA-Expression ( $p=0,019$ ), hier jedoch vorrangig in der Spätphase ( $p=0,013$ ). Daneben fiel der 48-Stunden-Wert im ungepaarten t-Test signifikant aus ( $p=0,023$ ) (siehe Abbildung 14, Tabelle 14 und 15).

Bezüglich der VCAM-1-mRNA-Expression in Synovialzellen nach Exposition mit *B31* lies sich ein signifikanter Gruppenunterschied nachweisen ( $p=0,048$ ), besonders in der Frühphase ( $p=0,008$ ). Auch der Unterschied der Messungen in der Frühphase verlief signifikant ( $p=0,05$ ). Im ungepaarten t-Test war der 24-Stunden-Wert signifikant ( $p=0,041$ ) (siehe Abbildung 15, Tabelle 16 und 17). Ein signifikanter Gruppenunterschied der VCAM-1-mRNA-Expression trat auch nach Exposition mit *Geho* auf ( $p$  (gesamt)= $0,001$ ,  $p$  (Frühphase)= $0,0048$ ). Noch ausgeprägter war hier zudem der Unterschied der Messungen ( $p$  (gesamt)= $0,0012$ ,  $p$  (Frühphase)= $0,019$ ,  $p$  (Spätphase)= $0,013$ ). Im ungepaarten t-Test hatte sowohl der 24-Stunden-Wert ( $p=0,01$ ) als auch der 72-Stunden-Wert ( $p=0,036$ ) Signifikanz (siehe Abbildung 16, Tabelle 16 und 17).

Daneben wurde mittels FACScan Durchflusszytometrie die ICAM-1-Proteinexpression auf der Oberfläche nicht exponierter Synovialzellen im Vergleich mit *B31*- und *Geho*-exponierten Synovialzellen untersucht.

Hier zeigte die ICAM-1-Oberflächenexpression der *B31*-exponierten Synovialzellen in der Spätphase sowohl einen signifikanten Unterschied der Messungen ( $p=0,0023$ ), als auch eine signifikante Interaktion ( $p=0,016$ ). Das spiegelte sich im ungepaarten t-Test wieder ( $p=0,015$  bei 72 Stunden und  $p=0,0043$  bei 120 Stunden) (siehe Abbildung 7, Tabelle 5 und 6). Mit der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis wurde die Hypothese bewiesen, dass sich die ICAM-1-Oberflächenexpression auf Synovialzellen signifikant nach Exposition mit *B. burgdorferi B31* vermindert ( $p=0,046$ ) (siehe Abbildung 7, Tabelle 7). Auch nach Exposition mit *Geho* fiel bezüglich der ICAM-1-Oberflächenexpression ein signifikanter Gruppenunterschied ( $p$  (gesamt)= $0,000005$ ,  $p$  (Frühphase)= $0,000005$ ,  $p$  (Spätphase)= $0,028$ ) und ein signifikanter Unterschied der Messungen auf ( $p=0,047$ ), vor allem in der Spätphase ( $p=0,047$ ). Darüber hinaus war die Interaktion der Spätphase signifikant ( $p=0,02$ ). Der ungepaarte t-Test hatte einen signifikanten 120-Stundenwert ( $p=0,006$ ) (siehe Abbildung 8, Tabelle 8 und 9).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Versuche kein eindeutiges, statistisch signifikantes „Muster“ der Genexpression für Adhäsionsmoleküle nach Exposition mit *B. burgdorferi* zeigen. Die

mRNA-Expression änderte sich für ICAM-2, NCAM-1 und VCAM-1, nicht jedoch für ICAM-1. Dieser komplexe Vorgang bedarf weiterer Studien, um einen genauen Regulationsmechanismus zu erforschen. Dahingegen änderte sich die Proteinexpression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 signifikant nach Exposition mit *B. burgdorferi*. Eine Verminderung der ICAM-1-Oberflächenexpression nach Exposition mit *B. burgdorferi* könnte beispielsweise aufgrund eines „Shedding“ des Adhäsionsmoleküls auftreten. Das wiederum könnte zu einer verringerten Anzahl an Immuneffektorzellen im betroffenen Gelenk führen und letztendlich in den frühen Phasen der Lyme-Arthritis auch eine Erregerpersistenz begünstigen. Dabei differierte die Expression der Adhäsionsmoleküle je nach Exposition mit den unterschiedlichen Stämmen *B. burgdorferi sensu stricto* B31 und Geko, so dass die Vermutung nahe liegt, dass verschiedene Borrelien-Stämme Synovialzellen auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen und somit eine unterschiedliche Klinik hervorrufen könnten.

## 6 Verwendete Lösungen, Reagenzien, Materialien und Geräte

### Lösungen und Reagenzien:

Agarose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Anti-ICAM-1-Antikörper (Caltag, Burlingame, CA, USA)

Anti-DIG Oxigenin-AP (Roche, Mannheim, Deutschland)

Antikörper (Isotypkontrolle für ICAM-1, Caltag)

1 x Blockierungslösung (Roche)

Bovines Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

BSK-H-Medium (Sigma-Aldrich)

10 x Buffer (Promega, Madison, WI, USA)

COCl<sup>2</sup>-Lösung (Roche)

CSPD (Roche)

Detektionspuffer (Roche)

Destilliertes Wasser (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

DIG-EASY-HYB (Roche)

DIG-1 1dUTP/ATP Markierungsmix (Roche)

DIG Oligonukleotide Tailing kit (Roche)

DIG Wash and Block Buffer Set (Roche)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (SERVA, Heidelberg, Deutschland)

dNTP 10 mM (Sigma-Aldrich)

DTT 0,1 M (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Ethidiumbromid (1 %) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)  
5 x First-Strand Buffer (Invitrogen)  
HCl 0,25 M (Sigma-Aldrich)  
Hepespuffer (Biochrom AG,)  
Kaninchenserumzusatz (RS) (Sigma-Aldrich)  
Ladder (50 bp oder 123 bp, Invitrogen)  
Loading Buffer (Eppendorf)  
Maleinsäure (Roche)  
MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega, Madison, WI, USA)  
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaOH) 0,5 M (Merck)  
Oligo dt (Promega)  
Oligonukleotide 50 pmol/ul (Roche)  
Phosphate Buffered Saline-(PBS) Puffer (Sigma-Aldrich)  
poly A (Roche)  
poly dA (Roche)  
Primerpaare (β-Aktin, ICAM-1, ICAM-1, ICAM-3, NCAM, VCAM)  
(MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland)  
Reaktionspuffer (Roche)  
RLT-Puffer (Qiagen)  
RNAeasy RNA isolation kit (Qiagen)  
RNAsin (Promega)  
RPMI-Medium mit Glutamin (Invitrogen)  
RQ1 RNase-free DNase (Qiagen, Chatsworth, CA, USA)  
0,5 x, 2 x, 10 x Sodium Citrat-(SSC)-Puffer (Eppendorf)

Superscript II RNase H-RT (Invitrogen)  
Taq DNA Polymerase (Promega)  
Terminaltransferase (Roche)  
0,5 x Tris-Borate-EDTA (TBE) (Eppendorf)  
Trypanblau (Merck)  
Trypsin (0,05 %)/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,02 %)  
(Biochrom AG)  
Waschpuffer (Roche)

### **Materialien und Geräte:**

Concentrator 5301 (Eppendorf)  
Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, Franklin Lakes,  
NJ, USA)  
Einfrüerbox (Nalgene, Rochester, NY, USA)  
Einfrüerröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,  
Deutschland)  
Elektrophoresekommer (Fisher Scientific GmbH, Nidderau,  
Deutschland)  
Elektrophorese-Maschine (Pharmacia Biosystems, Freiburg,  
Deutschland)  
FACS-Röhrchen (Becton Dickinson)  
Falcon-Röhrchen (12 ml, 50 ml) (Greiner Bio-One GmbH)  
Filterpapier (Eppendorf)

Gel Doc 2000 (Biorad, München, Deutschland)  
Gewebekulturschalen (60/15 mm, 94/16 mm) (Greiner Bio-One GmbH)  
Hybridisierungsflasche (Hybaid, Ashford, Middlesex, UK)  
Laminar-air-Sicherheitswerkbank (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA)  
Lichtmikroskop (Hund, Wetzlar-Nauborn, Deutschland)  
Neubauer-Zählkammer (Superior, Marienfeld, Deutschland)  
Nylonmembranen (Biorad)  
Parafilm (American National Can, Menasha, WI, USA)  
Phasenkontrastmikroskop (Leitz, Wetzlar-Nauborn, Deutschland)  
pH-Indikatorstäbchen (Merck)  
Pipetboy accu (Schubert & Weiss GmbH, München, Deutschland)  
Plastikreaktionsgefäße/Cups (Eppendorf)  
Shaking Platform (Hybaid)  
UV-Linker (Hybaid)  
Vakuumblotgerät (Biorad)  
Vakuumtrockner (Binder, Tuttlingen, Deutschland)  
Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) (Greiner Bio-One GmbH)  
Zellkulturschrank (Heraeus Sepatech)  
Zellkulturschrank (Nuaire, Plymouth, Minnesota, USA)  
Zellschaber (Schubert & Weiss)  
Zentrifuge (Eppendorf)  
Zentrifuge (Heraeus Sepatech)

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Strle F, Stantic-Pavlinic M (1996) Lyme Disease in Europe. *N Engl J Med* 334: 803
- 2 Afzelius A (1921) Erythema chronicum migrans. *Acta Derm Venereol*, Stockholm, 2: 120-125
- 3 Rille JH (1898) Acrodermatitis chronica atrophicans. *Arch Dermatol Syph*, Berlin, 45: 423
- 4 Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, Steele FM (1977) Lyme arthritis: An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthr Rheum* 20: 7-17
- 5 Bannwarth A (1944) Zur Klinik und Pathogenese der chronischen lymphozytären Meningitis. *Arch Psych* 117: 161-185 und 682-717
- 6 Logigian EL, Kaplan RF, Steere AC (1990) Chronic neurologic manifestations of Lyme disease. *N Engl J Med* 323: 1438-1444
- 7 Burgdorfer W, Barbour AG (1982) Lyme disease –a tick-borne spirochetosis? *Science* 216: 1317-1319
- 8 Barbour AG (1984) Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med* 57: 521-525
- 9 Benach JL, Bosler EM, Hanrahan JP, Coleman JL, Habicht JS, Bast TF, Cameron DJ, Ziegler JL, Barbour AG, Burgdorfer W, Edelmann R, Kaslow RA (1983) Spirochetes isolated from

- blood of two patients with Lyme disease. *New Engl J Med* 308: 740-742
- 10 Hovind-Hougen K (1984) Ultrastructure of spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* and *Ixodes dammini*. *Yale J Biol Med* 57: 543-548
  - 11 Barbour AG, Hayes SF (1986) Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 50: 381-400
  - 12 Pfister HW, Wilske B, Weber K (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. *Lancet* 343: 1013-1016
  - 13 Norris SJ, Carter CJ, Howell JK, Barbour AG (1992) Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect Immun* 60: 4662-4672
  - 14 Lam TT, Nguyen TP, Montgomery RR, Kantor FS, Fikrig E, Flavell RA (1994) Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect Immun* 62: 290-298
  - 15 Hefty PS, Jolliff SE, Caimano MJ, Wikel SK, Aikins DR (2002) Changes in temporal and spatial patterns of outer surface lipoprotein expression generate population heterogeneity and antigenic diversity in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 70: 3468-3478

- 16 Charon NW, Greenberg EP, Koopman MB, Limberger RJ (1992) Spirochete chemotaxis, motility, and the structure of the spirochetal periplasmic flagella. *Res Microbiol* 143: 597-603
- 17 Luft BJ, Jiang W, Munoz P (1989) Biochemical and immunological characterization of the surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 57: 3637
- 18 Fraser CM, Casjens S, Huang WM (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390: 580-586
- 19 Casjens S, Palmer N, van Vugt R (2000) A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 35: 490-516
- 20 Singh SK, Girschick HJ (2003) Tick-host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases. *Current Science* 85: 1285
- 21 van Dam AP, Kuiper MD, Vos K, Widjojokusumo 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
- 22 Anthonissen FM, De Kesel M, Hoet PP, Bigaignon GH (1994) Evidence for the involvement of different genospecies of Borre-

- lian the clinical outcome of Lyme disease in Belgium. *Res Microbiol* 145: 327-331
- 23 Assous MV, Postic D, Paul G, Nevot P, Baranton G (1993) Western blot analysis of sera from patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12: 261-268
- 24 Strle F, Nadelman RB, Cimperman J (1999) Comparison of culture-confirmed erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in New York State and by *Borellia afzelii* in Slovenia. *Ann Intern Med* 130: 32
- 25 Anderson JF (1989) Epizootiology of *Borrelia* in Ixodes tick vectors and reservoir hosts. *Rev Infect Dis* 11, suppl. 6: 1451-1458
- 26 Walter G, Liebisch A (1980) Untersuchungen zur Biologie und Verbreitung von Zecken in Norddeutschland. *Z Angew Zool* 67: 449-476
- 27 Bergmann J, Liebisch A, Pohlmeier K (1992) Borreliose – zum Vorkommen der einheimischen Borreliose bei Zecken, Wild- und Haustieren in einem niedersächsischen Moor. *J für den Veterinär* 2: 12-15
- 28 Lyme Borreliose 2002 Wilske B, Fingerle V  
<http://pollux.mpk.med.uni-muenchen.de/alpha1/nrz-borrelia/lb/lb-zecke.html>

- 29 Piesman J (1993) Standard system for infecting ticks (Acari: Ixodidae) with the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol* 30: 199-203
- 30 Wilske B, Steinhuber R, Bergmeister H, Fingerle V, Schierz G, Preac-Mursic V, Vanek E, Lorbeer B (1987) Lyme borreliosis in South Germany. Epidemiologic data on the incidence of cases and on the epidemiology of ticks (*Ixodes ricinus*) carrying *Borrelia burgdorferi*. *Dtsch Med Wochenschr* 112: 1730-1736
- 31 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
- 32 Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie, Handbuch 1997, 2. Auflage, Futuramed Verlag München
- 33 Reimer B, Marschang A, Fingerle V, Wilske B, v Sonnenburg F (1999) Prävalenz und Inzidenz der Lyme-Borreliose in Süd- und Ostbayern. Max-von-Pettenkofer Institut für Mikrobiologie, Universität München
- 34 Rothermel H, Hedges TR, Steere AC (2001) Optic neuropathy in children with Lyme disease. *Pediatrics* 108: 477-481
- 35 Killmann H, Lind P, Stanek G (1987) Acute hepatitis in Lyme borreliosis. *Wien Med Wochenschr* 137: 343-346
- 36 Dinerman H, Steere AC (1992) Lyme disease associated with fibromyalgia. *Ann Intern Med* 117: 281-285

- 37 Aberer E, Stanek G, Ertl M, Neumann R (1987) Evidence of spirochetal origin of circumscribed scleroderma (morphea). *Acta Derm Venerol*, Stockholm, 67: 225-23136 Steere AC (1989) Lyme disease. *N Engl J Med* 321: 586-596
- 38 Steere AC (1989) Lyme disease. *N Engl J Med* 321: 586-596
- 39 Steere AC, Malawista SE, Hardin JA (1977) Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: The enlarging clinical spectrum. *Ann Intern Med* 86: 685
- 40 Albrecht S, Hofstadter S, Artsob H, Chaban O, From L (1991) Lymphadenosis benigna cutis resulting from Borrelia infection (Borrelia lymphozytoma). *J Amer Acad Dermatol* 24: 621-625
- 41 Hengge UR, Tannapfel A, Tyring SK, Erbel R, Arendt G, Ruzicka T (2003) Lyme borreliosis. *Lancet Infect Dis* 3: 489-500
- 42 Jonsson L, Stiernstedt G, Thomander L (1987) Tick borne Borrelia infection in patients with Bell's palsy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113: 303-306
- 43 Bianchi G, Rovetta G, Monteforte P, Fumarola D, Trevisan G, Crovto F, Cimmino MA (1990) Articular involvement in European patients with Lyme disease. A report of 32 Italian patients. *Brit J Rheumatol* 29: 178-180
- 44 Asbrink E, Brehmer-Anderson E, Hovmark A (1986) Acrodermatitis chronica atrophicans – A spirochetosis. Clinical and histopathological picture based on 32 patients; course and

- relationship to erythema chronicum migrans Afzelius. *Amer J Dermatopath* 8: 209-219
- 45 Garcia-Monco JC, Benach JL (1997) Mechanisms of injury in Lyme neuroborreliosis. *Semin Neurol* 17: 57-62
- 46 Steere AC, Schoen RT, Taylor E (1987) The clinical evolution of Lyme arthritis. *Ann Intern Med* 107: 725-31
- 47 Lengel-Janssen B, Strauss AF, Steere AC, Kamradt T (1994) The T helper cell response in Lyme arthritis: differential recognition of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A in patients with treatment-resistant or treatment-responsive Lyme arthritis. *J Exp Med* 180: 2069-2078
- 48 Asbrink E, Hovmark A (1991) Comments on the course and classification of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis Suppl* 77: 41-43
- 49 Pavia CS (2003) Current and novel therapies for Lyme disease. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 1003-1016
- 50 Burkot TR, Schriefer ME, Larsen SA (1997) Cross-reactivity to *Borrelia burgdorferi* proteins in serum samples from residents of a tropical country nonendemic for Lyme disease. *J Infect Dis* 175: 466-469
- 51 Schutzer SE, Coyle PK, Dunn JJ, Luft BJ, Brunner M (1994) Early and specific antibody response to OspA in Lyme disease. *J Clin Invest* 94: 454-457

- 52 Coyle PK, Schutzer SE, Belman AL, Krupp LB, Golightly MG (1990) Cerebrospinal fluid immune complexes in patients exposed to *Borrelia burgdorferi*; detection of Borrelia-specific and -nonspecific complexes. *Ann Neurol* 28: 739-744
- 53 Wormser GP, Nadelman RB, Dattwyler RJ (2000) Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. *Clin Infect Dis* 31: 1
- 54 Luger SW, Paparone P, Wormser GP (1995) Comparison of cefuroxime axetil and doxycycline in treatment of patients with early Lyme disease associated with erythema migrans. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 661
- 55 Piesman J, Mather TN, Sinsky R, Spielman A (1987) Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol* 25: 557-558
- 56 Thanassi WT, Schoen RT (2000) The Lyme disease vaccine: Conception, development, and implementation. *Ann Intern Med* 132: 661
- 57 Steere AC, Sikand VK, Meurice F (1998) Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface membrane lipoprotein A with adjuvant. *N Engl J Med* 339: 209
- 58 Schaible U, Wallich R, Kramer MD (1993) Immune sera to individual *Borrelia burgdorferi* isolates or recombinant ospA thereof protect SCID mice against infection with homologous strains

- but only partially or not at all against those of different ospA/ospB genotype. *Vaccine* 11: 1049
- 59 Gross DM, Forsthuber T, Tary-Lehmann M, Etling C, Ito K, Nagy ZA, Field JS, Steere AC, Huber BT (1998) Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis. *Science* 281: 631-632
- 60 Girschick HJ, Meister S, Karch H, Huppertz HI (1999) *Borrelia burgdorferi* downregulates ICAM-1 on human synovial cells *in vitro*. *Cell Adhes Commun* 7: 73-83
- 61 Kriegsmann J, Keyszer GM, Geiler T, Brauer R, Gay RE, Gay S (1995) Expression of vascular cell adhesion molecule-1 mRNA and protein in rheumatoid synovium demonstrated by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Lab Invest* 72: 209-14
- 62 Rittig MG, Häupl T, Burmester GR (1994) Coiling phagocytosis: a way for MHC class I presentation of bacterial antigens? *Int Arch Allergy Immunol* 103: 4-10
- 63 Brodsky FM, Guagliardi LE (1991) The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 9: 707-744
- 64 Hexal *Taschenlexikon Medizin* (2004) 3. Auflage, Urban und Fischer Verlag
- 65 Girschick HJ, Huppertz HI, Russmann H, Krenn V and Karch H (1996) Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells. *Rheumatol Int* 16: 125-132

- 66 Rittig MG, Krause A, Häupl T, Schaible UE, Modolell M, Kramer MD, Lutjen-Drecoll E, Simon MM, Burmester GR (1992) Coiling phagocytosis is the preferential phagocytic mechanism for *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 60: 4205-4212
- 67 Aguero-Rosenfeld M, Nowakowski J, Bittker S (1996) Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients with culture-confirmed erythema migrans. *J Clin Microbiol* 34: 1
- 68 Burmester GR, Daser A, Kamradt T, Krause A, Mitchison NA, Sieper J, Wolf N (1995) Immunology of reactive arthritides. *Annu Rev Immunol* 13: 229-250
- 69 Wikel SK (1996) Immunology of the tick-host interface. The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships, CAB International, Wallingford: 204-231
- 70 Kroemer G, Moreno de Alboran I, Gonzalo JA, Martinez C (1993) Immunoregulation of cytokines. *Crit Rev Immunol* 13: 163-191
- 71 Sigal L (1997) The immunology and potential mechanisms of immunopathogenesis of Lyme disease. *Annu Rev Immunol* 15: 63
- 72 Yssel H, Shanafelt MC, Soderberg C, Schneider PV, Anzola J, Peltz G (1991) *Borrelia burgdorferi* activates T helper type 1-like T cells subsets in Lyme arthritis. *J Exp Med* 174: 593

- 73 Yin Z, Braun J, Neure L (1997) T cell cytokine pattern in the joints of patients with Lyme arthritis and its regulation by cytokines and anticytokines. *Arthritis Rheum* 49: 69
- 74 Ganapamo F, Rutti B, Brossard M (1995) *In vitro* production of interleukin-4 and interferon-gama by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal Ixodes ricinus ticks. *Immunology* 85: 120-124
- 75 Kovar L, Kopecky J, Rihova B (2001) Salivary gland extract from Ixodes ricinus tick polarizes the cytokine profile toward Th2 and suppresses proloferation of T lymphocytes in human PBMC culture. *J Parasitol* 87: 1342-1348
- 76 Guner E (1994) Retention of *B. burgdorferi* pathogenicity and infectivity after multiple passages in a co-culture system. *Experientia* 50: 54
- 77 Habicht GS, Beck G, Benach JL, Coleman JL, Leichtling KL (1985) Lyme disease spirochetes induce human and murine interleucin 1 production. *J Immunol* 134: 3147-3154
- 78 Habicht GS (1992) Cytokines in *Borrelia burgdorferi* infection. *Curr Common Cell Mol Biol* 6: 149-167 in Schatzer SE: Lyme disease: Molecular and immunologic approaches, CSHL Press, New York
- 79 Defosse D, Johnson RC (1992) *In vitro* and *in vivo* induction of tumor necrosis factor alpha by *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 60: 1109

- 80 Beck, G, Benach JL, Habicht GS (1989) Isolation of interleukine 1 from joint fluids of patients with Lyme disease. *J Rheumatol* 16: 800
- 81 Weller M, Stevens A, Sommer N, Wietholter H, Dichgans J (1991) Cerebrospinal fluid interleukins, immunoglobulins and fibronectin in neuroborreliosis. *Arch Neurol* 48: 837-841
- 82 Ma Y, Weis JJ (1993) *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoprotein ospA and ospB possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties. *Infect Immun* 61: 3843
- 83 Kalish R, Leong JM, Steere AC (1995) Early and late antibody responses to full-length and truncated constructs of outer surface protein A of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease. *Infect Immun* 63: 2228
- 84 Fikrig E, Berland R, Chen M, Williams S, Sigal LH, Flavell RA (1993) Serologic response to the *Borrelia burgdorferi* flagellin demonstrates an epitope common to a neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 183-187
- 85 Infante-Duarte C, Horton H, Byrne MC, Kamradt T (2000) Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in T helper (Th) cells. *J Immunol* 165: 6107-6115
- 86 Böcker W, Denk H, Heitz PU: Pathologie, 2. Auflage (2001) Urban und Fischer Verlag
- 87 Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P (1999) Human interleukin-17: A T cell-derived

- proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42: 963-97084
- 88 *Matusevicius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H* (1999) Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5: 101-104
- 89 *Kamradt T* (2000) Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten durch Infektion und Autoimmunität. Habilitationsschrift im Fach Experimentelle Medizin, vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin
- 90 *Kamradt T, Volkmer-Engert R* (2004) Cross-reactivity of T lymphocytes in infection and autoimmunity. *Mol Divers* 8: 271-280
- 91 *Steere AC, Falk B, Drouin EE* (2003) Binding of outer surface protein A and human lymphocyte function-associated antigen 1 peptides to HLA-DR molecules associated with antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 534
- 92 *Ribeiro J, Makoul GT, Levine J* (1985) Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J Exp Med* 161: 332
- 93 *Ribeiro J* (1987) *Ixodes dammini*: Saliva anticomplement activity. *Exo Parasitol* 64: 347
- 94 *Wikel SK* (1999) Tick modulation of host immunity: an important factor of transmission. *Int J Parasitol* 29: 851-859

- 95 Barbour AG, Hayes SF (1986) Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 50: 381-400
- 96 Takayama K, Rothenberg RJ, Barbour AG (1987) Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 55: 2311-2313
- 97 Steere AC (1995) Lyme arthritis: the joint lesion in Lyme borreliosis in the USA. *Ter Arkh* 67: 43-45
- 98 Isaacs R (1994) *Borrelia burgdorferi* binds to epithelial cell proteoglycans. *J Clin Invest* 93: 809
- 99 Leong J, Morrissey PE, Ortega-Barria E (1995) Hemagglutination and proteoglycan binding by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 63: 874
- 100 Kopp P, Schmitt M, Wellensiek H-J, Blobel H (1995) Isolation and characterization of fibronectin binding sites of *Borrelia garinii* N34. *Infect Immun* 63: 3804
- 101 Backenson P, Coleman JL, Benach JL (1995) *Borrelia burgdorferi* shows specificity of binding to glycosphingolipids. *Infect Immun* 63: 2811
- 102 Fuchs H, Wallich R, Simon MM, Kramer MD (1994) The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2594
- 103 Coleman J, Sellati TJ, Testa JE (1995) *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect Immun* 63: 2478

- 104 Coburn J, Barthold SW, Leong JM (1994) Diverse Lyme disease spirochetes bind integrin alpha libeta-3 on human platelets. *Infect Immun* 62: 5559
- 105 Hu L, Perides G, Noring R, Klempner MS (1995) Binding of human plasminogen to *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 63: 3491
- 106 Philipp Mt, Aydintug MK, Bohm RP Jr (1993) Early and early disseminated phases of Lyme disease in the rhesus monkey: a model for infection in humans. *Infect Immun* 61: 3047
- 107 Purser JE, Norris SJ (2000) Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13865
- 108 Pal U, de Silva AM, Montgomery RR, Fish D, Anguita J, Anderson JF (2000) Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J Clin Invest* 106: 561-569
- 109 Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA (1995) Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2909-2913
- 110 Gilmore RD Jr., Piesman J (2000) Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice. *Infect Immun* 68: 411-414

- 111 Barbour AG, Restrepo BI (2000) Antigenic variation in vector-borne pathogens. *Emerg Infect Dis* 6: 449-57
- 112 Kraiczy P, Skerka C, Kirschfink M, Zipfel PF, Brade V (2002) Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: insufficient killing of pathogens by complement and antibody. *Int J Med Microbiol (suppl.)* 291: 141-146
- 113 Kraiczy P, Skerka C, Brade V, Zipfel PF (2001) Further regulation of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 69: 7800-7809
- 114 Kraiczy P, Skerka C, Kirschfink M, Brade V, Zipfel PF (2001) Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconnectin and Factor H. *Eur J Immunol* 31: 1674-1684
- 115 Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ (1997) Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell* 89: 275-285
- 116 Ohnishi J, Piesman J, de Silva AM (2001) Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 670-675
- 117 Balmelli T, Piffaretti JC (1996) Analysis of the genetic polymorphism of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* 46: 167-172

- 118 Singh SK, Girschick HJ (2004) Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Lancet Infect Dis* 4: 575-583
- 119 Margolis N, Samuels DS (1995) Proteins binding to the promoter region of the operon encoding the major outer surface proteins OspA and OspB of *Borrelia burgdorferi*. *Mol Biol Rep* 21:159
- 120 Rosa P, Margolis N (1994) Unique plasmid location and linkage of genes encoding purine biosynthetic enzymes and outer surface protein C in *Borrelia burgdorferi*. *Advances in Lyme Borreliosis Research*, Cevenini R, Sambri V, Laplace M, Societa Editrice Esculapio, Bologna, Italy
- 121 El-Hage N, Stevenson B (2002) Simultaneous co-expression of *Borrelia burgdorferi* erp proteins occurs through a specific, erp locus-directed regulatory mechanism. *J Bacteriol* 184: 4536-4543
- 122 Löffler G (1994) Funktionelle Biochemie. Eine Einführung in die medizinische Biochemie. 2. Auflage, Springer-Verlag
- 123 Stevenson B, Babb K (2002) LuxS-mediated quorum sensing in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Infect Immun* 70: 4099-4105
- 124 Taga ME, Bassler BL (2003) Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14549-14554

- 125 Stevenson B, Schwan TG, Rosa PA (1995) Temperature-sensitive differential expression of antigens in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 63: 4535
- 126 Revel AT, Talaat AM, Norgard MV (2002) DNA microarray analysis of differential gene expression in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1562-1567
- 127 Wang XG, Lin B, Kidder JM, Telford S, Hu LT (2002) Effects of environmental changes on expression of oligopeptide permease (opp) genes of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 184: 6198-6206
- 128 Shoberg R, Thomas DD (1995) *Borrelia burgdorferi* vesicle production occurs via a mechanism independent of immunoglobulin M involvement. *Infect Immun* 63: 4857
- 129 Alban PS, Johnson PW, Nelson DR (2000) Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology* 146: 119-127
- 130 Shoberg R, Thomas DD (1993) Specific adherence of *Borrelia burgdorferi* extracellular vesicles to human endothelial cells in culture. *Infect Immun* 61: 3892
- 131 Kamradt T, Krause A, Burmester GR (1995) A role for T-cells in the pathogenesis of treatment-resistant Lyme arthritis. *Mol Med* 1: 486-490

- 132 Montgomery RR, Nathanson MH, Malawista SE (1993) The fate of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, in mouse macrophages. Destruction, survival, recovery. *J Immunol* 150: 909-915
- 133 Nordstrand A, Barbour AG, Bergstrom S (2000) *Borrelia* pathogenesis research in the post-genomic and post-vaccine era. *Curr Opin Microbiol* 3: 86-92
- 134 Dorward DW, Fischer ER, Brooks DM (1997) Invasion and cytopathic killing of human lymphocytes by spirochetes causing Lyme disease. *Clin Infect Dis* 25: 52-58
- 135 Pachner AR, Batsa J, Delaney E, Hulinska D (1995) Localisation of *Borrelia burgdorferi* in murine Lyme borreliosis by electron microscopy. *Am J Trop Med Hyg* 52: 128-133
- 136 Ma Y, Sturrock A, Weis JJ (1991) Intracellular location of *Borrelia burgdorferi* within human endothelial cell. *Infect Immunol* 59: 671-678
- 137 Georgilis K, Peacocke M and Klempner MS (1992) Fibroblasts protect the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from ceftriaxone *in vitro*. *J Infect Dis* 166: 440-444
- 138 Hulinska D, Jirous J, Valesova M, Herzogova J (1989) Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi* in tissues of patients with Lyme disease. *J Basic Microbiol* 29: 73-83

- 139 Nadelman RB, Pavia CS, Magnarelli LA, Wormser GP (1990) Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the blood of seven patients with Lyme disease. *Am J Med* 88: 21-26
- 140 Nocton JJ, Dressler F, Rutledge BJ, Rys PN, Persing DH, Steere AC (1994) Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *N Engl J Med* 330: 229-234
- 141 Preac-Mursic V, Weber K, Pfister HW, Wilske B, Gross B, Baumann A, Procop (1989) Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. *Infection* 17: 335-339
- 142 Weber K, Preac-Mursic V, Neubert U, Thurmayr R, Herzer P, Wilske B, Schlerz G, Marget W (1988) Antibiotic therapy of early Lyme borreliosis and acrodermatitis chronica atrophicans. *Ann N Y Acad Sci* 539: 324-345
- 143 Chary-Valckenaere I, Jaulhac B, Champigneulle J, Piemont Y, Mainard D and Pourel J (1998) Ultrastructural demonstration of intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* in Lyme arthritis. *Br J Rheumatol* 37: 468-470
- 144 Dejmkova H, Hulinska D, Tegzova D, Pavelka K, Gatterova J, Vavric P (2002) Seronegative Lyme arthritis caused by *Borrelia garinii*. *Clin Rheumatol* 21: 330-334
- 145 Franz JK, Fritze O, Rittig M (2001) Insights from a novel three-dimensional *in vitro* model of Lyme arthritis: standardized

- analysis of cellular and molecular interactions between *Borrelia burgdorferi* and synovial explants and fibroblasts. *Arthritis Rheum* 44: 151-162
- 146 *Albelda SM* (1993) Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 68: 4-17
- 147 *Janeway Travers*: Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. Blackwell Scientific Publication
- 148 *Cronstein BN* (1994) Adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 6: 300-304
- 149 *Larson RS and Springer TA* (1990) Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 114: 181-217
- 150 *Gerritsen ME, Kelley KA, Ligon G, Perry CA, Shen CP, Szczepanski A and Carley WW* (1993) Regulation of the expression of intercellular adhesion molecule 1 in cultured human endothelial cells derived from rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 36: 593-602
- 151 *Duray PH* (1989) Clinical pathologic correlations of Lyme disease. *Rev Infect Dis* 11 Suppl 6: 1487-1493
- 152 *Cicuttini FM, Martin M, Boyd AW* (1994) Cytokine induction of adhesion molecules on synovial typ B cells. *J Rheumatol* 21: 406-412

- 153 Shingu M, Hashimoto M, Ezaki I, Nobunaga M (1994) Effect of cytokine-induced soluble ICAM-1 from human synovial cells on synovial cell-lymphocyte adhesion. *Clin Exp Immunol* 98: 46-51
- 154 Wicks IP, Leizer T, Wawryk SO, Novotny JR, Hamilton J, Vittit G, Boyd AW (1992) The effect of cytokines on the expression of MAC antigens and ICAM-1 by normal and transformed synoviocytes. *Autoimmunity* 12: 13-19
- 155 Sellati TJ, Burns MJ, Ficazzola MA, Furie MB (1995) *Borrelia burgdorferi* upregulates expression of adhesion molecules on endothelial cells and promotes transendothelial migration of neutrophils *in vitro*. *Infect Immun* 63: 4439-4447
- 156 Comstock LE, Thomas DD (1989) Penetration of endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 57: 1626-1628
- 157 Staunton DE, Marlin ST, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA (1988) Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52: 925-933
- 158 Smith ME, Thomas JA (1990) Cellular expression of lymphocyte function associated antigens and the intercellular adhesion molecule-1 in normal tissue. *J Clin Pathol* 43: 893-900
- 159 Makgoba MW, Sanders ME, Ginther-Luce GE, Gugel EA, Dustin ML, Springer TA, Shaw S (1988) Functional evidence that intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for LFA-

- 1 dependent adhesion in T cell mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 18: 637-640
- 160 Springer TA (1990) Adhesion receptors in the immune system. *Nature* 346: 425-434
- 161 Dougherty GJ, Murdoch S, Hogg N (1988) The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the generation of an immune response. *Eur J Immunol* 18: 35-39
- 162 Tohma S, Hirohata S, Lipsky PE (1991) The role of CD11a/CD18-CD54 interactions in human T cell-dependent B cell activation. *J Immunol* 146: 492-499
- 163 Shaw S, Luce GS (1987) The lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 and CD2/LFA-3 pathways of antigen-independent human T cell adhesion. *J Immunol* 139: 1037-1045
- 164 van Senter GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S (1990) The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 144: 4579-4586
- 165 Staunton DE, Dustin ML and Springer TA (1989) Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339: 61-64
- 166 Panicker AK, Buhusi M, Thelen K, Maness PF (2003) Cellular signalling mechanisms of neural cell adhesion molecules. *Front Biosci* 8: 900-911

- 167 Povlsen GK, Ditlevsen DK, Berezin V and Bock E (2003) Intracellular signaling by the neural cell adhesion molecule. *Neurochem Res* 28: 127-141
- 168 Baldwin TJ, Fazeli MS, Doherty P, Walsh FS (1996) Elucidation of molecular actions of NCAM and structurally related cell adhesion molecules. *J Cell Biochem* 61: 502-513
- 169 Madsujama T, Kitani A (1996) The role of VCAM-1 in the pathogenesis of rheumatoid synovitis. *Hum Cell* 9: 187-191
- 170 Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME and Lobb RR (1990) VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60: 577-584
- 171 Singh SK, Baar V, Morbach H, Girschick HJ (2005) Expression of ICAM-1, ICAM-2, NCAM-1 and VCAM-1 by human synovial cells exposed to *Borrelia burgdorferi* in vitro. *Rheumatol Int* 24: 1-10
- 172 Lindsley HB, Smith DD, Davis LS, Koch AE, Lipsky PE (1992) Regulation of the expression of adhesion molecules by human synoviocytes. *Semin Arthritis Rheum* 21: 330-334
- 173 Koch AE, Burrow JC, Haines GK, Carlos TM, Harlan JM, Leibovich SJ (1991) Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues. *Lab Invest* 64: 313-320

- 174 Albelda SM, Buck CA (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J* 4: 2868-2880
- 175 Rawlings JA, Fournier PV and Teltow GJ (1987) Isolation of *Borrelia* spirochetes from patients in Texas. *J Clin Microbiol* 25: 1148-1150
- 176 Singh SK, Morbach H, Nanki T, Faber C, Baar V, Wirsing A and Girschick HJ (2004) Differential expression of matrix metalloproteinases and cyclooxygenases in synovial cells infected with different *Borrelia burgdorferi* isolates. *Inflamm Res* 53: 689-696
- 177 Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA (1986) Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137: 245-254
- 178 Schaible UE, Vestweber D, Butcher EG, Stehle T, Simon MM (1994) Expression of endothelial cell adhesion molecules in joints and heart during *Borrelia burgdorferi* infection of mice. *Cell Adhes Commun* 2: 465-479
- 179 Nortamo P, Salcedo R, Timonen T, Patarroyo M, Gahmberg CG (1991) A monoclonal antibody to the human leukocyte adhesion molecule intercellular adhesion molecule-2. Cellular distribution and molecular characterization of the antigen. *J Immunol* 146: 2530-2535

- 180 Bruses JL, Rutishauser U (2001) Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie* 83: 635-643
- 181 Buttner B, Kannicht C, Reutter W, Horstkorte R (2003) The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 967-971
- 182 Rice GE, Munro JM, Corless C, Bevilacqua MP (1991) Vascular and nonvascular expression of NCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues. *Am J Pathol* 138: 385-393
- 183 Burkly LC, Jakubowski A, Newman BM, Rosa MD, Chi-Rosso G, Lobb RR (1991) Signaling by vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) through VLA-4 promotes CD3-dependent T cell proliferation. *Eur J Immunol* 21: 2871-2875
- 184 van Seventer GA, Newman W, Shimizu Y, Nutman TB, Tanaka Y, Horgan KJ, Gopal TV, Ennis E, O'Sullivan D, Grey H (1991) Analysis of T cell stimulation by superantigen plus major histocompatibility complex class II molecules or by CD3 monoclonal antibody: costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM-1, but not ELAM-1. *J Exp Med* 174: 901-913
- 185 Eriksson BM, Sjolín J, Claesson K, Wirgart BZ, Grillner L, Totterman TH (2001) Circulating soluble vascular cell adhesion

- molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in immunocompetent and renal transplant patients: correlation with cytomegalovirus disease and renal function. *Scand J Infect Dis* 33: 350-354
- 186 *Kulander L, Pauksens K, Venge P* (2001) Soluble adhesion molecules, cytokines and cellular markers in serum in patients with acute infections. *Scand J Infect Dis* 33: 290-300
- 187 *Tomescu C, Law WK, Kedes DH* (2003) Surface downregulation of major histocompatibility complex class I, PE-CAM, and ICAM-1 following de novo infection of endothelial cells with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 77: 9669-9684
- 188 *Tsuzaka K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Suzuki K, Abe T, Takeuchi T* (2005) A splice variant of the TCR zeta mRNA lacking exon 7 leads to the down-regulation of TCR zeta, the TCR/CD3 complex, and IL-2 production in systemic lupus erythematosus T cells. *J Immunol* 174: 3518-3525
- 189 *Rougon G, Hobert O* (2003) New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Annu Rev Neurosci* 26: 207-238
- 190 *Levine SJ* (2004) Mechanisms of soluble cytokine receptor generation. *J Immunol* 173: 5343-5348
- 191 *Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misesk DE, Kardias SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM,*

- Beer DG* (2002) Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 1: 304-313
- 192 *Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R* (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19: 1720-1730
- 193 *Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ* (1992) Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 584-589
- 194 *Tada H, Sugawara S, Nemoto E, Imamura T, Potempa J, Travis J, Shimauchi H, Takada H* (2003) Proteolysis of ICAM-1 on human oral epithelial cells by gingipains. *J Dent Res* 82: 796-801
- 195 *Holzmann B, Weissman IL* (1989) Integrin molecules involved in lymphocyte homing to *Peyer's patches*. *Immunol Rev* 108: 45-61
- 196 *Comstock L, Thomas DD* (1991) Characterization of *Borrelia burgdorferi* invasion of cultured endothelial cells. *Microb Pathog* 10: 137-148

## Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Girschick bedanken!

Besonderen Dank an alle Mitarbeiter aus dem Labor!

Danke an Frau Dr. Haubitz und Herrn Dr. Mäder!

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Vogel!

Und ein dickes Dankeschön an alle, die sich zu Recht angesprochen fühlen!



## Lebenslauf

Verena Baar, geboren am 21. Dezember 1978,  
in Kulmbach, Nationalität: deutsch

### Schulbildung

---

09/85 – 08/89	Grundschule, Presseck
09/89 – 05/98	Markgraf-Georg-Friedrich-Gymnasium, Kulmbach
05/98	Abitur

### Studium

---

09/98 – 06/05	Humanmedizin an der Julius-Maximilians- Universität, Würzburg
08/00	Physikum
08/01	1. Staatsexamen
03/04	2. Staatsexamen
04/04 – 03/05	Praktisches Jahr in Coburg, Zürich (Schweiz) und Kapstadt (Südafrika)
06/05	3. Staatsexamen

### Beruf

---

seit 07/05	Assistenzärztin im Klinikum St. Marien, Amberg
------------	---

## Promotion

---

seit 2002            „Die Expression von Adhäsionsmolekülen in/auf Synovialzellen *in vitro* nach Exposition mit *Borrelia burgdorferi* B31 und Geho“, Prof. Dr. Girschick, Pädiatrie, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

## Publikation

---

2004                Singh S, Morbach H, Nanki T, Faber C, Baar V, Girschick HJ (2004) Differential expression of matrix metalloproteinases and cyclooxygenases in synovial cells exposed to *Borrelia burgdorferi*. *Inflamm Res* 53 (12): 689-96

2005                Singh S, Baar V, Morbach H, Girschick HJ (2005) Expression of ICAM-1, ICAM-2, NCAM-1 and VCAM-1 by human synovial cells exposed to *Borrelia burgdorferi in vitro*. *Rheumatol Int* 24: 1-10

Amberg, den 1. Mai 2006