

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Mikroglia-Aktivierung durch
Bestandteile von
*Borrelia burgdorferi sensu lato***

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen
vorgelegt von

Martha Töpfer

aus

Leinefelde

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. R. Nau
II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. H. Eiffert
III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön
Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Borreliose.....	1
1.1.1 Geschichtlicher Abriss.....	1
1.1.2 Borrelien und Vektoren.....	1
1.1.2.1 Outer Surface Protein C (OspC).....	2
1.1.2.2 P41.....	3
1.1.3 Inzidenz.....	4
1.1.4 Klinisches Bild.....	4
1.1.5 Diagnose.....	5
1.1.6 Neuroborreliose.....	6
1.1.6.1 Diagnose, Behandlung und Prognose der Neuroborreliose.....	7
1.1.6.2 Post-Lyme-Disease-Syndrom.....	8
1.2 Mikroglia.....	9
1.3 Zytokine.....	10
1.4 Ziele der Arbeit.....	11
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Geräte.....	12
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	12
2.3 Chemikalien.....	13

2.4 Mäuse.....	15
2.5 Medium.....	16
2.6 Herstellung von Borrelienbestandteilen.....	16
2.7 Präparation der Mikroglia.....	17
2.7.1 Zellernte.....	18
2.7.2 Stimulation der Mikroglia.....	18
2.7.3 Indirekte Quantifizierung der NO-Freisetzung durch photometrische Bestimmung von Nitrit im Überstand mittels Griess-Reagenz.....	20
2.7.4 Zusammenfassung der NO-Freisetzung von Mikroglia-kulturen.....	21
2.7.5 WST-1 Test.....	22
2.7.6 Quantifizierung der Zytokine mittels ELISA-Messung.....	23
2.7.7 Zusammenfassung der Zytokin-Freisetzung von Mikroglia-kulturen.....	24
2.8 Neuronenkulturen.....	24
2.8.1 Herstellung von Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen.....	25
2.8.2 Stimulation der Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen.....	25
2.8.3 Färbungen der Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen.....	26
2.8.4 Quantifizierung der neuronalen Schädigung in Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen.....	27

2.8.5 Zusammenfassung des Neuronenkultur/Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur-Experiments.....	27
2.9 Statistik.....	28
3 Ergebnisse.....	29
3.1 <i>Borrelia afzelii</i>	29
3.1.1 Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation.....	29
3.1.1.1 Natürliches OspC von <i>Borrelia afzelii</i>	29
3.1.1.2 Rekombinantes OspC von <i>Borrelia afzelii</i>	31
3.1.2 Interleukin-6-Freisetzung.....	32
3.1.3 TNF- α -Freisetzung.....	33
3.1.4 KC-Freisetzung.....	34
3.2 <i>Borrelia burgdorferi</i>	35
3.2.1 OspC - Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation...35	
3.2.1.1 Natürliches OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i>	35
3.2.1.2 Rekombinantes OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i>	37
3.2.2 OspC - Interleukin-6-Freisetzung.....	38
3.2.3 OspC - TNF- α -Freisetzung.....	39
3.2.4 OspC - KC-Freisetzung.....	40
3.2.5 P41 - Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation.....41	
3.2.5.1 Natürliches p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i>	41

3.2.5.2 Rekombinantes p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i>	43
3.2.6 P41 - Interleukin-6-Freisetzung.....	44
3.2.7 P41 - TNF- α -Freisetzung.....	45
3.2.8 P41 - KC-Freisetzung.....	46
3.3 <i>Borrelia spielmanii</i>	47
3.3.1 Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation.....	47
3.3.1.1 Rekombiantes OspC von <i>Borrelia spielmanii</i> mit PMB versetzt	47
3.3.1.2 Rekombinantes OspC von <i>Borrelia spielmanii</i> ohne PMB.....	48
3.4 Neuronen-Kulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen.....	49
3.4.1 Crossing - natürliches p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i>	49
3.4.2 Crossing - natürliches OspC von <i>Borrelia afzelii</i>	52
3.4.3 Crossing - natürliches OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i>	53
4 Diskussion.....	54
4.1 Auswertung.....	54
4.2 Post-Lyme-Disease-Syndrom.....	58
4.3 Rekombinante Proteine.....	60
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	62
6 Literaturverzeichnis.....	63
7 Anhang.....	75

7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	75
7.2 Tabellen/Abbildungen.....	79
7.3 Danksagung.....	86
7.4 Lebenslauf.....	87

1 Einleitung

1.1 Borreliose

1.1.1 Geschichtlicher Abriss

1959 beobachtete Familie Murray, dass nach ihrem Umzug in die Stadt Lyme (Connecticut) alle Familienmitglieder unspezifische Krankheitssymptome aufwiesen. Neben dermatologischen und neurologischen traten vor allem arthritische Beschwerden auf, die nach antibiotischer Behandlung nur vorübergehend verschwanden. Nachdem weitere Fälle mit ähnlichem Symptomkomplex auftraten, nahm Dr. Allen Steere (Rheumaklinik der Yale University) im Jahre 1975 die Forschungsarbeit zur Borreliose auf (Elbaum-Garfinkle 2011).

Die Erregersuche erwies sich als problematisch, da Wissenschaftler zunächst von einer Virus- oder Rickettsieninfektion ausgingen. Erst 1981/82 stieß Dr. Willy Burgdorfer bei der Untersuchung des Darmsackes von Schildzecken auf Spirochäten (Burgdorfer 1982,1983).

1.1.2 Borrelien und Vektoren

Borrelien sind gramnegative Bakterien, die zur Gruppe der Spirochäten gehören. Sie sind schraubenförmig gewunden und mobil. Eine äußere Zellmembran umschließt den protoplasmatischen Zylinder, der aus innerer Zellmembran, Zytoplasma und Proteoglykanen besteht. Im periplasmatischen Raum befinden sich Flagellen, die für die Mobilität der Bakterien verantwortlich sind. Somit sind Borrelien mit anderen pathogenen Bakterien wie Treponemen und Leptospiren verwandt (Barbour und Hayes 1986, Burgdorfer 1983).

Zur Gruppe der *Borrelia burgdorferi sensu lato* zählen 5 genotypisch verschiedene humanpathogene Spezies, die in Europa als Erreger der Borreliose bekannt sind: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia*

valaisiani und *Borrelia spielmanii* (Richter et al. 2004, Rijpkerna et al. 1997, Wilske et al. 2007).

Es sind 860 verschiedene Zeckenarten bekannt, die Vektoren für verschiedene Viren, Protozoen und auch Bakterien, wie z.B. Borrelien, sein können (Parola und Raoult 2001). Im europäischen Raum gilt *Ixodes ricinus* (gemeiner Holzbock) als häufigster Vektor, im nordamerikanischen Raum vorwiegend *Ixodes scapularis* (Hirschzecke) (Zimmerli 2003).

1.1.2.1 Outer Surface Protein C (OspC)

Vier Jahre nach der Entdeckung von *Borrelia burgdorferi* wurde ein 22 kDa schweres Oberflächenprotein der äußeren Zelloberfläche identifiziert, das später Outer surface Protein C genannt wurde (Fuchs et al. 1992, Wilske et al. 1986). Mittlerweile ist eine Vielzahl solcher Lipoproteine bekannt. OspC, das in dieser Arbeit verwendet wurde, ist ein sehr heterogenes Protein, dessen Identitätsgrad der Aminosäuren zwischen den einzelnen Spezies bei 71-75 % liegt.

Es wurde gezeigt, dass OspC ein Speichelprotein der Zecken (Slap15) *in vitro* und *in vivo* bindet. Somit hat es wahrscheinlich eine Funktion in der Transmission der Borrelien auf den Wirt (Ramamoorthi et al. 2005). OspC-defiziente Borrelien sind nicht in der Lage, den murinen Wirt zu infizieren (Grimm et al. 2004, Tilly et al. 2006).

Neben OspC exprimieren Borrelien auch ein weiteres Oberflächenprotein, das Outer surface Protein A (OspA). Borrelien-infizierte Zecken exprimieren nüchtern mehr OspA als OspC. Nach einer Blutmahlzeit scheint es zu einem Anstieg der Produktion von OspC zu kommen. Mit dem Anstieg des OspC-Spiegels im Darm von bereits infizierten Zecken wird die Produktion von OspA herunterreguliert. Im Gegensatz hierzu überwiegt bei der Neuinfektion von Zecken durch bereits infizierte Mäuse die OspA-Produktion im Darm der Zecken (Schwan und Piemann 2000). In Patienten wurden während der frühen Infektion mit Borrelien erhöhte Level von IgM- und

IgG-Antikörpern gegen OspC nachgewiesen (Engstrom et al. 1995).

Folglich ist OspC ein obligater Virulenzfaktor, der bei der Übertragung auf den Wirt bereits zu Beginn der Infektion exprimiert wird und anscheinend einen Schlüsselfaktor während der frühen Infektion darstellt.

Deshalb ist OspC neben OspA ein Hoffnungsträger für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Borreliose (Fikrig et al. 1990, Preac-Mursic et al. 1992, Schaible et al. 1990). Aufgrund der Tatsache, dass in Europa hauptsächlich 3 verschiedene Spezies für die Borrelieninfektionen verantwortlich sind, ist es schwer, ein geeignetes Vakzin herzustellen. Im Tiermodell ist die passive Immunisierung mit rekombinanten OspA- und OspC-Proteinen bereits geglückt (Preac-Mursic et al. 1992). Mittlerweile wurden Phase 1- und Phase 2-Studien zu einem neu entwickelten Impfstoff durchgeführt (Wressnigg et al. 2013).

1.1.2.2 P41

P41 ist ein für Borrelien unspezifisches Antigen. Es wurde auch bei anderen Flagellen-tragenden Bakterien wie Spirochäten, Treponemen und Leptospiren gefunden. Bei p41 handelt es sich um ein Antigen aus dem zentralen Achsenzylinder der Flagellen, das bei der Borreliose die Bildung der ersten Antikörper bewirkt (Coleman und Benach 1987). Die Zusammensetzung des Proteins ist noch nicht ganz geklärt, jedoch handelt es sich nicht um ein Lipoprotein (Rasiah et al. 1992). P41 ist ein sehr homogenes Oberflächenprotein mit einem Identitätsgrad von 93-96 % zwischen den einzelnen Borrelienspezies (Wilske et al. 1999).

1.1.3 Inzidenz

Borreliose gilt als häufigste durch einen Zeckenstich übertragene Krankheit. Sie hat eine Inzidenz von 100-130 Fällen je 100000 Einwohner in Europa (Huppertz et al. 1999). Die Durchseuchungsrate der Zecken lag 1985 in Süddeutschland zwischen 11,4 % und 33,8 %. Auch Nymphen und Larven können Reservoir für Borrelien sein (Wilske et al. 1987). In Connecticut, dem Staat, in dem die Stadt Lyme als „Ursprungsort“ der Borreliose liegt, lag die Inzidenz im Jahr 2005 bei 11-173 Fällen je 100000 Einwohner (Ertel et al. 2005).

Während in Nordamerika nur *Borrelia burgdorferi sensu stricto* als Erreger der Borreliose gefunden wurde, ist das Erregerspektrum in Europa vielfältiger. Im europäischen Raum sind 3 Genospezies bekannt, die vorzugsweise das Krankheitsbild der Borreliose auslösen: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* (Baranton et al. 1992, Busch et al. 1996, Canica et al. 1993). *Borrelia spielmanii* ist eine weitere humanpathogene Spezies, die im letzten Jahrzehnt in Hautbiopsien von Erythema migrans-Patienten in den Niederlanden gefunden und beschrieben wurde (Richter et al. 2006, Richter et al. 2011). Ebenso wurde *Borrelia valaisiana* in Hautisolaten von 2 Patienten mit Erythema migrans gefunden (Wang et al. 1997).

1.1.4 Klinisches Bild

Borreliose ist eine multisystemische Erkrankung. Die unterschiedlichen Borrelienspezies verursachen heterogene Krankheitsbilder. So wurde vor allem *Borrelia afzelii* in Hautbiopsien gefunden, vorwiegend bei solchen Patienten, die eine Acrodermatitis chronica atrophicans, eine chronische Hautläsion, hatten (Canica et al. 1993, Ohlenbusch et al. 1996, Wilske et al. 1999). *Borrelia garinii* hingegen wurde gehäuft in Zeckenisolaten und im Liquor von Borreliosepatienten gefunden (Eiffert et al. 1995, van Dam et al. 1993, Wilske et al. 1996). *Borrelia burgdorferi sensu stricto* wurde sowohl im Liquor als auch in Gelenkpunktaten und in der Haut betroffener Patienten

nachgewiesen (Wilske et al. 2007). Die Lyme-Arthritis wird von allen 3 Subspezies verursacht (Eiffert et al. 1998).

Die Borreliose wird in 3 Stadien eingeteilt. Während der frühen Infektionsphase (Tage bis Wochen nach dem Zeckenstich) treten häufig ein lokalisiertes Erythema migrans, eine lokoregionäre Lymphadenitis und grippale Allgemeinbeschwerden auf. Im Stadium 2 (Wochen bis Monate nach dem Zeckenstich) disseminiert die Infektion. Die Spirochäten werden über den Blut- und Lymphweg im gesamten Körper verteilt und befallen Haut sowie das Nerven- und muskuloskelettale System. Es kann zur Meningoradikulitis, Meningitis, peripheren Facialisparesen, Enzephalitis, Myelitis, zerebralen Arteriitis, einem Borrelienlymphozytom, Myo-, Peri- und Pankarditis sowie zur Myositis und Arthritis kommen. Im späten Infektionsstadium 3 (Monate bis Jahre nach dem Zeckenstich) persistiert die Infektion. Es können sich irreversible Schädigungen zeigen. Vorwiegend tritt eine chronische Arthritis auf. Es kann aber auch zu Enzephalitiden, kognitiven Beeinträchtigungen, Polyneuropathien, zerebraler Arteriitis und zur Acrodermatitis chronica atrophicans kommen (Steere 2001).

1.1.5 Diagnose

Die Diagnose „Borreliose“ wird in erster Linie anhand des Symptombildes und nach Ausschluss von Differentialdiagnosen gestellt. Pathognomisch für die Borreliose ist beispielsweise das Erythema migrans. Zur Untermauerung der Diagnose folgt die Labordiagnostik (Santino und Longobardi 2011). Der serologische Nachweis von Borrelien erfolgt indirekt über den Antikörpernachweis. In besonderen Fällen ist ein direkter Erregernachweis indiziert (Wilske et al. 2007).

1.1.6 Neuroborreliose

Die Neuroborreliose wird in eine akute und eine chronische Phase unterteilt. Das Symptombild der akuten Neuroborreliose erstreckt sich von Radikulitiden spinaler Nerven und Hirnnerven über zerebrale Vaskulitiden bis hin zur Myositis (Pachner und Steere 1985, Reimers et al. 1993, Schmutzhard et al. 1986).

Die typische Manifestation einer akuten Neuroborreliose im europäischen Raum ist das Bannwarth-Syndrom, eine schmerzhafte Meningoradikuloneuritis, deren Symptome erstmals 1922 beschrieben wurden (Garin und Bujadoux 1922). Die Ätiologie der Erkrankung war jedoch bis zur Entdeckung der Spirochäten durch Burgdorfer und deren gelungene Isolation aus dem Liquor von Patienten unklar (Pfister et al. 1984). Eine Meningoradikuloneuritis beginnt häufig 6 bis 8 Wochen nach Zeckenstich oder Erythema migrans. Oft treten die ersten Symptome nachts auf und äußern sich in einem radikulären, brennenden, bohrenden Schmerz, der sich über den gesamten Körper erstreckt und dessen Lokalisation wechseln kann. Etwa 1 bis 4 Wochen später treten neurologische Dysfunktionen wie Paresen und Sensibilitätsstörungen auf. 60 % der Patienten mit Bannwarth-Syndrom leiden unter einer ein- oder beidseitigen Parese des Nervus facialis (Kaiser 1998). Selten werden Meningitiden bei Erwachsenen beschrieben (Hansen und Lebech 1992, Sindic et al. 1987). Bei Kindern werden vor allem Facialisparesen und isolierte lymphozytäre Meningitiden als Symptome einer akuten Neuroborreliose beobachtet (Christen et al. 1993).

Eine chronische Neuroborreliose ist sehr selten. Es kommt hierbei meist zur Myelitis mit spastisch-ataktischen Gang- und/oder Blasenstörungen bis hin zu schweren Para- oder Tetraparesen. Auch extrapyramidale Manifestationen und Vaskulitiden als Folge der lymphozytären Infiltration wurden beschrieben (Nau et al. 2009).

Die genaue Pathogenese der Neuroborreliose ist bis heute ebenso ungeklärt wie der genaue Mechanismus zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (Garcia-Monco et al. 1990, Grab et al. 2005).

1.1.6.1 Diagnose, Behandlung und Prognose der Neuroborreliose

Die Diagnose „Neuroborreliose“ wird anhand der klinischen Symptome, eines borrelienspezifischen IgM- und IgG-Antikörpernachweises im Serum sowie des Nachweises eines entzündlichen Liquors mit lymphozytärer Pleozytose und intrathekaler Synthese borrelienspezifischer Antikörper (IgM und/oder IgG) gestellt. In vereinzelten Fällen wird eine Borrelienkultur oder PCR aus dem Liquor angefertigt, da z.B. in der Frühphase der Infektion der borrelienspezifische Antikörperindex noch negativ sein kann (Nau et al. 2009).

Die Prognose der Neuroborreliose ist nach adäquater antibiotischer Behandlung sehr gut (Steere et al. 1980,1983). Diese besteht in der intravenösen Verabreichung von Ceftriaxon, wahlweise kann auch Penicillin G i.v. oder Doxycyclin p.o. verabreicht werden (Leitlinie Neuroborreliose vom 10.01.2011, siehe Tabelle 1, 2).

Es gibt jedoch auch Studien, die von einer Persistenz der Borrelien trotz adäquater Therapie mit wiederholten Krankheitsepisoden berichten (Preac-Mursic et al. 1989).

Akute Neuroborreliose

Doxycyclin	2-3 × 100 mg/d p. o.**	14 Tage
Ceftriaxon*	1 × 2 g/d i. v.	14 Tage
Cefotaxim*	3 × 2 g/d i. v.	14 Tage
Penicillin G*	18-24 Mio. E/d i. v.	14 Tage

(* alternativ, ** optimale Tagesdosis derzeit unklar)

Tabelle1: Empfohlenes Therapieschema der akuten Neuroborreliose laut Leitlinie für Neuroborreliose vom 10.01.2011.

Chronische Neuroborreliose

Ceftriaxon*	1 × 2 g/d i. v.	14-21 Tage***
Cefotaxim*	3 × 2 g/d i. v.	14-21 Tage***
Penicillin G*	18-24 Mio. E/d i. v.	14 Tage
Doxycyclin	2-3 × 100 mg/d p. o.**	14-21 Tage***

(* alternativ, ** optimale Tagesdosis derzeit unklar,*** optimale Therapiedauer derzeit unklar)

Tabelle2: Empfohlenes Therapieschema der chronischen Neuroborreliose laut Leitlinie für Neuroborreliose vom 10.01.2011.

1.1.6.2 Post-Lyme-Disease-Syndrom

Das sogenannte „Post-Lyme-Disease-Syndrom“ ist eine Ansammlung chronischer unspezifischer Symptome, die mit einer positiven Borrelienserologie assoziiert sind. Zu diesen gehören vor allem Arthralgien, Myalgien, Müdigkeit, Konzentrations- und Schlafstörungen (Asch et al. 1994, Fallon et al. 1998). Das Post-Lyme-Disease-Syndrom ist ein eigenständiges Krankheitsbild mit chronischem Verlauf. Es ist Folge einer längstens vor 6 bis 12 Monaten durchgemachten Borreliose, die unbehandelt blieb oder antibiotisch behandelt wurde. Im Unterschied zur chronischen Borreliose kommt es, unabhängig von den im Stadium 2 auftretenden Beschwerden, zu einem Organwechsel.

Problematisch bei der Diagnose eines Post-Lyme-Disease-Syndroms ist, dass eine positive Serologie auch bei 5-25 % der gesunden Allgemeinbevölkerung nachzuweisen ist, sodass kein zwingender Zusammenhang zwischen Symptomen und Serologie besteht (Baird et al. 1989, Fahrer et al. 1991, Smith et al. 1991). Dadurch findet teilweise eine Überdiagnose des Post-Lyme-Disease-Syndroms statt, wodurch andere Krankheiten unentdeckt bleiben, die die Symptome eines Post-Lyme-Disease-Syndroms imitieren oder eine große Schnittfläche an Symptombildern mit diesem haben (Ljøstad und Mygland 2012). Auch Djukic et al. kamen 2010 zu dem Ergebnis,

dass eine chronische Lyme-Neuroborreliose und das Post-Lyme-Disease-Syndrom selten sind und die unspezifischen Symptome meist aufgrund einer anderen Erkrankung auftreten. Eine positive Borrelienserologie wurde in dieser Studie häufiger bei Patienten mit anderen Grunderkrankungen gefunden (Djukic et al. 2010).

1.2 Mikroglia

Mikroglia sind ontogenetisch den mononuklearen Phagozyten zuzuordnen. Dies unterscheidet sie von allen anderen Zelltypen des Zentralen Nervensystems (Chan et al. 2007). Die Aktivierung von Mikroglia hängt von der Homöostase ab (Dissing-Olesen et al. 2007). Einerseits haben sie supportive und protektive Funktionen, andererseits können sie zur Nervenschädigung beitragen. Ihre Aktivierung ist ein Schlüsselfaktor zum Schutz des neuronalen Parenchyms bei Infektionskrankheiten, Inflammation, Traumata, Ischämie, Hirntumoren und Neurodegeneration (Kreutzberg 1996). Die Kommunikation zwischen Mikroglia und umliegendem Milieu erfolgt durch verschiedene Rezeptoren, die eine Störung der Homöostase sensibel erfassen. Nach Stimulation durchlaufen die Mikroglia ein Stufenschema bis zur Entfaltung ihrer vollen Funktion (Hanisch 2002, Kreutzberg 1996). Unter anderem sind auch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Stickstoffmonoxid (NO) und Interferon- γ (IFN- γ) an der Zellkommunikation beteiligt, die einen Neuronenschaden fördern können (Hanisch 2002, Knauer et al. 2014). Vor allem die Freisetzung von TNF- α und Stickstoffmonoxid wirkt neurotoxisch auf das Hirngewebe (Iliev et al. 2004). Eine Studie von Widhe et al. aus dem Jahr 2004 zeigt, dass persistierend erhöhte IFN- γ -Spiegel bei Patienten mit chronischer Neuroborreliose zu finden sind (Widhe et al. 2004).

Die wichtigsten Aufgaben aktivierter Mikroglia sind Phagozytose, Antigenpräsentation und Zytokin-Freisetzung (Hanisch 2002). *In vitro*-Experimente zeigten, dass Mikroglia von T-Zellen aktiviert werden und daraufhin myelinisierte Fasern phagozytieren (Gimsa et al 2000). In Bezug auf Spirochäten wurde erforscht, dass Mikroglia in der Lage sind, diese zu töten und zu phagozytieren, ohne dass eine vorherige Opsoni-

sierung erfolgte (Kuhlow et al. 2005). Weiterhin wurde herausgefunden, dass eine intrathekale Langzeitexposition von OspC-Proteinen, die borrelienspezifisch sind, die axonale Schädigung fördern (Tauber et al. 2011).

Bei verschiedenen chronischen Erkrankungen mit zerebraler Beteiligung wie Multipler Sklerose (MS), Acquired Immune Deficiency Syndrom (AIDS), zerebraler Malaria und Tuberkulose ist eine inflammatorische Reaktion von Mikroglia und Makrophagen charakteristisch (González-Scarano und Baltuch 1999). Auch eine Studie von Lehnardt et al. aus dem Jahr 2003 zeigte, dass aktivierte Mikroglia neuronale Zellverbände schädigen können (Lehnardt et al. 2003).

1.3 Zytokine

Mikroglia setzen bei ihrer Aktivierung, wie in 1.2 beschrieben, Zytokine frei. Diese scheinen bei entzündungsvermittelten Prozessen eine duale Rolle einzunehmen. Mikroglia synthetisieren IL-1 β , welches zur Produktion von TNF- α , IL-6 und NO führt (Giulian et al. 1986). Unter normalen Bedingungen exprimieren Mikroglia hauptsächlich antiinflammatorische Proteine [IL-10, Transforming Growth Factor (TGF)-1 β]. Kommt es zur Störung des herkömmlichen Milieus, führen schon kleine pathologische Veränderungen zur verstärkten Synthese proinflammatorischer Zyto- und Neurokine (IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ und TNF- α) (Xiao et al. 1996).

IL-6 ist ein pleiotropes proinflammatorisches Protein. *In vivo*-Experimente zeigten bereits, dass IL-6 zu einem Anstieg der Phagozytoserate von Mikroglia führt (Chakrabarty et al. 2010).

TNF- α wird durch aktivierte Mikroglia freigesetzt und spielt bei demyelinisierenden Erkrankungen sowohl eine Rolle bei der De- als auch bei der Remyelinisierung (Arnett et al. 2001).

KC ist ein murines Homolog des humanen IL-8. Es wird von Mikroglia nach bakterieller Stimulation produziert. IL-8 wiederum ist ein CXC-Protein und gilt als

höchst potenter Stimulator der Chemotaxis von Neutrophilen *in vitro* und *in vivo* (Harada et al. 1994).

1.4 Ziele der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist es festzustellen, ob die Aktivierung von Mikroglia durch Borrelienbestandteile zu einem dauerhaften Neuronenschaden führt. Im ersten Schritt der Arbeit wurde die Aktivierung von Mikroglia durch die natürlichen und rekombinant hergestellten Borrelienbestandteile p41 von *Borrelia burgdorferi* und OspC von *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii* und *Borrelia spielmanii* untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen dieser Proteine zu den Mikroglia-kulturen gegeben und die Freisetzung von Nitrit (als stabiles Reaktionsprodukt von NO), IL-6, TNF- α und KC gemessen. Auf Grundlage der Ergebnisse wurden ausgewählte Proteine in der potentesten Konzentrationsstufe zur Stimulation der Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen verwendet und der Neuronenschaden quantifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Motor-Pipettierhelfer	Brand (Wertheim, D)
Inkubator	Heraeus (Hannover, D)
Sterilbank-Laminair®	Heraeus (Hannover, D)
Zentrifuge	Heraeus (Hannover, D)
Wasserbad	GFL (Burgwedel, D)
Mikroskop (binokulares)	Olympus (Hamburg, D)
Bunsenbrenner	Schütt (Göttingen, D)
Neubauer-Zählkammer	Schütt (Göttingen, D)
Eismaschine	Scotsman-Enodis (Sprockhövel, D)
Autoklav	Systemec (Wettenberg, D)
ELISA-Reader	Tecan Spectra (Crailsheim, D)
Schüttelplatte „rotomix“	Zeipel (Bovenden, D)
VortexREAX top	Heidolph (Schwabach, D)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Pinzetten	Aesculap (Tuttlingen, D)
Schere	Aesculap (Tuttlingen, D)
Parafilm	American National Can (Menasha, USA)
Skalpell	Dahlhausen (Köln, D)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
24-, 96-Loch-Gewebekulturplatten	Greiner (Frickenhausen, D)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen, D)
Zellkulturflaschen	Greiner (Frickenhausen, D)

13 mm-Coverslips	Menzel (Braunschweig, D)
Deckgläser (24 x 32 mm)	Menzel (Braunschweig, D)
10 ml-Pipetten	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Eppendorf-Cups	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Reagenzröhren (10 ml ;50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Pipetten Tips	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Schraubenbecher (100 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, D)

2.3 Chemikalien

Kohlenstoffmonoxid (CO)	Air-Liquide (Düsseldorf, D)
Glutamin	Biochrom AG (Berlin, D)
Hanks Buffered Salt Solution (HBSS)	Biochrom AG (Berlin, D)
Penicillin/Streptomycin (PS)	Biochrom AG (Berlin, D)
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG (Berlin, D)
Trypsin	Biochrom AG (Berlin, D)
Aqua, destilliert	Braun (Melsungen, D)
Microtubuli assoziiertes Protein 2 (MAP2)	Chemicon (Hofheim, D)
Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	DAKO (Glostrup, DK)
Alkalische-Phosphatase-Anti-	DAKO (Hamburg, D)
Alkalische-Phosphatase (APAAP)	
HRP-Diluent	DAKO (Hamburg, D)

Polyklonaler Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (reagiert mit allen Immunglobulinklassen)	DAKO (Hamburg, D)
Tetramethylbenzidine (TMB)	DAKO (Hamburg, D)
Tris-buffered saline (TBS)	DAKO (Hamburg, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Delta Select (Pfullingen, D)
B27	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, D)
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, D)
Fetal calf serum (FCS)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, D)
Neurobasalmedium	Gibco Invitrogen (Karlsruhe, D)
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck (Darmstadt, D)
Formalin	Merck (Darmstadt, D)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck (Darmstadt, D)
Hämalaun	Merck (Darmstadt, D)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumazid (NaN ₃)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumphosphat (Na ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck (Darmstadt, D)
Neufuchsin	Merck (Darmstadt, D)
Sucrose	Merck (Darmstadt, D)

Water Soluble Tetrazolium (WST-1)	Roche (Mannheim, D)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane Hydrochloride (Tris/HCl)	Roth (Karlsruhe, D)
Tween	Roth (Karlsruhe, D)
DePeX	SERVA (Heidelberg, D)
Trypanblau-Lösung	Sigma (Deisenhofen, D)
Interferon- γ	Sigma (Steinheim, D)
Poly-L-Lysin	Sigma (Steinheim, D)
Sulfonamid	Sigma (Steinheim, D)
Triton X-100	Sigma (Steinheim, D)
Endotoxin	Sigma- Aldrich (Taufkirchen, D)
(Lipopolysaccharid = LPS, <i>E. coli</i> Serotyp 026:B6)	
Naphthyl-ethylendiamin Dichlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Desoxyribonuclease I	Worthington (Lakewood, NJ)

MT-PBS ist ein Phosphatpuffer, der aus 150 mM NaCl, 16 mM Na₂PO₄ sowie 4 mM NaH₂PO₄ hergestellt wurde.

2.4 Mäuse

Die Versuche wurden mit neugeborenen C57/Bl6J-Mäusen (postnatal Tag 0-2, Wildtyp) durchgeführt, die von der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) gezüchtet wurden. Von diesen wurden Mikroglia isoliert und kultiviert. Für die Präparation von Neuronen für Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen und Neuronenkulturen wurden adulte C57/Bl6J Mäuse 17 Tage zuvor verpaart, die Hirne der Embryonen präpariert und kultiviert.

Das Verhältnis zwischen Neuronen und Mikroglia betrug in den Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen 2:1.

2.5 Medium

Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) ist ein Nährmedium, das mit Aminosäuren, anorganischen Salzen, Vitaminen und weiteren Bestandteilen angereichert ist. Es wird zur Anlegung von tierischen und humanen Zellkulturen verwendet. Zur Mikrogliapräparation wurde es zusätzlich mit fetalem Kälberserum (FCS) und mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PS) versetzt.

Neurobasalmedium mit B27-Supplement ist ein zur Präparation von pränatalen Neuronenzellen verwendetes Medium. Das Homogenisieren neuronaler Zellen kann durch dieses ohne Astrozytenrasen erfolgen. Es besteht ebenfalls aus einer Zusammensetzung von Aminosäuren, Vitaminen, anorganischen Salzen und anderen Bestandteilen.

2.6 Herstellung von Borrelienbestandteilen

Die Borrelienbestandteile wurden für die Versuche nicht selber hergestellt, sondern von der Firma Sekisui Virotech zur Verfügung gestellt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Herr Dr. Kugelstadt stellte freundlicher Weise rekombinantes und natives OspC von *Borrelia burgdorferi* und *Borrelia afzelii* sowie rekombinantes und natives OspC von *Borrelia spielmanii* und rekombinantes und natives p41 von *Borrelia burgdorferi* für die Experimente zur Verfügung.

Aufgrund der schwierigen Präparation nativer Borrelienbestandteile konnten in dieser Arbeit nur exemplarisch Daten für die Zytokin-Freisetzung erhoben werden. Das Konzentrationsmaximum von 10 µg/ml reichte nicht zur maximalen Stimulation.

2.7 Präparation der Mikroglia

Wie bereits unter 2.4 erwähnt wurden die Mikroglia von Gehirnen neugeborener C57/Bl6J-Mäuse präpariert (p 0-2, Wildtyp) (Ebert et al. 2005). Pro 2 Hirne wurde je eine Kulturflasche mit 10 ml Poly-L-Lysin zur Verbesserung der Zelladhäsion vorbereitend beschichtet. Nach Dekapitation der Mäuse wurden die Meningen erst makroskopisch danach mikroskopisch entfernt. Anschließend wurden alle Hirne mit 3 mal 10 ml Hanks Buffered Salt Solution (HBSS) gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl Trypsin pro Hirn wurden adhärenente Zellen gelöst, extrazelluläre Proteine gespalten und die Zellen anschließend nach mechanischer Dissoziation durch Schütteln mit dem Vortex 3 mal 5 Minuten in 37 °C warmem Wasserbad inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml DMEM pro Hirn mit Supplement von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und Penicillin/Streptomycin (PS). Anschließend erfolgte durch 40 µl DNase pro Hirn die weitere enzymatische Spaltung. Die Reagenzröhre wurde bei 4 °C und 900 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Die anfänglich beschichteten Zellkulturflaschen wurden 3 mal mit 10 ml sterilem bidestillierten Wasser und 1 mal mit 5 ml DMEM + FCS + PS gewaschen. Anschließend wurden 10 ml DMEM + FCS + PS in jede Flasche pipettiert. Das Pellet der abzentrifugierten Reagenzröhre wurde nach Abnahme des Überstandes mit 5 ml DMEM + FCS + PS pro Kulturflasche resuspendiert. Die Aussaat von 5 ml pro Zellkulturflasche erfolgte nach gründlicher Durchmischung der Lösung. Die Aussaat entsprach 2 Hirnen pro Flasche. Die Flaschen wurden bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre bei 5 % CO₂ inkubiert. Das Kulturmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Am Tag nach der Präparation wurden die Zellen mit 3 mal 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) und 5 ml DMEM + FCS + PS gereinigt und die Flaschen mit 10 ml DMEM + FCS + PS erneut aufgefüllt.

2.7.1 Zellernte

Die Zellernte erfolgte am 10. Tag der Inkubation. Nach 30-minütigem Schütteln der Zellkulturflaschen mit dem Rotomix wurde der Überstand mit den flottierenden Zellen von 4 Flaschen in eine Reagenzröhre überführt und ein neues Medium (DMEM + FCS + PS) appliziert. Die Reagenzröhrchen wurden bei Raumtemperatur und 900 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf 3 ml verworfen und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Nach 1:10 Verdünnung von 10 µl Zellsuspension in Trypanblau wurde die Zelldichte durch Auszählung mit einer Neubauerkammer bestimmt. Die Aussaat erfolgte nach Verdünnung in 96-Loch-Platten mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Kavität. Anschließend wurden die Platten erneut 24 Stunden bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert.

2.7.2 Stimulation der Mikroglia

Zur Aktivitätsbestimmung der Mikroglia wurden verschiedene Proteine der äußeren Zellmembran von unterschiedlichen Borrelienspezies verwendet. Weiterhin wurde die Aktivität natürlicher Proteine mit derjenigen verglichen, die ein biotechnisch hergestelltes Äquivalent darstellen sollten (rekombinante Proteine). Die unterschiedlichen Proteine wurden wie folgt verdünnt:

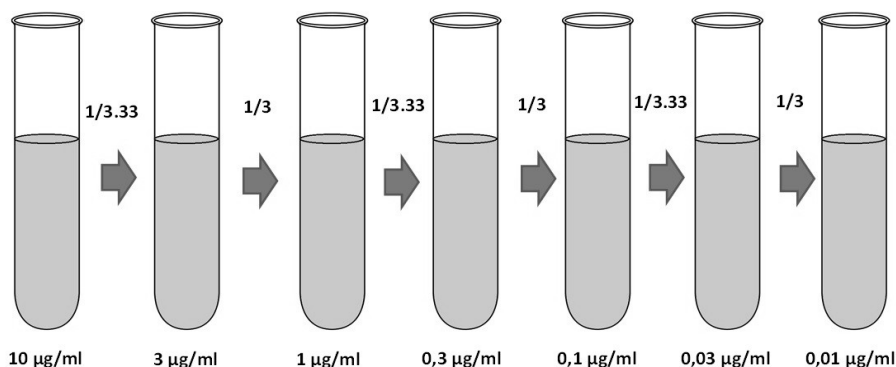


Abbildung 1: Dargestellt ist die angefertigte Verdünnungsreihe zur Verdünnung der zu untersuchenden Proteine.

Für die indirekte Messung der Stickstoffmonoxidfreisetzung (NO-Freisetzung) über Nitrit wurden diese Verdünnungen mit DMEM und FCS sowie IFN- γ angefertigt (Ebert et al. 2005). Für die Messung der Zytokine wurde das gleiche Medium ohne IFN- γ verwendet. Die unstimulierte Gruppe wurde mit unterschiedlichen Pufferreagenzien im jeweils niedrigsten Verdünnungsverhältnis angesetzt (siehe folgende Tabelle 3). Um eine LPS-Kontamination der Borrelienbestandteile auszuschließen, sendeten wir Proben an das Leibniz-Forschungszentrum Borstel. Rekombinantes OspC von *Borrelia spielmanii* wies in der Endotoxinanalyse grenzwertige Messwerte auf. Zur Vermeidung einer Aktivierung durch LPS-Kontamination wurde in einem Teil der Versuche mit rekombinantem OspC von *Borrelia spielmanii* 10 $\mu\text{g/ml}$ Polymyxin B hinzugefügt, welches den Effekt von LPS durch Bindung blockt.

Protein	unstimulierte Gruppe
OspC von <i>Borrelia afzelii</i> natürlich	PBS
OspC von <i>Borrelia afzelii</i> rekombinant	Tris/HCl
OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i> natürlich	PBS
OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i> rekombinant	Tris/HCl
OspC von <i>Borrelia spielmanii</i> rekombinant	Tris/HCl
p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i> natürlich	MT-PBS
p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i> rekombinant	MT-PBS

Tabelle 3: Dargestellt sind die jeweiligen unstimulierten Gruppen. Das jeweilige Pufferreagenz ist dem Stimulanz zugeordnet.

Nach Entfernung des über 24 Stunden inkubierten Mediums der Mikroglia-tragenden 96-Loch-Platten wurden je 100 µl zur Messung der NO-Freisetzung und 60 µl zur Messung der Zytokinkonzentration verwendet. Weiterhin wurden vergleichend Mikroglia mit LPS stimuliert (LPS = 1 µg/ml). Anschließend wurden die Platten erneut 24 Stunden bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Der Überstand der für die Zytokinbestimmung vorgesehenen Platten wurde bis zur Bestimmung der Zytokine bei -20 °C aufbewahrt.

2.7.3 Indirekte Quantifizierung der NO-Freisetzung durch photometrische Bestimmung von Nitrit im Überstand mittels Griess-Reagenz

Stickstoffmonoxid (NO) als Modulator vieler physiologischer Prozesse wird unter anderem auch von Mikroglia freigesetzt (Corradin et al. 1993). Durch die Freisetzung von NO können Neuronen geschädigt werden (Boje und Arora 1992). In dieser Arbeit wurde die NO-Freisetzung von Mikroglia-kulturen nach 24- und 48-stündiger Stimulation mit OspC von verschiedenen *Borrelia*-Spezies und des Flagellin p41 der *Borrelia*-art *Borrelia burgdorferi* untersucht. Die einbezogenen Proteine waren natürliches und rekombinantes OspC von *Borrelia afzelii* und *Borrelia burgdorferi* sowie rekombinantes OspC der Unterart *Borrelia spielmanii*. Die Messung der NO-Freisetzung erfolgte indirekt durch die Messung von Nitrit mittels Griess-Reagenz. Die Akkumulation von Nitrit als nicht flüchtiges und stabiles Abbauprodukt von NO wurde im Kulturüberstand mittels Adsorptionsmessung bei 570 nm mit dem ELISA-Reader bestimmt.

Durch die Nitrit-Messung im Überstand wurde das Aktivitätslevel der Mikroglia nach Stimulation bestimmt. Griess-Reagenz 1 (0,1g Naphthyl- ethylendiamin Dichlorid + 60 ml C₂H₄O₂ (100 %) + 40 ml Aqua dest.) und 2 (1 g Sulfonamid + 30 ml C₂H₄O₂ (100 %) + 70 ml Aqua dest.) wurden zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend 50 µl in 96-Loch-Platten ausplattiert. Der Nitrit-Standard wurde aus 34,5 mg Na-Nitrit auf 50 ml Aqua dest. hergestellt und 10 µl des Standards mit 1,25 ml DMEM

(angereichert mit FCS) aufgefüllt. Durch jeweiliges Übertragen gleicher Anteile des Mediums und vorangegangener Verdünnung wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt: 80 μmol , 40 μmol , 20 μmol , 10 μmol , 5 μmol , 2,5 μmol , 1,25 μmol (siehe Abbildung 2).

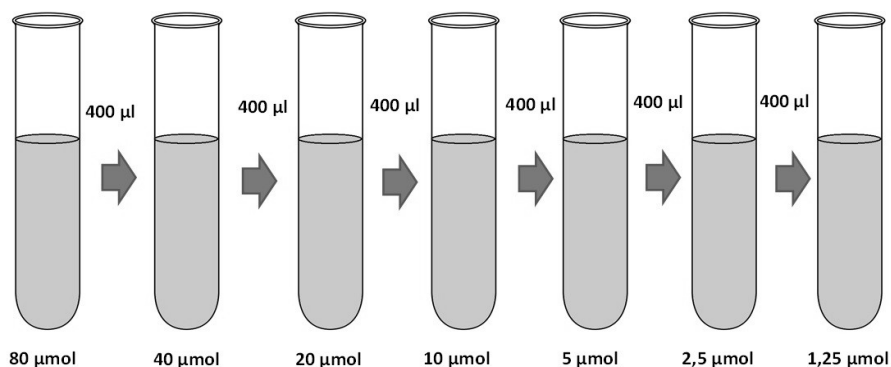


Abbildung 2 :Dargestellt ist die angefertigte Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Nitrit-Akkumulation im Überstand mittels Griess-Reagenz.

Als unterer Eichwert der Standardkurve wurde reines Medium (DMEM + FCS) verwendet. Je 50 μl der Kulturüberstände der stimulierten Mikroglia-tragenden 96-Loch-Platten wurden zur Messung pipettiert. Pro Verdünnungsschritt wurden 3 Mikroglia enthaltende Kavitäten stimuliert.

2.7.4 Zusammenfassung der NO-Freisetzung von Mikroglia-kulturen

Alle Versuche wurden 3-fach durchgeführt. Pro Substanz und Konzentration wurden 3 Kavitäten ausplattiert und stimuliert. Die Experimente wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Konzentrationen lagen bei 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS als Kontrollstimulanz für gramnegative Bakterien sowie 10 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,3 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 0,03 $\mu\text{g/ml}$ für die jeweiligen Stimulanzen. Die unstimulierten Gruppen

wurden mit unterschiedlichen Pufferreagenzien entsprechend der Verdünnung der Konzentrationsstufe 0,03 µg/ml angesetzt (siehe Tabelle 3).

Die Höhe der Nitrit-Akkumulation im Überstand wurde durch die Griess-Reaktion und Adsorptionsmessung mittels ELISA-Reader ermittelt. Die Nitrit-Akkumulation nach Stimulation von LPS = 1 µg/ml wurde als maximaler Wert angenommen (100 %). Die Messwerte nach 24 und 48 Stunden wurden darauf bezogen umgerechnet. Mit Graph-PadPrism 5 wurde die Nitrit-Akkumulation visualisiert. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. In einer weiteren Grafik wurden die Werte der Nitrit-Akkumulation logarithmisch aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde LPS = 1 µg/ml (= 100%) angenommen und die Mediane der unterschiedlichen Konzentrationsstufen darauf bezogen umgerechnet.

2.7.5 WST-1 Test

Nach 48 Stunden wurde der Überstand der Kulturplatten zur Messung der Nitrit-Akkumulation entfernt und ein Water Soluble Tetrazolium (WST)-1 Assay zum Nachweis vitaler Zellen mit intakter Atmungskette angefertigt. Dieser Test wurde zum Nachweis der Zellviabilität durchgeführt, sodass eine toxische Wirkung der untersuchten Proteine auf die Mikrogliaulturen ausgeschlossen werden konnte.

Zuerst wurden 400 µl WST-1 mit DMEM gemischt. In jede Kavität, die Kulturen enthielt, wurden 100 µl dieser Lösung ausplattiert. Ebenfalls wurde die gleiche Menge als Kontrollwert in 4 unverwendete Kavitäten gegeben. Nach 3-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Messwerte photometrisch mit dem ELISA-Reader bei 490 nm bestimmt. Triton-X wurde hierbei zur Zerstörung der Zellen auf 2 Kavitäten in der Verdünnung 1:1000 gegeben, um einen Referenzwert zu erhalten.

2.7.6 Quantifizierung der Zytokine mittels ELISA-Messung

Zur Bestimmung der Zytokinlevel wurden die vorher bei -20 °C aufbewahrten Platten langsam über Nacht bei 4 °C aufgetaut. Vorbereitend wurden die Messplatten mit Capture-Antikörpern (nach Herstellerangaben verdünnt) mit jeweils 50 µl pro Kavität beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde nach 3 maligem Waschen durch 300 µl des jeweiligen Blockpuffers geblockt. Hierzu wurden die Messplatten eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und anschließend 3 mal mit dem Puffer gewaschen.

IL-6 und TNF- α wurden, beruhend auf Erfahrungswerten, im Verhältnis 1:10 verdünnt, KC im Verhältnis 1:20. Jeweils 50 µl der zu untersuchenden Überstände wurden pro Kavität zur Bestimmung eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte je nach zu messendem Zytokin mit der entsprechenden Pufferlösung. TNF- α beispielsweise wurde mit Reagent Diluent 1 (1 g BSA in 100 ml PBS gelöst) verdünnt. Zur Normierung der Werte wurde die im Kit enthaltene Standardreihe verwendet. Je 50 µl der Proben sowie 50 µl der Standardreihe wurden auf die vorbereiteten Messplatten aufgetragen und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Platten 3 mal gewaschen und 50 µl des jeweiligen Detektionsantikörpers zugesetzt. Die Messprobenplatten wurden erneut 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und anschließend 3 mal gewaschen. Pro Kavität wurden 50 µl des HRP-Diluent auspipettiert und wiederum bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert. Nach einer wie oben bereits beschriebenen Waschung der Platten erfolgte eine Zufuhr von 100 µl TMB-Substratlösung pro Kavität. Die Reaktion wurde mit 50 µl Schwefelsäure pro Kavität gestoppt. Dabei erfolgte ein Farbumschlag zu gelb. Die Messung der zu untersuchenden Proben und ihrer Standards erfolgte innerhalb der nächsten 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter 540 nm). Durch Abgleichen der Reaktionen mit der Standardkurve und mit Hilfe von EXCEL wurden so die Konzentrationen der einzelnen Zytokine in pg/ml errechnet.

2.7.7 Zusammenfassung der Zytokin-Freisetzung von Mikrogliaulturen

Aufgrund der schwierigen Beschaffung natürlicher Borrelienproteine wurden die Zytokinversuche nur einmal durchgeführt. Je Konzentrationsstufe wurden 2 Kavitäten ausplattiert und stimuliert. Die Konzentrationen wurden wie folgt abgestuft: 10 µg/ml, 3 µg/ml, 1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,03 µg/ml. Die quantitative Bestimmung erfolgte mittels ELISA-Reader. Als Positivkontrolle wurden die Messwerte von 1 µg/ml LPS herangezogen (= 100 %) und der Median der Messwerte hierauf bezogen umgerechnet. Die Graphen stellen die logarithmisch-lineare Darstellung der Ergebnisse dar. Als Orientierungswert wurde die mittlere effektive Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt verursacht, herangezogen (EC_{50}). Das Detektionsniveau lag als Wert des kleinsten Standards bei 15 pg/ml.

2.8 Neuronenkulturen

Um Neuronenkulturen anzulegen, wurde eine adulte C57/Bl6J-Maus 17 Tage zuvor verpaart. Die Kulturen wurden von den Hirnen der Embryonen (E17) angelegt, die nach Tötung des mit Kohlenstoffmonoxid betäubten Muttertieres per Kaiserschnitt entfernt und präpariert wurden. Eihülle und Plazenta wurden beseitigt. Auch zur Anlegung dieser Kulturen wurden die Hirne erst in sterilen Petrischalen, die mit HBSS gefüllt waren, aufbewahrt und von den Meningen befreit. Zur Präparation wurden nur die Hemisphären genutzt, Kleinhirn und Hirnstamm wurden verworfen. Die Beschichtung von Glasplättchen (Durchmesser 13 mm) in 24-Loch-Platten wurde 24 Stunden zuvor mit 500 µl Poly-L-Lysin durchgeführt.

Nach Zugabe von 100 µl Trypsin (2,5 %) pro Hirn wurde das Material gevortext, 5 Minuten im Wasserbad inkubiert, erneut dissoziiert und wieder 5 Minuten inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 ml DMEM (mit Zusatz von FCS) pro Hirn verwendet. Anschließend wurde bei 1000 g und 22 °C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml Neurobasalmedium mit Zusätzen von B27 und 2 mM L-Glutamin zur Unterstützung des neuronalen Wachstums resuspendiert.

Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerkammer wurden $2,75 \times 10^5$ Zellen (suspendiert in 500 μ l Neurobasalmedium + B27 + L-Glutamin) in die vorher beschichteten und mit Glasplättchen ausgelegten Kavitäten nach Entfernung des Poly-L-Lysins ausgesät. Nach 1,5 Stunden erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel mit Neurobasalmedium + B27 + L-Glutamin. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre und 5 % CO₂ inkubiert.

2.8.1 Herstellung von Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen

Nach 5-tägiger Inkubation der Neuronen wurden die mit Glasplatten ausgelegten und mit Neuronen beschichteten Kavitäten mikroskopisch begutachtet und ungleichmäßig angewachsene Neuronen-Plättchen aussortiert. Zur Anfertigung von Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur wurden Mikroglia wie oben beschriebenen geerntet (siehe 2.7.1). Anstatt in DMEM + FCS + PS wurden die Zellen in Neurobasalmedium + B27 + L-Glutamin suspendiert. Die Mikroglia wurden im Verhältnis 1:2 auf die zu stimulierenden Kavitäten ausgesät und 24 Stunden inkubiert.

2.8.2 Stimulation der Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen

Nach 24-stündiger Inkubation der Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen wurden die Stimulanzien und Puffer der unstimulierten Gruppe im Neurobasalmedium + B27 + L-Glutamin suspendiert. Zur Stimulation wurden Konzentrationen von 3 μ g/ml verwendet. Die mit p41 und OspC von *Borrelia burgdorferi* und *Borrelia afzelii* behandelten Zellkulturen wurden mit Kontrollkulturen, die im jeweiligen Puffermedium (siehe Tabelle 3) inkubiert wurden, verglichen. Es wurden 300 μ l in die Kavitäten plattiert.

Nach 72-stündiger Inkubation wurden die Überstände separat in Eppendorfgefäßen gesammelt und bei -20 °C eingefroren, die Loch-Platten jeweils mit 500 μ l PBS

gespült und anschließend die Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen durch 30-minütige Inkubation mit 500 µl Formalin (4 % in PBS) fixiert. Zur Konservierung und bis zur Färbung wurden die Kulturen mit 1 ml PBS bei 4 °C gekühlt und gelagert.

2.8.3 Färbungen der Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen

Zur Färbung der Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen wurde zunächst PBS aus den 24-Loch-Platten abpipetiert und 3 mal mit TBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation über 24 Stunden bei Raumtemperatur mit Triton-X (in 0,1 % TBS). Nach erneuter Waschung wurden die Zellen über 30 Minuten mit FCS (10 % in TBS) inkubiert. Anschließend wurden die Coverslips der 24-Loch-Platten entnommen und 90 Minuten mit einem Maus-Anti-Microtubuli assoziiertem Protein (MAP2) monoklonalen Antikörper (1:100 in TBS gelöst) auf Parafilm inkubiert, gewaschen und anschließend mit einem Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (1:50 in TBS) für 60 Minuten inkubiert. Die Coverslips wurden erneut mit TBS gewaschen und danach mit Alkalischer-Phosphatase-Anti-Alkalischer-Phosphatase (APAAP) (1:50) 60 Minuten behandelt. An den Bindungsstellen der Antikörper wurden mittels einer Neufuchsinfärbelösung die Zellkörper, Dendriten und Axone rot koloriert. Die Zellkerne wurden durch eine Gegenfärbung mit Hämalaun blau gefärbt. Hierzu wurde Hämalaun 1:2 mit bidest. Aqua verdünnt und die Coverslips benetzt. Nach 30 Sekunden wurden die Coverslips für 15 Minuten in Leitungswasser gewaschen und anschließend 30 Minuten getrocknet und mit DePeX eingedeckt.

2.8.4 Quantifizierung der neuronalen Schädigung in Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen

Die Klassifizierung und Quantifizierung der Kerne und der intakten Neuronen erfolgte mit Hilfe der Definiens-Developer-XD Version 1.0.0 einer automatischen, objekt-orientierten Software, die die Analyse von Bildern aufgrund festgelegter Merkmale (Farbe, Größe, Form, Interaktion) ermöglicht. Die Bilder wurden durch eine 4-Loch-schablone von den einzelnen Coverslips der Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur angefertigt. Dabei wurden von den MAP2/Hämalaun-gefärbten Kulturen jeweils 4 Fotos pro Kavität (Coverslip) in einer 200-fachen Vergrößerung im tif-Format angelegt. Mittels eines in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Ruleset wurde die Anzahl der Überkreuzungen (*Crossing*) ermittelt und zur Quantifizierung der Intaktheit der Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur genutzt (Schütze et al. 2012).

2.8.5 Zusammenfassung des Neuronenkultur/Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur-Experiments

Die Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen wurden wie beschrieben angelegt. Als Stimulanzen wurden natürliches p41 und natürliches OspC von *Borrelia burgdorferi* und natürliches OspC von *Borrelia afzelii* verwendet, die im Vergleich zur unstimulierten Gruppe eine signifikante Nitrit-Akkumulation der Mikroglia-Kulturen gezeigt hatten. Außerdem wurden als Kontrolle Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen mit MT-PBS, PBS und Tris/HCl als Puffer stimuliert (siehe Tabelle 3). Diese Gruppe wird für das jeweilige Protein als unstimulierte Gruppe bezeichnet. Weiterhin wurden auch Neuronenkulturen ohne Mikroglia mit den bereits aufgeführten Stimulanzen versetzt, um die Rolle der Mikroglia bei der Neuronenschädigung zu verifizieren.

Die Stimulation neuronaler Kulturen mit den Borrelienbestandteilen p41 und OspC von *Borrelia burgdorferi* sowie mit natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* wurde in 4 Experimenten durchgeführt. Die Quantifizierung der Neuronenschädigung erfolgte

anhand von Fotos mit dem Lichtmikroskop durch eine 4-Lochschablone (200-fache Vergrößerung), die durch das Definiens-Developer-XD-Analyseprogramm ausgewertet wurden.

2.9 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden EXCEL und GraphPadPrism 5 genutzt.

Zur Auswertung der Nitrit-Akkumulation wurde LPS (= 1 µg/ml) als maximal stimulierende Substanz angenommen (= 100 %). Zur besseren Vergleichbarkeit von an verschiedenen Tagen durchgeführten Versuchen wurden die Ergebnisse darauf bezogen umgerechnet und der Median mit Interquartilsabstand zur Auswertung herangezogen. Die verschiedenen Versuche sind zusammengefasst und im Ergebnisteil graphisch dargestellt (Median mit Interquartilsabstand). Weiterhin wurden die Ergebnisse in einer zweiten Grafik logarithmisch-linear aufgetragen. Auch hier beziehen sich die Werte auf LPS = 1 µg/ml (= 100 %).

Zur Auswertung der Zytokin-Freisetzung galt 15 pg/ml als Wert des kleinsten Standards als Detektionslimit. Die Graphen stellen die logarithmisch-linear aufgetragenen Messungen der einzelnen Experimente bezogen auf die Positivkontrolle LPS = 1 µg/ml (= 100 %) dar.

Zur Auswertung der Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen wurde der Median der jeweiligen 4 Bilder eines Coverslips gebildet. Die Ergebnisse der Experimente wurden je nach Stimulanz ihren jeweiligen Gruppen zugeordnet und graphisch dargestellt (Median und Interquartilsabstand).

Die Gruppenvergleiche in Hinblick auf statistisch signifikante Differenzen wurden, da die Daten nicht normalverteilt waren, mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Zwecks Korrektur für wiederholtes Testen wurden Vergleiche ausgewählter Gruppen mit dem Mann-Whitney-Test vorgenommen und nach Bonferroni korrigiert. In den Säulenanalysen ist der jeweilige Median mit Interquartilsabstand angegeben. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels GraphPadPrism 5. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 *Borrelia afzelii*

3.1.1 Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation

3.1.1.1 Natürliches OspC von *Borrelia afzelii*

Durch die Stimulation der Mikroglia kulturen mit natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* zeichnete sich bereits nach 24-stündiger Inkubation eine deutliche Aktivierung ab (Abbildung 3A). Die Nitrit-Akkumulation und damit die Aktivität der Mikroglia nach Stimulation mit 10 µg/ml nativem OspC von *Borrelia afzelii* war bei einer Freisetzung von 77,89 % ($Q_{25} = 52,12$ %, $Q_{75} = 86,85$ %; $p = 0,014$) signifikant höher als in der unstimulierten Gruppe. Auch die Stimulation der Mikroglia mit 3 µg/ml nativem OspC von *Borrelia afzelii* erzielte signifikant höhere Werte als die unstimulierte Gruppe mit einer Freisetzung von 90,07 % ($Q_{25} = 70,04$ %, $Q_{75} = 101,1$ %; $p = 0,001$). Ebenso war in der Stimulationsgruppe mit 1 µg/ml nativem OspC von *Borrelia afzelii* mit Werten von 34,62 % ($Q_{25} = 12,67$ %, $Q_{75} = 71,03$ %; $p = 0,029$) die Akkumulation von Nitrit signifikant höher als in der unstimulierten Gruppe, die Werte bei 12,67 % ($Q_{25} = 12,07$ %, $Q_{75} = 29,89$ %) erreichte. Die Stoffmengen von LPS lagen in den einzelnen Versuchen bei 3,87 µmol, 2,78 µmol und 8,26 µmol. Die Stoffmengen der unstimulierten Gruppe bei 0,49 µmol, 0,33 µmol und 2,71 µmol.

Nach 48-stündiger Stimulation der Mikroglia kulturen zeichneten sich ebenfalls signifikante Ergebnisse in den Konzentrationsstufen 10 µg/ml, 3 µg/ml und 1 µg/ml ab. Für 10 µg/ml konnte eine Nitrit-Akkumulation von 60,12 % ($Q_{25} = 47,36$ %, $Q_{75} = 83,09$ %) errechnet werden, für die Konzentrationsstufe 3 µg/ml 48,64 % ($Q_{25} = 43,84$ %, $Q_{75} = 69,25$ %) und für 1 µg/ml 28,59 % ($Q_{25} = 20,98$ %, $Q_{75} = 57,16$ %). Die unstimulierte Gruppe lag bei 3,68 % ($Q_{25} = 3,68$ %, $Q_{75} = 3,72$ %). Die p-Werte lagen bei $p = 0,044$ (Abbildung 3B). Die absoluten Stoffmengen von LPS lagen in den Versuchen bei 11,25 µmol und 23,47 µmol. Die absoluten Stoffmengen der unstimulierten Gruppe bei 0,42 µmol und 0,86 µmol.

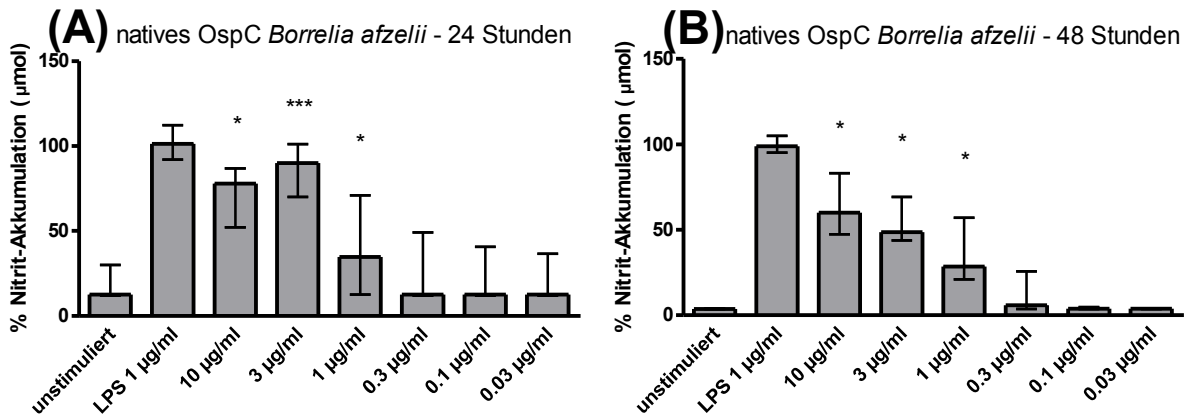


Abbildung 3: Die Grafiken stellen die prozentuale Nitrit-Akkumulation nach (A) 24- und (B) 48-stündiger Inkubation muriner Mikrogliaulturen mit dem natürlichen OspC von *Borrelia afzelii* im Median dar (* p < 0,05 ; *** p < 0,001). Pro Konzentrationsstufe wurden für (A) 24 Stunden n = 6-12 Kavitäten und (B) 48 Stunden n = 5-6 Kavitäten gemessen. Als Positivkontrolle wurde LPS = 1 µg/ml verwendet (= 100 %).

Durch Stimulation der Mikrogliaulturen mit natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* deutete sich sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden keine Plateaubildung der Graphen nach logarithmischer Auftragung der gemessenen Werte an (Abbildung 4A, B respektiv). Aufgrund der begrenzten Substratmenge von natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* konnte der maximale Effekt nicht bestimmt werden, da die Konzentrationsstufe 10 µg/ml keine maximalen Effekte erzielte und die Dosis nicht mehr gesteigert werden konnte.

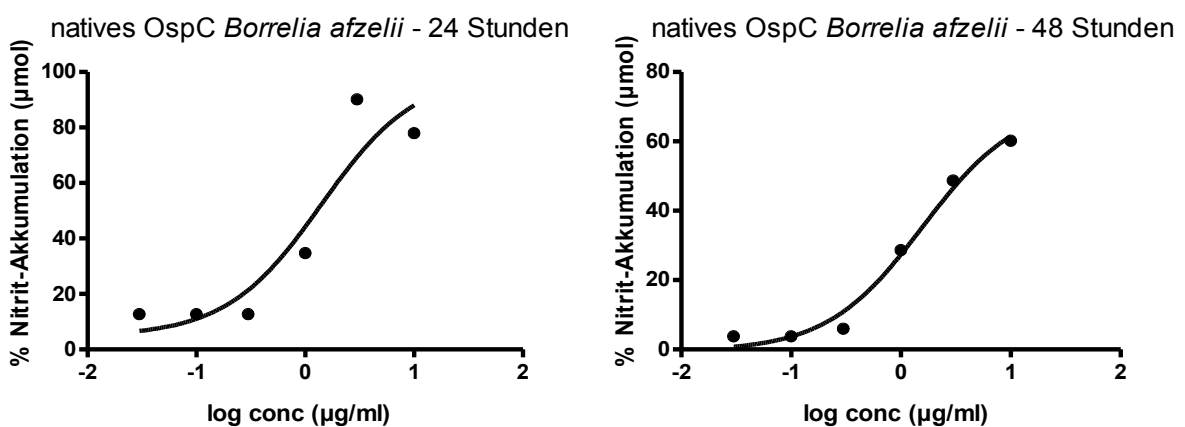


Abbildung 4: Dargestellt ist die logarithmische Auftragung der Nitrit-Akkumulation im Überstand von mit natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* stimulierter Mikroglia nach (A) 24 und (B) 48 Stunden. Die Mediane der verschiedenen Konzentrationsstufen wurden auf 100 % LPS (= 1 µg/ml) bezogen.

3.1.1.2 Rekombinantes OspC von *Borrelia afzelii*

Sowohl nach 24-stündiger (Abbildung 5A) als auch nach 48-stündiger (Abbildung 5B) Inkubation der Mikroglia mit rekombinant hergestelltem OspC von *Borrelia afzelii* zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse ab. Die absoluten Stoffmengen von LPS lagen in den einzelnen Versuchen (24 Stunden nach Stimulation) bei 3,87 μmol und 6,76 μmol . Die absoluten Stoffmengen der unstimulierten Gruppe bei 0,49 μmol und 0,47 μmol .

48 Stunden nach Stimulation lagen die absoluten Stoffmengen von LPS bei 23,47 μmol und 28,7 μmol . In der unstimulierten Gruppe lagen die Stoffmengen bei 0,86 μmol und 0,27 μmol .

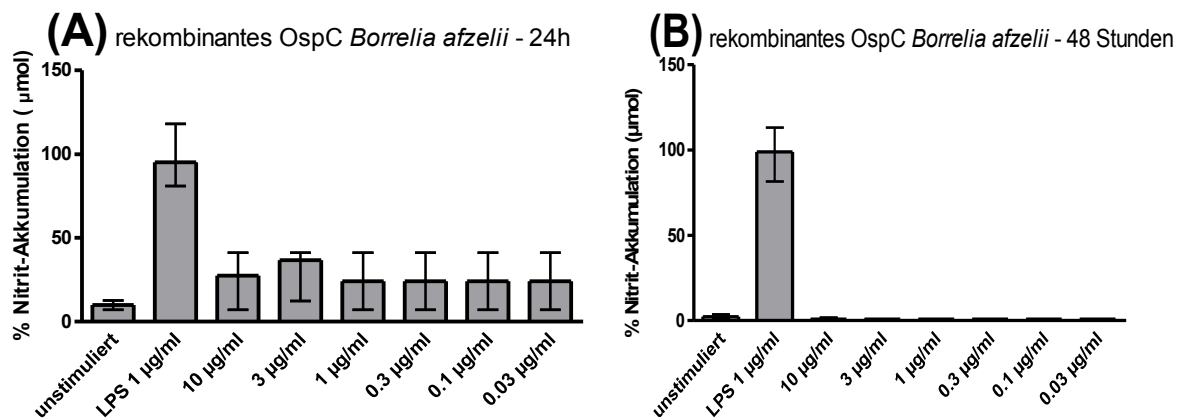


Abbildung 5: Die Grafiken stellen die prozentuale Nitrit-Akkumulation im Überstand nach (A) 24- und (B) 48-stündiger Inkubation muriner Mikrogliaulturen mit dem rekombinanten OspC von *Borrelia afzelii* im Median dar. Pro Konzentrationsstufe wurden für (A) 24 Stunden n = 6 Kavitäten und (B) 48 Stunden n = 6 Kavitäten gemessen. Als Positivkontrolle wurde LPS (= 1 $\mu\text{g/ml}$) verwendet (= 100 %).

3.1.2 Interleukin-6-Freisetzung

Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) von natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* in Bezug auf die Freisetzung von IL-6 konnte nicht ermittelt werden, weil mit der höchst verwendeten Konzentration von OspC das Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve noch nicht erreicht wurde. Die 48-stündige Stimulation mit rekombinantem OspC von *Borrelia afzelii* erreichte IL-6-Messwerten im Überstand um das Detektionsniveau (Abbildung 6).

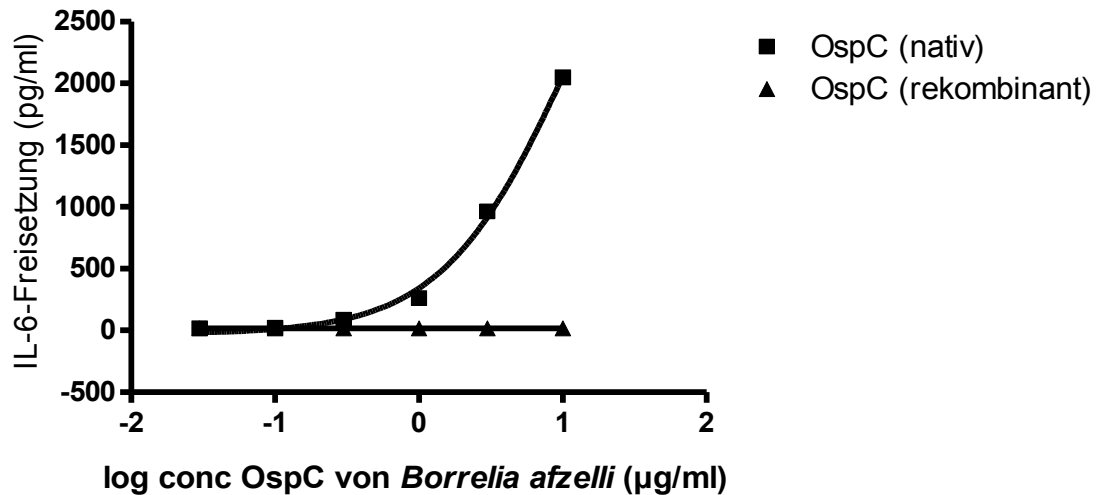


Abbildung 6: Dargestellt ist die logarithmisch aufgetragene Interleukin-6-Freisetzung muriner Mikroglia nach 48-stündiger Inkubation mit natürlichem und rekombinantem OspC von *Borrelia afzelii* (n = 2).

3.1.3 TNF- α -Freisetzung

Die EC₅₀ von natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* in Bezug auf die Freisetzung von TNF- α konnte nicht ermittelt werden, weil mit der höchst verwendeten Konzentration von OspC noch kein Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve erreicht wurde. Die Freisetzung von TNF- α nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem OspC von *Borrelia afzelii* lag im Überstand unterhalb des Detektionsniveaus (Abbildung 7).

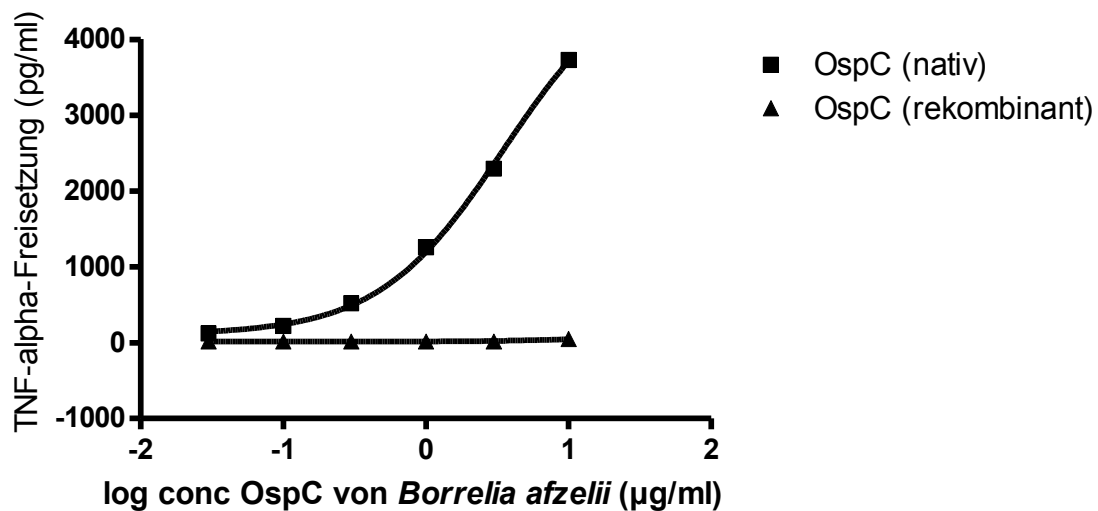


Abbildung 7: Dargestellt ist die logarithmisch aufgetragene TNF- α -Freisetzung muriner Mikrogliaulturen nach 48-stündiger Stimulation mit natürlichem und rekombinantem OspC von *Borrelia afzelii* (n = 2).

3.1.4 KC-Freisetzung

Die EC₅₀ von natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* in Bezug auf die Freisetzung von KC konnte nicht ermittelt werden, weil mit der höchst verwendeten Konzentration von OspC noch kein Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve erreicht wurde. Die KC-Messwerte im Überstand nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem OspC von *Borrelia afzelii* lagen im Bereich des Detektionsniveaus (Abbildung 8).

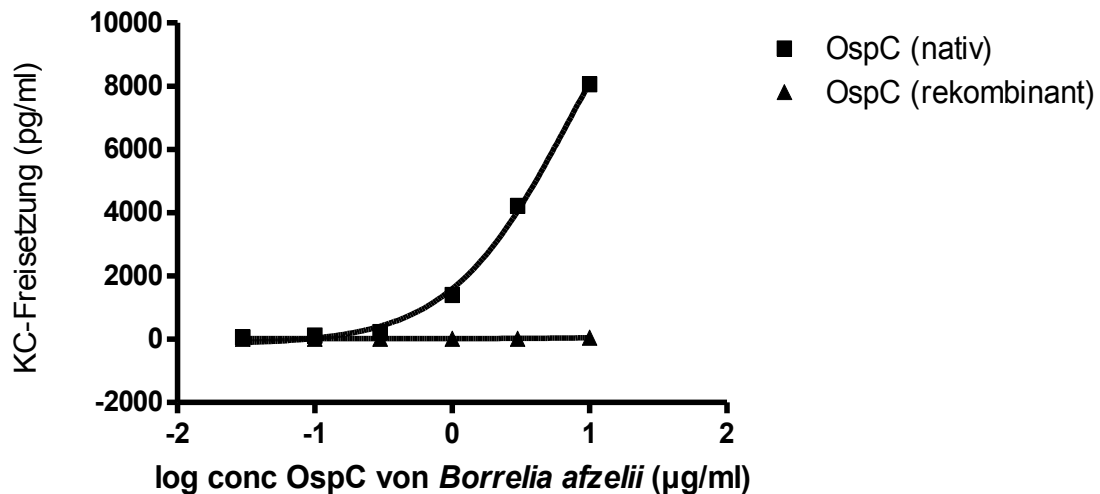


Abbildung 8: Dargestellt ist die logarithmisch aufgetragene KC-Freisetzung von murinen Mikroglia-kulturen nach 48-stündiger Stimulation mit natürlichem und rekombinantem OspC von *Borrelia afzelii* (n = 2).

3.2 *Borrelia burgdorferi*

3.2.1 *OspC - Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation*

3.2.1.1 *Natürliches OspC von Borrelia burgdorferi*

Nach 24-stündiger Inkubation der Mikroglia mit natürlichem OspC von *Borrelia burgdorferi* ergab sich ein signifikanter Unterschied der Nitrit-Akkumulation im Überstand in Bezug auf die unstimulierte Gruppe in den Konzentrationen 10 µg/ml und 3 µg/ml (Abbildung 9A). In der Auswertung wurden für 10 µg/ml Werte von 43,19 % ($Q_{25} = 36,84$ %, $Q_{75} = 57,43$ %) und für 3 µg/ml Werte von 53,23 % ($Q_{25} = 46,00$ %, $Q_{75} = 54,82$ %) ermittelt. Die unstimulierte Gruppe lag bei 12,67 % ($Q_{25} = 11,88$ %, $Q_{75} = 12,67$ %). Der p-Wert lag bei beiden Gruppen bei $p = 0,044$. Die Stoffmengen von LPS lagen in den einzelnen Versuchen bei 3,87 µmol, 2,78 µmol und 8,26 µmol. Die Stoffmengen der unstimulierten Gruppe bei 0,49 µmol, 0,33 µmol und 2,71 µmol.

48 Stunden nach Inkubation der Zellen lag der p-Wert in den Konzentrationsstufen 10 µg/ml, 3 µg/ml, 1 µg/ml und 0,3 µg/ml mit $p = 0,044$ im Signifikanzbereich (Abbildung 9B). In der Auswertung wurden für 10 µg/ml Werte von 57,90 % ($Q_{25} = 51,28$ %, $Q_{75} = 63,69$ %), für 3 µg/ml 60,12 % ($Q_{25} = 45,13$ %, $Q_{75} = 68,60$ %), für 1 µg/ml 43,06 % ($Q_{25} = 33,00$ %, $Q_{75} = 58,75$ %) und für 0,3 µg/ml bei 20,77 % ($Q_{25} = 13,07$ %, $Q_{75} = 32,09$ %) ermittelt. Die unstimulierte Gruppe erreichte 3,68 % ($Q_{25} = 3,68$ %, $Q_{75} = 3,72$ %). Die Stoffmengen von LPS lagen in den einzelnen Versuchen bei 11,29 µmol und 23,47 µmol, die Stoffmengen der unstimulierten Gruppe bei 0,42 µmol und 0,86 µmol.

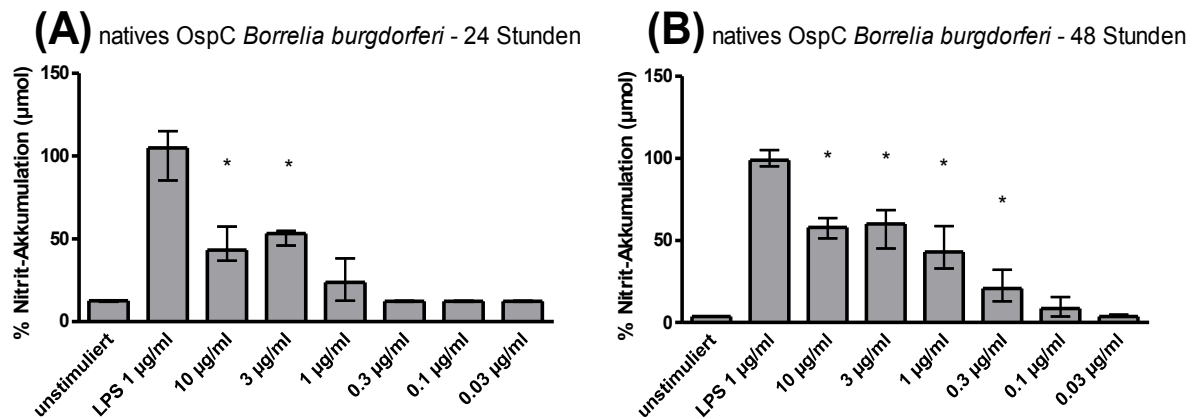


Abbildung 9: Die Grafiken stellen die prozentuale Nitrit-Akkumulation im Überstand nach (A) 24- und (B) 48-stündiger Inkubation muriner Mikrogliaulturen mit dem natürlichen OspC von *Borrelia burgdorferi* im Median dar. Pro Konzentrationsstufe wurden für (A) 24 Stunden n = 5-6 Kavitäten und (B) 48 Stunden n = 5-6 Kavitäten gemessen. Als Positivkontrolle wurde LPS (= 1 µg/ml) verwendet (= 100 %), (* p < 0,05).

Die EC₅₀ konnte nach 24 Stunden aufgrund der fehlenden Plateaubildung nicht bestimmt werden (Abbildung 10A). Nach 48-stündiger Stimulation mit natürlichem OspC von *Borrelia burgdorferi* lag die EC₅₀ bei 0,51 µg/ml. In Bezug auf die durch LPS = 1 µg/ml (= 100 %) stimulierte Gruppe wurden Werte von 64,99 % erreicht (Abbildung 10B).

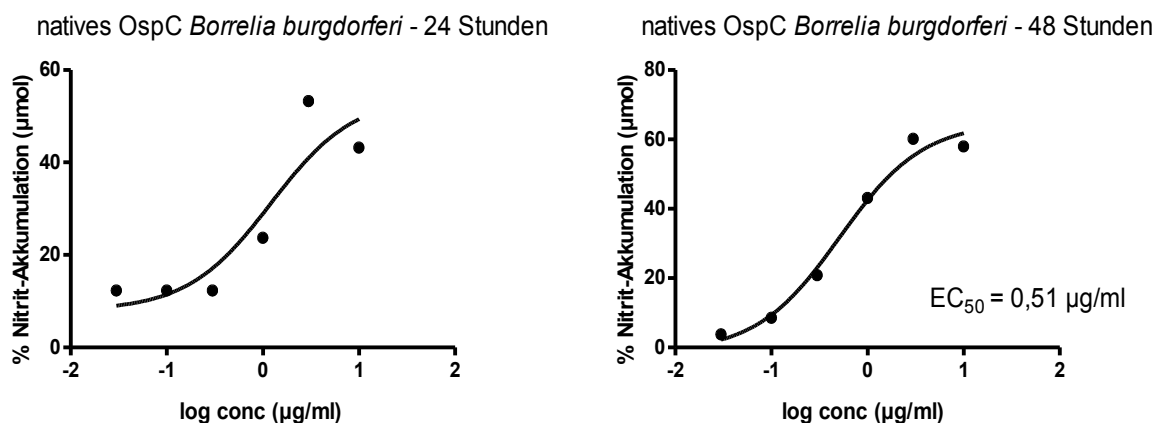


Abbildung 10: Dargestellt ist die logarithmische Auftragung der Messwerte der Nitrit-Akkumulation im Überstand von Mikroglia, die mit natürlichem OspC von *Borrelia burgdorferi* stimuliert wurden, nach (A) 24 und (B) 48 Stunden. Die einzelnen Punkte stellen den Median der verschiedenen Experimente dar, bezogen auf die Nitrit-Akkumulation im Überstand von durch LPS (= 1 µg/ml) stimulierten Mikroglia (= 100 %).

3.2.1.2 Rekombinantes OspC von *Borrelia burgdorferi*

Nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit rekombinantem OspC von *Borrelia burgdorferi* zeichneten sich keine signifikanten Differenzen der stimulierten Gruppen im Vergleich zur unstimulierten Gruppe ab (Abbildung 11A, B respektiv). Die Stoffmengen von LPS lagen nach 24 Stunden Stimulation in den einzelnen Versuchen bei 3,87 μmol und 6,76 μmol . Die Stoffmengen der unstimulierten Gruppe bei 0,49 μmol und 0,47 μmol .

Nach 48-stündiger Stimulation lagen die Stoffmengen der LPS stimulierten Gruppen bei 29,47 μmol und 28,27 μmol . In der unstimulierten Gruppe lagen die Stoffmengen bei 0,86 μmol und 0,27 μmol .

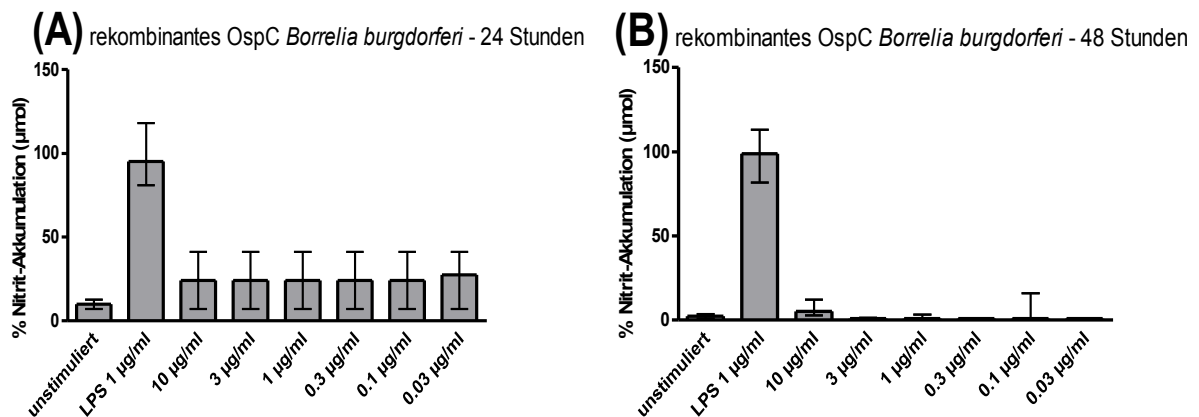


Abbildung 11: Die Grafiken stellen die prozentuale Nitrit-Akkumulation im Überstand nach (A) 24- und (B) 48-stündiger Inkubation muriner Mikrogliaulturen mit dem rekombinanten OspC von *Borrelia burgdorferi* im Median dar. Pro Konzentrationsstufe wurden für (A) 24 Stunden n = 6 Kavitäten und (B) 48 Stunden n = 6 Kavitäten gemessen. Als Positivkontrolle wurde LPS (= 1 $\mu\text{g/ml}$) verwendet (= 100 %).

3.2.2 *OspC* - Interleukin-6-Freisetzung

Die EC₅₀ von natürlichem *OspC* von *Borrelia burgdorferi* in Bezug auf die IL-6-Freisetzung konnte nicht ermittelt werden, weil mit der verwendeten Konzentration von *OspC* noch kein Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve erreicht werden konnte. Nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem *OspC* von *Borrelia burgdorferi* wurden im Überstand IL-6 Werte um das Detektionsniveau gemessen (Abbildung 12).

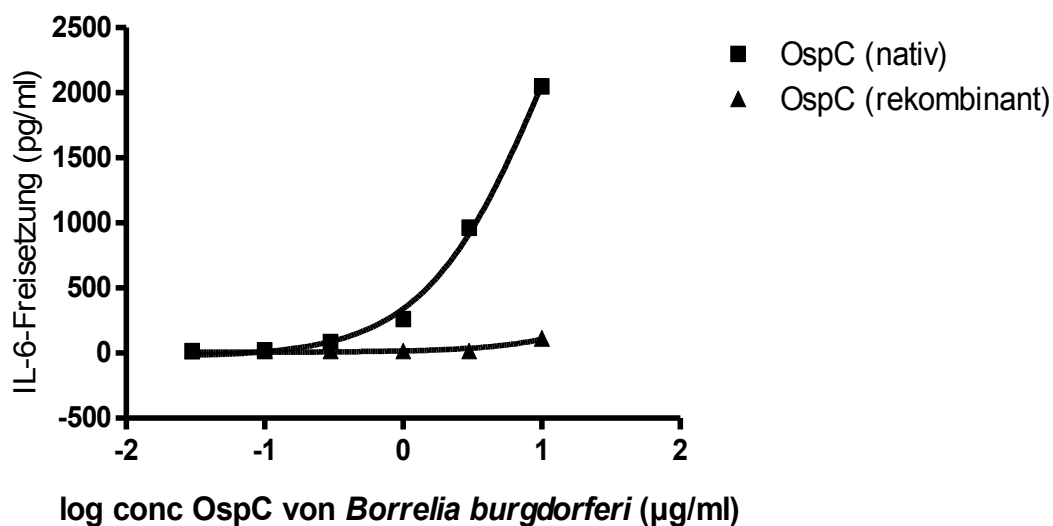


Abbildung 12: Dargestellt ist die logarithmisch aufgetragene Interleukin-6-Freisetzung muriner Mikroglia nach 48-stündiger Inkubation mit natürlichem und rekombinantem *OspC* von *Borrelia burgdorferi* (n = 2).

3.2.3 *OspC* - *TNF- α* -Freisetzung

Die EC_{50} von natürlichem *OspC* von *Borrelia burgdorferi* in Bezug auf die *TNF- α* -Freisetzung konnte nicht ermittelt werden, weil mit der verwendeten Konzentration von *OspC* noch kein Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve erreicht werden konnte. Die Messwerte von *TNF- α* im Überstand nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem *OspC* von *Borrelia burgdorferi* lagen um das Detektionsniveau (Abbildung 13).

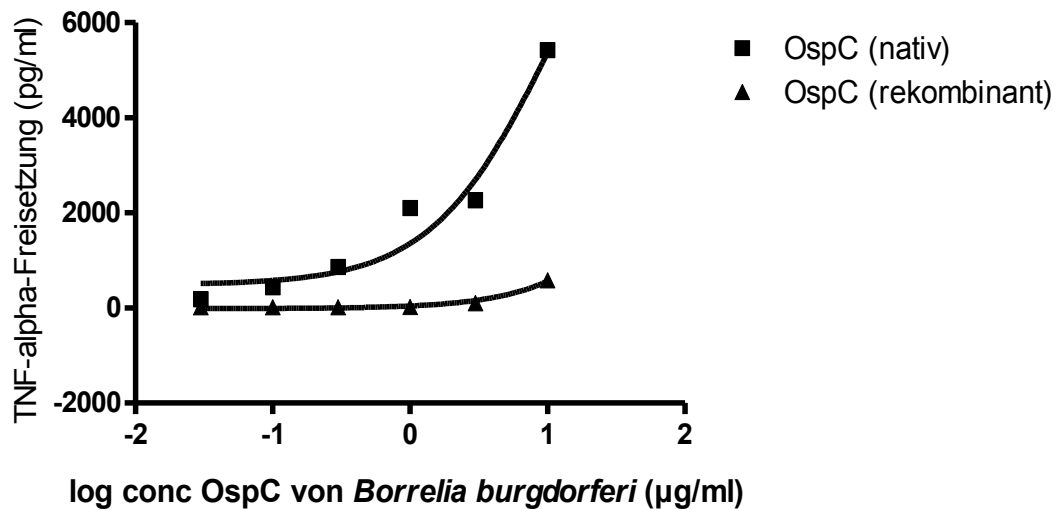


Abbildung 13: Dargestellt ist die logarithmisch aufgetragene *TNF- α* -Freisetzung muriner Mikrogliaulturen nach 48-stündiger Stimulation mit natürlichem und rekombinantem *OspC* von *Borrelia burgdorferi* (n = 2).

3.2.4 *OspC* - KC-Freisetzung

Die EC_{50} von natürlichem *OspC* von *Borrelia burgdorferi* in Bezug auf die KC-Freisetzung konnte nicht ermittelt werden, weil mit der verwendeten Konzentration von *OspC* noch kein Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve erreicht werden konnte. Die KC-Messwerte im Überstand nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem *OspC* von *Borrelia burgdorferi* lagen im Bereich des Detektionsniveaus (Abbildung 14).

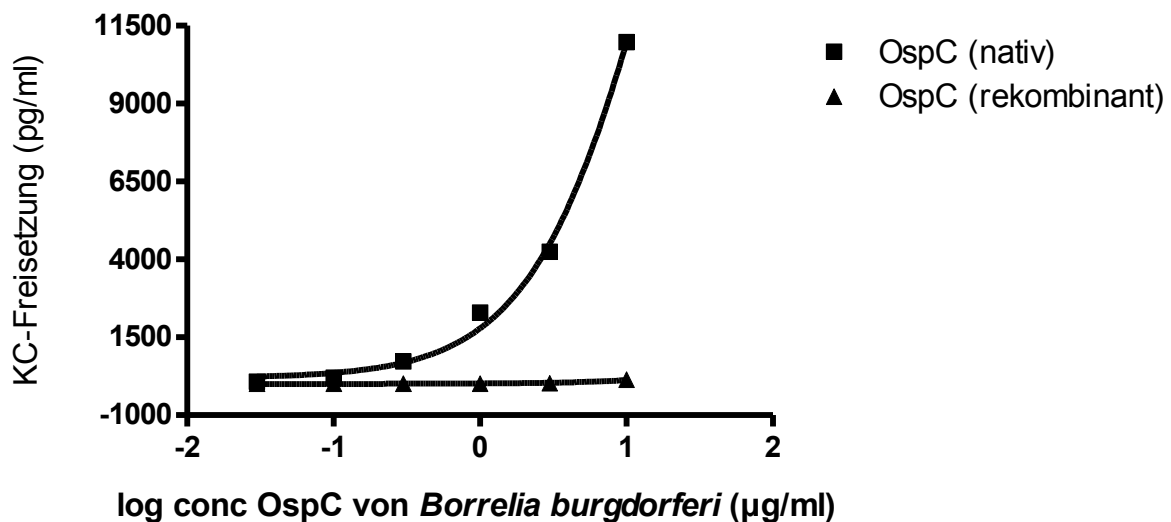


Abbildung 14: Dargestellt ist die logarithmisch aufgetragene KC-Freisetzung von murinen Mikroglia-kulturen nach 48-stündiger Stimulation mit natürlichem und rekombinantem *OspC* von *Borrelia burgdorferi* (n = 2).

3.2.5 P41 - Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation

3.2.5.1 Natürliches p41 von *Borrelia burgdorferi*

Nach 48-stündiger Inkubation waren die Nitrit-Akkumulationen im Überstand der Konzentrationsstufen 10 µg/ml mit Werten von 65,97 % ($Q_{25} = 59,28$ %, $Q_{75} = 73,60$ %; $p = 0,014$), 3 µg/ml mit Werten von 64,24 % ($Q_{25} = 52,57$ %, $Q_{75} = 79,69$ %; $p = 0,004$), 1 µg/ml mit Werten von 47,87 % ($Q_{25} = 34,42$ %, $Q_{75} = 54,71$ %; $p = 0,004$) und 0,3 µg/ml mit Werten von 24,46 % ($Q_{25} = 17,75$ %, $Q_{75} = 31,91$ %; $p = 0,004$) signifikant höher als die Akkumulation von Nitrit im Überstand der unstimulierten Gruppe, bei der Werte von 4,76 % ($Q_{25} = 3,49$ %, $Q_{75} = 6,19$ %) ermittelt wurden (Abbildung 15, respektiv). Die ermittelten Stoffmengen von LPS lagen bei 27,40 µmol, 7,27 µmol und 16,48 µmol. In der unstimulierten Gruppe lagen die Stoffmengen bei 1,30 µmol, 0,56 µmol und 0,67 µmol.

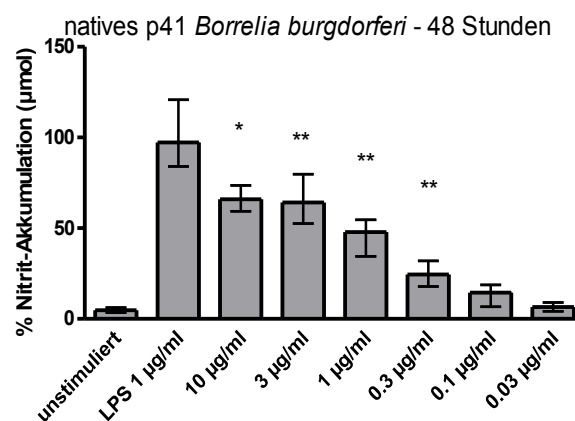


Abbildung 15: Die Grafik stellt die prozentuale Nitrit-Akkumulation im Überstand nach 48-stündiger Inkubation muriner Mikrogliaulturen mit dem natürlichen p41 von *Borrelia burgdorferi* im Median dar (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Pro Konzentrationsstufe wurden $n = 6-9$ Kavitäten gemessen. Als Positivkontrolle wurde LPS (= 1 µg/ml) verwendet (= 100 %).

Die EC_{50} lag nach 48-stündiger Inkubation bei 0,56 $\mu\text{g/ml}$. Es wurden Werte von bis zu 72,06 % bezogen auf die maximale Stimulation durch LPS erreicht (LPS = 1 $\mu\text{g/ml}$ = 100 %) (Abbildung 16).

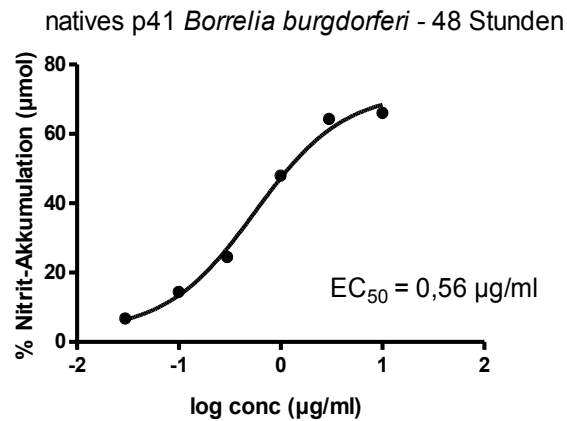


Abbildung 16: Dargestellt ist die logarithmische Auftragung der Nitrit-Akkumulation im Überstand von mit natürlichem p41 von *Borrelia burgdorferi* stimulierten Mikrogliaulturen nach 48 Stunden. Die Daten stellen die Mediane der einzelnen Versuche dar und sind auf die maximale Nitrit-Akkumulation im Überstand bezogen. LPS = 1 $\mu\text{g/ml}$ wurde als maximaler Stimulator angenommen (= 100 %).

3.2.5.2 Rekombinantes p41 von *Borrelia burgdorferi*

Nach 48-stündiger Inkubation mit rekombinatem p41 von *Borrelia burgdorferi* zeichneten sich keine signifikanten Differenzen in der Nitrit-Akkumulation im Überstand zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen und der unstimulierten Gruppe ab (Abbildung 17 respektiv). Die Stoffmengen von LPS lagen in den einzelnen Versuchen bei 29,93 µmol und 7,27 µmol. Die Stoffmengen der unstimulierten Gruppe bei 1,64 µmol und 0,56 µmol.

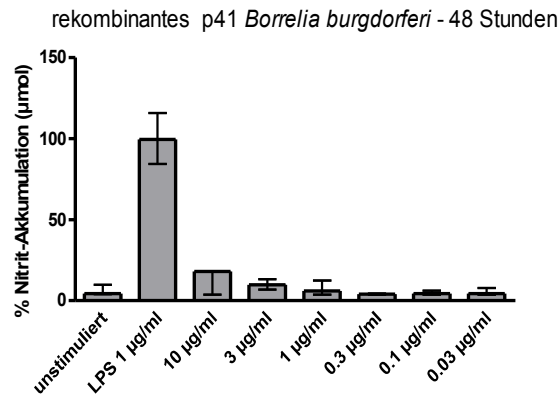


Abbildung 17: Die Grafik stellt die prozentuale Nitrit-Akkumulation im Überstand nach 48-stündiger Inkubation muriner Mikrogliaulturen mit dem rekombinatem p41 von *Borrelia burgdorferi* im Median dar. Pro Konzentrationsstufe wurden n = 3-6 Kavitäten gemessen. Als Positivkontrolle wurde LPS (= 1 µg/ml) verwendet (= 100 %).

3.2.6 P41 - Interleukin-6-Freisetzung

Die EC₅₀ von natürlichem p41 von *Borrelia burgdorferi* in Bezug auf die IL-6-Freisetzung konnte nicht ermittelt werden, weil mit der verwendeten Konzentration von OspC noch kein Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve erreicht werden konnte. Nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem p41 von *Borrelia burgdorferi* wurden im Überstand IL-6 Werte um das Detektionsniveau gemessen, tendenziell zeichnete sich ein Anstieg in den höheren Konzentrationsstufen ab (Abbildung 18).

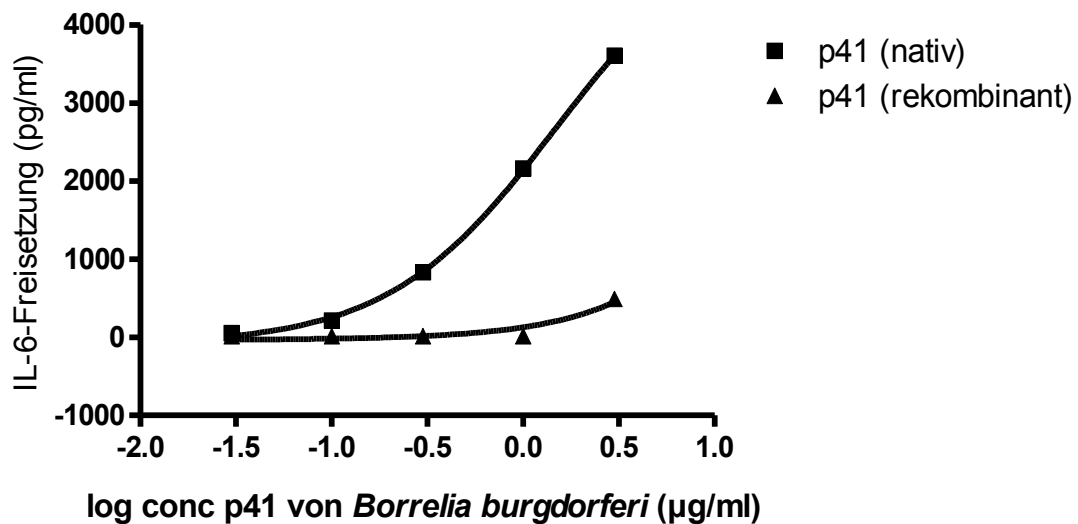


Abbildung 18: Dargestellt ist die logarithmisch aufgetragene Interleukin-6-Freisetzung muriner Mikroglia nach 48-stündiger Inkubation mit natürlichem und rekombinantem p41 von *Borrelia burgdorferi* (n = 2).

3.2.7 P41 - TNF- α -Freisetzung

Der EC₅₀ Wert von natürlichem p41 in Bezug auf die TNF- α -Freisetzung konnte nicht ermittelt werden, weil mit der verwendeten Konzentration von p41 noch kein Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve erreicht werden konnte. Die Messwerte von TNF- α nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem p41 von *Borrelia burgdorferi* lagen im Überstand um das Detektionsniveau und stiegen im Bereich höherer Konzentrationsstufen an (Abbildung 19).

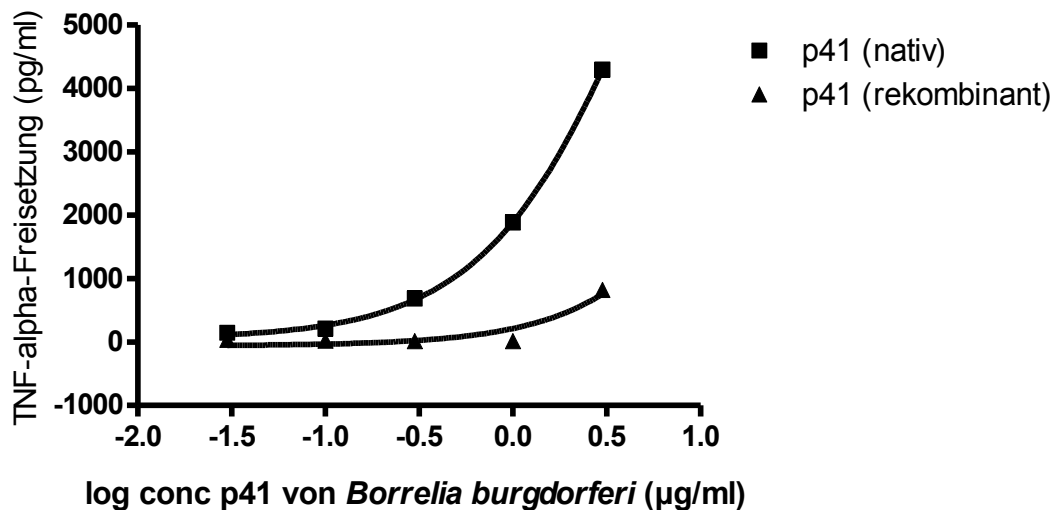


Abbildung 19: Dargestellt ist die logarithmisch aufgetragene TNF- α -Freisetzung muriner Mikroglia kulturen nach 48-stündiger Stimulation mit natürlichem und rekombinantem p41 von *Borrelia burgdorferi* (n = 2).

3.2.8 P41 - KC-Freisetzung

Der EC₅₀ Wert von natürlichem p41 in Bezug auf die KC-Freisetzung konnte nicht ermittelt werden, weil mit der verwendeten Konzentration von p41 noch kein Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve erreicht werden konnte. Die Messwerte von KC nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem p41 von *Borrelia burgdorferi* lagen im Überstand um das Detektionsniveau (Abbildung 20).

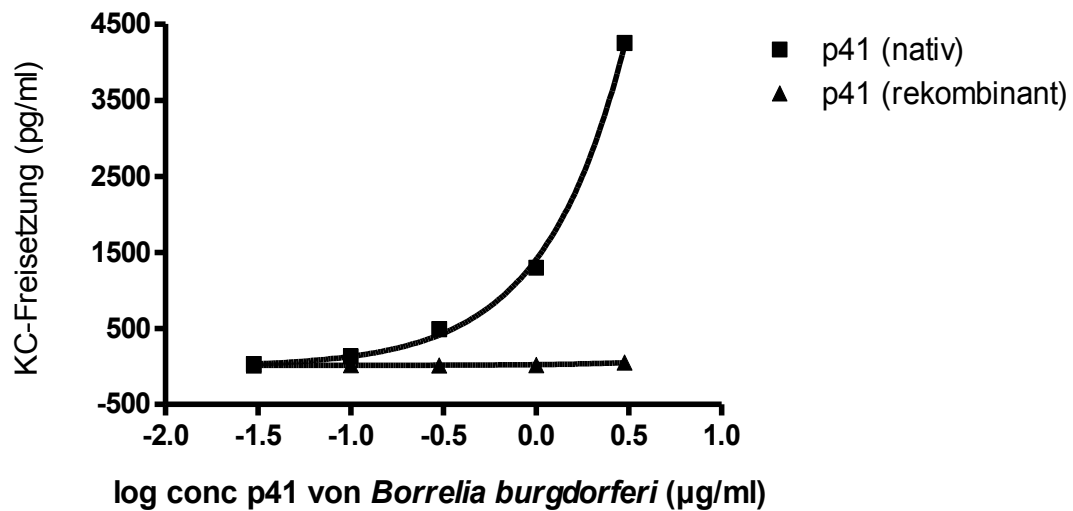


Abbildung 20: Dargestellt ist die logarithmisch aufgetragene KC-Freisetzung von murinen Mikroglia-kulturen nach 48-stündiger Stimulation mit natürlichem und rekombinantem p41 von *Borrelia burgdorferi* (n = 2).

3.3 *Borrelia spielmanii*

3.3.1 Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation

3.3.1.1 Rekombiantes OspC von *Borrelia spielmanii* mit PMB versetzt

Durch Zugabe von 10 µg/ml PMB wurde einem falsch positiven Ergebnis durch eine Kontamination mit LPS vorgebeugt (siehe 2.7.2). Weder nach 24-stündiger (Abbildung 21A) noch nach 48-stündiger (Abbildung 21B) Inkubation der murinen Mikrogliaulturen zeigte sich ein signifikant verschiedenes Aktivitätslevel in Bezug auf die Nitrit-Akkumulation im Überstand zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen und der unstimulierten Gruppe. Die Stoffmengen von LPS nach 24-stündiger Stimulation lagen in den einzelnen Versuchen bei 3,80 µmol, 9,80 µmol und 1,81 µmol. Die Stoffmengen der unstimulierten Gruppe nach 24-stündiger Stimulation bei 1,64 µmol, 0,46 µmol und 0,22 µmol.

Die Stoffmengen von LPS nach 48-stündiger Stimulation lagen in den einzelnen Versuchen bei 8,08 µmol, 39,83 µmol und 7,03 µmol. Die Stoffmengen der unstimulierten Gruppe nach 48-stündiger Stimulation bei 1,09 µmol, 0,75 µmol und 0,79 µmol.

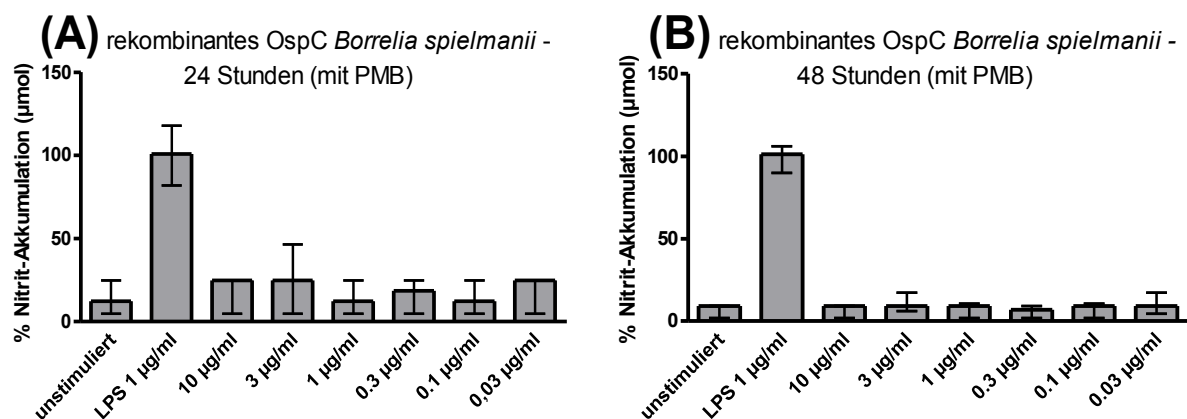


Abbildung 21: Die Grafiken stellen die prozentuale Nitrit-Akkumulation im Überstand nach (A) 24- und (B) 48-stündiger Inkubation muriner Mikrogliaulturen mit dem rekombinanten OspC von *Borrelia spielmanii* im Median dar. Pro Konzentrationsstufe wurden für (A) 24 Stunden n = 9-11 Kavitäten und (B) 48 Stunden n = 9-11 Kavitäten gemessen. Als Positivkontrolle wurde LPS (= 1 µg/ml) verwendet (= 100 %).

3.3.1.2 Rekombinantes OspC von *Borrelia spielmanii* ohne PMB

Nach 24-stündiger Inkubation zeichneten sich keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Konzentrationsstufen im Vergleich zur unstimulierten Gruppe in Bezug auf die Nitrit-Akkumulation im Überstand ab (Abbildung 22A). Die Stoffmengen von LPS lagen nach 24-stündiger Stimulation in den einzelnen Versuchen bei 13,31 µmol, 2,08 µmol, 10,7 µmol und 1,81 µmol. Die Stoffmengen der unstimulierten Gruppe nach 24-stündiger Stimulation bei 0,95 µmol, 0,52 µmol, 0,46 µmol und 0,22 µmol.

Nach 48-stündiger Inkubation waren die Konzentrationsstufen 10 µg/ml mit Werten von 18,82 % ($Q_{25} = 6,27$ %, $Q_{75} = 32,96$ %; $p = 0,028$) und 3 µg/ml mit Werten von 6,29 % ($Q_{25} = 6,27$ %, $Q_{75} = 19,81$ %; $p = 0,002$) signifikant verschieden von der unstimulierte Gruppe mit Werten von 4,57 % ($Q_{25} = 2,01$ %, $Q_{75} = 6,27$ %) (Abbildung 22B).

Die Stoffmengen von LPS lagen nach 48-stündiger Stimulation in den einzelnen Versuchen bei 45,92 µmol, 13,73 µmol, 42,88 µmol und 7,03 µmol. Die Stoffmengen der unstimulierten Gruppe nach 48-stündiger Stimulation bei 0,97 µmol, 0,86 µmol, 0,75 µmol und 0,79 µmol.

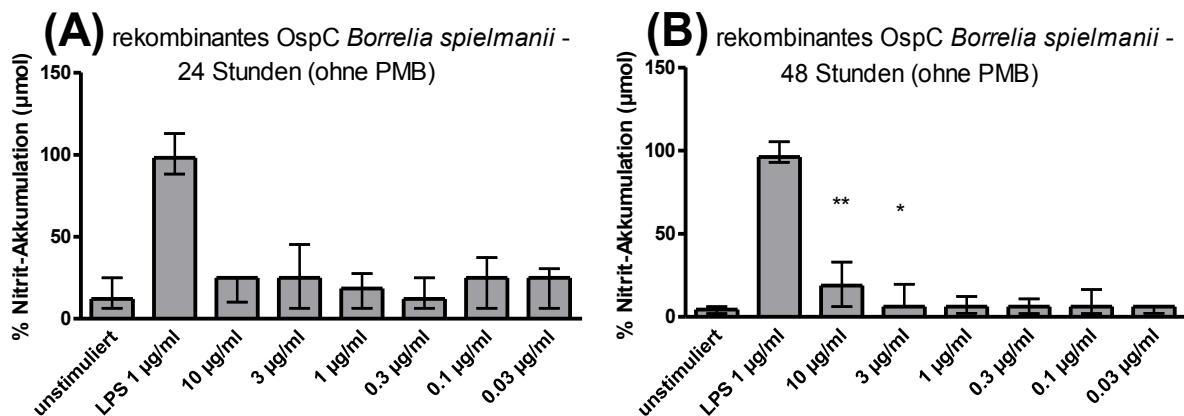


Abbildung 22: Die Grafiken stellen die prozentuale Nitrit-Akkumulation im Überstand nach (A) 24- und (B) 48-stündiger Inkubation muriner Mikrogliaulturen mit dem rekombinanten OspC von *Borrelia spielmanii* im Median dar (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Pro Konzentrationsstufe wurden für (A) 24 Stunden $n = 14$ Kavitäten und (B) 48 Stunden $n = 14$ Kavitäten gemessen. Als Positivkontrolle wurde LPS (= 1 µg/ml) verwendet (= 100 %).

3.4 Neuronen-Kulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen

3.4.1 Crossing - natürliches p41 von *Borrelia burgdorferi*

Als *Crossing* werden im Analyseprogramm die Überkreuzungen zweier Neuronenausläufer bezeichnet. Die Anzahl der Schnittstellen wurde per Definiens-Developer-XD-Analyse ermittelt. Die Ergebnisse wurden mittels Mann-Whitney-Test ausgewertet. Während bei den Neuronenkulturen ohne Mikroglia kein signifikanter Unterschied zwischen unstimulierter Gruppe und mit natürlichem p41 von *Borrelia burgdorferi* stimulierter Gruppe zu verzeichnen war ($p = 0,272$), unterschied sich die mit p41 stimulierte Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur signifikant von der unstimulierten Gruppe ($p = 0,023$). In der statistischen Auswertung wurde ein Median von 68,75 *Crossing* pro Coverslip ($Q_{25} = 27,88$; $Q_{75} = 117,1$), die mit natürlichem p41 von *Borrelia burgdorferi* stimuliert wurden, ermittelt. Die unstimulierte Kontrollgruppe wies 203,5 Überkreuzungen zweier Neuronenausläufer pro Coverslip auf ($Q_{25} = 87,13$; $Q_{75} = 352,9$, Abbildung 25, 26). Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurden die Abbildung 23A, B und Abbildung 24A, B beigelegt. Abgebildet ist jeweils ein Foto mit unstimulierten Neuronenkultur bzw. Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur im Vergleich zur p41 stimulierten Neuronenkultur bzw. Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur. Die folgenden Bilder wurden als repräsentative Beispiele aus den lichtmikroskopischen Fotos ausgewählt.

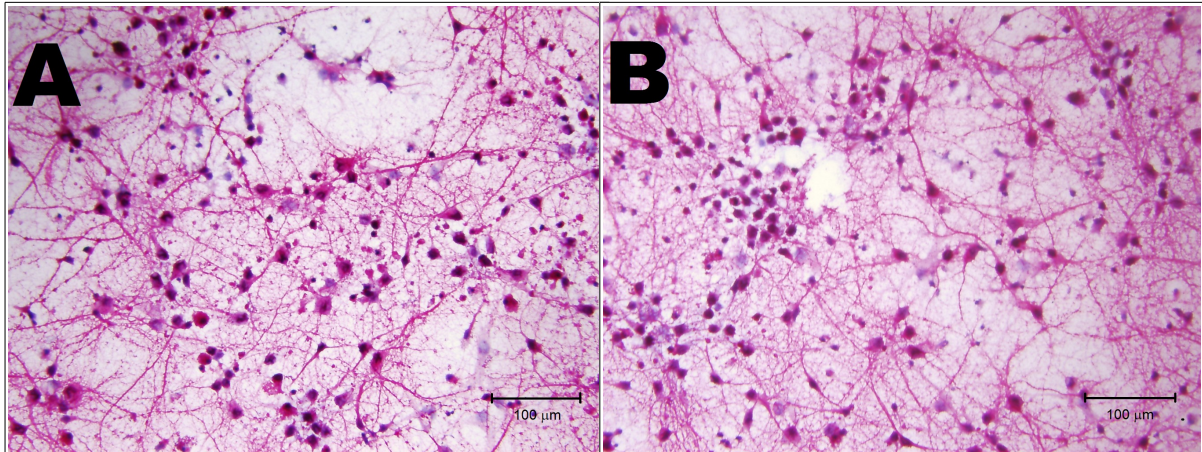


Abbildung 23: Die Abbildungen zeigen Neuronenkulturen. Aus dem Vergleich der beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass natürliches p41 von *Borrelia burgdorferi* in einer Konzentration von 3 µg/ml Neuronen nicht schädigt.

Links: (A) Neuronenkultur mit natürlichem p41 (3 µg/ml) von *Borrelia burgdorferi* stimuliert.

Rechts: (B) unstimulierte Neuronenkultur.

Die Coverslips wurden mit MAP2 (Neurone in rot) und Hämalaun (Neuronen- und Mikrogliazellkerne blau) gefärbt. Die Fotos wurden durch ein Lichtmikroskop aufgenommen, die Vergrößerung ist 200-fach.

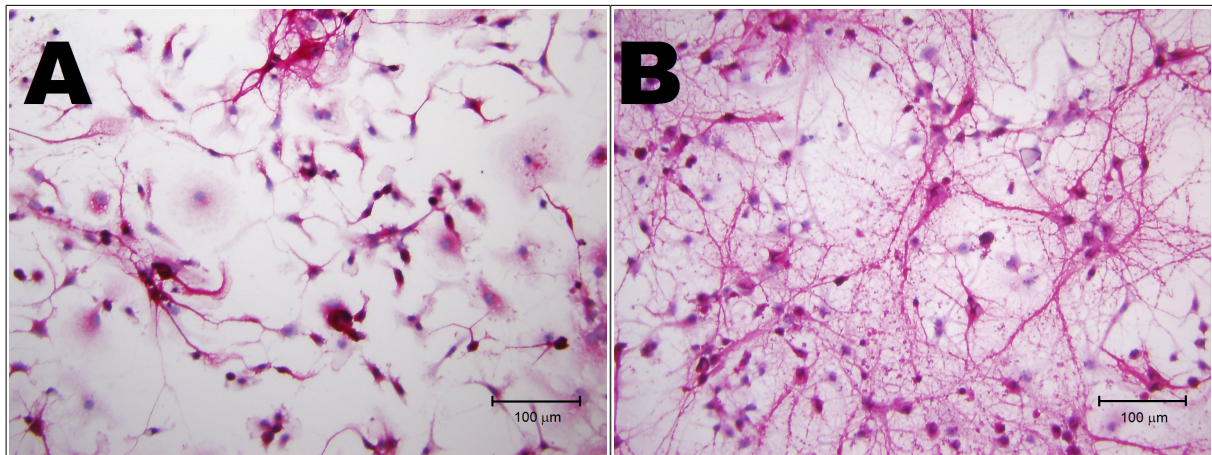


Abbildung 24: Die Abbildungen zeigen Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen. Aus dem Vergleich der beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass natürliches p41 von *Borrelia burgdorferi* in einer Konzentration von 3 µg/ml Neuronen in Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen schädigt.

Links: (A) Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur mit natürlichem p41 (3 µg/ml) von *Borrelia burgdorferi* stimuliert.

Rechts: (B) unstimulierte Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur.

Die Coverslips wurden mit MAP2 (Neurone in rot) und Hämalaun (Neuronen- und Mikrogliazellkerne blau) gefärbt. Die Fotos wurden durch ein Lichtmikroskop aufgenommen, die Vergrößerung ist 200-fach.

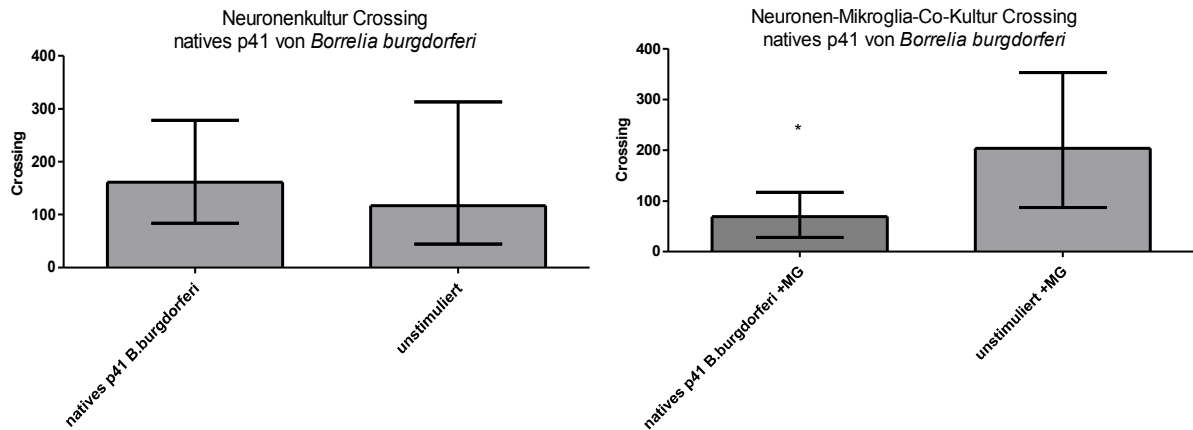


Abbildung 25, 26: Die Abbildung stellt die Anzahl der *Crossings* dar (Neuronenkulturen mit nativem p41 stimuliert n = 55, unstimulierte Gruppe n = 37, Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen mit nativem p41 stimuliert n = 18, unstimulierte Gruppe mit Mikroglia-Co-Kultur n = 8). Die abgebildeten Grafiken zeigen die Anzahl der Kreuzungen der Neuronenkulturen und der Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen nach 72-stündiger Stimulation mit 3 µg/ml natürlichem p41 von *Borrelia burgdorferi* (* p < 0,05). Die Grafiken zeigen den Median mit Interquartilsabstand.

3.4.2 Crossing - natürliches OspC von *Borrelia afzelii*

Die dargestellten Graphen zeigen die Stimulation von Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen mit 3 µg/ml von natürlichem OspC von *Borrelia afzelii*. Die unstimulierte Neuronenkultur zeigte im Vergleich zur mit natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* stimulierten Gruppe keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Anzahl der Überkreuzungen zweier Neuronenausläufer. In der unstimulierten Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur wurden im Median 180,5 (Q₂₅ = 30,50, Q₇₅ = 283,0) Überkreuzungen von Neuronen ermittelt, die mit 3 µg/ml natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* stimulierten Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen wiesen im Median 51,50 (Q₂₅ = 20,50, Q₇₅ = 82,50) Überkreuzungen auf. Dieses Ergebnis zeigt eine deutliche Tendenz dahingehend, dass mit natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* stimulierte Mikroglia Neuronen in Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur schädigen können (p = 0,146) (Abbildung 27,28).

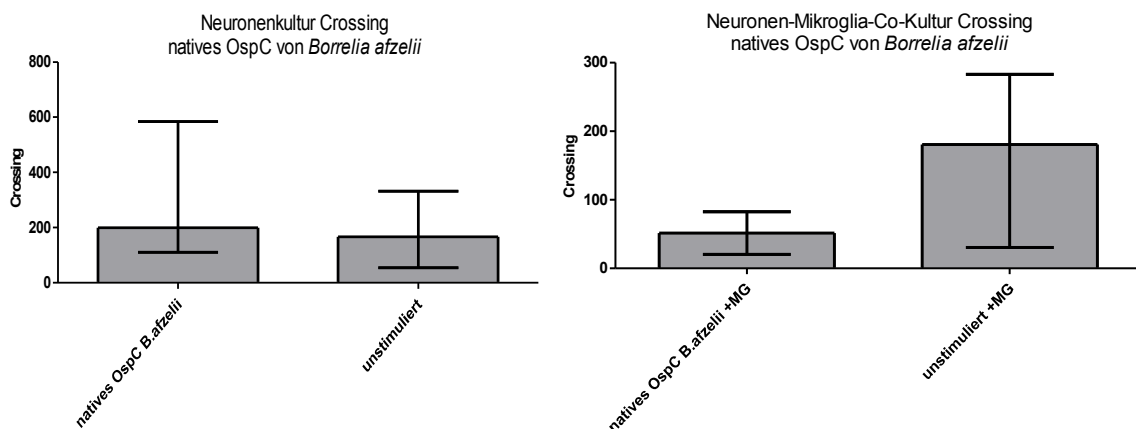


Abbildung 27, 28: Dargestellt ist die quantitative Auswertung der *Crossings* reiner Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen nach 72-stündiger Stimulation mit 3 µg/ml natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* (Neuronenkulturen mit nativem OspC von *Borrelia afzelii* stimuliert n = 23, unstimulierte Gruppe n = 44, Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen mit nativem OspC von *Borrelia afzelii* stimuliert n = 15, unstimulierte Gruppe mit Mikroglia-Co-Kultur n = 11). Die Grafiken zeigen den Median mit Interquartilsabstand.

3.4.3 Crossing - natürliches OspC von *Borrelia burgdorferi*

Die dargestellten Graphen zeigen die Stimulation von Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen mit 3 µg/ml von natürlichem OspC von *Borrelia burgdorferi*. Die unstimulierte Neuronenkultur zeigt im Vergleich zur mit natürlichem OspC von *Borrelia burgdorferi* stimulierten Gruppe keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Anzahl der Überkreuzungen zweier Neuronenausläufer. In der unstimulierten Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur wurden 180,5 (Q₂₅ = 30,50, Q₇₅ = 283,0) Überkreuzungen von Neuronen ermittelt, die mit 3 µg/ml natürlichem OspC von *Borrelia burgdorferi* stimulierten Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen wiesen 44,75 (Q₂₅ = 16,75, Q₇₅ = 92,50) Überkreuzungen auf (p = 0,132) (Abbildung 29, 30). Es ist eine deutliche Tendenz zu erkennen, dass ein Neuronenschaden in Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen entsteht.

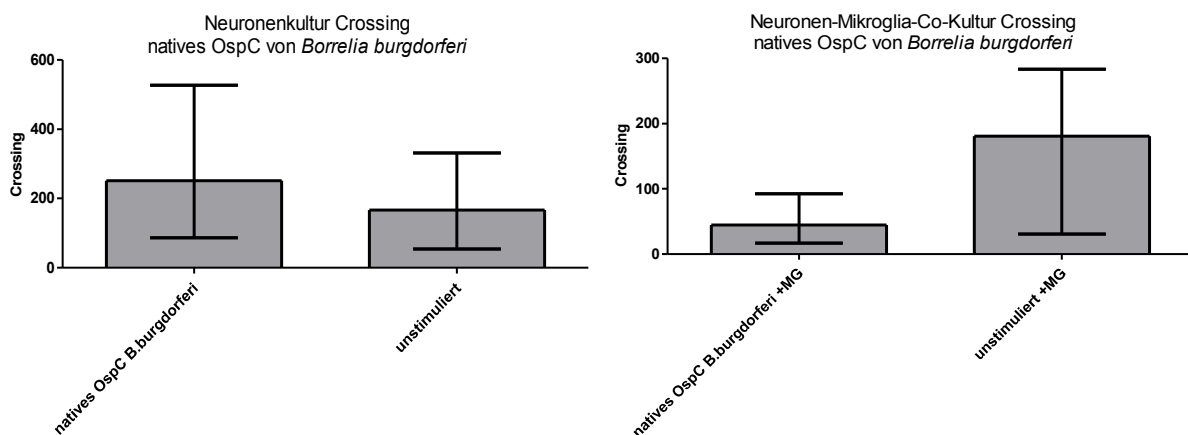


Abbildung 29, 30: Dargestellt ist die quantitative Auswertung der *Crossings* von Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen nach 72-stündiger Stimulation mit 3 µg/ml natürlichem OspC von *Borrelia burgdorferi* (Neuronenkulturen mit nativem OspC von *Borrelia burgdorferi* stimuliert n = 29, unstimulierte Gruppe n = 44, Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen mit nativem OspC von *Borrelia burgdorferi* stimuliert n = 11, unstimulierte Gruppe mit Mikroglia-Co-Kultur n = 9). Die Grafiken zeigen den Median mit Interquartilsabstand.

4 Diskussion

Unter der Annahme, dass durch Borrelienbestandteile Mikroglia aktiviert werden und in Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen Neuronen schädigen, wurde in dieser Arbeit zuerst die Aktivierung von Mikroglia in Mikroglia-kulturen durch Borrelienbestandteile untersucht und in einem zweiten Schritt die Zellschädigung von mit Borrelienbestandteilen versetzten Neuronenkulturen und Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen analysiert.

4.1 Auswertung

Während der Versuche zur Nitrit-Akkumulation (gemessen als stabiles Abbauprodukt von NO) und Zytokin-Freisetzung war nach Stimulation mit natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* sowie OspC und p41 von *Borrelia burgdorferi* eine Steigerung der Freisetzung proinflammatorischer Proteine und Mediatoren zu beobachten.

So war die Nitrit-Akkumulation im Überstand nach Stimulation muriner Mikroglia-kulturen mit natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* in den Konzentrationsstufen 10 µg/ml ($p = 0,014$), 3 µg/ml ($p = 0,001$) und 1 µg/ml ($p = 0,029$) nach 24 Stunden signifikant verschieden von der Nitrit-Akkumulation im Überstand von unstimulierten murinen Mikroglia-kulturen. Nach 48 Stunden unterschied sich die Nitrit-Akkumulation im Überstand in den Konzentrationsstufen 10 µg/ml ($p = 0,044$), 3 µg/ml ($p = 0,044$) und 1 µg/ml ($p = 0,044$) ebenfalls signifikant von der unstimulierten Gruppe. Auch durch die Stimulation muriner Mikroglia-kulturen mit natürlichem OspC von *Borrelia burgdorferi* war eine Nitrit-Akkumulation im Überstand nach 24 Stunden für die Konzentrationsstufen 10 µg/ml ($p = 0,044$) und 3 µg/ml ($p = 0,044$) signifikant verschieden von der Nitrit-Akkumulation im Überstand der unstimulierten Mikroglia-kultur. Nach 48 Stunden unterschieden sich die Konzentrationsstufen 10 µg/ml ($p = 0,044$), 3 µg/ml ($p = 0,044$), 1 µg/ml ($p = 0,044$) und 0,3 µg/ml ($p = 0,044$) signifikant von der unstimulierten Mikroglia-kultur. Wie bereits unter Punkt 1.2 beschrieben, besteht nach Literaturansicht ein Zusammenhang zwischen der Freisetzung von Mediatoren und der Schädigung von Neuronen.

OspC ist bekannt als eines der Proteine, das während einer Infektion mit Borrelien kontinuierlich *in vivo* exprimiert wird (Hodzic et al. 2003, Batsford et al. 2004). Es ist essentiell für die Infektion des Vertebraten. Die Virulenz und Expression von OspC wurde bereits im Abschnitt 1.1.2.1 beschrieben. Tauber et al. zeigten 2011 bereits, dass - wie in diesem Versuch - die Stimulation mit OspC murine Mikroglia zur Freisetzung von NO stimuliert (Tauber et al. 2011).

Natürliches p41 von *Borrelia burgdorferi* stimulierte die Mikroglia in den Konzentrationsstufen 10 µg/ml ($p = 0,014$), 3 µg/ml ($p = 0,004$), 1 µg/ml ($p = 0,004$) und 0,3 µg/ml ($p = 0,004$) nach 48 Stunden signifikant. P41 ist ein Protein des Interzellularraumes von *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Es gehört zu den Flagellinen, welche in Zusammenhang mit autoimmunologischen Prozessen gebracht werden. Es wird vermutet, dass durch molekulare Mimikry (Immunevasion, bei der Pathogene ihre Proteine und Kohlenhydrate denen des Wirtes angleichen, um dem wirtseigenem Immunsystem zu entgehen) eine humorale Antwort und ein Weiterbestehen der neuronalen Dysfunktionen nach *lege artis* durchgeführter Therapie hervorgerufen wird (Sigal und Williams 1997). Chandra et al. beschreiben jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Erhöhung p41-spezifischer Antikörper im Serum, was gegen eine solche Theorie in Bezug auf p41 und seine Rolle im Post-Lyme-Disease-Syndrom sprechen könnte (Chandra et al. 2011). Wie unter Punkt 1.1.2.2 beschrieben, bewirkt p41 aber eine Bildung erster Antikörper bei akuter Borreliose. Die hier festgestellte Steigerung der Freisetzung von NO könnte einen Zellschaden durch p41 aufgrund einer mikroglialen Aktivierung erklären. Die Schädigung von Neuronen durch das von Makrophagen und Mikroglia freigesetzte NO wird auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Multipler Sklerose und Morbus Alzheimer als Ursache in Erwägung gezogen (Aktas et al. 2007).

Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurde in der Arbeit von Tauber et. al 2011 bei rekombinant hergestelltem OspC von *Borrelia garinii* eine Stimulation der NO-Freisetzung beobachtet. Dieser Unterschied begründet sich vermutlich in der Herstellung der rekombinanten Proteine (siehe 4.3.). Die hier verwendeten rekombinanten

Proteine von *Borrelia burgdorferi* und *Borrelia afzelii* haben nicht zu einer signifikanten Steigerung der NO-Freisetzung im Vergleich zur unstimulierten Gruppe geführt. Wie bereits unter 2.7.2 wies rekombinantes OspC von *Borrelia spielmanii* in einer zuvor durchgeführten Endotoxinanalyse grenzwertige Messwerte auf. Signifikante Ergebnisse bei der NO-Freisetzung in Bezug auf die unstimulierte Gruppe zeichneten sich nur mit rekombinantem OspC von *Borrelia spielmanii* (ohne PMB) nach 48-stündiger Inkubation der Mikroglia ab. Der p-Wert lag in den Konzentrationsstufen 10 µg/ml ($p = 0,028$) und 3 µg/ml ($p = 0,002$) im signifikanten Bereich. Aufgrund der geringen Menge an rekombinantem OspC von *Borrelia spielmanii*, der fraglichen Kontamination und der schwachen, eventuell durch LPS verursachten Stimulation wurden keine weiteren Versuche mit der Substanz durchgeführt.

Zur Auswertung der Zytokin-Freisetzung konnte nur ein Versuch herangezogen werden ($n = 2$). Auch hier war durch die limitierte Menge an zur Verfügung gestellten Proteinen die Versuchszahl begrenzt. Die Analyse der Zytokin-Freisetzung zeigte, dass durch Stimulation der Mikroglia mit natürlichem OspC von *Borrelia afzelii*, natürlichem OspC und p41 von *Borrelia burgdorferi* eine tendenzielle Steigerung der Interleukin-6, TNF- α und KC-Freisetzung zu beobachten ist. Die Freisetzung proinflammatorischer Proteine zeigte sich bereits in früheren Studien. Sowohl Rasley, Anguita und Marriott als auch Ramesh et al. beobachteten einen Anstieg der proinflammatorischen Zytokine durch Stimulation von Mikroglia mit *Borrelia burgdorferi* (Ramesh et al. 2009, Rasley et al. 2002). Dass durch Mikrogliaaktivierung freigesetzte proinflammatorische Proteine einen Zellschaden verursachen können, ist in der Literatur bereits nachgewiesen (Boje und Aurora 1992, Ghoshal et al. 2007). Auch in Co-Kulturen der neuronalen Zelllinie SH-SY5Y mit Mikroglia wurde beobachtet, dass es durch Anwesenheit von mit *Borrelia burgdorferi* stimulierter Mikroglia zu einer Zunahme der Apoptoserate der neuronalen Zellen im Vergleich zur Kontrollkultur ohne Mikroglia kam (Myers et al. 2009).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es durch Stimulation der Mikroglia in der Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur zu einer Schädigung der Neurone kommen kann. Im

signifikanten Bereich lag hierbei die neuronale Schädigung in mit 3 µg/ml natürlichem p41 von *Borrelia burgdorferi* stimulierten Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen ($p = 0,023$). Die Auswertung bezog sich auf die *Crossings*.

Die Stimulation der Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen mit natürlichem OspC von *Borrelia afzelii* ($p = 0,146$) und *Borrelia burgdorferi* ($p = 0,132$) wiesen eine eindeutige Tendenz zur Schädigung von Neuronen durch Mikroglia auf. Aufgrund einer ausgeprägteren Streuung wurden keine signifikanten Ergebnisse erreicht.

Schon in vorherigen Studien wurde über einen zytotoxischen Effekt von stimulierten Mikroglia in Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen berichtet (Combs et al. 2001, Iliev et al. 2004, Neniskyte et al. 2011, Schütze et al. 2012). Inwieweit dieser Mechanismus die Neuronen im Zusammenhang mit der Neuroborreliose schädigt und einen dauerhaften Neuronenschaden hervorruft, ist ungeklärt. Eine weitere Möglichkeit, die zur Zell-schädigung der Neuronen bei Neuroborreliose führen könnte, wäre, dass durch die Aktivierung autoimmunologischer Prozesse Kreuzreaktionen von Antikörpern mit neuronalen Antigenen entstehen (Alaadini und Latov 2005, Sigal 1993). Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass es zu einer direkte Schädigung von Neuronen durch aktivierte Mikroglia kommen kann. Sollte es durch diese direkte Schädigung der Neurone durch Borrelienbestandteile oder durch Aktivierung autoimmunologischer Prozesse oder durch ein Zusammenspiel beider Mechanismen zu einem diffusen axonalen Schaden kommen, so wären kognitive Defizite, wie sie als Hauptsymptome des Post-Lyme-Disease-Syndroms beschrieben werden (siehe auch 1.1.6.2), ein wahrscheinliches Resultat (McAllister 1993).

4.2 *Post-Lyme-Disease-Syndrom*

Chronische unspezifische Beschwerden in Kombination mit einer positiven Borrelienserologie werden oft mit einer chronischen Borreliose in Zusammenhang gebracht (siehe auch 1.1.6.2). Ob eine Neuroborreliose zu einem dauerhaften Neuroschaden führen kann, wird kontrovers diskutiert. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2005 zeigt, dass Gedächtnis-, Konzentrations-, und Wortfindungsstörungen signifikant öfter in einer Gruppe von Patienten mit einer durchgemachten Borreliose zu finden waren als in der Kontrollgruppe (Cairns und Godwin 2005). Auch weitere Studien belegen, dass es zur geringfügigen Beeinträchtigung durch neuropsychiatrische und neurologische Symptome nach Borrelieninfektion kommen kann (Bloom et al. 1998). Eikeland et al. stützen die Theorie des chronischen Schadens nach Neuroborreliose durch eine Studie aus dem Jahr 2012, die eine signifikante Beeinträchtigung in visuellen, verbalen und kognitiven Funktionen bei *lege artis* therapierten Patienten 30 Monate nach durchgemachter Neuroborreliose bestätigt (Eikeland et al. 2012). Weiter zeigt auch eine frühere Studie von Shadick et al., dass Patienten mit Borreliose häufiger an kognitiven Dysfunktionen und Gedächtnisstörungen leiden als die Kontrollkohorte (Shadick et al. 1994). Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen meiner Arbeit vereinbar, da ein Neuronenschaden durch die Aktivierung von Mikroglia in Bezug auf natürliches p41 von *Borrelia burgdorferi* nachgewiesen wurde und eine eindeutige Tendenz der Ergebnisse der Stimulation in Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen mit natürlichem OspC von *Borrelia burgdorferi* und *Borrelia afzelii* zu beobachten war (siehe 3.4.). Bei einer größeren Versuchszahl wäre möglicherweise eine signifikante Stimulation zu beobachten gewesen. Dies war jedoch aufgrund der begrenzten Menge an zur Verfügung stehenden borrelienspezifischen Proteinen nicht möglich.

Anderslautende Studien beschreiben keine signifikanten Differenzen kognitiver Fähigkeiten und auch keine psychiatrischen Auffälligkeiten von Patienten, die eine Neuroborreliose durchgemacht haben, im Vergleich zu altersgleichen Kontrollpersonen (Adams et al. 1999, Elkins et al. 1999). Auch Stelzer fand in seiner Arbeit

aus dem Jahr 2000 bei Patienten, die vor 1-11 Jahren eine Borreliose durchgemacht haben, keine signifikanten Einschränkungen in Kognition und Gedächtnisfunktion im Vergleich zur altersgleichen Kontrollgruppe (Stelzer et al. 2000). Ebenfalls beschrieben Kalish et al. 2001 in einer Follow-up-Studie, dass 10-20 Jahre nach durchgemachter Borreliose keine signifikanten Unterschiede der neuropsychiatrischen Testergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe zu finden waren (Kalish et al. 2001). Eine psychische Vorbelastung soll laut einer Studie von Salomon et al. 1998 eine wichtige Rolle bei der Chronifizierung von Symptomen spielen unabhängig davon, ob die Patienten wirklich eine Borreliose in der Krankheitsgeschichte vorzuweisen haben (Salomon et al. 1998). Diese Ergebnisse beruhen möglicherweise auf der Reversibilität eines durch Aktivierung von Mikroglia induzierten Neuronenschadens.

Unter therapeutischem Ansatz zeigte eine US-amerikanische Studie, dass eine erneute Langzeitantibiose den Placeboeffekt nicht signifikant übersteigt (Klempner et al. 2001). Kaplan et al. publizierten 2003 ähnliche Ergebnisse, die keine Verbesserung kognitiver Fähigkeiten nach erneuter Langzeitantibiose vorweisen konnten (Kaplan et al. 2003). Lediglich eine Verbesserung der Erschöpfungssymptomatik wurde 2003 in einer Studie von Krupp et al. beobachtet. Aufgrund des Nebenwirkungsspektrums und des geringen Nutzens einer erneuten antibiotischen Therapie ist diese aber laut Autorenangaben nicht indiziert (Krupp et al. 2003). Die verbleibenden Symptome und Leiden sprechen also nicht oder nur in geringem Maße auf erneute antibiotische Therapie an. Die Behandlung der neurologischen und neuropsychiatrischen Beschwerden sollte daher symptomatisch erfolgen.

Das kontrovers diskutierte Thema Post-Lyme-Disease-Syndrom wird heutzutage von einer Vielzahl der Fachleute anerkannt oder für möglich gehalten. Gegenstand der Forschung ist vor allem die Frage, ob autoimmunologische Prozesse für die Persistenz der Symptome verantwortlich sind. Auch ein durch aktivierte Mikroglia verursachter

Neuronenschaden kann eine mögliche langfristige Beeinträchtigung der kognitiven Leistungsfähigkeit der Patienten verursachen. Im Zusammenhang mit anderen Krankheitsbildern wie der Alzheimer-Demenz ist die Schädigung von Neuronen durch Mikroglia ebenso Bestandteil der Forschung (Combs et al 2001, Iliev et al. 2004, Schütze et al. 2012). Diese Arbeit hat gezeigt, dass natürliches OspC von *Borrelia burgdorferi* und *Borrelia afzelii* sowie natürliches p41 von *Borrelia burgdorferi* zu einem Anstieg der Nitrit-Akkumulation im Überstand und somit zu einem Anstieg der NO-Freisetzung führen. Dies wiederum kann einen neuronalen Zelltod oder axonalen Schaden bewirken (Boje und Aurora 1992, Iliev et al. 2004). Auch der Anstieg der Zytokin-Freisetzung, der hier exemplarisch an einzelnen Versuchen dargestellt wurde, kann einen Untergang neuronalen Gewebes verursachen (Arnett et al. 2001, Iliev et al. 2004). Da die Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen in Bezug auf die Stimulation mit natürlichem p41 von *Borrelia burgdorferi* einen signifikanten Unterschied zur unstimulierten Gruppe aufweisen und die Stimulation mit natürlichem OspC von *Borrelia burgdorferi* (und *Borrelia afzelii*) eine eindeutige Tendenz zur Verursachung eines Neuronenschadens zeigen, ist ein Mikroglia-induzierter Neuronenschaden nach Stimulation mit Bestandteilen von *Borrelia burgdorferi sensu lato* wahrscheinlich.

4.3 Rekombinante Proteine

Nach Durchführung der Messung der NO-Freisetzung wurde deutlich, dass keines der rekombinanten Proteine zur Stimulation der Mikroglia führte. Dr. Olaf Jahn, Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Proteomics des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin Göttingen, analysierte daraufhin die Struktur der rekombinanten und natürlichen Proteine. Es wurde die MALDI ISD-Analyse verwendet, die zur Darstellung N- und C-terminaler Sequenzen von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 6-80 kDa genutzt werden kann. Die Darstellung N-terminal blockierter oder modifizierter Proteine (PEGyliert, acetyliert etc.) kann durch die Sequenzierung sehr gut dargestellt werden (Sukau und Resemann 2003). Die theoretische Masse der rekombinanten Proteine wich hierbei stark von denen der natürlichen Proteine ab (>1300 Da). Die

natürlichen Proteine waren rein, bei den rekombinanten Proteinen wies der N-terminale Teil ein sogenanntes Histidin-Tag (His-Tag) auf. Ein Tag ist eine Aminosäuresequenz, die bei Klonierung eines Proteins an den offenen Leserahmen herangefügt wird, um die Aufreinigung des Proteins auf bis zu 95% zu steigern. Durch die Verbindung mit einer Proteasesequenz, in diesem Fall der Faktor-Xa-Protease, soll die posttranslationale Reinigung der Proteine erleichtert werden. Besonders bei der auch hier verwendeten Klonierung durch *Escherichia coli* werden solche His-Tags verwendet (Hengen 1995). Im Fall der rekombinanten OspC-Proteine von *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia spielmanii* und des rekombinanten p41 von *Borrelia burgdorferi* scheint ein Vektor mit Faktor-Xa-Protease und einer N-Methylierung an Prolin vorzuliegen, wodurch die komplette Abspaltung nicht möglich war. Durch die veränderte Struktur und die Persistenz des His-Tags sowie der Faktor-Xa-Protease ist möglicherweise eine fehlende Stimulation der Proteine erklärbar.

5 Zusammenfassung und Ausblick

OspC und p41 sind Proteine von *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Ihnen wird eine große immunologische Rolle zugeschrieben. Sie werden bei der Infektion mit Borrelien im menschlichen Körper exprimiert und stimulieren das Immunsystem.

In dieser Arbeit wurde die immunstimulatorische und pathogene Wirkung von nativem OspC und p41 untersucht. Vergleichend wurden die rekombinant hergestellten Proteine zur Stimulation genutzt. In Mikroglia-Kulturen wurde eine mikrogliale Aktivierung durch verschiedene Borrelienbestandteile unterschiedlicher Spezies beobachtet. Durch die Stimulation wurden ruhende Mikroglia aktiviert und setzten proinflammatorische Zytokine und Stickstoffmonoxid in Mikroglia-Kulturen frei. Die rekombinant hergestellten Proteine stimulierten aufgrund ihrer fehlerhaften Struktur nicht. In angelegten Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen wurde die neuronale Schädigung durch OspC- und p41-aktivierte Mikroglia im Zellverband untersucht. P41 als stärkster Immunstimulator führte in Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen zum Untergang der Neurone. Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen, die mit OspC stimuliert wurden, zeigten eine eindeutige Tendenz zur Neuronenschädigung. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Schädigung von Neuronen durch die Aktivierung von Mikroglia durch Bestandteile von *Borrelia burgdorferi sensu lato* auch *in vivo* möglich ist.

6 Literaturverzeichnis

Adams WV, Rose CD, Eppes SC, Klein JD (1999): Long-term cognitive effects of Lyme disease in children. *Appl Neuropsychol* 6, 39-45

Aktas O, Ullrich O, Infante-Duarte C, Nitsch R, Zipp F (2007): Neuronal damage in brain inflammation. *Arch Neurol* Vol 64, 185-189

Alaedini A, Latov N (2005): Antibodies against OspA epitopes of *Borrelia burgdorferi* cross-react with neural tissue. *J Neuroimmunol* 159, 192-195

Arnett H A, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP (2001): TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4 (11), 1116-1122

Asch ES, Bujak DI, Weiss M, Peterson MG, Weinstein A (1994): Lyme disease: an infectious and postinfectious syndrome. *J Rheumatol* 21 (3), 454-461

Baird AG, Gillies JCM, Bone FJ, Dale BAS, Miscampbell NT (1989): Prevalence of antibody indicating Lyme disease in farmers in Wigtownshire *BMJ* 299, 836-837

Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA (1992): Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 42 (3), 378-383

Barbour AG, Hayes SF (1986): Biology of *Borrelia* Species. *Micorbiol Rev* Vol 50 (4), 381-400

Batsford S, Dunn J, Mihatsch M (2004): Outer Surface Lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* vary in their ability to induce experimental joint injury *Arthritis Rheum* Vol 50 (7), 2360–2369

Bloom BJ, Wyckoff PM, Meissner HC, Steere AC (1998): Neurocognitive abnormalities in children after classic manifestations of Lyme disease. *Pediatr Infect Dis J* 17, 189–196

Boje KM, Arora PK (1992): Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* 587, 250-256

Burgdorfer W (1983): Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med* 57, 515-520

Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP (1982): Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* 216, 1317-1319

Busch U, Hizo-Teufel C, Boehmer R, Fingerle V, Nitschko H, Wilske B, Preac-Mursic V (1996): Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. *J Clin Microbiol* 34, 1072–1078

Cairns V, Godwin J (2005): Post-Lyme borreliosis syndrome: a meta-analysis of reported symptoms. *Int J Epidemiol* 34, 1340–1345

Canica MM, Nato F, du Merle L, Mazie JC, Baranton G, Postic D (1993): Monoclonal Antibodies for Identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis* 25, 441-448

Chakrabarty P, Jansen-West K, Beccard A, Ceballos-Diaz C, Levites Y, Verbeeck C, Zubair AC, Dickson D, Golde TE, Das P (2010): Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses A β deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J* 24, 548-559

Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P (2007): The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 53(2), 344-354

Chandra A, Wormser GP, Marques AR, Latov N, Alaedini A (2011): Anti-*Borrelia burgdorferi* antibody profile in post-Lyme disease syndrome. *Clin Vaccine Immunol* 18 (5), 767–771

Christen HJ, Hanefeld F, Eiffert H, Thomssen R (1993): Epidemiology and clinical manifestations of Lyme borreliosis in childhood. A prospective multicentre study with special regard to neuroborreliosis. *Acta Paediatr Suppl* 386, 1-75

- Coleman JL, Benach JL (1987): Isolation of antigenic components of Lyme diseases spirochete. Their role in early diagnosis. *J infect Dis* 155, 756-765
- Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE (2001): β -Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21 (4), 1179–1188
- Corradin SB, Mauer J, Donini SD, Quattrocchi E, Riccardi-Castagnoli P (1993): Inducible nitric oxide synthase activity of cloned murine microglial cells. *Glia* 7, 255-262
- Dissing-Olesen L, Ladeby R, Nielsen HH, Toft-Hansen H, Dalmau I, Finsen B (2007): Axonal lesion-induced microglial proliferation and microglial cluster formation in the mouse. *Neuroscience* 149(1), 112-122
- Djukic M, Schmidt-Samoa C, Nau R, von Steinbüchel N, Eiffert H, Schmidt H (2010): The diagnostic spectrum in patients with suspected chronic Lyme neuroborreliosis--the experience from one year of a university hospital's Lyme neuroborreliosis outpatients clinic. *Eur J Neurol* 18, 547-55
- Ebert S, Gerber J, Bader S, Muhlhauser F, Brechtel K, Mitchell TJ, Nau R (2005): Dose-dependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. *J Neuroimmunol* 159, 87-96
- Eiffert H, Ohlenbusch A, Christen HJ, Thomssen R, Spielman A, Matuschka FR (1995): Nondifferentiation between Lyme disease spirochetes from vector ticks and human cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 171 (2), 476-479
- Eiffert H, Karsten A, Thomsson R, Christensen HJ (1998): Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains in Lyme arthritis. *Scand J Infect Dis* 30, 265–268
- Eikeland R, Ljøstad U, Mygland Å, Herlofson K, Løhaugen GC (2012): European neuroborreliosis: neuropsychological findings 30 months post-treatment. *Eur J Neurol* 19, 480–487
- Elbaum-Garfinkle S (2011): close to home: A history of Yale and Lyme disease. *Yale J Biol Med* 84, 103-108

- Elkins LE, Pollina DA, Scheffer SR, Krupp LB (1999): Psychological states and neuropsychological performances in chronic Lyme disease. *Appl Neuropsychol* 6, 19–26
- Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC (1995): Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 33, 419–427
- Ertel SH, Esponda B, Nelson R (2005): Lyme disease- Connecticut 2005. *Connecticut Epidemiologist* 26, 13-14
- Fahrer H, van der Linden SM, Sauvain MJ, Gern L, Zhioua E, Aeschlimann A (1991): The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme Borreliosis in a population at risk. *J Infect Dis* 163 (2), 305-310
- Fallon BA, Kochevar JM, Gaito A, Nields JA (1998): The underdiagnosis of neuropsychiatric Lyme disease in children and adults. *Psychiatr Clin North Am* 21, 693-703
- Fikrig E, Barthold SW, Kantor FS, Flavell RA (1990): Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. *Science* 250 (4980), 553-556
- Fuchs R, Jauris S, Lottspeich F, Preac-Mursic V, Wilske B, Soutschek E (1992): Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22 kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 6 (4), 503-509
- Garcia-Monco JC, Villar BF, Alen JC, Benach JL (1990): *Borrelia burgdorferi* in the central nervous system: experimental and clinical evidence for early invasion. *J Infect Dis* 161 (6), 1187-1193
- Garin C, Bujadoux C (1922): Paralysie par les tiques. *J Med Lyon* 71, 765–767
- Ghoshal A, Das S, Ghosh S, Mishra MK, Sharma V, Koli P, Sen E, Basu A (2007): Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. *Glia* 55, 483–496

- Gimsa U, Peter SV, Lehmann K, Bechmann I, Nitsch R (2000): Axonal damage induced by invading T cells in organotypic central nervous system tissue in vitro: involvement of microglial cells. *Brain Pathol* 10 (3), 365-377
- Giulian D, Baker TJ, Shih L-CN, Lachman LB (1986): Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J Exp Med* 164, 594–604
- González-Scarano F, Baltuch G (1999): Microglia as mediators of inflammatory and degenerative disease. *Annu Rev Neurosci* 22, 219–240
- Grab DJ, Perides G, Dumler JS, Jun Kim K, Park J, Kim YV, Nikolskaia O, Seong Choi K, Stins MF, Sik Kim K (2005): *Borrelia burgdorferi*, host-derived proteases, and the blood-brain barrier. *Infect Immun* 73 (2), 1014-1022
- Grimm D, Tilly K, Byram R, Stewart PE, Krum JG, Bueschel DM, Schwan TG, Policastro PF, Elias AF, Rosa PA (2004): Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 3142–3147
- Hanisch UK (2002): Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140-155
- Hansen K, Lebech AM (1992): The clinical and epidemiological profile of Lyme Neuroborreliosis in Denmark 1985-1990. A prospective study of 187 patients with *Borrelia burgdorferi* specific intrathecal antibody production. *Brain* 115, 399-423
- Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K (1994): Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 56, 559–564
- Hengen P (1995): Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 20 (7), 285-286
- Hodzic E, Feng S, Freet KJ, Barthold SJ (2003): *Borrelia burgdorferi* population dynamics and prototype gene expression during infection of immunocompetent and immunodeficient mice. *Infect Immun* 71 (5), 5042–5055

Huppertz HI, Böhme M, Standaert SM, Karch H, Plotkinet SA (1999): Incidence of Lyme Borreliosis in the Würzburg region of Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18, 697-703

Iliev AI, Stringaris AK, Nau R, Neumann H (2004): Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR9). *FASEB J* 18 (2), 412-414

Kaiser R(1998): Neuroborreliosis. *J Neurol* 245, 247-255

Kalish RA, Kaplan RF, Taylor E, Jones-Woodward L, Workman K, Steere AC (2001): Evaluation of study patients with Lyme disease, 10–20-year follow up. *J Infect Dis* 183, 453–460

Kaplan RF, Trevino RP, Johnson GM, Levy L, Dornbush R, Hu LT, Evans J, Weinstein A, Schmid CH, Klempner MS (2003): Cognitive function in post-treatment Lyme disease: do additional antibiotics help? *Neurology* 60, 1916–1922

Klempner MS, Linden T, Evans J, Schmid CH, Johnson GM, Trevino RP, Norton D, Levy L, Wall D, McCall J, Kosinski M, Weinstein A (2001): Two controlled trials of antibiotic treatment in patients with persistent symptoms and a history of Lyme Disease. *N Engl J Med* 345 (2), 85-92

Knauer C, Sivakumar V, Zou Z, Ling EA (2014): Microglia-derived proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta induce Purkinje neuronal apoptosis via their receptors in hypoxic neonatal rat brain. *Brain Struct Funct* 219, 151-70

Kreutzberg GW (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Neurosci* 19, 312-318

Krupp LB, Hyman LG, Grimson R, Coyle PK, Melville P, Ahnn S, Dattwyler R, Chandler B (2003): Study and treatment of post Lyme disease (STOP-LD): A randomized double masked clinical trial. *Neurology* 60, 1923–1930

Kuhlow CJ, Garcia-Monco JC, Coleman JL, Benach JL (2005): Murine microglia are effective phagocytes for *Borrelia burgdorferi*. *J Neuroimmunol* 168, 183-187

Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003): Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (14), 8515-8519

Leitlinien Neuroborreliose 10.01.2011

Ljøstad U, Mygland Å (2012): The phenomenon of chronic Lyme; an observational study. *Eur J Neurol* 19 (8), 1128–1135

McAllister TW (1993): Neuropsychiatric sequelae of head injuries. *Psychiatr Clin North Am* 15, 395-413

Myers TA, Kaushal D, Philipp MT (2009): Microglia Are Mediators of *Borrelia burgdorferi*- Induced Apoptosis in SH-SY5S Neuronal Cells. *PLOS Pathogens* 5, e1000659

Nau R, Christen HJ, Eiffert H (2009): Lyme-Borreliose –aktueller Kenntnisstand. *Deutsches Ärzteblatt* 106 (5), 72-83

Neniskyte U, Neher JJ, Brown GC (2011): Neuronal death induced by nanomolar amyloid β is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia. *J Biol Chem* 286 (46), 39904–39913

Ohlenbusch A, Matuschka FR, Richter D, Christen HJ, Thomssen R, Spielman A, Eiffert H (1996): Etiology of the acrodermatitis chronica atrophicans lesion in Lyme disease. *J Infect Dis* 174, 421-423

Pachner AR, Steere AC (1985): The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis. *Neurology* 35 (1),47-53

Parola P, Raoult (2001): Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an Emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* 32, 897–928

Pfister HW, Einhäupl K, Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G (1984): The spirochetal etiology of lymphocytic meningoradiculitis of Bannwarth (Bannwarth's Syndrom). *J Neurol* 231, 141-144

Preac-Mursic V, Weber K, Pfister HW, Wilske B, Gross B, Baumann A, Prokop J (1989): Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. *Infection* 17 (6), 355-359

Preac-Mursic V, Wilske B, Patsouris E, Jauris S, Will G, Soutschek E, Rainhardt S, Lehnert G, Klockmann U, Mehraein P (1992): Active immunization with pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gerbils against *B. burgdorferi* infection. *Infection* 20 (6), 342-349

Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, Fish D, Anguita J, Norgard MV, Kantor FS, Anderson JF, Koski RA, Fikrig E (2005): The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 436, 573–577

Ramesh G, Borda JT, Gill A, Ribka EP, Morici LA, Mottram P, Martin DS, Jacobs MB, Didier PJ, Philipp MT (2009): Possible role of glial cells in the onset and progression of Lyme neuroborreliosis. *J. Neuroinflammation* 25, 6-23

Rasiah C, Schiltz E, Reichert J, Vogt A (1992): Purification and characterization of a tryptic peptide of *Borrelia burgdorferi* flagellin, which reduces cross-reactivity in immunoblots and ELISA. *J Gen Microbiol* 138, 147-154

Rasley A, Anguita J, Marriott I (2002): *Borrelia burgdorferi* induces inflammatory mediator production by murine microglia. *J. Neuroimmunol* 130, 22-31

Reimers CD, de Koning J, Neubert U, Preac-Mursic V, Koster JG, Muller-Felber W, Pongratz DE, Duray PH (1993): *Borrelia burgdorferi* myositis: report of eight patients. *J Neurol* 240, 278-283

Richter D, Schlee DB, Algöwer R, Matuschka FR (2004): Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe *Appl Environ Microbiol* 70 (11), 6414-6419

Richter D, 'le Postic D, Sertour N, Livey I, Matuschka FR, Baranton G (2006): 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

Richter D, Schlee DB, Matuschka FR (2011): Reservoir competence of various rodents for the Lyme disease Spirocheta *Borrelia spielmanii*. *Appl Environ Microbiol* 77 (11), 3565-3570

Rijpkerna SGT, Taxelaar DJ, Molkenboer MJCH, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JEL (1997): Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect* 3 (1), 109-116

Salomon SP, Hilton E, Weinschel BS, Pollack S, Grolnick E (1998): Psychological factors in the prediction of Lyme disease course. *Arthritis Care Res* 11, 419-426

Santino I, Longobardi V (2011): Clinical and serological features of patients with suspected Lyme borreliosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24 (3), 797-801

Schaible UE, Kramer MD, Eichmann K, Modolell D, Museteanu C, Simon MM (1990): Monoclonal antibodies specific for the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* prevent Lyme borreliosis in severe combined immunodeficiency (scid) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 3768-3772

Schmutzhard E, Willeit J, Gerstenbrand F (1986): Meningopolyneuritis Bannwarth with focal nodular myositis. A new aspect in Lyme borreliosis. *Klin Wochenschr* 64, 1204-1208

Schütze S, Loleit T, Zeretzke M, Bunkowski S, Brück W, Ribes S, Nau R (2012): Additive microglia-mediated neuronal injury caused by A β and bacterial TLR agonists in murine neuron-microglia co-cultures quantified by an automated image analysis using cognition network technology. *J Alzheimers Dis* 30 (3), 651-657

Schwan TG und Piesman J (2000): Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J Clin Microbiol* 38, 382-388

Shadick NA, Phillips CB, Logigian EL, Steere AC, Kaplan RF, Berardi VP, Duray PH, Larson MG, Wright EA, Ginsburg KS, Katz JN, Liang MH (1994): The long-term

clinical outcomes of Lyme disease. A population based retrospective cohort study. *Ann Intern Med* 121, 560–567

Sigal LH (1993): Cross-reactivity between *Borrelia burgdorferi* flagellin and a human axonal 64.000 molecular weight protein. *J Infect Dis* 167, 1372-1378

Sigal LH, Williams S (1997): A monoclonal antibody to *Borrelia burgdorferi* flagellin modifies neuroblastoma cell neuritogenesis in vitro: a possible role for autoimmunity in the neuropathy of Lyme disease. *Infect Immun* 65 (5), 1722–1728

Sindic CJM, Depre A, Bigaginion G, Goubau PF, Hella P, Laterre C (1987): Lymphocytic meningoradiculitis and encephalomyelitis due to *Borrelia burgdorferi*: a clinical and serological study of 18 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50, 1565-1571

Smith HV, Gray JS, McKenzie G (1991): A Lyme borreliosis human serosurvey of asymptomatic adults in Ireland. *Zentralbl Bakteriologie* 275 (3), 382–389

Steere A (2001): Lyme Disease. *N Engl J Med* 345 (2), 115-125

Steere A, Malawista SE, Pachner AR (1983): Neurologic abnormalities of Lyme disease: successful treatment with high-dose intravenous penicillin. *Ann Intern Med* 99 (6), 767-772

Steere A, Malawista SE, Newman JH, Spieler PN, Bartenhagen NH(1980): Antibiotic therapy in Lyme disease. *Ann Intern Med* 93, 1-8

Stelzer EG, Gerber MA, Cartter ML, Freudigman K, Shapiro ED (2000): Long term outcomes of persons with Lyme disease. *JAMA* 2000 283 (5), 609-616

Sukau D, Resemann A (2003): T3-sequencing: targeted characterization of the N- and C-termini of undigested proteins by mass spectrometry. *Anal Chem* 75, 5817-5824

Tauber SC, Ribes S, Ebert S, Heinz T, Fingerle V, Bunkowski S, Kugelstadt D, Spreer A, Jahn O, Eiffert H, Nau R (2011): Long-Term intrathecal infusion of outer surface protein C from *Borrelia burgdorferi* causes axonal damage. *J Neuropathol Exp Neurol* 70 (9), 748-757

Tilly K, Krum JG, Bestor A, Jewett MW, Grimm D, Bueschel D, Byram R, Dorward D, VanRaden MJ, Stewart P, Rosa P (2006): *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infect Immun* 74, 3554–3564

Van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar ACP, Kramer MD, Dankert J (1993): Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* 17 (4), 708-717

Wang G, van Dam AP, Le Fleche A, Postic D, Peter O, Baranto G, De Boer R, Spanjaard L, Dankert J (1997): Genetic and Phenotypic Analysis of (*Borrelia* Genomic Groups *Borrelia valaisiana* sp. Nov. VS116 and M19). *Int J Syst Bacteriol* 47 (4), 926-932

Widhe M, Jarefors S, Ekerfelt C, Vrethem M, Bergström S, Forsberg P, Ernerudh J (2004): *Borrelia*-specific interferon-gamma and interleukin-4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during lyme Borreliosis in Humans: Association with clinical outcome. *J infect Dis* 189, 1881-1891

Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Busch KV (1986): Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 263 (1-2), 92-102

Wilske B, Steinhuber R, Bergmeister H, Fingerle V, Schierz G, Preac-Mursic V, Vanek E, Lorbeer B (1987): Lyme borreliosis in South Germany. Epidemiologic data on the incidence of cases and on the epidemiology of ticks (*Ixodes ricinus*) carrying *Borrelia burgdorferi*. *Dtsch med Wochenschr* 112, 1730-1736

Wilske B, Busch U, Eiffert H, Fingerle V, Pfister HW, Rössler D, Preac-Mursic V (1996): Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. *Med Microbiol Immunol* 184, 195–201

Wilske B, Fingerle V, Hauser U, Lehnert G, Jauris-Heipke S (1999): Implications of antigenic heterogeneity for Lyme borreliosis diagnosis. *Zentralabl Bakteriol* 289, 675-677

Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U (2007): Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49, 13-21

Wressnigg N, Pöllabauer EM, Aichinger G, Portsmouth D, Löw-Baselli A, Fritsch S, Livey I, Crowe BA, Schwendinger M, Brühl P et al. (2013): Safety and immunogenicity of a novel multivalent OspA vaccine against Lyme borreliosis in healthy adults: a double-blind, randomised, dose-escalation phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 13 (8), 680-689

Xiao BG, Bai XF, Zhang GX, Hojeberg B, Link H (1996): Shift from anti- to proinflammatory cytokine profiles in microglia through LPS- or IFN-gamma-mediated pathways. *Neuroreport* 7 (12), 1893-1898

Zimmerli W (2003): Neuroborreliosis: clinical spectrum, diagnosis and treatment. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* 154, 174-177

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

1β	Interleukin 1 beta
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti- Alkalische-Phosphatase
B27	Zellsupplement zur Förderung des Wachstums neuronaler Zellen (Vitamin A, Antioxidantien, Insulin etc.)
BSA	bovine serum albumin
C57/Bl6J	schwarze, genetisch modifizierte Labormaus
C₂H₄O₂	Essigsäure
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CXC	Chemokin (mit zwei Cysteinresten durch eine Aminosäure getrennt)
D	Deutschland
Da	Dalton
DK	Dänemark
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
E/d	Einheiten pro Tag
EC₅₀	mittlere effektive Konzentration
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay

FCS	Fetal calf serum
g	Gramm
g/d	Gramm pro Tag
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HBSS	Hanks buffered salt solution
His-Tag	Histidin-Anhang
H₂SO₄	Schwefelsäure
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
INFγ	Interferon γ
i.v.	intravenös
KC	murines IL- 8 Homolog
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
log conc	Logarithmus der Konzentration
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol
m	mili
MAP2	Microtubuli-assoziiertes Protein 2

MALDI ISD	matrix assisted laser desorption ionization – in source decay
MG	Mikroglia
mg/d	Milligramm pro Tag
Mio	Million
MT-PBS	Phosphatpuffer
μ	mikro
NaCl	Natriumchlorid
Na₂CO₃	Natriumcarbonat
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH₂PO₄	Natriumhydrogenphosphat
NaN₃	Natriumazid
Na₂PO₄	Natriumphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
OspA	Outer Surface Protein A
OspC	Outer Surface Protein C
p	piko
p41	Flagellin von Spirochäten
PBS	Phosphat buffered saline
p.o.	per os
PS	Penicillin/Streptomycin
Q₂₅	25 %-Perzentile
Q₇₅	75 %-Perzentile

rpm	revolutions per minute
TBS	Tris-buffered saline
TGF	Transforming growth factor
TNFα	Tumor-nekrose-factor-alpha
TRIS / HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride
WST-1	Water Soluble Tetrazolium
X	10

7.2 Tabellen/Abbildungen

Tabelle 1	S.7	Leitlinengerechte Behandlung der akuten Neuroborreliose
Tabelle 2	S.8	Leitlinengerechte Behandlung der chronischen Neuroborreliose
Tabelle 3	S.19	Stimulierendes Protein mit zugeordneter unstimulierter Gruppe
Abbildung 1	S.18	Verdünnungsreihe der Konzentrationsstufen
Abbildung 2	S.21	Verdünnungsreihe des Griess-Reagenz
Abbildung 3 A, B	S.30	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation nach 24-stündiger Stimulation mit natürlichem OspC von <i>Borrelia afzelii</i>
	S.30	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation nach 48-stündiger Stimulation mit natürlichem OspC von <i>Borrelia afzelii</i>
Abbildung 4 A, B	S.30	Logarithmische Auftragung der Nitrit-Akkumulation von mit natürlichem OspC von <i>Borrelia afzelii</i> stimulierten Mikroglia-kulturen, 24 Stunden

	S.30	Logarithmische Auftragung der Nitrit-Akkumulation von mit natürlichem OspC von <i>Borrelia afzelii</i> stimulierten Mikrogliaulturen, 48 Stunden
Abbildung 5 A, B	S.31	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation von Mikrogliaultur nach 24-stündiger Stimulation mit rekombinantem OspC von <i>Borrelia afzelii</i>
	S.31	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation von Mikrogliaultur nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem OspC von <i>Borrelia afzelii</i>
Abbildung 6	S.32	Interleukin-6-Freisetzung nach 48-stündiger Inkubation von Mikrogliaulturen mit natürlichem und rekombinantem OspC von <i>Borrelia afzelii</i>
Abbildung 7	S.33	TNF- α -Freisetzung nach 48-stündiger Inkubation von Mikrogliaulturen mit natürlichem und rekombinantem OspC von <i>Borrelia afzelii</i>
Abbildung 8	S.34	KC-Freisetzung nach 48-stündiger Inkubation von Mikrogliaulturen mit natürlichem und rekombinantem OspC von <i>Borrelia afzelii</i>

Abbildung 9 A, B	S.36	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation von Mikrogliakultur nach 24-stündiger Stimulation mit natürlichem OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i>
	S.36	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation von Mikrogliakultur nach 48-stündiger Stimulation mit natürlichem OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i>
Abbildung 10 A, B	S.36	Logarithmische Auftragung der relativen Nitrit-Akkumulation von mit natürlichem OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i> stimulierten Mikrogliaulturen, 24 Stunden
	S.36	Logarithmische Auftragung der Nitrit-Akkumulation von mit natürlichem OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i> stimulierten Mikrogliaulturen, 48 Stunden
Abbildung 11 A, B	S.37	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation von Mikrogliakultur nach 24-stündiger Stimulation mit rekombinantem OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i>

	S.37	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation von Mikrogliakultur nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i>
Abbildung 12	S.38	Interleukin-6-Freisetzung nach 48-stündiger Inkubation von Mikrogliaulturen mit natürlichem und rekombinantem OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i>
Abbildung 13	S.39	TNF- α -Freisetzung nach 48-stündiger Inkubation von Mikrogliaulturen mit natürlichem und rekombinantem OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i>
Abbildung 14	S.40	KC-Freisetzung nach 48-stündiger Inkubation von Mikrogliaulturen mit natürlichem und rekombinantem OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i>
Abbildung 15	S.41	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation von Mikrogliakultur nach 48-stündiger Stimulation mit natürlichem p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i>
Abbildung 16	S.42	Logarithmische Auftragung der Nitrit-Akkumulation von mit natürlichem p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i> stimulierten Mikrogliaulturen, 48 Stunden

Abbildung 17	S.43	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation von Mikrogliakultur nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i>
Abbildung 18	S.44	Interleukin-6-Freisetzung nach 48-stündiger Inkubation von Mikrogliaulturen mit natürlichem und rekombinantem p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i>
Abbildung 19	S.45	TNF- α -Freisetzung nach 48-stündiger Inkubation von Mikrogliaulturen mit natürlichem und rekombinantem p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i>
Abbildung 20	S.46	KC-Freisetzung nach 48-stündiger Inkubation von Mikrogliaulturen mit natürlichem und rekombinantem p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i>
Abbildung 21 A, B	S.47	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation von Mikrogliaulturen nach 24-stündiger Stimulation mit rekombinantem OspC von <i>Borrelia spielmanii</i> , PMB versetzt
	S.47	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation von Mikrogliaulturen nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem OspC von <i>Borrelia spielmanii</i> , PMB versetzt

Abbildung 22 A, B	S.48	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation von Mikroglia-kulturen nach 24-stündiger Stimulation mit rekombinantem OspC von <i>Borrelia spielmanii</i> , ohne PMB
	S.48	Indirekte Messung von NO über die Nitrit-Akkumulation von Mikroglia-kulturen nach 48-stündiger Stimulation mit rekombinantem OspC von <i>Borrelia spielmanii</i> , ohne PMB
Abbildung 23 A, B	S.50	Lichtmikroskopische Abbildung einer unstimulierten Neuronenkultur
	S.50	Lichtmikroskopische Abbildung einer mit natürlichem p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i> stimulierten Neuronenkultur
Abbildung 24 A, B	S.50	Lichtmikroskopische Abbildung einer mit unstimulierten Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur
	S. 50	Lichtmikroskopische Abbildung einer mit natürlichem p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i> stimulierten Neuronen-Mikroglia-Co-Kultur
Abbildung 25	S.51	<i>Crossing</i> von mit natürlichem p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i> stimulierten Neuronenkulturen und unstimulierter Gruppe

Abbildung 26	S.51	<i>Crossing</i> von mit natürlichem p41 von <i>Borrelia burgdorferi</i> stimulierten Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen und unstimulierter Kontrollgruppe
Abbildung 27	S.52	<i>Crossing</i> von mit natürlichem OspC von <i>Borrelia afzelii</i> stimulierten Neuronenkulturen und unstimulierter Gruppe
Abbildung 28	S.52	<i>Crossing</i> von mit natürlichem OspC von <i>Borrelia afzelii</i> stimulierten Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen und unstimulierter Kontrollgruppe
Abbildung 29	S.53	<i>Crossing</i> von mit natürlichem OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i> stimulierten Neuronenkulturen und unstimulierter Gruppe
Abbildung 30	S.53	<i>Crossing</i> von mit natürlichem OspC von <i>Borrelia burgdorferi</i> stimulierten Neuronen-Mikroglia-Co-Kulturen und unstimulierter Kontrollgruppe

7.3 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei meinem Doktorvater Professor Dr. Roland Nau, Chefarzt des Geriatrischen Zentrums am Evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Besonders bedanken möchte ich mich für den Themenvorschlag sowie seine Geduld und Hilfsbereitschaft, die er mir trotz des stressigen Klinikalltages entgegenbrachte.

Dr. Sandra Ribes danke ich im Besonderen für die hervorragende Betreuung und ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Ebenso möchte ich PD Dr. Sandra Schütze für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise und Hilfestellungen danken, die zur Vollendung derselben notwendig waren.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt hier PD Dr. Marija Djukic, Stefanie Bunkowski und Sandra Redlich.

Weiterhin danke ich Dr. Dominik Kugelstadt für die Bereitstellung der Borrelienproteine und Dr. Olaf Jahn für deren Analyse.

Bei meinen Eltern und Geschwistern möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Besonderer Dank gilt meiner geliebten Schwester, die mir vor allem auch in fachlichen Problemen weiter half und mir jederzeit zur Seite stand.

Schließlich möchte ich meinem Freund für die liebevolle Unterstützung, Hilfe und Motivation während meiner Promotionsphase danken.

7.4 Lebenslauf

Ich wurde am 05.12.1989 in Leinefelde als viertes Kind meiner Eltern geboren. Von 1996 bis 2000 besuchte ich die staatliche Grundschule zu Dingelstädt. 2000 wechselte ich auf das dortige St. Josef Gymnasium, an dem ich 2008 meine allgemeine Hochschulreife erlangte. Im gleichen Jahr begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen. 2010 absolvierte ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und nahm 2011 meine Arbeit in der Forschungsgruppe AG Nau auf. Im Sommersemester 2012 setzte ich ein Semester zur Weiterführung meiner Doktorarbeit aus. Die Betreuung meiner Arbeit erfolgt durch Dr. Sandra Ribes, Dr. Sandra Schütze und Prof. Dr. Roland Nau. Im Rahmen meines Studiums habe ich 4 Famulaturen in der Plastisch-Ästhetischen Chirurgie, Urologie, Nephrologie und Inneren Medizin abgeleistet.

Den schriftlichen Teil des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung habe ich im April 2014 absolviert. Die mündliche Prüfung werde ich vorraussichtlich im Mai/Juni 2015 ablegen.