

2. Materialien und Methoden

Die verwendeten Chemikalien wurden in pro analysi-Qualität bzw. als Lösungsmittel für die HPLC bezogen (Fluka, Neu Ulm; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg).

Das Aqua dest. wurde mit dem MILLI-Q Ultra-pure water system (Millipore, Eschborn) entsalzt und gereinigt.

2.1. Kultivierung und Aufarbeitung von *B. burgdorferi* B31

2.1.1. Bakterienstämme

Folgende Erreger wurden in dieser Studie untersucht bzw. eingesetzt:

a) *B. burgdorferi sensu lato*

B. burgdorferi sensu stricto: Stamm B31 (amerikanischer Stamm)

b) *Treponema pallidum ssp. pallidum*

Stamm Nichols (Fa. BAG, Lich, Deutschland)

2.1.2. Kulturbedingungen

2.1.2.1. *B. burgdorferi* B31

Der *B. burgdorferi sensu stricto* Stamm B31 wird in modifiziertem BSK H Medium (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) 4 bis 5 Tage bei 33°C kultiviert [59-61] und einmal pro Woche passagiert. Zur Überprüfung der Vermehrung und Qualität der Borrelien wird täglich eine kleine Kulturprobe im Dunkelfeldmikroskop auf Anzahl und Beweglichkeit untersucht. Nach ca. 4 bis 5 Tagen haben sich die Borrelien in ausreichender Zahl vermehrt, so daß die Kultur geerntet werden kann. Hierzu wird das Bakterienmedium in einer Sorvall Superspeed RC 2-B Zentrifuge bei 12000 U/min und 4°C Kühlung für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakteriensediment (Pellet) dreimal in „phosphate-buffered saline“ (PBS, Phosphatpuffer, pH 7.2) gewaschen und anschließend in PBS aufgenommen. Die Proteinkonzentration der Borreliensuspension wird mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, USA) ermittelt und mit PBS auf 1 mg/ml eingestellt. Die Borreliensuspension wird portioniert und bei -20°C zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

1-fach konzentrierte PBS-Lösung (Phosphate buffered saline)	
- NaCl (Natriumchlorid, Merck)	15.2 g
- NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat, Merck) · 2 H ₂ O	1.25 g
- Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat, Merck) · 2 H ₂ O	5.7 g
In 2000 ml Aqua dest. Lösen und auf pH 7.2 einstellen	

2.1.2.2. *Treponema pallidum*

Treponema pallidum ssp. *pallidum* Stamm Nichols wurde freundlicherweise von der Firma BAG in Lich zur Verfügung gestellt.

Kurz, die Treponemen wurden in Kaninchenhoden inokuliert und kultiviert, am 10. bzw. 11. Tag post infectionem aus dem Hodengewebe extrahiert und über Differential- bzw. Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt.

2.2. Nachweis der Antigene von *B. burgdorferi* B31 und *Treponema pallidum* mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblotting (Western-Blot)

Zur Darstellung der Borrelien- bzw. Treponem-Antigene wird eine Gelelektrophorese (Sodium Dodecyl Sulfate (=Natriumdodecylsulfat)–Polyacrylamide Gelelectrophoresis = SDS-PAGE) durchgeführt.

2.2.1. Probenaufbereitung

2.2.1.1. *B. burgdorferi* B31

Bevor man die kultivierte *B. burgdorferi* B31-Suspension (B31-Suspension) in die SDS-PAGE einsetzen kann, muß diese zuerst solubilisiert werden. Hierzu wird in einem Reagenzglas 1 ml der B31-Suspension mit 150 µl reduzierender SDS-Lösung und 50 µl 1%iger Bromthymolblau-Lösung versetzt. Anschließend wird das Reagenzglas zum Mischen auf einen Rüttler gestellt und danach im Wasserbad vorsichtig aufgeköcht.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur kann die B31-Suspension in die SDS-PAGE eingesetzt werden. Die Solubilisierung mit der reduzierenden Lösung bewirkt Spaltung von Disulfidbrücken und Streckung von Polypeptiden und ermöglicht so die Auftrennung nach Molekulargewicht in der Gelelektrophorese. Das Bromthymolblau dient als Laufmarkierung. Die Elektrophorese wird beendet, sobald die Bromthymolblaufront das untere Ende des Trenngels erreicht hat.

Benötigte Materialien:	
Reduzierende SDS-Lösung (Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumdodecylsulfat)	
DTE (Dithioerythritol)	2 g
20% SDS-Lösung (20 g Natriumdodecylsulfat in 100 ml Aqua dest.)	10 ml
0.1 mmol PMSF (0.174 g Phenylmethansulfonylfluorid in 10 ml Isopropanol gelöst)	1 ml
1% Bromthymolblau-Lösung	
(1 g Bromthymolblau in 100 ml Laemmli-Puffer lösen (s. 2.2.1.c.))	

2.2.1.2 *T. pallidum*

Die gereinigte *Treponema pallidum*-Suspension wird unter Zugabe von 2% SDS zweimal kurz aufgekocht und nach Abkühlen mit 2% DTE und 4% Mercaptoethanol versetzt.

2.2.2. SDS-PAGE

In einer SDS-PAGE werden die Borrelien- bzw. Treponemenantigene nach Molekulargewicht aufgetrennt.

Hierzu wird ein 15%iges Polyacrylamidgel mit 2% SDS hergestellt. Die Auftrennung erfolgt in einem diskontinuierlichen Puffersystem, modifiziert nach Lämmli [67, 69].

Die Molekulargewichtsbestimmung der Proteinbanden erfolgte an Hand eines Standard-Protein-Gemisches (LMW-Calibration-Kit, Pharmacia), bestehend aus folgenden Referenzproteinen: Phosphorylase b (94 kD), Rinderserumalbumin (67 kD), Ovalbumin (43 kD), Carbon-Anhydrase (30 kD), Sojabohnen Trypsin Inhibitor (20.1 kD), Laktalbumin (14.4 kD).

2.2.2.1 Materialien

a) 15% Trenngel

Acrylamid/Bisacrylamid (42 g Acrylamid, 0.7 g Bisacrylamid in 100 ml 8 M Harnstoff unter Erwärmen lösen und filtrieren)	12 ml
2 M Tris-Puffer (2 M Trishydroxymethyl-aminomethan in 8 M Harnstoff unter Erwärmen lösen, mit rauchender HCL auf pH 8.9 einstellen)	8 ml
8 M Harnstoff in Aqua dest.	19 ml
20% SDS-Lösung (20 g Natriumdodecylsulfat in 100 ml Aqua dest.)	400 µl
TEMED (N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin)	40 µl
10%iges APS (100 mg Ammoniumperoxodisulfat in 1 ml 8 M Harnstoff)	250 µl

5% Sammelgel

Acrylamid/Bisacrylamid (50 g Acrylamid, 1.5 g Bisacrylamid in 100 ml 8 M Harnstoff unter Erwärmen lösen und filtrieren)	2 ml
2 M Tris-Puffer (2 M Trishydroxymethyl-aminomethan in 8 M Harnstoff unter Erwärmen lösen, mit rauchender HCL auf pH 8.9 einstellen)	2 ml
8 M Harnstoff in Aqua dest.	16 ml
20% SDS-Lösung (20 g Natriumdodecylsulfat in 100 ml Aqua dest.)	200 µl
TEMED (N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin)	20 µl
10% APS (100 mg Ammoniumperoxodisulfat in 1 ml 8 M Harnstoff)	150 µl

b) Laemmli-Puffer

Tris (Trishydroxymethyl-aminomethan)	121 g
Glycin	576 g
NaN ₃ (Natriumazid)	4 g
in 4000 ml Aqua dest. Lösen	

c) Anoden-Puffer

Laemmli-Puffer	1000 ml
Aqua dest.	4000 ml

d) Kathoden-Puffer

Laemmli-Puffer	270 ml
20% SDS-Lösung	23 ml
Aqua dest.	1125 ml

- e) Gelkammer, bestehend aus je zwei abgedichteten 12x20 cm großen Glasplatten (Desaga, Heidelberg, Deutschland)
- f) Elektrophoresegerät mit vertikaler Elektrophoresekammer für 2 Gele Modell Desaphor VA (Desaga) und Steuergerät Modell ECPS 3600/150 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- g) Pro Gel je 1 ml der solubilisierten *B. burgdorferi* B31-Suspension oder 1 ml *Treponema pallidum*-Suspension

2.2.2.2 Durchführung der SDS-PAGE

Die Gelkammer wird nach Anleitung des Herstellers (Desaga) aus zwei Glasplatten zusammengebaut und mit Aqua dest. auf Dichtigkeit überprüft.

Das 12.5%ige Trenngel wird wie beschrieben hergestellt (s. 2.2.1.a.) und blasenfrei bis 2.5 cm unterhalb des oberen Plattenrandes in jede Gelkammer eingefüllt. Die Polymerisation dauert etwa 30 Minuten. Um eine Austrocknung des Trenngeles zu vermeiden, wird das Trenngel mit 500 µl Aqua dest. überschichtet.

Nach der Polymerisierung des Trenngeles wird das Aqua dest. aus der Gelkammer abgossen und das 5%ige Sammelgel hergestellt (s. 2.1.1.b.).

Das Sammelgel wird bis 1 cm unterhalb des oberen Plattenrandes eingefüllt und erneut mit 500 µl Aqua dest. überschichtet. Die Polymerisierung dauert etwa 60 Minuten.

Der Anoden-Puffer (s. 2.2.1.d.) wird hergestellt und in die Elektrophoresekammer gegossen. Nach ausreichender Polymerisierung wird die Gelkammer in die Elektrophoresekammer

gehängt und der Kathoden-Puffer (s.2.2.1.e) in das Oberteil der Elektrophoresekammer gefüllt.

Anschließend wird die solubilisierte Antigen-Suspension gleichmäßig auf das Sammelgel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wird an das Steuergerät angeschlossen und die Elektrophorese gestartet. Die Elektrophorese wird bei einer Betriebsspannung von 30 V, einer Betriebsstromstärke von 62 mA, einer Betriebsleistung von 3 W und einer Kammertemperatur von 20 °C durchgeführt. Nach etwa 16 Stunden ist der Lauf beendet und die Bromthymolblaufront steht 0.5 cm oberhalb des unteren Gelrandes.

Die Gelkammer wird aus der Elektrophoresekammer herausgenommen und das Gel zur weiteren Verarbeitung vorsichtig aus der Gelkammer herausgeholt.

2.2.2.3. Färben und Entfärben der Gele

Zum Nachweis der Trennung wird an beiden Seiten ein 1 cm breites Gelstück abgeschnitten und für 2 Stunden in Coomassieblau Lösung (0.2% Coomassie R-250 in 50% Ethanol-10% Essigsäure) gefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgt 1-2 Stunden bei Raumtemperatur in Entfärber-Lösung und mehrere Stunden in 10% Essigsäure. Die Färbung zeigt bei erfolgreicher Trennung die verschiedenen Proteinbanden auf dem Gel an.

Das restliche Gel wird im nachfolgenden Immunoblotverfahren eingesetzt.

Entfärber-Lösung

- 50% Ethanol-10% Essigsäure in Aqua dest.

2.2.3. Immunoblotting (Western-Blotting)

Beim Westernblotting werden nach einer modifizierten Methode nach Towbin [68, 69] die aufgetrennten Antigene auf eine Immobilon-Membran (Millipore, Deutschland) übertragen und anschließend mit Patientenserum inkubiert und gefärbt.

2.2.3.1. Material

- a) Horizontal-Elektrophoresekammer Modell Multiphor II Nova Blot (Pharmacia)
- b) Immobilon P Transfermembran 0.45µm der Größe 12 x 20 cm (Millipore)
- c) Filterpapierzuschnitte der Größe 12.5 x 20 cm

Blot-Transferpuffer

0.05 M Tris	6 g
0.04 M Glycin	3 g
20% Methanol	200 ml
Die Substanzen werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst	

d) Blot-Blockierungspuffer

10%iges fetales Kälberserum (Sigma, Deisenhofen) in 0.1 M Ethylendiaminetetraacetic Acid (EDTA, Sigma) gelöst und auf pH 7.5 eingestellt

f) 1-fach konzentrierte PBS-Lösung (Phosphate buffered saline)

NaCl (Natriumchlorid)	15.2 g
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat) · 2 H ₂ O	1.25 g
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat) · 2 H ₂ O	5.7 g
In 2000 ml Aqua dest. lösen und auf pH 6.5 einstellen	

g) Blot-Waschpuffer

20 mM Tris	2.42 g
500 mM NaCl	29.2 g
In 1000 ml Aqua dest. lösen und auf pH 7.5 einstellen	

h) Amidoschwarz-Lösung

- 0.5% Amidoschwarz in Entfärber-Lösung

i) Entfärber-Lösung (s. 2.2.1.3)

j) Zweit-Antikörper

- Peroxidase-markierter Kaninchen Anti-Human-IgG bzw. Anti-Human-IgM Antikörper (Dako, Hamburg), jeweils spezifisch für Gamma bzw. Lambda-Ketten

Peroxidase-Lösung:

50 mM Natriumacetat	6.8 g
100% Essigsäure	1.8 ml
Die Substanzen werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst	

k) Entwickler-Lösung (Substrat)

- 100 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol werden in 12,5 ml Dimethylformamid gelöst, mit 250 ml Peroxidase-Puffer verdünnt und mit 125 µl 30% Wasserstoffperoxid versetzt. Die Entwickler-Lösung sollte stets frisch angesetzt werden.

2.2.3.2 Durchführung des Western-Blot-Verfahrens

Vorbereitend wird die Immobilonmembran (Millipore) für eine Minute in 100% Methanol eingelegt und für 15 Minuten in Aqua dest. gespült. Durch diese Maßnahme wird die hydrophobe Oberfläche der Immobilonmembran hydrophiler.

Anschließend werden pro Polyacryamidgel 2 x 9 Filterpapiere mit Blottransfer-Puffer angefeuchtet und jeweils 9 Filterpapiere blasenfrei in die Transferzelle des Blotgerätes gelegt. Auf die feuchte Filterpapierschicht wird nun blasenfrei die vorbereitete Immobilonmembran gelegt. Alle Luftblasen werden mit einer kleinen Walze ausgestrichen.

Danach werden auf die Immobilonmembran weitere 9 feuchte Filterpapiere gelegt und die Transferzelle geschlossen. Das Blotgerät wird an die Stromquelle angeschlossen und eingeschaltet. Der Blotvorgang dauert etwa 2 Stunden bei einer Betriebsstromstärke von 250 mA.

2.2.3.3. Proteinfärbung der Immobilonmembran

Nach dem Blotvorgang wird die Immobilonmembran zur Neutralisation für 60 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Zur Kontrolle des Antigentransfers auf das Immobilon wird ein Blot-Randstreifen 5 Minuten mit Amidoschwarz-Lösung gefärbt und anschließend 2 Minuten mit Entfärber-Lösung entfärbt.

Danach wird die restliche Immobilonmembran zur Blockierung freier Bindungsstellen für eine Stunde in Blot-Blockierungspuffer gelegt.

2.2.3.4 Immunfärbung der Immobilonmembran

Für die anschließende Immunfärbung wird die Immobilonmembran in 0.4 cm dünne Streifen geschnitten und in eine geeignete Waschschale mit Vertiefungen für die Blot-Streifen gelegt. Pro Untersuchung bzw. Patient werden zwei Streifen benötigt: ein Streifen zur Darstellung von IgM-Antikörpern, ein Streifen zur Darstellung von IgG-Antikörpern im Serum.

Die Streifen werden jeweils mit 5 ml Blot-Blockierungspuffer versetzt und die Waschschale für eine Stunde auf eine rotierende Tischschüttelmaschine (Braun, Deutschland) bei 80 Umdrehungen pro Minute gestellt.

Nach der Blockierung wird der Blot-Blockierungspuffer verworfen und die Streifen über Nacht auf der rotierenden Tischschüttelmaschine bei Raumtemperatur in jeweils 5.05 ml Patientenserum inkubiert (1:100, 50 µl Serum in 5 ml Blot-Blockierungspuffer).

Nach der Inkubation erfolgt dreimaliges Waschen der Streifen auf der rotierenden Tischschüttelmaschine mit jeweils 10 ml Blot-Waschpuffer für 10 Minuten.

Nach dem Waschen erfolgt die Inkubation der Streifen mit dem Zweitantikörper. Der verwendete Zweitantikörper ist jeweils ein Peroxidase-markiertes Kaninchen Anti-Human-IgG bzw. Anti-Human-IgM Immunglobulin (Dako, Hamburg), jeweils spezifisch für Gamma bzw. Lambda-Ketten.

Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:1000, 5 µl Zweitantikörper in 5 ml Blot-Blockierungspuffer) erfolgt für 1.5 Stunden auf der rotierenden Tischschüttelmaschine bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubation werden die Streifen erneut mit jeweils 10 ml Blot-Waschpuffer für 10 Minuten gewaschen und anschließend gefärbt.

Die Färbung erfolgt durch Hinzugabe von 5 ml Entwickler-Lösung je Streifen, es entstehen rot-braune Banden.

Sobald die Antigen-Banden gut sichtbar sind, wird die Färbung durch Waschen der Streifen mit Aqua dest. abgebrochen. Die nassen Streifen werden zwischen Filterpapieren getrocknet.

2.3. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

2.3.1 Material

B. burgdorferi Screen Elisa Kit (Viramed, Planegg, Deutschland) zum gemeinsamen Nachweis von IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern im Humanserum gegen Antigene von *B. burgdorferi*. Der Elisa enthält eine Gesamtantigen-Präparation mit allen diagnostisch relevanten Proteinen. Es sind bisher 14 verschiedene borrelien-spezifische Proteine beschrieben, die mit dem VIRAMED Elisa nachweisbar sind.

Da der Screen Elisa die obengenannten Antikörper in einem Ansatz erfaßt, ist er besonders gut als Screeningtest geeignet.

2.3.2 Durchführung des ELISA

Der *B. burgdorferi* Screen Elisa Kit (Viramed) wird nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (Serumverdünnung 1:100). Nach der Extinktionsmessung wird anhand der mituntersuchten Kalibratoren der Grenzwert berechnet. Der Grenzwert liegt normalerweise bei 1.0, die negative Kontrolle unterhalb des Grenzwertes (< 0.6) und die positive Kontrolle oberhalb des Grenzwertes (> 1.2). Proben, deren Extinktion bis zu 10% unter dem Grenzwert oder 10% über dem Grenzwert liegen, gelten als grenzwertig und werden erneut getestet oder im Western-Blot untersucht.

2.4. Patientenseren

Die Serum-Proben stammen aus dem *B. burgdorferi* Routine Diagnostik Labor der Medizinischen Mikrobiologie der Universität Giessen.

Alle eingesetzten Seren wurden zuvor im *B. burgdorferi* Screen Elisa Kit (2.2.3) und im Western-Blot getestet (2.2.2.2.). Um die verschiedenen Seren miteinander vergleichen zu können, wurden alle Seren auf eine IgG-Konzentration von 8 mg/ml eingestellt.

Folgende Seren wurden eingesetzt:

Anzahl der Seren	Serum-Nr.	Stadium	ELISA	Bemerkung
10	12706 12728 13050 13070 13077 13088 13093 13100 13104 13127	keine Borreliose	negativ, um < 0.6	gesunde Spender, keine spezifischen Banden im Immunoblot, Negativkontrolle
5	12495 12716 12635 13091 13211	Borreliose I	Grenzwertig, um 1	ECM, unspezifische Allgemeinsymptome, schwache spezifische Banden im IgM-Blot
10	10763 11204 11701 12339 12522 12681 12955 13005 13238 13341	Borreliose II	positiv, um 1.5	Meningoradikulitis, Arthritis; starke spezifische Proteinbanden und Lipidbande im IgM- und IgG-Blot,

Tab. 2 Getestete Patientenseren

Anzahl der Seren	Serum-Nr.	Stadium	ELISA	Bemerkung
10	6000 6922 10309 11629 12480 12902 12960 13123 13038 13082 13064	Borreliose III	positiv, um 1.3	Arthritis, ACA, Enzephalitis; mäßige Proteinbande und Lipidbande im IgM- Blot, starke Banden im IgG-Blot
7	12177 12548 12673 12685 13194 13212 13286	abgelaufene Borreliose, Serumnarbe	grenzwertig, um 0,9	Keine Krankheitszeichen, spezifische Proteinbanden und Lipidbande nur im IgG- Blot
10	9125 10077 10567 10720 11004 11122 11279 11621 11687 12068	Syphilis II und III	Negativ, um 0,5	Syphilitische Hauterkrankungen, Neurosyphilis; spezifische Banden im IgM- und IgG- Treponemen-Blot, schwache Darstellung uncharakteristischer Proteinbanden im Borrelien-Blot, keine Lipidbande

Tab. 2 Getestete Patientenseren (Fortsetzung)

2.5. Lipid-Analyse der Lipid-Antigene von *B. burgdorferi* B31

Die Methoden der Lipidanalytik wurden modifiziert oder unverändert übernommen aus dem Manual von Kates [62].

2.5.1 Extraktion der Lipide

2.5.1.1 Material

- a) 10 ml der *B. burgdorferi* B31-Suspension (1 mg/ml)
- b) Chloroform-Methanol-Gemisch (CM 1:2, v/v)
- c) 15 ml Zentrifugenröhrchen aus Glas mit Glasstopfen
- d) 30 ml Zentrifugenröhrchen aus Glas mit Glasstopfen
- e) Rüttlergerät (Heidolph)
- f) Rotierende Tischschüttelmaschine (Braun)
- g) Zentrifuge Minifuge (Heraeus)
- h) Ultrazentrifuge Sorvall Superspeed RC 2-B mit SS-34 Rotor (Du Pont)
- i) Rotationsverdampfer (Heidolph)

2.5.1.2. Durchführung der Lipidextraktion nach Bligh & Dyer

Zur Extraktion der Borrelielipide werden 10 ml Borreliensuspension 10 Minuten bei 6000 u/min zentrifugiert, das Sediment in Aqua dest. resuspendiert und anschließend lyophilisiert. Nach Bestimmung des Trockengewichtes werden die Lipide nach einer modifizierten Methode nach Bligh & Dyer [63] extrahiert. Hierzu werden 10 mg der lyophilisierten Bakterien in 10 ml Aqua dest. suspendiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 15 Minuten bei 10000 U/min in der Ultrazentrifuge bei 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 1 ml Aqua dest. resuspendiert und in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 3.75 ml CM (1:2, v/v) überschichtet. Das Zentrifugenröhrchen wird mit einem Glasstopfen verschlossen und für 3 Minuten auf dem Rüttler intensiv geschüttelt. Anschließend erfolgt die Extraktion unter leichtem Schütteln auf dem Tischschüttelgerät (50 U/min) für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT). Nach der Extraktion wird die Suspension für 30 Minuten bei 6000 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand (Überstand 1) in ein zweites Gefäß pipettiert. Das Sediment wird erneut in 1 ml Aqua dest. aufgenommen, mit 3.75 ml CM (1:2, v/v) überschichtet und für 3 Min bei RT auf dem Rüttler geschüttelt. Danach wird wieder für 30 Minuten bei 6000 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand (Überstand 2) zu Überstand 1 gegeben. Die Überstände werden gemischt und in einem verschlossenen 30 ml Zentrifugenröhrchen aufbewahrt. Das Sediment wird in 1 ml PBS pH 6.5 suspendiert und in einem verschlossenen Reagenzglas zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Das Sediment dürfte nach der Lipidextraktion nur noch aus

proteinhaltigen *B. burgdorferi* B31-Antigenen bestehen. Zu den beiden Überständen werden jeweils 2.5 ml Chloroform und 2.5 ml Aqua dest. hinzugegeben. Nach kurzem Mischen, wird bei 6000 U/min für 30 Minuten und bei 4 °C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entsteht ein biphasisches System. Die obere hydrophile Phase besteht aus Methanol und Aqua dest. und den darin gelösten Bestandteilen (MP). Die untere lipophile Phase besteht aus Chloroform und den darin extrahierten Lipiden (CP). Beide Phasen werden vorsichtig abpipettiert, im Rotationsverdampfer abrotiert oder im Stickstoffstrom getrocknet und das Trockengewicht bestimmt. Nach Bestimmung des Trockengewichtes erfolgt die Entsalzung der Lipide der unteren lipophilen Phase.

2.5.2. Entsalzung von Lipiden mittels Reversed-phase Kartuschen Chromatographie

Zur Entsalzung und Reinigung der Lipide werden Chromabond C18ec Kartuschen (Macherey&Nagel) mit 500 mg Säulenmaterial verwendet [65]. Zunächst müssen die Säulen mit 10 ml Methanol, 10 ml CM (2:1, v/v) und erneut mit 10 ml Methanol gewaschen werden. Danach erfolgt die Äquilibration der Säulen mit 10 ml Chloroform/Methanol/wässrige 0.1 M KCl (3:98:74, v/v/v). Die Proben werden in 5 ml TUP (Theoretical Upper Phase, Chloroform/Methanol/wässrige 0.1 M KCl (3:98:74, v/v/v) aufgenommen, kurz mit Ultraschall behandelt und auf die Säule aufgetragen. Das Probengefäß wird mit 5 ml TUP nachgewaschen. Die Säulen werden dann mit 10 ml TUP und 15 ml Aqua dest. gewaschen. Die Elution der Lipidfraktion erfolgt mit 15 ml CM (2:1, v/v). Die Lipidfraktion wird im Stickstoffstrom getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

2.5.3. Trennung der Gesamtlipide an Aminopropylsäulen

Für die Trennung der Gesamtlipide werden Aminopropyl (NH₂-Isolute)-Säulen (ICT, Bad Homburg) mit 100 mg Säulenmaterial verwendet [66]. Die Säulen werden mit 4 ml n-Hexan äquilibriert und die Probe in 0.5 ml Chloroform aufgegeben. Die Elution der Tri-, Di-, Monoglyceride und Cholesterol erfolgt mit 4 ml Chloroform/Propanol (2:1, v/v), die Elution der freien Fettsäuren mit 4 ml 2%iger Essigsäure in Diethylether und die Elution der Glyko- und Phospholipide mit 4 ml Methanol. Alle Elutionen werden im Stickstoffstrom getrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

2.5.4. Dünnschichtchromatographie

Die Lipidfraktionen werden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Hierzu werden High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)-Platten (10x20 cm, Kieselgel 60, Merck) verwendet. Die Proben werden in CM (2:1, v/v) aufgenommen (etwa 6-8 µg/µl) und in 7 mm breiten Spuren im Luftstrom eines Ventilators aufgetragen. Der Abstand zwischen den Spuren

beträgt 5 mm und an den Seiten 1.5 cm. Nach dem Auftragen wird die HPTLC-Platte 10 Minuten im Ventilator-Luftstrom getrocknet. Die Chromatographie der Platten erfolgt in geschlossenem Glaskontainer (35x25x12 cm, Desaga) bei 12°C. Das Laufmittel wird vorbereitet und in den Glaskontainer eingefüllt. Die HPTLC-Platte wird in den Gasraum gehängt und der Gasraum und die HPTLC-Platte mit dem Laufmittel äquilibriert. Beschleunigt wird die Äquilibrierung durch einen Ventilator im Deckel des Glaskontainers. Nach 15 Minuten wird die HPTLC-Platte in das Laufmittel abgesenkt und die Chromatographie gestartet. Nach etwa 50 Minuten und einer Laufstrecke von 8 cm wird die Chromatographie beendet. Die HPTLC-Platte wird herausgenommen und im Ventilator-Luftstrom getrocknet. Danach folgt die chemische oder immunologische Analyse der aufgetrennten Lipidfraktionen. Die aufgetrennten Fraktionen werden nachfolgend als Bolip (Borreliallipid) bezeichnet.

2.5.4.1 Eindimensionale Dünnschichtchromatographie

Da die Zusammensetzung der Borreliallipide unbekannt war, wurden folgende Laufmittel getestet, um die beste Auftrennung der Fraktionen zu erzielen:

- a) Chloroform/Methanol/Wasser (CMW, 65:35:5, v/v/v)
- b) Diisobutylketon/Essigsäure/Wasser (DEW, 40:25:5, v/v/v)
- c) Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser (CMEW, 25:15:4:2, v/v/v/v)
- d) Chloroform/Methanol/Aceton/Essigsäure/Wasser (CMAEW, 65:10:20:10:3, v/v/v/v/v)

2.5.4.2 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie wird eingesetzt, um Glyko- und Phospholipide aufzutrennen. Hierzu wird auf 10x10 cm HPTLC-Platten mit CMW (65:15:2, v/v/v) eindimensional chromatographiert und die Platte gut im Ventilator-Luftstrom getrocknet. Danach wird die HPTLC-Platte um 90° gedreht und mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) chromatographiert.

2.5.5. Chemische Färbungsmethoden

a) Jodfärbung

Mit der Jod-Färbung lassen sich Lipide unspezifisch und zerstörungsfrei detektieren. Hierzu stellt man die HPTLC-Platte für 5-10 Minuten in einen Glaskontainer mit gesättigter Jod-Atmosphäre, die Lipidbanden zeigen dabei eine deutliche reversible Gelbfärbung. Nach Detektion bzw. Dokumentation der Banden lässt sich das Jod unter einem Ventilator-Luftstrom wieder entfernen.

a) Orcinol/H₂SO₄-Färbung

Mit Orcinol lassen sich Kohlenhydratstrukturen anhand ihrer blauviolettten Färbung gut darstellen. Hierzu werden die trockenen HPTLC-Platten mit einer Lösung von Orcinol (Sigma) in 2 M Schwefelsäure (0.2 g Orcinol/100 ml 2 M H₂SO₄) eingesprüht. Danach werden die HPTLC-Platten für 10-15 Minuten bei 110°C entwickelt. Durch die Färbung werden die Lipide zerstört.

b) Ninhydrin-Färbung

Mit dem Ninhydrin-Reagenz lassen sich primäre Aminogruppen durch eine rotviolette Färbung detektieren. Das Farbreagenz besteht aus 3%iger Lösung von Ninhydrin (Merck) in n-Butanol (Roth), welches 3% Essigsäure (Merck) enthält. Die HPTLC-Platte wird intensiv mit dem Reagenz besprüht und zur Detektion bei 110°C entwickelt. Die Färbung ist nur kurz haltbar.

c) Phosphat-Färbung

Mit der Phosphat-Färbung nach Dittmer und Lester [71] läßt sich organisch gebundenes Phosphat durch eine Blaufärbung darstellen. Hierzu werden zwei Stammlösungen hergestellt. Lösung A erhält man durch Lösen von 2 g MoO₃ (Sigma) in 50 ml 25 N H₂SO₄ und Lösung B durch Lösen von 0.178 g Mo (Sigma) in Lösung A. Die Sprühreagenz erhält man durch Mischen der beiden Lösungen und Hinzugabe von 100 ml Aqua dest.. Die HPTLC-Platten werden eingesprüht und bei Raumtemperatur getrocknet. Die phosphathaltigen Banden erscheinen blau. Die Färbung ist begrenzt haltbar.

d) Ammoniumsulfat-Veraschung

Mit diesem Verfahren kann man die Lipidbanden quantifizieren. Die Lipide werden mit 20% Ammoniumsulfat (NH₄)₂SO₄ behandelt und durch Erhitzung auf 200°C für 30 Minuten verascht. Nach der Veraschung werden die relativen Lipidanteile densitometrisch bestimmt. Die Veraschung ist irreversibel und zerstört die Lipide.

2.5.6. Immunologische Färbung

Analog zum Western-Blotting können Immunfärbungen auch direkt auf der HPTLC-Platte durchgeführt werden [72]. Hierzu werden die Lipide auf der HPTLC-Platte nach der Chromatographie gut im Ventilator-Luftstrom getrocknet und anschließend eine Minute mit 0.5%iger Polymethylacrylat-Lösung in n-Hexan (Röhm&Haas) fixiert. Die HPTLC-Platte wird bei Raumtemperatur getrocknet und 1 Stunde mit Blot-Blockierungspuffer (s.2.2.2.1.e)

bei 4°C inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Blockieren wird die HPTLC-Platte 2 Stunden mit Patientenserum (verdünnt 1:100 in Blot-Blockierungspuffer) bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch zehnmaliges Waschen mit je 5 ml PBS, pH 7.2 (s. 2.1.2.1.) entfernt. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Peroxidase-markierten Kaninchen Anti-Human IgG Antikörper (s. 2.2.2.1.j., verdünnt 1:1000 in Blot-Blockierungspuffer) für 2 Stunden bei 4°C. Die HPTLC-Platte wird erneut 10 mal mit je 5 ml PBS gewaschen, um nicht gebundene Zweit-Antikörper zu eliminieren. Anschließend erfolgt die Darstellung der Banden mit der Entwickler-Lösung (Substrat, s.2.2.2.1.1.) bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Die Färbung dauert 10-20 Minuten und wird durch Waschen mit PBS gestoppt. Die Platte wird getrocknet, dokumentiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.5.7 SDS-PAGE und Western-Blotting der Lipide

2.5.7.1. SDS-PAGE und Western-Blotting der extrahierten Lipide

Zur Untersuchung des immunologischen Verhaltens der Lipide nach Extraktion wird eine SDS-PAGE und ein Western-Blotting mit dem Gesamtlipid als Antigen durchgeführt. Hierzu wird nach Extraktion der Gesamtlipide nach Bligh & Dyer (s. 2.5.1.2.) die hydrophile (Proteine) und die lipophile Phase (Lipide) im Stickstoff-Strom getrocknet, das Trockengewicht der jeweiligen Phase bestimmt und die Trockensubstanzen mit der reduzierenden SDS-Lösung (s. 2.2.1.1.) solubilisiert. Die solubilisierten Substanzen werden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die SDS-PAGE wie beschrieben durchgeführt (s. 2.2.2.2.). Nach der SDS-PAGE wird wie beschrieben ein Western-Blotting durchgeführt (s. 2.2.3.2.), als Kontroll-Serum wird Serum von Patienten mit Borreliose Stadium II eingesetzt (s. 2.4.). Der Western-Blot der hydrophilen Phase dürfte nur die Protein-Antigene von *B. burgdorferi B31* anzeigen, während der Western-Blot der lipophilen Phase nur die Lipid-Antigene (< 10 kD) anzeigen dürfte.

2.5.7.2. SDS-PAGE und Western-Blotting der chromatographierten Lipid-Fractionen

Zur Feststellung des immunologischen Verhaltens der einzelnen Lipidfraktionen wird nach chromatographischer Auftrennung eine SDS-PAGE und ein Western-Blotting mit den einzelnen Lipidfraktionen als Antigen durchgeführt.

Nach einer präoperativen Dünnschicht-Chromatographie der Gesamtlipide (s. 2.5.4.) werden die individuellen Lipidbanden mit der reversiblen Jodfärbung dargestellt (s. 2.5.5.) und mit einem Skalpell auf der HPTLC-Platte markiert. Nach Entfernung des Jodes im Ventilator-Luftstrom werden die markierten Kieselgel-Areale von der Platte gekratzt und die Lipide mit CM (2:1, v/v) aus dem Kieselgel eluiert. Das Eluat wird im Stickstoff-Strom getrocknet und

das Trockengewicht bestimmt. Die Trockensubstanz wird mit der reduzierenden SDS-Lösung (s. 2.2.1.1.) solubilisiert und auf ein Polyacrylamid-Gel mit Slots aufgetragen. Hierzu wird eine Gelkammer aus zwei Glasplatten (Desaga) zusammengebaut und mit Aqua dest. auf Dichtigkeit überprüft (s. 2.2.2.2.). Danach wird das 12.5%ige Trenngel in die Gelkammer bis 2.5 cm unterhalb des oberen Plattenrandes gefüllt und mit 500 µl Aqua dest. überschichtet. Nach 40 Minuten Polymerisation wird das Aqua dest. verworfen und das 5%ige Sammelgel bis zum Plattenrand eingefüllt. Ein vorbereiteter Elektrophoresekamm mit 10 Slots (Größe der Slots: 0.7x1.5 cm; Volumen pro Slots: 200 µl) wird in das noch flüssige Sammelgel gehängt, um 10 separate Öffnungen im Sammelgel herzustellen. Nach etwa 4 Stunden ist das Sammelgel polymerisiert und der Elektrophoresekamm kann vorsichtig aus dem Sammelgel herausgezogen werden. Die Elektrophoresekammer wird mit Anodenpuffer gefüllt und die Gelkammer in die Elektrophoresekammer eingehängt. Der Kathodenpuffer wird in das Oberteil der Elektrophoresekammer eingefüllt und 100 µl der einzelnen solubilierten Lipidfraktionen in jeweils ein Slot der Gelkammer pipettiert. Danach wird die Elektrophoresekammer an die Stromquelle angeschlossen und die Elektrophorese gestartet. Die SDS-PAGE wird standardmäßig durchgeführt (s. 2.2.2.2.). Nach der SDS-PAGE wird wie beschrieben ein Western-Blotting durchgeführt (s. 2.2.3.2.), als Kontroll-Serum wird wieder Serum von Patienten mit Borreliose Stadium II eingesetzt (s. 2.4.).

2.5.8. Bestimmung der relativen Lipidanteile

Um die relativen Lipidanteile bestimmen zu können, wurden die aufgetrennten Lipide auf der chromatographierten HPTLC-Platte mit 20%iger Ammoniumsulfat-Lösung besprüht und 30 Minuten lang bei 200°C verascht. Dabei entspricht der Grad der Veraschung dem Lipidanteil der Bande. Nach der Veraschung wird die HPTLC-Platte in ein HPTLC-Platten Scanner (Camag, Muttenz, Schweiz) gelegt und die Absorption der individuellen Lipidbanden bei 450 nm densitometrisch gemessen.

2.5.9. Dünnschichtchromatographie der Lipidbande nach Extraktion aus dem Polyacrylamid-Gel

Um das chromatographische Verhalten der Lipidbande aus dem Polyacrylamid-Gel (s. 2.2.2.2.ff) untersuchen zu können und mit dem chromatographischen Verhalten der extrahierten Lipide (s. 2.5.1.1.ff) vergleichen zu können, wird die Lipidbande an der Lauffront des Bromphenolblau (< 10 kD) aus dem Gel excisiert und die Lipide mit CM (2:1, v/v) aus dem Gel eluiert. Das Eluat wird im Stickstoff-Strom getrocknet, das Trockengewicht bestimmt und die Trockensubstanz in CM (2:1, v/v; etwa 6-8 µl/ml) aufgenommen. Diese Probe wird auf eine HPTLC-Platte im Ventilator-Luftstrom aufgetragen und wie beschrieben mit CMAEW

(65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) als Laufmittel chromatographiert (s. 2.5.4.1.). Nach der Auftrennung wird das chemische Verhalten der Lipidfraktionen überprüft und dokumentiert (s. 2.5.5.).

2.6. Strukturanalyse der Glykolipide

Die gesamte Strukturanalytik der Kohlenhydrate der Lipide von *B. burgdorferi* B31 wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Geyer, unter Anleitung von Herrn Dr. Günter Lochnit, im Biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität zu Giessen durchgeführt.

2.6.1. Bausteinanalyse der Kohlenhydrate

Die Analyse der Kohlenhydratstrukturen im Gesamtlipid von *B. burgdorferi* erfolgt analog zu den Methylierungsanalysen (s. 2.6.2.). Dabei wird das Gesamtlipid zunächst hydrolysiert, reduziert und peracetyliert. Die erhaltenen Alditol-Acetate werden durch Gaschromatographie analysiert. Die Trennung erfolgt dabei in einer Quarz-Kapillarsäule mit chemisch gebundener Phase (DB-1 Säule, 0.25 mm ID, 60 m). Für die Detektion der Kohlenhydrate wird ein Flammenionisationsdetektor eingesetzt. Die Identifizierung der Kohlenhydrate erfolgt anhand der Retentionszeiten der Alditol-Acetate [73].

2.6.2. Methylierungsanalyse

Methylierungsanalysen liefern Informationen über die Substitution der einzelnen Zuckerkomponenten eines Oligosaccharids. Hierzu werden die Hydroxylgruppen der Oligosaccharide in Methoxylgruppen überführt und Acetamido-Reste ggf. n-methyliert. Nach Hydrolyse, Reduktion und Peracetylierung fallen dann partiell methylierte Alditol-Acetate an, die *O*-Acetylgruppen tragen. Diese Produkte können dann durch Kapillar-Gaschromatographie unter Verwendung von Säulen unterschiedlicher Polarität anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert werden. Die Detektion erfolgt dann durch Massenfragmentographie nach chemischer Ionisation mit Ammoniak [73, 74, 75].

2.6.2.1. Permethylierung

Die extrahierten Glykolipide werden in Mikroreaktionsgefäße (300 µl, Zinser) überführt und lyophilisiert. Durch ein Septum wird zu den verschlossenen Proben wasserfreies Dimethylsulfoxid (Merck) gegeben und die Proben darin 90 Minuten im Ultraschallbad bei Raumtemperatur gelöst. Nach Zugabe von 50 µl Lithium-Dimethylsulfinylat-Lösung (2 M Butyllithium in Dimethylsulfoxid) und 90 Minuten Inkubation im Ultraschallbad bei Raumtemperatur werden die Proben auf -20°C abgekühlt. Die Permethylierung erfolgt durch Zugabe von 50 µl frisch destilliertem Methyljodid und 90 Minuten Inkubation bei

Raumtemperatur im Ultraschallbad [73-75, 100]. Danach werden die Proben mit 150 μ l Aqua dest. versetzt und auf Chromabond C18ec-Säulen aufgegeben (s. 2.5.2.), welche zuvor mit 5 ml Aqua dest., 5 ml Acetonitril, 5 ml Methanol und erneut 10 ml Aqua dest. äquilibriert worden war. Anschließend werden die Säulen mit 5 ml Aqua dest., 2 ml 15% Acetonitril, 2 ml 30% Acetonitril, 2 ml 100% Acetonitril und je 2 ml Chloroform und Methanol gespült, wobei die Glykolipide mit Chloroform und Methanol eluierten. Die Proben werden in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.6.2.2. Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung

Um die Methylzucker freizusetzen, werden die permethylierten Oligosaccharide durch Zugabe von 500 μ l 0.25 M Schwefelsäure in 85%iger Essigsäure (beide Merck) 16 Stunden bei 80°C hydrolysiert. Die Ansätze werden mit 550 μ l 0.5 M Natronlauge (Merck) versetzt, in einer Vakuumzentrifuge bei 20°C getrocknet und zur Entfernung der restlichen Essigsäure noch zweimal in 500 μ l Aqua dest. aufgenommen und wieder eingedampft. Die so freigesetzten Methylzucker werden mit NaBH₄-Lösung (Natriumborhydrid) reduziert. Hierzu werden die Proben in 500 μ l NaBH₄-Lösung (300 mM) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Nach Zugabe von 150 μ l 1 M Essigsäure werden die Ansätze in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Entfernung der Borsäure werden die Proben 3 mal jeweils in 2 ml Methanol (mit 1% Essigsäure) aufgenommen und im Stickstoff-Strom getrocknet. Danach werden die Proben mit 400 μ l Acetanhydrid und 400 μ l Pyridin versetzt, über Nacht bei Raumtemperatur belassen, und anschließend im Stickstoff-Strom getrocknet. Die partiell methylierten Alditolacetate werden in 4 ml Dichlormethan aufgenommen und viermal mit 1 ml Aqua dest. gewaschen, wobei die wässrige Phase jeweils verworfen wird. Die organische Phase wird im Stickstoff-Strom getrocknet und in 50 μ l Dichlormethan aufgenommen.

2.6.2.3. Kombinierte Gaschromatographie/Massenfragmentographie (GC/MS)

Zur Identifizierung der Methylzuckerderivate werden die partiell methylierten Alditolacetate durch kombinierte Gaschromatographie/Massenfragmentographie (GC/MS) nach chemischer Ionisation mit Ammoniak anhand ihrer Pseudomolekülonen ($[M+NH_4]^+$ und $[M+H]^+$) nachgewiesen und quantifiziert. Die Identifizierung erfolgt mit Hilfe von Standards anhand ihrer Retentionszeiten. Als GC/MS-Gerät wird das Modell 4021 der Firma Finnigan MAT benutzt. Die Trennungen erfolgen unter Verwendung von Quarz-Kapillarsäulen mit chemisch gebundenen Phasen (DB1: 60 m, DB210: 30 m; ICT). Als Trägergas wurde Helium mit einem Druck von 30 kPa eingesetzt. Die Verdampfung erfolgt bei 260°C, wobei die Temperaturgradienten wie folgt sind: DB1: 1.2°C/min steigend von 130-200°C und dann

5°C/min steigend bis 250°C; DB210: 1.5°C/min steigend von 130-250°C. Die Pseudomolekülonen werden durch Einzelionenmessung erfaßt.

2.6.3. Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie (LSIMS)

Bei der Liquid-Secondary-Ion-Mass-Spectrometry (LSIMS) werden Ionen aus der Gasphase ohne vorherige thermische Verdampfung der Probe erzeugt. Zunächst wird ein beschleunigter Strahl von Ionen auf eine die Probe enthaltende visköse Matrix gerichtet. Dabei werden durch die Kollision Moleküle der Matrix und der Probe in das Hochvakuum der Ionenquelle überführt und ein Teil dieser Moleküle ionisiert. Abhängig von der chemischen Zusammensetzung der Probe und der Matrix entstehen Pseudomolekülonen des Typs: $[M+H]^+$, $[M+Kation]^+$, $[M-H]^-$ und $[M+Anion]^-$. Die entstehenden Spektren zeigen dabei pseudomolekulare Ionen von Matrix und Probe und auch ein chemisches Rauschen. Die Hintergrundionen werden sowohl von Matrix als auch von Probe geliefert. Um die Interpretation der Spektren zu erleichtern und die Empfindlichkeit zu erhöhen, werden die Proben im derivatisierten Zustand untersucht (z.B. Permethylierung von Glykolipiden). Permethylierte Proben fragmentieren sehr selektiv und limitiert und liefern somit Ionen, die leicht zugeordnet werden können, bei nur geringer Zunahme der Molekülmasse.

Die Messungen werden an einem doppelfokussierenden Hochfeld-Massenspektrometer MAT 900 (Finnigan MAT) durchgeführt. Die nativen Phospholipide werden auf eine Matrix aus Triethanolamin (Merck) pipettiert und in das Hochvakuum der Ionenquelle überführt. Die Ionisierung erfolgt dabei durch einen mit 23kV beschleunigten Cäsiumionen-Strahl, bei einem Emmissionstrom von 2 bis 3 μ A und einer Beschleunigungsspannung von 5kV für Sekundärionen. Für den Nachweis der Ionen wird ein Sekundärionen-Vervielfacher eingesetzt. Das Magnetfeld wird so gesteuert, daß die Registrierung der Ionen mit einem exponentiellen Zeitverlauf (30 s/Dekade) oder einem linearen Zeitverlauf (30 s/1000 Masseneinheiten) bezüglich Masse/Zeit (m/z) erfolgt. Die Spektren der nativen Phospholipide werden im „positive-ion-mode“ ($[M+H]^+$ bzw. $[M+H+Na]^+$) aufgenommen.

2.6.4. Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF)

Mit der „Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight“ (MALDI-TOF) Massenspektrometrie kann man Lipide in geringsten Mengen untersuchen. Hierzu ist eine Derivatisierung der Proben nicht erforderlich, auch eine Mischung von Lipiden läßt sich mühelos untersuchen. Anhand der Spektren der Pseudomolekülonen $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ kann Rückschluß über die Molekülzusammensetzung gezogen werden.

Die Messungen werden an einem Vision 2000 (Finnigan MAT) im Linear- und Reflektorbetrieb durchgeführt. Die Ionen entstehen durch Beschuß mit einem Stickstofflaser der Wellenlänge 337 nm, wobei als Matrix Dihydroxybenzoesäure (DHB, 10 g/l in 0.1%iger wässriger Trifluoressigsäure; Sigma) verwendet wird. Zunächst wird 1 µl Matrix vorgelegt und die Glykolipide in 0.5 µl CMW (10:10:1, v/v/v) zugegeben. Nach Trocknen im kalten Luftstrom wird erneut 1 µl Matrixlösung aufgetragen und getrocknet. Die Massenkalisierung erfolgt anhand der $[M+H]^+$ -Ionen von Angiotensin (1296.7 Da, Sigma) und DHB (155 Da, Sigma). Es werden sowohl Einzelspektren als auch Summenspektren aufgenommen.

2.6.5. Bestimmung der anomeren Konfiguration der Glykolipide

Um die anomere Konfiguration des Kohlenhydratanteils des Glykolipids zu bestimmen (α oder β gebunden), werden die Glykolipide zunächst peracetyliert (s. 2.6.5.1.) und anschließend mit Chromtrioxid oxidiert und somit zerstört. Bei der anschließenden Bausteinanalyse kann dann anhand der GC/MS eine Veränderung des Kohlenhydrates nachgewiesen werden. Bei α -gebundenen Kohlenhydraten findet durch die Chromtrioxid-Oxidation kaum eine Zerstörung statt, während bei einer β -Verknüpfung der Zucker oxidiert wird und dies in der Bausteinanalyse festgestellt werden kann (s. 2.6.1.).

2.6.5.1. Peracetylierung

Die getrockneten Glykolipide werden mit 0.5 ml Essigsäure/Trifluoressigsäureanhydrid (1:2, v/v) aufgenommen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert [76]. Nach dem Trocknen im Stickstoff-Strom werden die Proben in 3 ml Chloroform aufgenommen und die organische Phase dreimal mit je 2 ml Aqua dest. gewaschen. Die peracetylierten Glykolipide werden im Stickstoff-Strom getrocknet.

2.6.5.2. Chromtrioxid-Oxidation

Die peracetylierten Proben werden in 100 µl Eisessig (Merck) aufgenommen, mit 10 mg Chromtrioxid (Merck) versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von je 300 µl Aqua dest. und Chloroform, wird die organische Phase dreimal mit je 300 µl Aqua dest. gewaschen und im Stickstoff-Strom getrocknet [77]. Anschließend erfolgt eine Bausteinanalyse mit nachfolgender GC/MS (2.6.1.ff).

2.6.6. Perjodat-Oxidation

Bei der Perjodat-Oxidation wird der Kohlenhydratanteil der Glykolipide oxidiert und kann bei einer nachfolgenden immunologischen Färbung nicht mehr von spezifischen Antikörpern

nachgewiesen werden. Die Perjodat-Oxidation wird auf HPTLC-Platten durchgeführt. Hierzu werden die Lipide von *B. burgdorferi* B31 zunächst dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (s. 2.5.4.) und die HPTLC-Platte mit 0.5%iger Polymethylacrylat-Lösung in n-Hexan (Röhm&Haas) fixiert. Nach Trocknen im kalten Luftstrom wird die Platte 10 Minuten mit 100 mM Natriumacetat (Merck) pH 5.5 inkubiert. Die Perjodat-Oxidation erfolgt dann mit 20 mM Natriummetaperjodat (Merck) in 100 mM Natriumacetat pH 5.5 für eine Stunde bei 37°C im Dunkeln. Die Oxidation wird gestoppt durch dreimaliges Waschen der Platte mit Natriumacetat-Lösung. Anschließend wird die HPTLC-Platte wie beschrieben immunologisch gefärbt (s. 2.5.6.). Vorausgesetzt die Antikörper gegen die Glykolipide binden spezifisch an die Galaktose, dürfte nach der Zerstörung der Galaktose durch die Perjodat-Oxidation keine spezifische Antikörperbindung an die Galaktose mehr stattfinden. Die immunologische Färbung müsste negativ ausfallen.

2.6.7. Fettsäure-Analyse

Um Fettsäure-Gemische gaschromatographisch trennen zu können, muß zunächst eine Derivatisierung der Carboxyl-Gruppe erfolgen. Dies geschieht durch Bildung von Fettsäuremethylestern. Die anschließende Strukturanalyse der Fettsäure-Derivate erfolgt mittels kombinierter Gaschromatographie/Massenspektrometrie. Strukturelle Informationen erhält man aus Spektren nach Elektronenstoßionisierung (EI), die Ionisierung erfolgt dabei durch einen Elektronenstrahl, wobei die Beschleunigungsenergie der Elektronen etwa 70 eV beträgt. Durch die Ionisierung entstehen Molekülonen $[M]^+$ und charakteristische Fragmentationen, die wichtige strukturelle Informationen liefern. Bei der Fettsäure-Analyse steht neben der Ermittlung von Molekülmassen auch die Lokalisation der Doppelbindungen, Hydroxyl- und Methylgruppen im Mittelpunkt.

2.6.7.1. Hydrolyse der Glykolipide nach Gaver und Sweeley

Die Hydrolyse dient der Freisetzung der Fettsäuren aus den Glykolipiden. Hierzu wird eine Glykolipid-Probe 16 Stunden in 0.5 ml frisch angesetzter Hydrolyse-Lösung (1 M HCl in Methanol, 10 M Aqua dest.) bei 100°C inkubiert [78]. Nach Beendigung der sauren Hydrolyse lassen sich die freigesetzten Fettsäuren durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml n-Hexan (Merck) extrahieren und im Stickstoff-Strom trocknen.

2.6.7.2. Herstellung von Methylestern

Die getrockneten Fettsäuren werden mit 100 µl BF_3 /Methanol Reagenz (Sigma) versetzt und 60 Minuten bei 60°C inkubiert.

2.6.7.3. Acetylierung von Hydroxyfettsäuremethylestern

Zur Acetylierung werden die Hydroxyfettsäuremethylester 16 Stunden mit 600 µl Pyridin/Essigsäureanhydrid (1:1, v/v) bei 25°C inkubiert und im Stickstoff-Strom getrocknet.

2.6.7.4. GC/MS der Fettsäuremethylester

Die Fettsäuremethylester lassen sich mit der kombinierten Gaschromatographie /Massenfragmentographie (GC/MS) nach chemischer Ionisation mit Ammoniak anhand ihrer Pseudomolekülonen $[M+NH_4]^+$ nachweisen und quantifizieren. Die Identifizierung erfolgt dabei anhand der Retentionszeiten von Standards. Als GC/MS-Gerät wird das Modell 4021 der Firma Finnigan MAT verwendet. Die Trennungen erfolgen an einer Quarz-Kapillarsäule mit chemisch gebundener Phase (OV-1701, 0.25 mm, 60 m; ICT). Die Temperatur der Kapillar-Säule wird von 80°C bis 320°C erhöht und 10 Minuten bei 320°C gehalten. Der Temperaturgradient beträgt 7°C/min. Die Ionisierung erfolgt bei einem NH_3 -Quellendruck von 33 Pa [75].

2.7. Dot-Blot-Analyse der *B. burgdorferi* B31-Phospholipide

In der Diagnostik der Syphilis dient der „Veneral Disease Research Laboratory“-Test (VDRL) der Verlaufskontrolle nach antibiotischer Therapie [209-213]. Als Antigen dient dabei Cardiolipin, welches mit Cholesterin und Phosphatidylcholin complexiert eine stärkere Antigenität zeigt als uncomplexiertes Cardiolipin. Analog zum VDRL-Test soll geprüft werden, ob eine Komplexierung der Borrelien-Phospholipide mit Cholesterin und Phosphatidylcholin eine Verstärkung der Antigenität zeigt. Hierzu werden die Phospholipide von *B. burgdorferi* B31 nach der Trennung mittels Dünnschichtchromatographie (s. 2.5.4.) von der HPTLC-Platte gekratzt und mit CM (2:1, v/v) eluiert. Nach dem Trocknen im Stickstoff-Strom werden die Phospholipide in Ethanol aufgenommen. Zusätzlich werden folgende Lösungen in Ethanol hergestellt:

- a) 0.09% Cholesterin (Sigma)
- b) 0.021% Phosphatidylcholin (Sigma)
- c) *B. burgdorferi* B31-Gesamtlipid
- d) 0.003% Cardiolipin (Sigma)
- e) 0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin
- f) 0.003% Phospholipid Bolip2
- g) 0.003% Phospholipid Bolip3
- h) 0.003% Bolip2 + 0.003% Bolip3
- i) 0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Bolip2

- j) 0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Bolip3
- k) 0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Bolip2 + 0.003% Bolip3
- l) 0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Cardiophilin

Für die Herstellung der Komplexe werden ethanolisches Cholesterin und Phosphatidylcholin zusammengemischt und die ethanolischen Borrelienphospholipide bzw. Cardiophilin vorsichtig in diese Lösung injiziert. Danach wird das Gemisch aus Cholesterin, Phosphatidylcholin und Phospholipiden in einem Rotationsverdampfer abrotiert und erneut in einer definierten Menge Ethanol aufgenommen. Für die Dot-Blot-Analyse werden auf einem Immobilon-Streifen jeweils 1 µl der dieser Lösungen pipettiert und im kalten Luftstrom getrocknet. Danach wird der Streifen zwei Stunden mit Blot-Blockierungspuffer (10%iges fetales Kälberserum in 0.1 M EDTA, pH 7.5, s.2.2.2.1.e) bei 4°C inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Blockieren wird der Immobilon-Streifen 2 Stunden mit Patientenserum (verdünnt 1:100 in Blot-Blockierungspuffer) bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch fünfmaliges Waschen mit je 5 ml PBS, pH 7.2 (s. 2.1.2.1.) entfernt. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Peroxidase-markierten Kaninchen Anti-Human IgG Antikörper (s. 2.2.2.1.j., verdünnt 1:1000 in Blot-Blockierungspuffer) für 2 Stunden bei 4°C. Nach der Inkubation mit dem Zweit-Antikörper wird erneut 5 mal mit je 5 ml PBS gewaschen, um nicht gebundene Zweit-Antikörper zu eliminieren. Anschließend erfolgt die Färbung mit der Entwickler-Lösung (Substrat, s.2.2.2.1.1.) bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Die Färbung dauert 10-20 Minuten und wird durch Waschen mit PBS gestoppt.