

# **Immunochemische Charakterisierung des p83/100-Antigens von *Borrelia burgdorferi***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von           Jürgen Hinrich Heins

aus                        Zeven/Niedersachsen

Giessen 1999

Aus dem Medizinischen Zentrum  
für Medizinische Mikrobiologie und Virologie  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Leiter: Prof. Dr. Chakraborty  
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: PD Dr. Hugo

Gutachter: Prof. Dr. Kaps

Tag der Disputation: 18. Juli 2000

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologische Daten	1
1.2 Klinische Vielfalt der Lyme-Borreliose	1
1.3 Heterogenitäten innerhalb der Spezies <i>Borrelia burgdorferi</i>	3
1.4 Diagnostik der Lyme-Borreliose	6
1.5 Bedeutung des p83/100-Antigens	8
1.6 Molekulargewichtsbestimmung des p83/100-Antigens	9
1.7 Zielsetzung	11
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>12</b>
2.1 Tierhaltung	12
2.2 Borrelienstämme und Borrelienkultur	12
2.3 Antigenaufbereitung	13
2.3.1 <i>Borreliengewinnung aus Kultur</i>	13
2.3.2 <i>Gewinnung des p83/100-Antigens durch Elektroelution</i>	14
2.4 Immunisierung	15
2.4.1 <i>Immunisierung der Kaninchen zur Gewinnung von Borrelienantisera</i>	15
2.4.2 <i>Immunisierung der Mäuse zur Herstellung monoklonaler Antikörper</i>	16
2.5 Herstellung monoklonaler Antikörper	16
2.5.1 <i>Zellfusion</i>	16
2.5.2 <i>Isotypen-Bestimmung der monoklonalen Antikörper</i>	19
2.5.3 <i>Aufreinigung der Antikörper zur Elektronenmikroskopie</i>	19
2.6 Elektrophorese und Immunoblotting	20
2.6.1 <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	20
2.6.2 <i>SDS-PAGE mit Harnstoff</i>	20
2.6.3 <i>SDS-PAGE ohne Harnstoff im Minigel</i>	21
2.6.4 <i>Vertikale 2D-Elektrophorese</i>	22
2.6.5 <i>Immunoblot</i>	23
2.6.6 <i>Chemilumineszenz-Darstellung</i>	26
2.7 Elektronenmikroskopie	27

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>29</b>
3.1	Polyklonale Immunantwort von Kaninchen	29
3.2	Monoklonale Antikörper gegen das p83/100-Antigen	33
3.3	Zur Spezifität der monoklonalen Antikörper	34
3.3.1	<i>Reaktion der monoklonalen Antikörper gegenüber verwandten Spirochäten</i>	34
3.3.2	<i>Reaktion der monoklonalen Antikörper in einem Immunoblot mit rekombinantem p83/100-Antigen</i>	35
3.4	Bestimmung des isoelektrischen Punktes von p83/100 mittels monoklon. Antikörper	37
3.5	Einflüsse der Antigenaufbereitung auf das p83/100-Antigen	39
3.5.1	<i>Einflüsse auf die Haltbarkeit des Borrelienextraktes</i>	39
3.5.2	<i>Aggregation des p83/100-Antigens</i>	41
3.6	Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Lokalisation des p83/100-Antigens	42
3.7	Reaktionsmuster der monoklonalen Antikörper im Westernblot bei diversen Isolaten von Borrelia burgdorferi	45
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
4.1	Das p83/100-Antigen	53
4.1.1	<i>Bestimmung von Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt</i>	53
4.1.2	<i>Zur Lokalisation und Funktion des p83/100-Antigens innerhalb des Bakteriums</i>	55
4.2	Heterogenität der Spezies Borrelia burgdorferi	56
4.2.1	<i>Allgemeines</i>	56
4.2.2	<i>Polyklonale Immunantwort in Kaninchen</i>	57
4.2.3	<i>Reaktion der monoklonalen Antikörper gegen das p83/100-Antigen</i>	58
4.2.4	<i>Reaktion der monoklonalen Antikörper gegen das p83/100-Antigen von verschiedenen Borrelien</i>	60
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologische Daten

Die Lyme-Borreliose ist eine entzündliche Multisystemerkrankung, die durch die Spirochäte *Borrelia burgdorferi* verursacht wird. Sie gilt heute als die am häufigsten durch Zecken übertragene Erkrankung in den USA (21) und Europa (1). Die Inzidenz wird von Stanek et al. in Zentraleuropa mit 0,1 % bis 0,2 % jährlich angenommen (75). In Endemiegebieten Süddeutschlands wird eine Prävalenz von borreliosespezifischen Antikörpern im Serum der Bevölkerung von 11,0 % genannt (93), Hassler bestimmte sogar einen Durchseuchungstiter von 16,9 % (32).

Übertragen wird die Lyme-Borreliose vorrangig durch eng verwandte Zecken aus dem *Ixodes ricinus*-Komplex während ihrer Blutmahlzeit. Dieser Komplex beinhaltet *Ixodes dammini* (oder *Ixodes scapularis*) im Nordwesten und Mittelwesten der Vereinigten Staaten, *Ixodes pacificus* im Westen der USA, *Ixodes ricinus* in Europa und *Ixodes persulcatus* in Asien (76). In deutschen Endemiegebieten liegt die Rate infizierter Zecken je nach Autor zwischen 12,8 % bis 30 % (32, 58, 93).

## 1.2 Klinische Vielfalt der Lyme-Borreliose

Heute wird die Borreliose ähnlich der Syphilis in mehrere Stadien eingeteilt, die jedoch nicht zwangsläufig ineinander übergehen (81, 88).

Im ersten Stadium handelt es sich um eine lokale Entzündungsreaktion der Haut, Erythema (chronicum) migrans (ECM), die im Mittel etwa ein bis zwei Wochen nach dem Zeckenbiß sichtbar wird (88) und auch ohne antibiotische Therapie meist nach drei bis vier Wochen wieder rückläufig ist. Die Lymphadenosis benigna cutis (LABC), eine Proliferation des dermalen lymphoretikulären Gewebes, wird je nach Autor entweder dem Stadium I oder II zugeordnet (81, 88).

Im zweiten Stadium kommt es zur Dissemination des Erregers. Jetzt können multiple sekundäre Erytheme, allgemeine Symptome wie Abgeschlagenheit und Müdigkeit, wandernde Gelenk- und Muskelschmerzen, flüchtige Arthritiden, das Bannwarth-Syndrom und andere neurologische Erscheinungen sowie Manifestationen an inneren Organen hinzukommen. Diese Beschwerden beginnen in der Regel Wochen bis etwa drei Monate nach Infektion (88).

Im dritten, dem Spätstadium der Borreliose, kommt es zur Chronifizierung der Beschwerden. Nach einer Latenzzeit von Monaten bis Jahren können Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), prolongierte oder chronische Arthritiden (Lyme-Arthritis) bzw. Enzephalomyelitiden auftreten. Patienten mit Arthritiden sprechen häufig nur schwer auf eine antibiotische Therapie an und lassen eine Assoziation zu bestimmten HLA-Mustern erkennen, so daß in diesem Stadium auch ein (auto)immunologisches Geschehen nicht ausgeschlossen ist (77).

Die unterschiedlichen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose waren besonders in Europa schon lange vor Identifizierung des Erregers bekannt. So beschrieben Herxheimer und Hartmann erstmals 1902 eine Hautatrophie, der sie den Namen Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) gaben (37). Afzelius führte einen Fall von Erythema migrans (EM) 1909 auf einem Kongreß in Stockholm der Öffentlichkeit vor (2), seine Patientin war nach einem Zeckenbiß erkrankt. Auch in der 1922 von Garin und Bujadoux erörterten Fallbeschreibung einer „Radiculoneuritis“ war ein Erythem nach Zeckenbiß vorausgegangen (30). Durch die umfangreicheren Arbeiten Alfred Bannwarths wird dieses neurologische Beschwerdebild auch als Bannwarth-Syndrom bezeichnet (6). In den 70er Jahren kam die von Steere et al. an Kindern und Jugendlichen untersuchte Arthritis in der Stadt Old Lyme, Connecticut, USA, in den Verdacht, eine durch Zecken übertragene Infektionskrankheit zu sein (79). Die Arbeiten Willy Burgdorfers enthüllten die später nach ihm benannte Spirochäte *Borrelia burgdorferi* als Verursacher der bis dahin zusammenhangslos gesehenen Krankheitsbilder (19). Die Tatsache, daß ECM assoziierte Arthritiden vorrangig in Nordamerika beschrieben werden, die kutanen und neurologischen Krankheitsformen jedoch mehr im europäischen Raum auftreten, ließ Fragen nach der Homogenität bzw. Heterogenität des Erregers aufkommen (12).

### 1.3 Heterogenitäten innerhalb der Spezies *Borrelia burgdorferi*

*Borrelia burgdorferi* ist, wie alle Vertreter aus der Familie der Spirochaetaceae, ein helikal gewundenes durch Endoflagellen bewegliches Bakterium. Eine äußere Membran umgibt den protoplasmatischen Zylinderkomplex, der das Zytoplasma enthält (Abb. 1.1 und 1.2). Die Flagellen sind nicht wie bei gramnegativen Bakterien üblich an der Zelloberfläche sondern im periplasmatischen Raum lokalisiert, der sich zwischen der äußeren Zellmembran und dem Protoplasmazyylinder befindet. Diese Flagellen inserieren endständig am Protoplasmazyylinder (11). Mit einer Größe von 10-30  $\mu\text{m}$  Länge und 0,18-0,3  $\mu\text{m}$  Breite ist die Borrelie die längste und grazilste Spirochäte (19, 38, siehe Abb. 1.3).

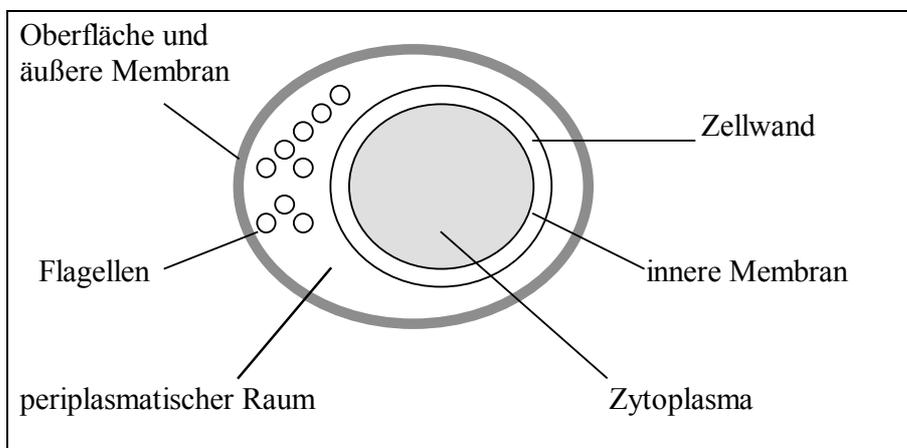


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Borrelienquerschnitts in Anlehnung an Simon (72)

*Borrelia burgdorferi* ist ungefärbt im Dunkelfeld- und Phasenkontrastmikroskop zu erkennen. Bei einer optimalen Wachstumstemperatur *in vitro* von 34 °C bis 37 °C beträgt die Generationszeit elf bis zwölf Stunden. (43).

Bildgebend lassen sich - wie wiederholt versucht - keine eindeutigen Unterschiede innerhalb der Spezies *Borrelia burgdorferi* nachweisen (35), jedoch sind mit immunologischen, proteinchemischen und molekularbiologischen Methoden sowohl phänotypische als auch genotypische Differenzen zwischen den einzelnen Borrelienstämmen darstellbar (13).



Abb. 1.2: *Borrelia burgdorferi* (B31), Querschnitt im Elektronenmikroskop (eigene Aufnahme)

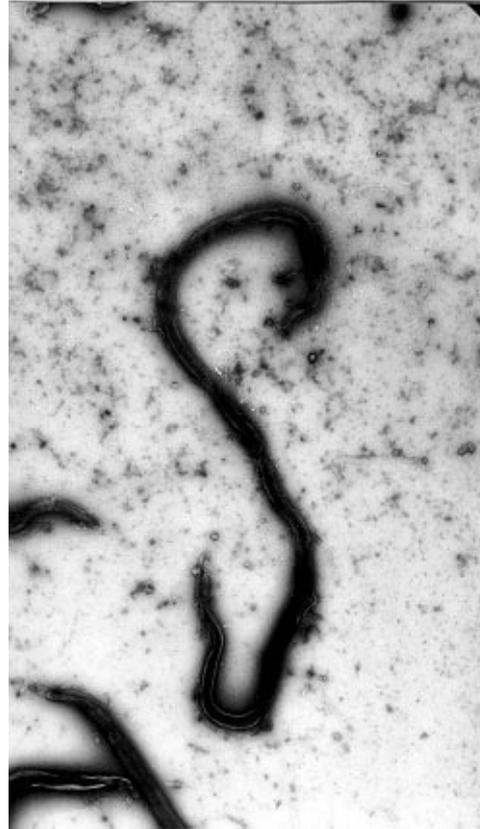


Abb. 1.3: *Borrelia burgdorferi* (B31) im Elektronenmikroskop (eigene Aufnahme)

Zum ersten Mal formulierte Barbour 1986 (8) einen Vorschlag für ein Subtypisierungssystem von *Borrelia burgdorferi* basierend auf Antikörperreaktionsmustern gegen sogenannte „outer surface“-Proteine (Osp); er nahm damit eine Unterteilung in drei Serogruppen vor. Auf derselben Idee fußend fanden Wilske und Mitarbeiter (96, 98) mittels acht verschiedener monoklonaler Antikörper gegen Osp A sieben Serogruppen. Hierbei konnten Hautisolate überwiegend der Serogruppe 2 zugeteilt werden. Isolate aus dem Liquor gehörten zu den Serotypen 1 bis 5.

Neben diesen immunologischen Methoden zur Subtypisierung der Borrelienstämme haben sich auch folgende proteinchemische und molekularbiologische Verfahren etabliert:

- Analyse von Laufeigenschaften ausgewählter Isoenzyme im SDS-PAGE (16).
- Analyse von Restriktionsmustern der rRNA (7, 54).
- Analyse der Längenunterschiede ausgewählter Gene nach Fermentierung durch Restriktionsendonukleasen, sogenannte RFLP (65, 86, 89).

Die genannten Methoden führten aufgrund der genetischen und immunologischen Unterschiede der einzelnen Borrelienstämme zur Bildung von Untergruppen innerhalb der Spezies.

So nahm Baranton 1992 eine Neuordnung der Spezies *Borrelia burgdorferi* vor (7). Für die Spezies selbst wurde der Name „*Borrelia burgdorferi sensu lato*“ gewählt, der initial drei Genotypen angehörten. Die Subspezies mit dem Referenzstamm B31 erhielt den Namen „*Borrelia burgdorferi sensu stricto*“. Die neu benannte Subspezies „*Borrelia garinii*“ wird durch den Referenzstamm 20047 vertreten, der vorher der Gruppe den Namen gab. Die als VS461 bezeichnete Gruppe erhielt von Canica et al. (20) 1993 den Namen „*Borrelia afzelii*“.

Im gleichen Jahr wiesen Fukunaga und Mitarbeiter darauf hin, daß einige japanische Isolate auffallend von nordamerikanischen, europäischen und anderen asiatischen Stämmen differieren (29). Kurz darauf definierten Kawabata und Mitarbeiter die Spezies „*Borrelia japonica*“, die sie in Japan aus *Ixodes ovatus* isoliert hatten. Im Gegensatz zu den bisher genannten ist diese Gruppe nicht humanpathogen und wohl auf Japan beschränkt (45).

Diese Subspezifizierungen scheinen gerechtfertigt, da DNA-Hybridisierungen eine DNA-Homologie von weniger als 70 % und Schmelztemperaturunterschiede von mehr als 5 °C ergaben (65). Dabei fiel auf, daß die nordamerikanische Borrelienpopulation heterogener ist als vormals angenommen. Zingg und Mitarbeiter konstatierten 1993, daß kalifornische Borrelienisolate vielfältiger seien als diejenigen der Ostküste. Sie schrieben, die an kalifornischen Isolaten beobachtete Vielfältigkeit sei mindestens so groß wie die europäischer Isolate (100). Drei verschiedene Methoden kamen bei ihren Untersuchungen zum Einsatz: Restriktionsendonuklease-Analysen (REA) der chromosomalen DNA, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) des Gens für das 83kD-Antigen und Pulsfeld-Gelelektrophoresen zur Plasmidanalyse. Unter den von ihnen untersuchten 29 Borrelien ist jedoch nur B31 als weiter klassifizierter Stamm enthalten, so daß zwar eine Einteilung in vier Gruppen aber keine Korrelation zu den bis dahin schon festgelegten Subspezies getroffen werden konnte.

Peter et al. (60, 61) untersuchten 50 Walliser Zeckenisolate nach OspA- und OspB-Heterogenitäten. Sie konnten neben *B. burgdorferi sensu stricto* (52 %), *B. garinii* (38 %) und *B. afzelii* (6 %) noch eine vierte Gruppe - genannt VS116 (4 %) - ausmachen. Nohlmans und Mitarbeiter (55) bestimmten bei 63 niederländischen Isolaten die RFLP der ribosomalen RNA und erhielten ebenfalls vier Gruppen. Nach ihren Untersuchungen gehören 46 % zu *B. burgdorferi sensu stricto*, 30 % zu *B. garinii*, 3 % zu VS461 (jetzt *B. afzelii*) und 21 % zu einer eindeutig unterscheidbaren Gruppe, die sie „M19“ nannten. Das Institut Pasteur veröffentlichte 1998 eine Untersuchung (70), in der 142 Borrelienisolate (von Zecken, Menschen und Nagern) aus verschiedenen europäischen Ländern untersucht wurden. Danach gehörten 44% zur Subspezies *Borrelia garinii*, 27% zu *Borrelia afzelii* (hauptsächlich aus Hautbiopsien isoliert), 19% zu *Borrelia burgdorferi sensu stricto* und 10% zur Gruppe VS116, die mittlerweile „*Borrelia valaisiana*“ genannt wird (87).

Eine deutsche Arbeitsgruppe verglich chromosomal- und plasmidkodierte Gene an 55 europäischen und nordamerikanischen Borrelienstämmen (86). Während sich die RFLPs von den drei chromosomalen Genen für Flagellin (*fla*) sowie die „heat shock-Proteine“ HSP-60 und -70 in vier Genomgruppen einteilen ließen, bildeten die RFLPs des OspA-Gens (Plasmid) sechs unabhängige Genomgruppen. Die genotypische Variabilität scheint folglich in den OspA-Genen mehr hervorzutreten als in den *fla*-, HSP60- und HSP70-Genen (86).

In mehreren Untersuchungen fällt eine Häufung der Hautisolate in der Subspezies *Borrelia afzelii* auf (4, 5, 55), was nach Wilske auf unterschiedliche pathogene Potenzen und Organotropismen von verschiedenen OspA-Serotypen hindeutet (98). Diese Aussage wird gestützt durch Untersuchungen von Wiencke et al., die in 18 Biopsaten von *Acrodermatitis chronica atrophicans* nur Borrelien der Gruppe VS461 (*B. afzelii*) fanden und denselben Subtyp in 28 von 35 Erythema-migrans-Biopsaten entdeckten (90).

#### **1.4 Diagnostik der Lyme-Borreliose**

Die Diagnostik der Lyme-Borreliose stützt sich vorwiegend auf das klinische Erscheinungsbild und den Nachweis spezifischer Antikörper. Zwar ist eine Isolierung des Erregers aus der Haut (78) und vereinzelt aus Blut (14) bzw. Liquor (63) möglich, doch ist die Ausbeute oft unsicher und das Verfahren sehr langwierig. Etabliert ist mittlerweile auch der Nachweis der Borrelien-DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) aus Hautbiopsaten und Gelenkpunktaten. Das zeitliche Fenster für eine gute Biopsie beträgt jedoch

nur wenige Wochen. Laut Steere entwickeln zudem nur etwa 60%-80% der Borreliosepatienten ein ECM (81). Zur Sensitivität der PCR aus Hautbiopsaten lassen sich Werte bis knapp 90% finden (17). Eine zweijährige prospektive Studie aus den USA, die diese Methode in ihrer Sensitivität mit Kulturmedien verglich, kam jedoch nur auf 25% (64). Auch in Zukunft scheint die Diagnostik der Lyme-Borreliose daher nicht auf serologische Testverfahren verzichten zu können.

Steere und Mitarbeiter (76) schlugen ein zweistufiges, serologisches Diagnoseschema vor, in dem als Screeningmethode ein Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) verwendet wird und bei grenzwertigen Ergebnissen zur Diagnosesicherung ein Immunoblot zum Einsatz kommt. Barbour betonte, daß erfahrene Laboratorien den Immunfluoreszenz-Test (IFT) mit gleicher Vorhersagekraft wie den ELISA als Screeningverfahren einsetzen können (9). Falsch positive Ergebnisse entstehen besonders bei Patienten mit Infektionserkrankungen, die durch andere Spirochäten verursacht werden, wie z.B. Rückfallfieber oder Syphilis. Aber auch bei Autoimmunerkrankungen können falsch positive Antikörperreaktionen auftreten (97). Andererseits kann im Krankheitsverlauf zu früh abgenommenes Serum oder jenes von bereits anbehandelten Patienten falsch negativ beurteilt werden (9).

Ein weiteres Problem ist die fehlende Standardisierung serologischer Tests (36). Es werden vollständige Zellysate/-sonikate, partiell aufgereinigte bzw. angereicherte Antigenaufbereitungen oder rekombinant hergestellte Antigene verwendet (26, 31). Zu diskrepanten Resultaten verschiedener Laboratorien kann es weiterhin aus folgenden Gründen kommen: 1. unterschiedliche serologische Techniken, 2. differierende Grenzwerte für die Positivität eines Tests, 3. unterschiedliche Vorbehandlung der Seren, 4. Verwendung differenter Stämme von *Borrelia burgdorferi sensu lato* als Antigen.

Desweiteren ist die Antikörperproduktion des Erkrankten und damit die diagnostische Möglichkeit entsprechender Tests stark vom Krankheitsstadium und der Schwere des Krankheitsbildes abhängig (97). Berg und Mitarbeiter (15) fanden eine hohe Variabilität in den Seren von Patienten mit Erythema migrans, deren positiven Ergebnisse zwischen 10 % und 60 % schwankten. Je fortgeschrittener die Krankheit, desto sicherer lassen sich erhöhte Antikörpertiter finden; nach Wilske 70 % bis 90 % im Stadium II und 90 % bis 100 % im Stadium III (97). Vor allem die stark erhöhten Immunglobulin G-Titer (IgG) gegenüber Borrelienantigenen können noch Jahre nach erfolgter Behandlung vorhanden sein, was wiederum die serologische Diagnostik anderer Erkrankungen (z.B. Rückfallfieber)

komplizieren kann (76).

Im Immunoblot wird nicht die Menge bindender Antikörper bestimmt, sondern welche Erregerantigene von den Patientenseren „erkannt“ werden. Obwohl der Immunoblot dem ELISA bzw. IFT sowohl in der Sensitivität als auch in der Spezifität überlegen ist (31, 23, 26), macht ihn eine personen- und erfahrungsabhängige Auswertung und eine fehlende Automatisierbarkeit aufwendig und somit ungeeignet für die tägliche Routine (97). Um so wichtiger sind deshalb verlässliche Kriterien für die Befundung und die Identifizierung spezifischer Marker, die für eine Erkrankung mit *Borrelia burgdorferi* sprechen.

Verschiedene Autoren haben sich mit der Interpretation von Immunoblots auseinandergesetzt (26, 33, 34, 101). Etwa drei bis sechs Wochen nach Beginn der Erkrankung werden erste Antikörper nachweisbar. Sie sind anfänglich vorrangig gegen das Flagellin (41 kD), das sogenannte „common Antigen“ (60 kD) und Proteine mit niedrigem Molekulargewicht gerichtet, hierunter befindet sich auch das als pC bekannte Osp C (21-22 kD) (73). Im weiteren Krankheitsverlauf lassen sich Immunglobuline gegen bis zu 100 verschiedene Antigene nachweisen. Für die Diagnostik von großer Bedeutung sind die „outer surface“-Proteine A (31-32 kD) und B (34-36 kD), Proteine von 17-18 kD Molekulargewicht, ein 39 kD-Protein sowie ein Antigen aus dem hochmolekularen Bereich mit einer Masse von 83 bis 100 kD. Zwar erzeugen das 41 kD- und 60 kD-Protein die intensivste Immunantwort, sie sind aufgrund ausgedehnter Kreuzreaktionen jedoch nur von eingeschränktem diagnostischen Wert.

Als weitgehend borrelienspezifisch und diagnostisch wertvoll gelten Osp C, Osp A, das 39 und 83/100 kD-Antigen (101). Zöller et al. sowie Ma und Mitarbeiter beschrieben letzteres als den besten Marker im Westernblot für die Diagnose der Lyme-Borreliose im Stadium III (102, 53). Es sind allerdings auch Antikörperreaktionen im frühen Stadium beschrieben worden (53, 26).

### **1.5 Bedeutung des p83/100-Antigens**

Der besondere Wert dieses hochmolekularen Proteins aus dem 100 kD-Bereich liegt in seiner Spezifität für *B. burgdorferi sensu lato* und in der hohen Sensitivität für die Lyme-Borreliose im Spätstadium. Dressler et al. beschrieben bei Patienten mit Lyme-Arthritis in allen Fällen Antikörper der IgG-Klasse gegen dieses Protein. Demgegenüber stand keine einzige Antikörperreaktion in der gesunden Kontrollgruppe (26). Ma beschrieb eine Antikörperreaktion gegen dieses Antigen im Spätstadium von 88 % (53).

Gegen das flagellenassoziierte p41-Antigen - ein weiteres immundominantes Protein - werden zwar viel früher Antikörper gebildet - in der Regel bis spätestens fünf Wochen nach Infektion (15) - doch liegen hier ausgeprägte Kreuzreaktionen zu Rückfallfieber-Borrelien, aber auch schwache Kreuzreaktionen zu Treponemen vor (97).

In einer ausführlichen Untersuchung zur Kreuzreaktion von Borrelienantigenen testete Bruckbauer Kaninchenserum (18). Hierzu wurden Kaninchen neben *Borrelia burgdorferi* mit je einem von 14 weiteren Bakterienpopulationen immunisiert. Wichtig für die Auswahl der Erreger war dabei entweder eine phylogenetische Verwandtschaft zu *Borrelia burgdorferi*, eine Relevanz des Erregers in der Differentialdiagnose der Lyme-Borreliose oder zu erwartende Kreuzreaktionen zu *Borrelia burgdorferi*. Dabei zeigte das p83/100-Antigen von *B. burgdorferi* - abgesehen von einer schwachen Kreuzreaktivität gegenüber *Borrelia hermsii* - keine weiteren Kreuzreaktionen. Es ist seiner Meinung nach als genusspezifisch anzusehen (18).

Etliche Arbeitsgruppen stellten daraufhin rekombinante Proteine aus dem 100 kD-Bereich her, um standardisierte Antigenpräparationen für spezifischere diagnostische Tests zu erhalten (94, 95, 68, 67).

### **1.6 Molekulargewichtsbestimmung des p83/100-Antigens**

Ein erstes Problem bei der Beschreibung dieses Proteins ergibt sich mit der Bestimmung des Molekulargewichts. Je nach Arbeitsgruppe und untersuchtem Borrelienstamm wird dieses mit 83 kD (49, 100), 93 kD (50), 94 kD (84), 97 kD (27) bzw. 100 kD (42) angegeben. Wilske et al. nennen es deshalb auch das Protein im 100 kD-Bereich (92) und Rössler und Mitarbeiter bezeichnen es als p83/100-Protein (69). Basierend auf dem reinen Aminosäuregehalt liegt das Molekulargewicht laut Perng et al. (59) bei 79,8 kD. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird es daher als p83/100-Antigen bezeichnet, um die Spannweite des Molekulargewichts auszudrücken.

Auch bezüglich des isoelektrischen Punktes herrschen uneinheitliche Angaben, Perng und Mitarbeiter (59) geben ihn aufgrund der Aminosäuresequenz rechnerisch mit pH 4,92 an, während Luft et al. (50) ihn mittels zweidimensionaler (2D-)Gelelektrophorese auf etwa pH 6,8 bestimmten. Anda und Mitarbeiter ermittelten ihn ebenfalls mit 2D-Gelelektrophorese jedoch auf pH 5,8 (3).

Ditton und Mitarbeiter konnten 1992 (25) nachweisen, daß die immundominanten Proteine p100, p94 und p83 von *Borrelia burgdorferi* identisch sind. Sie zeigten eine hochgradige Übereinstimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz dieser drei Proteine. Mittlerweile ist sie in ihrer Gesamtheit an verschiedenen Borrelienstämmen aufgezeigt worden (59, 42). Das p83/100-Antigen besteht aus etwa 700 Aminosäuren. Eine ausführliche Zusammenfassung der bis dahin bekannten Aminosäuresequenzen bieten Rössler et al. (69), die neben fünf selbst ermittelten Sequenzen (Stamm PBr, PBre, TN, PBi und Gö2) fünf weitere aus der Literatur bekannte miteinander verglichen (B31, K48, BPo, PTrob und PKo). Hiernach weist das p83/100-Antigen der Stämme aus der Subspezies *Borrelia burgdorferi sensu stricto* eine charakteristische Insertion ab Position 400 von sechs Aminosäuren und eine ab Position 639 von zwei Aminosäuren auf. Die *Borrelia afzelii* Stämme zeigen dagegen eine auffällige, 30 Aminosäuren umfassende Deletion ab Position 429. Die größten Unterschiede liegen in der sogenannten internen Region von Position 390 bis 540.

Untersuchungen zur Wasserlöslichkeit des p83/100-Antigens (Chou-Fasman-Vorhersage) eröffneten eine zentrale hydrophile Region von etwa 300 Aminosäuren, die eine auffällende Variabilität der Aminosäuresequenzen aufweist. Das N- und C-terminale Ende sind dagegen hydrophob (69).

Je nach Autor liegt die Homologie der Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Subspezies zwischen 62,5 % und 91 %, innerhalb einer Subspezies zwischen 88,6% und 100% und innerhalb eines Serotyps bei etwa 99% (28, 69). Aufgrund dieser Charakteristika meinen Rössler und Mitarbeiter, daß sich das p83/100-Antigen besser zur Klassifizierung von *Borrelia burgdorferi* eigne als viele andere Proteine (69).

Das p83/100-Antigen ist ein chromosomal kodiertes Protein. Nach Zingg et al. (100) ist die codierende Gensequenz 2100 Basenpaare (Bp) groß. Anhand von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen konnte diese Arbeitsgruppe fünf verschiedene Fragmente darstellen, die eine Einordnung der untersuchten Borrelienstämmen in vier Gruppen ermöglichte.

Welche Funktion das p83/100-Antigen im Zellstoffwechsel des Bakteriums einnimmt, ist noch weitgehend unklar; ebenso ungeklärt ist, ob und welche Rolle dieses Protein in der Pathogenese der Lyme-Borreliose hat. Luft und Mitarbeiter (52) konnten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß das p83/100-Antigen in den Randstrukturen des Protoplasmazyllinders liegt, über die Funktion konnten sie allerdings keine Aussagen treffen. Da es bei Aufbereitungen oft in der selben Fraktion erscheint wie das

flagellenassoziierte p41, hielt Volkmann es für ein Verankerungsprotein der Flagellen im Protoplasmazyylinder (85).

### **1.7 Zielsetzung**

Das p83/100-Antigen spielt eine wichtige Rolle in der serologischen Diagnostik der Lyme-Borreliose. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit immunologischen Methoden weitere Daten zur Charakterisierung dieses Antigens zu erhalten. Dazu wurden polyklonale und monoklonale Antikörper hergestellt. Es sollten Informationen über die zeitliche Abfolge der Immunantwort unterschiedlich immunisierter Kaninchen gewonnen werden. Ferner erschien es sinnvoll mit Hilfe der monoklonalen Antikörper einen Beitrag zur Molekulargewichtsbestimmung und zur Markierung des isoelektrischen Punktes dieses Antigens zu leisten. Die monoklonalen Antikörper wurden weiterhin eingesetzt, um die subzelluläre Lage dieses Proteins näher zu beschreiben. Schließlich sollte geklärt werden, ob durch die monoklonalen Antikörper Unterschiede im p83/100-Antigen verschiedener Borreliensstämme aufzeigbar sind.

## 2 Material und Methoden

Alle Chemikalien, die nicht explizit im Materialenteil der einzelnen Arbeitsanleitungen aufgeführt wurden, erhielten wir von der Firma E. Merck in Darmstadt, BRD.

### 2.1 Tierhaltung

Die Kaninchen zur Erzeugung der polyklonalen Antiseren lieferte der Tierzuchtbetrieb Kurt Meckel (Laubach-Ruppertsberg, BRD). Sie wurden in einem offenen System bei 21 °C und 50 % bis 60 % Luftfeuchtigkeit in voll klimatisierten Räumen gehalten. Die Käfige waren aus Edelstahl mit emaillierten Lochboden. Als Diätstandardfutter dienten Haltungspellets der Firma Altromin (Lage, BRD).

Die verschiedenen Mäusestämme, die zur Herstellung der monoklonalen Antikörper dienten, stammten von der Versuchs- und Tierzuchtanstalt (Hannover, BRD). Dabei wurden zur Herstellung der monoklonalen Antikörper die Stämme Balb/C, C57B2/6J und C3H verwendet. Sie wurden in Makralonkästen des Typs III unter den gleichen Bedingungen, wie sie für die Kaninchen beschrieben wurden, gehalten. Haltungspellets für Mäuse der Firma Altromin stellten hier den Diätstandard dar.

### 2.2 Borrelienstämme und Borrelienkultur

Die Borrelienstämme B31, IRS, N34 und Z25 erhielten wir von der BAG-Biologische Analysensystem GmbH (Lich, BRD). Die Referenzstämme PBI, BO23 und DMS4681 stammen aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität (Gießen, BRD). Ebenso stellte man uns von dort die vierzig regionalen Zeckenisolate und das Hautisolat zur Verfügung.

Von den erhaltenen Borrelienkulturen wurde jeweils 1 ml in 10 ml modifiziertes BSK II-Medium gegeben und bei 32 °C im Brutschrank inkubiert. Unser Medium enthielt im Gegensatz zu dem von Barbour et al. (10) beschriebenen kein Yeastolate dafür allerdings 0,5 mmol/l Glutamin. Im folgenden ist die genaue Zusammensetzung aufgeführt:

- |                           |        |                    |        |
|---------------------------|--------|--------------------|--------|
| • Neopepton               | 5,0 g, | HEPES              | 6,0 g, |
| • Zitronensäure (Na-Salz) | 0,7 g, | Pyruvat (Na-Salz)  | 0,8 g, |
| • NaHCO <sub>3</sub>      | 2,2 g, | N-Acetylglucosamin | 0,4 g, |

- D-Glucose (Monohydr.) 5,0 g, CMRL 100,0 ml,
- 0,2 mol/l Glutamin-Lsg 3,4 ml
- in ca. 700 ml aqua bidest., dann mit 1 mol/l NaOH auf pH 7.6 einstellen
- ad 1000 ml mit aqua bidest. auffüllen.

Danach wurden 200 ml autoklavierte Gelatinelösung (7 g in 100 ml aqua bidest.), 72 ml steriles Kaninchenserum und 70 ml bovines Serumalbumin hinzugegeben.

Material: Neopetone (DIFCO-Labroratories, Detroit/Michigan, USA)

HEPES, kristallin (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, BRD)

CMRL 10x (Gibco, Life Technologies Ltd., Paisley, Scotland, UK)

0,2 M Glutamin-Lösung (Biochrom, Berlin, BRD)

Kaninchenserum (steril, eigene Gewinnung)

Bovines Serumalbumin (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Kulturröhrchen 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht, BRD)

## **2.3 Antigenaufbereitung**

### **2.3.1 Borreliengewinnung aus Kultur**

Die Borrelienkulturen wurden alle drei bis vier Tage unter dem Dunkelfeldmikroskop auf Wachstum und Dichte überprüft. Bei einer Borreliendichte von etwa  $10^8$  Borrelien/ml erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 5000 g und zweimaliges Waschen in 10 ml phosphatgepuffertes Kochsalzlösung (PBS: 0,203 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,149 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8,5 g NaCl in einem Liter aqua bidest.; pH 7,3-7,5). Das bakterienreiche Sediment dreier Kulturröhrchen (je 10 ml) wurde dann in 1 ml PBS aufgenommen und nach einer Proteinbestimmung (BCA Protein Assay Reagent, PIERCE) mit PBS auf eine Eiweißkonzentration von 1,5 mg/ml eingestellt. Bis zum weiteren Gebrauch wurde diese Suspension bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Material: Heraeus Christ Minifuge (Heraeus Instruments, Hanau, BRD)

BCA Protein Assay Reagent (PIERCE, Rockford, IL, USA)

Kulturröhrchen 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht, BRD)

### 2.3.2 Gewinnung des p83/100-Antigens durch Elektroelution

Bei der Elektroelution werden geladene Moleküle durch ein elektrisches Feld z.B. aus einem Elektrophoresegel herausgelöst (41). Nachdem ein Borrelienextrakt des Stammes B31 in einer 7,5 %igen Harnstoff-SDS-PAGE aufgetrennt worden war (siehe Kap. 2.6.2), wurde der Gelabschnitt, der das p83/100-Antigen enthielt, herausgeschnitten und zu ca. 3 mm x 3 mm messenden Würfeln zerkleinert. Anschließend erfolgte das Einlegen der Würfel in die Elutionsvorrichtung (Bio-trap, Schleicher&Schuell). In der verwendeten Bio-trap erfolgt die Separation über eine spezielle Membran hinweg, und das Eluat kann anschließend aus einer separaten Kammer abpipettiert werden (Abb. 2.1).

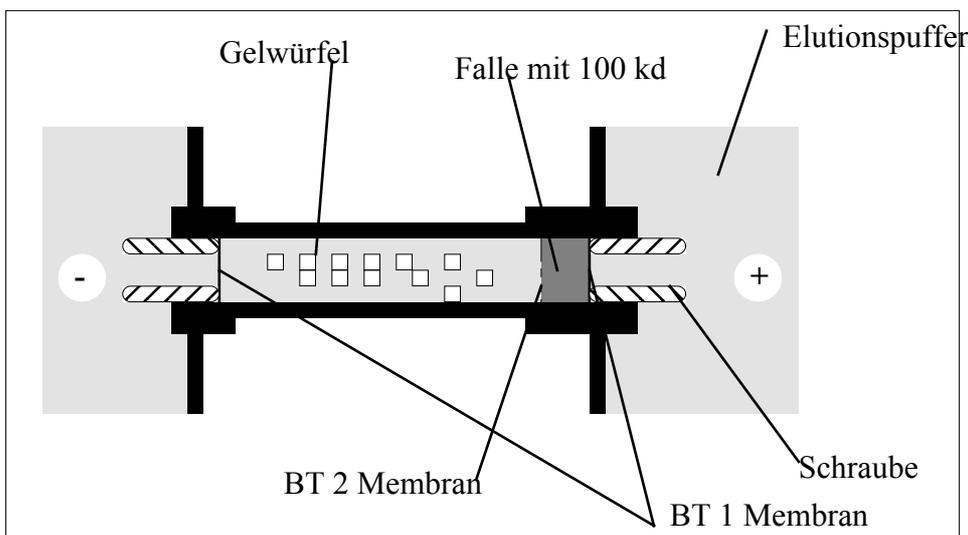


Abb. 2.1: Elektroelution der 100 kd-Bande von *Borrelia burgdorferi* (B 31)

Der zur Elution verwendete Puffer bestand aus folgenden Komponenten:

- 600 mg Tris (0,025 M), 2,8 g Glycin (0,187 M), 250  $\mu$ l 20 %ige SDS-Lösung
- in 200 ml aqua bidest. lösen.

Die Elution lief über Nacht bei 100 V, so daß sich am nächsten Morgen ca. 700 - 1000  $\mu$ l Eluat, die das p83/100-Antigen enthielten, aus der Falle entnehmen ließen.

Material: S & S Biotrap (Schleicher & Schuell, Dassel, BRD)

BT 1-Membran (Schleicher & Schuell, Dassel, BRD)

BT 2-Membran (Schleicher & Schuell, Dassel, BRD)

## **2.4 Immunisierung**

### **2.4.1 Immunisierung der Kaninchen zur Gewinnung von Borrelienantisera**

Sechs Kaninchen (A-F) wurden auf unterschiedliche Weise mit den Referenzstämmen B31, IRS, N34 und Z25 immunisiert, um Antisera gegen diese Borrelienstämmen zu erhalten. Hierzu wurde 1 ml der in Kap. 2.3.1 erwähnten Originalsuspension mit 4 ml 1 %iger Formalinkochsalzlösung versetzt. Die dadurch entstandene Suspension diente zur Immunisierung der Kaninchen (nach 99). Bei den Tieren A bis D erfolgte die Antigeninjektion intravenös in die Ohrvene nach folgendem Schema:

Tag 1 und 4:            0,5 ml Antigen-Formalinsuspension

Tag 8 und 11:        1,0 ml Antigen-Formalinsuspension

Tag 15 und 18:      1,5 ml Antigen-Formalinsuspension

Tag 22 und 25:      1,5 ml Antigen-Formalinsuspension

Die Immunisierung erfolgte bei Kaninchen A mit Antigenmaterial vom Borreliens Stamm B31, bei Kaninchen B mit Antigen von Z25, bei Tier C mit N34 und bei D mit IRS.

Das Kaninchen E wurde mit einer SDS behandelten Borreliensuspension immunisiert. Hierzu wurde 1 ml der beschriebenen Originalsuspension (Kap. 2.3.1) vom Stamm B31 mit SDS (2%, w/v) versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl ABM-S-Adjuvans (komplett, lyophilisiert, Linaris, Bettingen, BRD). Die erste Immunisierung erfolgte subkutan, alle weiteren intravenös nach dem oben ausgeführten Zeitplan.

Für Kaninchen F wurde 1 ml der oben erwähnten 1 %igen Formalinlösung des Stammes B31 mit 300 µl der gleichen Adjuvanslösung versetzt. Die erste Immunisierung erfolgte auch hier subkutan, alle weiteren Boosterungen nach oben genanntem Schema.

Bei allen Tieren erfolgten Blutentnahmen an den Tagen 0, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 22, 26, 28, 30, 33, 35, 37, 43, 54, 90, 145 und 146 nach erster Immunisierung (siehe Abb. 3.1 und 3.2).

## **2.4.2 Immunisierung der Mäuse zur Herstellung monoklonaler Antikörper**

Weibliche Mäuse der Stämme BALB/C, C57B2/6J und C3H dienten zur Immunisierung. Die erste Injektion wurde im Alter von ca. drei Wochen appliziert. Hierzu wurden 400 µl des unter Kap. 2.3.2 beschriebenen Eluates mit 100 µl ABM-N Adjuvans (eine Ampulle in 1 ml NaCl) und physiologischer Kochsalzlösung auf 2 ml aufgefüllt. Die so erhaltene Lösung wurde für die initiale, subkutane Immunisierung, das sogenannte „priming“, verwendet. Sie erfolgte 32 Wochen vor der Zellfusion. Danach erfolgten vier Boosterungen in der 29., 18., 14. und vierten Woche vor der Fusion. Das weitere Protokoll folgte, wie angegeben, in Anlehnung an das Schema von Stähli et al. (74):

7. Tag praefusionem: 10 µl Eluat mit 1 ml isotonischer NaCl intraperitoneal
4. Tag praefusionem: 100 µl Eluat mit 0,9 ml isotonischer NaCl intraperitoneal
3. Tag praefusionem: 500 µl Eluat mit 500 µl isotonischer NaCl zu ca. 50 % intravenös in die Schwanzvene, den Rest intraperitoneal
2. Tag praefusionem: 500 µl Eluat mit 500 µl isotonischer NaCl zu ca. 50 % intravenös in die Schwanzvene, den Rest intraperitoneal
1. Tag praefusionem: 600 µl Eluat mit 400 µl isotonischer NaCl intraperitoneal

Material: ABM-N, inkomplett, lyophilisiert (Linaris, Bettingen, BRD)

Einmalspritzen, steril, verschiedene Größen (Braun, Melsungen, BRD)

Einmalkanülen, steril, verschiedene Größen (Becton Dickinson, Dublin, Irland)

## **2.5 Herstellung monoklonaler Antikörper**

### **2.5.1 Zellfusion**

Zur Verwendung kamen Myelomzellen der Permanentlinie X63-Ag 8.6.5.3., die auf Petrischalen (Ø 9 cm) in RPMI 1640-Medium in Kultur gehalten wurden. Das Medium war durch 10% (v/v) fetales Kälberserum, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin ergänzt (39).

Die Kulturen wurden in den letzten Tagen vor der Fusion täglich ausverdünnt und mit frischem Medium kultiviert, so daß sie sich zum Zeitpunkt der Fusion in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Am Tag der Fusion fand durch Abpipettieren der Myelomkulturen in Zentrifugationsröhrchen und durch Zentrifugation bei 500 g über 10 min eine Ankonzentrierung statt. Nach Absaugen des Überstandes gelangten die pelletierten Zellen in 10 ml RPMI 1640-Medium (ohne Zusätze).

Die für die Fusion vorgesehene Maus wurde nach einer Äthernarkose entblutet und die Milz steril entnommen. Nach dreifachem Waschen in RPMI 1640 (ohne Zusätze) wurde diese zerkleinert und durch ein steriles Sieb in eine Petrischale mit PBS gepreßt. Durch Aspiration mit einer Spritze wurde das Gewebe weiter homogenisiert. Anschließend fand eine Volumenreduktion auf 20 ml statt.

Dann wurden Myelomzellen und Milzzellen dreimal in 10 ml PBS gewaschen und für 7 min bei 500 g zentrifugiert. Die nun vorhandenen Pellets wurden in 10 ml PBS resuspendiert und zum Mischen in einem gemeinsamen Röhrchen wiederum für 7 min bei 500 g zentrifugiert.

Der eigentliche Fusionsvorgang wurde nach einem von Peters beschriebenen Schema durchgeführt (62): 1,5 ml PEG 1500 (37 °C) wurden während 60 s auf das rotierende Sediment geträufelt. Es schloß sich eine weitere Minute Inkubationzeit an, gefolgt vom allmählichen Ausverdünnen des PEG 1500 mit PBS (37 °C). Dazu wurden in den ersten 30 s 1 ml PBS, in den folgenden 30 s 3 ml und während weiterer 60 s 16 ml PBS hinzugegeben. Die entstandene Zellsuspension zentrifugierte anschließend bei 500 g über 5 min in ungekühlter Zentrifuge. Nachdem das Zellsediment in 40 ml RPMI 1640 mit HAT-Zusatz (1 µM Hypoxanthin, 0,4 µM Aminopterin, 16 µM Thymidin) aufgenommen worden war, wurde es auf vier NUNC MicroWell-Platten verteilt, so daß auf jede der 4 x 96 Vertiefungen annähernd 100 µl entfielen.

Vierundzwanzig Stunden vor Verteilung der Hybridomzellen auf die Zellkulturplatten waren diese mit Peritonealmakrophagen aus weiblichen BALB/c-Mäusen sowie 100 µl Zellkulturmedium (RPMI 1640 mit 10% (v/v) FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/l Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) beschickt worden („feeder layer“).

An den ersten drei Tagen nach der Fusion fand ein täglicher Medienwechsel (Zellkulturmedium unter HAT-Zusatz, siehe oben) statt. Aufgrund eines Enzymdefektes im Purin- und Thymidinstoffwechsel sind Myelomzellen, die nicht mit B-Lymphoblasten zu Hybridomzellen verschmolzen sind, bei Anwesenheit von Aminopterin (Folsäure-reduktasehemmer) nicht in der Lage DNA-Bausteine herzustellen. Hybridomzellen haben aufgrund des vollen Enzymbestandes daher in Gegenwart von Hypoxanthin, Thymidin und Aminopterin einen Selektionsvorteil. Jeden zweiten Tag wurde das Wachstum und die HAT-Selektion im Phasenkontrastmikroskop überprüft. Nach sieben Tagen wurde die Hälfte des Mediums abgesaugt und durch neues HAT-Medium ersetzt. Eine weitere Woche später wurde von HAT-Zusatz auf HT-Zusatz (1  $\mu\text{M}$  Hypoxanthin, 16  $\mu\text{M}$  Thymidin) umgestellt.

Drei Wochen post fusionem konnte die Erneuerung des Zellkulturmediums (nunmehr ohne HT) alle drei Tage vorgenommen werden, da die Zellen nun gut herangewachsen waren. Positive Schalen wurden mittels limitierter Dilution weiter subkloniert (24). Aus insgesamt drei Fusionsansätzen erhielten wir elf Klone mit zufriedenstellenden Reaktionen gegenüber dem p83/100-Antigen im Westernimmunoblot.

Material: X63-Ag 8.6.5.3.-Myelomzellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, BRD)

L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin, H(yoxanthin)/T(hymidin)-Supplement, Aminopterin, fetales Kälberserum, RPMI 1640-Medium, (Biochrom, Berlin, BRD)

Polyethylenglycol (PEG 1500), (Boehringer, Mannheim, BRD)

9 cm-Petrischalen, (NUNC, Wiesbaden, BRD)

MicroWell-Platten, (NUNC, Wiesbaden, BRD)

Zentrifugenröhrchen, steril: 10 ml und 50 ml, (Greiner, Frickenhausen, BRD)

Sieb, autoklavierbar, (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Zentrifuge: Heraeus Christ Minifuge, (Heraeus Instruments, Hanau, BRD)

### **2.5.2 Isotypen-Bestimmung der monoklonalen Antikörper**

Die Isotypisierung der hergestellten monoklonalen Antikörper wurde mit einem kommerziellen ELISA-Test der Firma Calbiochem nach Herstelleranweisung durchgeführt (Calbiochem Immunochemicals, Hybridoma sub-isotyping kit, mouse). Hierzu wurden die Schalen einer 96er-Microtiterplatte zuerst mit einem Antimaus-Antikörper überzogen (gecoatet). Dann erfolgte der Auftrag der Zellkulturüberstände mit den jeweils zu untersuchenden Antikörpern, die durch die Antimaus-Antikörper fixiert wurden. Anschließend wurden die verschiedenen Antimaus-Subklassen-Antikörper hinzugegeben, deren Bindung an die monoklonalen Antikörper je nach Affinität in einem abschließenden Färbeschritt makroskopisch nachweisbar war.

Material: Hybridoma Sub-Isotyping Kit, Mouse; enthält alle genannten Antikörper und Lösungen, (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)  
MicroWell-Platten (NUNC, Wiesbaden, BRD)

### **2.5.3 Aufreinigung der Antikörper zur Elektronenmikroskopie**

Nach Sammeln des Zellkulturüberstandes aus FKS-armen CG-Medium (1,8% (v/v) FKS) wurden 500 ml des Zellkulturüberstandes auf etwa 13 ml eingengt. Die nachfolgende Dialyse fand über Nacht gegen einen Phosphatpuffer (0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH=8,6) statt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung über eine Protein A-Agarosesäule der Fa. Bio-Rad. Dazu wurde die Säule vorher mit dem zugehörigen Bindungspuffer equilibriert (fünffaches Säulenvolumen), gefolgt vom Auftrag der verdünnten Probe (13 ml Probe plus 26 ml Bindungspuffer). Dann wurde die Säule mit Bindungspuffer (15fache Menge des Säulenvolumens) gewaschen. Anschließend wurden die Immunglobuline mit Elutionspuffer (15faches Säulenvolumen) aus der Säule eluiert und das Eluat sofort durch 5 ml Tris/Glycin (pH=8,8) auf einen pH-Wert von 6-8 gebracht.

Material: Protein A-Säule: Affi-Gel Protein A MAPS II Kit, (BIO-RAD, München, BRD)  
CG-Medium (Frank Zimmerman, Wiesbaden, BRD)

## **2.6 Elektrophorese und Immunoblotting**

### **2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE dient zur Analyse von Proteingemischen in einem Spannungsfeld; dabei durchwandern die Proteine eine inerte Matrix eines stark vernetzten Polyacrylamid-Gels. Da die Polypeptide aufgrund der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung jeweils differente Nettoladungen besitzen, wird sowohl das Probenmaterial als auch das Gel mit einem geladenen Detergenz versetzt (SDS). Zusätzlich werden alle Sulfidbindungsbrücken durch eine reduzierende Substanz (DTT) gespalten. Durch diese Maßnahmen erfolgt die Separation allein nach der Größe der einzelnen Peptidketten.

Allgemein verwendete Geräte und Materialien werden hier aufgeführt.

Material: Acrylamide [2x, research grade] (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, BRD)  
N,N,Methylen-Bisacrylamid [2x] (Carl Roth, Karlsruhe, BRD)  
Tetramethylethyldiamin, reinst (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, BRD)  
Natriumdodecylsulfat (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, BRD)  
Ammoniumpersulfat (Bio-Rad Lab., Richmond, USA)  
Bromphenolblau (LKB-Produkte, Bromma, Schweden)  
Netzgerät ECPS 3000/150 (Pharmacia, Schweden)

### **2.6.2 SDS-PAGE mit Harnstoff**

In Anlehnung an Laemmli (47) wurden Polyacrylamidgele mit 8 M Harnstoff zur Elution der 100 kDa-Bande und zur Testung der Kaninchenserum im Blotverfahren hergestellt.

Für die Elektroelution wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 7,5 % (w/v) verwendet, um eine gute Separation der Proteine im oberen Molekularmassenbereich zu erzielen. Im einzelnen waren im Trenngel 7,5 % (w/v) Acrylamid, 0,12 % (w/v) Bisacrylamid, 8 M Harnstoff, 0,2 % (w/v) SDS, 0,4 M Tris-HCl (pH 8,9) sowie 0,1 % (v/v) TEMED und 62 µ% (w/v) Ammoniumpersulfat als Starter bzw. Katalysator für die Vernetzung enthalten.

Für die Darstellung der Antikörperreaktion der Kaninchenserum war der Acrylamidanteil auf 12 % (w/v) und die Bisacrylamidkonzentration im Trenngel auf 0,2 % (w/v) erhöht. Aufgrund des relativ hohen Acrylamidanteils ist die Strukturvernetzung innerhalb des Trenngels höher, so daß auch kleine Moleküle nach mehrstündiger Auftrennung noch im Gel vorhanden sind. Es wird somit eine ausreichende Separation der Proteine über die gesamte Spannbreite der Molekulargewichte erreicht.

Die 1 cm breiten Sammelgele setzten sich aus 5 % (w/v) Acrylamid, 0,15 % (w/v) Bisacrylamid, 8 M Harnstoff, 0,2 M Tris-HCl (pH 8,9) sowie 0,1 % (v/v) TEMED und 0,1 m% (w/v) Ammoniumpersulfat zusammen.

Zum Auftrag der Probe wurden die in PBS aufgenommenen Borrelien (siehe Kap. 2.2) so aufbereitet, daß 1 ml Antigensuspension 0,004 % (w/v) Bromphenolblau, 2 % (w/v) SDS, 100 mM DTT und 2 % (w/v) Saccharose enthielt.

Die 84 kD- und 116 kD-Marker waren in jeweils 1 ml Probenpuffer (0,0625 M Tris-HCl pH 6,8; 10 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau) gelöst und anschließend auf 20 µl aliquotiert und bei - 20 °C eingefroren worden. Für eine Laufsäule wurden jeweils 20 µl aufgetaut, mit 50 µl 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung verdünnt und nach Reduktion mit 100 mM DTT durch 2 % (w/v) Saccharose beschwert.

Sowohl Marker wie auch Antigenprobe wurden nach Erhitzung auf 95 °C auf das Gel aufgetragen und bei 40 V über Nacht im elektrischen Feld getrennt. Sobald die Färbebande den unteren Gelbereich erreichte, wurde die Stromzufuhr unterbrochen.

Material: Marker 84000: Fructose-6-Phosphokinase (Sigma Chemie, Deisenhofen, BRD)

Marker 116000: β-Galaktosidase (Sigma Chemie, Deisenhofen, BRD)

Elektrophoresekammer SES Havana (Desaga, Heidelberg, BRD)

### **2.6.3 SDS-PAGE ohne Harnstoff im Minigel**

Zur Analyse des Bindungsverhaltens der monoklonalen Antikörper gegen die einzelnen regionalen Isolate und Referenzstämme von *Borrelia burgdorferi* wurde das Mini-Protean II System von Bio-Rad verwendet.

Die 6 cm x 8 cm x 0,5 cm großen Gele wurden wie bei Laemmli (47) beschrieben hergestellt. Der Elektrodenpuffer enthielt 0,124 M Tris, 0,96 M Glycin und 0,5 g % SDS. Um einen zu großen Verdünnungseffekt zu vermeiden, wurde der Probenpuffer zweifach konzentriert angesetzt:

- 1,0 ml 1,0 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,8 ml 86 % Glycerin,
- 1,6 ml 20 g % SDS-Lösung, 0,2 ml 0,1 g % Bromphenolblau
- ad 8 ml mit aqua bidest.

Zur Probenaufbereitung wurden 150 µl der in PBS suspendierten Borrelien mit 100 µl des Probenpuffers versetzt und dazu DTT und Saccharose gegeben. Der Erhitzung auf 95 °C folgte der Probenauftrag und ein etwa einstündiger Separationslauf bei 140 V.

Material: Mini-Protean II (BIO-RAD, München, BRD)

#### 2.6.4 Vertikale 2D-Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte zuerst nach ihrem isoelektrischen Punkt in einem vertikalen Kapillargel und im zweiten Schritt nach ihrer Molekülmasse im Polyacrylamid-Gel (56). Nach einer Arbeitsanleitung der Firma BIO-RAD (J. de Mey, vertikale 2D-Elektrophorese mit der Mini-Protean II 2D Zelle, EMBL, Heidelberg) erfolgte der Aufbau zur isoelektrischen Fokussierung wie in Abb. 2.2 ersichtlich.

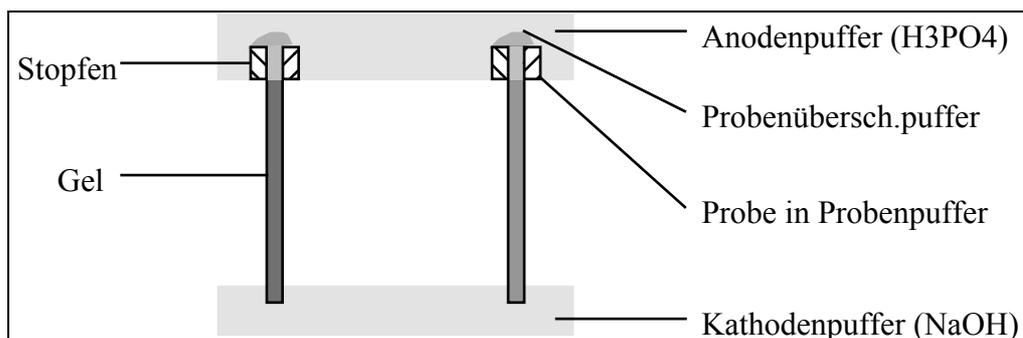


Abb. 2.2: Schema der vertikalen isoelektrischen Fokussierung im Kapillargel

Nach Herstellung der Kapillargele [9,2 M Harnstoff, 4 % (w/v) Acrylamid, 2 % (v/v) Triton X-100, 0,6 % (v/v) Pharmalyte 3-10, 0,6 % (v/v) Pharmalyte 4-6,5, 1,4 % (v/v) Pharmalyte 5-8 in aqua bidest sowie 0,016 % (w/v) Ammoniumpersulfat und 0,16 % (v/v) TEMED] wurden diese mit der Probe beladen. Sie bestand aus 5 µl Borreliensuspension (1,5 mg/ml in PBS) in 15 µl Probenpuffer [9,8 M Harnstoff, 2 % (w/v) Triton X-100, 2 %

(v/v) Servalyte 7-9, 100 mM DTT in aqua bidest. bei 37 °C]. Es folgte die Überschichtung mit Probenüberschichtungspuffer [8 M Harnstoff, 5 % (v/v) Triton X-100, 1 % (v/v) Servalyte 7-9 sowie 10 mM DTT in aqua bidest. bei 37 °C gelöst] und das Einfüllen der Elektrodenpuffer in die Elektrophoresekammer. Der Anodenpuffer bestand aus 1,5 mM Phosphorsäure und der Kathodenpuffer aus 50 mM NaOH. Beide Puffer wurden frisch zubereitet und entgast.

Durch Wechseln der Elektrodenpuffer und Umpolung wurde eine bessere Auftrennung im sauren Bereich erreicht (57). Ohne Vorlauf wurden die Proben zuerst 10 min bei 100V, danach 4,5 h bei 400 V getrennt.

Nach dem Lauf wurden die Gele aus dem Kapillarröhrchen gedrückt und entweder unbehandelt eingefroren (-20 °C) oder zur sofortigen Verwendung 10 min mit dem Probenpuffer für die zweite Dimension überschichtet, um dann auf ein 10 oder 12,5 %iges SDS-Polyacrylamid-Minigel gelegt zu werden. Weiteres ist unter Kap. 2.6.3 beschrieben.

### **2.6.5 Immunoblot**

Der Immunoblot oder Westernblot ist eine Methode, mit der Proteine durch ein elektrisches Feld aus einem Elektrophoresegel auf eine proteinbindende Membran gebracht werden (82). Sind Antikörper gegen die geblotteten Antigene vorhanden, so lassen sie sich zur spezifischen Markierung verwenden und in einem farbreaktiven Schritt sichtbar machen.

Bei der verwendeten Vorrichtung handelt es sich um ein Trockenblotverfahren, bei dem das elektrische Feld zwischen zwei Kohleplatten erzeugt wird (46).

Vor Beginn wurden drei Stammlösungen hergestellt, um die jeweiligen Filterpapierlagen damit zu tränken:

Anodenpuffer I (AP I): 7,2 g Tris (0,3 M), 40 ml Methanol z.A. (20 % v/v), ad 200 ml aqua bidest.

Anodenpuffer II (AP II): 605 mg Tris (0,025 M), 40 ml Methanol (20 % v/v), ad 200 ml mit aqua bidest.

Kathodenpuffer (KP): 605 mg Tris (0,025 M), 1000 mg Aminocaprinsäure (0,5 % w/v), 40 ml Methanol (20 % w/v), ad 200 ml mit aqua bidest.

Zwölf Blätter Filterpapier und die PVDF-Membran wurden in der Größe der zu blottenden Gelfläche zugeschnitten, je drei Filterblätter wurden mit AP II und KP sowie sechs Filterblätter mit AP I getränkt. Die PVDF-Membran wurde 20 s lang in Methanol gebadet und dann im noch feuchten Zustand - wie alle Filterpapiere auch - in die Blotkammer gelegt. Die genaue Anordnung ist aus Abb. 2.3 ersichtlich.

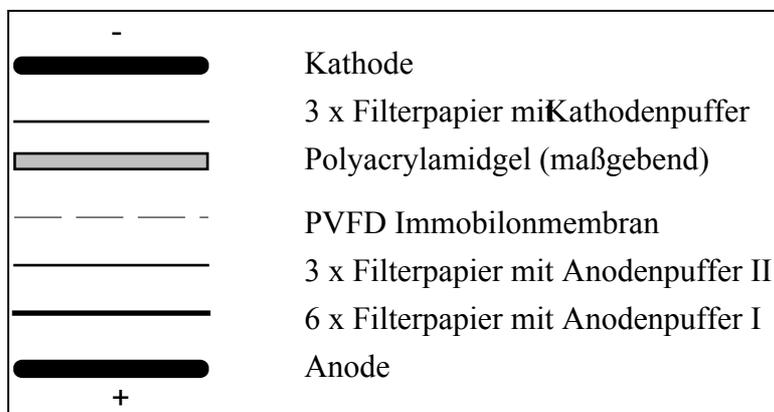


Abb. 2.3: Westernblot, Anordnung der einzelnen Schichten (46)

Der einzustellende Stromfluß richtete sich nach der Fläche des zu blottenden Gels: er entsprach in Milliampere der Querschnittsfläche in Quadratzentimetern. Diese Stromstärke wurde für eine Stunde beibehalten.

Daran schloß sich das Blockieren der Immobilonmembran an, d.h. alle nicht durch die transferierten Proteine belegten Bindungskapazitäten der Membran wurden abgesättigt, damit es nicht zu unspezifischen Bindungen bei weiteren Reaktionsschritten kommen konnte.

Blockierungspuffer: 200 mg Gelatine in 100 ml aqua bidest. bei 60 °C lösen, 480 mg Tris, 5,8 g NaCl, 1000 mg Aminocaprinsäure auf pH 7,5 mit Salzsäure [1 mol/l] einstellen, anschließend 20 ml FKS hinzugeben und auf 200 ml mit aqua bidest. auffüllen.

Mit diesem Puffer vollständig überdeckt inkubierte die Blotmembran eine Stunde bei Zimmertemperatur (20 °C). Danach wurde sie entweder eingefroren oder weiter verarbeitet.

Die Kulturüberstände der Hybridomzellen wurden dann mit dem oben erwähnten Blockierungspuffer im Verhältnis 1:11 verdünnt (1 ml Blockierungspuffer plus 100 µl Kulturüberstand). Die Kaninchenserum wurden 1:500 oder 1:250, die Humanserum 1:100 verdünnt. Die in Streifen geschnittene Blotmembran inkubierte mit dieser Lösung bei 20 °C über Nacht.

Nach zweimaligem 15minütigem Waschen mit Waschpuffer (6 g/l Tris, 3 g/l Glyzin, 200 ml/l Methanol in aqua bidest.) wurden die Blotstreifen mit dem Zweitantikörper bei 20 °C für 1,5 h inkubiert. Dieser Zweitantikörper war ein mit alkalischer Phosphatase (AP) markierter Anti-Maus-Antikörper (bzw Anti-Human- oder Anti-Kaninchen-Antikörper), der im Blockierungspuffer im Verhältnis 1:3000 verdünnt war.

Es folgte wiederum zweimaliges Waschen von je 15 min., bis der Blot mit angewärmten (32 °C) AP-Puffer (Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 0,026 M in aqua bidest. auf pH 9,5) bei 32 °C für 10 min vorinkubiert wurde.

Zum farbreaktiven Schritt wurde nach Abgießen der Vorinkubation eine kurz vorher mit BCIP-Lösung (5 mg in 1 ml aqua bidest. lösen und bei -20 °C konservieren) versetzte NBT-Lösung (33 mg NBT in 90 ml AP-Puffer bei 80-90 °C lösen) eingesetzt. Sie enthielt 1,65 mg% BCIP als Endkonzentration und wirkte in einem abgedunkelten Raum für etwa 5 min ein.

Zum Stoppen der Reaktion wurde die Farblösung entfernt, und die Blotstreifen wurden dreimal mit aqua bidest. für mehrere Minuten gewaschen.

Material: ε-Amino-N-Capronsäure (Sigma Chemical, St. Louis/MO, USA)

fetales Kälberserum ( Biochrom, Berlin, BRD)

Immobilon PVDF Transfer Membrane (Milipore Corp., Bedford/MA, USA)

Filterpapier [597] (Schleicher & Schuell, Dassel, BRD)

Netzgerät ECPS 3000/150 (Pharmacia, Schweden)

Kohleplatten-Trockenblotkammer (Werkstatt des MZI der JLU, Gießen, BRD)

Schüttler Certomat R (Braun, Melsungen, BRD)

Anti-Maus-Antikörper [AP konjugiert] (D 31401, DAKO, Hamburg, BRD)

Anti-Kaninchen-Antikörper [AP konjugiert] (D 30601, DAKO, Hamburg, BRD)

Anti-Human-Antikörper [AP konjugiert] (D 34201, DAKO, Hamburg, BRD)

NBT: Nitro-Blau-Tetrazolinchlorid z.A. (30550, SERVA Feinbiochemica, Heidelberg, BRD)

BCIP: 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat [Na<sub>2</sub>-Salz] (15259, SERVA  
Feinbiochemica, Heidelberg, BRD)

### **2.6.6 Chemilumineszenz-Darstellung**

Mit diesem Verfahren können auch kleine Proteinmengen ohne Verwendung radioaktiver Stoffe nachgewiesen werden. Die Proteinmarkierung erfolgt mittels spezifischer Antikörper, die Signalerzeugung durch eine enzymatische (Peroxidase) Oxidation von Luminol, das hierdurch zur Lumineszenz angeregt wird. Das emittierte Licht kann auf einem Röntgenfilm festgehalten werden. Grundlage des aufgeführten Vorgehens ist eine Arbeit von Thorpe et al. (83).

Bis zum Blockieren des auf die 2D-Gelelektrophorese folgenden Westernblots wurde nach Methoden der vorhergehenden Kapitel verfahren. Darauf folgte zweimaliges Waschen für 5 min in PBS-T (PBS mit 5%(v/v) Tween 20). Anschließend inkubierte die Blotmembran eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Erstantikörper (2G3, 2A6, Humanserum), der in 1%iger (v/v) BSA/PBS-T-Lösung verdünnt worden war (Patientenserum 1:300, monoklonaler Antikörper 1:10, BSA = bovines Serumalbumin). Wieder schloß sich ein 15minütiger Waschvorgang in PBS-T gefolgt von viermaligem Waschen in der selben Lösung für jeweils 5 min an. Die daran anschließende Inkubation mit dem peroxidase-markierten Zweitantikörper dauerte eineinhalb Stunden (Verdünnung 1:3000 in BSA/PBS-T-Lösung).

Nach weiteren Waschvorgängen (einmal 15 min und viermal 5 min in PBS-T) erfolgte die Chemilumineszenz-Darstellung. Hierfür wurde die Blotmembran im Minigelformat mit 8 ml (mindestens 125 µl/cm<sup>2</sup>) einer frisch angesetzten „Chemilumineszenz-Lösung“ (erzeugt laut Herstelleranweisung) eine Minute lang unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abtropfen des überschüssigen Reagenz wurde die Membran vorsichtig mit Filterpapier getrocknet. Schlußendlich setzte man die proteinbeladene Seite in der Dunkelkammer einem Röntgenfilm (Hyperfilm-ECL) aus, indem dieser direkt auf die Membran gelegt wurde. Nach einer Belichtungszeit von einer bis zu vier Minuten wurde der Film entwickelt.

Das Entfernen („stripping“) der initial zugesetzten Antikörper für die zweite und dritte Darstellung (Abb. 3.7 bis 3.9) wurde nach einer Anweisung von Kaufmann et al. (44) durchgeführt. Hierzu erfolgte nach der lichterzeugenden Reaktion eine 30minütige Inkubation der Blotmembran bei 70 °C in PBS-T, die mit 2 % (w/v) SDS und 100 mM Beta-Mercaptoethanol versetzt war. Nach diesem „Stripping“ konnte die Blotmembran für weitere Antikörperreaktionen (2A6, Humanserum) benutzt werden.

Material: Anti-Maus-Antikörper (peroxidase markiert), (DAKO, Hamburg, BRD)  
bovines Serumalbumin (BSA), (Sigma, St. Louis, MO, USA)  
Cemilumineszenz-Reagenz: Renaissance, (DuPont, Bad Homburg, BRD)  
Filterpapier [597], (Schleicher&Schuell, Dassel, BRD)  
Hyperfilm-ECL, (Amersham, Braunschweig, BRD)

## **2.7 Elektronenmikroskopie**

Mit dem monoklonalen Antikörper 2G3 (Vorbereitung siehe Kap. 2.5.3) wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation des p83/100-Antigens an vorbehandelten Borrelien des Stammes B31 durchgeführt.

Zuerst wurde 1 ml der Borreliensuspension (siehe Kap. 2.3.1) mit 0,2 % (w/v) Sarcosyl versetzt, hierdurch kommt es zur Auflösung der Bakterienoberflächenmembran (50). Nach Zentrifugation wurde das Pellet aus sarcosylunlöslichen Protoplasmazyllern in PBS aufgenommen. Anschließend erfolgte der Auftrag auf Maschen-Netze (siehe unter Material), die mit Formvarfolie überzogen und mit Kohle bedampft waren. Nach einer Inkubationszeit von 30 min. wurde überschüssige Flüssigkeit entfernt. Anschließend folgte einmaliges Waschen in PBS. Noch freiliegende Proteinbindungsstellen wurden dann mit 1%er (v/v) BSA-Lösung abgesättigt, gefolgt von der Überschichtung durch den monoklonalen Antikörper 2G3. Die Inkubationszeit betrug 30 min.

Zur Negativkontrolle wurde ein aufgereinigter muriner Antikörper verwendet, der gegen  $\alpha$ -Toxin von *Staphylococcus aureus* gerichtet war (40). Anschließend folgte erneutes Waschen in PBS und der Auftrag des goldmarkierten Anti-Maus-Antikörpers. Nach Auswaschen des Antikörpers fand die Negativkontrastfärbung mit 2 % Uranylacetat (pH 3,9) statt. Die Proben trockneten dann bei Raumtemperatur, bevor die elektronenmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt wurden. Sie erfolgten am EM 902 der Fa.

Zeiss im Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Material: Kupfer/Rhodium-Netze, Maschengröße 200, überzogen, bedampft, (Plano, Wetzlar, BRD)  
goldmarkierter Anti-Maus-Antikörper, (Plano, Wetzlar, BRD)  
Sarcosyl, (Sigma, St. Louis, MO, USA)

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Polyklonale Immunantwort von Kaninchen nach Immunisierung mit unterschiedlichen Borrelienstämmen

Ziel dieses Versuchs war die zeitliche Abfolge der Antikörperantwort gegen Partialantigene von *Borrelia burgdorferi* in immunisierten Kaninchen zu analysieren. Darüber hinaus wurde untersucht, ob unterschiedliche Immunisierungsarten (intravenös bzw. subkutan) und verschiedene Borrelienstämmen als Antigen zu divergenten Antikörperreaktionen führen.

Hierzu sind sechs Kaninchen mit den vier Referenzstämmen B31, Z25, IRS (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*) und N34 (*Borrelia garinii*) immunisiert worden. Die Kaninchen A bis D (Abb. 3.1 und 3.2) wurden mit je einem der oben genannten Stämme intravenös über die Ohrvene immunisiert. Den Kaninchen E und F (Abb. 3.1 und 3.2) wurde der Borrelienstamm B31 unter Hinzunahme eines Adjuvans subkutan appliziert. Insgesamt wurden jeweils acht Injektionen mit steigender Antigenkonzentration über einen Zeitraum von 25 Tagen durchgeführt (siehe Kap. 2.4.1).

Vor der Immunisierung wurde Blut abgenommen, um möglicherweise vorbestehende kreuzreagierenden Antikörper zu erkennen. Ab dem 26. Tag nach Immunisierungsbeginn konnten mit der Westernblot-Technik Antikörper nachgewiesen werden. Die am 26., 28., 30., 33., 35., 37., 43., 54., 90., 145. und 146. Tag nach der Immunisierung gewonnenen Seren wurden in einem Immunoblot mit Zellysaten der Stämme B31, Z25, IRS und N34 verwendet. Die Immunantworten der Kaninchen gegenüber den *Borrelia burgdorferi sensu stricto* Stämmen B31, Z25 und IRS unterschieden sich weder im zeitlichen Verlauf der Antikörperbildung noch in der Immunreaktion gegen die einzelnen Antigene. In Abbildung 3.1 wurde daher exemplarisch nur der Immunoblot mit dem Referenzstamm B31 als Antigenquelle dargestellt. Abbildung 3.1 zeigt die Antikörperbildung der verschiedenen Seren im Immunoblot gegen den sensu-stricto-Stamm B31.

Erste Antikörper lassen sich bei allen Kaninchen nach knapp vier Wochen vor allem gegen das Flagellin (41 kD), die outer surface Proteine und etwas später auch gegen das "common antigen" (60 kD) nachweisen.

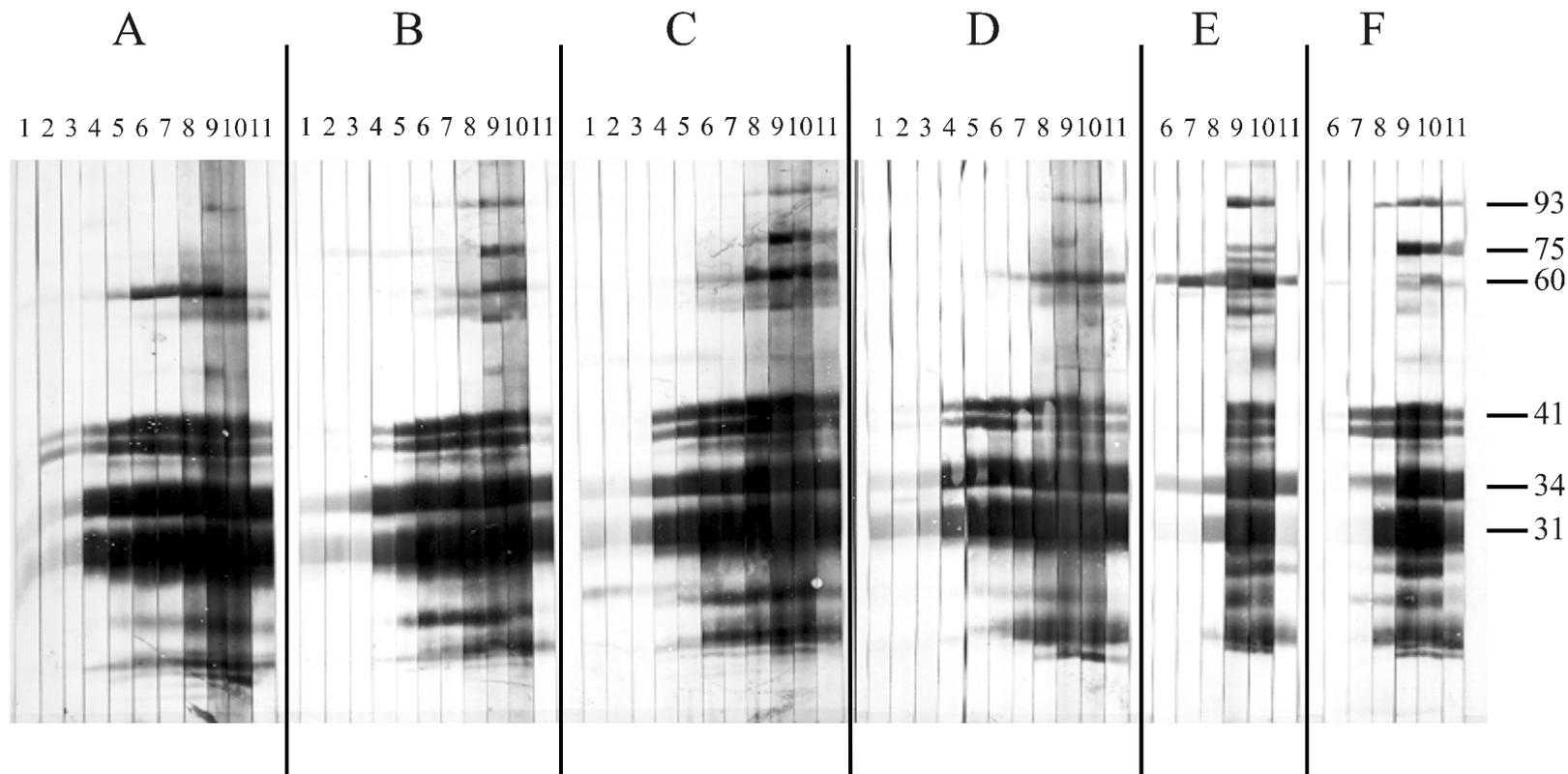


Abb. 3.1: Antikörperentwicklung im zeitlichen Verlauf gegen Antigene des Stammes B31 (*B. burgdorferi sensu stricto*)

Spalte 1: Serum von 26. Tag, 2: 28. Tag, 3: 30. Tag, 4: 33. Tag, 5: 35. Tag, 6: 37. Tag, 7: 43. Tag, 8: 54. Tag, 9: 90. Tag, 10: 145. Tag, 11: 146. Tag.

A=Kaninchen A mit B31, B=Kaninchen B mit Z25, C=Kaninchen C mit N34, D= Kaninchen D mit IRS jeweils intravenös, E=Kaninchen E subkutan mit

B31, F=Kaninchen F subkutan mit B31 immunisiert.

Zahlen rechts: Molekulargewichte in Kilodalton (kD), die Bande bei 93kD markiert das p83/100-Antigen; SDS-PAGE 12%.

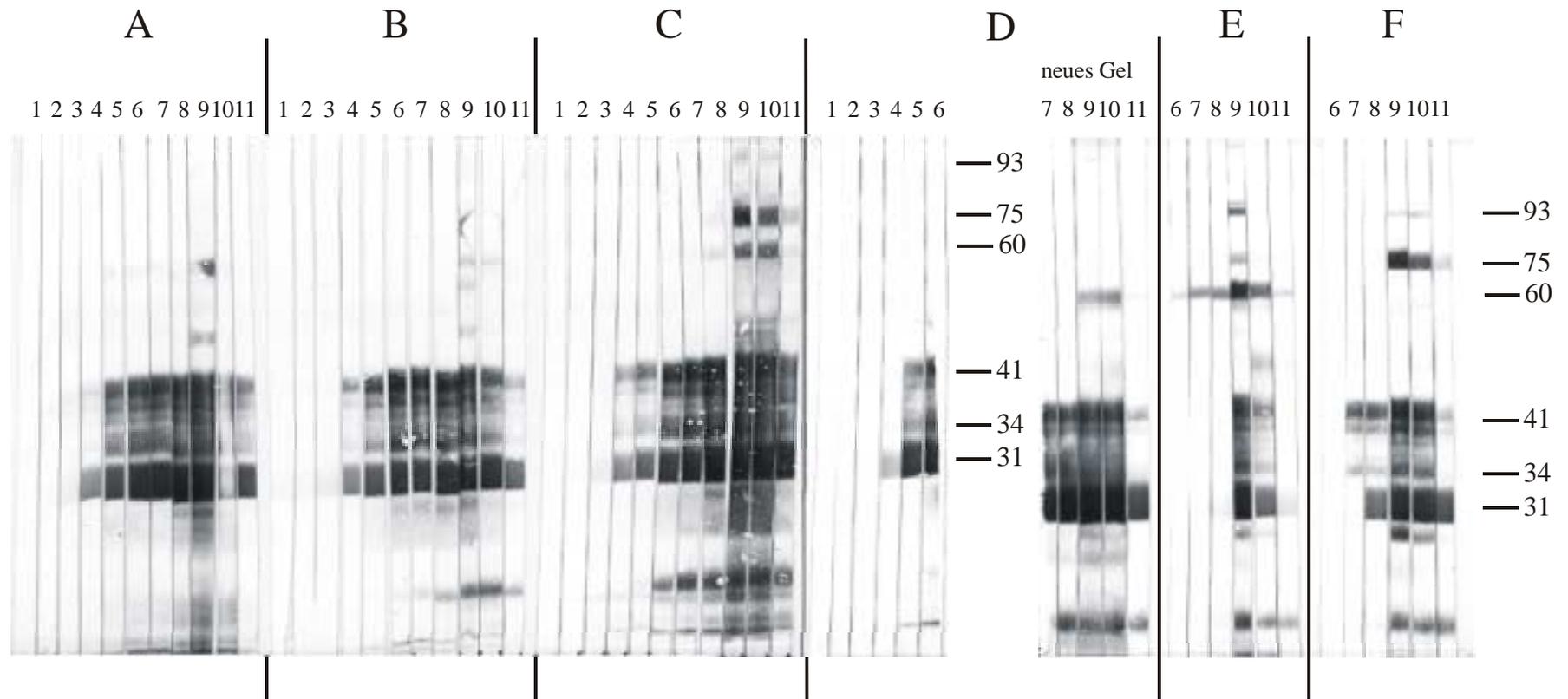


Abb. 3.2: Antikörperentwicklung im zeitlichen Verlauf gegen Antigene des Stammes N34 (*B. garinii*)

Spalte 1: Serum von 26. Tag, 2: 28. Tag, 3: 30. Tag, 4: 33. Tag, 5: 35. Tag, 6: 37. Tag, 7: 43. Tag, 8: 54. Tag, 9: 90. Tag, 10: 145. Tag, 11: 146. Tag.

A=Kaninchen A mit B31, B=Kaninchen B mit Z25, C=Kaninchen C mit N34, D= Kaninchen D mit IRS jeweils intravenös, E=Kaninchen E subkutan mit

B31, F=Kaninchen F subkutan mit B31 immunisiert.

Zahlen rechts: Molekulargewichte in Kilodalton (kD), die Bande bei 93kD markiert das p83/100-Antigen; SDS-PAGE 12%.

Ein Maximum erreicht die Antikörperreaktion nach 90 Tagen (Spalte 9), zu diesem Zeitpunkt reagiert auch das p83/100-Antigen in allen Immunoblots positiv. Erste positive Reaktionen gegen das p83/100-Antigen lassen sich auf Höhe von 93 kD jedoch schon am 54. Tag nach Immunsierung nachweisen. Die Antikörperbildung der Kaninchen A, B, C, und D verläuft nach dem zeitlichen Verlauf und ihrer Ausprägung gleich, d.h. die Immunsierung mit Antigenmaterial unterschiedlicher Stämme des gleichen Genotyps führt zu keiner wesentlich differenten Immunantwort.

Setzt man als Antigenquelle einen anderen Genotyp ein (N34, *Borrelia garinii*), so zeigen die Antiseren der mit *B. burgdorferi sensu stricto* Stämmen immunisierten Kaninchen vergleichsweise weniger Banden im Immunoblot (Abb. 3.2). Als wesentlicher Unterschied ist zu nennen, daß die Antikörper kaum an Proteine im hochmolekularen Bereich binden. Einzige Ausnahme bildet das Serum des mit N34 selbst immunisierten Kaninchens C. Hier findet sich eine Antikörperbindung gegen das 60 kD-, 75 kD-Protein und schwach auch gegen das p83/100-Antigen.

Anders sieht die Antikörperreaktion im Immunoblot aus, wenn die Immunsierung subkutan unter Zugabe eines Adjuvans erfolgte (Kaninchen E und F). Bei den Antiseren der Kaninchen E und F ist trotz der Verwendung des *B. burgdorferi sensu stricto* Stammes B31 als Immunogen eine weitgefächerte Bindung an Antigene von N34 zu erkennen, auch gegen die 93 kD-Bande. Vom zeitlichen Ablauf her scheint die Produktion spezifischer Antikörper etwas später einzutreten als bei den intravenös immunisierten Tieren (ab etwa der sechsten Woche, Spalte 7, statt nach bereits viereinhalb Wochen, Spalte 4). Die meisten Antigene werden auch hier ab dem 90. Tag nach Blutentnahme erkannt.

Es zeigt sich also, daß die Antikörperreaktion im Westernblot zum einen davon abhängig ist, wie das Immunogen appliziert wurde, und zum anderen welcher Genotyp als Antigenquelle verwendet wurde. Als markantes Antigen, das während der späten Immunreaktion (frühestens ab der siebten Woche) erkannt wird, fällt das p83/100-Antigen auf. Die gegen dieses Immunogen gerichtete Antikörperreaktion ist eindeutig von dem zur Immunsierung verwendeten Stamm abhängig.

### 3.2 Monoklonale Antikörper gegen das p83/100-Antigen

Zur näheren Charakterisierung dieses immundominanten Antigens wurden in drei Fusionsansätzen insgesamt elf verschiedene murine monoklonale Antikörper hergestellt (siehe Kap. 2.4.2, die Bezeichnung der monoklonalen Antikörper entstand anhand der fortlaufenden Nummerierung der Mikrotiterplatten und der Einzelschalenkoordinate, in dem der produzierende Hybridomzellklon gefunden wurde). In Abb. 3.3 zeigen sie ihr typisches Reaktionsmuster gegenüber dem Referenzstamm B31 im Westernblot. Dabei fällt auf, daß einige monoklonale Antikörper mehrere Proteinbanden markieren.

17A4, 14B3 und 8B12 haben ein dreibandiges Muster in Höhe von 93 kD, 65 kD und 55 kD sowie zwei schwächere Banden unterhalb der 55 kD-Bande. 14G9, 14F6, 13D12, 13A3, 2G6, 2G3 und 2A6 stellen sich einbandig dar. Das von ihnen erkannte Antigen liegt bei 93 kD. Die Ermittlung des Molekulargewichts erfolgte mittels graphischer Interpolation. Hierzu wurden die Laufstrecken der unter M1 und M2 aufgeführten Molekulargewichtsmarker (Abb. 3.3) auf halblogarithmisches Papier aufgetragen. Die ermittelten Punktkoordinaten wurden zu einer Geraden verbunden, woraus sich je nach Laufstrecke das Molekulargewicht der antikörpermarkierten Proteine ermitteln ließ. Das Molekulargewicht des größten antikörpermarkierten Proteins von B31 lag hiernach bei 93 kD. 14F6 und 3F2 markieren ein Protein etwas oberhalb der 93 kD-Bande. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein differentes Antigen, so daß diese monoklonalen Antikörper im Folgenden nicht weiter besprochen werden.

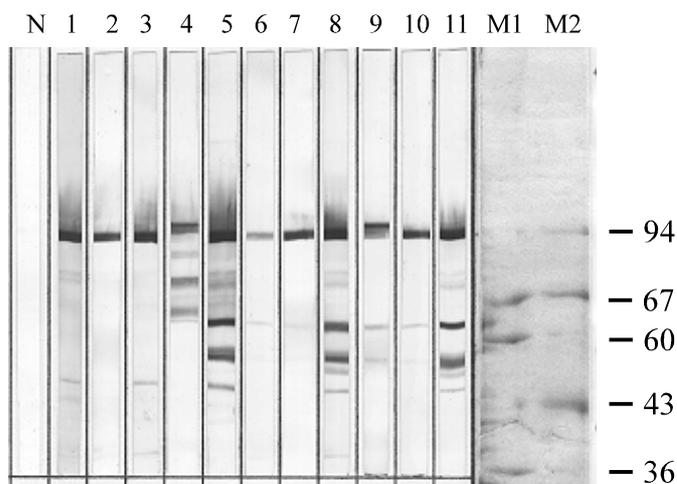


Abb. 3.3: Immunoblot mit B31

Spalte N: Negativkontrolle mit Zellkulturüberstand, 1: 2A6, 2: 2G3, 3: 2G6, 4: 3F2, 5: 8B12, 6: 13A3, 7: 13D12, 8: 14B3, 9: 14F6, 10: 14G9, 11: 17A4, M2: Marker (94 kD, 67 kD u. 43 kD), M1: Marker (220 kD, 67 kD, 60 kD u. 36 kD). Zahlen rechts: Molekulargewichtsangabe in kD

Mit einem kommerziellen ELISA-Kit wurden die Immunglobulinisotypen ermittelt. Wie Tabelle 3.1 zeigt, gehören die monoklonalen Antikörper der IgG-Subklasse 1 an, mit Ausnahme von Klon 3F2, der als einziger ein Immunglobulin der Klasse M darstellt.

mAk	2A6	2G3	2G6	3F2	8B12	13A3	13D12	14B3	14F6	14G9	17A8
Typ	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>1</sub>	IgM	IgG <sub>1</sub>						

Tab. 3.1: Sub-Isotypisierung der monoklonalen Antikörper

### 3.3 Zur Spezifität der monoklonalen Antikörper

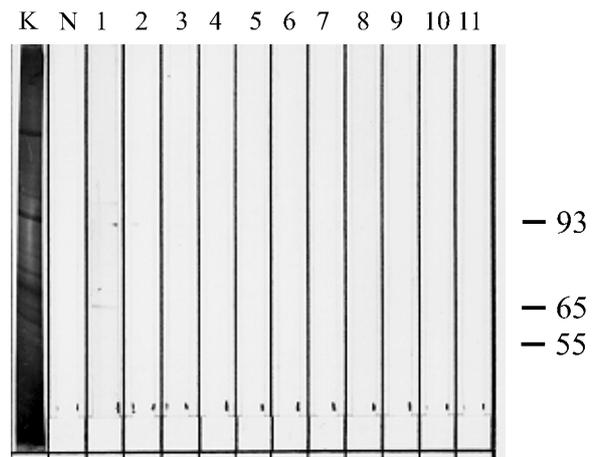
#### 3.3.1 Reaktion der monoklonalen Antikörper gegenüber verwandten Spirochäten

Zur Klärung der Frage, ob Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper mit Antigenen verwandter Bakterien vorliegen, wurden die Zellkulturüberstände der elf antikörperproduzierenden Klone in einer Verdünnung von 1:10 (in Zellkulturüberstand) gegen *Borrelia hermsii* und *Treponema pallidum* im Westernimmunoblot eingesetzt.

Im 7,5 %igen SDS-PAGE für den Immunoblot mit *Borrelia hermsii* sind 150 µl Bakterienlysat mit einer Proteinendkonzentration von 0,42 mg/ml eingesetzt worden. Die Abb.3.4 zeigt das Ergebnis.

Abb.3.4: Kreuzreaktion der monoklonalen Antikörper mit *B. hermsii*

Spalte N: Negativkontrolle Zellkulturüberstand, K: Positivkontrolle mit Antiserum gegen *B. hermsii* (1:250), 1: 2A6, 2: 2G3, 3: 2G6, 4: 3F2, 5: 8B12, 6: 13A3, 7: 13D12, 8: 14B3, 9: 14F6, 10: 14G9, 11: 17A4  
Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD



Keiner der Antikörper hat zur Markierung eines Antigens von *Borrelia hermsii* geführt. Die Negativkontrolle ist mit Zellkulturüberstand durchgeführt worden. Als Positivkontrolle kam ein 1:250 verdünntes Immunsereum eines mit *Borrelia hermsii* immunisierten Kaninchens zum Einsatz.

Gegen *Treponema pallidum* wurden wiederum 1:10 verdünnte Zellkulturüberstände eingesetzt (Abb. 3.5).

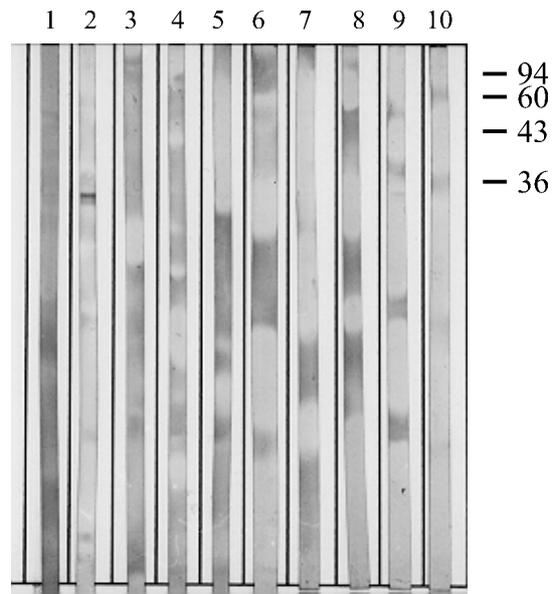
Abb. 3.5: Kreuzreaktion der monoklonalen Antikörper mit *Treponema pallidum*

Spalte 1: 2A6, 2: 2G3, 3: 2G6, 4: 3F2, 5: 8B12, 6: 13A3, 7: 13D12, 8: 14B3, 9: 14F6, 10: 14G9,

Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD;

SDS-PAGE mit 15 % Trisacrylamid.

Entwicklung mit alkalischer Phosphatase und BCIP über 4 min.



Lediglich 2G3 zeigt eine Reaktion mit einem Treponemenantigen bei etwa 35 kD. Weitere Bindungen sind nicht zu erkennen.

Hiervon abgesehen lassen sich zusammenfassend keine Kreuzreaktionen gegenüber *Borrelia hermsii* und *Treponema pallidum* nachweisen, so daß diese monoklonalen Antikörper als weitgehend spezifisch für *Borrelia burgdorferi* anzusehen sind.

### 3.3.2 Reaktion der monoklonalen Antikörper in einem Immunoblot mit rekombinarem p83/100-Antigen

Um die Spezifität der monoklonalen Antikörper gegen das p83/100-Antigen weiter aufzuzeigen, haben wir einen kommerziellen Westernblot eingesetzt (Recomblot®, Firma Mikrogen, München). Dieser Immunoblot verwendet fünf ausgewählte, rekombinant hergestellte Antigene des Stammes PKo (*Borrelia afzelii*). Neben dem p83/100-Antigen,



### 3.4 Bestimmung des isoelektrischen Punktes von p83/100 mittels monoklonaler Antikörper

Um den isoelektrische Punkt des p83/100-Antigens zu bestimmen wurde die 2D-Elektrophorese verwendet. Zur optischen Darstellung diente die Chemilumineszenztechnik (Kap. 2.6.6).

Nach Blotten eines mit dem Borellienstamm B31 bestückten 2D-Elektrophoresegels wurde die PVDF-Membran zunächst mit dem monoklonalen Antikörper 2G3 über Nacht inkubiert. Nach der Markierung dieses Antikörpers mit einem peroxidasekonjugierten Anti-Maus-Antikörper fand die lichterzeugende Reaktion durch Oxidation von Luminol® statt. Das emittierte Licht wurde auf einem Röntgenfilm festgehalten (Abb. 3.7).

Im Anschluß daran wurde der monoklonale Erstantikörper wieder entfernt ("gestrippt", siehe Kap. 2.6.6) und dies durch eine Kontrollaufnahme bestätigt. In einem zweiten Durchgang wurde der monoklonale Antikörper 2A6 (Abb. 3.8) dem selben Verfahren unterzogen; und nach nochmaligem Strippen wurde schließlich das Serum eines Borreliosepatienten (Abb. 3.9) eingesetzt. Dieser litt an einer Lyme-Borreliose im Spätstadium, sein Serum reagierte im routinemäßigen Westernimmunoblot deutlich positiv.

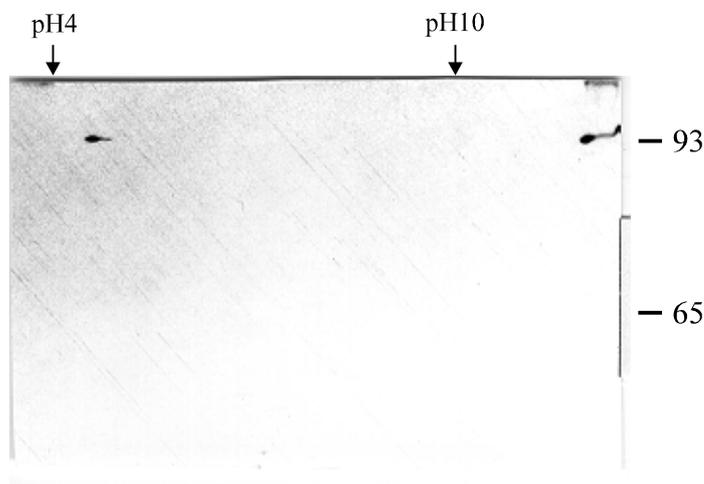


Abb. 3.7: 2D-Chemilumineszenz mit dem monoklonalen Antikörper 2G3

Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD, Zahlen oben: pH-Wert.

Belichtungszeit 3 min.

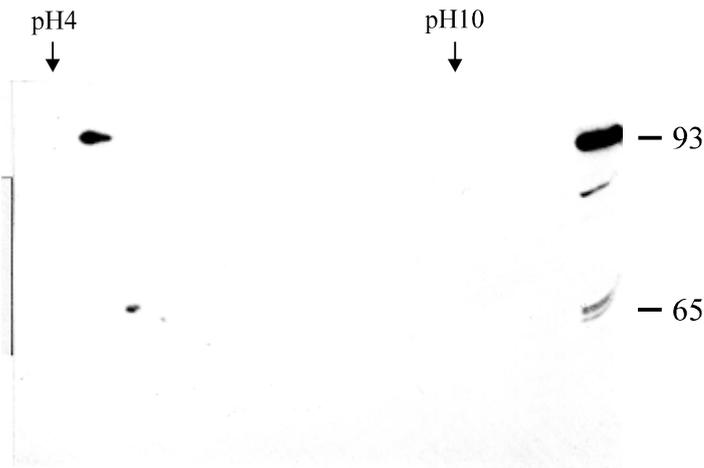


Abb. 3.8: 2D-Chemilumineszenz mit dem monoklonalen Antikörper 2A6

Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD, Zahlen oben: pH-Wert, Belichtungszeit 4 min.

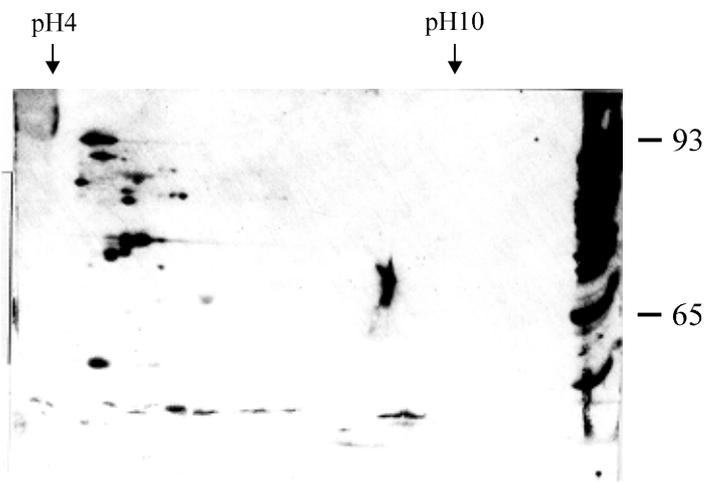


Abb. 3.9: 2D-Chemilumineszenz mit Humanserum

Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD, Zahlen oben: pH-Wert, Belichtungszeit 1 min.

Wie in Abb. 3.7 zu sehen, erkennt 2G3 ein Epitop, dessen zugehöriges Protein sich im hochmolekularen und sauren Bereich ansiedelt. Verglichen mit den Markern Ovalbumin (pH 5,9) und Bovalbumin (pH 4,7-4,9, beide nicht dargestellt) liegt dessen isoelektrischer Punkt (pI) zwischen pH 4,8 und 5,0. 2A6 erkennt das gleiche Makromolekül, wie Abb 3.8 zeigt. Zusätzlich ist noch ein kleineres und basischeres Molekül mit einem Molekulargewicht von 65 kD zu sehen. Das von beiden monoklonalen Antikörpern markierte Antigen ist identisch mit dem größten Protein, das vom Immunsrum des Borreliosepatienten markiert wird.

Mit der Chemilumineszenztechnik ist anschaulich gezeigt, daß die monoklonalen Antikörper 2G3 und 2A6 dasselbe Antigen markieren wie das Antiserum eines an Borreliose erkrankten Patienten. Dieses Protein hat nach unseren Berechnungen ein Molekulargewicht von 93 kD und einen isoelektrischen Punkt im sauren Bereich, der nach den vorliegenden Bestimmungen zwischen pH 4,8 und pH 5,0 liegt. Dieses Molekül ist das größte Antigen, welches von dem Antiserum des Borreliosepatienten im Westernblot markiert wird.

### **3.5 Einflüsse der Antigenaufbereitung auf das p83/100-Antigen**

#### **3.5.1 Einflüsse auf die Haltbarkeit des Borrelienextraktes**

Ziel dieses Versuchsabschnittes war zu untersuchen, welchen Einfluß die Einwirkung von Enzymen und die Lagerungszeit auf das p83/100-Antigen haben. Hierzu wurde die in Kap. 2.3.1 beschriebene Borreliensuspension (B31, Proteingehalt:1,5 mg/ml in PBS) mit Triton X-100 in einer Konzentration von 2 % (v/v) versetzt und sonikiert.

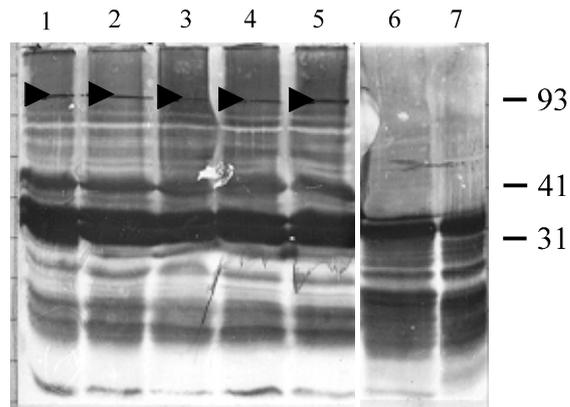
- a) Anschließend wurde die Probe eineinhalb, fünf bzw. 25 Stunden bei Kühlschranktemperatur (4 °C) aufbewahrt. (Abb.3.10, Spalten 1, 3 und 5).
- b) Zusätzlich wurde ein Teil der Probe unter Hinzugabe von 0.02 % Trypsin eineinhalb Stunden bei 4 °C gelagert (Abb. 3.10, Spalte 6).
- c) Als Kontrolle sind alle Ansätze auch unter sofortiger Zugabe eines Proteaseninhibitors (PMSF) durchgeführt worden (Abb. 3.10, Spalten 2, 4 und 7).

Abschließend wurde jede weitere Enzymaktivität unter Zugabe von 2 % (w/v) SDS und zweiminütiges Erhitzen auf 98 °C unterbunden. Es folgte der Auftrag auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (12,5 %) und der nachfolgende Blotvorgang. Abbildung 3.10 zeigt das Bandenmuster in einem doppelt gefärbten Immunoblot. Hierzu ist zunächst die 93 kD-Bande durch den monoklonalen Antikörper 2G3 in einer ersten Färbungsreaktion mit dem Chromogen Carbacol rotbraun gefärbt worden (Pfeil). In einem zweiten Schritt wurde polyklonales Immuserum von Kaninchen B als Markierung eingesetzt, dessen Antigen-Antikörper-Bindung anschließend mit dem Chromogen NBT/BCIP als Blaufärbung sichtbar wurde.

Abb. 3.10: Stabilität und Proteasenempfindlichkeit von p83/100

Spalte 1: 25 h, 2: 25 h mit 20  $\mu$ M PMSF, 3: 5h, 4: 5h mit 20 $\mu$ M PMSF, 5: 1,5 h, 6: 1,5 h mit 0,02 % Trypsin, 7: 1,5 h mit 0,02 % Trypsin und 20  $\mu$ M PMSF; Pfeil: peroxidase-markiertes p83/100-Antigen, Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD

Inkubation bei 4 °C



Die jeweils mit Pfeilen markierte 93 kD-Bande, die das p83/100-Antigen darstellt, ist in den ersten fünf Spalten gut zu erkennen, sie ist im Original deutlich rotbraun gefärbt. In der mit Trypsin versetzten Laufspalte sechs und sieben sind Proteine mit einem Molekulargewicht oberhalb von 35 kD nicht mehr vorhanden. Das OspA mit 31 kD ist noch erkennbar, und im unteren Molekulargewichtsbereich haben sich etliche Fragmente zu einem dunklen Schleier verdichtet.

Insgesamt zeigt sich, daß p83/100-Antigen ohne Zusatz von Proteaseninhibitoren bei 4 °C über mindestens 25 h gelagert werden kann. Eine nennenswerte Fermentierung durch borrelieneigene Enzyme findet dabei nicht statt. Dagegen wird es durch Trypsin vollständig zerstört.

Die Abb. 3.11 zeigt den Immunoblot eines 7,5 %igen Polyacrylamidgels, in dem gelagerte und frische Borrelienpräparationen miteinander verglichen werden. Jene in Spalte 3 und 4 sind vor dem Auftrag frisch aufgetaut worden, die Borrelienproben in Spalte 1 und 2 wurden für 300 Stunden bei 4 °C gelagert. Entgegen dem üblichen Vorgehen wurden die Proben in Spalte 2 und 4 nach der Zugabe von SDS und DTT nicht mehr erhitzt, so daß hier keine vollständige Denaturierung auftrat. Die Abb. 3.11 zeigt die Proteinauftrennung im Immunoblot und unter Verwendung eines polyklonalen Antiserums (Kaninchen B, Verdünnung 1:500). Die Molekulargewichtsmarker in Spalte M1 und M2 wurden mit Coomassie-Blue gefärbt, ebenso die Kontrolle des Blotvorganges rechts im Bild.

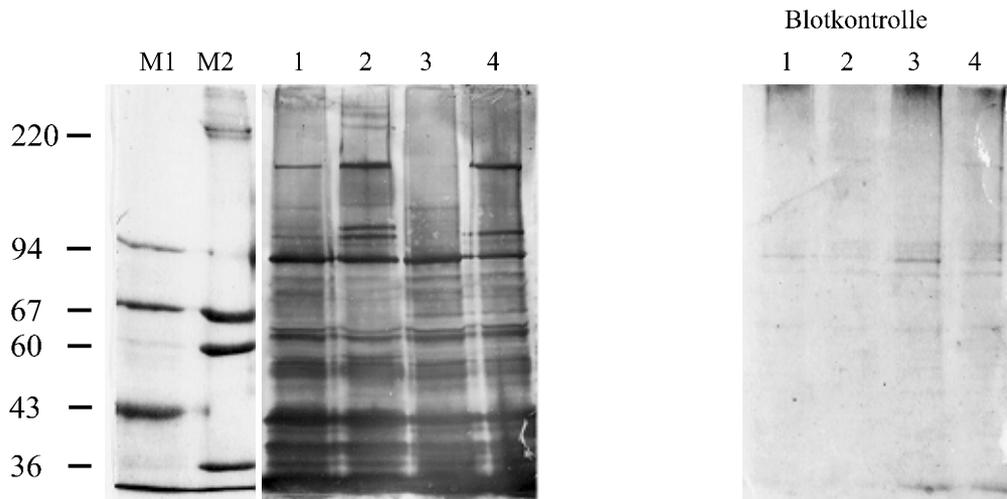


Abb. 3.11: Haltbarkeit und Aggregation von B31 nach 300 h

Spalte M1: Molekulargewichtsmarker (LMW), M2: Molekulargewichtsmarker (HMW), 1: 300 h erhitzt, 2: 300h unerhitzt vor Auftrag, 3: frisch erhitzt, 4: frisch unerhitzt;

Zahlen links: Molekulargewicht in kD

rechts Blotkontrolle der entsprechenden Spalten gefärbt mit Coomassie-Blue; Spalten M1 u. M2 gefärbt mit Coomassie-Blue; Spalten 1-4 markiert mit Serum des Kaninchen B, Färbung mit BCIP 3min.

Ein wesentlicher Unterschied in der Dicke der 93 kD-Bande und somit in der Proteinmenge des p83/100-Antigens läßt sich nicht erkennen. Eine Lagerung des Antigen-Extraktes über mehr als zwölf Tage führt somit zu keinem relevanten Abbau des p83/100-Antigens. In den Spalten 2 und 4, bei denen die Probe nach Zugabe von SDS und DTT nur kurzfristig erhitzt wurde, ist eine Bande zwischen 150 und 160 kD sichtbar sowie eine bzw. zwei Banden bei etwa 100 kD, die in der länger erhitzten Probe in Spalte 3 fehlen.

### 3.5.2 Aggregation des p83/100-Antigens

Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper sollte untersucht werden, ob die unter 3.6.1 angesprochenen Banden, die oberhalb von 93 kD liegen, unter Beteiligung des p83/100-Antigens gebildet werden. Dazu wurde ein 7,5%iges Polyacrylamidgel mit dem Borrelienstamm B31 bestückt und elektrophoretisch getrennt, wiederum wurde nach Zugabe von SDS und DTT auf die Denaturierung durch Erhitzen der Probe verzichtet. Anschließend erfolgte der Blotvorgang und die Inkubation mit den elf monoklonalen Antikörpern.

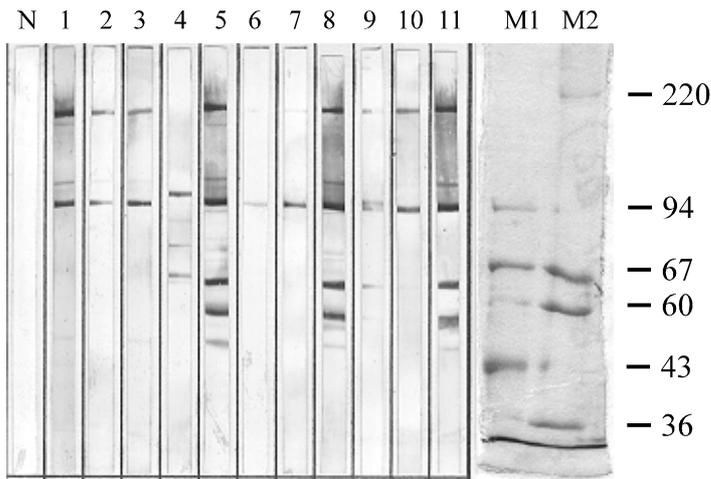


Abb. 3.12: Immunoblot der monoklonalen Antikörper mit B31, unerhitzt

Spalte N: Negativkontrolle mit Zellkulturüberstand, 1: 2A6 2: 2G3, 3: 2G6, 4: 3F2, 5: 8B12, 6: 13A3, 7: 13D12, 8: 14B3, 9: 14F6, 10: 14G9, 11: 17A4, M1: Marker (220 kD, 67 kD, 60 kD u. 36 kD), M2: Marker (94 kD, 67 kD u. 43 kD).

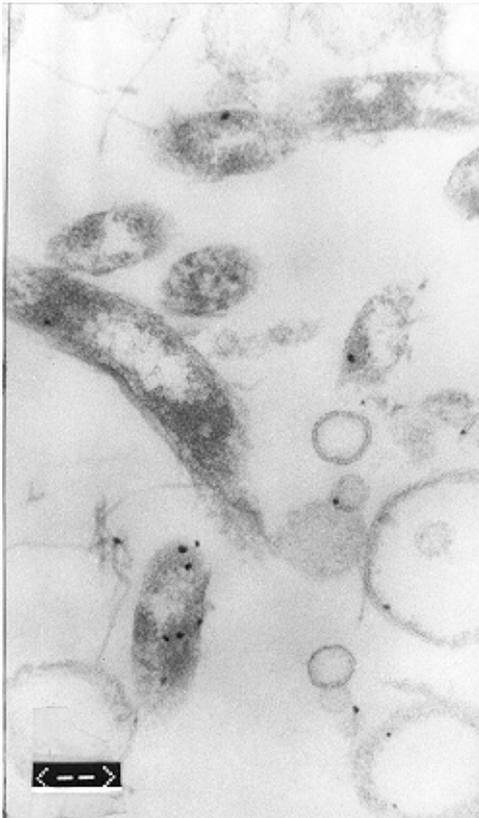
Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD

In Abb. 3.12 markieren fast alle Antikörper neben dem p83/100-Antigen bei 93 kD eine Bande, die bei 155 kD liegt, sowie schwächere Banden bei 140 kD und etwas über 100 kD. Von entscheidender Bedeutung ist, daß auch bei den in Abb. 3.17 gezeigten streng einbandigen Antikörpern 14G9, 13D12 und 2G3 eine Markierung in Höhe von etwa 155 kD auftritt. Dieser Befund spricht für ein Proteinkonglomerat unter Beteiligung des p83/100-Antigens.

Zusammenfassend zeigt sich somit, daß das p83/100-Antigen im nicht vollständig denaturiertem Zustand in Assoziation zu einem weiteren Molekül tritt und dieses Aggregat eine Molekularmasse von etwa 155 kD hat.

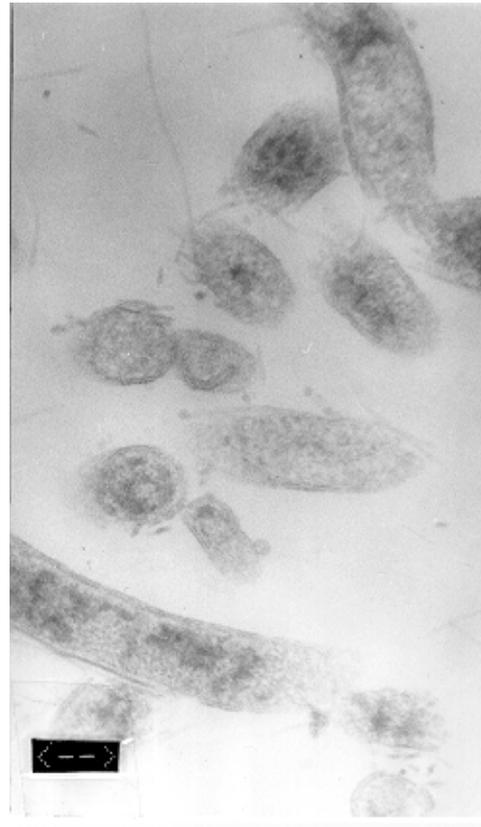
### **3.6 Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Lokalisation des p83/100-Antigens**

Ziel dieser Untersuchung war die Lage des p83/100-Antigens innerhalb des Bakteriums zu bestimmen. Dafür wurde der monoklonale Antikörper 2G3 in elektronenmikroskopischen Untersuchungen verwendet (Vorbereitung siehe Kap. 2.5.3). Er schien dazu geeignet, weil er mit allen untersuchten Borrelien im Immunoblot immer nur eine Bande bei 93 kD zeigte. Die Negativkontrolle ist mit einem gegen  $\alpha$ -Toxin von *Staphylococcus aureus* gerichteten monoklonalen Antikörper durchgeführt worden (siehe Kap. 2.7). Die genaue Aufarbeitung der Borrelien und Markierung mit kolloidalem Gold wurde unter Kap. 2.7 beschrieben.



*Abb. 3.13: 2G3 mit kolloidalem Gold markiert im Transmissionselektronenmikroskop*

Balken = 0,25 μm

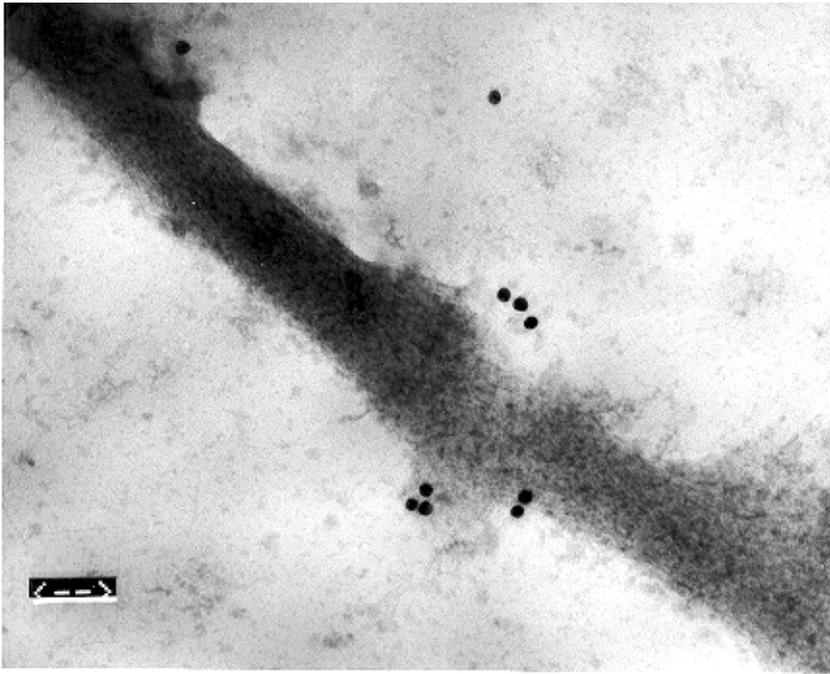


*Abb. 3.14: Negativkontrolle mit einem goldmarkierten unspez. Antikörper im Transmissionselektronenmikroskop*

Balken = 0,25 μm

Abbildung 3.13 zeigt einzelne Goldpartikel, wie sie an Strukturen des Protoplasmazyinders haften. Die Kontrolluntersuchung (Abb. 3.14) mit einem unspezifischen Antikörper zeigt keine Goldteilchen an Borrelienstrukturen. Damit ist gezeigt, daß die in Abb. 3.13 erkennbaren Bindungen an den Borrelienstrukturen durch die spezifische Antikörperbindung von 2G3 vermittelt ist.

Es wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Nachdem die Oberfläche der Borrelien durch Sarcosyl in ihrer Integrität zerstört worden war, wurden die verbliebenen Protoplasmazyylinder mit dem monoklonalen Antikörper inkubiert, der anschließend mit einem goldbehafteten Antikörper markiert wurde. Das Ergebnis zeigt Abb. 3.15.



*Abb. 3.15: p83/100-Antigen goldmarkiert mit 2G3 im Transmissionselektronenmikroskop*

Balken = 0,09  $\mu\text{m}$

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt den Protoplasmazyylinder als ein breites dunkles Band vom linken oberen bis zum rechten unteren Rand des Bildes laufen. Die Randkonturen sind teilweise scharf, zum Teil aber auch unscharf erkennbar. In der Bildmitte sind eindeutig Goldpartikel an den Randstrukturen des Protoplasmazyinders gebunden. Allerdings nur dort, wo die Randkonturen unscharf und etwas “ausgelaufen” erscheinen.

Ausgehend von Abb. 3.15 kann angenommen werden, daß das vom monoklonalen Antikörper 2G3 erkannte Epitop im Randbereich des Protoplasmazyinders gelegen ist. Da dieses Epitop erst nach Zerstörung der Zylinderintegrität zugänglich wird, müßte es auf der Innenseite lokalisiert sein. Dies steht nicht im Widerspruch zu Abb. 3.13, da es sich dort um Borellienquerschnitte handelt. Durch die Anschnitte werden auch bei diesen Borrellien innere Strukturen des Protoplasmazyinders erreichbar.

### **3.7 Reaktionsmuster der monoklonalen Antikörper im Westernblot bei diversen Isolaten von *Borrelia burgdorferi***

Schließlich wurden die monoklonalen Antikörper gegen sieben registrierte Borrelienstämme, 40 regionale Zeckenisolate und gegen ein Hautisolat im Westernblot eingesetzt (siehe Kap. 2.2). Ziel war zu klären, ob Bindungsunterschiede der Antikörper gegen das p83/100-Antigen der einzelnen Isolate und Stämme bestehen und somit Heterogenitäten in diesem Antigen nachgewiesen werden könnten. Als günstige Voraussetzung hierfür erschien die Tatsache, daß einige monoklonale Antikörper nicht nur eine sondern mehrere Banden im Immunoblot markieren.

Es kristallisierten sich in den Untersuchungen durch unterschiedliche Bindungsmuster der monoklonalen Antikörper vier Gruppen heraus, die in den folgenden Abbildungen 3.16 bis 3.23 anhand repräsentativer Beispiele dargestellt sind. Jeweils gleiche Bindungsmuster sind nebeneinander gestellt. Falls vorhanden befindet sich links der eingetragene Referenzstamm und rechts ein regionales Wildisolat. Wie schon bei den Antiseren der Kaninchen (Abb. 3.1 und 3.2) zeigt sich auch ein deutlicher Unterschied im Bindungsmuster der monoklonalen Antikörper gegen die einzelnen Referenzstämme. In Abb. 3.16 reagieren - wie bereits in Abb. 3.3 gesehen - alle Antikörper mit dem Stamm B31, während, wie in Abb. 3.18 zu sehen, deutlich weniger Antikörper mit den Antigenen von N34 (*B. garinii*) reagieren. Zudem bilden die Antikörper 14B3 und 17A4 nur zwei Banden im Immunoblot im Gegensatz zum dreibandigen Bindungsmuster gegenüber B31. Das Affinitätsverhalten der monoklonalen Antikörper gegen Antigene von BO23 (*Borrelia afzelii*) ähnelt dem gegen N34, allerdings bilden hier 14B3 und 17A4 wieder drei Banden (Abb. 3.20). Der Gruppe IV konnte keiner der von uns untersuchten Referenzstämme zugeordnet werden (Abb. 3.22 und 3.23). Das Antikörperbindungsverhalten ähnelt dem gegenüber B31 sehr, als einziger Unterschied fällt auf, daß der monoklonale Antikörper 2A6 nur eine Bande bei 65 kD bildet, jene bei 93 kD jedoch fehlt.

Gruppe I:

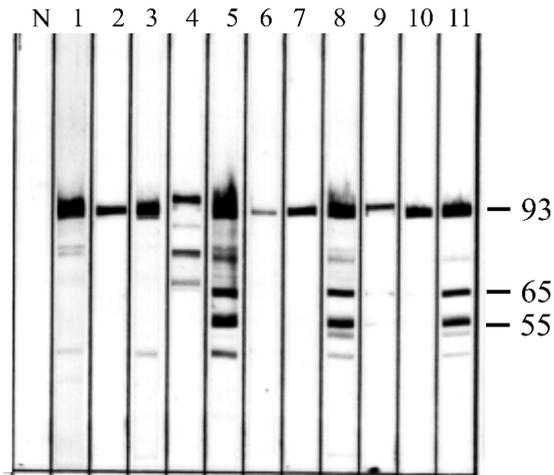


Abb. 3.16: B31 im Immunoblot mit mAk

Spalte N: Negativkontrolle mit Zellkulturüberstand, 1: 2A6 2: 2G3, 3: 2G6, 4: 3F2, 5: 8B12, 6: 13A3, 7: 13D12, 8: 14B3, 9: 14F6, 10: 14G9, 11: 17A4.  
Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD

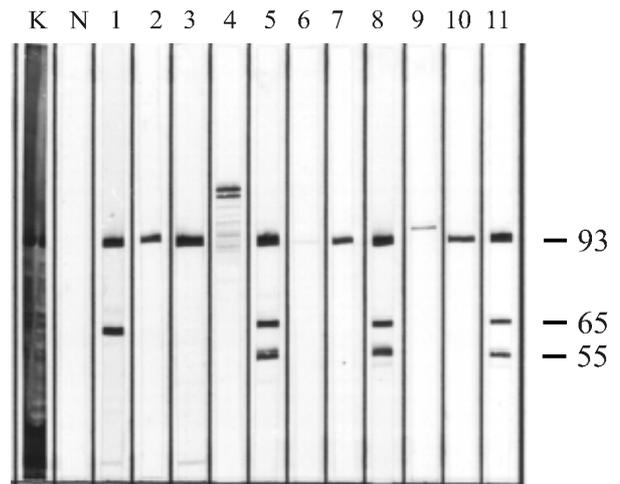


Abb. 3.17: Z 6/7/93 im Immunoblot mit mAk

Spalte K: Positivkontrolle mit Serum Kan. B gegen B31, N: Negativkontrolle mit Zellkulturüberstand, 1: 2A6 2: 2G3, 3: 2G6, 4: 3F2, 5: 8B12, 6: 13A3, 7: 13D12, 8: 14B3, 9: 14F6, 10: 14G9, 11: 17A4.  
Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD

Gruppe II:

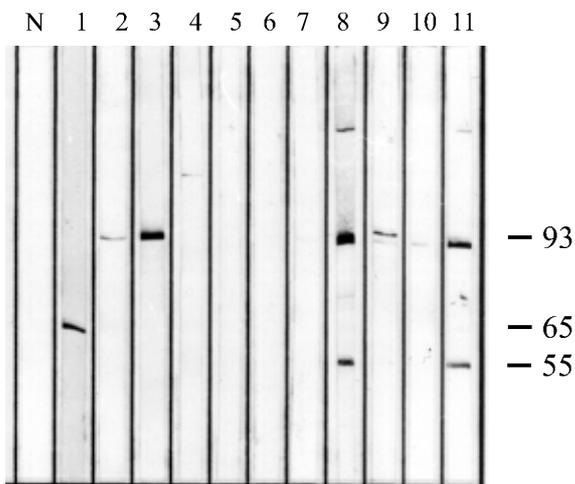


Abb. 3.18: N34 im Immunoblot mit mAk

Spalte N: Negativkontrolle mit Zellkulturüberstand, 1: 2A6 2: 2G3, 3: 2G6, 4: 3F2, 5: 8B12, 6: 13A3, 7: 13D12, 8: 14B3, 9: 14F6, 10: 14G9, 11: 17A4.  
Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD

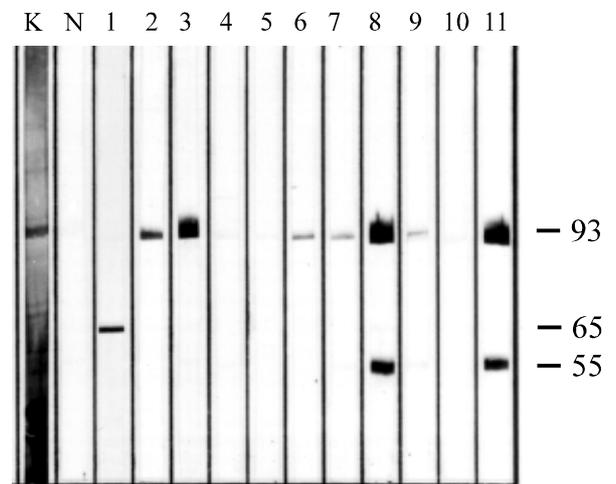


Abb. 3.19: Z 5/60/93 im Immunoblot mit mAk

Spalte K: Positivkontrolle mit Serum Kan. B gegen B31, N: Negativkontrolle mit Zellkulturüberstand, 1: 2A6 2: 2G3, 3: 2G6, 4: 3F2, 5: 8B12, 6: 13A3, 7: 13D12, 8: 14B3, 9: 14F6, 10: 14G9, 11: 17A4.  
Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD

### Gruppe III:

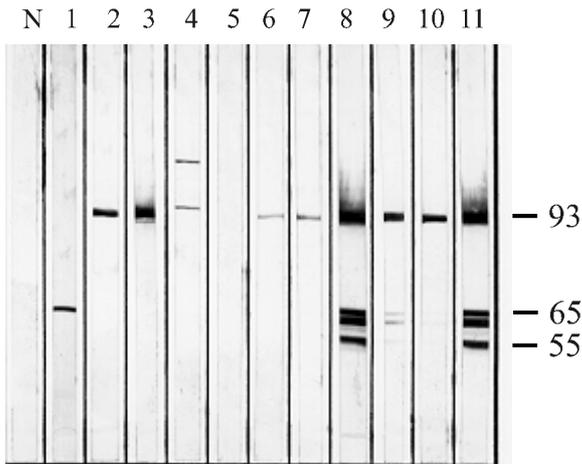


Abb. 3.20: BO 23 im Immunoblot mit mAk

Spalte N: Negativkontrolle mit Zellkulturüberstand, 1: 2A6 2: 2G3, 3: 2G6, 4: 3F2, 5: 8B12, 6: 13A3, 7: 13D12, 8: 14B3, 9: 14F6, 10: 14G9, 11: 17A4.

Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD

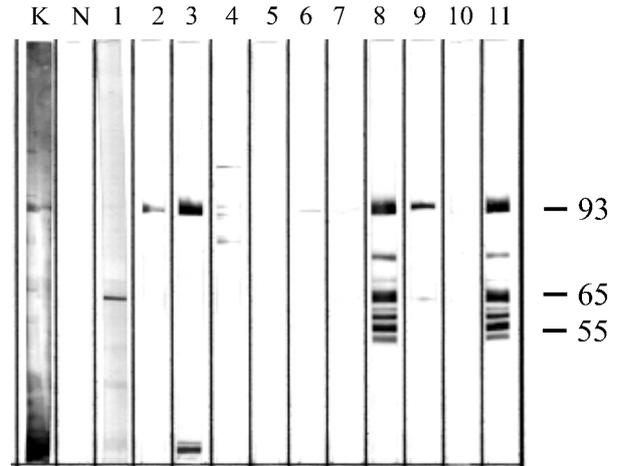


Abb. 3.21: Z 6/11/93 im Immunoblot mit mAk

Spalte K: Positivkontrolle mit Serum Kan. B gegen B31, N: Negativkontrolle mit Zellkulturüberstand, 1: 2A6 2: 2G3, 3: 2G6, 4: 3F2, 5: 8B12, 6: 13A3, 7: 13D12, 8: 14B3, 9: 14F6, 10: 14G9, 11: 17A4.

Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD

### Gruppe IV:

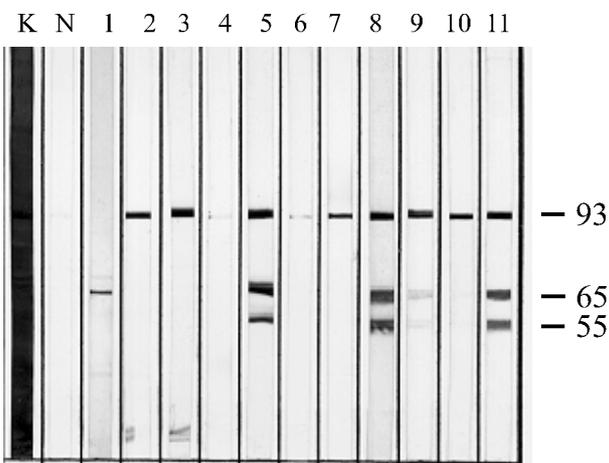


Abb.3.22: Z 4/12/93 im Immunoblot mit mAk

Spalte K: Positivkontrolle mit Serum Kan. B gegen B31, N: Negativkontrolle Zellkulturüberstand; 1: 2A6, 2: 2G3, 3: 2G6, 4: 3F2, 5: 8B12, 6: 13A3, 7: 13D12, 8: 14B3, 9: 14F6, 10: 14G9, 11: 17A4.

Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD

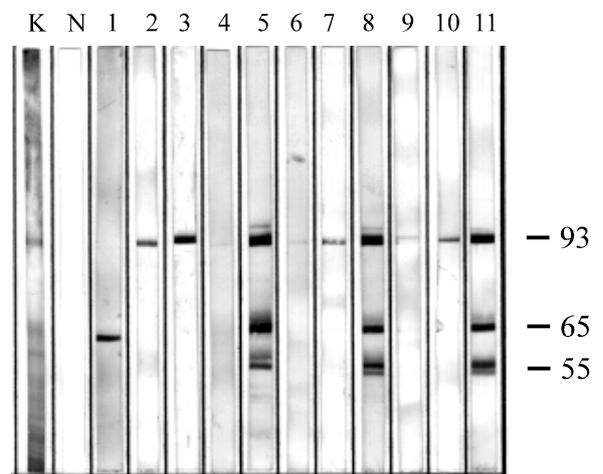


Abb. 3.23: Z 5/73/94 im Immunoblot mit mAk

Spalte K: Positivkontrolle mit Serum Kan. B gegen B31, N: Negativkontrolle Zellkulturüberstand; 1: 2A6, 2: 2G3, 3: 2G6, 4: 3F2, 5: 8B12, 6: 13A3, 7: 13D12, 8: 14B3, 9: 14F6, 10: 14G9, 11: 17A4.

Zahlen rechts: Molekulargewicht in kD

In der anschließend gezeigten Tabelle 3.2 ist die Reaktion der relevanten monoklonalen Antikörper gegen die getesteten Borrelienpopulationen dargestellt (die Bezeichnung der Zeckenisolate aus der Region Gießen ergab sich aus dem Monat, in dem die Isolate gewonnen wurden, einer laufenden Nummer und dem Isolierungsjahr). Es werden ausschließlich die Reaktionsmuster von Antikörpern vorgestellt, die

1. eine eindeutig auswertbare Reaktion mit den Immunoblots der verschiedenen Borrelienisolate bildeten, d.h. eine Bande mußte mit bloßem Auge klar erkennbar oder nicht nachweisbar sein. Z. B. bildete 13A2 im Immunoblot oft sehr schwache Banden, die schwer zu beurteilen waren, weshalb er nicht in die Tabelle aufgenommen wurde (siehe Abb. 3.19 bis 3.21).
2. distinkt waren, d.h. das Reaktionsmuster des Antikörpers mußte bei den verschiedenen Borrelien unterschiedlich sein. Aus diesem Grunde wurden die Bindungsmuster der monoklonalen Antikörper 2G3 und 2G6 nicht in die Tabelle aufgenommen, da sie abgesehen von zwei Ausnahmen mit allen Borrelienisolaten im Immunoblot gleich reagierten.
3. sicher gegen das p83/100-Antigen gerichtet waren. So bildete 3F2 mehrfach Banden im Immunoblot, die deutlich über der 93 kD-Bande lagen, während eine Bande in dieser Höhe fehlte (Abb. 3.16 bis 3.18). 14F6 bildet zwei Banden, eine in Höhe von 93 kD und eine weitere etwas darüber. Häufig ist nur die höher liegende Bande zu sehen. Beide Antikörper wurden mit ihrem Reaktionsmuster folglich nicht in die Tabelle aufgenommen.

*Tab. 3.2: Bindungsmuster ausgewählter mAk mit verschiedenen Borrelienisolaten*

Isolate	2A6	8B12	13D12	14G9	14B3/17A4	Gruppe
*B 31	o	3	1	1	3	I
*DMS4681	o/u	3	1	1	3	I
*IRS	o	3	1	1	3	I
*Z 25	o	3	1	1	3	I
Z 5/17/94	o/u	3	1	1	3	I
Z 5/38/93	o/u	3	1	1	3	I
Z 5/45/94	o/u	3	1	1	3	I
Z 6/151/93	o/u	3	1	1	3	I
Z 6/153/93	o/u	3	1	1	3	I

Fortsetzung der Tabelle

Isolate	2A6	8B12	13D12	14G9	14B3/17A4	Gruppe
Z 6/5/94	o/u	3	1	1	3	I
Z 6/7/93	o/u	3	1	1	3	I
Z 6/8/92	o/u	3	1	1	3	I
Z 6/81/93	o/u	3	1	1	3	I
Z 7/36/92	o/u	3	1	1	3	I
Z 7/45/92	o/u	3	1	1	3	I
Z 7/58/92	o/u	3	1	1	3	I
Z 8/16/92	o/u	3	1	1	3	I
Z 9W6/92	o/u	3	1	1	3	I
Z 5/73/94	u	3	1	1	3	IV
Z 4/14/93	u	3	1	1	3	IV
Z 4/12/93	u	3	1	1	3	IV
Z 5/27/94	u	3	1	1	3	IV
Z 5/10/94	u	3	1	1	3	IV
*BO 23	u	-	+/-	-	3	III
Z 7/22/92	u	-	-	-	3	III
Z 6/11/93	u	-	+/-	-	3	III
*N 34	u	-	-	+/-	2	II
*PBi	u	-	-	1	2	II
Frank 92	u	-	+/-	-	2	II
Z 1/94	u	-	+/-	-	2	II
Z 4/10/93	u	-	-	-	2	II
Z 4/28/93	u	-	1	-	2	II
Z 4/33/93	u	-	-	-	2	II
Z 5/3/94	u	-	-	-	2	II
Z 5/33/94	u	+/-	-	-	2	II
Z 5/41/94	u	-	-	-	2	II
Z 5/46/94	u	-	-	-	2	II
Z 5/50/93	u	-	-	-	2	II
Z 5/60/93	u	-	1	-	2	II
Z 5/7/94	u	-	+/-	-	2	II
Z 6/10/92	u	-	-	-	2	II
Z 6/15/92	u	-	+/-	-	2	II
Z 6/21/94	u	-	-	-	2	II

Fortsetzung der Tabelle

Isolate	2A6	8B12	13D12	14G9	14B3/17A4	Gruppe
Z 6/27/94	u	-	+/-	-	2	II
Z 7/12/94	u	-	1	-	2	II
Z 7/27/92	u	-	+/-	-	2	II
Z 8/2/92	u	-	-	-	2	II
Z 8/6/93	u	-	+/-	-	2	II

*Tab. 3.2: Bindungsmuster ausgewählter mAbs mit verschiedenen Borrelienisolaten*

o: obere Bande (93 kD), u: untere Bande (65 kD), -: keine Reaktion, +/-: uneindeutige Reaktionen  
Zahlen: Anzahl der Banden, I bis IV: Gruppe (willkür.), \*: eingetragener Referenzstamm

Es lassen sich vier Gruppen unterscheiden, wenn man die Bandenbildung von 17A4 bzw. 14B3, 8B12 und 2A6 betrachtet.

Die Reaktion von 17A4 und 14B3 ist in allen Immunoblots identisch, weshalb sie in der Tabelle nicht getrennt aufgeführt wurden. Sie weisen in Gruppe I, III und IV drei Banden und in Gruppe II zwei Banden auf. Auch innerhalb der Gruppe des selben Bindungsmusters war die Bandenbildung dieser mehrbandigen Antikörper gegenüber den verschiedenen Borrelienspopulationen nicht immer identisch (Abb. 3.16, 3.17, 3.19, 3.20 und 3.23). Es wurden daher nur die jeweils kräftigsten Banden gezählt. Sie waren auf Höhe von 93 kD, auf Höhe der unteren Bande von 2A6 und bei 55 kD.

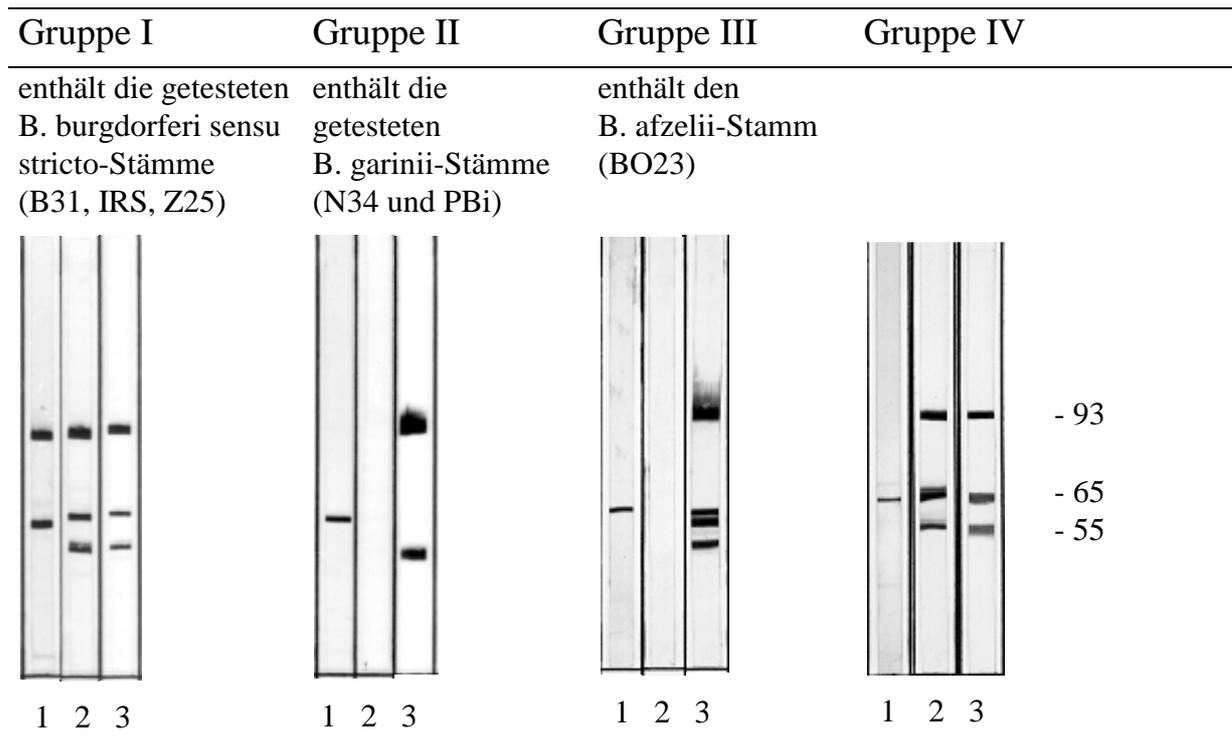
8B12 bildet wie 14B3/17A4 ebenfalls drei prominente Banden bei 93 kD, 65 kD und 55 kD. Dieser Antikörper ist in Gruppe I und IV immer positiv in Gruppe II und III immer negativ (bzw. bei Z 5/33/94 grenzwertig) zu beurteilen.

2A6 bildet eine oder zwei Banden. Die obere Bande bei 93 kD zeigt sich bei allen Borrelien der Gruppe I und nur in dieser. In den drei Borreliensstämmen B31, IRS und Z25, die am längsten in Kultur gehalten und am häufigsten passagiert wurden, ist sie die einzige. Bei allen anderen reagiert auch ein Protein mit einem Molekulargewicht von 65 kD. Bei Borrelien der Gruppe II bis IV erkennt 2A6 nur dieses Molekül. Dieser Antikörper ist somit immer positiv, im Sinne einer Positivkontrolle, aber durch seine Zweibandigkeit auch diskriminativ.

Die einbandigen Antikörper 13D12 und 14G9 reagieren wie 8B12 in Gruppe I und IV immer positiv. In Gruppe II und III zeigt besonders 13D12 ein wechselndes Bindungsverhalten. Hierdurch könnte eine weitere Untergruppe abgegrenzt werden.

Zusammenfassend läßt sich mit den hergestellten monoklonalen Antikörpern eine eindeutige Heterogenität für das p83/100-Antigen bei den sieben Referenzstämmen und 41 Isolaten nachweisen. Viele der monoklonalen Antikörper zeigen Unterschiede in ihrem Bindungsverhalten gegenüber den verschiedenen Borrelienpopulationen. Den größten Diskriminationswert haben dabei die Antikörper 2A6, 8B12, 13D12, 14G9, 14B3 und 17A4. Anhand dieser Antikörper ist eine Einteilung in vier verschiedene Gruppen möglich. Hierbei sind die untersuchten Referenzstämme der einzelnen Genotypen jeweils einer anderen Gruppe zugeordnet, d.h. die vorgenommene Gruppeneinteilung korreliert mit der bereits vorhandenen Einteilung von *Borrelia burgdorferi sensu lato* in die Genotypen *B. burgdorferi sensu stricto* (Gruppe I), *B. garinii* (Gruppe II) und *B. afzelii* (Gruppe III). Die Gruppe IV unterscheidet sich von diesen Gruppen, kommt Gruppe I aber am nächsten und könnte eine Untergruppe davon sein. Unter Mitbetrachtung des Antikörpers 13D12 ergäbe sich eine weitere Unterteilung der Gruppe II (*B. garinii*), da er mit den Antigenen von maximal zehn Wildisolaten in dieser Gruppe positiv reagiert.

Die Einteilung in die erwähnten Gruppen ist auch ausschließlich anhand dreier Antikörper z.B. 2A6, 8B12 und 17A4 möglich, die einzelnen Reaktionsmuster sind in der nachfolgenden Tab. 3.3 vorgestellt.



- 93  
- 65  
- 55

Tab. 3.3: Gruppeneinteilung anhand des Antikörpermusters von 2A6 (Spalte 1), 8B12 (Spalte 2) und 17A4 (Spalte 3)

Zahlen rechts: Molekulargewichte in kD

Mit diesen drei Antikörpern ließe sich somit ohne großen Aufwand eine Einteilung der Borrelienisolate in die einzelnen Subtypen durchführen.

## 4 Diskussion

Die Lyme-Borreliose ist die häufigste durch Zecken übertragene Erkrankung in den USA und Europa und wird durch die Spirochäte *Borrelia burgdorferi* verursacht (19). Aufgrund der großen epidemiologischen Bedeutung laufen aktuell intensive Bemühungen eine wirkungsvolle Vaccine gegen diese Erkrankung herzustellen. Steere et al. berichteten 1998 über erfolgversprechende Versuche mit rekombinant hergestelltem OspA (80). Die Diagnostik dieser Erkrankung stützt sich neben der Klinik weitestgehend auf serologische Methoden. Hierbei spielt das p83/100-Antigen eine wichtige Rolle. Zum einen führt es bei Infizierten zu einer deutlichen Immunantwort, zum anderen zeigen die gebildeten Antikörper kaum Kreuzreaktionen. Laut Bruckbauer et al. gilt das p83/100-Antigen als borrelienspezifisch (18). Antikörper gegen dieses Antigen sind sensitive Marker für die Lyme-Borreliose im Stadium II und III (102). Die Arbeitsgruppe von Wilske verwendet rekombinante Proteine aus dem 100 kD-Bereich, um die Spezifität ihrer Diagnostik zu verbessern (67, 68, 94). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe monoklonaler Antikörper weitere Erkenntnisse über das p83/100-Antigen zu erhalten.

### 4.1 Das p83/100-Antigen

#### 4.1.1 Bestimmung von Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt

Das Molekulargewicht des p83/100-Antigens wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedlich bestimmt; es finden sich Werte von 83 kD bis 100 kD (27, 42, 49, 50, 84, und 100). Ditton et al. konnten über die Analyse N-terminaler Aminosäuresequenzen nachweisen, daß diese Proteine identisch sind (25). Als Gründe für die unterschiedlichen Laufeigenschaften in der Gelelektrophorese vermuteten sie unterschiedliche posttranslationale Prozessierungen. Rössler und Mitarbeiter fanden eine Deletion von 30 Aminosäuren im p83/100-Protein von *B. afzelii*-Stämmen im Vergleich zu den übrigen Borrelienstämmen und zudem zwei mögliche Glykosilierungsstellen, deren alternative Glykosilierung ebenfalls ein verändertes Laufverhalten bewirken könnten (69). In der vorliegenden Arbeit wurde für dieses Protein beim Stamm B31 eine Molekularmasse von 93 kD bestimmt (Abb. 3.11). Um jedoch der möglichen Spannbreite der Molekülmasse Rechnung zu tragen wird es - wie von Rössler et al. vorgeschlagen (69) - im Rahmen dieser Arbeit weiterhin als p83/100-Antigen bezeichnet.

Laut Luft und Mitarbeiter ist es ein labiles Protein und Gegenstand von Fragmentierungen unter Standardbedingungen für Elektrophorese und Immunoblotting (51). Die vorliegenden Untersuchungen zeigen jedoch, daß die Antigenaufbereitungen ohne besondere Vorkehrungen über etwa 12 Tage bei 4 °C haltbar sind. Eine Fermentierung durch bakterieneigene Enzyme findet scheinbar nicht statt, da der Zusatz eines Proteaseninhibitors (PMSF) keinen wesentlichen Unterschied in der Ausbeute dieses Proteins erbrachte (Abb. 3.10 und 3.11). Jedoch wird das p83/100-Antigen durch Trypsin - im Gegensatz zu den oberflächenexponierten „outer-surface“ Proteinen A und B (31 und 34 kD) - vollständig abgebaut (Abb. 3.10). Coleman und Mitarbeiter konnten zeigen, daß keine der antigenen Determinanten dieses Proteins in intakten Borrelien durch Proteasenandau zerstört wird. Es scheint somit nicht oberflächenexponiert zu sein (22).

Wird die Borrelienprobe bei der Solubilisierung mit SDS weniger als eine Minute auf lediglich 80 °C erhitzt, liegt das p83/100-Antigen in Assoziation mit anderen Molekülen vor. Denn Antikörper wie 2G3 und 2G6, die sonst im Immunoblot nur eine Bande zeigen, markieren unter diesen Umständen neben der 93 kD-Bande eine weitere bei 155 kD (Abb. 3.11 und 3.12). Über das oder die in Assoziation getretene(n) Molekül(e) ist nichts bekannt.

Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper und der 2D-Elektrophorese-Technik haben wir für das p83/100-Antigen von *B. burgdorferi sensu stricto* (B31) den isoelektrischen Punkt zwischen pH 4,8 und 5,0 ermittelt (Abb. 3.7 bis 3.9). Damit wäre der Wert von Perng et al. bestätigt, die 1991 den isoelektrischen Punkt des hochmolekularen Proteins von B31 anhand der Aminosäuresequenz auf pH 4,92 errechneten (59). Ihr Protein stimmt bis auf eine Aminosäure mit dem p93 von Luft et al. beschriebenen überein, die in Position 568 statt Serin Arginin aus der Nukleotidsequenz vorhersagten (50). Diese Arbeitsgruppe bestimmte den isoelektrischen Punkt mittels 2D-Elektrophorese jedoch auf pH 6,8. Anda und Mitarbeiter bestimmten ihn mit derselben Methode etwa bei pH 5,8, allerdings ohne Nennung des untersuchten Stammes (3). Insgesamt dürfte auch die Ungenauigkeit der verwendeten Untersuchungsmethoden zur Divergenz in der Bestimmung des isoelektrischen Punktes beitragen.

#### 4.1.2 Zur Lokalisation und Funktion des p83/100-Antigens innerhalb des Bakteriums

Der monoklonale Antikörper 2G3 wurde für elektronenmikroskopische Untersuchungen verwendet. Die subzelluläre Lage des p83/100-Antigens konnte durch diesen hochaffinen Antikörper und Antikörper-gekoppelte Goldpartikel sichtbar gemacht werden. Die Abb. 3.15 veranschaulicht, daß es in den Randstrukturen des Protoplasmazyinders liegt. Die Goldpartikel sind allerdings nur in den Abschnitten zu sehen, in denen die Integrität der Zylinderwand zerstört ist und die inneren Schichten zugänglich sind. Demzufolge liegt das Epitop von 2G3 wohl auf der Innenseite der Zylinderwand oder an der darunter liegenden Protoplasmamembran. Anteile des p83/100-Antigens sind somit auf der Innenseite des Protoplasmazyinders vorhanden. Luft et al. hatten schon 1992 mittels eines goldmarkierten Antikörpers elektronenmikroskopische Aufnahmen vom p83/100-Antigen erhalten. Ihnen war es nicht möglich zu bestimmen, ob es auf der Oberfläche des Protoplasmazyinders lokalisiert ist; angesichts der Lage und voraussichtlichen helikalen Struktur mutmaßten sie, das Protein könnte Bestandteil einer helikalen Fibrille auf der Oberfläche des Protoplasmazyinders sein (50). Bereits 1991 konnten Volkmann und Mitarbeiter eine Assoziation des p83/100-Antigens zum Flagellin nachweisen, indem sie nach Aufreinigungsschritten durch Separation und Solubilisierung von Borrelienpräparationen diese beiden Proteine in den selben Fraktionen wiederfanden (85). Hinzu kommt, daß Eiffert et al. 1992 berichteten, sie hätten ein rekombinantes Protein (p200) hergestellt, dessen korrespondierendes Nativprotein ein Molekulargewicht von 97 kD hätte. Dieses wurde mittels monoklonaler Antikörper eindeutig als im periplasmatischen Raum liegend und flagellenassoziiert identifiziert (27). Ob dieses Protein mit dem p83/100-Antigen identisch ist, ist jedoch nicht erwiesen.

Wenn das p83/100-Antigen zum einen mit den im periplasmatischen Raum gelegenen Flagellen, zum anderen mit der Innenseite der Grenzstrukturen des Protoplasmazyinders verbunden ist, könnte es sich um ein integrales Zellwandprotein handeln, das z.B. zur Verankerung der Flagellen dient, wie bereits Volkmann vermutete (85).

Über die genaue Funktion des p83/100-Antigens im Zellstoffwechsel oder in der Pathogenese der Lyme-Borreliose ist wenig bekannt. Obwohl es im bakteriellen Organismus nur in kleinen Mengen vorkommt und offensichtlich nicht an der Oberfläche exponiert ist, erzeugt es doch eine starke Immunantwort. Urban et al. konnten nachweisen, daß ein 94 kD-Protein Penicillin bindet und schreiben ihm deshalb eine Rolle in der Zellwandsynthese des Protoplasmazyllinders zu, was die Annahme von der subzellulären Lage des Proteins als integraler Zellwandbestandteil stützt (84).

## **4.2 Heterogenität der Spezies *Borrelia burgdorferi***

### **4.2.1 Allgemeines**

Die Tatsache, daß ECM-assoziierte Arthritiden vorrangig in Nordamerika beschrieben wurden, die kutanen und neurologischen Krankheitsbilder jedoch mehr im europäischen Raum auftreten, führte zu der Vermutung, bestimmte Phänotypen von *Borrelia burgdorferi* würden die Manifestationsform der Erkrankung beeinflussen (12). Zwar stellt sich die Spezies bildgebend homogen dar, es lassen sich aber laborchemisch eindeutige Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen von *Borrelia burgdorferi* finden.

Barbour schlug erstmals 1986 ein Typisierungssystem vor, das auf der Agglutination von Borrelien durch monoklonale Antikörper beruhte, die gegen das an der Borrelienoberfläche exponierte OspA gerichtet waren. Er erhielt damit drei Serotypen innerhalb der Spezies (8). Wilske und Mitarbeiter verfeinerten das Verfahren und konnten mit acht monoklonalen Antikörpern und zwölf polyklonalen Antiseren gegen OspA und OspB sieben Serotypen unterscheiden (98).

Neben diesen immunologischen wurden auch molekularbiologische und proteinchemische Methoden zur Subtypisierung von *B. burgdorferi* eingesetzt. Baranton und Marconi machten sich die Heterogenität der 16S-Untereinheit der Ribosomen zur Einteilung zunutze (7, 54), Boerlin et al. führten Elektrophoresen von elf verschiedenen Enzymen durch. Sie erhielten aufgrund vorhandener Isoenzyme 35 verschiedene sogenannte Elektrophoresetypen (16). Andere Autoren bedienten sich zur Subtypisierung der Inhomogenität des Genoms selbst. Nach Fermentierung der gesamten bakteriellen DNA durch Restriktionsendonukleasen erhielten sie unterschiedlich lange Nukleinsäurestränge. Diese sogenannten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen dienten als Grundlage für die Gruppenzuordnung (55, 65, 86, 100).

Ab 1992 kam es zur Formulierung sogenannter Subspezies oder Genotypen innerhalb der Spezies *Borrelia burgdorferi*, die seitdem *Borrelia burgdorferi sensu lato* heißt. Eine erste Einteilung erfolgte in drei Subspezies mit dem Namen *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* und *B. afzelii* (7). Mittlerweile sind weitere Subtypen beschrieben worden. So beschrieben bereits 1993 Fukunaga und Mitarbeiter eine japanische Borreliensubspezies die sich von den bisher beschriebenen unterschied und kurz darauf mit *Borrelia japonica* benannt wurde (29, 45). 1997 schlugen Wang et al. für die Gruppe VS116 und M19 den neuen Namen *Borrelia valaisiana* vor (87), im gleichen Jahr definierten Le Fleche und Mitarbeiter ein divergentes Borreliencluster als *Borrelia lusitaniae* (48), und 1998 erhielt eine hauptsächlich in Kalifornien befindliche Borrelienuntergruppe (DN127) den Namen *Borrelia bissettii* (66).

#### 4.2.2 Polyklonale Immunantwort in Kaninchen

Schon bei der Immunisierung von Kaninchen hat sich gezeigt, daß Antigenpräparationen aus verschiedenen Borrelienstämmen zu unterschiedlicher Antikörperbildung bei den Tieren führen. Wie in Kap. 2.4.1 beschrieben, wurden sechs Kaninchen mit Zellysaten der vier Borrelienstämme B31, IRS, N34 und Z25 immunisiert. Dabei zeigte sich, daß die Antiseren der Tiere, die mit den *B. burgdorferi sensu stricto* Stämmen B31, IRS und Z25 immunisiert waren, Antigene im hochmolekularen Bereich von N34 (*B. garinii*) nicht erkennen. Nur das mit N34 selbst immunisierte Tier und die subkutan stimulierten Kaninchen bilden eine erkennbare Antikörperreaktion gegen das p83/100-Antigen. Der grundsätzliche zeitliche Verlauf in der Entwicklung der Immunantwort ist bei allen intravenös immunisierten Tieren ähnlich. Erste Antikörper bilden sich nach knapp vier Wochen, die maximale Antikörperreaktion ist nach 90 Tagen erreicht. Die subkutan unter Zugabe eines Adjuvans immunisierten Tiere zeigen die maximale Antikörperreaktion ebenfalls nach etwa 90 Tagen, die spezifische Antikörperbildung beginnt hier jedoch erst nach etwa sechs Wochen.

Antigene einer Borrelienpopulation, die nicht dem Subtyp angehört, mit dem ein Mensch oder Tier immunisiert bzw. infiziert wurde, reagieren also nicht sicher mit dem erzeugten Antiserum. Dies hat weitreichende Folgen für die Diagnostik und Prophylaxe der Lyme-Borreliose. Denn bei der Erstellung serologischer Tests müßte sichergestellt sein, daß die als Antigenquelle verwendeten Borrelienstämme alle Borellien(sub)typen repräsentieren, die als Infektionsquelle in einer Region vorkommen (34). Auch bei der Entwicklung einer

Vaccine wäre es erforderlich Impfmateriale zu erzeugen, das bei Inokulation eine Antikörperbildung anregt, die Schutz gegen alle relevanten Borreliensubtypen bietet.

#### 4.2.3 Reaktion der monoklonalen Antikörper gegen das p83/100-Antigen

Die auffallende Divergenz in der Immunreaktion von Kaninchen gegenüber dem p83/100-Antigen veranlaßte uns zu weiteren Untersuchungen. Das Protein wurde aus einem SDS-Polyacrylamidgel durch Elektroelution isoliert und zur Immunisierung von Mäusen mit dem Ziel zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet. Es konnten elf verschiedene murine Antikörperklone stabil in Kultur gehalten werden, die zur weiteren Charakterisierung des p83/100-Antigens dienen.

Mittels eines Chemilumineszenzverfahrens konnte exemplarisch mit den monoklonalen Antikörpern 2A6 und 2G3 gezeigt werden, daß diese tatsächlich gegen das immun-dominante p83/100-Antigen gerichtet sind. Bei der genannten Untersuchung wurden die Proteine eines Borrelienlysates (B31) erst in einem Kapillargel nach ihrem isoelektrischen Punkt und anschließend in einer SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Daraufhin erfolgte die Überführung auf eine Blotmembran. Das so fixierte Antigenmaterial wurde nacheinander mit den erwähnten monoklonalen Antikörpern und anschließend mit einem Patientenserum markiert und jeweils in einem lichterzeugenden Schritt auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Dabei war der von 2G3 und 2A6 gebildete Spot identisch mit dem größten Protein, welches vom Immuneserum eines Patienten mit Lyme-Borreliose im Spätstadium markiert wurde (Abb. 3.7 bis 3.9).

Ein weiterer Beweis für die Affinität der hergestellten monoklonalen Antikörper zu dem p83/100-Antigen ergibt sich aus dem Bindungsverhalten in einem rekombinanten Immunoblot (Recomblot®, Fa. Microgen, München). In dem Blot wird ein rekombinantes 100 kD-Protein von Stamm PKo (*B. afzelii*) als Antigen verwendet. Wie in Abb. 3.6 zu sehen, zeigen sechs der monoklonalen Antikörper eine hohe Affinität zu dem Protein, während Antikörper 2A6, 3F2, 8B12, 14F6 und 14G9 keine Bande markieren. Aus der Chemilumineszenzuntersuchung war jedoch bereits nachgewiesen, daß auch 2A6 an das p83/100-Antigen vom Stamm B31 bindet. Die fehlende Bindung in den genannten Fällen ist also auf eine differente Epitopbildung der Afzelii-Stämme zurückzuführen.

Unterschieden werden müssen davon allerdings die monoklonalen Antikörper 3F2 und 14F6, deren Bande im Immunoblot etwas von den anderen abweicht. Hier könnte es sich wirklich um ein anderes Protein handeln, daher wurden sie in weiteren Experimenten nicht verwendet.

Die Spezifität der hier vorgestellten Antikörper wurde im Immunoblot gegen *Borrelia hermsii* und *Treponema pallidum* untersucht. *Borrelia hermsii* ist phylogenetisch der nächstverwandte Stamm (11) und Bruckbauer konnte gelegentliche Kreuzreaktionen gegen dessen Antigene nachweisen (18). Von Syphilitikern ist ebenfalls bekannt, daß sie kreuzreagierende Antikörper gegen Borrelien besitzen. In unseren Untersuchungen bildet nur der Antikörper 2G3 eine schwache Bande mit einem Antigen von *Treponema pallidum* bei ca 35 kD (Abb. 3.4 und 3.5), so daß die monoklonalen Antikörper als weitestgehend spezifisch für *B. burgdorferi sensu lato* anzusehen sind.

Die Mehrbandigkeit mancher monoklonalen Antikörper im Westernblot mag auf den ersten Blick ungewöhnlich erscheinen, da per definitionem nur jeweils ein Epitop von einer Antikörperpopulation erkannt wird. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine Fragmentierung des p83/100-Antigens zu kleineren Bruchstücken, welche ebenfalls vom Antikörper markiert würden. Es ist jedoch auch denkbar, daß völlig unterschiedliche Proteine der Spirochäte identische Epitope - sogenannte „shared epitopes“ - ausbilden, die dann jeweils von den monoklonalen Antikörpern angezeigt werden. Einer der zuerst beschriebenen monoklonalen Antikörper gegen das p83/100-Antigen erkennt auch Antigene mit einem Molekulargewicht von 46 kD und 30 kD (85). Anda et al. beschrieben einen monoklonalen IgM-Antikörper, der mit etwa 30 verschiedenen Polypeptiden von *Borrelia burgdorferi* reagierte (3). Das markierte Molekül mit der größten Molekularmasse wurde mit 93 kD bestimmt. Da Proteaseninhibitoren das Bandenmuster dieses Antikörpers nicht veränderten, hielten sie die Bildung von Fragmenten durch endogene Proteasen für unwahrscheinlich. Die Ansequenzierung einiger, von diesem Antikörper erkannter, Antigene ergab bei einem Polypeptid mit 72 kD eine identische Sequenz zu einem „heat shock protein“, dem DnaK-Homolog von *Borrelia burgdorferi*. Bei einem weiteren Protein von 38,5 kD stimmte die Aminosäuresequenz mit der von Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase anderer Bakterien überein. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß ein Teil der Reaktivität des monoklonalen Antikörpers aufgrund der Fragmentierung größerer Proteine (mechanisch, chemisch) entsteht, meinen diese Autoren, daß in mindestens drei Fällen nicht verwandte Antigene von *Borrelia burgdorferi* gemeinsame

Epitope bilden. Ein Teil unserer Ergebnisse bestätigt diese Angabe, z.B. markiert 2A6 in manchen Stämmen die 93 kD-Bande nicht mehr, jene bei 65 kD allerdings weiterhin. Wäre das kleinere Protein lediglich ein Fragment des größeren, müßte mit dem Verlust des einen Epitopes diese Bande ebenfalls verschwunden sein. Der Verlust der 65 kD-Bande bei Erhalt der hochmolekularen, oder die bei manchen Isolaten fehlende Bande von 14B3/17A4 bei 65 kD weisen ebenfalls darauf hin, daß sich einzelne Epitope verändert haben oder ganze Proteine nicht mehr exprimiert werden. Zum Beispiel könnten plasmidkodierte Antigene, die dasselbe Epitop wie das chromosomal kodierte p83/100-Antigen ausbilden, verloren gegangen sein. Denn 1988 schrieben Schwan et al., daß nach 15maligem Passagieren einer Borrelienkultur zwei Plasmide verlorengegangen seien und OspB nicht mehr exprimiert würde (71). Damit einher ging auch die Infektiosität der Borrelien in Mäusen verloren. So verwundert es nicht, daß gerade in den am häufigsten passagierten Stämmen (B31, IRS, Z25) keine 65 kD-Bande von 2A6 zu sehen ist (Abb. 3.16 und Tab.3.2).

Diese Beobachtungen schließen eine Fragmentierung des p83/100-Antigens nicht aus. Eines der besten Hinweise für seinen Zerfall gibt der von Wilske et al. vorgestellte kommerziell erhältliche rekombinante Immunoblot. Dort markieren positive Kontrollseren Banden, die zwischen p100 (p83/100 des Stammes PKo) und p41 liegen, obwohl nur diese beiden und noch kleinere Antigene aufgetragen wurden (94). Besagte Banden können nur durch Fragmentierung des größeren Proteins entstanden sein. Es dürften somit mehrere Vorgänge für die Bandenvielfalt monoklonaler Antikörper im Immunoblot verantwortlich sein.

#### 4.2.4 Reaktion der monoklonalen Antikörper gegen das p83/100-Antigen verschiedener Borrelien

Die eben beschriebene Heterogenität der monoklonalen Antikörper gegenüber einzelnen Borrelienstämmen führte zu ausgedehnteren Untersuchungen. Ihr Bindungsverhalten wurde gegen sieben aus der Literatur bekannte Borrelienstämmen (B31, BO23, IRS, N34, Pbi, Z25 und DMS4681), 40 regionale Zeckenisolate und gegen ein Hautisolat getestet. Die Antikörper zeigen ein deutlich differentes Erkennungsmuster gegenüber den einzelnen Borrelienisolaten (Tab. 3.2).

Aufgrund dieses divergenten Bindungsverhaltens der Antikörper lassen sich die untersuchten Borrelienpopulationen in verschiedene Gruppen einteilen. Zu den Antikörpern, die eine hohe Diskriminationskraft haben, d.h. die zuverlässig zwischen den einzelnen Gruppen unterscheiden können, zählen 2A6, 8B12, 13D12, 14G9 und 17A4 bzw. 14B3.

In **Gruppe I**, der die *Borrelia burgdorferi sensu stricto*-Stämme (B31, DMS4681, IRS, Z25) angehören, reagieren alle eben erwähnten Antikörper mit den Bakterienlysaten und bilden eine oder mehrere distinkte Banden im Immunoblot. Dabei zeigt 2A6 immer eine obere und meistens eine untere Bande, 17A4 und 8B12 zeigen drei Banden (Näheres siehe Kap. 3.8). Von den 41 regionalen Borrelienisolaten gehören 14 zu dieser Gruppe (34%).

In **Gruppe II**, in die *B. garinii*-Stämme (PBi, N34) enthalten sind, reagieren lediglich 2A6 und 17A4 mit den Borrelienextrakten, wobei 2A6 nur eine untere Bande (65 kD) und 17A4 zwei Banden zeigt (Kap. 3.8). In dieser Gruppe sind 20 von 41 der regional gewonnenen Borrelien enthalten (49%). Hier ließe sich weiterhin unter Betrachtung des Antikörpers 13D12 eine zusätzliche Untergruppe bilden.

In **Gruppe III**, in der sich der *B. afzelii*-Stamm BO23 befindet, unterscheidet sich die Antikörperreaktion von der in Gruppe II lediglich dadurch, daß 17A4 drei Banden mit den Borrelienlysaten im Immunoblot zeigt. Zu ihr zählen zwei der regional gewonnenen Borrelien (knapp 5%).

In der **Gruppe IV** reagieren die monoklonalen Antikörper wie in Gruppe I, als einziger Unterschied zeigt 2A6 jedoch nur eine untere Bande im Immunoblot. Nach diesem Schema reagieren fünf von 41 der regional gewonnenen Borrelien (12%). Zusammen machen Gruppe I und IV 46% der regionalen Borrelienpopulation aus.

Die hier ermittelte Verteilung der regional gewonnenen Borrelien auf die jeweilige Subspezies von *Borrelia burgdorferi sensu lato* stimmt im Wesentlichen mit Untersuchungen aus der Schweiz und den Niederlanden überein. So bestimmten Nohlmans et al. bei 63 niederländischen Isolaten die Fragmente der ribosomalen RNA nach Restriktionsendonukleasenverdau und erhielten dabei vier Gruppen (55). Demnach gehörten 46 % zu *B. burgdorferi sensu stricto*, 30 % zu *B. garinii* und 3 % zu *B. afzelii*. 21 % gehörten der eindeutig differenten Gruppe M19 an. Peter und Mitarbeiter untersuchten 50 Walliser Zeckenisolate anhand ihrer Heterogenitäten bzgl. des OspA und OspB und erhielten neben *B. burgdorferi sensu stricto* (52 %), *B. garinii* (38 %) und *B. afzelii* (6 %) ebenfalls eine vierte Gruppe, die sie VS116 (4 %) nannten (61). 1997 sind

diese beiden Untergruppen von Wang et al. zur neuen Subspezies *Borrelia valaisiana* zusammengefaßt worden (87). Will meinte schon 1995, daß sich vor allem *B. garinii* durch eine besondere Serotypenvielfalt auszeichne und heterogener sei als die übrigen bis dahin definierten Subspezies (91).

Bereits an diesen wenigen Beispielen lassen sich zwei unterschiedliche Vorgehensweisen bei der Einteilung der Borrelien in Subtypen unterscheiden. Manche Untersucher orientieren sich am Genprodukt, den Proteinen, andere am Genom selbst. Wilske et al. verwendeten ein immunologisches System zur Subtypisierung von *B. burgdorferi sensu lato*, sie fertigten einen Agglutinationstest mit mono- und polyklonalen Antikörpern gegen OspA und B an (98). In ihrer Arbeit werden 136 verschiedene Borrelienisolat bzw. Stämme - u.a. alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Referenzstämme - untersucht und in sieben Serotypen eingeteilt. Zudem erfolgte eine Validierung der Ergebnisse, indem sie Sequenzen ribosomaler RNA und der Aminosäuren untersuchten. Andere Arbeitsgruppen untersuchten direkt die DNA oder RNA. Baranton und Marconi machten sich die Heterogenität der 16S-Untereinheit der Ribosomen zur Einteilung zunutze (7, 54). Eine weit verbreitete Methode ist die ebenfalls schon erwähnte Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen von DNA-Abschnitten nach Fermentierung durch Restriktionsendonukleasen (55, 65, 86, 100). Die Gruppenzuordnung bzgl. der von uns verwandten Referenzstämme, soweit sie dort untersucht wurden, ist in allen Arbeiten identisch und soll in der nachfolgenden Tabelle nochmals kurz dargestellt werden.

<b>Arbeitsgruppe\Genotyp</b>	<b>B. burgd. sensu stricto</b>			<b>B. garinii</b>		<b>B. afzelii</b>
Baranton et al. (Antikörpermuster und rRNA-Fragment)	B31	IRS		Pbi	N34	BO23
Wilske et. al. (Osp A-Serogruppe)	B31	IRS	Z25	Pbi	N34	BO23
Boerlin et. al. (Elektrophorese-gruppe)	B31	IRS		Pbi	N34	
Marconi et al. (rRNA-Fragment)	B31			Pbi	N34	BO23
Postic et. al. (RFLP-Gruppe)	B31			Pbi	N34	BO23
Wallich et al. (RFLP-Gruppe)	B31		Z25		N34	BO23
Welsh et al. (genomic fingerprint)	B31			Pbi	N34	BO23

*Tab. 4.: Einteilung der Referenzstämme*

Die aufgeführten Borrelienstämme sind unter dem jeweiligen Genotyp, den die einzelnen Arbeitsgruppen herausfanden, verzeichnet

Die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen entsprechen einander und begründen die von Baranton 1993 vorgenommene Subtypisierung in die drei Genotypen *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* und *B. afzelii*.

Ein Vorteil immunologischer Methoden liegt in ihrer relativ einfachen Durchführbarkeit. Die Problematik phänotypischer Merkmale als Grundlage einer „Genotypisierung“ bleibt jedoch darin bestehen, daß man mit der Betrachtung des Genproduktes relativ weit vom Genom entfernt ist und Gefahr läuft, durch posttranslationale Veränderungen am Protein falsche Rückschlüsse auf das kodierende Gen zu ziehen. Ebenso kann die genetische Information bei fakultativer Expressierung eines Genproduktes verloren gehen. Erschwert wird die Beurteilung, wenn plasmidkodierte Antigene wie die „outer-surface“ Proteine untersucht werden. Da Plasmide als sogenannte Satelliten-DNA nicht zum Hauptchromosom eines Bakteriums gehören, ist ihre Informationsweitergabe vielmehr äußeren Einflüssen unterworfen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kompromiß zwischen den erwähnten Vor- und Nachteilen immunologischer Methodik versucht, indem die Heterogenitäten eines chromosomal kodierten Antigens untersucht wurden. Dessen Ausprägung ist kaum durch Außenfaktoren zu beeinflussen, sondern ist im wesentlichen von Veränderungen im Genom selbst abhängig. Wie bereits erwähnt, kann dadurch mit einfachen laborchemischen Verfahren wie Gelelektrophorese und Westernblot eine zuverlässige und distinkte Gruppierung der Referenzstämme in die bekannten Subtypen vorgenommen werden. Die untersuchten regionalen Isolate lassen darüber hinaus eine weitere Untergruppierung vermuten. So sind in der Gruppe IV fünf Zeckenisolate, bei denen sich im Vergleich zu Gruppe I lediglich 2A6 vom Bindungsverhalten unterscheidet, und in der Garinii-Gruppe sind zehn Wildtypen, die im Gegensatz zu den anderen positiv mit 13D12 reagieren.

Eine Identifizierung der Subtypen von *Borrelia burgdorferi sensu lato* erscheint sinnvoll, da verschiedene Arbeiten den Schluß nahelegen, daß die einzelnen Genotypen das klinische Bild der Lyme-Borreliose entscheidend mitprägen. So isolierten Nohlmanns und Mitarbeiter ausschließlich Borrelien der Gruppe *afzelii* aus Hautbiopsaten von Patienten mit ECM (55); Wienecke et al. wiesen Borrelien dieser Gruppe hauptsächlich bei ACA-Patienten nach (90). Anthonissen untersuchte 1994 Seren verschiedener Borreliosepatienten im Immunoblot und konnte zeigen, daß die Seren der Arthritiker vorrangig mit *B. burgdorferi sensu stricto*, die der Patienten mit Neuroborreliose eher mit *B. garinii* und die

von ACA-Patienten am besten mit Westernblots von *B. afzelii* reagierten (4). Wenn dies zutrifft, spiegelt dann die Häufigkeit der einzelnen Manifestationsformen die Verteilung der einzelnen Borrelienpopulationen in den Zecken der jeweiligen Region wider? Oder besitzen die verschiedenen Subtypen unterschiedliche Virulenz? Wenn ca 50% der europäischen Zeckenisolate der Subspezies *B. burgdorferi sensu stricto* angehören, die vorrangig auf dem nordamerikanischen Subkontinent gefunden wird, warum werden in Europa dann deutlich weniger Lyme-Arthritiden gesehen als in den USA?

Bei all diesen Fragestellungen ist die Identifizierung und genaue Typisierung virulenter Keime ein wichtiger Aspekt. Eine einfache und sichere Untersuchungsmethode, wie sie der Westernblot unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern darstellt, kann hierfür ein hilfreiches Werkzeug sein. Die Korrelation der hier dargestellten Ergebnisse mit anderen Klassifizierungsmethoden soll in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Lyme-Borreliose ist eine durch *Borrelia burgdorferi sensu lato* hervorgerufene, in Stadien verlaufende Multisystemerkrankung. Der Erreger wird heute allgemein in mehrere Subtypen eingeteilt (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* und *B. valaisiana*). Die Diagnostik stützt sich im wesentlichen auf die Klinik und den serologischen Nachweis spezifischer Antikörper. In diesem Zusammenhang kommt dem chromosomal kodierten, hochmolekularen p83/100-Antigen eine besondere Bedeutung zu, da es borrelienspezifisch ist und im Spätstadium der Erkrankung eine ausgeprägte Immunantwort erzeugt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit immunchemischen Methoden dieses Antigen weiter zu charakterisieren. Dazu wurden polyklonale Antiseren in Kaninchen erzeugt, die mit unterschiedlichen Borrelienstämmen immunisiert worden waren. Darüber hinaus konnten insgesamt elf murine monoklonale Antikörper gegen das p83/100-Antigen vom Stamm B31 (*B. burgdorferi sensu stricto*) hergestellt werden. Es ließen sich folgende Ergebnisse erzielen:

1. Mit Stämmen verschiedener Borreliensubtypen immunisierte Kaninchen erzeugten eine divergente Immunantwort. Antikörperseren von intravenös mit *B. burgdorferi sensu stricto* immunisierten Tieren reagierten mit dem p83/100-Antigen eines *B. garinii* Stammes im Immunoblot nicht. Bei subkutaner Immunisierung hingegen wurden auch Antikörper gegen das p83/100-Antigen des anderen Borreliensubtyps gebildet.
2. Der isoelektrische Punkt des Proteins wurde mit Hilfe der monoklonalen Antikörper durch 2D-Elektrophorese und Immunoblot bei pH 4,8 bis 5,0 ermittelt.
3. Das p83/100-Antigen erwies sich in Aufbereitungen für immunologische Tests als sehr stabil. In einem Zelllysate unter Zugabe von Triton X-100 fand innerhalb von zwölf Tagen bei 4 °C kein nennenswerter Abbau durch bakterieneigene Enzyme statt. Es wird allerdings durch Trypsin weitgehend zerstört.
4. Bei unvollständiger Denaturierung der Antigene eines Borrelienlysates zeigt sich das p83/100-Antigen in Aggregation mit einem weiteren Protein. Denn monoklonale Antikörper wie 2G3 oder 2G6, die unter Standardbedingungen nur eine Bande bei 93 kD (Molekulargewicht des p83/100-Antigens in unseren Untersuchungen) im Immunoblot

markierten, erzeugten bei unzureichender Erwärmung im Rahmen der Solubilisierung mit SDS eine zweite Bande bei ca. 155 kD.

5. Der monoklonale Antikörper 2G3 wurde mittels kolloidaler Goldmarkierung zur subzellulären Lokalisation des p83/100-Antigens im Elektronenmikroskop eingesetzt. Hierbei zeigte sich, daß das Protein im Randbereich des Protoplasmazyllinders liegt. Das von dem Antikörper erkannte Epitop befindet sich dabei auf der Innenseite der Borrelienwand.
6. Mit den gegen das p83/100-Antigen hergestellten monoklonalen Antikörpern wurden 40 regionale Zeckenisolate, ein Hautisolat sowie sieben aus der Literatur bekannte, eingetragene Borrelienstämme untersucht. Dabei zeigten die Antikörper ein eindeutig differentes Affinitätsverhalten gegenüber den einzelnen Borrelienpopulationen. Das heterogene Bindungsverhalten der monoklonalen Antikörper erlaubte eine Einteilung der Referenzstämme und Isolate in vier verschiedene Gruppen, die mit den Genotypen von *B. burgdorferi sensu lato* korrelierten.

Damit würden sich diese monoklonalen Antikörper als hilfreiches Werkzeug zur Subtypisierung von *Borrelia burgdorferi*-Isolaten eignen. Ihr Einsatz im Immunoblot wäre dazu eine einfache, sichere und kostengünstige Alternative zu molekularbiologischen Methoden.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 **Ackermann, R.**, 1986. Erythema-migrans-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis. Dtsch. Ärztebl. 83: 1765-1774.
- 2 **Afzelius, A.**, 1910. Verhandlungen der Dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm, 28. October 1909. Arch. Dermatol. Syph. 101: 404.
- 3 **Anda, P., P. B. Backenson, J. L. Coleman and J. L. Benach**, 1994. Epitopes shared by unrelated antigens of *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. 62: 1070-1078.
- 4 **Anthonissen, F. M., M. Dekesel, P. P. Hoet and G. H. Bigaignon**, 1994. Evidence for the involvement of different genospecies of *Borrelia* in the clinical outcome of Lyme disease in Belgium. Res. Microbiol. 145: 327-331.
- 5 **Assous, M. V., D. Postic, G. Paul, P. Nevot and G. Baranton**, 1993. Westernblot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12: 261-268.
- 6 **Bannwarth, A.**, 1944. Zur Klinik und Pathogenese der „chronischen lymphocytären Meningitis“. Arch. Psychiatr. Nervenkr. 117: 161-185.
- 7 **Baranton, G, D. Postic, I. Saint Girons, P. Boerlin, J.-C. Piffaretti, M. Assous and P. A. D. Grimont**, 1992. Delineation of *B. burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int. J. of Systematic Bact. 42: 378-383.
- 8 **Barbour, A. G.**, 1986. A proposal for a serotyping system based upon major outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. Lyme borreliosis Newsletter 2: 7-9.
- 9 **Barbour, A. G.**, 1988. Laboratory aspects of Lyme borreliosis. Clin. Microbiol. Rev. 1: 399-414.

- 10 **Barbour, A. G.**, 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57: 521-525.
- 11 **Barbour, A. G. and S. F. Hayes**, 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* 50: 381-400.
- 12 **Barbour, A. G., R. A. Heilund and T. R. Howe**, 1985. Heterogeneity of major proteins in Lyme disease *Borrelia*: a molecular analysis of North American and European isolates. *J. Infect. Dis.* 152: 478-484.
- 13 **Barbour, A. G., W. Burgdorfer, S. F. Hayes, O. Peter and A. Aeschlimann**, 1983. Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Curr. Microbiol.* 8: 123-126.
- 14 **Benach, J. L., E. M. Bosler, J. P. Hanrahan, J. L. Coleman et al**, 1983. Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 308: 740-742.
- 15 **Berg, D., K. G. Abson and N. S. Prose**, 1991. The laboratory diagnosis of Lyme disease. *Arch. Dermatol.* 127: 866-870.
- 16 **Boerlin, P., O. Peter, A.-G. Bretz, D. Postic, G. Baranton and J.-C. Piffaretti**, 1992. Population genetic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *Infect. Immun.* 60: 1677-1683.
- 17 **Brettschneider, S., H. Bruckbauer, N. Klugbauer and H. Hofmann**, 1998. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2658-2665.
- 18 **Bruckbauer, HR., V. Praec-Mursic, R. Fuchs and B. Wilske**, 1992. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11: 224-232.
- 19 **Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt and J. P. Davis**, 1982. Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? *Science* 216: 1317-1319.

- 20 **Canica, M. M., F. Nato, L. du Merle, J. C. Mazie, G. Baranton and D. Postic,** 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme disease. *Scand. J. Infect. Dis.* 25: 441-448.
- 21 **Centers for Disease Control,** 1993. Lyme disease surveillance-United States. *Morbid. Mortal. Wkly. Rep.* 43: 564-5, 571-572.
- 22 **Coleman, J. L. and J. L. Benach,** 1992. Characterization of antigenic determinants of *Borrelia burgdorferi* shared by other bacteria. *J. Infect. Dis.* 165: 658-666.
- 23 **Craft, J. E., D. K. Fischer, G. T. Shimamoto and A. Steere,** 1986. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease: appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G response late in the illness. *J. Clin. Invest.* 78: 934-939.
- 24 **De Blas, A. L., M. V. Ratnaparkhi and J. E. Moismann,** 1983. Estimation of the number of monoclonal hybridomas in a cell-fusion experiment. *Methods in Enzymology* Vol. 92: 36-39.
- 25 **Ditton H.-J., M. Neuss and L Zöller,** 1992. Evidence that *Borrelia burgdorferi* immunodominant proteins p100, p94 and p83 are identical. *FEMS Microbiol. Lett.* 94: 217-220.
- 26 **Dressler, F., J. A. Whalen, B. N. Reinhardt and A. C. Steere,** 1993. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 167: 392-400.
- 27 **Eiffert, H., T. Schlott, M. Hoppert, H. Lotter and R. Thommsen,** 1992. Identification of an endoflagellar associated protein in *Borrelia burgdorferi*. *J. Med. Microbiol.* 36: 209-214.
- 28 **Fellinger, W., A. Farencena, B. Redl, V. Sambri, R. Cevenini and G. Stöffler,** 1995. Amino acid sequence heterogeneity of the chromosomal encoded B. *burgdorferi* sensu lato major antigen p100. *New Microbiol.* 18: 163-168.

- 29 **Fukunaga, M., M. Sohnaka, Y. Takashi, M. Nakao and K. Miyamoto, 1993.** Antigenetic and genetic characterization of *Borrelia* species isolated from *Ixodes persulcatus* in Hokkaido, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1388-1391.
- 30 **Garin, C. and R. Bujadoux, 1922.** Paralyse par les tiques. *J. Med. Lyon* 71: 765-767.
- 31 **Grodzicki, R. L. and A. C. Steere, 1988.** Comparison of immunoblotting and indirect ELISA using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 157: 790-797.
- 32 **Hassler, D., L. Zöller, M. Haude, H. D. Hufnagel und H. G. Sonntag, 1992.** Lyme-Borreliose in einem europäischen Endemiegebiet. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 117: 767-774.
- 33 **Hauser, U., G. Lehnert, R. Lobentanzer and B. Wilske, 1997.** Interpretation criteria for standardized western blots for three european species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1433-1444.
- 34 **Hauser, U., G. Lehnert and B. Wilske, 1999.** Validity of interpretation criteria for standardized western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2241-2247.
- 35 **Hayes, S. F. and W. Burgdorfer, 1993.** Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi*; in K. Weber, W. Burgdorfer (Eds.): *Aspects of Lyme borreliosis.* Springer, Berlin S. 29-43.
- 36 **Hedberg, C. W., M. T. Osterholm, K. L. MacDonald and K. E. White, 1987.** An interlaboratory study of antibody to *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 155: 1325-1327.
- 37 **Herxheimer K. und K. Hartmann, 1902.** Ueber Acrodermatitis chronica atrophicans. *Arch. Dermatol. Syph.* 61: 57-76, 255-300.
- 38 **Hovind-Hougen, K., 1984.** Ultrastructure of spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* and *Ixodes dammini*. *Yale J. Biol. Med.* 57: 543-548.

- 39 **Hugo, F., D. Jenne and S. Bhakdi**, 1985. Monoklonal antibodies against neoantigens of the terminal C5b-9 complex of human complement. *Biosci. Rep.* 5: 649-658.
- 40 **Hugo, F., M. Arvand, J. Reichwein, N. Mackman, I. B. Holland and S. Bhakdi**, 1987. Identification of hemolysin produced by clinical isolates of *E. coli* with monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 25: 26-30
- 41 **Jacobs, E. and A. Clad**, 1986. Electroelution of fixed and stained membrane proteins from preparative Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gels into a membrane trap. *Anal. Biochem.* 154: 583-589.
- 42 **Jauris-Heipke, S., R. Fuchs, A. Hofmann, F. Lottspeich, V. Preac-Mursic, E. Soutschek, G. Will and B. Wilske**, 1993. Molecular characterization of the p100 gene of *Borrelia burgdorferi* strain PKo. *FEMS Microbiol. Letter* 114: 235-241.
- 43 **Johnson, R. C., G. P. Schmid, F. W. Hyde, A. G. Steigerwaldt and D. J. Brenner**, 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 496-497.
- 44 **Kaufmann, S. H., C. M. Ewing and J. H. Shaper**, 1987. The erasable Western blot. *Anal. Biochem.* 161: 89-95.
- 45 **Kawabata, H., T. Masuzawa and Y. Yanagihara**, 1993. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol. Immunol.* 37: 843-848.
- 46 **Kyhse-Andersen, J.**, 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-20.
- 47 **Laemmli, U. K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 48 **Le Fleche, A., D. Postic, K. Girardet, O. Peter and G. Baranton**, 1997. Characterization of *Borrelia lusitania* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 921-925.

- 49 **LeFebvre, R. B., G. Perng and R. C. Johnson**, 1990. The 83-kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi* which stimulates Immunoglobulin M (IgM) and IgG responses in infected hosts is expressed by a chromosomal gene. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1673-1675.
- 50 **Luft, B. J., S. Mudri, W. Jiang, R.J. Dattwyler, P. D. Gorevic, T. Fischer P. Munoz, J. J. Dunn and W. H. Schubach**, 1992. The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: an immunodominant protoplasmic cylinder antigen. *Infect. Immun.* 60: 4309-4321.
- 51 **Luft, B. J., W Jiang, P. Munoz, R. J. Dattwyler and P. D. Gorevic**, 1989. Biochemical and immunological characterization of surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 57: 3637-3645.
- 52 **Luft, B. J., W. Jiang, P. D. Gorevic, S. Mudri, T. Fisher, R. J. Dattwyler and W. H. Schubach**, 1991. The 93 kD protein of *B. burgdorferi*: characterization and cloning of an immunodominant protoplasmic cylinder antigen. *Clin. Res.* 39: 440A.
- 53 **Ma, B., B. Christen, D. Leung and C. Vigo-Pelfrey**, 1992. Serodiagnosis of Lyme borreliosis by western immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 370-376.
- 54 **Marconi, R. T. and C. F. Garon**, 1992. Development of PCR primer sets for diagnosis of Lyme disease isolates by 16S rRNA signature nucleotide analysis. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2830-2834.
- 55 **Nohlmans, L. M., R. de Boer, A. E. van den Bogaard and C. P. van Boven**, 1995. Genotypic and phenotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from the netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 33: 119-125.
- 56 **O'Farrell, P. H.**, 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- 57 **O'Farrell, P. Z., H. M. Goodman and P. H. O'Farrell**, 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142.

- 58 **Paul, H., H. J. Gerth and R. Ackermann**, 1986. Infectiousness for humans of *Ixodes ricinus* containing *Borrelia burgdorferi*. Zbl. Bakt. Hyg. (A) 263: 473-476.
- 59 **Perng, G.-C., R. B. LeFebvre and R. Johnson**, 1991. Further characterization of a potent immunogen and the chromosomal gene encoding it in Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. 59: 2070-2074.
- 60 **Peter, O. and A. G. Bretz**, 1992. Polymorphism of outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for classification. Zbl. Bakt. 277: 28-33.
- 61 **Peter, O., A. G. Bretz and Bee**, 1995. Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ixodid ticks of Valais, Switzerland. Europ. J. Epidemiol. 11: 463-467.
- 62 **Peters, J. H.**, 1990. Zellfusion zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern der Maus; in J. H. Peters und H. Baumgarten (Hrsgg.): Monoklonale Antikörper, 2. Aufl., Springer, Berlin, S. 150-157.
- 63 **Pfister, H. W., K. Einhäupl, V. Preac-Mursic, B. Wilske and G. Schierz**, 1984. The spirocheteal aetiology of lymphocytic meningoradiculitis of Bannwarth (Bannwarth's syndrome). J. Neurol. 231: 141-144.
- 64 **Picken, M. M., R. N. Picken, D. Han, Y. Cheng, E. Ruzic-Sabljić, J. Cimperman, V. Maraspin, S. Lotric-Furlan and F. Strle**, 1997. A two year prospective study to compare culture and polymerase chain reaction amplification for detection and diagnosis of Lyme borreliosis. Mol. Pathol. 50: 186-193.
- 65 **Postic, D., M. V. Assous, P. A. Grimont and G. Baranton**, 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. Int. J. Syst. Bact. 44: 743-752.
- 66 **Postic, D., N. M. Ras, R. S. Lane, M. Hendson and G. Baranton**, 1998. Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov.. J. Clin Microbiol. 36: 3497-3504.

- 67 **Rasiah, C. S. Rauer, G. S. Gassmann and A. Vogt**, 1994. Use of a hybrid consisting of the variable region of the *Borrelia burgdorferi* flagellin and part of the 83-kDa protein as antigen for serodiagnosis of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1011-1017.
- 68 **Rauer, S., M. Kayser, U. Neubert, C. Rasiah and A. Vogt**, 1995. Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant 83-kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* for serodiagnosis of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2596-2600.
- 69 **Rössler, D., H. Eiffert, S. Jauris-Heipke, G. Lehnert, V. Preac-Mursic, J. Teepe, T. Schlott, E. Soutschek and B. Wilske**, 1995. Molecular and immunological characterization of p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains. *Med. Microbiol. Immunol.* 184: 23-32.
- 70 **Saint Girons, I., I. Gern, J. S. Gray, E. C. Guy, E. Korenberg, P. A. Nuttall, S. G. Rijpkema, A. Schonberg, G. Stanek and D. Postic**, 1998. Identification of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in Europe. *Zbl. Bakt.* 287: 190-195.
- 71 **Schwan, T. G., W. Burgdorfer and C. F. Garon**, 1988. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. *Infect. Immun.* 56: 1831-1836.
- 72 **Simon, M.M., U. E. Schaible, R. Wallich and M. D. Kramer**, 1991. A mouse model for *Borrelia burgdorferi* infection: approach to a vaccine against Lyme disease. *Immunology Today* 12: 11-16.
- 73 **Simpson, W. J., M. E. Schrumphf, S. F. Hayes and T. G. Schwan**, 1991. Molecular and immunological analysis of a polymorphic periplasmic protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1940-1948.
- 74 **Stähli, C., T. Staehelin, V. Miggiono, J. Schmidt and P. Häring**, 1980. High frequencies of antigen-specific hybridomas: dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. *J. Immunol. Methods* 32: 297-304.

- 75 **Stanek, G., N. Satz, F. Strle and B. Wilske**, 1993. Epidemiology of Lyme borreliosis; in K. Weber, W. Burgdorfer (Eds.): Aspects of Lyme borreliosis. Springer, Berlin S. 358-370.
- 76 **Steere A. C.**, 1994. Lyme disease: a growing threat to urban populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2378-2383.
- 77 **Steere, A. C., E. Dwyer and R. Winchester**, 1990. Association of chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and HLA-DR2. N. Engl. J. Med. 323: 219-223.
- 78 **Steere, A. C., R. L. Grodzicki, A. N. Kornblatt, J. E. Craft, A. G. Barbour, W. Burgdorfer, G. P. Schmid, E. Johnson and S. E. Malawista**, 1983. The spirochetal etiologi of Lyme disease. N. Engl. J. Med. 308: 733-740.
- 79 **Steere, A. C., S. E. Malawista, J. A. Hardin, S. Ruddy, P. W. Askenase and W. A. Undiman**, 1977. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum. Ann. Intern. Med. 86: 685-698.
- 80 **Steere, A. C., V. K. Sikand, F. Meurice, D. L. Parenti, E. Fikrig, R. T. Schoen et al.**, 1998. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. N. Engl. J. Med. 339: 209-215.
- 81 **Steere, AC.**, 1989. Lyme disease. N. Engl. J. Med. 321: 586-596.
- 82 **Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon**, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from PAGs to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.
- 83 **Thorpe, G. H. G., L. J. Kricks, S. B. Mosely and T. P. Whitehead**, 1985. Phenols as enhancers of the chemilumenscent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: Application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. Clin. Chem. 31: 1335-1341.
- 84 **Urban, S., J. J. Rahal and B. Luft**, 1991. Effect of a beta-lactamase inhibitor, tazobactam, on growth and penicillin-binding proteins of *Borrelia burgdorferi*. FEMS Microbiol. Lett. 66: 113-116.

- 85 **Volkman, D. J., B. J. Luft, P. D. Gorevic, J. Schultz and L. Padovano**, 1991. Characterization of an immunoreactive 93-kDa core protein of *Borrelia burgdorferi* with a human IgG monoclonal antibody. *J. Immunol.* 146: 3177-3182.
- 86 **Wallich, R., C. Helmes, U. Schaible, Y. Lobet, S. E. Moter, M. D. Kramer and M. M. Simon**, 1992. Evaluation of genetic divergence among *Borrelia burgdorferi* isolates by use of *ospA*, *fla*, HSP60, and HSP 70 gene probes. *Infect. Immun.* 60: 4856-4866.
- 87 **Wang, G., A. P. van Dam, A. Le Fleche, D. Postic, O. Peter, G. Baranton, R. de Boer, L. Spanjaard and J. Dankert**, 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 926-932.
- 88 **Weber, K., H. W. Pfister and C. D. Reimers**, 1993. Clinical features of Lyme borreliosis: clinical overview; in K. Weber, W. Burgdorfer (Eds.): *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer, Berlin, 93-104.
- 89 **Welsh, J. C. Pretzman, D. Postic, I. Saint Girons, G. Baranton and M. McClelland**, 1992. Genomic fingerprinting by arbitrarily primed PCR resolves *B. burgdorferi* into three distinct phyletic groups. *Int. J. Syst. Bact.* 42: 370-377.
- 90 **Wienecke, R., N. Zöchling, U. Neubert, EM. Schlüpen, M. Meurer and M. Volkenundt**, 1994. Molecular subtyping of *B. burgdorferi* in erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *J. Invest. Dermatol.* 103: 19-22.
- 91 **Will, G., S. Jauris-Heipke, E. Schwab, U. Busch, D. Rössler, E. Soutschek, B. Wilske and V. Preac-Mursic**, 1995. Sequence analysis of *ospA* genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii* species. *Med. Microbiol. Immunol.* 184: 73-80.
- 92 **Wilske, B., A. G. Barbour, S. Bergström, N. Burman, B. I. Restrepo, P. A. Rosa, T. Schwan, E. Soutschek and R. Wallich**, 1992. Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp.. *Res. Microbiol.* 143: 583-596.

- 93 **Wilske, B., R. Steinhuber, H. Bergmeister, V. Fingerle, G. Schierz, V. Preac-Mursic, E. Vanek und B. Lorbeer**, 1987. Lyme-Borreliose in Süddeutschland. Epidemiologische Daten zum Auftreten von Erkrankungsfällen sowie zur Durchseuchung von Zecken (*Ixodes ricinus*) mit *Borrellia burgdorferi*. Dtsch. Med. Wochenschr. 112: 1730-1736.
- 94 **Wilske, B., V. Fingerle, P. Herzer, A. Hofmann, G. Lehnert, H. Peters, H. W. Pfister, V. Preac-Mursic, E Soutschek and K. Weber**, 1993. Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. Comparison with IFT and ELISA. Med. Microbiol. Immunol. Berl. 182 (5): 255-270.
- 95 **Wilske, B., V. Fingerle, V. Preac-Mursic, S. Jauris-Heipke, A. Hofmann, H. Loy, H. W. Pfister, D. Rössler and E. Soutschek**, 1994. Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *B. burgdorferi sensu lato*. Med. Microbiol. Immunol. 183: 43-59.
- 96 **Wilske, B., V. Preac-Mursic, G. Schierz, R. Kuehbeck, A. G. Barbour and M. Kramer**, 1988. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 539: 126-143.
- 97 **Wilske, B., V. Preac-Mursic, R. Fuchs und G. Schierz**, 1990. Diagnostik der Lyme-Borreliose. Diagnose & Labor 40: 24-36.
- 98 **Wilske, B., V. Preac-Mursic, U. B. Göbel, B. Graf, S. Jauris, E. Soutschek, E. Schwab and G. Zumstein**, 1993. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J. Clin. Microbiol. 31: 340-350.
- 99 **Winkle, S.**, 1979. Herstellung von diagnostischen Salmonella-Immunsereen. In Winkle, Stefan: Mikrobiologische und serologische Diagnostik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1979: 54.
- 100 **Zingg, B. C., R. N. Brown, R. S. Lane and R. B. LeFebvre**, 1993. Genetic diversity among *Borrelia burgdorferi* isolates from wood rats and kangaroo rats in California. J. Clin. Microbiol. 31: 3109-3114.

- 101 **Zöller L., J. Cremer and M Faulde**, 1993. Western blot as a tool in the diagnosis of Lyme borreliosis. *Electrophoresis* 14: 937-944.
- 102 **Zöller, L., S. Burkhard and H. Schäfer**, 1991. Validity of western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 29: 174-182.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
AP	alkalische Phosphatase
BCIP	Bromochloroindolylphosphat
Bor./B. b.	Borrelia, Borrelie/Borrelia burgdorferi
BSK II	modifiziertes Barbour-Stoenner-Kelly-Medium zur Borrelienkultur
bzgl.	bezüglich
CG-Medium	cell growth-Medium zur Zellkulturrpflge
ECM	Erythema chronicum migrans
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FKS	fötales Kälberserum
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
IFT	Immunfluoreszenstest
IgG/M	Immunglobulin G/M
kD	Kilodalton
LABC	Lymphadenosis benigna cutis
Lsg	Lösung
mAk(s)	Monoklonale/r Antikörper
NBT	Nitroblautetrazolinchlorid
Osp A/B	Outer surface protein A/B
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	<b>Phenylmethylsulfonylfluorid</b> (Proteaseninhibitor)
RFLP	<b>Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus</b>
SDS	Natrium(sodium)dodezylsulfat
sog.	sogenannt/e/s
Tab.	Tabelle
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung

## **8 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Ferdinand Hugo für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, sowie Herrn Professor Dr. med. Wellensieck, in dessen Institut diese Arbeit durchgeführt wurde. Für anregende Diskussionen und Vorschläge sowie die kritische Durchsicht des Manuskriptes danke ich Frau Dr. med. Bettina Eberspächer und Herrn Privatdozent Dr. med. Christian Jantos. Frau Sylvia Krämer danke ich für die geduldige Einarbeitung in die experimentellen Techniken und zahlreiche praktische Tips.

Mein Dank gilt zudem Herrn Dr. med vet. Günther Wahn vom Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Frau Heidrun Will für die Herstellung der Abzüge.

Mein Dank geht auch an Herrn Professor Dr. med. vet. Max Wittenbrink vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere am Fachbereich Veterinärmedizin für die Bereitstellung der regionalen Borrelienisolate und mancher Referenzstämme.

# 9 Lebenslauf

## ***Persönliche Daten***

Name: Jürgen Hinrich Heins  
Geburtsdatum/-ort: 18.05.1967, Zeven/Niedersachsen  
Eltern: Adelheid Heins, geb. Brunkhorst,  
Krankenschwester, z.Z. Hausfrau  
Hinrich Heins, Landwirt  
Geschwister: Anne, geboren 1969  
Johannes, geboren 1971  
Familienstand: verheiratet seit 1994

## ***Schulische und berufliche Daten***

1973 - 1977            Grundschule Rhade  
1977 - 1979            Orientierungsstufe Selsingen  
1979 - 1986            St.-Viti-Gymnasium Zeven  
04.06.1986 Abitur  
  
9/86 - 4/88            Zivildienst  
4/88 - 7/88            Sprachkurs Hebräisch  
10/1988                Ein Semester Chemie-Diplom-Studium an der Georg-August-  
Universität, Göttingen  
4/1989                 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Georg-August-  
Universität, Göttingen  
4/1991                 Studienortswechsel an die Justus-Liebig-Universität Gießen  
09.11.1995            Beendigung des Studium mit dem dritten Abschnitt der ärztlichen  
Prüfung  
Seit 3/96                bis 8/97 AiP, seitdem Assistenzarzt in der Pneumologischen Klinik  
Waldhof Elgershausen, Greifenstein

Dezember 1999

Jürgen Heins