

5 DISKUSSION

Die Pathogenese der Borreliose ist auch knapp 20 Jahre nach Isolierung des verursachenden Erregers *Borrelia burgdorferi* in vielen Punkten immer noch ungeklärt. Nach gegenwärtigem Wissensstand ist das Entzündungsgeschehen bei der Lyme-Arthritis bedingt durch sogenannte proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 β . *B. burgdorferi* aktiviert Monozyten, die diese Entzündungsmediatoren in erhöhten Mengen ausschütten und deshalb bei der Borreliose in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden. Die spezifische Immunantwort bei der Lyme-Borreliose ist bestimmt von einer präferentiellen Th1-Antwort, die sich im dominierenden Th1-Zytokinmuster mit Produktion von IFN- γ widerspiegelt. Zu den stärksten Induktoren einer Th1-Antwort gehören IL-12 und IL-18. Die Th2-Antwort mit der Bildung von IL-4, IL-5 und IL-10 ist dagegen unterdrückt (Yin et al. 1997).

Diese Arbeit untersucht zum einen die Rolle des Zytokins IL-18, welches als sogenannter IFN- γ -induzierender Faktor an den hohen IFN- γ -Konzentrationen und damit an der Th1-Antwort beteiligt sein könnte. IL-18-Protein wird in Synovialflüssigkeiten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis erhöht angetroffen (Gracie et al. 1999). Die Rheumatoide Arthritis und die Lyme-Arthritis weisen einige Ähnlichkeiten auf: die patho-histologischen Bilder zeigen in beiden Fällen eine Verdickung der Synovialzellschicht sowie CD4-positive lymphozytäre Infiltrationen, das Zytokinmuster ist bei beiden Erkrankungen Th1-dominierend und die Th2-Antwort fehlend (RA) bzw. unterdrückt (Lyme-Borreliose) (Yin et al. 1997). Die Makrophagenaktivierung ist die hauptsächliche Funktion der inflammatorischen (Th1-) CD4-T-Zellen. Daraus läßt sich hypothetisch folgern, dass IL-18 auch bei der Lyme-Arthritis eine Rolle spielen kann. Diese Hypothese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht .

MMPs sind eine Familie von Matrix-abbauenden Enzymen, die im physiologisch arbeitenden Organismus in einem ausgewogenen Verhältnis zu ihren Antagonisten, den TIMPs, vorkommen. MMPs sind beteiligt am Auf- und Abbau von Geweben. Ihre Funktion ist nachgewiesen bei der Embryonalentwicklung, der Implantation der Blastozyste, der Ovulation, der Morphogenese von Organen, außerdem bei der Vaskularisation beim Wundheilungsprozess. Sie sind beteiligt an Krankheitsprozessen, die mit Zerstörung der

Extrazellulärmatrix einhergehen, wie beispielsweise der Metastasierung von Tumoren, Störungen der Blut-Hirn-Schranke (Kirchner et al. 2000, Curran und Murray 2000) sowie der Gewebedestruktion bei der Rheumatoiden Arthritis (Gebbia et al. 2000). Die Durchführung dieser Arbeit begründet sich in der Hypothese, daß bei der Lyme-Borreliose MMPs für die Ausbreitung der Spirochäten und die Gewebedestruktion verantwortlich sind. Von den 20 MMPs wurden in der vorliegenden Arbeit vier wichtige Vertreter untersucht, nämlich MMP-1 (Kollagenase), MMP-3 (Stromelysin-1), sowie die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9. Als wichtigster Antagonist wird TIMP-1 für die Messungen herangezogen.

Die Untersuchungen wurden zum einen an Patientenseren durchgeführt (*in-vivo*-Teil), außerdem wurde ein dreidimensionales *in-vitro*-Zellkulturmodell verwendet.

Die Untersuchung von Seren hat im Gegensatz zur Untersuchung von Synovialflüssigkeiten den Vorteil, dass nicht nur Patienten untersucht werden können, die aufgrund einer Lyme-Arthritis eine vermehrte Bildung einer entzündlich veränderten Synovialflüssigkeit aufweisen. So konnten auch Patienten mit weniger ausgeprägten Formen der Lyme-Arthritis oder mit anderen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose erfasst werden und bei der Klärung der Frage helfen, ob die zirkulierenden Mengen von MMPs und IL-18 eine Rolle in der Pathogenese der Lyme-Borreliose haben. Ferner erlauben Serumproben gegenüber Synovialpunktaten die Untersuchung einer größeren Stichprobenzahl und man erhält eine statistisch auswertbare Menge von Daten. Zudem bekommt man Vergleichsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose. Als Nachteil ist zu erwähnen, dass es natürlich zu einer lokalen Konzentrierung von Zytokinen oder Interleukinen in der Synovialflüssigkeit kommen kann, ohne dass sich diese Veränderungen im Serum bemerkbar machen müssen.

Um die Interaktionen zwischen Synovialgewebe und *B. burgdorferi* unter standardisierten Bedingungen *in vitro* zu untersuchen, wurde ein kürzlich entwickeltes dreidimensionales Gewebekulturmodell verwendet. Hierbei wird Synovialgewebe aus dem Gelenk entnommen und als Gewebekblock von 3–5 mm Kantenlänge unter sterilen Bedingungen in einem Zell-Borrelien-Cokulturmedium kultiviert. Nach Infektion mit *B. burgdorferi* wandern die beweglichen Spirochäten in das Gewebe ein. Eine Veränderung der Konzentration von

Zytokinen und Enzymen läßt sich mittels ELISA im Überstand der Kultur im Vergleich zum Überstand der nicht infizierten Kontrolle nachweisen. Der Vorteil des Modells liegt darin, daß die Borrelien-Zell-Interaktionen unter standardisierten Bedingungen beobachtet werden können, ohne Gelenkpunktate und Synovialbiopsien von Patienten zu entnehmen oder Tierversuche durchzuführen. Anhand dieses Modells konnte bereits die Induktion von TNF- α und IL-1 β durch *B. burgdorferi* nachgewiesen werden (Fritze 1999, Franz et al. 2001). Das entwickelte Modell wurde für die *in vitro*-Versuche übernommen und weiterentwickelt. Zusätzlich zu Untersuchungen der Überstände auf Proteinebene durch ELISA und Zymographie wurde die RNA der Gewebeblöcke isoliert und die mRNA von TNF- α , IL-1 β , IL-18 sowie oben genannter MMPs und TIMP-1 semiquantitativ im Verhältnis zu β -Actin mittels Realtime-PCR bestimmt. Auf diese Weise konnte eine Aussage getroffen werden, inwieweit eine Stimulation der Zellen durch *B. burgdorferi* sich auch auf die mRNA-Transkription auswirkt.

5.1 Untersuchungen *in vivo*

Die *in vivo*-Ergebnisse der Untersuchungen von IL-18 in 149 Seren mittels ELISA zeigen, dass dieses Zytokin bei Patienten mit Lyme-Arthritis im Vergleich zur Kontrollgruppe der Normalspender signifikant erhöht ist ($p < 0,001$). Der Medianwert in der Gruppe der Patienten mit anderen Manifestationsformen der Borreliose liegt mit 89 pg/ml zwar deutlich unter dem Medianwert der Lyme-Arthritis-Gruppe (179 pg/ml), ist jedoch gegenüber den Normalseren ebenfalls signifikant erhöht ($p < 0,001$). Auch in der Vergleichsgruppe der Patienten mit Rheumatoider Arthritis lagen die IL-18-Serumkonzentrationen signifikant höher. Das steht im Gegensatz zu Untersuchungen von Gracie et al.: dabei wurden in Synovialflüssigkeiten von RA-Patienten erhöhte Konzentrationen, in den dazugehörigen Seren jedoch nur geringe Konzentrationen an IL-18-Protein gemessen (Gracie et al. 1999). Auffällig sind die höheren Absolutwerte bei Patienten mit Borrelieninfektionen im Vergleich zu RA-Patienten (Maximalwerte: Lyme-Arthritis-Gruppe: 1599 pg/ml; andere Manifestationsformen: 1327 pg/ml; RA-Gruppe: 489 pg/ml). IL-18 ist bei der Th1-dominierten Lyme-Borreliose im Serum erhöht. Eine Rolle von IL-18 in der Pathogenese dieser Erkrankung ist demnach sehr wahrscheinlich. Inwiefern IL-18-Serumwerte für die

Diagnostik, beispielsweise als Verlaufsparemeter während der Lyme-Borreliose, angewendet werden können, bleibt durch weiterführende Studien zu untersuchen.

Sowohl MMP-1 als auch MMP-3 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Patientengruppen und der Kontrollgruppe. Das ist eventuell dadurch zu erklären, dass Enzyme, Hormone, Entzündungsmediatoren u. ä. lokal wirken können, ohne dabei jedoch auch im Serum erhöht zu sein. Das kann auch hier für die Metalloproteinasen gelten. Umso wichtiger war es, MMP-Messungen im Überstand des *in vitro* Zellkulturmodells durchzuführen, da durch Borrelien eventuell induzierte veränderte Konzentrationen dort mit Sicherheit nachgewiesen werden können. Dass lokal bei verschiedenen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose erhöhte Konzentrationen an MMPs vorhanden sind, ist bereits bekannt: bei Neuroborreliose ist MMP-9 im Vergleich zu nichtentzündlichen neurologischen Krankheiten im Liquor bei 84 % der Patienten erhöht (Kirchner et al. 2000). Perides et al. wiesen außerdem eine 130-kDa-MMP im Liquor von Neuroborreliosepatienten nach (Perides et al. 1998). Von Lin et al. (2001) mittels ELISA durchgeführte Messungen von MMP-1 und -3 in Synovialflüssigkeiten zeigten erhöhte Konzentration bei unbehandelten Lyme-Borreliose-Patienten im Vergleich zu Antibiotika-resistenten Lyme-Borreliose-Patienten. Die Werte lagen im Bereich von 6 µg/ml (MMP-1) bzw. 120 µg/ml (MMP-3), was die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse der unterschiedlichen Messbereiche für MMP-1 und MMP-3 bestätigt. Hu et al. (2001) wiesen ebenfalls MMP-3, MMP-2 und MMP-9 in Synovialflüssigkeiten von Lyme-Arthritis-Patienten nach (zymographisch bzw. durch Westernblot), jedoch ohne quantitative Angaben. Am Manifestationsort erhöhte Konzentrationen von MMPs scheinen demnach nicht mit einer Erhöhung der Serumkonzentrationen einherzugehen.

Zwischen Seren der Gruppe der Lyme-Borreliose und denen der Normalspender waren hinsichtlich der TIMP-1-Werte keine signifikanten Unterschiede zu messen. Diesbezügliche Ergebnisse von Messungen von TIMP-1 bei RA-Patienten sind widersprüchlich. Teilweise zeigten sich ebenfalls unveränderte TIMP-1-Werte (Keyßer et al. 1998; Keyßer et al. 1999). Yoshihara und Mitarbeiter wiesen dagegen in einer neueren Studie auch erhöhte TIMP-1-Konzentrationen in RA-Seren nach (Yoshihara et al. 2000). Das Verhältnis der Konzentrationen von MMP-1 zu TIMP-1 bei Lyme-Borreliose-Patientenseren und Normalspendern war ohne signifikanten Unterschied.

Die Lyme-Arthritis sowie die Rheumatoide Arthritis, zwei entzündliche Gelenkerkrankungen, zeigen demnach im Vergleich zueinander Unterschiede bei der MMP-Produktion. Untersuchungen der Seren von Patienten mit RA zeigten, dass MMP-1 und MMP-3 dort im Vergleich zu gesunden Kontrollen und Osteoarthritis-Kontrollen erhöht sind (Keyszer et al. 1999; Yoshihara et al. 2000). Dieses scheint jedoch nicht spezifisch für erosive Gelenkerkrankungen zu sein (Keyszer et al. 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bei der nicht-erosiven Lyme-Arthritis deuten darauf hin, dass MMP-Serumkonzentrationen nicht als Marker für die Krankheitsaktivität der Lyme-Borreliose in Frage kommen, während dies für die RA in Erwägung zu ziehen ist (Keyszer et al. 1998).

5.2 Untersuchungen *in vitro*

Für die *in vitro*-Untersuchungen wurden dreidimensionale humane Synovialzellblöcke mit *B. burgdorferi* beimpft und bis zu 72 Stunden in Zell-Borrelien-Cokulturmedium kultiviert. Der Nachweis, dass Borrelien in die Gewebelöcke eingewandert sind, wurde immunhistochemisch erbracht. Dabei zeigt sich, dass die Borrelien bis ins Zentrum des Gewebes eindringen. Zwar sind auch abgetötete Borrelien in der Lage, durch ihre Oberflächenantigene pathogen zu wirken. Durch die Infektion mit vitalen Erregern ist jedoch gewährleistet, dass die Borrelien Kontakt zu den Zellen herstellen und diese aktivieren können. Auf diese Weise ist ein Modellzustand erreicht, der dem *in vivo*-Zustand im infizierten Gelenk sehr nahe kommt. Die veränderten MMP- und Zytokinkonzentrationen in den Überständen der infizierten Gewebekulturen sind somit dem Einfluß von eingewanderten Borrelien zuzuschreiben.

Im Überstand des dreidimensionalen Zellkulturmodells wurde auf Proteinebene IL-18, MMP-1, MMP-3 und TIMP-1 mittels ELISA bestimmt, jeweils 24 und 72 Stunden nach Bakterieninfektion. IL-18 hat nach 24 Stunden in uninfizierten und infizierten Geweben die gleiche mediane Konzentration (91 pg/ml). Nach 72 Stunden ist in beiden Ansätzen ein Abfall zu registrieren, der jedoch in infizierten Kontrollen weniger stark ausgeprägt ist (von 91 auf 67 pg/ml, nicht signifikant). Betrachtet man jedoch die Anstiegsverhältnisse der einzelnen Meßwerte und erfaßt davon den Medianwert, ist in den Negativkontrollen nach 72 Stunden nur noch die 0,8fache Menge der Konzentration nach 24 Stunden enthalten. In den

infizierten Explantaten ist dagegen ein Anstieg um das 1,3fache zu messen. Von den mit *B. burgdorferi* infizierten Explantaten wurde in 5 Fällen ein Anstieg von IL-18 gemessen, bei den Kontrollen wurde nur in einem Kulturüberstand eine erhöhte Menge von IL-18 im Vergleich zur Konzentration nach 24 Stunden nachgewiesen. *B. burgdorferi* ist demnach in der Lage, die Synovialzellen in der Zeit zwischen 24 und 72 Stunden zur Produktion von IL-18 anzuregen.

Anhand der vorliegenden Messungen lässt sich nicht sagen, wie der genaue Konzentrationsverlauf von IL-18 innerhalb von 72 Stunden aussieht. In dieser Studie wird davon ausgegangen, dass der Anstieg linear erfolgt. Daraus wird das Verhältnis des Anstiegs (Konzentration nach 72 Stunden : Konzentration nach 24 Stunden) berechnet und mit dem Verhältnis in der Negativkontrolle verglichen. So erhält man eine Aussage über den Zeitverlauf zwischen 24 und 72 Stunden nach Inkubation, der den Vergleich zwischen infizierten und nicht infizierten Geweben zulässt. Im Gewebekulturmodell sind bereits nach 24 Stunden auch bei nichtinfizierten Kontrollen hohe IL-18-Konzentrationen nachweisbar. Demnach schütten Synovialfibroblasten auch ohne Stimulation durch Borrelien IL-18 aus, was eine konstitutive IL-18-Produktion möglich erscheinen lässt. Es ist außerdem möglich, dass die Zellen bereits *in vivo* aktiviert wurden oder dass durch die Gewebepräparation eine Zellaktivierung stattgefunden hat. Adhärenzen der Zellen mit der Beschichtung der Zellkulturplatte und daraus folgende Stimulation der Zellen sind im Gegensatz zu Monolayerzellkulturen nicht möglich, da die Gewebelöcke im Medium frei flutieren. Möglich ist, dass die IL-18-Konzentration innerhalb von 24 Stunden bereits angestiegen ist, ein Maximum an IL-18 schon erreicht hat und die Konzentration zum Zeitpunkt der ersten Messung wieder abgefallen ist. Deshalb müsste in weiteren Versuchsserien der Zeitabstand zwischen den Messungen verringert werden (Messungen beispielsweise nach 2 und 8 Stunden anstatt wie bisher nach 24 und 72 Stunden), um die genaue Kinetik der *in vitro* IL-18-Produktion zu charakterisieren.

Werte der Messungen der MMP-1-Konzentrationen im Überstand der infizierten Kontrollen sind nach 24 Stunden geringfügig höher als die in uninfizierten Gewebeüberständen (Mediane: 190 ng/ml und 175 ng/ml). Nach 72 Stunden ist in den infizierten Gewebekulturüberständen deutlich mehr MMP-1 zu messen als in den Negativkontrollen (339 ng/ml gegenüber 280 ng/ml in Kontrollen), jedoch ist der Unterschied nicht signifikant. Die stimulierten Gewebeüberstände weisen wesentlich höhere Maximalwerte auf. Das zeigt,

dass die Borrelien die Synoviozyten zur Abgabe von MMP-1 stimulieren und diese dadurch mehr MMP-1 sezernieren, was sich besonders in der Messung nach 72 Stunden bemerkbar macht. In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit *B. burgdorferi* stimulierte humane PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) aktives MMP-1 ausschütten (Gebbia et al. 2001). Im Westernblot war keine Bande für MMP-1 in der nicht infizierten Kontrolle zu sehen, was darauf hindeutet, dass PBMCs nicht konstitutiv MMP-1 ausschütten oder die ausgeschütteten Mengen unterhalb der Detektionsgrenze liegen.

Betrachtet man die Medianwerte, verhält sich MMP-3 in den untersuchten Kulturüberständen ähnlich wie MMP-1, wobei die gemessenen Werte in infizierten Kulturüberständen dort nach 24 Stunden schon deutlich über den der Kontrollen liegen (Mediane 7026 ng/ml und 7827 ng/ml; nach 72 Stunden 7419 ng/ml und 11370 ng/ml). Die Werte streuen jedoch in allen Ansätzen sehr stark. Im Unterschied zu den Anstiegsverhältnissen (Quotient aus Konzentration nach 72 Stunden : Konzentration nach 24 Stunden) von MMP-1 sind die von MMP-3 in infizierten und uninfizierten Proben annähernd gleich.

Die *in-vitro*-Induktion von MMPs durch *Borrelia burgdorferi* wurde bisher erst zweimal in Knorpelkulturen untersucht. Hu et al. entwickelten ein *in-vitro*-Knorpelzellmodell, um die Degradation von Knorpel durch Borrelien zu untersuchen. Sie benutzten Knorpelimplantate von Rindern und Rhesusaffen (Hu et al. 2001). Durch die Stimulation mit einem *B. burgdorferi sensu stricto*-Stamm (N 40) konnten sie die Induktion von MMP-3 nach 48 Stunden nachweisen, außerdem einen Anstieg von MMP-9, jedoch nicht von MMP-2. Zur Infektion der Explantate wurden 10 Millionen Borrelien/200 µl verwendet, also eine 5fach höhere Konzentration verglichen mit der vorliegenden Studie. In einer anderen Studie (Lin et al. 2001) wurde humanes Material verwendet. Humanes Knorpelgewebe wurde ebenfalls mit *B. burgdorferi sensu stricto* (N 40) infiziert. Die eingesetzte Borrelienkonzentration lag bei 10 Millionen/ml, die MMP-Konzentrationen wurden nach 5 Tagen gemessen. Im Überstand konnte ein hochgradiger Anstieg von MMP-1 und MMP-3 nachgewiesen werden. Bei der Beimpfung von humanem Synovialgewebe wurde ein minimaler Anstieg von MMP-1, aber keiner von MMP-3 gemessen (Lin et al. 2001). Demnach ist die Sezernierung von MMPs nicht nur abhängig vom Gewebetyp, sondern auch von der untersuchten Spezies. Das bestätigt erneut die Wichtigkeit, für die Untersuchung der Lyme-Borreliose beim Menschen auch tatsächlich humane Gewebemodelle zu verwenden. Da es bei der Lyme-Arthritis im Gegensatz zur Rheumatoiden Arthritis nur in seltenen Fällen zu Knorpelveränderungen

kommt, erscheint darüberhinaus der Ansatz mit Synoviozyten sinnvoller. *B. burgdorferi* ist in der Lage, die Sezernierung von MMP-1 in humanen Synovialzellen zu induzieren. Dieses ist, wie in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, bereits nach 72 Stunden, aber auch nach 120 Stunden noch erkennbar (Lin et al. 2001).

Die in dieser Arbeit durchgeführten TIMP-1-Messungen ergaben, dass dieser MMP-Antagonist in infizierten Gewebekulturüberständen auf das 1,35fache ansteigt, in Kontrollen auf knapp das Doppelte, jeweils im Zeitraum zwischen 24 und 72 Stunden ($p = 0,01$). Nach 72 Stunden liegt der Wert in Kontrollen bei 7929 ng/ml, bei infizierten Geweben dagegen bei 4208 ng/ml. Besondere Bedeutung erlangen diese Ergebnisse im Hinblick auf die ohnehin schon durch die Stimulation von *B. burgdorferi* verursachten erhöhten MMP-1-Konzentrationen. Dadurch ist das Verhältnis der MMP-1-Konzentrationen zu TIMP-1-Konzentration stark zu Gunsten des matrixdegradierenden MMP-1 verschoben, was ohne Zweifel dem Einfluss der Borrelien zuzuschreiben ist.

Problematisch an den dreidimensionalen Gewebemodellen ist, dass keine sichere Aussage über die Zellzahl und -zusammensetzung des verwendeten Gewebeblocks gemacht werden kann. Theoretisch ist nicht auszuschliessen, dass in den infizierten Explantaten zufällig mehr Zellen enthalten sind als in den nicht infizierten Kontrollen und der Effekt nicht auf die Induktion der Borrelien, sondern auf eine größere Zellzahl oder eine andere Zellzusammensetzung, beispielsweise dem Überwiegen der fibroblastenähnlichen Synoviozyten vom Typ B, zurückzuführen ist. Beim Präparieren der Gewebe wurde deshalb sorgfältig darauf geachtet, die zu infizierende Probe und die dazugehörige Negativkontrolle der gleichen Region zu entnehmen. Beide Blöcke stammten aus einem Patienten, stimmten makroskopisch weitgehend überein und hatten die gleiche Größe. Die Fehlerwahrscheinlichkeit wurde außerdem dadurch minimiert, dass 19 Gewebekulturen infiziert wurden und zu jedem separat eine Negativkontrolle angesetzt wurde. Ein wesentlicher Vorteil dieses Modells liegt darin, dass das Gewebe direkt aus dem Patienten stammt und die *in vivo*-Verhältnisse, im Gegensatz beispielsweise zu Monolayer-Kulturen, nicht verändert werden (gleiche Zellmorphologie, Extrazellulärmatrix bleibt erhalten).

Zymographisch konnte in den Kulturüberständen eine geringgradige Zunahme von MMP-9 im Vergleich zu Kontrollüberständen nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass *B. burgdorferi*

die Sezernierung dieses Enzyms stimuliert oder sogar einen Effekt auf die Transkription oder Translation hat und dadurch mehr MMP-9 ausgeschüttet wird. MMP-2 zeigte in allen Überständen starke Banden. Bei beiden MMPs ist auch in den Kontrollen nach 24 und 48 Stunden eine Bande sichtbar, was entweder durch eine Gewebestimulation durch die Präparier- und Kulturbedingungen verursacht worden sein kann oder auf eine konstitutive Ausschüttung zurückzuführen ist. Das entspricht den Ergebnissen von Hu und Mitarbeitern („baseline secretion“ von MMP-2 und MMP-9 ohne Infektion; Hu et al. 2001). Diese Ergebnisse bestätigen außerdem Beobachtungen bei Stimulationsversuchen an Nervenzellkulturen durch *B. burgdorferi* (Perides et al. 1999). *B. burgdorferi* induziert die Bildung von MMP-9, hat jedoch keine Auswirkung auf die Expression von MMP-2. Auch im Liquor von Neuroborreliosepatienten kann im Vergleich zum Liquor von Patienten mit nichtentzündlichen neurologischen Erkrankungen aktives MMP-9 nachgewiesen werden. Eine MMP-2-Aktivität zeigt sich dagegen in beiden Patientengruppen (Kirchner et al. 2000). *B. burgdorferi* induziert bei PBMCs, neutrophilen Granulozyten, Keratinozyten und monozytären Zellen der Linie U937 die Bildung von pro-MMP-9, was ebenfalls zymographisch nachgewiesen werden konnte (Gebbia et al. 2001). Dagegen schütten HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells) pro-MMP-2 und pro-MMP-9 konstitutiv aus. Ergebnisse entsprechender Stimulationsversuche sind demnach abhängig von der untersuchten Zellpopulation. Da das Zellgemisch in dem in der vorliegenden Studie verwendeten Modell jedoch dem *in vivo*-Zellgemisch entspricht, sind die dabei gemessenen Werte sehr wahrscheinlich mit dem Verhältnis im Gelenk nach Befall mit Borrelien zu vergleichen.

Die aufgetragenen Borreliensuspensionen zeigten im Zymogramm selbst keine Banden, obwohl im Genom von *B. burgdorferi* zwei Zinkproteasen sequenziert wurden (Fraser et al. 1997). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie besitzt *B. burgdorferi* jedoch keine gelatinolytische Aktivität, was Ergebnisse von Coleman und Mitarbeitern (1999) bestätigt. Andere Wissenschaftler wiesen nach, dass *B. burgdorferi* Gelatine sowie verschiedene Kollagentypen degradieren kann (Grab et al. 1996). Anhand der freigesetzten Radioaktivität wurde der Abbau von mit Jodisotopen markierter Gelatine bzw. Kollagen durch *B. burgdorferi* gemessen. Zymographisch konnte gezeigt werden, dass der *B. burgdorferi*-Stamm B31 eine proteolytische Aktivität zeigt, wobei die Enzyme jedoch Molekülgrößen von über 200 kDa aufweisen. Offensichtlich handelt es sich dabei nicht um MMP-2 bzw. MMP-9,

da diese eine Molekülgrößen von 72 bzw. 92 kDa haben und in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnten.

Da die Gewebeprouben für die molekularbiologische Analyse wegen der geringen mRNA-Mengen gepoolt werden mussten, sind von den ursprünglich 19 infizierten Ansätzen nur 4 gepoolte Ansätze ausgewertet worden. Die Ergebnisse dieser wenigen Versuchszahlen lässt natürlich keine generelle Aussage zu, sondern können lediglich Tendenzen aufzeigen. Bestätigt wurde die bereits bekannte Tatsache, dass es durch *B. burgdorferi* zur vermehrten mRNA-Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α kommt (Straubinger et al. 1998). Dieses konnte in allen Zellpools durchgängig gezeigt werden.

Die RT-PCR zeigte in zwei von vier Ansätzen eine Erhöhung der IL-18 mRNA-Menge in infizierten Geweben im Vergleich zu den Kontrollen. In den beiden anderen Ansätzen ließ sich eine Verringerung feststellen. Die auf Proteinebene festgestellten Konzentrationserhöhungen nach 72 Stunden in infizierten Kulturüberständen korrelieren somit nicht mit den mRNA-Messungen. Möglicherweise wird das als Protein schon in uninfizierten Geweben vorliegende IL-18 durch den Einfluß von *B. burgdorferi* sezerniert. Die Borrelien haben jedoch nicht unbedingt in allen Ansätzen eine Auswirkung auf die Transkription.

Durchgängig konnte gezeigt werden, dass *B. burgdorferi* im Gewebekulturmodell in der Lage ist, die Transkription von MMP-1 und MMP-3 zu induzieren. Die mRNA von beiden MMPs ist bereits in den Kontrollpools nachzuweisen. Für MMP-1 läßt sich folgendes festhalten: In den infizierten Kulturen steigt die mRNA-Menge bis auf das 3,1fache der Mengen in uninfizierten Kontrollen an. Bei MMP-3 ist ein Anstieg um das 3,7fache zu erkennen.

Diese eindeutigen Beobachtungen auf mRNA-Ebene spiegeln sich in den Proteinmessungen nicht so deutlich wieder. Die Messungen zeigen einen Anstieg der MMP-1-Proteinmengen in infizierten Gewebekulturüberständen nach 72 Stunden, der jedoch nicht signifikant ist. MMP-3 zeigt in den Anstiegsverhältnissen von infizierten und nicht infizierten Kulturüberständen keinen Unterschied. Es ist anzunehmen, dass durch die Stimulation mit *B. burgdorferi* die mRNA-Synthese der MMPs verstärkt wird, die Translation jedoch verzögert abläuft. Die Proteinsynthese erfolgt demnach nur von einem Teil der neu gebildeten mRNA.

Möglicherweise müssen in Folgeuntersuchungen die Untersuchungszeitpunkte diesen Ergebnissen entsprechend optimaler gewählt werden.

Die Aussagen für MMP-2 und MMP-9 sind dagegen weniger eindeutig. Auch diese Proteinase werden in den Negativkontrollen exprimiert und, wie aus den Zymographie-Ergebnissen ersichtlich wird, translatiert und ausgeschüttet. Möglich ist, dass eine Aktivierung nur durch die *in vitro*-Bedingungen verursacht wird, beispielsweise durch das Präparieren von Gewebe und die Kulturbedingungen. Inwieweit *B. burgdorferi* die mRNA-Expression von den Gelatinasen beeinflusst, bleibt durch weitere Untersuchungen zu klären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Seren von Patienten mit Lyme-Arthritis und verschiedenen anderen Manifestationsarten der Lyme-Borreliose signifikant höhere IL-18-Konzentrationen im Vergleich zu Seren gesunder Spender gemessen worden sind. Die spezifische Immunantwort der Lyme-Borreliose ist charakterisiert durch eine Th1-Dominanz, die mit erhöhten Konzentrationen von IFN- γ einhergeht. Das Zytokin IL-18 wirkt bei der Lyme-Borreliose demnach (ebenso wie IL-12) durch die Induktion von IFN- γ „in Richtung Th1“.

Die zirkulierenden Konzentrationen von MMP-1, MMP-3 und TIMP-1 zeigen keine Unterschiede in erkrankten und normalen Patientenserum.

Anhand eines dreidimensionalen Zellkulturmodells lassen sich folgende Wirkungen von *B. burgdorferi* auf Gelenkzellen beschreiben: Die Konzentration des Zytokins IL-18 steigt nach Stimulation mit *B. burgdorferi* nach 72 Stunden auf die 1,3fache Menge an, während in den nicht infizierten Kontrollen ein Abfall auf 80 % der Ausgangskonzentration zu verzeichnen ist. *B. burgdorferi* aktiviert Zellen von *in vitro* kultivierten dreidimensionalen Gewebeblöcken, woraus eine Zunahme der MMP-1- und MMP-3-Sekretion nach 72 Stunden resultiert. Außerdem lässt sich in gepoolten Gewebe-mRNAs ein Anstieg der mRNA der genannten MMPs beobachten. Die TIMP-1-Konzentrationen sinken im Verhältnis zu den MMP-1-Konzentrationen drastisch ab, was zu einem Ungleichgewicht zwischen Enzym und Antagonist führt. Diese Ergebnisse sprechen für die Hypothese, dass es durch die Einwirkung von *B. burgdorferi* zu einem vermehrten Abbau der Extrazellulärmatrix kommt, was es den

Spirochäten ermöglicht, mit Hilfe ihrer Eigenbeweglichkeit in die Synovialzellschicht einzuwandern und durch Destruktion des Zellverbandes das Gewebe zu zerstören sowie Zellfunktionen zu behindern. Ob dieser Pathogenitätsmechanismus außer im Gelenk auch in anderen Manifestationsorganen (z.B. Haut, Auge, Herz) zur Wirkung kommt, bleibt durch weitere Untersuchungen zu bestätigen.