
Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit
Fachbereich Veterinärmedizin
Freie Universität Berlin

Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Charité
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

**INDUKTION VON MATRIXMETALLOPROTEINASEN UND
INTERLEUKIN-18 DURCH BORRELIA BURGDORFERI
IN VIVO UND IN VITRO**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Catrin Unsicker
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2002

Journal-Nr.: 2635

Gedruckt mit der Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. E. Schein

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. A. Krause

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. L. H. Wieler

Tag der Promotion: 11.07.2002

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Lyme-Borreliose	3
2.1.1	Übertragung und Epidemiologie	3
2.1.2	Klinik und Therapie beim Menschen	5
2.1.3	Lyme-Borreliose bei Haustieren	6
2.2	Biologie von <i>Borrelia burgdorferi</i>	8
2.2.1	Klassifikation	8
2.2.2	Morphologie	8
2.2.3	Genom	9
2.2.4	Kultivierung	10
2.2.5	Nachweismethoden	11
2.3	Interleukin-18	12
2.4	Metalloproteinasen	16
2.5	Interaktion zwischen Borrelien und Synoviozyten	18
2.5.1	Histologie der Synovialmembran	18
2.5.2	Pathogenetische Aspekte der Lyme-Borreliose	19
2.6	Ziel der Studie	21
3	MATERIAL UND METHODEN.....	22
3.1	Schematische Übersicht über den Arbeitsplan	22
3.2	Zell- und Borrelienkultur	23
3.2.1	Kulturmedien	23
3.2.2	Kulturelle Anzucht der Borrelienstämme	24
3.3	Versuchsansätze der dreidimensionalen Gewebekulturmodelle	25
3.3.1	Präparation von Gewebe	25
3.3.2	Infektion der Gewebeexplantate mit <i>Borrelia burgdorferi</i>	26

3.3.3	Einfrieren der Gewebeexplantate und Anfertigung von Kryoschnitten	27
3.4	Immunhistochemischer Nachweis von <i>Borrelia burgdorferi</i> in Gewebekulturen	27
3.5	Nachweis von Metalloproteinasen im Kulturüberstand mittels Zymographie	29
3.6	Nachweis von Interleukin-18, MMP-1, MMP-3 und TIMP-1 in Seren und in Kulturüberständen	33
3.7	Molekularbiologische Untersuchungen an Gewebeexplantaten	35
3.7.1	RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung	36
3.7.2	Reverse Transkription	38
3.7.3	Auswahl von Primern und deren Temperaturoptima mittels konventioneller PCR	38
3.7.4	Semiquantitative Realtime-detection-PCR	40
3.8	Herkunft der Patientenserum für die serologischen Untersuchungen	43
3.9	Statistische Methoden	44
4	ERGEBNISSE.....	45
4.1	Ergebnisse der <i>in vivo</i>-Versuche	45
4.1.1	IL-18 in Seren	45
4.1.2	MMP-1 und MMP-3 in Seren	46
4.1.3	TIMP-1 in Seren	48
4.2	Ergebnisse der <i>in vitro</i>-Versuche	49
4.2.1	Ergebnisse der Immunhistochemie	49
4.2.2	Ergebnisse von Messungen in Gewebekulturüberständen	52
4.2.2.1	IL-18 in Gewebekulturüberständen	52
4.2.2.2	MMP-1 und MMP-3 in Gewebekulturüberständen	54
4.2.2.3	TIMP-1 in Gewebekulturüberständen	58
4.2.3	Ergebnisse der Zymographie	60
4.2.4	Ergebnisse der Realtime-PCR	61
4.2.4.1	mRNA von TNF α und IL-1 β	61
4.2.4.2	mRNA von IL-18	62

4.2.4.3	mRNA von MMP-1, MMP-3, MMP-2 und MMP-9	63
5	DISKUSSION.....	66
5.1	Untersuchungen <i>in vivo</i>	68
5.2	Untersuchungen <i>in vitro</i>	70
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	78
7	SUMMARY.....	80
8	ANHANG.....	82
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	84

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BSK-Medium	Barbour-Stoenner-Kelly Medium
cDNA	komplementäre DNA
CSF	Colony stimulating factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
IL	Interleukin
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger RNA
NO	Stickstoffmonoxid
OA	Osteoarthritis
Osp	outer surface protein
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Realtime-PCR
TGF	Transformable growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor

LEBENS LAUF

Catrin Unsicker

Geboren	08. Februar 1974 in Kiel
Eltern	Prof. Dr. med. Klaus Unsicker, Prof. für Anatomie und Zellbiologie Dr. phil. Karin Unsicker geb. Dettmann
Anschrift	Ystader Straße 15 10437 Berlin Tel.: (030) 41 72 55 53
Schule	1980 – 1984 Theodor-Heuss-Schule Marburg (Grundschule) 1983 – 1984 Doyle Elementary School, San Diego/Californien 1985 – 1993 Martin-Luther-Schule Marburg (Gymnasium) 1993 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
Studium	1993 – 1999 Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover 1999 Approbation
Wissenschaftl. Arbeit	2000 – 2001 Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt- Universität zu Berlin
Verlagstätigkeit	ab 08.2001 Parey Buchverlag im Blackwell Verlag (Programmbeereich Veterinärmedizin)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung meiner Dissertation in irgendeiner Art und Weise behilflich waren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Krause für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Durch seine Ideen und Denkanstöße und sein stets offenes Ohr für Probleme jeglicher Art konnte ich die Arbeit Schritt für Schritt weiterbringen.

Herzlichen Dank an Herrn Professor Schein für die sofortige Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen.

Die fundierte Einarbeitung durch Olaf Fritze sowie die intensive Betreuung durch Frau Dr. Juliane Franz machten es mir möglich, die alltäglichen Schwierigkeiten zu überwinden. Auf ihren Rat konnte ich immer zurückgreifen. Vielen Dank, liebe Juliane, für die zahlreichen Motivationsschübe sowie die unermüdliche Hilfestellung „vor Ort“ und am Telefon! Danke auch an Dr. Susanne Priem sowie Diana Mielke und Anett Hinkel für ihre Hilfsbereitschaft im Labor.

Ganz besonders gedankt sei an dieser Stelle Frau Dr. Ute Ungethüm für die Betreuung des molekularbiologischen Arbeitsteiles.

Ich danke außerdem Herrn Professor Neidel dafür, dass er die Gewebeproben zur Verfügung stellte, Frau Professor Aberer für die Bereitstellung von Seren und Herrn Professor Jung für die Möglichkeit, in seinem Labor die Technik der Zymographie zu lernen und anzuwenden.

Und zum Schluß gilt mein Dank natürlich allen Doktoranden und Mitstreitern unseres Flures, besonders auch Udo, ohne die ich alle Kaffee- und Süßigkeitenpausen sowie Mensagänge alleine hätte machen müssen!

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, alle Hilfsmittel und Hilfen angegeben und auf dieser Grundlage die Arbeit selbständig verfaßt zu haben.

Die vorliegende Arbeit wurde in keinem anderen Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt.

Berlin, den