

**Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main**

**Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
Direktor: Prof. Dr. med. Volker Brade**

**Analyse der Proteinexpression von *Borrelia burgdorferi*  
nach Inkubation mit Penicillin und Doxycyclin mittels 2D-  
Gelelektrophorese**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des  
Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-  
Universität Frankfurt am Main vorgelegt von:**

**Sebastian Burg**

**Bad Bergzabern**

**Frankfurt am Main, 2008**

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. P. Kraiczky

Korreferent: Prof. Dr. R. Kaufmann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2009

## **Danksagung**

Prof. Dr. Volker Brade danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene durchführen zu können.

Vorrangig danke ich Prof. Dr. Peter Kraiczy und Priv. Doz. Dr. Klaus-Peter Hunfeld für die fachliche und zielgerichtete Betreuung der Arbeit und die Geduld, die sie bis zur Fertigstellung aufgebracht haben.

Speziell auch Christa Hansen Hübner und Andrea Saames für die praktische Anleitung und tagtägliche Hilfe im Labor.

Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts und meinen Mitdoktoranden für ihre mannigfaltige Unterstützung und anregende Gespräche im Gemeinschaftsraum.

Danke auch an Prof. Dr. Michael Karas vom Institut für pharmazeutische Chemie für die Unterstützung bei der massenspektrometrischen Analyse der Proben.

Besonders herzlicher Dank gilt allen Personen meines persönlichen Umfelds für die fortwährende Unterstützung und ihrem generellen Interesse an meiner Arbeit.

Speziell meiner Familie, meinen Eltern Siglinde und Jürgen und meiner Schwester Sara Anne für ihre dauerhafte Motivation und orthografischen Alternativvorschläge, sowie Daniela Frings für ihre Liebe und Geduld mit mir.

## Eidesstattliche Erklärung

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

**Analyse der Proteinexpression von *Borrelia burgdorferi* nach Inkubation mit Penicillin und Doxycyclin mittels 2D-Gelelektrophorese**

im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
(Direktor: Prof. Dr. med. V. Brade)

unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. phil. nat. P. Kraiczy  
mit Unterstützung durch PD Dr. K.-P. Hunfeld

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- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde im International Journal of Medical Microbiology zur Veröffentlichung eingereicht.

# Lebenslauf

Sebastian Burg  
Charlottenstr. 2  
14467 Potsdam  
Tel: 0179-5904163  
Email: S.Burg@web.de

## Persönliche Daten

---

Geburtsdatum und –ort  
Staatsangehörigkeit

23.11.1976, Bad Bergzabern  
deutsch

## Klinische Tätigkeit

---

10.2007 – lfd.                      Assistenzarzt an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (CA Prof. Dr. Jungehülsing) am Klinikum Ernst-von-Bergmann, Potsdam

03.2005 – 04.2007                Assistenzarzt an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (CA Prof. Dr. Issing) am Klinikum Bad Hersfeld

## Studium

---

01.2005                                Approbation  
10.1997 – 11.2004                Studium der Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt/Main

## Praktisches Jahr

---

06.2004                                HNO, Zentrum für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Universitätsklinikum Frankfurt/Main

02.2004                                Chirurgie, King Edward VIII Hospital, Durban, Südafrika

10.2003                                Innere Medizin, Markus-Krankenhaus, Frankfurt/Main

## Famulaturen

---

09.2002                                Chirurgie, Victoria, Seychellen

08.2002                                Kardiologie, Bethanien-Krankenhaus, Frankfurt/Main

09.2001                                Kardiologie, Cardio-Centrum-Bethanien (CCB), Frankfurt/Main

03.2000                                Gastroenterologie, Bethanien-Krankenhaus, Frankfurt/Main

---

## Zivildienst

---

09.1996 - 09.1997                      Club Behinderter und ihrer Freunde (CBF) Südpfalz e.V.

## Schulbildung

---

18.06.1996                                  Abitur  
08.1994 - 06.1996                      Max-Slevogt-Gymnasium, Landau in der Pfalz  
08.1993 - 06.1994                      Monmouth Academy, Maine, USA, Erwerb der amerikanischen Hochschulreife  
08.1987 - 06.1993                      Max-Slevogt-Gymnasium, Landau in der Pfalz







## Inhaltsverzeichnis

### **1 Einleitung**

1.1 Lyme-Borreliose	1
1.1.1 Historie	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Klinik	2
1.1.4 Diagnostik	3
1.1.5 Therapie	5
1.2 Erregereigenschaften	7
1.2.1 Taxonomie	7
1.2.2 Morphologie	8
1.2.3 Kulturbedingungen	8
1.3 Zielsetzung der Arbeit	9

### **2 Material und Methoden**

2.1 Studiendesign	11
2.2 Kultivierung von <i>Borrelia burgdorferi</i>	12
2.2.1 Kulturmedium	12
2.2.2 Borrelienstamm	13
2.3 Kultur von <i>Borrelia burgdorferi</i> in Antibiotika-supplementiertem Medium	13
2.3.1 Kulturansatz	13
2.4 Bestimmung der Zellzahl und Dunkelfeldmikroskopie	13
2.5 MHK-Bestimmung mittels Mikrodilutionsmethode	14
2.6 Probenaufarbeitung	15
2.7 Zellaufschluß von Borrelienzellen mittels Ultraschallbehandlung	15
2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration	16
2.9 Zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese	17
2.9.1 Allgemeines	17
2.9.2 Isoelektrische Fokussierung – Erste Dimension	18
2.9.3 SDS-PAGE – Zweite Dimension	20
2.10 Färbemethoden	20
2.10.1 Visualisierung der Proteinspots mittels Silberfärbung	20

2.10.2 Visualisierung der Proteinspots mittels kolloidaler Coomassiefärbung	21
2.11 Computer-gestützte Analyse der 2D-Gele	21
2.11.1 Digitalisieren der Gele	21
2.11.2 Spoterkennung und Spotquantifizierung mittels PD-Quest	22
2.11.3 Vergleichsanalyse von 2D-Gelen	23
2.12 Proteinidentifikation mittels MALDI-TOF-MS	25
2.13 Puffer	27
2.13.1 Puffer für die 1. Dimension	27
2.13.2 Puffer und Lösungen für die 2. Dimension	28
2.14 Lösungen	28
2.14.1 Lösungen für die Silberfärbung	28
2.14.2 Lösungen für die kolloidale Coomassiefärbung	29
2.14.3 Lösungen für die MALDI-TOF-MS Analyse	30
2.14.4 Lösungen für die Tris/Tricin PAGE	31
2.15 Enzyme/Antibiotika	31
2.16 Chemikalien	32
2.17 Geräte	33
2.18 Sonstige Materialien	33
<b>3 Ergebnisse</b>	
3.1 MHK-Bestimmung mittels Mikrodilutionstest	35
3.2 Mikroskopische Analyse der morphologischen Veränderungen von Borrelienzellen in Gegenwart von Antibiotika	36
3.3 Analyse der Antibiotika-induzierten Modulation der Proteinexpression von <i>Borrelia burgdorferi</i> mittels 2D-Gelelektrophorese	36
3.4 Massenspektrometrische Analyse der durch Doxycyclin und Penicillin veränderten Proteinsignaturen	39
<b>4 Diskussion</b>	
4.1 Generelle Aspekte von Proteomanalysen	42
4.2 Problematik von Proteomstudien	43
4.3 Veränderungen des Proteinexpressionsprofils unter subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen	44

4.4 Übersicht über die Resistenzmechanismen von <i>Borrelia burgdorferi</i>	46
4.5 Analyse der Antibiotika-induzierten Alteration	48
4.5.1 Penicillin-induzierte Alteration der Proteinexpression	48
4.5.2 Doxycyclin-induzierte Alteration der Proteinexpression	51
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>6 Verzeichnisse</b>	
6.1 Literaturverzeichnis	54
6.2 Abkürzungsverzeichnis	59
<b>7 Anhang</b>	
7.1 Computer-gestützte Analyse veränderter Proteinspots	60



## 1 Einleitung

### 1.1 Lyme-Borreliose

#### 1.1.1 Historie

1981 isolierte W. Burgdorfer ein Spiralbakterium aus dem Darm einer Zecke, das heute als *Borrelia burgdorferi* sensu stricto [Burgdorfer et al., 1982; Johnson et al., 1984] bekannt ist. Damit war gleichzeitig der Erreger einer Serie ungeklärter Arthritiden unter Jugendlichen des Bezirks Old-Lyme in Connecticut, USA, gefunden [Steere et al., 1977]. Als neuer Name der Krankheit wurde der Begriff Lyme-Borreliose geprägt.

Schon im späten 19ten und zu Beginn des 20ten Jahrhunderts beschrieben europäische Ärzte einzelne klinische Entitäten, die später der Lyme-Borreliose zugeordnet wurden. Die Acrodermatitis chronicum atrophicans (Buchwald, 1883 und Nikulin, 1896), sowie das Erythema migrans (Lipschütz und Riehl, 1913). Afzelius, der 1910 ebenfalls das Erythema migrans beschrieb, stellte 1921 erstmals eine Kausalität zu Zeckenbissen her. Bäferstedt präsentierte 1943 eine größere Zahl von Patienten mit Borrelienlymphozytomen und Erythema migrans. Durch Garin und Bujadoux wurde 1922 der erste Fall von Meningoradiculoneuritis nach Zeckenstich beschrieben. Bannwarth behandelte 1941 Kinder mit der gleichen Symptomatik und zusätzlicher Fazialisparese. Nachdem 1949 Thyresson erstmals die Acrodermatitis chronicum atrophicans mit Penicillin behandelte und auch Patienten mit den weiteren Hautmanifestationen durch eine antibiotische Therapie behandelt werden konnten, schien 1954-1957 durch Götz et al., Binder et al. und Paschoud die infektiöse Natur dieser Krankheiten bewiesen. In der Folge gelang es neurologische und dermatologische Erscheinungen miteinander in Verbindung zu setzen [Burgdorfer et al., 2001]. Nach der Isolierung des Erregers als kausales Bindeglied konnten sowohl diese als auch orthopädische und kardiale Manifestationen zu einer Entität zusammengefaßt werden [Weber, 2001].

#### 1.1.2 Epidemiologie

In den gemäßigten Breiten der nördlichen Hemisphäre stellt die Lyme-Borreliose die häufigste durch Zecken übertragene Erkrankung dar. Man findet sie in fast allen Ländern Europas, Zentral-und Ostasiens, sowie im Nordosten und der Pazifikküste Nordamerikas [Orloski et al., 2000; Steere, 1994]. In Deutschland wird die Inzidenz

der Borrelieninfektion in den Endemiegebieten Süddeutschlands auf 30-40 pro 100.000 Einwohner geschätzt [Wilske, 2002], während in den Neuenglandstaaten der USA gebietsweise Inzidenzen von über bis zu 1000 pro 100.000 Einwohner gemeldet werden. Die Anzahl der gemeldeten Fälle scheint über die Jahre hinweg deutlich zu steigen. Nach einem aktuellen Bericht des Centers für Disease Control (CDC) zeigt sich eine zunehmende Anzahl von Neuerkrankungen in zahlreichen Bundesstaaten der USA [MMWR, 2004]. Europaweit gesehen kann ebenfalls davon ausgegangen werden, dass die Anzahl von Neuerkrankungen weiter ansteigt. Da keine Meldepflicht besteht, sind jedoch keine genauen Zahlen bekannt.

Als potentielle Vektoren der Borrelien dienen verschiedene Schildzeckenspezies. In Nordamerika können Borrelien aus *Ixodes pacificus* und *Ixodes scapularis* isoliert werden. In Eurasien kommen *Ixodes persulcatus* oder *Ixodes ricinus* („gemeiner Holzbock“) in Frage. Das Wirtsspektrum der Zecken ist breit gefächert und umfaßt den Großteil der Wildtiere in den entsprechenden Regionen. Unter ihnen stellen kleine Nagetiere, wie zum Beispiel Mäuse und Kaninchen, das größte Reservoir [Anderson 1991].

### **1.1.3 Klinik**

Nach dem Stich einer infizierten Zecke und erfolgreicher Transmission von Borrelien während der Blutmahlzeit entwickeln sich in 1-5 % der betroffenen Personen klinische Symptome [Paul et al., 1986; Paul et al., 1989].

Eine unbehandelte Infektion mit Borrelien kann einen sehr variablen Verlauf nehmen, wobei es zu einem Befall verschiedener Organsysteme kommen kann. Unter chronologischen Gesichtspunkten lassen sich Frühmanifestationen (Stadium I, Stadium II) und Spätmanifestationen (Stadium III) differenzieren.

#### ***Stadium I***

Nach Tagen bis wenigen Wochen kann im Stadium I ein Erythema migrans auftreten. Es handelt sich dabei um eine erythematöse, papulöse Hautreaktion, die sich konzentrisch um die Stelle des ursprünglichen Zeckenbiß ausbreitet. Aufgrund hämatogener Streuung können im weiteren Verlauf auch in anderen Körperregionen multiple Erytheme, sowie Borrelienlymphozytome in Form livider Knötchen auftreten.

Desweiteren ist mit unspezifischen Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit, Inappetenz, Fieber, Kopfschmerz und Myalgien zu rechnen.

### ***Stadium II***

Innerhalb der nächsten Wochen kann es zu Krankheitserscheinungen des Stadium II kommen. Am häufigsten manifestiert sich eine Neuroborreliose, insbesondere als Meningoradikulitis Bannwarth mit ausgeprägter Schmerzsymptomatik und Nervenpareesen, in selteneren Fällen als isolierte Meningitis. Häufigste neurologische Manifestation bei Kindern ist eine Fazialisparese. Am Herzen kann es sehr selten zu einer Lyme-Karditis mit Blockierung der atrioventrikulären Überleitung und anderen Rhythmusstörungen kommen.

### ***Stadium III***

Monate oder Jahre nach Primärinfektion können sich die Spätmanifestationen des Stadium III bemerkbar machen. Hierunter fallen die Lyme-Arthritis mit einem typischen, monoartikulären Kniegelenkbefall (aber auch disseminiert oligoartikulär), die Acrodermatitis chronicum atrophicans Herxheimer, sowie chronische Meningoenzephalitiden.

Die Ausprägung der einzelnen Symptome kann sehr unterschiedlich sein. Grundsätzlich können die genannten Krankheitsbilder isoliert oder in variabler Kombination auftreten. Das Auftreten aller drei Stadien ist eher selten. Alle Altersgruppen können betroffen sein. Es zeigt sich eine Häufung der Frühmanifestationen von Frühjahr bis Herbst, was der Zeit der erhöhten Zeckenaktivität entspricht. Die Spätsymptome treten jahreszeitenunabhängig auf [Wilske, 2002].

#### **1.1.4 Diagnostik**

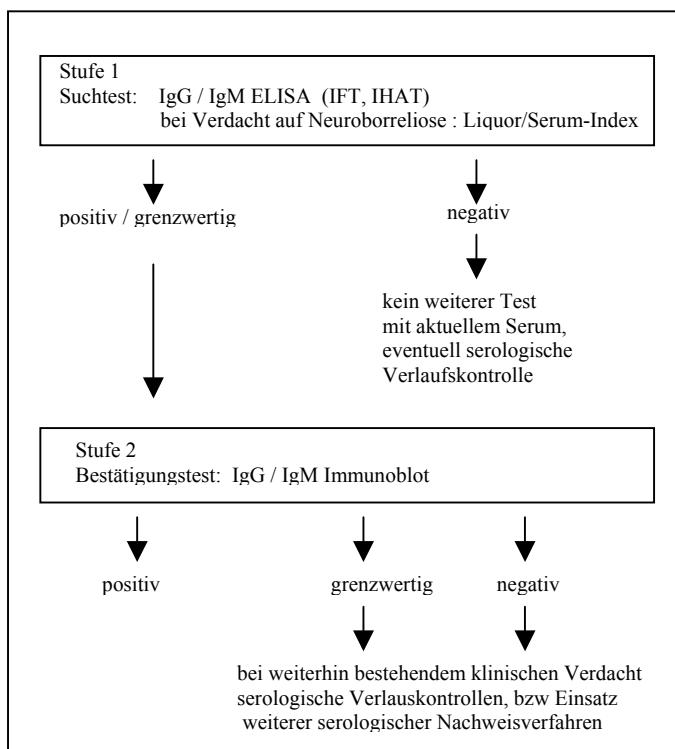
In der medizinischen Praxis erfolgt die Diagnose einer Borreliose meist aufgrund der typischen Symptomatik, dem saisonalen Auftreten der Erstmanifestationen und einer Zeckenbissanamnese in Kombination mit einer serologischen Untersuchung. Bei klinischem Verdacht kommen labordiagnostisch routinemäßig meistens indirekte Testverfahren zum Nachweis von Antikörpern in Serum oder Liquor zum Einsatz. In

diagnostisch schwierigen Fällen wird zusätzlich der direkte Erregernachweis aus Hautbiopsaten, Liquor oder Gelenkpunktaten mittels Kultur und PCR empfohlen (Tab.1).

Direkte Nachweisverfahren	indirekte Nachweisverfahren
Direktmikroskopie	Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)
Erregeranzucht in Kultur	Immunfluoreszenztest (IFT)
Polymerasekettenreaktion (PCR)	Vollantigen-Immunoblot
Borrelien-spezifischer Antigennachweis	Immunoblot mit rekombinanten Antigenen

**Tabelle 1** Mikrobiologische Nachweisverfahren

Als Grundlage zum Nachweis einer Borreliose gelten in Deutschland die Qualitätsstandards mikrobiologischer Diagnostik der Lyme-Borreliose, kurz MIQ [Wilske, 2002], erarbeitet von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Diese sehen eine serologische Stufendiagnostik vor. Ein sensitiver Suchtest wird mit einem spezifischen Bestätigungstest kombiniert (Abb.1).



**Abb. 1** Algorithmus zur serologischen Borreliendiagnostik [modifiziert nach Wilske, 2002]



Als Suchtest findet meistens ein ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay) Verwendung, der Immunglobuline (IgM und IgG) gegen Borrelienantigene nachweist. Liefert der Suchtest grenzwertige oder positive Befunde, wird als Bestätigungstest ein spezifischer Immunoblot angeschlossen.

### 1.1.5 Therapie

Der einzige Therapieansatz zur Behandlung einer diagnostizierten Borreliose stellen Antibiotika dar. Eine Reihe von Präparaten besitzen sehr gute Wirksamkeit gegen Borrelien (Tab.2). Die Wahl der passenden Antibiotika richtet sich nach der Krankheitsmanifestation und ist auf den zu behandelnden Patienten abzustimmen. Als orale Therapeutika finden als Mittel der ersten Wahl Doxycyclin (Tetracyclinderivat) und Amoxicillin ( $\beta$ -Lactam) Anwendung. Darüber hinaus kann auch mit Penicillin, Cephalosporinen oder Makroliden erfolgreich behandelt werden. [Massarotti et al., 1992; Dattwyler et al., 1990; Weber, 2001].

Empfehlung/Darreichung	Antibiotikum	Dosierung pro Tag <sup>a</sup>
oral 1.Wahl	Doxycyclin <sup>b</sup>	2 mal 100 mg
oral 1.Wahl	Amoxicillin	3 mal 500-750 mg
oral alternativ	Cefuroxim	2 mal 500 mg
oral alternativ	Erythromycin	4 mal 500 mg
oral alternativ	Minocyclin	2 mal 100 mg
oral alternativ	Clarythromycin	2 mal 500 mg
oral alternativ	Penicillin V	3 mal 1000 mg
parenteral 1.Wahl	Ceftriaxon <sup>c</sup>	1 mal 2000 mg
parenteral alternativ	Cefotaxim <sup>c</sup>	2-3 mal 2000 mg
parenteral alternativ	Penicillin G	4 mal 5 Mio I.E.

**Tabelle 2** Antibiotika zur Borreliose Therapie [modifiziert nach Wormser et al., 2000; Weber, 1994; Weber, 2001],

<sup>a</sup>Dosierung für Erwachsene (Kinder entsprechend gewichtsadaptiert)

<sup>b</sup>kontraindiziert für Kinder, Schwangere und Laktierende

<sup>c</sup>kontraindiziert im 1.Trimenon

Oral zu applizierende Antibiotika werden im Stadium I der Borreliose, bei Erythema migrans und Lymphocytosis cutis benigna, sowie im Stadium II bei Fazialisparesen und leichten Karditisformen angewandt. Des weiteren können eine Acrodermatitis chronicum atrophicans und unkomplizierte Arthritiden im Stadium III primär oral angegangen werden.

Bei Exazerbation der Krankheit im Stadium II und III wird aufgrund der höheren Blut- und Gewebewirkspiegel einer parenteralen Therapie der Vorzug gegeben. Dies gilt für Meningitiden, Radikulitiden, bedrohliche Karditiden, persistierende Arthritiden und chronische neurologische Verlaufsformen [Wormser et al., 2000]. (Tab.3) Mittel der Wahl stellt das 3. Generation Cephalosporin Ceftriaxon dar.

Indikation	Behandlung	Dauer
Zeckenbiß	keine Behandlung empfohlen Verlaufskontrolle	
Erythema migrans	orale Antibiotikatherapie	2-3 Wochen
Akute Neuroborreliose		
- Meningitis, Radikulitis	parenterale Antibiotikatherapie	2-3 Wochen
- Fazialisparese	orale Antibiotikatherapie	2-3 Wochen
Karditis mit		
- AV Block <sup>o</sup> I / <sup>o</sup> II	orale Antibiotikatherapie	2-3 Wochen
- AV Block <sup>o</sup> III	parenterale Antibiotikatherapie	2-3 Wochen
Arthritis		
- ohne neurologische Symptome	orale Antibiotikatherapie	4 Wochen
- persistierend nach 1. Therapie	parenterale Antibiotikatherapie	2-4 Wochen
- persistierend nach 2. Therapie	symptomatisch	Wochen
Chronische Neuroborreliose		
- Neuropathie/Enzephalopathie	parenterale Antibiotikatherapie	2-4 Wochen
Acrodermatitis chronica atrophicans	oral/parenterale Antibiotikatherapie	2-3 Wochen
Post-Lyme Syndrom	symptomatisch	

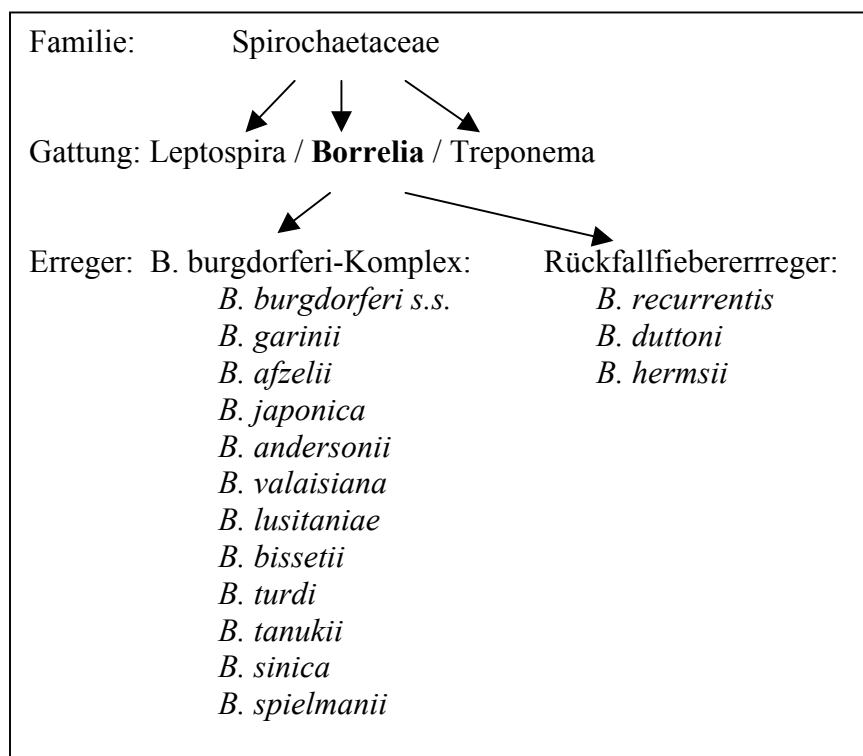
**Tabelle 3** Stadiengerechtes Therapieschema bei Infektion mit *Borrelia burgdorferi* [modifiziert nach Wormser et al., 2000; Weber, 2001]

Trotz adäquater Therapie im Stadium I der Borreliose kommt es in Einzelfällen zum Fortschreiten der Krankheit und zur Ausbildung der für Stadium II und III typischen Manifestationen [Priem et al., 1998; Limbach et al., 2001; Steere et al., 1994/2004; Weber, 1996; Oksi et al., 1999; Straubinger et al., 1997/2000]. Auch Jahre später kann sich ein sogenanntes Post-Lyme-Syndrom (Chronische Borreliose) entwickeln, das eine weitere Therapie erschwert [Klempner et al., 2001; Steere et al., 2004; Krupp et al., 2003].

## 1.2 Erregereigenschaften

### 1.2.1 Taxonomie

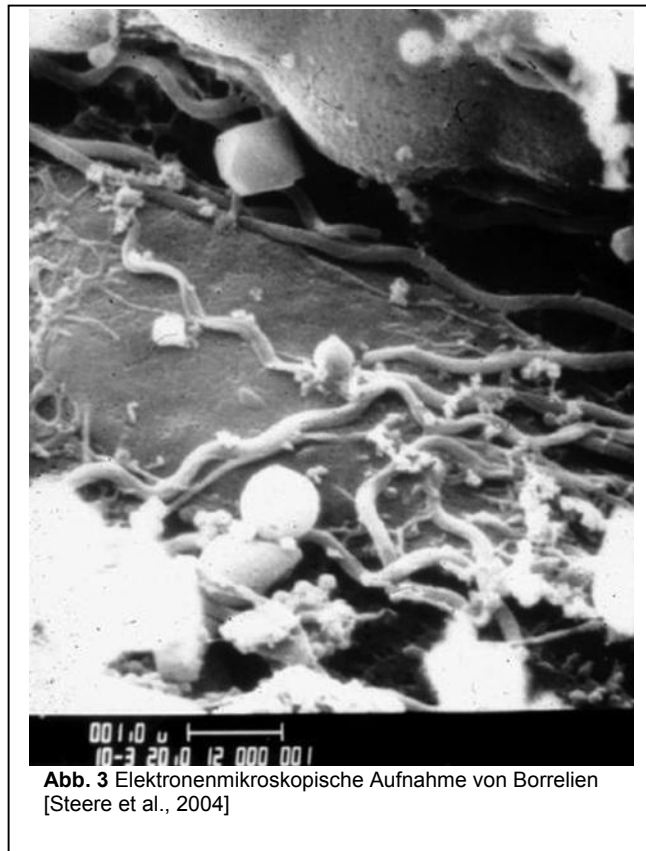
Borrelien werden der Familie der Spirochäten zugeordnet. Neben Borrelien gehören auch die ebenfalls spiralförmigen Gattungen der Treponemen und Leptospiren zu dieser Familie. Innerhalb der Gattung *Borrelia* unterscheidet man zum einem die Erreger des Rückfallfiebers, zu denen *B. recurrentis*, *B. duttoni*, *B. hermsii* und weitere Spezies gehören und zum anderen die Erreger der Lyme-Borreliose, die als *B. burgdorferi*-Komplex (*B. burgdorferi* sensu lato) zusammengefasst werden. Innerhalb des *B. burgdorferi*-Komplex nehmen *B. burgdorferi* s.s. [Burgdorfer 1982; Johnson et al., 1984], *B. garinii* [Baranton et al., 1992], *B. afzelii* [Canica et al., 1993] und *B. spielmanii* [Richter et al., 2004, 2006] aufgrund ihrer Pathogenität für den Menschen eine Sonderstellung ein. Weitere 8 Genospezies unklarer Pathogenität wurden bisher mittels molekulargenetischer Methoden identifiziert [Kawabata et al., 1993; Marconi et al., 1995; Fukunaga et al., 1996; Wang et al., 1997; LeFleche et al. 1997; Postic et al., 1998; Masuzawa et al., 2001]



**Abb. 2** Systematik der Familie der Spirochäten [modifiziert nach Kraiczy et al., 1998]

### 1.2.2 Morphologie

Borrelien sind filiforme, helikal gewundene Bakterien von 10-30µm Länge und 0,2-0,25µm Dicke (Abb. 3). Die Ultrastruktur stellt sich folgendermaßen dar [Barbour und Hayes, 1986]: das Cytoplasma enthält ein lineares Chromosom aus ca. 950.000 Basenpaaren und bis zu 24 lineare und zirkuläre Plasmide und wird von dem protoplasmatischen Zylinder umgeben [Fraser et al., 1997; Casjens et al., 2000]. Eine trilaminare Membran liegt dem Zylinder an. Zwischen der mittleren und äußeren Schicht befindet sich der periplasmatische Raum, in dem



zwischen 3 und 18 Endflagellen lokalisiert sind. Diese kontraktile Moleküle sind für die typische, rotierende Fortbewegung verantwortlich. Außen lagert sich der trilaminaren Membran eine mukoide amorphe Schicht (surface layer) auf.

### 1.2.3 Kulturbedingungen

Für die in vitro Kultur von Borrelien wird ein spezielles Flüssigmedium (modifiziertes Barbour-Stoenner-Kelly-Medium, BSK) verwendet. Aufgrund der fehlenden Gene zur Synthese von Aminosäuren, Fettsäuren, Kofaktoren und Nukleotiden müssen diese supplementiert werden. Unter optimalen mikroaerophilen Bedingungen bei 33°C ist mit Generationszeiten von 7 bis 20 Stunden zu rechnen [Pfister et al., 1994].

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Immunsystem ermöglicht es dem menschlichen Organismus sehr effektiv gegen eingedrungene Mikroorganismen vorzugehen. Einerseits über unspezifische Abwehrmechanismen wie Makrophagen, Granulozyten und dem Komplementsystem, andererseits über spezifische Antikörperbildung durch aktivierte B-Lymphozyten.

In den allermeisten Fällen ist eine Borrelieninfektion durch eine adäquate Immunantwort und gezielte antibiotische Therapie zu beherrschen.

Trotzdem sind Fälle bekannt, in denen es trotz nachgewiesener Immunkompetenz und Antibiotikatherapie zu chronischen Krankheitsverläufen kommt [Priem et al., 1997; Limbach et al., 2000; Steere et al., 1994/2004; Weber, 1996; Oksi et al., 1999; Straubinger et al., 1997/2000; Bantas et al., 2000; Georgilis, 1992; Nanagara, 1996; MacDonald, 1990; Klempner, 1993].

Man vermutet verschiedene Faktoren, die es den Borrelien ermöglichen, trotz immunologischer Abwehrreaktion im Körper zu überdauern (Tab. 4).

Strategien von <i>Borrelia burgdorferi</i> der Immunabwehr zu entgehen
Inaktivierung des Komplementsystems
Antigenwandel
Induktion entzündungshemmender Zytokine
Freisetzen löslicher Antigene
Ausweichen in spezielle Kompartimente
Intrazelluläres Überleben
Umwandlung in zystische Dauerformen

**Tabelle 4** Strategien der Immunevasion

Eine befriedigende Antwort für die Ursachen von Erregerpersistenz gibt es derzeit nicht. Speziell über die Mechanismen von Borrelien, eine adäquate antibiotische Therapie zu überdauern, ist wenig bekannt. Einige der oben genannten Strategien zum Entgehen der Immunantwort werden auch mit Persistenz von Borrelien unter Antibiotikatherapie in Verbindung gebracht. Hinreichende Erkenntnisse liegen bislang jedoch nicht vor. Vor diesem Hintergrund erschien es zweckmäßig zu betrachten, wie die Mikroorganismen auf zellulärer Ebene auf die Anwesenheit von antibiotischen Substanzen reagieren. Um Aussagen über den Einfluss von Antibiotika auf die Stoffwechselaktivität und der Proteinexpression treffen zu können, stellt die

Proteomanalyse die Methode der Wahl dar. Durch die hohe Sensitivität der Methode lassen sich selbst geringfügige Unterschiede mittels 2D-Gelelektrophorese visualisieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen behandelt werden:

- Gibt es eine Veränderung der Proteinexpression von *B. burgdorferi* als Reaktion auf die Anwesenheit von Antibiotika?
- Lassen identifizierte Proteine Rückschlüsse auf molekulare Resistenz/Persistenzmechanismen zu?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Um Hinweise auf Veränderungen im Proteinexpressionsmuster von *Borrelia burgdorferi* in Gegenwart von Antibiotika zu erhalten, wurden Borrelien mit zwei klassischen Antibiotika, die zur Behandlung von Lyme-Borreliose Verwendung finden, behandelt. Eine vergleichende Analyse mit unbehandelten Zellen erfolgte anhand der analytischen und präparativen, zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) unter Verwendung eines Computerprogramms (PD-Quest). Diejenigen Proteinspots, die sich in ihrer Ausprägung signifikant von der Kontrollgruppe unterschieden, wurden mittels Massenspektrometrie (MALDI-MS) analysiert und durch Datenbankrecherche identifiziert.

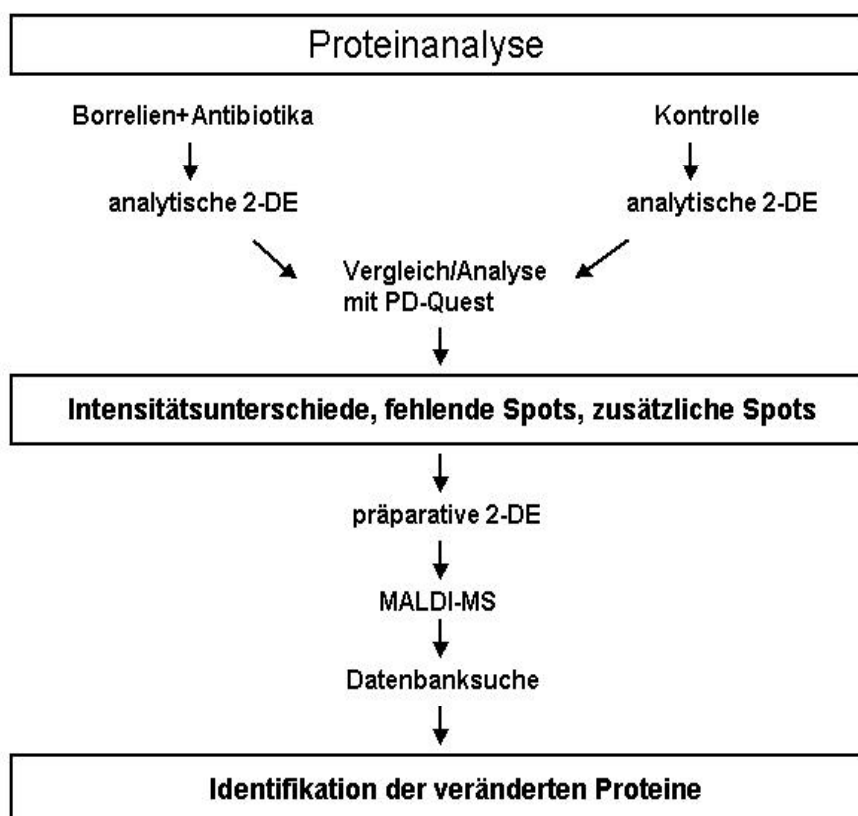


Abb. 4 Flussdiagramm des Studiendesigns

## 2.2 Kultivierung von *Borrelia burgdorferi*

### 2.2.1 Kulturmedium

Als Nährmedium zur Anzucht von Borrelienzellen diente modifiziertes BSK-Kulturmedium (Barbour-Stoenner-Kelly) [Preac-Mursic et al., 1986].

#### Zusammensetzung des Grundmediums:

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

Die Substanzen des Grundmediums wurden in 800 ml Aqua demin. gelöst und mit 100 ml 10x CMRL-Medium (Life Technologies) substituiert. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,6 mit 1 M NaOH eingestellt und die Lösung mit Aqua demin. auf 1l aufgefüllt. Nachfolgend wurde die Lösung mit einem 0,22 µm-Filter sterilfiltriert. Dieses Grundmedium ließ sich bei -20°C für 3-4 Monate lagern.

#### Kulturmedium für Borrelien:

1000 ml	Grundmedium (sterilfiltriert)
200 ml	7% Gelatine (autoklaviert bei 121 °C für 20 min)
72 ml	Kaninchenserum, hitzeinaktiviert (56 °C für 30 min)
70 ml	Rinderserumalbumin, 35%ige Lösung

Das fertige Kulturmedium konnte bei 4°C für 3-4 Wochen gelagert werden. Die für das Borrelienmedium verwendeten Festsubstanzen wurden in dem höchsten Reinheitsgrad (p.A.) von verschiedenen Herstellern bezogen.



### 2.2.2 Borrelienstamm

Für diese Studie wurde der *Borrelia burgdorferi* Stamm LW2 (Passage 33 und 37) verwendet. Es handelt sich um ein humanes Hautisolat, zeichnet sich durch gutes Wachstumsverhalten aus und läßt Vergleiche mit dem komplett sequenzierten Genom des *Borrelia burgdorferi* Stammes B31 zu [Fraser et al., 1997; Casjens et al., 2000]

## 2.3 Kultur von *Borrelia burgdorferi* in Antibiotika-supplementiertem Medium

### 2.3.1 Kulturansatz

Die Kultivierung der Borrelienzellen erfolgte in 10 ml Röhrchen ( $2,5 \times 10^7$  /ml Borrelien) nach folgendem Schema:

BSK-Medium wurde mit folgenden Antibiotika-Konzentrationen supplementiert und auf 10 ml aufgefüllt, in Klammern die entsprechenden Endkonzentrationen:

- a) 400µl Doxycyclin (1mg/l) / Penicillin (0,5mg/l)
- b) 200µl Doxycyclin (0,5mg/l) / Penicillin (0,25mg/l)
- c) 100µl Doxycyclin (0,25mg/l) / Penicillin (0,125mg/l)
- d) 50µl Doxycyclin (0,125mg/l) / Penicillin (0,0625mg/l)
- e) 25µl Doxycyclin (0,0625mg/l) / Penicillin (0,031mg/l)
- f) 12,5µl Doxycyclin (0,031mg/l) / Penicillin (0,016mg/l)
- g) Kontrolle ohne Antibiotikazusatz

Jeder Versuchsansatz wurde parallel durchgeführt und die Borrelien für 24 und 48 Stunden bei 33°C kultiviert. Die Stammlösungen enthielten 25 mg/l Doxycyclin bzw. 12,5 mg/l Penicillin.

## 2.4 Bestimmung der Zellzahl und Dunkelfeldmikroskopie

Nach Zentrifugieren der Borrelienkultur für 30 Minuten bei 4°C und 5000 Upm wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in 500 µl BSK-Medium aufgenommen. Daraus wurden nach vorsichtiger Resuspension 10 µl entnommen, im Verhältnis 1:1000 mit PBS Puffer verdünnt und 10µl der Verdünnung in eine Zählkammer pipettiert. Mittels Dunkelfeldmikroskopie (Vergrößerung : 100 x ) wurden

neun Felder ausgewertet und die Anzahl der Zellen pro Mikroliter nach folgender Formel berechnet.

$$90 \times B/9 \times 1000 = B \text{ pro } \mu\text{l}$$

90 : Multiplikationsfaktor

B : gezählte Borrelien

1000 : Verdünnungsfaktor

9 : Anzahl der ausgewerteten Felder in der Zellzählkammer

Mittels der in dieser Weise errechneten Zellkonzentrationen konnte die für die Kulturbedingungen in Mikrotiterplatten erforderliche Zellzahl von  $5 \times 10^6$  eingestellt werden.

## 2.5 MHK-Bestimmung mittels Mikrodilutionsmethode

Zur Bestimmung der MHK (minimale Hemmkonzentration), wurde das Wachstum der Borrelien in mit antibiotikabeschichteten Mikrotiterplatten (Merlin) gemessen.

Pro Kavität wurden 200  $\mu\text{l}$  BSK-Medium,  $5 \times 10^6$  Zellen und Phenolrot (25  $\mu\text{g/ml}$ ), das als Farbindikator diente, pipettiert.

Im Falle von Penicillin wurden Konzentrationen von 0,031  $\mu\text{g/ml}$  bis 4  $\mu\text{g/ml}$  und bei Doxycyclin der Konzentrationsbereich von 0,031  $\mu\text{g/ml}$  bis 64  $\mu\text{g/ml}$  getestet.

Die beimpften Mikrotiterplatten mit oder ohne Antibiotikazusätzen wurden luftdicht mit Klebefolie versiegelt und bei 33°C bebrütet.

Nach 0h, 24h, 48h, 72h und 96h wurden kolorimetrische Messungen mit Hilfe eines Immunoassayspektrometers durchgeführt, um den Indikatorfarbwechsel bei 562/630 nm zu messen. Diese Farbveränderung ist ein Resultat einer Reaktion des Indikators mit nicht flüchtigen Säuren, die im Prozeß des Spirochätenmetabolismus anfallen. Für jede Kavität wurde die Abnahme der Extinktion ( $E_{tx}$ ) nach den jeweiligen Inkubationszeiten im Vergleich zur ursprünglichen Extinktion ( $E_{t0}$ ) bestimmt. Die Messergebnisse wurden Computer-gestützt ausgewertet (Microwin 3.0, Microtek). Anhand der für jede einzelne Konzentration erstellte Wachstumskurve konnte die minimale Hemmkonzentration ermittelt werden, die als Grundlage für die Auswahl der nachfolgenden Makrodilutionsparameter in 10 ml Rörchen diente [Hunfeld et al., 2000 und 2002].

## 2.6 Probenaufarbeitung

Um die Borrelienzellen vom Kulturmedium zu separieren, wurden die 10ml Röhren bei 5000 U/min und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 10ml PBS-Puffer resuspendiert. Um sämtliche Medienbestandteile zu entfernen, wurden die Zellen in entsprechender Weise dreimal gewaschen. In einem weiteren Arbeitsschritt erfolgte die Zentrifugation der in 2ml PBS-Puffer resuspendierten Zellen bei 14000 U/min und 4°C für 10 Minuten.

## 2.7 Zellaufschluß von Borrelienzellen mittels Ultraschallbehandlung

Die Herstellung eines Zelllysates erfolgte durch Ultraschall, wobei darauf geachtet wurde, dass die auftretende Hitzeentwicklung stark vermindert wird, um Veränderungen am Proteingemisch zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde der Zellaufschluß in einem speziellen Becherresonator (Heinemann), der eine kontinuierliche Kühlung des Probenmaterials erlaubt, unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 30s sonifizieren und Probe bei 4°C 90 Sekunden abkühlen. Dieser Vorgang wurde 5fach wiederholt. Diese Methode erwies sich als geeignet, um einer Denaturierung der Proteine vorzubeugen und einen effektiven Zellaufschluß zu erzielen.

Das gewonnene Material wurde in je 100µl Lysispuffer aufgenommen, 1µl TBP und 2µl AEBSF hinzugefügt und auf Eis zwischengelagert.

Während der Zellyse werden zelleigene Proteasen freigesetzt. Deshalb müssen Maßnahmen getroffen werden, um eine proteolytische Degradation der Proteine zu verhindern, da diese die Analyse mittels 2D Gelelektrophorese verfälschen. Aus diesem Grund wurden stark chaotrope Substanzen, wie Harnstoff, Thioharnstoff, DTT, CHAPS und Ampholyte verwendet, die denaturierend wirken. Zusätzlich wurde die Ultraschallbehandlung bei 4°C durchgeführt, um die enzymatische Aktivität herabzusetzen. Um die Proben vor eventuell noch aktiven Proteasen zu schützen, wurde der Proteaseinhibitor AEBSF (Aminoethyl-benzylsufonylfluorid) hinzugegeben. Abschließend folgte eine Zentrifugation, um die Proteinfraction von nicht aufgeschlossenen Borrelienzellen und nicht gelösten Zellbestandteilen zu separieren. Der proteinhaltige Überstand wurde anschließend bei -80°C gelagert.

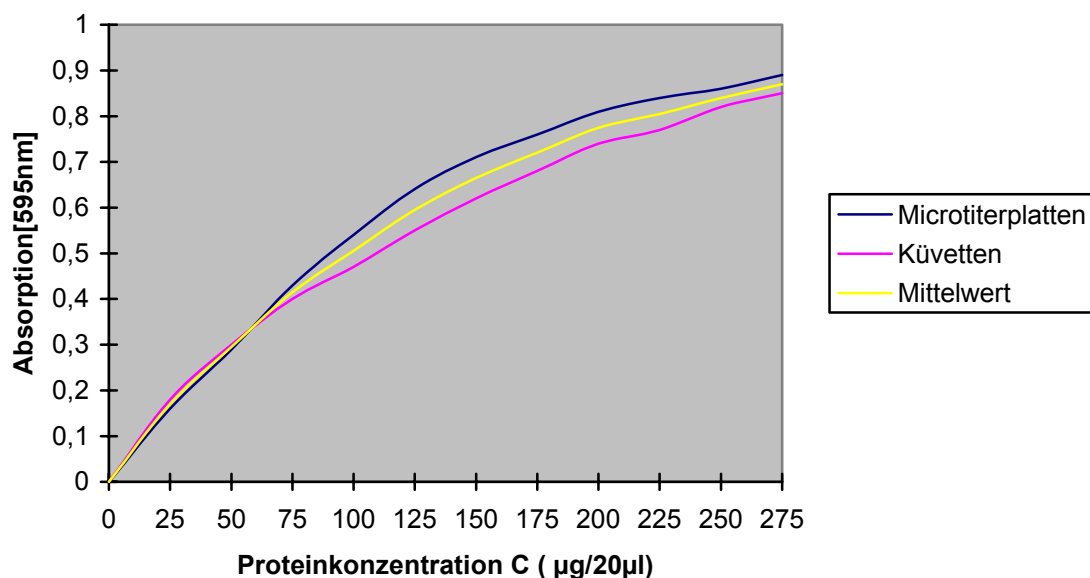
## 2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentrationen in den Einzelproben zu bestimmen, wurde ein modifizierter BIO-RAD Protein Assay verwendet. Der Vorteil dieses Assays liegt in der Unempfindlichkeit gegenüber der hohen Detergenzkonzentration des verwendeten Lysispuffers.

Zunächst wurde eine Standardkurve wie folgt erstellt:

1. Anfertigen einer Standardproteinlösung ( $\delta$ -Globulin aus Rind, 14mg/ml)  
Anfertigen einer 1:4 Verdünnung des mitgelieferten Färbereagens  
Herstellen einer 0,12 N Salzsäurelösung
2. Verdünnen der Standardproteinlösung von 0,1 mg/ml bis 14 mg/ml.  
Pro Reagenzröhrchen wurden 80  $\mu$ l 0,12 N HCL und 20  $\mu$ l der jeweiligen Proteinkonzentration gemischt und mit 3,5 ml der Färbereagenzverdünnung versetzt.
3. Nach 5 Minuten erfolgte die photometrische Messung des Farbumschlags bei 595nm. Die ermittelten Werte ergaben eine nicht-lineare Standardkurve (Abb.5)

Anhand der Eichkurve wurde im weiteren Verlauf eine Proteinmenge von 20 $\mu$ g für die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt.



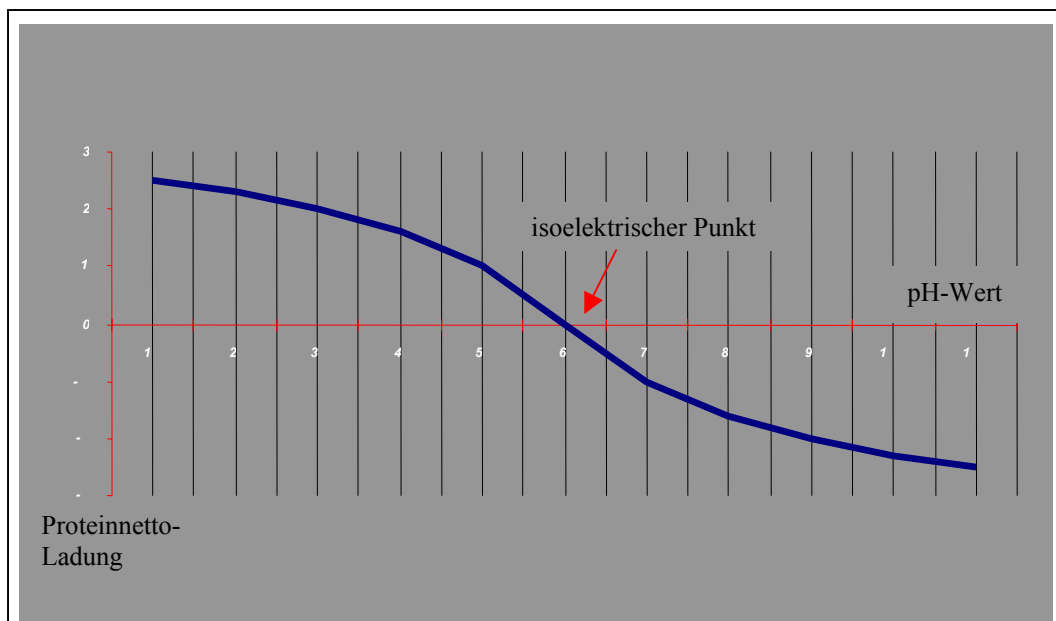
**Abb. 5** Standardkurve, modifiziertes Proteinassay von BIO-RAD

## 2.9 Zweidimensionale Gelelektrophorese

### 2.9.1 Allgemeines

Die 2D-Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung eines komplexen Proteingemisches anhand voneinander unabhängigen Kriterien, so daß eine Identifizierung einzelner Proteine, beziehungsweise ihrer Funktionszustände, möglich ist.

In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, erfolgt eine Trennung nach dem pI-Wert in einem stabilen pH-Gradienten. Definiert durch die Summe der basischen und sauren Aminosäurenreste nehmen die Proteine bei der Wanderung durch das elektrische Feld, ihrem isoelektrischen Punkt entsprechende Positionen innerhalb des pH-Gradienten ein.



**Abb. 6** 2D-Gelelektrophorese, Prinzip der Fokussierung von Proteinen an ihrem isoelektrischen Punkt

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden IPG- (immobilized pH gradient) Strips mit einem stabilen pH-Gradienten in dem Spektrum von pH 3 bis 10 verwendet, auf deren Geloberfläche, Acrylamidderivate mit puffernden Gruppen (tertiäre Aminogruppen, Carboxylgruppen) in wechselnder Konzentration polymerisiert sind.

Die isoelektrische Fokussierung setzte sich aus zwei Phasen zusammen:

- Rehydratisierung = Rehydratisieren des Gels bei gleichzeitiger Aufnahme der gelösten Proteine in die Gelmatrix
- Fokussierung = Wandern des Proteingemisches nach entsprechenden pI-Werten der einzelnen Proteinspezies und Fixation auf dem IPG-Strip

### **2.9.2 Isoelektrische Fokussierung – Erste Dimension**

Bei der isoelektrischen Fokussierung kommt es zu einer Auftrennung des Proteingemisches nach dem isoelektrischen Punkt der einzelnen Proteine.

Zu diesem Zweck müssen die Proteine unter möglichst schonenden Bedingungen solubilisiert werden. Interaktionen von Aminosäuren und Aminosäureseitenketten sind einerseits nichtkovalenter Natur, wie Wasserstoffbrücken, ionische Bindungen und hydrophobische Wechselwirkungen in der Anwesenheit von Wasser. Außerdem bestehen kovalente Disulfidbrücken, die sich zwischen schwefelwasserstoffhaltigen Seitenketten ausbilden können.

Die Bedingungen, die an einen Solubilisierungspuffer gestellt werden, sind folgende: der verwendete Puffer soll eine Inaktivierung der oben beschriebenen Wechselwirkungen bewerkstelligen, ohne die Ladung der funktionellen Gruppen der Seitenketten zu modifizieren, die zu einer Verfälschung der Proteinauftrennung führen könnte. Er sollte selbst also möglichst wenig geladene Bestandteile wie ionische Tenside oder Salze enthalten.

Zum Aufheben der nonkovalenten Bindungen im Vorfeld der IEF wurden Harnstoff, Thioharnstoff und CHAPS verwendet. Diese Substanzen fungieren als Chaotrope und halten die einzelnen Proteine in Lösung. Speziell während des Fokussierungsprozesses wirken Ampholyte, dem erwünschten pH-Bereich angepasst, unterstützend.

Außerdem wurde durch Zugabe von DTT ein Aufbrechen der Disulfidbindungen erzielt.

Nach Auftauen der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Proben, wurden 20  $\mu\text{g}$  Proteinlösung mit Rehydratisierungspuffer ad 320  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und der Ansatz bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Dem Rehydratisierungspuffer wurden direkt vor Gebrauch 2,5  $\mu\text{l/ml}$  Biolyte pH 3-10 und 2,3mg/ml DDT hinzugegeben.

Anschließend wurden die Proben in die einzelnen Vertiefungen der IEF-Kammern pipettiert, homogen verteilt und die IGP-Strips vorsichtig mit der gelbeschichteten Seite nach unten auf den Flüssigkeitsfilm gelegt und Luftblasen entfernt. Jede Kammer wurde mit 1200 $\mu\text{l}$  Mineralöl bedeckt.

Für die Fokussierung wurden folgende Laufparameter festgelegt, die bereits in Vorversuchen empirisch als geeignet ermittelt wurden.

**IEF Parameter** (gültig für 17cm IPG-Strips):

<u>Rehydratisierung</u>	50 V	14 hrs
<u>Konditionierung</u>	150 V	1 h
	300 V	1 h
	600 V	1 h
	1200 V	1 h
	2400 V	1 h
	2400-7000 V	1 h
<u>Fokussierung</u>	7000 V bis zum festgelegten Endpunkt von 30000 Vh	
	500 V	5 Minuten

Um eine starke Erwärmung bei der hohen Spannung zu vermeiden, wurde die Fokussierung kontinuierlich bei  $20^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Anschließend wurden die IPG-Gelstreifen entnommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.9.3 SDS-Page – Zweite Dimension

Vor Beginn der SDS-PAGE wurden die IPG-Gelstreifen reduziert und alkyliert. Diese Maßnahme dient der Reduktion und Alkylierung der fokussierten Gelstreifen.

Dazu wurden je 5 ml Äquilibriumspuffer mit 50 mg DTT beziehungsweise mit 240 mg Iodacetamid versetzt. Bromphenolblau, in geringen Mengen hinzugegeben, diente als Indikator der Lauffront in der SDS-Page. Die IPG-Gelstreifen wurden mit der gelbeschichteten Seite nach oben in der DTT-Lösung plaziert und 15 Minuten bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Direkt im Anschluß erfolgte eine Wiederholung der Prozedur unter Verwendung der Iodacetamid-Lösung. Danach wurden die IPG-Gelstreifen entnommen, kurz in Kathodenpuffer gespült und auf ein 10% Tris/Tricin SDS-Gel platziert [Schägger und von Jagow, 1987; Schägger, 2006]. Zur Laufkontrolle und zur Bestimmung der Molekulargewichtgrößen wurden 7 µl eines Proteinstandard (Precision Marker, BIO-RAD) auf ein Plättchen Filterpapier pipettiert und dieses auf das Gel aufgebracht. Durch vorsichtiges Übergießen mit flüssiger Agarose (0,5% w/v), wurden der IPG-Strip und das Filterpapier auf dem Gel fixiert. Die zweite Dimension wurde unter folgenden Laufparametern durchgeführt:

- 40 V für 30 Minuten, um ein gleichmäßiges Einwandern der Proteine in das Gel zu erreichen
- 85 V für 17 bis 18 Stunden, um die Proteine aufzutrennen

Anschließend wurde das Gel mit Silber gefärbt.

## 2.10 Färbemethoden

### 2.10.1 Visualisierung der Proteinspots mittels Silberfärbung

Alle analytischen Gele wurden mit Silbernitrat gefärbt. Diese Methode zeichnet sich durch hohe Sensitivität aus, so daß auch geringe Proteinmengen detektiert werden können. Außerdem lassen die mit Silber gefärbten Gele eine Computer-gestützte Weiterbearbeitung zu.

Das Gel wurde nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer 45 Minuten ohne schütteln fixiert. Die weiteren Arbeitsschritte wurden auf einem Horizontalschüttler durchgeführt. Als nächstes wurde das Gel 2x für 30 Minuten in Aqua bidest gewaschen und anschließend 2,5 Stunden in einer Inkubationslösung gebadet. Nach



erneutem Waschen in Aqua bidest für 3x 10 Minuten, wurde das Gel 40 Minuten einer Silberlösung inkubiert und kurz in Aqua bidest gespült. Unter Zugabe einer Entwicklerlösung wurden die Proteinspots visualisiert. Nach 3 Minuten erfolgte der Abbruch des Entwicklungsvorgangs durch Hinzugeben der Stopplösung. Die auf diese Weise bearbeiteten Gele wurden feucht in Klarsichtfolie eingeschweißt und bis zur Computer-gestützten Auswertung im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

### **2.10.2 Visualisierung der Proteinspots mittels kolloidaler Coomassiefärbung**

Die Färbemethode mit Coomassieblau diente der Anfertigung von präparativen 2D-Gele. Hier wurden größere Mengen Protein benötigt (ca. 200µg), wobei diese Färbemethode den Vorteil bietet, eine anschließende MALDI-MS-Analyse durchführen zu können. Die direkt aus der Elektrophoresekammer entnommenen Gele wurden für 5 Stunden unter leichtem Schütteln fixiert. Anschließend wurden die Gele für 6 Stunden unter leichtem Schütteln in die Coomassiefärbelösung gelegt. Dann wurde mit 10% Essigsäure entfärbt, bis der Gelhintergrund klar wurde. Die in dieser Weise bearbeiteten Gele wurden feucht in Klarsichtfolie eingeschweißt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

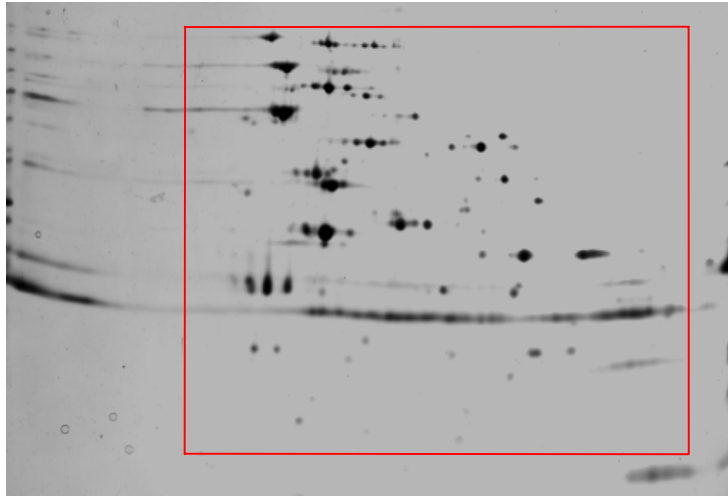
## **2.11 Computer-gestützte Analyse der 2D-Gele**

Zur Computer-gestützten Analyse der 2D-Gele wurde die PD-Quest Software der Firma BIO-RAD verwendet. Die wesentlichen Schritte bestanden aus dem Digitalisieren der Gele, der Spoterkennung, der Spotquantifizierung, des Gelvergleichs und der Datenanalyse.

### **2.11.1 Digitalisieren der Gele**

Unter Verwendung eines Densitometers (GS710, BIO-RAD) wurden die silbergefärbten Gele eingescannt, wobei Absorptionswerte gemessen und digitalisiert wurden. Ein gescanntes Gel ist in Abbildung 7 dargestellt.

Dabei vergleicht der Densitometer die Intensität des durch die Probe abgeschwächten Lichtstrahls  $I$  mit der Intensität des einfallenden Lichtstrahls  $I_0$ , wonach die Absorption oder optische Dichte (OD) gleich  $\log(I/I_0)$  ist.



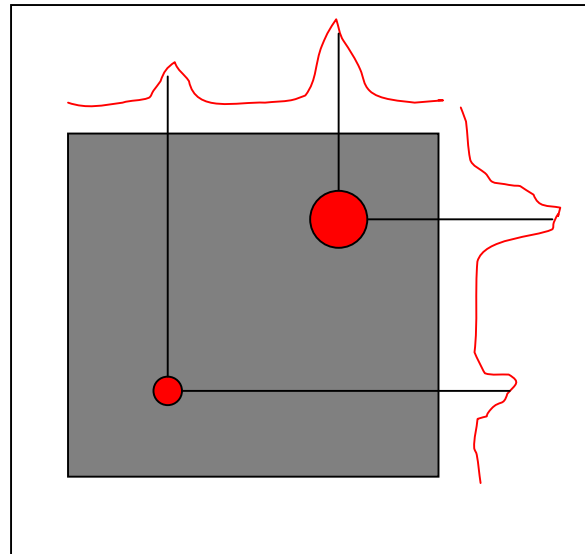
**Abb. 7** Eingescantes, unbearbeitetes 2D-Gel. Der rote Rahmen kennzeichnet den zu analysierenden Bereich.

### 2.11.2 Spoterkennung und Spotquantifizierung mittels PD-Quest

Für die Spotdetektion wurde nur der Bereich des 2D-Gels verwendet, der alle einzeln liegende Proteinspots erfasste; dass heißt, die Randbereiche des Gels, die akkumulierte Proteine enthielten, wurden nicht in die Gelanalyse miteinbezogen. Bei allen eingescanten Gelen wurden einheitliche Parameter zur Bearbeitung zugrunde gelegt. Ausschlaggebend für die Wahl geeigneter Filter war der Erhalt aller relevanten Gelinformationen nach Subtraktion von Hintergrund und durch die Färbung entstandenen Artefakte. Abbildung 8 zeigt einen Gelausschnitt, der mit dieser Methode bearbeitet wurde. PD-Quest interpretiert jeden Proteinspot als zweidimensionale Gaußverteilung, basierend auf seinen Absorptionsmaxima (Abb. 9).



**Abb. 8** Mit PD-Quest bearbeitetes 2D-Gel nach Subtraktion von Artefakten und Hintergrundfärbung



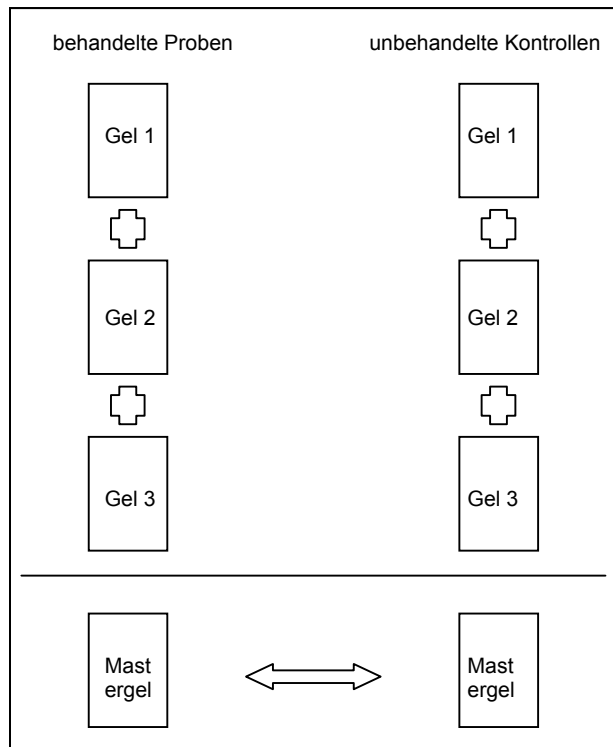
**Abb. 9** Prinzip der Spotquantifikation mit PD-Quest

### 2.11.3 Vergleichsanalyse von 2D-Gelen

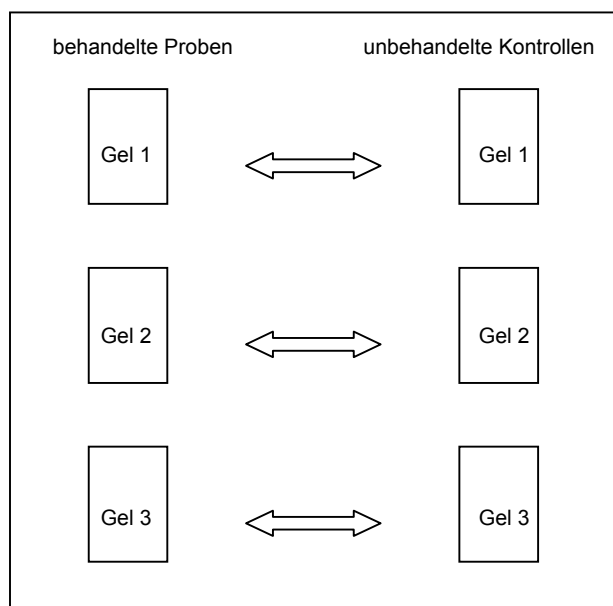
Das Kollektiv der zu analysierenden 2D-Gele bestand aus drei Proben von Penicillin-behandelten, beziehungsweise Doxycyclin-behandelten Borrelien und den parallel durchgeführten Kontrollen, die nicht mit den entsprechenden Antibiotika behandelt wurden.

Um die einzelnen digitalisierten Gele miteinander zu vergleichen, wurden anhand des Programms PD-Quest für ein Gel besonders auffällige Proteinspots markiert. Diese im Computerprogramm als „Landmarks“ bezeichneten Proteine dienten dem Programm als Grundlage dafür, die Lage der übrigen Proteinspots zu berechnen und sie in den verschiedenen Gelen zu identifizieren und eindeutig zuzuordnen. Spots, die mittels dieser Funktion nicht zugeordnet werden konnten, wurden manuell identifiziert. Während dieser Arbeitsschritte konnten noch bestehende Artefakte, wie Luftblasen und färbungsbedingte Schlieren, in den Einzelgelen entfernt werden. In einem ersten Schritt berechnete der Computer aus den Proteinspotabsorptionswerten der Einzelgele einen Absorptionsmittelwert sowohl für die Antibiotika behandelten Proben, als auch für die unbehandelten Kontrollen. Darauf folgte ein Vergleich der so gewonnenen Absorptionsmittelwerte (Abb.10). Dabei wurde die Sensitivität von PD-Quest so eingestellt, dass das Programm nur diejenigen Proteinspots anzeigte, die mindestens 50% Differenz in ihren Absorptionsmittelwerten aufwiesen. In einem zweiten Schritt zur Validierung der

Ergebnisse wurden diese Proteinspots in einem Vergleich von Antibiotika behandeltem Einzelgel mit dazugehöriger unbehandelter Kontrolle überprüft (Abb.11). Proteinspots, die eine gleichgerichtete Abweichung in den drei Einzelvergleichen aufwiesen, wurden als signifikant verändert definiert.



**Abb. 10** Erster Schritt der Gelauswertung schematisch, Erstellen eines Mastergels



**Abb. 11** Zweiter Schritt der Gelauswertung schematisch, Validierung der Ergebnisse durch Vergleich der Einzelgele

## 2.12 Proteinidentifikation mittels MALDI-TOF-MS

Um diejenigen Proteinspots zu identifizieren, deren Expression unter Antibiotikabehandlung Veränderungen aufzeigten, wurde eine MALDI-TOF-MS-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden präparative Gele angefertigt, bei denen zwischen 160 und 200µg Proteinlösung verwendet wurden.

Im Anschluß an die 2D Gelelektrophorese wurden diese Gele mit Coomassieblau gefärbt, die gewünschten Proteinspots ausgeschnitten, aufbereitet und zur massenspektrometrischen Analyse mittels MALDI-TOF-MS in Kooperation mit Prof. Karas (Pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt) eingesandt.

Die isolierten Gelstücke wurden per Skalpell zerkleinert in ein frisches Reaktionsgefäß (2ml) gegeben und kurz anzentrifugiert. Die weiteren Arbeitsschritte wurden wie folgt durchgeführt:

Zu den Gelpartikeln wurden 60 µl Aqua bidest hinzugegeben, nach 15 Minuten zentrifugiert (14000xg, 4°C) und anschließend der Überstand abpipettiert. Dann wurden erneut 60 µl Aqua bidest und zusätzlich 60 µl Acetonitril hinzugegeben, nach 15 minütiger Inkubation kurz anzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Im Anschluß daran wurden 20µl Acetonitril hinzugegeben. Nach 10-15 minütiger Inkubation wurde kurz anzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Nach Zugabe von 20µl MALDI-Lösung 3 und 5 minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 20µl Acetonitril und nach weiteren 15 Minuten wurde kurz anzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. In der Vakuumzentrifuge wurden die Gelpartikel circa 10 Minuten getrocknet. Die getrockneten Gelstücke wurden mit 20µl MALDI-Lösung 1 versetzt und für 45 Minuten bei 56°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die Gelstücke auf Raumtemperatur abgekühlt, kurz zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Wiederum erfolgte die Zugabe von 20µl Acetonitril, nach 15 minütiger Inkubation wurde kurz zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Anschließend wurden 20µl MALDI-Lösung 2 hinzupipettiert, nach 30 minütiger Inkubation kurz zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Gelpartikel wurden danach mit 200µl MALDI-Lösung 3 versetzt, nach 15 minütiger Inkubation kurz zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Unter Zugabe von 20µl Acetonitril wurde für 15 Minuten inkubiert, danach kurz zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Erneut erfolgte das Trocknen der Gelpartikel für circa 10 Minuten in der

Vakuumzentrifuge. Dann wurden 30µl MALDI-Lösung 5 hinzugegeben, nach 45 minütiger Inkubation bei 4°C kurz zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Als letzter Arbeitsschritt wurden die Gelpartikel mit 5µl MALDI-Lösung 4 versetzt und diese bei 37°C über Nacht inkubiert.

Die Proben wurden kurz zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und dieser bei –80°C bis zur massenspektrometrischen Analyse per MALDI-TOF-MS gelagert.

## 2.13 Puffer

### 2.13.1 Puffer für die 1. Dimension

- *Rehydratisierungspuffer*

8M Harnstoff 24 g

2% CHAPS 1 g

ad 50 ml Aqua bidest, einige Partikel Bromphenolblau hinzufügen und die Lösung mindestens 5 Stunden rühren, in 1ml Aliquots portionieren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern.

- *Äquilibrierungspuffer*

6M Harnstoff 72,07 g

2% SDS 4,0 g

50 mM Tris, pH 8,8 6,7 ml

30% Glycerin 60 ml

ad 200 ml Aqua bidest, mindestens 5 Stunden rühren, in 10ml Aliquots portionieren und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern.

- *Lysispuffer*

7M Harnstoff 21,02 g

2M Thioharnstoff 7,61 g

1% DTT 0,5 g

4% CHAPS 2,0 g

0,8% Biolytes pH 3-10 1,0 ml

ad 50 ml Aqua bidest lösen, in 1 ml Aliquots portionieren, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  lagern.

Kurz vor jedem Gebrauch 1 mg/ml Proteaseinhibitor AEBSF hinzufügen.

### 2.13.2 Puffer und Lösungen für die 2. Dimension

- *Gelpuffer für die SDS-Page*

3M Tris, pH 8,45	363,3 g
konz. HCL	85 ml
0,3% SDS	15 ml einer 20% Lösung
ad 1000 ml Aqua bidest.	

- *Acrylamidlösung (49,5% T, 3% C)*

Acrylamid	240 g
Bisacrylamid	7,5 g
ad 500ml Aqua bidest.	

- *Anodenpuffer*

100mM Tris, pH 8,9	12,1 g
ad 1000 ml Aqua bidest.	

- *Kathodenpuffer*

100mM Tris, pH 8,25	12,1 g
100mM Tricin	17,92 g
0,1 % SDS	5,0 ml einer 20% Lösung
ad 1000 ml Aqua bidest.	

## **2.14 Lösungen**

### 2.14.1 Lösungen für die Silberfärbung

- *Fixierlösung*

10% Essigsäure	100 ml
40% Ethanol	400 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	



- *Inkubationslösung*

0,2% Natriumthiosulfat	2 g
0,5M Natriumacetat	41,2 g
0,5% Glutaraldehyd	5,2 ml einer 25% Lösung
30% Ethanol	300 ml
ad 1000 ml mit Aqua bidest.	

- *Silberlösung*

0,1% Silbernitrat	1 g
0,06% Formaldehyd (37%)	600 µl
ad 1000 ml mit Aqua bidest.	

- *Entwicklerlösung*

25% Natriumcarbonat	25 g
0,03% Formaldehyd (37%)	300 µl
ad 1000 ml mit Aqua bidest.	

- *Stoplösung*

50mM EDTA	14,6 g
ad 1000 ml mit Aqua bidest.	

### 2.14.2 Lösungen für die Coomassie-Färbung

- *Coomassiefärbelösung*

17% Ammoniumsulfat	170 g
0,01% Coomassie G250	1 g
0,5% Essigsäure	5 ml
34% Methanol	340 ml
ad 1000 ml mit Aqua bidest.	

- *Fixationslösung für Coomassiefärbung*

45% Methanol	450 ml
1% Essigsäure	10 ml
ad 1000 ml mit Aqua bidest.	

- *Entfärber für Coomassiefärbung*

10% Essigsäure 100 ml  
ad 1000 ml Aqua bidest.

### 2.14.3 Lösungen für die MALDI-TOF-MS Analyse

- *MALDI-Lösung 1*

10mM DTT 10 µl  
0,1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 µl  
ad 1000µl Aqua bidest.

- *MALDI-Lösung 2*

55mM Iodacetamid 55 µl  
0,1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 µl  
ad 1000 µl Aqua bidest.

- *MALDI-Lösung 3*

0,1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 µl  
ad 1000µl Aqua bidest.

- *MALDI-Lösung 4*

50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 µl  
Aqua bidest 50 µl  
5mM Calciumchlorid 5 µl

- *MALDI-Lösung 5*

MALDI-Lösung 4 105 µl  
Trypsin (sequencing grade) 15 µl  
entspricht einer Endkonzentration von 12,5 ng/µl.

#### 2.14.4 Lösungen für die Tris/Tricin Page

- *Trenn-Gel (10%)*

Glycerin	9 g
Acrylamid (12,5% T, 3% C)	18 ml
Gelpuffer	30 ml
ad 90 ml mit Aqua bidest auffüllen, kurz rühren	
TEMED	45 µl
APS (10mg/100µl)	450 µl

hinzufügen und sofort in Gelkammer giessen.

#### 2.15 Enzyme/Antibiotika

- *Trypsin*

lyophilisiertes Trypsin (sequencing grade) 20 µg

HCl 200 µl

auf Eis lagern, resuspendieren, in 15µl Aliquots portionieren und bei -70°C lagern.

- *Doxycyclin*

Stammlösung 25 mg/ml in Aqua bidest wurde 1:1000 auf 25 µg/ml verdünnt, bei -20°C gelagert und in aufsteigenden Konzentrationen von 0,031 µg/ml bis 1 µg/ml verwendet.

- *Penicillin*

Stammlösung 12,5 mg/ml in Aqua bidest wurde 1:1000 auf 12,5 µg/ml verdünnt, bei -20°C gelagert und in aufsteigenden Konzentrationen von 0,0156 µg/ml bis 0,5 µg/ml verwendet.

**2.16 Chemikalien**

- Acrylamid 2K BIO-RAD, Nr. 161-0100
- AEBSF/Pefabloc SL Fluka, Nr. 76307
- Agarose Sigma-Aldrich, Nr. A-9539
- Ammoniumcarbonat Fluka, Nr. 09716
- Ammoniumsulfat Sigma-Aldrich, Nr. A-2939
- APS Sigma-Aldrich, Nr. A-1433
- Biolytes 3/10 BIO-RAD, Nr. 163-1192
- Bisacrylamid 2K BIO-RAD, Nr. 161-0200
- Bromphenolblau Sigma-Aldrich, Nr. B-5525
- CHAPS Sigma-Aldrich, Nr. C-9426
- Coomassie G250 BIO-RAD, Nr. 161-0786
- DTT Sigma-Aldrich, Nr. D-9163
- Doxycyclin Sigma-Aldrich, Nr. D-9891
- EDTA Applichem, Nr. A1104
- Essigsäure Merck, Nr. 1.00063.1011
- Ethanol J.T.Baker, Nr. 8006
- Formaldehydlösung 37% Merck, Nr. 4003.1000
- Gelatine Merck, Nr. 4070
- Glucose Merck, Nr. 1.08337.0250
- Glutaraldehydlösung 25% Applichem, Nr. A0589.0100
- Glycerin Roth, Nr. 3783.1
- Harnstoff Roth, Nr. 3941.1
- HEPES Sigma-Aldrich, Nr. H-3375
- Iodacetamid Sigma-Aldrich, Nr. I-1149
- Kaninchenserum Sigma-Aldrich, Nr. C-4505
- Methanol Riedel de Haehn, Nr. 32213
- Iodacetamid Sigma-Aldrich, Nr. I-1149
- N-Acetylglucosamin Sigma-Aldrich, Nr. A-8625
- Natriumacetat Merck, Nr. 1.06268.0250
- Natriumbicarbonat Sigma-Aldrich, Nr. S-8875
- Natriumcarbonat Merck, Nr. 1.06392.1000
- Natriumthiosulfat Sigma-Aldrich, Nr. S-6672

- Natriumcitrat Sigma-Aldrich, Nr. C-0909
- Natriumpyruvat Sigma-Aldrich, Nr. P-2256
- Neopepton Difco, Nr. 0119-01
- Penicillin G Sigma-Aldrich, Nr. P-7794
- Rinderserumalbumin (35%) Sigma-Aldrich, Nr. A-7409
- SDS Sigma-Aldrich, Nr. L-3771
- Silicone DC 200 Serva, Nr. 35132
- Silbernitrat Applichem, Nr. A0536
- TEMED Roth, Nr. 2367.3
- Thioharnstoff Fluka, Nr. 88810
- Tricin Applichem, Nr. A1085
- Tris USB, Nr. US75825
- Trypsin, sequencing grade modified Promega, Nr. V5111

Sämtliche Chemikalien wurden in dem jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen

### 2.17 Geräte

- Protean IEF System BIO-RAD
- Protean II Xi Kamm BIO-RAD
- Electrophoresis Power Supply EPS 3500 XL Pharmacia Biotech
- Varifuge 3.0 R Sepatech Heraeus
- Zentrifuge 5402 Eppendorf
- Thermomixer Eppendorf
- Brutschrank Heraeus
- Spektralphotometer Ultrospect III Amsterdam-Biosciences
- Immunoassayspektrometer PowerWave 200 Bio-Tec Instruments
- Densitometer GS 710 BIO-RAD
- Dunkelfeldmikroskop Standard 25 Zeiss

### 2.18 Sonstige Materialien

- ReadyStrip IPG-Strip pH 3-10 BIO-RAD
- ReadyStrip IPG-Strip pH 5-8 BIO-RAD

- Rehydration/Equilibration Trays 17cm BIO-RAD
- Mikrotiterplatten, antibiotikabeschichtet Merlin
- Zellzählkammer Hycor Kova®
- Protein Assay BIO-RAD

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 MHK-Bestimmung mittels Mikrodilutionstest

Zur Bestimmung der MHK des *B. burgdorferi* Stammes LW2 wurden kommerzielle Mikrotiterplatten verwendet, die mit definierten Konzentrationen von Doxycyclin und Penicillin beschichtet waren. Für den Test wurden ausschließlich vitale Borrelienzellen ( $2,5 \times 10^4/\mu\text{l}$ ) aus der logarithmischen Wachstumsphase eingesetzt und das Wachstumsverhalten in Gegenwart der Antibiotika über eine Kultivierungsdauer von 96h in jeweils 24h Abständen photometrisch ermittelt. Anhand der Wachstumskurven lässt sich erkennen, dass das Wachstum des Stammes LW2 in Gegenwart von Doxycyclin bis zu einer Konzentration von 0,25 mg/l kontinuierlich beeinträchtigt wird, eine Hemmung des Wachstums aber erst ab einer Konzentration von 0,5 bis 1 mg/l erfolgt (Abbildung 11). Die Wachstumskurven für Penicillin ergaben identische Wachstumsverläufe, so dass aus diesen Versuchen geschlossen werden kann, dass die MHK des Stammes LW2 für beide Antibiotika zwischen 0,5 und 1mg/l liegt. Diese Konzentrationen entsprechen den in der Literatur publizierten Werten [Hunfeld et al., 2000].

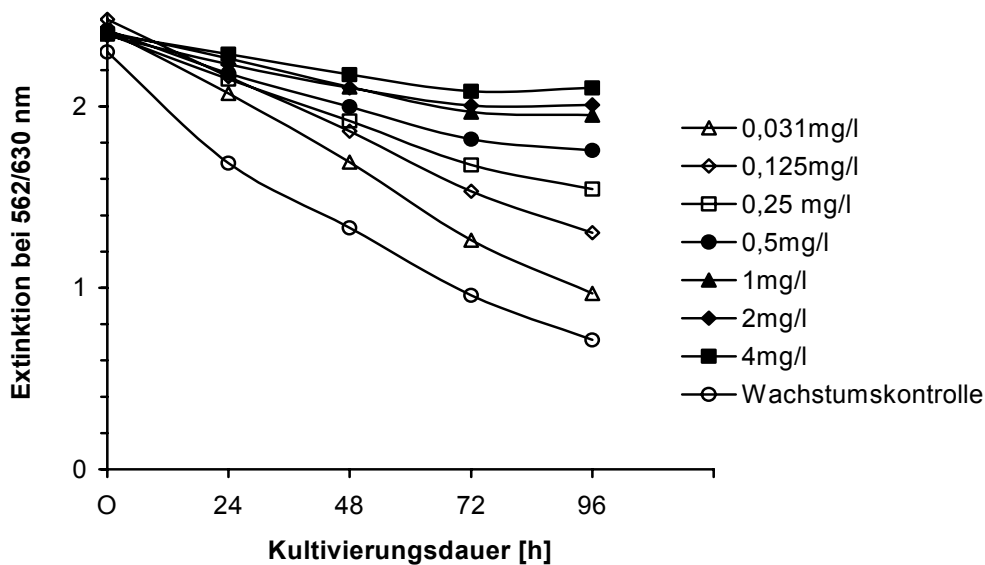


Abb. 11 Wachstumskurven unter verschiedenen Doxycyclinkonzentrationen

### **3.2 Mikroskopische Analyse der morphologischen Veränderungen von Borrelienzellen in Gegenwart von Antibiotika**

In einer ersten Versuchsreihe wurden Borrelien des Stammes LW2 ( $5 \times 10^6$  Zellen/Ansatz) in ansteigenden, subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen inkubiert und morphologische Veränderung mittels Dunkelfeldmikroskop analysiert. Sowohl für Doxycyclin als auch Penicillin in den verwendeten Konzentrationen von 0,031mg/l, 0,062 mg/l, 0,125 mg/l und 0,25 mg/l konnten keine Unterschiede in der Morphologie und der Zellzahl im Vergleich zu den unbehandelten Ansätzen nach 24 h bzw 48 h festgestellt werden.

Aus diesem Grund wurden die Borrelienzellen in einem zweiten Ansatz mit 0,5 und 1 mg/l Doxycyclin bzw. Penicillin behandelt. Die mikroskopische Analyse ergab, dass eine deutliche Reduzierung der Zellzahl festgestellt werden konnte, die Zellen in ihrer Motilität eingeschränkt waren und zum Großteil agglutinierten. Der Grad der beobachteten Veränderungen war einerseits abhängig von der Inkubationszeit, andererseits von der Konzentration des eingesetzten Antibiotikums. So konnte die stärkste Wirkung bei 1mg/l Doxycyclin bzw. 0,5 mg/l Penicillin beobachtet werden. Darüberhinaus ließen sich antibiotikaspezifische Veränderungen in der Morphologie der Zellen feststellen. In der Gegenwart von Doxycyclin zeigten die Borrelien eine langgestreckte Morphologie bis zur Auflösung der charakteristischen Spirochätenstruktur, sowie deutliche Einschränkungen in ihrer Motilität. Die mit Penicillin behandelten Zellen wiesen ungerichtete Kontraktionen auf und zeigen sich in ihrer Morphologie mehrfach geknickt. Dass es zu morphologischen Veränderungen kommt wurde in früheren Arbeiten von Kersten et al. [1995] auch elektronenmikroskopisch gezeigt.

### **3.3 Analyse der Antibiotika-induzierten Modulation der Proteinexpression von *B. burgdorferi* mittels 2D-Gelelektrophorese**

Um nachzuweisen, inwieweit Antibiotika das komplexe Netzwerk der Proteinexpression beeinflussen und welche Mechanismen einer möglichen Gegenregulation seitens der Borrelien getroffen werden, wurde eine Proteomanalyse mit Antibiotika-behandelten Zellen durchgeführt. Hierbei stellen Doxycyclin und Penicillin neben dem Cephalosporin der 3. Generation Ceftriaxon, die am häufigsten

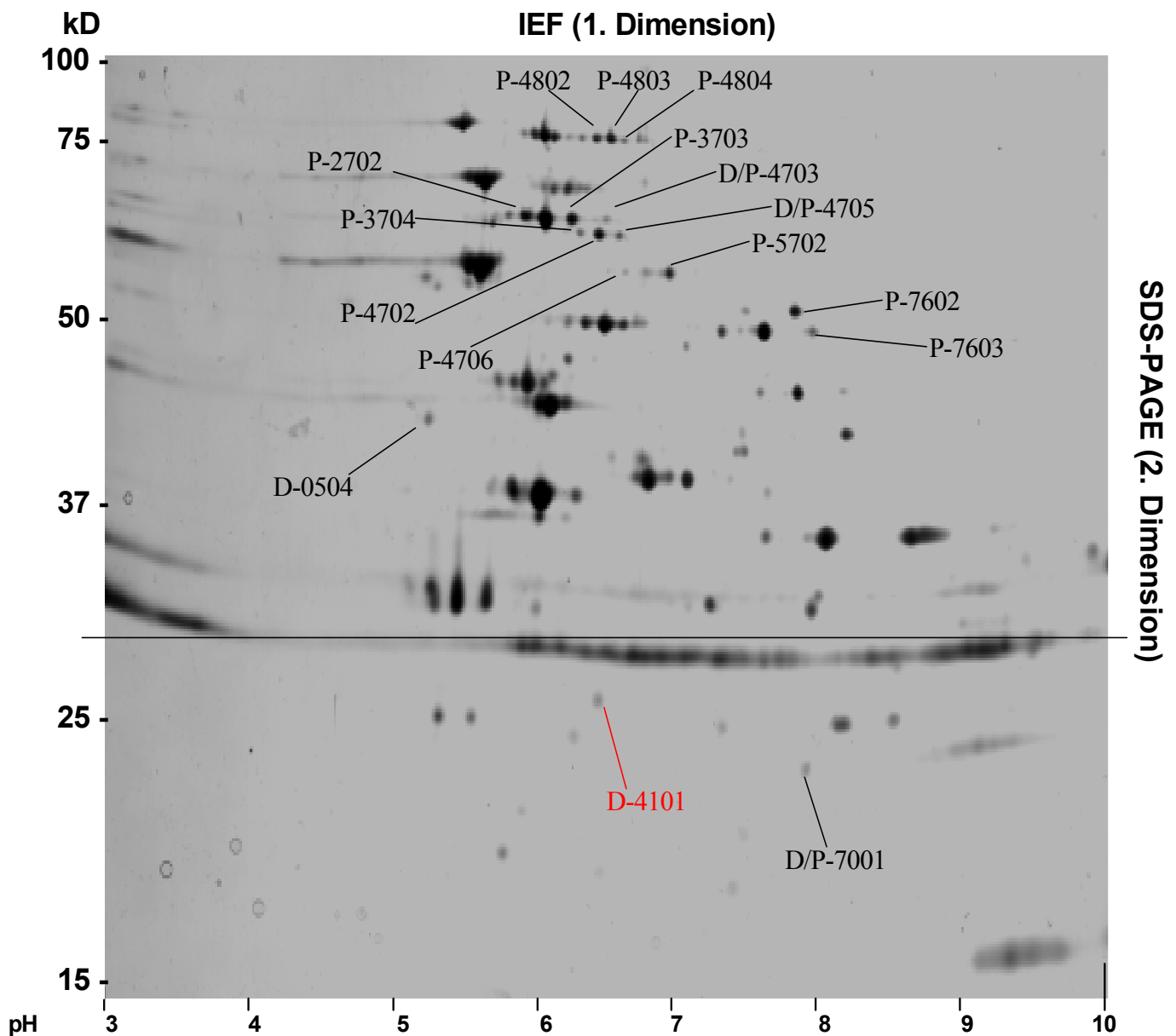


eingesetzten Antibiotika für die Therapie der Lyme-Borreliose dar, insbesondere bei einem frühen Stadium der Erkrankung.

In einer umfangreichen Analyse wurden zunächst Zellen ( $5 \times 10^7$ /ml) in Parallelansätzen mit subinhibitorischen Konzentrationen von Doxycyclin und Penicillin für 24 und 48h behandelt, mit dem Ziel, bereits geringfügige Veränderungen im Proteinexpressionsmuster detektieren zu können. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgende Proteomanalyse ein aufzulösender Bereich von pH3-10 für die isoelektrische Fokussierung gewählt, der bei entsprechender Gelgröße in der zweiten Dimension einen besseren Überblick auf mögliche Veränderungen zahlreicher Proteinspezies erlaubt und nur im extrem sauren als auch basischen Bereich Proteine von der Analyse ausschließt.

Die Auswertung der digitalisierten 2D-Gele mit dem Computerprogramm PD-Quest ergab, dass unter subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen bei keiner Probe signifikante Unterschiede in der Proteinexpression zwischen behandelten und unbehandelten Proben nachgewiesen werden konnten. Geringfügige Veränderungen einzelner Proteinspots waren zwar detektierbar, ließen sich jedoch nicht eindeutig in wiederholten Versuchen verifizieren. Aus diesem Grund wurden die Zellen 24 bzw. 48h in Gegenwart von Antibiotikakonzentrationen von 0,5 und 1 mg/l (MHK) kultiviert und anschließend für eine Proteomanalyse eingesetzt. Unter diesen Bedingungen konnten bei insgesamt 16 Proteinspots signifikante Unterschiede für die mit Doxycyclin- bzw. Penicillin-behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Proben nachweisen. Dies galt sowohl für eine Inkubationszeit von 24h und 48h. Diese Unterschiede ließen sich in mehrfach wiederholten 2D-Gele mit der gleiche Probe nachweisen. In Abbildung 12 ist ein digitalisiertes 2D-Gel von einer unbehandelten Probe dargestellt, in das die veränderten Proteinspots markiert wurden.

In der Versuchsreihe der mit Penicillin-behandelten Zellen konnten insgesamt 14 Proteinspots detektiert werden, die eine geringere Intensität gegenüber den unbehandelten Kontrollen aufwiesen, d. h., dass diese Proteine in Gegenwart von Penicillin herunterreguliert wurden. Zu den identifizierten Proteinen gehörten die Spots P-2702, P-3703, P-3704, P-4702, P-4706, P-4802, P-4803, P-4804, P-5702, P-7602, P-7603, D/P-4703, D/P-4705, und D/P-7001 (s. Anhang).



**Abb. 12** Identifizierung der durch Antibiotika veränderten Proteinspots.

(P-Veränderung unter Penicillinbehandlung, D-Veränderung unter Doxycyclinbehandlung)

In der Versuchsreihe der mit Doxycyclin behandelten Zellen konnten insgesamt 4 Proteinspots identifiziert werden, die durch eine geringere Intensität im 2D-Gel gegenüber den unbehandelten Kontrollen gekennzeichnet waren. Zu diesen Proteinen gehörten die Spots D-0504, D/P-4703, D/P-4705, und D/P-7001. Wie bei

den mit Penicillin-behandelten Proben zeigte sich bei diesen Proteinen eine verminderte Synthese („Down-Regulation“).

Interessanterweise konnte nur ein einzelnes Protein (D-4101) identifiziert werden, dessen Synthese gegenüber den Kontrollen anstieg (mit rot gekennzeichnete Proteinspot in Abbildung 12).

Einige Proteine zeigten in Gegenwart von beiden Antibiotika, Penicillin und Doxycyclin, eine reduzierte Syntheseleistung. Dazu zählten die drei Proteinspots D/P-4703, D/P-4705, und D/P-7001 (mit blau gekennzeichnete Spots in Abbildung 12). Die erhobenen Daten aus der Proteomanalyse weisen darauf hin, dass mit Ausnahme eines einzelnen Spots alle identifizierten Proteine einer verminderten Synthese unterliegen, die durch verschiedene Antibiotika induziert werden kann. Zudem konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Veränderungen in der Proteinsignatur individuell vom eingesetzten Antibiotika abhängen, was eine Eigenständigkeit in der Wirkung bzw. dem Wirkungsmechanismus einzelner Antibiotika reflektiert.

### **3.4 Massenspektrometrische Analyse der durch Doxycyclin und Penicillin veränderten Proteinsignaturen**

Die massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF wurde in Kooperation mit der AG von Prof. Dr. Karas (Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt) durchgeführt, um die ausgewählten Proteinspots zu identifizieren. Hierbei erlaubte das bereits komplett sequenzierte Genom des *B. burgdorferi* Stammes B31 (Fraser et al., 1997, Casjens et al., 2000) eine gezielte Datenbankrecherche mit den gewonnenen massenspektrometrischen Daten der veränderten Proteine des untersuchten *B. burgdorferi* Stammes LW2. Trotzdem ließen sich von insgesamt 16, aus einem präparativen 2D-Gel ausgeschnittenen Proteinspots, 5 Proteine nicht per MALDI-TOF-MS oder auch per ESI-MS/MS (electro spray ionization mass spectrometry) Methode identifizieren (Tabelle 4). Die Proteine, die in ihrer Synthese verändert wurden, gehören zu verschiedenen Kompartimenten der Bakterienzelle, wie z.B. das membranständige Protein p66 (BB603) als auch zytoplasmatische Proteine, wie z.B. die Pyrophosphat-Fruktose-6-Phosphat-1-Phosphotransferase (BB727), die Polyribonucleotid Nukleotidyltransferase (BB805), die Pyruvatkinase (BB241), die Glycerinkinase, die Triosephosphatisomerase (BB055), das ribosomale Protein S1 (BB127) oder das an der Zellteilung beteiligte Protein FtsZ (BB229). Das

heißt, dass die Borrelienzelle auf verschiedenen Ebenen ihrer Proteinbiosynthese auf das entsprechende Antibiotika reagiert bzw. angegriffen wird. Zwei Proteinspots, P-2702 und P-3703 wurden als p66 identifiziert und kennzeichnen zwei bekannte Funktionszustände dieses Proteins [Bunikis et al., 1998]. Dass beide Formen nachweislich eine verminderte Synthese zeigen, beweist eindrücklich die Effizienz der Auftrennung eines komplexen Proteingemisches mittels 2D-Gelelektrophorese. Des Weiteren wurden zwei weitere Spots als Pyrophosphat-Fruktose-6-Phosphat-1-Phosphotransferase (P-4706 und P-5702) identifiziert.

Von den fünf Proteinen, deren Synthese durch den hervorgerufenen Antibiotikastress von Doxycyclin und Penicillin verändert wurden, konnten drei (D/P-4703, D/P-4705, und D/P-7001) eindeutig mittels MALDI-TOF-MS zugeordnet werden. Alle diese Proteine zeigten eine verminderte Expression in wiederholten 2D-Gelanalysen.

Isoformen von Proteinen sind durch ihre charakteristische, perlenschnurartige Anordnung im 2D-Gel erkennbar. Die, möglicherweise aufgrund des zu geringen Proteingehalts in der Probe, nicht-identifizierbaren Proteinspots P-4802 und P-4804 lassen vermuten, dass es sich bei diesen beiden Proteinen um Isoformen des Proteinspots P-4803 (Polyribonucleotid-Nukleotidyltransferase) handelt.

Es fällt weiterhin auf, dass die meisten der durch die beiden Antibiotika veränderten Proteine im pH-Bereich von 6 bis 7,5 liegen und wenige im sauren pH-Bereich (P-2707, D-5204) bzw. im basischen Bereich (P-7602, P-7603, D/P-7001) nachzuweisen sind.

Es ist bekannt, dass die berechneten und die apparenten Molekülmassen von Proteinen differieren, da häufig denaturierte Proteine in der SDS-PAGE andere Laufeigenschaften besitzen. Erstaunlicherweise zeigten sich im Vergleich der geschätzten und berechneten Molekülmassen nur geringfügige Abweichungen von bis zu 3 kDa und bei P-4803 von 5 kDa (Tabelle 4).

<b>Spot-nummer</b>	<b>pI</b> geschätzt anhand Gel	<b>Molekülmasse</b> [kD] geschätzt anhand Gel	<b>Molekülmasse</b> [kD] berechnet aus Datenbank	<b>Identifiziertes Protein</b> mittels MALDI-TOF MS
P-2702	5,9	65	68,13	Membranprotein p66 (BB603)
P-3703	6,2	65	68,13	Membranprotein p66 (BB603)
P-3704	6,3	63	nicht möglich	keine Zuordnung möglich
P-4702	6,4	63	63,5	Ribosomales Protein S1 (RpsA) (BB127)
P-4706	6,7	63	62,78	Pyrophosphat-Fruktose- 6-Phosphat-1- Phosphotransferase (beta subunit) (BB727)
P-4802	6,4	75	nicht möglich	Keine Zuordnung möglich
P-4803	6,5	75	80,3	Polyribonucleotid Nukleotidyltransferase (PnpA) (BB805)
P-4804	6,6	75	nicht möglich	Keine Zuordnung möglich
P-5702	7,0	57	50,06	Pyrophosphat-Fruktose- 6-Phosphat 1- Phosphotransferase (Pfk) (BB727)
P-7602	7,8	50	55,86	Glycerinkinase (GlpK)
P-7603	7,9	49	53,23	Pyruvatkinase (Pyk) (BB241)
D/P-4703	6,5	65	nicht möglich	keine Zuordnung möglich
D/P-4705	6,6	63	nicht möglich	keine Zuordnung möglich
D/P-7001	7,9	23	26,57	PFS Protein (PFS-1) (BB375)
D-0504	5,2	42	42,37	Zellteilungsprotein FtsZ (BB229)
D-4101	6,4	26	27,98	Triosephosphatisomerase (BB055)

**Tab. 4** Zusammenfassung der durch 2D-Gelelektrophorese identifizierten Proteinspots

## 4 Diskussion

### 4.1 Generelle Aspekte von Proteomanalysen

Die Durchführung von Proteomstudien mittels 2D-Gelelektrophorese stellt inzwischen ein in der Mikrobiologie etabliertes Verfahren dar. Speziell die Vergleiche von Proteinmustern des „Normalzustands“ einer Zellpopulation mit Proteinmustern, die unter veränderten äußeren Einflüssen beobachtet werden, ist von großem wissenschaftlichen Interesse. Dabei sollte man sich die physiologische Dynamik des Proteoms vor Augen halten. Ein großer Teil der Gene wird nur exprimiert, wenn entsprechende Umweltfaktoren auf eine Zelle einwirken. Wobei im natürlichen Ökosystem der Bakterien Stress und Hunger eher die Regel sind und keinesfalls die Ausnahme [Hecker et al., 2003]. Borrelien müssen über eine koordinierte Steuerung ihrer Proteinexpression verfügen, sonst wäre eine Anpassung an verschiedene Wirtsbedingungen schwer zu erklären. Aus dem Verständnis dieses vernetzten Regulons hofft man Erkenntnisse zu erlangen, welche die Pathogenität oder natürliche Resistenz erklären.

Ein einzelner Umweltfaktor wird als Stimulus bezeichnet und sein Einwirken auf eine Bakterienpopulation erzeugt jeweils ein typisches Muster in der Proteinexpression, das als Stimulon bezeichnet wird [VanBogelen et al., 1999]. Was *Borrelia burgdorferi* betrifft, gibt es zahlreiche Daten, die morphologische Veränderungen auf exogene Stimuli, wie Änderung des pH-Werts, Mangel an Metaboliten, Anwesenheit antibakterieller Substanzen und Altern der Zellen beschreiben [Barbour and Hayes, 1986; Preac-Mursic et al., 1989,1996; Kersten et al., 1995; Brorson et al., 1997, 1998; Alban et al., 2000]. Über die zugrunde liegenden Mechanismen auf Ebene des Proteoms von Borrelien ist allerdings noch wenig bekannt. Für andere Mikroorganismen, wie *Escherichia coli* [VanBogelen et al., 1996] und *Bacillus subtilis* [Bandow et al., 2003], sind inzwischen definierte Proteinexpressionsmuster beschrieben, die auf Einwirken spezieller Stimuli basieren. Speziell für *B. subtilis* liegen detaillierte Proteinexpressionsprofile von über 30 antibakteriellen Substanzen vor [Bandow et al., 2003].

Vor diesem Hintergrund wurde diese Studie, deren Ziel es war, die zelluläre Reaktion von Borrelien auf antibiotische Substanzen zu analysieren, initiiert. Die spezielle Herausforderung für die Proteomanalyse von Borrelien stellen die langen Generationszeiten von bis zu 24h dar. Das macht geringe Einflüsse äußerer Faktoren in einer Zellpopulation schwer detektierbar.

Die verwendeten Antibiotika Penicillin (Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika) und Doxycyclin (Gruppe der Tetracycline) zeichnen sich einerseits als Mittel der Wahl für die Therapie einer diagnostizierten Lyme-Borreliose und andererseits durch ihre unterschiedlichen Wirkmechanismen aus.

#### **4.2 Problematik von Proteomstudien**

Die Durchführung von Proteomstudien erfordert einen hohen Arbeitsaufwand. Exaktes Einhalten von Studienprotokollen ist essentiell, da die Verarbeitung des Probenmaterials und das Anfertigen von 2D-Gelele viele Fehlerquellen bergen. Im Rahmen dieser Studie konnte nach zahlreichen Vorversuchen ein auf das Studiendesign zugeschnittenes Protokoll (siehe Material und Methoden, 2.7, 2.9) festgelegt werden.

Eine Voraussetzung der Proteomanalyse ist, dass es bei der Probenaufarbeitung zu keiner Veränderung der Proteine kommt. Dies wurde durch die Auswahl geeigneter Aufschlussmethoden gewährleistet. Diese Auswahl ist abhängig davon, was es zu untersuchen gilt, zum Beispiel einzelne Zellkompartimente oder gesamte Zellen.

Als geeignete Methode zur Zellyse wurde die Sonifikation gewählt. Das Sonifizieren der Zellsuspension im Becherresonator gewährleistet ein schonendes Aufbrechen der Zellmembranen. Eine kontinuierliche Kühlung minimiert dabei die Denaturierung der Proteine durch Erwärmung, sowie die enzymatische Aktivität freigesetzter Enzyme. Proteasen, Phosphatasen und Glucosidasen müssen schnell und irreversibel inaktiviert werden, so dass es während des Aufschlusses zu keiner Veränderung von Proteinen kommt. Zu diesem Zweck wurde dem Zellysat der Proteaseinhibitor AEBSF zugefügt. Andererseits wurden Nukleasen verwendet, um einen störenden Einfluss, während der isoelektrischen Fokussierung der Proben, durch DNA und RNA zu vermeiden. Durch Ultrazentrifugation konnten Lipide und größere Partikel (z. B. nicht aufgeschlossene Zellen) entfernt werden.

Die erstellten 2D-Gele, die zur Auswertung herangezogen wurden, waren durchweg von hoher Qualität. Die Hintergrundfärbung wurde durch folgende Vorgehensweise minimiert: Erstens durch Optimierung und exaktes Vorgehen nach dem Studienprotokoll bei der Probenaufarbeitung. Zweitens durch digitale Nachbearbeitung der Gele mittels Filteroptionen, die das Computerprogramm PD-Quest bereithält.

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem pH-Wert wurden IPG-Strips (immobilisierter-pH-Gradient) verwendet. Diese industriell hergestellten Gelstreifen garantieren einen kontinuierlichen pH-Gradienten mit gleichmäßiger und konstanter Leitfähigkeit sowie Pufferkapazität als Vorbedingungen zur Erzielung hochauflösender und reproduzierbarer Trennergebnisse. Eine überwiegende Zahl der aufgetrennten Proteine lagen in einem neutralen pH-Bereich. Mit IPG-Strips, die eine Auftrennung im pH-Bereich von 5-8 ermöglichen, konnten diese erfaßt werden. Um auch die wenigen Proteine außerhalb dieses Kernspektrums zu visualisieren, zeigten sich IPG-Strips für den pH-Bereich von 3-10 überlegen, welche auch bei sämtlichen analysierten 2D-Gelen Verwendung fanden.

Als besonders problematisch erwies sich die Färbung mit Silbernitrat. Trotz des Versuchs, identische Färbebedingungen zu gewährleisten, kam es zu methodisch bedingten Differenzen in der Anfärbbarkeit der an verschiedenen Tagen durchgeführten 2D-Gele. Für eine densitometrische Messung mit dem Anspruch der Vergleichbarkeit ist die Intensität des entsprechenden Proteinspots Grundlage für die Erfassung von Unterschieden. Um diese mögliche Fehlerquelle zu minimieren, wurden für die Auswertung nur 2D-Gele verwendet, die am gleichen Tag parallel entwickelt wurden.

### **4.3 Veränderungen des Proteinexpressionsprofils unter subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen**

Während der Auswertung der digitalisierten 2D-Gele mit der PD-Quest Software musste festgestellt werden, dass sich Gele, die an unterschiedlichen Tagen gefärbt wurden, nicht miteinander vergleichen ließen. Durch die Methode der Silberfärbung bedingt, kam es zu Intensitätsunterschieden der Proteine. Eine exakte Reproduzierbarkeit der Färbebedingungen war nicht möglich. Es kam zu nicht beeinflussbaren Färbungsunterschieden zwischen Gelen, die aus verschiedenen Probenaufarbeitungsansätzen stammten oder an verschiedenen Tagen gefärbt wurden. Die eigentliche Datenanalyse erfolgte daher aus einem Vergleich einzelner Gele, die unter identischen Bedingungen im selben Ansatz am gleichen Tag gefärbt wurden.

Sowohl für die Doxycyclin- als auch für die Penicillin-behandelten Proben wurden jeweils drei Gele direkt mit den dazugehörigen unbehandelten Kontrollen des selben Tages verglichen (Material und Methoden, 2.11). Auf diese Weise wurde



gewährleistet, dass trotz geringer Anzahl von auswertbaren 2D-Gelen eine Aussage über Differenzen in den Proteinexpressionsprofilen zwischen behandelten und unbehandelten Proben statthaft war. Als ausreichende Anzahl (n) von Proben wird zur Analyse von Proteinkomplexen n=3, zur Analyse des Proteoms von Zellkulturen n=5 angegeben [Marcus und Meyer, 2003].

Es kann angenommen werden, dass sich subinhibitorische Konzentrationen auf die Proteinexpression auswirken; in der Computer-gestützten Auswertung zeigte sich jedoch, dass geringfügige Veränderungen nicht erfasst werden konnten. Mit Hilfe sensitiver Färbemethoden oder einer signifikant größeren Anzahl von Vergleichsproben könnten möglicherweise geringfügige Unterschiede nachgewiesen werden. Zwischen den, nach unterschiedlichen Inkubationszeiten analysierten Proben, konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Expressionsmuster der behandelten und unbehandelten Proben festgestellt werden. Die beobachteten morphologischen Unterschiede mittels Dunkelfeldmikroskopie nach 24h bzw. 48h unter subinhibitorischen Konzentrationen legen nahe, dass es Veränderungen der Proteinexpression geben muss. Es kann vermutet werden, dass diese sich bei einer Analyse von einer höheren Anzahl von Proben herausarbeiten lassen. Unterschiedlich stark ausgeprägte morphologische Veränderungen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurden schon früher beschrieben. In dieser Arbeit gelang es jedoch nicht, proteomische Unterschiede herauszuarbeiten. Die verwendete eindimensionale Gelelektrophorese erlaubte keine Proteinauftrennung nach dem pH-Wert und damit Darstellung von gering veränderten Einzelproteinen [Kersten et al., 1995]. Bezüglich dieser Fragestellung scheint die 2D-Gelelektrophorese die geeignetere Methode. Zusammenfassend festzuhalten ist, dass unabhängig von Inkubationszeit von 24h bzw. 48h, aber abhängig von Antibiotikakonzentration (MHK +/- einer Logstufe) insgesamt 16 Proteinspots identifiziert werden konnten, die gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikante Unterschiede aufwiesen, d. h. in ihrer Intensität >50% voneinander abwichen. Im Bereich von Konzentrationen von 0,016µg/ml bis 0,125µg/ml bei Penicillin und Konzentrationen von 0,031µg/ml bis 0,25µg/ml bei Doxycyclin ließen sich weder in der Dunkelfeldmikroskopie, noch in der 2D-Gelelektrophorese, Unterschiede zu den unbehandelten Zellen nachweisen. Diese Konzentrationen liegen im subinhibitorischen Bereich, unterhalb der MHK von 0,5µg/ml für beide Antibiotika.

#### 4.4 Übersicht über Resistenzmechanismen von *Borrelia burgdorferi*

In der Literatur sind zahlreiche Mechanismen beschrieben, durch die *B. burgdorferi* möglicherweise vor dem Wirtsimmunsystem oder vor einer Antibiotikawirkung geschützt ist [Hunfeld et al., 2006]. Im Folgenden sind diese aufgeführt:

- **Natürliche Resistenz gegenüber der bakteriolytischen Fähigkeit von Komplement**

Um nicht durch die angeborene Immunabwehr, insbesondere durch die Aktivierung des alternativen, antikörperunabhängigen Weges des Komplementsystems angegriffen zu werden, ist *B. burgdorferi* in der Lage, mit Hilfe membranständiger Proteine Komplement-regulierende Moleküle an ihre Oberfläche zu binden, wie z.B. Faktor H und FHL-1. So kann der Komplementfaktor C3b inaktiviert und einer Elimination durch das Komplementsystem vorgebeugt werden [Kraiczy et al., 2001a,b,c; Kraiczy & Würzner, 2006; Embers et al., 2003].

- **Fähigkeit der Borrelien zum Antigenwandel**

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Borrelien in der Lage sind, ihre Oberflächenproteine zu verändern. Auf Ebene der Proteinbiosyntheseregulation können Genloci „an-und-abgeschaltet“ werden. Durch diesen Antigenwandel wird eine erfolgreiche Immunabwehr erschwert [Zhang et al., 1999; Liang et al., 2002].

- **Induktion von antiinflammatorischen Zytokinen**

Eine entzündliche Frühreaktion kann durch Induktion des Zytokins IL-10 vermindert werden. Daraus resultiert eine geringerer chemotaktischer Reiz für Zellen der Immunabwehr, in von *B. burgdorferi* infiziertes Gewebe einzuwandern [Diterich et al., 2003; Brown et al., 1999].

- **Lösliche Immunkomplexe**

Es konnte gezeigt werden, dass *B. burgdorferi* in der Lage ist, lösliche Antigene freizusetzen, die Antigen/Antikörper Komplexe bilden, d. h. Antikörper abfangen bevor sie an entsprechenden Antigenen der Zellmembran binden können [Schutzer et al., 1999; Brunner et al., 2000].

- **Rückzug in Nischen mit schlechter Immunabwehr**

Im Verlauf der Infektion gelangen Borrelien in verschiedene Organe des Wirts.

Darunter auch solche Kompartimente, die für die körpereigene Abwehr schwer zu erreichen sind, wie z.B. Gelenke, Auge oder Liquor [Embers et al., 2003].

- **Intrazelluläres Überleben**

Es wurde zumindest die in vitro Fähigkeit von Borrelien beobachtet, in verschiedene Zellen, wie z.B. Endothelzellen, Makrophagen, Kupferzellen, Fibroblasten und Synovialzellen, einzudringen und zu überdauern [Ma et al., 1991; Klempner et al., 1993; Montgomery et al., 1993; Sambri et al., 1996; Girschick et al., 1996].

- **Zystische Dauerformen**

Die Fähigkeit von Borrelien, bei widrigen äußeren Bedingungen bradytrophe, zystische Dauerformen zu bilden, wurde ebenfalls beschrieben. Diese können sich unter idealen Kulturbedingungen wieder in vitale Borrelien umwandeln. [Brorson et al 1998; Preac-Mursic et al., 1996; Gruntar et al., 2001]

- **Resistenzen gegenüber Antibiotika**

Bezogen auf die Gesamtheit der antibiotischen Behandlungen der Borreliose kommt es zu keinem häufigen Auftreten von Therapiversagern. Jedoch sind für fast alle zur Verfügung stehenden Antibiotika Fälle beschrieben, in denen die Therapie nicht erfolgreich war [Preac-Mursic et al., 1989 ; Hunfeld et al., 2005 ; Hunfeld et al., 2006 ; Straubinger et al., 1997]. Die hier zugrunde liegenden Resistenzmechanismen sind nicht bekannt. Allerdings sind für Erythromycin [Terekhova et al., 2002] sowie für die Fluorchinolone Sparfloxacin und Moxifloxacin [Galbraith et al., 2005] und die Aminoglykoside Kanamycin, Gentamycin und Spectinomycin [Criswell et al., 2006] erworbene Resistenzen beschrieben, die nach Kultur in Anwesenheit von subinhibitorischen Konzentrationen dieser Antibiotika auftraten.

Es ist davon auszugehen, dass allen Evasionsmechanismen Veränderungen im Proteom einer Zelle zugrunde liegen. Für Borrelien sind solche Veränderungen des Proteinmusters als Reaktion auf äußere Stimuli beschrieben. Veränderte Kulturbedingungen wie Temperatur, pH-Wert oder CO<sub>2</sub> Konzentration lassen sich mitunter in typischen Proteomsignaturen nachvollziehen. [ Jungblut et al., 1999 ; Brooks et al., 2003 ; Hyde et al., 2007 ; Carrol et al., 2000 ; Ojaimi et al., 2003 ; Schwan 2003 ; Yang et al., 2000].

## 4.5 Analyse der Antibiotika-induzierten Alteration

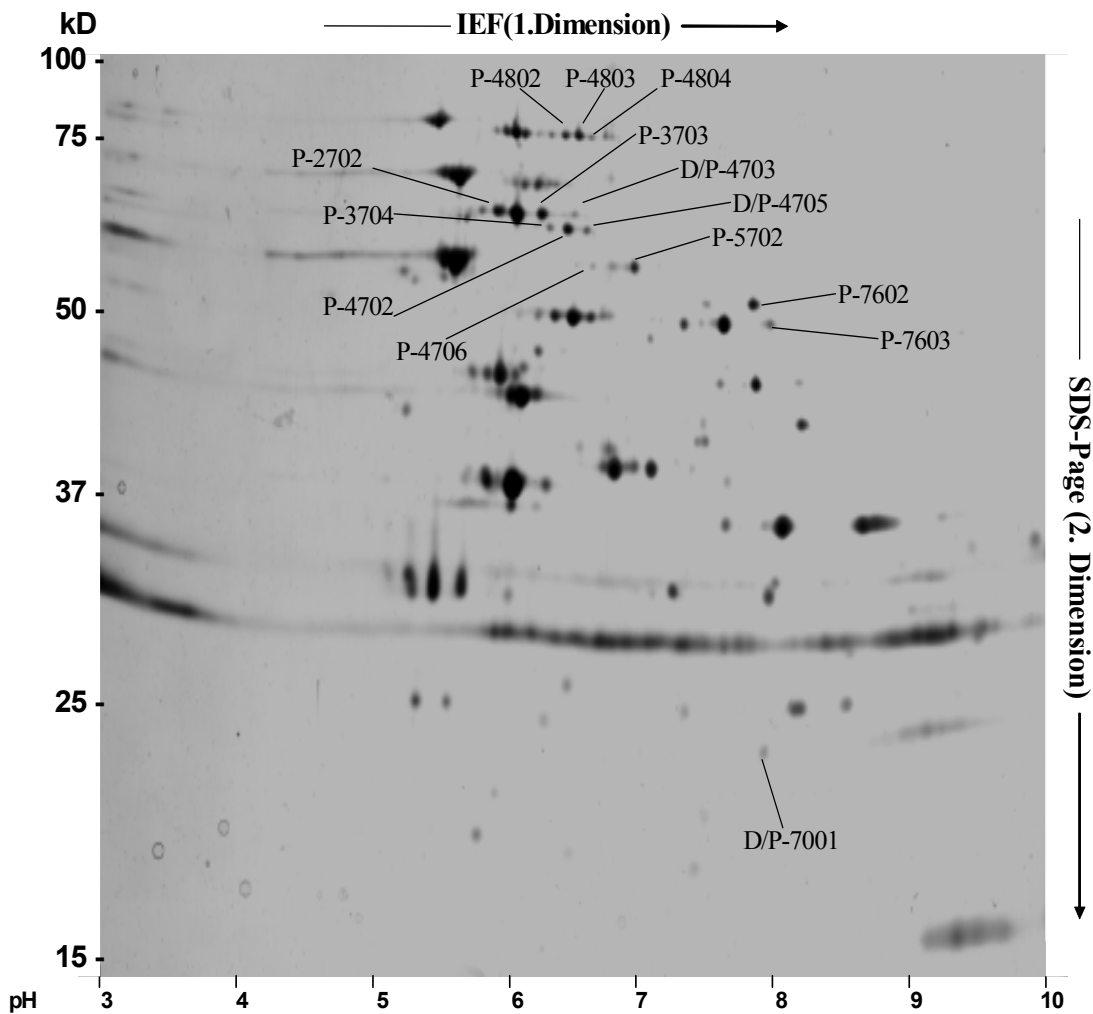
### 4.5.1 Penicillin-induzierte Alteration der Proteinexpression

Der Wirkungsmechanismus des zu der Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gehörenden Penicillins besteht in der Hemmung der Transpeptidase und damit des letzten Schritts der Peptidoglykan-Synthese, wodurch der Zellwandaufbau blockiert wird. Aufgrund struktureller Ähnlichkeit mit D-Alanyl-D-Alanin binden  $\beta$ -Lactam-Antibiotika nämlich unter Öffnung des  $\beta$ -Lactam-Ringes kovalent an das aktive Zentrum der Transpeptidase, so dass deren katalytische Aktivität irreversibel gehemmt wird. Eine Öffnung der Peptidoglykanstränge während der Zellteilung führt in Gegenwart von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zur Bakteriolyse. Das erklärt, warum ausschließlich proliferierende Bakterien abgetötet werden [Mutschler, 2001]. Von den 14 Proteinspots, die unter Penicillinsupplementation vermindert exprimiert wurden, konnten 9 durch MALDI-TOF-MS eindeutig identifiziert werden. Da 2 Proteinspotpaare auftraten, die gleichen Proteinen entsprachen, ergab sich dennoch eine Anzahl von 7 verschiedenen Proteinen. Drei der identifizierten Proteine können dem Energiestoffwechsel zugeordnet werden. Bei der Pyrophosphat-Fruktose-6-Phosphat 1-Phosphotransferase (P-4706, P-5702) handelt es sich um ein Schlüsselenzym der anaeroben Glykolyse, das die Reaktion Fructose-6-Phosphat + Pyrophosphat = Phosphat + Fructose-1,6-Bisphosphat katalysiert [www.ebi.ac.uk/interpro/]. Ebenfalls der anaeroben Glykolyse kann die Pyruvatkinase zugeordnet werden (P-7603). Im letzten Reaktionsschritt der anaeroben Glykolyse katalysiert die Pyruvatkinase die Reaktion  $\text{ADP} + \text{Phosphoenolpyruvat} = \text{ATP} + \text{Pyruvat}$  und die ebenfalls veränderte Glycerolkinase (P-7602) die Reaktion von Glycerol zu Glycerol-3-Phosphat; zwei ATP-abhängige Vorgänge [www.ebi.ac.uk/interpro/].

Die Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase (P-4803) katalysiert die Reaktion:



Das ribosomale Protein S1 (P-4702) ist Bestandteil des ribosomalen Translationsapparats und somit der Proteinbiosynthese. S1 ist ein Protein der kleinen Ribosomenuntereinheit. Es wird als RNA bindendes Helfermolekül mit der Polynucleotid-Phosphorylase assoziiert [www.ebi.ac.uk/interpro/].



**Abb. 13** Proteomanalyse Penicillin-veränderter Proteinspots

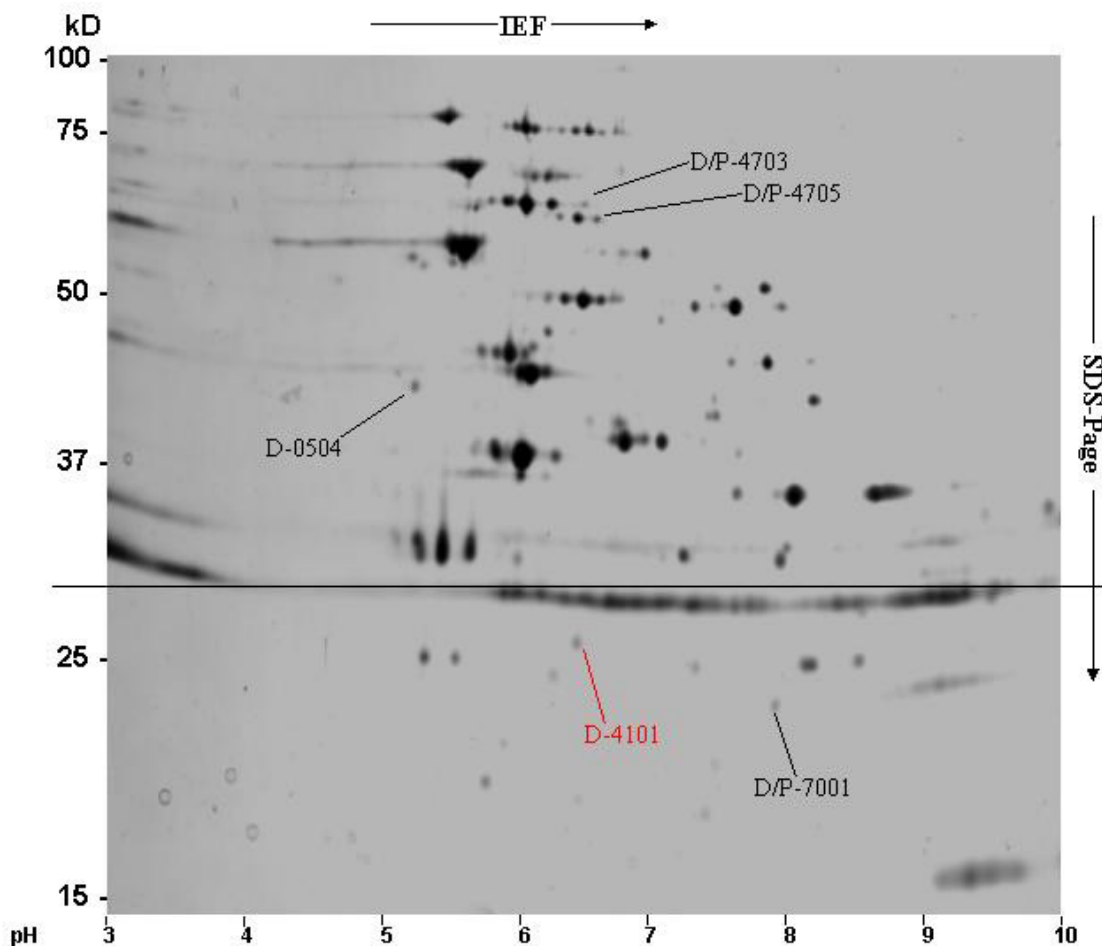
Die reduzierte Synthese dieser verschiedenen, im Stoffwechsel eingreifenden Proteine kann als generalisierte Verminderung des Zellmetabolismus interpretiert werden. Interessanterweise wurde die veränderte Expression von Proteinen des Energiehaushalts bei anderen Mikroorganismen in Verbindung mit der Entwicklung von Resistenz beschrieben. So konnte für *Streptococcus pneumoniae* eine Induktion von Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bei Stämmen gefunden werden, die gegenüber Erythromycin resistent waren [Cash, 1999].

Darüberhinaus wurde p66 (P-2702, P-3703), ein Porin, ein Zellmembrankanalbildendes Protein identifiziert. Es fungiert als unspezifischer Ionenkanal. Zwei Funktionszustände von p66 sind bekannt. Dies korreliert mit unseren Ergebnissen. Für p66 (OMS66) wurden 2 Proteinspots mit gleichen Molekulargewichten und

unterschiedlichen pI-Werten gefunden [Cugini et al., 2003; Exner et al., 2000; Bunikis et al., 1998; Skare 1997]. In Anwesenheit von Penicillin konnte eine „Down“-Regulation von p66 nachgewiesen werden. Porine spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Penetration von antibakteriellen Substanzen durch die Zellmembran in den zytoplasmatischen Raum von Gram-negativen Bakterien [Nitzan et al., 2002]. Darüber hinaus wird die Abwesenheit von Porinen mit Entwicklung von Resistenzen gegen  $\beta$ -Lactam Antibiotika assoziiert [Martinez-Martinez et al., 1996; Pages, 2004]. Für *Pseudomonas aeruginosa* wurde ein Porin (outer membrane protein D) beschrieben, dessen verminderte Expression mit einer Resistenzentwicklung gegenüber Imipenem in Zusammenhang zu stehen scheint [Vurma-Rapp et al., 1990]. Für *Klebsiella pneumonia* wurde ebenfalls eine zu Carbapenemresistenz führende „Down“-Regulation eines Phosphat-Transportproteins beschrieben [Kaczmarek et al., 2006]. So liegt es nahe zu vermuten, dass es sich bei der „Down“-Regulation von p66 um einen adaptiven Prozess handelt, der einen Influx von Penicillin durch die äußere Zellmembran in den periplasmatischen Raum verhindern könnte. So könnte die bakterizide Wirkung von  $\beta$ -Lactamen auf die Zellwandsynthese abgeschwächt werden.

#### 4.5.2 Doxycyclin-induzierte Alteration der Proteinexpression

Doxycyclin, als Tetracyclinderivat, hemmt die ribosomale Proteinsynthese, indem die Bindung von Aminoacyl-tRNA an die Akzeptorstellen des Ribosoms und damit die Verlängerung der Peptidkette bei der Elongation blockiert wird. Für einen ausreichenden antimikrobiellen Effekt ist eine intrazelluläre Anreicherung dieses Antibiotikums im Zytoplasma der Bakterien erforderlich. Diese wird bei resistenten Bakterien durch einen aktiven Transport nach außen verhindert. Daneben kann eine Tetracyclinresistenz auf einer Mutation in der ribosomalen Bindungsstelle beruhen [Mutschler, 2001].



**Abb. 14** Proteomanalyse der Doxycyclin-veränderten Proteinspots

Im Rahmen dieser Studie konnten 5 Proteinspots identifiziert werden, die unter Doxycyclin entsprechende Veränderungen aufwiesen. Von diesen ließen sich insgesamt 3 Spots mittels MALDI-TOF-MS eindeutig zuordnen.

Eine essentielle Komponente der bakteriellen Zellteilung stellt das Protein FtsZ (D-0504) dar, das von den behandelten Borrelien deutlich vermindert exprimiert wurde. Zu Beginn der Zellteilung ist dieses Protein an der Stelle lokalisiert, an der die Zellteilung induziert wird. Es besitzt die Fähigkeit, GTP-abhängig zu polymerisieren und, ähnlich dem eukaryonten Tubulinmolekül, Zytoskelettstrukturen auszubilden, die als Leitstrukturen für die Zellteilung fungieren [Eberhardt 2003].

Bei Pfs-1 (D/P-7001), das unter Penicillin und Doxycyclin vermindert exprimiert wurde, handelt es sich um ein Enzym aus der Gruppe der Nucleosidasen. Es katalysiert unter anderem die Reaktion: S-Adenosylhomocystein  $\rightarrow$  S-Ribosylhomocystein, ein Schritt in einer Reaktionskaskade, in der Autoinducer 2 auf der Basis von Methionin gebildet wird. Als Nebenprodukt wird bei dieser Reaktion Adenin frei. Eine reduzierte Bildung von Adenin könnte zu einer verminderten DNA Synthese führen. Autoinducer AI-2 selbst scheint der Zellkommunikation zu dienen. [Stevenson, 2002; Stevenson, 2003]. Andere Autoren vermuten, dass Autoinducer AI-2 im Sinne einer Selbstinduktion die Genexpression beeinflussen kann oder als Pheromon Rückschlüsse auf die Permeabilität der Umgebung liefert [Babb et al., 2005; Redfield, 2002].

Die wohl interessanteste Beobachtung unter Doxycyclineinwirkung ist die Hochregulation von Triosephosphatisomerase (D-4101), einem Schlüsselenzym der Glykolyse. Innerhalb der durchgeführten Versuchsreihe war es das einzige Protein, das durch eine verstärkte Expression auffiel. Die Triosephosphatisomerase ist ein zytosolisches Enzym, das die reversible Isomerisierung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Dihydroxyaceton-Phosphat katalysiert. Damit nimmt es eine Schlüsselrolle in Glykolyse und Glukoneogenese ein [www.ebi.ac.uk/interpro/]. Eine variable Expression von Triosephosphatisomerase wurde 2002 in Zusammenhang mit dem komplexen Entwicklungszyklus von *Leishmania infantum* beschrieben. Dort wurde eine Hochregulierung in Amastigoten beobachtet, den intrazellulären Formen der Leishmanien [El Fakhyr, 2002]. In Borrelien könnte die gesteigerte Synthese dieses Enzyms als Mechanismus interpretiert werden, durch den alternative Stoffwechselwege gefördert werden. Dies könnte auch als Anpassungsvorgang auf Antibiotikaeinwirkung gewertet werden.



## 5 Zusammenfassung

Die Lyme-Borreliose stellt in Deutschland mit ca. 60.000 Neuinfektionen pro Jahr die am häufigsten durch Zecken übertragene Zoonose beim Menschen dar. Obwohl adäquat antibiotisch therapiert, konnte in wenigen Fällen bei Patienten mit Erythema migrans eine persistierende Borrelieninfektion nachgewiesen werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen einer möglichen Antibiotikaresistenz sind jedoch nur unzureichend untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde daher der Frage nachgegangen, ob und wie *B. burgdorferi* der inhibitorischen Wirkung von Antibiotika entgehen. Basierend auf einer vergleichenden Proteomanalyse von antibiotisch behandelten und unbehandelten Borrelienzellen, sollten Unterschiede in den Proteinsignaturen einzelner Moleküle, als Ausdruck einer koordinierten Abwehrreaktion aufgezeigt werden.

Die unter subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen inkubierten Borrelienzellen wiesen mikroskopisch keine morphologischen Veränderungen auf. Gleichmaßen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression nachgewiesen werden. Sichtbare, strukturelle Veränderungen liessen sich erst in Gegenwart von 0,5mg/l bis 1mg/l Penicillin bzw. Doxycyclin nachweisen, was der MHK beider Antibiotika entsprach. Die unter identischen Bedingungen durchgeführte Proteomanalyse ergab eine deutliche Veränderung bei 14 Proteinen der mit Penicillin-behandelten Borrelienzellen und 5 Proteinen der mit Doxycyclin-behandelten Borrelienzellen. Mit Ausnahme eines einzelnen Proteins waren alle anderen Moleküle durch eine signifikante Repression gekennzeichnet. Interessanterweise wurde die Expression bei drei Proteinen sowohl von Penicillin als auch von Doxycyclin beeinflusst. Mittels massenspektrometrischer Analyse (MALDI-TOF-MS) konnten insgesamt 9 zytoplasmatische Proteine und ein membranständiges, porenbildendes Protein (p66) eindeutig identifiziert werden. Von den im Zytoplasma lokalisierten Proteinen besitzen vier Proteine als Isomerasen, Transferasen, bzw. Kinasen enzymatische Aktivität und ein Protein (FtsZ) ist bei der Zellteilung beteiligt. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass Borrelien auf Penicillin und Doxycyclin mit einem koordinierten Regulations- bzw. Abwehrmechanismus reagieren, der in unterschiedliche Stoffwechselprozesse eingreift. Inwieweit dieser Antibiotika-induzierte Prozess als Stressantwort zu deuten ist oder Teil eines Resistenzmechanismus darstellt, sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

## 6.1 Literaturverzeichnis

- Alban, P.S., Johnson, P.W., Nelson, D.R.:** Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology*, 146, 119-127 (2000)
- Anderson J.F.:** Epizootology of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.*, 77, 23-34 (1991)
- Babb, K., von Lackum, K., Wattier, R.L., Riley, S.P., Stevenson, B.:** Synthesis of autoinducer 2 by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 187:3079-87 (2005)
- Bandow, J.E., Brörtz, H., Leichert, L.I.O., Labischinski, H., Hecker, M.:** Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, 47, 948-955 (2003)
- Baranton, G., Posic, D., Saint-Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.C., Assous, M., Grimont, P.A.:** Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 378-382 (1992)
- Barbour, A.G., Hayes, S.F.:** Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev.* 50:381-400 (1986)
- Bentas, W., Karch, H., Huppertz, H.I.:** Lyme arthritis in children and adolescents: outcome 12 months after initial antibiotic therapy. *J. Rheumatol.*, 27, 2025-2030 (2000)
- Brorson, Ø., Brorson, S.H.:** Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal mobile spirochetes. *Infection*, 25, 240-246 (1997)
- Brorson, Ø., Brorson, S.H.:** A rapid method for generating cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and their reversal to mobile spirochetes. *Infection*, 25, 1131-1141 (1998)
- Brown, J.P., Zachary, J.F., Teuscher, C., Weis, J.J., Wooten, R.M.:** Dual role of interleukin-10 in murine Lyme disease: regulation of arthritis severity and host defense. *Infect. Immun.*, 67, 5142-5150 (1999)
- Brunner, M., Sigal, L.H.:** Immune complexes from serum of patients with Lyme disease contain *Borrelia burgdorferi* antigen and antigen-specific antibodies: potential use for improved testing. *J. Infect. Dis.*, 182, 534-539 (2000)
- Bunikis, J., Luke, C.J., Bunikiene, E., Bergström, S., Barbour, A.G.:** A surface-exposed region of a novel outer membrane protein (P66) of *Borrelia* spp. is variable in size and sequence. *J. Bact.*, 180, 1618-1623 (1998)
- Burgdorfer W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grunwaldt, E., Davis, J.P.:** Lyme Disease- a tick-borne spirochetosis? *Science*, 216, 1317-1319 (1982)
- Burgdorfer, W.:** Arthropod-borne spirochetoses: A historical perspective. *Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.*, 20, 1-5 (2001)
- Caimano, M.J., Eggers, C.H., Hazlett, K.R.O., Radolf, J.D.:** RpoS is not central to the general stress response in *Borrelia burgdorferi* but does control expression of one or more essential virulence determinants. *Infect. Immun.*, 72, 11, 6433-6445 (2004)
- Canica, M.M., Nato, F., Du Merle, L., Mazie, J.C., Baranton, G., Postic, D.:** Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.*, 25, 441-448 (1993)
- Carrol, J.A., Cordova, R.M., Garon, C.F.:** Identification of 11 pH-regulated genes in *Borrelia burgdorferi* localizing to linear plasmids. *Infect. Immun.*, 67, 3181-3187 (2000)
- Cash, P.:** Proteomics in medical microbiology. *Electrophoresis* 21, 1187-1201 (2000)
- Cash, P., Argo, E., Ford, L., Lawrie, L., McKenzie, H.:** A proteomic analysis of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Electrophoresis*, 20, 2259-2268 (1999)
- Casjens, S., Palmer, N., van Vugt, R., Huang, W.M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R.J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn, M., White, O., Fraser, C.:** A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs of an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 35, 490-516 (2000)
- Criswell, D., Tobiason, V.L., Lodmell, J.S., Samuels, D.S.:** Mutations conferring aminoglycoside and spectinomycin resistance in *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50, 445-452 (2006)
- Cugini, C., Medrano, M., Schwan, T.G., Coburn, J.:** Regulation of Expression of the *Borrelia burgdorferi*  $\beta_3$ -Chain Integrin Ligand, P66, in Ticks and in Culture. *Infect. Immun.*, 71, 1001-1007 (2003)
- Dattwyler, R.J., Volkman, D.J., Conaty, S.M., Platkin, S.P., Luft, B.J.:** Amoxicillin plus probenecid versus doxycycline for treatment of erythema migrans borreliosis. *Lancet*, 336, 1404-1406 (1990)
- Diterich, I., Rauter, C., Kirschning, C.J., Hartung, T.:** *Borrelia burgdorferi* induced tolerance as model of persistence via immunosuppression. *Infect. Immun.*, 71, 3979-3987 (2003)
- Eberhardt, C., Kuerschner, L., Weiß, D.S.:** Probing the catalytic activity of a cell division-specific transpeptidase in vivo with beta-lactams. *J. Bacteriol.*, 185, 3726-3734 (2003)

- El Fakhry, Y., Oullette, M., Papadopoulou, R.:** A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics* 2, 1007-1017 (2002)
- Embers, M.E., Ramamoorthy, R., Philipp, M.T.:** Survival strategies of *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. *Microb. Infect.*, 6, 312-318 (2004)
- Exner, M.M., Wu, X., Blanco, D.R., Miller, J.N., Lovett, M.A.:** Protection elicited by native outer membrane protein Oms66 (p66) against host-adapted *Borrelia burgdorferi*: Conformational nature of bacterial epitopes. *Infect. Immun.*, 68, 2647-2654 (2000)
- Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J-F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quakenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidmann, J., Utterback, T., Watthey, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fujii, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O., Venter, J.C.:** Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete: *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390, 580-586 (1997)
- Fukunaga, M., Hamase, A., Okada, K., Nakao, M.:** *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodic ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol. Immunol.*, 40, 877-881 (1996)
- Galbraith, K.M., Ng, A.C., Eggers, B.J., Kuchel, C.R., Eggers, C.H., Samuels, D.S.:** parC mutations in flouorchinolone-resistant *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 46-50 (2005)
- Georgilis, K., Peacocke, M., Klempner M.S.:** Fibroblasts protect the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from ceftriaxone in vitro. *J. Infect. Dis.*, 166, 440-444 (1992)
- Girschick, H.J., Huppertz, H.I., Russmann, H., Krenn, V., Karch, H.:** Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells. *Rheumatol. Int.*, 16, 125-132 (1996)
- Gruntar, I., Malovrh, T., Murgia, R., Cinco, M.:** Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes in vivo. *APMIS* 109, 383-388 (2001)
- Hecker, M., Bandow, J., Bernhardt, J., Labischinski, H., Brörtz-Osterheld, H.:** Physiologische Proteomanalyse – von Proteomsignaturen zu Wirkungsmechanismen von Antibiotika. *Biospektrum*, 9, 453-455 (2003)
- Hunfeld, K.-P., Kraiczy, P., Wichelhaus, T.A., Schäfer V., Brade, V.:** A new colorimetric microdilution method for in vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* against antimicrobiological substances. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 27-32 (2000)
- Hunfeld, K.-P., Kraiczy, P., Wichelhaus, T.A., Schäfer V., Brade, V.:** Colorimetric in vitro susceptibility of penicillins, cephalosporins, macrolides, streptogramins, tetracyclins and aminoglycosides against *Borrelia burgdorferi* isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 15, 11-17 (2000)
- Hunfeld, K.-P., Kraiczy, P., Kekoukh, E., Schäfer, V., Brade, V.:** Standardized in vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* against well known and newly developed antimicrobial agents – Possible implications for new therapeutic approaches on Lyme disease. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, Suppl.33, 125-137 (2002)
- Hunfeld, K.-P., Ružić-Sabljić, E., Norris, D.E., Kraiczy, P., Strle, F.:** In vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* s.l. in isolates cultured from patients with erythema migrans before and after antimicrobial chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 1294-1301 (2005)
- Hunfeld, K.-P., Ružić-Sabljić, E., Norris, D.E., Kraiczy, P., Strle, F.:** Risk of culture-confirmed borrelial persistence in patients treated for erythema migrans and possible mechanisms of resistance. *Int. J. Med. Microbiol.*, 296, 233-241 (2006)
- Hunfeld, K.P., Brade, V.:** Antimicrobial susceptibility of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: What we know, what we don't know, and what we need to know. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 118/21-22, 659-668 (2006)
- Hyde, J.A., Trzeciakowski, J.P., Skare, J.T.:** *Borrelia burgdorferi* alters its gene expression and antigenic profile in response to CO<sub>2</sub> levels. *J. Bacteriol.*, 189, 2, 437-445 (2007)
- Johnson, R.C., Schmid, G.P., Hyde, F.W., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J.:** *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 496-497 (1984)
- Jungblut, P.R., Grabher, G., Stöffler, G.:** Comprehensive detection of immunorelevant *Borrelia garinii* antigens by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 20, 3611-3622 (1999)
- Jungblut, P.R., Zymny-Arndt, U., Zeindl-Eberhart, E., Stulik, J., Koupilova, K., Pleißner, K.-P., Otto, A., Müller, E.-C., Sokolovska-Köhler, W., Grabher, G., Stöffler, G.:** Proteomics in human disease: Cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis*, 20, 2100-2110 (1999)
- Kaczmarek, F.M., Dib-Hajj, F., Shang, W., Gootz, T.D.:** High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoE. *Antimicrob Agents Chemother.* ,50:3396-406 (2006)

- Kawabata, H., Masuzawa, T., Yanagihara, Y.:** Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus*. Microbiol. Immunol., 37, 843-848 (1993)
- Kersten, A., Poitschek, C., Rauch, S., Aberer, E.:** Effects of Penicillin, ceftriaxone and Ddoxycycline on Morphology of *Borrelia burgdorferi*. Antimicrobiol. Agents Chemother., 39, 1127-1133 (1995)
- Klempner, M.S., Noring, R., Rogers, R.A.:** Invasion of human skin fibroblasts by the Lyme disease spirochete: *Borrelia burgdorferi*. J. Infect. Dis., 167, 1074-1081 (1993)
- Klempner, M.S., HU, L.T., Evans, J., Schmidt, C.H., Johnson, G.M., Trevino, R.P., Norton, D., Levy, L., Wall, D., McCall, J., Kosinski, M., Weinstein, A.:** Two controlled trials of antibiotic treatment in patients with persistent symptoms and a history of Lyme disease. New Eng. J. Med., 345, 85-92 (2001)
- Kraiczy, P., Oschmann, P.:** Lyme-Borreliose und Meningoenzephalitis. UNI-MED, 1.Auflage (1998)
- Kraiczy, P., Skerka, C., Brade, V., Zipfel, P.F.:** Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. 69, 7800-7809 (2001a)
- Kraiczy, P., Skerka, C., Kischfink, M., Brade, V., Zipfel, P.F.:** Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and factor H. Eur. J. Immunol. 31, 1674-1684 (2001b)
- Kraiczy, P., Skerka, C., Kischfink, M., Zipfel, P.F., Brade, V.:** Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. Int. Immunopharmacol., 1, 393-401 (2001c)
- Kraiczy, P., Würzner, R.:** Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. Mol. Immunol. 43, 31-44 (2006)
- Krupp, L.B., Hyman, L.G., Crimson, R., Coyle, P.K., Melville, P., Ahnn, S., Dattwyler, R., Chandler, B.:** Study and treatment of post Lyme disease: a randomised double masked clinical trial. Neurology, 60, 1888-1889 (2003)
- LeFleche, A., Postic, D., Girardet, K., Peter, O., Baranton, G.:** Characterization of *Borrelia lusitanae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 921-925 (1997)
- Liang, F.T., Nelson, F.K., Fikrig, E.:** Molecular adaption of *Borrelia burgdorferi* in the murine host. J. Exp. Med., 196, 275-280 (2002)
- Liang, F.T., Jacobs, M.B., Bowers, L.C., Philipp, M.T.:** An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in Lyme borreliosis. J. Exp. Med. 195, 415-422 (2002)
- Limbach, F.X., Jaulhac, B., Ruechal, X., Monteil, H., Kuntz, J.L., Piemont, Y., Sibilia, J.:** Treatment resistant Lyme arthritis caused by *Borrelia garinii*. Ann. Rheum. Dis., 60, 284-286 (2001)
- Ma, Y., Sturrock, A., Weis J.J.:** Intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* within human endothelial cells. Infect. Immun., 59, 671-678 (1991)
- MacDonald, A.B., Berger, B.W., Schwan, T.G.:** Clinical implications of delayed growth of the Lyme borreliosis spirochete: *Borrelia burgdorferi*. Acta Tropica, 48, 89-94 (1990)
- Massarotti, E.M., Luger, S.W., Rahn, D.W., Messner, R.P., Wong, J.B., Johnson, R.C., Steere, A.C.:** Treatment of early Lyme disease. Am. J. Med., 92, 396-493 (1992)
- Masuzawa, T., Takada, N., Kudaken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y., Esaki, T.:** *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related species isolated in China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 1817-1824 (2001)
- Marconi, R.T., Iveris, D., Schwartz, I.:** Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analysis of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.). J. Clin. Microbiol., 33, 2427-2434 (1995)
- Marcus, K., Meyer, H.E.:** Fallstricke in der Durchführung von Proteomanalysen. Biospektrum, 9.Jahrgang, Sonderausgabe, 492-494 (2003)
- Martinez-Martinez, L., Hernandez-Alles, S., Alberi, S., Tomas J.M., Benedi, V.J., Javoby, G.A.:** In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother., 40, 342-348 (1996)
- Montgomery, R.R., Nathanson, M.H., Malawista, S.E.:** The fate of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, in mouse macrophages. Destruction, survival, recovery. J. Immunol., 150, 909-915 (1993)
- Mutschler, Geislinger:** Pharmakologie 8. Auflage, 2001
- Nitzan, Y., Deutsch E.B., Pechatnikov, I.:** Diffusion of beta-lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. Curr. Microbiol., 45, 446-455 (2002)
- Nanagara, R., Duray, P.H., Schumacher H.R., Nitzan, Y., Deutsch, E.B., Pechatnikov, I.:** Diffusion of beta-lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. Curr. Microbiol., 45, 446-455 (2002)
- Rabilloud, T.:** 2-D Proteome Analysis Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol.112

- Ojaimi, C., Brooks, C., Casjens, S., Rosa, P., Elias, A., Barbour, A., Jasinskis, A., Benach, J., Katona, L., Radolf, J., Caimano, M., Skare, J., Swingle, K., Akins, D., Schwartz, I.:** Profiling to temperature induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome assays. *Infect. Immun.*, 71, 1689-1705 (2003)
- Oksi, J., Marjamaki, M., Nikoskelainen, J., Viljanen, M.K.:** *Borrelia burgdorferi* detected by culture and PCR in clinical relapse of disseminated Lyme Borreliosis. *Annals of Medicine*, 31, 225-232 (1999)
- Orloski, K.A., Hayes, E.B., Campbell, G.L., Dennis, D.T.:** Surveillance for Lyme disease—United States, 1992-1998. *MMWR CDC Surveillance summaries*, 49, 1-11 (2000)
- Pages, J.M.:** Bacterial porin and antibiotic susceptibility. *Med. Scienc. (Paris)* 20, 346-351 (2004)
- Paul H., Gerth, H.J., Ackermann, R.:** Infectiousness of *Ixodes ricinus* containing *Borrelia burgdorferi*. *Zentralbl. Bakteriologie. Microbiol. Hyg. [A]*, 263, 473-476 (1986)
- Paul H., Gerth, H.J., Ackermann, R.:** Infection and manifestation rate of European Lyme borreliosis in humans. *Zentralbl. Bakteriologie. Microbiol. Hyg. [A]*, 18, 44-49 (1989)
- Pfister, H.W., Wilske, B., Weber, K.:** Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. *Lancet*, 343, 1013-1016 (1994)
- Posch, A.:** Zwei-dimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten. *BIO-RAD Bulletin Nr.7112*, 1-18
- Postic, D., Ras, N.M., Lane, R.S., Henderson, M., Baranton, G.:** Expanded diversity among California borrelia isolates and description of *Borrelia bissetti* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J. Clin. Microbiol.*, 36, 3497-3504 (1998)
- Preac-Mursic, V., Wilske, B., Schierz, G.:** European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. [A]*, 263, 112-118 (1986)
- Preac-Mursic, V., Weber, K., Pfister, H.W., Wilske, B., Gross, B., Baumann, A., Prokop, J.:** Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibiotic treated patients with Lyme borreliosis. *Infection* 17, 355-359 (1989)
- Preac-Mursic, V., Wanner, G., Reinhardt, S., Wilske, B., Busch, U., Marget, W.:** Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants. *Infection*, 24, 218-226 (1996)
- Priem, S., Burmester G.R., Kamradt, T., Wolbart, K., Rittig, M.G., Krause, A.:** Detection of *Borrelia burgdorferi* by polymerase chain reaction in synovial membrane, but not in synovial fluid from patients with persistent Lyme arthritis after antibiotic therapy. *Ann. Rheum. Dis.*, 57, 118-221 (1998)
- Redfield, R.J.:** Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol.*, 10, 365-70 (2002)
- Richter, D., Schlee, D.B., Allgöwer, R., Matuschka, F.-R.:** Relationships of a novel Lyme Disease Spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with Its Hosts in Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 11, 6414-6419 (2004)
- Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F.-R., Baranton, G.:** Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 873-881 (2006)
- Sambri, V., Aldini, R., Massaria, F., Montagnani, M., Casanova, S., Cevenini, R.:** Uptake and killing of Lyme disease and relapsing fever borreliae in the perfused rat liver and isolated Kupffer cells. *Infect. Immun.*, 64, 1858-1861 (1996)
- Schägger, H.:** Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Prot.* 1, 16-22 (2006)
- Schägger, H., von Jagow, G.:** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analyt. Biochem.*, 166, 368-379 (1987)
- Schutzer, S.E., Coyle, P.K., Reid, P., Holland, B.:** *Borrelia burgdorferi* specific immune complexes in acute Lyme disease. *J. Am. Med. Assoc.*, 282, 1942-1946 (1999)
- Schwan, T.G.:** Temporal regulation of outer surface proteins of the Lyme-disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Biochem. Soc. Trans.*, 31, 108-112 (2003)
- Skare, J.T., Mirzabekov, T.A., Shang, E.S., Blanco, D.R., Erdjument-Bromage, H., Bunikis, J., Bergström, S., Tempst, P., Kagan, B.L., Miller, J.N., Lovett, M.A.:** The Oms66 (p66) Protein is a *Borrelia burgdorferi* Porin. *Infect. Immun.*, 3654-3661 (1997)
- Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Shope, R.E., Andiman, W.A., Ross, M.R., Steele, F.M.:** Lyme arthritis: an epidemic oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.*, 20, 7-17 (1977)
- Steere, A.C.:** Lyme disease: A growing threat to urban populations. *Proc. Natl. Sci. USA*, 91, 2379-2383 (1994)
- Steere, A.C., Levin, R.E., Molloy, P.J., Kalish, R.A., Abraham, J.H. 3<sup>rd</sup>, Liu, N.Y., Schmid, C.H.:** Treatment of Lyme arthritis. *Arthritis Rheum.*, 37, 878-888 (1994)

**Steere, A.C., Coburn, J., Glickstein, L.:** The emergence of Lyme disease. *J. Clin. Invest.*, 113, 1093-1101 (2004)

**Stevenson, B., von Lackum, K., Wattier, R.L., McAllister, J.D., Miller, J.C., Babb, K.:** Quorum sensing by the Lyme disease spirochete. *Microbes Infect.* 5, 991-997 (2003)

**Stevenson, B., Babb, K.:** LuxS-mediated quorum sensing in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Infect. Immun.*, 70, 4099-4105 (2002)

**Straubinger, R.K., Summers, B.A., Chang, Y.F., Appel, M.J.:** Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 111-116 (1997)

**Straubinger, R. K.:** PCR-based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-day postinfection period. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2191-2199 (2000)

**Terekhova, D., Sartakova, M.L., Wormser, G.P., Schwartz, I., Cabello, F.C.:** Erythromycin resistance in *B. burgdorferi*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 3637-3640 (2002)

**VanBogelen, R., Schiller, E.E., Thomas, J.D., Neidhardt, F.C.:** Diagnosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. *Electrophoresis*, 20, 2149-2159 (1999)

**Vurma-Rapp, U., Kayser, F.H., Hadorn, H., Wiederkehr, F.:** Mechanism of imipenem resistance acquired by three *Pseudomonas aeruginosa* strains during imipenem therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9, 580-587 (1990)

**Wang, G., van Dam, A.P., LeFleche, A., Postic, D., Peter, O., Baranton, G., de Boer, R., Spanjaard, L., Dankert, J.:** Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS 116 and M19). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 926-932 (1997)

**Weber, K., Pfister, H.-W.:** Clinical management of Lyme borreliosis. *Lancet*, 343, 1017-1020 (1994)

**Weber, K.:** Treatment failure in erythema migrans – A Review. *Infection*, 24, 75-77 (1996)

**Weber, K.:** Aspects of Lyme Borreliosis in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 20, 6-13 (2001)

**Wilske, B.:** Lyme Borreliose 2002  
[www.alpha1.mpk.med.uni-muenchen.de/bak/nrz-borrelia/nrz-borrelia/](http://www.alpha1.mpk.med.uni-muenchen.de/bak/nrz-borrelia/nrz-borrelia/)

**Wormser, G.P., Nadelman R.B., Dattwyler, R.J., Dennis, D.T., Shapiro, E.D., Steere, A.C., Rush, T.J., Rahn, D.W., Coyle, P.K., Persing, D.H., Fish, D., Luft, B.J.:** Practise guidelines for the treatment of Lyme disease. The infectious disease society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 31 Suppl.1, 1-14 (2000)

**Yang, X., Goldberg, M.S., Popova, T.G., Schoeler, G.B., Wikel, S.K., Hagman, K.E., Norgard, M.V.:** Interdependence of environmental factors influencing reciprocal patterns of gene expression in virulent *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.*, 37, 1470-1479 (2000)

**Zhang, J.R., Hardham, J.M., Barbour, A.G., Norris, S.J.:** Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell*, 89, 275-285 (1997)

#### Sonstige Quellen:

[www.ebi.ac.uk/interpro/](http://www.ebi.ac.uk/interpro/)

[www.pubmed.de](http://www.pubmed.de)

[www.rki.de](http://www.rki.de)

[www.cdc.gov/mmwr/](http://www.cdc.gov/mmwr/)

**6.2 Abkürzungsverzeichnis**

APS	Ammoniumpersulfat
BSK-Medium	Barbour-Stoenner-Kelly-Medium
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay.
h	Stunde
HEPES	N- (2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFT	Immunfluoreszenztest
IHAT	Indirekter Hämagglutinationstest
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kD	Kilodalton
l	Liter
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight-Mass Spectrometry
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MHK	Minimale Hemmkonzentration
Mol	SI-Einheit für Stoffmenge
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pI	isoelektrischer Punkt
SDS-Page	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vh	Voltstunde
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

## 7 Anhang

### 7.1 Computer-gestützte Analyse veränderter Proteinspots

#### Proteinspot Nummer P-2702

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS (Proteinnummer in Pubmed)
5,9	65	68,13	Membranprotein p66 (AAC66949)

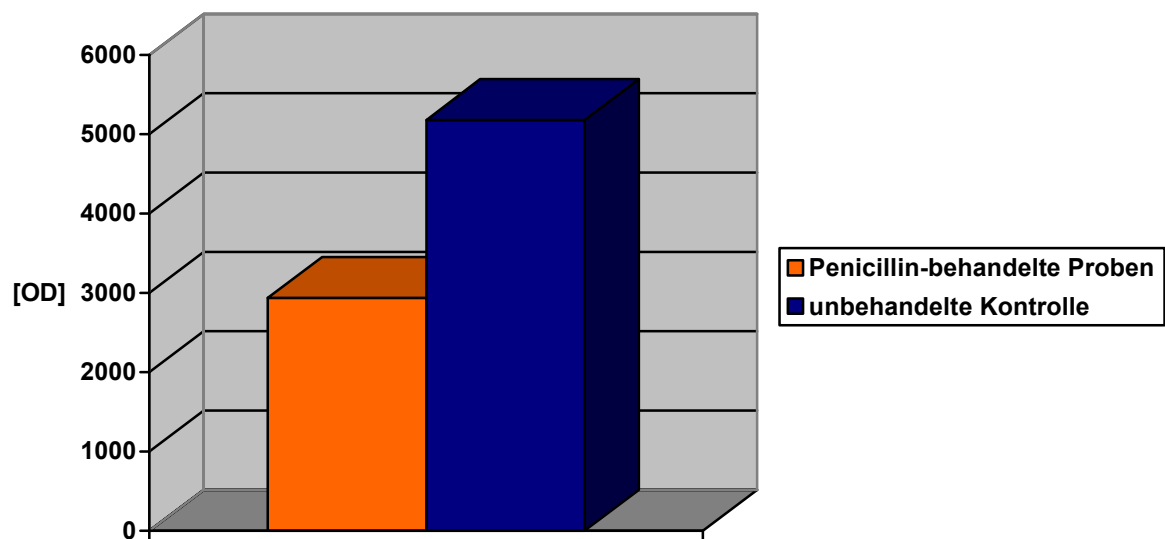
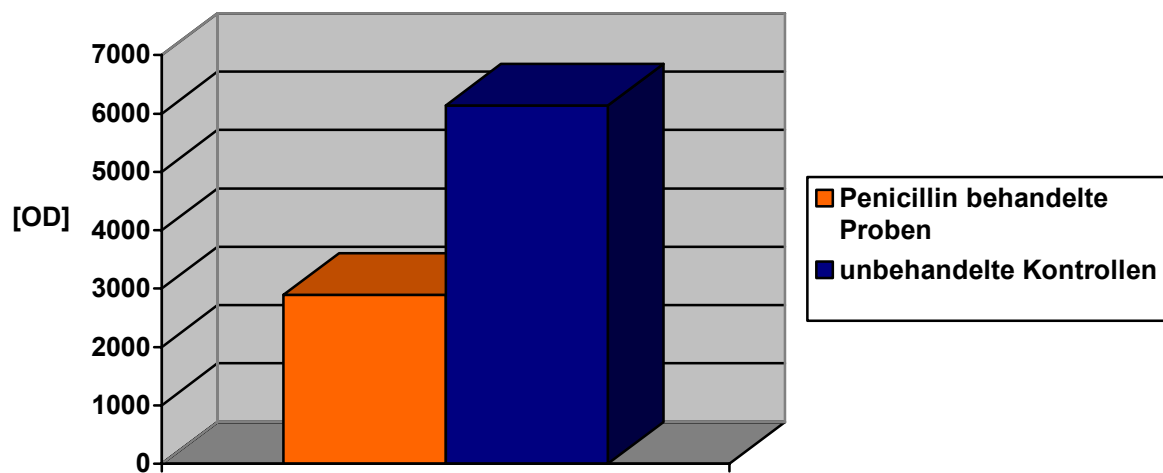


Abb. 15 Proteinspot P-2702



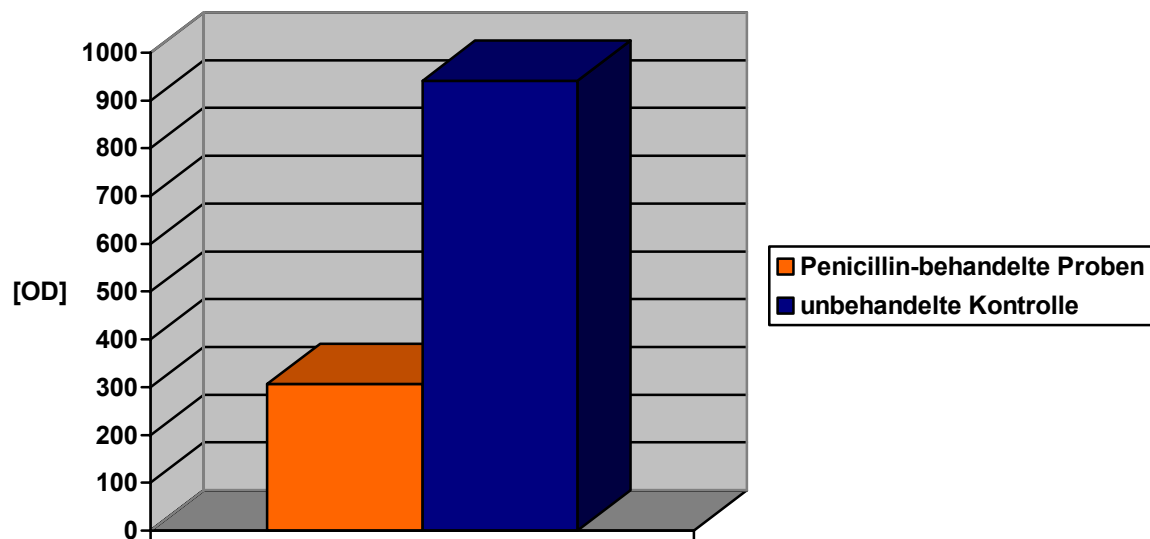
**Proteinspot P-3703**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS (Proteinnummer in Pubmed)
6,2	65	68,13	Membranprotein p66 (AAC66949)

**Abb.16** Proteinspot P-3703

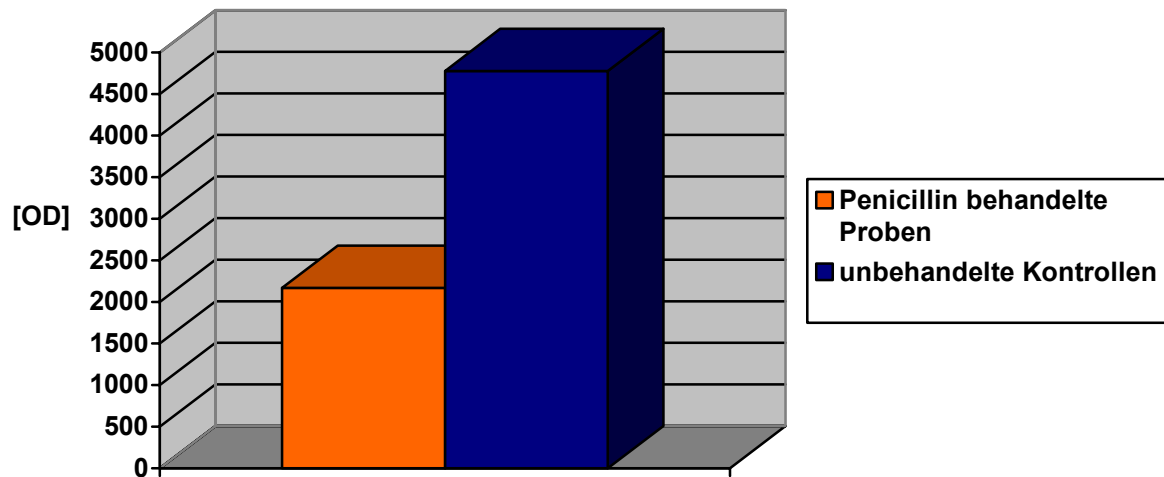
**Proteinspot P-3704**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS
6,3	63	nicht möglich	keine Zuordnung gefunden

**Abb. 17** Proteinspot P-3703

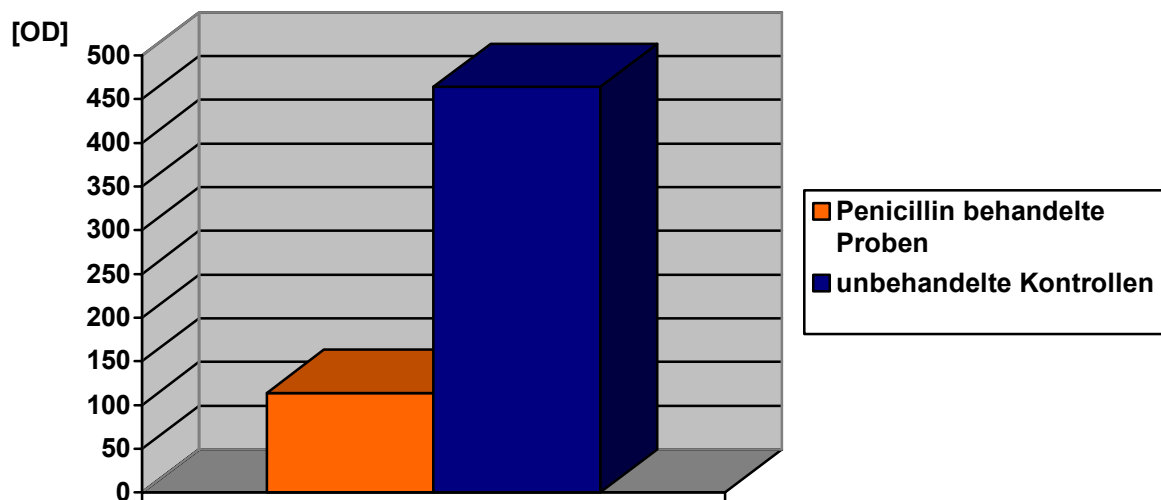
**Proteinspot P-4702**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS (Proteinnummer in Pubmed)
6,4	63	63,496	Ribosomales Protein S1 (RpsA) (AAC66510)

**Abb. 18** Proteinspot P- 4702

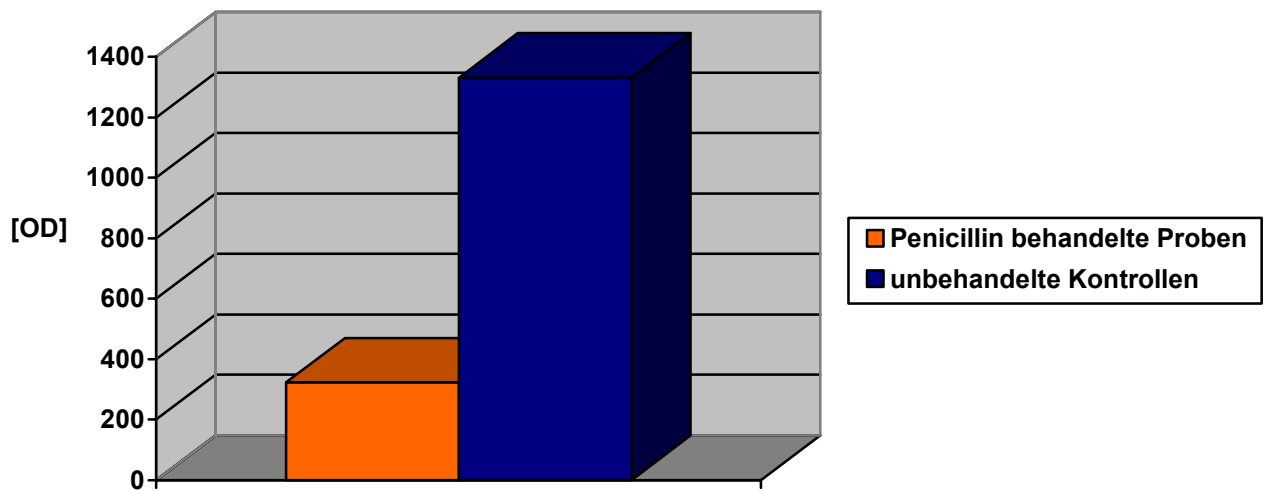
**Proteinspot P-4706**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS (Proteinnummer in Pubmed)
6,7	63	62,779	Pyrophosphat-Fruktose-6-Phosphat-1-Phosphotransferase (beta Untereinheit) (AAC66412)

**Abb. 19** Proteinspot P-4706

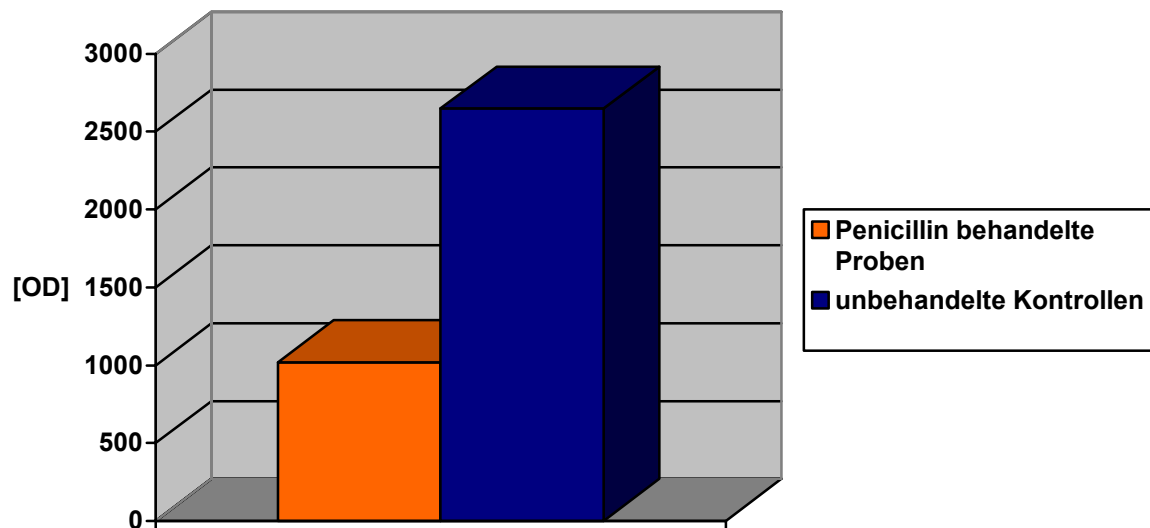
**Proteinspot P-4802**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS
6,4	75	nicht möglich	keine Zuordnung möglich

**Abb. 20** Proteinspot P-4802

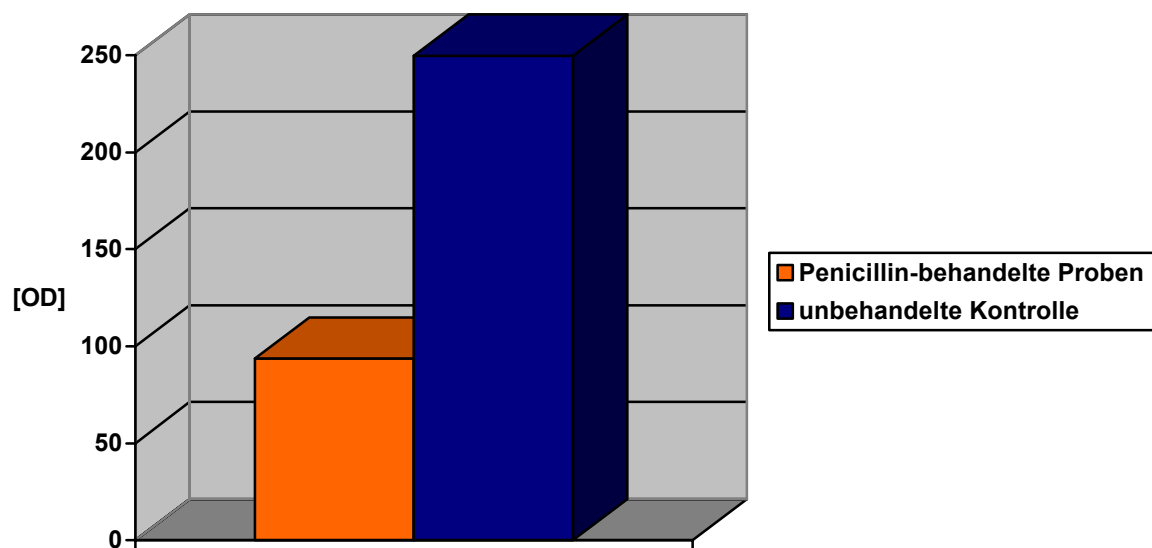
**Proteinspot P-4803**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS (Proteinnummer in Pubmed)
6,5	75	80,298	Polyribonucleotid Nukleotidyltransferase (PnpA) (AAC67149)

**Abb. 21** Proteinspot P-4803

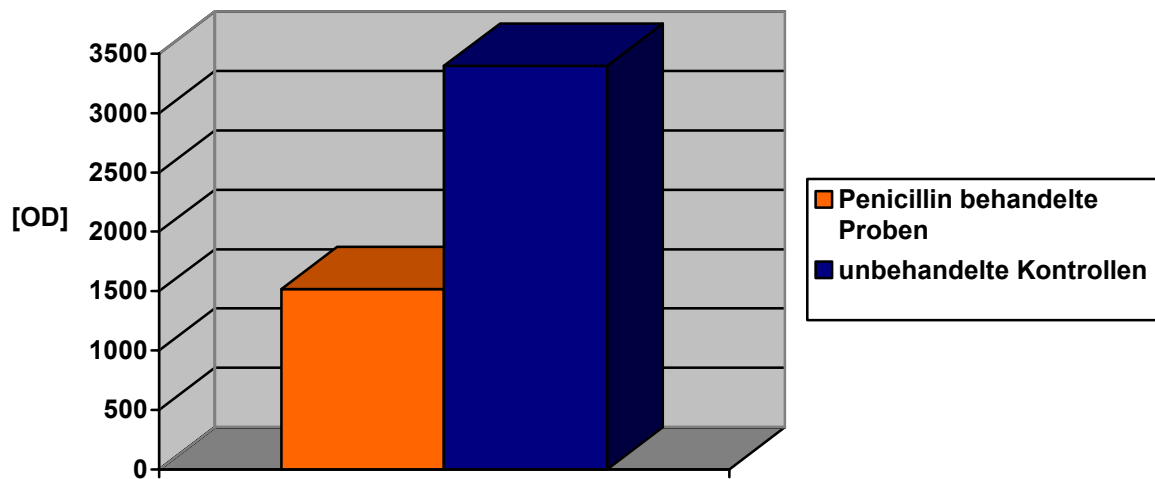
**Proteinspot P-4804**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS
6,6	75	nicht möglich	keine Zuordnung gefunden

**Abb. 22** Proteinspot P-4804

**Proteinspot P-5702**

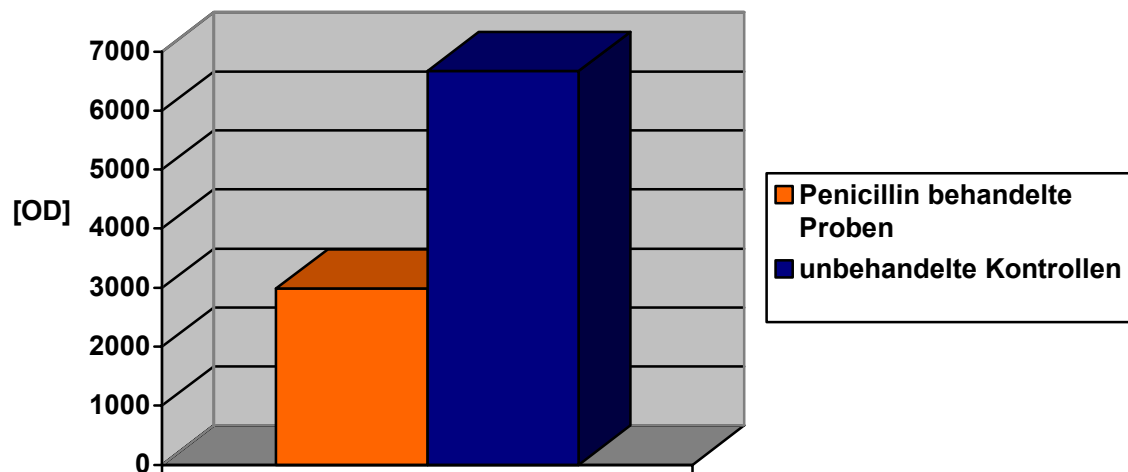
pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS (Proteinnummer in Pubmed)
7,0	57	50,061	Pyrophosphat-Fruktose-6-Phosphat-1-Phosphotransferase (Pfk) (AAC66412)

**Abb. 23** Proteinspot P-5702



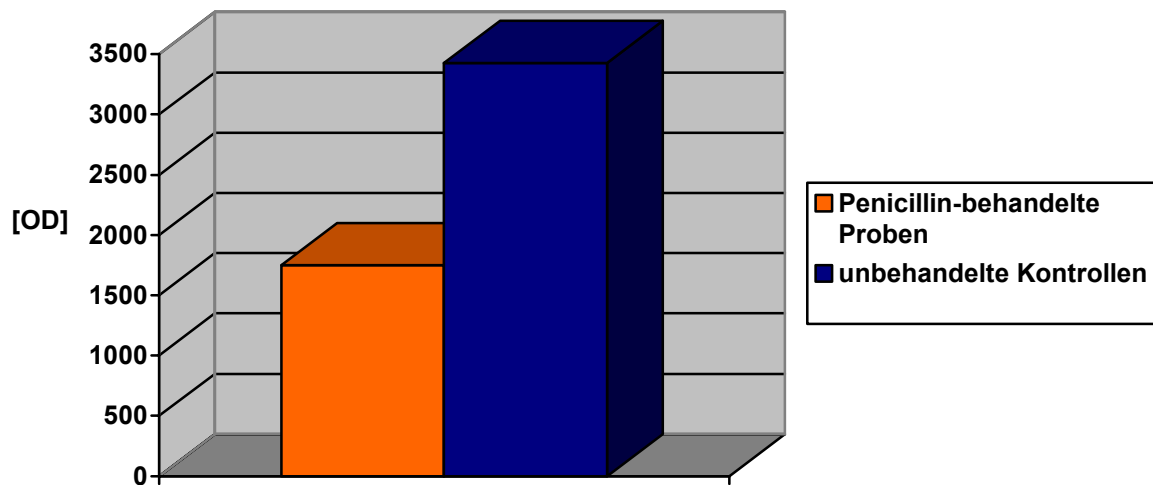
**Proteinspot P-7103**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS
8,1	25	30,417	keine Zuordnung gefunden

**Abb. 24** Proteinspot P-7103

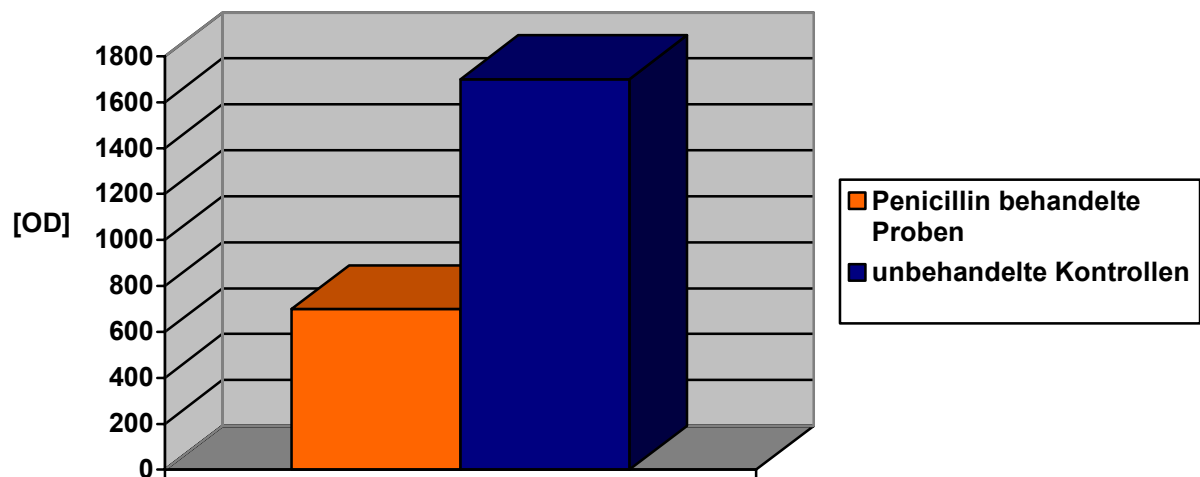
**Proteinspot P-7602**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS (Proteinnummer in Pubmed)
7,8	50	55.856	Glycerinkinase (GlpK) (AAC66628)

**Abb. 25** Proteinspot P-7602

**Proteinspot P-7603**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS (Proteinnummer in Pubmed)
7,9	49	53,227	Pyruvatkinase (Pyk) (AAC66733)

**Abb. 26** Proteinspot P-7603

**Proteinspot D/P-4703**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS
6,5	65	nicht möglich	keine Zuordnung gefunden

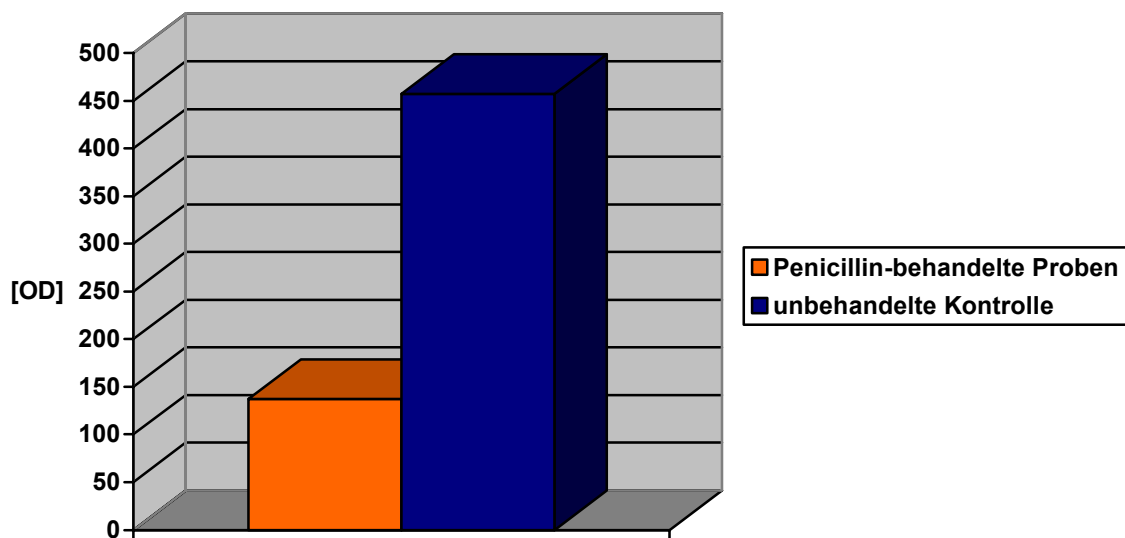
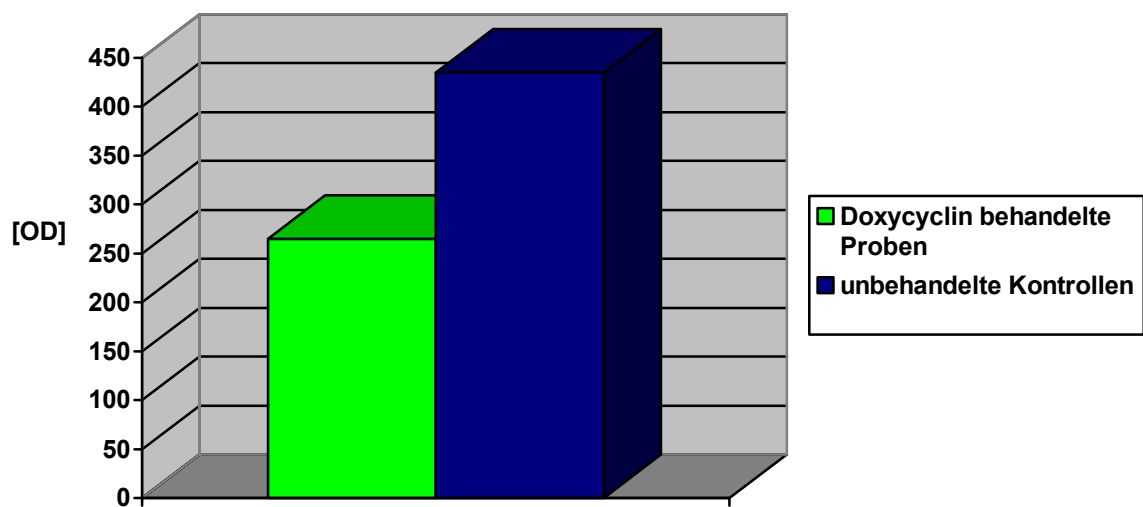


Abb. 27 Proteinspot D/P-4703

**Proteinspot D/P-4705**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS
6,6	63	nicht möglich	keine Zuordnung gefunden

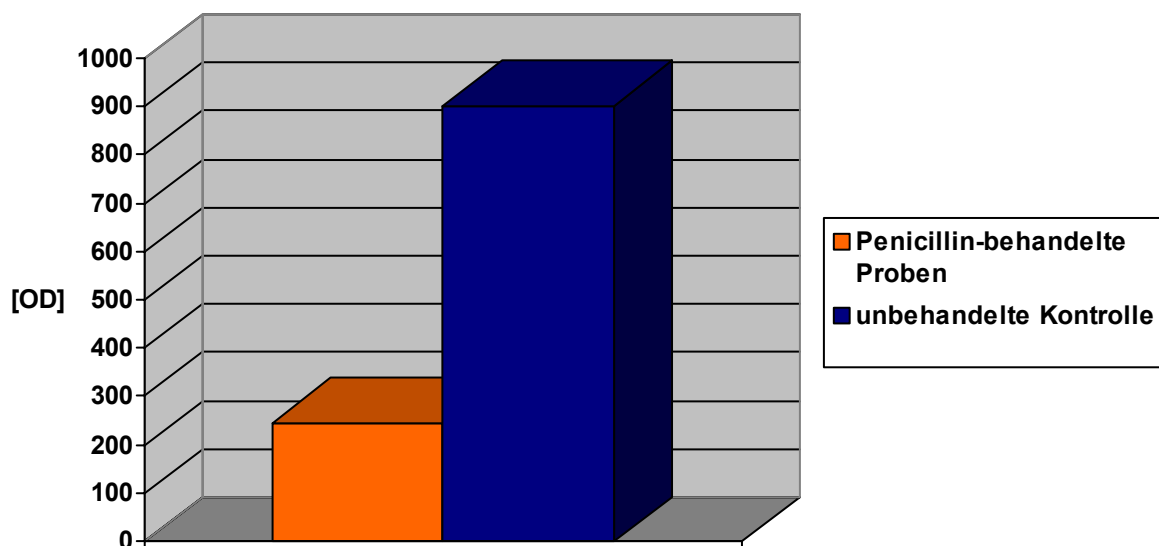
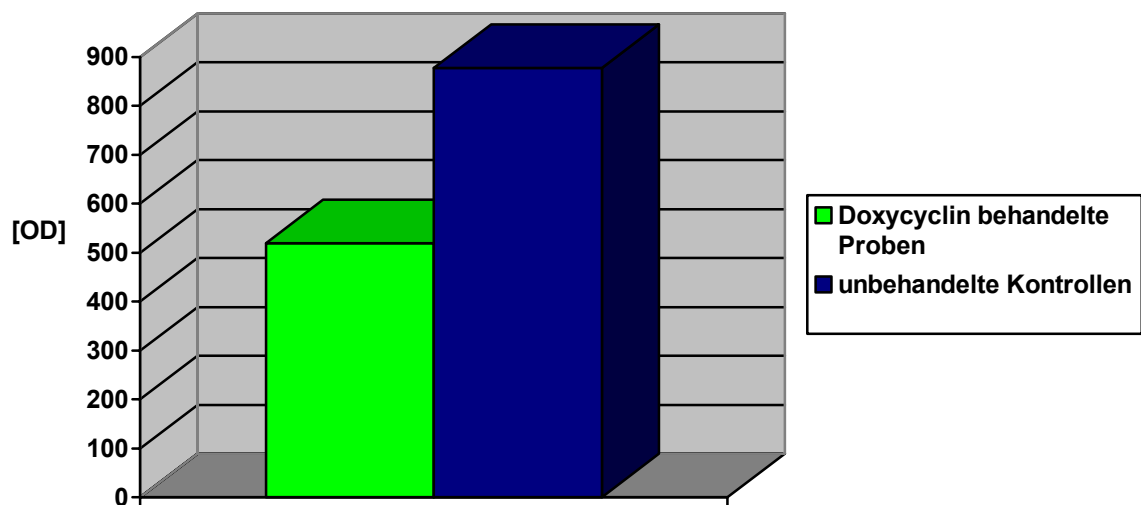
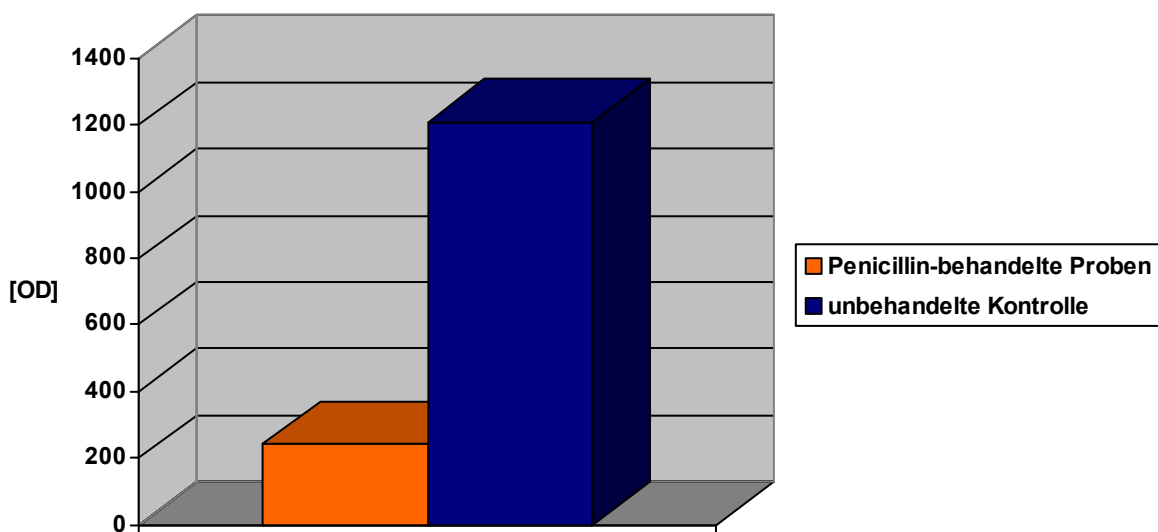
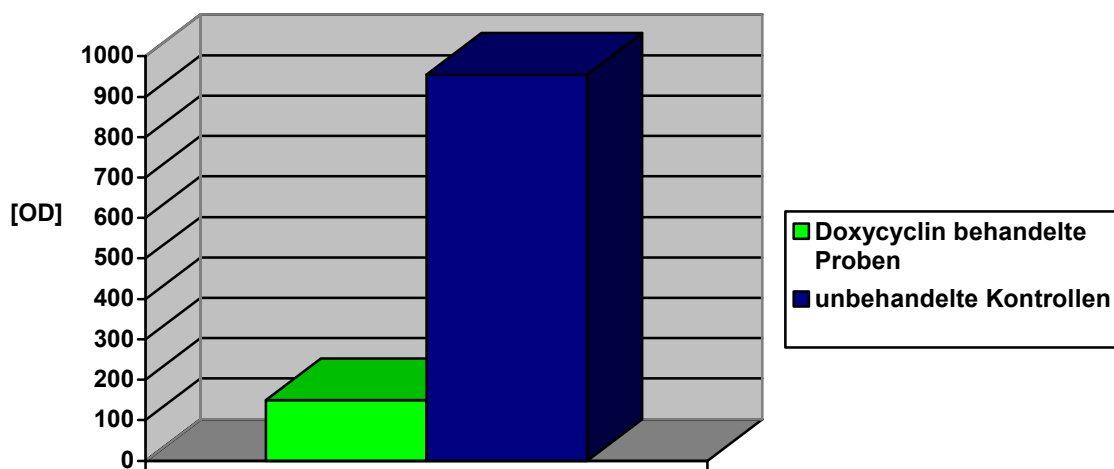


Abb. 28 Proteinspot D/P-4705

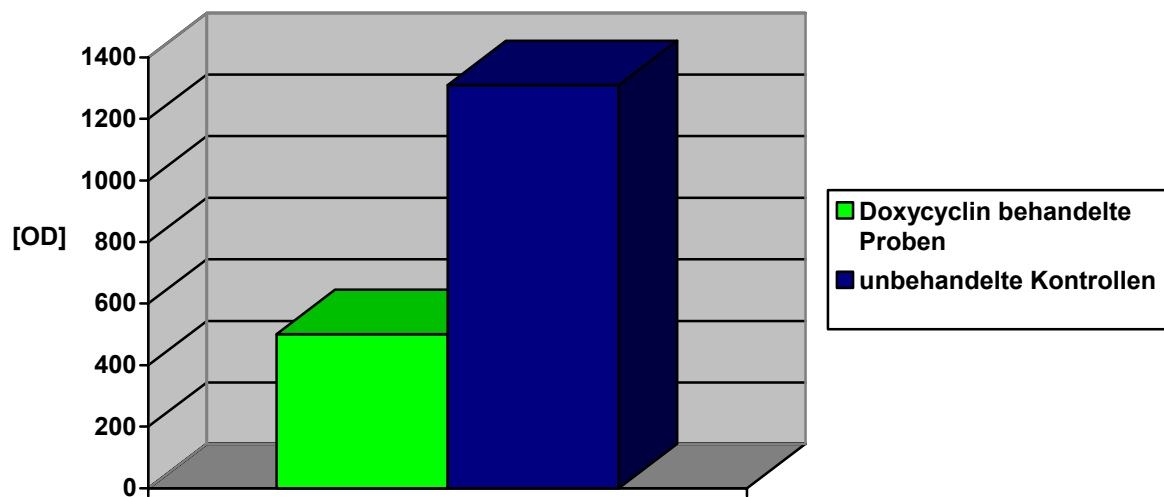
**Proteinspot D/P-7001**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS (Proteinnummer in Pubmed)
7,9	23	26,569	PFS Protein (Pfs-1) (AAC66764)

**Abb. 29** Proteinspot D/P-7001

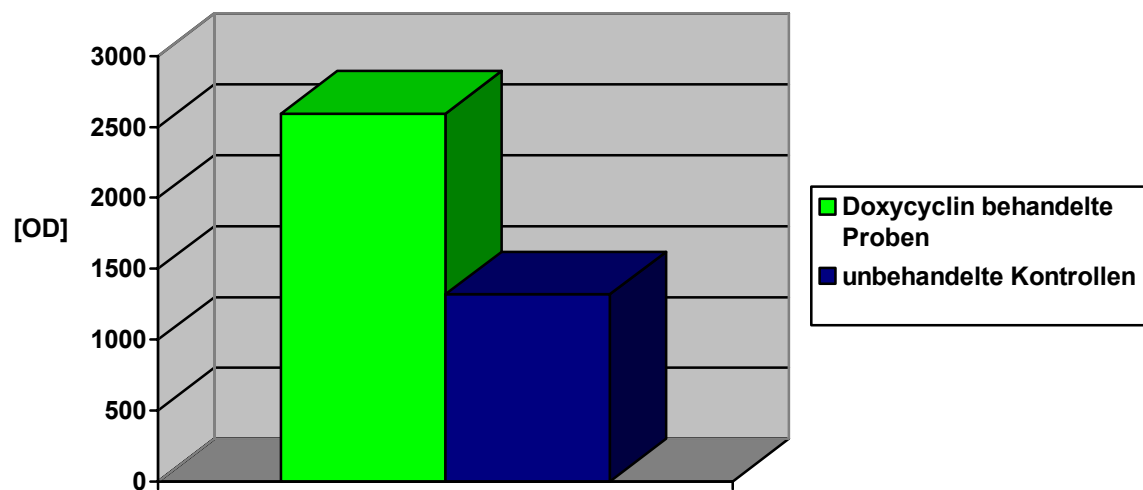
**Proteinspot D-0504**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS (Proteinnummer in Pubmed)
5,2	42	42,372	Zellteilungsprotein (FtsZ) (AAC66649)

**Abb. 30** Proteinspot D-0504

**Proteinspot D-4101**

pl anhand Gel	Molekülmasse [kD] geschätzt	Molekülmasse [kD] berechnet aus Datenbank	Identifiziertes Protein mittels MALDI-TOF MS (Proteinnummer in Pubmed)
6,4	26	27,984	Triosephosphatisomerase (AAC66452)

**Abb. 31** Proteinspot D-4101