

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Ergebnisse der *in vivo*-Versuche

Um herauszufinden, ob bei Patienten mit Borreliose ein veränderter Serumspiegel von IL-18, MMP-1, MMP-3 und TIMP-1 vorliegt, wurden die in Kapitel 3.8 beschriebenen Seren von Patienten mit klinisch manifester Lyme-Arthritis und mit anderen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose getestet (Erythema migrans, Acrodermatitis chronica atrophicans, Neuroborreliose, Lyme Karditis und ophthalmologische Manifestationsformen).

#### 4.1.1 IL-18 in Seren

Die Bestimmung von IL-18-Protein wurde mit Hilfe eines kommerziellen ELISA-Kits der Firma Diaclone durchgeführt. Es wurden 65 Seren von Lyme-Arthritis Patienten, 35 Seren von Patienten mit anderen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose, 37 Normalspenderseren sowie 12 Seren von Patienten mit Rheumatoider Arthritis getestet. Die Ergebnisse sind als Boxplots in Abbildung 8 dargestellt.

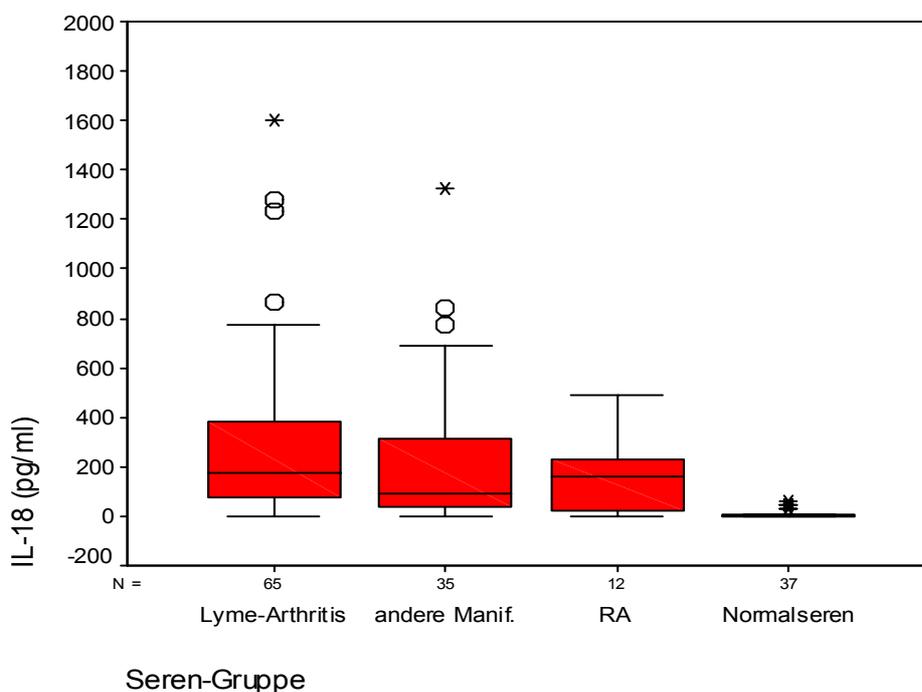


Abbildung 8: IL-18-Proteinkonzentrationen (in pg/ml) in Seren von Patienten mit Lyme-Arthritis, anderen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose, Rheumatoider Arthritis (RA) und Normalspendern

IL-18 war im Serum von Lyme-Arthritis-Patienten im Vergleich zu Normalserenseren signifikant erhöht (179 pg/ml und 0,05 pg/ml,  $p < 0,001$ ). Der Median liegt knapp über dem Medianwert von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (162 pg/ml), der ebenfalls im Vergleich zu den Normalseren signifikant höher liegt ( $p < 0,001$ ). Patienten mit anderen Manifestationsformen der Borreliose weisen, verglichen mit der Lyme-Arthritis-Gruppe, deutlich niedrigere IL-18-Proteinkonzentrationen auf (89 pg/ml). Auch diese sind im Vergleich zur Serengruppe der Normalspender signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ). Beide Gruppen der Borreliose-Patientenseren streuen weiter nach oben als die Seren der Kontrollgruppen (Maximum: 1589 pg/ml im Vergleich zu 489 pg/ml bei RA-Patientenseren), wobei der Maximalwert der Lyme-Arthritis über dem der Gruppe mit anderen Manifestationsformen liegt.

#### 4.1.2 MMP-1 und MMP-3 in Seren

Die Bestimmung von MMP-1 und MMP-3 auf Proteinebene erfolgte mittels eines ELISA-Kits der Firma Amersham Pharmacia Biotech. MMP-1 wurde in 19 Seren von Lyme-Borreliose-Patienten und in 12 Normalseren gemessen. Die MMP-3-Messung erfolgte in Seren von 19 Patienten mit Lyme-Arthritis, 23 Patienten mit anderen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose und 22 Normalseren.

Das Ergebnis der MMP-1-Bestimmung ist in Abbildung 9 dargestellt, das der MMP-3-Bestimmung in Abbildung 10.

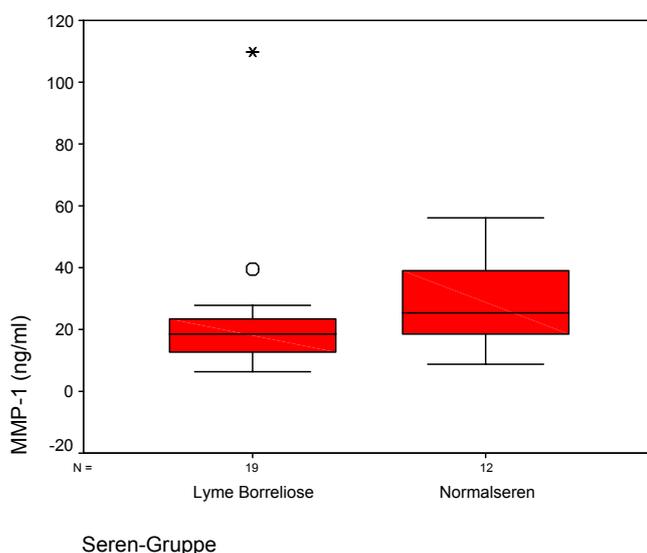


Abbildung 9: MMP-1 Proteinkonzentrationen (in ng/ml) in Seren von Patienten mit Lyme-Borreliose und Normalspendern

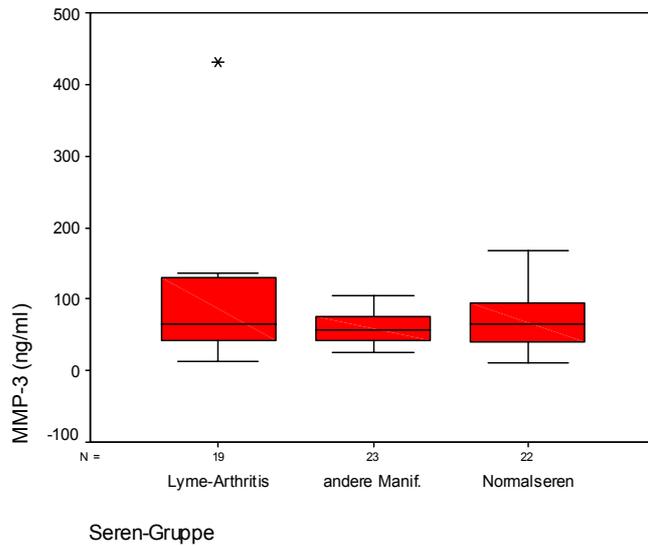


Abbildung 10: MMP-3 Proteinkonzentrationen (in ng/ml) in Seren von Patienten mit Lyme-Arthritis, anderen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose und Normalseren

Die MMP-1-Proteinwerte sowie die MMP-3-Werte zeigen bei den verschiedenen Patientengruppen keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Normalseren. Die medianen Konzentrationen schwanken zwischen 18 und 25 ng/ml (MMP-1) bzw. 56 und 66 ng/ml (MMP-3). Zu beachten ist, dass die absoluten MMP-3-Werte deutlich höher als die der gemessenen MMP-1-Werte sind.

### 4.1.3 TIMP-1 in Seren

Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) sind die physiologischen Antagonisten der MMPs. TIMP-1 wurde als wichtigster Vertreter dieser Gruppe in Seren von 16 PCR-positiven Lyme-Borreliose-Patienten gemessen, als Kontrollgruppe dienten 16 Normalspenderseren. Das Ergebnis ist in Abbildung 11 dargestellt.

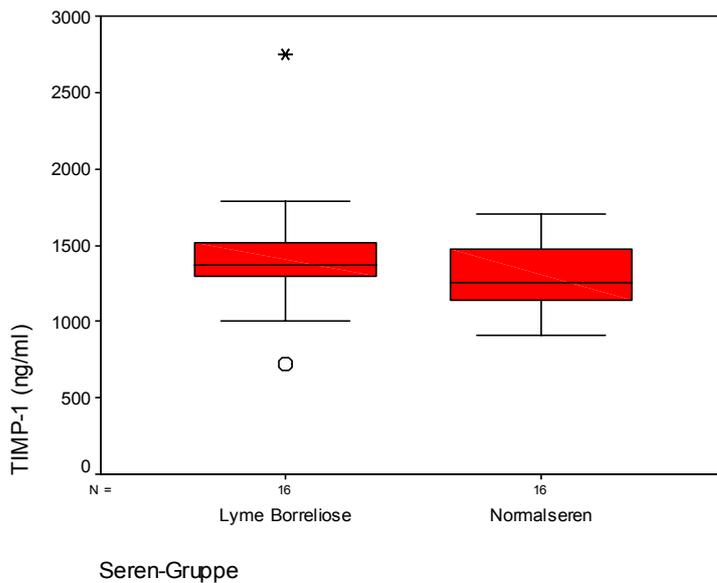


Abbildung 11: **TIMP-1**-Konzentrationen in Seren von Patienten mit Lyme-Borreliose und Normalspendern

Die TIMP-1-Konzentrationen zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen Lyme-Borreliose-Patientenseren und Normalspenderseren. Abbildung 12 zeigt die Quotienten aus MMP-1-Konzentrationen und TIMP-1-Konzentrationen. Das Verhältnis von MMP-1 zu TIMP-1 in Seren von Patienten mit Lyme-Borreliose ist unsignifikant kleiner als in Normalseren. Dieses ist dadurch zu erklären, dass der Median der MMP-1-Konzentration in Seren von Patienten mit Lyme-Borreliose geringer ist als der von Normalspendern (s. 4.1.2). Die TIMP-Medianwerte verhalten sich jedoch genau umgekehrt: hier tritt in Seren von Borreliosepatienten ein (nicht signifikant) höherer Medianwert als bei Normalspendern auf (s. oben).

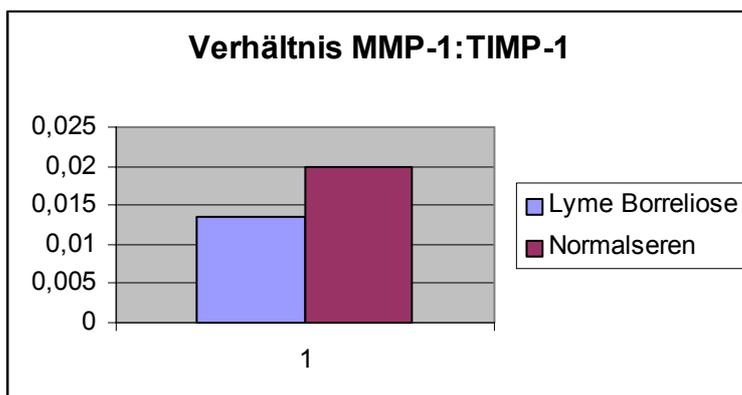


Abbildung 12: Verhältnis von MMP-1 zu TIMP-1 in Seren von Patienten mit Lyme-Borreliose (li) und Normalspendern

## 4.2 Ergebnisse der *in vitro*-Versuche

Die *in vitro*-Untersuchungen wurden in einem dreidimensionalen *in-vitro*-Zellkulturmodell der Lyme-Borreliose durchgeführt, welches ermöglicht, Interaktionen von *B. burgdorferi* mit humanen Zellen unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen. Es wurde ausschließlich humanes Material verwendet, wodurch für die Untersuchung der Pathogenese der Lyme-Arthritis Tierversuche vermieden wurden. Das Modell hat zusätzlich die Vorteile, dass die *in vivo* vorkommende Zellzusammensetzung, die extrazelluläre Matrix sowie die räumliche Anordnung der Zellen erhalten bleiben.

Die Gewebestücke mit 3–5 mm Kantenlänge wurden mit einer definierten Borrelienzahl beimpft und über 72 Stunden bei 37 °C in 3 ml Cokulturmedium inkubiert. Parallel zu jedem Ansatz wurde eine Negativkontrolle (Gewebekultur ohne Borrelien) angesetzt, die aus der gleichen Geweberegion stammte wie das zu infizierende Stück und diesem morphologisch ähnelte.

### 4.2.1 Ergebnisse der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie diente in diesem Fall als Nachweis dafür, dass die Borrelien in die Gewebeexplantate eingewandert sind. 5 µm dicke Gewebeschnitte wurden auf Objektträgern fixiert und mit Borrelien-spezifischen Antikörpern markiert, die anschließend durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht wurden. In Abbildung 13a und 14 sind die Borrelien als fadenartig aneinandergereihte punktartige dunkelrote Strukturen zu sehen, die sich sowohl im Randbereich als auch im Zentrum des Gewebes befinden. Abbildung 13b zeigt die Negativkontrolle in der gleichen Vergrößerung wie 13a. Die Borrelien sind demnach während der 72 Stunden in das Gewebe eingewandert.

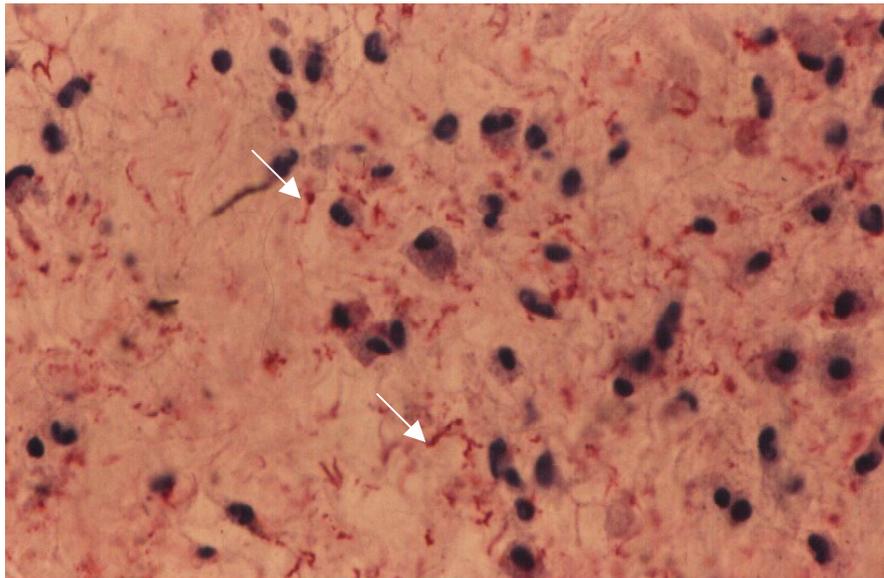


Abbildung 13a: Alkalische Phosphatase-Immunhistochemische Markierung von *B. burgdorferi* (weiße Pfeile) und Kern-Gegenfärbung mit Hämatoxylin (400fache Vergrößerung)

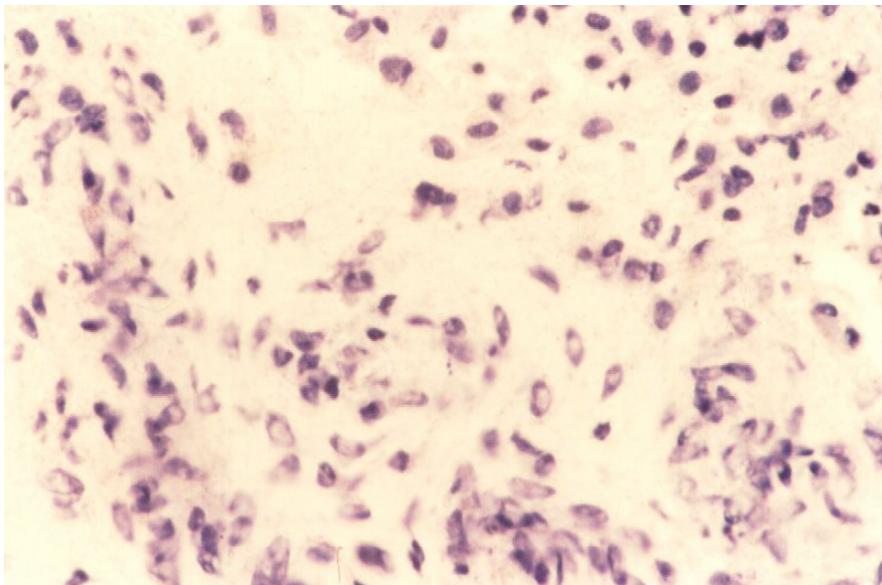


Abbildung 13b: Negativkontrolle zu Abbildung 18a; Alkalische Phosphatase-Immunhistochemische Markierung von *B. burgdorferi* und Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin (400fache Vergrößerung)

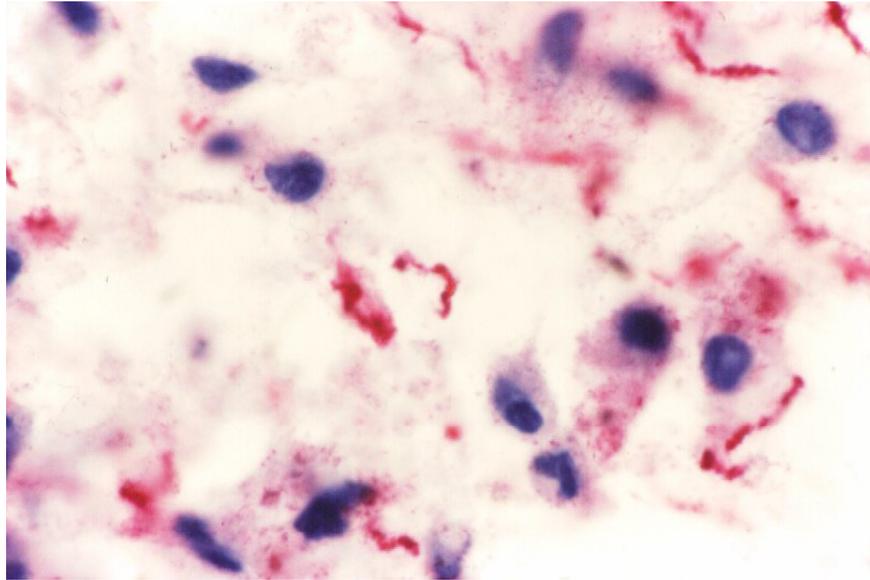


Abbildung 14: Alkalische Phosphatase-Immunhistochemische Markierung von *B. burgdorferi* und Kern-Gegenfärbung mit Hämatoxylin (800fache Vergrößerung)

## 4.2.2 Ergebnisse von Messungen in Gewebekulturüberständen

Der Überstand der Explantate wurde alle 24 Stunden abgenommen und bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Konzentrationen von IL-18, MMP-1 und MMP-3 wurden in Überständen nach 24 Stunden und nach 72 Stunden Inkubationszeit mittels ELISA gemessen. Bei den Darstellungen der Proteinkonzentrationen nach 24 und 72 Stunden wurden die zusammengehörigen Meßergebnisse (aus je einem Versuchsansatz) der Übersicht halber mit einer Geraden verbunden. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine Verlaufsmessung. Um eine Aussage über den Anstieg der gemessenen Konzentrationen machen zu können, wurde das Verhältnis der Konzentrationen nach 72 Stunden und 24 Stunden errechnet (Quotient: Konz. 72 h : Konz. 24h).

### 4.2.2.1 IL-18 in Gewebekulturüberständen

IL-18 wurde in 9 unterschiedlichen Gewebekulturüberständen 24 und 72 Stunden nach Infektion gemessen (Abbildungen 15 und 16). In den Negativkontrollen wurde nach 72 Stunden ein hochgradiger Abfall der Konzentrationen (von 91 auf 10 pg/ml) gemessen, in den infizierten Kulturen war der Abfall geringer (von 91 auf 67 pg/ml). Betrachtet man die einzelnen Kulturüberstände, stieg die IL-18-Konzentration bei den nicht infizierten Ansätzen nur in einem Fall an, in den infizierten Überständen dagegen in 5 von 9 Ansätzen.

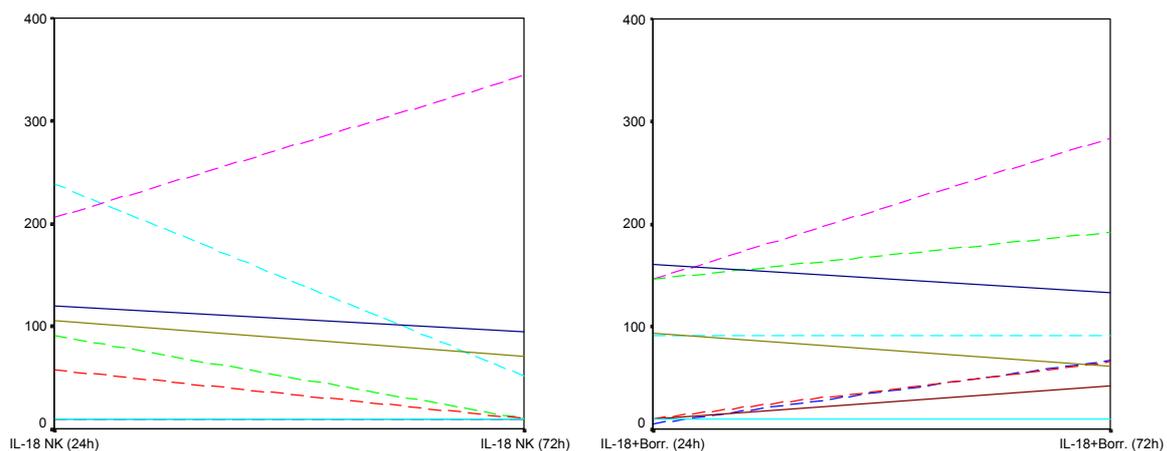


Abbildung 15: Proteinkonzentrationen von **IL-18** in Negativkontrollen (li) und mit Borrelien infizierten Explantaten (re) nach 24 und 72 Stunden; die Konzentrationen in pg/ml sind auf der y-Achse angegeben

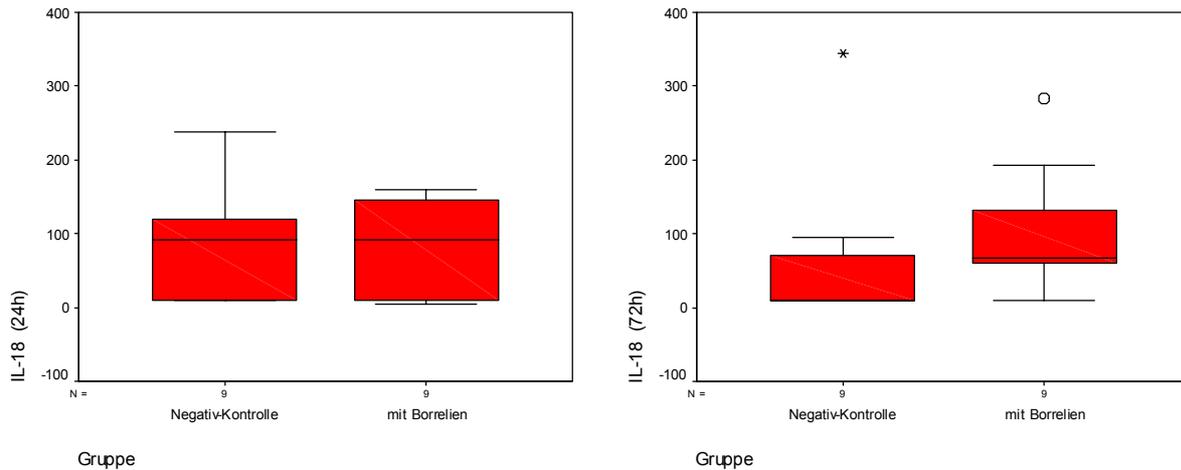


Abbildung 16: IL-18 in Überständen von Versuchsansätzen nach 24 und 72 Stunden

Abbildung 17 zeigt das Anstiegsverhältnis in uninfizierten und infizierten Explantaten. Die infizierten Gewebe streuen deutlich weiter nach oben, sind jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu den nicht infizierten Kontrollen. Die Einzelwertanalyse zeigt aber, dass in uninfizierten Kulturen nur in 1/9 Ansätzen, in infizierten dagegen in 5 von 9 Ansätzen ein Anstieg der IL-18-Konzentration stattfindet. Betrachtet man deshalb die einzelnen Anstiegsverhältnisse in jeder Gruppe und bildet hieraus die Medianwerte, so zeigt sich folgendes: Uninfizierte Gewebekulturüberstände enthalten nach 72 Stunden nur noch die 0,8fache Menge von der gemessenen Konzentration nach 24 Stunden, in infizierten Überständen ist die 1,3fache Menge enthalten (Medianwerte).

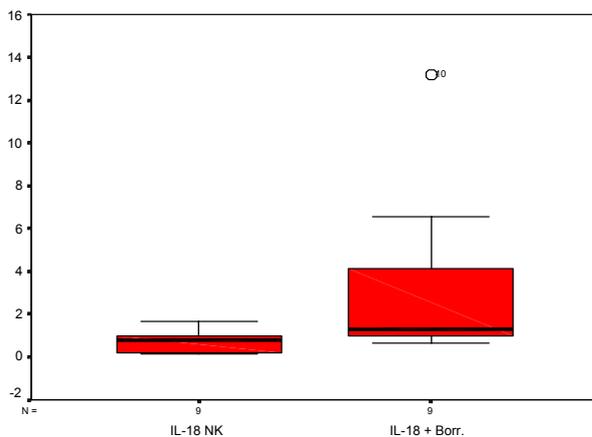


Abbildung 17: Anstiegsverhältnisse in Negativkontrollen (li) und infizierten Explantaten (re) (Konz. nach 72 h : Konz. nach 24 h)

#### 4.2.2.2 MMP-1 und MMP-3 in Gewebekulturüberständen

Die Ergebnisse der Messungen der Überstände von 19 infizierten Gewebekulturen und den dazugehörigen 19 Negativkontrollen sind im folgenden dargestellt. Auf der y-Achse sind die MMP-Werte in ng/ml angegeben. Der Anstieg der gemessenen Konzentrationen ist anhand der Steigung der Linien abzulesen.

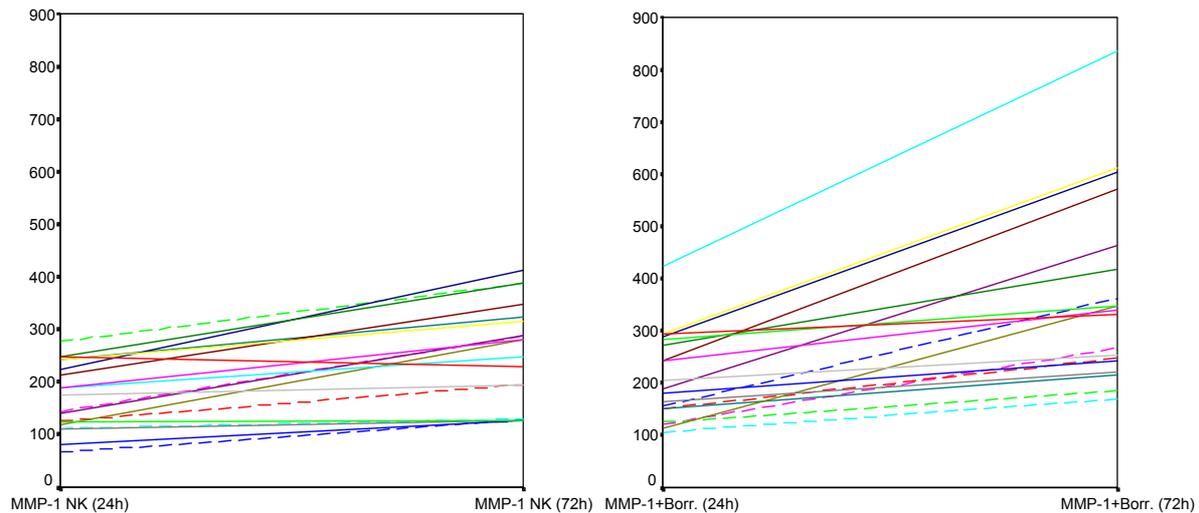


Abbildung 18: Proteinkonzentrationen von **MMP-1** in Negativkontrollen (li) und infizierten Explantaten (re) jeweils nach 24 und 72 Stunden; die Konzentrationen in ng/ml sind auf der y-Achse angegeben

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich ist, liegen die Konzentrationen nach 24 Stunden im gleichen Bereich. Nach 72 Stunden steigen die Konzentrationen von MMP-1 in den Überständen der Negativkontrollen geringgradig an. In den Überständen der infizierten Explantate liegen die gemessenen Konzentrationen nach 72 Stunden deutlich über den Werten, die in Kontrollen nach 72 Stunden gemessen werden.

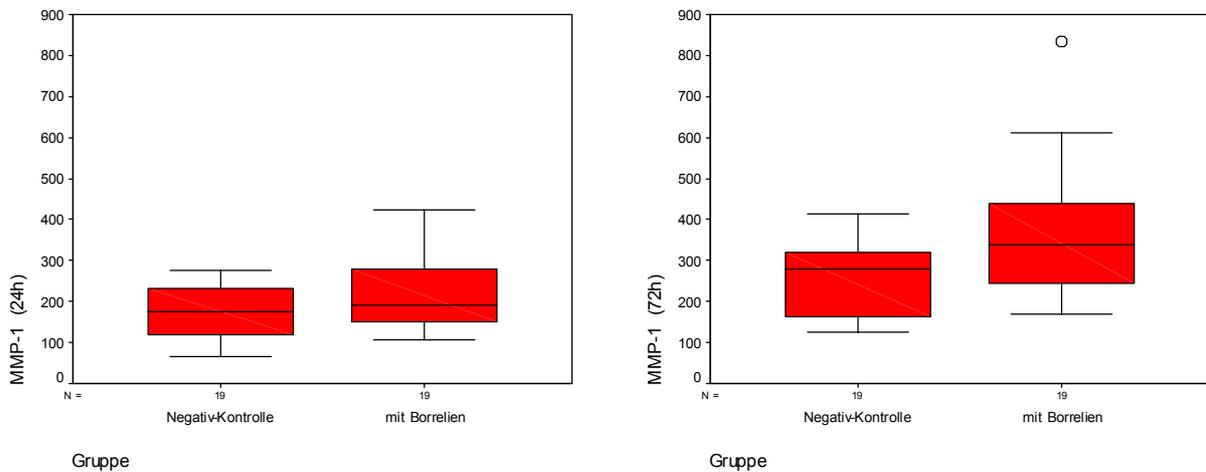


Abbildung 19: MMP-1 in Überständen von Versuchsansätzen nach 24 und 72 Stunden

Abbildung 19 zeigt die Daten im Boxplot-Diagramm. Nach 24 Stunden ist zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturüberständen kein deutlicher Unterschied zu sehen (175 ng/ml und 190 ng/ml), nach 72 Stunden liegt der Wert der infizierten Kontrollen über dem der nicht infizierten (280 ng/ml und 339 ng/ml); der Unterschied ist aber nicht signifikant.

Die Quotienten aus dem Verhältnis der Konzentrationen nach 72 Stunden zu dem nach 24 Stunden in infizierten und uninfizierten Explantaten sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Anstiegsverhältnisse wurden, ebenso wie für IL-18 beschrieben (s. 4.2.2.1), aus den Einzelwerten gebildet.

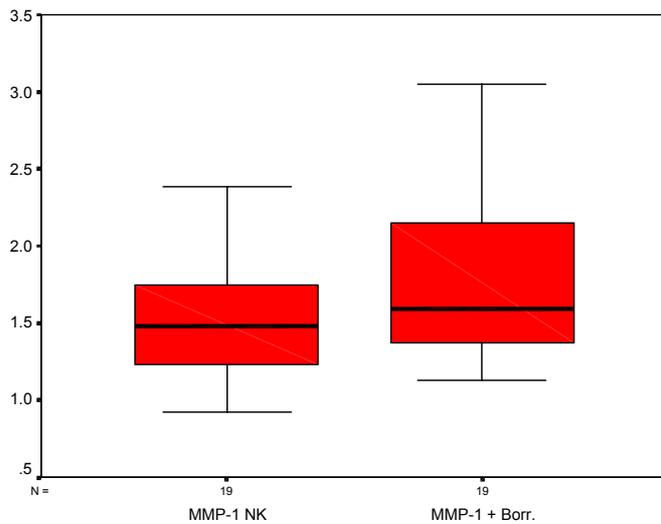


Abbildung 20: Anstiegsverhältnisse in Negativkontrollen (li) und infizierten Explantaten (re) (Konz. nach 72 h : Konz. nach 24 h)

Die MMP-3-Konzentrationen im Überstand der Negativkontrollen fallen in 8 von 19 Ansätzen ab. In mit Borrelien infizierten Explantaten ist dagegen nur in 3 Überständen ein Abfall, in den anderen 16 eine Zunahme von MMP-3 nachzuweisen (Abbildung 21).

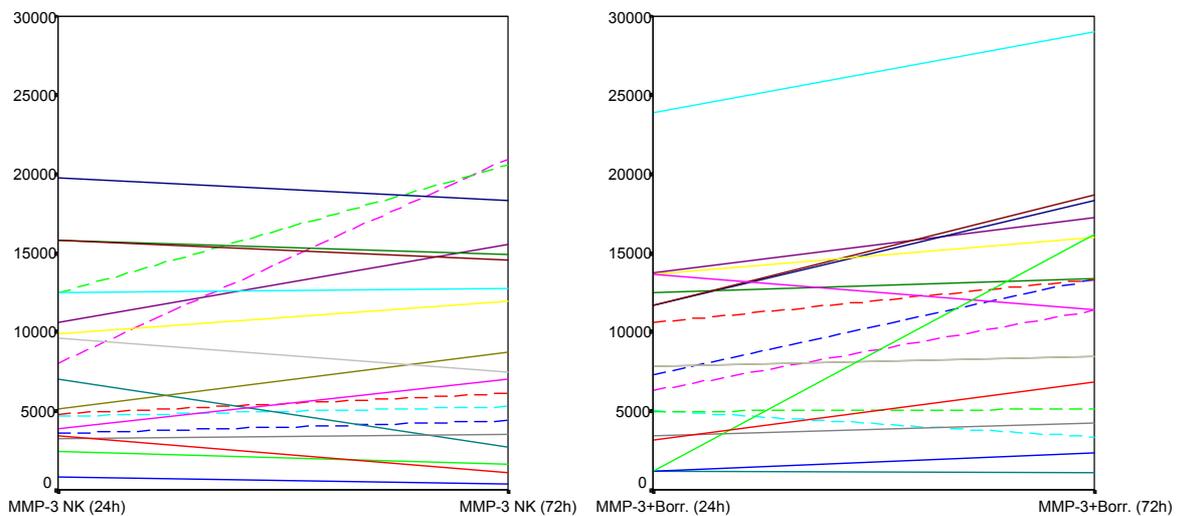


Abbildung 21: Proteinkonzentrationen von **MMP-3** in Negativkontrollen (li) und mit Borrelien infizierten Explantaten (re) nach 24 und 72 Stunden; die Konzentrationen in ng/ml sind auf der y-Achse angegeben

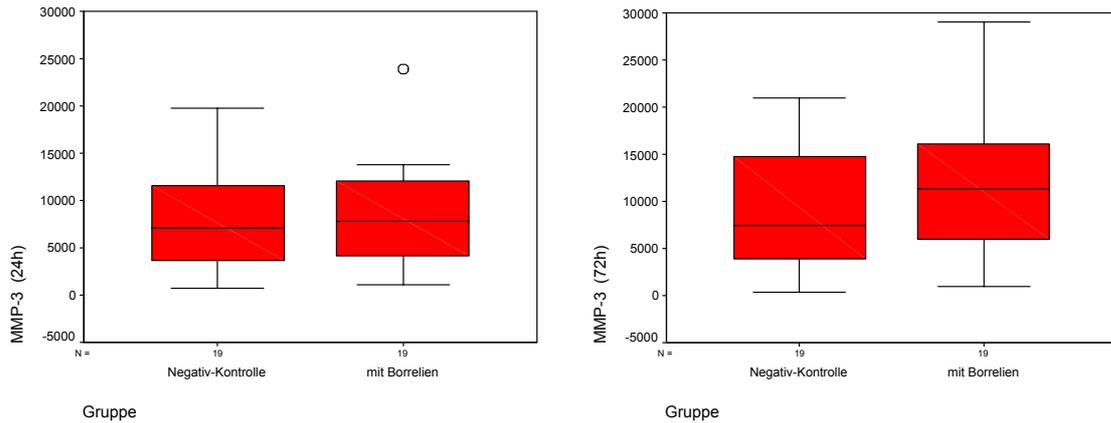


Abbildung 22: MMP-3 in Überständen der Versuchsansätze nach 24 und 72 Stunden

Die Streuung in den Negativkontrollen bleibt konstant, während sie in infizierten Überständen nach 72 Stunden einen Maximalwert von 29025 ng/ml erreicht. Ebenso wie in den Seren liegt auch in den Überständen der Konzentrationsbereich der MMP-3-Werte deutlich höher als der von MMP-1.

Abbildung 23 zeigt das Verhältnis der MMP-3-Konzentrationen nach 72 Stunden zu den MMP-3-Konzentrationen nach 24 Stunden. Im Vergleich zu den MMP-1-Anstiegen sind die Anstiege relativ konstant und streuen wenig. Demnach zeigt sich in der Proteinexpression in infizierten Überständen kein anderes Anstiegsverhältnis als in uninfizierten Kontrollen.

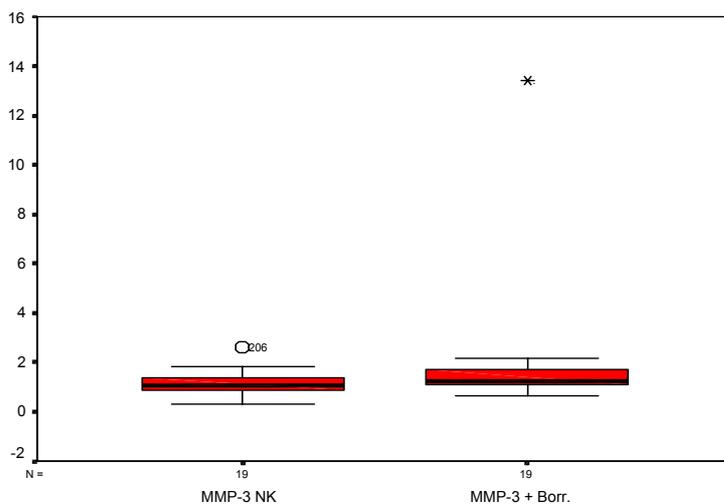


Abbildung 23: Anstiegsverhältnisse in Negativkontrollen (li) und infizierten Explantaten (re) (Konz. nach 72 h : Konz. nach 24 h)

### 4.2.2.3 TIMP-1 in Gewebekulturüberständen

TIMP-1 wurde in 10 Kulturüberständen gemessen (Ergebnis in Abbildung 24).

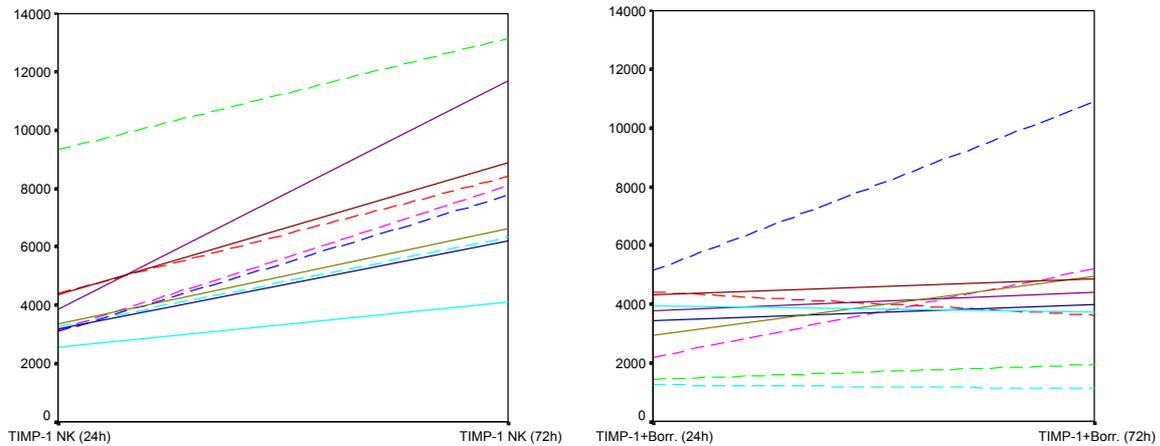


Abbildung 24: Proteinkonzentrationen von **TIMP-1** in Negativkontrollen (li) und mit Borrelien infizierten Explantaten (re) nach 24 und 72 Stunden; die Konzentrationen in ng/ml sind auf der y-Achse angegeben

In der Negativkontrolle steigt TIMP-1 in allen 10 Überständen deutlich an. Die Überstände der infizierten Explantate zeigen weniger starke Anstiege oder fallen sogar ab.

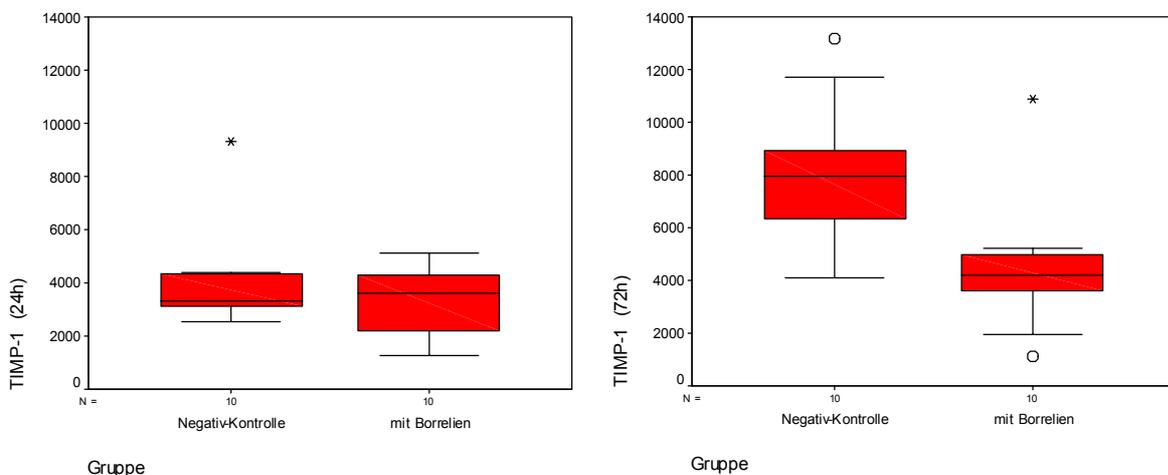


Abbildung 25: TIMP-1 in Überständen von Versuchsansätzen nach 24 und 72 Stunden

Von Zellen der Kontrollgruppe wird kontinuierlich TIMP-1 sezerniert (Anstieg von 3305 auf 7929 ng/ml). Infizierte Explantate haben dagegen nach 72 Stunden nur knapp die Hälfte des Wertes der Kontrollüberstände sezerniert (Abbildung 25). Die daraus resultierenden unterschiedlichen Anstiegsverhältnisse zeigt Abbildung 31: TIMP-1 steigt in Negativkontrollen nach 72 Stunden auf das 1,9fache an, in infizierten Explantaten dagegen auf das 1,3fache (Mediane). Das Ergebnis ist signifikant ( $p = 0,01$ ).

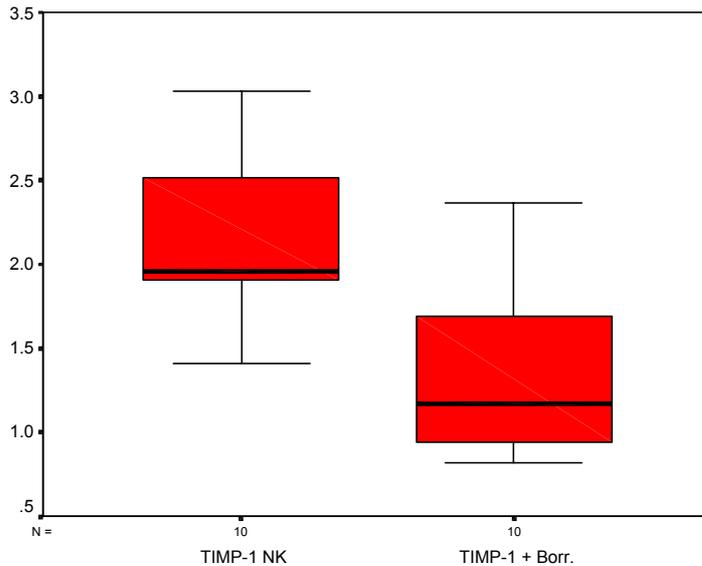


Abbildung 26:  
Anstiegsverhältnisse in  
Negativkontrollen (li) und  
infizierten Explantaten (re)  
(Konz. nach 72 h : Konz. nach  
24 h)

Abbildung 27 zeigt den Bezug zwischen MMP-1 und TIMP-1 in denselben Kulturüberständen. Betrachtet man den Quotienten von MMP-1 und TIMP-1, fällt folgendes auf: Nach 24 Stunden ist kein Unterschied zwischen infizierter Kultur und Negativkontrolle zu messen. Jedoch fällt der Quotient nach 72 Stunden in nicht mit Borrelien infizierten Kontrollen geringgradig ab, während das Gleichgewicht in infizierten Geweben stark zugunsten von MMP-1 zunimmt. Durch die Infektion mit *Borrelia burgdorferi* kommt es demnach zu einer relativen Zunahme der Aktivität des degradierenden Enzyms MMP-1.

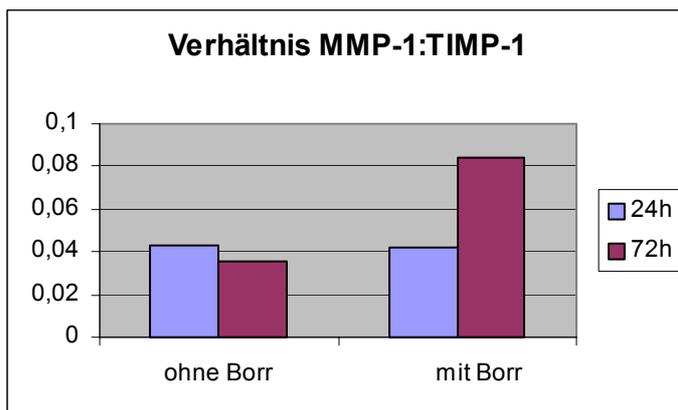


Abbildung 27: Verhältnis von MMP-1 zu TIMP-1 in uninfizierten (li) und mit Borrelien infizierten (re) Explantaten nach 24 und 72 Stunden

### 4.2.3 Ergebnisse der Zymographie

Die Zymographie ermöglicht durch Abbau der im Gel befindlichen Gelatine eine Aussage über das Vorhandensein und die Aktivität von Gelatinasen (MMP-2, MMP-9). Es wurden Gewebekulturüberstände nach 24, 48 und 72 Stunden zymographisch untersucht, parallel dazu die nicht infizierten Negativkontrollen. Da bekannt ist, dass *B. burgdorferi* kollagenolytische Aktivität besitzt (Grab et al. 1996), wurden außerdem Borreliensuspensionen getestet: hierbei sollte untersucht werden, ob Borrelien an sich eine Gelatinaseaktivität besitzen.

Abbildung 28 zeigt beispielhaft ein SDS-Gelatinegel.

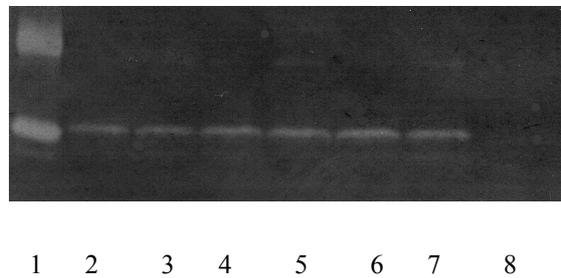


Abbildung 28: 1= Standard  
2= NK (24h)  
3= Gewebe+Borr. (24h)  
4= NK (48h)  
5= Gewebe+Borr. (48h)  
6= NK (72h)  
7= Gewebe+Borr. (72h)  
8= Borr. (72h)

Das Gel zeigt in infizierten Überständen in Abhängigkeit von der Zeit eine geringgradige Dickenzunahme der aufgehellten Banden im Bereich von 92 kDa, was als Zunahme der MMP-9-Aktivität zu interpretieren ist. Die MMP-2-Banden sind überall in etwa gleich stark ausgeprägt. Dort wo *B. burgdorferi*-Suspension aufgetragen wurde (8) sind keine Banden vorhanden, woraus gefolgert werden kann, dass *B. burgdorferi* alleine keine Gelatineabbauenden Enzyme produziert.

#### 4.2.4 Ergebnisse der Realtime-PCR

Um festzustellen, ob *B. burgdorferi* die mRNA-Expression der MMPs und IL-18 beeinflusst, wurde von den Geweben die RNA extrahiert, diese in cDNA umgeschrieben und anschließend eine Realtime-PCR durchgeführt. Dabei kann durch den Einbau des Farbstoffes SYBR Green und einen Vergleich mit dem „house keeping gene“  $\beta$ -Actin eine semiquantitative Aussage getroffen werden. Da ein einziger Gewebepool zu wenig mRNA enthält, wurde aus 3 bzw. 4 Explantaten ein Pool gebildet, ebenso aus den parallel angesetzten Negativkontrollen. Die gemessenen RNA-Konzentrationen sind aus Tabelle 13 ersichtlich.

Tabelle 13: RNA-Konzentrationen von 10 Gewebepools

Probe 1:	0,061 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Probe 6:	0,075 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Probe 2:	0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Probe 7:	0,162 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Probe 3:	0,28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Probe 8:	0,179 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Probe 4:	0,14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Probe 9:	0,179 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Probe 5:	0,077 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Probe 10:	0,098 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

##### 4.2.4.1 mRNA von TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$

Ermittelt wurde die Menge an mRNA der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , da bekannt ist, dass diese bei der Lyme-Arthritis erhöht sind. Durch einen Vergleich dieser Entzündungsparameter in infizierten und uninfizierten Geweben sollte überprüft werden, ob die Borrelien die Zellen stimuliert haben und das Experiment auswertbar ist. Die Abbildungen 29 und 30 zeigen die Ergebnisse von 4 gepoolten Ansätzen nach jeweils 72 Stunden.

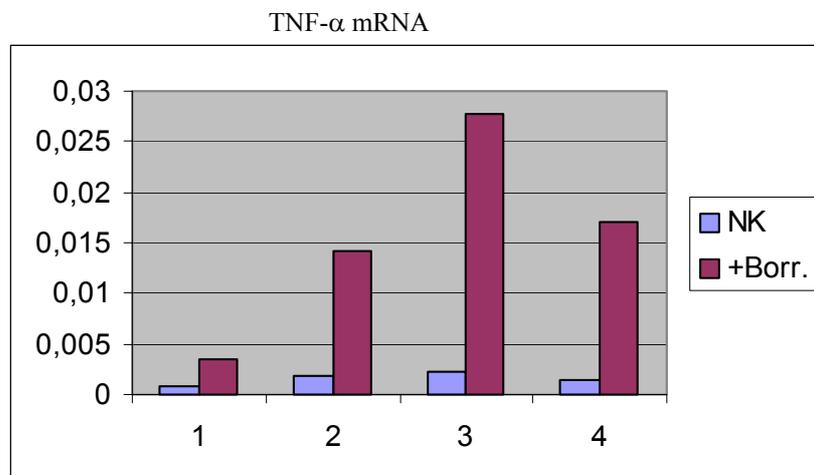


Abbildung 29: mRNA von TNF- $\alpha$  bei der Negativkontrolle und dem infizierten Explantat nach 72 Stunden; auf der y-Achse ist das Mengenverhältnis zum „house keeping gene“  $\beta$ -Actin aufgetragen

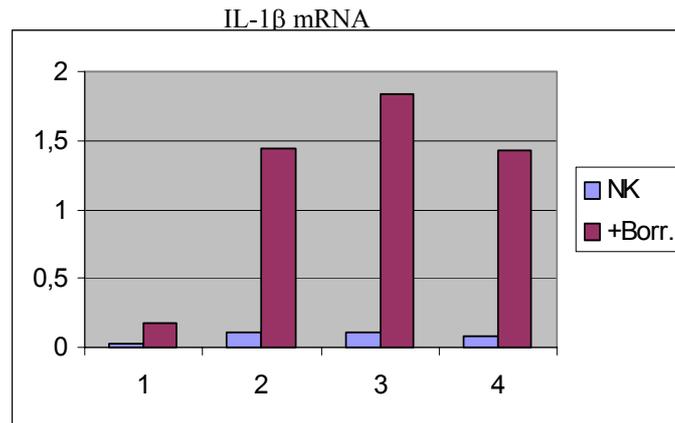


Abbildung 30: mRNA von **IL-1 $\beta$**  bei der Negativkontrolle und dem infizierten Explantat nach 72 Stunden; auf der y-Achse ist das Mengenverhältnis zum „house keeping gene“  $\beta$ -Actin aufgetragen

Wie aus den Abbildungen ersichtlich wird, ist die mRNA-Menge in allen infizierten Explantaten verglichen mit den uninfizierten Kontrollen stark erhöht. Dieses weist darauf hin, dass *B. burgdorferi* in den Versuchen die Zellen aktiviert und die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziert hat. Die Diagramme zeigen die mRNA-Menge im Vergleich zur mRNA-Menge von  $\beta$ -Actin. Während in den infizierten Kontrollen die mRNA-Menge von TNF- $\alpha$  in 4 infizierten Ansätzen um maximal das 12,7fache ansteigt (Anstiege um das 4,7-, 7,6-, 12,7- und 11,1fache), bleibt sie in den uninfizierten Proben konstant niedrig. Die mRNA-Menge von IL-1 $\beta$  zeigt sogar noch höhere Werte: sie erhöht sich um maximal das 17,5fache (Einzelwerte: 6,1; 13,4; 16,1; 17,5).

#### 4.2.4.2 mRNA von IL-18

IL-18 wurde in vier Zellpools auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abbildung 31 dargestellt. In zwei Ansätzen wurde in infizierten Explantaten weniger mRNA detektiert, nämlich nur die 0,4- bzw. die 0,9fache Menge von der mRNA der Kontrollgruppe. In den anderen beiden Ansätzen stieg die IL-18 mRNA-Menge in den infizierten Proben um das 2,8- bzw. das 1,2fache an. Für die Induktion von IL-18 im dreidimensionalen Kulturmodell ist somit kein einheitliches Ergebnis zu beobachten, eine Induktion erfolgt lediglich in zwei von vier Kulturen.

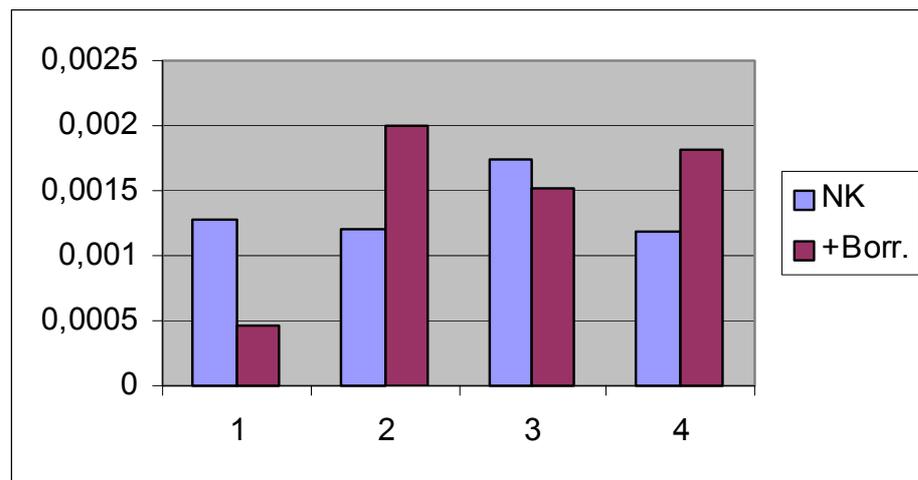


Abbildung 31: **IL-18**-mRNA in vier Zellpools von infizierten Explantaten und den dazugehörigen Negativkontrollen (NK) im Vergleich zum house keeping gene  $\beta$ -Actin

#### 4.2.4.3 mRNA von MMP-1, MMP-3, MMP-2 und MMP-9

Die schon im Überstand auf Proteinebene gemessenen Mengen an MMP-1 und MMP-3 wurden ebenfalls auf mRNA-Ebene semiquantitativ im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin ermittelt. Die Ergebnisse sind in folgenden Abbildungen dargestellt.

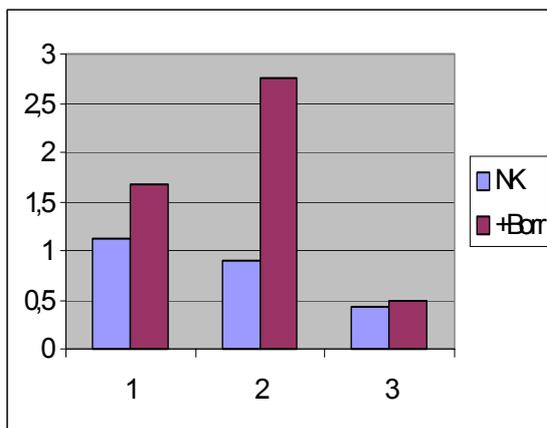


Abbildung 32: mRNA-Mengen von **MMP-1** im Vergleich zum „house keeping gene“  $\beta$ -Actin in infizierten Geweben und den zugehörigen Negativkontrollen (NK)

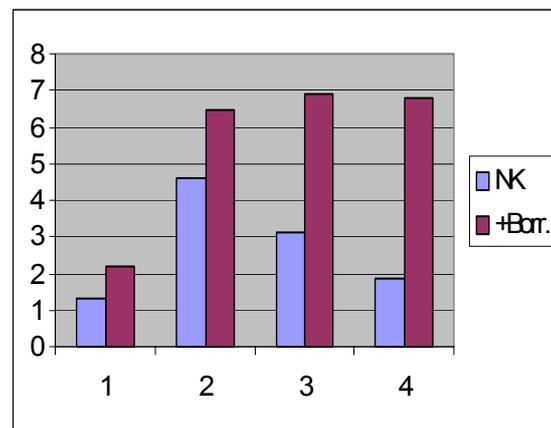


Abbildung 33: mRNA-Mengen von **MMP-3** im Vergleich zum „house keeping gene“  $\beta$ -Actin in infizierten Geweben und den zugehörigen Negativkontrollen (NK)

In den Kontrollen findet eine Expression der gemessenen MMPs statt. In infizierten Proben steigt die mRNA-Menge von MMP-1 und MMP-3 in allen Ansätzen an, jeweils verglichen mit den dazugehörigen Negativkontrollen. MMP-1-mRNA steigt bis auf die 2,8fache Menge

von  $\beta$ -Actin-mRNA an, die mRNA für MMP-3 bis zur 7fachen Menge. Im Vergleich zu uninfizierten Kontrollen ist in den infizierten Geweben 1,5-, 3,1- bzw. 1,2mal soviel MMP-1-mRNA enthalten. MMP-3-mRNA steigt sogar auf maximal das 3,7fache an (Einzelwerte: 1,7; 1,4; 2,2; 3,7). Hiermit ist gezeigt worden, dass *B. burgdorferi* in der Lage ist, die Transkription von mRNA für MMP-1 und MMP-3 in Zellen der Gewebeexplantate (Synovialfibroblasten, Makrophagen) zu induzieren. Für MMP-1 spiegelt sich dieses Ergebnis in der Proteinsynthese wieder. Wie in Kapitel 4.2.2.2 bereits erwähnt wurde, ist die Proteinkonzentrationen von MMP-1 in den Überständen infizierter Explantate erhöht, wenn auch nicht signifikant. MMP-3 zeigt dagegen keine gesteigerte Translation: die durch den Einfluß von *B. burgdorferi* zusätzlich produzierte mRNA-Menge führt nicht zu einer gesteigerten Proteinsynthese.

Um zu beurteilen, ob sich die in den Explantatüberständen zymographisch nachgewiesene Produktion der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 ebenfalls auf mRNA-Ebene nachweisen läßt, wurden Primer für MMP-2 und MMP-9 eingesetzt und die mRNA-Menge im Vergleich zu  $\beta$ -Actin gemessen. Der Vergleich von infizierten Geweben und dazugehörigen Negativkontrollen (erfasst in Zellpools) ist in den Abbildungen 34 und 35 dargestellt.

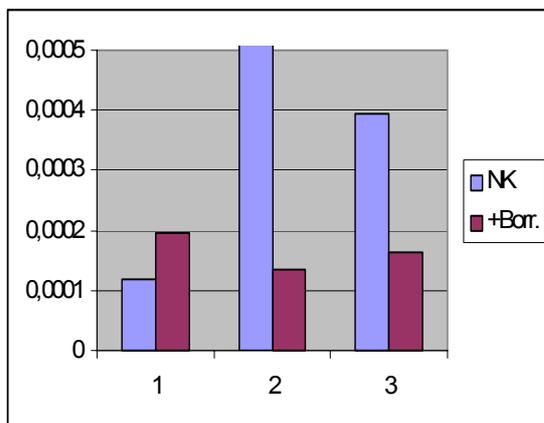


Abbildung 34: mRNA von **MMP-2** in infizierten Explantaten und dazugehörigen Negativkontrollen (NK) im Vergleich zum house keeping gene  $\beta$ -Actin

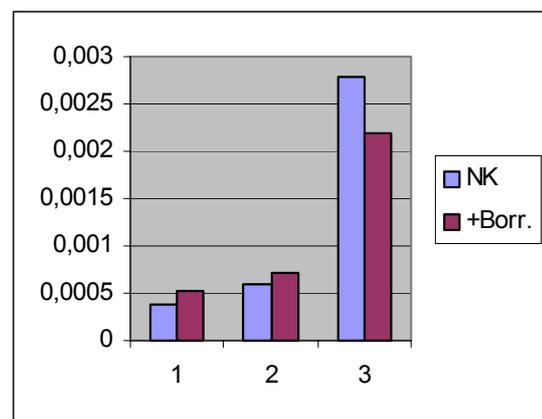


Abbildung 35: mRNA von **MMP-9** in infizierten Explantaten und dazugehörigen Negativkontrollen (NK) im Vergleich zum house keeping gene  $\beta$ -Actin

In einem infizierten Zellpool ist die Menge an MMP-2-mRNA um das 1,6fache angestiegen, in den beiden anderen dagegen hochgradig abgefallen, jeweils verglichen mit der dazugehörigen Negativkontrolle. MMP-9 zeigt in zwei infizierten Ansätzen einen Anstieg um das 1,4fache bzw. das 1,2fache der mRNA-Menge der uninfizierten Explantate. In einem

Ansatz ist die mRNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle geringer. Bemerkenswert sind die geringen absoluten Mengen an MMPs im Vergleich zu  $\beta$ -Actin (0,0001fache bis 0,0004fache Menge von  $\beta$ -Actin). Auch im Vergleich zu MMP-1 und MMP-3 ist die Menge an mRNA sehr gering.