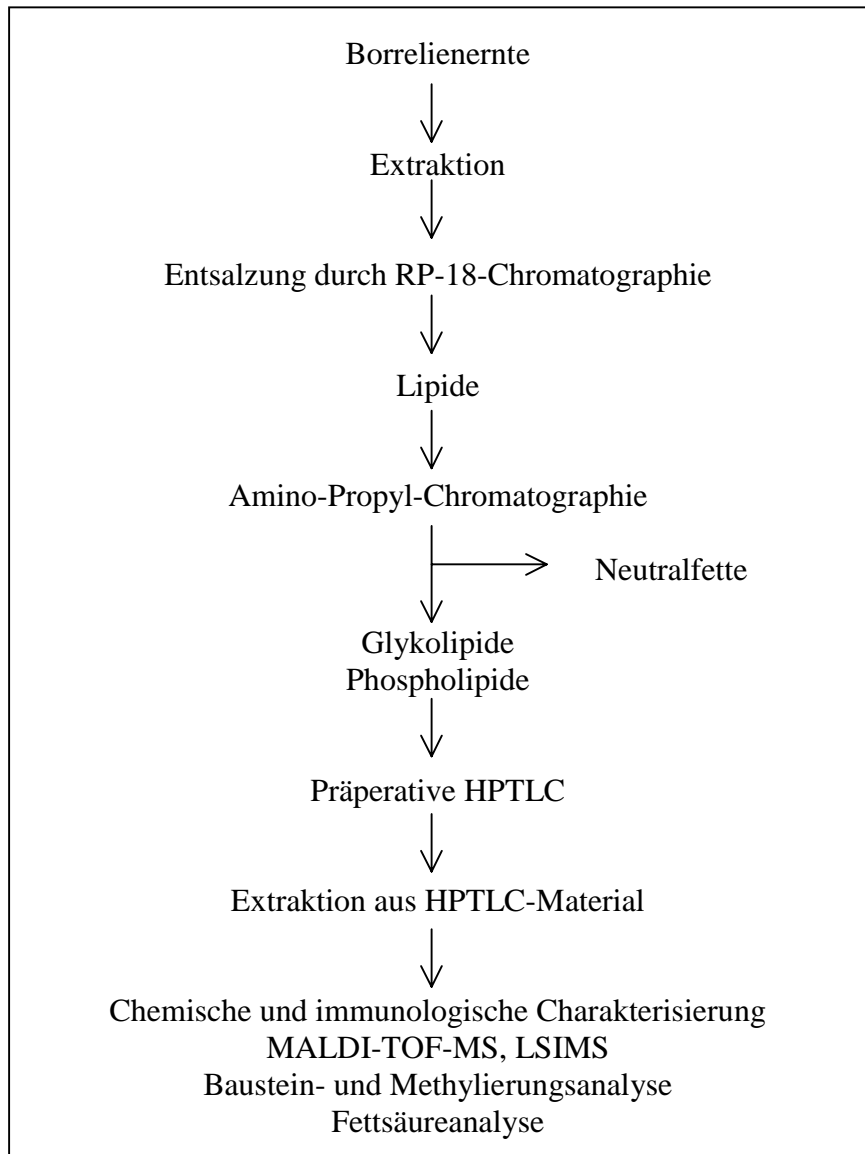


### 3. Ergebnisse

Die *B. burgdorferi* Proben wurden nach folgendem Schema analysiert (Abbildung 14):



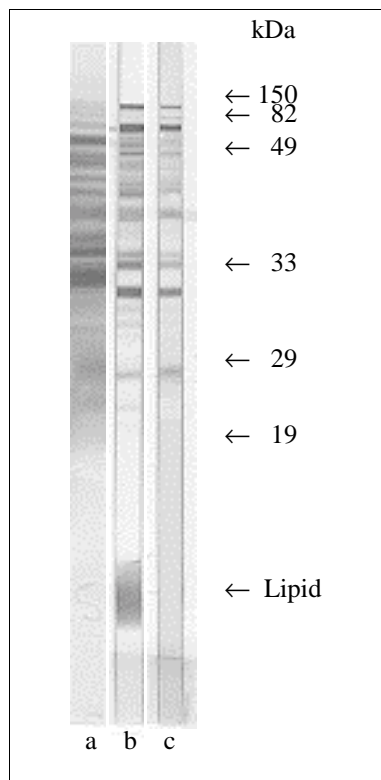
**Abb.14 Vorgehensweise bei der Analyse der Borrelienlipide**

#### 3.1. Nachweis der Antigene von *B. burgdorferi* mittels SDS-PAGE und Immunoblotting

Nach der Kultivierung und Ernte von *B. burgdorferi* B31, wurde die Bakteriensuspension lyophilisiert und das Trockengewicht bestimmt (s. 2.1.2.1.). Die Antigene von *B. burgdorferi* B31 wurden mittels SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennt (s. 2.2.2.2.), auf eine Membran übertragen (s.2.2.3.2.) und mit Proteinfarbstoffen gefärbt (2.2.3.3.). Anschließend erfolgte ein Immunoblotting mit Patientenserum (s. 2.2.3.4.).

Zur Darstellung der erfolgreichen Auftrennung in der SDS-PAGE wurde ein Gelstück mit Coomassie-Blau gefärbt. Mit Coomassie-Blau ließen sich die proteinhaltigen Partialantigene

von *B. burgdorferi* darstellen. Nach dem Transfer der Antigene auf eine Immobilonmembran, wurde ein Blotstreifen mit Amidoschwarz gefärbt. Dabei ließen sich erneut die Proteinantigene darstellen. Im anschließenden Immunoblotting mit Serum von Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium II (s. 2.4.) reagierten die Antikörper des Patienten mit einer Vielzahl von *B. burgdorferi*-Partialantigenen, vor allem mit den Proteinbanden, aber auch mit einer Bande bei  $< 10$  kDa. Die gebundenen humanen Antikörper wurden durch die Verwendung eines peroxidase-markierten Antihuman-IgG-Immunglobulins sichtbar gemacht. Die Bande bei  $< 10$  kDa lief oberhalb der Lauffront des Bromphenolblau und konnte nicht mit den Proteinfarbstoffen Coomassie-Blau und Amidoschwarz gefärbt werden (Abb. 15). Darstellbar war diese Bande nur im Immunoblot nach Inkubation mit Seren von Lyme-Borreliose Patienten. Anscheinend handelte es sich bei dieser Bande nicht um Proteinantigen, sondern um ein Lipidantigen. Dies belegte auch die Chloroform-Löslichkeit dieser Bande. Wurden die Blotstreifen nach dem Transfer (Blotting) mit Chloroform/Methanol (1:1, v/v) behandelt, war im anschließenden Immunoblotting die Lipidbande nicht mehr darstellbar, obwohl die Proteinbanden noch vorhanden waren (Abb. 15). Dieses Ergebnis sprach für ein Lipid und erhärtete den Verdacht, daß es sich bei der Bande um ein Lipidantigen handelt. Die Isolierung und Charakterisierung dieses Lipidantigens ist Hauptbestandteil dieser Studie.



**Abb. 15 Darstellung der Lipidbande im Blot**

Westernblot nach SDS-PAGE mit *B. burgdorferi*-Lysat als Antigen

a = Amidoschwarz    b = IgG-Blot vom Patienten mit Borreliose Stadium II vor Methanolbehandlung

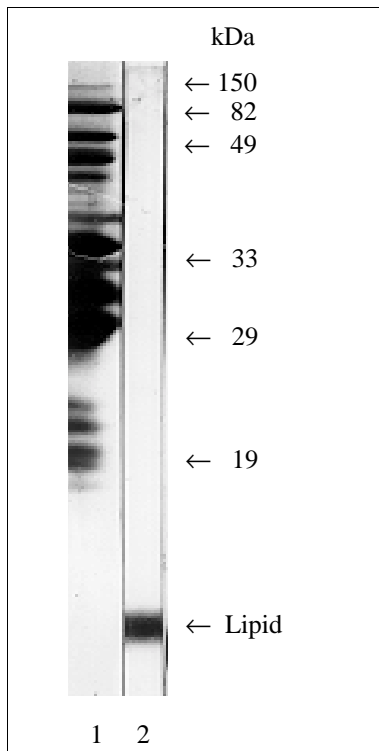
c = Gleicher Blot nach Methanolbehandlung; Proteinbanden sind noch vorhanden, Lipidbande ist verschwunden

### **3.2. Isolierung der Lipide von *B. burgdorferi***

Nach der Kultivierung und Ernte von *B. burgdorferi* B31 wurde die Bakteriensuspension lyophilisiert und das Trockengewicht bestimmt (s. 2.1.2.1.). Die Lipide wurden extrahiert nach einer modifizierten Methode nach Bligh&Dyer (s. 2.5.1.2.) [64]. Nach der Extraktion erhält man eine biphasische Lösung mit einer oberen hydrophilen Methanol-Wasser-Phase (MP) und einer unteren lipophilen Chloroform-Phase (CP). Beide Phasen wurden vorsichtig abpipettiert, im Rotationsverdampfer abrotiert und das Trockengewicht bestimmt. Die extrahierten Lipide der Chloroform-Phase betragen etwa 25 – 30% des gesamten Zelltrockengewichtes der Borrelien. Das ist ein hoher Lipidanteil im Vergleich zu anderen gramnegativen Bakterien.

### **3.3. SDS-PAGE und Immunoblotting der extrahierten Lipide**

Zur Untersuchung des immunologischen Verhaltens der Lipide nach Extraktion (s. 2.5.1.2.) wurde nach Extraktion die hydrophile Methanol-Phase (Proteine) und die lipophile Chloroform-Phase (Lipide) im Stickstoff-Strom getrocknet, das Trockengewicht der jeweiligen Phase bestimmt und die Trockensubstanzen als Antigene in die SDS-PAGE eingesetzt (s. 2.2.2.2.). Nach der SDS-PAGE wurde wie beschrieben ein Western-Blotting durchgeführt (s. 2.2.3.2.), als Kontroll-Serum wurde Serum von Patienten mit Borreliose Stadium II eingesetzt (s. 2.4.). Der Western-Blot der hydrophilen Methanol-Phase zeigte nur die Protein-Antigene von *B. burgdorferi* B31, das Lipidantigen wurde nicht dargestellt. Der Western-Blot der lipophilen Chloroform-Phase dagegen zeigte nur das Lipid-Antigene bei < 10 kDa, während die Proteine nicht dargestellt wurden. Dieses Ergebnis verdeutlicht einerseits die erfolgreiche und vollständige Extraktion der Lipide aus der Borreliensuspension und andererseits die unverändert vorhandene Immunogenität des Lipidantigens auch nach Chloroform-Methanol-Behandlung (Abb. 16).




**Abb. 16 Darstellung der Lipidbande im Blot nach erfolgreicher Lipidextraktion**

Westernblot nach SDS-PAGE mit *B.burgdorferi*-Lysat als Antigen und Serum Borreliose III

1= Methanol/Wasser-Phase 2= Chloroformphase

### 3.4. Dünnschichtchromatographie der Lipide

Vor der Dünnschichtchromatographie (s. 2.5.4.) wurden die Lipide mittels RP-Chromatographie entsalzt und aufgereinigt (s. 2.5.2.). Die gereinigten Lipide wurden in Linien auf die HPTLC-Platten aufgetragen und mit verschiedenen Laufmitteln chromatographiert (s. 2.5.4.1.). Die beste Auftrennung der Lipide gelang mit Chloroform/Methanol/Aceton/Essigsäure/Wasser (CMAEW, 65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) als Laufmittel. Die Chromatographie mit diesem Laufmittel ergab 11 verschiedene Fraktionen, die alle mit Jod anfärbbar waren. Die 11 Fraktionen wurden als Bolip 1 – 11 (Borrelienlipid 1 – 11) bezeichnet. Nach der Chromatographie wurde die relative Laufstrecke (RF-Wert) der 11 verschiedenen Fraktionen bestimmt (Abb. 17, Tabelle 2).

RF-Wert	Lipidbezeichnung		Lipidfraktionen Bolip
0.03	BOLIP 1		11
0.09	BOLIP 2		10
0.21	BOLIP 3		9
0.30	BOLIP 4		8
0.43	BOLIP 5		7
0.48	BOLIP 6		6
0.55	BOLIP 7		5
0.61	BOLIP 8		4
0.71	BOLIP 9		3
0.80	BOLIP 10		2
0.89	BOLIP 11		1

**Tab. 2 Relative Laufstrecken (RF-Werte) der Lipidfraktionen von *B. burgdorferi***

**Abb. 17 HPTLC der Borrelienlipide**

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde auf HPTLC-Platten aufgetragen und mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) entwickelt. Die Detektion erfolgte mit Joddampf

### 3.5. Chemische Färbung der Lipidfraktionen

#### a) Jod-Färbung

Zunächst wurde die chromatographierte HPTLC-Platte mit Jod gefärbt (s. 2.5.5.), dabei ließen sich 11 Banden darstellen. Die Jod-Färbung färbt Lipide unspezifisch und zerstörungsfrei an. Nach der Färbung läßt sich das Jod wieder mühelos unter einem Ventilator-Luftstrom entfernen und die HPTLC-Platte steht weiteren Färbungen zur Verfügung.

#### b) Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Färbung

Mit Orcinol-Färbung lassen sich Kohlenhydratstrukturen gut darstellen (s. 2.5.5.). Im Falle der chromatographierten Borrelienlipide ließen sich von den 11 Fraktionen nur 2 mit Orcinol darstellen, Bolip 7 und 8. Die restlichen Fraktionen zeigten keine Reaktion mit dem Orcinol, sodaß man behaupten kann, daß Bolip 7 und 8 die einzigen Glykolipide von *B. burgdorferi* sind.

### c) Ninhydrin-Färbung

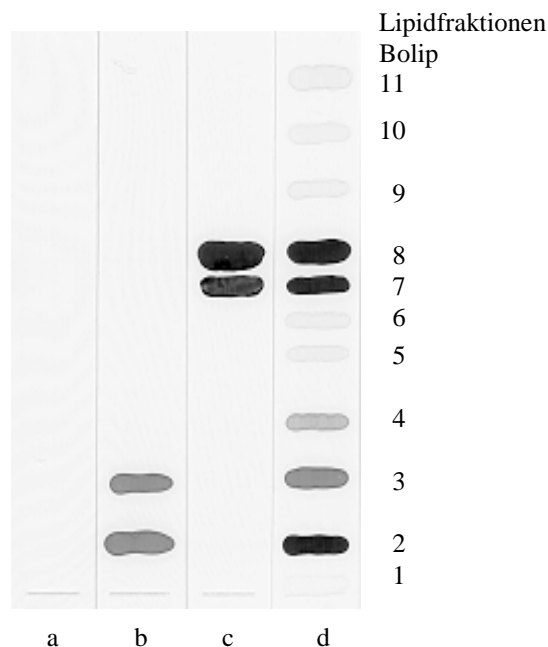
Mit dem Ninhydrin-Reagenz lassen sich primäre Aminogruppen detektieren (s. 2.5.5.). Die Ninhydrin-Färbung zeigte keine Reaktionen mit den Lipidfraktionen (Abb. 18). Somit kann man die Anwesenheit von freien Aminogruppen bei den 11 Lipidfraktionen von *B. burgdorferi* ausschließen.

### d) Phosphat-Färbung

Mit der Phosphat-Färbung nach Dittmer und Lester [71] lassen sich Phosphatgruppen darstellen (s. 2.5.5.). Von den aufgetrennten Borrelielipiden ließen sich nur 2 Fraktionen mit dem Phosphat-Reagenz darstellen, Fraktion Bolip 2 und 3 (Abb. 18). Somit besitzt *B. burgdorferi* außer 2 Glykolipiden, Bolip 7 und 8, zusätzlich noch 2 Phospholipide, Bolip 2 und 3.

### e) Ammoniumsulfat-Veraschung

Mit dieser Methode lassen sich alle Lipidbanden darstellen. Sie werden für die anschließende Quantifizierung verascht. Nach der Veraschung werden die relativen Lipidanteile densitometrisch bestimmt.



### Abb. 18 Chemische Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi*

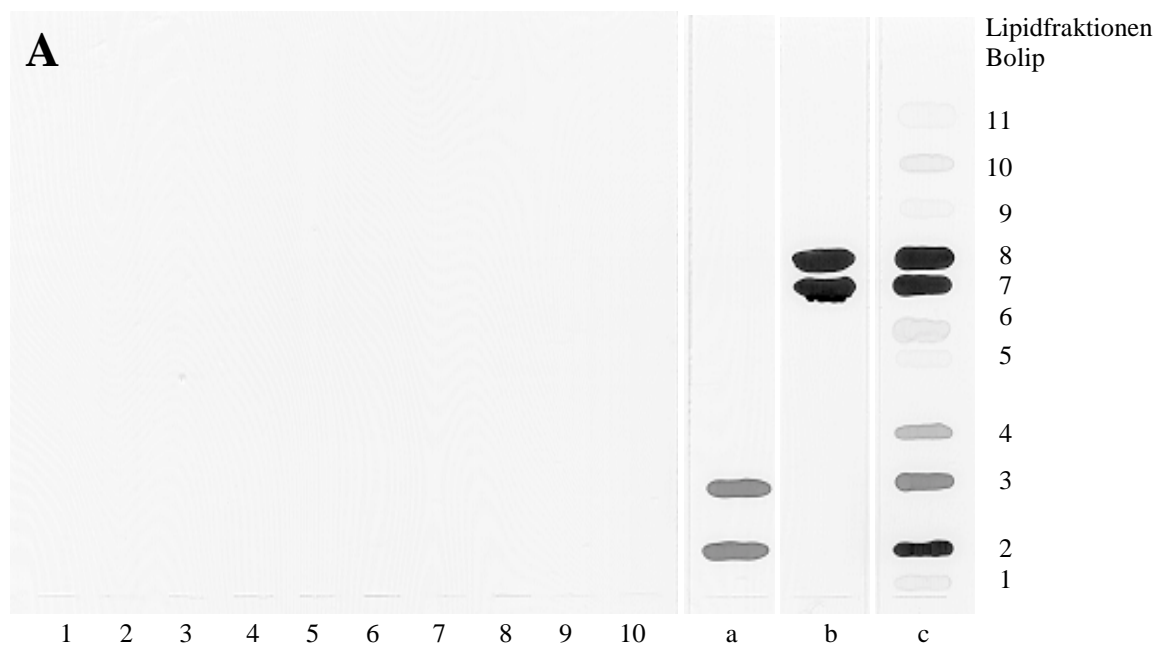
Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde auf HPTLC-Platten aufgetragen und mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) entwickelt. Die Detektion erfolgte mit folgenden Nachweisreagenzien:

- a. Ninhydrin-Färbung (Aminogruppen); b. Phosphat-Färbung (Phosphatgruppen); c. Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Färbung (Kohlenhydrate); d. Ammoniumsulfat-Veraschung

### 3.6. Immunologische Färbung

Die Immunfärbungen wurden analog zum Western-Blotting nach einer beschriebenen Methode [72] direkt auf der HPTLC-Platte durchgeführt (s. 2.5.6.). Die eingesetzten Patientenserum sind in Materialien und Methoden 2.4. beschrieben. Alle Seren wurden auf eine IgG-Konzentration von 8 mg/ml eingestellt, um die Seren miteinander vergleichen zu können. Die Bindung der humanen IgG-Antikörper an die Lipidfraktionen wurde durch die Verwendung eines peroxidase-markierten Antihuman-IgG-Immunglobulins sichtbar gemacht (Abb. 19A-E).

- a) 10 Seren von gesunden Blutspendern (Negativ-Kontrolle; Elisa-Grenzwert  $< 0.6$  und keine spezifischen Banden im Borrelien- oder Treponemen-Western-Blot):  
Keiner der 10 Seren reagierte mit den 11 Lipidfraktionen (Abb. 19A).

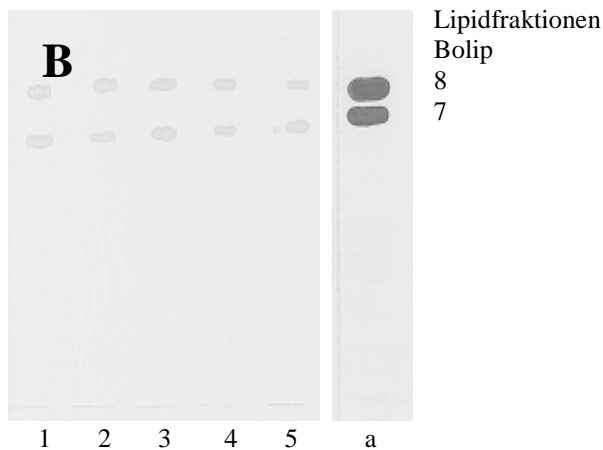


#### Abb. 19A. Immunologische Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi*

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) dünnstschichtchromatographisch aufgetrennt. Die chemische Detektion erfolgte mit Phosphat-Färbung (a), Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (b) und Ammoniumsulfat-Veraschung (c).

Die immunologische Detektion wurde mit 10 Seren von gesunden Patienten (Blutspender) ohne Lyme-Borreliose (1-10) durchgeführt (jeweils Serumverdünnung 1:100), als Zweitantikörper dienten Antihuman-IgG-Antikörper vom Kaninchen (Verdünnung 1:1000).

- b) 5 Seren von Patienten mit Borreliose Stadium I (ECM, unspezifische Allgemeinsymptome; Elisa-Grenzwert um 1, schwache spezifische Proteinbanden im IgM-Borrelien-Blot, schwache Lipidbande im IgM-Blot):  
Schwache Anfärbung der beiden Glykolipide, Bolip 7 und 8. Sonst keine Fraktion angefärbt (Abb. 19B).

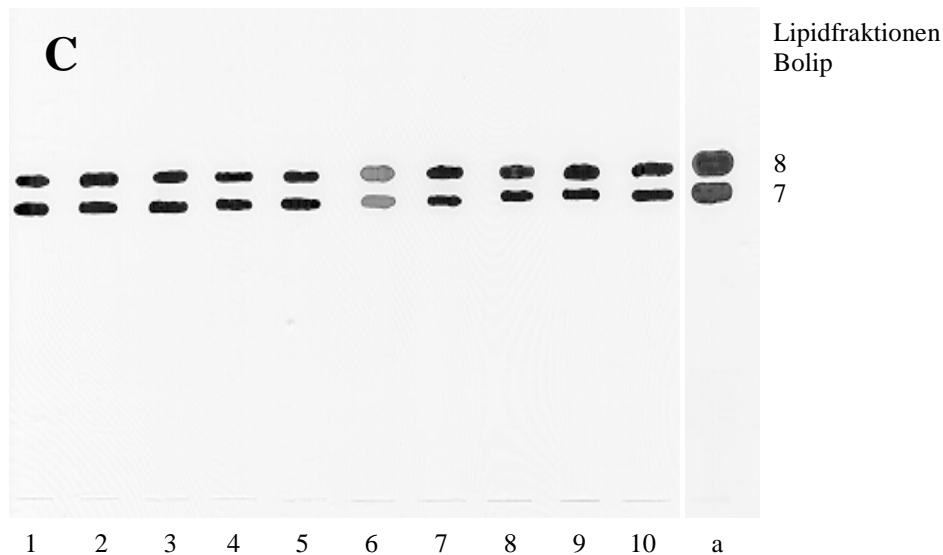


**Abb. 19B Immunologische Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi***

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) dünnstschichtchromatographisch aufgetrennt. Die chemische Detektion erfolgte mit Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (a). Der Immunoblot wurde mit 5 Seren (1-5) von Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium I durchgeführt (jeweils Serumverdünnung 1:100)

- c) 10 Seren von Patienten mit Borreliose Stadium II (neurologische Manifestation, Arthritis; Elisa-Grenzwert um 1.5, starke spezifische Proteinbanden und Lipidbande im IgM- und IgG-Borrelien-Blot):  
Starke Anfärbung der beiden Glykolipide, Bolip 7 und 8. Die restlichen Fraktionen zeigten keine Anfärbung (Abb. 19C).





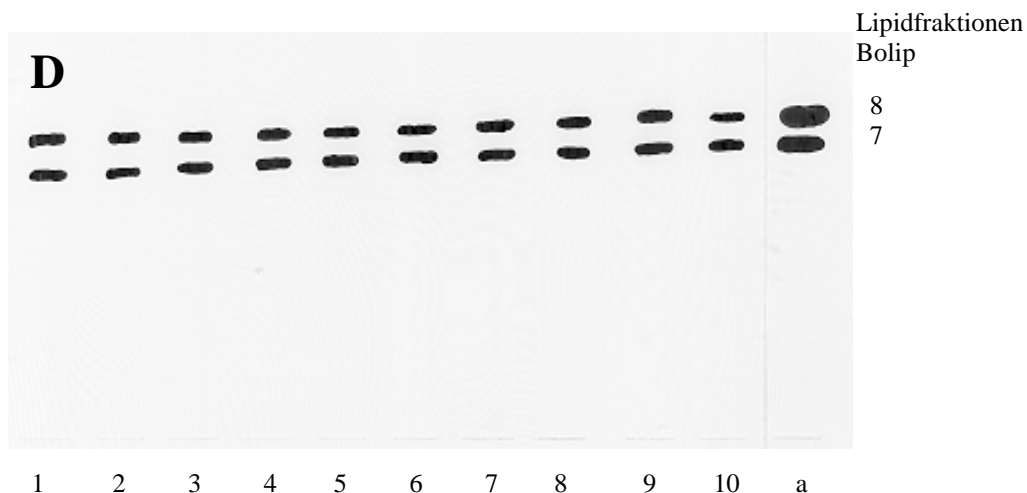
### Abb. 19C Immunologische Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi*

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) chromatographiert. Die chemische Detektion erfolgte mit Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (a).

Der Immunoblot wurde mit 10 Seren (1-10) von Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium II durchgeführt (Serumverdünnung 1:100)

- d) 10 Seren von Patienten mit Borreliose Stadium III (Enzephalitis, ACA; Elisa-Grenzwert um 1.3, schwache spezifische Proteinbanden und Lipidbande im IgM-Borrelien-Blot, starke spezifische Proteinbanden und Lipidbande im IgG-Borrelien-Blot)

Erneut starke Anfärbung der beiden Glykolipide, Bolip 7 und 8; keine weitere Anfärbung (Abb. 19D).



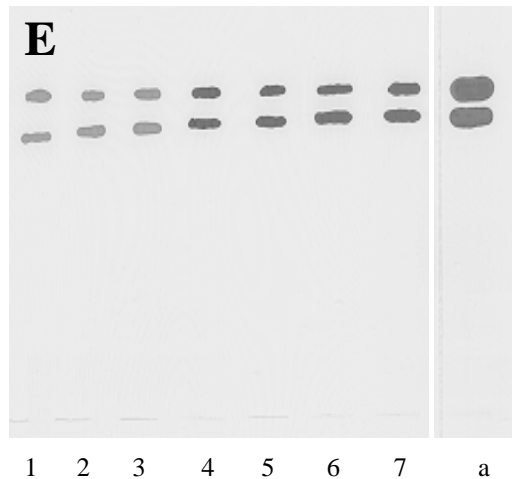
### Abb. 19D Immunologische Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi*

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) chromatographisch aufgetrennt. Die chemische Detektion erfolgte mit Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (a).

Der Immunoblot wurde mit 10 Seren (1-10) von Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium III durchgeführt (Serumverdünnung 1:100)

- e) 10 Seren von Patienten mit einer abgelaufenen Borreliose nach Therapie (Serumnarbe, keine Krankheitszeichen; Elisa-Grenzwert um 0,9, nur spezifische Proteinbanden und Lipidbande im IgG-Borrelien-Blot):

Mäßige Darstellung der Glykolipide, Bolip 7 und 8, sonst keine Anfärbung (Abb. 19E).



**Abb. 19E Immunologische Charakterisierung der Lipide von *B. burgdorferi***

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) chromatographisch aufgetrennt. Die chemische Detektion erfolgte mit Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (a).

Der Immunoblot wurde mit 7 Seren (1-7) von Patienten mit abgelaufener Lyme-Borreliose (Serumnarbe) durchgeführt (Serumverdünnung 1:100)

- f) 10 Seren von Patienten mit einer Syphilis im Sekundär- oder Tertiär-Stadium (syphilitische Hauterkrankungen, Neurosyphilis; spezifische Banden im IgM- und IgG-Treponemen-Blot, im Borrelienblot schwache Darstellung uncharakteristischer Proteinbanden durch kreuzreagierende Antikörper, keine Darstellung der Lipidbande)  
Mit den Seren von Patienten mit Syphilis ließen sich keine der 11 Lipidfraktionen von *B. burgdorferi* darstellen .

Die immunologischen Untersuchungen der Borrelienlipide zeigte deutlich, daß nur 2 von 11 Fraktionen Antikörper von Lyme-Borreliose Patienten binden. Es sind die Fraktionen Bolip 7 und 8, welche gleichzeitig auch die einzigen Glykolipide von *B. burgdorferi* sind. Weder die Phospholipide, Bolip 2 und 3, noch die restlichen Lipidfraktionen zeigten eine Antikörperbindung. Die Seren der Lyme-Borreliose Patienten im Stadium I zeigten eine schwache Färbung der Glykolipide, entsprechend der schwachen Darstellung der Lipidbande im Immunoblot. Die Seren des Stadiums II, III und der Patienten nach abgelaufener Borreliose zeigten dagegen eine starke Darstellung der Glykolipide, dies entsprach auch der

Darstellung der Lipidbande im Immunoblot. Sowohl die Seren von gesunden Blutspendern als auch die Seren von Syphilis-Patienten zeigten keine unspezifische Anfärbung der Lipidfraktionen. Während die Proteinantigene von *T. pallidum* und *B. burgdorferi* oft miteinander kreuzreagieren, scheinen die immunogenen Glykolipide von *B. burgdorferi* keine Kreuzantigenität mit *T. pallidum* zu besitzen und somit spezifisch für *B. burgdorferi* zu sein.

### 3.7. SDS-PAGE und Western-Blotting der chromatographierten Lipid-Fraktionen

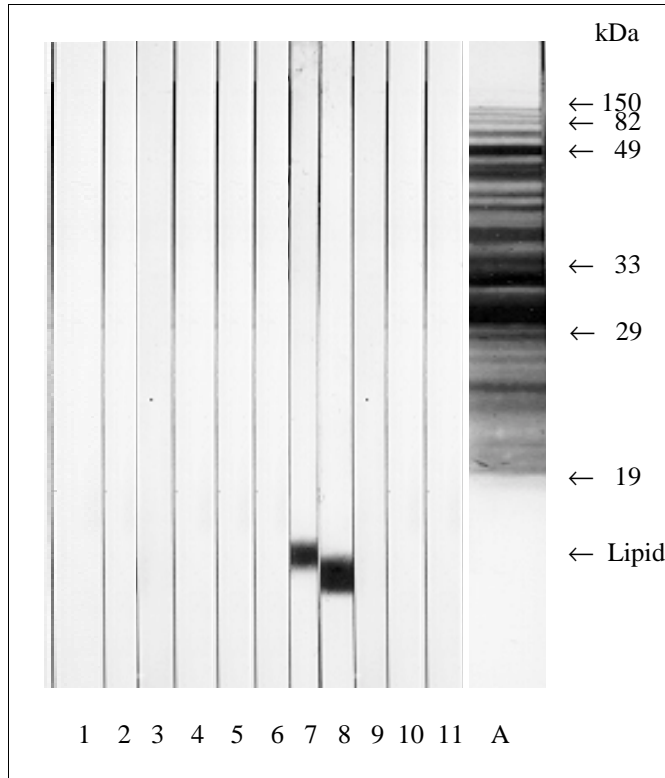
Um das immunologische Verhalten der 11 einzelnen Lipidfraktionen im Western-Blot zu überprüfen, wurden die Lipidfraktionen nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung einzeln von der HPTLC-Platte herausgekratzt und mit CM (2:1, v/v) aus dem Kieselgel eluiert. Nach Trocknen im Stickstoff-Strom und Bestimmung des Trockengewichtes, wurden die einzelnen Lipidfraktionen als Antigene in eine SDS-PAGE mit Kammern eingesetzt (s. 2.5.7.2.). Nach der SDS-PAGE wurden die Lipidantigene auf eine Immobilonmembran übertragen (s. 2.2.3.2.) und anschließend ein Immunoblotting mit Serum von Patienten mit Borreliose Stadium II durchgeführt (2.4.). Wie auch im Immuno-HPTLC reagierten nur die beiden Glykolipide Bolip 7 und 8 mit dem Patientenserum, während die Phospholipide und die restlichen Fraktionen keinerlei Reaktion mit dem Patientenserum zeigten (Abb. 20). Es wurde auch deutlich, daß die beiden Glykolipide in der SDS-PAGE dieselbe Laufhöhe aufwiesen wie das Gesamtlipid (< 10 kDa).

### 3.8. Dünnschichtchromatographie der Lipidbande nach Extraktion aus dem Polyacrylamid-Gel

Das chromatographische Verhalten der Lipidbande aus dem Polyacrylamid-Gel wurde untersucht und mit dem chromatographischen Verhalten der Gesamtlipide verglichen. Dabei wurde die Lipidbande an der Lauffront des Bromphenolblau (< 10 kD) aus dem Gel excisiert und mit CM (2:1, v/v) aus dem Gel eluiert. Das Eluat wurde wie beschrieben (s. 2.5.9.) auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) als Laufmittel chromatographiert (s. 2.5.4.1.). Nach der Auftrennung wurde das chemische Verhalten der Lipidfraktionen überprüft (s. 2.5.5.).

Bei dieser Untersuchung zeigte sich, daß die aus dem Gel extrahierte Lipidbande sich dünnschichtchromatographisch in 11 unterschiedliche Fraktionen auftrennen läßt. Die relativen Laufstrecken der Fraktionen sind identisch mit denen des chromatographierten Gesamtlipides. Auch die chemischen Färbungen sind identisch mit denen des *B. burgdorferi* Gesamtlipides, es lassen sich erneut 2 Glykolipide und 2 Phospholipide darstellen. Mit anderen Worten, die antigene Lipidbande an der Lauffront von Bromthymolblau ist das

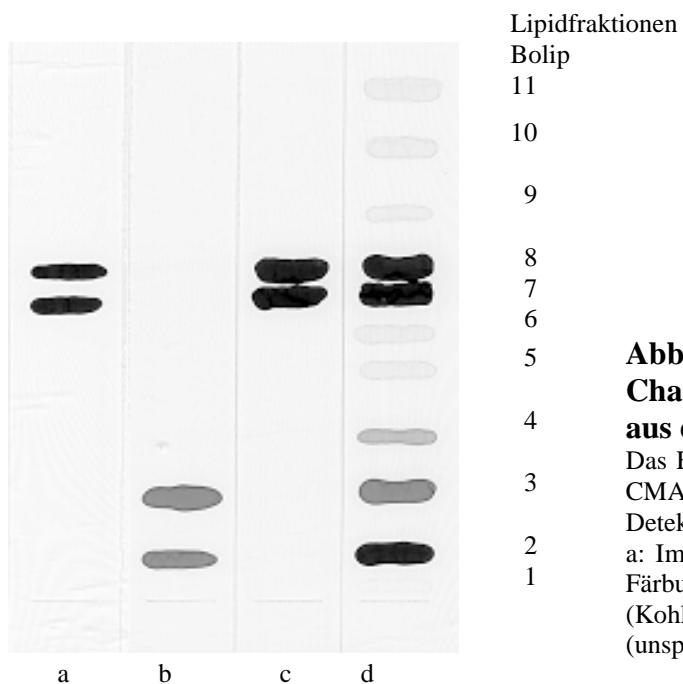
extrahierbare Gesamtlipid von *B. burgdorferi* und besteht aus 11 verschiedenen Fraktionen, wobei nur die beiden Glykolipide immunogen sind (Abb. 21).



**Abb. 20 SDS-PAGE der chromatographierten Lipidfraktionen**

Nach SDS-PAGE mit den 11 Lipidfraktionen von *B. burgdorferi* als Antigen, erfolgte ein Westernblot mit Serum vom Patienten mit Borreliose Stadium II.

1-11= Lipidfraktionen Bolip 1-11 von *B. burgdorferi*  
A = Amidoschwarz



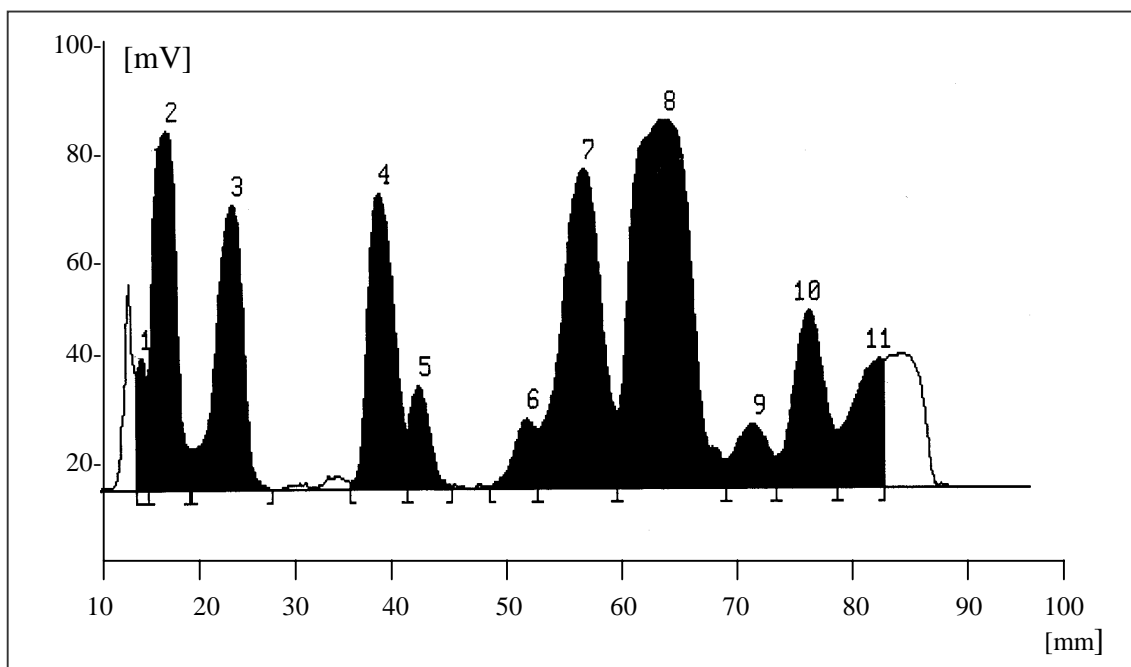
**Abb. 21 Chemische und immunologische Charakterisierung der eluierten Lipidbande aus dem Polyacrylamid-Gel**

Das Eluat wurde auf HPTLC-Platten aufgetragen und mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) entwickelt. Die Detektion erfolgte mit folgenden Nachweisreagenzien:

a: Immunoblot mit Borreliose St. II Serum; b: Phosphat-Färbung (Phosphatgruppen); c: Orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Färbung (Kohlenhydrate); d: Ammoniumsulfat-Färbung (unspezifische Lipidfärbung)

### 3.9. Bestimmung der relativen Lipidanteile

Die chromatographierte HPTLC-Platte wurde mit 20%iger Ammoniumsulfat-Lösung besprüht und 30 Minuten lang bei 200°C verascht (s. 2.5.5.). Dabei entspricht der Grad der Veraschung dem Lipidanteil der Bande. Nach der Veraschung wurde die Absorption der individuellen Lipidbanden mittels eines HPTLC-Platten Scanner (Camag, Muttenz, Schweiz) densitometrisch bei 450 nm gemessen (s. 2.5.8.). Die relativen Anteile sind in der Tab. 2 und Abb. 22 aufgeführt. Das Glykolipid Bolip 8 hat den größten Anteil am Gesamtlipid von *B. burgdorferi* (etwa 30%), das Glykolipid Bolip 7 den zweitgrößten Anteil (17%), gefolgt von den beiden Phospholipiden Bolip 2 (11%) und Bolip 3 (10%). Interessanterweise machen die einzigen immunogenen Lipidfraktionen von *B. burgdorferi*, die beiden Glykolipide Bolip 7 und 8, zusammen etwa 50% der Gesamtlipide aus.



**Abb. 22 Densitometrische Quantifizierung der Lipide von *B. burgdorferi***

Die durch HPTLC aufgetrennten Lipide wurden mit Ammoniumsulfat besprüht, verascht und die einzelnen Banden densitometrisch vermessen (s. Tab. 3).

RF-Werte	Lipidbezeichnung	Relative Menge [%]
0.03	BOLIP1	1.65
0.09	BOLIP2	11.26
0.21	BOLIP3	10.51
0.30	BOLIP4	10.21
0.43	BOLIP5	2.76
0.48	BOLIP6	2.03
0.55	BOLIP7	17.13
0.61	BOLIP8	29.03
0.71	BOLIP9	2.74
0.80	BOLIP10	7.39
0.89	BOLIP11	5.29

**Tab. 3** Relative Mengen der Lipide von *B. burgdorferi*

### 3.10. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie wurde durchgeführt, um festzustellen, ob die Glyko- und Phospholipidbanden von *B. burgdorferi* sich noch weiter auftrennen lassen. Bei Glyko- oder Phospholipide kann eine weitere Auftrennung der Banden durch eine zweite Chromatographie erreicht werden (s. 2.5.4.2.).

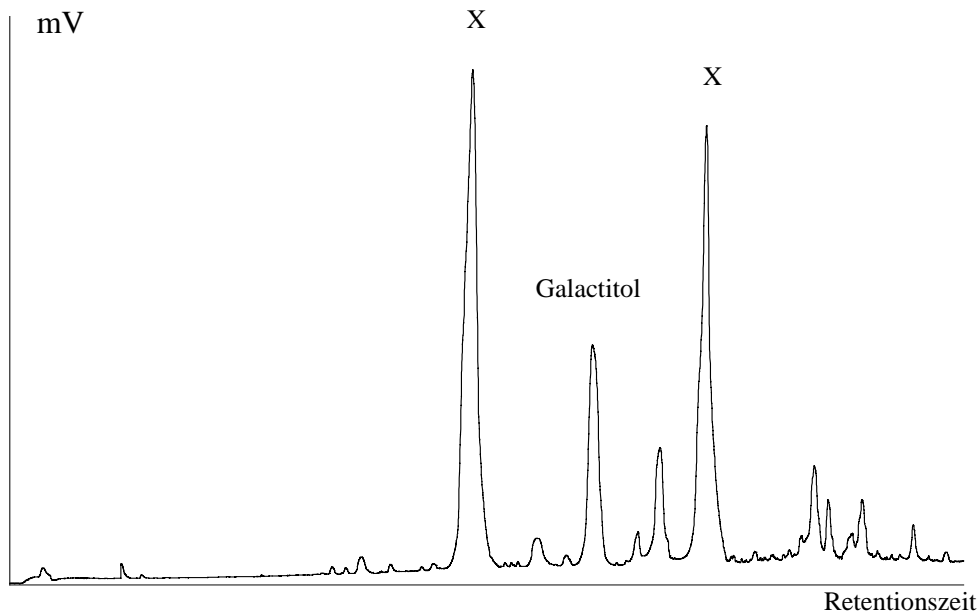
Sowohl die Glykolipide Bolip 7 und 8 als auch die Phospholipide Bolip 2 und 3 zeigten keine weitere Auftrennung in der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie, daher ist es anzunehmen, daß es sich bei diesen Lipiden um homogene Fraktionen handelt.

### 3.11. Strukturanalyse der Glykolipide

#### 3.11.1. Kohlenhydratbausteinanalyse der Gesamtlipide von *B. burgdorferi*

Die Analyse der Kohlenhydratstrukturen im Gesamtlipid von *B. burgdorferi* erfolgt analog zu den Methlierungsanalysen (s. 2.6.2.). Die erhaltenen Alditol-Acetate werden durch Gaschromatographie analysiert. Für die Detektion der Kohlenhydrate wird ein Flammenionisationsdetektor eingesetzt. Die Identifizierung der Kohlenhydrate erfolgt anhand der Retentionszeiten der Alditol-Acetate [73].

Die Bausteinanalyse des Gesamtlipides von *B. burgdorferi* zeigte nur die Präsenz von Galaktose als einzigen Kohlenhydratbaustein in den Lipiden von *B. burgdorferi*, andere Kohlenhydrate konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 23).



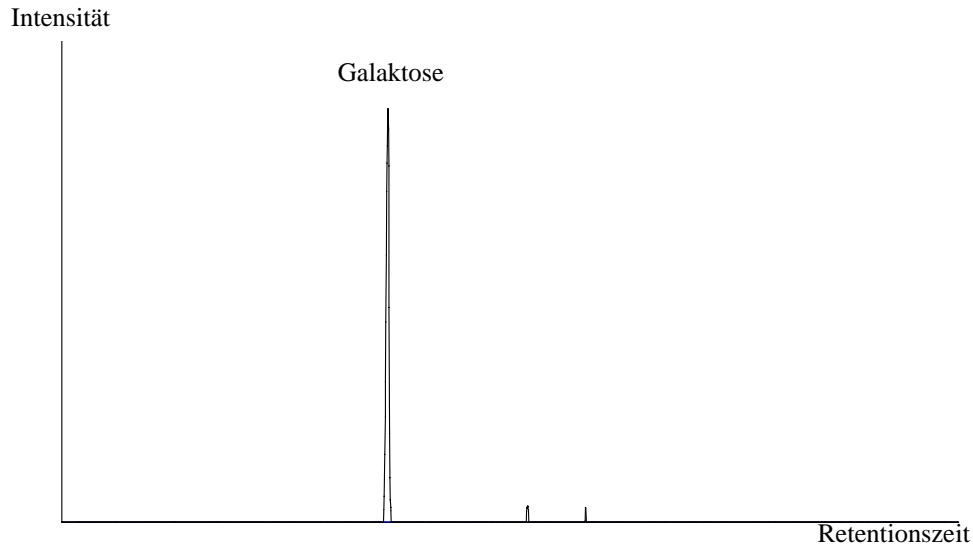
**Abb. 23 Bausteinanalyse des Gesamtlipides von *B. burgdorferi***

Die nach Hydrolyse, Reduktion und Peracetylierung erhaltenen Alditol-Acetate wurden durch GC analysiert. Die Trennung erfolgte an einer Quarz-Kapillarsäule mit chemisch gebundener Phase. Zur Detektion wurde ein Flammenionisationsdetektor verwendet. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeiten der Alditol-Acetate

X: Verunreinigung

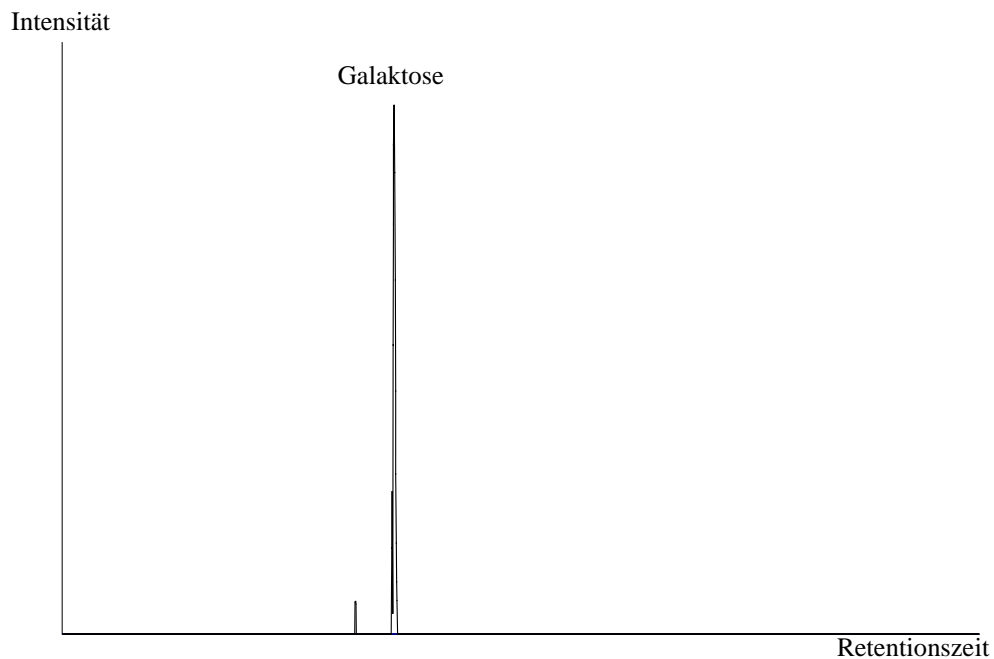
### 3.11.2. Methylierungsanalyse

Um Informationen über die Substitution der einzelnen Zuckerkomponenten eines Oligosaccharids zu erhalten, wurden Methylierungsanalysen durchgeführt (s. 2.6.2.). Die Methylierungsanalyse der Glykolipide von *B. burgdorferi*, Bolip 7 und 8, ergab in beiden Glykolipiden nur eine terminal gebundene Galaktose (Abb. 24 und 25).



#### Abb. 24 Methylierungsanalyse der Lipidfraktion Bolip7

Die nach Methylierung, Hydrolyse, Reduktion und Peracetylierung erhaltenen partiell methylierten Alditol-Acetate wurden durch kombinierte GC/MS analysiert. Die Detektion erfolgte nach chemischer Ionisation mit Ammoniak. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeiten und Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$  und  $[M+NH_4]^+$  der Alditol-Acetate.



#### Abb. 25 Methylierungsanalyse der Lipidfraktion Bolip 8

Die nach Methylierung, Hydrolyse, Reduktion und Peracetylierung erhaltenen partiell methylierten Alditol-Acetate wurden durch kombinierte GC/MS analysiert. Die Detektion erfolgte nach chemischer Ionisation mit Ammoniak. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeiten und Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$  und  $[M+NH_4]^+$  der Alditol-Acetate.



### 3.11.3. Bestimmung der anomeren Konfiguration des Kohlenhydratanteiles der Glykolipide

Um festzustellen, ob es sich bei der Galaktose der beiden Glykolipide, Bolip 7 und 8, um  $\alpha$ - oder  $\beta$ -gebundene Galaktose handelt, wurde eine Chromtrioxid-Oxidation durchgeführt (s. 2.6.5.ff). Dabei konnte festgestellt werden, daß die Galaktose in beiden Glykolipiden nur unwesentlich oxidiert bzw. zerstört wurde, was auf eine  $\alpha$ -gebundene Galaktose deutete (Tab. 4).

	Ohne Chromtrioxid-Oxidation	Nach Chromtrioxid-Oxidation
Gal-Bolip 7	1.0	0.9
Gal-Bolip 8	1.0	0.9

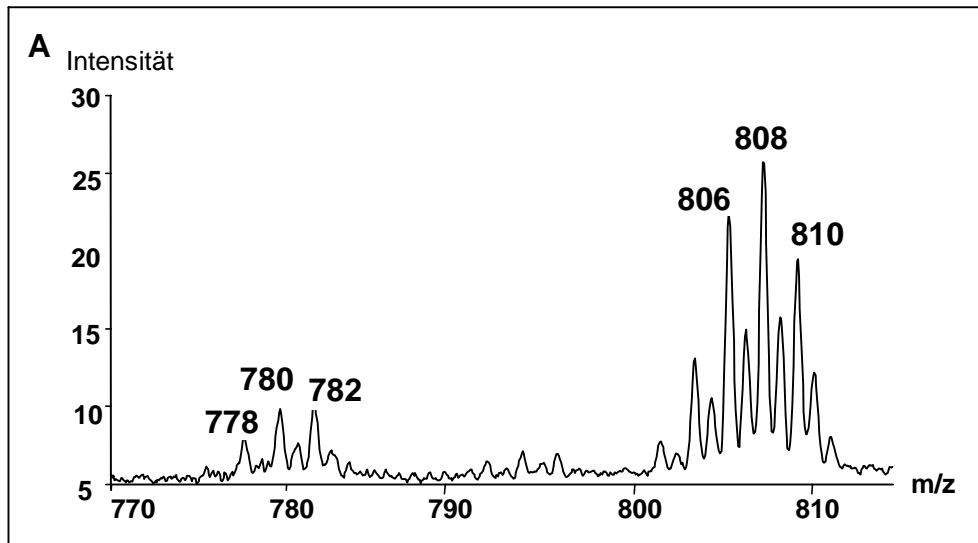
#### Tab. 4 Chromtrioxid-Oxidation der Lipidfraktionen Bolip 7 und 8

Um die anomere Konfiguration des Kohlenhydratanteils des Glykolipids zu bestimmen ( $\alpha$  oder  $\beta$  gebunden), werden die Glykolipide zunächst peracetyliert (s. 2.6.5.1.) und anschließend mit Chromtrioxid oxidiert. Bei der anschließenden Bausteinanalyse kann anhand der GC/MS eine Veränderung des Kohlenhydrates nachgewiesen werden. Galaktose ohne Chromtrioxid-Oxidation wurde gleich 1,0 gesetzt.

### 3.11.4. Massenspektrometrie (MALDI-TOF) der Lipide von *B. burgdorferi*

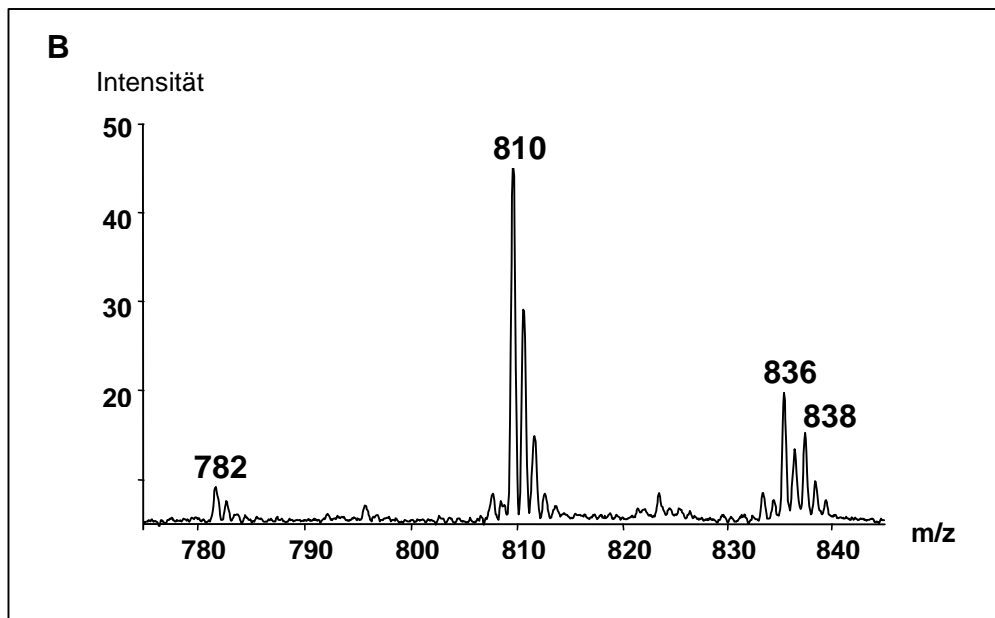
Mit der „Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight“ (MALDI-TOF) Massenspektrometrie kann man Lipide in geringsten Mengen untersuchen. Anhand der Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  können Rückschlüsse über die Molekülzusammensetzung gezogen werden.

Die Pseudomolekülonen der Borrelienlipide Bolip 1 bis 11 sind im Anhang angegeben. Wichtig für diese Studie waren die Pseudomolekülonen der beiden Glykolipide, Bolip 7 und 8, weil diese die einzigen immunogenen Fraktionen waren, und die der beiden Phospholipide, Bolip 2 und 3. Auf diese vier Hauptfraktionen der Lipide von *B. burgdorferi* richtete sich das weitere analytische Augenmerk. Die MALDI-TOF-Analyse im positiven Reflektron-Mode ergab für Bolip 7 die Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  bei  $m/z$  778, 780, 782, 804, 806, 808 und 810, während die Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  für Bolip 8 bei  $m/z$  782, 810, 836 und 838 lagen (Tab. 6, Abb. 26A und B).



**Abb. 26A Massenspektrometrische Daten des Glycolipids Bolip 7**

Glycolipide wurden mittels MALDI-TOF-MS mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix im Positiv-Ionen-Mode analysiert. Die Massenangaben entsprechen Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  und sind gerundet.



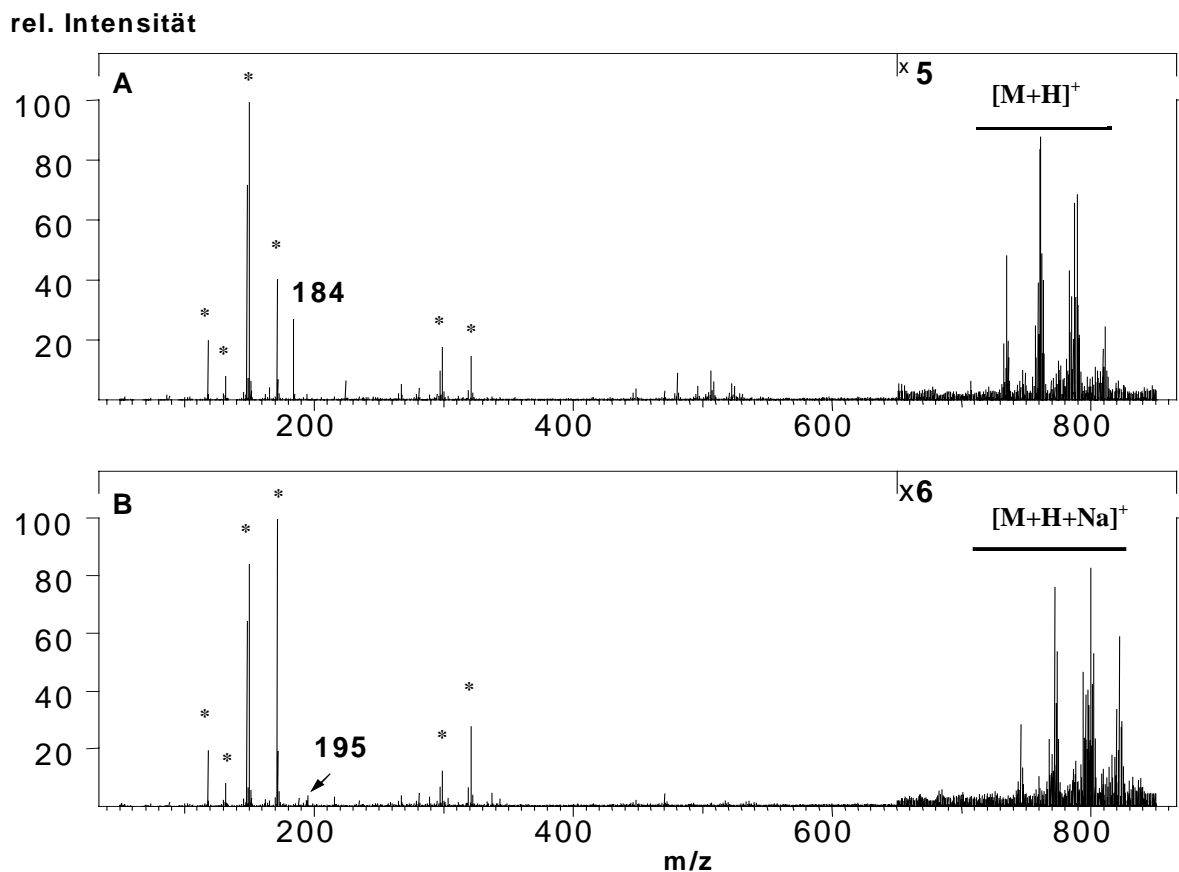
**Abb. 26B Massenspektrometrische Daten des Glycolipids Bolip 8**

Glycolipide wurden mittels MALDI-TOF-MS mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix im Positiv-Ionen-Mode analysiert. Die Massenangaben entsprechen Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  und sind gerundet.

### 3.11.5. Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie (LSIMS) der Phospholipide

Mit der Liquid-Secondary-Ion-Mass-Spectrometry (LSIMS) wurden die beiden Phospholipide, Bolip 2 und 3, von *B. burgdorferi* im Positiv-Ionen-Mode untersucht. LSIMS von Bolip 2 ergaben Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  757, 759, 761, 783, 785, 787 und 789. Ein Fragment-Ion bei  $m/z$  184 wies eindeutig auf das Vorhandensein eines Phosphocholin-Restes hin. Die LSIMS zeigte, daß es sich bei dem Phospholipid Bolip 2 um Phosphatidylcholin (Lecithin) handelt.

Das Phospholipid Bolip 3 wurde durch die Pseudomolekülonen  $[M+H+Na]^+$  bei  $m/z$  768, 770, 772, 794, 796, 798 und 800 charakterisiert. Ein Fragment-Ion bei  $m/z$  195 deutete auf die Präsenz eines Phosphoglycerol-Restes hin. Die LSIMS ergab somit, daß es sich bei Bolip 3 um Phosphatidylglycerol handelt (Abb. 27A und B, Tab. 6).



**Abb. 27A und B** Massenspektrometrische Daten der Phospholipide von *B. burgdorferi*

Phospholipide wurden mittels LSIMS mit Triethanolamin als Matrix im Positiv-Ionen-Mode analysiert. Die Massen entsprechen Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$  und  $[M+H+Na]^+$  und sind gerundet.

A = Phosphatidylcholin (Bolip 2)

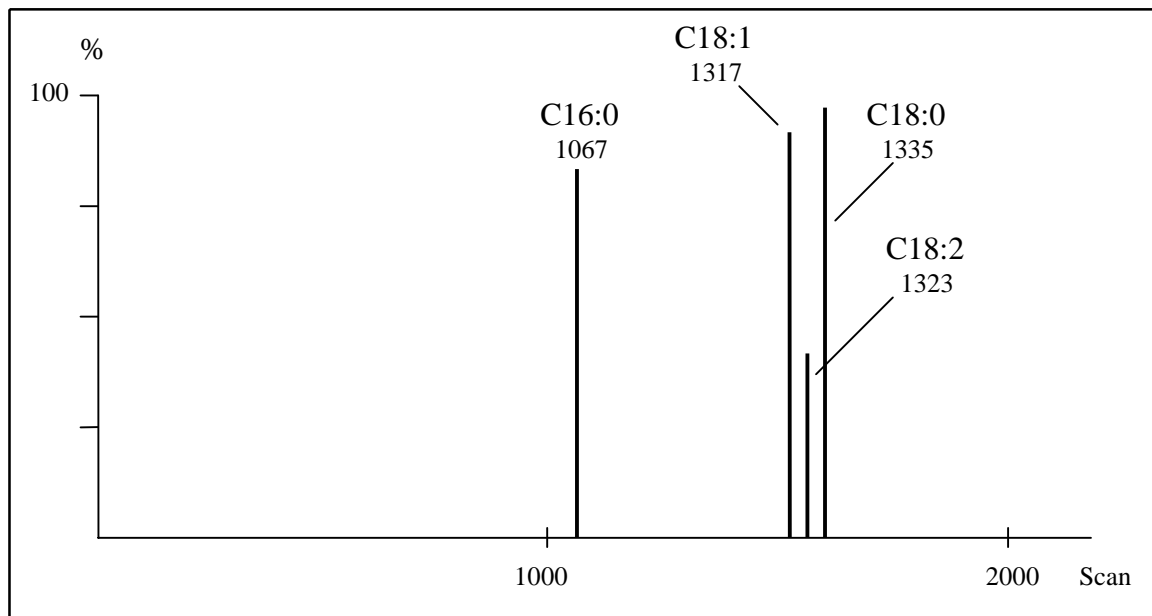
B = Phosphatidylglycerol (Bolip 3)

### 3.11.6. Fettsäure-Analyse der Lipide von *B. burgdorferi*

Für die Analyse der Fettsäuren der Glyko- und Phospholipide von *B. burgdorferi* wurden diese zunächst hydrolysiert (s. 2.6.7.1.) und in die entsprechenden Methylester überführt. Nach Extraktion mit n-Hexan erfolgte die Identifizierung der Fettsäuremethylester durch kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie nach Ionisation mit Ammoniak.

Hierbei konnten alle Fettsäuren anhand ihrer Pseudomolekülonen  $[M+NH_4]^+$  eindeutig identifiziert werden. Die Fettsäureanalyse zeigte, daß die Fettsäuren der Glyko- und Phospholipiden sich aus geradkettigen Fettsäuren zusammen setzten, wobei vornehmlich Palmitinsäure (C16:0), Stearinsäure (C18:0), Ölsäure (C18:1), Linolsäure (C18:2), Linolensäure (C18:3) und Arachidonsäure (C20:0) nachgewiesen wurden..

Die Ergebnisse sind in Tab. 5 und Abb. 28 zusammengefaßt.



**Abb. 28 Gaschromatographisch/Massenspektrometrische Analyse der Fettsäuremethylester der Gesamtlipide von *B. burgdorferi* nach chemischer Ionisation mit Ammoniak**

Die Trennung der durch saure Hydrolyse freigesetzten Fettsäuremethylester des Gesamtlipids von *B. burgdorferi* erfolgte an einer Quarz-Kapillarsäule mit chemisch gebundener Phase (DB-1701, 0.25 mm, 60 m; ICT). Die Detektion wurde massenspektrometrisch nach chemischer Ionisation mit Ammoniak durchgeführt. Die Identifizierung der Fettsäuremethylester erfolgte anhand des Vergleichs der Retentionszeiten und Pseudomolekülonen  $[M+NH_4]^+$  mit denen von bekannten Fettsäuremethylester-Standards.

Fettsäuremethylester	Relative Mengen				
	Gesamtlipid	Phosphatidyl- cholin (Bolip 2)	Phosphatidyl- glycerol (Bolip 3)	Glykolipid (Bolip 7)	Glykolipid (Bolip 8)
C16:0 (Palmitinsäure)	27.2	35.5	24.3	16.2	53.0
C18:0 (Stearinsäure)	31.0	32.9	48.8	36.5	16.7
C18:1 (Ölsäure)	30.6	25.7	22.0	35.3	25.3
C18:2 (Linolsäure)	11.2	5.9	4.9	12.0	5.0
C18:3 (Linolensäure)	Spuren				
C20:0 (Arachidon- säure)	Spuren				

**Tab. 5 Prozentuale Verteilung der Fettsäuren am Gesamtlipid und an den Glyko- und Phospholipiden von *B. burgdorferi***

Das Lipidextrakt wurde hydrolysiert, die Fettsäuremethylester extrahiert und gas-chromatographisch aufgetrennt. Die Identifizierung erfolgte anhand ihrer Retentionszeiten und Pseudomolekülonen.

Lipidfraktion	Chemische Struktur	Pseudomolekülonen	Fettsäuren
Bolip-2	Phosphatidylcholin	757 <sup>*</sup>	16:0; 18:2
		759 <sup>*</sup>	16:0; 18:1
		761 <sup>*</sup>	16:0; 18:0
		783 <sup>*</sup>	18:0; 18:3
		785 <sup>*</sup>	18:0; 18:2
		787 <sup>*</sup>	18:0; 18:1
		789 <sup>*</sup>	18:0; 18:0
Bolip-3	Phosphatidylglycerol	768 <sup>*\$</sup>	16:0; 18:2
		770 <sup>*\$</sup>	16:0; 18:1
		772 <sup>*\$</sup>	16:0; 18:0
		794 <sup>*\$</sup>	18:0; 18:3
		796 <sup>*\$</sup>	18:0; 18:2
		798 <sup>*\$</sup>	18:0; 18:1
		800 <sup>*\$</sup>	18:0; 18:0
Bolip-7	Galactoglycerolipid	778 <sup>¶</sup>	16:0; 18:2
		780 <sup>¶</sup>	16:0; 18:1
		782 <sup>¶</sup>	16:0; 18:0
		804 <sup>¶</sup>	18:0; 18:3
		806 <sup>¶</sup>	18:0; 18:2
		808 <sup>¶</sup>	18:0; 18:1
		810 <sup>¶</sup>	18:0; 18:0
Bolip-8	Galactoglycerolipid	782 <sup>¶</sup>	16:0; 18:0
		810 <sup>¶</sup>	18:0; 18:0
		836 <sup>¶</sup>	20:0; 18:1
		838 <sup>¶</sup>	20:0; 18:1

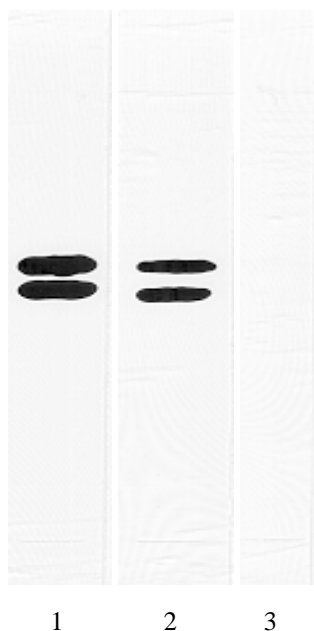
**Tab. 6 Zusammenfassung der massenspektrometrischen Daten der Glyco- und Phospholipide von *B. burgdorferi***

Die Lipide wurden nativ für MALDI-TOF-MS bzw. nativ, permethyliert und peracetyliert für LSIMS Messungen eingesetzt. Es wurden in der Regel Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$  bzw.  $[M+Na]^+$  registriert und die exakten m/z-Werte gerundet

\*  $[M+H]^+$ ; <sup>§</sup> nach Natriumacetat-Zugabe; <sup>¶</sup>  $[M+Na]^+$  .

### 3.12. Darstellung der Immunogenität des Galaktose-Restes an den Glykolipiden Bolip 7 und 8 mittels Perjodat-Oxidation

Die Galaktolipide sind die einzigen immunogenen Lipidfraktionen von *B. burgdorferi*, die Antikörper von Lyme-Borreliose-Patienten binden können. Um die Spezifität der Galaktose als Bindungsort der Antikörper darzustellen, wurde der Galaktoserest der beiden Glykolipide mittels Perjodat oxidiert und somit zerstört. In der nachfolgenden immunologischen Färbung mit Serum von Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium II war eine Anfärbung der beiden Glykolipide nicht mehr sichtbar. Demnach konnten durch die Zerstörung der Galaktose Antikörper nicht mehr spezifisch binden und somit auch nicht dargestellt werden. Dieses Ergebnis spricht für die Spezifität der Galaktose als Bindungsort der Antikörper gegen die Glykolipide (Abb. 29).



#### Abb. 29 Darstellung der Bedeutung der terminal-gebundenen Galaktose als spezifischer Bindungsort für Antilipid-Antikörper bei Lyme-Borreliose

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* wurde mit CMAEW (65:10:20:10:3, v/v/v/v/v) chromatographisch aufgetrennt. Die chemische Detektion der Glycolipide erfolgte mit Orcinol/ $H_2SO_4$  (1).

Der Immunoblot wurde mit Serum vom Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium II durchgeführt (Serumverdünnung 1:100).

1 = Orcinolfärbung  
Perjodatbehandlung

2 = Immunoblot vor Perjodatbehandlung

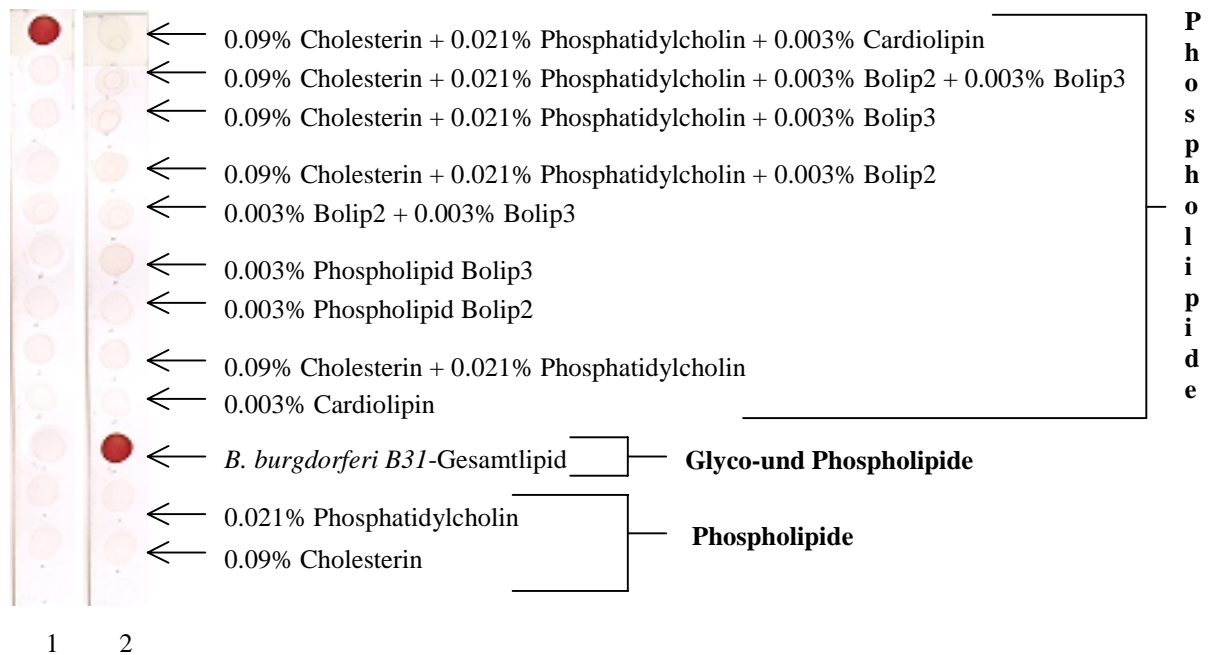
3 = Immunoblot nach

### 3.13. Darstellung der Antigenität der Phospholipide von *B. burgdorferi* durch Komplexierung mit Phosphatidylcholin und Cholesterin

In der Diagnostik der Syphilis wird der „Veneral Disease Research Laboratory“-Test (VDRL) regelmäßig als Verlaufskontrolle nach antibiotischer Therapie [209-213] eingesetzt. Als Antigen dient dabei Cardiolipin, welches eine schwache eigene Antigenität besitzt. Wird das Cardiolipin allerdings mit Cholesterin und Phosphatidylcholin komplexiert, tritt eine deutliche Verstärkung der Antigenität auf. Als Ursache für die stärkere Antigenität wird eine verbesserte Antigenpräsentation durch die Komplexierung angenommen. Da die Phospholipide von *B. burgdorferi* bisher keine Antigenität in den immunologischen Untersuchungen gezeigt haben, soll analog zum VDRL-Test geprüft werden, ob die Komplexierung der Borrelien-Phospholipide mit Cholesterin und Phosphatidylcholin eine Verstärkung der Antigenität zeigt. Cholesterin, Phosphatidylcholin, das Borreliengesamtlipid, die Borrelien-Phospholipide und das Cardiolipin wurden sowohl einzeln als auch im Komplex mit Cholesterin/ Phosphatidylcholin auf einen Immobilonstreifen pipettiert und mit Serum von einem Patienten mit Lyme-Borreliose Stadium II und einem Syphilis Patienten immunologisch dargestellt. Bei dem Syphilisserum wurde ein Serum mit positivem VDRL-Titer eingesetzt.

Die Dot-Blot-Analyse ergab mit dem Borrelioseserum lediglich eine Darstellung des Borreliengesamtlipids. Cholesterin, Phosphatidylcholin, die Borrelien-Phospholipide und das Cardiolipin zeigten weder einzeln noch im Komplex mit Cholesterin/ Phosphatidylcholin eine Reaktion mit dem Borrelioseserum. Demnach läßt sich die Antigenität der Phospholipide von *B. burgdorferi* auch durch Komplexierung und damit besserer Antigenpräsentation nicht verstärken. Das Syphilisserum mit hohem VDRL-Titer reagierte nur mit dem komplexierten Cardiolipin; das Borreliengesamtlipid, die nativen und komplexierten Borrelienphospholipide, Cholesterin, Phosphatidylcholin und das native Cardiolipin zeigten keinerlei Reaktion mit dem Syphilisserum. Dieses Ergebnis zeigt, daß eine Kreuzreaktivität zwischen dem Treponemenphospholipid Cardiolipin und den Borrelienphospholipiden nicht anzunehmen ist (Abb. 30, Tab. 8).





**Abb. 30** Dotblotanalyse der nativen und komplexierten Lipide von *B. burgdorferi*

Je 1  $\mu$ l der nativen bzw. komplexierten Lipide wurde auf einem Immobilon-Papier aufgetragen. Anschließend erfolgte ein Immunoassay mit je einem Borreliose- und Syphilisserum (Verdünnung 1:100). Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit einem peroxidase-markierten Zweitantikörper nachgewiesen (1:1000).

1 = Syphilisserum

2 = Borrelioseserum

<b>Native bzw. komplexierte Lipide</b>	<b>Syphilis-Serum</b>	<b>Borreliose-Serum</b>
0.09% Cholesterin	-	-
0.021% Phosphatidylcholin	-	-
B. burgdorferi B31-Gesamtlipid	-	<b>+</b>
0.003% Cardiolipin	-	-
0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin	-	-
0.003% Phospholipid Bolip2	-	-
0.003% Phospholipid Bolip3	-	-
0.003% Bolip2 + 0.003% Bolip3	-	-
0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Bolip2	-	-
0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Bolip3	-	-
0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Bolip2 + 0.003% Bolip3	-	-
0.09% Cholesterin + 0.021% Phosphatidylcholin + 0.003% Cardiolipin	<b>+</b>	-

**Tab. 7 Darstellung der Ergebnisse der Dotblotanalyse**

- = keine Reaktion

+ = Positive Reaktion