

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Erreger der Lyme-Borreliose *Borrelia burgdorferi* ist in der Lage, über viele, großteils noch ungeklärte Pathogenitätsmechanismen ein multisystemisches Krankheitsbild mit Beteiligung von Haut, Bewegungsapparat, Herz und Nervensystem zu verursachen. Die spezifische Immunantwort gegen *B. burgdorferi* ist durch eine präferentielle Th1-Antwort mit Produktion von IFN- γ gekennzeichnet. IL-18 ist bekannt als IFN- γ -induzierender Faktor. In der Arbeit wurde deshalb die Rolle von IL-18 bei der Lyme-Borreliose untersucht. Darüber hinaus ist es bis heute nicht klar, wie sich die Borrelien innerhalb des Wirtsorganismus ausbreiten. Die mögliche Induktion von MMPs durch *B. burgdorferi* wurde deshalb näher untersucht.

Anhand der Untersuchung von 100 Seren von Lyme-Borreliose-Patienten (Lyme-Arthritis n = 65; andere Manifestationsformen n = 35) mittels „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) konnte gezeigt werden, dass bei Borreliosepatienten im Vergleich zu Normalspenderseren (n = 37) signifikant erhöhte IL-18-Konzentrationen im Serum vorliegen. MMP-1 und MMP-3 sowie deren physiologischer Antagonist TIMP-1 zeigten keine Unterschiede in Seren von Lyme-Borreliose-Patienten verglichen mit Seren von gesunden Spendern. Der signifikante Anstieg von IL-18 in Seren von Patienten mit Lyme-Borreliose weist auf eine pathophysiologische Rolle dieses Zytokins hin. Zusätzliche Untersuchungen müssen zeigen, ob IL-18 als Marker in der Diagnose und Therapie der Lyme-Borreliose dienen kann.

Die potentielle Sekretion und Induktion von IL-18, verschiedener MMPs und TIMP-1 bei der Lyme-Arthritis wurde anhand eines neuen dreidimensionalen Zellkulturmodells untersucht. 19 humane Synovialgewebsproben wurden mit *B. burgdorferi* infiziert und bis zu 72 Stunden inkubiert. Immunhistochemisch konnte nachgewiesen werden, dass die Borrelien in das Synovialgewebe einwandern. Im Überstand wurden Proteinkonzentrationen von IL-18, MMP-1, MMP-3 und TIMP-1 mittels ELISA gemessen. MMP-2 und MMP-9 wurde zymographisch nachgewiesen. Aus den Geweben wurde darüber hinaus mittels semiquantitativer Realtime-PCR die Induktion von TNF- α , IL-1 β , IL-18, MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 bestimmt.

In infizierten Kulturen war nach 72 Stunden im Verhältnis zur Konzentration nach 24 Stunden die 1,3fache Menge an IL-18 vorhanden. MMP-1 stieg im Vergleich zu den Kontrollen an, jedoch konnte auch in uninfizierten Kontrollen ein geringgradiger Anstieg gemessen werden, bei MMP-3 war der Anstieg weniger ausgeprägt. TIMP-1 zeigte in infizierten Gewebekulturüberständen einen Abfall der Konzentrationen nach 72 Stunden. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten eine Induktion durch *B. burgdorferi* von MMP-1, MMP-3, TNF- α und IL-1 β . Zymographisch konnte ein geringgradiger Anstieg von MMP-9 in infizierten Kulturüberständen nachgewiesen werden, die Banden von MMP-2 waren in allen Kulturüberständen etwa gleich stark ausgeprägt. Spirochäten alleine produzierten weder MMP-2 noch MMP-9. Die mRNA-Analyse von IL-18 ergab kein eindeutiges Ergebnis der 4 Gewebepools, das gleiche gilt für MMP-2 und MMP-9.

B. burgdorferi ist in der Lage, wirtseigene proteolytische Enzyme zu induzieren. Darüber hinaus wird die TIMP-1-Produktion reduziert, wodurch das normalerweise herrschende Gleichgewicht zwischen MMP-1 und TIMP-1 zu Gunsten von MMP-1 verschoben ist. Dieser Pathogenitätsmechanismus kann den Borrelien *in vivo* dazu dienen, Gewebebarrieren zu überwinden. Außerdem kann die lokale Freisetzung von MMPs zur Pathophysiologie der Lyme-Arthritis beitragen, wie es auch bei anderen entzündlichen Gelenkerkrankungen, beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis, der Fall ist.

Unsicker, C (2002): Induction of Matrixmetalloproteinases and Interleukin-18 by *Borrelia burgdorferi* in vivo and in vitro

7 SUMMARY

Lyme borreliosis is a systemic disease involving the skin, the musculoskeletal system, the heart and the central nervous system. The shift of the cytokine pattern towards the Th1 response is one characteristic feature of the disease. Recently, interleukin-18 has been described to induce interferon- γ . Therefore the potential role of IL-18 in Lyme disease has been studied. In addition, it is not clear how the spirochetes can disseminate within the host organism. Therefore, the potential induction of metalloproteinases (MMPs) by *B. burgdorferi* was observed.

Serum samples from patients with Lyme disease (n = 100) were collected (Lyme arthritis; n = 65, other manifestations of Lyme disease n = 35). Normal blood donors (n = 37) and patients with rheumatoid arthritis (RA; n = 12) served as controls. IL-18 levels were determined by ELISA. In patients with Lyme arthritis IL-18 was significantly elevated (median value 179 pg/ml; $p < 0.01$) as compared to normal controls (0,05 pg/ml). Patients with RA had significantly higher levels compared to normal controls, too (162 pg/ml). Collagenase-1 (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) as well as tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) had no significant different levels in patients with Lyme Borreliosis compared to healthy donors. The significant elevation of IL-18 in sera of patients with Lyme disease implies a pathophysiological role of this cytokine. Additional studies will have to show if IL-18 reflects the activity of the disease and may be useful as a novel marker in diagnosis and therapy of Lyme borreliosis.

The potential secretion and induction of IL-18, MMPs and TIMP-1 by *Borrelia burgdorferi* was tested using a novel threedimensional *in-vitro* model of Lyme arthritis. Explant cultures of human synovial tissue were infected with *B. burgdorferi*. and co-cultured for up to 72 hours. The concentrations of IL-18, MMP-1, MMP-3 and of TIMP-1 were measured by ELISA. The activities of gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) were assessed by

zymography. Moreover, a semiquantitative RT-PCR was used to determine the induction of TNF- α , IL-1 β , IL-18, MMP-1, MMP-2, MMP-3 and MMP-9 mRNA.

After 72 hours, the infected cultures showed an increase of IL-18 concentrations up to the 1.3 fold of the levels at 24 hours after infection. In uninfected controls the IL-18 level after 72 hours was reduced to 80 % of the level at 24 hours. Furthermore, in the infected cultures there was an increase of MMP-1 levels compared to the uninfected cultures, whereas no increase of MMP-3 concentrations was observed. Of note, there was a reduction of TIMP-1 levels in the infected cultures. The RT-PCR results showed MMP-1 and MMP-3 to be induced by *B. burgdorferi*. By zymography, a slightly increased activity of MMP-9 in the infected cultures could be demonstrated, MMP-2 had activity in all supernatants. Spirochetes themselves did not produce MMP-2 or MMP-9. An increase of IL-18 could be demonstrated in 2/4 cultures infected with *B. burgdorferi*.

B. burgdorferi is able to induce proteolytic enzymes of the host. Moreover, the spirochetes reduce the TIMP-1 production, pointing towards an imbalance between the proteases and their inhibitor. This may reflect a mechanism potentially operative *in vivo* that enables the microorganism to penetrate host barriers. In addition, the local release of MMPs within the joint may contribute to the pathophysiology of Lyme arthritis like in other inflammatory arthritides such as rheumatoid arthritis.