

4. Diskussion

In den beiden letzten Jahrzehnten lernte man die Lyme-Borreliose als eine neue komplexe Infektionskrankheit kennen. Sie ist die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit in den gemäßigten Klimazonen [167, 214] (Abb. 31).

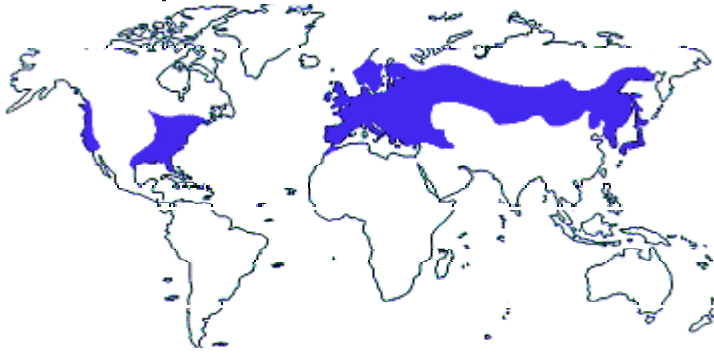


Abb. 31 Verbreitung der Lyme-Borreliose

Hervorgerufen wird die Erkrankung durch die Spirochäte *B. burgdorferi*, die von infizierten Zecken im Rahmen einer Blutmahlzeit auf den Menschen oder auf Tiere übertragen wird.

Die Lyme-Borreliose mit ihrer vielfältigen Symptomatik gewinnt zunehmend an Bedeutung. Die steigende Zahl der klinischen Manifestationen macht die Entwicklung verbesserter spezifischer Diagnostika und effektiver Vakzine dringend erforderlich.

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte bei der Aufklärung der molekularen Struktur sowie der Heterogenität und Antigenvariabilität von *B. burgdorferi* erzielt [215]. Dabei stand vor allem die Analyse der Oberflächenproteine („*Outer Surface Protein*“, Osp) im Mittelpunkt der Forschung [5, 16-19]. Viele dieser Oberflächenproteine sind Lipoproteine und an Wechselwirkungen mit der körpereigenen Abwehr und der Pathogenese der Lyme-Borreliose beteiligt [24, 186-200]. Es zeigten sich aber auch große Unterschiede in Verteilung und spezifischer Immunität dieser Lipoproteine, und das nicht nur zwischen amerikanischen und europäischen Stämmen von *B. burgdorferi*, sondern auch innerhalb einer Borrelienpopulation [19, 31-34]. Diese Heterogenität und Antigenvariabilität bedingt auch die schwierige Standardisierung von serologischen Tests und die Etablierung einer weltweit einsetzbaren Vakzine.

Es sind immer noch viele Faktoren des Erregers und des Wirts unbekannt, welche zur Pathogenese bzw. zur Protektion beitragen. Insbesondere weiß man noch wenig über Aspekte der Erregerausbreitung, der differentiellen Infektion verschiedener Organe und der Persistenz

der Erreger. Auch die Rolle natürlicher Resistenzmechanismen und immunologisch spezifischer Abwehrmechanismen ist noch weitgehend unklar [215].

Aber nicht nur Proteine spielen eine Rolle bei der Pathogenese der Lyme-Borreliose, sondern auch die Lipide von *B. burgdorferi* sind daran beteiligt. Die Existenz immunreaktiver Lipide von *B. burgdorferi* ist beschrieben [39, 40, 44, 45, 46], aber nur wenig ist über die Struktur und Funktion dieser Lipide bekannt.

In der serologischen Abteilung unseres diagnostischen Routinelabors konnten wir regelmäßig auf den Immunoblots von Lyme-Borreliose Patienten eine antigene Bande an der Lauffront des Bromthymolblau feststellen. Diese schnelllaufende Bande bei < 10 kDa reagierte stark mit Seren von Lyme-Borreliose Patienten, ließ sich aber nicht mit Proteinfarbstoffen darstellen, zeigte aber gleichzeitig eine Löslichkeit in Chloroform. Diese Eigenschaften deuteten auf die Existenz eines nicht-proteinösen Agens. In dieser Studie wird die Analyse der Struktur und des immunologischen Verhaltens der Lipide von *B. burgdorferi* beschrieben.

Spirochäten zählen zu den lipidreichen Bakterienfamilien [49-59]. Für einige Spezies der Gattungen *Treponema* und *Spirochaeta* sind 14 bis 30% Gesamtlipid beschrieben [49], während bei Leptospiren der Lipidgehalt nur 8 bis 10% des Trockengewichtes beträgt [59]. Wir konnten zeigen, daß auch *B. burgdorferi* zu den lipidreichen Gattungen gehört.

Der Lipidanteil betrug 25 – 30% des Gesamttrockengewichts und war damit vergleichbar hoch mit dem Lipidanteil von *Treponema* und *Spirochaeta*.

Das Gesamtlipid von *B. burgdorferi* konnte dünn-schichtchromatographisch in 11 verschiedene Fraktionen aufgetrennt werden. Dies ist die erste Beschreibung einer derart hohen Anzahl an auftrennbaren Lipidfraktionen beim Gesamtlipid von *B. burgdorferi* B31. Bisher wurden lediglich 4 Lipidfraktionen bei *B. burgdorferi* B31 durch die Arbeitsgruppe um Wheeler beschrieben [45]. Dieser Unterschied in der Anzahl der Fraktionen ist zum Einen auf unsere verbesserte Lipidextraktion und –aufreinigung und zum Anderen auf die Verwendung optimaler Laufmittel zurückzuführen.

Mittels chemischer Färbungen der Fraktionen konnten zwei Glykolipide und zwei Phospholipide nachgewiesen werden. Die Glykolipide hatten mit 50% den größten Anteil am Gesamtlipid, gefolgt von den Phospholipiden mit jeweils 10%. Insgesamt machten diese vier Hauptfraktionen etwa 70% der Gesamtlipide aus.

Ähnlich hohe Mengen an Glykolipid (ca. 50%) fanden Livermore et al. [49] bei *Spirochaeta* und *Treponema*, wogegen die Menge an Phospholipid (50%) bei beiden Gattungen deutlich höher war als die von *B. burgdorferi* (20%). Ausnahmen bildeten *Spirochaeta aurantia* mit 85% Glykolipidgehalt und *Treponema denticola* mit 80% Phospholipidgehalt [49].

Bei den beiden Borrelien-Glykolipiden handelte es sich jeweils um Monoglykosyldiglyceride. Mittels massenspektrometrischer und gaschromatographischer Methoden konnten sie als α -Galaktosyldiacylglycerol mit jeweils unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung identifiziert werden. Die unterschiedliche Fettsäurekomposition erklärt auch die unterschiedlichen Laufweiten in der Dünnschichtchromatographie.

Monogalaktosyl-Diacylglycerole wurden bereits in den Gattungen *Treponema* und *Spirochaeta* nachgewiesen, aber nicht in *Treponema pallidum* [218] und nicht in *Leptospira* [49]. Auch in *Borrelia hermsii*, dem Erreger des Rückfallfiebers konnte Monogalaktosyl-Diacylglycerol nachgewiesen werden [54].

Die beiden Phospholipide von *B. burgdorferi* konnten als Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylglycerol (PG) identifiziert wurden, während Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und Cardiolipin (CL) nicht nachgewiesen wurden. Es ist beschrieben, daß PC zusammen mit CL die Hauptfraktion der Phospholipide bei *Treponema* bildet, während PE das häufigste Phospholipid bei *Leptospira* ist [49]. In *Spirochaeta* dagegen konnte nur PG nachgewiesen werden [49]. Bei *B. hermsii* wurden sowohl PC als auch PG nachgewiesen [54], während bei *T. pallidum* insgesamt 6 Phospholipide (PC, PG, PE, PS, PI und CL) identifiziert wurden [142].

Es besteht somit die Möglichkeit die Gattungen *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira* und *Spirochaeta* anhand ihrer Glyko- und Phospholipidzusammensetzung voneinander zu unterscheiden (Tab.9)

Organismus	Kohlenhydrat- und Phospholipidbestandteil ^a						
	Glukose	Galaktose	PC	PG	PE	PS	CL
<i>B. burgdorferi</i>	–	+++	++	++	–	–	–
<i>T. pallidum</i>	NI	–	++	++	+	+	++
<i>T. phagedenis</i>	–	+++	++	+	++	–	+
<i>T. denticola</i>	+	++	+++	+	++	–	+
<i>S. aurantia</i>	+++	–	–	+++	–	–	++
<i>S. zuelzerae</i>	+++	–	–	++	–	–	++
<i>L. interrogans</i>	NI	–	–	+	+	–	+

Tab. 9 Verteilung der Glyko- und Phospholipide bei Spirochäten

^a +++ hauptsächlich vorhanden; ++ signifikant vorhanden; + wenig vorhanden; – nicht vorhanden.

Die Fettsäureanalyse der Lipide von *B. burgdorferi* ergab zu je etwa 30% die gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (C16:0) und Stearinsäure (C18:0), während die ungesättigten Fettsäuren mit 30.6% Ölsäure (C18:1) und 11.2% Linolsäure (C18:2) vertreten waren. Im Gegensatz dazu dominierte bei der Gattung *Treponema* Palmitinsäure mit ca. 50%, gefolgt von Ölsäure (ca. 50%), während Linolsäure und Stearinsäure lediglich als Spuren vorlagen [49]. Auch bei *T. pallidum* bildete Palmitinsäure (52.5%) die Hauptfraktion der Fettsäuren, während Stearinsäure (21.4%), Ölsäure (15.3%) und Linolsäure (8.9%) deutlich weniger vorhanden waren als bei *B. burgdorferi* [142]. Bei den *Spirochaeta* dagegen waren 3-20% Palmitinsäure und 1-12% Ölsäure beschrieben, während Stearin- und Linolsäure nur als Spuren vorlagen [49]. Die Fettsäurekomposition von *L. interrogans* war ähnlich wie bei *B. burgdorferi* mit etwa je 27% Palmitinsäure und Ölsäure verteilt, während Linolsäure mit 27.4% deutlich vermehrt und Stearinsäure mit nur 1.7% deutlich vermindert vorhanden war [59].

Abhängig vom Fettsäuremuster des Mediums bietet die Fettsäureanalyse eine gute Möglichkeit die verschiedenen Gattungen von Spirochäten voneinander zu unterscheiden (Tab. 10).

Organismus	Fettsäure ^a			
	16:0	18:0	18:1	18:2
<i>B. burgdorferi</i>	27.2	31	30.6	11.2
<i>T. pallidum</i>	52.5	21.4	15.3	8.9
<i>T. phagedenis</i>	51.3	Spuren	48.7	Spuren
<i>T. denticola</i>	53.4	Spuren	29.6	Spuren
<i>S. aurantia</i>	19.7	Spuren	11.9	Spuren
<i>S. zuelzerae</i>	3.5	Spuren	1.6	Spuren
<i>L. interrogans</i>	26.9	1.7	26.5	27.4

Tab. 10 Relative prozentuale Verteilung der Fettsäuren bei Spirochäten

^a Die Zahl vor dem Doppelpunkt gibt die Länge der Fettsäure an, die Zahl nach dem Doppelpunkt die Anzahl der Doppelbindungen.

Zur Unterscheidung der Spirochäten kann man aber auch den Lipidmetabolismus der einzelnen Gattungen hinzuziehen und miteinander vergleichen.

Früherer Studien haben gezeigt, daß *Spirochaeta* in der Lage sind ihre Lipide de novo zu synthetisieren [49], während *Borrelia*, *Treponema* und *Leptospira* dies nicht vermögen [49, 54, 142].

Die drei letztgenannten Gattungen sind daher auf exogene Fettsäuren im Medium angewiesen. Die komplette Sequenzierung des *B. burgdorferi* Genoms zeigte das Fehlen von Genen für die Synthese von Fettsäuren, so daß die Fettsäure-Komposition von *in vitro* kultivierten *B. burgdorferi* die Fettsäure-Verteilung des Wachstumsmediums widerspiegelt [54, 55, 80]. Ähnlich wie *Treponema* und *Spirochaeta* ist *B. burgdorferi* nicht in der Lage eine Beta-Oxidation von langen Fettsäure-Ketten durchzuführen, um diese als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Von den Spirochäten vermag nur die Gattung *Leptospira* die Beta-Oxidation von Fettsäure-Ketten als Energiequelle zu nutzen [53, 55, 59].

Die Kenntnis des Lipidmetabolismus und der Lipidkomposition der verschiedenen Spirochätengattungen ermöglicht nun die Identifizierung und Zuordnung neuer Isolate.

Tabelle 11 demonstriert wie Lipidkomposition und Metabolismus als taxonomische Marker benutzt werden können, um besser neue Isolate differenzieren und charakterisieren zu können. Da auf der einen Seite die Spirochäten sehr lipidreich sind und auf der anderen Seite die Nachweismethoden (HPTLC, MALDI, LSIMS, GC-MS) sehr sensitiv sind, braucht man nur kleinste Mengen an Probe, um relativ schnell (1-2 Tage) ein neues Isolat identifizieren zu können. Es genügt bereits, eine kleine Probe auf einer HPTLC-Platte dünnenschichtchromatographisch aufzutrennen und mittels Spray-Reagenzien auf Glykolipid und Phosphatidylethanolamin zu untersuchen. Mit dem Ergebnis läßt sich bereits eine Zuordnung zu einer der Spirochätengattungen treffen.

Lipidkomposition und Metabolismus ^a	Gattung			
	Borrelia	Treponema	Spirochaeta	Leptospira
De novo Fettsäuresynthese	–	–	+	–
Beta-Oxidation von Fettsäuren	–	–	–	+
Monoglycosyldiacylglycerol	+	+	+	–
Phosphatidylcholin	+	+	–	–
Phosphatidylglycerol	+	+	+	+
Phosphatidylethanolamin	–	+	–	+
Phosphatidylserin	–	+*	–	–
Cardiolipin	–	+	+	+

Tab. 11 Differenzierung der Spirochäten anhand der Lipidkomposition

* Gilt nur für *T. pallidum*

^a + vorhanden; – nicht vorhanden.

Lipopolysaccharide (LPS) kommen häufig in der Außenmembran von gram-negativen Bakterien vor. Normalerweise besteht das LPS aus 3 Komponenten: dem O-Antigen, dem Kernsaccharid und dem Lipid A. Das O-Antigen besteht aus sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten, wobei jede Einheit aus 3-5 Hexosen besteht. Diese antigene Region bestimmt die serologische Spezifität des LPS und die Sequenz der Kohlenhydrate ist speziesspezifisch. Das Kernsaccharid ist die Verbindung zwischen O-Antigen und Lipid A und ist chemisch bei vielen Bakteriengruppen ähnlich. Die Verbindung zum Lipid A wird durch das Kohlenhydrat *3-deoxy-D-mannooctulosonic acid*, auch KDO genannt, gewährleistet. Das Lipid A selbst verankert das gesamte Molekül in die Außenmembran des Bakteriums und besteht aus Glukosamin, Phosphat und lang-kettigen Fettsäuren. Da das Lipid A pyrogene Eigenschaften hat, wird das LPS auch als Endotoxin bezeichnet. Lipid A und KDO sind charakteristisch für das LPS und werden als LPS-Marker eingesetzt [219].

Neben den LPS gibt es auch Lipooligosaccharide (LOS). LOS kommen bei sogenannten rauhen Formen (R-Form) von gram-negativen Bakterien vor. R-Formen synthetisieren inkomplette LPS mit mangelhafter bzw. fehlender O-spezifischer Kette oder defektem Kernsaccharid. In der SDS-PAGE zeigen LPS eine langsame Migration mit typischem leiterförmigen Bandenmuster, während LOS eher schnell im Gel laufen und keine Leiterform

bilden [41, 43]. Halter et al. konnten LOS bei *T. hyodysenteriae* nachweisen [38], während Vinh et al. LPS bei *L. interrogans* nachweisen konnten [35-37].

Da es sich bei *B. burgdorferi* auch um ein gram-negatives Bakterium handelt, wurde auch hier die Präsenz eines LPS vermutet. Beck et al. [46] konnten ein LPS mit Lipid A und KDO bei *B. burgdorferi* nachweisen. Diese Ergebnisse konnten von Takayama [39], Eiffert [44] und Cinco [40] nicht bestätigt werden. Diese Autoren fanden weder Lipid A noch KDO und auch sonst keine typischen Merkmale von bakterieller LPS. Sie beschrieben aber alle eine antigene Lipidfraktion, die im SDS-PAGE eine schnelle Migration zeigte, aber sonst keine Attribute von LPS aufwies. Cinco beschrieb diese Fraktion als LOS, aber auch diese Bezeichnung wurde verworfen, da typische Merkmale von LOS nicht nachgewiesen werden konnten. . Mittlerweile hat sich die Bezeichnung und die Existenz einer antigenen *LPS-like* Fraktion etabliert. Auch mittels unserer biochemischen Analysen konnten wir kein LPS bei *B. burgdorferi* nachweisen und somit die Ergebnisse von Takayama bestätigen. Bei der zuvor beschriebenen *LPS-like* Fraktion handelte es sich wahrscheinlich um unsere extrahierte Lipidfraktion von *B. burgdorferi* mit den beiden antigenen Galaktolipiden.

Galaktose war das einzige nachweisbare Monosaccharid im Lipidextrakt von *B. burgdorferi*. Eiffert [44] berichtete über den Nachweis von anderen Kohlenhydraten und Aminoalkoholen wie Glukose, Rhamnose, Mannose, Glukosamin, Galaktosamin oder Ethanolamin im Lipidextrakt von *B. burgdorferi*. Diese Resultate konnten wir nicht bestätigen. Diese Diskrepanz der beiden Analysen könnten bedingt sein durch die unterschiedlichen angewandten Extraktionsverfahren. Die in dieser Studie eingesetzten Extraktions- und Aufreinigungsmethoden führten zu einer hochgereinigten Lipidfraktion, dadurch konnten Fehlanalysen durch proteinöse Bestandteile des Bakteriums oder störende Substanzen aus dem Medium weitgehend eliminiert werden.

Das apparente Molekulargewicht der *LPS-like* Fraktion wurde von Beck [46] und Eiffert [44] bei 4 kDa beschrieben, während Cinco [40] ein Molekulargewicht von etwa 11 kDa feststellte. Mit unseren massenspektrometrischen Untersuchungen konnten wir zeigen, daß das apparente Molekulargewicht zwischen 778 und 838 Da liegt und somit viel kleiner ist als es von den anderen Arbeitsgruppen vermutet wurde. Aufgrund des kleinen Molekulargewichts wandert die Lipidbande in der SDS-PAGE schnell und an der Front von Bromthymolblau. Dadurch kann das Lipid unter chromatographischen Standardbedingungen leicht aus dem Gel wandern und später nicht mehr auf den Immunoblots detektiert werden. Somit ist es nachvollziehbar, daß viele Arbeitsgruppen dieses niedermolekulare Antigen zuvor in ihren Immunoblots nicht bemerkt hatten.

Wir konnten zeigen, daß es sich bei dem Kohlenhydratanteil der beiden Glykolipide um terminale α -gebundene Galaktose handelte. Um die Wichtigkeit der α -gebundenen Galaktose für die Antikörperbindung darzustellen, wurde die Galaktose mittels Perjodat-Oxidation zerstört. Immunologische Untersuchungen auf HPTLC-Platten vor der Perjodat-Behandlung zeigten positive Reaktionen der beiden Glykolipide mit Seren von Lyme Borreliose Patienten, während nach der Perjodat-Behandlung eine Immunreaktion der Seren mit den Glykolipiden nicht mehr nachweisbar war. Dieses Ergebnis verdeutlichte die Bedeutung der α -gebundenen Galaktose als einzige relevante Bindungsstelle für Antikörper gegen Lipide von *B. burgdorferi* B31.

Immunologische Untersuchungen mit Seren von Patienten mit akuter, chronischer oder abgelaufener Lyme Borreliose zeigten starke positive Reaktionen aller Seren nur mit den beiden Glykolipiden, die restlichen 9 Lipidfraktionen waren an einer Immunreaktion nicht beteiligt. Dagegen zeigten Seren von Patienten in einem Frühstadium nur schwache Reaktionen mit den Glykolipiden. Seren von syphilitischen Patienten zeigten eine Reaktion weder mit den Glykolipiden noch mit den restlichen 9 Lipidfraktionen. Diese Untersuchungen verdeutlichen, daß Antikörper gegen die Glykolipide in jedem Stadium einer Borreliose vorhanden sind und auch detektiert werden können. Die Antikörper richten sich sehr spezifisch nur gegen die Glykolipide von *B. burgdorferi* und es gibt keinen Anhalt für eine Kreuzreaktivität zwischen den Lipiden von *B. burgdorferi* und *T. pallidum*. Diese Feststellungen sind sehr bedeutsam im Hinblick auf einen Einsatz dieser Glykolipide für die Diagnostik der Lyme Borreliose.

Die Existenz zweier immunreaktiver Lipide von *B. burgdorferi* wurde auch von Wheeler [45] beschrieben und mit F1 und F2 benannt, eine chemische Analyse dieser Lipide wurde allerdings nicht durchgeführt. Im Unterschied zu unseren Daten, zeigten F1 und F2 starke Kreuzreaktivität mit Antikörpern von syphilitischen Patienten, wobei die immunologischen Daten mittels eines *home-made ELISA* mit F1 und F2 (in Diethylether) als Antigen ermittelt wurden, während unsere Ergebnisse auf Immunoblots beruhen. In diesem Zusammenhang sei zu erwähnen, daß die Glykolipide aufgrund ihrer Chemie und ihrer hohen Konzentration im Gesamtlipid häufig Antikörper unspezifisch gebunden haben. Dieses Problem stellte sich uns beim Immunoblotting sowohl auf dem Immobilon-Papier auch auf HPTLC-Platten. Um die unspezifischen Bindungen zu eliminieren, haben wir die Blockierung der freien Bindungsstellen optimiert durch

- a) Blockierung mit 10%igem Kälberserum in 0.1 M EDTA
- b) Blockierung bei 4 °C und
- c) Blockierung über Nacht

Durch diese verbesserte Art der Blockierung war es möglich die unspezifischen Antikörperbindungen weitestgehend zu eliminieren.

Die nachgewiesene Kreuzreaktivität bei Wheeler [45] könnte eventuell bedingt sein durch unspezifische Antikörperbindungen je nach Wahl der Blockierungsmethode. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten aber auch zurückzuführen sein auf die jeweilige Art der Extraktion und Aufreinigung der Lipidantigene. Die Glykolipide in dieser Arbeit wurden durch eine optimierte HPTLC sehr sauber chromatographiert und anschließend über Säulenchromatographie aufgereinigt. Das Resultat war ein hochaufgereinigtes Glykolipidantigen, wodurch Fehlanalysen minimal gehalten wurden.

Die Phospholipide von *B. burgdorferi* zeigten keine Reaktionen mit Seren von Lyme Borreliose Patienten und sind somit nicht als antigen anzusehen. Auch die Phospholipide von *T. pallidum* zeigen keine Antigenität mit Ausnahme von Cardiolipin. Cardiolipin-Antikörper können bei der Syphilis im VDRL-Test nachgewiesen werden [210-214, 221]. Das Phospholipid-Hapten Cardiolipin ist alleine nicht in der Lage Antikörper zu binden, aber durch Komplexierung mit Cholesterin und Phosphatidylcholin wird dessen Antigenität verstärkt und es können sich Antigen-Antikörper-Komplexe bilden. Dieses Phänomen wird im VDRL-Test ausgenutzt, wo komplexiertes Cardiolipin als Antigen dient. Der VDRL-Test ist ein quantitativer Test, der vornehmlich zur Verlaufskontrolle der Syphilis und zur Detektion von syphilitischen Reinfektionen dient. Cardiolipin konnte bei *B. burgdorferi* nicht nachgewiesen werden, aber dafür Phosphatidylglycerol, welches chemisch gesehen ein „halbes Molekül“ Cardiolipin darstellt (Di-Phosphatidylglycerol). Einen solchen Test zur Verlaufskontrolle gibt es noch nicht bei der Lyme Borreliose. Daher wollten wir prüfen, ob es möglich ist, analog zum VDRL-Test die Antigenität der Borrelien-Phospholipide durch Komplexierung zu erhöhen und somit einen Test zur Verlaufskontrolle zu etablieren. Wir konnten zeigen, daß tatsächlich nur das komplexierte Cardiolipin mit den Syphilis Seren reagierte, während unkomplexiertes Cardiolipin und die komplexierten Borrelien-Phospholipide keinerlei Reaktion mit den Seren zeigten. Eine Steigerung der Antigenität der Borrelien-Phospholipide durch Komplexierung konnte nicht erzielt werden.

Mackworth-Young [220] beschrieb Anticardiolipin-Antikörper bei Lyme Borreliose Patienten und auch Garcia-Monco [148] konnte bei einer Vielzahl von Neuroborreliose Patienten Anticardiolipinantikörper der IgG-Klasse nachweisen. Dies Resultate konnten wir nicht bestätigen. Bei *B. burgdorferi* konnte kein Cardiolipin nachgewiesen werden und somit können bei einem Borreliose-Patienten per se auch keine Antikörper dagegen induziert werden. Auch unsere getesteten Lyme Borreliose Seren zeigten keine Reaktion mit dem

Cardiolipin von *T. pallidum*. Einen positiven Cardiolipin-Titer bei einem Borreliosepatienten konnten wir nur bei gleichzeitiger Infektion mit *T. pallidum* feststellen.

Aufgrund dieser Resultate scheint die Entwicklung eines Tests zur Verlaufskontrolle der Borreliose auf Basis von Phospholipiden eher unwahrscheinlich. Die Glykolipide eignen sich nicht als Antigene für eine Verlaufskontrolle, da sie in jedem Stadium der Lyme-Borreliose vorhanden sind und auch nach abgelaufener Borreliose noch detektiert werden können.

B. burgdorferi kann sich an viele verschiedene Zelltypen binden [209, 222, 223]. Durch diese unspezifische Adhäsionsspezifität ist der Erreger in der Lage in Gewebe verschiedenster Organe einzudringen. Eine Erklärung für diese unspezifische Adhäsion wäre, daß *B. burgdorferi* Bindungsstellen (Rezeptoren) benutzt, die auf den meisten Zellen vorhanden sind. Glykosphingolipide sind auf vielen Arten von Zellen vorhanden und spielen sowohl als Rezeptoren für Bakterien als auch bei der zellulären Signaltransduktion [224] eine wichtige Rolle.

Weller et al. [146, 147] konnten bei Patienten mit Neuroborreliose Antikörper gegen Ganglioside nachweisen. Ganglioside sind Sphingolipide mit mehreren Zuckereinheiten am C1 der Spingoid-Base und kommen in der Plasmamembran von Nervengewebszellen vor. Es wurden Antikörper hauptsächlich gegen die Ganglioside GM1, GD1b und GT1b nachgewiesen, aber auch gegen andere Ganglioside konnten Antikörper detektiert werden. Aufgrund dieser mangelnden Spezifität der Gangliosid-Antikörper war es fraglich, ob diese Gangliosid-Antikörper die Verbindung zwischen *B. burgdorferi* Infektion und Neuroborreliose darstellen.

Garcia-Monco et al. [143] konnten zeigen, daß für die Adhäsion von *B. burgdorferi* an Zelloberflächen von Neuralzellen, Galaktocerebroside (GalCer) als Bindungsstellen dienen. Dabei war die Adhärenz an GalCer häufiger als an Glukocerebroside oder Spingosin und war inhibierbar durch Anti-GalCer-Antikörper. Auch *T. phagedenis* Reiter und *B. hermsii* waren in der Lage an GalCer zu binden. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl bei Neuroborreliose Patienten als auch bei Syphilitikern IgM-Antikörper gegen Ganglioside, vornehmlich mit einer terminalen Gal (β 1-3) GalNac Sequenz (GM1, GD1b), nachweisbar waren. Es wurde vermutet, daß diese Antikörper entweder als Immunantwort auf eine Infektion des ZNS durch *B. burgdorferi* entstanden oder das Resultat einer Kreuzreaktion durch *B. burgdorferi* darstellten. Ausgehend von dieser Information immunisierten Garcia-Monco et al. [149] Laborratten sowohl mit einem nicht-proteinhaltigen Chloroform-Methanol-Extrakt (CME) von *B. burgdorferi* als auch mit nativen Glykosphingolipiden und konnten jeweils eine Antikörperproduktion feststellen. Die Lipid-Antikörper, induziert durch den CME von *B. burgdorferi*, richteten sich gegen Ganglioside, hauptsächlich Asialo-GM1 und GM1.

Umgekehrt erkannten die Antikörper, induziert durch Glykosphingolipide, antigene Determinanten von *B. burgdorferi*. Dieses Ergebnis deutete auf eine bidirektionale Kreuzantigenität zwischen Borrelienlipiden und Glykosphingolipiden. Die kreuzreagierenden Antikörper gehörten vornehmlich der IgM-Klasse an und konnten in den Ranvierschen Knoten von peripheren Nerven bei infizierten Ratten nachgewiesen werden. Diese Resultate belegen, daß die potentiell autoreaktiven Gangliosid-Antikörper einen mikrobiologischen Ursprung haben könnten. Ein solcher Zusammenhang ist für die Induktion von Antikörpern gegen GM1 nach Infektion mit *C. jejuni* bekannt [226]. Dabei stellte man fest, daß die Entstehung der kreuzreagierenden Antikörper auf das LPS von *C. jejuni* zurückzuführen war. Dessen O-Antigen wies ähnliche bzw. identische Zuckersequenzen wie GM1 auf.

In diesem Zusammen sollte erwähnt werden, daß bei einer Vielzahl von Patienten mit einem Guillain-Barre-Syndrom und nachweisbaren Anti-GM1-Antikörpern, anamnestisch eine Infektion mit *C. jejuni* vorgelegen hatte [227].

Im Fall von *B. burgdorferi* könnten die kreuzreagierenden Antikörper, welche sich speziell gegen Ganglioside mit terminaler Galaktose richten, auf die in dieser Studie nachgewiesenen Glykolipide zurückzuführen sein. Wir konnten zeigen, daß es sich bei den Glykolipiden um α -Galaktosylglycerolipide handelte, die antigen waren und die Antigenität auf die Galaktose zurückzuführen war. Die Galaktolipide könnten also der Ursprung für die kreuzreagierenden Gangliosid-Antikörper sein und damit indirekt eine Rolle bei der Pathogenese der Neuroborreliose spielen. Sie scheinen aber nicht nur bei dieser mehr autoreaktiven Entwicklung der Neuroborreliose eine Rolle zu spielen, sondern könnten auch direkt bei der lokalen Entzündung von neuronalen Zellen beteiligt sein.

B. burgdorferi kann sich an Neurone, Glia- und Schwannsche Zellen anheften [176, 222]. Als spezifische Bindungsstelle ist Galaktocerebrosid anzusehen, ein Glykophingolipid, welches die Hauptkomponente bei Myelin darstellt. Unbekannt dagegen ist bisher der entsprechende Rezeptor bei *B. burgdorferi*. Aufgrund der Bindung an Galaktocerebroside, müßte es sich bei dem Rezeptor nach Meinung von Kaneda et al. [139] um ein Ceramidmonohexosid handeln. Bisher konnten 3 Proteine gefunden werden, die eine Rolle bei der Bindung an Glykosphingolipiden spielen: das 67 kDa Protein, 62 kDa Hsp60 und das 41 kDa Flagellin. Die Oberflächenlipoproteine OspA, OspB und OspC scheinen bei der Adhäsion an Glykosphingolipiden keine Rolle zu spielen [139]. Nach Adhäsion von *B. burgdorferi* an Oligodendroglia- oder Schwannschen Zellen können diese IL-6 und TNF- α produzieren und so eine lokale Entzündung mit Verletzung der neuronalen Zellen hervorrufen [176, 225].

Das Galaktolipid könnte aber auch direkt durch Aktivierung von Makrophagen eine Entzündung der Gliazellen hervorrufen. Eine solche Makrophagenaktivierung ist für die Lipide von *Borrelia burgdorferi* schon nachgewiesen [228].

Die Glykolipide von *B. burgdorferi* scheinen aber nicht nur bei der Pathogenese der Neuroborreliose eine Rolle zu spielen, sondern könnten auch bei der Entstehung der Arthritis beteiligt sein. Erst kürzlich fanden Kaneda et al. Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Galactoceramidbindung bei der Induktion einer Arthritis durch Borrelien [145].

Die in dieser Studie erstmalig chemisch identifizierten Galaktolipide scheinen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Lyme Borreliose zu spielen. Weiterführende Arbeiten in unserem Labor haben gezeigt, daß alle Spezies der Gattung *Borrelia burgdorferi* sensu lato identische Galaktolipide aufwiesen. Aufgrund dieser Präsenz in den getesteten *B. burgdorferi* Stämmen und der fehlenden Kreuzreaktivität zu *T. pallidum*, könnten diese Galaktolipide als Antigene in der Diagnostik der Lyme Borreliose und als potentielle Kandidaten für eine Vakzine eingesetzt werden.