

Klinik und Poliklinik  
für Dermatologie und Allergologie  
am Biederstein  
Technische Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)

**T-zelluläre Immunreaktion durch MHC II-präsentierte rekombinante *B. burgdorferi*-  
Antigene im autologen System  
Verlaufsuntersuchungen bei Patienten mit Lyme Borreliose**

**Iris Eckmüller**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. H. Hofmann  
2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker

Die Dissertation wurde am 31.01.2003 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.05.2003 angenommen.

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. M. Schwaiger

Referentin: Prof. Dr. med. H. Hofmann

„Der erste Schluck aus dem Becher der Natur führt zum Atheismus,  
aber auf dem Grund wartet Gott.“

Werner Heisenberg

Meinem Großvater,  
Friedrich Kalchgruber,  
\* 23.01.1921  
† 24.08.2001  
gewidmet.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Lyme-Borreliose</b>	<b>11</b>
1.1.1	Historischer Überblick	11
1.1.2	Vektoren und Infektionswege	12
1.1.3	Epidemiologie	12
1.1.4	<i>Borrelia burgdorferi</i> - Zuordnung und Morphologie	13
1.1.5	Das klinische Spektrum der Lyme-Borreliose	14
1.1.5.1	Stadium I: lokalisierte Frühinfektion	15
1.1.5.1.1	Erythema migrans (EM) / Erythema chronicum migrans (ECM)	16
1.1.5.1.2	Lymphadenosis benigna cutis (LBC)	17
1.1.5.2	Stadium II: generalisierte Frühinfektion	17
1.1.5.2.1	Multiple Erythemata migrantia (MEM)	18
1.1.5.2.2	Neuroborreliose (NB)	18
1.1.5.2.3	Weitere Organmanifestationen der früh-disseminierten Lyme Borreliose	18
1.1.5.3	Stadium III: Chronische Organmanifestation	19
1.1.5.3.1	Lyme-Arthritis	19
1.1.5.3.2	Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)	20
1.1.5.3.3	Chronische Enzephalomyelitis	20
1.1.5.4	Post-Lyme-Syndrom (postinfektiöses Syndrom)	21
1.1.6	Diagnostik bei Lyme-Borreliose	21
1.1.6.1	Serologischer Nachweis von <i>B. burgdorferi</i> -spezifischen Antikörpern	21
1.1.6.1.1	ELISA	22
1.1.6.1.2	Westernblot	23
1.1.6.2	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
1.1.6.3	Der kulturelle Nachweis	24
1.1.7	Therapie und Impfung bei Lyme-Borreliose	24
<b>1.2</b>	<b>Immunantwort bei Borrelieninfektionen</b>	<b>25</b>
1.2.1	Unspezifische Abwehrreaktionen gegen <i>B. burgdorferi</i>	25
1.2.2	Spezifische Immunantwort auf <i>B. burgdorferi</i> -Infektion	27
1.2.2.1	Humorale Immunantwort auf <i>B. burgdorferi</i>	27

1.2.2.2	T-Zell-vermittelte Immunantwort auf <i>B. burgdorferi</i> .....	29
1.2.3	Die Rolle der dendritischen Zellen bei Borrelieninfektion .....	31
1.2.4	Besonderheiten in der Pathogenese der <i>B. burgdorferi</i> -Infektion.....	32
1.2.5	Autoimmunologische Aspekt bei <i>B. burgdorferi</i> -Infektion.....	34
<b>1.3</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b><u>Methoden.....</u></b>	<b><u>37</u></b>
<b>2.1</b>	<b>Zellisolierung .....</b>	<b>39</b>
2.1.1	Monozytenpräparation durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten-Zentrifugation .....	39
2.1.2	T-Lymphozyten-Präparation durch Schafserythrozyten-TZ-Rosettierung .....	41
2.1.3	Auswahl und Aufbereitung der Antigene.....	42
2.1.3.1	OspC.....	43
2.1.3.2	p83.....	43
2.1.3.3	ZSA36 .....	44
2.1.3.4	DbpA.....	44
2.1.3.5	pG.....	45
2.1.4	Antigenstimulation dendritischer Zellen.....	45
<b>2.2</b>	<b>Proliferations-Assay.....</b>	<b>46</b>
<b>2.3</b>	<b>Methodik des Zytokinnachweises .....</b>	<b>47</b>
2.3.1	Verstärkung der Zytokinantwort durch Restimulation spezifischer T-Zellen	47
2.3.2	Elispot.....	47
2.3.3	ELISA.....	50
<b>2.4</b>	<b>Western-Blot.....</b>	<b>51</b>
<b>3</b>	<b><u>Ergebnisse .....</u></b>	<b><u>53</u></b>
<b>3.1</b>	<b>Grundlagen der statistischen Analyse.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2</b>	<b>Etablierung des Meßsystems.....</b>	<b>53</b>
3.2.1	Optimierung der Zellkultur .....	53
3.2.1.1	TZ-Proliferation auf das Mitogen PHA .....	53
3.2.1.2	TZ-Proliferation / Zytokinproduktion durch DZ-präsentiertes .....	
	Tetanustoxoid.....	54
3.2.1.3	10% FCS versus 1% autologes Plasma im Zellkulturmedium.....	56

3.2.1.4	Optimale Bedingungen für die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen .....	57
3.2.1.4.1	Optimaler Zeitpunkt zur Antigenstimulation während der DZ-Reifung. ....	57
3.2.1.4.2	Verbesserung der DZ-Reifung durch 2. Zytokincocktail.....	58
3.2.1.5	Kombination Medium mit 1% autologem Plasma und 2. Zytokincocktail. ....	59
3.2.2	Optimierung des Proliferationsassay.....	59
3.2.2.1	Kinetik zum optimalen Zeitpunkt des Proliferationsmessung .....	60
3.2.2.2	Untersuchung zur optimalen <sup>3</sup> H-Thymidinmenge .....	60
3.2.3	Optimierung des Zytokinnachweises mittels ELISpot-Assay.....	61
3.2.3.1	Verbesserung der Zytokinantwort durch Restimulierung .....	61
3.2.3.2	Optimaler Zeitpunkt für den Zytokinnachweis .....	63
3.2.3.3	Vergleich unterschiedlicher Elispot-Meßsysteme: AID versus Zeiss.....	63
<b>3.3</b>	<b>Zusammenfassung der benutzten Methode.....</b>	<b>64</b>
<b>3.4</b>	<b>Auswertung nach der Zielsetzung .....</b>	<b>64</b>
3.4.1	Charakterisierung des Untersuchungskollektivs .....	65
3.4.2	Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientenkollektiv .....	66
3.4.2.1	Vergleich Kontrollgruppe / Patientenkollektiv im TZ-Proliferationsassay .....	66
3.4.2.2	Vergleich Kontrollgruppe / Patientenkollektiv im Elispot.....	68
3.4.3	Verlaufsbeobachtungen.....	70
3.4.3.1	Verlaufsbeobachtungen im TZ-Proliferationsassay .....	71
3.4.3.2	Verlaufsbeobachtungen im Elispot .....	71
3.4.3.2.1	IFN- $\gamma$ -Messung.....	72
3.4.3.2.2	IL-4-Messung .....	73
3.4.3.3	Betrachtung exemplarischer Kasuistiken.....	74
3.4.3.4	Frühinfektion.....	75
3.4.3.4.1	Erythema migrans .....	75
3.4.3.4.2	Erythema chronicum migrans .....	78
3.4.3.5	Spätinfektionen.....	80
3.4.3.5.1	Acrodermatitis chronicum atrophicans .....	80
3.4.3.5.2	Arthritis .....	82
3.4.3.5.3	Chronisches Erschöpfungssyndrom .....	83

3.4.4	Zusammenhang zwischen TZ-Proliferation und Zytokinsekretion.....	84
3.4.5	Zusammenhang zwischen zellulärer und humoraler Immunreaktion .....	84
3.4.6	Zusammenhang zwischen Beschwerdepersistenz (chronischer Erkrankung) und zellulärer Immunreaktion .....	85
3.4.7	Zusammenhang zwischen speziellen Symptomen und der zellulären Immunantwort .....	87
<b>4</b>	<b><u>Diskussion.....</u></b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der methodischen Problematik .....</b>	<b>89</b>
4.1.1	Patientenauswahl.....	89
4.1.1.1	Grundlagen des Versuchsaufbaus .....	90
4.1.1.2	Einflussgröße Medium .....	91
4.1.1.3	Auswahl der Antigene.....	91
4.1.1.4	Optimierung der Antigenverarbeitung dendritischer Zellen .....	92
4.1.1.4.1	Optimale Antigenkontaktdauer für dendritische Zellen.....	92
4.1.1.4.2	„Nachreifung“ dendritischer Zellen mittels 2. Zytokincocktail.....	93
4.1.1.4.3	Die autologe DZ-stimulierte TZ-Proliferationsmessung im Vergleich zum klassischen Lymphozytenproliferationstest .....	94
4.1.1.4.4	Elispot-Assay .....	95
<b>4.2</b>	<b>Diskussion nach der Zielsetzung.....</b>	<b>96</b>
4.2.1	Welche Borrelienantigene induzieren eine krankheitsspezifische TZ-Reaktion? .....	96
4.2.2	Spezifität der Nachweissysteme - Differenzierung „Gesund / Krank“ .....	97
4.2.3	T-zelluläre Immunantwort nach antibiotischer Therapie und im Krankheitsverlauf.....	99
4.2.4	Zusammenhänge zwischen humoraler und T-zellulärer Immunantwort.....	100
4.2.5	Zelluläre Immunantwort bei chronischer Erkrankung und Begleitsymptomen.. .....	101
4.2.6	Interpretation der exemplarischen Kasuistiken .....	102
4.2.6.1	Frühinfektionen: Erythema migrans und Erythema chronicum migrans.... .....	102
4.2.6.2	Spätinfektionen.....	103
4.2.6.2.1	Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA).....	103
4.2.6.2.2	Lyme-Arthritis.....	104

4.2.6.2.3	Chronisches Erschöpfungssyndrom (CFS) .....	104
<b>5</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b> .....	<b>105</b>
<b>6</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b> .....	<b>107</b>
<b>7</b>	<b><u>Anhang</u></b> .....	<b>132</b>
<b>7.1</b>	<b>Patientenbeispiele Krankheitsverlauf / Diagnostik</b> .....	<b>132</b>
<b>7.2</b>	<b>Arbeitsanleitung</b> .....	<b>140</b>
7.2.1	Zellisolierung .....	140
7.2.1.1	Monozytenpräparation .....	141
7.2.1.2	T-Zell-Isolierung .....	142
7.2.1.3	Kryokonservierung der Zellen (-70°C) .....	142
7.2.2	Elispot.....	142
7.2.3	Westernblot .....	143
<b>7.3</b>	<b>Materialliste</b> .....	<b>144</b>
	Danksagung .....	147

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen Presenting Cell
AV-Block	atrioventrikulärer Block
<i>B.</i>	<i>Borrelia</i>
BSA	Rinderserumalbumin
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly-Medium
BZ	B-Zellen
CD	Cluster of Differentiation
CFS	Chronic Fatigue Syndrome = chronisches Erschöpfungssyndrom
cpm	Counts per minute
$\Delta$	TZ-Differenz = antigenstimulierte TZ-Zytokinsekretion abzüglich TZ-Basissekretion
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zellen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Erythema chronicum migrans
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzym-linked immunosorbent single spot assay
EM	Erythema migrans
Fab	fragment antigen binding
FACS	Fluoreszenz-Activating-Cell-Scanning
Fc	fragment crystalline
FCS	Fötale Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte Makrophage-Colony Stimulating Factor
GST	Glutathion S-Transferase
HSP	Hitzeschockprotein
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kD	Kilo-Dalton
LBC	Lymphadenosis benigna cutis
LC	Langerhans Cells
LD	Lyme Disease
LPS	Lipopolisaccharid
LT	Leukotrien
mAb	monoconal Antibody
MEM	Multiple Erythemata Migrantia
MHC	Major Histocompatibility Complex
n.d.	nicht durchgeführt
NB	Neuroborreliose

---

NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OD	Optische Dichte
OR	Odd's ratio
p.o.	per os
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	peripheral blood monocytic cells
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
pH	potentia hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Range over the curve
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
SI	Stimulationsindex
Tab	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TZR	T Cell Receptor
TH	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TT	Tetanustoxoid
TZ	T-Zellen
UV	Ultraviolett
WB	Westernblot
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1 Einleitung

### 1.1 Lyme-Borreliose

#### 1.1.1 Historischer Überblick

Im Jahre 1975 wurde man erstmals auf eine Endemie „juveniler rheumatischer Arthritis“ im Gebiet der Stadt Lyme im amerikanischen Bundesstaat Connecticut aufmerksam. Nach klinischen und epidemiologischen Untersuchungen beschrieb Dr. Allen C. Steere 1976 eine unbekannte Form der endemischen Arthritis, der sogenannten Lyme-Arthritis (*Steere et al., 1977b*). Typische Kennzeichen der Lyme-Arthritis, wie das ausgeprägte jahreszeitliche Maximum der Erstsymptome und die endemische Zuordnung zu waldreichen Gegenden, führten zu der Vermutung, dass Arthropoden Krankheitsüberträger sein könnten (*Steere und Malawista; 1979*). Im Jahre 1981 fand *W. Burgdorfer* mit seiner Arbeitsgruppe bei der Untersuchung von Zecken der Gattung *Ixodes dammini* Spirochäten als Erreger der Lyme-Krankheit, die nach ihrem Entdecker *Borrelia burgdorferi* benannt wurden (*Burgdorfer et al., 1982*). Später erfolgte die Isolierung von *B. burgdorferi* aus Blut (*Benach et al., 1983*), Liquor (*Preac-Mursic et al., 1984*) und Hautbiopsien aus Erythema chronicum migrans- (ECM) und Acrodermatitis chronica atrophicans- (ACA) Läsionen (*Steere et al., 1984b, Asbrink et al., 1985b*).

In Europa gab es seit langem Hinweise auf eine durch Zecken übertragene Infektionskrankheit. *Afzelius (1910)* beschrieb im Jahre 1909 und später *Lipschütz (1913)* das Erythema migrans. Die Acrodermatitis chronica atrophicans wurde erstmals bereits 1883 von *Buchwald*, und später von *Herxheimer et al. (1902)*, dessen Eigennamen die Erkrankung erhielt, beschrieben. Im Jahre 1922 schilderten *Garin* und *Bujadoux*, sowie 1941 der Münchner Neurologe *Bannwarth* eine dem Zeckenstich und Erythem folgende Polyradikulitis mit Hirnnervenbeteiligung, die als Meningoradikulitis Garin-Bujadoux-Bannwarth oder Bannwarth-Syndrom bezeichnet wurde. Als weiteren Zusammenhang zwischen Hautveränderungen und neurologischen Symptomen beschrieb *Hellerström 1930* das ECM mit Meningitis. Bereits 1942 äußerte *Kahle* als er bei Patienten mit ACA Antikörper gegen *Treponema pallidum* fand, dass es sich um einen, den Treponemen verwandten Erreger handeln könnte. Die erfolgreiche Behandlung von ACA-Patienten mit Penicillin beschrieb *Svartz, 1946* und erhärtete damit den Verdacht einer infektiösen Ätiologie. Den endgültigen Beweis lieferten die Übertragungsversuche von *Götz (1954)*, *Binder et al. (1955)* und *Paschoud (1957)*, wobei es jedoch nicht gelang den Erreger anzuzüchten.

### 1.1.2 Vektoren und Infektionswege

In Amerika sind verschiedene Gattungen der Schildzecken (*Burgdorfer et al., 1982, 1985*), in Europa hingegen ausschließlich *Ixodes ricinus* (*Barbour et al., 1983b*) an der Übertragung von *B. burgdorferi* beteiligt. Der Holzbock, *I. ricinus*, ein hämatophager Ektoparasit, dient Mikroorganismen wie *B. burgdorferi*, die durch eine Blutmahlzeit von der Zecke aufgenommen oder durch vertikale Infektion bereits in die Eier im Ovar des Weibchens gelangt sind (*Liebisch, 1991, Lane und Burgdorfer, 1987*), als Übertragungsvektor. *I. ricinus* ist eine euryphage Zeckenart, d.h. er nutzt viele verschiedene Wirte als Nahrungsquelle, darunter mehr als 300 Säuger-, Vogel- und Reptilienarten. Vor allem Zugvogelarten verdankt er seine weite geographische Verbreitung (*Anderson et al., 1986, Anderson, 1988, 1991*). Seine parasitäre Aktivität verläuft bimodal mit zwei Maxima, Frühjahr (April - Mai) und Herbst (August - Oktober). In einem zweijährigen Zyklus durchlaufen alle *Ixodes*-Arten vier Entwicklungsstadien. Die Fortpflanzung findet am Wirt statt, die Eiablage am Erdboden. Nach dem Schlüpfen der Larve entsteht nach je einer Blutmahlzeit die Nymphe und dann die adulte Zecke (*MacLeod, 1935*). Mit Hilfe des Haller'schen Sinnesorgans, das der Wahrnehmung von thermischen (Wärme des Wirtsorganismus), mechanischen (Erschütterung) und chemischen Reizen (CO<sub>2</sub> in der Atemluft und Buttersäure im Schweiß des Wirtes) dient, ortet die Zecke den potentiellen Wirt und klammert sich an ihm fest. Der Stich erfolgt in der Regel an feinhäutigen Körperpartien, je nach Entwicklungsstadium an unterschiedlichen Regionen. Nach dem Stich verankert sich die Zecke in der Haut des Wirtes durch das sog. Hypostom mit Widerhaken und einer zementartigen Substanz. Durch den anästhesierenden, entzündungs- und blutgerinnungshemmenden Speichel (*Ribeiro et al., 1985, 1990, Ribeiro, 1987*) bleibt der Stich vorerst in der Regel unbemerkt. Die Übertragung der Spirochäten erfolgt während des Saugaktes, entweder durch den Speichel, wohin *B. burgdorferi* nach ca. 1-3 Tagen durch Überwindung des Mitteldarmepithels gelangt (*Burgdorfer et al., 1988, 1991*), oder, abhängig von der Saugdauer (3-7 Tage) durch Regurgitation, die eine Übertragung von Mikroorganismen aus dem Darm ermöglicht (*Piesmann et al., 1987, Duray, 1989, Burgdorfer et al., 1988, 1991*).

### 1.1.3 Epidemiologie

Die Durchseuchungsrate der Zecken (*I. ricinus*) mit *B. burgdorferi* in Europa variiert je nach Untersuchungsgebiet stark, wobei sie in endemischen Gebieten 20-60% (*Wilske et al., 1987, Hassler et al., 1992*) erreicht. Deutliche Unterschiede der Infektionsrate bestehen

auch für die verschiedenen Entwicklungsstadien der Zecke. Adulte Zecken sind zu ca. 20%, Nymphen zu ca. 10%, und Larven nur zu ca. 1% mit *B. burgdorferi* infiziert (Fingerle et al., 1994). Dies zeigt, dass *B. burgdorferi* in der Regel während einer Blutmahlzeit und nur selten transovariell übertragen wird. Die höchste Anzahl Borrelieninfizierter Zecken im süddeutschen Raum fand sich mit 33,6% in Bayern, in der Isarregion nördlich von München (Wilske et al., 1987). Der Infektionsindex variiert zwischen 10 und 13,7% (Wilske et al., 1985a). Personen im süddeutschen Endemiegebiet zeigten in 11% (Wilske et al., 1987) bzw. 14% (Reimer et al., 2002), bzw. 16,9% (Hassler et al., 1992), beruflich hoch exponierte Personen, wie Waldarbeiter oder Jäger in 20-26% eine Serokonversion (IgG) mit *B. burgdorferi*-spezifischen Antikörpern und nur in 2% (Hofmann, 1991, Fahrner et al., 1991) bzw. 7% (Reimer et al., 2002) eine floride Infektion (Inzidenz). Interessanterweise zeigte sich bei hoch exponierten Personen keine höhere Infektionsrate als bei niedrig exponierten Personen (Reimer et al., 2002). Bei der klinischen Manifestation der Lyme-Borreliose überwiegen die Frühstadien, v.a. EM mit 77%, während Spätstadien (Neuroborreliose, Arthritis, ACA, Karditis) mit ca. 26% eher selten auftreten (Berglund et al., 1995).

#### 1.1.4 *Borrelia burgdorferi* - Zuordnung und Morphologie

Taxonomisch gehört die Spezies *B. burgdorferi* zur Familie der *Spirochaetaceae* in der Ordnung *Spirochaetales*. Die Ordnung der *Spirochaetales* wird in zwei Familien unterteilt, die *Leptospiraceae* und die *Spirochaetaceae*. Zur Familie der *Spirochaetaceae* zählen neben *Borrelia* die Gattungen *Spirochaeta*, *Treponema* und *Christispira*.

*B. burgdorferi* ist gramnegativ, mikroaerophil und lebt parasitisch in Wirbeltieren und Arthropoden (Barbour, 1987). Das korkenzieherartig gewundene Bakterium ist vorwiegend extrazellulär gelegen, von 20-30µm Länge und 0,2-0,3µm Durchmesser (Wilske et al., 1991) und extrem flexibel und beweglich. Dies wird durch Flagellen (Axialfibrillen) ermöglicht, die mit dem einen Ende an einem Zellpol verankert sind und sich an ihrem freien Ende überlappen. Diese Axialfibrillen liegen im periplasmatischen Raum, zwischen Hüllmembran und Zellkörper, der einem protoplasmatischen Zylinder darstellt (Barbour und Hayes, 1986). Der gesamte Zellkörper wird durch Kontraktion der Axialfibrillen in eine rotierende Bewegung versetzt (Hovind-Hougen, 1984).

Genomanalysen bewiesen Unterschiede zwischen Isolaten unterschiedlicher Regionen (Barbour et al., 1985) und führten zur Unterscheidung dreier humanpathogener Genospezies von *B. burgdorferi* *sensu lato*: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* (Baranton et al., 1992). Alle nordamerikanischen und vereinzelt europäische

Borrelienisolate zählen zur Genospezies *B. burgdorferi sensu stricto*, während der größte Teil der asiatischen Isolate zur Genospezies *B. garinii* und russische und europäische Isolate zur Genospezies *B. afzelii* gehören (Wallich et al., 1993). Die unterschiedlichen Genospezies rufen bevorzugt bestimmte Manifestationsformen der Lyme-Borreliose hervor. Nachgewiesen wurde ein deutliches Überwiegen von *B. afzelii* bei Hautmanifestationen (Canina, 1993, Wienecke, 1993a, Strle, 1995), von *B. burgdorferi sensu stricto* bei Arthritis und von *B. burgdorferi sensu stricto* und *B. garinii* bei Neuroborreliose (Balmelli und Piffaretti, 1995). Die verschiedenen Genospezies exprimieren heterogene Oberflächenmoleküle, so z.B. OspC, das analog zu dem „surface variable membrane proteins (Vmps)“ anderer Borrelien ist (Marconi et al., 1993, Carter et al., 1994). Insgesamt konnten ca. 100 Proteine von *B. burgdorferi* charakterisiert werden, darunter viele verschiedene Oberflächenmoleküle, wie OspA (31-32 kD), OspB (34-36 kD) (Barbour et al., 1986), OspC (22,6 kD) (Fuchs et al., 1992, Wilske et al., 1993), OspD (28 kD) (Norris et al., 1992, Ramamoorthy et al., 1996), OspE (19,2 kD), OspF (26,1 kD) (Lam et al., 1994), DbpA (20kD) (Guo et al., 1998), *in vivo*-Proteine wie pG (22kD) und ZSA36 (22kD) (Wallich et al., 1995, 2002), p35 und p37 (Fikrig et al., 1997b) die in der äußeren Hüllmembran verankert sind und der Gruppe der Lipoproteine angehören. Daneben sind das 41kD Protein Flagellin (Wallich et al., 1990), aus dem die Axialfibrillen aufgebaut sind, und 58-66kD Proteine (Hansen et al., 1988a, Carreiro et al., 1990), die sog. „heat shock proteins“ von Bedeutung, wobei nur das 58kD-Protein *B. burgdorferi*-spezifisch ist. Ein klassisches Lipopolysaccharid (LPS) wird von *B. burgdorferi* nicht exprimiert (Takayama et al., 1987). *B. burgdorferi* besitzt im Gegensatz zu anderen Prokaryonten lineare Plasmide, auf denen die Gene der meisten Oberflächenproteine liegen (Howe et al., 1986, Bundoc und Barbour, 1989, Sadziene et al., 1993b), während die Gene für Flagellin und die Hitzeschockproteine chromosomal kodiert sind (Wallich et al., 1990, Gassmann et al., 1989, 1991).

### 1.1.5 Das klinische Spektrum der Lyme-Borreliose

Die unterschiedlichen Krankheitsmanifestationen ermöglichen eine stadienhafte Einteilung der Lyme-Borreliose (Asbrink und Hovmark, 1988, Steere et al., 1984a, Steere, 1989), wobei nicht alle Stadien bei einer erkrankten Person klinisch manifest werden. Zwischen den einzelnen Krankheitsstadien können symptomfreie Intervalle liegen, aber auch ein fließender Übergang ist möglich. Spontanheilungen stehen neben chronischen Krankheitsverläufen.

Die erste Phase der Frühinfektion (Stadium I) stellt eine lokalisierte Hautinfektion dar, die als Erythema migrans (EM) oder Lymphozytom in Erscheinung tritt. In der zweiten Phase der Frühinfektion (Stadium I) kommt es zu einer Bakteriämie und dadurch zu zusätzlichen systemischen Beschwerden wie Kopfschmerzen, grippeartigem Krankheitsgefühl, Lymphknotenvergrößerungen, Arthralgien und Fieber. Bei der generalisierten Frühinfektion (Stadium II) können sich extrakutane Manifestationen, wie Arthritis, Karditis, Meningitis, Radikulitits, Meningoradikulopolyneuritis, Paresen, Uveitis und Chorioretinitis zeigen. Das Spätstadium entspricht der chronischen Organmanifestation, in Form der akut-infiltrativen und später chronisch-atrophischen Acrodermatitis, der chronischen Arthritis, in Form von Polyneuritiden, selten Kardiomyopathien und Enzephalopathien. Bisher noch ungeklärt ist die genaue Pathogenese der Späterkrankung, wobei eine pathologische Immunreaktion vermutet wird, da ca. 10% der Patienten auch nach adäquater Antibiotikatherapie persistierende Beschwerden angeben (*Aberer et al., 1989a, Szczepanski et al., 1991*).

<p style="text-align: center;"><b>Stadium I</b> (Tage bis Wochen nach Infektion) Lokalisierte Frühinfektion</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erythema migrans (50-70%)</li> <li>• Lymphadenosis benigna cutis (Lymphozytom)</li> </ul> <p>Zusätzliche Allgemeinsymptome:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kopfschmerz, Ermüdung, Unwohlsein, Fieber</li> <li>• Arthralgie/Myalgie</li> <li>• Regionale/generalisierte Lymphadenopathie</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Stadium II</b> (Tage bis Monate nach Infektion) disseminierte Frühinfektion</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multiple Erythemata migrantia (5-10%)</li> <li>• Meningitis, kraniale Neuropathie (v.a. Facialisparesie), periphere Neuro-/Radikulopathie, Myelitis (10-12%)</li> <li>• Uveitis, Chorioretinitis, Neuritis N. optici</li> <li>• Endo-/Myo-/Perikarditis (8-10%)</li> <li>• Hepatitis (passager)</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Stadium III</b> (Monate bis Jahre nach Infektion) Spätinfektion</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wandernde Polyarthritits (50%), chronische Monarthritits (10%)</li> <li>• Chronische Enzephalopathie, periphere Neuropathie, Encephalomyelitis, depressives Syndrom</li> <li>• Acrodermatitis chronica atrophicans</li> </ul>

**Tabelle 1.1 Übersicht über die verschiedenen Krankheitsstadien der Lyme-Borreliose und deren mögliche klinische Symptomatik**

### 1.1.5.1 Stadium I: lokalisierte Frühinfektion

Neben den typischen Hautmanifestationen der Lyme-Borreliose, Erythema migrans und Lymphozytom, werden im Stadium I auch unspezifische Allgemeinsymptome, wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Fieber beschrieben (*Asbrink, 1985a*), die als Zeichen der Bakteriämie zu werten sind. So konnten *Goodman et al. (1995)* durch Nachweis von *B. burgdorferi*-DNS im Blut eine hoch signifikante Korrelation zwischen Begleitsymptomen und Erregerdissemination darstellen. Bereits *Steere et al. (1986)* beschrieben bei

begleitenden Krankheitssymptomen im Stadium I eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer generalisierten Infektion und/oder einer chronischen Organmanifestation.

#### 1.1.5.1.1 Erythema migrans (EM) / Erythema chronicum migrans (ECM)

Das typische Erythema migrans stellt die Primäraffektion der Lyme-Borreliose dar, die sich in der Regel innerhalb weniger Tage bis Wochen entwickelt (Steere *et al.*, 1986) und als pathognomonisch gilt. Sein Auftreten wird in USA mit 60-80% (Steere, 1989), in Europa mit 30-50% (Hassler *et al.*, 1992, Satz, 1993) angegeben, wobei es wegen seines häufigen Fehlens trotz seiner eindeutigen Zuordnung zur Lyme-Borreliose nicht als sicheres Diagnosekriterium gelten darf.



Abbildung 1.1 Verschiedene Erscheinungsformen des Erythema migrans

Das EM entwickelt sich ausgehend von der Papel des Zeckenstiches, als ringförmiges, rötlich bis livide verfärbtes Erythem, das sich zentrifugal ausbreitet und schließlich zentral wieder ablassen kann. Das Erythem kann sehr variabel sein, mit zusätzlichen vesikulösen, erysipelartigen Hautveränderungen, Schuppung oder Hyperpigmentierung in der Umgebung des Zeckenstiches und selten Dysästhesien. Bevorzugt befallene Stellen sind bei Erwachsenen die untere Extremität, vor allem die Kniekehle, bei Kindern Kopf und Schulterregion. Das Erythema chronicum migrans (ECM) ist durch den zeitlichen

Zusammenhang ( $\geq 4$  Wochen) zwischen Infektion (Zeckenstich) und klinischer Manifestation definiert. Zu den vielgestaltigen Differentialdiagnosen des EM/ECM zählen u.a. Erysipel, Erysipeloid, persistierende Insektenstichreaktion, Herpesinfektion und fixes Arzneimittelexanthem. Häufig verschwindet das EM unbehandelt innerhalb von 4 bis 10 Wochen, was keinesfalls mit einer Ausheilung der Infektion gleichzusetzen ist.

#### 1.1.5.1.2 Lymphadenosis benigna cutis (LBC)



**Abbildung 1.2 Lymphozytom am linken Ohrläppchen mit präaurikulärem Lymphknoten**

Eine weitere Frühmanifestation stellt die Lymphadenosis benigna cutis (LBC) dar, die sich klinisch meist als ca. 2-4 cm großer Knoten der Haut äußert, der blaurot verfärbt sein kann und eine prall-elastische Konsistenz aufweist. Prädilektionsstellen sind Ohrläppchen, Perimamillarregion und Genitalbereich. Die LBC wird durch eine starke B- und T-Zell-Reaktion auf Borrelienantigene hervorgerufen und entspricht histologisch einer dichten Infiltration der Dermis mit B- und T-Lymphozyten und Histiozyten (*Büchner et al., 1988*). Der serologische Nachweis (*Weber et al., 1985*) und die kulturelle Isolation von *B. burgdorferi* aus einer LBC-Biopsie (*Hovemark et al., 1986*) bewiesen nach anfänglicher Sepsis die Ätiologie des Borrelienlymphozytoms.

#### 1.1.5.2 Stadium II: generalisierte Frühinfektion

Die generalisierte Frühinfektion mit dem typischen Krankheitsbild der Neuroborreliose tritt in der Regel nach einer Latenzzeit von wenigen Wochen bis Monaten auf. Auch ist in diesem Krankheitsstadium eine Gelenkbeteiligung in Form von wandernden, episodenhaft auftretenden Arthralgien oder selten in Form einer intermittierenden Arthritis beschrieben (*Steere et al., 1984a*).

### 1.1.5.2.1 Multiple Erythemata migrantia (MEM)

Das wesentlich häufigere solitäre EM (83%) ist von den eher seltenen (5-10%) multiplen Erythemata abzugrenzen. Sie sind weniger scharf begrenzt, breiten sich geringer aus und besitzen kein induriertes Zentrum. Das MEM ist örtlich nicht mit einem Zeckenstich assoziiert (*Steere et al., 1986*) und gilt als Zeichen der Dissemination.

### 1.1.5.2.2 Neuroborreliose (NB)

Den neurologische Symptomenkomplex entwickeln ca. 15% der Patienten mit der klassischen Trias: Meningitis, kraniale Neuritis (v.a. Facialisparesie) und periphere Radikuloneuropathie (*Steere et al., 1984a*), meist in der Nähe der Primärinfektion. Als Frühsymptome sind brennende Parästhesien und Hyperalgesien mit radikulärer Topik oder im Versorgungsgebiet peripherer Nerven möglich. Bei Kindern findet sich häufiger als bei Erwachsenen eine Meningitis oder eine isolierte Facialisparesie. Diagnostisch wegweisend, ist der typische Liquorbefund mit lymphozytärer Pleozytose und Liquoreiweißerhöhung. Die frühe NB kann schubförmig oder chronisch progredient verlaufen und zeichnet sich im Vergleich zur späten NB (Stadium III) durch eine hohe Spontanheilungsrate aus (*Kristoferitsch, 1989*).



Abbildung 1.3 Facialisparesie links

### 1.1.5.2.3 Weitere Organmanifestationen der früh-disseminierten Lyme Borreliose

Die Lyme-Borreliose manifestiert sich in 0,3-8% aller Borrelieninfektionen als Karditis. Herzrhythmusstörungen sind in Form von Erregungsleitungsstörungen (AV-Block I. bis

III. Grades) am häufigsten zu beobachten (*McAlister et al., 1989*). Seltene Erscheinungsbilder der Lyme-Karditis sind Perikarditis mit Ergußbildung, Myokarditis mit zum Teil chronischer Verlaufsform und die Kardiomegalie (*Steere et al., 1984a, 1980a*). Unter den borrelieninduzierten ophtalmologischen Krankheitsbildern zeigen sich im Frühstadium häufig Iritis, Uveitis, Chorioretinitis sowie Entzündungen des Glaskörpers (Vitritis) (*Lesser, 1995*).

### 1.1.5.3 Stadium III: Chronische Organmanifestation

Die Späterkrankungen der Lyme-Borreliose, wie chronische Arthritis, Acrodermatitis chronica atrophicans und chronische Enzephalomyelitis manifestieren sich in der Regel erst nach einer Latenzphase von mehreren Monaten bis Jahren.

#### 1.1.5.3.1 Lyme-Arthritis

Die artikuläre Form der Lyme-Erkrankung ist durch akut beginnende, intermittierende Mono- und Oligoarthritis charakterisiert, wobei häufig das Kniegelenk betroffen ist und Spontanremissionen häufig sind. Davon abzugrenzen ist die sehr seltene chronisch destruierende Arthritis, die bei 10% der Patienten mit Fibrinablagerungen, Villushypertrophie, vaskulärer Proliferation und einer schweren Infiltration von mononukleären Zellen und Plasmazellen einhergeht (*Steere et al., 1977a, 1979, 1980b*).



Abbildung 1.4 Monarthritis am linken Knie nach Zeckenstich

### 1.1.5.3.2 Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)

Die ACA manifestiert sich primär als entzündliche, ödematöse Schwellungen und livid-rötliche Verfärbungen der Haut. Bevorzugt betroffen sind dabei die Streckseiten der Extremitäten, vor allem Hand- und Fußrücken, Ellenbogen und Knie. Selten sind auch einzelne oder multiple fibrotische Knoten nahe den Gelenken, besonders in der Gegend des Olekranons zu beobachten. Dieses entzündliche Stadium kann Jahre persistieren und geht schließlich in ein atrophisches Stadium über, das durch eine faltige, Zigarettenpapierdünne Haut mit verstärkter Venenzeichnung, Teleangiektasien, Pigmentierungen und/oder Depigmentierungen gekennzeichnet ist. Die Patienten klagen über Schwächegefühl, Sensibilitätsstörungen und Parästhesien in der befallenen Extremität (*Kristoferitsch, 1989*). Zu den Differentialdiagnosen zählen akrale Zyanose, Thrombophlebitis, venöse Durchblutungsstörungen, Erfrierungen, Kollagenosen, Altersatrophie und die Morphea (*Hofmann, 1992*).



Abbildung 1.5 Acrodermatitis chronica atrophicans der rechten Hand mit Arthritis der Fingergelenke

### 1.1.5.3.3 Chronische Enzephalomyelitis

Die NB im Stadium III ist sehr selten (2-4% aller NB) und meist, wie die frühe NB (Stadium II) mit einem Borrelien-spezifischen autochthonen Antikörpernachweis im Liquor und einer obligaten lymphozytären Pleozytose assoziiert. Zwei Hauptmanifestationsformen können unterschieden werden, die chronisch-lymphozytäre Meningitis mit Kopfschmerz, Krankheitsgefühl und häufig fehlender weiterer neurologischer Symptomatik und die chronisch progressive Enzephalomyelitis mit Beteiligung des pyramidalen, seltener des cerebellären Systems, kognitiven

Einschränkungen, v.a. Gedächtnis-/ Wortfindungsstörungen und Depression (*Krupp et al., 1991, Kaplan et al., 1992*). Bei einem Drittel der Patienten konnte durch elektrophysiologische Untersuchungen diffuse Polyneuropathien mit axonalem Schädigungsmuster nachgewiesen werden (*Halperin et al., 1990*).

#### **1.1.5.4 Post-Lyme-Syndrom (postinfektiöses Syndrom)**

Das postinfektiöse Syndrom geht mit chronischen Schmerz- und Erschöpfungszuständen einher und entspricht wahrscheinlich einer persistierenden Immunreaktion nach akuter Infektion. Dazu zählen rheumatische Symptome, die Fibromyalgie, das chronische Schmerzsyndrom und das chronische Erschöpfungs- oder Müdigkeitssyndrom („chronic fatigue syndrom“ = CFS). Das Krankheitsbild zeichnet sich durch monate- bis jahrelang andauernde beträchtliche Leistungsminderung aus, bedingt durch geistige und körperliche Erschöpfung. Seh- und Konzentrationstörungen, depressive Verstimmungen stehen neben Kopf-, Muskel- und Gelenkschmerzen, Fieber und Lymphknotenschwellungen (*Asch et al., 1994, Bujak et al., 1996*).

#### **1.1.6 Diagnostik bei Lyme-Borreliose**

Die Diagnose Lyme-Borreliose wird anhand des klinischen Befundes und verschiedener direkter und indirekter Nachweisverfahren gestellt. In der Routinediagnostik hat sich der serologische Nachweis von spezifischen Antikörpern mittels ELISA und Westernblot bewährt. Bei besonderen Fragestellungen kommen Direktnachweisverfahren, wie kulturelle Anzucht oder DNS-Nachweis mit Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Einsatz.

##### **1.1.6.1 Serologischer Nachweis von *B. burgdorferi*-spezifischen Antikörpern**

Der ELISA nimmt in der Serodiagnostik der Lyme-Borreliose wegen leichter Durchführbarkeit, hoher Sensitivität als Suchtest und seiner im Vergleich zur Immunfluoreszenz höheren Spezifität (*Craft et al., 1984*) eine vorrangige Stellung ein. Der Immunoblot sollte wegen seiner noch höheren Sensitivität (*Karlsson et al., 1989*) und Spezifität (*Grodzicki et al., 1988*) als Bestätigungstest eingesetzt werden (*Centers of Disease Control, 1995, MIQ, 2000*).

Diagnostisch problematische Fälle seronegativer Lyme-Borreliose kommen durch Diskrepanz des Antigenspektrums des aktuellen Erregerstammes und den diagnostisch genutzten Borrelien-Antigenen von Laborstämmen durch häufige Subkultivierung (*Schwan et al., 1987, Carroll et al., 1996*) zu Stande. Durch den Einsatz nativer Flagellen konnte jedoch die diagnostische Sensitivität verbessert werden (*Hansen et al., 1988b*). Auch

können zirkulierende Antigen-Antikörperkomplexe, in denen die nachzuweisenden *B. burgdorferi*-spezifischen Antikörper gebunden sind, Seronegativität vortäuschen (*Schutzer et al., 1990*). Antigenetische Homologien von *B. burgdorferi* mit anderen Erreger, wie z.B. *Treponema pallidum* führen zu Kreuzreaktionen (*Magnarelli et al., 1987, Bruckbauer et al., 1992*) in der serologischen Diagnostik, zu Ungunsten der diagnostischen Spezifität.

#### 1.1.6.1.1 ELISA

Der ELISA („enzym-linked immunoabsorbent assay“) wird zum Nachweis *B. burgdorferi*-spezifischer Antikörper im Patientenserum verwendet. In einer Mikrotiterplatte werden Antigenhomogenat und Patientenserum zusammengegeben, wobei Antigen-Antikörperkomplexe entstehen. Durch enzymmarkiertes Anti-human-IgM- oder IgG, wird ein enzyspezifisches Substrat umgesetzt, das zu einer photometrisch meßbaren Farbänderung im Ansatz führt. Für die IgM-Bestimmung kann zusätzlich der sensitivere  $\mu$ -Capture-ELISA (*Hansen et al., 1991*) als Bestätigungstest durchgeführt werden. Dabei wird das IgM-haltige Patientenserum in eine Mikrotiterplatte gegeben, die mit spezifischen Antikörpern gegen die  $\mu$ -Ketten von human-IgM beschichtet ist. Auf das gebundene IgM werden mit Peroxidase komplexierte, native *Borellia*-Flagellen zugegeben, wobei dieses Flagellum-Konjugat hochspezifisch an *B. burgdorferi*-spezifische Antikörper bindet und ein chromogenes Substrat umsetzt.

Anhand des getrennten Nachweises von IgM und IgG besteht theoretisch die Möglichkeit zwischen einer akuten Frühinfektion und einem früherem Erregerkontakt (Seronarbe) (*Hofmann, 1992*) zu unterscheiden. Der IgM-Nachweis (ab 1. Woche) ohne IgG-Erhöhung spricht für eine frische Primärinfektion. Bei einer IgM-Produktion in späteren Stadien kann es sich auch um Reaktivierung einer latenten Infektion oder eine unspezifische polyklonale B-Zellstimulierung durch Epstein-Barr-Virus-Infektion oder Autoimmunerkrankungen handeln. Eine IgG-Antikörper-Produktion hingegen kann immer als spezifische Immunantwort gewertet werden, die umso höher ansteigt, je länger die Infektion besteht und nach Therapie über lange Zeit, in niedriger Konzentration lebenslang, nachweisbar bleibt (Seronarbe). Häufig werden im Frühstadium erst während oder nach Antibiotikatherapie IgM- und IgG-Antikörper nachweisbar (*Hofmann, 1996*), da *B. burgdorferi*-Antigene in bestimmten Fällen erst durch antibiotische Therapie immunologisch enttarnt und so einer Immunantwort zugänglich werden.

### 1.1.6.1.2 Westernblot

Das Western-Blotting umfaßt die Auftrennung einer oder mehrerer Genospezies von *B. burgdorferi* in seine einzelnen Proteinfractionen durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese und die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozelluloseacetatfolie. In der Routinediagnostik werden kommerziell erhältliche Teststreifen verwendet, die mit Antikörper-haltigem Patientenserum inkubiert werden. Spezifische Antikörper binden an die verschiedenen auf dem Blotstreifen fixierten Borrelienproteine und durch Zugabe eines enzymgekoppelten Anti-human-IgM oder -IgG und dem geeigneten enzyspezifischen Substrat werden die Antikörperkomplexe angefärbt. Die Bandendicke wird semiquantitativ als Maß für die gebundene Antikörpermenge bei der Bewertung berücksichtigt. Im frühen Stadien der Lyme-Borreliose werden v.a. gegen Flagellin (41kD), OspC und p39 in den späten Krankheitsstadien u.a. gegen p83 und OspB (34kD) Antikörper gebildet.

Ein positives Testergebnis im IgM-Westernblot liegt nach den deutschen MIQ-Kriterien (2000) vor, wenn eine von vier spezifischen Banden nachweisbar ist. Dazu zählt die 41kD- (Flagellin), 39kD- (BmpA), 21/25kD- (OspC), und 17kD-Proteinbande (DbpA). Im IgG-Westernblot müssen für ein positives Testergebnis mindestens zwei von acht spezifischen Banden nachweisbar sein, darunter das 83kD-, 58kD-, 43kD-, 39kD- (BmpA), 30kD-, 21/25kD- (OspC), 17kD-, und 14kD-Protein. Durch die Charakterisierung spezifischer Banden ist eine Unterscheidung zwischen spezifischen und kreuzreagierenden Antikörpern möglich.

### 1.1.6.2 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine molekulargenetische Methode zur Amplifikation von DNS-Sequenzen. Aus dem Untersuchungsmaterial, Haut (*Schwartz et al., 1992*), Liquor und Urin (*Lebech und Hansen, 1992*) wird DNS extrahiert und mit Hilfe eines spezifischen Oligonucleotidprimers aus chromosomaler oder Plasmid-DNS von *B. burgdorferi* die erregerspezifische DNS-Sequenz exponentiell vervielfältigt. Der DNS-Doppelstrang wird durch Erwärmung (94°C) aufgetrennt, wodurch sich nach Abkühlung (37-60°C) ein synthetischer Primer mit komplementärer Oligonukleotidsequenz zum gesuchten DNS-Abschnitt anlagern kann. Zum Nachweis von *B. burgdorferi*-DNS kann ein Flagellin- oder p66-Gen-Primer (Wienecke) verwendet werden. Die dem Primer folgende DNS-Sequenz wird von der Taq-Polymerase bei einem Temperaturoptimum von 70-74°C polymerisiert und durch erneutes Erwärmen von dem ursprünglichen DNS-Doppelstrang entfernt, um eine erneute Kopie zu ermöglichen. Nach mehreren Zyklen, Denaturierung-Anlagerung-

Extension, ist das vervielfältigte spezifische DNS-Fragment durch Gelelektrophorese nachweisbar. Die Sensitivität des direkten Erregernachweises in Hautbiopsien beträgt ca. 80%, in Urin und Liquor ca. 10%.

### 1.1.6.3 Der kulturelle Nachweis

*B. burgdorferi* ist ein sehr anspruchsvoller und in seiner Anzucht problematischer Mikroorganismus, der ein spezielles Nährmedium zum Wachstum braucht. Für die Kultur ist das Barbour-Stoenner-Kelly-Medium (BSK) (Kelly, 1971, Stoenner et al., 1982, Barbour et al., 1984) am besten geeignet. Das Temperaturoptimum für die Anzucht von *B. burgdorferi* liegt bei 32°C, ein antimykotischer und antibiotischer Zusatz zum Medium (Berger et al., 1992, Kuiper et al., 1994) empfiehlt sich unter Umständen, um eine Überwucherung durch die Standortflora zu vermeiden. Der Zeitraum zwischen Beimpfung des Kulturmediums und dem *B. burgdorferi*-Nachweis im Dunkelfeld ist sehr variabel und liegt zwischen 72 Stunden (Mitchell et al., 1993) und zehn Wochen (Schwartz et al., 1993). Am Besten für die Anzucht geeignet sind Hautbiopsien von unbehandelten Patienten, gewonnen aus dem äußeren EM-Begrenzungsring (Berger et al., 1992). Ein negatives Kulturergebnis darf keinesfalls zum Ausschluß einer Infektion herangezogen werden.

### 1.1.7 Therapie und Impfung bei Lyme-Borreliose

In der Frühphase der Infektion ist bei erwachsenen Patienten Doxycyclin 200mg/d p.o. über einen Zeitraum von 14 Tagen die Therapie der Wahl. Bei Spätmanifestationen werden Cephalosporine der 3. Generation, wie z.B. Ceftriaxon 2g/d i.v. für 3-4 Wochen bevorzugt. Alternative Therapiemöglichkeiten zeigt Tabelle 1.2. In den ersten 24 Stunden der Therapie kann eine Intensivierung und/oder zusätzliche Allgemeinsymptome, wie v.a. Fieber durch den schnellen Zerfall einer großen Anzahl von Mikroorganismen, im Sinne einer Jarisch-Herxheimer-Reaktion, entstehen.

	Antibiotikum	Erwachsene Dosis/Tag	Kinder Dosis/kg Körpergewicht/Tag	Dauer
<b>Frühinfektion</b>	Doxycyclin	2x 100mg p.o.	Ab 9.Lj. 2-4mg p.o.	14-21d
	Amoxicillin	4x 500mg p.o.	50mg p.o.	14-21d
	Azithromycin	2x 250mg p.o.	5-10mg p.o.	5-10d
	Cefuroximaxetil	2x 500mg p.o.	30mg p.o.	12-18d
<b>Disseminierte und Spätinfektion ohne neurologische Symptome</b>	Ceftriaxon	1x 2g i.v.	50-80mg i.v.	14-21d
	Penicillin G	4x 5Mio. IE i.v.	200-500000 IE i.v.	14-21d
	Cefotaxim	3x 2g i.v.	100mg i.v.	14-21d
	Doxycyclin	2x 100mg p.o.	Ab 9.Lj. 2-4mg p.o.	21-30d

Tabelle 1.2: Therapieempfehlungen bei Lyme-Borreliose

Es wurde eine lipOspA-basierte Impfung entwickelt, die eine protektive Immunität durch Induktion spezifischer Antikörperbildung gewährleisten (*Fikrig et al., 1995, Wallich et al., 1996*). Wegen der Heterogenität der *B. burgdorferi*-Oberflächenmoleküle und den in Europa vorhandenen verschiedenen Genospezies ist eine multivalente lipOspA-Impfung zum ausreichenden Infektionsschutz nötig (*Wallich et al., 1996, Simon et al., 1999*). Wirksam ist die Impfung durch spezifische LA-2-IgG-Antikörper, die gegen ein Epitop des lipOspA gerichtet sind und eine Übertragung der Spirochäten verhindern (*Kurtenbach et al., 1997, de Silvia et al., 1996*). Diese Transmissionsblockade ist nur in den ersten 48 Stunden der Blutmahlzeit der Zecke wirksam, da nach Blutkontakt die Oberflächenmolekülexpression von *B. burgdorferi* verändert wird (OspA↓/OspC↑) (*Kurtenbach et al., 1997*). Die Effizienz der OspA-Vakzine beträgt nach 2 Injektionen 49-68%, nach 3 Injektionen 76-92% bei der Prävention von Lyme-Erkrankungen und 83-100% bei der Prävention asymptomatischer Infektionen (*Steere et al., 1998, Sigal et al., 1998*). Diese Vakzine wurde 1998 in USA zugelassen, jedoch wegen dem Verdacht auf Arthritis-Induktion bei genetischer Disposition, 2001 wieder vom Markt genommen.

## 1.2 Immunantwort bei Borrelieninfektionen

Das Immunsystem befaßt sich mit der Abwehr von Infektionen durch pathogene Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen und Würmern und der Kontrolle körpereigener entarteter Tumorzellen. Die Immunantwort, induziert durch Infektion mit einem Krankheitserreger, gliedert sich zeitlich in drei Phasen. Die erste Phase und teilweise auch die zweite Phase sind durch unspezifische (angeborene) Abwehrmechanismen geprägt, während die dritte Phase der spezifischen (erworbenen) Abwehr zuzuordnen ist.

### 1.2.1 Unspezifische Abwehrreaktionen gegen *B. burgdorferi*

Die erste, unmittelbare Phase der Abwehr eines Erregers erfolgt durch die Hautbarriere, die das Eindringen des Erregers in der Regel verhindert. Diese erste Schutzbarriere Haut überwindet *B. burgdorferi* durch den Stich der Zecke, so dass eine Ausbreitung in der Haut und in andere Organe erfolgen kann (*Malawista, 1989*). Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen tragen zur unspezifischen Abwehr bei. In experimentell, durch den Stich infizierter Zecken erzeugten Hautläsionen wurden überwiegend Infiltrate von mononukleären Zellen (*Silberer, 2000*) und neutrophilen Granulozyten gefunden (*Benach, 1983*). Zu Beginn der Infektion stehen im Rahmen der angeborenen Immunität unspezifische Mechanismen wie Phagozytose durch aktivierte Makrophagen und

Bakteriolyse durch das Komplementsystem (alternativer Aktivierungsweg) im Vordergrund (*Benach et al., 1991*). Die Makrophagenaktivierung erfolgt, via CD14-Rezeptor (*Giambartolomei et al., 1999*), durch *B. burgdorferi*-Lipoproteinkomponenten, u.a. OspA und B (*Ma und Weis, 1993*), die dem klassischen LPS Gram-negativer Bakterien in seiner chemischen und biologischen Aktivität sehr ähnlich sind (*Habicht et al., 1986*). Das *B. burgdorferi*-Lipoprotein OspA aktiviert Phagozyten zum „respiratory burst“ ( $O_2^-$ /NO-Freisetzung) über den TLR2 (Toll-like-Rezeptor 2) durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (nukleärer Faktor- $\kappa$ B) (*Aliprantis et al., 1999*), wobei eine Kooperation zwischen TLR2 und TLR6 stattfindet und eine Signalkaskade über IL-1R-Signalmoleküle getriggert wird (*Bulut et al., 2001*). Eine Überexpression des „Toll-interacting protein“ (Tollip) hemmt jedoch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung und die NO-Freisetzung (*Bulut et al., 2001*). Zusätzlich vermittelt der TLR2 die Apoptose von Monozyten und Epithelzellen, potenziert durch CD14. Die Bedeutung der TLR2-vermittelten unspezifischen Abwehr einer *B. burgdorferi*-Infektion zeigt sich an folgendem Mausmodell. TLR2-defiziente Mäuse wiesen eine 100-fach erhöhte Spirochätenzahl und eine verlängerte Spirochätenpersistenz (>8 Wochen) im Gewebe mit vermehrter Gelenkschwellung und erhöhter Konzentration mononukleärer Zellen auf, da Makrophagen TLR2-defizienter Mäuse nicht auf Lipoproteine, sondern nur auf hohe Konzentrationen anderer Spirochätensonikat-Komponenten reagieren und keine OspA-stimulierte regulierende Zytokin- (IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ ) und NO-Produktion erfolgt. Allerdings entwickelten TLR2-defiziente Mäuse eine normale bzw. ausgeprägtere humorale Immunantwort auf *B. burgdorferi*, mit weitgehend normaler Ig-Isotypenverteilung und unauffälligem Ig-Klassenswitch (IgM/IgG), ein Zeichen der TLR2-unabhängigen BZ-Aktivierung (*Wooten et al., 2002*).

Die Vernichtung der Borrelien erfolgt durch direkte (Fc-vermittelt durch Antikörper- oder Komplementaktivierung) und indirekte (nicht-Fc-vermittelt durch Opsonierung von Oberflächenkomponenten) Phagozytose und durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und Sauerstoffradikalen (*Modolell et al., 1994, Montgomery et al., 1994*). Durch das Komplementsystem ist auch eine direkte Zerstörung infizierter Zellen oder Mikroorganismen möglich. Der membranangreifende Komplex, bestehend aus den terminalen Komplementkomponenten bildet in der Zell- oder Erregeroberfläche eine Pore, die zur Lyse der infizierten Zelle bzw. des Erregers führt. Im weiteren Verlauf der Abwehrreaktion wird aktiviertes Komplement durch die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern neutralisiert (*Kochi und Johnson, 1988*).

Die zweite Phase der Abwehrreaktion verläuft teils unspezifisch, teils spezifisch innerhalb der folgenden 96 Stunden der Infektion. Über eine IL-1 (*Ma et al., 1994, Miller et al., 1992*), TNF- $\alpha$  (*Defosse und Johnson, 1992, Ma und Weis, 1993, Ma et al., 1994, Weis et al., 1994*), IL-6-Sekretion der Makrophagen (*Ma und Weis, 1993, Ma et al., 1994, Weis et al., 1994*), potenziert durch PAF (Plättchen aktivierender Faktor) (*Isogai et al., 1996*), IL-12 und IFN- $\beta$  (*Ma et al., 1994*) werden weitere unspezifische und spezifische Entzündungsreaktionen ausgelöst und die Immunantwort moduliert. Neben einer Steigerung des Eiweißkatabolismus werden lokale Entzündungsfaktoren, wie Leukotriene und Prostaglandine, und proteolytische Enzyme, wie Proteasen und Kollagenasen freigesetzt (*Steere et al., 1980b*). Auch das Komplementsystem liefert, durch den Krankheitserreger (alternativer Weg) in einer komplexen Kaskade proteolytischer Reaktionen aktiviert, sog. Entzündungsvermittler, C5a, C3a und C4a (Anaphylatoxine). Der Komplementfaktor C5a vermittelt eine Mastzellaktivierung, ausgelöst durch *B. burgdorferi*, mit Degranulation von Histamin, Serotonin (*Talkington und Nickell, 1999*) und Leukotrien (LT B<sub>4</sub>), wodurch die Gefäßpermeabilität gesteigert und durch erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen, sog. Selektine an der Endothelzelloberfläche, die Diapedese der Phagozyten in das infizierte Gewebe ermöglicht wird.

### **1.2.2 Spezifische Immunantwort auf *B. burgdorferi*-Infektion**

Eine adaptive, spezifische Immunantwort erfolgt, wenn die Erreger den angeborenen Abwehrmechanismus überwunden haben. Nach einigen Tagen, wenn eine bestimmte Antigenmenge überschritten wird und das Fremdatigen von antigenpräsentierenden Zellen erkannt, gebunden, verarbeitet und den Zellen des spezifischen Immunsystems präsentiert wurde, kommt es zur Proliferation und Differenzierung antigenspezifischer T- und B-Zellen zu Effektorzellen. Das Muster der Abwehrreaktion, ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Zellpopulationen und ihrer Sekretionsprodukte, wird durch die Struktur des Antigens, die Art und Weise seiner Präsentation und durch die Eigenschaften der spezifischen Immunzellen bestimmt. Zu unterscheiden sind zwei Gruppen der Immunantwort, die humorale, antikörpervermittelte Immunantwort durch B-Zellen und die Zell-vermittelte Abwehrreaktion durch T-Zellen.

#### **1.2.2.1 Humorale Immunantwort auf *B. burgdorferi***

Die humorale Immunantwort durch aktivierte B-Zellen beinhaltet die Bildung von Antikörpermolekülen, die im Blut und anderen Körpersekreten anzutreffen sind, höchst

spezifisch an Fremdanigen binden und durch verschiedene Mechanismen der Pathogenelimination dienen. Die B-Zell-Aktivierung erfolgt durch die Bindung eines Antigens (**Antikörper-Generator**), wie z.B. lipOspA (*Weis et al., 1994*) oder OspB (*Ma et al., 1993*) auf membranassoziierten Oberflächenimmunglobulinen und einem zusätzlichen Signal antigenspezifischer T-Helferzellen, wodurch eine klonale Expansion spezifischer B-Zellen induziert wird. Während der folgenden Differenzierung entstehen antikörpersezernierende Zellen, sog. Plasmazellen und Gedächtniszellen, induziert u.a. durch IL-6, das z.B. Gliazellen nach Infektion mit *B. burgdorferi* produzieren (*Habicht et al., 1991*). Im Tiermodell konnte durch Serum, das Antikörper gegen OspA/B enthielt, eine Immunität gegen Borrelioseninfektion übertragen werden (*Fikrig et al., 1994*). IgM wird als primäre Immunantwort (Frühstadium einer Infektion) produziert und ist, neben IgG, ein besonders wirksamer Aktivator des Komplementsystems. IgG ist die Hauptklasse der Immunglobuline im Blut und wird als sekundäre Immunantwort, nach 4-6 Wochen post infectionem in großen Mengen produziert. IgG bindet Toxine sowie Mikroorganismen (Bakterien), um sie mit Hilfe des Fc-Teils, der an Neutrophile und Makrophagen zu binden vermag, der Phagozytose zuzuführen. Wegen seiner langen Halbwertszeit ist IgG entscheidend für den Schutz vor Reinfektionen (z.B. aktive Immunisierung durch Impfung). Die Effektivität der humoralen Immunantwort wird durch somatische Hypermutationen in den Genen der variablen Region und Antikörperisotypenwechsel erhöht. Auch erfolgt eine Selektion der B-Zellen auf eine hochaffine Bindung mit antigenpräsentierenden Zellen im Lymphknoten. T-Helferzellen vermitteln diese Prozesse durch Zytokine, die den Klassenwechsel der Antikörper induzieren, und durch Selektion der B-Zellen nach präsentiertem Antigenpeptid. So kann eine IgM-Persistenz (*Craft et al., 1986*), durch Fehlen des Antikörperklassenwechsels, ein Hinweis auf mangelnde B-Zell-Stimulation durch T-Helferzellen sein. Die Borrelien-spezifischen Antikörpertiter (IgM/IgG) sind meistens im Anfangsstadium der Infektion sehr niedrig und erreichen erst nach Wochen bis Monaten ein Maximum, wobei sie zeitlich meistens mit dem Auftreten der Krankheitssymptome korrelieren (*Coleman und Benach, 1987, Craft et al., 1986*). Primär werden IgM-Antikörper gegen das relativ unspezifische Flagellenantigen (41kD) gebildet, das auch bei anderen Spirochäten, wie z.B. *Treponema pallidum* vorhanden ist. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es dann zur Antikörpergenerierung gegen spezifische Borrelienoberflächenproteine.

### 1.2.2.2 T-Zell-vermittelte Immunantwort auf *B. burgdorferi*

Die Beobachtung, dass bestehende *B. burgdorferi*-spezifische Antikörper-Titer nicht mit einer Krankheitsresistenz einhergehen (*Barthold et al., 1990, Schaible et al., 1991*) verwies auf die Bedeutung der zellulären Immunreaktion. Auch *Sigal (1984)* erkannte, dass eine geringe Anzahl spezifischer T-Zellen, die aus Gelenkflüssigkeit (*Sigal et al., 1986*), Liquor (*Pachner et al., 1985*) und Blut isoliert werden konnten (*Schluesener et al., 1989*), mit einer hohen Krankheitsaktivität korreliert. *B. burgdorferi* löst durch das Lipoprotein OspA (*Knigge et al., 1996*), sowohl bei Patienten mit Lyme-Borreliose als auch bei gesunden Kontrollpersonen eine unspezifischen T-Zellaktivierung (Proliferation) aus (*Roessner et al., 1994, Zoschke et al., 1991*). Andere Autoren fanden eine wesentlich höhere (*Dattwyler et al., 1988a, Sigal, 1984*) oder eine niedrigere (*Chiao et al., 1994*) TZ-Proliferation bei Patienten mit Lyme-Borreliose, erklärbar durch Einflußfaktoren wie Spirochätenquantität, Infektionsdauer (*Chiao et al., 1994*) und unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte (*Yoshiari et al., 1991*).

T-Zellen erkennen Antigen nur auf der Oberfläche anderer Körperzellen, präsentiert auf MHC-Molekülen, wodurch eine klonale Proliferation und Differenzierung zur T-Effektorzelle erfolgt. Ihren Bestimmungsort (Entzündungsherd) erreichen die reifen Effektorzellen, ähnlich wie beim „homing“ durch differentielle Expression von Adhäsionsmolekülen im Zielgewebe. Es werden drei Gruppen aktivierter T-Effektorzellen unterschieden, CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-TH1-, CD4<sup>+</sup>-TH2-Zellen, deren Eigenschaften durch *B. burgdorferi* moduliert werden. Die Anzahl (*Busch et al., 1996*) und die Aktivität (*Dattwyler et al., 1986*) CD8<sup>+</sup>-zytotoxischer T-Zellen wird durch eine aktive *B. burgdorferi*-Infektion deutlich reduziert. Daraus kann eine höhere Krankheitsresistenz resultiert, da die Entwicklung der protektiven Immunität nicht durch Vernichtung antigenpräsentierender Zellen und Sekretion immunsuppressiver Zytokine gestört wird (*Keane-Myers und Nickell, 1995b*). Die Suppressorzellen zeigen bei Borrelieninfektion eine verminderte Aktivität (*Moffat, 1984*). Möglicherweise ist bei der Lyme-Borreliose, ähnlich der juvenilen rheumatoiden Arthritis bei der Autoantikörper gegen T-Helferzellen vorliegen, die Aktivitätsregulierung der Suppressorzellen, die eine überschießende Antikörperproduktion unterdrücken, durch die T-Helferzellpopulation gestört (*Sigal, 1984, Dattwyler et al., 1986*). Durch diese vermehrte Antikörperproduktion wegen unzureichend aktivierter Suppressorzellen werden autoimmunologische Phänomene begünstigt (*Moffat, 1984*). Die CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellpopulation trägt zur protektiven Immunität (*Keane-Myers et Nickell, 1995a, Rao et al., 1995*) bei, ist nicht für die Generierung protektiver Antikörper

und die Regression der Lyme-Arthritis, wohl aber für die Resolution der Lymekarditis erforderlich (*Fikrig et al., 1997a*). Man unterscheidet TH1- und TH2-Zellen, die durch den Einfluß der in der Frühphase der Infektion gebildeten Zytokine entstehen. IFN- $\gamma$  und IL-12 lenken die Differenzierung Richtung TH1-, IL-4 und IL-6 Richtung TH2-Effektorzelle. Meistens sind TH1- und TH2-Zellen an der Immunantwort beteiligt, da verschiedene Antigenpeptidsequenzen durch unterschiedliche Affinität beide Zellpopulationen stimulieren. Durch zytokingesteuerte, gegenseitige Unterdrückung der Zellvermehrung dominiert jedoch meist ein TH-Subset die Immunantwort. Bei Patienten mit Lyme-Arthritis differenzieren sich T-Helferzellen hauptsächlich in Richtung TH1-Subset (*Yssel et al., 1991, Gross et al., 1998b*), da *B. burgdorferi* die TH1-Antwort verstärkt (*Ma et al., 1994*). TH1-Zellen exprimieren Makrophagen-aktivierende Effektormoleküle (CD40-Ligand, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ ) und sind v.a. bei der Abwehr intrazellulärer oder eingekapselter extrazellulärer Mikroorganismen von Bedeutung. TH2-Zellen exprimieren B-Zell-aktivierende Effektormoleküle (CD40-Ligand, IL-4, IL-5), die antigenspezifische B-Zellen zur Proliferation und IgM-Produktion anregen. Die Produktion inflammatorischer Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , IL-1 und TNF- $\alpha$ , durch TH1-Zellen ist mit einer entzündlichen Gelenkerstörung verbunden, während TH2-Zellen in der Lage sind diesen Entzündungsvorgang zu dämpfen (*Miossec et al., 1992, Cocoran et al., 1992, van Roon et al., 1995*). Dies wurde anhand eines Modells *B. burgdorferi*-empfindlicher C3H- und resistenter BALB/c-Mäuse bestätigt (*Keane-Myers et al., 1995a*), da sich durch Behandlung mit rIL-4 das klinische Beschwerdebild (Gelenkschwellung), bei rückläufiger Spirochätenzahl, bessern lies. Die zunehmende Krankheitsresistenz ging mit einer signifikanten Reduktion der IFN- $\gamma$ -Produktion, verminderter IgG2-/IgG3- und vermehrter IgG1-Produktion einher. Anhand des Modells TLR2-defizienter Mäuse zeigte sich jedoch, dass IL-4 (IL-13) für die Erregerkontrolle im Gewebe (Arthritis) nicht allein ausschlaggebend ist, da verminderte IgG2b- und erhöhte IL-4-stimulierte IgG1-Level bei massiver Gelenkschwellung nachgewiesen wurden (*Potter et al., 2000*). Bei der Lymekarditis überwiegt ebenfalls die TH1-Zellantwort (*Doyle et al., 1998*), während IL-4 die Krankheitsaktivität positiv zu beeinflussen vermag (*Satoskar et al., 2000*). Allgemein wird das Vorherrschen von TH1-Zytokine (IL-2, GM-CSF, IFN- $\gamma$ ) und ein Fehlen von TH2-Zytokinen (IL-4, IL-5) bei LD-Patienten beschrieben (*Yssel et al., 1991, Oksi et al., 1996*). Die borrelieninduzierte (*Giambartolomei et al., 1998*) IL-12 vermittelte (*Pohl-Koppe et al., 1998*) IL-10-Produktion ist bei Überwiegen der TH1-Zytokine unzureichend, da IL-10 die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  vermindert (*Yin et al., 1997*). TH1- oder

Makrophagen-Zytokine (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ) können eine Infektion mit *B. burgdorferi* verhindern (Zeidner et al., 1996), da TH1-Zellen eine hohe zytolytische Aktivität besitzen und die Immunglobulinsynthese der B-Zellen vermitteln (Del Prete et al., 1993). Eine durch IL-10 verminderte TH1-Zellantwort führt zu verminderter Antikörperproduktion und erlaubt eine Vermehrung der Borrelien (Anguita et al., 1996). Andererseits induziert IFN- $\gamma$  speziell die Synthese von IgG2a, das an den Fc- $\gamma$ -Rezeptor der Monozyten und an Komplement bindet und so mit der Gewebeerstörung in Verbindung steht (Mattyniak et al. 1995). So trat bei Behandlung empfindlicher bzw. borrelieninfizierter Mäuse mit neutralisierenden anti-IFN- $\gamma$ -mAb oder mit anti-IL-12-mAb, die eine Abnahme der TH1-Antwort bewirken, eine Besserung der klinischen Symptomatik (Lyme-Arthritis) ein (Anguita et al., 1996, Keane-Myers et al., 1995a). Auch die zeitliche Synchronisation der *B. burgdorferi*-induzierten Zytokinproduktion hat Einfluß auf den Krankheitsverlauf. Kang et al. (1997) erfassten bei krankheitsresistenten BALB/c Mäusen zu Beginn der Infektion eine höhere IFN- $\gamma$ -Produktion als bei dem empfindlichen C3H/HeN-Stamm. Während bei den krankheitsresistenten BALB/c Mäusen der IFN- $\gamma$ -Level konstant blieb, stieg er bei dem empfindlichen C3H/HeN-Stamm kontinuierlich an. Erst nach 14 Tagen war ausschließlich bei dem resistenten BALB/c-Stamm IL-4 meßbar. Beide Mäusestämme entwickelten während dieser Zeit eine vergleichbare Arthritis, die sich nur bei den BALB/c-Mäusen zurückbildete, während sie bei den C3H/HeN-Mäusen persistierte. Durch die anfangs höhere IFN- $\gamma$ -Produktion der BALB/c-Mäuse wurde eine effektivere Makrophagenaktivierung und somit eine Antigenreduktion ermöglicht. In Abhängigkeit dieser niedrigen Antigenkonzentration erfolgt später die Differenzierung in Richtung TH2 (Hosken et al., 1995).

### 1.2.3 Die Rolle der dendritischen Zellen bei Borrelieninfektion

Nach Zeckenstich entsteht Kontakt zwischen Langerhanszellen und *B. burgdorferi*-Antigen. Ihr unreifer Phänotyp, der durch niedrige Expressionsraten von MHC-Proteinen und kostimulatorischen Oberflächenmolekülen gekennzeichnet ist, ermöglicht die Aufnahme antigenetischen Materials über Makropinozytose oder Mannose-Rezeptor-vermittelte Endozytose (Sallusto et al., 1995). Humane dendritische Zellen, die aus Hautbiopsien oder wie in dieser Arbeit aus peripherem Blut generiert wurden, phagozytieren und prozessieren intakte *B. burgdorferi*-Spirochäten und präsentieren spezifische Peptide gegenüber T-Zellen (Filgueira et al., 1996, Svenson et al., 1997). Nach Aktivierung der Langerhanszellen (Antigenaufnahme) wird die Reifung, gekennzeichnet

durch erhöhte MHC- und Adhäsions-/Kostimulationsmolekülexpression induziert, wodurch über eine stabile MHCII-Präsentation *B. burgdorferi*-spezifischer Oberflächenproteine, v.a. Lipoproteine wie Lip-OspA eine TZ-Stimulation (*Altenschmidt et al., 1996, Beermann et al., 2000*) ermöglicht wird. Die Erkennung des MHC-Peptidkomplexes durch die T-Zelle in der parakortikalen Zone des Lymphknotens erfolgt über den T-Zell-Rezeptor (TZR), der einem membranassoziierten Ig-Fab-Fragment ähnelt. Erkennt eine naive T-Zelle ihren spezifischen Peptid-MHC-Komplex wird LFA-1 exprimiert, das der T-Zelle ermöglicht mit hoher Affinität an ihre dendritische Zelle zu binden, wodurch eine Rezirkulation durch das Blut und weitere Lymphknoten unterbunden wird und eine Anregung zur Differenzierung und Proliferation erfolgt. *Mbow et al. (1997)* erzeugten durch den Transfer *B. burgdorferi*-stimulierter dendritischer Zellen eine protektive Immunantwort.

#### 1.2.4 Besonderheiten in der Pathogenese der *B. burgdorferi*-Infektion

Obwohl *B. burgdorferi* beim Menschen eine humorale und eine zelluläre Immunantwort auslöst, ist nicht immer eine Erregerelimination möglich. Der Infektionsmodus scheint eine entscheidende Rolle für die Reaktionsweise des Immunsystems zu spielen (*Pachner et al., 1992*). Der Speichel der Zecke induziert eine Immunmodulation im Wirtsorganismus mit TH2-Polarisation und TH1-Suppression, getriggert durch IL-10 (*Schoeler et al., 1999, Zeidner et al., 1997, Urioste et al., 1994*). *B. burgdorferi* induziert ultrastrukturelle Veränderungen humaner Phagozyten (*Rittig et al., 1997*) und besitzt Schutzmechanismen gegen die Vernichtung durch Komplementlyse (*Guner, 1996*). Eine Erregerpersistenz kann durch Rückzug von *B. burgdorferi* in Gewebe mit niedriger MHC-Expressionsrate wie z.B. ZNS/PNS entstehen („escape“ Mechanismus), ermöglicht durch *B. burgdorferi*-induzierte Expressionserhöhung von „neural cell adhesion molecules“ (NCAM) (*Duray, 1992*). Im Rahmen chronischer Hautinfektionen (ACA/ECM) bewirkt *B. burgdorferi* eine verminderte MHCII-Expression der Langerhanszellen, mit Folge einer ineffektiven Immunantwort bzw. Erregerelimination (*Silberer et al., 2000*).

Durch die antigenetische Heterogenität der Oberflächenproteine (OspA/OspC) (*Wilske et al., 1988*) europäischer Borrelienstämme im Gegensatz zur Homogenität nordamerikanischer Isolate (*Barbour et al., 1985*) hat *B. burgdorferi* die Möglichkeit zur schnellen Adaptation an neue Umweltbedingungen und zur positiven Selektion besonders virulenter Stämme (*Wilske et al., 1985b*). Die Antigene OspA (31kd) und OspB (34kd) (*Bundoc et al., 1989*) und die Lipoproteine pG (*Wallich et al., 1995*) und LA7 (*Wallich et al., 1993*) weisen eine extensive genotypische Heterogenität durch ständige

plasmidgesteuerte Antigendrift auf. *Zhang und Norris (1998)* konnten ein *vsl*-System („*variable major protein*-like sequence“) bei dem *B. burgdorferi*-Stamm B31 nachweisen, das durch multiphasische Variation dieses Oberflächen-exponierten Membranproteins der Immunantwort des menschlichen Wirtes entgeht (*Barbour und Stoenner, 1985*). Nach Übertragung auf den Wirt kommt es durch Blutkontakt zur verminderten OspA und vermehrten OspC-Expression (*Guner, 1994, Fingerle et al., 1995, Schwan et al., 1995*). *Cluss und Boothby (1990)* verwiesen auf die Thermoregulation der Proteinsynthese bei *B. burgdorferi*, wobei eine Temperaturerhöhung mit einer OspC-, OspE-, OspF-, und pG-Expressionserhöhung einhergeht (*Cluss et al., 1996*). Auch der pH-Wert in der Umgebung von *B. burgdorferi* verändert die Membranproteine (*Carroll et al., 1999*), wodurch eine veränderte Infektiosität durch Wachstums- und Endothelbindungsvermögen, und eine veränderte Antikörper- und Komplementempfindlichkeit resultiert (*Sadziene et al., 1993a, 1995, Fikrig et al., 1995*). Die Antigendrift ermöglicht trotz suffizienter spezifischer Antikörper gegen die primär präsentierten Oberflächenmoleküle eine persistierende Infektion mit antigenetisch veränderten Borrelien (*Pfister et al., 1986*). So werden durch den Einfluß des menschlichen Immunsystems Antikörper-resistente Stämme selektioniert (*Fikrig et al., 1995*).

*B. burgdorferi* hat die Fähigkeit sich an menschliche Fibroblasten anzulagern, sie zu penetrieren und invadieren. Dadurch entgeht es der Vernichtung durch Antibiotikatherapie (*Klempner et al., 1993*) und kann so Ausgangspunkt einer chronisch persistierenden Infektion werden. Zudem kann *B. burgdorferi* an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix, wie die Proteoglycane Dermatan sulfat und Heparansulfat (*Isaacs, 1994, Leong et al., 1998*), Kollagen über Decorin (*Guo et al., 1995*), Glykosaminoglykane (*Leong et al., 1995*), Fibronectin (*Kopp et al., 1995; Guner, 1996, Coburn et al., 1998*), an neuronale Strukturen, wie Glykosphingolipide (*Garcia-Monco et al., 1992*) und Gliazellen (*Garcia-Monco et al., 1989*), aber auch an Blutbestandteile, wie Erythrozyten (*Leong et al., 1995*) und Thrombozyten (*Coburn et al., 1994*) binden, die eine Rolle in der Disseminierung und dem Organotropismus der Spirochäten spielen. Als potente Bindungsliganden wurden Osp A, B, C, D identifiziert (*Comstock et al., 1993, Thomas und Comstock, 1989, Sadziene et al., 1995, 1993a*). *B. burgdorferi* bindet über OspA Plasminogen und aktiviert dieses zu Plasmin. Dadurch wird ein Abbau der extrazellulären Matrix ermöglicht mit der Folge einer gesteigerten Fähigkeit Endothelzellmonolayer zu durchdringen. So entsteht für *B. burgdorferi* die Möglichkeit der Migration und Disseminierung (*Fuchs et al., 1994, Coleman et al., 1995, Hu et al., 1995, 1997*).

### 1.2.5 Autoimmunologische Aspekt bei *B. burgdorferi*-Infektion

Die Autoimmunreaktion, eine spezifische Immunantwort gegen körpereigene Antigene (Autoantigene) ist von Erbfaktoren (HLA- bzw. MHC-Molekülen), Umweltfaktoren, z.B. Infektion, anatomischen Gegebenheiten und intraindividuellen Unterschieden in der Zytokinfreisetzung (erhöhte TNF- $\alpha$ -Level), abhängig. Die Selbsttoleranz schützt durch klonale Deletion und Inaktivierung autoreaktiver B- und T-Lymphozyten, vor einer Autoimmunerkrankung, die erst nach Aktivierung unspezifischer Entzündungsmechanismen eine Gewebeerstörung auslöst. (Janeway und Travers, 2001).

Die Entstehung von Autoimmunreaktionen nach Infektion mit *B. burgdorferi* basiert u.a. auf dem Mechanismus der molekularen Mimikry durch kreuzreagierende Autoantigene. Sequenzhomologien wurden zwischen dem *B. burgdorferi*-Flagellinprotein (41kD) und humanen Proteinen myelinisierter Fasern peripherer Nerven, Nervenzellen, Axonen des ZNS und epithelialer Zellen, wie Gelenksynovia, und Herzmuskelzellen (Aberer et al., 1989a) identifiziert. Bei behandlungsresistenter Lyme-Arthritis konnte eine Sequenzhomologie zwischen bakteriellem OspA und dem menschlichen hLFA-1-Protein („human leukocyte function-associated antigen-1“) das auf körpereigenem HLA-DRB1\*0401 (MHCII-Molekül) präsentiert wird, gefunden werden (Gross et al., 1998a, Steere et al., 2001). Potentiell autoreaktive OspA-spezifische T-Zellen bekommen durch inflammatorische Zytokine Zugang zum Gelenkinneren, um dort die „Selbsttoleranz zu überlisten“ (Lengl-Jaßßen et al., 1994). Weitere Selbstantigene des ZNS/PNS, wie das „myelin basic protein“, peripheres Myelin, Kardiolipin und Galactocerebroside erzeugten bei Lyme-Radikulomyelitis eine TZ-Proliferation (Martin et al., 1988). Begünstigt wird die Reaktion auf Selbstantigen durch MHCII-Expressionserhöhung auf Endothelzellen und Synoviozyten bei *B. burgdorferi*-Infektion (Duray, 1992). Zudem induziert *B. burgdorferi* eine polyklonale B-Zellaktivierung (Yang et al., 1992) und eine Präsentation nicht-assoziiertes Antigens, wodurch eine TZ-Autoreaktivität durch BZ-TZ-Interaktion entsteht kann (Goronzy et al., 1992). Durch Aktivierung ruhender Gedächtnis-B-Zellen und folgender TZ-Rekrutierung kann so auch nach langer Latenzzeit, z.B. bei späten Krankheitsstadien ein Autoimmunprozeß in Gang gesetzt werden.

### 1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Diagnose einer Lyme-Borreliose bereitet in vielen Fällen Schwierigkeiten, da der Erregernachweis nicht gelingt. Die derzeitige Routinediagnostik der Borrelieninfektion, der serologische Nachweis von IgM- und IgG-Antikörperkonzentrationen mittels ELISA oder Westernblot, zeigt eine „diagnostische Lücke“ in den ersten Wochen nach Infektion (Hofmann, 1996). Dies kann bedingt sein durch die Auswahl der Testantigene, die bei kommerziellen Tests von häufig subkultivierten Laborstämmen stammen, wobei die Expression *B. burgdorferi*-Oberflächenantigene einer hohen Variabilität abhängig von den „Kulturbedingungen“ (Temperatur, pH-Wert, Blutkontakt) unterliegen. Andere Proteine dagegen, wie z.B. pG werden nur *in vivo* und nicht unter *in vitro* Bedingungen in Laborstämmen exprimiert (Wallich et al., 1995). Dattwyler et al. verwiesen bereits 1988 auf die frühere Nachweisbarkeit der T-Zellantwort im Vergleich zum Nachweis humoraler Parameter (Dattwyler et al., 1988b). Die Messung der zellulären Immunreaktion auf *B. burgdorferi* im Blut könnte zur Verbesserung der Frühdiagnostik beitragen.

Ein Großteil der Patienten mit Frühinfektion ist zunächst seronegativ und erst unter antibiotischer Therapie werden IgM-Ak nachweisbar. Verschiedene Autoren beobachteten jedoch gerade bei dieser serologisch schlecht zu diagnostizierenden Patientengruppe eine positive TZ-Proliferation (Dressler et al., 1991, Breier et al., 1996), sodass die Untersuchung der T-Zell-vermittelten Immunantwort eine wertvolle Bereicherung in dem bisherigen Diagnosespektrum darstellen könnte.

Bei einem Teil der Patienten mit Lyme-Borreliose bestehen trotz adäquater Antibiotikatherapie neurologische oder „rheumatische“ Beschwerden weiter oder entwickeln sich sogar erst nach Behandlung. Mit den derzeitig eingesetzten diagnostischen Methoden gelingt es nicht, eine Erklärung der chronischen Beschwerden zu finden.

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob mit Hilfe der zellulären Immunantwort eine Aussage über den pathogenetischen Zusammenhang zwischen TH1- oder TH2-Zellantwort, und/oder Zytokinwirkung und Beschwerdepersistenz getroffen werden kann und sich aus den gewonnenen Erkenntnissen ein therapeutisches Konzept zur Behandlung chronischer Beschwerden entwickeln lässt.

- Können bestimmte rekombinante *B. burgdorferi*-Antigene, die über MHCII-Moleküle autologer dendritischer Zellen präsentiert werden, *in vitro* eine krankheitsspezifische TZ-Proliferation und/oder Zytokinproduktion auslösen?
- Erlaubt die Untersuchung der TZ-Proliferation und/oder Zytokinproduktion im autologen System mit MHCII-präsentierten Antigenen eine Unterscheidung zwischen „Gesund und Krank“?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der TZ-Reaktion (TZ-Proliferation und/oder Zytokinproduktion) durch *B. burgdorferi*-spezifisches Antigen und dem klinischen Erkrankungsbild bzw. Krankheitsstadium?
- Welchen Einfluß hat eine adäquate antibiotische Behandlung auf den Verlauf der zellvermittelten Immunantwort bei Lyme-Borreliosepatienten?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen Antikörperproduktion und TZ-Reaktion (TZ-Proliferation und/oder Zytokinproduktion)?

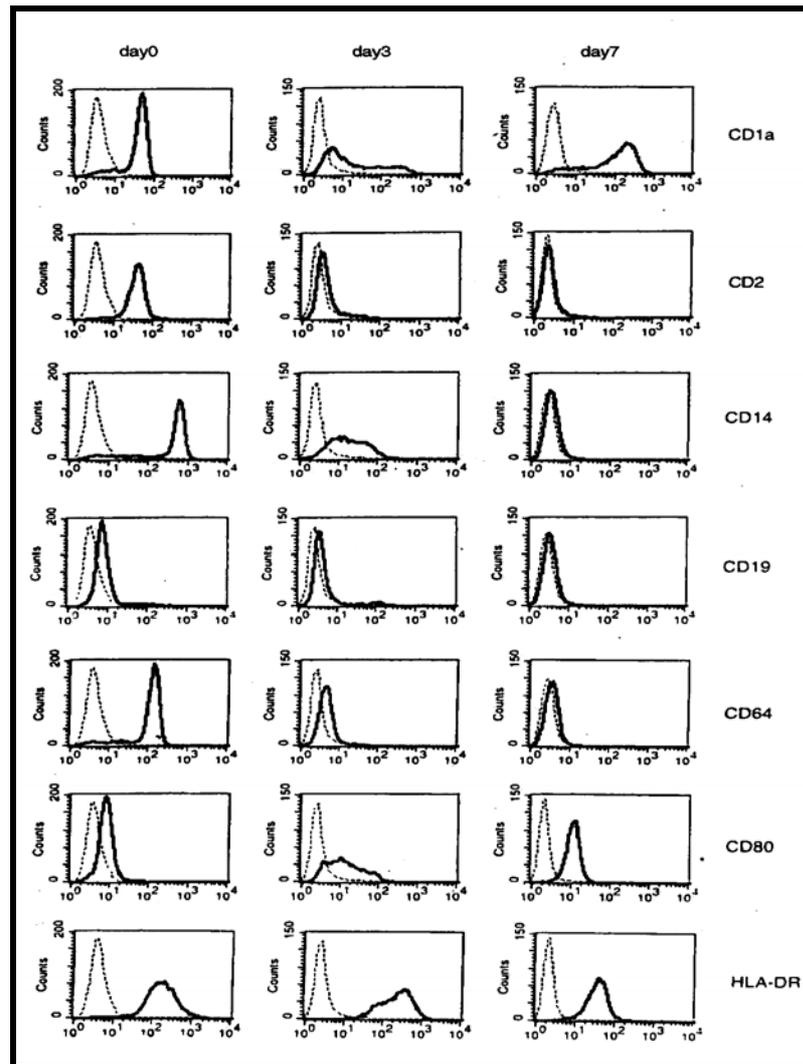
## 2 Methoden

In dem verwendeten Versuchsaufbau sollte die zelluläre Immunreaktion auf *B. burgdorferi* untersucht werden, wobei versucht wurde die *in vivo* Bedingungen einer *B. burgdorferi*-Infektion nachzuahmen.

*B. burgdorferi* wird nach Übertragung auf den Wirtsorganismus in der Haut durch Langerhans-Zellen phagozytiert, intrazellulär fragmentiert und schließlich als Proteinfragmente auf MHC-Oberflächenmolekülen präsentiert. Im regionalen Lymphknoten stimuliert die aktivierte Langerhanszelle u.a. CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, die danach proliferieren und Zytokine produzieren.

Durch Züchtung dendritischer Zellen, die den Langerhans-Zellen möglichst ähnlich sind (CD1a<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>), ist eine Nachahmung, der *in vivo* beteiligten Zellpopulation versucht worden. Die Differenzierung aus hämatopoetischen Progenitorzellen (Monozyten), gewonnen aus peripherem Venenblut, erfolgte durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF (1. Zytokincocktail) zur Zellkultur (Steinmann, et al., 1997, Schuler und Romani, 1997, Sallusto und Lanzavvechia, 1994). Um den Reifegrad der generierten, dendritischen Zellen charakterisieren zu können, wurde, neben mikromorphologischen Beobachtungen, in Vorversuchen eine FACS-Analyse („Floureszenz-Activated-Cell-Scanning“) der Oberflächenmoleküle zunächst in Heidelberg (Yvonne Bauer, Institut für Immunologie, Abt. Infektionsimmunologie, der Ruprecht-Karls-Universität), und später auch in München durchgeführt (Abb. 2.1.).

Nach 7-tägiger Reifung bzw. Differenzierung der peripheren Blutmonozyten wurde den noch unreifen dendritischen Zellen 48 Stunden verschiedene rekombinante Borrelienantigene zur Aufnahme angeboten.



**Abbildung 2.1 Oberflächenphänotyp der dendritischen Zellen am 0., 3. und 7. Kulturtag**  
 Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzlevel der Monozytenpopulation. Die gepunkteten Kurven zeigen Kontrollfärbungen mit Isotyp-entsprechenden irrelevanten Antikörpern. Die Expression der jeweiligen Markermoleküle ist durch die überlagerten Diagramme dargestellt

Die stabile Präsentation der Antigene wurde durch eine „Nachreifung“ der dendritischen Zellen mit Hilfe eines 2. Zytokincocktails (IL-4, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PG E<sub>2</sub>) erreicht, da unreife dendritische Zellen in Abwesenheit von GM-CSF und IL-4 wieder zu Monozyten entdifferenzieren (Schuler und Romani, 1997). Die nun den antigenpräsentierenden Langerhanszellen entsprechenden dendritischen Zellen wurden mit T-Zellen inkubiert, ähnlich dem *in vivo* T-Zell-Kontakt im regionalen Lymphknoten. Die daraus resultierende Proliferation bzw. Zytokinproduktion der T-Helferzellpopulation wurde anschließend gemessen (Abb. 2.2).

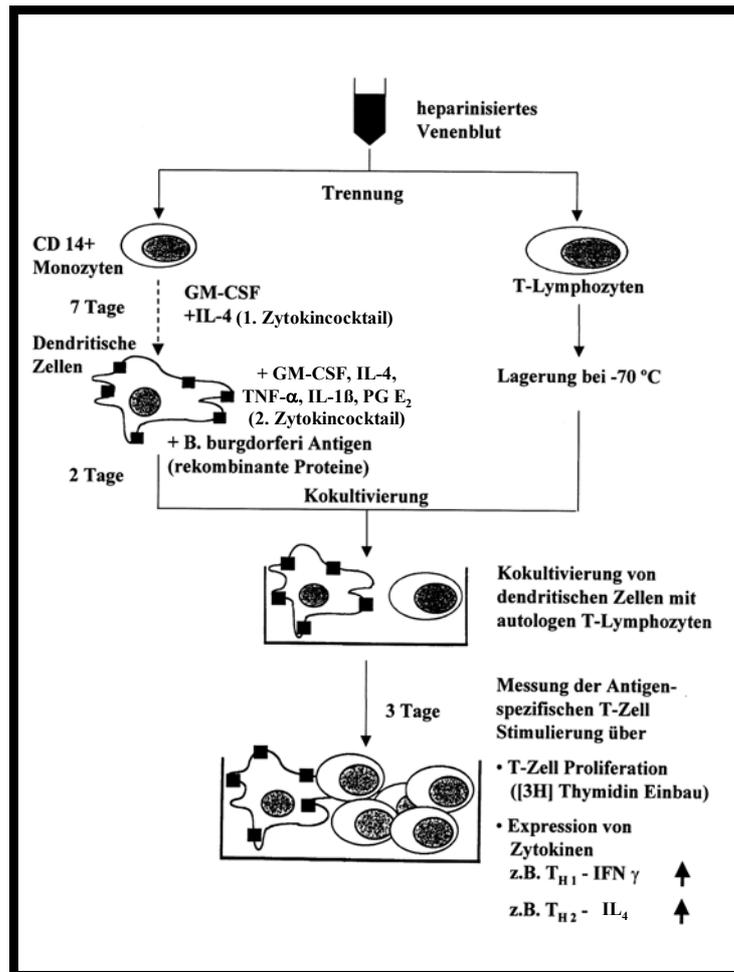


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

## 2.1 Zellisolierung

### 2.1.1 Monozytenpräparation durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten-Zentrifugation

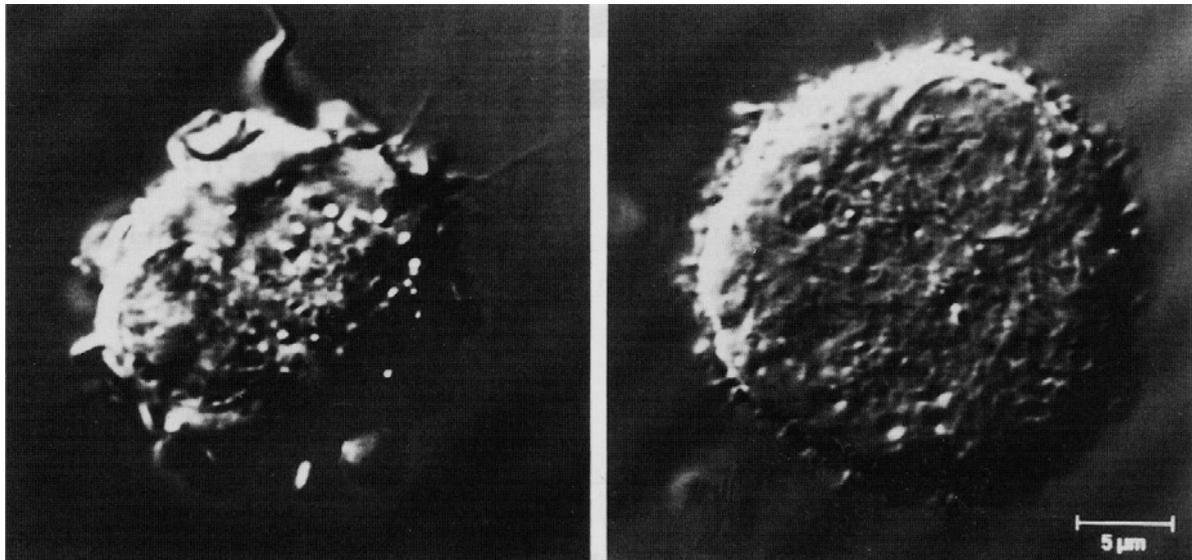
Als Ausgangsmaterial wurde humanes Venenblut (ca. 60ml), gewonnen in sterilen, heparinisierten Röhrchen verwendet. Alle verwandten Medien, Ficoll-Lösung, ACK-Lyse-Puffer, Vollmedium, PBS wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. In 4 Falcon-Röhrchen à 50ml wurden jeweils 15ml Ficoll-Lösung vorgelegt und mit jeweils ca. 15ml Blut sehr langsam und vorsichtig überschichtet, um das Vermischen der beiden Flüssigkeiten zu verhindern. Nach Zentrifugation (30 min. bei 1750 rpm, ohne Bremse!) wurde das Blutplasma (klarer Überstand) abpipetiert und zur späteren Verwendung 30min. bei 56°C inaktiviert. Die darunterliegenden hell-trüben Zellringe, die Mono- und Lymphozyten enthalten, wurden anschließend vorsichtig abgenommen und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Das verbleibende Pellet (Erythrozyten) wurde verworfen.

Bei Verwendung, sog. Vacutainer-CPT-Röhrchen („Cell Preparation Tube“, Firma Becton Dickinson) die bereits Ficoll-Lösung, ein Trenngel und Na-Heparin enthielten, entfiel der beschriebene Vorgang der Überschichtung, da durch Vakuumsog direkt mit diesen Röhrchen, steril Blut gewonnen werden konnte. Zentrifugiert werden mußte allerdings mit Bremse (!), bei 2800 rpm, 20 min., damit die Erythrozyten durch das Gel gepresst werden und nur mononukleäre Zellen als Interphasering, und das Blutplasma als Überstand zurückblieben.

Die in Falcon-Röhrchen überführte Zellsuspension wurden mit PBS auf 50ml aufgefüllt und zentrifugiert (10min., bei 1200 rpm, ohne Bremse), um die Zellen von Plasmarückständen zu befreien. Das gewonnene Pellet war von verbliebenen Erythrozyten z.T. noch rot verfärbt, weshalb eine Erythrozytenlyse mit ACK-Lyse-Puffer (10ml) angeschlossen wurde. Dazu wurde das Zellpellet in ACK-Lyse-Puffer resuspendiert und nach ca. 5 min wurde durch Verdünnung des Lyse-Puffers mit PBS (40ml) die Erythrozytenlyse abgestoppt. Das Lyseverfahren basiert auf unterschiedlichen osmotischen Werten der Erythrozyten und des ACK-Lyse-Puffers, dessen osmotischer Wert geringfügig unter dem der Erythrozyten liegt. Infolge des so entstehenden Konzentrationsgefälles strömt Wasser in die roten Blutkörperchen ein und bringt die Zellmembran durch das zusätzliche Volumen zum Platzen. Da allerdings auch andere Blutzellen geschädigt werden können, ist der Lysevorgang möglichst kurz zu halten. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min., bei 1200 rpm, ohne Bremse) wurde das Pellet in 10ml PBS resuspendiert und einer Zellzählung unterzogen. Dazu wurden 50µl Trypanblau mit 50µl Zellsuspension gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. (Berechnung siehe Zellisolierungsprotokoll/Anhang)

Nach einem weiteren Waschschrift (Zentrifugieren 10min., bei 1200 rpm, ohne Bremse) wurden die Zellen in 10ml Vollmedium aufgenommen, in eine Petrischale gegeben und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert, um die Monozyten aus der Zellsuspension am Plastikboden der Petrischale adhären zu lassen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und der Boden der Petrischale mit 10ml PBS abgespült, sodass der überwiegende Teil der Monozyten haften blieb und die anderen Leukozytenfraktionen zurückgewonnen wurden. Die im abgenommenen Überstand und der Spülflüssigkeit (PBS) enthaltenen Lymphozyten wurden für die darauffolgende T-Zell-Isolierung in ein neues Falcon-Röhrchen (50ml) überführt. Die in der Petrischale verbliebenen Monozyten wurden mit 10ml frischem Medium versorgt und zur Reifung mit 10µl GM-CSF (100µg/ml) und

10µl IL-4 (500U/ml) versorgt. Die Reifung der Monozyten zu dendritischen Zellen mit Hilfe von GM-CSF und IL-4 nahm die folgenden 7 Tage in Anspruch.



**Abbildung 2.3 Laserscanmikroskopie der *in vitro* generierten dendritischen Zellen am 7. Kulturtag**  
Beide Bilder zeigen die Morphologie der in Kultur beobachteten dendritischen Zellen. (Quelle Y. Bauer)

### 2.1.2 T-Lymphozyten-Präparation durch Schafserythrozyten-TZ-Rosettierung

Aus der, von der Monozytenpräparation verbliebenen lymphozytenhaltigen Zellsuspension wurde nach einer Zentrifugation (10min., bei 1200 rpm, ohne Bremse) ein Aliquot entnommen und, wie schon zuvor beschrieben, einer Zellzählung unterzogen. Anhand der ermittelten Zellzahl wurde mit Vollmedium eine Zellsuspension mit der Konzentration von  $0,5 \times 10^7$  Zellen/ml Vollmedium hergestellt, um dann Schafserythrozyten (SRCB) zur Rosettierung im Verhältnis 1:10 zuzusetzen.

Zuvor wurden die SRCB mit PBS solange gewaschen (1200 rpm, 10 min.) bis der Überstand klar blieb und dadurch störende Reste der Erythrozyten entfernt wurden. Danach wurde eine 10% Lösung (1ml SRCB + 9ml PBS) hergestellt, die wegen ihrer begrenzten Lagerungsfähigkeit (max. 1 Woche bei 4°C) stets frisch angesetzt werden mußte.

Das SRBC-Zellsuspensionsgemisch wurde zentrifugiert (10 min., bei 680 rpm, ohne Bremse) und 45 min. bei Raumtemperatur inkubiert, um die rosettenartige Anlagerung der Schafserythrozyten an die T-Zellen zu ermöglichen. Die T-Zell-spezifische Bindung kommt durch die Wechselwirkung des Oberflächenmoleküls CD-2 auf den T-Lymphozyten mit LFA-3 auf den Erythrozyten zustande. Durch die T-Zell-Rosettierung

veränderte sich die Dichte der T-Lymphozyten, sodass sie anschließend über eine Dichte-Zentrifugation isoliert werden können.

Das Pellet des T-Zell-Rosettierungsansatzes wurde auf einer drehenden Wippe langsam (ca. 10 min.) gelöst und mit 15ml Ficoll-Lösung vorsichtig unterschichtet. Nach erfolgter Zentrifugation (30 min., bei 1750 rpm, ohne Bremse) wurde der klare Überstand abgenommen und verworfen. Der entstandene Interphasering (E-Ring) mit den restlichen Monozyten und B-Zellen konnte zu einer zweiten Adhärenz der Monozytenisolation verwendet werden. Das verbleibende Pellet wurde in 10ml ACK-Lyse-Puffer resuspendiert und dadurch die TZ-gebundenen Schafserythrozyten lysiert. Dieser Lyseschritt wurde wie bei der Monozytenpräparation nach ca. 5 min. durch Verdünnung mit PBS abgestoppt. Nach weiteren Waschschritten (Zentrifugation 10 min., bei 1800 rpm, ohne Bremse, Resuspendierung des Pellets in PBS und nochmalige Zentrifugation (10 min., bei 1200 rpm, ohne Bremse) wurden die im Pellet befindlichen T-Zellen in 10ml Vollmedium aufgenommen und für 1 Tag bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank aufbewahrt. Zur weiteren Verarbeitung wurden die T-Zellen tief gefroren. Dazu wurde der Überstand aus der Petrischale abgenommen und durch Abspätern des Schalenbodens und spülen mit PBS wurden die noch in der Petrischale verbliebenen Zellen zurück gewonnen. Nach einem Waschschrift wurde das Zellpellet in 500µl fötalem Kälberserum gelöst und mit 500µl 20%igem DMSO (Gefrierschutz) versetzt. Dabei war zu beachten, dass die T-Zellen nach Zugabe des bei Raumtemperatur zelltoxischen DMSO unverzüglich tiefgekühlt, dann aber die Temperatur langsam abgesenkt werden musste (d.h. zuerst 2-3 Stunden -30°C, dann -70°C).

### 2.1.3 Auswahl und Aufbereitung der Antigene

Alle verwendeten Antigene wurden von R. Wallich und Mitarbeitern vom Institut für Immunologie, Abt. Infektionsimmunologie der Ruprecht- Karls-Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um rekombinante Proteine, die von E. coli DH5α mit dem Plasmidvektor pZS-77, nach Induktion durch Isopropyl-β-Thiogalaktosid, produziert wurden, mittels Ultraschall und 20% Triton X-100 angereichert, mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und im abschließenden Thrombinverdau die GST-Komponente der Fusionsproteine abgespalten wurde. Zur Proteinanalyse wurden SDS-Polyacrylamid-Minigele verwendet, die mit Coomassie Blau angefärbt wurden, die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Pierce bestimmt.

### 2.1.3.1 OspC

Das Oberflächenprotein OspC ist ein 22,6kD Protein, das analog zu dem „surface variable membrane proteins (Vmps)“ anderer Borrelien auf der Zelloberfläche präsentiert wird (Marconi et al., 1993, Carter et al., 1994). Der *in vivo* Expression folgt eine, vermutlich Stamm-spezifische Immunität des Wirtes (Bockenstedt et al., 1997). OspC ist auf einem Plasmid codiert (Sadziene et al., 1993b) und einer Thermoregulation unterworfen. Durch das Erreichen des menschlichen Wirtes, dem damit verbundenen Blutkontakt und der Temperaturerhöhung wird eine vermehrte Expression von OspC ausgelöst (Guner, 1994, Fingerle et al., 1995, Schwan et al., 1995, Cluss et al., 1996, Obonyo et al., 1999). Durch spezifische Antikörper gegen OspC kann eine Übertragung von Spirochäten durch die Zecke verhindert werden, da die Migration von *B. burgdorferi* aus dem Mitteldarm in die Speicheldrüsen gehemmt wird (Gilmore und Piesman, 2000). OspC stellt einen serologischen Marker dar, der vor allem bei Patienten mit Frühinfektion eine starke IgM-Antwort auszulösen vermag, während bei Patienten mit ACA häufig keine OspC-spezifischen IgM-Antikörper nachweisbar sind (Mathiesen et al., 1998, Rousselle et al., 1998). Durch das Hinzufügen von OspC zum Flagellum-ELISA konnte die Sensitivität um 10% bzw. 15% bei Patienten mit NB und EM gesteigert werden (Matthiesen et al., 1996).

### 2.1.3.2 p83

Das chromosomal codierte Protein p83 (Lefebvre et al., 1990) ist identisch mit p100 und p94 (Ditton et al., 1992), und wird als spezifisches Markerantigen in der Serodiagnostik der Lyme-Borreliose-Spätinfektion verwendet. Antikörper gegen das 83kD Antigen, sowohl IgM als auch IgG, wurden in allen Stadien der Lyme-Borreliose gemessen, wobei die Sensitivität von nur 20%, in der Frühphase der Erkrankung, z.B. EM bis 94% bzw. 86% in den Spätstadien, wie Lyme-Arthritis und ACA variiert (Rauer et al., 1995). p83 besitzt eine heterologe Region, lokalisiert zwischen der Aminosäureposition 390-540, durch die sich drei große Gruppen einteilen lassen, in Übereinstimmung mit den drei Genospezies von *B. burgdorferi sensu lato* (Rössler et al., 1995). Bei dem Vergleich des p83/100-Moleküls mit anderen Proteinsequenzen wurde eine Ähnlichkeit mit Charakteristika eukaryotischer Zellstrukturen gefunden und die nahe liegende Vermutung geäußert, dass p83 durch molekulare Mimikry zur Tarnung von *B. burgdorferi* im Wirtsorganismus beiträgt (Rössler et al., 1995).

### 2.1.3.3 ZSA36

ZSA36 weist eine Proteingröße von 22kD und eine Proteinelänge von 196 Aminosäuren (AS) auf. Der genetische Code von ZSA36 ist auf dem gleichen linearen Plasmid (lp54), wie bei den Antigenen OspA/B, lokalisiert und unterliegt ebenso einer unterschiedlichen Expressionsregulation *in vivo* und *in vitro*. Exprimiert wird ZSA36 sowohl *in vitro*, z.B. bei Laborstämmen, als auch *in vivo* sowohl in der Zecke als auch im Wirtsorganismus. ZSA36 ist im Genom aller Spezies von *B. burgdorferi sensu stricto* (strain ZS7) nachweisbar, allerdings bei *B. garinii* und *B. afzelii* in unterschiedlicher Intensität. Vor allem Patienten mit ACA (58%), Arthritis (30%) und Neuroborreliose (13%) weisen ZSA36-spezifische IgG-Antikörper auf. Diese spezifischen Antikörper wirken krankheitsprotektiv und verzögern den Arthritisbeginn, werden jedoch häufig nicht oder nur in geringer Menge produziert, erklärbar durch einen Translationsblock spezifischer mRNA oder eine suboptimale, nicht immunogene Expression (Wallich *et al.*, 2002).

### 2.1.3.4 DbpA

*B. burgdorferi* besitzt Decorin-bindende Adhäsine (Dbps), durch die es an das Kollagen-assoziierte Proteoglycan Decorin, befindlich in der extrazellulären Matrix des Wirtes, binden kann. Man unterscheidet DbpA mit 17kD und DbpB mit 22kD, die beide eine ähnliche Struktur aufweisen und an der Oberfläche von *B. burgdorferi* exprimiert werden. Während durch DbpA effektiv die Bindung von *B. burgdorferi* an ein Decorin-Substrat verhindert werden kann, weist DbpB nur einen abgeschwächten Effekt auf, begründet auf unterschiedlicher Substratspezifität (Guo *et al.*, 1998). Feng *et al.* (1998) konnten bei Mäusen durch Hyperimmunisation mit DbpA eine protektive Immunität erzeugen. Cassatt *et al.* (1998) fanden heraus, dass eine Immunisation mit DbpA die Dissemination von *B. burgdorferi* von der kutanen Inokulationsstelle aus verhindert und deshalb die Antikörper gegen DbpA, die während der Frühinfektion *in vivo* gebildet werden, bei der Kontrolle persistierender Infektionen eine Rolle spielen. Hagman *et al.* (1998) konnten während der Früh- und der Spätinfektion Antikörpertiter nachweisen. Auch hemmt DbpA-Antiserum das Wachstum von *B. burgdorferi in vitro* (Hanson *et al.*, 1998). Zudem sind Dbps in der Lage eine persistierende Antikörperantwort bei Mäusen zu triggern (Cinco *et al.*, 2000). Verschiedene Expressionslevel der Dbps-Epitope wurden zwischen und innerhalb der Genospezies gefunden (Cinco *et al.*, 2000, Roberts *et al.*, 1998).

### 2.1.3.5 pG

Besonderer Wert wurde auf die Untersuchung der T-Zellreaktivität auf das von *Wallich et al. (1995)* charakterisierte pG gelegt. Dieses 22kD Lipoprotein ist auf einem 48kb linearem Plasmid codiert, Spezies-spezifisch und wird nur *in vivo*, selektiv in Säugetieren exprimiert. Es weist eine extensive genotypische Heterogenität auf und ist im Vergleich mit anderen Oberflächenproteinen von *B. burgdorferi* am meisten mit OspF verwandt. Die Induktion von Antikörpern gegen pG bei Mäusen ging mit einer verzögerten Entwicklung und einer abgeschwächten Form der Arthritis einher.

Auch fand *Bauer (1999)* einen Zusammenhang zwischen T-Zellproliferation auf pG und Hautmanifestationen durch *B. burgdorferi* (*Bauer et al., 2001*). Der mangelnde Zusammenhang zu chronischen Manifestationen der Borreliose sieht *Bauer (1999)* in der fehlenden Sequenzhomologie von pG zu humanen Proteinen, da die Möglichkeit der molekularen Mimikry als pathogenetischer Mechanismus entfällt. Zudem fiel *Bauer (1999)* bei Southern-Blot-Analysen auf, dass die Stämme *B. afzelii* und *B. garinii* nicht mit der pG-Sonde von *B. burgdorferi* ZS7, einem *B. burgdorferi sensu stricto*-Stamm, hybridisierten. Als mögliche Gründe wurden signifikante Sequenzunterschiede des pG-Gens zwischen den Stämmen oder ein gänzlich Fehlen des pG-Gens bei den Stämmen *B. afzelii* und *B. garinii*, genannt.

### 2.1.4 Antigenstimulation dendritischer Zellen

Nach 7-tägiger Inkubationszeit, in der die Monozyten mit Hilfe von IL-4 und GM-CSF zu dendritischen Zellen gereift waren, wurde den noch unreifen dendritischen Zellen für 48 Stunden Antigen, in Form einzelner rekombinanter Borrelienproteine angeboten und ein 2. Zytokincocktail, bestehend aus je 5µl GM-CSF (100µg/ml), IL-4 (500U/ml), IL-1β (1µl/ml=10<sup>3</sup>U/ml), TNF-α (1µl/ml=10<sup>3</sup>U/ml), PG E<sub>2</sub> (1µl/ml), zugesetzt. In dieser Zeit erfolgte die Internalisierung, Prozessierung und Präsentation einzelner Peptidfragmente auf MHC-II-Oberflächenmolekülen (*Watts, 1997, Filgueira et al., 1996, Cella et al., 1997*) und durch den 2. Zytokincocktail eine „Nachreifung“ der dendritischen Zellen. Vor Kokultivierung der nun antigenpräsentierenden dendritischen Zellen mit autologen T-Zellen wurde das Antigen und die zugesetzten Zytokine durch einen Waschvorgang wieder aus dem System entfernt.

Auf Bestrahlung der dendritischen Zellen zur Proliferationshemmung wurde verzichtet, da *Anton et al. (1998)* bestrahlte DZ als weniger effizient in der Antigenpräsentation und T-

Zellstimulation beschrieben und in den Kontrollansätzen, in denen nur dendritische Zellen enthalten waren, keine signifikante Proliferation gemessen werden konnte.

## 2.2 Proliferations-Assay

Sowohl die dendritischen Zellen als auch die T-Zellen wurden vor der Weiterverarbeitung einer Zellzählung mit Trypanblau unterzogen, um die Vitalität der Zellen zu beurteilen und die Konzentration der benötigten T-Zellsuspension einzustellen. Einige Untersuchungen wurden mit verschiedenen „effector : target ratios“ (DZ:TZ 1:5, 1:10) durchgeführt, um das optimale Konzentrationsverhältnis zu definieren.

Triplets mit je  $5 \times 10^4$  T-Zellen und  $1 \times 10^4$  antigenpräsentierenden dendritischen Zellen wurden in einer 96-well-Platte angesetzt. Während der folgenden 4 Tage im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 7%  $\text{CO}_2$  proliferierten die T-Zellen durch den Stimulationsreiz MHCII-präsentierter Peptidfragmente auf den dendritischen Zellen. Nach Zugabe von  $20\mu\text{l}$  [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin ( $20\mu\text{Ci}$ ) in einer Konzentration von  $1\text{mCi/ml}$  erfolgte in einer weiteren Inkubationszeit von ca. 20 Stunden im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 7%  $\text{CO}_2$  der Einbau des [ $^3\text{H}$ ]-Thymidins in die T-Lymphozyten-DNS. Dieser Vorgang wurde durch Einfrieren der Zellen oder durch Ernten der Mikrotiterplatte beendet. Die Zellansätze wurden auf spezielle Glasfaserfilter übertragen, die anschließend getrocknet wurden. Die Proliferation der T-Zellen wurde anhand der Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern mit einem Gasszintillationszähler ( $\beta$ -Counter) als „counts per minute (cpm)“ quantifiziert.

Als positive Kontrolle wurde ein Triplet von je  $5 \times 10^4$  T-Zellen pro well mit Phytohämagglutinin (PHA) ( $10\mu\text{g/ml}$ ) unspezifisch stimuliert. Als negative Kontrolle wurden dendritische Zellen ohne spezifische Antigenpräsentation mit T-Zellen koinkubiert, um eine Proliferation durch die alleinige DZ/TZ-Interaktion auszuschließen. Weitere Kontrollansätze, zum Ausschluss der Proliferation dendritischer Zellen und/oder T-Zellen allein durch Medium oder Antigen, z.B. Tetanustoxoid (TT) waren, TZ in Medium, DZ in Medium, TZ mit TT, DZ mit TT.

Die Ergebnisse wurden als Stimulationsindex (SI) ausgedrückt, einem Quotienten gebildet aus der TZ-Proliferation (Mittelwert) durch antigenbeladene DZ und der TZ-Proliferation durch unbeladene DZ (negative Kontrolle). Bei einem  $\text{SI} > 2$  wurde das Ergebnis als positive TZ-Proliferation gewertet.

## 2.3 Methodik des Zytokinnachweises

### 2.3.1 Verstärkung der Zytokinantwort durch Restimulation spezifischer T-Zellen

Bei der Untersuchung der T-Zellantwort und deren Charakterisierung durch Erfassung des Zytokinprofils erwies sich die T-Lymphozyten-Precursor-Frequenz als limitierender Faktor (Neumann *et al.*, 1989), da ohnehin nur sehr geringe Zytokinmengen pro Zelle gebildet werden. Daher wurde eine Methode zur Vermehrung der zytokinproduzierenden spezifischen TZ entwickelt, indem TZ mehrfach ein Proliferationsreiz durch antigenpräsentierende dendritische Zellen angeboten wurde.

Autologe frisch isolierte T-Lymphozyten wurden aufgetaut und im Doppelansatz in konstanter Zellzahl von  $10^5$  Zellen/100 $\mu$ l in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde eine konstante Anzahl ( $10^4$  Zellen/50 $\mu$ l) von Stimulatorzellen (antigen-gepulste dendritische Zellen) hinzugefügt und für 7 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die T-Zellen zweimal erneut, im zeitlichen Abstand von 7 Tagen, mit antigenpräsentierenden dendritischen Zellen stimuliert, wodurch spezifische TZ-Klone proliferierten.

### 2.3.2 Elispot

Zur Vorbereitung des Zytokinnachweises auf Einzelzellebene wurden die benötigten wells einer Elispot-Mikrotiterplatte (MAIP) mit je 50 $\mu$ l Erstantikörper (monoclonal mouse-anti-human IFN- $\gamma$  2 $\mu$ g/ml PBS und monoclonal mouse-anti-human IL-4 15 $\mu$ g/ml PBS) bestückt und 24 Stunden im Kühlschrank inkubiert, um eine Anheftung des Erstantikörpers an die bodenständige Filtermembran zu ermöglichen. Nach der Inkubationszeit wurde die restliche Antikörperlösung aus der Elispot-Mikrotiterplatte herausgeklopft und die wells 4-malig mit PBS gewaschen, wobei der Waschpuffer jeweils erst nach 15 Minuten dekantiert wurde. Anschließend wurden die Filter mit 200 $\mu$ l PBS/1%BSA pro well für 1 Stunde bei 37°C geblockt, um die noch unbesetzten Bindungsstellen an der Filteroberfläche zu besetzen und dadurch die Adhärenz unerwünschter Moleküle zu verhindern. Danach wurde die Platte wiederum ausgeklopft um das Blocking-Reagenz zu entfernen und die restimulierten T-Zellansätze wurden in die Elispotplatte überpipettiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die am Boden der wells entstandenen Zell-Pellets resuspendiert waren und die gesamte Zellsuspension in die Elispotplatte übertragen wurde. Da für die Messung von IFN- $\gamma$  und IL-4 unterschiedliche Inkubationszeiten (IL-4 48h, IFN- $\gamma$  24h) einzuhalten waren, wurden am Tag der letzten TZ-Stimulierung nur die Ansätze für die IL-4-Messung

und mit einer Latenz von 24h die Ansätze für die IFN- $\gamma$ -Messung übertragen. Die für die ersten 24h unbenutzten wells für die IFN- $\gamma$ -Messung wurden während dieser Zeit mit 50 $\mu$ l PBS feucht gehalten. Die produzierten Zytokinmoleküle hefteten sich während der erschütterungsfreien Inkubation an die filtergebundenen Antikörper, die gegen ein spezielles Zytokinepitop gerichtet sind. Die Zellansätze wurden schließlich durch 6-maliges Waschen mit 200 $\mu$ l PBS-Tween 20 aus der Elispot-Mikrotiterplatte entfernt. Da keine adhärenen Zellen verwendet wurden, konnte auf das Spülen der wells mit Aqua dest. und nachfolgend mit PBS/0.05% Tween/1% BSA, verzichtet werden. Nach Zugabe von 100 $\mu$ l des biotinylierten Zweitantikörpers (7-B6-1-biotinylierter, polyclonaler mouse anti-human IFN $\gamma$  / 1 $\mu$ g/ml PBS) wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. In dieser Inkubationszeit heftete sich der biotinylierte Detektionsantikörper an ein anderes Epitop des Zytokinmoleküls, das über den Fängerantikörper an den Filter gebunden war. Der überschüssige Zweitantikörper wurde im nächsten Waschschrift, 6-maliges Waschen mit 200 $\mu$ l PBS/Tween 20, entfernt. Dann wurde der Drittantikörper, das sog. A/B-Reagenz (100 $\mu$ l Streptavidin-Peroxidase-Komplex) zugegeben und nochmals eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wobei durch die Bindungsaffinität Streptavidin/Biotin die Peroxidase an den Detektionsantikörper gebunden wurde. Nach Auswaschen des Überschusses an A/B-Reagenz durch 3-maliges Waschen mit 200 $\mu$ l PBS/Tween 20 und 3-maligem Waschen mit PBS wurden zur Visualisierung der Zytokinspots 100 $\mu$ l AEC-Substrat zugegeben. Zur Herstellung des Substrates wurde eine 3-Amino-9-ethylcarbazol Tablette, á 20mg in 2,5ml Dimethylformamid gelöst und mit Na-Acetat-Puffer, bestehend aus 46,9ml H<sub>2</sub>O, 4,6ml 2,0N Essigsäure-Lösung und 11ml 0,2N Na-Acetat-Lösung, 1:20 verdünnt. Nach Filtration der Lösung wurde kurz vor Zugabe des AEC-Substrates in die Mikrotiterplatte 25 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt. Das AEC-Substrat wurde durch die Peroxidase in einen roten Farbstoff umgesetzt, sodass nach einer Entwicklungszeit von ca. 4 min. rote Flecken, sog. spots zu erkennen waren. Die Reaktion wurde durch Waschen mit Aqua dest. abgestoppt, die Platte getrocknet und ausgewertet.

Bei der Auswertung wurden zwei verschiedene Systeme verglichen, das Elispot-Auswertungssystem der Firma AID und das KS ELISPOT Grundsystem der Firma Zeiss.

Das vollautomatische Elispot-Auswertesystem der Firma AID besteht aus einem automatischen Lesegerät, einer Rechner/Steuereinheit, Monitor und Drucker. Das Lesegerät, eine Kamera Pixera ProfiDesk hat ein Auflösungsvermögen von 1260 x 960 Pixel und vergrößert über ein Rodenstock Objektiv 0,5 x 1:8. Es ist ein offenes System, mit dem 96-well-Elispotplatten auf einem motorisierten Kreuztisch eingelesen werden können

ohne dass ein Herauslösen der Filter notwendig wird. Das System erfasst die 96 Wells der Elispotplatte vollautomatisch und zählt die Spots anhand der Vorgaben des Benutzers (minimale Spotoberfläche, minimale Spotintensität, maximaler Spotdurchmesser). Das Einlesen und Auszählen einer Platte dauert ca. 12 Minuten. Nachdem die Bilddaten gespeichert sind, wird die Originalplatte selbst nicht mehr benötigt, da die Bild- und numerischen Daten dauerhaft auf magnetoptischen Wechselmedien archiviert werden und dadurch einer erneuten Auswertung unter anderen Gesichtspunkten zur Verfügung stehen.

Das KS ELISPOT Grundsystem der Firma Zeiss besteht aus einem Mikroskop (Axioplan 2), einer Kamera (Sony DXC 950), einem Rechner, Monitor und Drucker. Das Mikroskop ist in seiner Konzeption ein Universalmikroskop mit 5x / 0,15 Objektiv und Zoomadapter (0,63x), das für die Elispotauswertung als Auflichtmikroskop verwendet wird. Die Steuerung des Motortisches, auf den die auf Klebefolie abgelösten Filter aufgebracht werden müssen, erfolgt durch eine 3 Achsen Steuereinheit mit Fokus Schrittmotor. Ein eingebauter Mikroprozessor und ein Steuerprogramm arbeiten über Standardschnittstellen CAN-Bus und RS 232 mit dem Host Computer (Pentium PC 256 MB RAM) zusammen, wodurch eine Prozeßautomation möglich wird. Die 3-CCD (Charge-Coupled Device)-Farbvideokamera DXC-950P erzeugt durch den mit 3 Chips (Power HAD) ausgestatteten 1/2-Zoll-CCD-Bildwandler eine Auflösung von ca. 380000 Pixel pro Bild. Das Einlesen und Auszählen einer 96-well-Platte dauert ca. 50 Minuten. Eine Archivierung der Bilddaten ist nicht möglich. Nach Benutzer-definierten Merkmalen, wie Spotdurchmesser, Spotfläche, Farbwert, Sättigung, Kontrast, Form und Randsteigung wird die Anzahl der „typischen“ dunklen Spots mit einem unscharfen, diffus verblassenden Hof ermittelt. Es wurden Spots mit einem Durchmesser von  $10\mu\text{m}$  bzw. einer Fläche von  $100\mu\text{m}^2$  berücksichtigt, da dies der Größe eines aktivierten Lymphozyten entspricht. Eine Anpassung bei der Messung verschiedener Zytokine ist über den sog. „Teach-Algorithmus“ möglich, wodurch „typische“ Spots nach oben angeführten Kriterien definiert werden können. Bei der Auswertung wurde, sowohl bei dem AID-System als auch bei dem Zeiss-System mit zwei verschiedenen „Settings“ für IFN- $\gamma$ , das in der Regel in großer Menge (= große Spots) gebildet wurde, und IL-4, das in der Regel in kleiner Menge (=kleine Spots) gebildet wurde, gearbeitet.

Bei der Auswertung der Elispot-Messung wurde beobachtet, dass Filter, die vollständig rot gefärbt waren, da sie so viele Spots enthielten, nicht adäquat von dem Messsystem erkannt und quantifiziert werden konnten. Daher wurde für die Beobachtung eines vollständig rot

gefärbten Filters empirisch ein Wert zugeordnet, der größer als der höchste Wert der Messreihe gewählt wurde ( $>500$  Spots /  $>1000$  Spots).

Als positive Kontrolle wurden T-Zellen unspezifisch durch PHA ( $10\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert und die Anzahl Zytokin-sezernierender T-Zellen nach Stimulation mit Tetanustoxoid präsentierenden dendritischen Zellen bestimmt. Als negative Kontrolle dienten T-Zellen, die mit unbeladenen dendritischen Zellen koinkubiert wurden.



**Abbildung 2.4: MAIP-Filter mit positiver und negativer Kontrollreihe der IFN- $\gamma$ -Messung im Elispot**

Die ermittelten Ergebnisse wurden bei Betrachtung des Quotienten unter der Bedingung  $SI > 2$  und bei Betrachtung des Absolutwertes, unter der Bedingung Differenz  $> 0$  als positives Ergebnis gewertet. Bei der Interpretation der Zytokinmessung musste berücksichtigt werden, dass auch gesunde Kontrollpersonen eine Basissekretion von Zytokinen durch die unspezifische Stimulierung aufweisen (Absolutwert) und dass individuelle Unterschiede im Sinne von „high and low responder“ existieren (Quotient) (Friberg et al., 1994).

### 2.3.3 ELISA

Für den Nachweis von IFN- $\gamma$  und IL-4 mittels ELISA wurde ein komplettes Testkit der Firma Immunotech verwendet.

Die Überstände der Doppelansätze nach Kokultivierung von  $1 \times 10^5$  spezifischen autologen T-Zellen mit  $1 \times 10^4$  antigenbeladenen dendritischen Zellen, wurden nach 6h, 24h und 48h abgenommen und bezüglich ihres Gehaltes an IFN- $\gamma$  und IL-4 analysiert. So wurden  $50\mu\text{l}$  der Überstände bzw. der Standards in eine Mikrotiterplatte pipettiert, in deren wells monoklonale anti-IFN- $\gamma$ -Antikörper gebunden waren. In der folgenden 2-stündigen Inkubationzeit bei  $18-25^\circ\text{C}$  auf dem Schüttler wurden die in den Zellkulturüberständen befindlichen IFN- $\gamma$ -Moleküle an die spezifischen Antikörper am Boden der wells

gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit 300µl Waschlösung wurde 50µl des biotinylierten Zweitantikörpers und danach 100µl Streptavidin-Peroxidase-Lösung zugegen. Es folgte eine Inkubation von 30 min. bei Raumtemperatur auf dem Schüttler, wobei sich der biotinylierte Zweitantikörper an ein anderes Epitop des IFN- $\gamma$ -Moleküle anlagert und über eine Biotin/Avidin-Bindung die Fixierung der Peroxidase an dem Erstantikörper-IFN- $\gamma$ -Molekül-Zweitantikörper-Sandwich erfolgt. Vor Zugabe des Substrates wurde durch dreimaliges Waschen die ungebundenen Reste des Zweitantikörpers und der Streptavidin-Peroxidase-Lösung entfernt. Zuletzt wurde in Dunkelheit 100µl Substrat von der gebundenen Peroxidase innerhalb von 20 min. umgesetzt. Dieser Vorgang wurde durch 50µl Stop-Lösung beendet und die Absorption der einzelnen wells bei 450nm in einem ELISA-Plate-Reader gemessen.

Anhand der mitgeführten Standards konnte eine Standardkurve erstellt werden und nach Abzug des Substrat-Leerwertes auf die Zytokin-Konzentration in den anderen wells geschlossen werden.

## 2.4 Western-Blot

Um einen Vergleich zwischen humoralen und zellulären Immunreaktion auf pG anstellen zu können, wurde zum Nachweis von pG-spezifischen Antikörpern ein Western-Blot durchgeführt. Die Herstellung der Membran wurde von Y. Bauer, Institut für Immunologie, Abt. Infektionsimmunologie der Ruprecht- Karls-Universität Heidelberg übernommen.

Die Nitrocelluloseacetatmembran, die exklusiv pG enthielt, wurde in ca. 3mm breite Streifen geschnitten und nummeriert. Dann wurden die Streifen mit 5% Magermilchpulver/TBS-Puffer geblockt, um ein unspezifisches Binden der Antikörper an die Membranstreifen zu verhindern. Nach einem Waschschrift mit 3% Magermilchpulver/TBS (5min. auf dem Schüttler) wurde die Teststreifen mit Serum von Lyme-Borreliose-Patienten und von gesunden Kontrollpersonen, in einer 1:10 Verdünnung mit 3% Magermilchpulver/TBS, überschichtet. Während einer Inkubation über Nacht bei +4°C oder 5 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler fand die Bindung der im Serum enthaltenen spezifischen pG-Antikörper an das membrangebundene Antigen statt. Nachfolgend wurde mit je 2ml pro Streifen einmal mit 3% Magermilchpulver/TBS, zweimal mit 0,2% Tween 20/TBS und einmal mit TBS je 5 min. auf dem Schüttler gewaschen, um die Reste des ungebundenen Antikörpers zu entfernen. Dann erfolgte die Zugabe des AP-konjugierten Zweitantikörpers (alkalische Phosphatase-konjugierter

Antikörper goat-anti-human IgG) gegen humane Immunglobuline, der 1:20.000 in 3% Magermilchpulver/TBS verdünnt worden war. Dieses AP-konjugierten Goat-Anti-human-IgG wurde in der folgenden 1-stündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur an die membrangebunden humanen anti-pG-IgG-Antikörper gebunden. Nach intensivem Waschen der Membranstreifen, wie beschrieben, erfolgte dann die Entwicklung durch Zugabe des Substrates BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chromo-Indoylphosphat Liquid Substrate System). Die alkalische Phosphatase, über den Zweitantikörper an die pG-spezifischen IgG-Antikörper gebunden, setzte das spezifische Substrat zu einem Farbstoffkomplex um, der die pG-Bande auf den Westernblot-Streifen visualisierte. Die Farbreaktion wurde durch Überführen der Streifen in reines Aqua dest. nach ca. 5 min. abgestoppt und die Teststreifen zwischen Zellstoff getrocknet. Nur scharf begrenzte, deutlich gegen die Färbung des Streifens abgrenzbare Banden, in Höhe von 22kD wurden als positives Ergebnis gewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Grundlagen der statistischen Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistik-Software *SPSS for Windows, Version 10.0*. Vor der weiteren statistischen Analyse wurden die erfassten Daten auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test für eine Stichprobe überprüft, wobei sich eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung ( $p < 0,05$ ) ergab, sodass alle weiteren Berechnungen mit nichtparametrischen Testverfahren durchgeführt wurden.

Es wurde eine ROC-Analyse der Proliferationsassay-Ergebnisse exemplarisch für das Antigen pG durchgeführt, da für dieses Antigen die meisten Messwerte zur Verfügung standen. Dabei wurde ein Grenzwert von 1,76 für den Stimulationsindex (SI) berechnet. Bei den Grenzwertberechnungen wurde der Schwerpunkt auf die Sensitivität des Verfahrens (80%) gelegt, da ein zusätzlicher diagnostischer Marker definiert werden sollte, der bei nicht aussagekräftiger Routinediagnostik einen weiteren Anhaltspunkt bzgl. der Krankheitsaktivität liefern könnte. Um die Spezifität zu verbessern, wurde die Auswertung mit einem Grenzwert von  $SI > 2$  durchgeführt.

#### 3.2 Etablierung des Meßsystems

##### 3.2.1 Optimierung der Zellkultur

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Reaktionsfähigkeit der verwendeten Zellpopulationen überprüft. Um den dendritischen Zellen in der Zellkultur ein optimales Nährmedium zur Verfügung zu stellen, aber auch im Proliferations- und Zytokinnachweis optimale Bedingungen, z.B. niedrige Basisproliferation (= „background“) zu erhalten, wurden verschiedene Versuchsprotokolle verglichen.

##### 3.2.1.1 TZ-Proliferation auf das Mitogen PHA

Um die Reaktionsfähigkeit der T-Zellen nach Zellisolierung und Kryokonservierung zu überprüfen, wurde die Proliferation auf einen unspezifischen Stimulus, nämlich das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) gemessen. Diese Auswertung wurde wegen des hohen TZ-Bedarfes im Elispot nur für die TZ-Proliferation durchgeführt.

Die statistische Überprüfung mittels Wilcoxon-Test ergab einen höchst signifikanten Unterschied zwischen der Proliferation von T-Zellen, die mit dem unspezifischen Mitogen PHA stimuliert wurden, und T-Zellen, die als negative Kontrolle mit Medium inkubiert wurden. Die Abbildung 3.1 zeigt, dass T-Zellen, die lediglich in Medium inkubiert

wurden, eine nur sehr geringe spontane Proliferation aufweisen. Dies beweist, dass kein Inhaltsstoff des Zellkulturmediums eigenständig eine Proliferation auszulösen vermag und dass die getesteten T-Zellen ihre Reaktionsfähigkeit durch die Kryokonservierung nicht verloren haben.

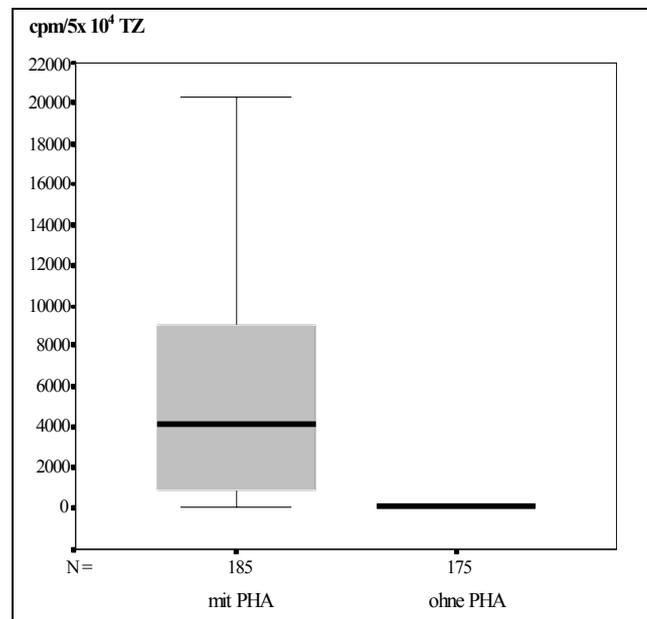
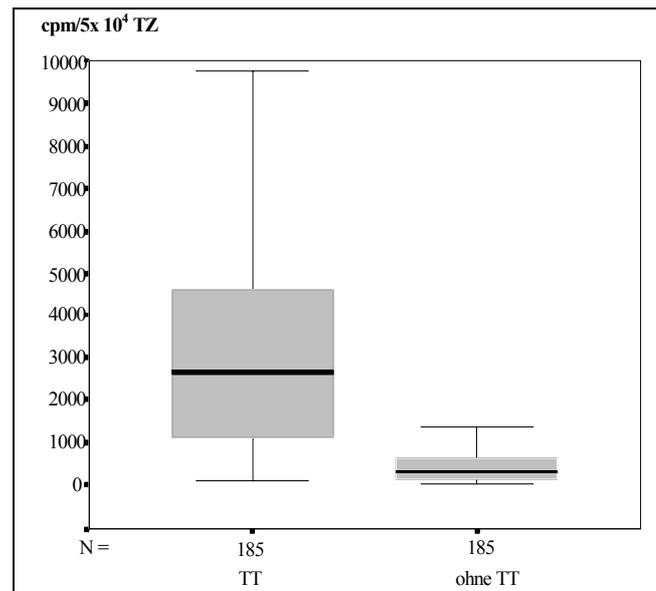


Abbildung 3.1 TZ-Proliferation nach Stimulation mit PHA (positive Kontrolle) oder Inkubation in Medium (negative Kontrolle)

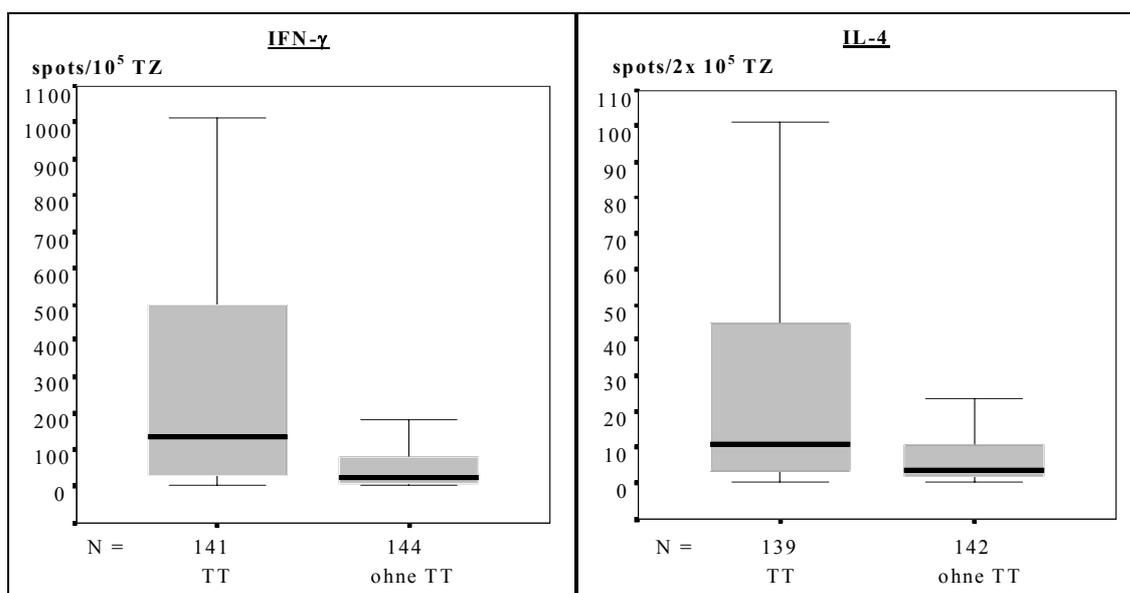
### 3.2.1.2 TZ-Proliferation / Zytokinproduktion durch DZ-präsentiertes Tetanustoxoid

Die hohe stimulatorische Kapazität dendritischer Zellen für autologe naive T-Zellen wurde beispielhaft an der Induktion einer Tetanustoxoid-spezifischen Proliferation und Zytokinproduktion *in vitro* gezeigt. Tetanustoxoid (TT) wurde als Kontrollantigen ausgewählt, da bei hoher Immunisierungsrate der Bevölkerung höchstwahrscheinlich TT-spezifische TZ im Blut vorhanden sind, wobei durch unterschiedlich lang zurückliegende Immunisierung große Schwankungen in der spezifischen TZ-Proliferation zu erklären sind. T-Zellen, die mit Tetanustoxoid-beladenen dendritischen Zellen stimuliert wurden, wiesen deutlich höhere Proliferationswerte auf, als T-Zellen, die mit unbeladenen dendritischen Zellen koinkubiert wurden (Abb. 3.2). Dies wurde anhand des Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben als höchst signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) gezeigt.



**Abbildung 3.2 TZ-Proliferation durch TT-präsentierende dendritische Zellen (TT) und durch unbeladene dendritische Zelle (Basisproliferation)**

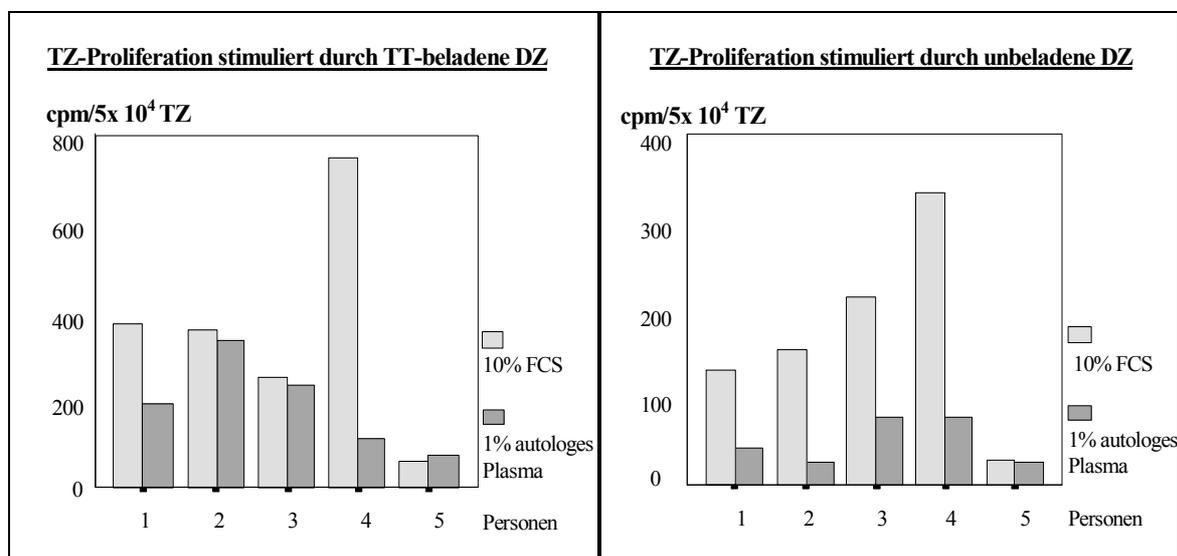
Auch für die Zytokinproduktion (IFN- $\gamma$  und IL-4) konnte mit Hilfe des Wilcoxon-Testes ein höchst signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen der Zytokinmenge, die durch T-Zellen, die mit Tetanustoxoid-präsentierenden dendritischen Zellen stimuliert wurden, und der Zytokinmenge, die durch T-Zellen, die mit unbeladenen dendritischen Zellen koinkubiert wurden, nachgewiesen werden (Abb. 3.3). Dies zeigt, dass dendritische Zellen *in vitro* angebotenes Antigen aufnehmen, prozessieren und präsentieren und dass T-Zellen *in vitro*, durch autologe DZ präsentiertes Antigen, erkennen und darauf reagieren. Die Anzahl der IL-4-produzierenden TZ liegt dabei im Mittel um den Faktor 10 unter der Anzahl der IFN- $\gamma$ -sezernierenden TZ.



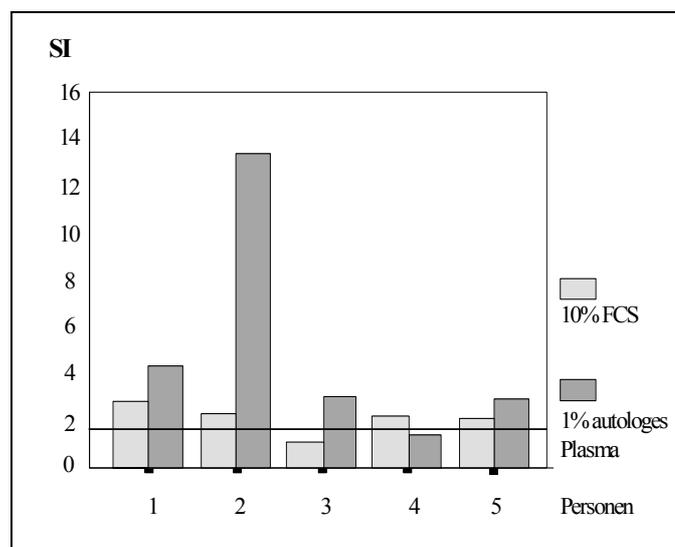
**Abbildung 3.3 IFN- $\gamma$ - und IL-4-Produktion der T-Zellen stimuliert durch TT-beladene dendritische Zellen (TT) und unbeladene dendritische Zellen (negative Kontrolle)**

### 3.2.1.3 10% FCS versus 1% autologes Plasma im Zellkulturmedium

Beim Vergleich von 10% FCS versus 1% autologes Plasma im Zellkulturmedium zeigte sich in 10% FCS-haltigem Medium eine höhere TZ-Proliferation, sowohl durch TT-präsentierende DZ (4/5 Personen) als auch durch Medium (Hintergrundaktivität) (5/5 Fällen), während sich bei Verwendung von Medium mit 1% autologem Plasma eine niedrigere TZ-Proliferation durch TT-präsentierende DZ bei ebenfalls niedriger Hintergrundaktivität zeigte (Abb. 3.4). Die zur Auswertung verwendeten Stimulationsindices fallen daher bei 4 von 5 (80%) dargestellten Fällen wesentlich höher aus, wodurch eine sensitivere Bewertung möglich ist (Abb. 3.5).



**Abbildung 3.4** TZ-Proliferation durch TT-präsentierende und unbeladene dendritische Zellen im Vergleich 10% FCS-haltiges Medium versus Medium mit 1% autologem Plasma (Kontrollpersonen)



**Abbildung 3.5** TZ-Proliferation durch TT-präsentierende DZ dargestellt als Stimulationsindex, im Vergleich 10% FCS-haltiges Medium versus Medium mit 1% autologem Plasma

### 3.2.1.4 Optimale Bedingungen für die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen

Da die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen ausschlaggebend für die Funktionsfähigkeit des verwendeten Testsystems ist, wurden verschiedene Untersuchungen zur Optimierung der Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation durchgeführt. Neben Variation des Stimulationszeitpunktes und der Stimulationsdauer wurde auch das Nährmedium und der Reifegrad der dendritischen Zellen durch Zugabe eines 2. Zytokincocktails verändert.

#### 3.2.1.4.1 Optimaler Zeitpunkt zur Antigenstimulation während der DZ-Reifung

Es sind zwei Stadien in der Entwicklung dendritischer Zellen, generiert aus peripheren Blutmonozyten zu unterscheiden, die mit unterschiedlichen Fähigkeiten und Aufgaben gekoppelt sind (Romani *et al.*, 1996, Bender *et al.*, 1996). Im ersten Reifestadium besitzen dendritische Zellen, durch GM-CSF und IL-4 generiert, eine gesteigerte Fähigkeit Antigen aufzunehmen, im zweiten Reifestadium präsentieren dendritische Zellen vermehrt aufgenommenes Antigen und verlieren mit zunehmendem Reifegrad die Fähigkeit zur Antigenaufnahme. In folgender Versuchsanordnung sollte der bestmögliche Zeitpunkt für das Anbieten des Antigens während der DZ-Reifung herausgefunden werden. Wegen des aufwendigen Versuchsaufbaus, der eine Zellisolierung aus Blut (60ml) derselben Person an zwei aufeinander folgenden Tagen notwendig machte, wurden nur zwei Personen untersucht. Dendritischen Zellen wurden, nach 6- oder 7-tägiger Reifung durch GM-CSF und IL-4, Antigen angeboten und anschließend die TZ-Proliferation, stimuliert durch diese unterschiedlich gereiften TT-präsentierenden dendritischen Zellen, gemessen.

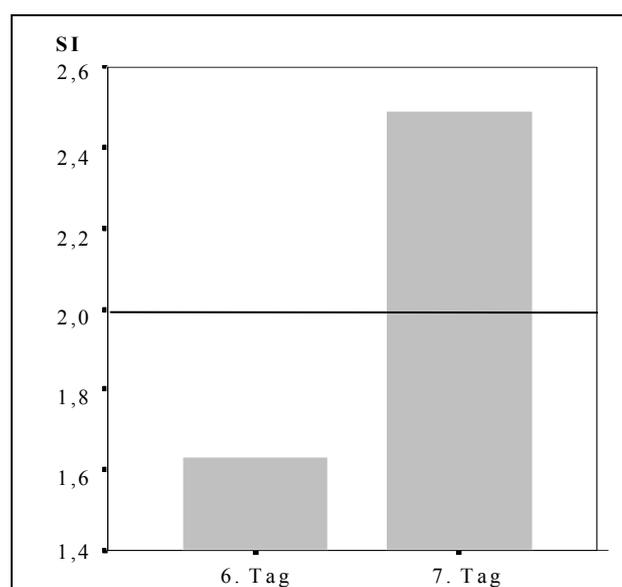


Abbildung 3.6 Stimulatorische Kapazität dendritischer Zellen, denen nach 6- oder 7-tägiger Reifung Antigen angeboten wurde, dargestellt als Stimulationsindex der verursachten TZ-Proliferation auf TT-präsentierende DZ (n=2)

Die Abbildung 3.6 zeigt einen deutlichen Unterschied der stimulatorischen Kapazität dendritischer Zellen, denen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Reifung Antigen angeboten wurde. So konnten dendritische Zellen, die am 7. Tag nach Isolierung mit Antigen (Tetanustoxoid), stimuliert wurden, eine wesentlich höhere Proliferation autologer T-Zellen induzieren. Der dargestellte Quotient (SI) zeigt bei Antigenstimulation nach 7-tägiger Reifung eine verbesserte Signal-Hintergrund-Ratio (hohes Signal und niedriger Hintergrund) mit positiv zu wertender TZ-Proliferation ( $SI > 2$ ).

### 3.2.1.4.2 Verbesserung der DZ-Reifung durch 2. Zytokincocktail

Um den Einfluss des 2. Zytokincocktails zu analysieren, wurden dendritische Zellen einerseits mit und andererseits ohne 2. Zytokincocktail mit Antigen inkubiert. Diese unterschiedlich gereiften dendritischen Zellen wurden anschließend mit naiven T-Zellen angesetzt und die spezifische TZ-Proliferation (cpm) gemessen. Dabei konnte eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Korrelation (Korrelationskoeffizient nach Spearman) zwischen der TZ-Proliferation durch TT-präsentierende DZ, die in An- oder Abwesenheit des 2. Zytokincocktails stimuliert wurden, ermittelt werden. Dendritische Zellen, die in Anwesenheit des 2. Zytokincocktail mit Antigen stimuliert wurden, zeigten eine höhere stimulatorische Kapazität, die anhand der Abbildung 3.7 ersichtlich, statistisch jedoch nicht signifikant (Wilcoxon-Test) war.

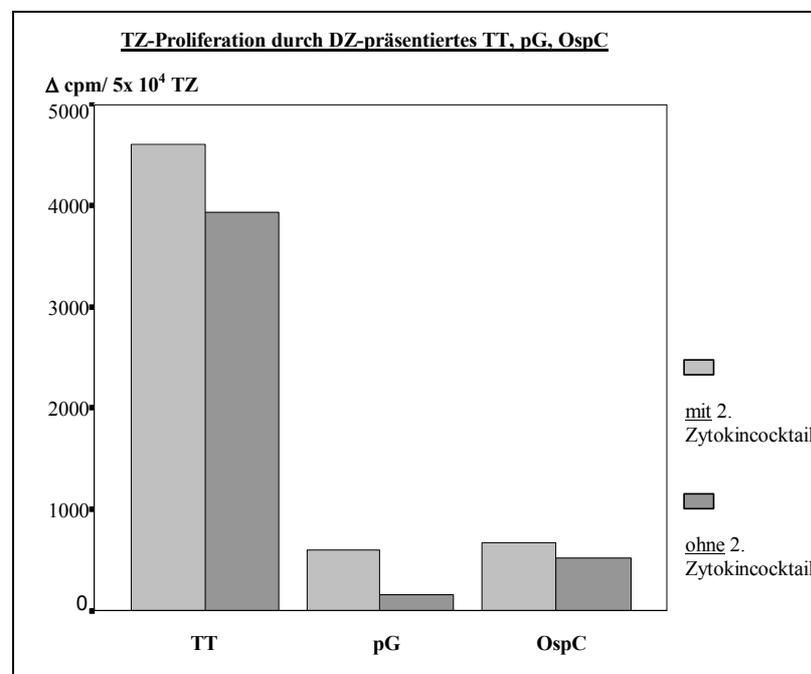
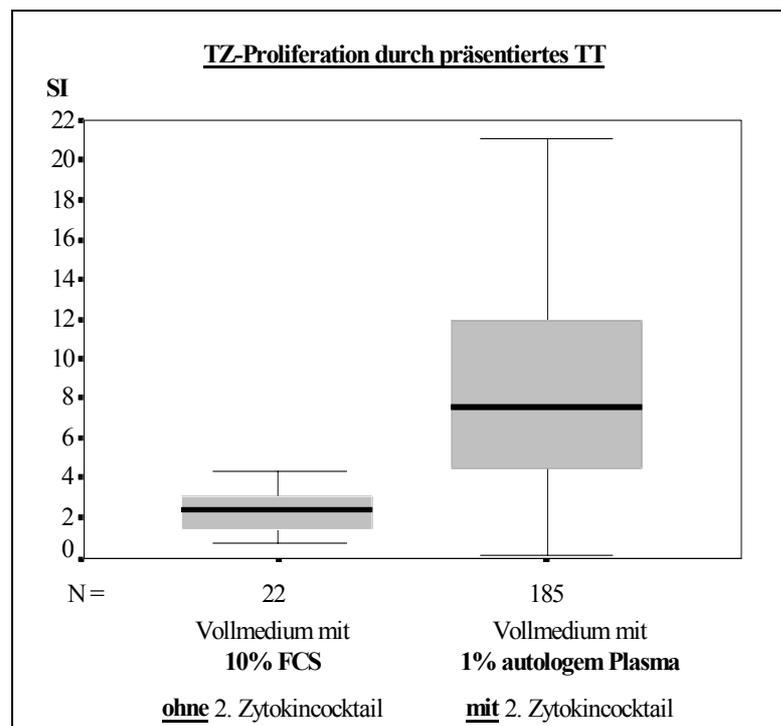


Abbildung 3.7 TZ-Proliferation durch präsentiertes TT, pG, und OspC ( $\Delta \text{cpm}$  = TZ-Proliferation abzüglich Basisproliferation) in An- (mit 2. Zytokincocktail) und Abwesenheit (ohne 2. Zytokincocktail) des 2. Zytokincocktail während der Antigenstimulation bei gesunden Probanden ( $n=14$ )

### 3.2.1.5 Kombination Medium mit 1% autologem Plasma und 2. Zytokincocktail

Bei einer kombinierten Analyse, des Einflusses von Medium mit 1% autologem Plasma und Einsatz des 2. Zytokincocktails während der Antigenverarbeitung durch dendritische Zellen konnte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ein höchst signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) der stimulatorischen Kapazität der DZ erkannt werden.



**Abbildung 3.8:** Vergleich der TZ-Proliferation (SI) stimuliert durch dendritische Zellen, die einerseits in Vollmedium mit 10% FCS kultiviert und ohne 2. Zytokincocktail mit TT stimuliert wurden und durch dendritische Zellen, die andererseits in Vollmedium mit 1% autologem Plasma kultiviert und mit 2. Zytokincocktail antigenstimuliert (TT) wurden.

Die Kombination Vollmedium mit 1% autologem Plasma in der Zellkultur und Zusatz des 2. Zytokincocktails während der Antigenstimulation, ermöglicht eine Verstärkung der TZ-Proliferation (Abb. 3.8). Bei der Zytokinmessung zeigte lediglich die IL-4-Produktion tendenziell höhere Werte, die IFN- $\gamma$ -Produktion hingegen tendenziell niedrigere Werte bei der Verwendung des 2. Zytokincocktails in Verbindung mit 1% autologem Plasma im Medium, wobei die Unterschiede statistisch nicht signifikant waren.

### 3.2.2 Optimierung des Proliferationsassay

Um optimale Bedingungen bei der Proliferationsmessung zu schaffen, wurden verschiedene grundlegende Voraussetzungen, wie Zeitpunkt der Proliferationsmessung und optimale  $^3\text{H}$ -Thymidinmenge, überprüft.

### 3.2.2.1 Kinetik zum optimalen Zeitpunkt des Proliferationsmessung

Da die Proliferationskinetik von Lymphozyten in einer exponentiellen Kurve verläuft, wobei eine quantitative Aussage nur in dem linearen Anteil der Kurve möglich ist, wurde folgender Versuch zur Ermittlung des optimalen Zeitpunktes des Proliferationsnachweises durchgeführt. Spezifische T-Zellen wurden mit dendritischen Zellen für 48h, 72h, 96h und 120h kokultiviert und dann anschließend mit  $^3\text{H}$ -Thymidin inkubiert und die Proliferation quantifiziert.

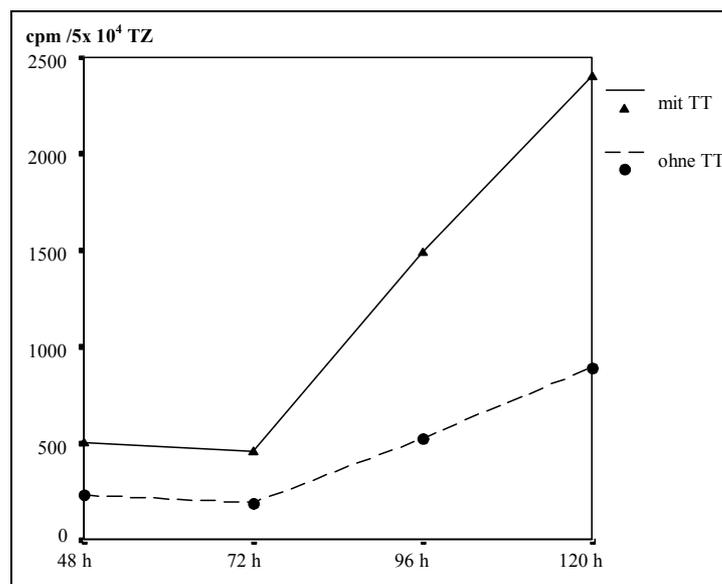


Abbildung 3.9 Proliferationskinetik (Median) nach 48h, 72h, 96h und 120h TZ/DZ-Koinkubation (n=3)

Die Abbildung 3.9 zeigt, dass erst nach einer Koinkubationszeit von mehr als 72h der lineare Teil der exponentiell verlaufenden Proliferationskurve erreicht ist, sodass die Messung der TZ-Proliferation erst nach einer Koinkubation von 96h sinnvoll erscheint.

### 3.2.2.2 Untersuchung zur optimalen $^3\text{H}$ -Thymidinmenge

Das Substrat,  $^3\text{H}$ -Thymidin muss für den Einbau in Lymphozyten-DNS im Überfluss vorhanden sein, um eine korrekte Proliferationsmessung zu ermöglichen. In diesem Versuch wurden unterschiedliche  $^3\text{H}$ -Thymidindmengen der Kultur spezifischer T-Zellen und dendritischer Zellen zugesetzt, um eine Limitierung der messbaren Proliferation durch eine zu geringe  $^3\text{H}$ -Thymidinmenge zu vermeiden.

Durch die Zugabe von  $40\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin lässt sich eine deutliche Zunahme der TZ-Proliferation durch TT im Vergleich zu  $20\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin erkennen. Bei dem Einsatz von  $60\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin hingegen lässt sich keine maßgebliche Steigerung in der

Proliferationsmessung eruieren (Abb. 3.10). Demzufolge wurde in den folgenden Untersuchungen  $40\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin als adäquate Menge für das „labeling“ gewählt.

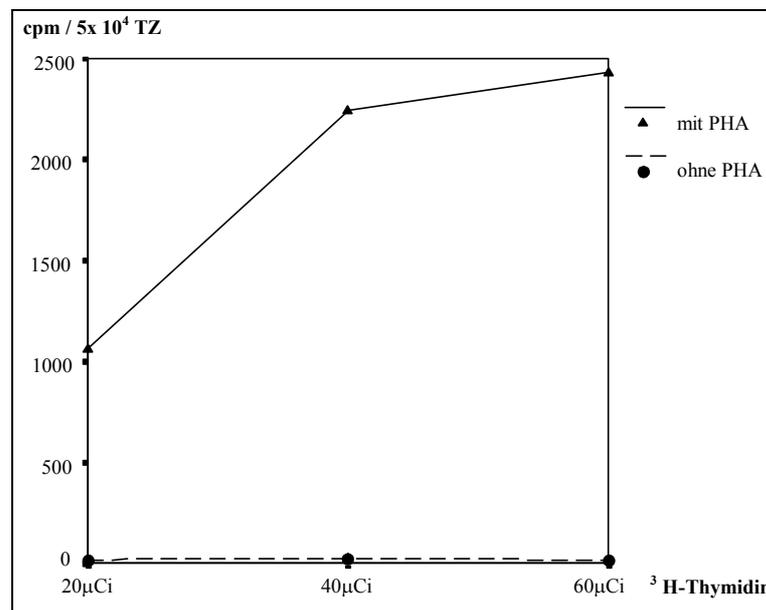


Abbildung 3.10 Abhängigkeit der TZ-Proliferationsmessung von der eingesetzten  $^3\text{H}$ -Thymidinmenge (n=3)

### 3.2.3 Optimierung des Zytokinnachweises mittels ELISpot-Assay

Da Zytokine, vor allem IL-4, nur in geringen Mengen sezerniert werden, stellen sich an das angewandte Nachweissystem hohe Ansprüche. Durch verschiedene Modifikationen im Testsystem wurde versucht eine Signalverstärkung zu erreichen.

#### 3.2.3.1 Verbesserung der Zytokinantwort durch Restimulierung

Um der Problematik der geringen Anzahl spezifischer Effektorzellen im peripheren Venenblut zu begegnen, bedienen wir uns, nach dem Vorbild des menschlichen Immunsystems, der Vermehrung antigenspezifischer T-Zellen durch Restimulation. Die Restimulation der TZ mit antigenbeladenen DZ bedingt eine klonale Selektion und Proliferation antigenspezifischer T-Zellen. Dies ermöglicht den Nachweis der Zytokinproduktion nach Verstärkung des Signals durch Vermehrung der Effektorzellen. In der folgenden Abbildung ist eine höhere antigenspezifische TZ-Proliferation durch eine 2. Stimulation dargestellt (Abb. 3.11).

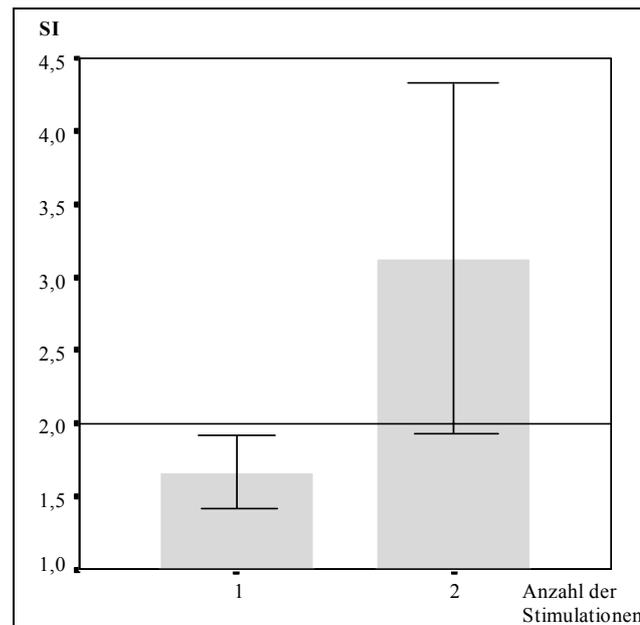


Abbildung 3.11 TZ-Proliferation nach einer und zwei Stimulationen mit TT-präsentierenden DZ (n=5)

Im dargestellten Versuchsaufbau (n=5) wurde eine zunehmende Zytokinproduktion nach einer, zwei und drei TZ-Stimulationen ermittelt (Abb. 3.12). Die Änderung der Signal-Hintergrund-Ratio (SI) kommt einerseits durch eine höhere Anzahl spezifischer TZ und andererseits durch eine geringere Anzahl unspezifischer TZ zu Stande, da unstimulierte TZ nach ca. 7 Tagen zu Grunde gehen. Dieser Effekt konnte nicht nur für das Kontrollantigen Tetanustoxoid, sondern auch für die Borrelienantigene, pG, OspC und p83 nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Demzufolge wurde in dieser Studie im Elispot mit einer 3-fachen TZ-Stimulierung gearbeitet.

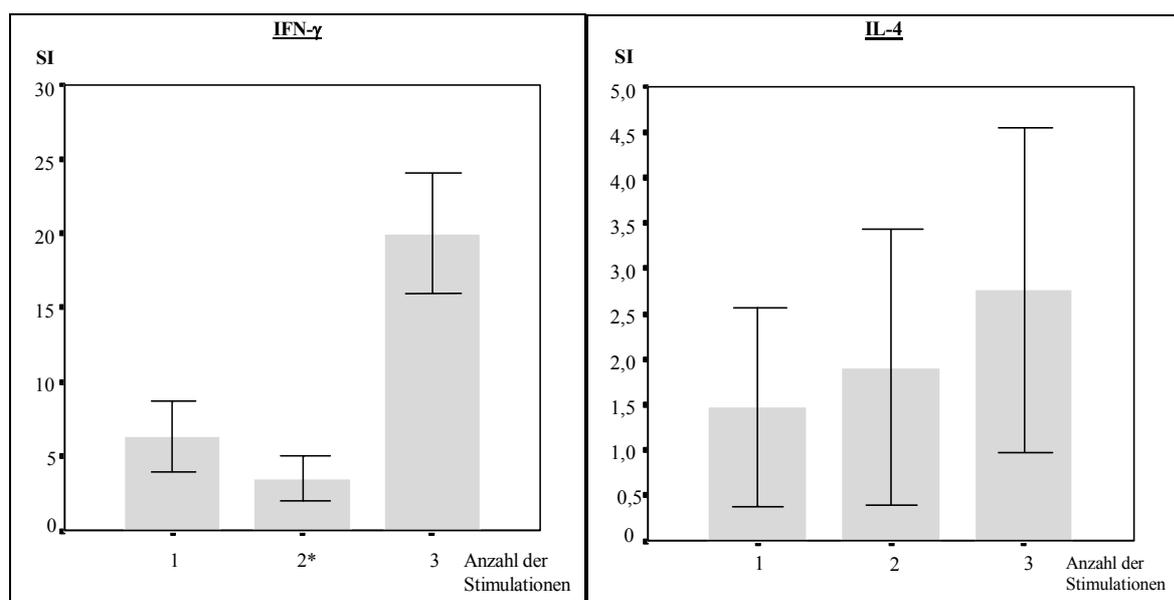


Abbildung 3.12 Darstellung der Signal-Hintergrund-Ratio (SI) für IFN- $\gamma$  und IL-4 nach einer, zwei und drei TZ-Stimulationen durch TT-präsentierende DZ (n=5) \* bedingt durch Messfehler

### 3.2.3.2 Optimaler Zeitpunkt für den Zytokinnachweis

Um den optimalen Zeitpunkt zur Zytokinmessung zu ermitteln, wurde wegen seiner gegenüber der Einzelzellmessung im Elispot-Assay leichteren Handhabung bzgl. unterschiedlicher Inkubationszeiten ein Zytokin-ELISA durchgeführt.

Anhand der Abbildung 3.13 zeigt, dass IFN- $\gamma$  bereits nach 24h ein messbarer Unterschied zwischen der Zytokinmenge produziert durch TT-stimulierte TZ und der spontan sezernierten Menge der Kontrolle (ohne TT) ermittelt werden, sodass diese Inkubationsdauer auf den Elispot übertragen wurde.

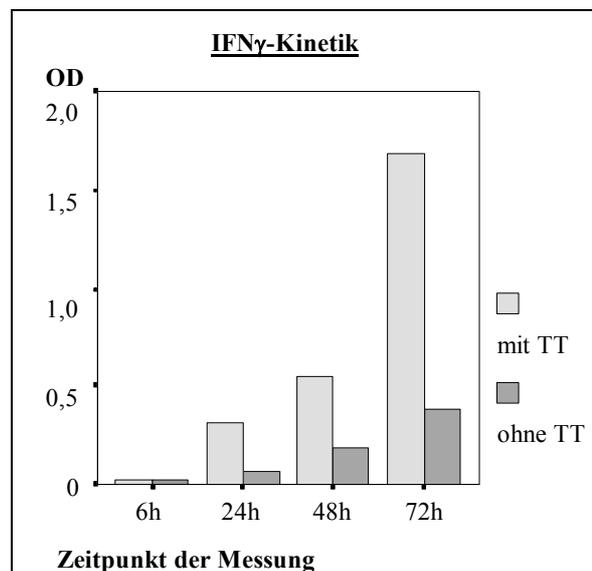


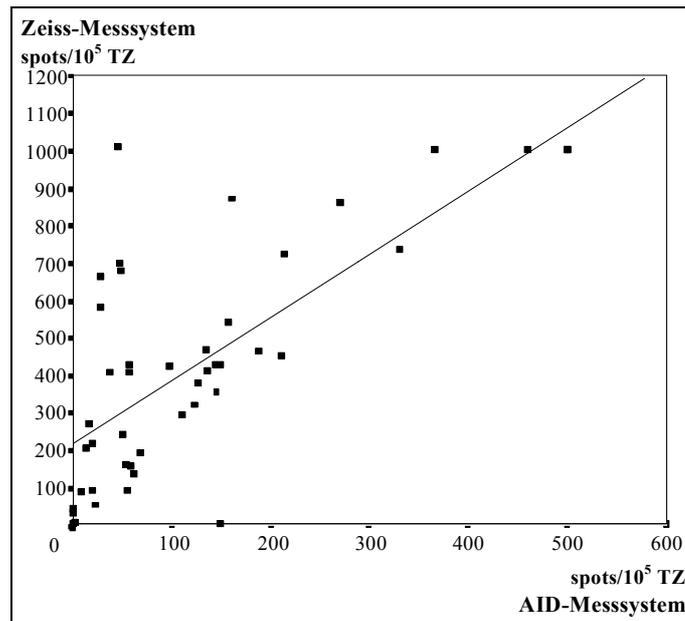
Abbildung 3.13 IFN- $\gamma$ -Produktion der TZ durch TT-präsentierende DZ nach einer Inkubationszeit von 6h, 24h, 48h und 72h (n=2)

Für IL-4 konnte nach einer Inkubationszeit von 48h ein höherer Stimulationsindex als nach 24h ermittelt werden (Ergebnis nicht dargestellt), der bei ohnehin geringer IL-4-Produktion zur besseren Diskrimination bzgl. der Bewertung beitrug. Demzufolge wurde für die IL-4-Messung im Elispot eine Inkubationszeit von 48h gewählt.

### 3.2.3.3 Vergleich unterschiedlicher Elispot-Meßsysteme: AID versus Zeiss

Zwei verschiedene Elispot-Meßsysteme, das Elispot-Auswertesystem der Firma AID (Autoimmun Diagnostika GmbH) und das KS Elispot Grundsystem der Firma Zeiss, wurden bei der Auswertung des Elispots verglichen.

Die Ergebnisse des Kollektivs, das mit beiden Meßsystemen ausgewertet worden ist, wurde mittels Korrelationskoeffizienten nach Spearman verglichen, wobei sich eine sehr signifikante Übereinstimmung ( $p < 0,01$ ) für die Parameter OspC (n=43) TT, pG und negative Kontrolle (n=46) für die IFN- $\gamma$ -Messung ergab.



**Abbildung 3.14** Streudiagramm zum Vergleich AID- / Zeiss-Elispotmesssystem an Hand der IFN- $\gamma$ -Produktion (Mittelwerte) durch DZ-präsentiertes TT

Am Beispiel der IFN- $\gamma$ -Messung (Mittelwerte) für das Kontrollantigen TT, zeigt die Abbildung 3.14, dass mit dem Zeiss-System die ca. 2-fache Spotanzahl im Vergleich zur AID-Messung erkannt werden konnten. Dies ist wahrscheinlich auf die Möglichkeit der differenzierteren Abstimmung der „settings“ beim Zeiss-Meßsystem zurückzuführen.

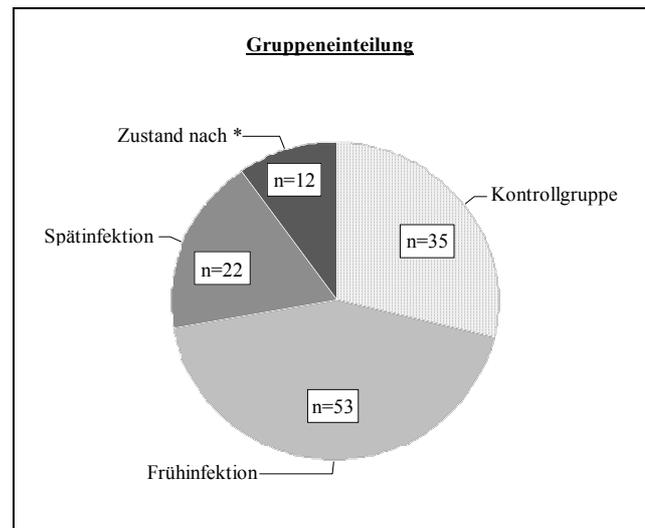
### 3.3 Zusammenfassung der benutzten Methode

Nach den Ergebnissen der durchgeführten Vorversuche wurde im verwendeten Testsystem mit 1% autologem Plasma im Zellkulturmedium gearbeitet. Die rekombinanten Antigene wurden dendritischen Zellen nach 7-tägiger Reifung in Anwesenheit des 2. Zytokincocktails angeboten. Die anschließende Messung der TZ-Proliferation wurde nach einer 96-stündigen Inkubation mit 40  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin durchgeführt. Nach dreimaliger Restimulation durch antigenpräsentierende dendritische Zellen wurde die Zytokinproduktion der TZ nach 24h (IFN- $\gamma$ ) bzw. nach 48h (IL-4) Inkubationszeit gemessen.

### 3.4 Auswertung nach der Zielsetzung

Im folgenden Teil wurde eine statistische Auswertung der erhobenen Daten versucht, die jedoch bei der individuell zu interpretierenden Methodik nicht immer sinnvoll erschien. Deshalb wurde zusätzlich eine individuelle Fallbeschreibung angeschlossen.

### 3.4.1 Charakterisierung des Untersuchungskollektivs



**Abbildung 3.14 Gruppeneinteilung des Untersuchungskollektivs**  
\* Zustand nach Borreliose mit persistierenden Beschwerden

Innerhalb des Untersuchungskollektivs wurden vier verschiedene Gruppen unterschieden. Als Kontrollgruppe wurden klinisch gesunde Individuen erfasst, die keine *B. burgdorferi*-spezifischen Antikörper im ELISA aufwiesen. Die Gruppe der Frühinfektionen setzt sich aus Patienten mit den klinischen Diagnosen EM (n=25) und ECM (n=28) zusammen. Die Gruppe der Spätinfektionen beinhaltet Patienten, welche unter den klinischen Diagnosen ACA (n=9), Arthritis (n=5), Fibromyalgie (n=4) und CFS („chronic fatigue syndrom“) bzw. chronisch disseminierte Borreliose (n=4) charakterisiert wurden. Die Untergruppe der Patienten mit Zustand nach behandelter Frühinfektion und/oder Spätinfektion mit persistierenden Beschwerden wurde durch länger als 180 Tage zurückliegende akute Erkrankung in Bezug auf den Untersuchungszeitpunkt charakterisiert (n=12).

Insgesamt wurden 207 Untersuchungen durchgeführt. Davon wurden 122 Personen einmalig (Kontrollen n=35, Patienten n=87), 55 Personen zweimalig (Kontrollen n=5, Patienten n=50), 24 Patienten dreimalig, 4 Patienten viermalig, und 2 Patienten fünfmalig untersucht. In der nachfolgenden statistischen Auswertung wurden bei mehrfacher Untersuchung eines Patienten jeweils die Daten der Ersterfassung berücksichtigt, wodurch das „gesamte Patientenkollektiv“ 87 Fälle beinhaltet.

Anzahl der Untersuchungen	1	2	3	4	5	
<i>Kontrollgruppe</i>	35	5				
<i>Frühinfektion</i>	53	31	16	3	2	
<i>Spätinfektion</i>	22	15	6	1		
<i>Zustand nach</i>	12	4	2			
	122	55	24	4	2	207

**Tabelle 3.1 Unterteilung des Untersuchungskollektivs nach der zeitlichen Abfolge der Untersuchungen**

Alle durchgeführten Untersuchungen wurden für die Verlaufsbeurteilung einem zeitlichen Raster unterworfen, nach dem fünf Zeiträume unterschieden wurden.

<b>Zeitpunkt der Untersuchung</b>	<b>vor und während Therapie</b>	<b>bis 40d nach Therapie</b>	<b>40 bis 90d nach Therapie</b>	<b>90 bis 180d nach Therapie</b>	<b>&gt;180d nach Therapie</b>
<i>Frühinfektion</i>	42	15	27	17	3
<i>Spätinfektion</i>	16	6	5	9	3
<i>Zustand nach</i>					12
	59	21	32	26	17

**Tabelle 3.2 Unterteilung des Patientenkollektivs nach dem Zeitpunkt der Untersuchung**

Unterschiede zwischen Fallzahlen in der Kollektiveinteilung und Fallzahlen in der folgenden Auswertung kommen einerseits durch nicht berücksichtigte oder fehlende Ergebnisse von Fällen zustande, die mit einer anderen Variante der Methodik untersucht wurden, z.B. Kultivierung der Zellen in Vollmedium mit 10% FCS oder Antigenstimulation ohne 2. Zytokincocktail, und andererseits durch methodische Probleme, wie z.B. Kontamination der Zellkultur. Auch wurden nicht alle Probanden für alle Antigene untersucht, da z.B. die Antigene DbpA und ZSA36 erst zu einem späteren Zeitpunkt verfügbar waren und/oder bei geringer Zellausbeute bei der Zellisolierung die Untersuchung auf bestimmte Antigene beschränkt werden musste.

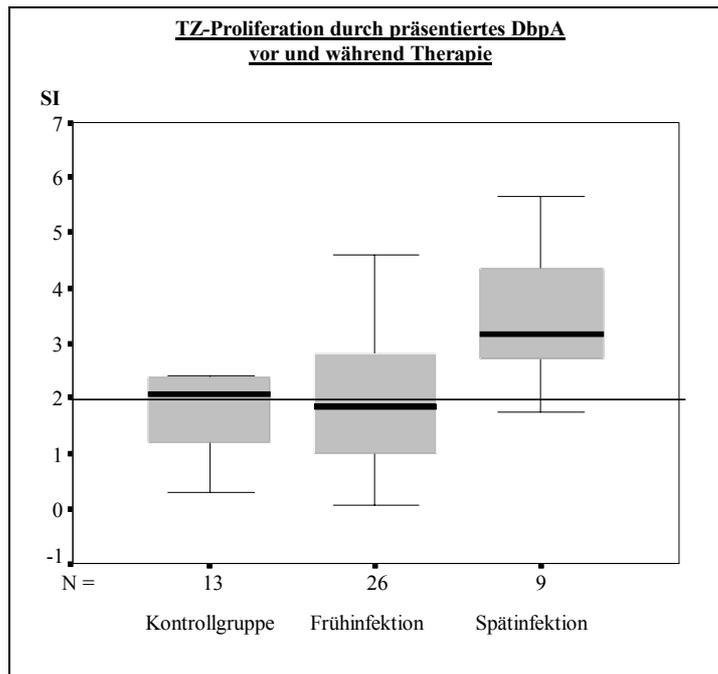
Für die Betrachtung exemplarischer Kasuistiken wurden insgesamt 25 Patienten, die im Verlauf der Erkrankung mehrfach untersucht wurden, ausgewählt. Ausgeschlossen wurden Patienten die methodische Besonderheiten aufwiesen, deren Zellen im Verlauf mit FCS-haltigem Medium kultiviert wurden und deren Proliferationsantwort auf Tetanustoxoid geringer als 1000 cpm ausfiel.

### **3.4.2 Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientenkollektiv**

Mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests für unverbundene Stichproben konnten einzelne signifikante Unterschiede der Stimulationsindices zwischen gesundem Kontrollkollektiv und Patientenkollektiv ermittelt werden. Berücksichtigt wurden bei der Berechnung nur Personen, die unter der Kategorie Ersterfassung klassifiziert wurden (Patienten n=87, Kontrollgruppe n=35).

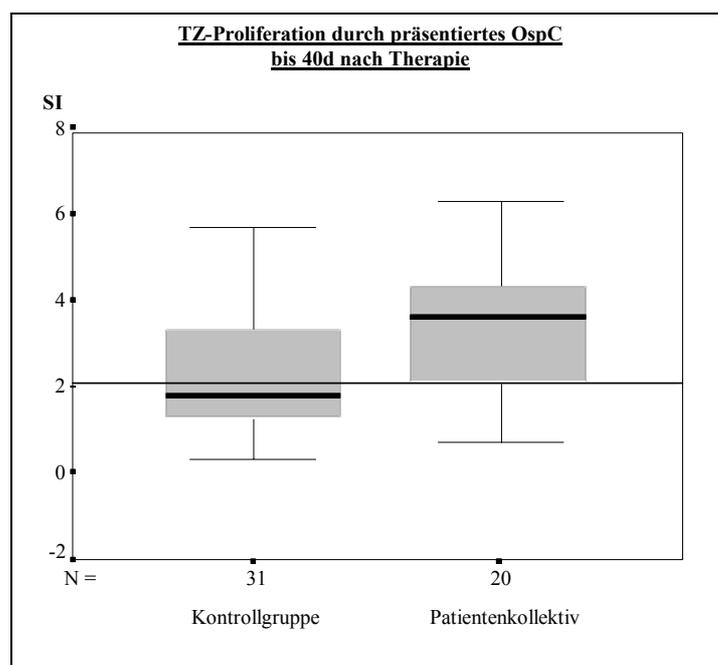
#### **3.4.2.1 Vergleich Kontrollgruppe / Patientenkollektiv im TZ-Proliferationsassay**

Die TZ-Proliferation (SI) durch das Antigen DbpA (Abb. 3.15) zeigte bei Patienten (n=9) mit Spätinfektion (ACA, Arthritis, NB, Fibromyalgie, CFS) im ersten Verlaufszeitraum (vor oder während Therapie) einen signifikanten Unterschied zum Kontrollkollektiv (n=13).



**Abbildung 3.15 TZ-Proliferation durch DbpA (SI) bei Kontrollgruppe (n=13), Frühinfektion (n=26), Spätinfektion (n=9).** Dargestellt ist der Median (schwarzer Balken), die 25. und 75. Perzentile (graue Box) mit dem größten und dem kleinsten gemessenen Wert (⊥) ohne Extremwerte und Ausreißer.

Das gesamte Patientenkollektiv (n=20) (Abb. 3.16) zeigte im zweiten Verlaufszeitraum (bis 40d nach Therapie) einen signifikanten Unterschied der TZ-Proliferation durch das Antigen OspC zum Kontrollkollektiv (n=31).



**Abbildung 3.16 TZ-Proliferation durch OspC bei Kontrollgruppe (n=31) und gesamtem Patientenkollektiv (n=20).** Dargestellt ist der Median (schwarzer Balken), die 25. und 75. Perzentile (graue Box) mit dem größten und dem kleinsten gemessenen Wert (⊥) ohne Extremwerte und Ausreißer.

Beide Ergebnisse konnte nach Ausschluss von Patienten mit Fibromyalgie und CFS (DbpA n=5, OspC n=2) Krankheitsbildern, die nicht sicher als Folge der voraus gegangenen Borrelieninfektion zu werten sind, und unter Berücksichtigung methodischer Besonderheiten bestätigt werden.

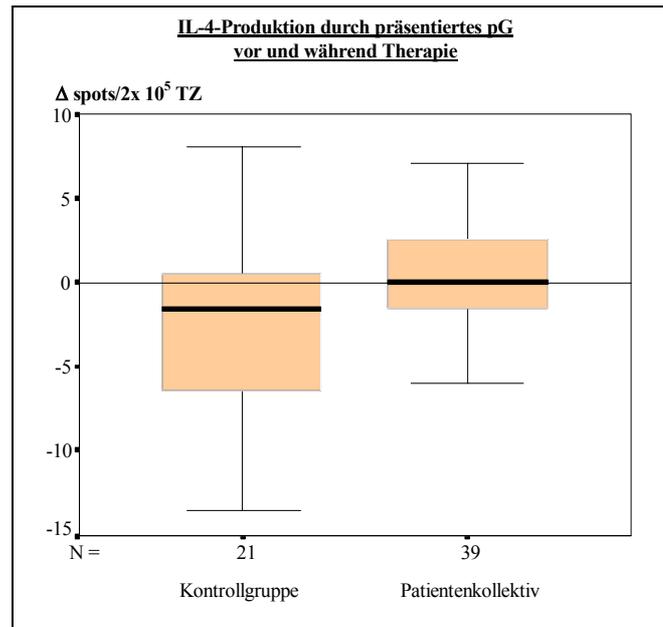
Alle anderen Antigene ermöglichen im TZ-Proliferationsassay keine Differenzierung zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Lyme-Borreliose.

#### **3.4.2.2 Vergleich Kontrollgruppe / Patientenkollektiv im Elispot**

Zur Bewertung der Elispotergebnisse wurden zwei verschiedene Parameter, Stimulationsindex (SI) und TZ-Differenz ( $\Delta$ spots = antigenstimulierte TZ-Zytokinsekretion abzüglich TZ-Basissekretion) verglichen. Der Stimulationsindex bietet den Vorteil, dass ein interindividueller Vergleich der Ergebnisse möglich ist, ist jedoch bei geringer Spotanzahl nicht sinnvoll. Die Differenz hingegen zeigt die absolute Zytokinsekretion auf Einzelzellebene und erlaubt eine bessere Einschätzung der tatsächlich durch die spezifische Antigenstimulation produzierten Zytokinmenge. Für Untersuchungsergebnisse, bei denen die negative Kontrolle keinen Spot enthielt, konnte der Stimulationsindex nicht berechnet werden, wodurch unterschiedliche Fallzahlen erklärt sind.

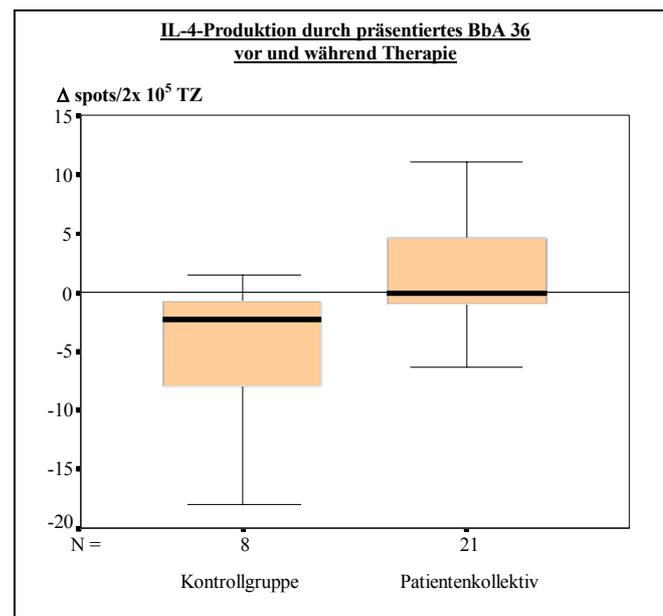
Der IL-4-Elispot ermöglicht durch die Antigene OspC und DbpA, der IFN- $\gamma$ -Elispot durch die Antigene OspC, DbpA, ZSA36 keine Differenzierung zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Lyme-Borreliose.

Die IL-4-Produktion durch das Antigen pG zeigte im ersten Verlaufszeitraum (vor und während Therapie) einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (n=21) und dem gesamten Patientenkollektiv (SI: n= 33,  $\Delta$ : n=39) (Abb. 3.17). Dieses Ergebnis konnte auch nach Ausschluss von Patienten mit Fibromyalgie und CFS (n=3) bestätigt werden. Geprägt wurde dieses Ergebnis durch den hohen Anteil von Frühinfektionen (SI: n=24,  $\Delta$ : n=30) am gesamten Patientenkollektiv.



**Abbildung 3.17 IL-4-Produktion ( $\Delta$ ) durch pG bei Kontrollgruppe (n=21) und gesamtem Patientenkollektiv (n=39).** Dargestellt ist der Median (schwarzer Balken), die 25. und 75. Perzentile (graue Box) mit dem größten und dem kleinsten gemessenen Wert ( $\perp$ ), ohne Extremwerte und Ausreißer. ( $\Delta$ spots = antigenstimulierte TZ-Zytokinsekretion abzüglich TZ-Basissekretion)

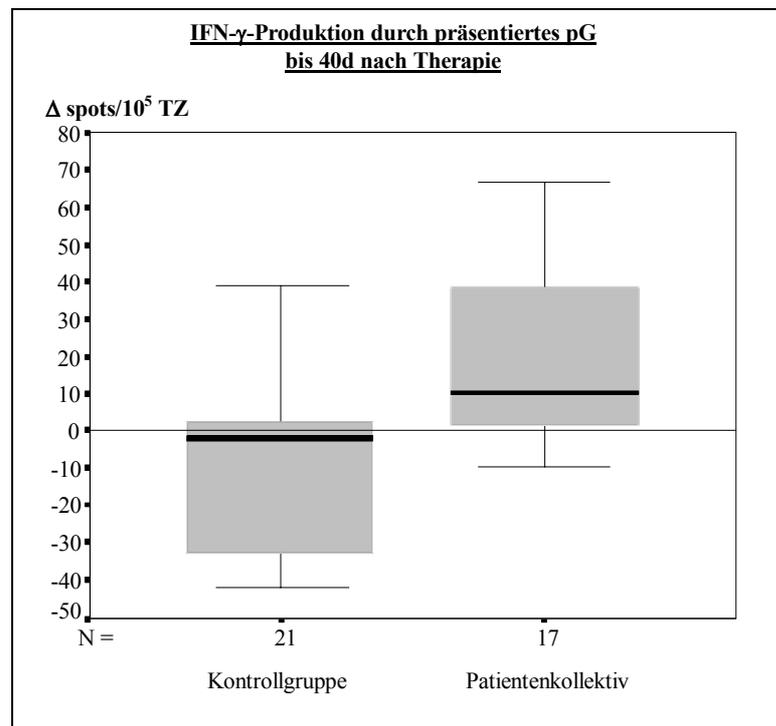
Ebenfalls im ersten Verlaufszeitraum konnte für die IL-4-Sekretion durch das Antigen ZSA36 (SI: n=16,  $\Delta$ : n=21) ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe (n=8) und Patientenkollektiv erkannt werden (Abb. 3.18). Dieses Ergebnis konnte jedoch nach Ausschluss von Patienten mit Fibromyalgie und CFS (n=2) nur für die Differenz bestätigt werden. Dieses Ergebnis ist ebenfalls durch den hohen Anteil von Frühinfektionen (n=18) geprägt.



**Abbildung 3.18 IL-4-Produktion ( $\Delta$ ) durch ZSA36 bei Kontrollgruppe (n=8) und gesamtem Patientenkollektiv (n=21)** Dargestellt ist der Median (schwarzer Balken), die 25. und 75. Perzentile (schraffierte Box) mit dem größten und dem kleinsten gemessenen Wert ( $\perp$ ) ohne Extremwerte und Ausreißer. ( $\Delta$ spots = antigenstimulierte TZ-Zytokinsekretion abzüglich TZ-Basissekretion)

Bei den beiden zuletzt dargestellten Ergebnissen ist zu beachten, dass es sich um einen relativen Unterschied der IL-4-Sekretion zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv handelt, wobei der Median der IL-4-Produktion im negativen Bereich ( $\leq 0 \Delta\text{spots}$ ) liegt.

Im zweiten Verlaufszeitraum (bis 40d nach Therapie) konnte für die IFN- $\gamma$ -Sekretion durch das Antigen pG ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe (n=21) und Patientenkollektiv ( $\Delta$ : n=17) ermittelt werden (Abb. 3.20). Dieses Ergebnis konnte auch nach Ausschluss von Patienten mit Fibromyalgie und CFS (n=1) bestätigt werden. Geprägt wird das Ergebnis durch den hohen Anteil der Frühinfektionen (n=12) am gesamten Patientenkollektiv.



**Abbildung 3.19 IFN- $\gamma$ -Produktion ( $\Delta$ ) durch pG bei Kontrollgruppe (n=21) und gesamtem Patientenkollektiv (n=17)** Dargestellt ist der Median (schwarzer Balken), die 25. und 75. Perzentile (graue Box) mit dem größten und dem kleinsten gemessenen Wert (L) ohne Extremwerte und Ausreißer. ( $\Delta\text{spots}$  = antigenstimulierte Zytokinsekretion abzüglich Basissekretion)

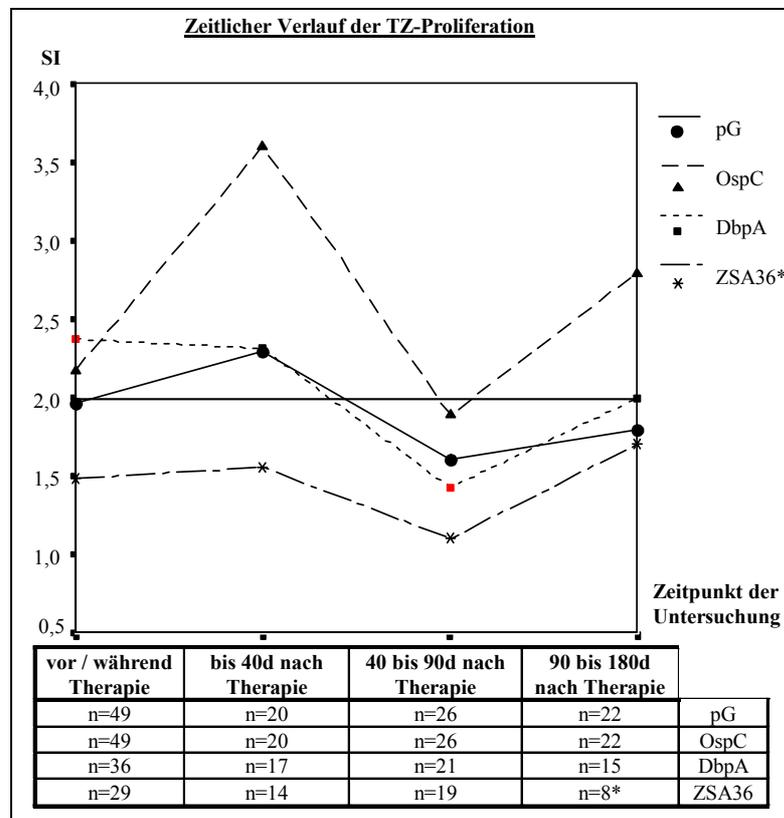
### 3.4.3 Verlaufsbeobachtungen

Bei der Gesamtauswertung aller Krankheitsverläufe wurde der Median dargestellt.

Zur statistischen Auswertung wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Testes für verbundene Stichproben die zweiseitige asymptotische Signifikanz berechnet, wobei signifikante Ergebnisse und Ergebnisse mit einer Fallzahl  $n < 10$  durch Berechnung der exakten zweiseitigen Signifikanz kontrolliert wurden. Der Friedman-Test für verbundenen Stichproben konnte nicht für alle Verlaufszeiträume durchgeführt werden, da nicht jeder Patient zu allen Verlaufszeitpunkten untersucht wurde. Ein Unterschied wurde als signifikant beschrieben, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  war.

### 3.4.3.1 Verlaufsbeobachtungen im TZ-Proliferationsassay

Die TZ-Proliferation durch das Antigen DbpA fiel vom ersten Verlaufszeitraum (vor und während Therapie) zum dritten Verlaufszeitraum (40 bis 90d nach Therapie) statistisch signifikant ab (Abb. 3.20).



**Abbildung 3.20 Verlaufsbeobachtung der TZ-Proliferation (Median)**

Dargestellt ist der Median berechnet aus dem gesamten Patientenkollektiv. Die Bezugslinie markiert den Grenzwert (SI>2). Statistisch signifikante Unterschiede wurden rot markiert. \* im 4. Zeitintervall geringe Fallzahl

Die Abbildung 3.20 zeigt den TZ-Proliferationsverlauf durch die untersuchten Antigene ermittelt am gesamten Patientenkollektiv. Die TZ-Proliferation durch das Antigen OspC stieg nach Therapie steil an, während die TZ-Proliferation durch die Antigene pG und ZSA36 nur leicht anstieg. Hingegen sank die TZ-Proliferation durch DbpA kontinuierlich bis zum dritten Verlaufszeitraum ab. Alle Antigene bewirkten einen leichten Anstieg der TZ-Proliferation zum vierten Verlaufszeitraum. Bei der Verlaufsbeobachtung der Spätinfektionen waren im Vergleich zu den Frühinfektionen allgemein höhere SI (Median) durch alle Antigene auffällig.

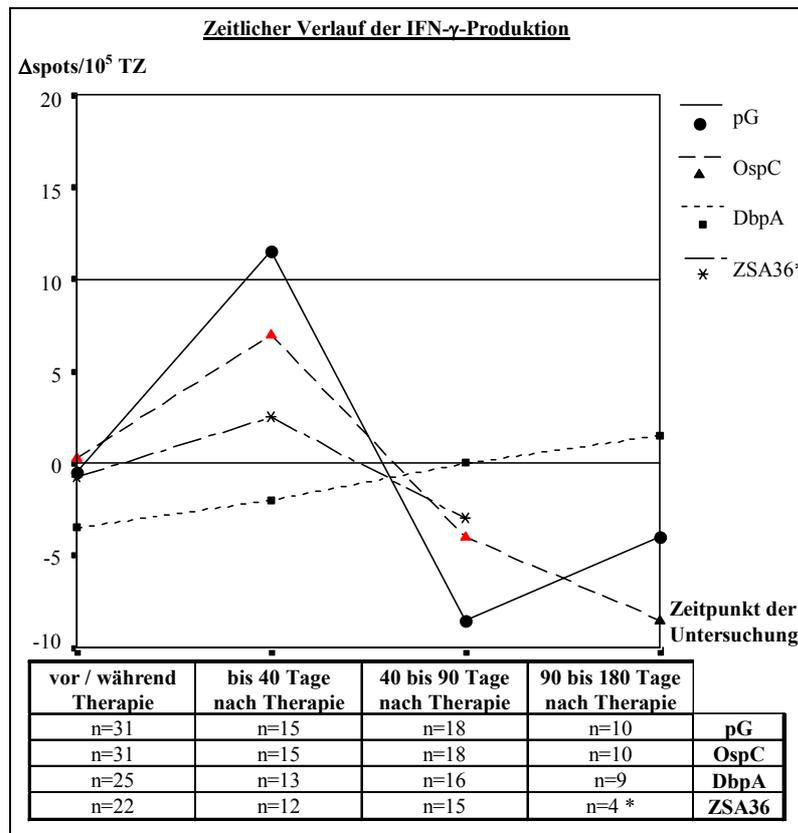
### 3.4.3.2 Verlaufsbeobachtungen im Elispot

Die statistische Analyse der Verläufe wurde für Stimulationsindex (SI) und TZ-Differenz ( $\Delta$ ) durchgeführt, graphisch dargestellt wurde jeweils der Verlauf der TZ-Differenz.

3.4.3.2.1 IFN- $\gamma$ -Messung

Die Verlaufsbeobachtung der IFN- $\gamma$ -Produktion durch das Antigen OspC (TZ-Differenz) zeigte vom ersten zum zweiten Verlaufszeitraum einen statistisch signifikanten Anstieg (Wilcoxon-Test und Friedmann-Test für exakte Signifikanz). Zusätzlich konnte ein signifikanter Abfall (Wilcoxon-Test) der IFN- $\gamma$ -Produktion durch OspC vom ersten zum dritten Verlaufszeitraum erkannt werden.

Die Abbildung 3.21 zeigt einen Anstieg der IFN- $\gamma$ -Produktion (TZ-Differenz) durch alle Antigene zum zweiten Beobachtungszeitraum. Die IFN- $\gamma$ -Produktion durch die Antigene pG, OspC und ZSA36 fielen anschließend steil zum dritten Untersuchungszeitpunkt ab. Während die IFN- $\gamma$ -Produktion durch OspC zum vierten Beobachtungszeitpunkt weiter abfiel, stieg die IFN- $\gamma$ -Produktion durch pG und ZSA36 erneut an. Die IFN- $\gamma$ -Produktion durch das Antigen DbpA stieg kontinuierlich vom ersten bis zum vierten Beobachtungszeitpunkt an. All diese Beobachtungen konnten auch für die Betrachtung der Stimulationsindices bestätigt werden.



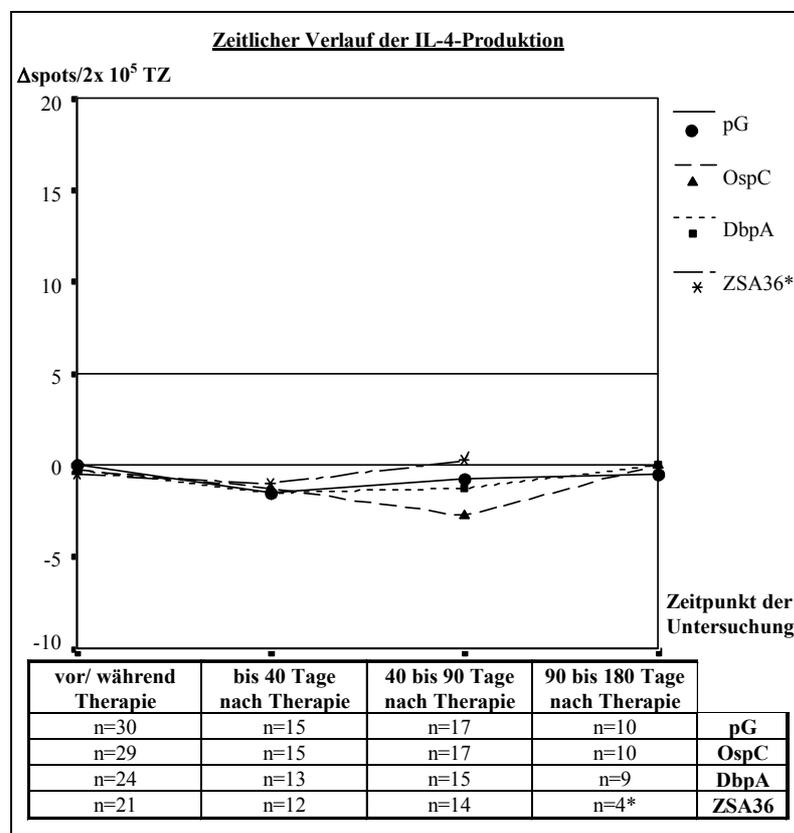
**Abbildung 3.21 Verlaufsbeobachtung der IFN- $\gamma$ -Produktion (Absolutwerte)**

Dargestellt ist der Median berechnet aus dem gesamten Patientenkollektiv. Die beiden Bezugslinien markieren den Bereich (0-10 spots) der als grenzwertig bewertet wurde. ( $\Delta$ spots = antigenstimulierte TZ-Zytokinsekretion abzüglich TZ-Basissekretion) Statistisch signifikante Unterschiede wurden rot markiert. \* wegen geringer Fallzahl 4. Zeitintervall nicht dargestellt.

Die Auswertung für Frühmanifestationen erbrachte einen noch homogeneren Verlauf der IFN- $\gamma$ -Produktion durch alle Antigene mit Anstieg nach Therapie, durch pG und ZSA36 sogar in den positiven Bereich ( $>10 \Delta$ spots), und Absinken ( $<0 \Delta$ spots) zum dritten Beobachtungszeitraum. Für die Spätmanifestationen ist kein Anstieg der IFN- $\gamma$ -Produktion nach Therapie zu erkennen, wobei wegen der geringen Fallzahl und der individuell unterschiedlichen Krankheitsverläufe keine sichere Aussage getroffen werden kann.

### 3.4.3.2.2 IL-4-Messung

Die IL-4-Produktion zeigte im Verlauf keinen signifikanten Anstieg oder Abfall zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten (exakte zweiseitige Signifikanz) (Abb. 3.22).



**Abbildung 3.22 Verlaufsbeobachtung der IL-4-Produktion**

Dargestellt ist der Median berechnet aus dem gesamten Patientenkollektiv. Die beiden Bezugslinien markieren den Bereich (0-5 spots) der als grenzwertig bewertet wurde. ( $\Delta$ spots = antigenstimulierte TZ-Zytokinsekretion abzüglich TZ-Basissekretion)  
\* wegen geringer Fallzahl 4. Zeitintervall nicht dargestellt

Die Betrachtung der Frühmanifestationen erbrachte keine abweichenden Ergebnisse, so dass auf die Darstellung verzichtet wurde. Bei den Spätmanifestationen fiel auf, dass bereits vor Therapie eine positiv zu wertende IL-4-Produktion durch das Antigen OspC gemessen werden konnte.

### 3.4.3.3 Betrachtung exemplarischer Kasuistiken

Da die statistische Auswertung viele verschiedene, mögliche Einflussgrößen auf das verwendete System, wie z.B. fehlerhafte Gruppenunterteilung und Patientenauswahl, medikamentöse Vorbehandlung und aktueller Gesundheitszustand des untersuchten Patienten, intraindividuelle Unterschiede der Immunreaktion („high and low responder“) unberücksichtigt lässt, erscheint eine individuelle Betrachtung einzelner Fallbeispiele sinnvoll. Ausgewählt wurden insgesamt 25 Patienten, die im Verlauf der Erkrankung mehrfach untersucht wurden. Ausgeschlossen wurden Patienten die methodische Besonderheiten aufwiesen, deren Zellen mit FCS-haltigem Medium kultiviert wurden und deren Proliferationsantwort auf Tetanustoxoid geringer als 1000 cpm ausfiel. Die folgenden Fallbeispiele wurden exemplarisch ausgewählt, wobei die große Individualität der Krankheitsverläufe und der Immunreaktion gezeigt werden sollte. Eine kurze Erläuterung ist der tabellarischen Verlaufsdarstellung angeschlossen, die Interpretation erfolgt in der Diskussion. Die hier nicht näher erläuterten Fälle sind im Anhang in tabellarischer Form enthalten. In der tabellarischen Darstellung wurde die Dynamik der Werte im Verlauf durch Pfeile gekennzeichnet (geringer Anstieg/Abfall  $\uparrow/\downarrow$ , mittlerer Anstieg/Abfall  $\uparrow\uparrow/\downarrow\downarrow$ , großer Anstieg/Abfall  $\uparrow\uparrow\uparrow/\downarrow\downarrow\downarrow$ ), positive Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung folgender Grenzwerte fett gedruckt:

- ELISA IgM: OR > 0,44 = positiv  
OR 0,4-0,44 = grenzwertig  
OR < 0,4 = negativ
- $\mu$ -capture EIA: OR > 1,04 = positiv  
OR 0,96-1,04 = grenzwertig  
OR < 0,96 = negativ
- ELISA IgG: OR > 0,23 = positiv  
OR 0,19-0,23 = grenzwertig  
OR < 0,19 = negativ
- WB IgM: 1/4 spezifischen Banden = positiv  
(41kD (sehr stark), 39kD 21-25kD (OspC), 17kD)
- WB IgG: 2/8 spezifischen Banden = positiv  
(14kD, 17kD, (21kD), 25kD (OspC), 30kD, 39kD, 43kD, 58kD, 83kD)  
(eingeklammert dargestellte Banden zeigten nur eine schwache Farbintensität)
- TZ-Proliferation: SI > 2 = positiv  
SI = 1,8-2 = grenzwertig  
SI < 1,8 = negativ
- IFN- $\gamma$ -Sekretion: TZ-Differenz= $\Delta$ spots (spots abzüglich background) >10 = positiv  
TZ-Differenz= $\Delta$ spots (spots abzüglich background) 0-10 = grenzwertig  
TZ-Differenz= $\Delta$ spots (spots abzüglich background) <0 = negativ
- IL-4-Sekretion: TZ-Differenz= $\Delta$ spots (spots abzüglich background) > 5 = positiv  
TZ-Differenz= $\Delta$ spots (spots abzüglich background) 0-5 = grenzwertig  
TZ-Differenz= $\Delta$ spots (spots abzüglich background) <0 = negativ

## 3.4.3.4 Frühinfektion

## 3.4.3.4.1 Erythema migrans

<b>Patient 1:</b> A.L.	<b>Alter:</b> 47 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b> <u>Erythema migrans</u> linke Kniekehle (3x 1cm)		
<b>Zeckenstich:</b> vor 14d	<b>Erkrankungsdauer:</b> 5d	

Untersuchungsdatum			07.06.00	28.06.00	02.08.00	06.09.00
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	0,05	<b>↑↑ 0,98</b>	↓ 0,11	↓ 0,06
		μ-capture-EIA	n.d.	<b>1,26</b>	n.d.	n.d.
		WB (kD)	(OspC)	<b>41, 34, OspC</b>	n.d.	(OspC)
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	0,07	0,17	0,06	0,05
		WB (kD)	41, (75,60,34)	75, 60, 41, 34	n.d.	41, (75,60,34)
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	0,38	n.d.	0,58	0,74
		OspC	<b>3,30</b>	n.d.	↓ 0,87	0,52
		DbpA	1,39	n.d.	↓ 0,46	0,99
		ZSA36	1,21	n.d.	↓ 0,71	0,56
	<b>IFN-γ-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	<b>63</b>	n.d.	n.d.	↓ -2
		OspC	<b>51</b>	n.d.	n.d.	↓ -4
		DbpA	-71	n.d.	n.d.	-1
		ZSA36	-25	n.d.	n.d.	3
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	-5	n.d.	n.d.	-1
		OspC	-6	n.d.	n.d.	-2
		DbpA	-2	n.d.	n.d.	0
		ZSA36	2	n.d.	n.d.	↓ -2
<b>Klinischer Verlauf</b>				Myalgie	=	

↑ Therapie: ↑  
Doxycyclin 200mg/d

Bei dieser sehr kurz Zeit bestehenden Borrelieninfektion sind noch keine erhöhten Antikörper im Serum, aber bereits zelluläre Reaktionszeichen (TZ-Proliferation auf OspC, IFN-γ-Sekretion durch pG und OspC) zu erkennen. Die TZ-Antwort erscheint vor dem IgM-Anstieg. Außer dem Erythema migrans bestehen zu Beginn der Erkrankung keine weiteren Krankheitssymptome. Ungefähr 2 Monate nach Therapie tritt eine Myalgie auf. Gleichzeitig ist keine IFN-γ-Produktion mehr nachzuweisen. Zu keinem untersuchten Zeitpunkt der Erkrankung erfolgt eine IL-4-Produktion.

<b>Patient 2:</b> K.R.	<b>Alter:</b> 55 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b> <u>Erythema migrans</u> linke Kniekehle		
<b>Zeckenstich:</b> vor 1 Woche	<b>Erkrankungsdauer:</b> 2 Tage	

<b>Untersuchungsdatum</b>		16.08.00	25.09.00	08.11.00	
<b>Serologie</b>	<u>IgM-Nachweis</u>	ELISA	<b>1,71</b>	<b>1,62</b>	↓ <b>1,55</b>
		μ-capture-EIA	<b>9,68</b>	<b>9,56</b>	↓↓ <b>2,23</b>
		WB (kD)	<b>41, OspC</b>	<b>41,OspC</b>	<b>41, OspC</b>
	<u>IgG-Nachweis</u>	ELISA	0,22	<b>0,43</b>	↓ <b>0,27</b>
		WB (kD)	<b>60, 41, 30, OspC</b>	<b>60,41,30, (34,OspC)</b>	<b>60,41,30, OspC,(34)</b>
		<b>T-Zellantwort</b>			
<u>Proliferation</u> (Stimulationsindex)	PG	n.d.	<b>3,19</b>	↓ 1,66	
	OspC	n.d.	<b>2,91</b>	↓ 1,62	
	DbpA	n.d.	<b>3,29</b>	↓ 1,39	
	ZSA36	n.d.	<b>3,13</b>	↓ 0,83	
<u>IFN-γ-Sekretion</u> (spots abzüglich background)	pG	n.d.	-27	↑ <b>15</b>	
	OspC	n.d.	-17	3	
	DbpA	n.d.	-29	↑ 9	
	ZSA36	n.d.	-26	-9	
<u>IL-4-Sekretion</u> (spots abzüglich background)	pG	n.d.	1	-9	
	OspC	n.d.	0	-6	
	DbpA	n.d.	2	-8	
	ZSA36	n.d.	<b>11</b>	↓ -9	
<b>Klinischer Verlauf</b>				Arthralgie	

↑ Therapie: ↑  
Cefuroximaxetil 1000mg/d 12d

Bei dieser ebenfalls sehr frühen Infektion sind bei der Erstuntersuchung schon IgM- (ELISA/WB) und IgG-Antikörper (WB) nachweisbar. Bereits vor Therapie besteht eine gesteigerte TZ-Proliferation durch alle Antigene und eine IL-4-Sekretion durch ZSA36. Mit dem Auftreten einer Arthralgie nach Therapie, 3 Monate nach Infektionsbeginn wechselt das Zytokinprofil zur IFN-γ-Produktion (pG +, DbpA +/-, OspC +/-), während die Antikörperproduktion (IgM/IgG) und die TZ-Proliferation deutlich rückläufig ist.

<b>Patient 3:</b> G.J.	<b>Alter:</b> 36 Jahre	<b>Geschlecht:</b> männlich
<b>Diagnose:</b> <u>Erythema migrans</u> Bauch mit B-Symptomatik		
<b>Zeckenstich:</b> vor 1 Monat	<b>Erkrankungsdauer:</b> 1 Woche	

<b>Untersuchungsdatum</b>		05.07.00	23.08.00	27.09.00	
<b>Serologie</b>	<u>IgM-Nachweis</u>	ELISA	0,24	0,15	0,12
		μ-capture-EIA	n.d.	n.d.	n.d.
		WB (kD)	41	<b>OspC</b>	41
	<u>IgG-Nachweis</u>	ELISA	0,03	0,03	0,08
		WB (kD)	<b>75,60,45,41,39</b>	<b>75,45,39, (60,39,OspC)</b>	<b>75,45,39, (60,39,OspC)</b>
<b>T-Zellantwort</b>	<u>Proliferation</u> (Stimulationsindex)	pG	1,13	↑ 2,24	↓ 0,52
		OspC	1,48	↑ 4,17	↓ 1,01
		DbpA	0,86	↑ 2,31	↓ 1,03
		ZSA36	1,30	1,50	1,01
	<u>IFN-γ-Sekretion</u> (spots abzüglich background)	pG	0	4	↑↑47
		OspC	5	↑↑↑ 495	↓ 13
		DbpA	-4	↑ 28	↑↑ 97
		ZSA36	-4	3	↑ 11
	<u>IL-4-Sekretion</u> (spots abzüglich background)	pG	1	2	-10
		OspC	1	0	-6
		DbpA	1	5	-5
		ZSA36	5	1	-9
	<b>Klinischer Verlauf</b>		Allgemein- symptome	Besserung	Wohl- befinden

↑ Therapie: ↑  
Doxycyclin 200mg/d

Bei der Erstuntersuchung ist lediglich der serologische IgG-Nachweis im Westernblot positiv, während IgM als Zeichen einer frischen Infektion zu keinem Zeitpunkt nachweisbar ist. Erst nach Therapie nimmt die TZ-Proliferation durch alle Antigene, außer durch ZSA36 stark zu. Die nach Therapie steigende IFN-γ-Produktion (OspC+, DbpA+) geht mit einer Besserung aller Symptome einher. Während die IFN-γ-Produktion durch die Antigene pG, DbpA und ZSA36 einen Monat nach Therapieende weiter ansteigt, ist die IFN-γ-Sekretion durch OspC bereits wieder rückläufig. Der positive IFN-γ-Nachweis auf ZSA36 zu diesem Zeitpunkt geht mit Wohlbefinden des Patienten einher, Begleitsymptome, wie v.a. Arthralgien sind nicht mehr vorhanden.

## 3.4.3.4.2 Erythema chronicum migrans

<b>Patient 4:</b> K.E.	<b>Alter:</b> 53 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b> <u>Erythema chronicum migrans</u> rechte Kniekehle (30 x 20cm), Schulderschmerzen		
<b>Zeckenstich:</b> vor ca. 2 Monaten	<b>Erkrankungsdauer:</b> ca. 6 Wochen	

Untersuchungsdatum		20.10.99	08.12.99	12.01.00	26.01.00	10.05.00	
<b>Direktnachweis</b>	PCR	flagellin+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	Kultur	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
<b>Serologie</b>	<u>IgM-Nachweis</u>	ELISA	<b>0,75</b>	<b>0,93</b>	<b>↑ 0,96</b>	<b>↓ 0,53</b>	0,70
		μ-capture-EIA	<b>2,67</b>	<b>↑ 3,18</b>	<b>↓ 2,88</b>	<b>↓ 1,56</b>	<b>↑↑ 5,19</b>
		WB (kD)	<b>41,OspC</b>	n.d.	<b>41,OspC</b>	n.d.	<b>41,31,OspC</b>
	<u>IgG-Nachweis</u>	ELISA	<b>0,53</b>	<b>↑ 0,75</b>	<b>↑ 1,11</b>	<b>↓ 0,29</b>	0,22
		WB (kD)	60, 41	n.d.	60,41	n.d.	<b>60,41,31,18</b>
		<b>T-Zellantwort</b>	<u>Proliferation</u> (Stimulationsindex)	pG	<b>5,71</b>	1,86	<b>↑ 3,12</b>
		OspC	<b>3,36</b>	1,11	<b>↑ 4,42</b>	<b>↓ 2,59</b>	<b>↑ 4,32</b>
		p83	<b>5,65</b>	<b>↓ 3,42</b>	n.d.	n.d.	n.d.
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>5,65</b>
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<u>IFN-γ-Sekretion</u> (spots abzüglich background)	pG	-94	-39	<b>↑↑↑ 685</b>	n.d.	<b>27</b>
		OspC	<b>10</b>	9	<b>↓ -141</b>	n.d.	<b>↑ 86</b>
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>37</b>
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<u>IL-4-Sekretion</u> (spots abzüglich background)	pG	1	<b>↑ 10</b>	1	n.d.	-3
		OspC	2	<b>↑ 20</b>	-70	n.d.	-3
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>23</b>
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Klinischer Verlauf</b>				Arthralgie	=	=	
		↑ Therapie: ↑ Doxycyclin 200mg/d		↑NSAR	↑NSAR	↑NSAR	

Bei dieser Patientin handelt es sich um eine lokalisierte Frühinfektion mit persistierender Arthralgie nach Antibiotikatherapie. Bereits vor Therapie weist diese Patientin eine massiv erhöhte TZ-Proliferation durch pG, OspC und p83 auf. Auch die IgG- und IgM-Ak im Serum sind erhöht, der Direktnachweis von *B. burgdorferi*-DNS durch PCR (Flagellinprimer) ist positiv. Nach Therapie zeigt sich eine IL-4-Produktion durch pG und OspC. Bei Auftreten der Arthralgie, 3 Monate nach Krankheitsbeginn wird erstmals IFN-γ (pG) nachgewiesen, in Verbindung mit erneuter erhöhter TZ-Proliferation. 4 Monate nach Behandlung bestehen persistierende Arthralgien bei erhöhter IFN-γ-Sekretion (pG, OspC, DbpA) und erneut erhöhter TZ-Proliferation (pG, OspC).

<b>Patient 5:</b> E.M.	<b>Alter:</b> 63 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b> <u>Erythema chronicum migrans</u> linke Kniekehle (15 x 20cm), Allgemeinsymptome		
<b>Zeckenstich:</b> vor 2 Monaten	<b>Erkrankungsdauer:</b> 4-6 Wochen	

Untersuchungsdatum			08.12.99	29.12.99	12.01.00	09.05.00	
<b>Serologie</b>	<u>IgM-Nachweis</u>	ELISA	0,28	0,32	0,22	0,22	
		$\mu$ -capture-EIA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		WB (kD)	41	n.d.	(41)	(41)	
	<u>IgG-Nachweis</u>	ELISA	0,01	0,04	0,08	0,02	
		WB (kD)	41,34	n.d.	34,(41,21)	34,(45,41)	
<b>T-Zellantwort</b>	<u>Proliferation</u> (Stimulationsindex)	pG	<b>2,26</b>	n.d.	<b>↑↑ 9,31</b>	<b>↓ 2,35</b>	
		OspC	<b>2,18</b>	n.d.	<b>↑↑↑ 13,95</b>	<b>↓↓ 4,37</b>	
		p83	<b>5,06</b>	n.d.	<b>↑↑↑ 21,99</b>	n.d.	
		Dbp	n.d.	n.d.	n.d.	<b>2,13</b>	
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	<u>IFN-<math>\gamma</math>-Sekretion</u> (spots abzüglich background)	pG	-49	n.d.	<b>↑↑↑ 538</b>	<b>↓ -23</b>	
		OspC	<b>234</b>	n.d.	<b>↑↑ 421</b>	<b>↓ -26</b>	
		Dbp	n.d.	n.d.	n.d.	-11	
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	<u>IL-4-Sekretion</u> (spots abzüglich background)	pG	-29	n.d.	<b>↑ 17</b>	<b>↓ -1</b>	
		OspC	-2	n.d.	<b>↑ 21</b>	<b>↓ -2</b>	
		Dbp	n.d.	n.d.	n.d.	-1	
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	<b>Klinischer Verlauf</b>			Allgemein- symptome	Besserung	Wohl- befinden	

↑ Therapie: ↑  
Doxycyclin 200mg/d

Hierbei handelt es sich um ein Beispiel seronegativer, aber klinisch eindeutiger Borreliose. Bereits vor Therapie ist eine erhöhte TZ-Proliferation durch pG, OspC und p83 und eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Sekretion durch OspC zu erkennen. Nach Therapie kommt es zu einer Besserung der Allgemeinsymptome, wobei es zu einer massiv erhöhten TZ-Proliferation und IFN- $\gamma$ -Sekretion kommt, sogar IL-4 wird vermehrt sezerniert. 6 Monate nach Erkrankungsbeginn ist die TZ-Proliferation deutlich rückläufig und keine Zytokinproduktion mehr nachweisbar, bei Wohlbefinden des Patienten.

## 3.4.3.5 Spätinfektionen

## 3.4.3.5.1 Acrodermatitis chronicum atrophicans

<b>Patient 6:</b> S.R.	<b>Alter:</b> 50 Jahre	<b>Geschlecht:</b> männlich
<b>Diagnose:</b> <u>Acrodermatitis chronica atrophicans</u> (livide Verfärbung des linken Beines)		
<b>Zeckenstich:</b> ?	<b>Erkrankungsdauer:</b> 9 Monate	

Untersuchungsdatum		22.08.00	10.10.00
<b>Direktnachweis</b>		PCR	p66 -
		Kultur	-
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	0,16
		μ-capture-EIA	n.d.
		WB (kD)	41, 18
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	<b>0,77</b>
		WB (kD)	<b>83,60,58,41</b>
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	1,67
		OspC	<b>2,06</b>
		DbpA	1,42
		ZSA36	0,93
	<b>IFN-γ-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	7
		OspC	0
		DbpA	0
		ZSA36	1
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	<b>5</b>
		OspC	-1
		DbpA	-2
		ZSA36	0
	<b>Klinischer Verlauf</b>		

↑ Therapie (5/00):↑  
Doxycyclin 200mg/d, Ceftriaxon 2g/d i.v.

Das typische klinische Bild und der positive serologische IgG-Nachweis sichert die Diagnose und weist auf eine länger bestehende Erkrankung hin. 5 Monate nach Therapie erscheint erstmals im Krankheitsverlauf eine positive TZ-Antwort. Zu keinem Zeitpunkt ist eine TZ-Proliferation durch DbpA, dem Spätmarker für Hautinfektionen, nachzuweisen. Allerdings ist 5 Monate nach Therapie eine erhöhte Zytokinsekretion durch DbpA zu detektieren, wobei die IL-4-Sekretion überwiegt. Eine massiv erhöhte IFN-γ Sekretion erscheint zu diesem Zeitpunkt durch das Antigen ZSA36.

<b>Patient 7:</b> H.J.	<b>Alter:</b> 74 Jahre	<b>Geschlecht:</b> männlich
<b>Diagnose:</b> <u>Acrodermatitis chronica atrophicans</u> / Morphea linker Oberschenkel		
<b>Zeckenstich:</b> ?	<b>Erkrankungsdauer:</b> ?	

Untersuchungsdatum		15.02.00	15.03.00	24.05.00	
<b>Serologie</b>	<u>IgM-Nachweis</u>	ELISA	0,25	↑ <b>0,46</b>	↓ 0,35
		μ-capture-EIA	n.d.	0,68	n.d.
		WB	-	-	n.d.
	<u>IgG-Nachweis</u>	ELISA	<b>0,74</b>	<b>0,99</b>	<b>0,84</b>
		WB (kD)	<b>83,75,60,45,41,29, pG</b>	<b>83,75,60,45,41,29, pG</b>	n.d.
<b>T-Zellantwort</b>	<u>Proliferation</u> (Stimulationsindex)	pG	1,96	0,15	1,05
		OspC	<b>2,15</b>	↓ 0,75	0,3
		DbpA	<b>3,48</b>	↓ 1,08	1,37
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.
	<u>IFN-γ-Sekretion</u> (spots abzüglich background)	pG	<b>88</b>	↓ -88	↑ 9
		OspC	6	↑ <b>25</b>	↓ -7
		DbpA	<b>60</b>	↓ -93	↑ <b>22</b>
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.
	<u>IL-4-Sekretion</u> (spots abzüglich background)	pG	<b>9</b>	↓ -2	↓ -3
		OspC	<b>14</b>	↓ 0	↓ -2
		DbpA	<b>8</b>	↓ -2	↑ <b>7</b>
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Klinischer Verlauf</b>					

↑ Therapie: ↑  
Doxycyclin 200mg/d

Eine verstärkte T-Zellantwort (TZ-Proliferation durch OspC, DbpA, IFN-γ-Produktion durch pG, DbpA, IL-4-Produktion durch pG, OspC, DbpA) ist bereits vor Therapie nachweisbar, während erhöhte IgM-Ak erst nach Therapie nachweisbar werden. Nach Therapie nimmt die TZ-Proliferation und die Zytokinsekretion ab, außer die IFN-γ-Produktion durch OspC, die zeitverzögert ansteigt. 3 Monate nach Therapie steigt die IFN-γ-Produktion erneut mäßig durch pG und deutlich durch DbpA an. Auch eine erhöhte IL-4-Produktion durch DbpA wird erneut nachweisbar.

## 3.4.3.5.2 Arthritis

<b>Patient 8:</b> B.G.	<b>Alter:</b> 32 Jahre	<b>Geschlecht:</b> männlich
<b>Diagnose:</b> <u>Arthritis</u> Knie rechts, aufsteigende Schmerzen rechtes Bein, HWS-Beschwerden		
<b>Zeckenstich:</b> ?	<b>Erkrankungsdauer:</b> 1 ½ Jahre	

Untersuchungsdatum			16.08.00	20.09.00	21.11.00
<b>Serologie</b>	<u>IgM-Nachweis</u>	ELISA	0,25	0,26	0,30
		μ-capture-EIA	n.d.	n.d.	n.d.
		WB (kD)	41, OspC	n.d.	<b>41,39,34,31, OspC,22</b>
	<u>IgG-Nachweis</u>	ELISA	<b>0,59</b>	<b>0,52</b>	<b>0,55</b>
		WB (kD)	<b>83,60,45,41,39,34, 29,OspC,21,18,pG</b>	n.d. <b>pG</b>	<b>83,60,41,34,31, 29,OspC,21,pG</b>
<b>T-Zellantwort</b>	<u>Proliferation</u> (Stimulationsindex)	pG	<b>5,26</b>	↓ <b>2,75</b>	↓ 1,51
		OspC	<b>15,12</b>	↓ <b>4,38</b>	↓ 1,70
		DbpA	<b>5,67</b>	↓ <b>3,11</b>	↓ 1,53
		ZSA36	<b>4,57</b>	↓ 1,27	↓ 1,38
	<u>IFN-γ-Sekretion</u> (spots abzüglich background)	pG	5	↑ <b>67</b>	n.d.
		OspC	<b>89</b>	↓ -23	n.d.
		DbpA	6	-17	n.d.
		ZSA36	4	↑ <b>39</b>	n.d.
	<u>IL-4-Sekretion</u> (spots abzüglich background)	pG	-17	-7	n.d.
		OspC	-18	-16	n.d.
		DbpA	-2	-12	n.d.
		ZSA36	-7	-15	n.d.
<b>Klinischer Verlauf</b>	Arthralgie	Besserung	=	=	
		↑ Therapie: Doxycyclin 200mg/d	↑	↑NSAR	

Bei der serologischen Diagnostik konnten nur erhöhte IgG-Antikörper im ELISA und Westernblot nachgewiesen werden als Hinweis auf eine Spätinfektion. Die Ätiologie der Arthritis ist durch das spezifische Bandenmuster im Westernblot gesichert. Direkt nach Therapie steigt die IFN-γ-Produktion durch pG und ZSA36, die bereits vor Therapie durch OspC nachweisbar war. Nach Therapie nimmt die TZ-Proliferation langsam ab. Während der Behandlung stellt sich eine klinische Besserung der Symptome, aber keine Beschwerdefreiheit ein. Weder vor noch nach Therapie ist eine IL-4-Produktion nachweisbar.

## 3.4.3.5.3 Chronisches Erschöpfungssyndrom

<b>Patient 9:</b> L.I.	<b>Alter:</b> 37 Jahre	<b>Geschlecht:</b> männlich
<b>Diagnose:</b> chronisches Erschöpfungssyndrom		
<b>Zeckenstich:</b> ?	<b>Erkrankungsdauer:</b> 10 Jahre	

<b>Untersuchungsdatum</b>		10.10.00	07.11.00	
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	0,07	0,23
		μ-capture-EIA	0,81	0,73
		WB (kD)	(21)	(OspC)
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	↓ <b>0,71</b>	↑ <b>1,09</b>
WB (kD)		<b>83,60,41,30, (OspC,21), pG</b>	<b>83,60,41,30,29,21, (OspC), pG</b>	
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation (Stimulationsindex)</b>	pG	0,60	↑ <b>2,36</b>
		OspC	1,68	↑ <b>4,03</b>
		DbpA	1,72	↑ <b>2,78</b>
		ZSA36	1,19	↑ <b>2,43</b>
	<b>IFN-γ-Sekretion (spots abzüglich background)</b>	pG	9	n.d.
		OspC	8	n.d.
		DbpA	7	n.d.
		ZSA36	-1	n.d.
	<b>IL-4-Sekretion (spots abzüglich background)</b>	pG	<b>11</b>	n.d.
		OspC	<b>14</b>	n.d.
		DbpA	<b>12</b>	n.d.
		ZSA36	<b>68</b>	n.d.
	<b>Klinischer Verlauf</b>		Allgemeinsymptome	Persistenz
			↑ Therapie: Cefuroximaxetil 1000mg/d	↑

In der serologischen Diagnostik sind lediglich stark erhöhte IgG-Ak (ELISA) nachweisbar, welche auf eine länger bestehende Borrelieninfektion hinweisen. Vor Therapie besteht eine erhöhte IL-4-Produktion durch sämtliche Antigene und keine nennenswerte IFN-γ-Sekretion. Eine TZ-Proliferation ist erst nach Therapie nachweisbar, vereinbar mit Aktivierung der zellulären Immunreaktion durch den therapiebedingten Erregerzerfall.

### 3.4.4 Zusammenhang zwischen TZ-Proliferation und Zytokinsekretion

Die TZ-Proliferation steht in unterschiedlich engem Zusammenhang mit der Zytokinsekretion, wobei die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen 17% und 82% variiert. Die beste Übereinstimmung mit der Zytokinproduktion (55-82%) zeigte sich für alle Antigene im 3. Verlaufszeitraum. Die Ergebnisse der TZ-Proliferation stimmten zu diesen Zeitpunkt am besten mit der IFN- $\gamma$ -Produktion durch ZSA36 (82%) und mit der IL-4-Produktion durch DbpA (75%) und am geringsten mit der IFN- $\gamma$ - und IL-4-Produktion durch OspC (55%/59%) überein. Die IL-4- und IFN- $\gamma$ -Produktion zeigte eine Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen 59-73%, wobei sich die beste Übereinstimmung für pG im dritten (89%), für OspC im zweiten (93%), für DbpA im vierten (90%) und für ZSA36 im ersten Verlaufszeitraum (62%) zeigte.

### 3.4.5 Zusammenhang zwischen zellulärer und humoraler Immunreaktion

Anhand der exemplarischen Kasuistiken konnte die Antikörperproduktion (IgM/IgG) im Serum mit der TZ-Reaktion (TZ-Proliferation, IFN- $\gamma$ /IL-4-Produktion) auf das Antigen OspC verglichen werden. Die IgM-Produktion stimmte in 60% (35/58) der Fälle mit der TZ-Proliferation, in 41% (20/49) der Fälle mit der IFN- $\gamma$ -Produktion und in 33% (16/49) der Fälle mit der IL-4-Produktion überein. Die beste Übereinstimmung der IgM-Ak-Produktion zeigte sich mit der TZ-Proliferation im ersten Untersuchungszeitraum (17/22, 77%) und mit der IFN- $\gamma$ -Produktion im vierten Untersuchungszeitraum (7/9, 78%). Die IgG-Produktion stimmte in 48% (28/59) der Fälle mit der TZ-Proliferation, in 55% (27/49) der Fälle mit der IFN- $\gamma$ -Produktion und in 49% (24/49) der Fälle mit der IL-4-Produktion überein. Die beste Übereinstimmung der IgG-Ak-Produktion zeigte sich mit der IFN- $\gamma$ -Produktion im dritten Untersuchungszeitraum (6/9, 67%) und der IL-4-Produktion im ersten Verlaufszeitraum (12/21, 57%).

		vor und während Therapie	bis 40 Tage nach Therapie	40 bis 90 Tage nach Therapie	90 bis 180 Tage nach Therapie
<b>IgM</b>	<b>Frühinfektionen</b>	11/16 69%	3/7 43%	6/9 67%	5/10 50%
	<b>Gesamtes Patientenkollektiv</b>	17/22 77%	7/14 50%	6/10 60%	5/12 42%
<b>IgG</b>	<b>Frühinfektionen</b>	6/16 37%	4/7 57%	5/9 55%	5/10 50%
	<b>Gesamtes Patientenkollektiv</b>	10/22 45%	8/14 57%	5/10 50%	5/12 42%

**Tabelle 3.3 Übereinstimmung der Ergebnisse der OspC-spezifischer IgM- und IgG-Ak-Produktion im Westernblot und der TZ-Proliferation durch OspC**

Eine Übereinstimmung der IgG-Ak-Produktion und der TZ-Proliferation durch das Antigen pG zeigten sich in 60% der Fälle (76/126), der IFN- $\gamma$ -Produktion in 68%(SI) (28/43) bzw. 61% ( $\Delta$ ) der Fälle und der IL-4-Produktion in 69% (SI) (18/26) bzw. 74% ( $\Delta$ ) der Fälle (nach Ausschluss grenzwertiger Ergebnisse). Die beste Übereinstimmung der IgG-Ak-Produktion und der TZ-Proliferation durch das Antigen pG zeigte sich im 3. Untersuchungszeitraum, 40 bis 90 Tage nach Therapie (15/20, 75%).

	Vor und während Therapie	bis 40 Tage nach Therapie	40 bis 90 Tage nach Therapie	90 bis 180 Tage nach Therapie
<b>Frühinfektionen</b>	15/30 50%	7/13 54%	13/18 72%	11/14 79%
<b>Gesamtes Patientenkollektiv</b>	17/37 46%	9/17 53%	15/20 75%	12/19 63%

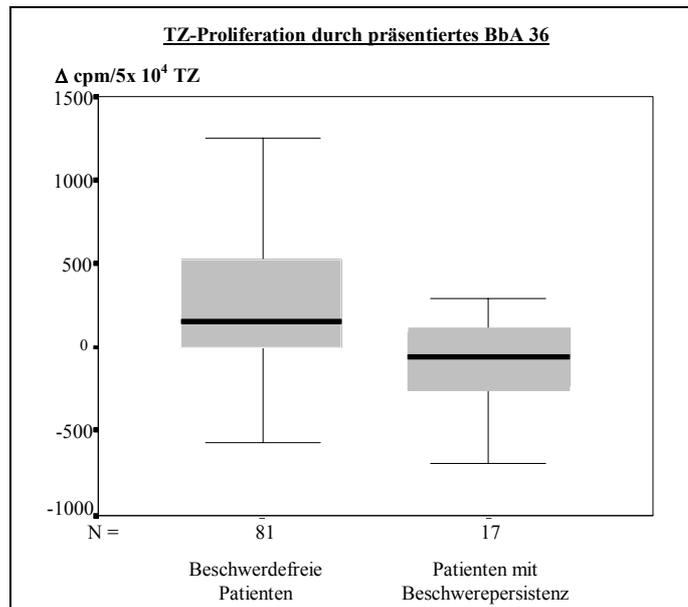
**Tabelle 3.4 Übereinstimmung der Ergebnisse pG spezifischer IgG-Antikörperproduktion im Westernblot und der TZ-Proliferation durch pG**

Bei dem Vergleich der Untersuchungsergebnisse im ELISA und Proliferationsassay (Absolutwerte) konnte keine Korrelation zwischen der TZ-Proliferation und der Antikörperproduktion gefunden werden. Ebenso korreliert die Antikörperproduktion nicht mit der Zytokinproduktion (Absolutwerte, SI, IFN- $\gamma$ /IL-4-Ratio).

### **3.4.6 Zusammenhang zwischen Beschwerdepersistenz (chronischer Erkrankung) und zellulärer Immunreaktion**

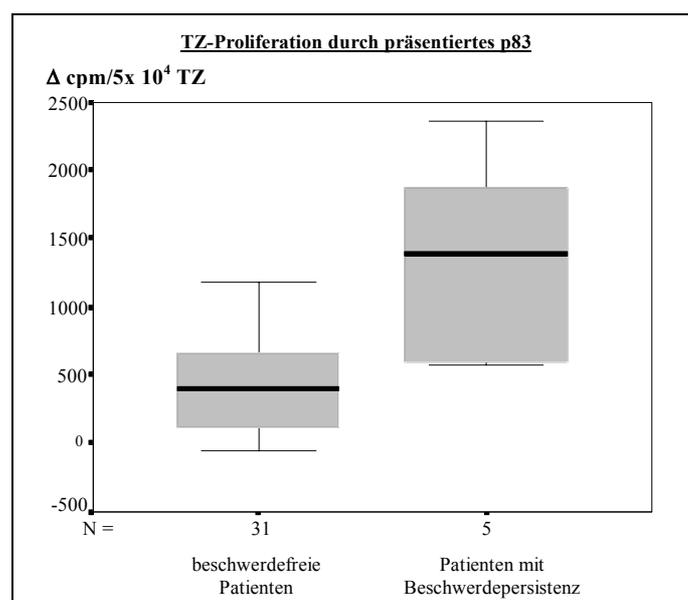
Patienten, die nach korrekt durchgeführter Therapie weiter bestehende Primärsymptome aufwiesen, aber auch Patienten, die nach der Therapie neue Symptome entwickelten, wurden in die Gruppe mit chronischer Erkrankung/Beschwerdepersistenz aufgenommen. Hingegen Patienten, die nach der Therapie beschwerdefrei waren oder eine Besserung der Symptomatik schilderten, wurden als „geheilt“ betrachtet. Der Zusammenhang zwischen Beschwerdepersistenz nach Therapie und TZ-Proliferation bzw. Zytokinsekretion wurde durch die Berechnung des Mann-Whitney-Testes dargestellt. Es konnten signifikante Unterschiede der TZ-Proliferation durch die Antigene ZSA36 ( $\Delta$  und SI) und p83 ( $\Delta$ ) bei Patienten mit und ohne Beschwerdepersistenz ermittelt werden. Es zeigte sich ein negativer Zusammenhang zwischen der TZ-Proliferation durch ZSA36 und Beschwerdepersistenz, d.h. eine chronische Erkrankung geht mit einer mangelnden Reaktion bzw. Proliferation auf das Antigen ZSA36 einher. Auch im McNemar-Test (bewertete SI) zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Beschwerdepersistenz und TZ-Proliferation durch ZSA36. Insgesamt zeigten 15 von 17 (88%) der Patienten mit persistierenden Beschwerden ein negatives Testergebnis im Proliferationsassay. Allerdings

ergab sich auch für 59 von 81 (73%) beschwerdefreie Patienten ein negatives Proliferationsergebnis.



**Abbildung 3.23 TZ-Proliferation (Differenz) durch präsentiertes ZSA36 bei beschwerdefreien Patienten (n=81) und Patienten mit Beschwerdepersistenz (n=17)** Dargestellt ist der Median (schwarzer Balken), die 25. und 75. Perzentile (schraffierte Box) mit dem größten und dem kleinsten gemessenen Wert (⊥) ohne Extremwerte und Ausreißer.

Das Antigen p83 hingegen induzierte eine höhere TZ-Proliferation bei Patienten mit Beschwerdepersistenz. Dieser Sachverhalt konnte bei der Analyse mittels McNemar-Test nicht bestätigt werden. Es reagierten zwar alle Patienten mit Beschwerden (5/5, 100%), jedoch auch Kontrollpersonen (10/15 = 67%) mit einer positiven TZ-Proliferation durch das Antigen.



**Abbildung 3.24 TZ-Proliferation (Differenz) durch präsentierte p83 bei beschwerdefreien Patienten (n=31) und Patienten mit Beschwerdepersistenz (n=5).** Dargestellt ist der Median (schwarzer Balken), die 25. und 75. Perzentile (schraffierte Box) mit dem größten und dem kleinsten gemessenen Wert (⊥) ohne Extremwerte und Ausreißer.

Im Elispot konnte mittels Mann-Whitney-Test kein signifikanter Unterschied zwischen der Zytokinsekretion beschwerdefreier Patienten und Patienten mit Beschwerdepersistenz gefunden werden. Auch durch eine andere Betrachtungsweise, in Form einer TH1/TH2-Ratio, zeigte sich kein unterschiedliches Zytokinsekretionsmuster. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Beschwerdepersistenz und einer bestimmten T-Helferzellantwort gefunden werden.

### **3.4.7 Zusammenhang zwischen speziellen Symptomen und der zellulären Immunantwort**

Die Überprüfung, ob zwischen einem bestimmten Symptom und der T-zellulären Immunantwort ein Zusammenhang besteht, erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied der TZ-Proliferation bei Auftreten von Allgemeinsymptomen, Arthralgien und neurologischen Symptomen ( $\Delta$  und SI) ermittelt werden. Die IL-4-Sekretion durch pG (SI) unterscheidet sich sehr signifikant ( $p < 0,01$ ) bei Patienten mit und ohne Allgemeinsymptome. So wiesen 11 von 27 Patienten (41%) mit Allgemeinsymptomen eine positive IL-4-Sekretion auf, während nur 12 von 94 Patienten (13%) ohne Allgemeinsymptome IL-4 sezernierten. In 93 von 121 Fällen (77%) stimmte das Auftreten von Allgemeinsymptomen und der IL-4-Sekretion überein. Auch die IL-4-Sekretion durch OspC (SI) und durch p83 ( $\Delta$ ) ( $n=10$ ) unterschied sich signifikant bei Patienten mit und ohne Allgemeinsymptome. Die IL-4-Sekretion durch OspC stimmte mit dem Auftreten von Allgemeinsymptomen in 84 von 117 Fällen (72%) überein, wobei 6 von 24 Patienten (25%) mit Allgemeinsymptomen im Vergleich zu 15 von 93 beschwerdefreien Patienten (16%) eine positive IL-4-Sekretion zeigten. Die IFN- $\gamma$ -Sekretion durch ZSA36 (SI) unterschied sich signifikant bei Patienten mit und ohne Arthralgie. Eine mangelnde IFN- $\gamma$ -Sekretion durch das Antigen ZSA36 war mit Arthralgie verknüpft. So wiesen 14 von 16 (87%) Patienten mit Arthralgie und 44 von 63 beschwerdefreien Patienten (63%) ein negatives Testergebnis für IFN- $\gamma$  auf. In 58% (46/79) stimmte das Auftreten einer Arthralgie mit der IFN- $\gamma$ -Sekretion durch ZSA36 überein. Die IL-4-Sekretion durch OspC unterschied sich signifikant ( $\Delta$ ) bei Patienten mit und ohne neurologische Reizsymptome. So zeigten 11 von 12 Patienten (92%) mit neurologischen Reizsymptomen und 79 von 118 beschwerdefreien Patienten (67%) ein negatives Testergebnis für IL-4. In 80 von 130 Fällen (61%) stimmten das Auftreten neurologischer Symptome und die IL-4-Produktion überein.

In 61% (16/26) traten Allgemeinsymptome mit neurologischen Symptomen, in 54% (21/39) mit Arthralgie und in 42% (11/26) Arthralgie mit neurologischen Symptomen auf. Eine Übereinstimmung für bestehendes oder nicht bestehendes Symptom lag zwischen 73% (Arthralgie und neurologische Symptome) und 84% (Allgemeinsymptome und neurologische Symptome). Dies bedeutet, dass Zusatzsymptome, wie Allgemeinsymptome, Arthralgie und neurologische Symptome, häufig kombiniert oder gar nicht in Erscheinung traten. Auch zwischen dem Auftreten von weiteren Symptomen und einer Beschwerdepersistenz ließ sich eine Übereinstimmung zwischen 76-80% eruieren, wobei eine Beschwerdepersistenz am häufigsten bei Patienten zu beobachten war, die bereits vor Therapie über Arthralgien (24/41, 58%) geklagt hatten. Hingegen beklagten Patienten mit Beschwerdepersistenz in nur 16 von 41 Fällen (39%) Allgemeinsymptome und in nur 13 von 41 Fällen (32%) neurologische Reizsymptome.

## 4 Diskussion

Die Diagnostik der Lyme-Borreliose ist vor allem in der Frühphase der Infektion und bei atypischem klinischen Verlauf erschwert, da die serologische Routinediagnostik wegen der verzögerten Antikörperproduktion in ca. 30% eine „diagnostische Lücke“ zeigt. In dieser Studie wurde anhand eines differenzierten Testsystems untersucht, ob ein Parameter der T-zellulären Immunreaktion (TZ-Proliferation, IFN- $\gamma$ /IL-4-Produktion) vor dem Antikörperanstieg nachweisbar ist.

Zudem klagt ein Teil der Patienten mit Lyme-Borreliose nach adäquater antibiotischer Therapie über persistierende oder neue aufgetretene neurologische oder „rheumatische“ Beschwerden. Deshalb wurde in dieser Studie anhand der Verlaufsbeobachtungen untersucht, ob durch die Analyse der zellulären Immunreaktion ein pathogenetischer Zusammenhang zwischen Beschwerdepersistenz und Zytokinprofil (TH1/TH2) besteht.

### 4.1 Diskussion der methodischen Problematik

#### 4.1.1 Patientenauswahl

Die Patientenakquirierung in ausreichender Fallzahl gestaltete sich sehr aufwändig, da einzelne Krankheitsstadien unterschieden und der zeitliche Verlauf der Erkrankung bei der Untersuchung berücksichtigt werden sollten. Zudem stellt der aktuelle Gesundheitszustand des Patienten zum Untersuchungszeitpunkt bei der Beurteilung der TZ-Antwort eine unberücksichtigte Einflussgröße dar. Welchen Einfluss hat zum Beispiel eine akute Erkältungskrankheit zum Zeitpunkt der Untersuchung auf die Immunantwort? Ist eine verstärkte spezifische TZ-Reaktion durch ein bereits aktiviertes Immunsystem zu erwarten oder eine abgeschwächte TZ-Antwort durch „Doppelbelastung“ des Immunsystems? In der Literatur wird z.B. auch von verschiedenen Auswirkungen immunsuppressiver und antiphlogistischer Medikamente auf die Immunantwort berichtet (*Herr et al., 1997, Callebaut et al., 1993, Orlik und Splitter, 1996, Fitzgerald et al., 1991, McCutcheon et al., 1997*). Zudem bleiben interindividuelle Unterschiede in der fein orchestrierten TZ-Immunreaktion zu berücksichtigen, da jeder Organismus ein individuell einzigartiges Immunsystem besitzt, das gemäß seiner genetisch determinierten Stärken und Schwächen reagiert.

#### 4.1.1.1 Grundlagen des Versuchsaufbaus

Der verwendete Versuchsaufbau stellt eine *in vitro* Simulation des Kontaktes naiver T-Effektorzellen mit dem Erreger, *B. burgdorferi*, präsentiert durch dendritische Zellen dar. *In vivo* findet die Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Fremdorganismus in der Haut statt, wobei an der T-zellulären Immunreaktion durch *B. burgdorferi* in der Haut ortsständige dendritische Zellen, die Langerhans-Zellen und zirkulierende T-Zellen beteiligt sind. Der mögliche Einfluss des Mikromilieus und anderer in der Haut ortständiger Zellpopulationen auf die T-zelluläre Immunantwort konnte nicht berücksichtigt werden.

In der Testanordnung wurden periphere Blutmonozyten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert und mit Hilfe von IL-4 und GM-CSF zu dendritischen Zellen ausgereift. Diese Generierung von dendritischen Zellen aus PBMC wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (*Bender et al., 1996, Romani et al., 1996*) und von *Bauer et al. (1999)* modifiziert, um mit einem vereinfachtem Protokoll größere Mengen an dendritischen Zellen aus peripherem Blut gewinnen zu können. Ein Unterschied in der Funktions- und Reaktionsweise ist in diesen zwei morphologisch sehr ähnlichen (*Romani et al., 1989, Bauer et al., 1999*), aber doch unterschiedlichen Zellpopulationen denkbar. Mehrere Arbeitsgruppen (*Steinmann et al., 1997, Winzler et al., 1997*) untersuchten die Funktion, der aus PBMC generierten, unreifen dendritischen Zellen und konnten eine Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation in Form eines MHC-Antigen-Peptid-Komplexes nachweisen. Abweichung bzgl. kostimulatorischer Oberflächenmoleküle zwischen Langerhans-Zellen und generierter dendritischer Zellen beschrieben *Zhou und Tedder (1996)*, die eine fehlende Expression von CD83, einem kostimulatorischen Molekül zur Aktivierung der T-Zellreaktion, am Tag 7 bei generierten DZ erkannten. *Bauer (1999)* beschreibt jedoch einen Anstieg dieses wichtigen Signalmoleküls an der Oberfläche dendritischer Zellen nach Antigenkontakt und Kokultivierung mit autologen T-Zellen. Die terminale Reifung, die eine erhöhte kostimulatorische Aktivität antigenpräsentierender Zellen bedingt, erfolgt erst durch TZ-Kontakt (*Bergstresser et al., 1997, Morse et al., 1998*). Zudem beschreiben verschiedene Arbeitsgruppen die Möglichkeit mit aus PBMC generierten dendritischen Zellen eine antigenspezifische T-Zellreaktion zu induzieren (*Bender et al., 1996, Chapuis et al., 1997, Romani et al., 1996*). Demzufolge wurde in dieser Studie mit autologen dendritischen Zellen zur Antigenstimulation autologer T-Zellen gearbeitet.

#### 4.1.1.2 Einflussgröße Medium

Dendritische Zellen können prinzipiell sowohl in 10% FCS-haltigem Medium als auch in Medium mit 1% autologem Plasma kultiviert werden. Vor allem bei der Entwicklung klinisch einsetzbarer dendritischer Zellen, z.B. für Immuntherapien wird autologes Plasma verwendet, um eine Abwehr des Immunsystems, ähnlich der Transplantatabstoßung gegen körperfremde immunogene Substanzen, wie in fötalem Kälberserum enthalten, zu vermeiden (*Romani et al., 1996, Bender et al., 1996*). Verschiedene Autoren beschrieben, dem Ergebnis dieser Studie entsprechend, dass Medium mit autologem Serum oder Plasma die bestmögliche antigenspezifische T-Zellantwort ermöglicht (*Mannering et al., 1998, Krause et al., 1991*) und die analytische Potenz des Proliferationsassay verbessert, indem die Basisproliferation im Vergleich zur antigenspezifischen Proliferation vermindert wurde (*Büchtele und Höpfl, 1997, Orlik und Splitter, 1996, Kaldjian et al., 1992*). In der Literatur heißt es weiter, dass höhere Konzentrationen des Serumgehaltes im Nährmedium (5-10% FCS) die Lymphozytenproliferation supprimieren (*Orlik und Splitter, 1996*). *Anton et al. (1998)* konnten keinen morphologischen oder funktionellen Unterschied bei dendritischen Zellen erkennen, die in Vollmedium mit FCS oder mit gepooltem humanem Serum kultiviert worden waren. *Bauer (1999)* beschrieb eine langsamere Differenzierung dendritischer Zellen, erkennbar an bestimmten Oberflächenmarkern, und eine geringere Zellausbeute bei der Zellisolierung (*Bender et al., 1996*) bei Verwendung von Medium mit 1% autologem Plasma. Deshalb wurde in dieser Studie zur Reifeinduktion der dendritischen Zellen ein 2. Zytokincocktail eingesetzt, bei Verwendung von 1% autologem Plasma.

#### 4.1.1.3 Auswahl der Antigene

In früheren Studien wurde zur Stimulation spezifischer T-Lymphozyten Präparationen aus intakten Borrelien (*Dattwyler et al., 1988*), Borrelienlysate (*Neumann et al., 1989, Weyand und Goronzy, 1989, Peltz, 1991*) oder verschiedene Proteinfractionen solcher Lysate (*Yoshinari et al., 1991, Forsberg et al., 1995*) verwendet. In der verwendeten Testanordnung wurden dendritischen Zellen einzelne rekombinante Proteine angeboten, da verschiedene Studien eine unspezifische T-Zell-Stimulierung (Proliferation) bei der Verwendung von intakten Borrelien oder Borrelienlysaten gezeigt hatten (*Zoschke et al., 1991, Roessner et al., 1994, Filgueira et al., 1996, Bauer, 1999*). Mögliche Ursache hierfür sind bei intakten Borrelien und Lysaten vorhandene Lipoproteine, die voraktivierte T-

Lymphozyten unspezifisch stimulieren können, wie von *Knigge und Mitarbeitern (1996)* für das Borrelienantigen lipOspA beschrieben.

Die verwendeten Antigene, pG, OspC, p83, DbpA, ZSA36 wurden anhand bestimmter Kriterien wie Immunogenität, *in vivo*-Expression, protektives Potential (Vakzinekandidaten) ausgewählt, wobei möglicherweise auch noch andere Erregerkomponenten für die entscheidende T-zellulären Reaktion verantwortlich sind. Es ist denkbar, dass durch die zellinterne Proteinprozessierung *in vivo* andere Peptidfragmente als die gewählten Antigene an der Zelloberfläche dendritischer Zellen präsentiert werden. *Schulze et al. (1996)* berichteten zudem von der Abhängigkeit der Zytokinsekretion von dem zur Stimulation eingesetzten *B. burgdorferi*-Stamm, sodass auch der zur Herstellung der rekombinanten Proteine verwendete Borrelienstamm die erhobenen Ergebnisse maßgeblich beeinflussen könnte.

#### 4.1.1.4 Optimierung der Antigenverarbeitung dendritischer Zellen

##### 4.1.1.4.1 Optimale Antigenkontaktdauer für dendritische Zellen

Die optimale Dauer des Antigenkontaktes dendritischer Zellen liegt nach einem Versuch, bei dem dendritischen Zellen Antigen 2h, 6h, 24h, 48h, 72h angeboten wurde (Ergebnisse nicht dargestellt) bei 48h. Bei dem Vergleich zu anderen Studien, bei denen meist PBMC verwendet wurden, ist zu beachten, dass in dieser Studie die Antigenaufnahme durch dendritische Zellen (48h) und die nachfolgende TZ-Stimulation und TZ-Proliferation (72h) getrennt voneinander erfolgte. Bei der Verwendung von PBMC, einer gemischten Zellpopulation mit antigenpräsentierenden und reagierenden Zellen erfolgt hingegen Antigenaufnahme und TZ-Stimulation in einem Ansatz. Insgesamt werden von verschiedenen Autoren sehr unterschiedliche Inkubationszeiten für den Antigenkontakt beschrieben. *Roessner et al. (1994)* inkubierten unter serumfreien Bedingungen PBMC 5 Tage mit Antigen, bevor sie mit spezifischen T-Zell-Klonen kokultiviert wurden, wobei rekombinante Proteine (OspA, OspB, Flagellin) und *B. burgdorferi*-Sonikate verwendet wurden. *Rutkowski et al. (1997)* hingegen inkubierten PBMC mit intakten vitalen *B. burgdorferi*-Organismen für 7 Tage, nach Voruntersuchungen von *Huppertz et al. (1996)*, die PBMC mit ganzen Borrelien zwischen 4 und 9 Tagen inkubierten und den 7 Tag als optimale Stimulationsdauer erkannten. Die längere optimale Stimulationsdauer in diesen Studien mag zum Teil auf die Verwendung von intakten Borrelien zurückzuführen sein, da für die präsentationsreife Aufbereitung des antigenetischen Materials (phagolysosomale Proteinspaltung) wohl ein zusätzlicher zeitlicher Aufwand nötig ist.

#### 4.1.1.4.2 „Nachreifung“ dendritischer Zellen mittels 2. Zytokincocktail

Grundsätzlich sind zwei Stadien in der Entwicklung dendritischer Zellen aus peripheren Blutmonozyten zu unterscheiden (Romani et al., 1996, Bender et al., 1996). Im ersten Reifestadium besitzen die Zellen, durch GM-CSF und IL-4 stimuliert, einige, aber nicht alle Eigenschaften reifer dendritischer Zellen, während im zweiten Reifestadium die Differenzierung zur dendritischen Zelle, die eine hohe stimulatorische Aktivität zur Folge hat, vollendet wird. In unseren Untersuchungen konnte demzufolge, anhand der Wirkung auf die TZ-Proliferation eine höhere stimulatorische Kapazität dendritischer Zellen am 7. als am 6. Reifungstag erkannt werden.

Um eine stabile Population reifer dendritischer Zellen mit optimalen Fähigkeiten zur Antigenpräsentation zu erreichen, sind *in vivo*, wie am Beispiel der Langerhanszellen gezeigt, Signale aus dem Mikroenvironment notwendig (Heufler et al., 1988, Winzler et al., 1997, Streilein, 1991). Neben lebenden Bakterien, stellen LPS oder Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (Aiba, 1998, Sallusto und Lanzavecchia, 1994, Chen et al., 1998) und GM-CSF (Paquette et al., 1998) solche Reifungssignale für dendritische Zellen dar. Jonuleit et al. (1997) berichteten, dass durch die Zugabe von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 eine dem „monocytes-conditioned-medium“, das den letzten Reifungsschritt der dendritischen Zellen auslöst, gleichwertige Potenz in der Generierung dendritischer Zellen erreicht werden kann. Durch Hinzufügen von PGE<sub>2</sub> zu dem Zytokincocktail ist eine größere Ausbeute, bessere Ausreifung und immunostimulatorische Kapazität zu erzielen.

Um dem Problem der langsameren DZ-Reifung in Medium mit 1% autologem Plasma (Bauer, 1999) zu begegnen, wurde in dem verwendeten Testsystem, wie bereits von Jonuleit et al. (1997) beschrieben eine „Nachreifung“ dendritischer Zellen während der Antigenaufnahme durch einen 2. Zytokincocktail (GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>) induziert. Die Kombination von Prostaglandin E<sub>2</sub> und TNF- $\alpha$  bewirkt bei DZ eine Stilllegung der Mannose-Rezeptor-vermittelten Endozytose und eine Hochregulation bzw. Neoexpression von MHC-I- und MHC-II-, Adhäsions- und Kostimulationsmolekülen (Rieser et al., 1997). Kalinski et al. (1997) konnten allein durch PGE<sub>2</sub> keine Änderung der DZ-Morphologie und der Expression von MHC-II- und Kostimulationsmolekülen erkennen. Allerdings beschrieben Kalinski et al. (1998) eine durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  induzierte Resistenz bei DZ gegen weitere Modulationen. Rougier et al. (1998) beschrieben die wichtige Rolle von IL-4, welches das Überleben und die Reifung von Langerhanszellen-ähnlicher DZ sichert. In dieser Studie konnte ein höchst signifikanter Unterschied in der TZ-Proliferation durch dendritische Zellen, die einerseits in FCS-

haltigem Medium und ohne 2. Zytokincocktail und andererseits in Medium mit 1% autologem Plasma und mit 2. Zytokincocktail generiert wurden, ermittelt werden. Der eingesetzte 2. Zytokincocktail, in Verbindung mit autologem Plasma erbrachte eine höhere TZ-Proliferation. (siehe Abb. 3.8)

Ob die Zugabe des 2. Zytokincocktails oder einzelner Komponenten desselben die T-Helferzellantwort in TH1- oder TH2-Richtung zu lenken oder eine generelle Immunsuppression auszulösen vermag, wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert.

So berichten *Sallusto und Lanzavecchia (1994)*, dass durch eine zu hohe Konzentration von TNF- $\alpha$  *in vivo* eine generalisierte Immunsuppression durch Reifeinduktion und dem damit verbundenem Verlust der Fähigkeit neue Antigene aufzunehmen, denkbar ist. Die Untersuchungen von *Kalinski et al. (1997)* erbrachten, dass PG E<sub>2</sub>-gereifte dendritische Zellen kein IL-12 produzieren und deshalb nur eine TH2-Antwort stimulieren können. Allerdings konnte durch direkten Kontakt mit Bakterien oder T-Zellen eine hohe IL-12-Produktion ausgelöst werden. Auch *Phipps et al. (1991)* verwiesen auf einen größeren inhibitorischen Effekt auf TH1- als auf TH2-Zellen durch Prostaglandin. *Jonuleit et al. (1997)* beschreiben hingegen, dass eine signifikante Produktion von IFN- $\gamma$  (TH1-Antwort) durch das Hinzufügen von PG E<sub>2</sub> induziert wird und kein Einfluss auf IL-4 oder IL-10 (TH2-Antwort) nachzuvollziehen sei. *De Saint-Vis et al. (1998)* zeigten die Abhängigkeit des Zytokinprofils von dem Zellsubtyp und Grad der Aktivierung dendritischer Zellen, wobei reife CD1a<sup>+</sup>-DZ (Langerhanszellen) nach CD40-Kontakt (T-Zellen) über IL-12 eine TH1-Antwort erzeugten und unreife CD14<sup>+</sup>-Zellen (Monozyten) über IL-10 die DZ-Reifung hemmten und eine Anergie hervorriefen. Auch die Dichte der MHC-II-Moleküle, Zeichen der Reife antigenpräsentierender Zellen, beeinflusst die TH1/TH2-Ratio (*DiMolfetto et al., 1998*). Jedoch scheint nicht nur das Reifestadium der antigenpräsentierenden Zellen ausschlaggebend für den Typ der T-Zellantwort zu sein, sondern vor allem die Eigenschaften des präsentierten Antigens. So beschreiben *Rieser et al. (1997)*, dass PGE<sub>2</sub> eine TH1-Differenzierung sowohl hemmen als auch ermöglichen kann, in Abhängigkeit vom stimulierenden Antigen. So hemmt z.B. LPS die IL-12-Produktion durch DZ, während seine Abwesenheit die IL-12-Produktion zu stimulieren vermag.

Bei unseren Untersuchungen konnte bei Einsatz des 2. Zytokincocktails sowohl TH1- als auch TH2-Zytokine detektiert werden. Der Einfluss des 2. Zytokincocktails auf die TH1-/TH2-Differenzierung war nicht statistisch signifikant.

#### **4.1.1.4.3 Die autologe DZ-stimulierte TZ-Proliferationsmessung im Vergleich zum klassischen Lymphozytenproliferationstest**

In früheren Studien wurde in der Regel der klassische Proliferationsassay mit peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) durchgeführt. Mit diesen Methoden konnte keine Differenzierung zwischen „Gesund und Krank“ getroffen werden, da sowohl gesunde Kontrollindividuen als auch Patienten mit Lyme-Borreliose eine Proliferation auf Borrelienantigene zeigten (*Roessner et al., 1994, Zoschke et al., 1991*). *Rutkowski et al. (1997)* konnten durch FACS-Analyse der beteiligten Subpopulationen bei Lyme-Arthritis

erkennen, dass überwiegend CD4<sup>+</sup>-T-Zellen neben einer geringen Anzahl von CD8<sup>+</sup>-Zellen auf Borrelienantigen proliferierten. Wegen der Identifizierung der CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen als Hauptakteur der zellvermittelten Immunreaktion bei Lyme-Borreliose wurde im DZ-stimulierten TZ-Proliferationsassay, im Gegensatz zum klassischen Lymphozytenproliferationsassay mit PBMC, nur die Proliferation einer festgelegten Zellpopulation, nämlich der T-Zellen gemessen. Zur Stimulation der TZ wurden autologe antigenpräsentierende DZ verwendet, die im Vergleich zu PBMC eine höhere stimulatorische Aktivität für naive T-Zellen aufweisen und in der Lage sind eine T-Zellantwort mit wesentlich geringeren Antigenmengen zu erzeugen (*Steinmann et al., 1997, Sallusto und Lanzavecchia, 1994, Demotz et al., 1990, Harding et al., 1990*). PBMC vermögen im Gegensatz zu DZ keine T-Zellen aus dem Knochenmark, die als Beispiel einer vollkommen naiven T-Zellpopulation gelten können, zu stimulieren (*Sallusto und Lanzavecchia, 1994*). *Mannering et al. (1998)* konnten hingegen beim Vergleich der Antigenpräsentation durch PBMC und DZ keinen signifikanten Unterschied in der Fähigkeit zur antigenspezifischen TZ-Stimulation erkennen.

#### 4.1.1.4.4 Elispot-Assay

Ein allgemeines Problem des Zytokinnachweises sind die geringen Zytokinmengen, die sezerniert werden und ihre schnelle Bindung an Zielrezeptoren (*Beech et al., 1997*). Zusätzlich erschweren die kurze Halbwertszeit, die Präsenz löslicher Zytokinrezeptoren, anti-Zytokin-Antikörper und Inhibitoren den Nachweis. Trotzdem nützten *Friberg et al. (1994)* die *in vitro* Messung der Zytokinproduktion als Maß der Immunkompetenz und der Aktivierung von Leukozyten als Parameter eines pathologischen Geschehens. Die Untersuchung der Zytokinsekretion antigenspezifisch aktivierter T-Zellen erfolgte über den Nachweis von IFN- $\gamma$  und IL-4, als Marker für TH1- und TH2-Zellantwort, im Enzyme-Linked-Immospot-Assay (ELISpot) nach *Czerkinsky et al. (1988)*, wobei einzelne Zytokin-sezernierende Zellen direkt durch immunenzymatische Färbung auf dem Nitrozellulosefilter sichtbar gemacht werden. Es gilt jedoch zu bedenken, dass sicher auch noch andere, nicht untersuchte Zytokine ausschlaggebend für die Lenkung der T-zellulären Immunantwort sind. Gegenüber dem konventionellen Zytokin-ELISA aus Kulturüberstand ist die Nachweisempfindlichkeit im ELISpot-Verfahren durch Detektion der Zytokinsekretion auf Einzelzellebene wesentlich erhöht. Zudem ist es möglich die Präkursorfrequenz zu bestimmen, indem man die eingesetzte Zellzahl mit der Anzahl der Zytokin-sezernierenden Zellen vergleicht.

Frühere Studien mit klonierten T-Zellen von Borreliose-Patienten, wiesen darauf hin, dass TH1-Zytokine ausschlaggebend für die Pathogenese der Lyme-Borreliose seien (*Yssel et al., 1990, Gross et al., 1998b*). *Forsberg et al. (1995)* beobachteten, dass T-Zellen von Borreliosepatienten, nicht aber von gesunden Kontrollpersonen IFN- $\gamma$  als Antwort auf eine Stimulation mit *B. burgdorferi* zeigten. *Keane-Myers und Nickell (1995a)* konnten anhand eines Mäusemodells zeigen, dass vorwiegend empfindliche C3H-Mäuse hohe Level von IFN- $\gamma$  sezernierten. *Kang et al. (1997)* konnten jedoch, ebenfalls anhand eines Mäusemodells feststellen, dass lediglich das im Verlauf entwickelte Zytokinprofil eine Unterscheidung zwischen empfindlichen und resistenten Individuen ermöglicht. So zeigten sowohl empfindliche C3H/HeN-Mäuse als auch resistente BALB/c-Mäuse zu Infektionsbeginn eine IFN- $\gamma$ -Produktion, im weiteren Verlauf allerdings führte eine hohe IFN- $\gamma$ -Sekretion zur Krankheitsentwicklung. Bei wiederholtem Erregerkontakt, wie bei der TZ-Restimulation durch antigenbeladene dendritische Zellen, kommt es zu einer Verstärkung, jedoch zu keiner generellen Modifizierung der Immunantwort. *Mayer et al. (1996)* restimulierten PBMC in Anwesenheit von rIL-2 mit Peptiden am 7 und 14 d der Kultur, und erreichten damit nach 19tägiger Kultur eine erhöhte peptidpezifische Proliferation im Vergleich zur 7tägigen Kultur. Dies spricht, ebenfalls wie das Ergebnis dieser Studie, lediglich für eine allgemeine Verstärkung der Immunantwort, die eine Zunahme proliferierender und zytokinsezernierender T-Zellen durch Restimulation ergab (siehe Abb. 3.11 und 3.12). Allerdings bleibt die Frage offen, ob die Menge der Zytokinausschüttung bzw. die Anzahl der sezernierenden T-Zellen für die folgende Reaktionskaskade ausschlaggebend ist, oder ob vielmehr die Anwesenheit und die Reaktionsbereitschaft zytokingesteuerter Effektorzellen, z.B. Makrophagen, der limitierende Faktor der Immunantwort ist.

## 4.2 Diskussion nach der Zielsetzung

### 4.2.1 Welche Borrelienantigene induzieren eine krankheitsspezifische TZ-Reaktion?

Es besteht eine höchst signifikante Korrelation zwischen den TZ-Reaktionen durch die einzelnen Antigene, d.h. alle untersuchten Antigene sind in der Lage eine TZ-Reaktion zu induzieren, sind immunogen. Allerdings ist die TZ-Reaktion individuell und auch im Krankheitsverlauf sehr variabel.

Im dritten Verlaufszeitraum stimmten die Ergebnisse der TZ-Proliferation am besten mit der Zytokinproduktion überein (55-82%), was ein Hinweis auf eine zeitlich verzögerte Zytokinproduktion sein könnte, wobei die IFN- $\gamma$ -Sekretion durch ZSA36 (82%) und die

IL-4-Sekretion durch DbpA (75%) scheinbar am engsten mit der jeweiligen TZ-Proliferation verknüpft ist. Die beste Übereinstimmung der IL-4- und IFN- $\gamma$ -Sekretion zeigte sich für jedes Antigen zu einem anderen Zeitpunkt, möglicherweise durch unterschiedliches Expressionsverhalten der Antigene im Laufe der Infektion bedingt. Die Zytokinproduktion erreichte durch ZSA36 (62%) im ersten, durch OspC (93%) im zweiten, durch pG (89%) im dritten und durch DbpA (90%) im vierten Untersuchungszeitraum die beste Übereinstimmung der Ergebnisse. Dies lässt vermuten, dass bei TZ-Stimulation durch antigenpräsentierende DZ zu bestimmten Zeitpunkten entweder, sowohl TH1- als auch TH2-Zytokine, oder weder TH1- noch TH2-Zytokine gebildet werden. So scheint das Verhältnis der Zytokine der ausschlaggebende Modulationsreiz für die weitere Immunantwort und den Krankheitsverlauf zu sein.

#### 4.2.2 Spezifität der Nachweissysteme - Differenzierung „Gesund / Krank“

Unter der Annahme eines phasenhaften Verlaufes der T-zellulären Immunantwort auf *B. burgdorferi* erscheint eine getrennte Betrachtung von Früh- und Spätinfektionen sinnvoll. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass alle Patienten auf den erneuten Kontakt mit *B. burgdorferi in vitro* mit einer gleichförmigen „Patentantwort“ reagieren, unabhängig von der immunologischen Vorgeschichte.

Bei Untersuchung der T-Zellproliferation des gesamten Patientenkollektivs konnte kein Borrelienantigen identifiziert werden, mit dem uneingeschränkt zwischen gesund und krank differenziert werden konnte. Die TZ-Reaktion gesunder Kontrollen auf Borrelienantigene, kann durch die Redundanz der TZ-Antigenerkennung erklärt werden, da Peptide mit geringem Aminosäurenunterschied ebenfalls eine TZ-Stimulierung über den TZR hervorrufen können. Lediglich für Spätinfektionen zeigte sich zu einem diagnostisch sinnvollen Zeitpunkt, nämlich vor Therapie als möglicher zusätzlicher diagnostischer Marker, DbpA, das bei Spätinfektionen eine signifikant höhere TZ-Proliferation im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zeigte. So wiesen 5/6 Spätinfektionen (83%) vor Therapie ein positives Proliferationsergebnis durch das Antigen DbpA auf. Demzufolge könnte DbpA einen Marker für ein fortgeschrittenes Infektionsstadium mit *B. burgdorferi* darstellen. Erst nach Therapie konnte eine signifikant höhere TZ-Proliferation durch OspC bei allen Patienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv erkannt werden. So zeigten 15/19 Patienten (79%) nach Therapie ein positives Proliferationsergebnis durch OspC. Dies stellt aufgrund des zeitlichen Zusammenhangs für die Primärdiagnostik keine Bereicherung dar, ist vielleicht aber für eine prognostische Aussage hilfreich. Der Erregerzerfall, induziert durch antibiotische Therapie, ermöglicht einen erneuten TZ-Kontakt mit dem

Oberflächenprotein OspC. Diese erneute Auseinandersetzung mit OspC könnte einen gelungenen Eliminationsversuch von *B. burgdorferi* zu erkennen geben. Das Antigen OspC konnte bei 71 von 102 Patienten (70%) eine spezifische TZ-Proliferation auslösen. Allerdings zeigten auch 11 von 26 Kontrollpersonen (42%) ein positives Proliferationsergebnis. Allgemein fielen bei Spätinfektionen im Vergleich zu Frühinfektionen höhere Stimulationsindices auf. Auch *Buechner et al. (1995)* konnte bei Patienten mit Spätinfektion (ACA) höhere Stimulationsindices ermitteln als bei Patienten mit Frühinfektion (EM). Diese quantitativ massivere TZ-Reaktion lässt auf eine Verstärkung („Boosterung“) der Immunantwort schließen. Ob es sich dabei um eine spezifische Reaktion im Sinne einer immunologischen Prägung nach Erregerkontakt oder um eine unspezifische Verstärkung sämtlicher immunologischer Reaktionen handelt, ist unklar, da *Goronzky et al. (1992)* bei chronischer *B. burgdorferi*-Infektion eine verstärkte Proliferationsantwort auch gegenüber anderen mikrobiellen Antigenen beschrieben.

Durch die Untersuchung der Zytokinproduktion konnte ebenfalls nicht anhand eines bestimmten Borrelienantigens uneingeschränkt zwischen gesund und krank differenziert werden. Vor Therapie konnte bei 47% des gesamten Patientenkollektiv (18/38) eine höhere IL-4-Produktion auf das Antigen pG nachgewiesen werden im Vergleich zur Kontrollgruppe (4/21, 19%). Hingegen zeigte das Patientenkollektiv nach Therapie eine signifikant höhere IFN- $\gamma$ -Sekretion durch pG (13/17, 76%) im Vergleich zum Kontrollkollektiv (9/24, 37%). Denkbar wäre, dass die Therapie eine Erhöhung der Antigenkonzentration auslöst, die eine Änderung der T-Helferzellantwort in Richtung TH1 zur Folge hat (*Hosken et al., 1995*). Dies würde eine lokale Erregerelimination durch IFN- $\gamma$ -abhängige Makrophagen begünstigen, die möglicherweise vor einer Disseminierung schützt. ZSA36 verursacht vor Therapie ebenfalls, wie pG, bei 43% aller Patienten (9/21) eine signifikant höhere IL-4-Produktion als bei dem Kontrollkollektiv (5/15 33%). Die IL-4-Produktion durch die Antigene pG und ZSA36 stellt möglicherweise einen Hinweis für eine aktuelle immunologische Auseinandersetzung mit *B. burgdorferi* dar, die für Erregerpersistenz spricht. T-Zellen von Patienten mit Frühinfektionen (6/7 86%) bilden 3-6 Monate nach Therapie geringe IFN- $\gamma$ -Mengen durch pG, was auf eine Erregerelimination mit Verlust von spezifischen Effektorzellen hinweisen könnte.

### 4.2.3 T-zelluläre Immunantwort nach antibiotischer Therapie und im Krankheitsverlauf

Huppertz *et al.* (1996) beschrieben in ihren Studien, dass eine positive Proliferation häufig erst nach antibiotischer Therapie nachzuweisen war und im Durchschnitt 6 Monate nach Therapie wieder negative Werte aufwies. Auch in unseren Untersuchungen stieg die TZ-Proliferation durch die Antigene pG, OspC, ZSA36 nach Therapie an, um im weiteren Verlauf wieder abzusinken. (siehe Abb. 3.20) Dies könnte als Zeichen einer erneuten Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Erreger *B. burgdorferi* interpretiert werden, ausgelöst durch den Erregerzerfall bei antibiotischer Therapie. Krause *et al.* (1991) beschrieben eine signifikante Abnahme der Proliferation bei Arthritis-Patienten nach erfolgreicher antibiotischer Therapie, bei weiterhin erhöhten Proliferationswerten. Pohl-Koppe *et al.* (2001) beobachtete jedoch, entsprechend unseren Ergebnissen, dass die TZ-Proliferation häufig erst nach antibiotischer Therapie positive Werte erreicht. So zeigten in unserer Untersuchung 28 von 47 Patienten (60%) bereits vor Therapie, aber 16 von 20 Patienten (80%) nach Therapie ein positives Proliferationsergebnis auf das Antigen OspC. Die TZ-Proliferation durch DbpA zeigte im Gegensatz zu den restlichen Antigenen einen statistisch signifikanten kontinuierlichen Abfall bis 3 Monate nach Therapie, sodass vermutlich die DbpA-Expression bzw. -Freisetzung durch die antibiotische Therapie nicht beeinflusst wird. 6 Monate nach Therapie stieg die TZ-Proliferation durch alle Antigene erneut an, was wahrscheinlich auf eine unbeabsichtigte Selektionierung des Patientenkollektivs zurückzuführen ist, wonach Patienten mit persistierenden oder neuen Beschwerden länger in Behandlung waren und zu diesem späten Zeitpunkt untersucht werden konnten. Bei gesonderter Betrachtung der Spätinfektionen ist ein kontinuierlicher Abfall der TZ-Proliferation durch ZSA36 zu berücksichtigen. Diese Beobachtung könnte auf eine fehlende erneute Auseinandersetzung hinweisen, da Beschwerdepersistenz mit einer unzureichenden Proliferationsantwort durch ZSA36 korreliert (siehe 4.2.5.).

Die IFN- $\gamma$ -Produktion zeigte ein ähnliches Verlaufsmuster wie die TZ-Proliferation (siehe Abb. 3.21). Alle Antigene verursachen einen Anstieg der IFN- $\gamma$ -Produktion nach Therapie, die allerdings nur für das Antigen pG positive Werte erreichte. Im weiteren Verlauf fiel die IFN- $\gamma$ -Produktion kontinuierlich ab. Der Anstieg und der nachfolgende Abfall (bis 3 Monate nach Therapie) der IFN- $\gamma$ -Produktion durch das Antigen OspC war statistisch signifikant. Hingegen zeigte die generell geringe IL-4-Produktion keine nennenswerte Dynamik im zeitlichen Verlauf der Erkrankung (siehe Abb. 3.22).

Die lokale Infektionsbegrenzung, induziert durch IFN- $\gamma$  verliert längere Zeit nach Therapie an Bedeutung, bedingt durch die abnehmende Antigenkonzentration (*Hosken et al., 1995*), während kurz nach Therapie durch vermehrte Antigenfreisetzung vermehrt IFN- $\gamma$  durch TH1-Helferzellen ausgeschüttet wird, um die MHC-Expression von APC zu steigern und Makrophagen zu aktivieren. Zudem ist IFN- $\gamma$  in der Lage einen Immunglobulin-Klassen- und/oder Isotypenwechsel zu induzieren. Die antibiotische Therapie scheint kein notwendiger Auslöser für die TH2-Zellantwort zu sein. Das vor Therapie geringfügig sezernierte IL-4 könnte die BZ-Aktivierung und Anregung zur Differenzierung zur Immunglobulin-bildenden Plasmazelle, das nach Therapie ansteigende IFN- $\gamma$  den notwendigen Immunglobulinklassenwechsel von IgM zu IgG triggern. Möglicherweise ist ein IFN- $\gamma$  induzierter Immunglobulinisotypenwechsel (IgG1 $\rightarrow$ IgG2a/b, IgG3) zur Infektionskontrolle (Komplementaktivierung) durch das Immunsystem vorteilhaft. So konnten *Widhe et al. (1998)* bei LD-Patienten als dominierende IgG-Subklassen IgG1 und IgG3 erkennen, die durch Komplementaktivierung und verbesserte Opsonierung zur Heilung beitragen und eine chronische Erkrankung verhindern.

#### 4.2.4 Zusammenhänge zwischen humoraler und T-zellulärer Immunantwort

Beim Vergleich humoraler und zellulärer Parameter bei der Diagnostik einer Borrelioseninfektion ist zu beachten, dass dem jeweiligen Testverfahren nicht die gleichen Antigene zu Grunde liegen. Lediglich OspC wurde bei der zellulären, sowie bei der humoralen Diagnostik im Westernblot verwendet. Anhand der exemplarischen Kasuistiken konnte die Antikörperproduktion (WB) und die TZ-Proliferation durch OspC verglichen werden. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse zeigte sich für die IgM-Ak-Produktion in 60% (35/58) für die IgG-Ak-Produktion in 48% (28/59) der Untersuchungen, wobei die IgM-Ak-Produktion im ersten (77%) und die IgG-Ak-Produktion im zweiten Verlaufszeitraum (57%) am besten mit der TZ-Proliferation übereinstimmte. Während der IgM-Nachweis mit der IFN- $\gamma$ -Produktion am besten im vierten Verlaufszeitraum (78%) übereinstimmte, zeigte sich für die IL-4-Produktion nur eine geringe Übereinstimmung in 20-45% der Fälle. Der IgG-Nachweis stimmte am besten mit der IFN- $\gamma$ -Produktion im dritten (67%) mit der IL-4-Produktion im ersten Verlaufszeitraum (57%) überein. Die TZ-Proliferation scheint, ähnlich dem IgM-Nachweis ein Frühmarker bei Infektion zu sein. Für das *in vivo* sezernierte Protein pG wurde eine IgG-Bestimmung im Westernblot durchgeführt, sodass ein Vergleich zwischen IgG-Antikörperproduktion und zellulärer Immunreaktion möglich war. Die Ergebnisse des IgG-Nachweises stimmten mit der TZ-

Proliferation in 60%, der IFN- $\gamma$ -Produktion in 68% (SI) bzw. 61% ( $\Delta$ ) und der IL-4-Produktion in 69% (SI) bzw. 74% ( $\Delta$ ) der Fälle überein. Dies zeigt, dass zwischen IgG-Produktion und IL-4 Sekretion durch pG der engste Zusammenhang besteht.

Wie bereits von *Vaz et al. (2001)* beschrieben ergab sich kein Zusammenhang zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort auf *B. burgdorferi* beim Ergebnisvergleich Proliferationsassay/Elispot und ELISA (Absolutwerte).

#### 4.2.5 Zelluläre Immunantwort bei chronischer Erkrankung und Begleitsymptomen

Patienten, die trotz suffizienter antibiotischer Therapie unter persistierenden Beschwerden litten, wurden gesondert analysiert. Dabei zeigte sich interessanterweise ein negativer Zusammenhang zwischen der TZ-Proliferation durch ZSA36 und Beschwerdepersistenz, d.h. eine chronische Erkrankung geht mit einer mangelnden zellulären Reaktion durch das Antigen ZSA36 einher. So zeigten 15 von 17 (88%) Patienten mit persistierenden Beschwerden ein negatives Testergebnis im Proliferationsassay. Es zeigten jedoch auch 59 von 81 beschwerdefreien Patienten (73%) eine negative zu wertende TZ-Proliferation. Für das Antigen p83 hingegen zeigte sich eine höhere TZ-Proliferation bei Beschwerdepersistenz, d.h. TZ-Proliferation durch p83 könnte einen Marker für chronische Erkrankung darstellen. Alle Patienten (5/5 100%) mit Beschwerden zum untersuchten Zeitpunkt reagierten auf p83 mit einer positiven Proliferation. Allerdings ist anzumerken, dass auch TZ gesunder Kontrollpersonen (10/15 67%) durch p83 proliferierten und es sich hier um eine unspezifische Reaktion handeln könnte.

Ein genereller Zusammenhang zwischen dem Zytokinmuster, TH1 oder TH2, und Beschwerdepersistenz konnte nicht gefunden werden. Bei Patienten, die zusätzlich zur pathognomonischen Symptomatik einer *B. burgdorferi*-Infektion unter Arthralgien litten, konnte eine unzureichende IFN- $\gamma$ -Produktion durch das Antigen ZSA36 nachgewiesen werden. So zeigten 14 dieser 16 Patienten (87%) keine IFN- $\gamma$ -Sekretion. Allerdings zeigten auch 44 von 63 beschwerdefreien Patienten (70%) eine negative IFN- $\gamma$ -Sekretion. Möglicherweise wird ZSA36 bei Patienten mit Arthralgie und/oder Beschwerdepersistenz in unzureichendem Maße als Oberflächenprotein exprimiert, um eine evtl. protektive spezifische TZ-Reaktion hervorzurufen. Vielleicht erzeugen nur bestimmte Borrelienstämme, die ZSA36 nicht als Oberflächenmarker präsentieren eine Arthralgie und/oder Beschwerdepersistenz. Bei Patienten mit Allgemeinsymptomen konnte eine positive IL-4-Sekretion durch pG in 11 von 27 Fällen (41%) im Vergleich zu 12 von 94 beschwerdefreien Patienten (13%), und auf OspC in 6 von 24 Fällen (25%) im Vergleich

zu 15 von 93 beschwerdefreien Patienten (16%), beobachtet werden. Dies zeigt, dass die spezifische IL-4-Sekretion nicht vor einer Bakteriämie bzw. Dissemination schützt. Patienten mit neurologische Symptomen hingegen zeigten bei der zellulären Reaktion durch OspC in 11 von 12 Fällen (92%) einen IL-4-Mangel, im Vergleich zu 79 von 118 beschwerdefreien Patienten (67%). Dies könnte Hinweis auf mangelnden Schutz vor Gewebedestruktion durch eine TH1-/TH2-Ungleichgewicht sein.

Häufig traten Zusatzsymptome kombiniert auf (73-84%) und zeigten einen Zusammenhang zur Beschwerdepersistenz (76-80%), wobei Arthralgien am häufigsten mit einer Beschwerdepersistenz einhergingen (58%).

#### 4.2.6 Interpretation der exemplarischen Kasuistiken

##### 4.2.6.1 Frühinfektionen: Erythema migrans und Erythema chronicum migrans

Anhand der Auswertung des Zusammenhanges Begleitsymptome und T-zellulärer Reaktion konnte eine signifikante Korrelation zwischen Arthralgie/Myalgie und einer mangelnden IFN- $\gamma$ -Produktion durch das Antigen ZSA36 nachgewiesen werden. Bei Patient 1 (EM), der unter einer Beschwerdepersistenz im Krankheitsverlauf leidet, ist zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung eine ausreichende Menge an IFN- $\gamma$  oder eine positive TZ-Proliferation, stimuliert durch ZSA36, zu erkennen. Die, von *Kang et al. (1997)* beobachtete, IL-4-Produktion, die 14 Tage nach Infektionsbeginn bei den resistenten BALB/c-Mäusen zu detektieren ist, erscheint bei Patient 1 nicht, begleitet von persistierenden Beschwerden. *Zeidner (1996)* beschreibt, dass TH1-Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ ) vor Infektion mit *B. burgdorferi* schützen. Bei Patient 2 (EM) könnte demzufolge die primär fehlende IFN- $\gamma$ -Produktion die Möglichkeit einer Infektionsetablierung getriggert haben. Die IFN- $\gamma$ -Produktion nach Therapie ist möglicherweise durch ansteigende Antigenkonzentration, hervorgerufen durch die antibiotische Therapie, zu erklären. *Kang et al. (1997)* erkannten bei empfindlichen C3H/He-Mäusen ansteigende IFN- $\gamma$ -Level im Verlauf der Infektion, vergesellschaftet mit persistierender Arthritis. Auch bestätigten *Keane-Myers und Nickell (1995a)*, dass bei zunehmender Resistenz empfindlicher C3H-Mäuse die IFN- $\gamma$ -Produktion abnimmt. Das bei Patient 2 gegenläufige Zytokinprofil weist möglicherweise auf einen „infektionsempfindlichen“ Wirtsorganismus hin. Der Schutzfaktor IL-4, der die Entzündungsaktivität zu senken vermag (*van Roon et al., 1995, Miosec et al., 1992, Cocoran et al., 1992*), ist bei Auftreten der Arthralgie nicht mehr nachweisbar. Patient 3 (EM) zeigte eine IgG-Serokonversion, aber keine

ausreichenden spezifischen IgM- oder IgG-Titer zur humoralen Bekämpfung der Borrelieninfektion. Erst die antibiotische Therapie scheint eine suffiziente Auseinandersetzung mit dem Erreger zu triggern, die sich in der T-zellulären Immunreaktion zeigte. Die primär vor Therapie mangelnde TZ-Proliferation, u.a. durch ZSA36 geht auch bei Patient 3 mit Allgemeinsymptomen und Arthralgie einher. Erst die gesteigerte TZ-Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion, durch ZSA36, ca. 1 Monat nach Therapieende ermöglicht eine Verbesserung der Krankheitssymptome.

Bei Patient 4 (ECM), der eine bereits längere Zeit (ca. 2 Monate) bestehende *B. burgdorferi*-Infektion hat, reicht die IL-4-Produktion zu Beginn der Erkrankung nach Therapie allein nicht aus, um die bestehenden Symptome zu bessern. Trotz Therapie lege artis bleiben die Symptome bestehen. Allerdings tritt zum Zeitpunkt der IL-4-Sekretion keine Arthralgie auf. Dies entspricht den Beobachtungen verschiedener Autoren, dass IL-4 in der Lage ist die entzündliche Aktivität einer Arthritis zu dämpfen (*Miosec et al., 1992, Cocoran et al., 1992, van Roon et al., 1995*). Die extrem hohe IFN- $\gamma$ -Produktion durch pG bei Auftreten der Arthralgie könnten Hinweis auf einen Eliminationsversuch im Sinne einer lokalen Begrenzung der Infektion sein. Allerdings könnte es sich hier auch um eine überschießende Immunreaktion handeln durch proinflammatorische Zytokine induziert, die sich klinisch als Arthralgie manifestiert hat. Zudem schreiben *Anguita et al. (2001)* IFN- $\gamma$  die Rolle als Induktor variabler Antigenexpression zu, das eine persistierende Infektion ermöglichen würde. Die gemischte TH1-/TH2-Zellantwort führt bei Patient 5 (ECM) zur erfolgreichen Krankheitsbewältigung. Zudem zeigt sich hier der Nutzen weiterer diagnostischer Marker bei seronegativen Personen, da durch die TZ-Marker eine eindeutige ätiologische Zuordnung ermöglicht wurde. Auch hier scheint die antibiotische Therapie durch Antigenfreisetzung eine erneute Auseinandersetzung (Anstieg der TZ-Reaktion) mit dem Erreger und so eine Krankheitsbewältigung zu ermöglichen.

#### 4.2.6.2 Spätinfektionen

##### 4.2.6.2.1 Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)

Das späte Erscheinen der T-zellulären Immunantwort im Krankheitsverlauf, 5 Monate nach Therapie, bei Patient 6 könnte Hinweis auf eine erstmalige oder erneute Auseinandersetzung mit dem Erreger *B. burgdorferi* sein. Zu diesem Zeitpunkt überwiegt die IL-4-Sekretion im Vergleich zur IFN- $\gamma$ -Ausschüttung, wodurch die Entzündungsaktivität, induziert durch proinflammatorische Zytokine, gedämpft wird. Eine

Ausnahme stellt das Antigen ZSA36 dar, das jetzt eine immens hohe IFN- $\gamma$ -Produktion hervorruft. Da nach unseren Untersuchungen eine mangelnde IFN- $\gamma$ -Sekretion durch ZSA36 mit Arthralgie einhergeht, könnte hier die hohe IFN- $\gamma$ -Produktion einen Schutzfaktor vor postinfektiösen Beschwerden, die klinisch häufig als Arthralgie/Myalgie in Erscheinung tritt, darstellen. Die gemischte TH1-/TH2-Antwort ermöglicht in beiden ACA-Fallbeispielen (Patient 6 und 7) die erfolgreiche Krankheitsbewältigung, verdeutlicht durch rückläufige Ak-Titer und klinische Besserung. Nach erfolgreicher Therapie erzeugt bei Patient 7 lediglich das für Hauterkrankungen typische Antigen DbpA noch eine Zytokinsekretion.

#### 4.2.6.2.2 Lyme-Arthritis

Anhand Patient 8 ist ersichtlich, dass zur erfolgreichen Krankheitsbewältigung auch eine TH2-Antwort von Nöten ist, um der proinflammatorischen gewebedestruierenden TH1-Antwort entgegenzusteuern. Dies geht konform mit der Feststellung von *Kang et al. (1997)*, dass erst mit dem Einsetzen der IL-4-Produktion eine Besserung der klinischen Symptomatik (Arthritis) einhergeht. Auch entspricht dies den Untersuchungsergebnissen von *Keane-Myers et al. (1996)*, die nach Behandlung mit rekombinantem IL-4 eine klinische Besserung der Arthritis bei empfindlichen C3H-Mäusen erkennen konnten.

#### 4.2.6.2.3 Chronisches Erschöpfungssyndrom (CFS)

Viele Autoren schrieben in der Pathogenese der Borrelieninfektion, meist am Beispiel der Lyme-Arthritis, IL-4 eine protektive Wirkung zu (*Mioseca et al., 1992, Cocoran et al., 1992, Rao et al., 1995, van Roon et al., 1995, Keane-Myers et al. 1996*). Dies kann bei Patient 9 mit einer chronischen disseminierten Borrelieninfektion nicht bestätigt werden. Sämtliche Borrelienantigene, präsentiert durch dendritische Zellen, lösen eine TH2-Antwort aus, ersichtlich an der hohen IL-4-Sekretion. Dennoch bestehen chronische Beschwerden nach behandelter Lyme-Borreliose. Demzufolge wäre es denkbar, dass eine konstante IFN- $\gamma$ -Produktion im Verlauf der Erkrankung notwendig ist, um die Infektion lokal begrenzt zu halten und die Erregeranzahl zu dezimieren. So erkannten *Kang et al. (1997)*, dass resistente BALB/c-Mäuse zu Beginn einer Borrelieninfektion hohe Level an IFN- $\gamma$  produzierten und erst nach 14 Tagen mit einer IL-4-Produktion aufwiesen, während die IFN- $\gamma$ -Produktion im Verlauf quantitativ unverändert blieb.

## 5 Zusammenfassung

Bei den manigfaltigen Erscheinungsformen der Lyme-Borreliose ist klinisch nicht immer eine eindeutige ätiologische Zuordnung möglich, sodass verschiedene diagnostische Marker zu Rate gezogen werden müssen, wobei die bisherige Routinediagnostik aus verschiedenen serologischen Nachweisverfahren besteht. Verschiedene Autoren berichteten von einer frühzeitigen T-Lymphozyten-Proliferation bei *B. burgdorferi*-Infektion, die häufig auch bei noch seronegativen Patienten im Frühstadium nachweisbar war (Buecher et al., 1995, Dattwyler et al., 1988a, Yoshinari et al., 1991). Die Möglichkeit der Früherkennung durch T-Zell-Diagnostik konnte in der vorgelegten Studie an Einzelfällen bestätigt werden, da häufig vor IgM-Nachweis eine positive TZ-Proliferation gemessen wurde. In früheren Studien erwies sich die Verwendung von intakten Borrelien oder Borrelienlysaten als unspezifisch, da sowohl gesunde Kontrollindividuen als auch Patienten mit Lyme-Borreliose eine Proliferation zeigten (Roessner et al., 1994, Zoschke et al., 1991). Deshalb wurden in dieser Arbeit nur rekombinante Borrelienantigene (pG, OspC, p83, DbpA, ZSA36) verwendet, ausgewählt anhand bestimmter Kriterien wie Immunogenität, *in vivo*-Expression, protektives Potential (Vakzinekandidaten). In einer aufwändigen Versuchsanordnung wurden periphere Blutmonozyten mit Hilfe von GM-CSF und IL-4 in 7-tägiger Kultur zu dendritischen Zellen gezüchtet, die rekombinante Borrelienantigene autologen T-Zellen präsentierten. Eine spezifische, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte TZ-Proliferation konnte bei dem gesamten Patientenkollektiv nur durch das Antigen OspC nach Therapie (79%), für Spätinfektionen durch das Antigen DbpA allerdings vor Therapie (83%), ermittelt werden. Die Untersuchungen des Zytokinmusters bei *B. burgdorferi*-Infektion zeigten durch Stimulierung mit den *in vivo*-exprimierten Proteinen pG (47%) und ZSA36 (43%) bei Patienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv vor Therapie eine signifikant höhere, aber generell geringe IL-4-Produktion. Durch pG wurde zusätzlich nach Therapie eine signifikant höhere IFN- $\gamma$ -Produktion (76%) als im Kontrollkollektiv induziert. Bei der Betrachtung einzelner Fallbeispiele wurde die individuell sehr unterschiedliche Immunreaktion im Krankheitsverlauf durch eine *B. burgdorferi*-Infektion deutlich. Im Krankheitsverlauf stieg die TZ-Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion direkt nach Therapie im Median an und fiel 40 bis 90d nach Therapie wieder ab. Die Erhöhung der TZ-Reaktion nach antibiotischer Therapie deutet auf eine erneute Auseinandersetzung mit *B. burgdorferi* hin, getriggert durch die Antigenfreisetzung. Eine Übereinstimmung zwischen Antikörperspektrum im Westernblot und zellulärer Diagnostik

im TZ-Proliferationsassay zeigte sich für das Antigen pG in 60% (IgG), für das Antigen OspC in 48% (IgG) bzw. 60% (IgM) der Fälle.

Erstmals wurde in dieser Studie der Versuch unternommen, den Verlauf der zellulären Immunreaktion bei Patienten mit Lyme-Borreliose nach Therapie im weiteren Krankheitsverlauf darzustellen. Trotz der differenzierten Versuchsanordnung im autologen DZ-stimulierten TZ-Proliferationsassay mit rekombinanten Borrelienproteinen konnte im Vergleich zum klassischen Lymphozytentransformationstest mit Borrelienlysaten keine wesentlich bessere Spezifität und/oder Sensitivität erreicht werden. Die Arbeit zeigt, dass die differenzierte Methode zur Untersuchung der TZ-Reaktion geeignet ist, aber keinen diagnostischen Vorteil bringt, da kein Hinweis auf eine isolierte TZ-Reaktion besteht und alle Patienten im Krankheitsverlauf serologisch diagnostizierbar waren. Zudem zeigte sich kein Zusammenhang zwischen einer typischen TZ-Reaktivität und dem Krankheitsverlauf, insbesondere bei Beschwerdepersistenz nach Therapie.

**6 Literaturverzeichnis**

- **Aberer, E., Brunner, C., Suchanek, G., Klade, H. Barbour, A., Stanek, G., Lassmann, H., 1989**  
Molecular Mimicry and Lyme Borreliosis: A Shared Antigenic Determinant Between *Borrelia burgdorferi* and Human Tissue  
Ann. Neurol. 26: 732-737
- **Afzelius, A., 1910**  
Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm  
Arch. Derm.Syph. 101:404
- **Aiba, S., 1998**  
Maturation of Dendritic Cells Induced by Cytokines and Haptens  
Tohoku J. Exp. Med. 184: 159-172
- **Aliprantis, A.O., Yang, R.-B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., Zychlinsky, A., 1999**  
Cell Activation and Apoptosis by Bacterial Lipoproteins Through Toll-like Receptor-2  
Science 285: 736-739
- **Altenschmidt, U., Ricciardi-Casagnoli, P., Modolell, M. Otto, H., Wiemüller, K.-H., Jung, G., Simon, M.M., 1996**  
Bone marrow-derived macrophage lines and immortalized cloned macrophage and dendritic cells support priming of *Borrelia burgdorferi* - specific T cell responses in vitro and/or in vivo  
Immunol. Lett. 50 (1-2): 41-49
- **Anderson, J.F., 1988**  
Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*  
Ann. NY Acad. Sci. 539:180-191
- **Anderson, J.F., 1991**  
Epizootiology of Lyme borreliosis  
Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 77: 23-24
- **Anderson, J.F., Johnson, R.C., Magnarelli, L.A., Hyde, F.W., 1986**  
Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*  
Infect. Immun. 51: 394-396
- **Anguita, J., Persing, D.H., Rincon, M., Barthold, S.W., Fikrig, E., 1996**  
Effect of anti-interleukin 12 treatment on murine Lyme borreliosis  
J. Clin. Invest. 97 (4): 1028-1034
- **Anguita, J., Thomas, V., Samanta S., Persinski, R., Hernanz, C., Barthold, S.W., Fikrig, E., 2001**  
*Borrelia burgdorferi*-induced inflammation facilitates spirochetes adaptation and variable major protein-like sequence locus recombination  
J. Immunol. 167 (6): 3383-3390
- **Anton, D., Dabadghao, S., Palucka, K., Holm, G., Yi, Q., 1998**  
Generation of Dendritic Cells from Peripheral Blood Adherent Cells in Medium with Human Serum  
Scand. J. Immunol. 47: 116-121
- **Asbrink, E., 1985a**  
Erythema Chronicum Migrans Afzelius and Acrodermatitis Chronica Atrophicans.  
Early and late manifestations of Ixodes ricinus-borne *Borrelia* spirochetes  
Acta Derm. Venerol. Suppl. (Stockholm) 118: 2-63
- **Asbrink, E., Hovmark, A., 1985b**  
Successful cultivation of spirochetes from skin lesions of patients with erythema chronicum migrans

- afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans  
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 93: 161-163
- **Asbrink, E., Hovmark, A., 1988**  
Early and late cutaneous manifestation in Ixodes-borne borreliosis  
Ann. NY Acad. Sci. 539: 4-15
  - **Asch, E.S., Bujak, D.I., Weiss, M., Peterson, M.G.E., Weinstein, A., 1994**  
Lyme disease: an infectious and post infectious syndrome  
J. Rheumatol. 21: 454-456
  - **Balmelli, T., Piffaretti, J.C., 1995**  
Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*  
Res. Microbiol. 146: 329-340
  - **Bannwarth, A., 1941**  
Chronische lymphozytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und „Rheumatismus“  
Ein Beitrag zum Problem „Allergie und Nervensystem“  
Arch. Psychiatr. Nervenkr. 113: 284-376
  - **Baranton, G., Postic, D., Saint Giron, J., 1992**  
Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS 461 associated with Lyme borreliosis  
Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 378-383
  - **Barbour, A. G., Heiland, R. A., Howe, T.R., 1985**  
Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: a molecular analysis of North American and European isolates  
J. Inf Dis. 152: 478-484
  - **Barbour, A., Hayes, S.F., 1986**  
Biology of *Borrelia* species  
Microbiol. Rev. 50: 381-400
  - **Barbour, A.G., 1984**  
Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes  
Yale J. Biol. Med. 57: 521-525
  - **Barbour, A.G., 1987**  
Immunobiology of relapsing fever  
Contr. Microbiol. Immunol. 8: 125-137
  - **Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Peter, O., Aeschlimann, A., 1983**  
Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland  
Curr. Microbiol. 8: 123-126
  - **Barbour, A.G., Stoenner, H.G., 1985**  
Antigenic variation of *Borrelia hermsii*  
UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Ser. 20: 123-125
  - **Barthold, S., Beck, D.S., Hansen, G.M., Terwilliger, G.A., Moody, K.D., 1990**  
Lyme Borreliosis in selected strains and ages of laboratory mice  
J. Infect. Dis. 162: 133-138
  - **Bauer, Y., 1999**  
Untersuchungen zur zellulären Immunantwort bei der *Borrelia burgdorferi*-Infektion  
Disseration Medizinische Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität

- **Bauer, Y., Hofmann, H., Jahraus, O., Mytilineos, J., Simon, M.M., Wallich, R., 2001**  
Prominent T cell response to a selectively in vivo expressed *Borrelia burgdorferi* outer surface protein (pG) in patients with Lyme disease  
*Eur. J. Immunol.* 31 (3): 767-76
- **Bauer, Y.; Jäger, C., Kramer, M.D.; Wallich, R., 1999**  
Phenotype and Function of Antigen-Presenting Dendritic Cells Generated from Peripheral Blood Monocytes  
*Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 26: 115-118
- **Beech, J.T., Bainbridge, T., Thompson, S.J., 1997**  
Incorporation of cells into an ELISA system enhances antigen-driven lymphokine detection  
*J Immun Meth* 205: 163-168
- **Beermann, C., Lochnit, G., Geyer, R., Groscurth, P., Filgueira, L. 2000**  
The Lipid Component of Lipoproteins from *Borrelia burgdorferi*:  
Structural Analysis, Antigenicity, and Presentation via Human Dendritic Cells  
*Biochem Biophys Res Comm* 267: 897-905
- **Benach, J., Bosler, E.M., Hanrahan, J.P., Voleman, J.L., Habicht, G.S., Bast, T.F., Cameron, D.J., Ziegler, J.L., Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Edelman, R., Kaslow, R.A. 1983**  
Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease  
*N. Engl. J. Med.* 308: 740-742
- **Benach, J.L., Fernandez Villar, G., Szczepanski, A., Garcia Monco, J.C., 1991**  
Lyme Borreliosis: Non-specific interactions of the organism with the host  
*Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 77: 130-135
- **Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, M., Bhardwaj, N., 1996**  
Improved methods for generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood  
*J. Immunol. Met.* 196: 121-135
- **Berger, B.W., Johnson, R.C., Kodner, C., Coleman, L., 1992**  
Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from Erythema Migrans Lesions and Perilesional Skin  
*J. Clin. Microbiol.* 30: 359-361
- **Berglund J., Eitren, R., Ornstein, K., Lindberg, A., Ringer, A., Elmrud, H., Carlsson, M., Runehagen, A., Svanborg, C., Norrby, R., 1995**  
An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden  
*N. Engl. J. Med.* 333: 1319-24
- **Bergstresser, P. T.; Kitajima, T., Xu, S.; Ariizumi, K.; Takashima, A., 1997**  
T cell-mediated terminal maturation of dendritic cells  
aus *Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology* edited by Ricciardi-Castagnoli  
Plenum Press, New York 1997, S.65-69
- **Binder, E., Doepfmer, R., Hornstien, O., 1955**  
Experimentelle Übertragung der Erythema chronicum migrans von Mensch zu Mensch  
*Hautarzt* 6: 494-496
- **Bockenstedt, L.K., Hodzic, E., Feng, S., Bourrel, K.W., de Silva, A., Montgomery, R.R., Fikrig, E., Radolf, J.D., Barthold, S.W., 1997**  
*Borrelia burgdorferi* strain-specific Osp C-mediated immunity in mice  
*Infect. Immun.* 65 (11): 4661-4667
- **Breier, F., Klade, H., Stanek, G., Poitschek, C., Kirnbauer, R., Dordas, W., Aberer, E. 1996**  
Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in circumscribed scleroderma  
*British J. Dermatol.* 134: 285-291

- **Bruckbauer, H.R., Preac-Mursic, V., Fuchs, R., Wilske, B., 1992**  
Cross-Reactive Proteins of *Borrelia burgdorferi*  
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11 (3): 224-232
- **Bücheler, S., Höpfl, R., 1997**  
Presentation of tetanus toxoid to autologous T cells by dendritic cells generated from human blood  
Improved Specificity with Dendritic Cells Generated Without Fetal Calf Serum  
aus Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology edited by Ricciardi-Castagnoli  
Plenum Press, New York 1997, S.233-237
- **Büchner, S.A., Flückinger, J.B., Ruffli, T. 1988**  
Infiltrative Lymphadenosis benigna cutis als Borreliose der Haut  
Hautarzt 39: 77-81
- **Buchwald, A. 1883**  
Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut Atrophie  
Arch Dermatol Syph 10: 553-556
- **Buechner, S.A., Lautenschlager, S., Itin, P., Bircher, A., Erb, P. 1995**  
Lymphoproliferative Responses to *Borrelia burgdorferi* in Patients With Erythema Migrans,  
Acrodermatitis Chronica Atrophicans, Lymphadenosis Benigna Cutis, and Morphea  
Arch. Dermatol. 131, 673-677
- **Bujak, D.I., Weinstein, A., Dornbush, R.L., 1996**  
Clinical and neurocognitive features of the post Lyme syndrome  
J. Rheumatol. 23: 1392-1397
- **Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O., Arditi, M., 2001**  
Cooperation of Toll-like Receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and  
*Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1  
receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling  
J. Immunol. 167: 987-994
- **Bundoc, V.g., Barbour, A.G., 1989**  
Clonal polymorphisms of outer membrane protein OspB of *Borrelia burgdorferi*  
Infect. Immun. 51 (1989): 2733-2741
- **Burgdorfer, W., Anderson, J.F., Gern, L., Lane, R.S., Piesman, J., Spielman, A., 1991**  
Relationship of *Borrelia burgdorferi* to its arthropod vectors  
Scan. J. Infect. Dis. Suppl 77: 35-40
- **Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grunwaldt, E., Davis, J.P. 1982**  
Lyme disease - A tick-borne spirochetosis?  
Science 216: 1317-1319
- **Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Benach, J.L. 1988**  
Development of *Borrelia burgdorferi* in Ixodid tick vectors  
Ann NY Acad Sci 539: 172-179
- **Burgdorfer, W., Hyes, S.F., Corwin, D., 1989**  
Pathophysiology of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* in Ixodes ticks  
Rev. Infect. Dis. 11, Suppl. 6: 1442-1450
- **Burgdorfer, W., Lane, R.S., Barbour, A.G., Gresbrink, R.A., Anderson, J.F., 1985**  
The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi*  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 34: 925-930
- **Busch, D.H., Jassoy, C., Brinckmann, U., Girschick, H., Huppertz, H., 1996**  
Detection of *Borrelia burgdorferi*-specific CD8+ cytotoxic T cells in patients with Lyme arthritis  
J. Immunol. 157: 3534-3541

- **Callebaut, I., Vonecke, V., Mager, A., Fumiere, O., Krchnak, V., Merza, M., Zavada, J., Mammerickx, M., Burny, A., Protetelle, D., 1993**  
Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51  
*J. Virol.* 67: 5321
- **Carreiro, M. Laux, D.C., Nelson, D.R., 1990**  
Characterization of the heat shock response and identification of heat shock protein antigens of *Borrelia burgdorferi*  
*Infect. Immun.* 58: 2186-2191
- **Carroll, J., Gherardini, F.C., 1996**  
Membrane protein variations associated with in vitro passage of *Borrelia burgdorferi*  
*Infect. Immun.* 64: 392-398
- **Carroll, J.A., Garon, C.F., Schwan, T.G., 1999**  
Effects of Environmental pH on Membrane Proteins in *Borrelia burgdorferi*  
*Infect. Immun.* 67 (7): 3181-3187
- **Carter, C., Bergstrom, S., Norris, S.J., Barbour, A.G., 1994**  
A family of surface-exposed proteins of 20 kilodaltons in the genus *Borrelia*  
*Infect. Immun.* 62: 2792-2799
- **Cassatt, D.R., Patel, N.K., Ulbrandt, N.D., Hanson, M.S., 1998**  
DbpA, but not OspA, is expressed by *Borrelia burgdorferi* during spirochetemia and is a target for protective antibodies  
*Infect. Immun.* 66 (11): 5379-5387
- **Cella, M., Sallusto, F.; Lanzavecchia, A. 1997**  
Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells  
*Innate Immunity / Current Opinion in Immunology*: 9:10-16
- **Centers of Disease Control, 1995**  
Recommendations for test performance and interpretation from the second national conference on serologic diagnosis of Lyme disease  
*JAMA* 274: 937
- **Chapuis, F., Rosenzweig, M., Yagello, M., Ekman, M., Biberfeld, P., Gluckman, J.C., 1997**  
Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro  
*Eur. J. Immunol.* 27: 431-441
- **Chen, B.-G., Shi, Y., Smith, J.D., Choi, D., Geiger, J.D., Mulè, J.J. 1998**  
The Role of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in Modulation the Quantity of Peripheral Blood-derived, Cytokine-Driven Human Dendritic Cells and Its Role in Enhancing the Quality of Dendritic Cell Function in Presenting Soluble Antigens to CD4<sup>+</sup> T Cells in Vitro  
*Blood*, Vol. 91, No. 12: 4652-4661
- **Chiao, J.W., Pavia, Ch., Riley, M., Altmann-Lasekan, W., Abolhassani, M., Liegner, K., Mittelman, A., 1994**  
Antigens of Lyme disease of spirochete *Borrelia burgdorferi* inhibits antigen of mitogen-induced lymphocyte proliferation  
*FEMS Immunology and Medical Microbiology* 8; 151-156
- **Cinco, M., Rusciaio, M., Rapagna, F., 2000**  
Evidence of Dbps (decorin binding proteins) among European strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and in the immune response of LB patient sera  
*FEMS Microbiol. Lett.* 183 (1): 111-114
- **Cluss, R., Goel, A.S., Rehm, H.L., Schoemecker, J.G., Boothby, J.T., 1996**  
Coordinate synthesis and turnover of heat shock proteins in *Borrelia burgdorferi*: Degradation of

- DnaK during recovery from heat shock  
Infect. Immun. 64: 1736-1743
- **Cluss, R.G., Boothby J.D. 1990**  
Thermoregulation of protein synthesis in *Borrelia burgdorferi*  
Infect. Immun. Vol. 58, No. 4:1038-1042
  - **Coburn, J., Barthold, S.W., Leong, J.M., 1994**  
Diverse Lyme disease spirochetes bind integrin alpha (IIb) beta (3) on human platelets  
Infect. Immun. 62: 5559-5567
  - **Coburn, J., Magoun L., Bodary, S.C., Leong, J.M., 1998**  
Integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  Mediate Attachment of Lyme Disease Spirochetes to human Cells  
Infect. Immun. 66 (5): 1946-1952
  - **Cocoran; M.L., Stetler-Stevenson, W.G., Brown, P.D., Wahl, L.M., 1992**  
Interleukin-4 inhibition of prostaglandin E2 synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kD type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes  
J. Biol. Chem. 267:515
  - **Coleman, J., Sellati, T.J., Testa, J.E., Kew, R.R., Furie, M.B., Benach, J.L., 1995**  
*Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers  
Infect. Immun. 63: 2478-2484
  - **Coleman, J.L., Benach, J.L., 1987**  
Isolation of antigenetic components from the Lyme disease spirochete: Their role in early diagnosis  
J. Infect. Dis. 155: 756-765
  - **Comstock, L., Fikrig, E., Shoenberg, R.J., Flavell, R.A., Thomas. D.D., 1993**  
A monoclonal antibody to OspA inhibits association of *Borrelia burgdorferi* with human endothelial cells  
Infect. Immun. 61: 423-431
  - **Craft, J.E., Fischer, D.K., Shimamoto, G.T., Steere, A.C. 1986**  
Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new IgM response and expansion of the Ig response late in the illness  
Clin. Invest. 78: 934-939
  - **Craft, J.E., Grodzicki, K.L., Steere, A.C. 1984**  
Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests  
Inf. Dis. 149: 789-795
  - **Czerkinsky, C., Andersson, G., Ekre H.-P., Nilsson, L.-A., Klareskog, L. Ouchterlony, Ö., 1988**  
Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production  
Enumeration of gamma-interferon-secreting cells  
J Immun Meth 110:29-36
  - **Dattwyler, R.J., Thomas J.A., Benach, J.L., Golightly, M.G. 1986**  
Cellular immunoresponse in Lyme disease  
Zbl. Bakt. Hyg. A263: 151-159
  - **Dattwyler, R.J., Volkman, D.J., Halperin, J.J., Luft, B.J., Thomas, J., Golightly, M.G. 1988b**  
Specific Immune Responses in Lyme Borreliosis  
Characterization of T Cell and B Cell Responses to *Borrelia burgdorferi*  
Ann. NY Acad. Sci. 539: 93-102
  - **Dattwyler, R.J., Volkman, D.J., Luft, B.J., Halperin, M.D., Thomas, J., Golightly, M.G., 1988a**  
Seronegative Lyme disease  
New Engl. J. Med. 319: 1441-1446

- **de Saint-Vis, B., Fugier-Vivier, I., Massacrier, C., Gaillard, C., Vanbervliet, B., Ait-Yahia, S., Banchereau, Liu, Y.-J., Lebecque, S., Caux, C., 1998**  
The Cytokine Profile Expressed by Human Dendritic Cells Is Dependent on Cell Subtype and Mode of Activation  
*J. Immunol.* 160: 1666-1676
- **De Silva, A., Telford III, S.R., Brunet, L.R., Barthold, S.W., Fikrig, E., 1996**  
*Borrelia burgdorferi* OspA is an anthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine  
*J. Exp. Med.* 183: 271-275
- **Defosse, D.L., Johnson, R.C., 1992**  
In vitro and in vivo induction of tumor necrosis factor alpha by *Borrelia burgdorferi*  
*Infect Immun* 60 (3): 1109-1113
- **Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Romagnani, S., 1993**  
Human IL-10 is Produced by Both Type 1 Helper (Th1) and Type 2 Helper (Th2) T Cell Clones and Inhibits Their Antigen-Specific Proliferation and Cytokine Production  
*J. Immunol.* 150 (2): 353-360
- **Demotz, S., Grey, H.M., Sette, A., 1990**  
The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation  
*Science (Wash. D.C.)* 249: 1028
- **DiMolfetto, L., Neal, H.A., Wu, A., Reilly, C., Lo, D., 1998**  
The Density of the Class II MHC T Cell Receptor Ligand Influences IFN- $\gamma$ /IL-4 Ratios in Immune Responses in Vivo  
*Cell. Immun.* 183: 70-79
- **Ditton, H.J., Neuss, M., Zoller, L., 1992**  
Evidence that *Borrelia burgdorferi* immunodominant proteins p100, p94, p83 are identical  
*FEMS Microbiol. Lett.* 73 (3): 217-220
- **Doyle, M.K., Telford III, S.R., Criscione, L., Lin, S.R., Spielman, A., Gravallese, E.M., 1998**  
Cytokines in Murine Lyme Carditis: Th1 Cytokine Expression Follows Expression of Proinflammatory Cytokines in a Susceptible Mouse Strain  
*J. Inf. Dis.* 177: 242-246
- **Dressler, F., Yoshinari, N.H., Steere, A.C., 1991**  
The T-Cell Proliferative Assay in Diagnosis of Lyme Disease  
*Ann. Intern. Med.* 115: 533-539
- **Duray, P., 1992**  
Target organs of *Borrelia burgdorferi* infections: functional responses and histology  
See Ref. 289: 11-30
- **Duray, P.H., 1989**  
Clinical Pathologic Correlations of Lyme Disease  
*Rev. Infect. Dis.* 11, Suppl. 6: S1487-S1493
- **Ekerfelt, D., Forsberg, P., Syenik, M., Roberg, M., Bergstrom, S., Ernerudh, J., 1999**  
Asymptomatic *Borrelia*-seropositive individuals display the same incidence of *Borrelia*-specific interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )-secreting cells in blood as patients with clinical *Borrelia* infection  
*Clin. Exp. Immunol.* 115 (3): 498-502
- **Fahrer, H., van der Linden, S.M., Sauvain, M.J., Gern, L., Zhioua, E., Aeschlimann, A., 1991**  
The Prevalence and Incidence of Clinical and Asymptomatic Lyme Borreliosis in a Population at Risk  
*J. Infect. Dis.* 163: 305-310

- **Feng, S., Hodzic, E., Stevenson, B., Barthold, S.W., 1998**  
Humoral immunity to *Borrelia burgdorferi* N40 decorin binding proteins during infection of laboratory mice  
Infect. Immun. 66 (86): 2827-2835
- **Fikrig, E., Barthold, S.W., Chen, M., Cang, Ch.-H., Flavell, R.A., 1997a**  
Protective Antibodies Develop, and Murine Lyme Arthritis Regresses, in the Absence of MHC Class II and CD4<sup>+</sup> T Cells  
J. Immunol. 159: 5682-5686
- **Fikrig, E., Barthold, S.W., Sun, W., Feng, W., Telford III, S.R., Flavell, R.A., 1997b**  
*Borrelia burgdorferi* p35 and p37 proteins, expressed in vivo, elicit protective immunity  
Immunity 6: 531-539
- **Fikrig, E., Bockenstedt, L.K., Barthold, S.W., Chan, M., Tao, H., Ali-Salaam, P., Telford III, S.R., Flavell, R.A., 1994**  
Sera from patients with chronic Lyme disease protect mice from Lyme Borreliosis  
J. Infect. Dis. 169: 568-574
- **Fikrig, E., Liu, B., Fu, L.L., Das, S., Smallwood, J.I., Flavell, R.A., Persing, D.H., Schoen, R.T., Barthold, S.W., Malawista, S.E., 1995**  
An ospA frame-shift, identified from DNA in Lyme arthritis synovial fluid, results in an outer surface protein A that does not bind protective antibodies  
J. Immunol. 155: 5700-5704
- **Filgueira, L., Nestle, F.O., Rittig, M., Joller, H.I., Groscurth, P. 1996**  
Human Dendritic Cells Phagocytose and Process *Borrelia burgdorferi*  
J Immunol 157 (7): 2998-3005
- **Fingerle, V., Bergmeister, H., Liegl, G., Vanek, E., Wilske, B., 1994**  
Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* in Southern Germany  
J. Spiroch. Tick Dis. 1: 41-45
- **Fingerle, V., Hauser, U., Liegl, G., Petko, B., Preac-Mursic, V., Wilske, B., 1995**  
Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*  
J. Clin. Microbiol. 33: 1867-1868
- **Fitzgerald, T.J., Tomai, M.A., Trachte, G.J., Rice, T., 1991**  
Prostaglandins in experimental syphilis: treponemes stimulate adherent spleen cells to secrete prostaglandin E<sub>2</sub>, and Indomethacin upregulates immune function  
Infect. Immun. 59: 143-149
- **Forsberg, P., Ernerudh, J., Ekerfelt, C., Roberg, M., Vrethem, M., Berström, S., 1995**  
The outer surface proteins of Lyme disease borrelia spirochetes stimulate T cells to secrete Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ): diagnostic and pathogenic implications  
Clin Exp Immunol 101: 453-460
- **Friberg, S., Bryant, J., Shannon, W., Whiteside, T.L., 1994**  
In Vitro Cytokine Production by Normal Human Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Measure of Immunocompetence or the State of Activation  
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1 (3): 261-268
- **Fuchs, H., Wallich, R., Siman, M.M., Kramer, M.D., 1994**  
The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12594-12598
- **Fuchs, R., Jauris, S., Lottspeich, F., Preac-Mursic, V., Wilske, B., Soutschek, E., 1992**  
Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22 kD protein (pC) in *Escherichia coli*  
Mol. Microbiol. 6: 503-509

- **Garcia-Monco, J., Fernandez-Villar, B., Benach, J.L., 1989**  
Adherence of the Lyme disease spirochete to glial cells and cells of glial origin  
J. Infect. Dis. 160: 497-506
- **Garcia-Monco, J., Fernandez-Villar, B., Rogers, R.C., Szczepanski, A., Wheeler, C.M., Benach, J.L., 1992**  
Borrelia burgdorferi and other related spirochetes bind to galactocerebroside  
Neurology 42: 1341-1348
- **Garin, C., Bujadoux, Ch., 1922**  
Paralysie per les tiques  
J.Méd. Lyon 71: 765-776
- **Gassmann, G.S., Jacobs, E., Deutzmann, R., Gobe. U.B., 1991**  
Analysis of the fla gene of *Borrelia burgdorferi* GeHo and antigenic characterization of its gene product  
J. Bacteriol. 173: 1452-1459
- **Gassmann, G.S., Kramer, M., Gobel, U.B., Wallich, R., 1989**  
Nucleotide sequence of a gene encoding the *Borrelia burgdorferi* flagellin  
Nucleic Acids Res. 17: 3590
- **Giambrolomei, G.H., Dennis, V.A., Lasater, B.L., Philipp, M.T., 1999**  
Induction of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines by *Borrelia burgdorferi* Lipoproteins in Monocytes Is Mediated by CD14  
Infect. Immun. 67 (1): 140-147
- **Giambartolomei, G.H., Dennis, V.A., Philipp, M.T., 1998**  
Borrelia burgdorferi Stimulates the Production of Interleukin-10 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Uninfected Humans and Rhesus Monkeys  
Infect. Immun. 66 (6): 2691-2697
- **Gilmore Jr., R.D., Piesman, J., 2000**  
Inhibition of Borrelia burgdorferi migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice  
Infect. Immun. 68 (1): 411-414
- **Goodman, J.L., Bradley, J.F., Ross, A.E., Goellner, P., Lagus, A., Vitale, B., Berger, B.W., Luger, S., Johnson, R.C., 1995**  
Bloodstream invasion in early Lyme disease: results from a prospective, controlled, blinded study using the polymerase chain reaction  
Am J med 99: 6-12
- **Goronzy, J.J., Hanson, T.L., Weyand, C.M., 1992**  
Immunoregulatory Effects of Borrelia burgdorferi an T-B Cell Interactions  
J. Rheumatol. 19: 573-578
- **Götz, H., 1954**  
Die Acrodermatitis chronica atrophicus Herxheimer als Infektionskrankheit  
Hautarzt 5: 491-504
- **Grodzicki, R.L., Steere, A.C., 1988**  
Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease  
Inf. Dis. Vol. 157, No. 4:790-797
- **Gross, D.M., Forsthuber, T., Tary-Lehmann, M., Etling, C., Ito, K., Nagy Z.A., Field, J.A., Steere, A.C., Huber, B.T., 1998a**  
Identification of LFA-1 as a Candidate Autoantigen in Treatment-Resistant Lyme Arthritis  
Science, Vol. 281: 703-706

- **Gross, D.M., Steere, A.C., Huber, B.T., 1998b**  
T Helper 1 Response Is Dominant and Localized to the Synovial Fluid in Patients with Lyme Arthritis  
J. Immunol. 160:1022-1028
- **Guner, E., 1994**  
Retention of *B.burgdorferi* pathogenicity and infectivity after multiple passages in a co-culture system  
Experientia 50: 54-59
- **Guner, E., 1996**  
Complement evasion by the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* grown in host-derived tissue co-culture: role of fibronectin in complement resistance  
Experientia 52: 364-372
- **Guo, B., Norris, S.J., Rosenberg, L.C., Hook, M., 1995**  
Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the proteoglycan decorin  
Infect. Immun. 63: 3467-3472
- **Guo, B.P., Brown, E.L., Dorward, D.W., Rosenberg, L.C., Hook, M., 1998**  
Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*  
Mol. Microbiol. 30 (4): 711-723
- **Habicht, G.S., Beck, G., Benach, J.L., Coleman, J.L., 1986**  
*Borrelia burgdorferi* lipopolysaccharide and its role in the pathogenesis of Lyme disease  
Zbl. Bakt. Hyg. A 263: 137-141
- **Habicht, G.S., Katona, L.I., Benach J.L., 1991**  
Cytokines and the Pathogenesis of Neuroborreliosis: *Borrelia burgdorferi* Induces Glioma Cells to Secrete Interleukin-6  
J. Infect. Dis. 164: 568-574
- **Hagman, K.E., Lahdenne, P., Popova, T.G., Porcella, S.F., Akins, D.R., Radolf, J.D., Norgard, M.W., 1998**  
Decorin-binding protein of *Borrelia burgdorferi* is encoded within a two-gene operon and is protective in the murine model of Lyme borreliosis  
Infect. Immun. 66 (6): 2674-2683
- **Halperin, J., Luft, B.J., Volkman, D.J., Dattwyler, R.J., 1990**  
Lyme borreliosis: peripheral nervous system manifestations  
Brain 113: 1207-1211
- **Hansen, K., Bangsborg, J.M., Fjordvang, H., Pedersen, N.S., Hindersson, P., 1988a**  
Immunochemical characterization of an isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60-kilodalton antigen common to a wide range of bacteria  
Infect. Immun. 56 (1988): 2047-2053
- **Hansen, K., Hinderson, P., Pedersen, N.S., 1988b**  
Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum improves serodiagnosis in Lyme disease  
J. Clin. Microbiol. 27: 545-551
- **Hansen, K., Pii, K., Lebech, A.M., 1991**  
Improved immunoglobulin M serodiagnosis in Lyme borreliosis by using a  $\mu$ -capture enzyme-linked immunosorbent assay with biotinylated *Borrelia burgdorferi* flagella  
J. Clin. Microbiol. 29: 166-173
- **Hanson, M.S., Cassatt, D.R., Guo, B.P., Patel, N.K., McCarthy, M.P., dorward, D.W., Hook, M., 1998**  
Active and passive immunity against *Borrelia burgdorferi* decorin binding protein A (DbpA)

- protects against infection  
Infect. Immun. 66 (5): 2143-2153
- **Harding, C.V., Unanue, E.R., 1990**  
Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation  
Nature (Lond.) 346: 574
  - **Hassler, D., Zöller, L., Haude, M., Hufnagel, H.D., Sonntag, H.G., 1992**  
Lyme-Borreliose in einem europäischen Endemiegebiet  
Dtsch. Med. Wschr. 117: 767-774
  - **Hellerström S. 1930**  
Erythema chronicum migrans Afzelii  
Acta Derm Venereol (Stockh) 11: 315-321
  - **Herr, W., Linn, B., Leister, N., Wandel, E., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., Wölfel, T. 1997**  
The use of computer-assisted video image analysis for the quantification of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes producing tumor necrosis factor  $\alpha$  spots in response to peptide antigens  
J. Immun. Meth. 203: 141-152
  - **Herxheimer, K., Hartmann, K., 1902**  
Über Acrodermatitis chronica atrophicans  
Arch. Derm. Syph. 61: 57-76
  - **Heufler, C., Koch, F., Schuler, G., 1988**  
Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells  
J. Exp. Med. 167: 700-712
  - **Hofmann, H., 1991**  
Die Borrelia burgdorferi-Infektion der Haut. Untersuchungen zum Krankheitsspektrum, zur Labordiagnostik und zur Verbreitung der Infektion im Saarland.  
Habilitation, Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes
  - **Hofmann, H., 1992**  
Hauterkrankungen bei Borrelia burgdorferi-Infektion  
Therapiewoche Schweiz 8: 515-522
  - **Hofmann, H., 1996**  
Lyme Borreliosis - Problems of Serological Diagnosis  
Infection 24 (6):470-472
  - **Hosken, N.A., Shibuya K., Heath, A.W., Murphy, K.M., O'Garra, A., 1995**  
The effect of antigen dose on CD4<sup>+</sup> T helper cell phenotype development in a T cell receptor- $\alpha\beta$ -transgenic-mice  
J. Exp. Med. 182: 1579-1584
  - **Hovind-Hougen, K., 1984**  
Ultrastructure of spirochetes isolated from Ixodes ricinus and Ixodes dammini  
Yale J Biol Med 57: 543-548
  - **Howe, T.R., Laquier, F.W., Barbour, A.G., 1986**  
Organisation of genes encoding two outer membrane proteins of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* within a single transcriptional unit  
Infect. Immun. 54: 207-212
  - **Hu, L., Perides, G., Noring, R., Klempner, M.S., 1995**  
Binding of human plasminogen to *Borrelia burgdorferi*  
Infect. Immun. 63: 491-496

- **Hu, L.T., Klempner, M.S., 1997**  
Host-Pathogen Interactions in the Immunopathogenesis of Lyme Disease  
J. Clin. Immunol. 17 (5): 354-361
- **Huppertz, H.-I., Mösbauer, S., Busch, D.H., Karch, H., 1996**  
Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in the diagnosis of Lyme arthritis in children and adolescents  
Eur J Pediatr 155: 297-302
- **Isaacs, R., 1994**  
*Borrelia burgdorferi* bind to epithelial cell proteoglycans  
J. Clin. Invest. 93: 809-819
- **Isogai, E., Kimura, K., Fujii, N., Nishikawa, T., Ishii, N., Postic, D., Baranton, G., Isogai, H., 1996**  
Platelet-activating factor-mediated pathogenesis in Lyme disease  
Infect. Immun. 60: 1026-1029
- **Janeway, C.A., Travers, P., 2001**  
Kapitel 12: Immunreaktionen in Abwesenheit von Infektionen  
in: Immunologie, 3. Auflage  
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 2001
- **Jonuleit, H., Kühn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., Enk, A.H., 1997**  
Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions  
Eur. J. Immunol. 27:3135-3142
- **Kahle, R., 1942**  
Pallida-Reaktionen bei peripheren Durchblutungsstörungen der Haut  
Disseration. Halle
- **Kaldjian, E.J., Chen, G.-H., Cease, K.B., 1992**  
Enhancement of lymphocyte proliferation assays by use of serum-free medium  
J. Immunol. Meth. 147; 189-195
- **Kalinski, P., Hilkens, C.M.U., Snijders, A., Snijdewint, F.G.M., Kapsenberg, M.L., 1997**  
IL-12-Deficient Dendritic Cells, Generates in the Presence of Prostaglandin E<sub>2</sub>, Promote Type 2 Cytokine Production in Maturing Human Naive T Helper Cells  
J. Immunol. 159: 28-35
- **Kalinski, P., Schuitemaker, J.H.N., Hilkens, C.M.U., Kapsenberg, M.L., 1998**  
Prostaglandin E<sub>2</sub> Induces the Final Maturation of IL-12-Deficient CD1a<sup>+</sup> CD83<sup>+</sup> Dendritic Cells: The Levels of IL-12 Are Determined During the Final Denritic Cell Maturation and Are Resistant to Further Modulation  
J. Immunol. 161: 2804-2809
- **Kang, I., Barthold, S.W., Persing, D.H., Bockenstedt, L.K., 1997**  
T-Helper-Cell Cytokines in the Early Evolution of Murine Lyme Arthritis  
Inf. Immun. 65 (8): 3107-3111
- **Kaplan, R.F., Meadows, M.E., Vincent, L.C. Logigian, E.L., Steere, A.C., 1992**  
Memory impairment and depression in patients with Lyme encephalopathy: comparison with fibromyalgia and nonpsychotically depressed patients  
Neurology 42: 1263-1267
- **Karlsson, M., Møllegard, I., Stiernstedt, G., Wretling, B., 1989**  
Comparison of Western Blot and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Lyme Borreliosis  
Eur. J. Clin. Microbiol., Vol. 8, No. 10: 871-877

- **Keane-Myers, A., Maliszewski, C.R., Finkelman, F.D., Nickell, S.P., 1996**  
Recombinant IL-4 Treatment Augments Resistance to *Borrelia burgdorferi* Infection in Both Normal and Antibody-Deficient Susceptible Mice  
J. Immunol. 156:2488-2494
- **Keane-Myers, A., Nickell, S.P., 1995a**  
Role of IL-4 and IFN- $\gamma$  in Modulation of Immunity to *Borrelia burgdorferi* in Mice  
J. Immunol. 155 (4): 2020-2028
- **Keane-Myers, A., Nickell, S.P., 1995b**  
T Cell Subset-Dependent Modulation of Immunity to *Borrelia burgdorferi* in Mice  
J Immunol 154: 1770-1776
- **Kelly, R., 1971**  
Cultivation of *Borrelia hermsii*  
Science 173: 443-444
- **Klempner, M.S., Noring, R., Rogers, R.A., 1993**  
Invasion of Human Skin Fibroblasts by the Lyme Disease Spirochete *Borrelia burgdorferi*  
J. Infect. Dis. 167: 1074-1081
- **Knigge, H., Simon, M.M., Meuer, S.C., Dramer, M.D., Wallich, R., 1996**  
The outer surface lipoprotein OspA of *Borrelia burgdorferi* provides co-stimulatory signals to normal human peripheral CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes  
Eur. J. Immunol. 26: 2299-2303
- **Kochi, S.K., Johnson, R.C., 1988**  
Role of immunoglobulin G in killing *Borrelia burgdorferi* by the classical complement pathway  
Infect. Immun. 56: 314-321
- **Kopp, P., Schmitt, M., Wellensiek, H.-J., Bolbel, H., 1995**  
Isolation and characterization of fibronectin-binding sites of *Borrelia garinii* N34  
Infect. Immun. 63: 3804-3808
- **Krause, A., Brade, V., Schoerner, C., Solbach, W., Kalden, J.R., Burmeister, G.R., 1991**  
T Cell Proliferation Induced By *Borrelia Burgdorferi* In Patients With Lyme Borreliosis  
Autologous serum required for optimum stimulation  
Arthritis Rheum. Vol. 34, No. 4: 393-402
- **Kristoferisch, W., 1989**  
Neuropathien bei Lyme Borreliose  
Springer-Verlag: Wien, New York 1989
- **Krupp, L.B., Masur, D., Schwartz, D., Coyle, P., Langenbach, L.J., Fernquist, S.K., Jandorf, L., Halperin, J., 1991**  
Cognitive functioning in late Lyme borreliosis  
Arch Neurol 48: 1125-1129
- **Kuiper, H., van Dam A.P., Spanjaard, L., de Jongh, B.M., Widjojokusomo, A., Ramselaar, T.C.P., Cairo, I., Vos, K., Dankert, J., 1994**  
Isolation of *Borrelia burgdorferi* from Biopsy Specimen Taken from Healthy-Looking Skin of Patients with Lyme Borreliosis  
J. Clin. Microbiol. 32: 715-720
- **Kurtenbach, K., Dizij, A., Voet, P., Hauser, P., Simon, M.M., 1997**  
Vaccination of natural reservoir hosts with recombinant lipidated OspA induces a transmission-blocking immunity against Lyme disease spirochaetes associated with high levels of LA-2 equivalent antibodies  
Vaccine 15 (15): 1670-1674

- **Lam, T., Nguyen, T.-P.K., Montgomery, R.R., Kontor, F.S., Fikrig, E., Flavell, R.A., 1994**  
Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease  
Infect. Immun. 62: 290-298
- **Lane, R.S., Burgdorfer, W., 1987**  
Transovarial and transdial passage of *Borrelia burgdorferi* in western black-legged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae)  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 37: 188-192
- **Lebech, A.M., Hansen, K., 1992**  
Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in Urine Samples and Cerebrospinal Fluid Samples from Patients with Early and Late Lyme Neuroborreliosis by Polymerase Chain Reaction  
J. Clin. Microbiol. 30: 1646-1653
- **Lefebvre, R.B., Perng, G.C., Johnson, R.C., 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 (7): 1673-1675
- **Lengl-Janßen, B., Strauss, A.F., Steere, A.C., Kamradt, T., 1994**  
The T Helper Cell Response in Lyme Arthritis: Differential Recognition of *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Protein A in Patients with Treatment-resistant or Treatment-responsive Lyme Arthritis  
J. Exp. Med., Vol. 180: 2069-2078
- **Leong, J., Morrissey, P.E., Ortega-Barria, E., Pereira, M.E.A., Coburn, J., 1995**  
Hemagglutination and proteoglycan binding by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*  
Infect. Immun. 63: 874-883
- **Leong, J.M., Wang, H., Magoun, L., Field, J.A., Morrissey, P.E., Robbins, D., Tatro, J.B., Coburn, J., Parveen, N., 1998**  
Different Classes of Proteoglycans Contribute to the Attachment of *Borrelia burgdorferi* to Cultured Endothelial and Brain Cells  
Infect. Immun. 66 (3): 994-999
- **Lesser, R.L., 1995**  
Ocular manifestations of Lyme Disease  
Am J Med 98 (Suppl 4A): 60S-62S
- **Liebisch, A., 1991**  
Biologie und Ökologie der Zecken  
in: Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier  
Horst, H., Lüneburg, perimed Fachbuch-Verlagsgesellschaft mbH D-8520 Erlangen
- **Lipschütz, B., 1913**  
Über eine seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans)  
Arch. Derm. Syph. (Berl.) 118:349-356
- **Ma, Y., Seiler, K.P., Tai, K.-F., Yang, L., Woods, M., Weis, J.J., 1994**  
Outer surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* stimulate nitric oxide production by the cytokine-inducible pathway  
Infect. Immun. 62: 3663-3671
- **Ma, Y., Weis, J.J., 1993**  
*Borrelia burgdorferi* Outer Surface Lipoproteins OspA and OspB Posses B-Cell Mitogenic and Cytokine-Stimulatory Properties  
Infect. Immun. 61 (9): 3843-3853
- **MacLeod, J., 1935**  
*Ixodes ricinus* in relation to its physical environment.

- II. The factors governing survival and activity  
*Parasitology* 27: 123-144
- **Magnarelli, L.A., Anderson, J.F., 1986**  
Early detection and persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in persons with Lyme disease  
*Zbl. Bakt. Hyg. A* 263: 392-399
  - **Malawista, S.E., 1989**  
Lyme disease: Pathogenesis of Lyme disease  
*Rheumatol Int.* 9: 233-235
  - **Mannering, S.I., McKenzie, J.L., Hart, D.N.L., 1998**  
Optimisation of the conditions for generation human DC initiated antigen specific T lymphocyte lines in vitro  
*J. Immunol. Meth.* 219: 69-83
  - **Marconi, R., Samuels, D.S., Schwan, T.G., Garon, C.F., 1993**  
Identification of a protein in several *Borrelia* species which are related to OspC or Lyme disease spirochetes  
*J. Clin. Microbiol.* 31: 2577-2583
  - **Martin, R., Ortlaf, J., Sticht-Groh, V., Bogdahn, U., Goldmann, S.F., Mertens, H.G., 1988**  
*Borrelia burgdorferi*-specific and Autoreactive T-Cell Lines from Cerebrospinal Fluid in Lyme Radiculomyelitis  
*Ann Neurol.* 24: 509-516
  - **Mathiesen, M.J., Christiansen, M., Hansen, K., Holm, A., Asbrink, E., Theisen, M., 1998**  
Peptide-based OspC enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of Lyme borreliosis  
*J. Clin. Microbiol.* 36 (12): 3474-3479
  - **Mattyniak, J., Reiner, S.L., 1995**  
T helper phenotype and genetic susceptibility in experimental Lyme disease  
*J. Exp. Med.* 181: 1251-1254
  - **Mayer, S., Scheibenbogen, C., Lee, K.H., Keilholz, W., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., Keilholz, U., 1996**  
A sensitive proliferation assay to determine the specific T cell response against HLA-A2.1-binding peptides  
*J Immun Meth* 197:131-137
  - **Mbow, M.L., Zeidner, N., Panella, N., Titus, R.G., Piesman, J. 1997**  
*Borrelia burgdorferi*-Pulsed Dendritic Cells Induce a Protective Immune Response against Tick-Transmitted Spirochetes  
*Infect Immun* 65 (8): 3386-3390
  - **McAlister, H.F., Klementowicz, P.T., Andrews, C., Fisher, J.D., Feld, M., Furman, S. 1989**  
Lyme carditis: an important cause of reversible heart block  
*Ann. Intern. Med.* 110: 339-345
  - **McCutcheon, M., Wehner, N., Wensky, A., Kushner, M., Doan, S., Hsiao, L., Calabresi, P., Ha, T., Tran, T.V., Tate, K.M., Winkelhake, J., Spack, E.G., 1997**  
A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes  
*J. Immun. Meth.* 210: 149-166
  - **Miller, L.C., Isa, S., Vannier, E., Georgilis, K., Steere, A.C., Dinarello, C.A. 1992**  
Live *Borrelia burgdorferi* preferentially activate interleukin-1 beta gene expression and protein synthesis over the interleukin-1 receptor antagonist  
*J. Clin. Invest.* 90 (3): 906-912

- **Miossec, P., Briolay, J., Dechanet, J., Wijdenes, J., Martinez-Valdez, H., Banchereau, J., 1992**  
Inhibition of the production of proinflammatory cytokines and immunoglobulins by interleukin-4 in an ex vivo model of rheumatoid arthritis  
*Arthritis Rheum.* 35: 874
- **MIQ-Expertengremium der DGHM, 2000**  
Qualitätsstandards Lyme Borreliose  
Urban & Fischer Verlag 2000
- **Mitchell, P.D., Reed, K.R., Vandermause, M.F., Melski, J.W., 1993**  
Isolation of *Borrelia burgdorferi* from Skin Biopsy Specimens of Patients with Erythema Migrans  
*Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 99: 104-107
- **Modolell, M., Schauble, U.E., Rittig, M., Simon, M.M., 1994**  
Killing of *Borrelia burgdorferi* by macrophages is dependent on oxygen radicals and nitric oxide and can be enhanced by antibodies to outer surface proteins of the spirochete  
*Immunol. Lett.* 40: 139-146
- **Moffat, C.M., Sigal, L.H., Steere, A.C., Freeman, D.H., Dwyer, J.M., 1984**  
Cellular immune findings in Lyme disease: Correlation with serum IgM and disease activity  
*Am. J. Med.*, Vol. 77: 625-632
- **Montgomery, R., Nathanson, M.H., Malawista, S.E., 1994**  
Fc and non Fc-mediated phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by macrophages  
*J. Infect. Dis.* 170: 890-893
- **Morse, M.A., Lyerly, H.K., Gilboa, E., Thomas, E., Nair, S.K. 1998**  
Optimization of the Sequence of Antigen Loading and CD40-Ligand-induced Maturation of Dendritic Cells  
*Cancer Research* 58: 2965-2968
- **Neumann, A., Schlesier, M., Schneider, H., Vogt, A., Peter, H.H., 1989**  
Frequencies of *Borrelia burgdorferi*-reactive T lymphocytes in Lyme arthritis  
*Rheumatol Int* 9: 237-241
- **Obonyo, M., Munderloh, U.G., Fingerle, V., Wilske, B., Kurtti, T.J., 1999**  
*Borrelia burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature  
*J. Clin. Microbiol.* 37 (7): 2137-2141
- **Oksi, J., Savolainen, J., Pène, J., Bousquet, J., Laippala, P., Viljanen, M.K., 1996**  
Decreased Interleukin-4 and Increased Gamma Interferon production by Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Lyme Borreliosis  
*Infect Immun* 64 (9): 3620-3623
- **Orlik, O., Splitter, G.A., 1996**  
Optimization of lymphocyte proliferation assay for cells with high spontaneous proliferation in vitro: CD4<sup>+</sup> T cell proliferation in bovine leukemia virus infected animals with persistent lymphocytosis  
*J Immun Meth* 199:156-165
- **Pachner, A., Delaney, E., Ricalton, N.S., 1992**  
Murine Lyme Borreliosis: Route of inoculation determines immune response and infectivity  
*Reg. Immunol.* 4: 345-351
- **Pachner, A.R., Sigal, L.H., Johnson, C.L., Steere, A.C., 1985**  
Antigenic-specific proliferation of CSF lymphocytes in Lyme disease  
*Neurology* 35: 1642-1644

- **Paquette, R.L., Hsu, N.C., Kiertscher, S.M., Park, A.N., Tran, L., Roth, M.D., Glaspy, J.A., 1998**  
Interferon- $\alpha$  and granulocyte-macrophage colony-stimulation factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells  
J. Leukocyte Biology, Vol. 64: 358-367
- **Paschoud, J.M., 1957**  
Die Lymphadenosis benigna cutis als übertragbare Infektionskrankheit  
Hautarzt 8: 197-211
- **Peltz, G., 1991**  
A role for CD4<sup>+</sup> T-cell subsets producing a selective pattern of lymphokines in the pathogenesis of human chronic inflammatory and allergic disease  
Immunol. Rev. 123: 23-35
- **Pfister, H-W., Neubert, U., Wilske, B., Preac-Mursic, V., Einhäupl, K.M., Borasio, G.D., 1986**  
Reinfection with *Borrelia burgdorferi*  
Lancet II 984-985
- **Phipps, R.P., Shein, S.H., Roper, R.L., 1991**  
A new view of prostaglandin E regulation of the immune response  
Immuno.Today 12: 349-351
- **Piesman, J., Mather, T.N., Sinsky, J., Spielman, A., 1987**  
Duration of Tick Attachment and *Borrelia burgdorferi* Transmission  
J. Clin. Microbiol. 31: 1251-1255
- **Pohl-Koppe, A., Balashov, K.E., Steere, A.C., Logigian, E.L., Hafler, D.A., 1998**  
Identification of a T Cell Subset Capable of both IFN- $\gamma$  and IL-10 Secretion in Patients with Chronic *Borrelia burgdorferi* Infection  
J. Immunol. 160: 1804-1810
- **Pohl-Koppe, A., Kaunicnik, A., Wilske, B., 2001**  
Characterization of the cellular and humoral immune response to outer surface protein C and outer surface protein 17 in children with early disseminated Lyme borreliosis  
Med. Microbiol. Immunol. (Berl.) 189 (4): 193-200
- **Potter, M.R., Noben-Trauth, N., Weis, J.H., Teuscher C., Weis, J.J., 2000**  
Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 signaling pathways do not regulate *Borrelia burgdorferi*-induced arthritis in mice: IgG1 is not required for host control of tissue spirochetes  
Infect. Immun. 68: 5603
- **Preac-Mursic, V., Wilske, B., Schierz, B., Pfister, H.W., Einhäupl, K.M., 1984**  
Repeated isolation of spirochetes from the cerebrospinal fluid of a patient with meningoradiculitis  
Bannwarth  
Eur. J. Clin. Microbiol 3: 564-565
- **Ramamoorthy, R., Povinelle, L., Phillip, M.T., 1996**  
Molecular characterization, genomic arrangement, and expression of *bmpD*, a new member of the *bmp* class of genes encoding membrane proteins of *Borrelia burgdorferi*  
Infect. Immun. 64 (1996): 1259-1264
- **Rao, T.T., Frey, A.B., 1995**  
Protective Resistance to Experimental *Borrelia burgdorferi* Infection of Mice by Adoptive Transfer of a CD4<sup>+</sup> T Cell Clone  
Cell. Immunol. 162: 225-234
- **Rauer, S., Kayser, M., Neuber, U., Rasiah, C., Vogt, A., 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 (10): 2596-2600

- **Reimer, R., Erbas, B., Lobbischler, K., Truckenbrodt, R., Gartner-Kothe, U., Kapeller, N., Hansen, M., Fingerle, V., Wilske, B., v. Sonnenburg, F., 2002**  
Seroprevalence of *Borrelia* infection in occupational tick-exposed people in Bavaria (Germany)  
Int. J. Med. Microbiol. 291, Suppl. 33: 215
- **Ribeiro, J., 1987**  
*Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity  
Exp. Parasitol. 70: 347-353
- **Ribeiro, J., Makoul, G.T., Livine, J., Robinson, D.R., Spielman, A., 1985**  
Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*  
J. Exp. Med. 161: 332-344
- **Ribeiro, J., Weis, J.J., Telford III., S.R., 1990**  
Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function  
Exp. Parasitol. 70: 382-388
- **Rieser, C., Böck, G., Klocker, H., Bartsch, G., Thurnher, M., 1997**  
Prostaglandin E2 and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Cooperate to Activate Human Dendritic Cells: Synergistic Activation of Interleukin 12 Production  
J. Exp. Med. Vol. 186, No. 9: 1603-1608
- **Rittig, M.G., Häupl, T., Krause, A., Kressel, M., Groscurth, P., Burmester, G.R., 1997**  
*Borrelia burgdorferi*-induced ultrastructural alterations in human phagocytes: a clue to pathogenicity?  
J. Pathol. 173: 269-282
- **Roberts, W.C., Mullikin, B.A., Lathigra, R., Hanson, M.S., 1998**  
Molecular analysis of sequence heterogeneity among genes encoding decorin binding proteins A and B of *Borrelia burgdorferi* sensu lato  
Infect. Immun. 66 (11): 5275-5285
- **Roessner, K., Fikrig, E., Russel, J.Q., Cooper, S.M., Flavell, R.A., Budd, R.C., 1994**  
Prominent T lymphocyte response to *Borrelia burgdorferi* from peripheral blood of in-exposed donors  
Eur. J. Immunol. 24: 320-324
- **Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kämpgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D., Schuler, G., 1996**  
Generation of mature dendritic cells from human blood: An improved method with special regard to clinical applicability  
J. Immunol. Meth. 196: 137-151
- **Romani, N.; Lenz, A.; Glassel, H., Stossel H., Stanzl, U., Majdic, O., Fritsch, O.; Schuler, G.; 1989**  
Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in Phenotype and function  
J Invest Dermatol 93.600-609, 1989
- **Rössler, D., Eiffert, H., Jauris-Heipke, S., Lehnert, G., Preac-Mursic, V., Teepe, J., Schlott, T., Soutschek, E., Wilske, B., 1995**  
Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains  
Med. Microbiol. Immunol (Berl) 184 (1): 23-32
- **Rougier, N., Schmitt, D., Vincent, C., 1998**  
IL-4 addition during differentiation of CD34 progenitors delays maturation of dendritic cells while promoting their survival  
Eur. J. Cell Biol. 75: 287-293

- **Rousselle J.C., Callister, S.M., Schell, R.F., Lovrich, S.D., Jobe, D.A., Marks, J.A., Wieneke, C.A., 1998**  
Borrelial antibody production against outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi*  
J. Infect. Dis. 178 (3): 733-741
- **Rutkowski, S., Busch, D.H., Huppertz, H.I. 1997**  
Lymphocyte proliferation assay in response to *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme arthritis: analysis of lymphocyte subsets  
Rheumatol Int 17 (4): 151-158
- **Sadziene, A., Barbour, A.G., Rosa, P.A., Thomas, D.D., 1993a**  
An ospB mutant of *Borrelia burgdorferi* has reduced invasiveness in vitro and reduced infectivity in vivo  
Infect. Immun. 61: 3590-3596
- **Sadziene, A., Thomas, D.D., Barbour, A.G., 1995**  
*Borrelia burgdorferi* mutant lacking osp: biological and immunological characterization  
Infect. Immun. 63: 1573-1580
- **Sadziene, A., Wilske, B., Ferdows, M.S., Barbour, A.G., 1993b**  
The Cryptic ospC Gene of *Borrelia burgdorferi* B31 Is Located on a Circular Plasmid  
Infect. Immun. 61 (5): 2192-2195
- **Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. Lanzavecchia, A., 1995**  
Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class II Compartment: Downregulation by Cytokines and Bacterial Products  
J Exp Med 182:389-400
- **Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 1994**  
Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
J Exp Med 179:1109-1118
- **Satoskar, A.R., Elizondo, J., Monteforte, G.M., Stamm, L.M., Bluethmann, H., Katavolos, P., Telford III, S.R., 2000**  
Interleukin-4-deficient BALB/c mice develop an enhanced Th1-like response but control cardiac inflammation following *Borrelia burgdorferi* infection  
FEMS Microbiol Lett 183: 319-325
- **Satz, N., 1993**  
Klinik der Lyme Borreliose  
Verlag Hans Huber, Bern
- **Schaible, U.E., Kramer, M.D., Gobel, U.B., Wallich, R., Simon, M.M., 1991**  
Experimental *Borrelia burgdorferi* infection in inbred mouse strains: antibody response and association of H-2 genes with resistance and susceptibility to development of arthritis  
J. Immunol. 21: 2307
- **Schluesener, H.J., Martin, R., Sticht-Grob, V., 1989**  
Autoimmunity in Lyme-disease-molecular cloning of antigens recognized by antibodies in the cerebrospinal fluid  
Autoimmun. 2: 323-330
- **Schoeler, G.B., Manweiler, S.A., Wikel, S.K., 1999**  
*Ixodes scapularis*: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice  
Exp Parasitol 92 (4): 239-248

- **Schuler, G.; Romani, N., 1997**  
Generation of mature dendritic cells from human blood  
An Improved Method with Special Regard to Clinical Applicability  
in: Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology edited by Ricciardi-Castagnoli  
Plenum Press, New York 1997, S.7-13
- **Schulze, J., Breitner-Ruddock, S., von Briesen, H., Brade, V., 1996**  
High- and low-level cytokine induction in human peripheral blood mononuclear cells by different  
*Borrelia burgdorferi* strains  
Med Microbiol Immunol 185 (1): 31-37
- **Schutzer, S.E., Coyle, P.K., Belman, A.L., Golightly, M.G., Drulle, J., 1990**  
Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme  
disease  
Lancet 335: 312-315
- **Schwan, T., Burgdorfer, W., 1987**  
Antigenic changes of *Borrelia burgdorferi* as a result of in vitro cultivation  
J. Infect. Dis. 156: 852-853
- **Schwan, T.G., Piesman, J., Golde, W.T., Dolan, M.C., Rosa, P.A., 1995**  
Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2909-2913
- **Schwartz, I., Bittker, S., Bowen, S.L., Cooper, D., Pavia, C., Wormser, G.P., 1993**  
Polymerase Chain Reaction Amplification of Culture Supernatants for Rapid Detection of *Borrelia*  
*burgdorferi*  
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12: 879-882
- **Schwartz, I., Wormser, G.P., Schwartz, J.J., Cooper, D., Weissensee, P., Gazumyan, A.,  
Zimmermann, E., Goldberg, N.S., Bittker, S., Campbell, G.L. Pavia, C.S., 1992**  
Diagnosis of early Lyme disease by polymerase chain reaction amplification and culture of skin  
biopsies from erythema migrans lesions  
J. Clin. Microbiol. 30: 3082-3088
- **Sigal, L.H. Moffat, C.M., Steere, A.C., Dwyer, J., 1984**  
Cellular immune findings in Lyme disease  
Yale J. Biol. Med. 57:595-598
- **Sigal, L.H., Leonard H., 1997**  
Lyme disease: A Review of Aspects of its immunology and immunopathogenesis  
Annu. Rev. Immunol. 15:63-92
- **Sigal, L.H., Steere, A.C., Freeman, D.H., Dwyer, J.M., 1986**  
Proliferative responses of mononuclear cells in Lyme disease: reactivity to *Borrelia burgdorferi*  
antigens is greater in joint fluid than in blood  
Arthritis Rheum. 29: 761-769
- **Sigal, L.H., Zahradnik, J.M., Lavin, P., Patella, S.J., Bryant, G., Haselby, R., Hilton, E., Kunkel,  
M., Adler-Klein, D., Doherty, T., Evans, J., Malawista, S.E., and The Recombinant Outer-Surface  
Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium, 1998**  
A Vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer- surface protein A to prevent  
Lyme disease  
N. Engl. J. Med. 339 (4): 216-222
- **Silberer, M., Koszik, F., Stingl, G., Aberer, E., 2000**  
Downregulation of class II molecules on epidermal langerhans cells in Lyme borreliosis  
Br. J. Dermatol. 143 (4):786-794

- **Simon, M.M., Bauer, Y., Zhong, W., Hofmann, H., Wallich, R., 1999**  
Lyme disease: pathogenesis and vaccine development  
Zentralbl. Bakteriologie. 289 (5-7): 690-5
- **Steere A.C., Gibofsky, A., Patarroyo, M.E., Winchester, R.J., Hardin, J.A., Malawista, S.E., 1979**  
Chronic Lyme arthritis: Clinical and immunogenetic differentiation from rheumatoid arthritis  
Ann Intern Med. 90: 286-291
- **Steere, A., Malawista, S.E., 1979**  
Cases of Lyme disease in the United States: locations correlated with distribution of *Ixodes dammini*  
Ann. Int. Med. 91: 730-733
- **Steere, A.C., 1989**  
Lyme disease  
N Engl. J. Med 321: 586-596
- **Steere, A.C., Bartenhagen, N.H., Craft, J.E., Hutchinson, G.J., Newman, J.H., Pachner, A.R., Rahn, D.W., Sigal, L.H., Taylor, E., Malawista, S.E., 1986**  
Clinical Feature – Overview. Clinical Manifestations of Lyme Disease  
Zbl. Bakt. Hyg. A. 263: 201-205
- **Steere, A.C., Batsford, W.P., Winberg, M., Alexander, J., Berger, H.J., Wolfson, S., Malawista, S.E., 1980a**  
Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease  
Ann. Int. Med. 93: 8-16
- **Steere, A.C., Brinkerhoff, C.F., Miller, S.J., Drinker, H., Harris Jr., E.D. Malawista S.E., 1980b**  
Elevated levels of collagenase and prostaglandin E2 from synovium associated with erosion of cartilage and bone in a patient with chronic Lyme arthritis  
Arthritis Rheum. 238: 591-599
- **Steere, A.C., Grodzicki, R.L., Craft, J.E., Shrestha, M., Komblatt, A.N., Malawista S.E., 1984b**  
Recovery of Lyme Disease Spirochetes from Patients  
Yale J. Biol. Med. 57: 557-560
- **Steere, A.C., Gross, D., Meyer, A.L., Huber, B.T., 2001**  
Autoimmune Mechanisms in antibiotic Treatment-Resistant Lyme Arthritis  
J. Autoimmun. Vol.16, No.3: 263-268
- **Steere, A.C., Malawista, S.E., Bartenhagen, N.H., Spieler, P.N., Newman, J.H., Rahn, D.W., Hutchinson, G.J., Green, J., Snyderman, D.R., Taylor, E., 1984a**  
The Clinical Spectrum and Treatment of Lyme Disease  
Yale J. Biol. Med. 57: 453-461
- **Steere, A.C., Malawista, S.E., Hardin, J.A., Ruddy, S., Askenase, P.W., Andiman, W.A. 1977a**  
Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum  
Ann. Intern. Med 86: 685-698
- **Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Shope, E.E., Andiman, W.A., Ross, M.R., Steele, F.M., 1977b**  
Lyme arthritis: An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities  
Arthritis Rheum. 20: 7-17
- **Steere, A.C., Sikand, V.K., Meurice, F., Parenti, D.L., Fikrig, E., Schoen, R.T., Noxakaoxsko, J., Schmid, C.H., Laukamp, S., Buscarino, C., Krause, D.S., and the Lyme Disease Vaccine Study Group, 1998**  
Vaccination against Lyme Disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant  
N. Engl. J. Med. 339 (4): 209-215

- **Steinmann, R.M., Pack, M., Inaba, K., 1997**  
Dendritic cell development and maturation  
in: Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology edited by Ricciardi-Castagnoli  
Plenum Press, New York 1997, S.1-6
- **Stoenner, H.G., Dodd, T., Larsen, C., 1982**  
Antigenic variation of *Borrelia hermsii*  
J. Exp. Med. 156: 1297-1311
- **Streilein, J.W., 1991**  
Structure and function of cutaneous immune cells  
Cellular and Cytokine Networks in Tissue Immunity, 43-48  
1991 Wiley-Liss, Inc.
- **Strle, F., Cheng, Y., Cimperman, J., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S., Nelson, J.A., Picken, M.M., Ruzic-Sabljić, Picken, R.N., 1995**  
Persistence of *Borrelia burgdorferi* Sensu lato in Resolved Erythema Migrans Lesions  
Clin. Infect. Dis. 21: 380-389
- **Svartz, N., 1946**  
Penicillinbehandlung vid dermatitis atrophicans Herxheimer  
Nord. Med. 32: 2783
- **Svenson, M., Stockinger, B., Wick, M.J., 1997**  
Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells  
J. Immunol. 158: 4229-4236
- **Szczepanski, A., Benach, J.L., 1991**  
Lyme Borreliosis: Host Responses to *Borrelia burgdorferi*  
Microb. Rev. 55: 21-34
- **Takács, K., Douek, D.C., Altmann, D.M., 1995**  
Exacerbated autoimmunity associated with T helper-1 cytokine profile shift in H-2E-transgenic mice  
Eur. J. Immunol. 25: 3134-3141
- **Takayama, K., Rothenberg, R.J., Barbour, A.G., 1987**  
Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*  
Infect. Immun. 55:2311-2313
- **Talkington, J., Nickell, S.P., 1999**  
*Borrelia burgdorferi* spirochetes induce mast cell activation and cytokine release  
Infect Immun 67 (3): 1107-1115
- **Thomas, D., Comstock, L.E., 1989**  
Interaction of Lyme disease spirochetes with cultured eucaryotic cells  
Infect. Immun. 57: 1324-1326
- **Urioste, S., Hall, L.R., Telford III, S.R., Titus, R.G., 1994**  
Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism  
J. Exp. Med. 180: 1077-1085
- **van Roon, J.A., van Roy, J.L., Lafeber, F.P., Bijlsma, J.W., 1995**  
Proinflammatory cytokine production and cartilage damage due to rheumatoid synovial T-helper-1 activation is inhibited by interleukin-4  
Ann. Rheum. Dis. 54: 836
- **Vaz, A., Glickstein, L., Field, J.A., McHugh, G., Sikand, V.K., Damle, N., Steere, A.C., 2001**  
Cellular and Humoral Immune Responses to *Borrelia burgdorferi* Antigens in Patients with

- Culture-Positive Early Lyme Disease  
Infect. Immun. 69 (12): 7437-7444
- **Wallich, R., Brenner, C., Kramer, M.D., Simon, M.M., 1995**  
Molecular Cloning and Immunological Characterization of a Novel Linear-Plamid-Encoded Gene, pG, of *Borrelia burgdorferi* Expressed Only in Vivo  
Inf. Immun. Vol. 63, No. 9: 3327-3335
  - **Wallich, R., Jahraus, O., Stehle, T., Tran, T.T., Brenner, Ch., Hofmann, H., Gern, L., Simon, M.M., 2002**  
Artificial infection protocols allow immunodetection of novel *Borrelia burgdorferi* antigens suitable as vaccine candidates against Lyme disease  
Arbeit eingereicht bei Nat. Med.
  - **Wallich, R., Kramer, M.D., Simon, M.M., 1996**  
The Recombinant Outer Surface Protein A (lipOspA) of *Borrelia burgdorferi*: A Lyme Disease Vaccine  
Infect. 24 (5): 396-397
  - **Wallich, R., Moter, S.E., Simon, M.M., Ebnet, K. Heiberger, A., Kramer, M.D., 1990**  
The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression and amplification of the gene  
Infect. Immun. 58: 1711-1719
  - **Wallich, R., Simon, M.M., Hofmann, H., Moter, S.E., Schaible, U.E., Kramer, M.D., 1993**  
Molecular and Immunological Characterization of a Novel Polymorphic Lipoprotein of *Borrelia burgdorferi*  
Inf. Immun.. Vol. 61, No.10: 4158-4166
  - **Watts, C., 1997**  
Capture and Processing exogenous Antigens for Presentation on MHC Molecules  
Annu. Rev. Immunol. 15: 821-850
  - **Weber, R., Schierz, G., Wilske, B., Preac-Mursic, V., 1985**  
Das Lymphozytom – eine Borreliose?  
Z. Hautkr. 60: 1585-1598
  - **Weis, J., Ma, Y., Erdile, L.F., 1994**  
Biological activities of native and recombinant *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A: dependence on lipid modification  
Infect. Immun. 62: 4632-4636
  - **Weyand, C.M., Goronzy, J.J., 1989**  
Immune responses to *Borrelia burgdorferi* in patients with reactive arthritis  
Arthritis Rheum. 32: 1057-1064
  - **Widhe, M., Ekerfelt, C., Forsberg, P., Bergstrom, S., Ernerudh, J., 1998**  
IgG subclasses in Lyme borreliosis: a study of specific IgG subclass distribution in an interferon-gamma-predominated disease  
Scand. J. Immunol. 47 (6): 575-581
  - **Wienecke, R., Koch, O.M., Neubert, U., Göbel, U., Volkenandt, M., 1993a**  
Detection of Subtype-Specific Nucleotide Sequence Differences in a *Borrelia burgdorferi* Specific Gene Segment by Analysis of Conformational Polymorphism of cRNA Molecules  
Med. Microbiol. Lett. 2: 239-246
  - **Wilske, B., Anderson, H.F., Baranton, G., Barbour, A.G., Hovind-Hougen, K., Johnson, R.C., Preac-Mursic, V., 1991**  
Taxonomy of *Borrelia* spp.  
Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 77:108-129

- **Wilske, B., Münchhoff, P., Schierz, G., Preac-Mursic, V., Roggendorf, M., Zoulek, G., 1985a**  
Zur Epidemiologie der *Borrelia burgdorferi*-Infektion  
Münch. Med. Wschr. 127: 126-143
- **Wilske, B., Preac-Mursic, V. Schierz, G., 1985b**  
Antigenic heterogeneity of European *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients and ticks  
Lancet 1: 1099
- **Wilske, B., Preac-Mursic, V., Schierz, G., Kühlbeck, R., Barbour, A.G., Kramer, M., 1988**  
Antigenetic variability of *B. burgdorferi*  
Ann. NY Acad. Sci. 539: 126-143
- **Wilske, B., Steinhuber, R., Bergmeister, H., Fingerle, V., Schierz, G., Preac-Mursic, V., Vanek, E., Lorbeer, B., 1987**  
Die Lyme Borreliose in Süddeutschland  
Dtsch Med Wochenschr 112: 1730-1736
- **Wilske, G., Preac-Mursic, V., Jauris, S., Hofmann, A., Pradel, I., Soutschek, E., Schwab, E., Will, G., Wanner, G., 1993**  
Immunological and Molecular Polymorphisms of OspC, an Immunodominant Major Outer Surface Protein of *Borrelia burgdorferi*  
Infect. Immun. Vol. 61. No. 5: 2182-2191
- **Winzler, C., Rovere, P., Zimmermann, V.S., Davoust, J., Rescigno, M., Citterio, S., Ricciardi-Castagnoli, P., 1997**  
Checkpoints and functional stages in DC Maturation  
in: Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology edited by Ricciardi-Castagnoli  
Plenum Press, New York 1997, S.59-64
- **Wooten, R.M., Ma, Y., Yoder, R.A., Brown, J.P., Weis, J.H., Zachary, J.F., Kirschning, C.J., Weis, J.J., 2002**  
Toll-like Receptor 2 Is Required for Innate, But Not Acquired, Host Defense to *Borrelia burgdorferi*  
J. Immunol. 168: 348-355
- **Yang, L., Ma, Y., Schoenfeld, R., Griffiths, M., Eichwald, E., Araneo, B., Weis, J.J., 1992**  
Evidence for B-lymphocyte mitogen activity in *Borrelia burgdorferi* infected mice  
Infect. Immun. 60: 3033-3041
- **Yin, Z., Braun, J., Neure, L., Wu, P., Eggens, U., Krause, A., Kamradt, T., Sieper, J. 1997**  
T cell cytokine pattern in the joints of patients with Lyme arthritis and its regulation by cytokines and anticytokines  
Arthritis Rheum 40 (1): 69-79
- **Yoshinari, N.H., Reinhardt, B.N., Steere, A.C. 1991**  
T cell responses to polypeptide fractions of *borrelia burgdorferi* in patients with lyme arthritis  
Arthritis Rheum., Vol. 34, no. 6: 707-713
- **Yssel, H., Nakamoto, T., Schneider, P., Freitas, V., Collins, C., Webb, D., Mensi, N., Soderberg, C., Peltz, G., 1990**  
Analysis of T lymphocytes cloned from the synovial fluid and blood of a patients with Lyme arthritis  
Int. Immunol. 11: 1083-1089
- **Yssel, H., Shanafelt, M.-C., Soderberg, C., Schneider, P.V., Anzola, J., Peltz, G. 1991**  
*Borrelia burgdorferi* Activates a T Helper Type 1-like T Cell Subset in Lyme Arthritis  
J. Exp. Med. Vol. 174: 593-601
- **Zeidner, N., Dreitz, M., Belasco, D., Fish, D. 1996**  
Suppression of acute *Ixodes scapularis*-induced *Borrelia burgdorferi* infection using tumor necrosis

factor-alpha, interleukin-2, and interferon-gamma  
J Infect Dis 173 (1): 187-195

- **Zeidner, N., Mbow, M.L., Dolan, M., Massung, R., Baca, E., Piesman, J., 1997**  
Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on Modulation of the Host Immune Response: Induction of a TH2 Cytokine Response in Lyme Disease-Susceptible (C3H/HeJ) Mice but Not in Disease-Resistant (BALB/c) Mice  
Inf. Immun. 65 (8): 3100-3106
- **Zhang, J.-R., Norris, S.J., 1998**  
Genetic Variation of the *Borrelia burgdorferi* Gene *vlsE* Involves Cassette- Specific, Segmental Gene Conversion  
Infect. Immun. 66 (8): 3698-3704
- **Zhou, L.-J., Tedder, T., 1996**  
CD14<sup>+</sup> blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells  
Pro. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2588-2592
- **Zoschke, D.C., Skemp, A.A., Defosse, D.L. 1991**  
Lymphoproliferative Responses to *Borrelia burgdorferi* in Lyme Disease  
Ann. Intern. Med. 114: 285-289

## 7 Anhang

## 7.1 Patientenbeispiele Krankheitsverlauf / Diagnostik

<b>Patient:</b> Z.A.	<b>Alter:</b> 62 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b>	<u>Erythema migrans</u> rechte Kniekehle (15 x 4 cm), Rückenschmerzen ausstrahlend in beide Beine (Radikulitits)	
<b>Zeckenstich:</b> vor 10d	<b>Erkrankungsdauer:</b> 2d	

Untersuchungsdatum			07.06.00	21.06.00	23.08.00	27.09.00
<b>Direktnachweis</b>		PCR	<b>p66 +</b>	n.d.	n.d.	n.d.
		Kultur	+	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	0,06	<b>↑ 1,36</b>	↓ 0,43	0,34
		μ-capture-EIA	n.d.	<b>15,1</b>	<b>↓ 2,42</b>	<b>1,17</b>
	WB (kD)		-	<b>OspC</b>	n.d.	<b>OspC,(41)</b>
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	0,06	0,09	0,06	0,13
WB (kD)		75,41	75,41,29	n.d.	<b>75,(41,29, OspC)</b>	
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	<b>2,31</b>	n.d.	↓ 1,60	1,61
		OspC	1,73	n.d.	1,85	<b>↑ 2,06</b>
		DbpA	<b>2,47</b>	n.d.	↓ 1,43	1,50
		ZSA36	1,86	n.d.	1,60	0,95
	<b>IFN-γ-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	-4	n.d.	-7	n.d.
		OspC	-2	n.d.	-8	n.d.
		DbpA	<b>57</b>	n.d.	↓ -8	n.d.
		ZSA36	2	n.d.	-4	n.d.
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	3	n.d.	4	n.d.
		OspC	<b>5</b>	n.d.	↓ -3	n.d.
		DbpA	-1	n.d.	-4	n.d.
		ZSA36	<b>14</b>	n.d.	↓ 4	n.d.
<b>Klinischer Verlauf</b>			Arthralgie	Persistenz	=	=

↑ Therapie: ↑  
Doxycyclin 200mg/d

<b>Patient:</b> K.K.	<b>Alter:</b> 26 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b>	<u>multiple Erythematata migrantia</u> rechte Kniekehle, Unterschenkel, Unterarm, Brust	
<b>Zeckenstich:</b> vor ca. 1 Woche	<b>Erkrankungsdauer:</b> 3-4 d	

Untersuchungsdatum			22.08.00	20.09.00	21.11.00
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	<b>1,52</b>	<b>↑ 1,78</b>	↓ <b>1,15</b>
		μ-capture-EIA	<b>18,0</b>	<b>↑ 24,9</b>	↓ <b>17,0</b>
		WB (kD)	<b>60,41,34,OspC</b>	n.d.	<b>41,OspC,22</b>
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	0,1	<b>↑ 0,31</b>	↓ 0,18
WB (kD)		60,41	n.d.	<b>60,39,34,31,OspC</b>	
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	<b>4,62</b>	↓ <b>3,35</b>	↓ 1,48
		OspC	<b>3,80</b>	<b>↑ 4,01</b>	↓ <b>2,01</b>
		DbpA	<b>2,51</b>	↓ 1,37	1,82
		ZSA36	1,61	1,91	1,10
	<b>IFN-γ-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	<b>14</b>	<b>↑ 29</b>	n.d.
		OspC	3	↓ -32	n.d.
		DbpA	<b>21</b>	↓ -36	n.d.
		ZSA36	2	<b>↑ 48</b>	n.d.
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	1	-4	n.d.
		OspC	0	-6	n.d.
		DbpA	2	-1	n.d.
		ZSA36	1	2	n.d.
<b>Klinischer Verlauf</b>					

↑ Therapie: ↑  
Doxycyclin 200mg/d

<b>Patient:</b> F.W.	<b>Alter:</b> 60 Jahre	<b>Geschlecht:</b> männlich
<b>Diagnose:</b>	<u>Erythema migrans</u> linker Oberschenkel(10 x 10 cm), Kopfschmerzen, Schüttelfrost/Fieber, Gleichgewichtsstörungen	
<b>Zeckenstich:</b> vor 5d	<b>Erkrankungsdauer:</b> 2d	

Untersuchungsdatum		20.09.00	27.09.00	14.11.00	
<b>Serologie</b>	IgM-Nachweis	ELISA	2,47	↑-2,23	↓-2,13
		μ-capture-EIA	46,1	↓↓25,3	↓20,8
		WB (kD)	60,41,34,30,OspC, 21	n.d.	(75,41,OspC)
	IgG-Nachweis	ELISA	0,14	0,12	↑0,25
WB (kD)		58,41,34,29,OspC	n.d.	41	
<b>T-Zellantwort</b>	Proliferation (Stimulationsindex)	pG	n.d.	1,25	0,77
		OspC	n.d.	0,94	0,66
		DbpA	n.d.	1,54	1,11
		ZSA36	n.d.	1,18	0,79
	IFN-γ-Sekretion (spots abzüglich background)	pG	n.d.	-123	-58
		OspC	n.d.	-84	-38
		DbpA	n.d.	-130	-35
		ZSA36	n.d.	-87	-41
	IL-4-Sekretion (spots abzüglich background)	pG	n.d.	-2	2
		OspC	n.d.	n.d.	-1
		DbpA	n.d.	1	↑8
		ZSA36	n.d.	-1	↑10
<b>Klinischer Verlauf</b>		Allgemein-symptome	Besserung	=	

↑ Therapie: ↑  
Ceftriaxon 2g/d i.v.

<b>Patient:</b> C.R	<b>Alter:</b> 50 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b>	<u>Erythema migrans</u> rechter Unterschenkel ( 6 x 8 cm), Kreislaufbeschwerden, Erbrechen, Kopfschmerzen. Lichtscheu	
<b>Zeckenstich:</b> vor 8d	<b>Erkrankungsdauer:</b> 6d	

Untersuchungsdatum		07.04.00	14.04.00	19.04.00	17.05.00	02.08.00	08.11.00	
<b>Direktnachweis</b>	PCR	flagellin+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	Kultur	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
<b>Serologie</b>	IgM-Nachweis	ELISA	0,12	2,60	↓2,33	↑2,50	↓1,83	↓1,29
		μ-capture-EIA	0,66	26,4	↑↑↑719	↓586	↓27,0	↓10,2
	WB (kD)	-	60,41,39,34,OspC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	41,34,24
		-	75,60,41,OspC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	75,60,41OspC
IgG-Nachweis	ELISA	0,02	0,04	0,11	0,14	0,15	0,14	
	WB (kD)	-	75,60,41,OspC	n.d.	n.d.	n.d.	75,60,41OspC	
<b>T-Zellantwort</b>	Proliferation (Stimulationsindex)	pG	3,98	n.d.	↓1,66	↑2,38	↑4,61	↓1,65
		OspC	4,64	n.d.	↓2,74	↑4,74	↑4,59	↑5,77
		DbpA	4,40	n.d.	↓1,21	↓1,15	↑4,69	↑4,73
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,43	1,28
	IFN-γ-Sekretion (spots abzüglich background)	pG	-9	n.d.	n.d.	-87	n.d.	↑17
		OspC	35	n.d.	n.d.	↓32	n.d.	↓7
		DbpA	-4	n.d.	n.d.	-84	n.d.	-18
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	32
	IL-4-Sekretion (spots abzüglich background)	pG	-1	n.d.	n.d.	-1	n.d.	1
		OspC	-1	n.d.	n.d.	-1	n.d.	4
		DbpA	-7	n.d.	n.d.	0	n.d.	2
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1
<b>Klinischer Verlauf</b>		Allgemein-symptome	Besserung	Wohl-befinden	=	=	=	

↑ Therapie: ↑  
Ceftriaxon 2g/d i.v. 14d/Cefuroximaxetil 1000mg/d 6d

<b>Patient:</b> E.E.	<b>Alter:</b> 60 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b>	<u>Erythema migrans</u> Unterschenkel rechts, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Arthralgie/Myalgie, Nackensteifigkeit	
<b>Zeckenstich:</b> vor 30d (fraglich)	<b>Erkrankungsdauer:</b> ?	

Untersuchungsdatum		21.06.00	05.07.00	
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	0,24	↑ 1,21
		μ-capture-EIA	1,25	8,32
		WB (kD)	41,34,OspC	41,34,31,OspC
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	0,06	0,08
WB (kD)		75,60,41	75,60,41	
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	2,84	↓ 1,09
		OspC	2,70	↑ 6,41
		DbpA	2,56	↓ 1,01
		ZSA36	1,89	0,85
	<b>IFN-γ-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	-70	2
		OspC	-54	↑ 8
		DbpA	-175	↑ 57
		ZSA36	-95	-2
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	7	4
		OspC	-2	1
		DbpA	-2	0
		ZSA36	-4	6
<b>Klinischer Verlauf</b>		Allgemeinsymptome, Arthralgie/Myalgie, neurologische Symptome	Persistenz	
		↑ Therapie: Doxycyclin 200mg/d	↑	

<b>Patient:</b> F.M.	<b>Alter:</b> 63 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b>	<u>Erythema migrans</u> rechte Kniekehle (14 x 15cm)	
<b>Zeckenstich:</b> vor 4 Wochen	<b>Erkrankungsdauer:</b> ?	

Untersuchungsdatum		28.06.00	03.08.00	16.08.00	15.11.00	
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	0,50	↑ 0,55	↓ -0,51	
		μ-capture-EIA	1,40	↑ 1,59	↑ 1,66	↓ 0,07
		WB (kD)	41,OspC	60,41, OspC	n.d.	41,OspC
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	0,07	0,09	0,09	0,08
WB (kD)		41,OspC pG	60,41	n.d. pG	41,OspC, (60), pG	
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	1,58	n.d.	↑ 3,83	↑ 4,49
		OspC	4,33	n.d.	↑ 5,03	↑ 12,35
		DbpA	1,49	n.d.	↑ 4,28	↑ 5,38
		ZSA36	2,22	n.d.	↑ 3,15	↑ 3,25
	<b>IFN-γ-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	5	n.d.	↑ 39	↓ -84
		OspC	5	n.d.	↑ 7	↓ -68
		DbpA	2	n.d.	↓ -30	-59
		ZSA36	-2	n.d.	-16	-8
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	1	n.d.	-5	-1
		OspC	1	n.d.	-10	-1
		DbpA	3	n.d.	-1	1
		ZSA36	0	n.d.	-7	↑ 20
<b>Klinischer Verlauf</b>		Progredienz des Erythems nach Roxythromycin		Abheilung des Erythems		
		↑ Therapie: Amoxicillin 2000mg/d	↑			

<b>Patient:</b> G.H.	<b>Alter:</b> 32 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b> <u>Erythema migrans</u> linker Unterschenkel, Nackensteifigkeit, Arthralgien		
<b>Zeckenstich:</b> vor ca. 2 Monaten	<b>Erkrankungsdauer:</b> ?	

Untersuchungsdatum		31.08.00	09.10.00	08.11.00	
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	0,37	0,41	0,43
		$\mu$ -capture-EIA	<b>1,35</b>	<b>1,71</b>	↓ 0,11
		WB (kD)	<b>OspC, (41,39)</b>	<b>60,58,41, OspC</b>	<b>OspC,(41)</b>
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	0,10	0,16	0,15
		WB (kD)	41	41	45,41,39, (75,60,OspC)
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	1,84	1,33	1,88
		OspC	<b>2,00</b>	↓ 0,99	↑↑ <b>7,37</b>
		DbpA	<b>3,15</b>	↓ 1,15	1,47
		ZSA36	<b>2,07</b>	↓ 0,82	↑ <b>2,62</b>
	<b>IFN-<math>\gamma</math>-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	<b>22</b>	n.d.	↓ <b>11</b>
		OspC	-5	n.d.	↑ <b>36</b>
		DbpA	-9	n.d.	↑ <b>11</b>
		ZSA36	<b>43</b>	n.d.	↓ <b>20</b>
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	<b>7</b>	n.d.	↑ <b>23</b>
		OspC	<b>9</b>	n.d.	↑ <b>280</b>
		DbpA	<b>14</b>	n.d.	↓ 3
		ZSA36	<b>6</b>	n.d.	↑ <b>32</b>
		<b>Klinischer Verlauf</b>		Allgemein- symptome, Arthralgie	Besserung

↑ Therapie: ↑  
**Amoxicillin 2250mg/d 6d**  
**Azithromycin 1000mg/d 5d**  
 wegen Arzneimittelexanthem

<b>Patient:</b> M.A.	<b>Alter:</b> 41 Jahre	<b>Geschlecht:</b> männlich
<b>Diagnose:</b> <u>Erythema migrans</u> am Unterbauch, perigenital		
<b>Zeckenstich:</b> vor 2 Monaten	<b>Erkrankungsdauer:</b> ?	

Untersuchungsdatum		30.08.00	25.09.00	17.10.00	
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	<b>0,52</b>	<b>0,52</b>	↓ 0,41
		$\mu$ -capture-EIA	<b>1,50</b>	↑ <b>2,06</b>	↓ <b>1,40</b>
		WB (kD)	-	-	-
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	0,11	0,20	0,15
		WB (kD)	<b>60,58,41,39</b>	41,(39)	41,(39)
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	<b>5,82</b>	↓ <b>2,96</b>	↓ <b>2,33</b>
		OspC	<b>9,93</b>	↓ <b>4,74</b>	↑ <b>6,18</b>
		DbpA	<b>6,43</b>	↓ <b>4,52</b>	↓ <b>2,51</b>
		ZSA36	1,79	1,94	1,10
	<b>IFN-<math>\gamma</math>-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	-95	-10	↑↑ <b>59</b>
		OspC	-68	-1	↑↑ <b>46</b>
		DbpA	-82	-5	↑ <b>14</b>
		ZSA36	-56	<b>32</b>	↑ <b>87</b>
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	4	-1	1
		OspC	-2	-3	0
		DbpA	-1	-2	-1
		ZSA36	-1	-2	2
		<b>Klinischer Verlauf</b>			

↑ Therapie: ↑  
**Doxycyclin 200mg/d**

<b>Patient:</b> Sch.C.	<b>Alter:</b> 22 Jahre	<b>Geschlecht:</b> männlich
<b>Diagnose:</b>	<u>Erythema migrans</u> linke Leiste (25 x 15 cm), Schmerzen linkes Bein	
<b>Zeckenstich:</b> ?	<b>Erkrankungsdauer:</b> 4 Wochen	

Untersuchungsdatum		19.07.00	16.08.00	17.10.00	20.12.00	
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	<b>1,33</b>	↓ <b>1,11</b>	↓ <b>0,51</b>	↑ <b>0,75</b>
		μ-capture-EIA	<b>13,1</b>	↓ <b>6,16</b>	↓ <b>4,16</b>	↓ <b>3,06</b>
		WB (kD)	41	n.d.	<b>41,OspC, (21)</b>	<b>41, OspC</b>
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	<b>0,55</b>	<b>0,55</b>	↓ <b>0,29</b>	<b>0,32</b>
		WB (kD)	<b>83,60, 45,41</b>	n.d.	83,41,(75,60, 45,39,OspC)	83,60,41
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	1,27	↑ <b>2,60</b>	↓ 1,57	n.d.
		OspC	1,13	↑ <b>4,26</b>	↑ <b>4,51</b>	n.d.
		DbpA	0,98	↑ <b>3,11</b>	↓ 1,57	n.d.
		ZSA36	0,81	1,60	1,47	n.d.
	<b>IFN-γ-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	3	1	-86	n.d.
		OspC	1	↑↑ <b>50</b>	↓ -76	n.d.
		DbpA	0	↑ <b>32</b>	↓ -65	n.d.
		ZSA36	0	↑ <b>21</b>	↓ -65	n.d.
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	0	-9	1	n.d.
		OspC	0	-6	2	n.d.
		DbpA	0	-3	0	n.d.
		ZSA36	0	-4	0	n.d.
	<b>Klinischer Verlauf</b>		Myalgie			

↑ Therapie: ↑  
Doxycyclin 200mg/d

<b>Patient:</b> W.E.	<b>Alter:</b> 71 Jahre	<b>Geschlecht:</b> männlich
<b>Diagnose:</b>	<u>Erythema chronicum migrans</u> rechtes Knie (20 x 30 cm), intermittierendes Grippegefühl	
<b>Zeckenstich:</b> vor 6 Monaten	<b>Erkrankungsdauer:</b> ?	

Untersuchungsdatum		17.01.00	02.02.00	24.05.00	
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	0,18	0,25	0,16
		μ-capture-EIA	n.d.	<b>1,27</b>	0,82
		WB (kD)	-	-	-
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	0,04	0,06	0,04
		WB (kD)	41, <b>pG</b>	<b>41,34,31,(60), pG</b>	41,(34,31), <b>pG</b>
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	1,33	1,65	↑ <b>2,09</b>
		OspC	0,72	<b>2,16</b>	↑ <b>2,50</b>
		DbpA	n.d.	n.d.	<b>3,69</b>
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>IFN-γ-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	<b>26</b>	n.d.	n.d.
		OspC	<b>133</b>	n.d.	n.d.
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	<b>20</b>	n.d.	n.d.
		OspC	4	n.d.	n.d.
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>Klinischer Verlauf</b>		Allgemein- symptome		

↑ Therapie: ↑  
Doxycyclin 200mg/d

<b>Patient:</b> Sch.G.	<b>Alter:</b> 57 Jahre	<b>Geschlecht:</b> männlich
<b>Diagnose:</b>	<u>Erythema chronicum migrans</u> rechte Leiste (15 x 20 cm), Arthralgie rechtes Knie und Schulter	
<b>Zeckenstich: ?</b>	<b>Erkrankungsdauer:</b> 3 Monate	

Untersuchungsdatum		06.12.99	12.01.00	10.05.00	
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	<b>0,99</b>	↓ <b>0,62</b>	↓ 0,32
		μ-capture-EIA	<b>6,79</b>	↓ <b>2,24</b>	<b>1,22</b>
		WB (kD)	41	-	-
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	<b>0,57</b>	<b>0,55</b>	↓ 0,13
WB (kD)		45	(60,41)	-	
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	1,80	1,14	1,99
		OspC	0,61	1,87	↑ <b>5,70</b>
		p83	<b>3,09</b>	n.d.	n.d.
		DbpA	n.d.	n.d.	<b>4,75</b>
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>IFN-γ-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	1	↑↑↑ <b>689</b>	-4
		OspC	2	↑↑ <b>194</b>	-9
		DbpA	n.d.	n.d.	<b>102</b>
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	3	↑↑ <b>68</b>	-1
		OspC	<b>5</b>	↑ <b>29</b>	2
		DbpA	n.d.	n.d.	3
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Klinischer Verlauf</b>		Arthralgie	Besserung	Wohlbefinden	
		↑ Therapie: ↑ Doxycyclin 200mg/d			

<b>Patient:</b> R.A.	<b>Alter:</b> 55 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b>	<u>Erythema chronicum migrans</u> rechter Ober- bis Unterschenkel	
<b>Zeckenstich: ?</b>	<b>Erkrankungsdauer:</b> 2 Monate	

Untersuchungsdatum		27.10.99	10.11.99	12.01.00	10.05.00	
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	<b>0,69</b>	<b>0,57</b>	0,39	0,31
		μ-capture-EIA	<b>1,26</b>	<b>1,13</b>	n.d.	n.d.
		WB (kD)	OspC	n.d.	OspC	41, OspC
		<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	<b>1,05</b>	<b>0,87</b>	↓ <b>0,69</b>
		WB (kD)	<b>41,31, OspC</b>	n.d.	OspC	41, OspC
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	n.d.	n.d.	<b>9,22</b>	↓ 1,90
		OspC	n.d.	n.d.	<b>18,09</b>	↓ <b>4,20</b>
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	1,99
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>IFN-γ-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	n.d.	n.d.	3	↑ <b>17</b>
		OspC	n.d.	n.d.	<b>26</b>	↓ <b>16</b>
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	2
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	n.d.	n.d.	<b>15</b>	↓ -1
		OspC	n.d.	n.d.	3	2
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	0
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<b>Klinischer Verlauf</b>					
		↑ Therapie: ↑ Doxycyclin 200mg/d				

<b>Patient:</b> K.-G.D.	<b>Alter:</b> 41 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b>	Erythema chronicum migrans rechter Unterschenkel, Rückenschmerzen / Radikulitis	
<b>Zeckenstich:</b> vor ca. 1 Jahr	<b>Erkrankungsdauer:</b> ?	

Untersuchungsdatum '00		05.01.00	15.03.00	17.05.00	15.11.00	
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	<b>1,09</b>	<b>0,48</b>	0,26	0,24
		$\mu$ -capture-EIA	<b>1,29</b>	<b>↓1,09</b>	0,82	n.d.
		WB (kD)	-	n.d.	(41,OspC)	41,OspC
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	<b>0,52</b>	<b>0,46</b>	<b>0,24</b>	0,19
WB (kD)		<b>75,60,41, OspC,19</b>	n.d.	60,41,19, (75,OspC)	<b>75,60,41,3431, OspC</b>	
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	n.d.	0,16	<b>4,24</b>	↓1,69
		OspC	n.d.	0,47	<b>12,74</b>	<b>6,2</b>
		DbpA	n.d.	0,28	<b>2,33</b>	↓1,67
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	0,33
	<b>IFN-<math>\gamma</math>-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	n.d.	-31	-3	-11
		OspC	n.d.	4	<b>↑95</b>	-2
		DbpA	n.d.	-30	-3	-9
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	-9
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	n.d.	n.d.	0	-6
		OspC	n.d.	1	0	-7
		DbpA	n.d.	0	0	-5
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	-6
<b>Klinischer Verlauf</b>		Radikulitis	Persistenz	=	=	

↑Therapie:  
Doxycyclin 200mg/d 5d /  
Ceftriaxon 2g i.v.

↑NSAR

<b>Patient:</b> W.H.	<b>Alter:</b> 61 Jahre	<b>Geschlecht:</b> männlich
<b>Diagnose:</b>	Acrodermatitis chronica atrophicans, Radikulitis linkes Bein mit massiver Schwellung und livider Verfärbung, subfebrile Temperatur	
<b>Zeckenstich:</b> vor 6 Monaten	<b>Erkrankungsdauer:</b> ?	

Untersuchungsdatum		22.08.00	20.09.00	09.10.00	29.11.00	
<b>Direktnachweis</b>	PCR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	Kultur	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
<b>Serologie</b>	<b>IgM-Nachweis</b>	ELISA	<b>0,71</b>	<b>1,08</b>	<b>↓0,77</b>	<b>0,87</b>
		$\mu$ -capture-EIA	0,86	0,94	0,83	0,61
		WB (kD)	41	n.d.	n.d.	60,41, OspC
	<b>IgG-Nachweis</b>	ELISA	<b>1,5</b>	<b>↑1,67</b>	<b>↓1,36</b>	<b>↓1,11</b>
WB (kD)		<b>60,41,34, OspC,(29)</b>	n.d.	n.d.	<b>60,41,34,22</b>	
<b>T-Zellantwort</b>	<b>Proliferation</b> (Stimulationsindex)	pG	n.d.	n.d.	n.d.	0,75
		OspC	n.d.	n.d.	n.d.	0,92
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	1,06
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	0,83
	<b>IFN-<math>\gamma</math>-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	n.d.	n.d.	n.d.	-4
		OspC	n.d.	n.d.	n.d.	<b>36</b>
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	<b>12</b>
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	-6
	<b>IL-4-Sekretion</b> (spots abzüglich background)	pG	n.d.	n.d.	n.d.	-8
		OspC	n.d.	n.d.	n.d.	-12
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	-10
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	-8
<b>Klinischer Verlauf</b>				Taubheitsgefühl Gesicht, Arm, Stamm, Bein li.		

↑Therapie:↑  
Doxycyclin 200mg/d

↑Therapie:  
Doxycyclin 200mg/d

<b>Patient:</b> W.L.	<b>Alter:</b> 40 Jahre	<b>Geschlecht:</b> weiblich
<b>Diagnose:</b>	<u>Anetodermie</u> (Erythem Ober- und Unterarm bds., interskapulär atrophische Fältelung der Haut)	
<b>Zeckenstich:</b> vor 5 Monaten	<b>Erkrankungsdauer:</b> ?	

Untersuchungsdatum		29.09.99	15.12.99	23.02.00	29.03.00	27.09.00	
<b>Serologie</b>	IgM-Nachweis	ELISA	<b>0,82</b>	<b>0,67</b>	<b>0,71</b>	<b>0,65</b>	<b>0,89</b>
		μ-capture-EIA	<b>1,19</b>	<b>1,49</b>	<b>1,72</b>	<b>1,47</b>	<b>1,31</b>
		WB (kD)	60	(60,30,OspC)	-	n.d.	n.d.
	IgG-Nachweis	ELISA	0,04	0,04	0,08	0,04	0,10
		WB (kD)	41	-	41	n.d.	n.d.
<b>T-Zellantwort</b>	Proliferation (Stimulationsindex)	pG	n.d.	<b>3,18</b>	↓ 1,26	1,22	n.d.
		OspC	n.d.	<b>3,07</b>	↓ 1,04	0,56	n.d.
		p83	n.d.	<b>4,06</b>	n.d.	n.d.	n.d.
		DbpA	n.d.	n.d.	1,60	n.d.	n.d.
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	IFN-γ-Sekretion (spots abzüglich background)	pG	n.d.	<b>263</b>	n.d.	n.d.	n.d.
		OspC	n.d.	-118	n.d.	n.d.	n.d.
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	IL-4-Sekretion (spots abzüglich background)	pG	n.d.	-2	n.d.	n.d.	n.d.
		OspC	n.d.	<b>8</b>	n.d.	n.d.	n.d.
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Klinischer Verlauf</b>		Haut- atrophie	Persistenz	=	=	=	

↑ Therapie: ↑  
Doxycyclin 200mg/d

<b>Patient:</b> H.-R.A.	<b>Alter:</b> 42 Jahre	<b>Geschlecht:</b> männlich
<b>Diagnose:</b>	<u>Arthralgie</u> bei <u>Z.n. EM '93</u> , vorbehandelt mit Doxycyclin / Rocephin	
<b>Zeckenstich:?</b>	<b>Erkrankungsdauer:</b> 2 Jahre	

Untersuchungsdatum		24.04.94	22.04.96	25.03.98	18.04.00	05.07.00	04.10.00	
<b>Serologie</b>	IgM-Nachweis	ELISA	<b>1,18</b>	↓ <b>1,06</b>	↓ <b>0,8</b>	↓ <b>1,08</b>	↑ <b>1,09</b>	↑ <b>1,15</b>
		μ-capture-EIA	n.d.	<b>2,85</b>	↑ <b>2,66</b>	↓ <b>5,22</b>	↓ <b>4,06</b>	↓ <b>2,49</b>
		WB	n.d.	<b>41, OspC</b>	-	<b>75,60,41, OspC, (21)</b>	<b>75,60,41, OspC, (21)</b>	<b>75,60,41, OspC, 19</b>
	IgG-Nachweis	ELISA	<b>2,03</b>	↓ <b>1,90</b>	↑ <b>1,83</b>	↓ <b>1,43</b>	<b>1,44</b>	↑ <b>1,64</b>
		WB	n.d.	<b>83,75,60,58, 45,41,39,37, 31,OspC, &lt;18</b>	<b>83,75,60,58, 45,41,39,37, 31, OspC, &lt;18</b>	<b>29,19,75,60, 41,39,OspC</b>	<b>75,60,4139, 29, OspC</b>	<b>75,60,45, 41,39,29, OspC, 21</b>
<b>T-Zellantwort</b>	Proliferation (Stimulationsindex)	pG	n.d.	n.d.	n.d.	<b>3,04</b>	↓ 1,57	n.d.
		OspC	n.d.	n.d.	n.d.	<b>5,88</b>	↓ <b>3,92</b>	n.d.
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	<b>4,38</b>	↓ 1,42	n.d.
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,56	n.d.
	IFN-γ-Sekretion (spots abzüglich background)	pG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	n.d.
		OspC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1	n.d.
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-3	n.d.
	IL-4-Sekretion (spots abzüglich background)	pG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	n.d.
		OspC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.
		DbpA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1	n.d.
		ZSA36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	n.d.
	<b>Klinischer Verlauf</b>		Arthralgie				Besserung	Wohl- befinden

↑ Therapie: ↑  
Doxycyclin 200mg/d

## 7.2 Arbeitsanleitung

## 7.2.1 Zellisolierung

VersuchsprotokollI. Zellisolierung (frei nach Yvonne Bauer)

Patient: \_\_\_\_\_ Geburtsdatum: \_\_\_\_\_

Besonderheiten: \_\_\_\_\_

1. Zellzählung: \_\_\_\_\_ x 20000 = \_\_\_\_\_ Zellen/ml = \_\_\_\_\_ Zellen/ml

2. Zellzählung: \_\_\_\_\_ x 20000 = \_\_\_\_\_ Zellen/ml = \_\_\_\_\_ Zellen/ml

→ Aufnahme in \_\_\_\_\_ ml Medium + \_\_\_\_\_ µl Schafserythrozyten

→ eingestellt auf \_\_\_\_\_ Zellen/ml

Datum	Aussehen der Zellen		Weiterverarbeitung der Zellen	
	Monozyten	T-Lymphozyten	Monzyten	T-Lymphozyten
Tag 0:				
Tag 1:				
Tag 2:				
Tag 3:				
Tag 4:				
Tag 5:				
Tag 6:				

II. Antigenstimulation

Datum: \_\_\_\_\_

(benötigte dendritische Zellen\*:  $9 \times 10^5$ )Zellzählung DZ: \_\_\_\_\_ x 20000 = \_\_\_\_\_ x  $10^4$  Zellen/ml = \_\_\_\_\_ x  $10^5$  Zellen/mlZellsuspension in **2,5 ml Medium** aufnehmen mit je **5µl Zytokin** (GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) und Minprostin (PG E<sub>2</sub>)III. T-Zell-Stimulation

Datum: \_\_\_\_\_

(benötigte T-Zellen\*:  $52,5 \times 10^5$ )Zellzählung TZ: \_\_\_\_\_ x 20000 = \_\_\_\_\_ x  $10^4$  Zellen/ml = \_\_\_\_\_ x  $10^5$  Zellen/ml  
= \_\_\_\_\_ x  $10^5$  Zellen/100µl : 2 → in \_\_\_\_\_ ml Medim =  $2 \times 10^5$ 

Zellen/100µl

gezählte DZ: \_\_\_\_\_ x  $10^4$  : 6 Antigene = \_\_\_\_\_ x  $10^4$  : 20 → in \_\_\_\_\_ ml Medim =  $1 \times 10^4$  Zellen/50µlfür 2. und 3. Stimulation (Elispot)  $4 \times 10^4$  dendritische Zellen pro Antigen (200µl)  
wegfrieren\* für Proliferationsassay (3-fach-Ansatz) und für Elispot (2-fach-Ansatz) mit 2 Restimulierungen für 2 Zytokine (IFN- $\gamma$ , IL-4) für 5 Antigene und negative Kontrolle

### 7.2.1.1 Monozytenpräparation

1. in 4 Röhrchen je 15 ml Ficoll mit ca. 15 ml Blut vorsichtig überschichten
2. Zentrifugieren 30 min bei 1750 rpm ohne Bremse
3. Überstand abnehmen und verwerfen
4. Ring abnehmen, in ein neues 50 ml Röhrchen überpipettieren und mit PBS auffüllen
5. Zentrifugieren 10 min bei 1200 rpm ohne Bremse
6. Überstand abkippen, Pellet in 10 ml ACK-Lyse-Puffer resuspendieren und nach ca. 5 min. mit PBS abstoppen
7. Zentrifugieren 10 min. bei 1200 rpm ohne Bremse
8. Pellet in 10 ml PBS lösen
9. Zellzählung: 50 µl Trypanblau (0,5%) + 50 µl Zellsuspension in Neubauerzählkammer (Zellzahl ins Protokoll Zellisolierung eintragen)
10. verbleibende Zellsuspension mit PBS auf 50 ml auffüllen
11. Zentrifugieren 10 min. bei 1200 rpm ohne Bremse
12. Pellet in 10 ml Vollmedium suspendieren und für 1 h in einer großen Petrischale im Brutschrank (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) inkubieren → **1. Monozytenadhärenz**
13. Zellsuspension aus der Petrischale abnehmen, mit 10 ml PBS gut nach spülen und in ein neues Röhrchen geben
14. die in der Petrischale verbleibenden Zellen mit neuen 10ml VM versorgen und mit IL-4 (500 U/ml) und GM-CSF (100 µg/ml) je 10 µl (1 µl/ml) stimulieren
15. abgenommene Zellsuspension zentrifugieren 10 min. bei 1200 rpm ohne Bremse
16. Pellet in 10 ml PBS lösen
17. Zellzählung: 50 µl Trypanblau (0,5%) + 50 µl Zellsuspension in Neubauerzählkammer (Zellzahl ins Protokoll Zellisolierung eintragen)
18. verbleibende Zellsuspension mit PBS auf 50 ml auffüllen
19. Zentrifugieren 10 min. bei 1200 rpm ohne Bremse
20. Zellsuspension auf  $0,5 \times 10^7$  Zellen/ml VM einstellen (siehe Protokoll Zellisolierung)
21. resuspendierte Zellen + ...VM + ...10% SRCB-Lösung in 50ml Röhrchen
22. Zentrifugieren 10 min. bei 600-800 rpm ohne Bremse
23. 45 min. bei Raumtemperatur stehenlassen
24. Pellet auf „drehender Wippe“ aufmischen und mit 15 ml Ficoll unterschichten
25. Zentrifugieren 30 min. bei 1750 rpm ohne Bremse
26. Überstand verwerfen, Ring abnehmen, in ein neues Röhrchen überpipettieren und mit PBS auf 50 ml auffüllen
27. Zentrifugieren 10min. bei 1200 rpm ohne Bremse
28. Pellet in 4 ml VM aufnehmen, in eine Petrischale geben und 1 h im Brutschrank inkubieren → **2. Monozytenadhärenz**
29. Zellsuspension aus der Petrischale abnehmen, mit 10 ml PBS gut nach spülen und verwerfen
30. die in der Petrischale verbleibenden Zellen mit neuen 4 ml VM versorgen und mit IL-4 (500 U/ml) und GM-CSF (100 µg/ml) je 4 µl (1 µl/ml) stimulieren

### 7.2.1.2 T-Zell-Isolierung

31. verbleibendes Pellet in 10 ml ACK-Lyse-Puffer resuspendieren und nach ca. 5 min. mit PBS abstoppen
32. Zentrifugieren 10 min. bei 1200 rpm ohne Bremse
33. Pellet resuspendieren und mit PBS auf 50 ml auffüllen
34. Zentrifugieren 10 min. bei 1200 rpm ohne Bremse
35. Pellet in 10 ml VM aufnehmen und in eine Petrischale geben
36. 1 Tag im Brutschrank inkubieren

### 7.2.1.3 Kryokonservierung der Zellen (-70°C)

T-Zellen nach 1 Tag. Inkubationszeit wegfrieren

1. Zellsuspension aus der Petrischale abnehmen, Petrischale abspateln, mit 10 ml PBS gut abspülen und in ein neues Röhrchen geben
2. Zentrifugation 10 min. bei 1200 rpm ohne Bremse
3. Überstand abkippen und Pellet in 10 ml PBS lösen
4. Zellzählung: 50 µl Trypanblau (0,5%) + 50 µl Zellsuspension in Neubauerzählkammer
5. verbleibende Zellsuspension abzentrifugieren 10 min. bei 1200 rpm ohne Bremse
6. Pellet in 500 µl FCS (Fötale Kälberserum, inaktiviert) lösen
7. 500 µl DMSO (20%) (10%) in ein Kryo-Tube vorlegen, Zellsuspension zugeben und sofort auf Eis stellen

## 7.2.2 Elispot

### 1. Tag: Coating der MAIP-Platte

- je 50µl Erstantikörper (monoclonal 10µg/ml) in die benötigten wells pipettieren
- Inkubation bei 4°C über Nacht (24h)

### 2. Tag: Zugabe der cytokinproduzierenden TZ

- gecoatete MAIP-Platte 4x mit 200 µl/well PBS waschen, wobei erst nach je 15 Minuten dekantiert wird.
- Zum Blockieren 150 µl/well PBS + 10% BSA zusetzen
- Inkubation 1 h bei 37°C
- Blockiermedium aus der Platte dekantieren und Zellsuspension aus der Restimulation (200µl/well) überpipettieren
- Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht (ca. 20h)

### 3. Tag: Entwicklung der Spots

- Platten 6x mit PBS/Tween 20 0,05% waschen
- Zugabe von 100µl/well Zweitantikörper (biotiniert)
- Inkubation für 2h bei 37°C, 15 Minuten vor Ende Avidin-Peroxidase-Komplex ansetzen:  
1 gtt. Reagenz A und 1 gtt. Reagenz B in 10 ml PBS/Tween 20 0,1% mischen
- Platten 6x mit PBS/Tween 20 0,05% waschen
- Zugabe von 100µl/well Avidin-Peroxidase-Komplex

- Inkubation 1h bei Raumtemperatur
- Ansetzen der AEC-Lösung:
- Acetatpuffer ansetzen:
- 46,9 ml H<sub>2</sub>O
- + 4,6 ml 0,2 N Essigsäure-Lösung (11,33ml Essigsäure 96% (Merck-M: 60,05 g/mol) in 1l)
- + 11 ml 0,2 N Na-Acetat-Lösung (16,4g Na-Acetat (H<sub>2</sub>O frei - M: 82,03 g/mol) in 1l)
- 1 Tbl. AEC in 2,5 ml Dimethylfomamid auflösen
- 47,5 ml Acetatpuffer ergänzen
- Lösung filtrieren
- zu den resultierenden 50 ml 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% hinzufügen (erst kurz vor Gebrauch ergänzen!)
- 3x mit PBS/Tween 20 0,05% und 3x mit PBS waschen
- Zugabe der AEC-Lösung 100µl/well für 4 min.
- Reaktion unter fließendem destiliertem Wasser abstoppen
- Rückseite gut abtrocknen und Platte über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß trocknen lassen

### 7.2.3 Westernblot

- Westernblotstreifen 2h bei Raumtemperatur blocken mit TBS+5% Magermilchpulver
- Streifen 5 min. auf der Wippe mit Waschpuffer 2\* waschen
- Serum 1:10 oder 1:5 mit Waschpuffer 2\* verdünnen und auf die Streifen geben
- Inkubation auf der Wippe über Nacht bei + 4°C
- Streifen je 5 min. in folgender Reihenfolge mit 2 ml Waschpuffer auf der Wippe waschen
  - Waschpuffer 2\*
  - Waschpuffer 3\*
  - Waschpuffer 3\*
  - Waschpuffer 1\*
- Goat-Anti-Human-IgG (AP-konjugiert) 1:1400 mit Waschpuffer 2\* verdünnen (1,5µl Ak + 2100µl Waschpuffer 2\*) und auf die Streifen geben
- Inkubation 1h bei Raumtemperatur
- Streifen je 5 min. in folgender Reihenfolge mit 2 ml Waschpuffer auf der Wippe waschen
  - Waschpuffer 2\*
  - Waschpuffer 3\*
  - Waschpuffer 3\*
  - Waschpuffer 1\*
- Inkubation mit Substrat (BCIP/NBT) bis bei der positiven Kontrolle die Bande sichtbar entwickelt ist
- Abstoppen mit Aqua dest. und trocknen der Streifen

\* Waschpuffer 1: TBS

Waschpuffer 2: TBS + 3% Magermilchpulver (100ml TBS + 3g Magermilchpulver)

Waschpuffer 3: TBS + 0,2% Tween 20 (100ml TBS + 200µl Tween 20)

### 7.3 Materialliste

#### Antigene

- Tetanus Toxoid Chiron Behring
- pG Labor Wallich
- Osp C Labor Wallich
- p 83 Labor Wallich
- Dbp A Labor Wallich
- ZSA36 Labor Wallich

#### Antikörper

- Antikörper Maus-anti-Mensch IFN- $\gamma$  (monoklonal/clone1-D1K purified) Mabtech
- Antikörper Maus-anti-Mensch IL-4 (monoklonal/clone 82.4 purified) Mabtech
- biotinylierter Antikörper Maus-anti-Mensch IFN- $\gamma$  (7-B6-1) Mabtech
- biotinylierter Antikörper Maus-anti-Mensch IL-4 (clone 12.1) Mabtech
- Vectastain ABC-Kit Elite PK 6100 Standard (AP-konjugierter Anti Maus-AK) Vector
- Antikörper-Ziege-anti-Mensch-IgG (AP-konjugiert) Sigma

#### Chemikalien

- AEC-Substrat (3-Amino-9-Ethylcarbazol) Sigma
- Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) 99,99% Aldrich
- BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chromo-Indoylphosphat) Liquid Substrate System Sigma
- Bovine Serum Albumine (BSA) Sigma
- Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma
- Essigsäure 0,2 N Merck
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,1mM Merck
- Ficoll-Hypaque-Lösung (Pancoll) Dichte 1,077 g/l PAN Systems
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% Merck
- Kaliumchlorid (KCl) Merck
- Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>) Aldrich
- Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Merck
- Magermilchpulver Glücksklee
- N,N-Dimethylfomamid Merck
- Natriumacetat 0,2 N Merck
- Natriumchlorid (NaCl) Merck
- Natronlauge (NaOH) Merck
- Salzsäure (HCl) Merck
- PBS/Tween 20 0,05% Sigma
- PHA lyophilisiert, steril Sigma
- Phosphat Buffered Saline (PBS) Gibco
- Trypanblau 5% Sigma

#### Geräte

- Brutschrank Heraeus
- Elispot-Reader AID
- KS ELISPOT, Release 4.3 Zeiss
- Laminar Flow Heraeus
- Mehrkanalpipette Eppendorf
- Filter Mate Cell Harvester Packard
- Mikroskop Zeiss
- pH-Meter WTW
- Pipetboy Integra Bioscience
- Pipetten P1000, P200, P20, P10 Eppendorf
- $\beta$ -Counter (Gasszintilationszähler) Wallac
- Wasserbad GFC

- Wippe EMBL
- Zählkammer Neubauer W. Schreck GmbH
- Zentrifuge (Rotina) Heraeus

**Lösungen**

- TBS-Puffer (pH 7,4): 100 mmol Tris (12,15 g)  
137 mmol NaCl (8 g)  
3 mmol KCl (0,2 g)  
in 1000 ml Aqua bidest  
  
pH-Einstellung mit HCl
- ACK-Lysepuffer (pH 7,27): 155 mM NH<sub>4</sub>Cl (4,145 g)  
10 mM KHCO<sub>3</sub> (0,5 g)  
0.1 mM EDTA (0,186 g)  
in 500 ml Aqua bidest  
  
pH-Einstellung mit HCl und/oder NaOH
- PBS-Puffer: 137 mM NaCl  
2.7 mM KCl  
4.0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
in 500ml Aqua bidest
- ELISPOT-Waschpuffer: 1x PBS  
0,05 % Tween 20  
1 % BSA
- ELISPOT-Blockierpuffer: 1x PBS mit 10 % BSA

**Membranen, Filter, Verbrauchsmaterialien**

- 96-well Immobilon-P-Elispot-Platte (MAIP) Millipore
- 96-well Mikrotiter-HA-Platte mit Nitrozellulose-Boden Millipore
- 96-well-Mikrotestplatten Sarstedt
- Combitips plus 5 ml long Biopur/Eppendorf
- Glas Fiber-Filters, self-Aliguing, RG (Size 6,3 in x 3,8 in) Packard
- Pipetten steril, einzeln verpackt 25, 10, 5 ml Greiner
- PP-Röhrchen 50, 15 ml Greiner
- Sterifilter Filtropur: 0,2 µm Sarstedt
- Sterifiltertips 1000, 500, 20, 10 µl Biozym
- Sterilfiltergerät 500, 250 ml:: 0,2µm Schubert
- Vacutainer-CPT-Röhrchen mit Na-Heparin Becton Dickensen
- Zellkulturschalen 20, 10, 5 ml Falcon

**Radioaktive Substanzen**

- 3H-Thymidin (1mC/ml) Amersham Pharmacia Biotech UK Limited

**Zellkulturmedium und Zusätze**

- RPMI 1640 (mit 2g/l NaHCO<sub>3</sub>) Bio Whittaker
- L-Glutamin (200 mM) Bio Whittaker
- FCS PAN Systems
- rh-GM-CSF R&D-Systems
- Leukomax (rh-GM-CSF) Novartis/Essex Pharma
- rh-IL-4 Promocell
- Minprostin E2 0,5 ml (5mg/0,5ml) (Dinoproston) Novartis/Essex Pharma
- rh-TNF-α Strathmann Biotec
- rh-IL-1β Strathmann Biotec
- Zellkulturmedium: 500 ml RPMI 1640  
50 ml FCS 10% oder 5 ml autologes Plasma 1%  
5 ml L-Glutamin

**Zellen**

- Schaf-Erythrozyten (Schafblut in Alsever-Lösung)

ICN Biomedicals GmbH

**Kits**

- IFN- $\gamma$ -ELISA-Kit
- IL-4-ELISA-Kit

Coulter  
Coulter

**Danksagung**

Mein Dank gilt Fr. Prof. Dr. H. Hofmann, die mir ein sehr interessantes Thema für meine Dissertationsarbeit gab und es mir ermöglichte den experimentellen Teil dieser Arbeit unter einmaligen Bedingungen in ihrem Labor durchzuführen. Danke für die vielen Ideen, Anregungen und die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Hr. Prof. Dr. Dr. J. Ring bedanken für die Möglichkeit an seiner Klinik meine Doktorarbeit durchzuführen.

Danke an Yvonne Bauer und Reiner Wallich, die durch Ihre Erfahrungen, den regen Gedankenaustausch und die Bereitstellung ausschlaggebender Materialien, einen unschätzbaren Beitrag an dieser Arbeit geleistet haben.

Ein ganz großes Dankeschön an Fr. Gudrun Prangenberg, die mir in jeder Situation mit Ihrem fachmännischen Rat und mehr noch mit Tat zur Seite stand und mit Ihrer unendlichen Geduld und Ihrem Ideenreichtum so manches scheinbar unüberwindbare Problem zu meistern half. Danke für den außergewöhnlichen Einsatz, die Motivation und die Freundschaft.

Herzlichen Dank an Wolfgang Agerer, der mir über so manche Computerkrise hinweghalf und die technische Umsetzung dieses Schriftstückes ermöglichte.

Einen ganz lieben Dank an Bastian Höhl, der mir oft neuen Mut zusprach und meine Perspektive oft wieder in die richtige Position gerückt hat.

Ebenso ein riesiges Dankeschön an meine Familie, die mich immer ideell, aber auch finanziell unterstützt hat und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinem Vater ein ganz besonderer Dank dafür, dass er mir immer den Raum gegeben hat, mich wieder zu besinnen.

Meiner Mutter ein großes Dankeschön, für's Zuhören und die Motivation.

Ein ganz liebes Dankeschön an meine Schwester Anja, die einfach immer für mich da war.

Herzlichen Dank auch an Barbara Höhl für's verständnisvolle und mitfühlende Zuhören. Ebenso an alle nicht namentlich genannten Freunde, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben ein ganz großes

**Danke!**