

Aus dem Zentrum der Hygiene  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Volker Brade

Subtypisierung von PCR-Amplifikaten des Flagellin-Gens  
von *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose,  
mittels Dot blot-Hybridisierung

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Radha Rani Bauer  
aus Stuttgart

Frankfurt am Main, 2003



Dekan:	Prof. Dr. med. J. Pfeilstifter
Referent:	Prof. Dr. med. V. Brade
Koreferent:	Prof. Dr. med. H. Schöfer
Tag der mündlichen Prüfung:	13. Mai 2004



## **Danksagung**

Allen, die zum Werden meiner Arbeit beigetragen haben, danke ich ganz herzlich:

Herrn Prof. Dr. med. V. Brade für die Überlassung des Themas

Herrn Dr. med. Jörg Schulze für die Einführung in die Thematik

Herrn PD Dr. phil. nat. Peter Kraiczy für die hilfsbereite Weiterführung der Betreuung und die freundliche wissenschaftliche Bereicherung bei der schriftlichen Ausfertigung

Frau Christa Hanssen-Hübner für die freundliche Aufnahme und Einarbeitung im Labor

Dem Ev. Studienwerk Villigst für die Ermöglichung meines Medizinstudiums

Allen Ungenannten, die mich während der Fertigstellung dieser Arbeit mit so viel Geduld und Hilfsbereitschaft begleitet haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
1. DIE LYME-BORRELIOSE .....	9
1.1 Beschreibung und Entdeckung.....	9
1.2 Epidemiologie .....	10
1.3 Klinik.....	11
1.4 Diagnostik .....	14
1.5 Therapie.....	16
2. CHARAKTERISTIKA DES ERREGERS .....	18
2.1 Morphologie und Kulturbedingungen.....	18
2.2 Taxonomie .....	18
2.3 Flagellin-Gen.....	19
3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	21
<b>II. MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	<b>22</b>
1. MATERIALIEN .....	22
1.1 Puffer und Lösungen.....	22
1.2 Nährmedium für Borrelien.....	25
1.3. Oligonukleotide .....	25
1.4. Chemikalien .....	28
1.5. Geräte .....	29
1.6 Verschiedenes .....	30
1.7. Borrelienstämme.....	31
2. METHODEN .....	33
2.1 Kultivierung von Borrelien.....	33
2.2 Gewinnung von Borrelien-DNA durch osmotische Lyse.....	33
2.3 Amplifikation des Flagellin-Gens mittels PCR .....	33
2.4 Nachweis des amplifizierten Flagellin-Gens mittels Agarosegelelektrophorese .....	35
2.5 Quantifizierung des amplifizierten Flagellin-Gens .....	35
2.5.1 Computerunterstützte DNA-Quantifizierung .....	35
2.5.2 DNA-Quantifizierung mittels Spektralphotometrie .....	36
2.6 Dot blot-Hybridisierung .....	36

<b>III. ERGEBNISSE</b> .....	<b>39</b>
1. GENERIERUNG VON BORRELIEN-AMPLIFIKATEN BASIEREND AUF DEM FLAGELLIN-GEN .....	39
2. DOT BLOT-HYBRIDISIERUNG VON PCR-AMPLIFIKATEN DES FLAGELLIN-GENS .....	42
2.1 <i>Optimierung der Sensitivität durch DNA-Fixierung</i> .....	45
2.2 <i>Ermittlung der geeigneten DNA-Konzentration</i> .....	45
2.3 <i>Optimierung der Ionenkonzentration</i> .....	47
2.4 <i>Optimierung der Temperaturbedingungen</i> .....	47
2.4.1 <i>Austestung des Temperaturbereichs</i> .....	47
2.4.2 <i>Optimierung der Waschttemperatur</i> .....	50
2.4.3 <i>Sondenspezifische Optimierungen</i> .....	54
3. SUBTYPISIERUNG VON TYPISIERTEN UND NICHT-CHARAKTERISIERTEN <i>B. BURGENDORFERI</i> S. L.- STÄMMEN .....	57
<b>IV. DISKUSSION</b> .....	<b>63</b>
1. POLYMERASE-KETTENREAKTION IN DER DIAGNOSTIK DER LYME-BORRELIOSE .....	63
1.1 <i>Inhibition der PCR und Probenaufbereitung</i> .....	63
1.2 <i>Problematik der Amplifikation</i> .....	64
1.3 <i>Sensitivität und Kontaminationsgefahr</i> .....	65
1.4 <i>Wahl der Zielsequenz</i> .....	66
2. DOT BLOT-HYBRIDISIERUNG .....	69
2.1 <i>Wahl der geeigneten Membran und Einfluß der Fixationsmethode auf die Hybridisierung</i> .....	69
2.2 <i>Wahl der Digoxigenin-Markierung</i> .....	70
2.3 <i>Wahl der Hybridisierungs- und Waschttemperatur im Literaturvergleich</i> .....	71
2.4 <i>Nachweis des Flagellin-Gens mittels DNA-DNA-Hybridisierungstechnik</i> .....	73
2.5 <i>Zeitlicher Aufwand und Zuverlässigkeit der Methode</i> .....	77
2.6 <i>Vergleichsanalyse der Hybridisierung mit der PFGE</i> .....	78
3. GENO- UND PHÄNOTYPISCHE HETEROGENITÄT DES <i>B. BURGENDORFERI</i> S. L.-KOMPLEXES UND IHRE DIFFENZIERUNGSMETHODEN .....	78
3.1 <i>Genotypische Subtypisierungsmethoden</i> .....	79
3.2 <i>Phänotypische Subtypisierungsmethoden</i> .....	79
4. EPIDEMIOLOGIE UND ORGANOTROPIE-HYPOTHESE .....	81

<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>84</b>
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>85</b>
<b>VII. ANHANG</b> .....	<b>97</b>
1. NUKLEOTID-SEQUENZ DES FLAGELLIN-GENS VON <i>B. BURGDORFERI</i> S.S.....	97
2. ABKÜRZUNGEN .....	98
3. LEBENSLAUF .....	99
4. EHRENWÖRTLICH ERKLÄRUNG.....	100

# I. Einleitung

## 1. Die Lyme-Borreliose

### 1.1 Beschreibung und Entdeckung

Die humanpathogenen Bakterien des *Borrelia burgdorferi*-Komplexes sind die Erreger der Multisystem-Erkrankung Lyme-Borreliose. Zahlreiche klinische Manifestationen waren lange Zeit vor der Entdeckung des Erregers bereits bekannt. 1883 erfolgte die erste Publikation von *Buchwald*, der die „differenzierte ideopathische Hautatrophie“, die heute als *Acrodermatitis chronica atrophicans* bekannt ist, beschrieb [Buchwald, 1883]. Der schwedische Dermatologe *Afzelius* berichtet 26 Jahre später über ein „wahrscheinlich durch Zecken hervorgerufenes Erythema migrans“ [Afzelius, 1909]. In den folgenden Jahren wurden weitere Erstbeschreibungen veröffentlicht. Doch erst 1976 gelang ein entscheidender Durchbruch, als der Rheumatologe *Steere* eine Häufung von 35 Fällen von juveniler Arthritis in der Umgebung Stadt Old-Lyme in Connecticut, USA untersuchte. Epidemiologische und klinische Studien zeigten ein endemisches Auftreten der Arthritis in dieser Region [Steere *et al.*, 1977]. *Steere* nannte die Gelenkerkrankung „Lyme-Arthritis“. Den eigentlichen Erreger entdeckte *Burgdorfer* 1982 bei einer Suche nach Rickettsien in der Zecke *Ixodes persulcatus* [Burgdorfer *et al.*, 1982; Burgdorfer, 1984]. Die Spirochäte wurde aufgrund ihrer Morphologie zu den Borrelien gezählt und nach ihrem Erstbeschreiber *Borrelia burgdorferi* benannt [Hyde und Johnson, 1984].

In den darauffolgenden Jahren gelang es mehreren europäischen und nordamerikanischen Arbeitsgruppen, Borrelien aus Haut, Blut und Liquor erkrankter Patienten zu isolieren [Preac-Mursic *et al.*, 1986; Craft *et al.*, 1986; Jaulhac *et al.*, 1991; Kramer *et al.*, 1991; Berger *et al.*, 1992; Kuiper *et al.*, 1994]. Dabei wurde erkannt, dass *Burgdorfer* lediglich eine Borrelien-Genospezies entdeckt hatte. Diese wurde als *Borrelia (B.) burgdorferi* sensu stricto bezeichnet und mit anderen Genospezies, z.B. den humanpathogenen *B. garinii* und *B. afzelii*, als *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex zusammengefaßt.

## 1.2 Epidemiologie

Die Lyme-Borreliose ist die am häufigsten durch Arthropoden übertragene Zoonose in Europa, Nordamerika und anderen Regionen der Erde mit gemäßigttem Klima [Schmid, 1985; Steere, 1989]. Die bedeutendsten Vektoren sind verschiedene Schildzeckenspezies: in Westeuropa *Ixodes ricinus*, auf dem nordamerikanischen Kontinent *Ixodes persulcatus*, *Ixodes scapularis* und *Ixodes pacificus* und in Osteuropa *Ixodes persulcatus* [Schmid, 1985; Wilske *et al.*, 1987; Picken *et al.*, 1995; Nohlmans *et al.*, 1995; Scheibe *et al.*, 1998]. *Ixodes*-Zecken lauern ihren Wirten in bodennahen Vegetationen wie Gräsern und niedrigen Büschen auf. Beim Stich mit dem Hygrostom überträgt die infizierte Zecke Borrelien mit ihrer Speicheldrüsenflüssigkeit oder dem regurgitiertem Verdauungsbrei. Dabei können mehrere Borrelien-Genospezies durch einen Stich übertragen werden [Burgdorfer, 1989; Nadal *et al.* 1989; Wienecke *et al.*, 1994; Demaerschack *et al.*, 1995; Lebech *et al.*, 1998; Lebech, 2002].

Während in den USA endemische Herde regional begrenzt entlang der Atlantikküste und im Mittelwesten bestehen, kann *B. burgdorferi* aus Zecken in ganz Deutschland isoliert werden [Wilske *et al.*, 1987; Asbrink und Hovmark, 1993]. Je nach dem Entwicklungsstadium der Zecke bewegt sich die Durchseuchung von *Ixodes ricinus* mit *B. burgdorferi* in Deutschland zwischen 3% und 34% [Wilske *et al.*, 1987]. Die Übertragung von *B. burgdorferi* auf den Menschen erfolgt während der Blutmahlzeit der Zecke. Dabei korreliert die Übertragungsrate mit der Dauer der Blutmahlzeit. In tierexperimentellen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Dauer von 36 Stunden nur 7% der Versuchstiere infiziert wurden, nach 48 Stunden jedoch schon 75% [Piesmann *et al.*, 1987]. Das Infektionsrisiko wird folglich durch ein frühzeitiges Entfernen der Zecke reduziert. Das gehäufte Auftreten von Frühmanifestationen der Lyme-Borreliose (z.B. Erythema migrans) in den Monaten März bis Oktober entspricht dem Zeitraum gesteigerter Zeckenaktivität. Späterscheinungen der chronischen Lyme-Borreliose (z.B. Acrodermatitis chronica atrophicans und Lyme-Arthritis) treten dagegen Jahreszeiten unabhängig auf [Braun-Falco *et al.*, 1996; Steere, 1998].

Die humanpathogenen Genospezies des *B. burgdorferi* sensu lato (s. l.) – Komplexes verteilen sich ungleichmäßig auf die verschiedenen Durchseuchungsgebiete. [Schmid, 1985; Wilske *et al.*, 1987; Sigal und Curron, 1991; Hassler *et al.*, 1992; Asbrink und Hovmark, 1993; Wilske *et al.* 1993]. In Nordamerika bildet *B. burgdorferi* sensu stricto (s. s.) die einzige humanpathogene Genospezies, in Europa findet man jedoch alle drei humanpathogenen Genospezies des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes. In den Regionen Asiens mit gemäßigttem Klima ist *B. garinii* vorherrschend.

### 1.3 Klinik

Der Stich einer infizierten Zecke führt in 5% der Fälle zu klinischen Symptomen [Oschmann und Kaiser, 1998a]. Kommt es zu klinischen Symptomen, so verläuft die Lyme-Borreliose - ähnlich der Syphilis - in drei Stadien unter Beteiligung verschiedener Organsysteme (siehe folgende Abschnitte und Tabelle I.1) [Sigal, 1988; Steere, 1989; Weber *et al.* 1993; Braun-Falco *et al.* 1996; Steere, 1998; Nadelman und Wormser, 1998]. Fallberichte mit einem Durchlauf aller drei Stadien sind jedoch extrem selten. Im klinischen Verlauf zeigt die Lyme-Borreliose häufig unspezifische (Begleit-)Symptome oder überspringt Stadien. In diesen Fällen ist keine eindeutige Zuordnung alleine aufgrund des klinischen Befundes möglich.

#### Stadium I

In 50 % der Fälle beginnt die Primärinfektion nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 12 Tagen mit dem Erythema migrans (EM). Dabei handelt es sich um eine lokale, homogene oder randbetonte, nicht-schuppige, selbstlimitierende Rötung um die Stichstelle, die sich zentrifugal ausbreitet und zentral abbläht. Besteht das Erythem länger als vier Wochen, spricht man vom Erythema chronicum migrans (ECM). Begleitende unspezifische Reaktionen wie Fieber, Kopfschmerzen, Arthralgien und Myalgien sprechen für eine hämatogene Generalisation im Frühstadium, eine Schwellung der regionalen Lymphknoten wird nur selten beobachtet. Bei Kindern findet man gelegentlich, bei Stich in der Region, im Bereich des Ohrläppchens und der Mamillen eine lymphozytäre Infiltration um den Zeckenstich. Sie imponiert als derber, rötlicher

bis livider Nodus und wird als Lymphadenosis cutis benigna (LCB) bezeichnet. Ohne antibiotische Therapie heilt die Lyme-Borreliose im Stadium I in über 90% der Fälle folgenlos aus.

## **Stadium II**

Wochen bis Monate nach der Infektion findet eine hämatogene Generalisation der Erreger statt. Es kommt zur Beteiligung anderer Organsysteme, wie z.B. der Gelenke, des zentralen Nervensystems (Neuroborreliose) oder des Herzens (Lyme-Carditis). Das häufigste klinische Bild in Stadium II sind oligoartikuläre Arthritisschübe der großen Gelenke. Sie betreffen bevorzugt das Kniegelenk, seltener das Sprung- oder Schultergelenk. Begleitende Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit und Müdigkeit können ausgeprägt sein. Bei Befall des zentralen Nervensystems (Neuroborreliose) kann die gesamte Neuroaxis betroffen sein, was zu einem breiten Spektrum neurologischer Manifestationen im sekundären und später auch tertiären Stadium führen kann. Bei einem Zeckenstich der Extremitäten kann das (*Garin-Bujadoux-*) *Bannwarth-Syndrom*, eine Meningoradikuloneuritis mit mono- oder pluriradikulärem Befall auftreten. Es zeigt eine Areflexie, Paresen, eine Amyotrophie und quälenden, lanzierenden, betont nachts auftretende Schmerzen als typischen Befund. Die Beteiligung der Hirnnerven als Mono- oder Oligoneuritis äußert sich meist in einer akuten peripheren Fazialisparese, die mit einer lymphozytären Liquorpleozytose einhergeht. Kinder sind gehäuft betroffen, bei ihnen macht die Borrelien-Fazialisparese sogar bis zu 30 % aller Fazialisparesen aus [Christen *et al.* 1995]. Weiterhin treten lymphozytäre Meningitiden oder Enzephalitiden auf.

## **Stadium III**

Liegt die Infektion mehr als sechs Monate zurück, befindet sich der Patient in Stadium III. Chronischen Beschwerden wie die chronisch-erosive Arthritis (Lyme-Arthritis), eine chronische Karditis mit Überleitungsstörungen, die progressive Borrelien-Enzephalomyelitis mit zerebraler Vaskulitis oder die Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) können auftreten. Die ACA ist eine

anfangs ödematös-entzündliche, später atrophisch-livide Veränderung der Haut in der Umgebung von Gelenken oder an den Streckseiten der Extremitäten. In den USA stellt die Gonarthrit das häufigste Krankheitsbild der Lyme-Borreliose dar. Die Klinik dieser Gonarthrit ist uncharakteristisch mit Schwellung, Ergussbildung sowie Bewegungseinschränkung, wobei die Arthralgie subjektiv im Vordergrund steht. Kardiale Symptome sind weltweit insgesamt selten. Am häufigsten findet man eine Beteiligung des Reizleitungssystem (z.B. AV-Blockierungen I. bis III. Grades). Spontanremissionen der tertiären Lyme-Borreliose sind nicht bekannt.

Eine Mitbeteiligung des *B. burgdorferi* s. I.-Komplexes u. a. bei der zirkumskripten Sklerodermie (Morphea), dem Lichen sclerosus et atrophicus und dem *Guillain-Barré*-Syndrom wird kontrovers diskutiert [Aberer *et al.*, 1985; Büchner, 1989; Horneff *et al.*, 1993; Klempner *et al.* 1993; Schempp *et al.*, 1993; Wienecke *et al.*, 1995; Halperin, 1997; Weide *et al.*, 2000].

	<b>Stadium I 4 bis 6 Wochen</b>	<b>Stadium II Bis zu 6 Monaten</b>	<b>Stadium III über 6 Monate</b>
<b>Haut</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Erythema migrans</i></li> <li>• Lymphadenosis cutis benigna</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acrodermatitis chronica atrophicans</i></li> <li>• Lymphadenosis cutis benigna</li> </ul>
<b>ZNS</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fazialisparese</li> <li>• Lymphozytäre Meningitis</li> <li>• Meningoradikuloneuritis (Bannwarth-Syndrom)</li> <li>• Zerebrovaskuläre Formen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mono-(Poly-) neuritis</li> <li>• Progressive Enzephalomyelitis</li> <li>• Zerebrovaskuläre Formen</li> </ul>
<b>Gelenke</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intermittierende Arthritiden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Chron.-erosive Lyme-Arthritis</i></li> </ul>

Tab. I.1 Die häufigsten Manifestationen der Lyme-Borreliose und ihre Stadienzuordnung [Steere, 1989; Brade und Burmester, 1990]. Die Leitmanifestationen der Stadien sind *kursiv* hervorgehoben.

## 1.4 Diagnostik

Die Diagnose einer *B. burgdorferi*-Infektion erfolgt in erster Linie aufgrund klinischer Kriterien, die bei eindeutigen Manifestationsformen, wie z.B. dem EM, in Verbindung mit einer Zeckenstich-Anamnese selten Probleme bereitet [Kramer *et al.*, 1990 und 1991; Nadelman und Wormser, 1998]. Bei einer eher uncharakteristischen Symptomatik, wie sie bei einer Systembeteiligung (z.B. bei Karditis, Arthritis und Neuritiden) gefunden wird, ist eine Unterstützung durch serologische und molekularbiologische Befunde notwendig [Wallich *et al.*, 1993]. Es wird jedoch vor einem „Überdiagnostizieren“ bei unspezifischen Symptomen mit Einleiten einer antibiotischen Therapie gewarnt [Shapiro und Gerber, 2000]. Gegenwärtig gibt es zwei grundsätzliche Ansätze zur Bestätigung einer *B. burgdorferi*-Infektion: den direkten Erregernachweis, wie z.B. durch Anzucht, Direktmikroskopie mit Phasenkontrast- und Dunkelfeldmikroskop oder Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und den indirekten Erregernachweis, wie z.B. mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) oder einem Immunfluoreszenztest (IFT) oder Immunoblot. Die gängigste diagnostische Maßnahme bei Verdacht auf Lyme-Borreliose ist der Nachweis von Antikörpern. Als Untersuchungsmaterialien werden in den Routinelaboratorien Serum und Liquor verwendet. Prinzipiell kann auch eine Analyse von Gelenkflüssigkeit, Hautbiopsien und Urin durchgeführt werden. Die serologische Routineuntersuchung bei Verdacht auf Lyme-Borreliose wird als Zwei-Stufen-Diagnostik durchgeführt und beinhaltet einen sensitiven Suchtest sowie einen spezifischen Bestätigungstest [Hamann-Brand *et al.*, 1995; Oschmann und Kraiczy, 1998, Wilske *et al.*, 1999]. Die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) hat 2000 hierzu Qualitätsstandards zur mikrobiologischen Diagnostik der Lyme-Borreliose (MIQ) erarbeitet [Wilske *et al.* 2000].

### Erster Schritt (Suchtest)

Zunächst wird ein Suchtest (Screening assay) zur qualitativen Detektion von IgM und IgG Antikörpern, hauptsächlich mit einem ELISA, IFT durchgeführt. Dabei ist ein moderner ELISA der zweiten oder dritten Generation aufgrund seiner höheren Spezifität gegenüber der ersten Generation bei gleicher Sensitivität vorzuziehen. Der Nachweis von IgM-Antikörpern kann je nach

Stadium der Lyme-Borreliose auf eine akute oder kürzlich aufgetretene Infektion hinweisen. Ein negativer IgM-Test schließt jedoch eine behandlungsdürftige Borreliose nicht aus. Falls keine Antikörper nachgewiesen werden können und dennoch weiterhin der Verdacht auf ein frühes Stadium der Lyme-Borreliose besteht, ist die Untersuchung nach zwei und vier Wochen zu wiederholen, um eine später erfolgte Serokonversion zu erfassen. Patienten mit chronischer Lyme-Borreliose produzieren selten IgM-Antikörper und auch in frühen Stadien können IgM-Antikörper fehlen. Persistierende IgM-Antikörper können sehr selten noch nach abgeschlossener Therapie z.B. bei noch vorhandenen, aber nicht mehr lebensfähigen Erregern nachgewiesen werden. Bei einem grenzwertigen oder positiven Screeningergebnis sollte sich - zum Ausschluß von Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen Treponemen - ein Syphilis-Suchtest anschließen.

### **Zweiter Schritt (Bestätigungstest)**

Um das Ergebnis des Suchtests zu verifizieren, wird im zweiten Schritt als Bestätigungstest ein Immunoblot durchgeführt. Dadurch werden falsch positive Ergebnisse durch unspezifische Immunreaktionen, z.B. bei Patienten mit positivem Rheumafaktor, Autoimmunerkrankungen oder einer *Ebstein-Barr*-Virus-Infektion, erkannt [Schwan *et al.*, 1991; Bruckbauer *et al.*, 1992; Fawcett *et al.*, 1992; Steere *et al.* 1993]. Da einerseits der Immunoblot die höchste Spezifität aller serologischen Tests besitzt und andererseits ELISA bzw. IFT eine gute Sensitivität bei geringer Spezifität zeigen, ist die Kombination dieser Verfahren sinnvoll [Schmitz *et al.*, 1993; Magnarelli *et al.* 1994]. Aus ökonomischen Gesichtspunkten sollte der Immunoblot nicht als Suchtest angewandt werden.

### **Ergänzungstests in unklaren Fällen**

Weiterer diagnostischer Schritte bedarf es bei unklaren klinischen Fällen, wie z.B. bei Spätstadien mit diffuser Klinik und persistierenden IgG-Antikörpern. Hierbei kann die PCR im positiven Falle Aufschluss über das Vorliegen einer Erregerpersistenz geben [Muellegger *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1996].

## 1.5 Therapie

Schon Jahrzehnte vor der Entdeckung der Borrelien wurden verschiedene Krankheitsbilder der Lyme-Borreliose erfolgreich mit Antibiotika behandelt. Die Wahl des Medikaments und die Behandlungsdauer richtet sich heute nach der vorliegenden Manifestationsform, der Gewebegängigkeit des Antibiotikums und nach bereits vorangegangenen Therapieversuchen (siehe Tabelle 1.2). Die Behandlung in den Frühstadien wird als unproblematisch beurteilt, in den Spätstadien treten Therapieversagen auf [Kaiser *et al.*, 1998; Oschmann und Kaiser, 1998b].

Bei Erwachsenen in Stadium I ist in der Regel eine orale Therapie (z.B. mit Amoxicillin) ausreichend. Im sekundären und tertiären Stadium ist die parenterale Gabe von Cephalosporinen der dritten Generation Mittel der Wahl [Kaiser *et al.*, 1998]. Im Kindesalter, während der Schwangerschaft und Stillperiode sind Tetrazykline und Doxycyclin kontraindiziert. Ansonsten werden bei Kindern Körpergewicht adaptiert die gleichen Antibiotika wie bei Erwachsenen verabreicht. Bei Patienten mit kardialer Beteiligung sollte zusätzlich zur Antibiotikatherapie eine Glukokortikoid-Komedikation zur Entzündungshemmung in Erwägung gezogen werden.

Erkrankung	Antibiotikum	Dosierung/Tag	Darreichung	Dauer
Erythema migrans	Amoxicillin	2 x 1 g	per os	2 Wochen
	Doxycyclin**	2 x 100 mg	per os	2 Wochen
Acrodermatitis chronica atrophicans	Amoxicillin	2 x 1 g	per os	3 Wochen
	Ceftriaxon*	1 x 2 g	intravenös	2 Wochen
	Cefotaxim	3 x 2 g	intravenös	2 Wochen
	Doxycyclin	1 x 200 mg	per os	3 Wochen
Arthritis	Amoxicillin	2 x 1 g	per os	3 Wochen
	Ceftriaxon*	1 x 2 g	per os	3 Wochen
	Cefotaxim	3 x 2 g	intravenös	2 Wochen
	Cefuroxim*	2 x 500 mg	intravenös	2 Wochen
	Doxycyclin	1 x 200 mg	per os	3 Wochen
Akute Neuroborreliose	Ceftriaxon*	1 x 2 g	intravenös	2 Wochen
	Cefotaxim	3 x 2 g	intravenös	2 Wochen
	Doxycyclin	1 x 200 mg	per os	2 Wochen
	Penicillin G	4 x 5 Mio. I.E.	intravenös	2 Wochen
Chron. Neuroborreliose	Ceftriaxon*	1 x 2 g	intravenös	3 Wochen
	Cefotaxim	3 x 2 g	intravenös	3 Wochen
Erythema migrans in der Schwangerschaft	Amoxicillin	2 x 1 g	per os	2 Wochen
	Ceftriaxon*	1 x 2 g	intravenös	2 Wochen
	Cefuroxim*	2 x 500 mg	intravenös	2 Wochen
	Penicillin V	3 x 1,5 Mio. I.E.	per os	3 Wochen

Tab. I.2 Stadiengerechte Therapie der Lyme-Borreliose mit Dosierung (für erwachsene Patienten) und Dauer eines Behandlungszyklus. Zu einer Erkrankungsgruppe aufgelistete Antibiotika wurden in klinischen Studien als wirksam befunden und können alternativ eingesetzt werden. \*\* Doxycyclin kann ein Beta-Laktam-Allergie alternativ eingesetzt werden. \*Im ersten Drittel der Schwangerschaft wird von der Gabe von Ceftriaxon und Cefuroxim abgeraten [Auszug aus: Kaiser *et al.*, 1998].

## 2. Charakteristika des Erregers

### 2.1 Morphologie und Kulturbedingungen

Die gramnegativen, spiralförmigen Borrelien sind zwischen 7 und 24 µm lang und 0,2 bis 0,5 µm breit [Wilske *et al.*, 1991]. Das Bakterium besitzt eine innere und eine äußere Zellmembran [Barbour und Hayes, 1986]. Die äußere Membran umschließt den protoplasmatischen Zylinder mit den sieben bis 30 Flagellen [Hayes und Burgdorfer, 1993]. Durch ihre Morphologie sind Borrelien extrem beweglich [Charon *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2000]. Die gebündelten Endoflagellen sind jeweils an einem Ende mit der inneren Membran verankert und winden sich in einer rechtsdrehenden Bewegung um den protoplasmatischen Zylinder und die innere Membran [Goldstein *et al.*, 1996]. Dadurch entsteht eine linksgängige Helix. Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop zeigen, dass sich Borrelien mit rückwärts gerichteten Wellenbewegungen vorwärtsbewegen [Goldstein *et al.*, 1994]. Borrelien beanspruchen ein spezielles Kulturmedium, wie das Barbour-Stoener-Kelly- (BKS-) Medium und wachsen unter mikroaerophilen Bedingungen bei 33°C mit einer Generationszeit von 20 bis 24 Stunden.

### 2.2 Taxonomie

Borrelien werden wegen ihres spiralförmigen Erscheinungsbildes zu der Ordnung der *Spirochetaceae* gezählt, zu der auch die medizinisch bedeutsamen Gattungen *Treponema* und *Leptospira* gehören (siehe Abbildung I.1). Die Vertreter des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes können anhand verschiedener molekulargenetischer Methoden in 11 weitere Genospezies differenziert werden [Rosa *et al.*, 1991; Wilske *et al.*, 1991; Peter und Bretz, 1992; Saint Girons *et al.*, 1992; Belfaiza *et al.*, 1993; Kawabata *et al.*, 1993; Lebech *et al.*, 1994; Postic *et al.*, 1994; Picken *et al.*, 1995; Wilske *et al.*, 1995; Liveris *et al.*, 1995 und 1996; Postic *et al.*, 1996]. Die drei in Europa vorkommenden humanpathogenen Genospezies des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes sind *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii* [Baranton und Old, 1992]. Die pathogenetische Bedeutung der anderen acht Genospezies ist bislang unklar [Kraiczy *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Masuzawa *et al.*, 2001].

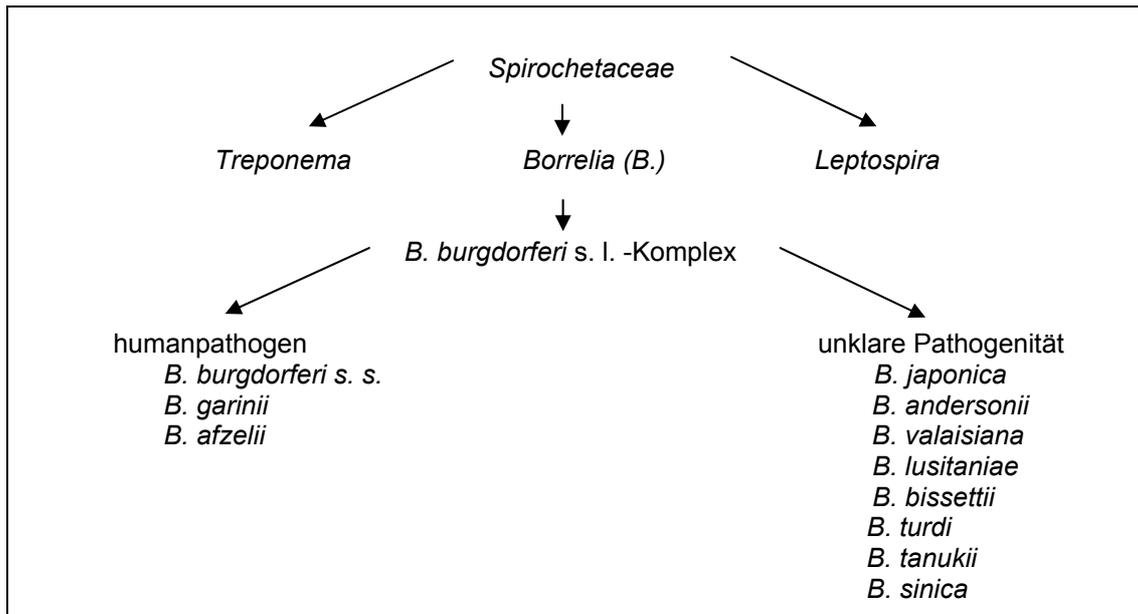


Abb. I.1 Taxonomische Einteilung der Borrelien [Kraiczy *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Masuzawa *et al.*, 2001].

## 2.3 Flagellin-Gen

Borrelien besitzen im Gegensatz zu anderen Mikroorganismen als Charakteristikum ein lineares Chromosom aus Doppelstrang-DNA und zusätzlich verschiedene lineare und zirkuläre Plasmide [Barbour, 1986; Postic *et al.*, 1993; Casjens *et al.*, 1995; Baranton und Old, 1995; Oschmann und Kraiczy; 1998]. Ende 1997 wurde erstmals die komplette Gensequenz des Borrelienchromosoms sowie neun linearer und zwei zirkulärer Plasmide des *B. burgdorferi* s. s.-Stammes B31 veröffentlicht [Fraser *et al.*, 1997]. Casjens *et al.* konnten einige Jahre später nachweisen, dass der Stamm B31 insgesamt 21 Plasmide besitzt [Casjens *et al.*, 2000]. Das für die Endoflagellen kodierende Flagellin-Gen (1.011 Basenpaare, bp) ist auf dem linearen Chromosom (910.725 bp) lokalisiert und gehört zur konservierten Erbinformation der Borrelien. Ein 358 bp langer Abschnitt des Flagellin-Gens zwischen den Nukleotidpositionen 474 und 831 kann über die Polymerase-Kettenreaktion mit Hilfe der Primer (Startmoleküle) Fla6 und Fla7 amplifiziert werden. Mit Hilfe der hochspezifischen Gensonden Fla8, Fla15 und Fla16 können diese Amplifikate der drei humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii* voneinander differenziert werden (siehe Abbildung I.2 und Anhang 1).

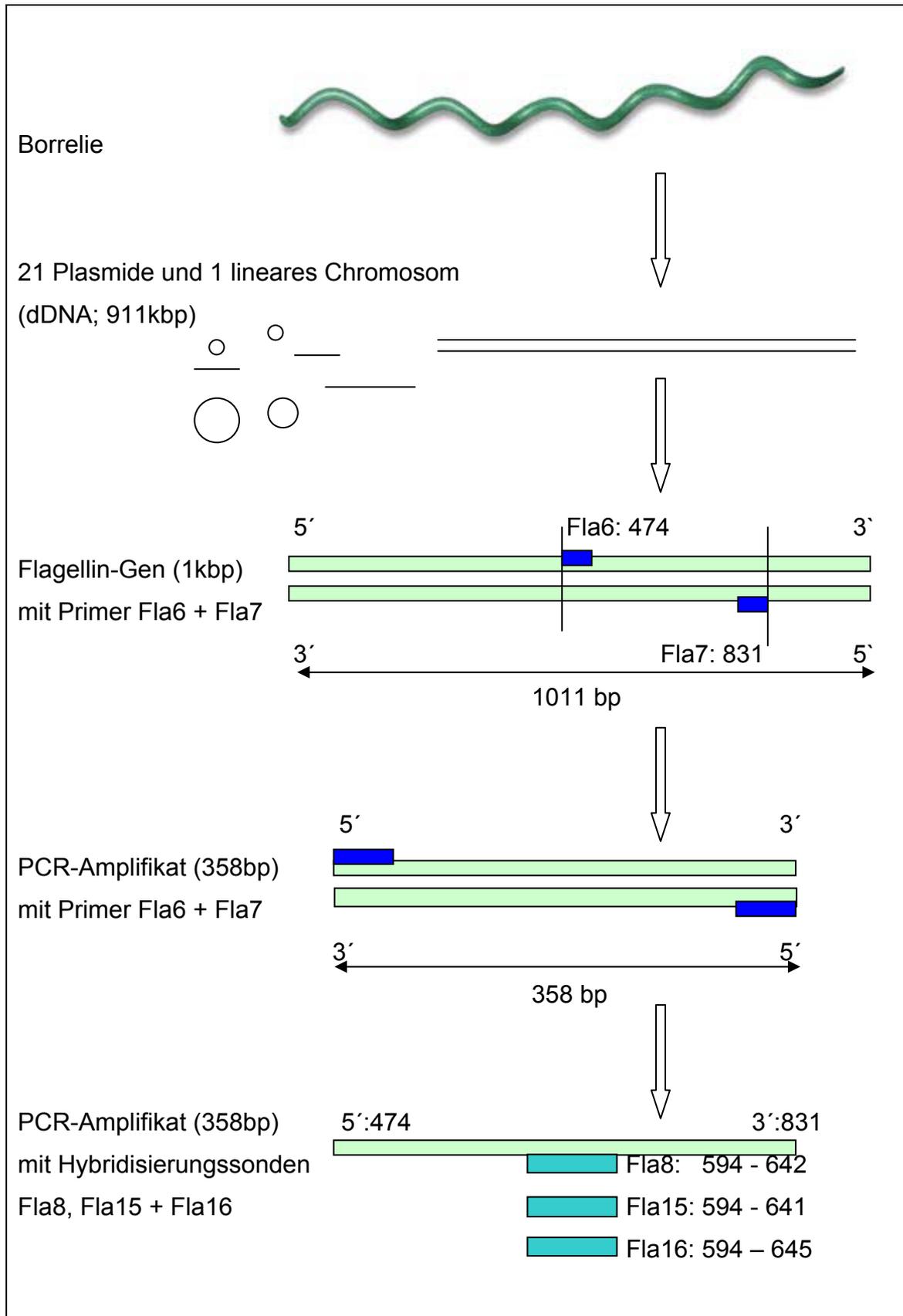


Abb. I.2 Genotypisierungsschema des Flagellin-Gens für die drei humanpathogenen Genospezies des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes. bp = Basenpaare, dDNA = Doppelstrang-DNA

### 3. Zielsetzung der Arbeit

Der *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex umfasst derzeit elf differenzierbare Genospezies. Zu den drei humanpathogenen Vertretern zählen die Genospezies *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* und *B. afzelii*, die im gesamten Bundesgebiet in Zecken nachgewiesen und aus klinischen Untersuchungsmaterial kulturell angezüchtet werden können. Allerdings ist die Erregerdichte in klinischen Proben oft sehr gering (bzw. die Borrelien sind während des Probenverkehrs bereits abgestorben), so dass ein kultureller Direktnachweis häufig misslingt. Dies führt zu falsch negativen Befunden. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, stellen molekularbiologische Methoden wie die PCR eine Alternative gegenüber konventionellen Nachweismethoden dar. Zur Beantwortung epidemiologischer Fragestellungen und der Frage nach der übertragenen Genospezies ist der alleinige Nachweis von Borrelien-DNA in der Patientenprobe jedoch nicht ausreichend.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, eine sensitive und gleichzeitig spezifische molekularbiologische Methode zur Subtypisierung der drei humanpathogenen Genospezies des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes zu entwickeln und zu evaluieren. Diese Vorgabe konnte durch Kombination zweier molekularbiologischer Methoden realisiert werden, indem eine auf dem Flagellin-Gen basierende Borrelien-PCR mit einer sich anschließenden Hybridisierung gekoppelt wurde. Zusätzlich sollte dieses Verfahren folgende Bedingungen erfüllen:

1. eindeutige Differenzierung und Typisierung der drei humanpathogenen Genospezies
2. Reproduzierbarkeit
3. einfache Durchführung.

## II. Materialien und Methoden

### 1. Materialien

#### 1.1 Puffer und Lösungen

##### Puffer und Lösungen für die PCR

10x PCR-Puffer:

100 mM	Tris-HCl (pH 8,4)
15 mM	MgCl <sub>2</sub>

Nukleosid-Mix (à 100µl):

10 µl	ATP (100 pmol/µl)
10 µl	CTP (100 pmol/µl)
10 µl	GTP (100 pmol/µl)
30 µl	UTP (100 pmol/µl)
40 µl	A. bidest.

##### Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

Elektrophoresepuffer:

5 x Trisborat-EDTA (TBE; à 1000 ml):

0,45 M	Tris
0,45 M	Borsäure
0,01 M	EDTA (pH 8,0)
ad 1000 ml	A. bidest.

Die Inhaltsstoffe wurden zusammengegeben, autoklaviert und bei ZT aufbewahrt.

TE-Puffer:

10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM	EDTA (pH 8,0)

Dieser Puffer wurde sterilfiltriert und bei – 20 °C gelagert.

### **Puffer und Lösungen für die Hybridisierung**

20x SSC-Puffer:

3 M	NaCl
0,3 M	Na <sub>3</sub> Citrat

Der Puffer wurde auf einen pH von 7,0 eingestellt.

Puffer 1:

0,1 M	Maleinsäure
0,15 M	NaCl

Dieser Puffer wurde auf einen pH von 7,5 eingestellt, autoklaviert und bei ZT aufbewahrt.

Puffer 2:

1 % (w/v) Blockierungslösung wurde aus einer 10 % Blockierungs-Stammlösung hergestellt (1:10 mit Puffer 1 verdünnt). Dieser Puffer war bei einer Lagerungstemperatur von 4°C für 14 Tage verwendbar.

Puffer 3:

0,1 M	Tris-HCl (pH 9,5)
0,1 M	NaCl
50 mM	MgCl <sub>2</sub>

Puffer 4:

10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM	EDTA

Puffer 3 und 4 wurde für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und bei ZT aufbewahrt.

Prähybridisierungspuffer und Hybridisierungspuffer:

5x	SSC in A. bidest.
1 % (v/v)	10 %ige Blockierungslösung
0,1 % (v/v)	N-Laurylsarkosin
0,02 % (w/v)	SDS in A. bidest.

Dieser Puffer wurde bei -20 °C gelagert.

#### Waschlösung 1:

2x SSC in A. bidest.

0,1 % (v/v) SDS in A. bidest.

#### Waschlösung 2:

0,1x SSC in A. bidest.

0,1 % (v/v) SDS in A. bidest.

Waschlösung 1 und 2 wurden aus autoklavierten Komponenten hergestellt und bei ZT aufbewahrt.

#### Waschpuffer:

Der fertige Puffer 1 wurde mit 0,3 % (v/v) Tween 20 angesetzt, autoklaviert und bei ZT aufbewahrt.

#### Blockierungs-Stammlösung:

Das Blockierungsreagens wurde im fertigen Puffer 1 zu einer Endkonzentration von 10 % (w/v) unter sorgfältigem Schütteln und Erhitzen auf dem Heizblock gelöst, anschließend für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert und bei -4°C gelagert.

#### Farblösung:

Von der instabilen Farblösung wurden pro 100 cm<sup>2</sup> Nylonmembran (positiv-geladene Nylonmembran von BOEHRINGER MANNHEIM) frisch angesetzt:

20 ml Puffer 3

200 µl NBT/BCIP

## 1.2 Nährmedium für Borrelien

Borrelien benötigen ein spezielles Nährmedium. Die Herstellung des Babour-Stoenner-Kelly-Medium (BSK-Medium) erfolgte in zwei Schritten. Die Herstellung des Grundmedium (1000 ml) erforderte:

6,0 g	HEPES
5,0 g	Neopepton
0,7 g	Natrium-Citrat
5,0 g	Glucose
2,2 g	Natrium-Bicarbonat
0,8 g	Natrium-Pyruvat
0,4 g	N-Acetylglucosamin

Die Reagenzien wurden in 800 ml A. dem. gelöst, mit 100 ml 10x CMRL (Firma GIBCOL-BRL) versetzt und auf einen pH von 7,6 eingestellt. Danach wurde der Ansatz mit A. bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und mit 0,20 µm Sterilfilter filtriert. Das Grundmedium konnte bei -20°C für drei bis vier Monate gelagert werden.

Die Herstellung des Kulturmediums:

Zu 1000 ml Grundmedium wurden folgende Lösungen steril hinzugefügt:

200 ml	7 % Gelatine (autoklaviert)
72 ml	hitzeinaktiviertes Kaninchenserum
70 ml	35 % Rinderserumalbumin

Das fertige Kulturmedium wurde bei 4 °C für drei bis vier Wochen aufbewahrt.

## 1.3. Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma MWG BIOTECH synthetisiert und anschließend in A. bidest. resuspendiert. Die Konzentration der Oligonukleotide betrug 100 pmol/µl; sie wurden bei 4°C gelagert.

### Oligonukleotide als Primer für die PCR

Die Nukleotidsequenz des Flagellin-Gens des Borrelienstammes B31 bildet die Grundlage der PCR-Primer Fla6 und Fla7 (siehe VII Anhang 1) [Gassmann et

al., 1989]. Fla6 ist ein 27-mer (Bindungsstelle: Nukleotidposition 474 bis 501), Fla7 ein 32-mer (Bindungsstelle: Nukleotidposition 831 bis 799) Oligonukleotid (siehe Tabelle II.1). Mittels dieser PCR-Startermoleküle wurde ein 358 bp großes Amplifikat (Nukleotidposition 474 bis 831 generiert.

Primer	Sequenz	T <sub>m</sub> (errechnet)
Fla6 (27-mer)	5'-AAC ACA CCA GCA TCA CTT TCA GGG TCT -3'	62,0 °C
Fla7 (32-mer)	5'-TAT AGA TTC AAG TCT ATT TTG GAA AGC ACC TA-3'	57,9 °C

Tab. II.1 Sequenz und errechnete Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der PCR-Primer Fla6 und Fla7.

### Oligonukleotide als Gensonden zur Hybridisierung

Die Sequenzen der Sonden für die Differenzierung der Flagellin-PCR-Amplifikate der drei humanpathogenen Genospezies mittels Dot blot-Hybridisierung wurden der Publikation von *Picken* entnommen [Picken, 1992]. Die hochspezifischen Gensonden Fla8 (*B. burgdorferi* s. s.), Fla15 (*B. garinii*) und Fla16 (*B. afzelii*) wurden an ihrem 5'-Ende vom Hersteller MWG BIOTECH mit Digoxigenin markiert (siehe Tabelle II.2).

Sonde	Sequenz	T <sub>m</sub> (errechnet)
Fla8 (49-mer)	5'- <b>CTC</b> TGG TGA <b>GGG</b> AGC TCA <b>AAC</b> TGC TCA <b>GGC</b> TGC ACC <b>GGT</b> TCA AGA <b>GGG</b> T-3'	84,6 °C
Fla15 (48-mer)	5'- <b>CTC</b> TGG TGA <b>AGG</b> AGC TCA <b>GGC</b> TGC TCA <b>GAC</b> TGC ACC <b>TGT</b> TCA AGA <b>AGG</b> -3'	81,6 °C
Fla16 (52-mer)	5'- <b>TGC</b> TGG TGA <b>GGG</b> AGC TCA <b>AGC</b> TGC TCA <b>GGC</b> TGC ACC <b>TGT</b> TCA AGA <b>GGG TGC</b> T-3'	87,2 °C

Tab. II.2 Sequenz und errechnete Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der für die Hybridisierung verwendeten Sonden Fla8 (*B. burgdorferi* s. s.), Fla15 (*B. garinii*) und Fla16 (*B. afzelii*). Die jeweils von den anderen Sonden abweichenden Basen wurden fett hervorgehoben.

### Schmelztemperaturen der Oligonukleotide

Eine Hybridisierung ist die Bildung eines Doppelstrangs durch sequenzspezifische Basenpaarung an komplementären Einzelsträngen. Dabei spielt die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Gensonde eine wichtige Rolle. Die Schmelztemperatur (diejenige Temperatur, bei der die Hälfte der Doppelstrangmoleküle in ihre Einzelstränge dissoziiert sind) ist abhängig von der Konzentration der einfach-positiv geladenen Ionen ( $M$  in Mol pro Liter), der Anzahl von Guanin (G) und Cytosin (C), sowie der Länge der Sonde. Folgende Formeln werden allgemein zur Berechnung der Schmelztemperatur angewandt:

- formal nach Bolton und McCarthy (1962):

$$T_m = 81,5^\circ + 16,6 \log M + 41 (G+C\text{-Anteil}) - (600/L)$$

- empirisch nach Suggs *et al.* für Oligonukleotide < 20 (1981):

$$T_m (^\circ\text{C}) = 4 (G + C) + 2 (A + T).$$

- thermodynamisch nach Freier *et al.* (1986) und Breslauer *et al.* (1986).

Die Schmelztemperatur der hier verwendeten Oligonukleotide wurde von der Firma MWG BIOTECH wie folgt thermodynamisch berechnet:

$$N = \frac{OD \cdot 100}{1.54n_A \cdot A + 0.75n_C \cdot C + 1.17n_G \cdot G + 0.92n_T \cdot T}$$

$n_i$  = number of nucleotides of the type  $i$

$OD$  = optische Dichte

$T_m$  für Oligonukleotide mit mehr als 14 Basen:

$$T_m = 69,3^\circ\text{C} + (0,41 \times \text{GC } \%) - 650 / n$$

$n$  = Anzahl der Basen

Die Markierung der Sonden mit Digoxigenin am 5'-Ende führt lediglich eine geringfügige Erniedrigung der Schmelztemperatur (Aussage der Firma MWG BIOTECH). Danach ergab sich für die Sonde Fla8 (49-mer, GC-Anteil 59,2%, spezifisch für *B. burgdorferi* s. s.) eine Schmelztemperatur von 84,6 °C, für die Sonde Fla15 (48-mer, GC-Anteil 56,3%, spezifisch für *B. garinii*) von 81,6 °C und für die Sonde Fla16 (52-mer, GC-Anteil 59,6%) von 87,2 °C. Diese Angaben bildeten die Grundlage für die Wahl der Hybridisierungs- und Waschttemperaturen.

## 1.4. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden entsprechend ihres Verwendungszwecks mindestens im Reinheitsgrad pro analysi von den Firmen MERCK, ROTH, GIBCO-BRL, DIFCO, INC, APPLICHEM, USB, APPLIGENE, SCHLEICHER & SCHUELL, PAA oder SIGMA-ALDRICH bezogen.

Agarose NEEO, Cat. No. 2267.3	ROTH
Borsäure, Cat. No. 191411	ICN
Bromphenolblau, Cat. No. B-5525	SIGMA-ALDRICH
CMRL 1066,10 x Medium, Cat. No. 21540-026	GIBCO-BRL
D(+)-Glucose wasserfrei, Cat. No. 1.08337	MERCK
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat, Cat. No. A-1104	APPLICHEM
Gelatine, Cat. No. 1.04078.0500	MERCK
HEPES, Cat. No. 9105.2	ROTH
Na-Acetat, Cat. No. 6268	MERCK
N-Acetylglucosamin, Cat. No. A-8625	SIMGA-ALDRICH
Na-Bicarbonat, Cat. No. S-8875	SIGMA-ALDRICH
NaCl, Cat. No. 1.01540.0500	MERCK
Na-Pyruvat, Cat. No. P-2256	SIGMA
Neopepton, Cat. No. 0119-17-9	DIFCO
N-Laurosylsarkosin, Cat. No. L-9150	SIGMA-ALDRICH
MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat, Cat. No. 5833	MERCK
Maleinsäure, Cat. No. 800380	MERCK
SDS (Sodiumdodecylsulfat), Cat. No. L-5750	SIGMA-ALDRICH
TRIS, Cat. No. US-75825	USB
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Cat. No. 3580.1	ROTH
TWEEN 20, Cat. No. 1.09280	MERCK

## 1.5. Geräte

Analysenwaage, 822	KERN
Elektrophorese-Kammer, Horizon 11.14	GIBCO-BRL
Gel-Kammer, Gel Casting System 11.14	GIBCO
Hybridisierungsöfen, Mini (HB-MOVC) (Messgenauigkeit +/-1,0°C; 5 Upm)	HYBAID
Hybridisierungsröhren, Medium (HB-OV-BM)	HYBAID
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA
Mikroskop, Standard 25 mit Dunkelfeldkondensator	ZEISS
pH-Meter 654	METROHM
Photometer, Spektralphotometer Ultrospect III	AMERSHAM- BIOSCIENCE
Pipetten	EPPENDORF
<b>Schüttler:</b>	
Rockomat	INTEGRA BIOSCIENCE
Schüttler, KL2	E. BÜHLER
Vortexer VF 2	IKA
<b>Temperierbare Schüttler:</b>	
Schüttel-Wasserbad, 1083	GFL
Thermomixer 5436	EPPENDORF
Thermomixer 5437	EPPENDORF
Sterilisationsofen (Heißluft), U 60	MEMMERT
<b>Thermocycler für PCR:</b>	
Thermal Cycler Gene E	TECHNE
Thermocycler, Modell 2400	PERKIN-ELMER
Thermocycler, Modell 9600	PERKIN-ELMER
UV- Crosslinker, Fluo-Link	BIOMETRA
Videodokumentations-System CS 1+	CYBERTECH

Werkbank, Sicherheitsklasse II:

Dual Flow Control System, BSB 4A

GELAIRE

Antair BSK

ANTAIR

WinCam 2.2 (Auswertungssoftware)

CYBERTECH

### **Zentrifugen:**

Varifuge 3.0R (400 – 5000 Upm)

HERAEUS

Tischzentrifugen (bis 18.000 Upm bzw. 24.000 g):

Modell 5402 (bis 18.000 Upm bzw. 24.000 g)

EPPENDORF

Mikro 24-48R (bis 18.000 Upm bzw. 24.000 g)

HETTICH

## **1.6 Verschiedenes**

### **Zur Herstellung des Nährmediums:**

0,20 µm Sterilfilter, Cat. No. 18058-D

SARTORIUS

### **Verschiedenes für die PCR:**

DIG Nucleic Acid Detection Kit,

BOEHRINGER

Cat. No. 1175041

MANNHEIM

Taq-DNA-Polymerase, Cat. No. 18038-026

GIBCO-BRL

123 bp-DNA-Leiter (1 µg/ml), Cat. No. 1561-029

GIBCO

Gel-Blotting-Paper GB 002, Cat. No. 426693

SCHLEICHER &

SCHUELL

### **Hybridisierungsmembranen:**

Nylonmembranen, positiv geladen,

BOEHRINGER

Cat. No. 1209299

MANNHEIM

Nylonmembranen, positiv geladen

APPLIGENE

### **Seren:**

Kaninchenserum auf Mykoplasmen getestet,

PAA

sterilfiltriert, bei –20°C lagern, Cat. No. B11-034

Rinderserumalbumin 35 %, bei 4°C lagern,

SIGMA-ALDRICH

Cat. No. A-7409

## 1.7. Borrelienstämme

Tabellen II.3 zeigt eine Zusammenfassung aller in dieser Arbeit verwendeten humanpathogenen Borrelienstämme und ihrer biologischen und geographischen Herkunft.

<b>Stamm</b>	<b>Biologische Herkunft</b>	<b>Geographische Herkunft</b>
1/B29	Zecke ( <i>Ixodes ricinus</i> )	Berlin
LW2	Hautbiopsie	Berlin
61BV1	Hautbiopsie	Berlin
EB1	Hautbiopsie (EM)	Erlangen
EB2	Hautbiopsie (EM)	Erlangen
EB3	Hautbiopsie (EM)	Erlangen
FEM1	Hautbiopsie (EM)	Frankfurt
FEM2	Hautbiopsie (EM)	Frankfurt
FAC1	Hautbiopsie (ACA)	Frankfurt
Z25	Zecke ( <i>Ixodes ricinus</i> )	Freiburg
ZQ1	Zecke ( <i>Ixodes ricinus</i> )	Freiburg
ZS7	Zecke ( <i>Ixodes ricinus</i> )	Freiburg
MMS	Zecke ( <i>Ixodes ricinus</i> )	Freiburg
PKa-1	Liquor cerebrospinalis	München
PBr	Liquor cerebrospinalis	München
PBi	Liquor cerebrospinalis	München
PTrob	Hautbiopsie	München
PStH	Hautbiopsie	München
PGau	Hautbiopsie	München
PKo	Hautbiopsie	München
G1	Liquor cerebrospinalis	Würzburg
G2	Liquor cerebrospinalis	Würzburg

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<b>Stamm</b>	<b>Biologische Herkunft</b>	<b>Geographische Herkunft</b>
2301/7	Zecke ( <i>Ixodes ricinus</i> )	Italien
2301/5	Zecke ( <i>Ixodes ricinus</i> )	Italien
3521/2	Zecke ( <i>Ixodes ricinus</i> )	Italien
3521/4	Zecke ( <i>Ixodes ricinus</i> )	Italien
ACA1	Hautbiopsie (ACA)	Schweden
NE11H	Zecke ( <i>Ixodes ricinus</i> )	Schweiz
MMS	Zecke ( <i>Ixodes ricinus</i> )	Freiburg
N40	Zecke ( <i>Ixodes persulcatus</i> ) <i>i</i>	USA
297	Liquor cerebrospinalis	USA
SH-2-82	Zecke ( <i>Ixodes scapularis</i> )	USA
B31	Zecke ( <i>Ixodes ricinus</i> )	USA
387	unbekannt	unbekannt

Tab. II.3 Biologische und geographische Herkunft der 34 Borrelienstämme.

Die Stämme EB1, EB2, EB3, FEM1, FEM2 und FAC1 wurden im Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie in Erlangen bzw. in Frankfurt isoliert. Die Bereitstellung einzelner Stämme erfolgte durch A.C. Steere (297), H. Karch (G1, G2), A. Vogt (Z25), A. Schönberg (1/B29), M. Preac-Mursic (PKa-1, PBr, PBi, PTrob, PStH), M. Cinco (2307/1, 2307/5, 3521/2, 3521/4) und M.M. Simon (MMS, NE11H, N40, ZQ1, SH-2-82, ZS7). Der *B. burgdorferi* s.s.-Stamm B 31 stammt aus der „Amerikanischen-Typ-Kultur-Kollektion“ (ATCC 35210; Rockville, USA). Die Herkunft des Stammes 387 ließ sich nicht klären.

## 2. Methoden

### 2.1 Kultivierung von Borrelien

Die Anzucht der Borrelienstämme erfolgte aus eingefrorenen ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) Stammkulturen im Brutschrank bei  $33^{\circ}\text{C}$ . Dazu wurden  $1000\ \mu\text{l}$  der aufgetauten Borreliensuspension in  $10\ \text{ml}$  BSK-Medium inkubiert. Je nach Vitalitätsgrad der Borrelien konnte nach ein bis vier Wochen die erste Passage in frisches BSK-Medium durchgeführt werden. Dabei wurden etwa  $0,5\ \text{ml}$  der Borrelienkultur aus dem verbrauchten BSK-Medium in  $10\ \text{ml}$  frisches Medium pipettiert. Weitere Passagen in frisches Medium erfolgten alle drei bis fünf Tage nach Vitalitäts- und Kontaminationskontrolle im Dunkelfeldmikroskop unter sterilen Bedingungen.

### 2.2 Gewinnung von Borrelien-DNA durch osmotische Lyse

$2\ \text{ml}$  der Borrelienkultur wurden für  $30\ \text{Minuten}$  bei  $14.000\ \text{U/min}$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in  $100\ \mu\text{l}$  A. bidest. resuspendiert. Durch osmotische Lyse wurden die Borrelien aufgeschlossen und die DNA freigesetzt (Ganzzell-Lysate). Durch zehnmütiges Erhitzen auf  $95^{\circ}\text{C}$  mit abschließender Kühlung auf Eis wurde die DNA denaturiert. Die so gewonnen Proben dienten als Template für die PCR. Bis zur Verwendung wurde die DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3 Amplifikation des Flagellin-Gens mittels PCR

Die Amplifikation des  $358\ \text{bp}$  langen DNA-Fragments vom Flagellin-Gen des *B. burgdorferi* s. I.-Komplexes mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte gemäß der etablierten Methode [Fischer, 2002].

Für 100 µl PCR-Reaktionsansatz wurden zunächst folgenden Substanzen (in einer Werkbank der Sicherheitsklasse II) auf Eis pipettiert:

73,3 µl	A. bidest
10,0 µl	10 x PCR-Puffer
4,0 µl	MgCl <sub>2</sub>
1,0 µl	Primer Fla6 (100 pmol/µl)
1,0 µl	Primer Fla7 (100 pmol/µl)
0,5 µl	NTP-Mix
0,2 µl	Taq-DNA-Polymerase
+ 10 µl Probe (Template)	

Der Reaktionsansatz (100 µl) wurde bei 92 °C für 5 Minuten inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der DNA zu gewährleisten. Nach einer Abkühlung des Ansatzes auf die Annealing-Temperatur von 60 °C wurden die Primer Fla6 und Fla7 komplementär angelagert. Im nächsten Schritt wurde die Elongation der angelagerten Primer in 30 Sekunden bei 72 °C durchgeführt. Der Zyklus wurde insgesamt 50mal durchlaufen. Dabei betrug die Denaturierungszeit ab dem zweiten Zyklus jeweils nur 30 Sekunden. Abschließend wurden die Amplifikate bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C oder –20 °C aufbewahrt. Tabelle II.4 zeigt das PCR-Amplifikationsprogramm zur Synthese des Flagellin-Gens.

<b>Initialer Zyklus</b>			
92 °C	-	5 min. :	Denaturierung
60 °C	-	30 sec. :	Annealing (Anlage der Primer)
72 °C	-	30 sec. :	Amplifikation
<b>weitere 49 Zyklen</b>			
92 °C	-	30 sec. :	Denaturierung
60 °C	-	30 sec. :	Annealing (Anlage der Primer)
72 °C	-	30 sec. :	Amplifikation

Tab. II.4 PCR-Amplifikationsprogramm zur Synthese des Flagellin-Gens

## **2.4 Nachweis des amplifizierten Flagellin-Gens mittels Agarosegelelektrophorese**

In 0,5x TBE wurde 2 % Agarose (w/v) angesetzt, in der Mikrowelle bei 380 Watt zum Kochen gebracht, kurz abgekühlt und luftblasenfrei in die 15x13 cm<sup>2</sup> große horizontale Flachbett-Gelapparatur gegossen, in der sie bei ZT erstarrte. Nach Entfernen des Kammes wurden die Geltaschen mit je 8 µl PCR-Ansatz und 3 µl Bromphenolblau submers gefüllt. Als Molekulargewichtstandard diente der 123 bp DNA-Marker (Firma GIBCO-BRL). Hierzu wurden 1,5 µl 123 bp-DNA-Marker, 3 µl Bromphenolblau und 6,5 µl 0,1x TE pipettiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 125 V und 65 mA in 0,5x TBE als Elektrophorese-Puffer über eine Laufzeit von 1,5 Stunden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel eine Stunde in der Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) gefärbt. Anschließend wurde das Agarosegel für eine Stunde im Wasserbad gespült und mit UV-Licht (312 nm) betrachtet. Die Dokumentation der DNA-Banden erfolgte mittels einer Videokamera unter UV-Bestrahlung.

## **2.5 Quantifizierung des amplifizierten Flagellin-Gens**

Die Konzentrationsbestimmung der amplifizierten Borrelien-DNA erfolgt mittels zwei unterschiedlicher Methoden:

1. der computerunterstützten densitometrischen Auswertung sowie
2. photometrisch bei 260/280 nm

### **2.5.1 Computerunterstützte DNA-Quantifizierung**

Die im Agarosegel videodokumentierten unterschiedlichen DNA-Konzentrationen der hergestellten PCR-Pools wurden durch Verdünnungsreihen vereinheitlicht. Dazu wurde die Konzentration jeder Bande (der 27 für die Hybridisierung eingesetzten PCR-Pools) im videodokumentierten Agarose-Gel mittels geeigneter Software densitometrisch vermessen. Die AUC (area under the curve, Fläche unter der Kurve), entspricht der DNA-Konzentration und wurde mit Hilfe der Software WinCam 2.2 ermittelt. Diese Ergebnisse wurden mit den visuellen Eindrücken verglichen. Verdünnungsreihen wurden durchgeführt und das Ergebnis in einem Agarosegel überprüft.

### **2.5.2 DNA-Quantifizierung mittels Spektralphotometrie**

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden je 50 µl der PCR-Amplifikationsansätze in die Küvette des Spektralphotometers Ultrospec III eingesetzt und bei 260/280 nm Wellenlänge die Absorption gemessen.

### **2.6 Dot blot-Hybridisierung**

Die Hybridisierung ist die Bildung von Doppelstrang-Nukleinsäuremolekülen durch sequenzspezifische Basenpaarung an komplementären Einzelsträngen. Durch ihre hohe Spezifität kann die Hybridisierung mit bekannten Sonden zur exakten Differenzierung von Nukleinsäuremolekülen, hier PCR-Amplifikaten, genutzt werden. Die Durchführung der Hybridisierung erfolgte entsprechend Angaben des Herstellers (DIG Nucleic Acid Detection Kit von BOEHRINGER MANNHEIM). Alle Angaben beziehen sich auf 100 cm<sup>2</sup> positiv-geladener Nylonmembran.

#### **Bindung der Borrelien-DNA an die Membran**

Vor dem Auftrag der Borrelien-Amplifikate auf die Nylonmembran wurde die DNA durch zehnmütiges Kochen bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Diese PCR-Amplifikate wurden auf die Nylonmembran pipettiert. Die Fixation der DNA auf die Membran erfolgte entweder bei 120 °C für 20 Minuten im Heißluftofen oder im UV-Crosslinker (120 J/cm<sup>2</sup>). Die so präparierte Membran wurde bei 4 °C in Folie gelagert.

#### **Prähybridisierung**

Die Prähybridisierung erfolgt vor der eigentlichen Hybridisierung zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen und damit zur Reduktion von Hintergrundreaktionen. Dazu wurde die mit DNA-Amplifikaten beschichtete Nylonmembran bei 60 °C unter Rotation (5 U/min) für eine Stunde in Prähybridisierungspuffer (20 ml je 100 cm<sup>2</sup> Membran) in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Nach Beendigung der Prähybridisierung wurde der Prähybridisierungspuffer abgeschüttet und für weitere Prähybridisierungen bei -20 °C gelagert.

### **Hybridisierung**

Der prähybridisierte Träger wurde mit der Digoxigenin-markierten Sonde inkubiert. Unter Rotation fand die Anlagerung der Sonde an die DNA statt. Dazu wurden jeweils 150 pmol der Sonden Fla8, Fla15 oder Fla16 zu 2,5 ml Hybridisierungspuffer je 100 cm<sup>2</sup> Membran in die dazugehörigen Röhren zu den Membranen hinzugegeben. Die Inkubation der Membran erfolgte unter Rotation bei 60°C für mindestens sechs Stunden. Anschließend wurden der mit Oligonukleotiden angereicherte Hybridisierungspuffer abgegossen und bei -20°C gelagert.

### **Waschen der Membranen**

Alle nicht sequenzspezifisch gebundenen Sonden sollten durch geeignetes Waschen vom Träger entfernt werden. Dabei waren die Bedingungen so zu wählen, dass die Bindungen der korrekt hybridisierten Sonden nicht ebenfalls gelöst wurden. Dazu wurde das Wasserbad auf 63°C (Thermometer bei geöffnetem Deckel ins Wasserbad gelegt) vorgeheizt und die Waschlösungen 1 und 2 darin erwärmt. Die Membranen wurden zweimal für 10 Minuten in 100 ml Waschlösung 1 (je 100 cm<sup>2</sup> Membran) in exakt temperiertem Wasserbad mit der für die jeweilige Hybridisierungssonde optimalen Temperatur gewaschen. Danach wurde die Waschlösung 1 verworfen und die Membranen erneut - unter optimierten Bedingungen - 30 Minuten in 100 ml Waschlösung 2 (je 100 cm<sup>2</sup> Membran) gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für 1 Minute in 50 ml Waschpuffer (mit Tween 20) für die folgende Detektion äquilibriert und auf Filterpapier getrocknet. Gegebenenfalls wurden die hybridisierten Membranen bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C in Folie gelagert.

### **Immunologische Detektion der hybridisierten PCR-Amplifikate**

Die hybridisierte DNA wurde mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Die alkalische Phosphatase gekoppelten polyklonalen Anti-Digoxigenin-Antikörper binden an die mit Digoxigenin markierten Sonden der hybridisierten DNA. Anschließend wurde die Hybridisierung durch eine enzymkatalysierte Farbreaktion mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazolium-Salz (NBT; als Substrat) als blauroter Farbniederschlag sichtbar. Dazu wurde die Membran zunächst 30 Minuten bei ZT auf dem Schüttler mit 100 ml Puffer 1 inkubiert.

Nach Verwerfen des Puffers 1 wurden 20 ml Puffer 2 und 4  $\mu$ l Antikörper-Konjugat zur Membran hinzu pipettiert und für weitere 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. In einem erneuten Waschschrift wurden nun die nicht spezifisch gebundenen Antikörper für 30 Minuten in 100 ml Puffer 1 unter Schütteln bei ZT entfernt. Nach erneutem Verwerfen des Puffers 1 wurden 200  $\mu$ l des Farbsubstrats NBT/BCIP in 20 ml Puffer 3 zur Membran hinzu gegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 bis 60 Minuten im Dunkeln ohne Schütteln. Das Ergebnis der Hybridisierung ließ sich nun anhand des blauroten Farbumschlags ablesen. Die fertige Membran wurde luftblasenfrei mit ca. 5 ml TE in Folie eingeschweißt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

### III. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Subtypisierung von PCR-Amplifikaten des Flagellin-Gens von *B. burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose, mittels Dot blot-Hybridisierung. Eine Differenzierung zwischen den drei humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii* sollte erreicht werden. Hierzu wurden PCR-Amplifikate des für die Endoflagellen kodierenden Flagellin-Gens generiert und anschließend mit den drei spezifischen Gensonden Fla8, Fla15 und Fla16 im optimierten Dot blot-Verfahren subtypisiert.

#### 1. Generierung von Borrelien-Amplifikaten basierend auf dem Flagellin-Gen

Es wurden sechs Borrelienstämme, die die drei humanpathogenen Genospezies des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes repräsentierten, als Referenzstämme ausgewählt (siehe Tabellen II.3 und III.1). Anhand dieser und 21 weitere Stämme wurde sukzessive die Amplifizierbarkeit des Flagellin-Gens der drei humanpathogenen Genospezies mit den ausgewählten Primern Fla6 und Fla7 überprüft (siehe Kapitel II.2.3).

Genospezies	Borrelienstamm
<i>B. burgdorferi</i> s. s.	B31 und 297
<i>B. garinii</i>	1/B29 und G2
<i>B. afzelii</i>	FAC1 und PKo

Tab. III.1 Ausgewählte Borrelienstämme der drei humanpathogenen Genospezies des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes.

Dazu wurden die PCR-Amplifikate in einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel nachfolgend mit Ethidiumbromid angefärbt und fotografiert. Wie in Abbildung III.1 gezeigt, ließ sich bei allen 27 verwendeten Borrelienstämmen die zu erwartende 358 bp-Bande nachweisen (siehe Tabelle II.3). Anfänglich zeigten sich nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Amplifikate Doppelbanden im mit Ethidiumbromid gefärbten 2% igen Agarosegel. Dies konnte durch submerses Beladen des Gels verhindert werden. Auch von sieben nicht identifizierten Borrelienstämmen konnte ein 358 bp-Amplifikat des Flagellin-Gens generiert werden. Die biologische und geographische Herkunft sämtlicher, in dieser Studie eingesetzten, Borrelienstämme ist in Kapitel II.1.7 (Material und Methoden) aufgeführt. In den ersten Versuchsansätzen ließen sich jedoch nicht bei allen der 34 untersuchten Borrelien-Isolate ein PCR-Amplifikat generieren, wiederholt werden musste die PCR insbesondere bei einigen *B. garinii*-Stämmen. Als Negativkontrolle der PCR wurden statt der Ganzzell-Lysate Ansätze ohne DNA-Zugabe (Template) verwendet (siehe Abbildung III.2). Um Kontaminationen zu vermeiden wurde eine räumliche Trennung von DNA-Gewinnung, Ansetzen des PCR-Reaktionsansatzes und der Durchführung der PCR gewährleistet. Die bei jeder PCR und Hybridisierung mitgeführten Negativkontrollen blieben in jedem Versuch ohne Amplifikatnachweis, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass keine Kontaminationen vorlagen.

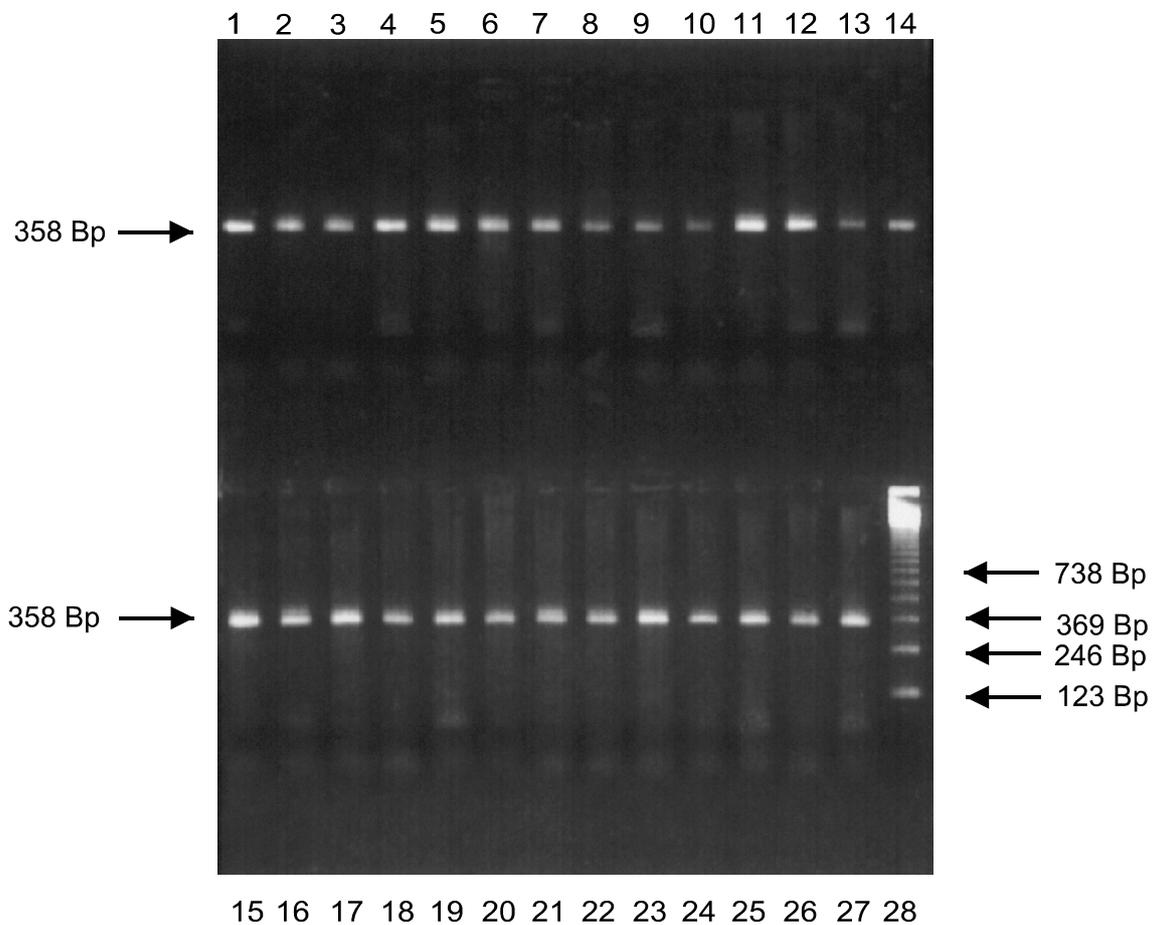


Abb. III.1 Agarosegelelektrophorese zum Nachweis eines 358 bp PCR-Amplifikats des Flagellin-Gens (2 %iges Agarosegel).

*B. burgdorferi s. s.*

1: B31, 2: Z25, 3: PKa-1, 4: 297, 5: 387, 6: LW 2, 7: 2307/1, 8: 2307/5,

*B. garinii*

9: 1/B29, 11: G1, 12: G2, 13: PBr, 14: PBi, 15: PTrob, 16: PStH,

*B. afzelii*

10: 61BV1, 17: EB1, 18: EB2, 19: EB3, 20: FEM1, 21: FEM2, 22: FAC1, 23:

PGau, 24: PKo, 25: ACA1, 26: 3521/2, 27: 3521/4,

Marker

28: 123 bp DNA-Marker.

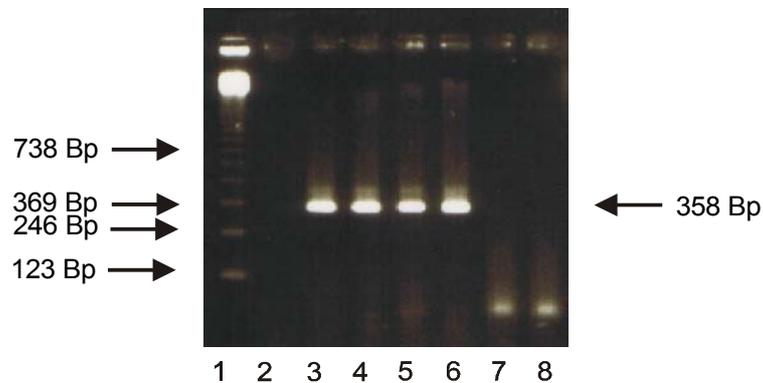


Abb. III.2 Agarosegelelektrophorese zum Nachweis eines 358 bp PCR-Amplifikats des Flagellin-Gens (2 %iges Agarosegel) des Stammes B31.  
1: 123 bp DNA-Marker, 2: Borrelien-Plasmide, 3-6: B31, 7+8: Negativ-Kontrolle.

## 2. Dot blot-Hybridisierung von PCR-Amplifikaten des Flagellin-Gens

Folgende Parameter sind vor und bei der Dot blot-Hybridisierung zu beachten:

1. Auswahl der Zielsequenz bzw. der Gensonde
2. Fixierungsmethode
3. DNA-Konzentration
4. Hybridisierungstemperatur
5. Ionenkonzentration des Hybridisierungspuffers und der Waschlösungen
6. Stringenz der Waschbedingungen.

Das Ergebnis der Hybridisierung im Dot blot-Verfahren wurde anhand einer Farbreaktion ausgewertet (Abbildung III.3 und Tabelle III.2).

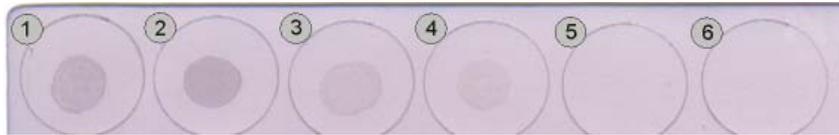


Abb. III.3 Beispiel für eine Dot blot-Hybridisierung mit sechs Referenzstämmen und Gensonde Fla8 (spezifisch für *B. burgdorferi* s.s.).  
 Waschtemperatur: 60 °C  
 Hybridisierungsbedingungen: Temperatur 60 °C, über Nacht  
 ++ : *B. burgdorferi* s. s. : 1: B31, 2: 297,  
 (+) : *B. garinii*: 3: 1/B29, 4: G2,  
 0 : *B. afzelii*: 5: FAC1, 6: PKo

Farbreaktion	Bedeutung
++ bis +++	deutliche Farbreaktion; Spezifische Hybridisierung
(+)	geringgradige Anfärbung; Unspezifische Anlagerung der Gensonden
0	keine Anfärbung

Tab.III.2 Auswertung der Farbreaktion der Dot blot-Hybridisierung.

Zum Austesten der optimalen Hybridisierungsbedingungen wurden wiederholt die sechs Referenzstämme eingesetzt (siehe Tabelle III.1). Als Kontrolle wurde Lambda-Phagen-DNA mitgeführt, die wie in Abbildung III.4 und III.5 dargestellt, keine Kreuzreaktivität zeigte. Die ebenfalls aufgetragene Kontroll-DNA aus dem DIG Nucleic Acid Detection Kit zur Überprüfung des Farbumschlags (BOEHRINGER MANNHEIM) zeigte bei 1 ng eine deutliche und bei 100 pg eine schwache Farbreaktion. D. h., mindestens 1 ng war notwendig, um einen starken Farbumschlag zu erzielen.

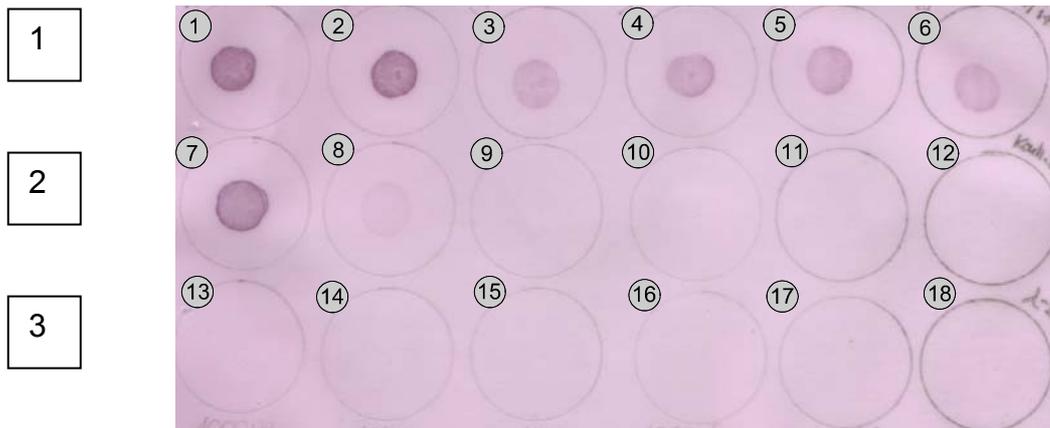


Abb.III.4 Dot blot-Hybridisierung mit sechs Referenzstämmen, Kontroll-DNA und Lambda-Phagen-DNA und Gensonde Fla8 (spezifisch für *B. burgdorferi* s.s.).  
Waschtemperatur: 68 °C  
Hybridisierungsbedingungen: Temperatur 60 °C, über Nacht

- 1. Zeile:** Borrelien-Referenzstämmen; je 10 µl  
*B. burgdorferi* s. s.: **1:** B31, **2:** 297;  
*B. garinii:* **3:** 1/B29, **4:** G2;  
*B. afzelii:* **5:** FAC1, **6:** PKo.  
**2. Zeile:** Kontroll-DNA in unterschiedlichen Konzentrationen; je 10 µl  
**7:** 100 pg/µl, **8:** 10 pg/µl, **9:** 1.000 fg/µl, **10:** 100 fg/µl, **11:** 10 fg/µl, **12:** 1 fg/µl.  
**3. Zeile:** Lambda-Phagen-DNA in unterschiedlichen Konzentrationen; je 10 µl  
**7:** 100 pg/µl, **8:** 10 pg/µl, **9:** 1.000 fg/µl, **10:** 100 fg/µl, **11:** 10 fg/µl, **12:** 1 fg/µl.

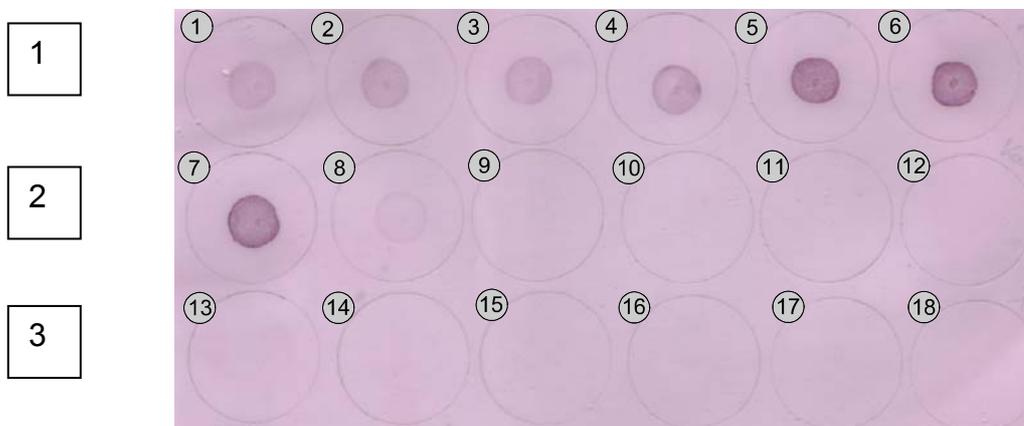


Abb.III.5 Dot blot-Hybridisierung mit sechs Referenzstämmen, Kontroll-DNA, Lambda-Phagen-DNA und Gensonde Fla16 (spezifisch für *B. afzelii*).  
Waschtemperatur: 68°C  
Hybridisierungsbedingungen: Temperatur 60 °C, über Nacht

- 1. Zeile:** Borrelien-Referenzstämmen; je 10 µl  
*B. burgdorferi* s. s.: **1:** B31, **2:** 297;  
*B. garinii:* **3:** 1/B29, **4:** G2;  
*B. afzelii:* **5:** FAC1, **6:** PKo.  
**2. Zeile:** Kontroll-DNA in unterschiedlichen Konzentrationen; je 10 µl  
**7:** 100 pg/µl, **8:** 10 pg/µl, **9:** 1.000 fg/µl, **10:** 100 fg/µl, **11:** 10 fg/µl, **12:** 1 fg/µl.  
**3. Zeile:** Lambda-Phagen-DNA in unterschiedlichen Konzentrationen; je 10 µl  
**7:** 100 pg/µl, **8:** 10 pg/µl, **9:** 1.000 fg/µl, **10:** 100 fg/µl, **11:** 10 fg/µl, **12:** 1 fg/µl.

Untersuchungen mit der Gensonde Fla15 erbrachten keine nachvollziehbaren Ergebnisse, selbst bei einer mehrstündigen Inkubationszeit der hybridisierten Membranen mit den Farbreagenzien. Die Membranen der anfänglichen Versuche zeigten lediglich eine starke Hintergrundreaktion, so dass sie nicht abgebildet wurden und weitere Untersuchungen zur Gensonde Fla15 erfolgten (siehe Kapitel III.2.4.3.1).

## 2.1 Optimierung der Sensitivität durch DNA-Fixierung

Um eine ausreichende Sensitivität bei der Dot blot-Hybridisierung zu erreichen, wurden Vorversuche mit den sechs ausgewählten Borrelienstämmen (B31, 297, 1/B29, G2, FAC1 und PKo) durchgeführt. Zunächst wurden zwei Fixierungsmethoden und deren Einfluß auf die Sensitivität untersucht:

1. Heißluftofen
2. UV-Crosslinker

Es wurde analysiert, bei welcher DNA-Konzentration eine Sättigung der Farbreaktion erzielt werden konnte. Dabei zeigte sich, dass mindestens 1 ng DNA im UV-Crosslinker ( $120 \text{ J/cm}^2$ ) für eine maximale Färbung benötigt wurden. Demgegenüber wurde für die Heißluftfixierung eine minimale DNA-Menge von 10 ng ermittelt. Für die anschließenden Versuche wurden daher 2 ng amplifizierte DNA mittels UV-Crosslinker auf die Nylonmembran fixiert und diese für die Dot blot-Hybridisierung verwendet.

## 2.2 Ermittlung der geeigneten DNA-Konzentration

Eine genaue Einstellung der DNA-Konzentration beeinflusst die Interpretierbarkeit der Farbumschläge. Bestehen zu große Unterschiede in der Konzentration, können unspezifische Farbreaktionen bei hohen DNA-Mengen unter Umständen ebenso stark wie spezifische bei geringerer Menge ausfallen. Weiterhin wird durch eine Optimierung der eingesetzten DNA-Menge eine Hintergrundreaktion minimiert. Zur Ermittlung der geeigneten DNA-Konzentration wurden Verdünnungsreihen der Borrelien-Amplifikate der sechs ausgewählten Stämme zwischen 10 ng/ $\mu\text{l}$  und 1 fg/ $\mu\text{l}$  erstellt. Je 10  $\mu\text{l}$  davon wurden für die Dot blot-Hybridisierung eingesetzt. Eine DNA-Menge von 2 ng

gelöst in einem Volumen von 10  $\mu$ l lieferte spezifische Farbreaktionen bei geringer Hintergrundreaktion und wurde im Folgenden eingesetzt.

Für die weiteren Versuche wurde die Konzentration spektralphotometrisch gemessen, auf 2 ng/ $\mu$ l eingestellt und zur optischen Kontrolle der Einstellung mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abbildung III.6). Danach erfolgte eine 1:10-Verdünnung für die Dot blot-Hybridisierung.

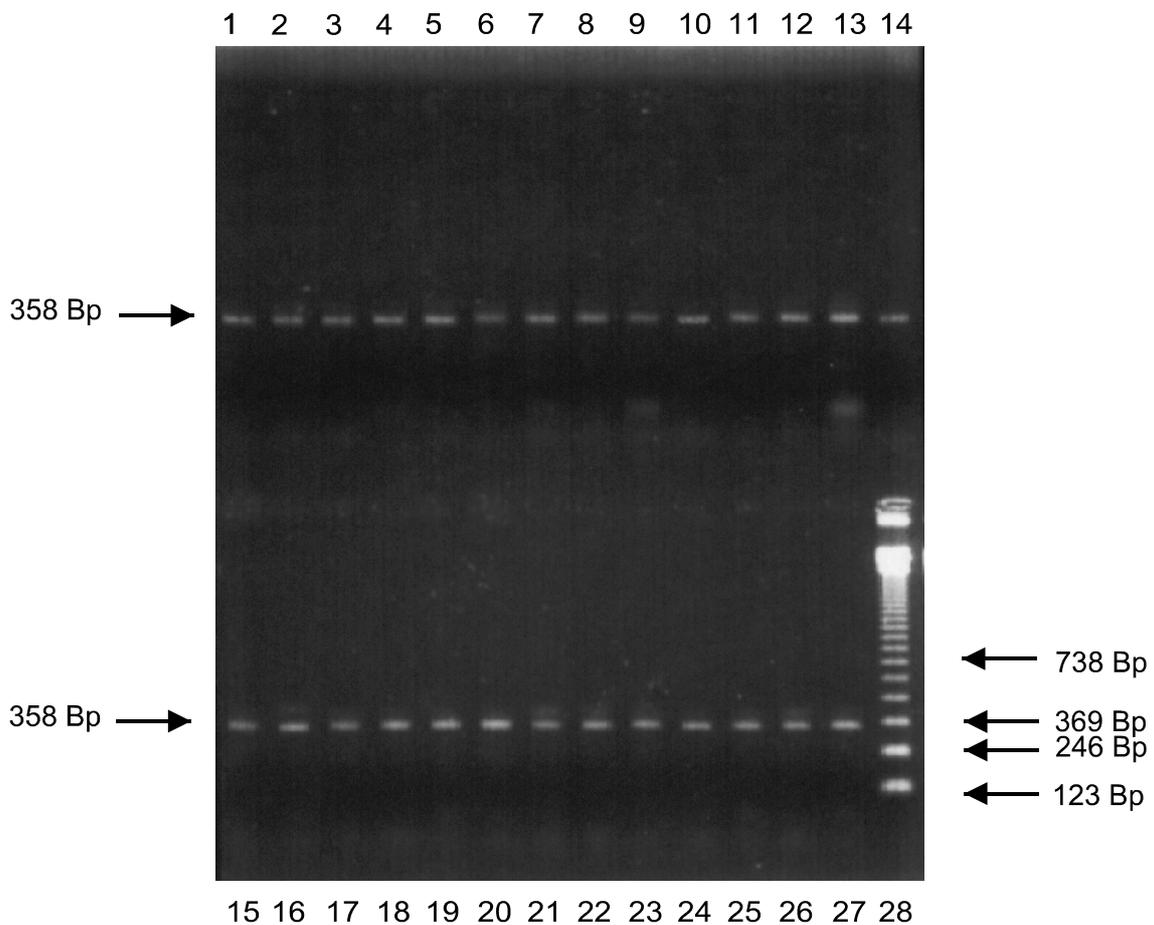


Abb.III.6 Agarosegelelektrophorese zum Nachweis des amplifizierten 358 bp PCR-Amplifikats des Flagellin-Gens, nach Einstellung der Amplifikat-Konzentration auf 2 ng/ $\mu$ l (2 %iges Agarosegel).

*B. burgdorferi s. s.*

**1:** B31, **2:** Z25, **3:** PKa-1, **4:** 297, **5:** 387, **6:** LW 2, **7:** 2307/1, **8:** 2307/5,

*B. garinii*

**9:** 1/B29, **11:** G1, **12:** G2, **13:** PBr, **14:** PBi, **15:** PTrob, **16:** PSth,

*B. afzelii*

**10:** 61BV1, **17:** EB1, **18:** EB2, **19:** EB3, **20:** FEM1, **21:** FEM2, **22:** FAC1, **23:** PGau, **24:** PKo, **25:** ACA1, **26:** 3521/2, **27:** 3521/4,

Marker

**28:** 123 bp DNA-Marker

## 2.3 Optimierung der Ionenkonzentration

Die Natriumkonzentrationen des Hybridisierungspuffers sowie der Waschlösungen 1 und 2 wurden gemäß den Angaben des Herstellers verwendet: Hybridisierungspuffer: 5x SSC; Waschlösung 1: 2x SSC, Waschlösung 2: 0,1x SSC. Durch Veränderung der Ionenkonzentration der Waschlösung 1 (0,5x oder 0,1x SSC) bei gleichbleibender Ionenkonzentration der Waschlösung 2 konnte keine Verbesserung für die Hybridisierung erzielt werden.

## 2.4 Optimierung der Temperaturbedingungen

Die Anleitung des Herstellers BOEHRINGER MANNHEIM empfiehlt eine Prähybridisierungs- und Hybridisierungstemperatur von 60 °C und eine Waschttemperatur von 68 °C. In einer Vorgängerarbeit wurden hiermit allerdings nur verwertbare Ergebnisse für die Genospezies *B. burdorferi* s. s. erzielt. Die Temperaturen wurden daher im Folgenden variiert, wobei zunächst alle drei Temperaturen gleich gehalten wurden. Ausschlaggebend für das Ergebnis ist hierbei der Schritt mit der höchsten Temperatur.

### 2.4.1 Austestung des Temperaturbereichs

Um die Temperatur für die Anlagerung und die Waschschritte der spezifischen Gensonden Fla8 (*B. burgdorferi* s. s.), Fla15 (*B. garinii*) und Fla16 (*B. afzelii*) zu verifizieren, wurden die Prähybridisierung, die Hybridisierung und die Waschschritte zunächst bei 60°C, 68°C und 80°C durchgeführt, wobei für alle drei Schritte die gleich Temperatur gewählt wurde (siehe Abbildung III.7 bis III.9 und Tabelle III.3 bis III.4). Bei einer Temperatur von 80°C sowie einer Detektionszeit von bis zu 30 Stunden konnte für alle drei Gensonden keine positive Farbreaktion nachgewiesen werden. Bei einer Temperatur von 68°C zeigte sich eine unspezifische, schwache Farbreaktion der Sonde Fla16 (*B. afzelii*) für alle drei Genospezies. Die beiden anderen Gensonden Fla8 (*B. burgdorferi* s. s.) und Fla15 (*B. garinii*) zeigten im Vergleich zur aktuellen Literatur mehrere nur unspezifische Farbreaktionen, die als negativ gewertet wurden.

Wurden die Prähybridisierung und die Hybridisierung bei einer Temperatur von 60 °C durchgeführt, so fanden sich spezifische und unspezifische schwache Farbreaktion aller drei Gensonden. Die Gensonde Fla8 (*B. burgdorferi* s. s.) zeigte eine spezifische Farbreaktion für *B. burgdorferi* s. s. sowie eine unspezifische Farbreaktion für *B. garinii*. Die Gensonde Fla15 (*B. garinii*) wies eine spezifische Farbreaktion für *B. garinii*, aber gleichzeitig eine starke, jedoch unspezifische Farbreaktion für *B. burgdorferi* s.s. auf. Die Gensonde Fla16 (*B. afzelii*) zeigte einen schwache, jedoch spezifische Farbreaktion für *B. afzelii*. In weiteren Versuchen verhielt sich die Gensonde Fla15 (*B. garinii*) völlig unspezifisch (siehe auch Kapitel III.2.4.3.1). Nachdem die Untersuchungen mit o.g. Temperaturen für die Prähybridisierung und Hybridisierung belegten, dass eine Temperatur von 60°C geeignet war, wurden im Folgenden die Prähybridisierung und Hybridisierung bei 60 °C durchgeführt.

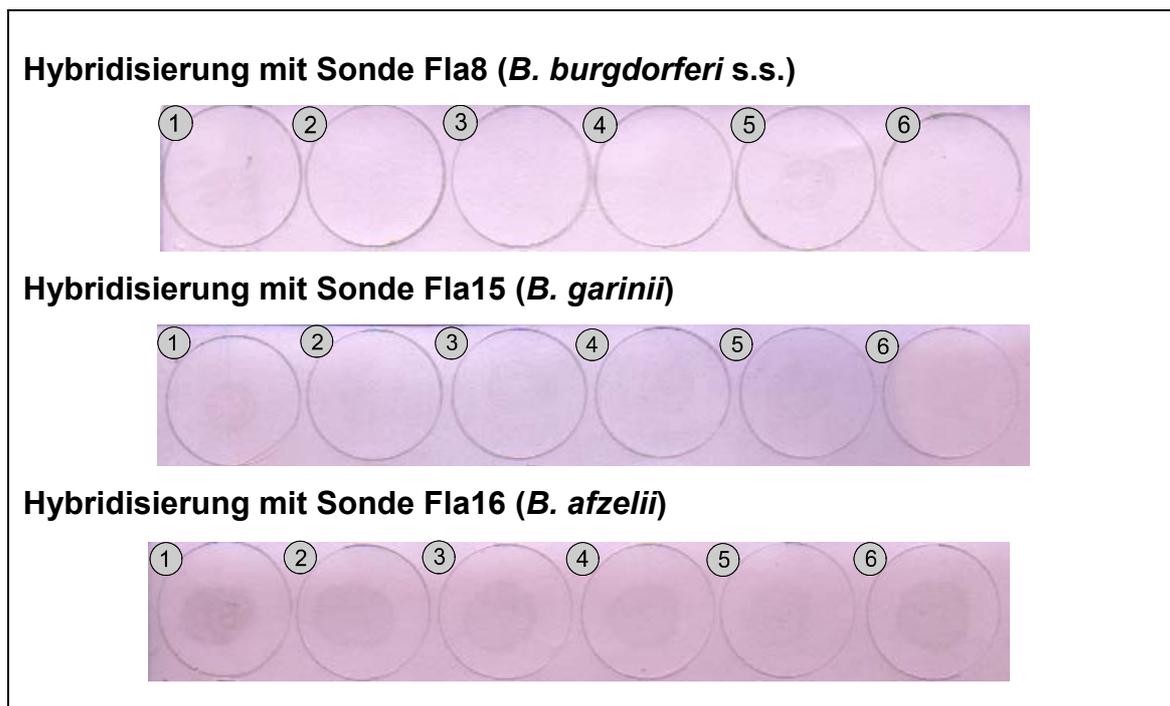


Abb. III.7      Dot blot-Hybridisierung mit sechs Referenzstämmen.  
 Waschtemperatur: 68 °C.  
 Hybridisierungstemperatur: 68°C.  
*B. burgdorferi* s. s.: **1**: B31, **2**: 297,  
*B. garinii*: **3**: 1/B 29, **4**: G2,  
*B. afzelii*: **5**: FAC1, **6**: PKo.

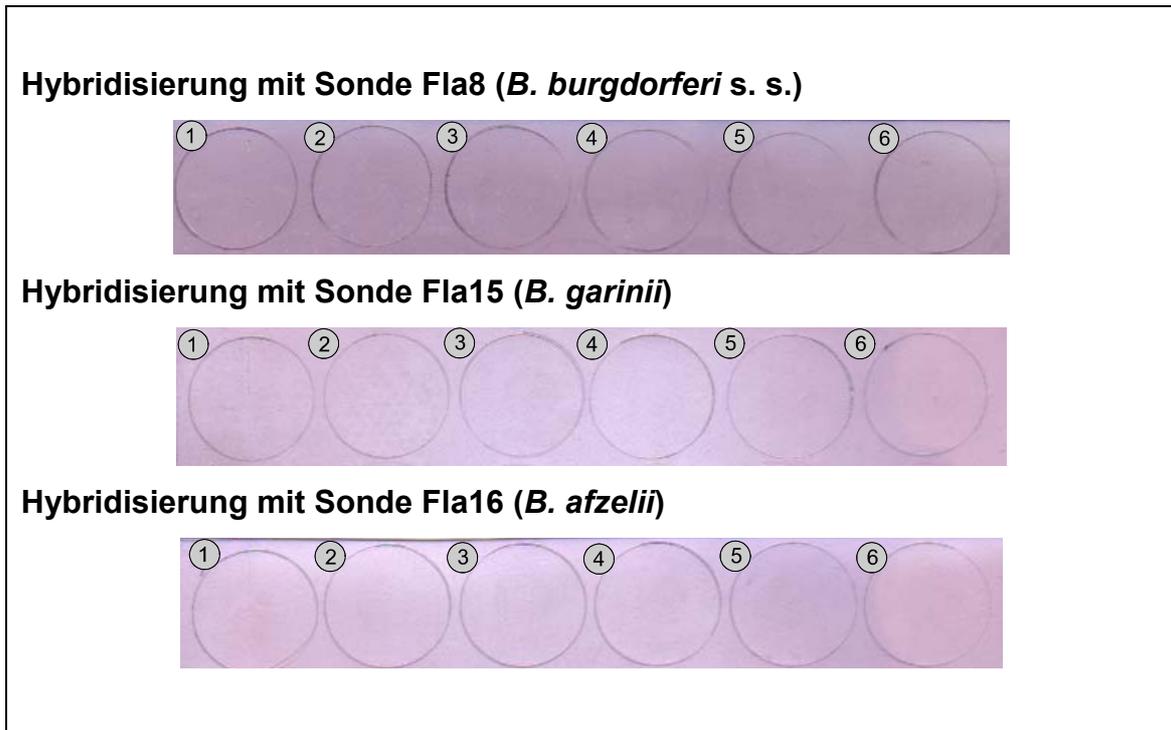


Abb. III.8 Dot blot-Hybridisierung mit sechs Referenzstämmen.  
Hybridisierungstemperatur: 80°C.  
Waschtemperatur: 80 °C.  
*B. burgdorferi* s. s.: 1: B31, 2: 297,  
*B. garinii*: 3: 1/B 29, 4: G2,  
*B. afzelii*: 5: FAC1, 6: PKo.

Hybridisierungs- und Wascht-temperatur	Fla8			Fla15			Fla16		
	B. b.	B. g.	B. a.	B. b.	B. g.	B. a.	B. b.	B. g.	B. a.
68 °C	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(+)	(+)	(+)
80 °C	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. III.3 Ergebnis der Hybridisierung bei nachfolgendem Waschen von 68°C.  
B. b. = *Borrelia burgdorferi* s. s. (B31, 297);  
B. g. = *Borrelia garinii* (1/B29, G2);  
B. a. = *Borrelia afzelii* (FAC1, PGau).  
0: keine Anfärbung;  
(+): geringgradige Anfärbung, jedoch unspezifisch  
Die den Sonden zugeordneten Borrelienspezies sind jeweils fett hervorgehoben.

## 2.4.2 Optimierung der Waschtemperatur

### 2.4.2.1 Austesten der geeigneten Waschtemperatur

Orientierend erfolgten die ersten Waschschriffe der mit den Gensonden Fla8 (*B. burgdorferi* s.s.), Fla15 (*B. garinii*) und Fla16 (*B. afzelii*) hybridisierten Membranen bei 60 und 80 °C. Bei einer Waschtemperatur von 60 °C zeigten sich bereits richtungsweisende Ergebnisse für die Gensonden Fla8 und Fla16 (siehe Abbildung III.9 und Tabelle III.4). Die getesteten Borrelienstämme wiesen eine unspezifische Hybridisierung für Gensonde Fla15 auf. Bei einer Erhöhung der Hybridisierungs- und Waschtemperatur um 20°C konnte dagegen keine Anlagerung der drei Gensonden nachgewiesen werden (siehe Abbildung III.8 und Tabelle III.3).

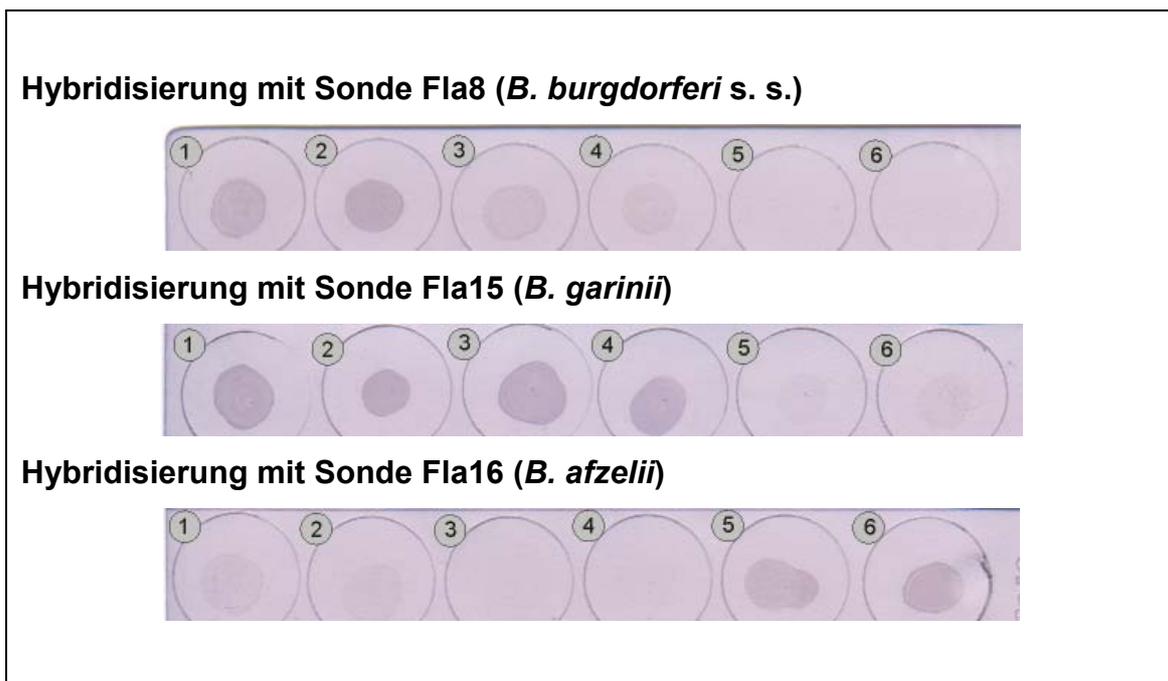


Abb. III.9 Dot blot-Hybridisierung mit sechs Referenzstämmen.  
Hybridisierungstemperatur: 60°C.  
Waschtemperatur: 60 °C.  
*B. burgdorferi* s. s.: 1: B31, 2: 297,  
*B. garinii*: 3: 1/B 29, 4: G2,  
*B. afzelii*: 5: FAC1, 6: PKo.

Hybridisierungs- und Wascht-temperatur	Fla8			Fla15			Fla16		
	B. b.	B. g.	B. a.	B. b.	B. g.	B. a.	B. b.	B. g.	B. a.
60 °C	++	(+)	0	++	++	0	(+)	(+)	++

Tab. III.4 Zusammengefaßte Ergebnisse der Hybridisierung und des Waschens bei je 60 °C und 80 °C (siehe Abbildung III.7 bis III.8 und Tabelle III.3).  
 B. b. = *Borrelia burgdorferi* s. s. (B31, 297);  
 B. g. = *Borrelia garinii* (1/B29, G2);  
 B. a. = *Borrelia afzelii* (FAC1, PGau).  
 0: keine Anfärbung;  
 (+): geringgradige Anfärbung, unspezifisch;  
 ++: deutliche Farbreaktion, spezifisch.  
 Die den Sonden zugeordneten Borrelienspezies sind jeweils fett hervorgehoben.

#### 2.4.2.2 Ermittlung der optimalen Waschbedingungen für die Gensonden Fla8 und Fla16

Um den optimalen Temperaturbereich für das Waschen einzugrenzen, wurde das Hybridisierungsverhalten der drei Gensonden Fla8, Fla15 und Fla16 zwischen 60 und 74 °C in 2 °C-Intervallen untersucht. Dazu wurde die fixierte DNA der sechs Referenzstämme mit den drei Sonden Fla8, Fla15 und Fla16 bei 60 °C inkubiert und die Membranen anschließend bei den verschiedenen Temperaturen gewaschen. Die Auswertung des Hybridisierungsverhaltens bei Temperaturen von 64 °C und kleiner sowie bei Temperaturen von 70 °C und größer zeigte zu diesem Zeitpunkt keine Spezifitätssteigerung und wurde zunächst nicht weiter verfolgt. Für die folgenden Versuche waren die Ergebnisse der Dot blot-Hybridisierung der drei Sonden Fla8, Fla15 und Fla16 bei den Waschttemperaturen von 66 °C, 68 °C und 70 °C entscheidend (siehe Abbildungen III.10 bis III.12 und Tabelle III.5). Es zeigte sich eine sehr hohe Spezifität der Gensonde Fla8 zu den *B. burgdorferi* s. s.-Stämmen bei einer Waschttemperatur von 68 °C sowie ein guter Nachweis der *B. afzelii*-Stämme durch Gensonde Fla16 im Temperaturbereich von 66 °C bis 68 °C. Für die Sonde Fla15 konnte keine zur Subtypisierung von Borrelienstämmen geeignete Waschttemperatur ermittelt werden, das Hybridisierungsverhalten war gänzlich unspezifisch (siehe auch Kapitel III.2.4.3.1).

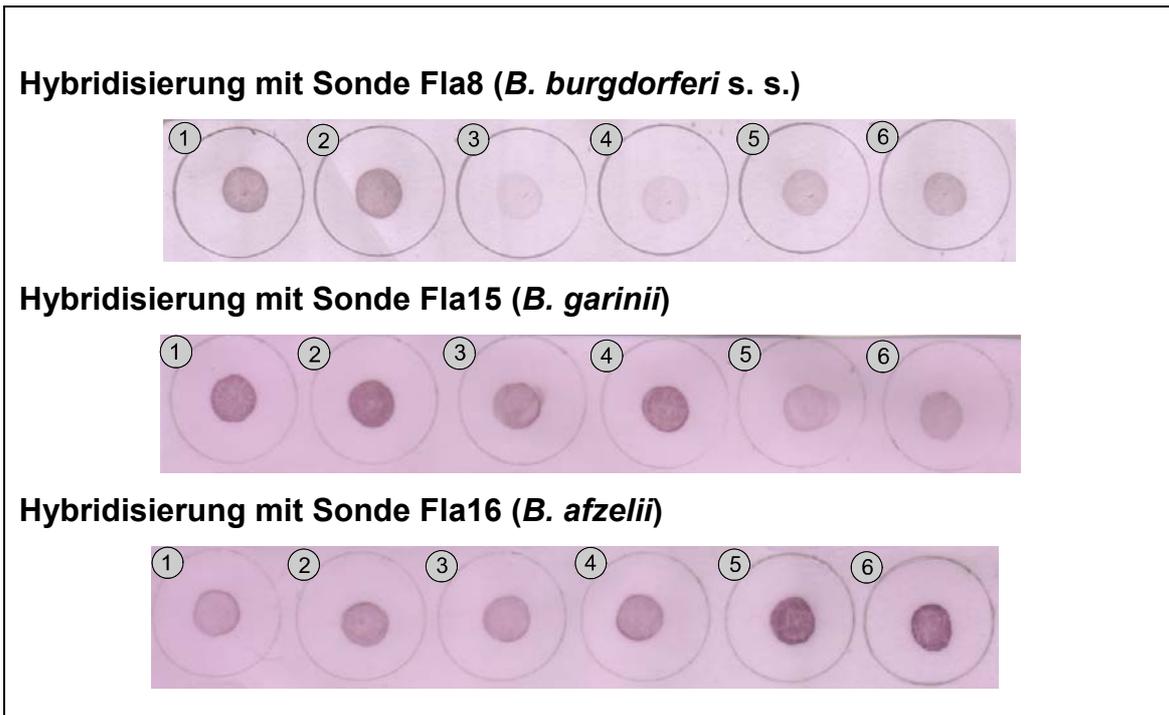


Abb. III.10 Dot blot-Hybridisierung mit sechs Referenzstämmen.  
Hybridisierungstemperatur: 60°C.  
Waschtemperatur: 70 °C.  
*B. burgdorferi* s. s.: 1: B31, 2: 297,  
*B. garinii*: 3: 1/B29, 4: G2,  
*B. afzelii*: 5: FAC1, 6: PKo.

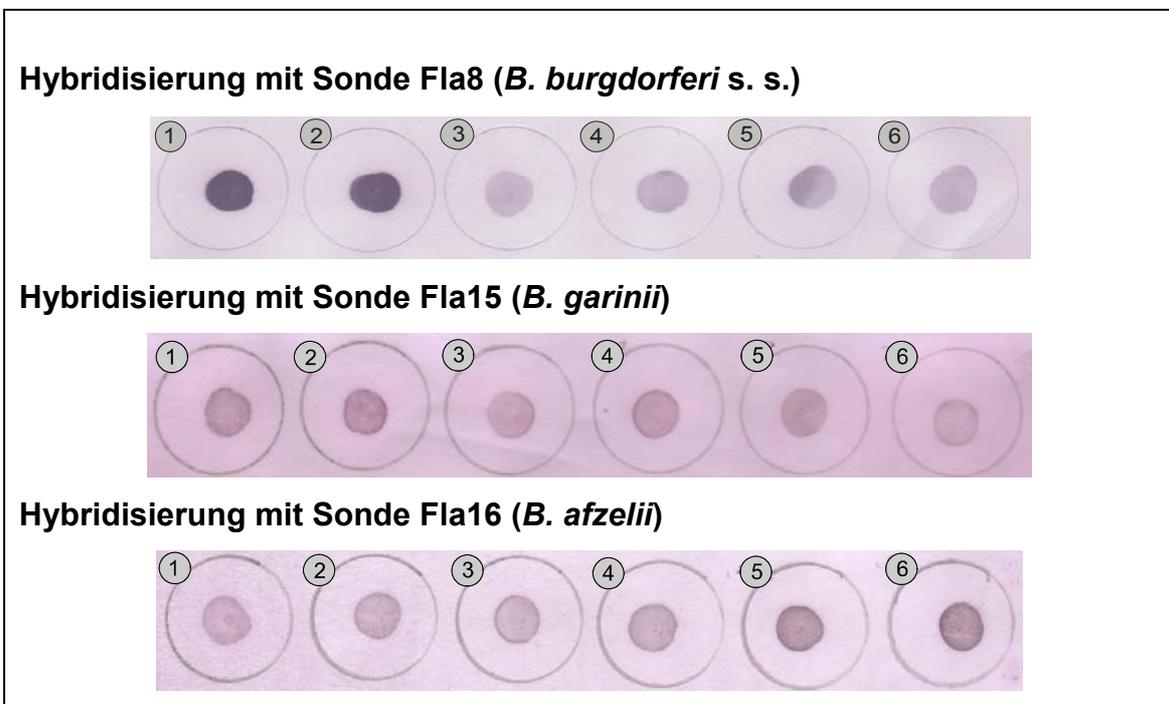


Abb. III.11 Dot blot-Hybridisierung mit sechs Referenzstämmen.  
Hybridisierungstemperatur: 60°C.  
Waschtemperatur: 68 °C.  
*B. burgdorferi* s. s.: 1: B31, 2: 297,  
*B. garinii*: 3: 1/B29, 4: G2,  
*B. afzelii*: 5: FAC1, 6: PKo.

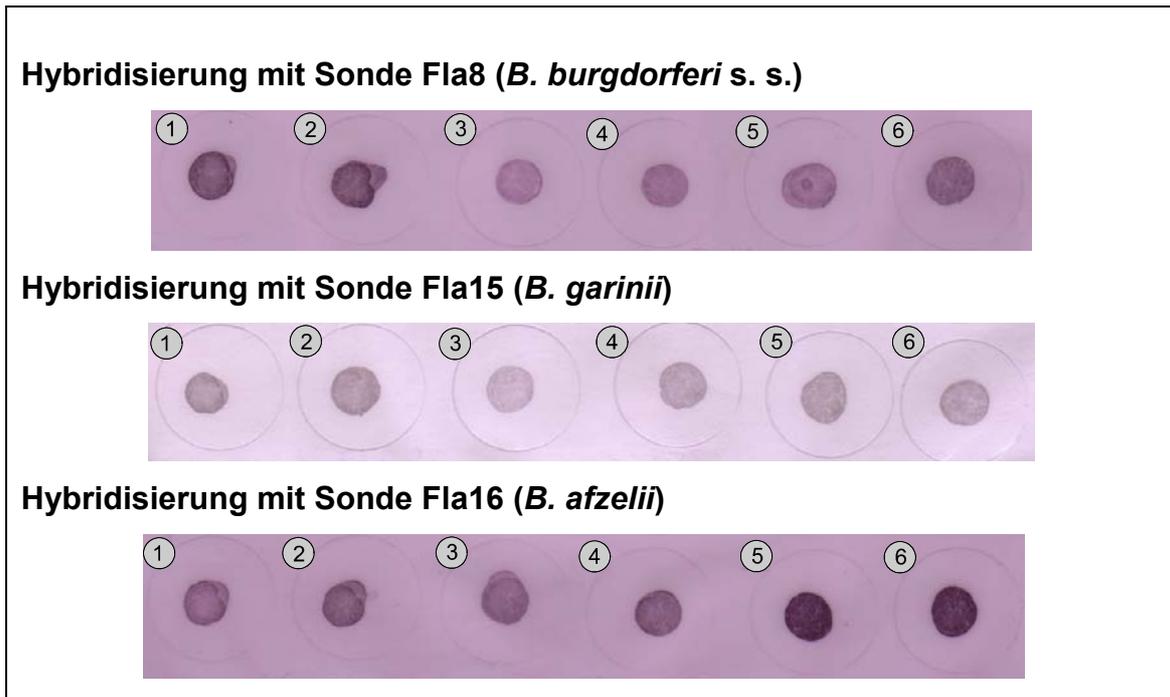


Abb. III.12 Dot blot-Hybridisierung mit sechs Referenzstämmen.  
 Hybridisierungstemperatur: 60°C.  
 Waschttemperatur: 66 °C.  
*B. burgdorferi* s. s.: 1: B31, 2: 297,  
*B. garinii*: 3: 1/B29, 4: G2,  
*B. afzelii*: 5: FAC1, 6: PKo

Wasch- temperatur	Fla8			Fla15			Fla16		
	B. b.	B. g.	B. a.	B. b.	B. g.	B. a.	B. b.	B. g.	B. a.
62 °C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
64 °C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
66 °C	<b>++</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>
68 °C	<b>+++</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<b>++</b>
70 °C	<b>++</b>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<b>+</b>
72 °C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
74 °C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Tab. III.5 Untersuchungen zur Eingrenzungen der Waschttemperaturen.  
 Hybridisierungstemperatur: 60°C.  
 Waschttemperatur: 62, 64, 66, 68, 70, 72 und 74 °C.  
 B. b. = *Borrelia burgdorferi* s. s. (B31, 297);  
 B. g. = *Borrelia garinii* (1/B29, G2);  
 B. a. = *Borrelia afzelii* (FAC1, PGau).  
**0**: keine Anfärbung;  
**(+)**: geringgradige Anfärbung, unspezifisch;  
**++ bis +++**: deutliche Farbreaktion, spezifisch.  
 Die den Sonden zugeordneten Borrelienspezies sind jeweils fett hervorgehoben.

## 2.4.3 Sondenspezifische Optimierungen

### 2.4.3.1 Untersuchung mit der neu synthetisierten Gensonde Fla15/2

Nachdem die Variation der Waschtemperatur der mit Sonde Fla15 hybridisierten Membran in 2 °C-Intervallen zwischen 58 °C und 74 °C zu keinem Ergebnis führte, wurde die Möglichkeit eines Synthesefehlers erwogen und eine neu synthetisierte Gensonde eingesetzt.

Es wurden parallel Hybridisierungen mit der neuen Gensonde Fla15/2 sowie der alten Gensonde Fla15/1 durchgeführt, wobei die Waschschritte zwischen 60 und 70 °C erfolgten. Im direkten Vergleich ließ sich klar zeigen, dass mit der neu synthetisierten Gensonde Fla15/2 die Genospezies spezifische Differenzierung für *B. garinii* gelang. Das beste Ergebnis zeigte sich bei einer Temperatur von 64 °C, woraus geschlossen wurde, dass die optimale Waschtemperatur um 64 °C zu erwarten war. In Abbildung III.13 und Tabelle III.6 sind die Parallelversuche beider Sonden dargestellt.

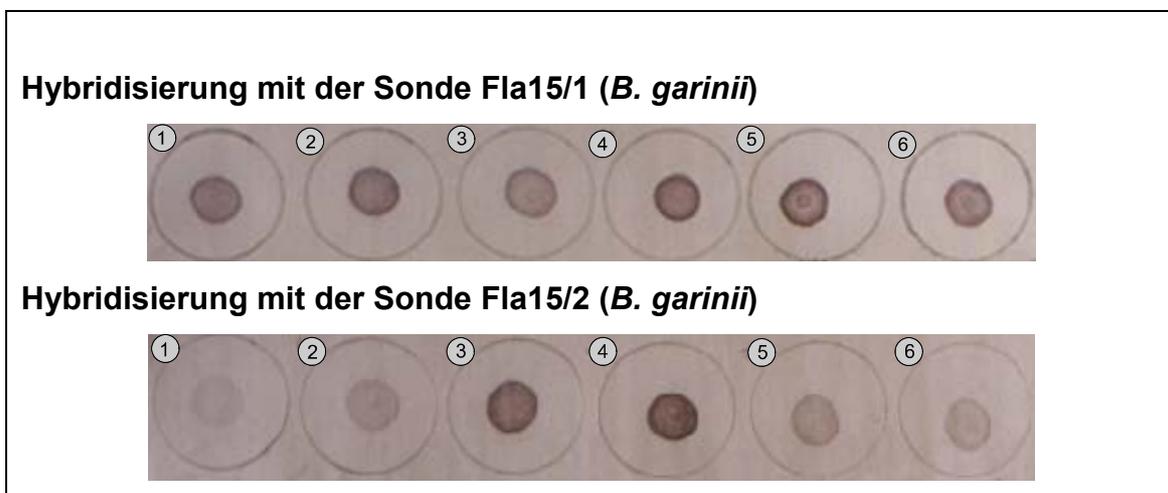


Abb. III.13 Direkter Vergleich der Gensonden Fla15/1 und Fla15/2. Die Sonde 15/2 zeigt im Gegensatz zur Sonde 15/1 ein spezifisches Hybridisierungsverhalten.  
Hybridisierungstemperatur: 60°C.  
Waschtemperatur: 64 °C.  
*B. burgdorferi* s. s.: 1: B31, 2: 297,  
*B. garinii*: 3: 1/B29, 4: G2,  
*B. afzelii*: 5: FAC1, 6: PKo.

Wasch- temperatur	Fla15/1			Fla15/2		
	B. b.	<b>B. g.</b>	B. a.	B. b.	<b>B. g.</b>	B. a.
60 °C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
62 °C	(+)	(+)	(+)	(+)	<b>+</b>	(+)
64 °C	(+)	(+)	(+)	(+)	<b>++</b>	(+)
66 °C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
68 °C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
70 °C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Tab. III.6

Direkter Vergleich der Gensonden Fla15/1 und Fla15/2.

B. b. = *Borrelia burgdorferi* s. s. (B31, 297);

B. g. = *Borrelia garinii* (1/B29, G2);

B. a. = *Borrelia afzelii* (FAC1, PGau).

0: keine Anfärbung;

(+): geringgradige Anfärbung, unspezifisch;

++: deutliche Farbreaktion, spezifisch.

Die den Sonden zugeordneten Borrelienspezies sind jeweils fett hervorgehoben.

#### 2.4.3.2 Optimierung der spezifischen Waschttemperaturen für Gensonden Fla15/2 und Fla16

Nachdem die optimalen Hybridisierungs- und Waschbedingungen für Gensonde Fla8 (*B. burgdorferi* s. s.) ermittelt waren (siehe dazu Abbildung III.11 und Tabelle III.6), wurden zu einer weiteren Optimierung der Hybridisierung für die Gensonden Fla15/2 (*B. garinii*) und Fla16 (*B. afzelii*) engere Temperaturbereiche ausgewählt (siehe Abbildung III.14). Für die mit Sonde Fla15/2 hybridisierten Membranen wurden Waschttemperaturen zwischen 63 und 64 °C ausgewählt. In gleicher Weise wurde das Temperaturintervall zwischen 67 und 68 °C für die Sonde Fla16 untersucht. Die ermittelten optimalen Temperaturen zur genospezifischen Differenzierungen sind in Tabelle III.7 zusammengefasst. Unter diesen hochstringenten Bedingungen konnte eine eindeutige Differenzierung zwischen *B. garinii* (63,1 °C) und für *B. afzelii* (67,1 °C) erreicht werden. Zuvor war bereits die optimale Waschttemperatur für *B. burgdorferi* s. s. von 68°C ermittelt worden (siehe Kapitel III.2.4.2.2).

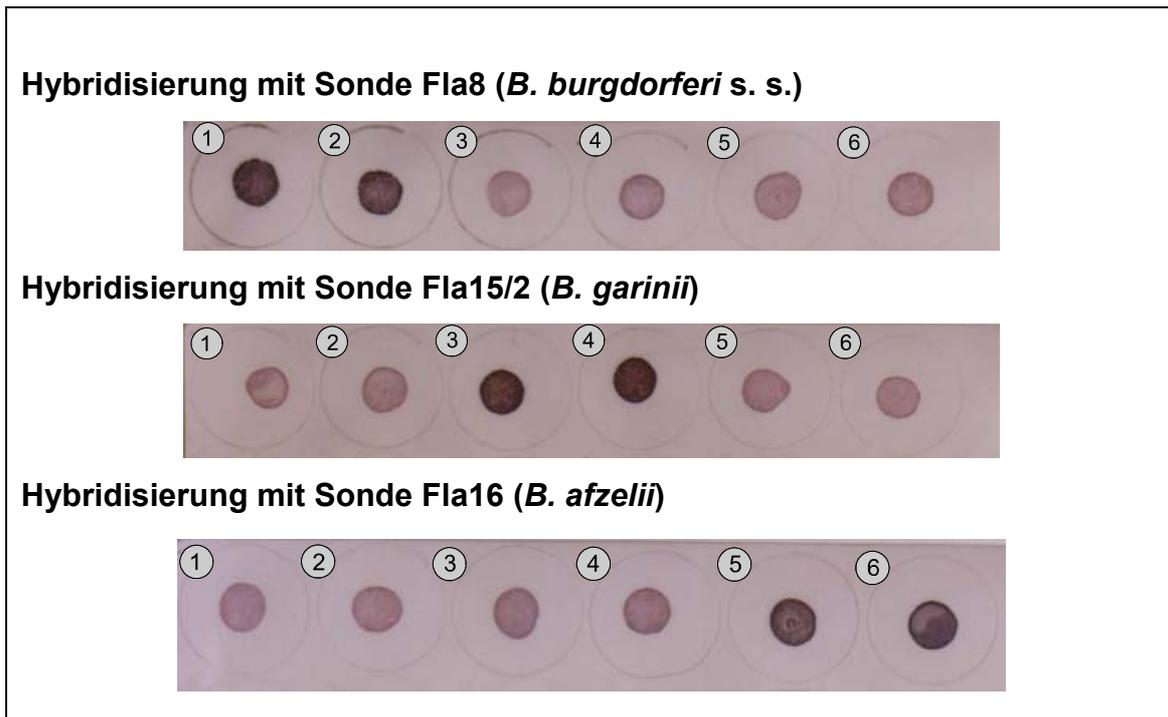


Abb. III.14 Dot blot-Hybridisierung unter stringenten Waschbedingungen.  
Hybridisierungstemperatur: 60°C.

Membran mit Sonde Fla8: **Waschtemperatur 68,0 °C** (+/- 0,2 °C).  
 Membran mit Sonde Fla15/2: **Waschtemperatur 63,3 °C** (+/- 0,2 °C).  
 Membran mit Sonde Fla6: **Waschtemperatur 67,1 °C** (+/- 0,2 °C).

*B. burgdorferi* s. s.: 1: B31, 2: 297,  
*B. garinii*: 3: 1/B29, 4: G2,  
*B. afzelii*: 5: FAC1, 6: PKo.

Sonde	Spezifität für Genospezies	Waschtemperatur
Fla15/2	<i>B. garinii</i>	<b>63,1 °C (+/- 0,2 °C)</b>
Fla16	<i>B. afzelii</i>	<b>67,1 °C (+/- 0,2 °C)</b>
Fla8	<i>B. burgdorferi</i> s. s.	<b>68,0 °C (+/- 0,2 °C)</b>

Tab. III.6 Hochspezifische Waschtemperaturen zur Differenzierung von PCR-Amplifikaten des Flagellin-Gens der drei humanpathogenen Stämme des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes mit Hilfe der Gensonden Fla8, Fla15/2 und Fla16.

### **3. Subtypisierung von typisierten und nicht-charakterisierten *B. burgdorferi* s. l.-Stämmen**

Nach Optimierung der geeigneten Waschttemperaturen für die Dot blot-Hybridisierung mit den drei hochspezifischen Sonden Fla8, Fla15/2 und Fla16 erfolgte eine Überprüfung weiterer Stämme des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes aus der institutseigenen Stammsammlung.

Es wurden PCR-Amplifikate des Flagellin-Gens von 21 weiteren bekannten Laborstämmen sowie von sieben noch nicht typisierten Borrelienstämmen generiert (siehe Kapitel III.1). Diese wurden anschließend mittels Dot blot-Hybridisierung subtypisiert. Für alle 27 vorcharakterisierten Borrelienstämmen konnte ihre in der Literatur beschriebenen Genospezies mittels Dot blot-Hybridisierung bestätigt werden. Als Genospezies *B. burgdorferi* s. s. wurden die Stämme B31, Z25, PKa-1, 297, 387, LW2, 2307/01 und 2307/5 identifiziert (siehe Abbildung III.15). Eine Übereinstimmung mit der Genospezies *B. garinii* konnte für die Stämme 1/B29, G1, G2, PBr, PBi, PTrob und PSth ermittelt werden (siehe Abbildung III.16). Eine Zuordnung zur Genospezies *B. afzelii* erfolgte bei den Stämmen EB1, EB2, EB3, FEM1, FEM2, FAC1, PGau, PKo, ACA1, 3521/2 und 3521/4 (siehe Abbildung III.17). Obwohl der Stamm 61BV1 als *B. garinii* in der Stammsammlung geführt wurde, zeigte sich durch die Hybridisierungsversuche eine eindeutige Diskrepanz. Dieser Stamm reagierte mit der spezifischen Gensonde Fla16 am stärksten, so dass 61BV1 aufgrund seines Hybridisierungsverhaltens als Genospezies *B. afzelii* klassifiziert wurde.

### Hybridisierung mit Sonde Fla8 (*B. burgdorferi* s.s.)

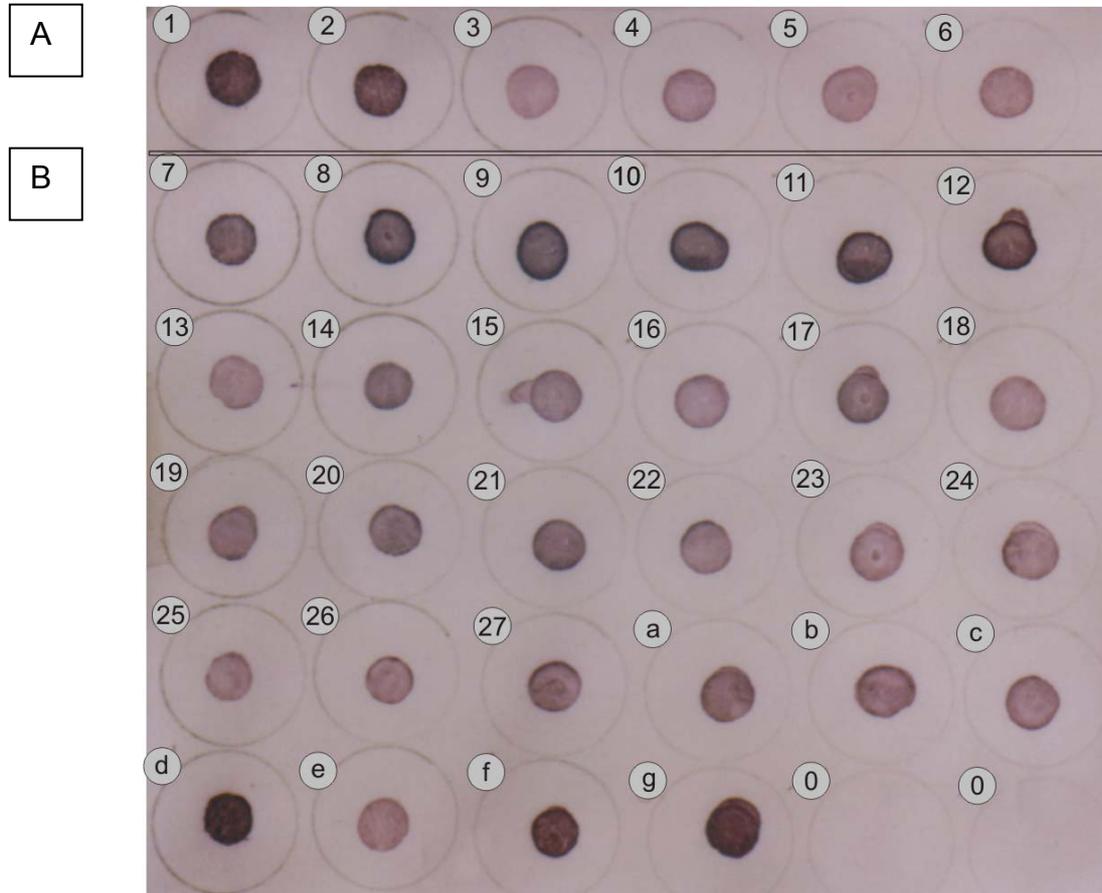


Abb. III.15 Dot blot-Hybridisierung von 34 Stämmen des humanpathogenen *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes mit Gensonde Fla8.  
Hybridisierungstemperatur: 60°C.  
Waschtemperatur: 68,0 °C.

- A: Referenzstämmen: 1 bis 6 (aus der Stammsammlung)  
B: Typisierte Stämme: 7 bis 27 (aus der Stammsammlung)  
Nicht-identifizierte Stämme: a bis g;  
(0: Negativ-Kontrolle)

***B. burgdorferi* s. s.**

**1: B31, 2: 297, 7: Z25, 8: PKa-1, 9: 387, 10: LW2, 11: 2307/1, 12: 2307/5,  
d: N40, f: SH-2-82, g: ZS7**

***B. garinii***

3: 1/B29, 4: G2, 13: G1, 14: PBr, 15: PBi, 16: PTrob, 17: PStH, c: NE11H,  
e: ZQ1

***B. afzelii***

5: FAC1, 6: PKo 18: EB1, 19: EB2, 20: EB3, 21: FEM1, 22: FEM2, 23: PGau,  
24: ACA1, 25: 3521/2, 26: 3521/4, 27: 61BV1, a: MMS, b: ACA1

Die der Gensonde Fla8 zugeordneten Stämme sind fett hervorgehoben.

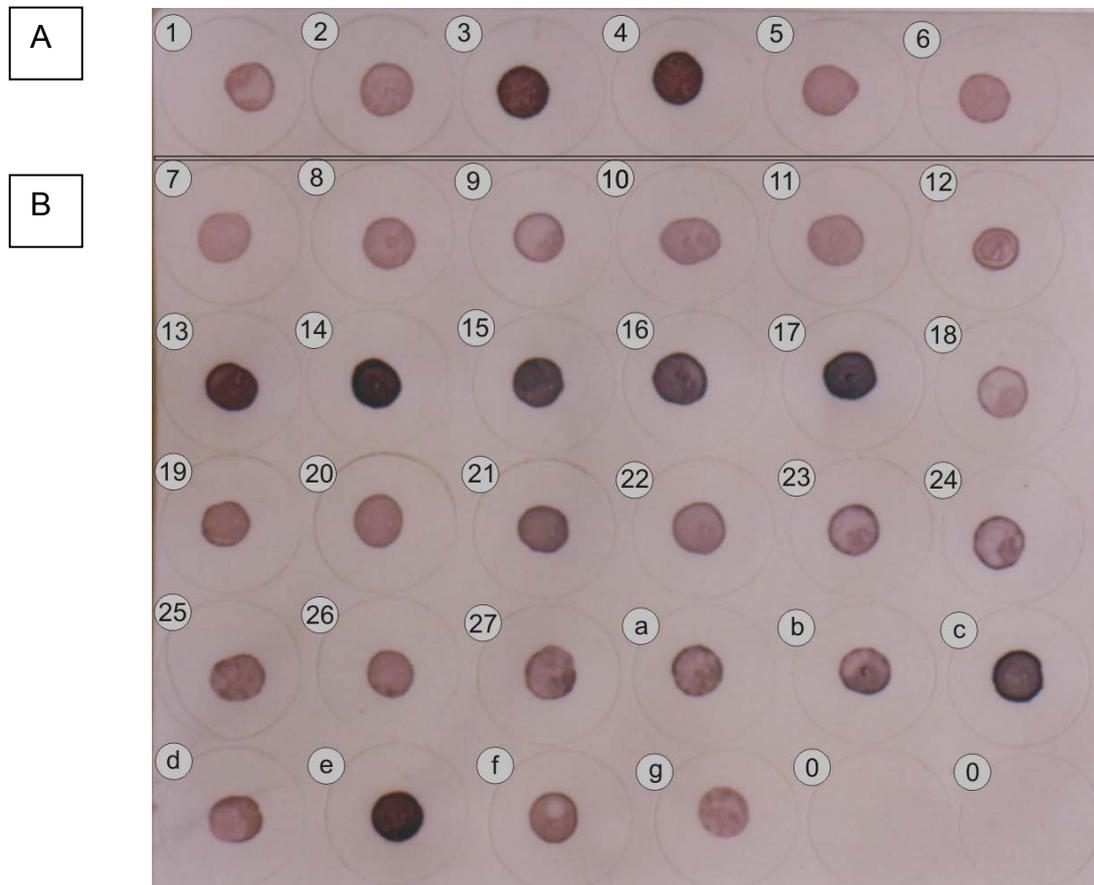
Hybridisierung mit Sonde Fla15/2 (*B. garinii*)

Abb. III.16 Dot blot-Hybridisierung von 34 Stämmen des humanpathogenen *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes mit Gensonde Fla15/2.  
Hybridisierungstemperatur: 60°C.  
Waschtemperatur: 63,1 °C.

- A: Referenzstämme: 1 bis 6 (aus der Stammsammlung)  
B: Typisierte Stämme: 7 bis 27 (aus der Stammsammlung)  
Nicht-identifizierte Stämme: a bis g;  
(0: Negativ-Kontrolle)

*B. burgdorferi* s. s.

1: B31, 2: 297, 7: Z25, 8: PKa-1, 9: 387, 10: LW2, 11: 2307/1, 12: 2307/5,  
d: N40, f: SH-2-82, g: ZS7

*B. garinii*

3: 1/B29, 4: G2, 13: G1, 14: PBr, 15: PBi, 16: PTröb, 17: PStH, c: NE11H,  
e: ZQ1

*B. afzelii*

5: FAC1, 6: PKo 18: EB1, 19: EB2, 20: EB3, 21: FEM1, 22: FEM2, 23: PGau,  
24: ACA1, 25: 3521/2, 26: 3521/4, 27: 61BV1, a: MMS, b: ACA1

Die der Gensonde Fla15/2 zugeordneten Stämme sind fett hervorgehoben.

### Hybridisierung mit Sonde Fla16 (*B. afzelii*)

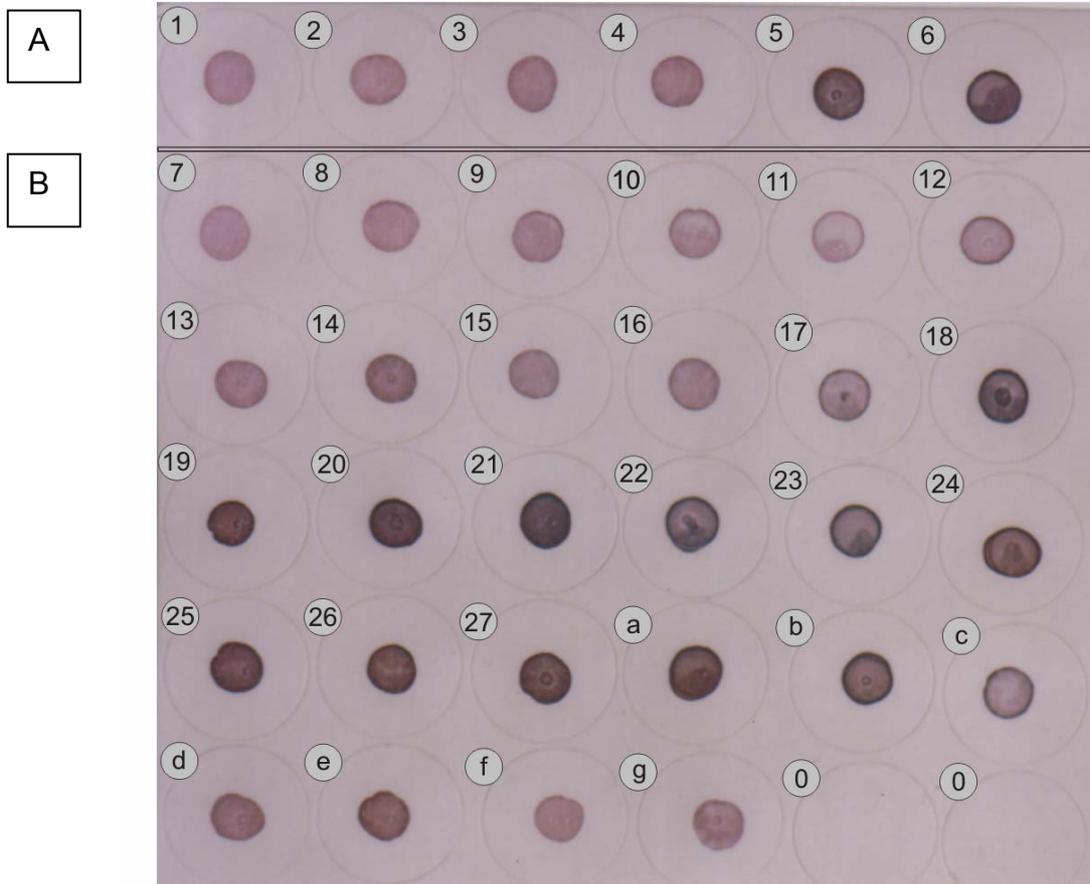


Abb. III.17 Dot blot-Hybridisierung von 34 Stämmen des humanpathogenen *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes mit Gensonde Fla16.  
Hybridisierungstemperatur: 60°C.  
Waschtemperatur: 67,1 °C.

- A: Referenzstämme: 1 bis 6 (aus der Stammsammlung)  
 B: Typisierte Stämme: 7 bis 27 (aus der Stammsammlung)  
 Nicht-identifizierte Stämme: a bis g;  
 (0: Negativ-Kontrolle)

*B. burgdorferi* s. s.

1: B31, 2: 297, 7: Z25, 8: PKa-1, 9: 387, 10: LW2, 11: 2307/1, 12: 2307/5,

d: N40, f: SH-2-82, g: ZS7

*B. garinii*

3: 1/B29, 4: G2, 13: G1, 14: PBr, 15: PBi, 16: PTrob, 17: PStH, c: NE11H,

e: ZQ1

*B. afzelii*

5: FAC1, 6: PKo 18: EB1, 19: EB2, 20: EB3, 21: FEM1, 22: FEM2, 23: PGau,

24: ACA1, 25: 3521/2, 26: 3521/4, 27: 61BV1, a: MMS, b: ACA1

Die der Gensonde Fla16 zugeordneten Stämme sind fett hervorgehoben.

Die Hybridisierungsergebnisse aller 34 Stämme des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes (unter Berücksichtigung der hochstringenten Waschbedingungen) ließen sich wie folgt zusammenfassen (siehe Tabelle III.7):

Stamm	Fla8 <i>B. burgdorferi</i> s. s.	Fla15/2 <i>B. garinii</i>	Fla16 <i>B. afzelii</i>
B31	+++	(+)	(+)
Z25	+++	(+)	(+)
PKa-1	+++	(+)	(+)
297	+++	(+)	(+)
387	+++	(+)	(+)
LW2	+++	(+)	(+)
2307/1	+++	(+)	(+)
2307/5	+++	(+)	(+)
1/B29	(+)	+++	(+)
G1	(+)	+++	(+)
G2	(+)	+++	(+)
PBr	(+)	+++	(+)
PBi	(+)	+++	(+)
PTrob	(+)	+++	(+)
PStH	(+)	+++	(+)
EB1	(+)	(+)	+++
EB2	(+)	(+)	+++
EB3	(+)	(+)	+++
FEM1	(+)	(+)	+++
FEM2	(+)	(+)	+++
FAC1	(+)	(+)	+++
PGau	(+)	(+)	+++
PKo	(+)	(+)	+++
ACA1	(+)	(+)	+++
3521/2	(+)	(+)	+++
3521/4	(+)	(+)	+++
61BV1	(+)	(+)	+++

Tab. III.7 Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse der 27 typisierten Borrelien-Stämme.

0: keine Anfärbung;

(+): geringgradige Anfärbung, unspezifisch;

++ bis +++: deutliche Farbreaktion, spezifisch.

Die den Sonden zugeordneten Borrelienspezies sind jeweils fett hervorgehoben.

### 3.5 Genotypisierung von sieben unbekanntem Stämmen des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes

Anhand der in dieser Studie erarbeiteten spezifischen Dot blot-Hybridisierungsmethode zur Typisierung von Borrelienstämmen konnte bei sieben nicht-identifizierten Stämmen eine eindeutige Genotypisierung durchgeführt werden (siehe Abbildung III.15 bis III.17 und Tabelle III.8). Die Stämme d (N40), f (N40) und g (ZS7) wurden aufgrund der Reaktion mit der Gensonde Fla8 der Genospezies *B. burgdorferi* s. s. zugeordnet. Die Stämme c (NE11H) und e (ZQ1) reagierten mit der Gensonde Fla15/2 am stärksten, so dass diese Stämme als Genospezies *B. garinii* klassifiziert wurden. Die Stämme a (MMS) und b (MMS) hybridisierten mit der Gensonde Fla16 und sind demnach der Genospezies *B. afzelii* zuzuordnen. Dieses Ergebnis ließ sich auch in späteren Untersuchungen durch die als „Goldstandard“ zur Bakterientypisierung angesehene Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) verifizieren.

Stamm	Gensonde Fla8 ( <i>B. burgdorferi</i> s. s.)	Gensonde Fla15/2 ( <i>B. garinii</i> )	Gensonde Fla16 ( <i>B. afzelii</i> )
a	(+)	(+)	+++
b	(+)	(+)	+++
c	(+)	++	(+)
d	+++	(+)	(+)
e	(+)	+++	++
f	+++	(+)	(+)
g	++	(+)	(+)

Tab. III.8 Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse der 7 nicht-differenzierten Borrelien-Stämme  
**0**: keine Anfärbung;  
**(+)**: geringgradige Anfärbung, unspezifisch;  
**++ bis +++**: deutliche Farbreaktion, spezifisch.

## IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine sensitive und spezifische Methode zur Subtypisierung von *Borrelia burgdorferi* auf der Grundlage des Dot blot-Hybridisierungsverfahrens entwickelt. Anhand des hier etablierten Dot blot-Verfahrens von PCR-Amplifikaten des Flagellin-Gens konnten 34 Vertreter der drei humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii* eindeutig typisiert werden. Alle Ergebnisse ließen sich mit denen der PFGE, der „Goldstandard“-Methode zur Typisierung von Bakterien, verifizieren.

### 1. Polymerase-Kettenreaktion in der Diagnostik der Lyme-Borreliose

Hybridisiert wurden PCR-Amplifikate des Flagellin-Gens von Isolaten des humanpathogenen *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes. Die PCR zur Amplifikation des 358 bp langen DNA-Fragments erfolgte auf Basis einer bereits etablierten Methode [Fischer, 2002]. Ein Vorteil der PCR gegenüber anderen Methoden in der Borreliendiagnostik liegt in den geringen DNA-Mengen, die zum Nachweis benötigt werden. Folglich kann auch Borrelien-DNA aus klinischen Materialien, wie z. B. Haut, Urin, Gelenkflüssigkeit, Liquor cerebrospinalis, etc. gewonnen und zur Subtypisierung verwendet werden, wenn die Erreger bereits abgestorben sind oder in einer so geringen Dichte vorliegen, dass eine Anzucht erfolglos bliebe [Malloy *et al.*, 1990; Erlich *et al.*, 1991, Guy und Stanek, 1991; Jaulhac *et al.*, 1991 und 1996; Persing *et al.*, 1994; Krüger und Pulz, 1991; Melcher *et al.*, 1991; Berger *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*, 1992 und 1993; Keller *et al.*, 1993; Kuiper *et al.*, 1994; von Stedingk *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996].

#### 1.1 Inhibition der PCR und Probenaufbereitung

Vor einigen Jahren führten Inhibitoren in Patientenproben (v.a. im Urin) zu falsch negativen PCR-Ergebnissen, so dass die Borrelien-PCR für diagnostische Zwecke nur in wenigen Fällen in Speziallaboratorien zur Anwendung kam [Debue *et al.*, 1991; Goodman *et al.*, 1991; Huppertz *et al.*

1993; Lieling *et al.*, 1993]. Mit neuen Extraktionsverfahren lässt sich dieses Problem drastisch minimieren [Cogswell *et al.*, 1996; Mercier *et al.*, 1997].

Zur Etablierung und Verifizierung einer Methode zur Subtypisierung von PCR-Amplifikaten wurde in der vorliegenden Arbeit auf bereits vorhandene Borrelienisolate aus Kulturen zurückgegriffen. Die Wahl von Borrelienkulturen vermied zusätzliche Schwierigkeiten, die mit Patientenproben assoziiert sind. Die Aufbereitung der Borrelienisolate war - in Hinblick auf eine Anwendung zur Untersuchung von klinischen Materialien in einem Routinelabor - bewusst einfach und effektiv gewählt. Die DNA-Freisetzung durch osmotische Lyse der Borrelien in Aqua dest. (Ganzzell-Lysate) zeigte eine vergleichbare Materialausbeute wie andere Aufschlussverfahren, z.B. mittels Butanol-Extraktion [LeFebvre *et al.*, 1993], DNA-Isolierung [Adam *et al.*, 1991; Barbour, 1988], proteolytische Verfahren mittels Lysozym und Proteinase K [Rosa und Schwan, 1989; Lebech *et al.*, 1991]. Aktuelle kommerzielle Kits zur DNA-Extraktion (MagNA Pure-Kit, Gene-Clean-Kit, DNeasy tissue-Kit, DNAzol-Extraktion etc.) können die DNA-Ausbeute und damit die Sensitivität der PCR jedoch weiter erhöhen [Bergmann *et al.*, 2002; Exner und Lewinski, 2003].

## 1.2 Problematik der Amplifikation

In ersten Versuchsansätzen liessen sich nicht bei allen der 34 getesteten Borrelien-Isolate ein PCR-Amplifikat generieren. Wiederholte Versuche ergaben, dass von den *B. burgdorferi* s.s.-Isolaten 387, 2307/1, dem *B. afzelii*-Isolat PKo sowie den *B. garinii*-Isolaten PBr und PStH kein PCR-Amplifikat gewonnen werden. Dies deckt sich teilweise mit den bereits bestandenen Ergebnissen des Labors [Fischer, 2002]: So konnten für die Stämme PBr und PStH in der PCR bei mehrfacher Durchführung kein Nachweis erbracht werden. Die Ursachen für eine zunächst erfolglose Amplifikation lässt sich jedoch nicht mit der bekannten genetischen Heterogenität der drei Genospezies erklären. Allerdings zeigen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, dass *B. garinii*-Stämme gehäuft Probleme bei der Amplifikation bereiten und sich z.B. der Stamm G2 nicht amplifizieren liess [Rosa und Schwan, 1989]. Dies könnte jedoch wiederum mit der größeren genetischen Heterogenität der Genospezies *B. garinii* begründet werden. Denn es ist bekannt, dass die Genospezies *B.*

*garii* generell eine größere genetische Heterogenität aufweist als andere Vertreter des *B. burgdorferi* s. s.- Komplexes. Die Untersuchungen von *Lebech et al.* [1994] und *Bunikis et al.* [1996] zeigten einen ausgeprägten molekularen Polymorphismus mit Hilfe u.a. der PFGE, der OspA-Serotypisierung und der 16S rRNA-PCR. Auch die Untersuchung von *Busch et al.* [1996] bestätigten in der PFGE und 16S rRNA-PCR eine deutliche Heterogenität innerhalb der Genospezies *B. garii*.

### 1.3 Sensitivität und Kontaminationsgefahr

Für eine erfolgreiche Amplifikation ist theoretisch die DNA einer einzigen Borrelienzelle im PCR-Ansatz ausreichend. Durch diese hohe Sensitivität ergibt sich die Gefahr von Kontaminationen. Während der zahlreichen PCR-Versuche, die als Grundlage der Dot blot-Hybridisierung dienten, kam es nie zu Verunreinigungen durch Amplifikate oder Borrelien. Um Kontaminationen von Fremd-DNA zu vermeiden, wurden zahlreiche Schutzmaßnahmen verfolgt. Grundlegend war dabei die räumliche Trennung der Arbeitsschritte. In jeweils unterschiedlichen Räumen (mit neuen Handschuhen und Labormänteln) fanden die Probenaufbereitung, die Herstellung des PCR-Ansatzes, die Zugabe der Positiv-Kontrolle und die Amplifikation mit anschließender Geldokumentation und Hybridisierung statt [Kwok und Higuchi, 1989; Linz und Degenhardt, 1990; Nienhaus und Gehrman, 1991; Rys und Persing, 1993; Victor *et al.*, 1993]. Auf den Einsatz von Uracil statt Thymidin und der Uracil-Glykosylase, die im Falle einer Kontamination eingesetzt werden, um DNA-Amplifikate vollständig zu eliminieren, konnte verzichtet werden [Longo, 1990; Udaykumar, 1993; Loewy *et al.*, 1994; Schmidt, 1997].

Der Nachweis von PCR-Amplifikaten in der Agarosegelelektrophorese erbrachte anfänglich nicht die gewünschten Resultate. Der Probenauftrag erfolgte im Trockenen mit Verschluss der Geltaschen durch flüssige Agarose. Unschärfe und Doppelbanden nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Banden sind beschrieben [Fischer, 2002]. Durch den Probenauftrag in der gefluteten Elektrophoresekammer ohne zusätzliches

Verschließen der Geltaschen durch Agarose konnte eine klar umrissene Bande erzeugt werden.

#### 1.4 Wahl der Zielsequenz

Die Auswahl der PCR-Primer wird von der Zielsequenz, die entscheidend ist für die Spezifität, bestimmt [Wang *et al.*, 1994]. Borrelien besitzen ein lineares DNA-Doppelstrang-Chromosom und bis zu zwölf lineare und neun zirkuläre Plasmide, die in Anzahl und Größe variieren können [Barbour, 1986; Postic *et al.*, 1993; Casjens *et al.*, 1995 und 2000; Baranton und Old, 1995; Fraser *et al.*, 1997; Kraiczy *et al.*; 1998]. Das für diese Arbeit verwendete Flagellin-Gen ist auf dem linearen Chromosom lokalisiert. Die Nukleotidsequenz des 1011 bp langen Flagellin-Gens, das für das 41 kDa-Protein der endoplasmatischen Geißeln (Endoflagellen) der Borrelien kodiert, wurde 1989 veröffentlicht (siehe Anhang VII.1); 1997 wurden drei Allele des Flagellin-Gens identifiziert [Gassmann *et al.*, 1989; Norris *et al.*, 1997]. Sie weisen im Vergleich zu den für Oberflächenproteine (outer surface protein) kodierenden Genen OspA und OspC aufgrund ihrer phylogenetischen Konservierung eine sehr geringe Heterogenität auf [Picken, 1992; Wilske *et al.*, 1995]. Im Gegensatz zu den auf Plasmiden lokalisierten Genen ist das Flagellin-Gen in einfacher Kopie pro Borreliie vorhanden und unterliegt als genomische DNA deutlich weniger mutativer Veränderungen oder Verlusten. Die Plasmide der Borrelien sind in Anzahl und Größe, aber auch in ihrer Gensequenz deutlich heterogener [Barbour, 1986; Postic *et al.*, 1993; Casjens *et al.*, 1995 und 2000; Baranton und Old, 1995; Kraiczy *et al.*; 1998]. Als Zielsequenz der beiden hier verwendeten Primer Fla6 und Fla7 wurde ein konservierter Genabschnitt des Flagellin-Gens gewählt. Dieser Bereich des Flagellin-Gens wurde gewählt, weil andere Abschnitte des Flagellin-Gens eine bis zu 90%ige Übereinstimmung mit *B. hermsii* zeigen und deshalb nicht als Zielsequenz für eine spezifische PCR und anschließende Subtypisierung geeignet wären [Picken, 1992; Fraser *et al.*, 1997]. Der gewählte Bereich ist einerseits so spezifisch, dass keine Amplifikation des Flagellin-Gens anderer Spirochäten stattfindet, andererseits phylogenetisch so konserviert, dass alle drei bisher bekannten Erreger des humanpathogenen *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes erfaßt werden können [Gassmann *et al.*, 1989; Picken, 1992].

*Picken* [1992] beschrieb als erster eine Flagellin-PCR mit anschließender Hybridisierung der Amplifikate zur Subtypisierung der drei humanpathogenen Borreliengenospezies. Er wählte ein 276 bp großes Fragment des Flagellin-Gens (zwischen Nukleotidposition 492 und 767) als PCR-Zielsequenz. Es liegt innerhalb des in der vorliegenden Arbeit gewählten Abschnittes (siehe Abbildung IV.1). Er wies nach, dass sechs Vertreter der phylogenetisch verwandten Erreger des nordamerikanischen Rückfallfiebers (u. a. *B. hermsii*, *B. parkeri*, *B. turicatae*), vier weitere z. Zt. nicht als humanpathogen eingestufte Stämme (u. a. *B. anserina* und *B. coriaceae*) sowie fünf Vertreter der verwandten Treponemen und Leptospiren nicht mit seinen gewählten Primern amplifiziert werden konnten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der bereits im Labor etablierten Flagellin-PCR [Fischer, 2002]: Sie zeigte keine Kreuzreaktionen mit phylogenetisch verwandten Spirochäten und den Treponemen *Treponema pallidum*, *Treponema phagedenis* und *Treponema pertenuae*. Auch DNA anderer begeißelter Bakterien wie zum Beispiel *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* wurde nicht amplifiziert [Fischer, 2002]. Die Flagellin-PCR von *Picken*, *Fischer* und der vorliegenden Arbeit erfüllten die zwei zur Subtypisierung erforderlichen Voraussetzungen. Es wurde ein konservierter Bereich des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes gewählt, der gleichzeitig die Möglichkeit bietet die drei Genospezies durch nachfolgende Hybridisierung nachzuweisen.

Für die vorliegende Arbeit wurde folglich eine Zielsequenz für die PCR gewählt, die zuverlässig alle drei humanpathogenen Erreger der Lyme-Borreliose (*B. burgdorferi* s. s., *B. garinii*, *B. afzelii*), jedoch nicht phylogenetisch nahe stehende Bakterien amplifiziert. Die mittleren Abschnitte des gewählten Genabschnittes gehören zum weniger konservierten Teil des Flagellin-Gens und bieten daher die ideale Voraussetzung zur weiteren Differenzierung, wie z.B. mittels Hybridisierung.

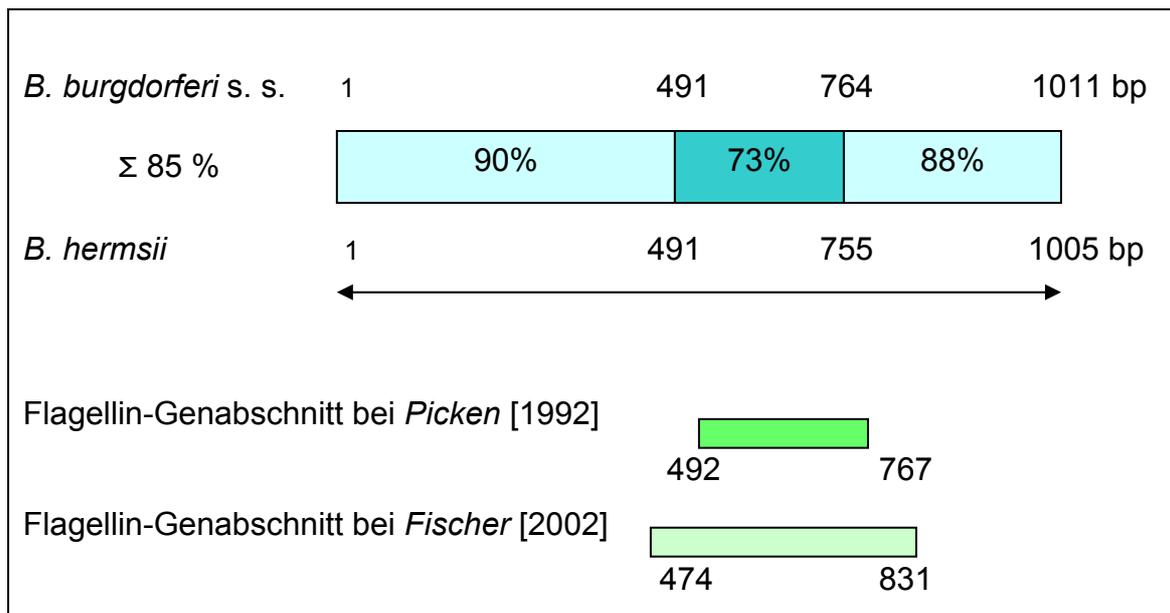


Abb.IV.1 Genetische Homologien des Flagellin-Gens von *B. burgdorferi* s. s. und *B. hermsii* und die Wahl der PCR-Zielsequenzen von Picken und Fischer [Picken, 1992; Fischer, 2002].

Weitere in der Literatur zur Subtypisierung der drei humanpathogenen Erreger der Lyme-Borreliose mittels PCR und abschließender Hybridisierung untersuchte Genabschnitte sind das auf einem linearen Plasmid lokalisierte OspA- und das einem zirkulären Plasmid lokalisierte OspC-Gen [Barbour, 1986; Postic *et al.*, 1993; Casjens *et al.*, 1995 und 2000; Baranton und Old, 1995; Oschmann und Kraiczky, 1998]. Sie weisen gegenüber dem Flagellin-Gen den Vorteil auf, dass z. B. das OspA-Gen zu einem höheren Prozentsatz als das Flagellin-Gen auch aus Patientenmaterial mittels PCR nachgewiesen werden kann. Dies kann auf die bessere Extrahierbarkeit der Plasmid-kodierten OspA- und OspC-Gene mittels Säulen-chromatographischer Methoden (im Gegensatz zum chromosomal-kodierten Flagellin-Gen) zurückgeführt werden. Die Plasmid-kodierten OspA- und OspC-Gene sind jedoch phylogenetisch weniger konserviert als das Flagellin-Gen, so dass Kreuzreaktionen mit anderen (nahe verwandten) Bakterienarten auftreten können. Vergleicht man wiederum das OspA-Gen und das OspC-Gen miteinander, so beinhaltet Letzteres eine noch größere molekulare Heterogenität [Wilske *et al.*, 1995; Schmidt, 1997].

## **2. Dot blot-Hybridisierung**

### **2.1 Wahl der geeigneten Membran und Einfluß der Fixationsmethode auf die Hybridisierung**

Wegen der einfachen Handhabung (verminderte Bruchgefahr und problemlose, platzsparende Lagerung), v. a. aber wegen der guten DNA-Bindungskapazität wurde der Dot Blot auf positiv geladenen Nylonmembranen ausgeführt. Hierzu wurden Produkte der Firmen BOEHRINGER MANNHEIM und APPLIGENE in Vorversuchen miteinander verglichen. Bei der Hybridisierung zeigte sich ein deutlich besseres Ergebnis der Nylonmembran der Firma BOEHRINGER MANNHEIM. Aufgrund der deutlich besseren Bindungskapazität konnte mit geringeren DNA-Mengen gearbeitet werden, was die Sensitivität der Hybridisierung erhöhte. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Hybridisierungsversuche wurden folglich auf positiv geladenen Nylonmembranen der Firma BOEHRINGER MANNHEIM ausgeführt. Nitrozellulosemembranen waren als Träger nicht erwogen worden, denn sie können - neben der höheren Bruchgefahr - weniger DNA-Mengen binden und haben somit eine geringere Sensitivität [Twomey und Krawetz, 1990].

Nachdem der Probenauftrag auf die positiv geladenen Nylonmembranen erfolgte, mußten die PCR-Amplifikate vor der Hybridisierung auf dem Trägermedium fixiert werden (siehe Kapitel II Methoden 2.6.2). Dies erfolgte zunächst mittels Thermofixation im Heißluftofen. Die im Vergleich zur Heißluftfixation zehnfach geringere benötigte Probenmenge bei der Fixation mittel UV-Crosslinker wird durch die Literatur bestätigt. Bereits Khandjan [1986] zeigte, dass 10- bis 40-mal stärkere Signale nach der Fixation von radioaktiv-markierter RNA mittels UV-Crosslinker auf Nylonmembranen gegenüber der herkömmlichen Thermofixation erzielt werden können.

## 2.2 Wahl der Digoxigenin-Markierung

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Dot Blot-Hybridisierung zur Genotypisierung der PCR-Amplifikate des Flagellin-Gens gewählt, da diese gegenüber anderen DNA-DNA-Hybridisierungsverfahren einige Vorzüge in der Handhabung und Umsetzung aufwies. Die Sonden zur Hybridisierung werden zum Nachweis mit einer Tracersubstanz gekoppelt.

Eine Analyse der in der Borrelien-Diagnostik angewandten Hybridisierungsverfahren bzw. Markierungsmöglichkeiten und die daraus abgeleiteten logistischen Überlegungen führten zur Wahl einer Digoxigenin-Markierung der Sonden. Digoxigenin ist ein Steroid, das in der Natur im wolligen und roten Fingerhut (*Digitalis lanata* und *Digitalis purpurea*) vorkommt. Gegen eine Koppelung der Sonden mit einem radioaktiven Element z.B. Phosphat  $^{32}\text{P}$ , wie von Picken zur Differenzierung von PCR-Amplifikaten des Flagellin-Gens beschrieben, sprach die Aufbewahrung und Entsorgung des radioaktiven Materials und die damit verbundene mangelnde Eignung für den Einsatz in der Routinediagnostik [Picken, 1992; Lebech, 1994]. Auch aus ökologischer Sicht und wegen des erhöhten Gefahrenpotenzials für das Laborpersonal war eine radioaktive Markierung abzulehnen. Das Fehlen eines Dunkelraums führte zum Ausschluß einer Markierung mittels fluoreszierenden Agens [Hammer *et al.*, 2001]. Gegen die von Mansey [1996] in der Borrelien-Diagnostik bevorzugte DNA-Detektion mit polybiotinylierten Sonden auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit anschließender photometrischer Auswertung sprach die erforderliche Neuanschaffung eines Photometers für besonders geringe Probenmengen. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Digoxigenin-Markierung einen besonderen Benefit in Bezug auf ihre einfache und gefahrlose Handhabung, Aufbewahrung und Entsorgung sowie ihrer potenziellen Routinetauglichkeit besitzt.

## 2.3 Wahl der Hybridisierungs- und Waschtemperatur im Literaturvergleich

Die Stringenz, als komplementäre Bindung von Ziel-DNA und Gensonde definiert, kann entweder während des Hybridisierungsvorganges oder in den Waschschritten (WS) nach erfolgter Hybridisierung erzielt werden. Die Stringenz nimmt bei höheren Temperaturen zu, d.h. die komplementäre Basenpaarung wird zunehmend genauer und lässt weniger Fehlbindungen (mismatches) zu. Eine maximale Stringenz wird im Bereich der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des DNA-Sonden-Hybrids erzielt, oberhalb der Schmelztemperatur dissoziiert der Hybridstrang (siehe auch Kapitel II Material und Methoden 1.3). Bei geringen Hybridisierungstemperaturen nimmt die Stringenz ab, es treten häufiger nicht-komplementäre Bindungen auf. Wegen der einfacheren Durchführbarkeit wird in der Regel die Hybridisierung bei niedriger Stringenz und die WS mit zunehmender Stringenz vollzogen. Diese Vorgehensweise wurde für die Aufgabenstellung bevorzugt. Die Hybridisierung bei  $T_m - 25\text{ °C}$  mit anschließenden höheren Waschttemperaturen ermöglicht die Detektion von verwandten Sequenzen sowie eine Überprüfung der Effektivität der WS. Bei der Wahl der Temperatur der WS wurden die Angaben der Firma BOEHRINGER MANNHEIM [1996], die Durchführung von *Lathe* [1985], von *Sambrook et al.* [1989], von *Papandrikopoulou* [1998], von *Dilella und Woo* [1987], von *Miyada und Wallace* [1987] und von *Wahl et al.* [1987a und 1987b] analysiert. Zunächst wurden die Angaben zur Waschttemperatur mit der Anleitung des DIG Nucleic Acid Detection Kit (BOEHRINGER MANNHEIM) verglichen und zu der errechneten Schmelztemperatur in Beziehung gesetzt.

*Lathe* [1985] führte die Hybridisierung 5 bis  $25\text{ °C}$  unter der Schmelztemperatur der Gensonde durch, was die Formation von unspezifischen Hybriden zuließ, wie sie bei Sequenzhomologien von unter 100 % auftreten. Der entscheidende Schritt, der hochstringente Waschschriff bei vollkommener Übereinstimmung von Ziel- und SONDENSEQUENZ, wurde bei der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Sonde durchgeführt. Die Anleitung des verwendeten Kits zur Hybridisierung mit Digoxigenin markierten Sonden empfiehlt, die Prähybridisierung, die Hybridisierung und die WS – wenn kein Formamid verwendet wird - jeweils bei  $68\text{ °C}$  durchzuführen. Demgegenüber wurden in der vorliegenden Arbeit für *B.*

*garinii* und *B. afzelii* hochstringente Waschttemperaturen ermittelt, die unter 68°C lagen. Hieraus erklärt sich der fehlende Nachweis dieser Stämme bei Fischer [2002 und unveröffentlichte Daten]; die dort gewählte Temperatur der Waschschrte bei 68 °C führte vermutlich zu einer Dissoziation der zuvor gebildeten Hybride aufgrund Überschreitens der Schmelztemperatur (siehe Kapitel III Ergebnisse 2.4.1 bis 2.4.3).

An diesen Beispielen zeigte sich, dass die übliche Herangehensweise bei der Ermittlung der optimierten Waschttemperatur (wie sie bei *Sambrook et al.* und anderen o.g. Autoren beschrieben werden) sich als unspezifisch erwies, weshalb die Bedingungen für jede Sonde einzeln neu ermittelt wurden. Bei der technischen Umsetzung konnte wegen der erforderlichen Feinjustierung der Temperatur während der WS der vorhandene Hybridisierungssofen der Firma HYBAID nicht verwendet werden, da Referenzanalysen mittels mitgeführtem Quecksilberthermometer (Skalierung 0,1 °C) Temperaturschwankungen innerhalb des Hybridisierungssofens von +/- 0,5 °C erbrachten.

## 2.4 Nachweis des Flagellin-Gens mittels DNA-DNA-Hybridisierungstechnik

In der Literatur finden sich zwei Arbeiten (siehe auch Tabelle IV.1), die sich – wie die vorliegende Arbeit – intensiv mit der Hybridisierung von PCR-Amplifikaten des Flagellin-Gens zur Genotypisierung des humanpathogenen *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes beschäftigten [Picken, 1992; Assous *et al.*, 1994]. Die Grundidee und Etablierung der Flagellin-PCR-Primer sowie der drei spezifischen Gensonden stammte von Picken [1992] (siehe auch Kapitel IV Diskussion 1.4). In den darauffolgenden Jahren wurde diese Methode mit den dazugehörigen Gensonden von verschiedenen Arbeitsgruppen in gleicher oder leicht abgeänderter Form aufgegriffen und zur Subtypisierung eingesetzt [Assous *et al.*, 1994; Lebech *et al.*, 1994; Bergmann *et al.*, 2002].

Picken [1992] synthetisierte die drei hochspezifischen Gensonden basierend auf dem Flagellin-Gen des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes zur Differenzierung der drei humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s. s. (Fla8), *B. garinii* (Fla15) und *B. afzelii* (Fla16). Er wies nach, dass die PCR-Zielsequenz so gewählt war, dass phylogenetisch verwandte Bakterien unter stringenten Hybridisierungsbedingungen mit den Sonden nicht kreuzreagierten (siehe auch Kapitel IV 1.4 für weitere Details). Picken markierte die Oligonukleotide mittels radioaktivem Phosphat (<sup>32</sup>P) am 5'-Ende. Die Hybridisierung erfolgte als Southern Blot-Verfahren. Die Prähybridisierung wurde für zwei Stunden bei  $T_m - 15$  °C durchgeführt. Für die Hybridisierung wurden die PCR-Amplifikate mit den drei spezifischen <sup>32</sup>P-markierten Gensonden über Nacht erneut bei  $T_m - 15$  °C inkubiert [Picken, 1996]. Die Filter wurden anschließend bei  $T_m - 15$  °C gewaschen und autoradiographisch ausgewertet.

Assous *et al.* [1994] bedienten sich der gleichen von Picken [1992] veröffentlichten und in der vorliegenden Arbeit angewandten drei Oligonukleotide Fla8, Fla15 und Fla16 sowie einer neu synthetisierten Gensonde (Fla20) zur Differenzierung von *B. japonica*. Hybridisiert wurden analog zu Picken jeweils 276 bp große PCR-Amplifikate des Flagellin-Gens und mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Hybridisierung erfolgte bereits unter stringenten Bedingungen bei 75 °C. Die Dot blot-Membranen wurden

anschließend für 15 Minuten in 0,5 x SSC mit 0,1% SDS bei 75,5 °C (Fla8), 74,4 °C (Fla15), 76,8 °C (Fla16) und 74,9 °C (Fla20) gewaschen. Ein erneuter Waschschrift erfolgte für 15 Minuten in 0,1 x SSC mit 0,1 % SDS bei 65,3 °C (Fla8), 63,8 °C (Fla15), 66,1 °C (Fla16) und 64,4 °C (Fla20). Anhand dieser Methode konnten *Assous et al.* alle humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii* von einander abgrenzen. Außerdem konnten fünf Stämme entsprechend ihrem Sequenzierungsergebnis der Gruppe *B. japonica* mit Hilfe der Sonde Fla20 identifiziert werden. Beachtenswert ist dabei, dass die Temperaturen (T) für die Hybridisierung und dem ersten Waschvorgang - im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit – ein geringes  $\Delta T$  von maximal 1,8 °C aufwiesen und z.T. sogar unter der Hybridisierungstemperatur lagen. Dies könnte u.a. durch die geringe Natriumkonzentration (nur 0,5 x SSC) der ersten Waschlösung bedingt sein.

Nachdem *Picken* [1992] und *Assous et al.* [1994] die Eignung der Flagellin-PCR und der Gensonden zur spezifischen Subtypisierung der drei humanpathogenen *B. burgdorferi* s. l.-Genospezies gezeigt hatten, wurde die Methode von anderen Arbeitsgruppen übernommen. *Lebech et al.* [1994] wählten die gleichen Oligonukleotide als PCR-Primer und Gensonden wie *Picken*. Sie markierten die Gensonden ebenfalls radioaktiv, hybridisierten bei 59°C und führten die Waschschrift für Fla8 bei 67°C, für Fla15 bei 64°C und für Fla16 bei 69 °C durch. Ähnlich verfahren *Bergmann et al.* [2002]. Im Unterschied zu den bereits beschriebenen, hybridisierten sie in Mikrotiterplatten mit einem DNA-Enzym-Immunoassay GEN-ETI-K-DEIA (Firma DiaSorin). Die hybridisierte DNA wurde mit monoklonalen Anti-DNA-Antikörpern von der Maus detektiert und im Spektralphotometer gemessen.

Die Anzahl der untersuchten Bakterien belief sich in der vorliegenden Arbeit auf 34 *Borrelia burgdorferi* s. l.-Isolate sowie Lambda-Phagen-DNA, bei *Picken* auf 22 *B. burgdorferi* s. l.-Isolate, 5 *B. hermsii*-Isolate, 5 weitere Borrelien-Isolate sowie auf 16 Vertreter von Treponemen, Leptospiren u. a. Spirochaeten. *Assous et al.* hybridisierten neben 31 *B. burgdorferi* s. l.-Isolaten noch 5 *B. japonica*-Isolate. Stets wurden nur die drei humanpathogenen Genotypen des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes mittels der Oligonukleotide Fla8, Fla15 und Fla16 nachgewiesen. Kreuzreaktionen traten nicht auf. Alle drei

Untersuchungen erbrachten folglich eine sehr gute Spezifität. Angaben über die Sensitivität wurden in den Vergleichspublikationen nicht gemacht. In der vorliegenden Arbeit ist die Sensitivität mit 2 ng als sehr gut zu bewerten.

	<b>Vorliegende Arbeit</b>	<b>Picken</b>	<b>Assous et al.</b>
Gen	Flagellin	Flagellin	Flagellin
Genabschnitt des PCR-Amplifikats (Nukleotidposition)	474 – 831	492 – 767	492 – 767
Länge des PCR-Amplifikats	358 bp	276 bp	276 bp
Markierung der Gensonden	Digoxigenin	Radioaktives Phosphat : <sup>32</sup> P	Chemilumineszenz
Gensonden-Lokalisation: <i>B. burgdorferi</i> s.s. <i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i>	594 – 642 594 – 641 594 – 644	594 – 642 594 – 641 594 – 644	594 – 642 594 – 641 594 – 644
Hybridisierungstemperatur	60 °C	~70 °C	75 °C
Waschtemperatur: <i>B. burgdorferi</i> s. s. <i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i>	68,0 °C +/- 0,2 °C 63,1 °C +/- 0,2 °C 67,1 °C +/- 0,2 °C	~ 70 °C ~ 67 °C ~ 73 °C	75,5 °C / 65,3 °C 74,4 °C / 63,8 °C 76,8 °C / 66,1 °C
Borrelienstämme	11 <i>B. burgd.</i> s. s. 9 <i>B. garinii</i> 14 <i>B. afzelii</i>	22 <i>B. burgd.</i> s. l. 5 <i>B. hermsii</i> 1 <i>B. parkeri</i> 1 <i>B. turicatae</i> 1 <i>B. crocidurae</i> 1 <i>B. anserina</i> 1 <i>B. coriaceae</i>	11 <i>B. burgd.</i> s. s. 11 <i>B. garinii</i> 9 <i>B. afzelii</i> 5 <i>B. japonica</i>
weitere Bakterien-DNA	Lambda-Phagen-DNA Borrelien-Plasmide	16 <i>Treponema</i> , <i>Leptospira</i> u.a.	10 atypische amerikanische Borrelienstämme
Sensitivität	< 2 ng	nicht genannt	nicht genannt
Spezifität für: <i>B. burgdorferi</i> s.s. <i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i>	sehr gut sehr gut sehr gut	sehr gut sehr gut sehr gut	sehr gut sehr gut sehr gut

Tab. IV.1 Literaturvergleich: Subtypisierungen von PCR-Amplifikaten des Flagellin-Gens mittels verschiedener Hybridisierungen [Picken, 1992; Assous et al., 1994].

Der Vergleich der Publikationen von *Picken* [1992], *Assous et al.* [1994], *Lebech et al.* [1994], *Bergmann et al.* [2002] mit der vorliegenden Arbeit bestätigte, dass die Gensonden Fla8, Fla15 und Fla16 zur Subtypisierung eingesetzt werden können. Die Wahl der Markierung der Gensonden, des Hybridisierungsverfahrens und Detektion richtete sich nach den Gegebenheiten der einzelnen Labors und gehen mit einer Änderung der Temperaturen für Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschschriffe einher. Meist wurde dabei die höchste, und damit für die Sensitivität entscheidende Temperatur, für die Waschschriffe gewählt.

## 2.5 Zeitlicher Aufwand und Zuverlässigkeit der Methode

Die hier etablierte Methode zur Differenzierung von Borrelien-Isolaten ist ein einfaches, schnell durchzuführendes Verfahren. Der zeitliche Aufwand für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Dot blot-Hybridisierung beträgt ca. 18 Stunden und kann an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt werden. Dabei ist es günstig, wenn die Versuche bis zur Prähybridisierung am ersten Versuchstag erfolgen und die Hybridisierung über Nacht stattfindet. Bei 15 Proben entfallen von den 18 Stunden rund sechs Stunden auf die Herstellung der PCR-Amplifikate und des Nachweises im Agarosegel, weitere 12 Stunden auf die Hybridisierung mit anschließender immunologischer Detektion. Findet die eigentliche Hybridisierung während der Nacht statt, verkürzt sich der Arbeitsaufwand der Dot blot-Hybridisierung auf rund sechs Stunden. Im Gegensatz dazu beträgt bei 15 Proben die Durchführung einer Sequenzierung mit Auswertung in einem großen gentechnischen Einsendelabor rund drei Tage (plus Transport) und einer PFGE drei bis vier Tage.

In der vorliegenden Arbeit konnten die PCR-Amplifikate alle 34 Borrelien-Isolate erfolgreich und reproduzierbar ihren humanpathogenen Genotypen zugeordnet werden. Dabei war bei der Durchführung der Dot blot-Hybridisierung die Temperatur während der Waschstritte der entscheidende Parameter, um die gewünschte hoch-stringente Bindung der drei Gensonden zu erreichen. Nur, wenn die Waschttemperaturen  $\pm 0,2$  °C eingehalten wurden, konnte eine spezifische Hybridisierung nachgewiesen werden. Desweiteren waren die Anwendung des UV-Crosslinkers zur verbesserten Fixation der DNA auf den Nylonmembranen sowie das weiterentwickelte Verfahren zur immunologischen Detektion der gebundenen Gensonden (mittels DIG Nucleic Acid Detection Kit, BOEHRINGER MANNHEIM) bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von großer Bedeutung.

## 2.6 Vergleichsanalyse der Hybridisierung mit der PFGE

Die PFGE stellt den gegenwärtigen „Goldstandard“ in der Genotypisierung von Bakterien allgemein dar. Eine Vergleichsanalyse der Resultate der in dieser Arbeit etablierten Dot blot-Hybridisierung von PCR-Amplifikaten des Flagellin-Gens mit den Ergebnissen der PFGE bestätigte, dass sich das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Verfahren hervorragend zur Subtypisierung eignet. Alle 34 in dieser Arbeit untersuchten Borrelien-Stämme zeigten eine vollständige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PFGE [Kraiczky *et al.*, 1998 und unveröffentlichte Daten]. Anhand der einfachen, schnellen und eindeutigen Auswertung der Dot blot-Hybridisierung wurden alle 11 Isolate der Genospezies *B. burgdorferi* s. s., alle 9 Isolate der Genospezies *B. garinii* sowie alle 14 Isolate der Genospezies *B. afzelii* korrekt zugeordnet.

Das Isolat 61BV1, das zunächst als *B. garinii*-Stamm aus der Institutsstammsammlung übernommen wurde, konnte aufgrund der in dieser Arbeit etablierten Dot blot-Hybridisierung des Flagellin-Gens der Genospezies *B. afzelii* zugeordnet werden. Dieses Resultat konnte anschließend durch die PFGE bestätigt werden.

## 3. Geno- und phänotypische Heterogenität des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes und ihre Differenzierungsmethoden

Zur Identifizierung und Typisierung von Mikroorganismen werden zunehmend molekularbiologische Verfahren angewandt. Die humanpathogenen Borrelien-Genospezies des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes besitzen sowohl eine große genotypische, als auch eine phänotypische Vielfalt. Die Analyse dieser genotypischen und phänotypischen Heterogenität innerhalb des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes stellt eine Voraussetzung für folgende Projekte dar:

1. Etablierung eines standardisierten und die gesamte Art umfassenden diagnostischen Testsystems.
2. (Weiter-) Entwicklung einer Vakzination gegen die Lyme-Borreliose.
3. Epidemiologische Studien.

### 3.1 Genotypische Subtypisierungsmethoden

*Baranton et al.* [1992] publizierten die heute noch gültige taxonomische Einteilung der Erreger der Lyme-Borreliose in die drei Genospezies, *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und eine „VS461“-Gruppe, die heute als *B. afzelii* bezeichnet wird. Hierfür analysierten *Baranton et al.* u. a. die rRNA-Genrestriktionsmuster und Proteinelektrophoresemuster von 48 Borrelien-Isolaten aus Europa, den USA und Japan. Die drei Genospezies liessen sich mit Hilfe verschiedener Methoden weiter in kleinere Gruppen mit identischen oder vergleichbaren geno- bzw. phänotypischer Merkmalen unterscheiden [Wilske *et al.*, 1991, 1993 und 1995; Kraiczy *et al.*, 1998].

Neben der in der vorliegenden Arbeit etablierten Dot blot-Hybridisierung zur Differenzierung von *B. burgdorferi* werden eine Vielzahl weiterer genotypischer Subtypisierungsverfahren angewandt. Sie dienen in erster Linie zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums der Borrelien, einschließlich der nicht-humanpathogenen Vertreter und den Erregern des Rückfallfiebers (*B. recurrentis*). Wie bereits erwähnt, stellt die PFGE den gegenwärtigen Standard in der Typisierung des humanpathogenen *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes dar. Weitere Methoden sind die DNA-DNA-Reassoziationsanalyse, die Restriktionsanalyse der ribosomalen RNA, das sogenannte Plasmid-Fingerprinting, die DNA-Sequenzanalyse und der Restriktionslängen-Polymorphismus [Lebech *et al.*, 1994; Wilske *et al.*, 1993; Picken *et al.*, 1995; Liveris *et al.*, 1996; Nohlmans *et al.*, 1995; Hamann-Brand *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999]. Die Auswahl des Typisierungsverfahrens ist dabei von der Ausgabenstellung, der geforderten Diskriminationsfähigkeit und der Ausstattung des Labors abhängig.

### 3.2 Phänotypische Subtypisierungsmethoden

Theoretisch sind eine Vielzahl von phänotypischen Subtypisierungsmethoden in der Borrelien-Diagnostik möglich. Das Wuchsverhalten in Nährmedien, die Phagentypisierung und die Auswertung von Antibiogrammen sind jedoch aufgrund besonderer Eigenschaften der Borrelien und ihrer hohen Ansprüche an das Nährmedium nicht durchführbar. Auch die Resultate der SDS-

Polyacrylamidgelelektrophorese zur Analyse des Proteinmusters erwies sich als unzuverlässig [Wilske *et al.*, 1991; Picken *et al.*, 1995; Nohlmanns *et al.*, 1995]. Die Serotypisierung stellt deswegen eine wichtige Methode zur phänotypischen Differenzierung des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes dar. Sie kann jedoch nur in Speziallaboratorien erfolgen [Wilske *et al.*, 1991; Lebech *et al.*, 1994; Wilske *et al.*, 1993 und 1995].

Zur Zeit gibt es zwei gut etablierte Serotypisierungssysteme, basierend auf den beiden plasmidkodierten Oberflächenproteinen OspA und OspC. Das immunogene Lipoprotein OspA ist eines der wichtigsten Proteine der äußeren Membran und wurde sowohl für die serologische Diagnostik als auch für die Entwicklung einer Vakzine herangezogen [Thanassi und Schoen; 2000]. Mit Hilfe von acht OspA-spezifischen monoklonalen Antikörpern für verschiedene Epitope untersuchten Wilske *et al.* 132 Vertreter des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes [Wilske *et al.*, 1993]. Basierend auf dem unterschiedlichen Reaktionsverhalten der acht monoklonalen Antikörper wurden sieben noch heute gültige Serotypen für OspA definiert, die ebenfalls den drei großen Genospezies zugeordnet werden konnten: *B. burgdorferi* s. s. (Serotyp 1), *B. garinii* (Serotyp 3 bis 7) und *B. afzelii* (Serotyp 2). Das OspC Protein ist das immundominante Antigen in der frühen Phase der humanen Borrelioseinfektion [Wilske *et al.*, 1993]. Es differenziert in ähnlicher Weise durch monoklonale Antikörper den *B. burgdorferi* s. l.-Komplex in 16 Serotypen.

Gegenüber dem in dieser Arbeit etablierten Dot blot-Hybridisierungsverfahren besitzen die beiden Serotypisierungssysteme zur Subtypisierung des humanpathogenen *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes zwei Nachteile. Neben der Erfordernis eines Speziallaboratorium, wie es die Arbeitsgruppe um *B. Wilske* besitzt, kommt es außerdem im Fall aberranter oder veränderter Expression der Proteine OspA und OspC gehäuft zum Auftreten falsch negativer Ergebnisse.

#### 4. Epidemiologie und Organotropie-Hypothese

Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel I Einleitung 1.2), finden sich nicht in jedem Durchseuchungsgebiet der Erde alle drei humanpathogenen Genospezies des *B. burgdorferi* s. l.-Komplexes [Schmid, 1985; Wilske *et al.*, 1987; Sigal und Curron, 1991; Hassler *et al.*, 1992; Asbrink und Hovmark, 1993; Wilske *et al.* 1993]. In Nordamerika kommt allein *B. burgdorferi* s. s. als humanpathogene Genospezies vor [Centers for Disease Control and Prevention, 1997], in Europa findet man neben *B. burgdorferi* s. s. noch die beiden Genospezies *B. garinii* und *B. afzelii*. Betrachtet man die jeweiligen Manifestationen der Lyme-Borreliose in beiden Regionen, so zeigt sich in Nordamerika ein nahezu ausschließliches Auftreten von Lyme-Arthritis und Erythema migrans, wohingegen bei Patienten in Europa zusätzliche dermatologische, neurologische und internistische Manifestationen der Lyme-Borreliose auftreten können.

Die gehäufte Korrelation zwischen klinischer Manifestation und der nachgewiesenen Borrelien-Genospezies führte zur Formulierung der Organotropie-Hypothese [van Dam *et al.*, 1993; Lebech *et al.*, 1994; Demaerschalck *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999]. So wird die Lyme-Arthritis allen drei humanpathogenen Genospezies zugeschrieben, wobei *B. burgdorferi* s. s. überwiegend als pathogenes Agens beschrieben wird (siehe Tabelle IV.2) [Balmelli und Piffaretti, 1995; Baranton *et al.*, 1998; Eiffert *et al.*, 1998; Hulinska *et al.*, 1999; van der Heijden *et al.*, 1999; Jaulhac *et al.*, 2000]. Die dermatologischen Manifestationen in Stadium I der Lyme-Borreliose (EM und LCB) werden den beiden Genospezies *B. afzelii* und *B. garinii* zugeschrieben, wobei *B. afzelii* als der häufigste Erreger gilt (80% bei EM) [Wienecke *et al.*, 1994; Jaulhac *et al.*, 2000; Ornstein *et al.*, 2001; Zore *et al.*, 2002]. Die chronische kutane Manifestation in Form einer ACA wird nahezu gänzlich auf eine Infektion mit *B. afzelii* zurückgeführt [Baranton *et al.*, 1998; Hengge *et al.*, 2003; Picken *et al.*, 1998; Saint Giron *et al.*, 1998; Balmelli und Piffaretti, 1995; Wienecke *et al.*, 1994].

Das Krankheitsbild einer Neuroborreliose wird überwiegend mit einer Infektion durch die Genospezies *B. garinii* korreliert, wobei *B. afzelii* selten und *B. burgdorferi* s. s. nie nachgewiesen wurden [Baranton *et al.*, 1998; Lebech *et al.*, 1998; Saint Giron *et al.*, 1998; Ornstein *et al.*, 2001; Lebech, 2002; Ornstein *et al.*, 2002]. Eine ausführliche Literaturrecherche von Wang *et al.* [1999] zeigte, dass bei insgesamt 50,7% der EM-Patienten und bei 89,2% der ACA-Patienten *B. afzelii* nachgewiesen werden konnte. Die Genospezies *B. garinii* wurde bei 67,7% der Neuroborreliose-Patienten als pathogenes Agens identifiziert. Wang *et al.* beschrieben ein Auftreten von *B. burgdorferi* s. s. nur in 26,3 % aller Patienten mit Lyme-Borreliose. Bei Auftreten arthritischer Beschwerden wurde die Genospezies *B. burgdorferi* s.s. jedoch in 72,8 % nachgewiesen.

Infektionen mit mehr als einer Genospezies sind möglich, treten jedoch insgesamt selten auf [Burgdorfer, 1989; Nadal *et al.* 1989; Wienecke *et al.*, 1994; Demaerschalck *et al.*, 1995; Lebech *et al.*, 1998; Lebech, 2002]. Anzumerken ist, dass bislang noch keine großen Patientenkollektive untersucht wurden, wobei die erhobenen Daten mit der Organotropie-Hypothese vereinbar sind (siehe Tabelle IV.2).

Mit der in dieser Arbeit etablierten Dot blot-Hybridisierung steht nunmehr eine Methode zur Verfügung mit der zukünftige, epidemiologische Fragestellungen im Hintergrund der Organotropie-Hypothese beantwortet werden können.

Manifestation	Genospezies	Literatur	Anzahl der nachgesiesenen Genospezies)
<b>Erythema migrans</b>	<i>B. afzelii</i> <i>B. garini</i> <i>B. afzelii</i> <i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i> <i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i> <i>B. garinii</i>	Ornstein et al., 2001 Ornstein et al., 2001 Wienecke et al., 1994 Wienecke et al., 1994 Jaulhac et al., 2000 Jaulhac et al., 2000 Zore et al., 2002 Zore et al., 2002	31 von 33 2 von 33 28 von 35 6 von 35 8 von 10 2 von 10 60 von 70 10 von 70
<b>Lymphadenosis cutis benigna</b>	<i>B. garinii</i> und <i>B. afzelii</i>	Hengge et al., 2003	n. n.
<b>Lyme-Arthritis</b>	<i>B. burgdorferi</i> s. s. <i>B. burgdorferi</i> s. s. <i>B. burgdorferi</i> s. s. <i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i> <i>B. burgdorferi</i> s. s.  <i>B. afzelii</i> <i>B. garinii</i> <i>B. burgdorferi</i> s. s. <i>B. garinii</i>	Baranton et al., 1998 Balmelli u. Piffaretti, 1995 Eiffert et al., 1998 Eiffert et al., 1998 Eiffert et al., 1998 van der Heijden et al., 1999 Hulinska et al, 1999 Hulinska et al, 1999 Jaulhac et al., 2000 Jaulhac et al., 2000	n. n. n. n. 3 von 7 3 von 7 1 von 7 3 von 4  2 von 10 8 von 10 9 von 10 1 von 10
<b>Acrodermatitis chronica atrophicans</b>	<i>B. afzelii</i> <i>B. afzelii</i> und <i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i> <i>B. afzelii</i> <i>B. afzelii</i> <i>B. afzelii</i>	Baranton et al., 1998 Hengge et al., 2003 Picken et al., Saint Giron et al., 1998 Balmelli u. Piffaretti, 1995 Wienecke et al., 1994	n. n. n. n. 17 von 22 n. n. 6 von 6 18 von 18
<b>Neuroborreliose</b>	<i>B. garini</i> <i>B. garinii</i> <i>B. garinii</i> <i>B. burgdorferi</i> s. s. <i>B. afzelii</i> <i>B. garinii</i> <i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i> <i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i>	Baranton et al., 1998 Lebech, 2002 Ornstein et al., 2002 Ornstein et al., 2002 Ornstein et al., 2002 Ornstein et al., 2002 Saint Giron et al., 1998 Ornstein et al., 2001 Ornstein et al., 2001 Lebech et al., 1998 Lebech et al., 1998	n. n. 6 von 7 4 von 7 2 von 7 1 von 7 n. n. 5 von 6 1 von 6 11 von 13 1 von 13

Tab. IV.2. Manifestationen der Lyme-Borreliose in Europa und ihre verursachende Genospezies. n.n. = Patientenanzahl nicht genannt

## V. Zusammenfassung

Seit der Entdeckung der Spirochäten als Erreger der Lyme-Borreliose durch *Willy Burgdorfer* im Jahre 1982 wird an ihrer genotypischen und phänotypischen Differenzierung gearbeitet. Als humanpathogen gelten die drei Genospezies *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii*.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung einer schnellen und hochspezifischen Methode zur Subtypisierung der drei o.g. Genospezies und basiert auf einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) des Flagellin-Gens. Als Zielsequenz für die PCR wurde ein konservierter Genabschnitt gewählt, der einerseits so spezifisch ist, dass keine Amplifikation nahe verwandter Spirochäten stattfindet, andererseits phylogenetisch so konserviert vorliegt, dass alle drei humanpathogenen Genospezies erfaßt werden können. Die erhaltenen PCR-Amplifikate wurden zur Subtypisierung mit drei hochspezifischen Oligonukleotiden hybridisiert. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 34 Borrelien-Isolate untersucht und eindeutig und reproduzierbar mittels Dot blot-Hybridisierung typisiert. Als entscheidender Parameter zeigte sich die gewählte Waschttemperatur. Sie lag für das Oligonukleotid Fla15 (spezifisch für *B. garinii*) bei 63,1 °C (+/- 0,2°C), für das Oligonukleotid Fla16 (spezifisch für *B. afzelii*) bei 67,1°C (+/- 0,2°C) und für das Oligonukleotid Fla8 (spezifisch für *B. burgdorferi* s. s.) bei 68,0°C (+/- 0,2°C). Die Zielsetzung der Arbeit, eine hochstringente Methode zur Subtypisierung von PCR-Amplifikaten des phylogenetisch konservierten Flagellin-Gens der Erreger der Lyme-Borreliose zu etablieren, konnte erfolgreich umgesetzt werden.

Mit der in dieser Arbeit evaluierten und etablierten Methode für die Subtypisierung aller drei humanpathogenen Borrelien-Genospezies eröffnet sich die Möglichkeit, epidemiologische Studien mit klinischen Untersuchungsmaterialien durchzuführen und der Frage nachzugehen, ob die Hypothese des Organotropismus bei der Lyme-Borreliose aufrecht erhalten werden kann.

## VI. Literaturverzeichnis

Aberer, E., R. Neuman, G. Stanek (1985): Is localised scleroderma a *borrelia* infection? The Lancet II: 278

Adam, T., G. Gassmann, C. Rasiah, U. Göbel, (1991): Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from various sources. Infect. Immun. **59**: 2579 - 2585

Afzelius, A. (1910): Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. Sitzung vom 28.10.1909. Arch. Derm. Syph. (Berlin) **101**: 404

Asbrink, E., A. Hovmark (1993): Classification, geographic variations and epidemiology of Lyme-Borreliosis. Clin. Dermatol. **11**: 353 - 357

Assous, M.V., D. Postic, G. Paul, P. Nénot, G. Baranton (1993): Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **12**: 261 - 268

Assous; M.V., D. Postic, G. Paul, P. Nénot, G. Baranton (1994): Individualisation of two new genomic groups among American *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. FEMS Microbiology Letters **121**:93 - 98

Balmelli, T., J.C. Piffaretti (1995): Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Res. Microbiol **146**: 329 - 340

Baranton, G., I. G. Old (1995): The spirochaetes: a different way of life. Bull. Inst. Pasteur **93**: 63 - 95

Baranton, G., D. Postic, I. Saint-Girons, P. Boerlin, J.C. Piffaretti, M. Assous, P. A. D. Grimont (1992): Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov. and group VS461 associated with Lyme disease. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**: 378 - 383

Baranton, G., N. Marti Ras, D. Postic (1998): *Borrelia burgdorferi*, taxonomy, pathogenicity and spread. Ann. Med. Interne (Paris) **149**: 455 - 458

Barbour, A. G., S. F. Hayes (1986): Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Rev. **50**: 381 - 40

Barbour, A. G. (1988): Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. J. Clin. Microbiol. **26**: 475 - 478

Belfaiza, J., D. Postic, E. Bellenger, G. Baranton, I. Saint-Girons (1993): Genomic fingerprinting of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. **31**: 2873 - 2877

Berger, B. W., R. C. Johnson, C. Kodner, L. Coleman (1992): Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. J. Clin. Microbiol. **30**: 359 - 361

- Bergmann, A. R., B. L. Schmidt, A. M. Derler, E. Arberer (2002): Importance of sample preparation for molecular diagnosis of Lyme Borreliosis from urine. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4581 - 4584
- Boehringer Mannheim Benutzerhandbuch (1996): Hybridization (S. 33 - 47) und Detection (S. 49 - 60)
- Brade, V., G. R. Brumester (1990): Klinik und Diagnose der Lyme-Borreliose. Editiones Roche, Hofmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen
- Braun-Falco, O., G. Plewig, H. H. Wolff (1996): Dermatologie und Venerologie. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, S. 169
- Bruckbauer, H. R., V. Praec-Mursic, R. Fuchs, B. Wilske (1992): Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**: 224 - 232
- Büchner, S. A. (1989): Morphea - eine zeckenübertragene Borreliose der Haut? Ein Beitrag zur zirkumskripten Sklerodermie. *H + G Zeitschrift für Haut-Krankheiten* **64**: 661 - 669
- Buchwald, A. (1883): Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. *Arch. Derm. Syph., Berlin* **15**: 553 - 556
- Bunikis, J., B. Olsen, V. Fingerle, J. Bonnedahl, B. Wilske, S. Bergström (1996): Molecular polymorphism of the Lyme disease agent *Borrelia garinii* in northern Europe is influenced by a novel enzootic *Borrelia* focus in the north Atlantic. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 364 - 368
- Burgdorfer, W. (1989): Vector/host relationships of Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Rheum. Dis. Clin. N. Amer.* **15**: 775
- Burgdorfer, W., A. G. Brabour, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt, J.P. Davis (1982): Lyme disease - a tickborn spirochitosis? *Science* **216**: 1317 - 1319
- Burgdorfer, W. (1984): Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Microbiol Med* **57**: 515 - 520
- Busch, U., C. Hizo-Teufel, R. Boehmer, V. Fingerle, H. Nitschko, B. Wilske, V. Praec-Mursic (1996): Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by PFGE and PCR. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1072 - 1078
- Casjens, S. M., H. L. Ley III, P. Rosa, W. M. Huang (1995): Linear chromosomes of Lyme disease agent spirochetes: genetic diversity and conservation of gene order. *J. Bacteriol.* **177**: 2769 - 2780
- Casjens, S., N. Palmer, R. van Vugt, W. M. Huang, B. Stevenson, P. Rosa, R. Lathigra, G. Sutton, J. Peterson, R. J. Dodson, D. Haft, E. Hickey, M. Gwinn, O. White, C. M. Fraser (2000): A bacterial genome in flux: twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **35**: 490 - 516
- Centers for Disease Control and Prevention (1997): Lyme disease – United States, 1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **46**: 531 - 535

- Charon, N. W., E. P. Greenberg, M. B. H. Koopmann, R. J. Limberger (1992): Spirochete chemotaxis, motility and the structure of the spirochetal periplasmatic flagella. *Res. Microbiol.* **143**: 597 - 603
- Christen, H.J., H. Eiffert, A. Ohlenbusch, F. Hanefeld (1995): Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in cerebrospinal fluid of children with acute peripheral facial palsy. *Eur. J. Pediatr.* **154**: 374 - 377
- Cinco, M., C. Costantini, B. Wilske, G. Graziosi, G. Trevisan, F. Florian (1994): Use of polymerase chain reaction and specific monoclonal antibodies as rapid method to recognize *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii* among Italian isolates of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology and Immunology*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Cogswell, F. B., C. E. Bantar, T. G. Hughes, Y. Gu, M. T. Philipp (1996): Host DNA can interfere with detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy specimens by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 980 - 982
- Craft, J. E., D. K. Fischer, G. T. Shimamoto, A. C. Steere (1986): Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. *J. Clin. Invest.* **78**: 934 - 939
- Debue, M., M. Gautier, C. Hackel, A. van Elsen, A. Herzog, G. Bigaignon, A. Bollen (1991): Detection of *Borrelia burgdorferi* in biological samples using the PCR assay. *Res. Microbiol.* **142**: 565 - 572
- Demaerschalck, I., A. B. Messaoud, M. de Kesel, B. Hoyois, Y. Lobet, P. Hoet, G. Bigaignon, A. Bollen, E. Godfroid (1995): Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 602 - 608
- Dilella, A. G., S. L. C. Woo (1987): Hybridization of genomic DNA to oligonucleotide probes in the presence of tetraethylammonium chloride. (Eds. S. L. Berger und A. R. Kimmel), *Metho. Enzymology* **152**: 447 - 451
- Eiffert, H., A. Karsten, R. Thomssen, H. J. Christen (1998): Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains in Lyme arthritis. *Scand. J. Infect. Dis.* **30**: 265 -268
- Erlich, A.H., D. Gelfand, J. J. Sninsky (1991): Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* **252**: 1643 - 1651
- Exner, M. M., M. A. Lewinski (2003): Isolation and detection of *Borrelia burgdorferi* DNA from cerebral spinal fluid, synovial fluid, blood, urine, and ticks using the Roche MagNA Pure system and real-time PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **46**: 235 - 240
- Fawcett, P. T., K. M. Gibney, C. D. Rose, S. B. Dubbs, R. A. Doughty (1992): Frequency and specificity of antibodies that crossreact with *Borrelia burgdorferi* antigens. *J. Rheumatol.* **19**: 582 - 587
- Fischer, U. (2002): Etablierung einer routine-tauglichen Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von *Borrelia burgdorferi* aus menschlichen Untersuchungsmaterialien unter Nutzung des Flagellin-Gens. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin, Institut für Medizinische Mikrobiologie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Fraser C. M., S. Casjens, W. M. Hang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Wathley, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fuji, M. D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H. O. Smith, J. C. Venter (1997): Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature **390**: 580 - 586

Gassmann, G. S., M. Kramer, U. B. Göbel, R. Wallich (1989): Nucleotide sequence of a gene encoding the *Borrelia burgdorferi* flagellin. Nucleic Acids Research **17**: 3590

Goldstein, S. F., K. F. Buttler, N. W. Charon (1996): Structural analysis of *Leptospiraceae* and *Borrelia burgdorferi* by high-voltage electron microscopy. J. Bacteriol. **178**: 6539 - 6545

Goldstein, S.F., N. W. Charon, J. A. Kreiling (1994): *Borrelia burgdorferi* swims with a planar waveform similar to that of eukaryotic flagella. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 3433 - 3437

Goodman, J. L., P. Jurkovich, J. M. Kramber, R. C. Johnson (1991): Molecular detection of persistent *Borrelia burgdorferi* in the urine of patients with active Lyme disease. Infect. Immun. **59**: 269 - 278

Guy, E. C., G. Stanek (1991): Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. J. Clin. Pathol. **44**: 610 - 611

Halperin, J. J. (1997): Neuroborreliosis: central nervous system involvement. Semin. Neurol. **17**: 19 - 24

Hamann-Brand, A., S. Breitner, J. Schulze, V. Brade (1995): Laboratory diagnosis of Lyme disease. Biotest Bulletin **5**: 127 - 142

Hammer, B., A. Moter, O. Kahl, G. Alberti, U. B. Gobel (2001): Visualization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by fluorescence in situ hybridization (FISH) on wholebody sections of Ixodes ricinus ticks and gerbil skin biopsies. Microbiology **147**: 1425 - 1436

Hayes, S.F., W. Burgdorfer (1993): Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi*. in: Aspects of Lyme borreliosis (Eds. Weber K. und Burgdorfer W.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Hengge, U. R., A. Tannapfel, S. K. Tying, R. Erbel, G. Arendt, T. Ruzicka (2003): Lyme borreliosis. Lancet Infect. Dis. **3**: 489 - 500

Horneff, G., H. I. Huppertz, K. Müller, T. Voit, H. Karch (1993): Demonstration of *Borrelia burgdorferi* infection in a child with *Guillain-Barré* syndrome. Eur. J. Pediatr. **152**: 810 - 812

Hulinska, D., J. Votypka, M. Valesova (1999): Persistence of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in patients with Lyme arthritis. Zentralbl. Bakteriologie **289**: 3001 - 318

- Huppertz, H. I., H. Schmidt, H. Karch (1993): Detection of *Borrelia burgdorferi* by nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid and urine of children with neuroborreliosis. Eur. J. Pediatr. **152**: 414 - 417
- Hyde, F., R. Johnson (1984): Genetic relationship of lyme disease spirochetes to *Borrelia*, *Treponema* and *Leptospira* spp.. J. Clin. Microbiol. **20**: 151-154
- Jaulhac, B., P. Nicolini, Y. Piemont, H. Monteil (1991): Detection of *Borrelia burgdorferi* in cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. N. Engl. J. Med. **324**: 1440
- Jaulhac, B., I. Chary-Valckenaere, J. Sibilis, R. M. Javier., Y. Piémont, J. L. Kuntz, H. Monteil, J. Pourel (1996): Detection of *Borrelia burgdorferi* by DNA amplification in synovial tissue samples from patients with Lyme arthritis. Arthritis Rheum. **39**: 736 - 745
- Kaiser, R. und die Teilnehmer der Expertenkonferenz (1998) Frühsommer-Meningoenzephalitis und Lyme-Borreliose – Prävention vor und nach Zeckenstich. Dtsch. Med. Wschr. **123**: 847 - 853
- Khandjian, E. W. (1986): UV crosslinking of RNA to nylon membrane enhances hybridization signals. Mol. Biol. Rep. **11**: 107 - 115
- Kawabata, H., T. Masuzawa, Y. Yanagihara (1993): Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. Isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. Microbiol. Immunol. **37**: 843 - 849
- Keller, T., J. J. Halperin, M. Whitman (1992): PCR detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in cerebrospinal fluid of Lyme disease patients. Neurology **42**: 32 - 42
- Klempner, M. S., R. Noring, R. A. Rogers (1993): Invasion of human skin fibroblasts by the Lyme disease spirochetes, *Borrelia burgdorferi*. J. Infect. Dis. **167**: 1074 - 81
- Kraiczy, P., G. Acker, V. Brade (1998): Kapitel 2 Erregereigenschaften. Aus: Oschmann, P., P. Kraiczy: Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis. UNI-MED Verlag AG, Bremen, Deutschland
- Kramer, M. D., R. Wallich, U. E. Schaible, G. Zimmer, M. M. Simon (1990): Die *Borrelia burgdorferi*-Infektion – Aspekte der Grundlagenforschung, neue Ansätze für Diagnostik und Therapie. Hautarzt **41**: 648 - 657
- Kramer, M. D., M. M. Simon, U. E. Schaible, S. E. Moter, R. Wallich (1991): Die *Borrelia burgdorferi*-Infektion Aspekte – der Grundlagenforschung, neue Ansätze für Diagnostik und Therapie. Hautarzt **42**: 63 - 71
- Krüger, W. H., M. Pulz (1991): Detection of *Borrelia burgdorferi* in cerebrospinal fluid by the polymerase chain reaction. J. Med. Microbiol. **35**: 98 - 102
- Kuiper, H., A. P. Van Dam, L. Spanjaard, B. M. de Jongh, A. Widjojokusumo, T. C. P. Ramselaar, I. Cairo, K. Vos, J. Dankert (1994): Isolation of *Borrelia burgdorferi* from biopsy specimens taken from healthy-looking skin of patients with Lyme borreliosis. J. Clin. Microbiol. **32**: 715 - 720

Kwok, S., R. Higuchi (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* **339**: 237 - 238

Lathe, R. (1985): Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. *J. Mol. Biol.* **183**: 1 - 12

Lebech, A. M., P. Hindersson, J. Vuust, K. Hanssen (1991): Comparison of in vitro culture and polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* in tissues from experimentally infected animals. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 731 - 737

Lebech, A.M., K. Hansen, B. Wilske, M. Theisen (1994): Taxonomic classification of 29 *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients with Lyme borreliosis: a comparison of five different phenotypic and genotypic typing schemes. *Med. Microbiol. Immunol.* **183**: 325 - 341

Lebech, A.M., K. Hansen, B. J. Trutledge, C. P. Kolbert, P. N. Rys, D. H. Persing (1998): Diagnostic detection and direct genotyping of *Borrelia burgdorferi* regular by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *Mol. Diagn.* **3**: 131 - 141

Lebech, A.M. (2002): Polymerase chain reaction in diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections and studies on taxonomic classification. *APMIS Suppl.* **105**: 1 - 40

LeFebvre, R., W. Probert, G. C. Perng (1993): Characterization of a chromosomal gene and the antigen it expresses from the lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2146 - 2151

Li, C., M. Sal, S. F. Goldstein, N. W. Charon (2000): Spirochete periplasmic flagella and motility. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 245 - 354

Lieling, M. R., M. J. Nishio, A. Rodriguez, L. H. Sigal, T. Jin, J. S. Louie (1993): The polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* in human body fluids. *Arthritis Rheum.* **36**: 665 - 675

Lambert, F. X., B. Jaulhac, X. Puechal, H. Monteil, J. L. Kuntz, Y. Piemont, J. Sibilis (2001): Treatment resistant Lyme arthritis caused by *Borrelia garinii*. *Ann. Rheum. Dis.* **60**: 284 - 286

Linz, U., H. Degenhardt (1990): Die Polymerase-Kettenreaktion - Ein Überblick. *Naturwissenschaften* **77**: 515 - 530

Liveris, D., A. Gazumayan, I. Schwartz (1995): Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 589 - 595

Liveris, D., G. P. Wormser, J. Nowakowski, R. Nadelman, S. Bittker, D. Cooper, S. Varde, F. H. Moy, G. Forseter, C. S. Pavia, I. Schwartz (1996): Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* from Lyme disease patients by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1306 - 1309

Loewy, Z. G., J. Mecca, R. Diaco (1994): Enhancement of *Borrelia burgdorferi* PCR by Uracil N-Glycosylase. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 135 - 138

- Longo, M., M. Berninger, J. Hartley (1990): Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**: 125 - 128
- Magnarelli, L. A., J. F. Anderson, R. C. Johnson, B. R. Nadelmann, G. P. Wormser (1994): Comparison of different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato used as antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1154 - 1158
- Malloy, D. C., R. K. Naumann, H. Paxton (1990): Detection of *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1089 - 1093
- Mansy, F., B. Hoyois, M.-J. De Vos, A. Van Elsen, A. Bollen, E. Godfroid (1996): Colorimetric solid-phase capture hybridization assay for detection of amplified *Borrelia burgdorferi* DNA. *Bio Techniques* **21**: 122 - 125
- Masuzawa, T., N. Takada, M. Kudaken, T. Fukui, Y. Yano, F. Ishiguro, Y. Kawamura, Y. Imai, T. Ezaki (2001): *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1817 - 1824
- Melcher, W., J. Meis, R. Rosa, E. Claas, L. Nohlmans, R. Koopman, A. Horrevorts, J. Galama (1991): Amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin biopsies from patients with Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2401 - 2406
- Mercier, G., A. Bruckel, G. Lucotte (1997): Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction of urine specimens of patients with erythema migrans lesions. *Mol. Cell. Probes* **11**: 89 - 94
- Miyada, C. G., R. B. Wallace (1987): Oligonucleotide hybridization techniques. *Meth. Enzymol.* **154**: 94 - 107
- Moeter, S. E., H. Hofmann, R. Wallich, M. M. Simon, M.D. Kramer (1994): Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lesional skin of patients with Erythema migrans and Acrodermatitis chronica atrophicans by OspA-specific PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2980 - 2988
- Muellegger, R. R., N. Zoechling, E. M. Schluengen, H. P. Soyer, S. Hoedl, H. Kerl, M. Volkenandt (1996): Polymerase chain reaction control of antibiotic treatment in dermatoborreliosis. *Infection* **24**: 76 - 79
- Nadal, D., W. Wunderli, H. Briner, K. Hansen (1989): Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in forestry workers and blood donors from the same region in Switzerland. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **8**: 992 - 995
- Nadelmann, R. B., G. P. Wormser (1998): Lyme borreliosis. *Lancet* **352**: 557 - 565
- Nienhaus, C., P. Gehrman (1991): PCR: Kontaminationen und deren Vermeidung. *BioTec* - Nr. 2 März 1991
- Nohlmans, L. M. K. E., R. de Boer, A. E. J. M. Van den Bogaard, C. P. A. Van Boven (1995): Genotypic and phenotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 119 - 125

- Norris, D. E., B. J. Piesman, G. O. Clark, W.C. Black 4th (1997): Culturing selects for specific genotypes of *Borrelia burgdorferi* in an enzootic cycle in Colorado. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2359 - 2364
- Ornstein, K., J. Berglund, I. Nilsson, R. Norrby, S. Berstrom (2001): Characterization of Lyme borreliosis isolates from patients with erythema migrans and neuroborreliosis in south Sweden. *J. Clin. Mikrobiol.* **39**: 1294 - 1298
- Ornstein, K., J. Berglund, S. Berstrom, R. Norrby, A. G. Barbour (2002): Three major Lyme *Borrelia* genospecies (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* and *B. garinii*) identified by PCR in cerebrospinal fluid from patients with neuroborreliosis in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.* **34**: 341 - 346
- Oschmann, P., R. Kaiser (1998a): Kapitel 5 Klinische Symptomatik. Aus: Oschmann, P., P. Kraiczy: Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis. UNI-MED Verlag AG, Bremen, Deutschland
- Oschmann, P., R. Kaiser (1998b): Kapitel 7 Therapie und Prognose. Aus: Oschmann, P., P. Kraiczy: Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis. UNI-MED Verlag AG, Bremen, Deutschland
- Papandrikopoulou, A. (1998): Richtlinien zur Berechnung der Schmelztemperatur bei der Hybridisierung mit Oligonukleotid-Proben. Aus: Gentechnische Methoden von S. Bertram und H. G. Gassen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Persing, D.H., B. J. Rutledge, P. N. Rys, D. S. Podzorski, P. D. Mitchell, K. D. Reed, B. Liu, E. Fikrig, S. E. Malawista (1994): Target imbalance: disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. *J. Infect. Dis.* **169**: 668 - 672
- Peter, O., A. G. Bretz (1992): Polymorphism of the outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for classification. *Zbl. Bakt. Hyg. A* **277**: 28 - 33
- Picken, M. M., R. N. Picken, D. Han, Y. Cheng, F. Strle (1996): Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**: 489 - 498
- Picken, R. N. (1992): Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agent of Lyme disease and North American relapsing fever. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 99 - 114
- Picken, R. N., Y. Cheng, D. Han, J. A. Nelson, A. G. Reddy, M. K. Hayden, M. M. Picken, F. Strle, J. K. Bouseman, G. M. Trenholme (1995): Genotypic and phenotypic characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from ticks and small animals in Illinois. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2304 - 2315
- Picken, R. N., F. Strle, M. M. Picken, E. Ruzic-Sabljić, V. Maraspin, S. Lotric-Furlan, J. Cimperman (1998): Identification of three species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *J. Invest. Dermatol.* **110**: 211 - 214

- Piesmann, J., T. N. Mather, R. J. Skinsky, A. Spielmann (1987): Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. J. Clin. Microbiol. **25**: 557
- Postic, D., J. Belfaiza, E. Isogai, I. Saint-Girons (1993): A new genomic species in *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated from Japanese ticks. Res. Microbiol. **144**: 467 - 473
- Postic, D., M. V. Assous, P. A. D. Grimont, G. Baranton (1994): Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**: 743 - 752
- Postic, D., M. Assous, J. Belfaiza, G. Baranton (1996): Genetic diversity of *Borrelia* of Lyme borreliosis. Wien. Klin. Wochenschr. **108**: 748 - 751
- Preac-Mursic, V., B. Wilske, G. Schierz (1986): European *Borrelia burgdorferi* isolated from human and ticks: culture conditions and antibiotic susceptibility. Zbl. Bakt. Hyg. A **263**: 112 - 118
- Rosa, P.A., T. G. Schwan (1989): A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. **160**: 1018 - 29
- Rosa, P.A., D. Hogan, T. G. Schwan (1991): Polymerase chain reaction analysis identifies two distinct classes of *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. **29**: 524 - 532
- Rys, R. N., D. H. Persing (1993): Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. J. Clin. Microbiol. **31**: 2356 - 2360
- Saint Girons, I. S. J. Norris, U. Göbel, J. Meyer, E. M. Meyer, R. Zuerner (1992): Genome structure of spirochetes. Res. Microbiol. **143**: 615 - 621
- Saint Girons, I., L. Gern, J. S. Gray, E. C. Guy, E. Korenberg, S. G. Rijpkema, A. Schonberg, G. Stanek, D. Postic (1998): Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. Zentralbl. Bakteriologie. **287**: 190 - 195
- Sambrook, J., T. Maniatis, E. F. Fritsch (1989): Molecular Cloning. 2. Edition. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York
- Scheibe, K., M. Hahn, P. Oschmann (1998): Kapitel 3 Zeckenökologie und Epidemiologie. Aus: Oschmann, P., P. Kraiczy: Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis. UNI-MED Verlag AG, Bremen, Deutschland
- Schempp, C., H. Bocklage, R. Lange, H. W. Kömel, C. E. Orfanos, H. Gollnick (1993): Further evidence for *Borrelia burgdorferi* infection in morphea and lichen sclerosus et atrophicus confirmed by DNA-Amplification. J. Invest. Dermatol. **100**: 717 - 720
- Schmid, G. P. (1985): The global distribution of Lyme disease. Rev. Infect. Dis. **7**: 41 - 50

- Schmidt, B., R. R. Muellegger, C. Stockenhuber, H. P. Soyer, S. Hoedl, A. Luger, H. Kerl (1996): Detection of *Borrelia burgdorferi*-specific DNA in urine specimens from patients with erythema migrans before and after antibiotic therapy. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1359 - 1363
- Schmidt, B. L. (1997): PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 185 - 201
- Schmitz, J. L., C. S. Powell, J. D. Folds (1993): Comparison of seven commercial kits for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**: 419 - 424
- Schwan, T. G., W. J. Simpson, P.A. Rosa (1991): Laboratory confirmation of Lyme disease. *Canad. J. Infect. Dis.* **2**: 64
- Schwartz, I., G. P. Wormser, J. J. Schwartz, D. Cooper, D. Weissensee, A. Gazumyan, E. Zimmermann, N. S. Goldberg, S. Bittker, G. L. Campell (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
- Schwartz, I., S. Bittker, S. L. Bowen, D. Cooper, C. Pavia, G. P. Wormser (1993): Polymerase chain reaction amplification of culture supernatants for rapid detection of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**: 879 - 882
- Shapiro, E. D., M. A. Gerber (2000): Lyme disease. *Clin. Infect. Dis.* **31**: 533 - 542
- Sigal, L. H. (1988): Lyme disease. *Semin. Arthritis Rheum.* **18**: 151 - 167
- Sigal, L. H., A. S. Curron (1991): Lyme Disease: A multifocal world-wide epidemic. *Annu. Rev. Publ. Health.* **12**: 85 - 109
- Steere, A. C., S. E. Malawista, D. R. Snyderman, R. E. Shope, W. A. Andiman, M. R. Ross, F.M. Steele (1977): Lyme-Arthritis. An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis. Rheum.* **20**: 7 - 17
- Steere, A. C. (1989): Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* **321**: 586 - 596
- Steere, A. C., E. Taylor, G. L. McHughes, E. L. Logigian (1993): The overdiagnosis of Lyme disease. *JAMA* **269**: 1812 - 1816
- Steere, A. C. (1998): Lyme Borreliosis. Aus: Harrison's Principles of Internal Medicine. International Edition, Mcgraw-Hill, Health Professions Division, USA
- Suggs, S. V., T. Hirose, T. Miyake, E. H. Kawashima, M. J. Johnson, K. Itakura, R. B. Wallace (1981): Aus: Developmental biology using purified genes (Eds. D. Brown und C. F. Fox) Academic Press New York
- Twomey, T. A., S. A. Krawetz (1990): Parameters affecting hybridization of nucleic acids blotted onto nylon or nitrocellulose membranes. *Biotechniques* **8**: 478 - 482

- Udaykumar, J. S. Epstein, I. K. Hewlett (1993): A novel method employing UNG to avoid carry-over contamination in RNA-PCR. *Nucleic Acids Res.* **21**: 3917 - 3918
- van Dam, A. P. H. Kuiper, K. Vos, A. Widjojokusumo, B. M. de Jongh, L. Spanjaard, A. C. P. Ramselaar, M. D. Kramer, J. Dankert (1993): Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clinical Infectious Diseases* **17**: 708 - 717
- van der Heijden, I. M., B. Wilbrink, S. G., Rijpkema, L. M. Schouls, P. H., Heymans, J. D. van Embden, F. C. Breedveld, P. P. Tak (1999): Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by reverse blot in the joint of Dutch patients with Lyme arthritis. *Arthritis Rheum.* **42**: 1473 - 1480
- Victor, T., A. Jordaan, R. du Toit, P. D. Van Helden (1993): Laboratory experience and guidelines for avoiding false positive polymerase chain reaction results. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **31**: 531 - 535
- von Stedingk, L. V., I. Olsson, H. S. Hanson, E. Asbrink, A. Hovmark (1995): Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin lesions of early and late Lyme borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**: 1 - 5
- Wahl, G. M., J. L. Meinkoth, A. R. Kimmel (1987a): Northern and southern blots. *Meth. Enzymology*, Hrsg. S. L. Berger und A. R. Kimmel, **152**: 572 - 577
- Wahl, G. M., S. L. Berger, A. R. Kimmel (1987b): Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: theoretical and practical considerations. *Meth. Enzymology* **152**: 399 - 407
- Wallich, R., C. Helmes, U. E. Schaible, M. M. Simon, S. E. Moter, M.D. Kramer (1993): Genotypische Variation bei *Borrelia burgdorferi*: Konsequenzen für die molekularbiologische Diagnostik. *Lab. med.* **17**: 269 - 276
- Wallich, R., A. Siebers, O. Jahraus, C. Brenner, T. Stehle, M. M. Simon (2001): DNA vaccines expressing a fusion product of outer surface protein A and C from *Borrelia burgdorferi* induce protective antibodies suitable for prophylaxis but not for resolution of Lyme Disease. *Infect. Immun.* **69** (4): 2130 - 2136
- Wang, H., I. Fliegel, C. E. Cass, A. M. W. Penn, M. Michalak, J. H. Weiner, B. D. Lemire (1994): Primers are decisive for sensitivity of polymerase chain reaction. *BioTechniques* **17**: 82 - 90
- Wang, G., A. P. van Dam, I. Schwartz, J. Dankert (1999): Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Review* **12** (4): 633 - 653
- Weber, K., H. W. Pfister, C. D. Reimers (1993): Clinical overview. Aspects of Lyme borreliosis (Eds. Weber, K. und W. Burgdorfer) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Weide, B., T. Walz, C. Garbe (2000): Is morphaea caused by *Borrelia burgdorferi*? A review. *Br. J. Dermatol.* **142**: 636 - 644

- Wienecke, R. , N. Zochling, U. Neubert, E. M. Schlupen, M. Meurer, M. Volkenandt (1994): Molecular subtyping of *Borrelia burgdorferi* in erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. J. Invest. Dermatol. **103**: 19 - 22
- Wienecke, R., E. M. Schlüpen, N. Zöchling, U. Neubert, M. Meurer, M. Volkenandt (1995): No evidence for *Borrelia burgdorferi*-specific DNA in lesion of localized scleroderma. J. Invest. Dermatol. **104**: 23 - 26
- Wilske, B., S. Jauris-Heipke, R. Lobentanzer, I. Pradel, V. Preac-Mursic, D. Rössler, E. Soutschek, R. C. Johnson (1995): Phenotypic analysis of OspC of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. J. Clin. Microbiol. **33**: 103 - 109
- Wilske, B., R. Steinhuber, H. Bergmeister, V. Fingerle, G. Schierz, V. Preac-Mursic, E. Vanek, B. Lorbeer (1987): Lyme-Borreliose in Süddeutschland. Dtsch. Med. Wschr. **112**: 1730 - 1736
- Wilske, B., V. , Preac-Mursic, U. B. Göbel, B. Graf, S. Jauris, E. Soutschek, E. Schwab, G. Zumstein (1993): An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J. Clin. Microbiol. **31**: 340 - 350
- Wilske, B.; J. F. Anderson, G. Baranton, A. G. Barbour, K. Hovind-Hougen, R. C. Johnson, V. Preac-Mursic (1991): Taxonomy of *Borrelia* spp. Scand J Infect Dis, Suppl. **77**:108 - 129
- Wilske, B., L. Zöller, V. Brade, H. Eiffert, U. B. Göbel, G. Stanek (2000): Quality Standards for the Microbiological Diagnosis of Infectious Diseases: MiQ-12 Lyme Borreliosis. Urban und Fischer Verlag, München Jena.
- Wilske, B. , C. Habermann, V. Fingerle, B. Hillenbrand, S. Jauris-Heipke, G. Lehnert, I. Pradel, D. Rossler, U. Schulte-Spechtl (1999): An improved recombinant IgG immunoblot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. Med. Microbiol. Immunol. **188**: 139 -144
- Wolcott, M. K. (1992): Advances in Nucleic Acid-Based Detection Methods. Clinical Microbiology Review, Oct. 1992 , p.370 - 386
- Xu, Y., R. C. Johnson (1995): Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. J. Clin. Microbiol. **33**:26679 - 2685
- Zore, A., E. Ruzic-Sabljić, V. Maraspin, J. Cimperman, S. Lotric-Furlan, A. Pikelj, T. Jurca, M. Logar, F. Strle (2002): Sensitivity of culture and polymerase chain reaction of the etiologic diagnosis of erythema migrans. Wien. Klin. Wochenschr. **114**: 606 - 609

## VII. Anhang

### 1. Nukleotid-Sequenz des Flagellin-Gens von *B. burgdorferi* s.s.

Genospezies: *B. burgdorferi* s. s.

Stamm: B31

Länge: Flagellin-Gen 1011 bp

1	ATGATTATCA	ATCATAATAC	ATCAGCTATT	AATGCTTCAA	GAAATAATGG	CATTAACGCT	60
61	GCTAATCTTA	GTAAACTCA	AGAAAAGCTT	TCTAGTGGGT	ACAGAATTAA	TCGAGCTTCT	120
121	GATGATGCTG	CTGGCATGGG	AGTTTCTGGT	AAGATTAATG	CTCAAATAAG	AGGTTTGTC	180
181	CAAGCTTCTA	GAAATACTTC	AAAGGCTATT	AATTTTATTC	AGACAACAGA	AGGGAATTTA	240
241	AATGAAGTAG	AAAAAGTCTT	AGTAAGAATG	AAGGAATTGG	CAGTTCAATC	AGGTAACGGC	300
301	ACATATTCAG	ATGCAGACAG	AGGTTCTATA	CAAATGAAA	TAGAGCAACT	TACAGACGAA	360
361	ATTAATAGAA	TTGCTGATCA	AGCTCAATAT	AACCAAATGC	ACATGTTATC	AAACAAATCT	420
421	GCTTCTCAA	ATGTAAGAAC	AGCTGAAGAG	CTTGAATGC	AGCCTGCAA	AATTAACACA	480
481	CCAGCATCAC	TTTCAGGGTC	TCAAGCGTCT	TGGACTTTAA	GAGTTCATGT	TGGAGCAACC	540
541	CAAGATGAAG	CTATTGCTGT	AAATATTTAT	GCAGCTAATG	TTGCAAATCT	TTTCTCTGGT	600
601	GAGGGAGCTC	AAACTGCTCA	GGCTGCACCG	GTTCAAGAGG	GTGTTCAACA	GGAAGGAGCT	660
661	CAACAGCCAG	CACCTGCTAC	AGCACCTTCT	CAAGCGGAG	TTAATTCTCC	TGTTAATGTT	720
721	ACAACCTACAG	TTGATGCTAA	TACATCACTT	GCTAAAATTG	AAAATGCTAT	TAGAATGATA	780
781	AGTGATCAAA	GGGCAAATTT	AGGTGCTTTC	CAAAATAGAC	TTGAATCTAT	AAAGAATAGT	840
841	ACTGAGTATG	CAATTGAAAA	TCTAAAAGCA	TCTTATGCTC	AAATAAAAGA	TGCTACAATG	900
901	ACAGATGAGG	TTGTAGCAGC	AACAACATAAT	AGTATTTTAA	CACAATCTGC	AATGGCAATG	960
961	ATTGCGCAGG	CTAATCAAGT	TCCCCAATAT	GTTTTGTGTCAT	TGCTTAGATA	A	1011

[Gassmann *et al.*, 1989]

## 2. Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua demineralisata et destillata
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
B.	<i>Borrelia</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Erythema chronicum migrans
EM	Erythema migrans
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
fg	femtogramm = $10^{-15}$ g
G	Guanin
DIG	Digoxigenin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LCB	Lymphadenitis cutis benigna
µg	mikrogramm = $10^{-6}$ g
µl	mikroliter = $10^{-6}$ l
min.	Minuten
MIQ	Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik
ng	nanogramm = $10^{-9}$ g
NTP	Nukleotidtriphosphat
OspA	Oberflächenprotein A (outer surface protein A)
OspC	Oberflächenprotein C (outer surface protein C)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pg	pikogramm = $10^{-12}$ g
pmol	pikomol = $10^{-12}$ mol
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s. l.	sensu lato (im weiteren Sinne)
s. s.	sensu stricto (im engeren Sinne)
T	Thymin
$T_m$	Schmelztemperatur (melting temperature)
U	Uracil
Upm	Umdrehungen pro Minute
WS	Waschschritt(e)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
ZT	Zimmertemperatur

### 3. Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name	Radha Rani Bauer, geb. Sinha
Geburtsdatum	14. Juli 1972
Geburtsort	Stuttgart
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Wohnhaft	Wendelsweg 47, 60599 Frankfurt

#### Schulabschluss und Studium der Humanmedizin

1992	Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Gerlingen, Baden-Württemberg
1992	Immatrikulation an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
1995	Ärztliche Vorprüfung
1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

#### Stipendium

1993 bis 1999	Stipendium des Ev. Studienwerkes Villigst
---------------	---

#### Tätigkeiten im Bereich der Medizinischen Mikrobiologie

1995 bis 1996	Seminar und Praktikum „Einführung in molekularbiologische Methoden“, Georg Speyer-Haus, Frankfurt am Main
1996 bis 1997	Praktischer Teil der Dissertation am Institut für Medizinischen Mikrobiologie, Universitätsklinikum, Frankfurt am Main
1996 bis 1999	Kursbetreuung als studentische Hilfskraft am Institut für Medizinische Mikrobiologie
1999	„Tropenmedizinischer Lehrgang“, Universitätsklinikum, Leipzig

#### Ärztliche Tätigkeiten

2000 bis heute	AiP und Assistenzzeit am Zentrum der Dermatologie und Venerologie (Prof. Dr. med. R. Kaufmann), Universitätsklinikum, Frankfurt am Main
----------------	---

#### 4. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Subtypisierung von PCR-Amplifikaten des Flagellin-Gens  
von *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose,  
mittels Dot blot-Hybridisierung

im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Zentrums der Hygiene unter der Leitung von Professor Dr. med. V. Brade mit Unterstützung von Herrn Dr. med. J. Schulze und Herrn PD Dr. phil. nat. P. Kraiczy ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt, 12.12.2003

Radha Rani Bauer