

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zecken

Die zur Xenodiagnose (s. 2.2.2) verwendeten Zeckenlarven des Gemeinen Holzbockes, *I. ricinus*, waren in der dritten Generation kontinuierlicher Laborzucht niemals infizierten Wirten ausgesetzt. Sie stammten ursprünglich aus dem Raum Berlin-Brandenburg. Gesogene Zecken und Gelege wurden in Gläschen in Exsikkatoren über einer gesättigten MgSO₄-Lösung bei 95% relativer Luftfeuchte, 23°C und Langtagbedingungen (16:8 Stunden) gehalten. Geschlüpfte Larven wurden bei Raumtemperatur gehalten und etwa zwei Monate nach dem Schlüpfen an entsprechende Wirte angesetzt. Geschlüpfte Nymphen wurden bei 10°C gehalten und 1 Tag vor dem Ansatz in Raumtemperatur verbracht.

2.1.2 Bakterienstämme

Für die Versuche wurden Spirochäten der Genospezies *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii* Serotyp 6 verwendet. Die Spirochätenstämme stammten jeweils aus einer im Göttinger Stadtpark gesammelten Nymphe.

2.1.3 Kleinnager

Die verwendeten Versuchstiere waren zwischen sechs und zwölf Monate alt. Mongolische Wüstenrennmäuse, *Meriones unguiculatus*, Waldmäuse, *Apodemus sylvaticus*, Wanderratten, *Rattus norvegicus* (genehmigter Tierversuch Nummer: G 0355/96) und haarlose Hausmäuse, *Mus musculus* Stamm SKH-1 (genehmigter Tierversuch Nummer: G 0153/97), stammten aus institutseigener Zucht. Sie wurden in Gruppen von zwei bis vier Tieren in Makrolonkäfigen (Größe III und IV, Ebeco, Castrop Rauxel) auf Holzspäneneinstreu gehalten und mit handelsüblichem Nagerfutter (Altromin, Lage-Lippe) und Wasser *ad libitum* ernährt.

2.1.4 Seren

Die Versuchstiere wurden nach Abschluß der Untersuchungen durch CO₂-Narkose getötet. Das Blut wurde durch sofort anschließende Herzpunktion gewonnen und nach Koagulation zur Serumgewinnung 3min bei 7000 x g zentrifugiert (Zentrifuge 5402, Eppendorf GmbH, Engelsdorf). Der Überstand wurde bei -70°C eingefroren. Die Seren wurden im ELISA eingesetzt.

Die negativen Kontrollseren stammten von Labortieren, die keinen Kontakt zu Zecken hatten. Die positiven Kontrollseren wurden von Labortieren gewonnen, die immunisiert worden waren wie unter 2.2.4 beschrieben.

2.1.5 Organproben

Nach der Tötung der Tiere wurden die Ohren sowie Leber, Milz, Niere, Harnblase und Herz in 80% Ethanol bei -20°C asserviert.

2.1.6 Chemikalien

Absättigungspuffer (0,05M PBS mit 3% Magermilch, 0,05% Tween)	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
Agarose	SeaKem FMC BioProducts, Rockland, USA
Ammoniumpersulfat	BioRad, Richmond, USA
Ethanol 80%	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Ethanol 100%	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Bromphenolblau	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
BSK-H Nährmedium	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
dNTP's	Perkin Elmer, Branchburg, USA
ddNTP's	Amersham Pharmacia biotech, Buckinghamshire, UK
DMSO	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
DNA-Längenstandard (in Schritten von 100 Basenpaaren)	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
Ethidiumbromid	Amresco, Solon, USA
Glyzerin	Merck, Darmstadt
HPLC-Wasser	Merck, Darmstadt
Kaninchenserum, steril für Kultivierung von Spirochäten	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
Ketamin (Ketanest)	Bayer, Leverkusen
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchloridlösung 0,9%, steril	Braun, Melsungen
Polyacrylamidlösung 6%	FMC Bioproducts, Maine, USA
PBS-Puffer 10x	Perkin Elmer, Branchburg, USA
PCR-Puffer 10x	Perkin Elmer, Branchburg, USA
pNPP-Substrat	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
Saccharose	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
SDS	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
TBE-Puffer	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
TEMED	BioRad, Richmond, USA
Tween 20	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
Xylazin (Rompun)	Bayer, Leverkusen

2.1.7 Enzyme

Proteinase K	QIAGEN GmbH, Hilden
Taq-Polymerase	Perkin Elmer, Branchburg, USA

2.1.8 Antikörper

Ziege - Anti Maus IgG (Alkalische Phosphatase-konjugiert)	Kirkegaard & Perry Lab. Inc., Gaithersburg, USA
Ziege - Anti Ratte IgG+IgM (Alkalische Phosphatase-konjugiert)	Kirkegaard & Perry Lab. Inc., Gaithersburg, USA

2.1.9 Primer

Tab. 2 PCR Primer ohne Konjugat Roth GmbH, Karlsruhe

	OspA	16S
äußere Primer (5'-3')	GGTCTAATATTAGCCTTATAGCATG TCAGCAGCTAGAGTTCCTCAAG	CTAACGCTGGCAGTGCCTTAAGC AGCGTCAGTCTTGACCCAGAAGTTC
innere Primer (5'-3')	CATGTAAGCAAAATGTTAGCAGCC CTGTGTATTCAAGTCTGGTTCC	AGTCAAACGGGATGTAGCAATAC GGTATTCTTCTGATATCAACAG

mit Fluoreszenzfarbstoff IRD 700 bzw. IRD 800 konjugierte Primer zum Sequenzieren MWG-Biotech, Ebersberg

2.1.10 Diagnostische Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Lyme Borreliosis ELISA Kit	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Thermo Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia biotech, UK

2.1.11 Lösungen

Lösung	Substanz	Konzentration
Ladepuffer für Agarosegel	Saccharose SDS Bromphenolblau	50% (w/v) 1,0% (w/v) einige Kristalle gelöst in TBE
Ethidiumbromid- Färbelösung	Ethidiumbromid	1 µg/ml gelöst in Aqua dest.

2.2 Methoden

2.2.1 Besatz der Kleinnager mit *I. ricinus* Zecken

Subadulten *I. ricinus* Zecken wurde die Möglichkeit gegeben, Nagetiere zu infestieren, indem sie mit Hilfe eines Pinsels in das Fell der Tiere gebracht wurden. Nicht angesogene Nymphen wurden nach 2-3 Stunden wieder eingesammelt und gezählt. Die infestierten Gerbilde und Ratten wurden einzeln in Edelstahlkäfigen Größe II, die Waldmäuse in kleineren Edelstahlgitterkäfigen über Wasser gehalten. Das Wasser wurde zweimal täglich gewechselt und vollgesogene Zecken eingesammelt.

2.2.2 Xenodiagnose

Um festzustellen, ob ein Zeckenwirt mit Spirochäten infiziert ist, wurde er mit nachweislich nicht infizierten Zeckenlarven besetzt. Anschließend wurden die daraus entstandenen Nymphen mittels Dunkelfeldmikroskopie oder PCR (siehe 2.2.6 bis 2.2.8) auf Erreger untersucht und so die Infektiosität des Wirtes ermittelt.

2.2.3 Kultivierung von *B. burgdorferi* s.l.

Zum Kultivieren von Spirochäten wurde BSK-H Medium durch Zugabe von 6% sterilem Kaninchenserum komplettiert. Dieses Serum ist auf Verträglichkeit mit Spirochäten getestet und speziell für diese Verwendung vorgesehen. 9 ml des Mediums wurden mit 1 ml einer Bakterienstammlösung beimpft und in einem sterilen Röhrchen mit Schraubverschluß (Falcon, Lincoln Park, USA) bei 34°C unter Luftabschluß inkubiert. Während der Wachstumsphase wurde dem Medium regelmäßig eine Probe entnommen und mittels Dunkelfeldmikroskopie auf Zelldichte untersucht. Eine erneute Passage in frisches Medium erfolgte bei leichter Gelbfärbung des Mediums. Für eine längerfristige Konservierung wurden 1 ml frisch passagierte Kultur in Kryoröhrchen (Nalgene, Hereford, England) um -1°C pro Minute auf -70°C eingefroren. Für eine erneute Anzucht wurden die Zellen ohne Verzögerung auf 34°C erwärmt und in 9 ml entsprechend temperiertes Medium überführt.

2.2.4 Gewinnung positiver Kontrollseren

Um positive Kontrollseren zu gewinnen wurden von einer gut bewachsenen *B. afzelii* Kultur zwei ml in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und bei 14.000 x g für 20 min bei 20°C zentrifugiert (Eppendorf 5417 R, Tischzentrifuge). Das Sediment wurde in 0,01M PBS-Lösung aufgeschwemmt, die Dichte mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 10⁹ Spirochäten in 0,5 ml Lösung eingestellt. Diese Suspension wurde dem zu immunisierenden Gerbil subkutan im Nacken injiziert (Labor Prof. Dr. Schein, FU Berlin). Nach vier Wochen wurde dies wiederholt. Acht Wochen nach der Erstimmunisierung wurde der Gerbil getötet und Serum gewonnen.

2.2.5 Antikörperbestimmungen im Serum der Nagetiere

Für die Antikörperbestimmung im Serum der SKH-Mäuse wurde der Dako-Lyme Borreliosis ELISA Kit fogendermaßen abgewandelt. Die Mikrotiterplatte ist mit dem *B. burgdorferi*-Flagellum-Antigen beschichtet, welches hoch immunogen ist und keine Stamm-Variationen zeigt (Hansen et al. 1988). Laut Beschreibung ist der ELISA gleichermaßen sensitiv für

Infektionen mit *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. Die Serumproben der Versuchstiere sowie ein Negativ- und ein Positivkontrollserum wurden mit dem mitgelieferten Puffer 1:200 verdünnt und 100 µl im Doppelansatz in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben. Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Platte mit Waschpuffer viermal mittels ELISA-Washer (Wellwash 4, Denley, Großbritannien) gewaschen. Dann wurde der mit alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper gegen Maus-IgG 1:1000 mit beigefügtem Puffer verdünnt und 100 µl der Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Es folgten eine Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur und vier weitere Waschschriffe. Als Enzym-Substrat wurde eine Lösung mit 1mg/ml pNPP und 0,2M Tris-Puffer hergestellt und 200 µl in jede Vertiefung gegeben. Nach 30 min Inkubation in der Dunkelheit bei Raumtemperatur wurde die Optische Dichte bei 405 nm mit dem ELISA-Reader (SPECTRAMax PLUS, Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA) bestimmt.

Zur Messung der Antikörpermengung im Serum der Gerbale, Waldmäuse und Ratten wurde ein im Labor entwickelter ELISA eingesetzt. Gereinigte Spirochäten-Kulturen aller drei Genospezies bzw. des Serotypen 6 von *B. garinii* wurden per Ultraschall in Bruchteile zertrümmert, die Protein-Konzentration mittels BCA Protein Assay Kit bestimmt und auf 2µg/ml mit 0,01M PBS-Puffer eingestellt. 50 µl dieses Lysates wurden in jede Vertiefung einer Mikrotiter Platte (Immulon 2, Dynatech Laboratories, Virginia, USA) pipettiert. Die so beschickte Platte wurde mit Folie abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann folgte ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (0,01M PBS mit 0,05% Tween 20) mittels ELISA-Waschautomat. Zum Absättigen aller unspezifischen Bindungsstellen der Platte wurden 200 µl Absättigungspuffer (0,05M PBS mit 3% Magermilch und 0,05% Tween 20) einpipettiert, für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Die zu untersuchenden Seren wurden 1:500 in Absättigungspuffer verdünnt und pro Vertiefung 50 µl im Doppel- bzw. Dreifachansatz einpipettiert. Bei jeder der drei als Antigen verwendeten Genospezies wurden ein positives Kontrollserum der mit der entsprechenden Genospezies infizierten Tierart und ein negatives Serum der gleichen Tierart mitgetestet. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurde je Vertiefung 50 µl des Phosphatase-konjugierten Antikörpers zugegeben. Bei den Waldmäusen und Gerbilen wurde der Ziege-anti Maus -, bei den Ratten der Ziege-anti Ratte Antikörper bei einer Verdünnung von 1:1000 in Absättigungspuffer verwendet. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde dreimal gewaschen. Nach Zugabe von je 100 µl des Enzym-Substrates pNPP je Vertiefung wurde die Mikrotiterplatte im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion nach 30 Minuten mit 25µl 3N NaOH abgestoppt. Die Optische Dichte wurde bei 405 nm mit dem ELISA-Reader bestimmt.

2.2.6 Untersuchung der Zecken mittels Dunkelfeldmikroskopie

Das Abdomen der zu untersuchenden Zecken wurde ventral mit einer 27-G Kanüle aufgeschlitzt und der Mitteldarm in 4 µl 0,9%iger Kochsalzlösung ausgestrichen und mit einem Deckgläschen versehen. Die xenodiagnostischen Larven wurden frühestens zwei Wochen nach der Häutung zu Nymphen auf Spirochäten untersucht. Das Präparat wurde bei 312-facher Vergrößerung mit Dunkelfeldbeleuchtung betrachtet (Laborlux mit 25x Fluotar-Objektiv und 12,5x Okular; Leitz, Wetzlar).

2.2.7 DNA-Isolierung aus Larven, Nymphen oder adulten Zecken und Gewebeproben

Der Mitteldarm von lebenden Zecken wurde als ganzes in 4 µl 0,9%ige Kochsalzlösung herauspräpariert. Der Tropfen wurde mittels Pipette in ein mit 180 µl Lysispuffer (ATL Tissue Lysis Buffer, QIAgen, Hilden) und 20 µl Proteinase K gefülltes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. In 80% Ethanol konservierte Zecken wurden mittig mit einer Kanüle geteilt und beide Hälften überführt. 3 x 3 mm große Probenstücke von asservierten Geweben wurden ebenfalls in 180 µl Lysispuffer mit 30 µl Proteinase K verbracht. Die Lyse bei 56°C und leichtem Schütteln erfolgte für Zecken in 3-4 Stunden, für Organproben über Nacht. Die DNA wurde mittels QIAamp DNA Mini Kit extrahiert. Dabei wird die DNA an eine Siliziumdioxidmembran gebunden, zweimal mit einem ethanolhaltigen Puffer mittels Zentrifugation bei 8000 bzw. 14000 UPM gewaschen und mit einem im Kit bereitgestellten Puffer von der Membran eluiert. Die DNA aus Därmen von Zeckennymphen wurde mit 50 µl, die von adulten Zecken mit 75 µl und die DNA von Organproben der Nagetiere mit 100 µl AE-Puffer eluiert. Die so gewonnene DNA wurde bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.8 Nachweis von Spirochäten-DNA mittels PCR

Die isolierte DNA wurde mittels "nested-PCR"-Methoden analysiert. Zwei verschiedene Gene wurden so durch die Amplifikation bestimmter Abschnitte nachgewiesen. Die erste PCR, kurz OspA-PCR genannt, amplifiziert ein 400bp langes Fragment des Gens, welches für das outer surface protein (Oberflächenprotein) A kodiert (Eiffert et al. 1995) (Tab.1). In der zweiten PCR, kurz 16S-PCR genannt, wird das Gen der 16S-rRNA amplifiziert und ein 650 bp langes Fragment erzeugt (Ohlenbusch, Dissertation 1996) (Tab. 1). Beide PCR-Methoden wurden wie folgt durchgeführt, verwendete Mengen an Chemikalien und angewendete Anlagerungstemperaturen sind in Tabelle 3 aufgeführt: Der Master-Mix-Ansatz enthielt 200 µM eines jeden dNTP, 1,5-4 mM MgCl₂, 5 µl 10x PCR-Puffer, 1U Taq-Polymerase sowie 10-20 pmol des äußeren bzw. bei der zweiten Amplifikation des inneren Primerpaares (Tab.3). 2-10 µl der extrahierten DNA wurden zum Master-Mix pipettiert und mit Aqua destillata auf 50µl aufgefüllt. Das Reaktionsgefäß mit der Mischung wurde in einem Thermocycler (PTC 200, Biozym, Deutschland) plaziert und für 1min auf 94°C erwärmt. Es folgten 25-40 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 94°C, 30 s für die Anlagerungsreaktion bei 56-63°C sowie 30 s Kettenverlängerung bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus erfolgte ein weiterer Verlängerungsschritt von 2 min bei 72°C, wonach die Proben auf 14°C abgekühlt wurden. Nach der ersten Amplifikation mit dem äußeren Primerpaar wurden 2-10 µl des Produktes in ein neues Reaktionsgefäß mit dem oben beschriebenen Reaktionsansatz und dem inneren Primerpaar gegeben. Bei jedem PCR-Ansatz wurde eine Positivkontrolle bestehend aus ca. 100 fg *B. burgdorferi* s.l. DNA einer nicht im jeweiligen Versuch verwendeten Genospezies und mehrere Negativkontrollen (Wasser) mitgeführt. Zur Vermeidung einer Kontamination wurde die Isolierung der DNA, Amplifikation, Elektrophorese sowie Sequenzierung der PCR-Fragmente in voneinander getrennten Räumen durchgeführt. Durch Bestrahlung der Arbeitsflächen und -geräte mit ultraviolettem Licht für mindestens 20 Minuten wurde eventuell vorhandene DNA zerstört.

Tab. 3 Variable Chemikalien und Temperaturen der beiden angewandten PCR-Methoden

Variable	OspA-PCR	16S-PCR
<u>MgCl₂-Konzentration</u>		
1. Runde	4mM	1,5mM
2. Runde	4mM	2,5mM
<u>Primerkonzentration</u>		
1. Runde	10pmol	10pmol
2. Runde	10pmol	15pmol
<u>Annealingtemperatur und Zyklenzahl</u>		
1. Runde	58°C - 40x	63°C - 20x -0,3°C/Zyklus*
2. Runde	59°C - 40x	63°C - 20x 63°C - 40x

*Pro Zyklus erfolgte eine Absenkung der Annealingtemperatur um 0,3°C bis auf 57°C.

2.2.9 Elektrophorese und Färbung der Gele sowie deren Dokumentation

1,5% (w/v) Agarose wurden in TBE-Puffer in der Mikrowelle vollständig aufgelöst und nach dem Abkühlen auf 50°C auf den Träger der Elektrophoresekammer (Horizon 58, Gibco BRL, Gaithersburg, USA) gegossen und zur Taschenformung zwei Käbme mit je 14 Zinken eingesetzt. Zu 1 µl Probenpuffer wurden jeweils 5 µl der Proben bzw. 0,5 µl des DNA-Längenstandares gegeben und anschließend in die Taschen des erkalteten Gels pipettiert. Als Laufpuffer wurde TBE verwendet. Die PCR-Produkte wurden 30 min bei 100V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Färbung erfolgte für 15-25 min mit Ethidiumbromid-Färbelösung (1 µg/ml). Anschließend wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator (International Biotechnologies, New Haven, USA) plaziert, mit UV-Licht der Wellenlänge 311 nm durchleuchtet und mit einem Polaroidfilm 667 fotografiert.

2.2.10 Sequenzierung der PCR-Produkte

Für die automatische Sequenzierung nach der Dideoxyterminationsmethode wurden die Amplifikate aus der 2. Runde der PCR mittels des QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und in 20-30 µl HPLC-Wasser gelöst. Zur Abschätzung der DNA-Menge wurden 3 µl des Eluates im Agarosegel aufgetrennt. Für die Sequenzierung wurde das Thermo Cycle Sequencing Kit eingesetzt. Dieses Kit besteht aus vier Basengemischen, wobei jeweils eine Base pro Mischung teilweise als ddNTP vorliegt und die drei anderen als dNTP. Außerdem sind in jedem Basengemisch die Thermo Sequenase DNA Polymerase und Puffer vorhanden. In einer ultradünnen Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Biozym, Hessisch-Oldendorf) wurde der Sequenzansatz wie folgt pipettiert: 2 µl des jeweiligen Basengemisches wurden in eine Vertiefung gegeben, dazu kamen 5 µl des Mastermixes, bestehend aus je 1 µl (2 pmol)

mit IRD 700 bzw. IRD 800 konjugiertem inneren Primer, 12 µl 2,5%iges DMSO und 9 µl gereinigtes und, je nach DNA-Konzentration, bis zu 3,5fach verdünntes gereinigtes PCR-Amplifikationsprodukt. Der Sequenzansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, die Mikrotiterplatte mit einer Folie (Microseal A-Film, Biozym) abgedichtet und im Thermocycler plaziert. Für die Sequenzreaktion wurde folgendes Programm benutzt: Denaturierung bei 95°C für eine Minute, dann 19 Zyklen mit jeweils 20 s Denaturierung bei 95°C, 1 min Anlagerung bei 59°C und 1,5 min Verlängerung bei 65°C, danach Kühlung bei 14°C. Anschließend wurden je Vertiefung 9 µl des mitgelieferten Ladepuffers, bestehend aus Formamide, EDTA und Fuchsin, einpipettiert und der Ansatz bei -20°C eingefroren.

2.2.11 Elektrophorese der Sequenzprodukte

Zur Auftrennung der bei der Sequenzierung entstandenen kurzkettigen Produkte wurde ein 6%iges Polyacrylamidgel (Long Ranger 6%) in einer Stärke von 0,2 mm gegossen. Dazu wurden 25 ml der Fertigzellösung mit 16,6 µl TEMED und 117 µl 10% APS versetzt und mittels einer Einmalpipette zwischen die gereinigten Glasplatten des Gelapparates einpipettiert. Zur Formung einer Tasche wurde die glatte Seite des Kammes oben zwischen die Glasplatten geschoben. Nach einer Stunde Polymerisierung wurde der Kamm entfernt, der Gelapparat in den Sequenzierer (LICOR GeneReadIR 4200, Model Dual Dye, MWG-biotech, Ebersberg) eingehängt und die Puffertanks mit TBE aufgefüllt. Nach einem 15minütigen Vorlauf wurde der 64-zinkige Haifischzahnkamm mit den Zähnen nach unten bis leicht in die Gelkante eingeschoben. Vor dem Auftragen der Proben ins Sequenziergel wurde die Mikrotiterplatte aufgetaut und für fünf Minuten bei 60°C im Thermomixer (Eppendorf) leicht geschüttelt. Mittels einer 0,4 mm starken 8-Kanal-Hamilton-Pipette wurde dann ca. 1 µl jedes Ansatzes in die zwischen den Zinken liegenden Hohlräume eingegeben und der Sequenzlauf mit 2000V bei 31,5 W, 35mA und 45°C gestartet. Zur Sequenzierung des OspA-Genproduktes wurden ca. 3,5 h, für die 16S-PCR-Produkte ca. 6 h benötigt.

2.2.12 Identifizierung der Genospezies von *B. burgdorferi* s.l.

Die Sequenz der durch die gewählten Primer amplifizierten Fragmente lässt einen Rückschluß auf die Genospezies zu, bei der OspA-PCR sogar auf die Serotypen. Da die in den Versuchen verwendeten Genospezies bzw. der Serotyp bei *B. garinii* bekannt waren und die Sensitivität der 16S- höher als die der OspA-PCR ist, wurde diese PCR und die Sequenzierung der Amplifikate als Methode der Wahl eingesetzt. Die Bandenzuordnung der erhaltenen Sequenzbilder erfolgte mit der Software Image Analysis 4.10 (LICOR, MWG-biotech) und die Zuordnung einer Sequenz zu einer Genospezies bzw. eines Serotypen durch Vergleich der unbekannt Sequenz mit bekannten Sequenzen (GenBank Zugangsnummern: 16S-PCR: für *B. afzelii*: X85193, X85199 und M64311, für *B. burgdorferi* s.s.: X85190, X85192 und X85194, für *B. garinii*: X98228 und X98229, OspA-PCR: für *B. afzelii* X80185, für *B. burgdorferi* s.s. X80182, für verschiedene Serotypen von *B. garinii* X80256, X80257, X80186, X85441, X80251, X80252 und X80254) mittels der AlignIR 1.1 Software (LICOR, MWG-biotech).

2.2.13 Gewinnung von monoinfizierten Zecken

Die für die Experimente genutzten Genospezies stammten jeweils aus einer infizierten *I. ricinus*-Nymphe aus der Natur. Um monoinfizierte Zeckenchargen zu erhalten, wurden im Freiland gesammelte wirtssuchende Nymphen einzeln an geeignete Wirte angesetzt. Zwei Wochen später dienten diese Tiere als Wirte für spirochäten-negative Larven. Der Inhalt des Mitteldarmes der resultierenden Nymphen wurde mittels Dunkelfeldmikroskopie auf Spirochäten untersucht. Bei einem Teil der Zecken wurden Monoinfektionen von *B. burgdorferi* s.l. festgestellt und die einzelnen Genospezies per PCR und Sequenzierung wie unter 2.2.8 und 2.2.10 beschrieben identifiziert. An einen solchermaßen monoinfizierten Wirt wurden Larven angesetzt, die sich zu infizierten Nymphen häuteten und für die Versuche eingesetzt wurden. Die zur Infektion verwendeten Chargen von Nymphen wurden mittels Dunkelfeldmikroskopie auf ihre Infektionsrate untersucht. Die Chargen wurden mittels Sequenzierung des OspA-Genfragmentes wiederholt auf die Genospezies- und Serotypen-Zugehörigkeit getestet.

2.2.14 Statistik

Die Auswertung erfolgte mit dem PC-Programm GraphPad InStat Version 3.01. Verwendung fanden dabei der χ^2 , Fisher's exact Test und Mann-Whitney Test unter der Annahme, dass keine Gaußsche Verteilung vorliegt.

2.2.15 Generelle Methoden und spezielles experimentelles Design

Die unter Material und Methoden beschriebenen Durchführungen gelten für alle Experimente. Bei spezifischen Abwandlungen für einzelne Untersuchungen werden diese des besseren Verständnisses wegen im jeweiligen Ergebnisteil aufgeführt.