

Lipide von *Borrelia burgdorferi*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Mohammad Hamid Hossain
aus Karachi

Giessen 1999

Aus dem Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie

Institut für Medizinische Mikrobiologie

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. T. Chakraborty

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. med. H.-J. Wellensiek

Gutachter: Prof. Dr. med. C. Hornig

Tag der Disputation: 04. April 2000

Für meine Eltern

*Lernen ist wie Rudern
gegen den Strom,
sobald man aufhört,
treibt man zurück*

Laotse

Tagungsbeiträge

Hossain MH, Wellensiek HJ, Geyer R and Lochnit G.

Structural analysis of the lipids of *B. burgdorferi*.

2. Frankfurt/Giessen Borrelia Workshop Juni 1997, Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Frankfurt

Hossain MH, Wellensiek HJ, Geyer R and Lochnit G.

Lipids of *B. burgdorferi* – a structural and immunological analysis

IBC Int. Conference on Spirochete Diseases Oktober 1998 am M.I.T. in Cambridge (Boston, MA), USA

Hossain MH, Wellensiek HJ, Geyer R and Lochnit G.

Lipids of *B. burgdorferi* – a structural and immunological analysis

10th Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycokongjugaten in November 1998 in Nuland, Niederlande

Hossain MH, Wellensiek HJ, Geyer R and Lochnit G.

Lipids of *B. burgdorferi* – a structural and immunological analysis

5. Werkstattberichte aus Natur- und Lebensmittelwissenschaften
Justus-Liebig-Universität, Giessen, 1999

Publikation

Hossain MH, Wellensiek HJ, Geyer R and Lochnit G. Lipids of *B. burgdorferi*
(eingereicht)

Abkürzungen

ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
<i>B. burgdorferi</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CL	Cardiolipin
CM	Chloroform/Methanol
CMAEW	Chloroform/Methanol/Acetat/Essigsäure/Wasser
CME	Chloroform/Methanol/Essigsäure
CMW	Chloroform/Methanol/Wasser
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat
DC	Dünnschichtchromatographie
DEW	Diisobutylketon/Essigsäure/Wasser
ECM	Erythema chronicum migrans
Gal	D-Galaktose
GalCer	Galaktocerebrosid
GC	Gaschromatographie
GC/MS	kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GlcNAc	2-Acetamido-2-deoxy-D-Galaktose (N-Acetyl-Galaktosamin)
HPTLC	High-Performance-Liquid-Chromatographie
kDa	kilo Dalton
LCB	Lymphadenitis cutis benigna
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
LSIMS	Liquid-Secondary-Ion-Mass-Spectrometry
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight
MS	Massenspektrometrie
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin
RT	Raumtemperatur

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Historischer Überblick	1
1.2.	Der Erreger	2
1.2.1.	Morphologie und Taxonomie	2
1.2.2.	Übertragung	6
1.3.	Klinik der Lyme-Borreliose	9
1.4.	Diagnostik der Lyme-Borreliose	12
1.5.	Therapie der Lyme-Borreliose	13
1.6.	Pathogenitätsfaktoren von <i>B. burgdorferi</i>	14
1.7.	Membranlipide	15
1.7.1.	Phospholipide	16
1.7.1.1	Glycerophospholipide	16
1.7.1.2.	Sphingolipide	17
1.7.2.	Glycolipide	19
1.7.2.1.	Glyceroglycolipide	19
1.7.2.2.	Glycerosphingolipide	19
1.8.	Problemstellung	19
2.	Materialien und Methoden	22
2.1.	Kultivierung und Aufarbeitung von <i>B. burgdorferi</i> B31	22
2.1.1.	Bakterienstämme	22
2.1.2.	Kulturbedingungen	22
2.1.2.1.	<i>B. burgdorferi</i> B31	22
2.1.2.2.	<i>Treponema pallidum</i>	23
2.2.	Nachweis der Antigene von <i>B. burgdorferi</i> B31 und <i>Treponema pallidum</i> mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblotting (Western-Blot)	23
2.2.1.	Probenaufbereitung	23
2.2.1.1.	<i>B. burgdorferi</i> B31	23
2.2.1.2.	<i>T. pallidum</i>	24
2.2.2.	SDS-PAGE	24
2.2.2.1.	Materialien	24

2.2.2.2.	Durchführung der SDS-PAGE	25
2.2.2.3.	Färben und Entfärben der Gele	26
2.2.3.	Immunoblotting (Western-Blotting)	26
2.2.3.1	Material	26
2.2.3.2.	Durchführung des Western-Blot-Verfahrens	28
2.2.3.3.	Proteinfärbung der Immobilonmembran	28
2.2.3.4	Immunfärbung der Immobilonmembran	29
2.3.	ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)	29
2.3.1.	Material	29
2.3.2	Durchführung des ELISA	30
2.4.	Patientenseren	30
2.5.	Lipid-Analyse der Lipid-Antigene von <i>B. burgdorferi</i> B31	33
2.5.1	Extraktion der Lipide	33
2.5.1.1	Material	33
2.5.1.2.	Durchführung der Lipidextraktion nach Bligh & Dyer	33
2.5.2.	Entsalzung von Lipiden mittels Reversed-phase Kartuschen Chromatographie	34
2.5.3.	Trennung der Gesamtlipide an Aminopropylsäulen	34
2.5.4.	Dünnschichtchromatographie	34
2.5.4.1	Eindimensionale Dünnschichtchromatographie	35
2.5.4.2	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	35
2.5.5.	Chemische Färbungsmethoden	35
2.5.6.	Immunologische Färbung	36
2.5.7	SDS-PAGE und Western-Blotting der Lipide	37
2.5.7.1.	SDS-PAGE und Western-Blotting der extrahierten Lipide	37
2.5.7.2.	SDS-PAGE und Western-Blotting der chromatographierten Lipid-Fraktionen	37
2.5.8.	Bestimmung der relativen Lipidanteile	38
2.5.9.	Dünnschichtchromatographie der Lipidbande nach Extraktion aus dem Polyacrylamid-Gel	38
2.6.	Strukturanalyse der Glykolipide	39
2.6.1.	Bausteinanalyse der Kohlenhydrate	39
2.6.2.	Methylierungsanalyse	39
2.6.2.1.	Permethylierung	39
2.6.2.2.	Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung	40
2.6.2.3.	Kombinierte Gaschromatographie/Massenfragmentographie (GC/MS)	40
2.6.3.	Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie (LSIMS)	41

2.6.4.	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF)	41
2.6.5.	Bestimmung der anomeren Konfiguration der Glykolipide	42
2.6.5.1.	Peracetylierung	42
2.6.5.2.	Chromtrioxid-Oxidation	42
2.6.6.	Perjodat-Oxidation	42
2.6.7.	Fettsäure-Analyse	43
2.6.7.1.	Hydrolyse der Glykolipide nach Gaver und Sweeley	43
2.6.7.2.	Herstellung von Methylestern	43
2.6.7.3.	Acetylierung von Hydroxyfettsäuremethylestern	44
2.6.7.4.	GC/MS der Fettsäuremethylester	44
2.7.	Dot-Blot-Analyse der <i>B. burgdorferi</i> B31-Phospholipide	44
3.	Ergebnisse	46
3.1.	Nachweis der Antigene von <i>B. burgdorferi</i> mittels SDS-PAGE und Immunoblotting	46
3.2.	Isolierung der Lipide von <i>B. burgdorferi</i>	48
3.3.	SDS-PAGE und Immunoblotting der extrahierten Lipide	48
3.4.	Dünnschichtchromatographie der Lipide	49
3.5.	Chemische Färbung der Lipidfraktionen	50
3.6.	Immunologische Färbung	52
3.7.	SDS-PAGE und Western-Blotting der chromatographierten Lipid-Fraktionen	56
3.8.	Dünnschichtchromatographie der Lipidbande nach Extraktion aus dem Polyacrylamid-Gel	56
3.9.	Bestimmung der relativen Lipidanteile	58
3.10.	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	59
3.11.	Strukturanalyse der Glykolipide	59
3.11.1.	Kohlenhydratbausteinanalyse der Gesamtlipide von <i>B. burgdorferi</i>	59
3.11.2.	Methylierungsanalyse	60
3.11.3.	Bestimmung der anomeren Konfiguration des Kohlenhydratanteiles der Glykolipide	62
3.11.4.	Massenspektrometrie (MALDI-TOF) der Lipide von <i>B. burgdorferi</i>	62
3.11.4.	Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie (LSIMS) der Phospholipide	64
3.11.6.	Fettsäure-Analyse der Lipide von <i>B. burgdorferi</i>	65

3.12.	Darstellung der Immunogenität des Galaktose-Restes an den Glykolipiden Bolip 7 und 8 mittels Perjodat-Oxidation	67
3.13.	Darstellung der Antigenität der Phospholipide von <i>B. burgdorferi</i> durch Komplexierung mit Phosphatidylcholin und Cholesterin	68
4.	Diskussion	72
5.	Zusammenfassung	83
6.	Literatur	85