

Untersuchungen zu den Glycolipiden von *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose, und deren Verwendung in der Serodiagnostik sowie als  
Impfstoff

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Dipl.-Chem. **Gunthard Stübs**  
aus Greifswald

**Berlin · 2010**

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ralf R. Schumann  
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Ulrich Reißig

Tag der Disputation: 20. Dezember 2010

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Berlin-Mitte) in der Arbeitsgruppe von Prof. Ralf Schumann angefertigt.

Die Experimente wurden in der Zeit von September 2005 bis Februar 2006 sowie von August 2007 bis Oktober 2009 dort und gastweise von März 2006 bis Juli 2007 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (Berlin-Buch) in der Arbeitsgruppe von Prof. Jörg Rademann durchgeführt.



# Inhaltsverzeichnis

Danksagung	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
Zusammenfassung	1
Abstract (in English)	3
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Kurze Geschichte der Lyme-Borreliose	5
1.2 Der Erreger – <i>Borrelia burgdorferi</i>	6
1.2.1 Morphologie	7
1.2.2 Taxonomie	7
1.2.3 Lebensraum	9
1.2.4 Kultivierung	9
1.3 Die Infektion mit Lyme-Borreliose	10
1.3.1 Vektor	10
1.3.2 Reservoir	10
1.3.3 Übertragung	11
1.3.4 Ausbreitung	11
1.4 Lyme-Borreliose	11
1.4.1 Klinik	11
1.4.2 Diagnostik	14
1.4.3 Therapie	15
1.4.4 Prophylaxe	15
1.4.5 Epidemiologie	16
1.5 Rückfallfieber	17
1.6 Lipide	17
1.6.1 Glycerolipide	18
1.6.2 Sphingolipide	18
1.6.3 Steroide	18
1.6.4 Lipide von Spirochäten	19
1.7 Lipoproteine und Pathogenitätsfaktoren	20
1.7.1 Bakterielle Lipoproteine	20
1.7.2 Lipoproteine von <i>B. burgdorferi</i>	21
1.7.3 Pathogenitätsfaktoren und Wirtsinteraktion	21

1.8	Immunsystem	22
1.8.1	Angeborenes Immunsystem	23
1.8.2	Erworbenes Immunsystem	24
1.8.3	Impfstoffentwicklung gegen Lyme-Borreliose	27
<b>2</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>Materialien, Methoden und Reaktionen</b>	<b>31</b>
3.1	Biologische Materialien und Methoden	31
3.1.1	Bakterienstämme	31
3.1.2	Borrelienkultivierung	32
3.1.3	Borrelienmedienadaptierung	32
3.1.4	Boreliolyse	32
3.1.5	Gesamtlipidextraktion	33
3.1.6	Zellkultur	33
3.1.7	Zellstimulationen	34
3.1.8	Zytokin-ELISA	34
3.1.9	Proteinbestimmung	35
3.1.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.1.11	Patientenseren	36
3.1.12	Immunisierungen von Versuchstieren	37
3.1.13	Western-Blots	38
3.1.14	Dot-Blots	39
3.1.15	Dünnschichtchromatogramm-Blots	41
3.1.16	Line-Blots	41
3.1.17	Indirekter ELISA mit ACGal-Seren	41
3.1.18	Affinitätschromatographie	42
3.1.19	Radioaktiver Enzymtest	42
3.1.20	Indirekter Immunofluoreszenztest	42
3.2	Chemische Methoden und Reaktionen	43
3.2.1	Dünnschichtchromatographie	44
3.2.2	Säulenchromatographie	45
3.2.3	Gaschromatographie/Massenspektrometrie	45
3.2.4	Kernresonanzspektroskopie	46
3.2.5	Massenspektrometrie	47
3.2.6	Synthese von Cholesteryl- $\beta$ -D-Galactopyranosid	48
3.2.7	Synthese der Acetonoximester	50
3.2.8	Regioselektive Acylierung der Galactopyranoside	53
3.2.9	Schützung und Entschützung der Mercaptogruppe	60
3.2.10	Konjugation von ACGal an Trägerproteine	62
3.2.11	Bromcyanspaltung	64
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>65</b>
4.1	Chemische Strukturanalyse der Borrelienlipide	65
4.1.1	Strukturanalyse der Gesamtlipide von <i>B. burgdorferi</i>	65
4.1.2	Vergleichende Analyse der Gesamtlipide von vier Borrelienarten	72

4.2	Glycosyltransferaseaktivität . . . . .	77
4.3	Erkennung durch das angeborene Immunsystem . . . . .	78
4.3.1	Aktivierung von Makrophagen . . . . .	78
4.3.2	TLR-2 Abhängigkeit . . . . .	79
4.4	Serologie mit natürlichen Borrelienlipiden . . . . .	80
4.4.1	Identifizierung der Lipid-Antigene . . . . .	80
4.4.2	Bestimmung der Antikörperfrequenz in LB-Patienten . . . . .	80
4.4.3	Bestimmung der Antikörpertiter in den ACGal-positiven Seren . . . . .	82
4.4.4	Serologischer Nachweis von ACGal in weiteren Borrelienarten . . . . .	83
4.5	Synthese von ACGal und Serologie mit Humansen . . . . .	84
4.5.1	Synthese von Cholesterylgalactosid . . . . .	84
4.5.2	Regioselektive Acylierung von Cholesterylgalactosid . . . . .	85
4.5.3	Bestätigung der Antigenität . . . . .	87
4.5.4	Synthese einer Glycolipidbibliothek . . . . .	88
4.5.5	Erkennung der Glycolipide durch Humansen . . . . .	90
4.5.6	Synthese eines funktionalisierten ACGal . . . . .	92
4.6	Konjugation von ACGal, Immunisierung, Serologie . . . . .	94
4.6.1	Konjugation von ACGal an Trägerproteine . . . . .	95
4.6.2	Immunisierung von Versuchstieren . . . . .	99
4.6.3	Erkennung der Glycolipide durch Kaninchensen . . . . .	100
4.7	Indirekte Immunofluoreszenz . . . . .	102
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>105</b>
5.1	Analytik der Borrelienlipide . . . . .	105
5.1.1	Glycolipide . . . . .	106
5.1.2	Neutral- und Phospholipide . . . . .	108
5.2	Synthese der Glycolipide und Konjugation . . . . .	109
5.2.1	Synthese von acyliertem Cholesterylgalactosid . . . . .	109
5.2.2	Synthese einer Glycolipidbibliothek . . . . .	111
5.2.3	Funktionalisierung von ACGal . . . . .	112
5.2.4	Konjugation an Trägerproteine . . . . .	113
5.3	Biologische Aktivität der Glycolipide . . . . .	114
5.3.1	Einsatz der unterschiedlichen serologischen Methoden . . . . .	114
5.3.2	Erkennung durch Antikörper in Patientensen . . . . .	116
5.3.3	Generierung von Antikörpern in Versuchstieren . . . . .	119
5.3.4	Erkennung durch Antikörper in Tierensen . . . . .	120
5.3.5	Definition des ACGal-Epitops . . . . .	121
5.3.6	Interaktionen mit zellulären Rezeptoren . . . . .	123
5.4	Mögliche Verwendung von ACGal . . . . .	125
5.4.1	Verwendung von ACGal in der Serodiagnostik . . . . .	125
5.4.2	Verwendung von ACGal als Impfstoff . . . . .	126
<b>6</b>	<b>Ausblick</b> . . . . .	<b>129</b>

<b>A NMR-Spektren</b>	<b>133</b>
A.1 NMR-Spektren der natürlichen Strukturen . . . . .	133
A.2 NMR-Spektren der synthetischen Strukturen . . . . .	139
<b>B Massenspektren</b>	<b>145</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>151</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>167</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>171</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	<b>173</b>
<b>Stichwortverzeichnis</b>	<b>175</b>



# Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken bei:

- Prof. Dr. Ralf Schumann, Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité, und PD Dr. Nicolas Schröder, heute Institut für Neuropathologie der Charité, für die Stellung des Themas sowie die Betreuung und Unterstützung der Arbeit insgesamt
- Prof. Dr. Jörg Rademann, heute Universität Leipzig, für die Betreuung der chemisch-synthetischen Arbeiten in seinem Labor am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (Berlin) und die Mitbegutachtung
- Prof. Dr. Ulrich Zähringer, Forschungszentrum Borstel – Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften (Borstel), für die Betreuung der chemisch-analytischen Arbeiten, zum Teil in seinem Labor
- Prof. Dr. Hans-Ulrich Reißig, Freie Universität Berlin, für die Übernahme des Zweitgutachtens

*an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin*

- den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schumann: Fränzi, Diana, Jana, Linn, Evelyn, Doreen, Lutz, Dirk und allen anderen
- Dr. Janine Zweigner, heute Institut für Hygiene und Umweltmedizin, für Proben, Hinweise, interessante Diskussionen und das Korrekturlesen der Einleitung
- Dr. Annette Moter, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, und den Mitarbeitern ihrer Gruppe – Anne, Kathrin, Julia und Judith – für Hinweise zu den Borrelien und Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie
- den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Göbel / Bereswill: Gernot, André und Stefan
- Prof. Dr. Rüdiger Schade, Institut für Pharmakologie, für alle Immunisierungen und die Blutentnahmen der Kaninchen; ebenso Christiane Sprang für die Blutentnahmen der Mäuse
- Dr. Peter Henklein, Institut für Biochemie, für wertvolle Hinweise zur Konjugation

*am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin-Buch*

- den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Medizinische Chemie (J. Rademann): Liudmilla, Viviane, Marco, Johannes, Samuel und anderen
- Dr. Eberhard Krause und Heike Stephanowitz, Arbeitsgruppe Massenspektrometrie, für die MALDI-Messungen der ACGal-Konjugate

- Dr. Bernd Rupp, Arbeitsgruppe Drug Design, für das ACGal-Modelling  
*am Forschungszentrum Borstel – Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften (FZB), Borstel*
- den Mitarbeitern der Laborgruppe Immunchemie (U. Zähringer): Hermann Moll (GLC/MS-Messungen), Heiko Käßner (NMR-Messungen), Dr. Kai Schmengler, Dr. Christian Alexander und allen anderen
- PD Dr. Buko Lindner für die MALDI-Messungen
- PD Dr. Sabine Gronow, heute DSMZ Braunschweig, und Irina von Cube für die Einführung in das DC-Blotting
- Prof. Dr. Bettina Wilske und Dr. Volker Fingerle, Nationales Referenzzentrum für Borrelien (Oberschleißheim), für die Bereitstellung von LB-Patientenseren, die Kultivierung einiger Borrelienstämme und viele Ratschläge
- Dr. Dirk Warnecke, Universität Hamburg, für Glycolipidstandards, das gemeinsame Experiment zur Glycosyltransferaseaktivität und viele Hinweise
- Prof. Dr. Sebastian Joyce, Vanderbilt University (Nashville, TN, USA) für die Untersuchung der Glycolipide mit NKT-Zellen
- Dr. Evelyn Rossmann und Dr. Michael Bechtel, Fa. Genzyme Virotech (Rüsselsheim), für die ACGal-Testung und die interessante Zusammenarbeit
- Dr. Sven Augner, Fa. Bruker (Karlsruhe), für die Bereitstellung einer TopSpin-Lizenz
- dem Direktor des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene, Prof. Dr. Dr. Ulf Göbel, für die Möglichkeit, in diesem historischen Haus arbeiten zu können
- Herrn Müller und Herrn Günther für die Betreuung der Datentechnik bzw. die Erfüllung fast aller Wünsche
- meinen Eltern, Dres. Jürgen † und Renate Stübs, für ihre stete Unterstützung und das Korrekturlesen des Manuskripts

# Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans (LB-Manifestation) (s. 1.4.1.3, S. 14)
ACG	6- <i>O</i> -Acyl-cholesteryl- $\beta$ -D-glycopyranosid (ACGal und/oder ACGlc)
ACGal	6- <i>O</i> -Acyl-cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid (Glycolipid) (s. 4.1.1.3, S. 67)
ACGal-BSA	Konjugat von ACGal an BSA (s. 3.2.10.2, S. 62)
ACGal-KLH	Konjugat von ACGal an KLH (s. 3.2.10.1, S. 62)
ACGal-OVA	Konjugat von ACGal an OVA (s. 3.2.10.2, S. 63)
ACGlc	6- <i>O</i> -Acyl-cholesteryl- $\beta$ -D-glucopyranosid (Glycolipid) (s. 4.1.2.4, S. 74)
ACN	Acetonitril (Lösungsmittel)
AcOH	Essigsäure bzw. Eisessig
AG	Antigen(e) (Strukturen, die von Antikörpern gebunden werden)
AK	Antikörper (Immunglobulin, i. A. IgG) (s. 1.8.2.3, S. 26)
AMeGal	Methyl-6- <i>O</i> -(15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid <b>20</b> (s. 3.2.8.8, S. 59)
AP	alkalische Phosphatase (Enzym)
APC	Antigenpräsentierende Zelle (s. 1.8.2.2, S. 25)
APhGal	Phenyl-6- <i>O</i> -(15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid <b>21</b> (s. 3.2.8.9, S. 60)
AU	absorption unit, Absorptionseinheiten
B.	<i>Borrelia</i> (Spirochätengattung) (s. 1.2.2, S. 7)
Baf	<i>Borrelia afzelii</i> (Borrelienart) (s. 1.2.2.1, S. 8)
Bba	<i>Borrelia bavariensis</i> (Borrelienart) (s. 1.2.2.1, S. 8)
Bbu	<i>Borrelia burgdorferi</i> s. s. (Borrelienart) (s. 1.2.2.1, S. 7)
BCA	Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) (Komplexbildner)
BCIP <sup>®</sup>	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (AP-Substrat)
Bga	<i>Borrelia garinii</i> (Borrelienart) (s. 1.2.2.1, S. 8)
Bhe	<i>Borrelia hermsii</i> (Borrelienart) (s. 1.5, S. 17)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl (Schutzgruppe)
BrCN	Bromcyan (Proteinspaltreagenz)
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin (Protein)
BSK-H	Barbour-Stoener-Kelly Medium (Borrelienmedium) (s. 1.2.4, S. 9)

BuOH	Butanol, als <i>n</i> -BuOH oder <i>tert</i> -BuOH
CD	cluster of differentiation, z. B. CD1d, CD14 (Oberflächenprotein von Zellen)
CGal	Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid (Glycolipid) (s. 4.1.1.6, S. 69)
CGlc	Cholesteryl- $\beta$ -D-glucopyranosid (Glycolipid) (s. 4.1.1.5, S. 68)
Cho	Cholesterol (Steroid)
COSY	correlation spectroscopy (NMR-Spektrum)
CV	column volume, Säulenvolumen
Cy3	Carbocyanin 3 (Fluoreszenzfarbstoff, $\lambda_{\text{Ex}} = 550 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{Em}} = 570 \text{ nm}$ [rot])
Cys	Cystein (Aminosäure)
Cys-BSA	Konjugat von Cystein an BSA (s. 3.2.10.2, S. 62)
Cys-OVA	Konjugat von Cystein an OVA (s. 3.2.10.2, S. 63)
d	Dublett (Multiplizität eines NMR-Signals)
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol (Lipidanker)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff, $\lambda_{\text{Ex}} = 358 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{Em}} = 461 \text{ nm}$ [blau])
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (basisches Reagenz)
DC	Dendritische Zellen (s. 1.8.1.1, S. 23)
DC	Dünnschichtchromatogramm (Analyseplatte der Dünnschichtchromatographie) (s. 3.2.1, S. 44)
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid (Veresterungsreagenz)
DCM	Dichlormethan (Lösungsmittel)
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer 135° (NMR)
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure (MALDI-Matrix)
DMAP	4-Dimethylamino-pyridin (Katalysator)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Zellkulturmedium)
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid (Lösungsmittel)
DMSO	Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitrothiophenyl (Schutzgruppe)
DQF-COSY	double quantum filtered correlated spectroscopy (NMR-Spektrum)
DTT	1,4-Dithiothreitol (Reduktionsmittel)
ECL	enzymatische Chemolumineszenz (Detektionsverfahren) (s. 3.1.13, S. 39)
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (Veresterungsreagenz)
EE	Essigsäureethylester (Lösungsmittel)

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (antikörperbasierte Messmethode) (s. 3.1.8, S. 34)
EM	Erythema migrans, Wanderröte (LB-Manifestation) (s. 1.4.1.1, S. 12)
ESI	Elektrospray-Ionisation (Ionisierungsverfahren für MS)
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
FA	fatty acid, Fettsäure (Monocarbonsäure)
FCA	Freund's Complete Adjuvant (Immunmodulator)
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FICA	Freund's Incomplete Adjuvant (Immunisierungshilfsstoff)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff, $\lambda_{\text{Ex}} = 492 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$ [grün])
G418	Geneticin <sup>TM</sup> (Aminoglycosidantibiotikum)
Gal	Galactose (Monosaccharid)
Glc	Glucose (Monosaccharid)
GLC/MS	gas-liquid chromatography / mass spectrometry (Analyseverfahren) (s. 3.2.3, S. 45)
Gro	Glycerol (Propantriol)
HEK-293	human embryonic kidney cells, menschliche embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Puffer)
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence (NMR-Spektrum)
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence (NMR-Spektrum)
HPTLC	High performance thin-layer chromatography, Hochleistungsdünnschichtchromatographie (Trennverfahren) (s. 3.2.1.2, S. 44)
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase (Enzym)
HV	Hochvakuum (eigentlich Feinvakuum)
i. p.	intraperitoneal, in die Bauchhöhle (Injektionsmethode)
i. v.	intravenös, in eine Vene (Injektionsmethode)
IF	Immunofluoreszenz (antikörperbasiertes Visualisierungsverfahren) (s. 3.1.20, S. 42)
IFN	Interferon, als IFN- $\gamma$ (Zytokin) (s. 1.8.1.3, S. 24)
IgG	Immunglobulin G (Antikörperklasse) (s. 1.8.2.3, S. 26)
IgM	Immunglobulin M (Antikörperklasse) (s. 1.8.2.3, S. 26)
IL	Interleukin, als IL-1 oder IL-8 (Zytokin) (s. 1.8.1.3, S. 24)
iNKT	invariant natural killer t-(cell) (T-Zelltyp)
kat.	katalytisch
KG60	Kieselgel mit 60 Å Porengröße
KLH	keyhole limpet hemocyanin (Trägerprotein)
LA	Lyme Arthritis (LB-Manifestation) (s. 1.4.1.3, S. 13)

LB	Lyme-Borreliose (s. 1.4, S. 11)
LC/MS	Liquid chromatography / mass spectrometry (Analyseverfahren)
LCB	Lymphadenosis cutis benigna (LB-Manifestation) (s. 1.4.1.2, S. 12)
LM	Lösungsmittel
LP	Lipoprotein oder Lipopeptid (s. 1.7.1, S. 20)
LPS	Lipopolysaccharid (Lipid gramnegativer Bakterien)
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization (Ionisierungsverfahren für MS)
Me	Methyl
MEM	multiple Erythema migrantia (LB-Manifestation) (s. 1.4.1.2, S. 13)
MeOH	Methanol
MGalD	Mono- $\alpha$ -D-galactopyranosyldiacylglycerol (Glycolipid) (s. 4.1.1.4, S. 68)
Mostain	molybdenum stain, Molybdänfärbung (DC-Färbung) (s. 3.2.1.3, S. 44)
MS	Massenspektrometrie (Analyseverfahren) (s. 3.2.5, S. 47)
n. det.	nicht detektierbar
NB	Neuroborreliose (LB-Manifestation) (s. 1.4.1.2, S. 12)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (AP-Reagenz/Verstärker)
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid (Aktivierungsgruppe für Carbonsäuren)
NKT	natural killer t-(cell) (T-Zelltyp) (s. 1.8.2.1, S. 25)
NMR	nuclear magnetic resonance, Kernresonanz(spektroskopie) (Analyseverfahren) (s. 3.2.4, S. 46)
NRZ	Nationales Referenzzentrum (hier für Borrelien in München)
NZW	New Zealand white (Kaninchenrasse)
OD	optische Dichte
Osp	outer-surface protein, z.B. OspA (Oberflächenprotein) (s. 1.7, S. 20)
OT	Objektträger
OVA	Ovalbumin (Protein)
p. o.	peroral, durch den Mund
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Trennverfahren für Proteine) (s. 3.1.10, S. 35)
Pam3Cys	synthetisches dreifachacyliertes LP (TLR-2-Ligand)
PBS	phosphate-buffered saline, phosphat-gepufferte Salzlösung pH 7,4
PC	Phosphatidylcholin (Phospholipid) (s. 1.6.1, S. 18)
PG	Phosphatidylglycerol (Phospholipid) (s. 1.6.1, S. 18)
Ph	Phenyl
PTFE	Polytetrafluorethylen, Teflon <sup>®</sup> (fluorierter Kohlenwasserstoff)
PVDF	Polyvinylidenfluorid (fluorierter Kohlenwasserstoff)
q	Quartett (Multiplizität eines NMR-Signals)

RAW 264.7	murine monozytäre Makrophagenzelllinie
RF	relapsing fever, Rückfallfieber (s. 1.5, S. 17)
RP	reverse phase, Umkehrphase (Chromatographiematerial)
RPMI-1640	(Roswell Park Memorial Institute) chemisch definiertes, hydrogencarbonat-gepuffertes Medium
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (Multiplizität eines NMR-Signals)
s. l.	sensu lato, im weiteren Sinn (s. 1.2, S. 6)
s. s.	sensu stricto, im engeren Sinn (s. 1.2.2.1, S. 7)
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat (anionisches Detergenz)
SEM	standard error of the mean, Standardabweichung
SMCC	4-( <i>N</i> -Maleimidomethyl)cyclohexancarbonsäure <i>N</i> -hydroxysuccinimidester (heterobifunktionales Verknüpfungsreagenz)
t	Triplett (Multiplizität eines NMR-Signals)
T.	<i>Treponema</i> (Spirochätengattung) (s. 1.2.2, S. 7)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (Reduktionsmittel)
TEA	Triethylamin (basisches Lösungsmittel)
TEMED	Tetramethylethylendiamin (Polymerisationskatalysator)
TFA	Trifluoroacetic acid, Trifluoressigsäure (organische Säure)
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon (MALDI-Matrix)
THF	Tetrahydrofuran (Lösungsmittel)
TLR	Toll-like Receptor (Mustererkennungszepetor) (s. 1.8.1.2, S. 24)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Peroxidasesubstrat)
TMS	Tetramethylsilan (NMR-Standard/Referenz)
TMSOTf	Trimethylsilyl-trifluormethansulfonat (Lewis-Säure)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$ (proinflammatorisches Zytokin) (s. 1.8.1.3, S. 24)
TOCSY	total correlated spectroscopy (NMR-Spektrum)
TOF	time-of-flight, Flugzeit (MS-Analyseverfahren)
TOF/TOF	Tandem-Massenspektrometrie (MS-Verfahren)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Puffersubstanz)
Tween <sup>®</sup> 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (nichtionisches Tensid)
UV	ultraviolett
v	Volumen
w	weight, Gewicht
WB	Western-Blot (antikörperbasiertes Analyseverfahren für Proteine) (s. 3.1.13, S. 38)
äq.	Äquivalente





# Zusammenfassung

Lyme-Borreliose (LB) ist eine Infektionskrankheit, deren Erreger einige Bakterienarten aus der taxonomischen Gruppe *Borrelia burgdorferi* sensu lato („im weiteren Sinn“) sind. Die Diagnose erfolgt aufgrund der klinischen Manifestationen und einer bestätigenden Serologie. Die Serodiagnostik und die Impfstoffentwicklung werden durch die Heterogenität der Proteinantigene zwischen und teilweise innerhalb der Bakterienarten vor große Herausforderungen gestellt. Ein Impfstoff gegen LB ist weder aktuell verfügbar, noch in Aussicht.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Glycolipide von *B. burgdorferi* sensu lato eingehend zu analysieren und auf ihre Einsetzbarkeit für beide medizinischen Anwendungen hin zu untersuchen. Es wird dargelegt, dass die verschiedenen Arten unabhängig von ihrer Pathogenität die gleichen Glycolipide aufweisen und diese etwa 13 % der Borrelientrockenmasse ausmachen. Die Glycolipide der drei klinisch wichtigsten Pathogene wurden isoliert, chromatographisch aufgereinigt, quantifiziert und chemisch mittels GLC/MS, NMR und MALDI-TOF analysiert. Die dominierende Struktur ist Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ACGal), das fast die Hälfte der Glycolipide und damit 5-6 % des Borreliengewichtes ausmacht. Jeweils etwa ein Viertel stellen Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid (CGal) sowie Mono- $\alpha$ -D-galactosyldiacylglycerol (MGalD) und ein kleiner Anteil ist Cholesteryl- $\beta$ -D-glucopyranosid (CGlc). Sowohl ACGal als auch CGal sind innerhalb von Bakterien und Tieren einmalige Strukturen. Experimente mit Zellkulturen zeigten, dass keines der Glycolipide von den Toll-like-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt wird. Eine Untersuchung der Gesamtlipide mit LB-Patientenseren identifizierte dagegen ACGal und MGalD als Antigene des erworbenen Immunsystems. Die Analyse dieser beiden isolierten Antigene mit 174 LB-Patientenseren mittels Dot-Blots oder Line-Blots ergab, dass im Spätstadium der LB 83 % bzw. 63 % der Seren Antikörper gegen ACGal mit Titern bis 1:32 000 aufwiesen. Der eng verwandte Erreger des Rückfallfiebers, *Borrelia hermsii*, verfügt dagegen statt ACGal über Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-glucopyranosid, das von LB-Seren nicht erkannt wird. Ebenso ist die Spezifität von ACGal bei oft kreuzreagierenden Seren anderer Erkrankungen sehr gut. ACGal kann daher zusätzlich zu den Proteinantigenen zur Verbesserung von kommerziellen Borrelien-Serodiagnostik-Kits eingesetzt werden und wird von einer Firma bereits verwendet.

Um die Eignung von ACGal als Impfstoff zu untersuchen, wurde ein effizienter chemisch-enzymatischer Syntheseweg konzipiert und erprobt. Dabei wurde CGal zunächst mittels der Trichloracetimidatmethode dargestellt und dann mittels einer Lipase regioselektiv zum ACGal acyliert. Diese Vorgehensweise wurde zum Aufbau einer Glycolipidbibliothek mit diversen ACGal-Derivaten verwendet, die zur Bestimmung des Epitops der Anti-ACGal-Antikörper in den LB-Patientenseren diente. Die Kenntnis des

antigenen Epitops ermöglichte wiederum die Synthese eines funktionalisierten ACGal. Für den dabei verwendeten  $\omega$ -Mercaptoacyl-Rest wurde eine einfache Schützungs- und Entschützungs- mit der flüchtigen Thioethylgruppe etabliert. Zur Konjugation des hydrophoben, funktionalisierten ACGal an hydrophile Trägerproteine wurde eine neue Methode entwickelt, die reproduzierbar hohe Beladungsgrade erzielt. Mit diesen immunogenen ACGal-Konjugaten wurden Kaninchen erfolgreich immunisiert und die generierten Antikörper mittels Immunoblots charakterisiert. Die bestimmten Antikörpertiter unterschieden sich zwischen den ACGal-Derivaten und erreichen Werte von 1:128 000 für natives ACGal und 1:512 000 für kurzkettige, artifizielle ACGal-Derivate, wobei das Epitop mit dem der humanen Antikörper übereinstimmt. Mittels Immunofluoreszenz wurde gezeigt, dass die Antiseren an intakte Borrelien binden und das Epitop somit für Antikörper zugänglich scheint. Nicht mehr untersucht wurde, ob die Antikörper die Borrelien opsonieren oder sogar abtöten können. In noch ausstehenden Tierversuchen muss geklärt werden, ob eine Impfung mit ACGal-Konjugat vor einer Infektion mit *B. burgdorferi* schützen kann.

# Abstract

Lyme Disease (LD) is an infectious disease caused by several bacterial species of the taxonomic group of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (“in a wider sense”). The diagnosis is based on clinical manifestations and confirmed by serology. However, serodiagnostics as well as the development of a vaccine are hampered by the heterogeneity of the protein antigens between or even within the bacterial species. A vaccine is neither available today nor foreseeable.

The aim of this work was to analyze and evaluate the glycolipids of *B. burgdorferi* sensu lato for both medical applications. It is shown that different species possess identical glycolipids independent of their pathogenicity accounting for approx. 13 % of the cellular dry weight. The glycolipids of the clinically most relevant species were isolated, separated by column chromatography, quantified and analyzed by GLC/MS, NMR, and MALDI-TOF. The dominant structure is cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ACGal) representing nearly half of the glycolipids and therefore 5-6 % of the borrelial mass. About one quarter of the glycolipids are composed of cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranoside (CGal) and mono- $\alpha$ -D-galactosyldiacylglycerol (MGalD), and a minor proportion constitutes cholesteryl- $\beta$ -D-glucopyranoside (CGlc). ACGal as well as CGal are unique structures within the bacteria and the animal kingdom. Experiments with cell cultures revealed that none of the glycolipids is recognized by toll-like receptors of the innate immune system. However, screening of the total lipids with LD patient sera identified ACGal and MGalD as antigens of the adaptive immune system. Subsequent analyzes of both antigens with 174 LD patient sera using dot-blots or line-blots demonstrated the highest seroprevalence in the late stage of disease. Then 83, and 63 % respectively of the sera contained antibodies against ACGal with titers up to 1:32,000. On the other hand the closely related causative agent of tick-borne relapsing fever, *Borrelia hermsii*, instead of ACGal contains cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-glucopyranoside that is not recognized by LD sera. Also, the specificity of ACGal for cross-reacting sera of patients with other diseases is excellent. Taken together, ACGal can be employed in addition to proteinacious antigens to improve commercial *Borrelia* serodiagnostics kits and one company is currently pursuing this.

To assess the use of ACGal as a vaccine, an efficient chemo-enzymatic synthesis route was established. First, CGal was prepared by the trichloroacetimidate method. Next it was acylated regioselectively to ACGal by lipase. This approach was utilized to build a glycolipid library consisting of diverse ACGal derivatives to determine the epitope of the anti-ACGal antibodies in LD patient sera. Knowledge of the antigenic epitope enabled the synthesis of a functionalized ACGal molecule. For the employed  $\omega$ -mercaptoacyl residue a simple protection and deprotection strategy was developed using the evaporable thioethyl protecting group. This allows the conjugation of ACGal

to immunogenic carrier proteins. To achieve high conjugation grades in a reproducible fashion a new method was designed to bring these hydrophobic and hydrophilic molecules into reaction. These ACGal conjugates were used to successfully immunize rabbits. The antibodies generated were characterized by different immunoblotting methods. The determined antibody titers varied between the ACGal derivatives and reached values of 1:128,000 for native ACGal and 1:512,000 for artificial short-chain ACGal derivatives. However, the epitope coincided with the one detected by human antibodies. Applying immunofluorescence it could be shown that the antisera bound to whole *Borrelia* and that the epitope seems to be accessible to the antibodies. It was not examined whether antibodies opsonize *Borrelia* or are capable of killing them. Furthermore, it remains to be investigated in animal experiments whether a vaccination with an ACGal conjugate is able to prevent an infection by *B. burgdorferi*.

# Kapitel 1

## Einleitung

Die Lyme-Borreliose (LB) ist die häufigste durch Zecken übertragene Krankheit des Menschen (s. 1.3, S. 10). Der Infektionserreger ist das spiralförmige Bakterium *Borrelia burgdorferi* (s. 1.2, S. 6). Die Erkrankung ist heute über die gesamte nördliche Hemisphäre verbreitet und kommt in Endemiegebieten mit einer Inzidenz von bis zu 160 Fällen pro 100 000 Einwohnern vor (s. 1.4.5, S. 16). Klinisch handelt sich um eine entzündliche, teilweise chronische Multisystemerkrankung, die in drei Stadien verläuft und viele Organe betreffen kann (s. 1.4.1, S. 11). Die Differentialdiagnose erfolgt aufgrund einer Anamnese und der Bestätigung des klinischen Verdachtsfalls durch eine Serodiagnostik (s. 1.4.2, S. 14). Wenn die LB frühzeitig erkannt wird, kann sie mit Antibiotika gut behandelt werden (s. 1.4.3, S. 15). Ein Humanimpfstoff ist nicht verfügbar (s. 1.4.4, S. 15). Die verschiedenen Manifestationen von Haut und Nervensystem wurden bereits ab 1883 beschrieben, die Ätiologie der LB konnte jedoch erst nach 100 Jahren Forschung aufgeklärt werden (s. 1.1). Seitdem waren die Lipoproteine (s. 1.7, S. 20) und deren Interaktion mit dem Immunsystem (s. 1.8, S. 22) der Forschungsschwerpunkt. Informationen zu den Glycolipiden und deren Erkennung durch das Immunsystem sind dagegen noch spärlich (s. 1.6, S. 17).

### 1.1 Kurze Geschichte der Lyme-Borreliose (LB)

Die ältesten Berichte betreffen die dermatologischen Manifestationen und datieren aus dem späten 19. Jahrhundert. Eine idiopathische Hautatrophie wurde von [Buchwald \(1883\)](#) genannt und von [Herxheimer und Hartmann \(1902\)](#) ausführlich beschrieben und als Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) bezeichnet. Das Erythema migrans (EM) wurde initial von [Afzelius \(1910, 1921\)](#), [Balban \(1911\)](#) und [Lipschütz \(1913\)](#) beschrieben und auch mit Zeckenbissen und Insektenstichen in Verbindung gebracht. Das Lymphozytom wurde von [Biberstein \(1923\)](#) und detailliert von [Bäferstedt \(1943\)](#) beschrieben, der auch den Namen Lymphadenosis benigna cutis prägte. Die Neuroborreliose (NB) wurden zuerst von [Garin und Bujadoux \(1922\)](#) berichtet und dann von [Bannwarth \(1941\)](#) umfangreich dargelegt. Durch [Hellerström \(1930\)](#) wurde ein Zusammenhang von EM und NB beschrieben. Seit den 1920er Jahren wurde bei ACA-Patienten gelegentlich über Gelenkschmerzen und -veränderungen berichtet ([Jessner, 1921](#)), aber keine gemeinsame Ursache vermutet.

Bestehende Hinweise auf eine bakterielle Ätiologie wurden durch die erfolgreiche Behandlung mit dem gerade entdeckten Penicillin von Svartz (1946) und Thyresson (1949) (ACA), Bianchi (1950) (LCB) und Hollström (1951) (EM, ein Fall NB) bekräftigt. Die Vermutung, dass es sich bei dem Erreger um Spirochäten handelt, wurde von Kahle (1942) (ACA) und Lennhoff (1948) (EM) geäußert, die diese unter dem Mikroskop anfärben konnten. Der Beweis für eine Infektionskrankheit wurde mittels Hauttransplantationen in Selbstversuchen von Götz (1954) (ACA), Binder u. a. (1955) (EM) und Paschoud (1957) (LCB) erbracht. Durch Hauser (1955) wurde der große Zusammenhang der Dermatosen (EM, ACA) mit der geographischen Verbreitung der Zecken und einer Übertragung von Spirochäten durch Zecken hergestellt. In Europa waren damit die Hintergründe der Borreliose eigentlich Ende der 1950er Jahre aufgeklärt – mit der wichtigen Ausnahme, dass die Spirochäten nicht aus Biopsien kultiviert und untersucht werden konnten.

In der Gegend der Orte Lyme und Old Lyme im Staat Connecticut (USA) kam es Anfang der 1970er Jahre zu einer Häufung von Fällen idiopathischer juveniler Arthritis, die ab 1975 von Steere u. a. (1977) untersucht und unter dem Begriff Lyme-Arthritis (LA) publiziert wurden. Von Steere u. a. (1978) und Wallis u. a. (1978) wurde schnell ein Zusammenhang mit EM und eine Übertragung durch Zecken postuliert sowie eine gemeinsame Verbreitung der Zecken und der Krankheitsfälle festgestellt (Steere und Malawista, 1979). Die Anzüchtung von Spirochäten gelang dann Burgdorfer u. a. (1982) aus dem Darm von Zecken, Benach u. a. (1983) aus dem Blut und Steere u. a. (1983) aus der Haut und dem Liquor von Patienten. Von Burgdorfer u. a. (1983) und Weber u. a. (1984) wurde die Gleichheit der amerikanischen und europäischen Symptome erkannt und die Gesamtheit der Manifestationen als eine Krankheit verstanden (Steere u. a., 1983). Die gefundenen Spirochäten wurden von Johnson u. a. (1984a) taxonomisch den Borrelien zugeordnet und der Name *Borrelia burgdorferi* vorgeschlagen (Johnson u. a., 1984b). Von Barbour u. a. (1984) und Wilske u. a. (1985) wurde eine Heterogenität der wichtigsten Antigene bemerkt und eine Einteilung in Serotypen vorgenommen. Von Adam u. a. (1991) und Wilske u. a. (1991) wurde aufgezeigt, dass die phäno- und genotypischen Unterschiede der pathogenen *B. burgdorferi* so groß sind, dass eine Unterteilung in Arten sinnvoll erscheint. Bis heute wurden von *B. burgdorferi* s. s., die durch Fraser u. a. (1997) und Casjens u. a. (2000) vollständig sequenziert ist, 15 weitere Arten abgegrenzt (s. 1.2.2, S. 7).

## 1.2 Der Erreger – *Borrelia burgdorferi*

Der Begriff *B. burgdorferi* steht mit dem Zusatz „sensu stricto“ („im engeren Sinn“, Abk. s. s.) für die eine Art, die zunächst als Erreger der LB entdeckt wurde (s. 1.2.2.1, S. 7). Mit dem Zusatz „sensu lato“ („im weiteren Sinn“, Abk. s. l.) steht der Begriff hingegen für eine Gruppe sehr eng mit *B. burgdorferi* s. s. verwandter Arten (s. 1.2.2, S. 7). Bei den Borrelien handelt es sich um spiralförmige Bakterien, die zu den Spirochäten gehören (s. 1.2.1). Die Borrelien zirkulieren in der Natur zwischen dem Arthropodvektor und zumeist Säugetieren (s. 1.2.3, S. 9), lassen sich jedoch auch *in vitro* kultivieren (s. 1.2.4, S. 9).

### 1.2.1 Morphologie

Spirochäten sind flexible, spiralförmige Bakterien, die sich schraubend auch durch hochviskose Medien bewegen können (Abb. 1.1). Ihre Größe variiert sehr stark zwischen den Arten mit 0,1-0,75  $\mu\text{m}$  Durchmesser und 3-500  $\mu\text{m}$  Länge (Johnson, 1977). Borrelien sind im Allgemeinen bis 40  $\mu\text{m}$  lang und bis 0,5  $\mu\text{m}$  dick. *B. burgdorferi* im Besonderen hat eine Länge von 4-30  $\mu\text{m}$  und einen Durchmesser von 0,18-0,25  $\mu\text{m}$  (Johnson u. a., 1984a). Die Borrelien stellen sich in der Gramfärbung gramnegativ dar. Ihre Zellwand besteht aus einer Zytoplasmamembran, einer Peptidoglycanschicht und einer äußeren Membran. An beiden Enden der Zelle weisen sie Endoflagellen auf, die zwischen der äußeren Membran und dem Peptidoglycan verankert sind (Johnson u. a., 1973). Diese Flagellen dienen nicht nur der Fortbewegung, sondern sie haben auch eine Stützfunktion und definieren die Spiralförmigkeit (Motaleb u. a., 2000). Aufgrund der großen Zelloberfläche im Verhältnis zum Zytoplasmavolumen sowie den zwei Membranen sind die Borrelien außergewöhnlich reich an Lipiden (s. 1.6.4, S. 19). In den Membranen sind zudem zahlreiche Lipoproteine verankert (s. 1.7.2, S. 21), die für die Interaktion der Borrelien mit dem Wirt und auch die Pathogenität wichtig sind (s. 1.7.3, S. 21).



Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer Spirochäte.

### 1.2.2 Taxonomie

Die Spirochäten werden taxonomisch innerhalb der Bakterien in einen eigenen Stamm mit einer einzigen Klasse *Spirochaetes* und der Ordnung *Spirochaetales* eingeordnet und teilen sich in drei Familien auf. Zur Familie *Spirochaetaceae* gehören u. a. die Gattungen *Borrelia*, *Spirochaeta* und *Treponema*, mit dem Erreger der Syphilis – *Treponema pallidum*. Zur Familie *Leptospiraceae* gehören die Gattungen *Leptonema* und *Leptospira*, mit dem Erreger der Weilschen Krankheit – *Leptospira interrogans*. Die dritte Familie bilden die *Brachyspiraceae* mit der Gattung *Brachyspira* (Paster und Dewhirst, 2000). Der Stammbaum der Borrelien untergliedert sich in die Rückfallfiebererreger (s. 1.5, S. 17) und die *B. burgdorferi* s. l. Gruppe. Letztere umfasst aktuell 16 Bakterienarten, von denen nur einige LB (s. 1.4, S. 11) verursachen können. Die phäno-, sero- und genotypische Abgrenzung dieser Arten erfolgte anfangs mit mono- und polyklonalen Antikörpern (Barbour u. a., 1984; Wilske u. a., 1988) und heute durch Sequenzierung unterschiedlicher Gene (Richter u. a., 2006; Postic u. a., 2007).

#### 1.2.2.1 Humanpathogene *B. burgdorferis*. 1.

Zum heutigen Zeitpunkt sind fünf eindeutig humanpathogene Arten bekannt:

*Borrelia burgdorferi* s. s. (Bbu) (Johnson u. a., 1984b) wurde in Nordamerika und Europa, aber nicht in Asien gefunden (Le Fleche u. a., 1997) (in Bayern in 22 % der infizierten Zecken, Fingerle u. a., 2008). Diese Art wird besonders als Erreger der LA (s. 1.4.1.3, S. 13) betrachtet, jedoch auch in anderen Organen gefunden. Das Genom des Stammes B31 wurde sequenziert und besteht aus 853 Genen auf dem linearen Chromosom. Darauf sind Gene für DNA-Replikation, Transkription, Translation, Membrantransport und Energiemetabolismus vorhanden, allerdings fehlen solche für die zelluläre Biosynthese, z. B. von Fettsäuren, Aminosäuren oder Nukleotiden. Über 6 % des Genoms

kodieren für Proteine zur Beweglichkeit und Chemotaxis (Fraser u. a., 1997). Zusätzlich verfügt Bbu über die größte Anzahl extrachromasomaler Plasmide – zwölf lineare und neun ringförmige – mit 535 Genen. Die meisten Plasmide können bei der *in vitro* Kultur verloren gehen. Die Funktion von 90 % dieser Gene, die keine Ähnlichkeit mit bekannten Genen anderer Bakterien haben, ist noch unbekannt (Casjens u. a., 2000).

*Borrelia afzelii* (Baf) – früher VS461 – kommt in Europa und Asien vor – in Süddeutschland in 25 % der infizierten Zecken (Fingerle u. a., 2008). Baf wurde in 67-90 % der Hautbiopsien (Canica u. a., 1993; Lebech u. a., 1994), aber auch in anderen Organen und dem Liquor gefunden (Busch u. a., 1996). Baf wird als wichtigster Erreger der ACA (s. 1.4.1.3, S. 14) betrachtet (Ohlenbusch u. a., 1996) und ist vorrangig mit Nagetieren als Reservoir assoziiert (Kurtenbach u. a., 2002).

*Borrelia garinii* (Bga) wurde in Europa und Asien in 50-70 % der Liquorproben und in Süddeutschland in 34 % der infizierten Zecken gefunden (Baranton u. a., 1992; Fingerle u. a., 2008). Bga wird mit NB (s. 1.4.1.2, S. 12) assoziiert (Lebech u. a., 1994), führt aber auch zu anderen Manifestationen. Als Reservoir werden Vögel angesehen (Kurtenbach u. a., 2002).

*Borrelia bavariensis* (Bba) – früher Bga OspA Serotyp 4 – wurde in Mitteleuropa im Liquor von LB-Patienten gefunden (Wilske u. a., 1993a). Im Gegensatz zu Bga ist es Nagetier-assoziiert und genetisch ausreichend verschieden, um als eigene Art betrachtet zu werden (Margos u. a., 2009).

*Borrelia spielmanii* – früher A14S – wurde in Mitteleuropa gefunden (in Bayern in 6 % der infizierten Zecken, Fingerle u. a., 2008) und in einigen Fällen als ein Erreger von EM identifiziert (Wang u. a., 1999a; Richter u. a., 2006). Die Art ist besonders eng an Gartenschläfer und Haselmäuse assoziiert (Richter u. a., 2004).

#### 1.2.2.2 Möglicherweise humanpathogene *B. burgdorferis*. 1.

Weitere Arten wurden bisher nur in wenigen Patientenproben gefunden, so dass sie vermutlich humanpathogen sind, aber fast keine klinische Relevanz haben.

*Borrelia bissettii* (Bbi) – früher DN127 – wurde in den USA in Zecken, aber nicht in Patientenmaterial gefunden (Postic u. a., 1998). In Slowenien wurde in LB-Patientenmaterial ein sehr eng verwandter Stamm (25015) (Picken u. a., 1996) und in Tschechien DNA von Bbi an Herzklappen von Patienten gefunden (Rudenko u. a., 2008), so dass diese Art vermutlich auch LB verursachen kann.

*Borrelia valaisiana* (Bva) wurde in Zecken in Europa und Asien nachgewiesen. Die DNA von Bva konnte aus Hautbiopsien amplifiziert werden (Wang u. a., 1997) und in Griechenland wurde Bva im Liquor eines Patienten mit fortgeschrittener NB festgestellt (Diza u. a., 2004).



*Borrelia lusitaniae* wurde in Zecken in Westeuropa (Le Fleche u. a., 1997) und in einer Hautbiopsie in Portugal gefunden (Collares-Pereira u. a., 2004).

### 1.2.2.3 Nichtpathogene *B. burgdorferi*

Weitere *B. burgdorferi* konnten bisher nicht in Patientenmaterial nachgewiesen werden. In den südlichen USA wurden *B. americana* und *B. carolinensis* in Zecken sowie Nagetieren und Vögeln nachgewiesen (Rudenko u. a., 2009b,a). *B. andersonii* sowie *B. californiensis* wurden in Nordamerika lediglich in Zecken entdeckt (Marconi u. a., 1995; Postic u. a., 2007) und *B. japonica*, *B. tanukii* sowie *B. turdae* (auch *turdi*) in Japan aus Zecken isoliert (Kawabata u. a., 1993; Fukunaga u. a., 1996). In China wurde *B. sinica* aus Weißbauchratten kultiviert (Masuzawa u. a., 2001).

## 1.2.3 Lebensraum

Spirochäten sind entweder freilebend, z. B. in Schlamm und Abwässern, oder wirtsassoziiert. In ihren Wirten siedeln sie als Kommensale, z. B. in oralen Kavitäten und dem Magen-Darm-Trakt, oder in den unterschiedlichsten Geweben. Borrelien vermehren sich bevorzugt in Wirbeltieren und in hämatophagen Arthropoden (Gliederfüßer), die als Vektoren fungieren (Barbour und Hayes, 1986). *B. burgdorferi* hat sich besonders an diese unterschiedlichen Lebensräume mit anderen Umgebungstemperaturen und Bedingungen angepasst: In Zecken verweilen sie im Mitteldarm und in Säugetieren besiedeln sie extrazellulär die verschiedensten Organe, z. B. die Haut, das Herz, das Gehirn oder die Gelenke. Die Zecken als Vektor ( $\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und die Säugetiere als Wirt ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) bedingen bei den Borrelien eine unterschiedliche Genexpression (Schwan u. a., 1995) und Genregulation (Revel u. a., 2002). Die Anpassung an diese beiden Habitate spiegelt sich vermutlich auch in der großen Anzahl Lipoproteine wider (s. 1.7.2, S. 21). Bei der Fortbewegung durch Blutgefäße sind die Borrelien dem Immunsystem direkt ausgesetzt, so dass sie diesem ausweichen und sich aufgrund ihrer Fähigkeit in hochviskosen, gelähnlichen Medien zu schwimmen, auch durch das Gewebe fortbewegen (Motaleb u. a., 2000) und die Blut-Hirn-Schranke passieren können (Garcia-Monco u. a., 1990). Da *B. burgdorferi* viele essentielle Bausteine nicht selbst synthetisiert, sind für die Proliferation *in vivo* exzellente Chemotaxis und Beweglichkeit absolut notwendig. Viele der zahlreichen Chemotaxisgene sind daher konstitutiv exprimiert (Charon und Goldstein, 2002).

## 1.2.4 Kultivierung

Einige Borrelienarten lassen sich *in vitro* bei  $30\text{--}37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter mikroaerophilen Bedingungen kultivieren und weisen Generationszeiten von 12–24 h auf (Klaviter und Johnson, 1979) – so auch *B. burgdorferi* (Barbour, 1984). Das gebräuchlichste Medium wurde mehrfach weiterentwickelt und als BSK-H standardisiert (Pollack u. a., 1993). Es enthält neben Aminosäuren, Nukleotiden und Salzen, Glucose als Energiequelle sowie BSA und Neopepton als Protein-/Peptidequelle. Chemisch nicht definierte Zusätze, die auch die Fettsäuren zuführen, sind Hefeextrakt und Kaninchenserum. Cholesterin ist dem Medium mit  $0,5\text{ }\mu\text{M}$  zugesetzt. Die Verdopplungszeit von Bbu beträgt in BSK-H bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

10-18 h. Die Bakterien wachsen bis etwa  $10^7$  Zellen/ml (von Lackum und Stevenson, 2005; Williams und Austin, 1992).

## 1.3 Die Infektion mit Lyme-Borreliose

Bei der LB handelt es sich um eine Zoonose, bei der der Erreger durch einen Vektor vom tierischen Reservoir auf den Menschen übertragen wird und sich dort ausbreitet (Steere u. a., 1983).

### 1.3.1 Vektor

Der bedeutendste Vektor der LB sind Schildzecken (Ixodidae) der Gattung *Ixodes*, die phylogenetisch zur Ordnung der Milben und damit zu den Spinnentieren (Arachnida) gehören. Die häufigsten Vertreter sind in Mitteleuropa *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock) sowie an der Ost- und Westküste der USA *I. scapularis* (Hirschzecke) bzw. *I. pacificus*. Nüchtern sind die Schildzecken 2-4 mm lang, während die mit Blut vollgesogenen Weibchen Längen bis zu 12 mm erreichen (Abb. 1.2, S. 10).

Typisch für Zecken ist der etwa zweijährige Lebenszyklus: Aus dem Ei schlüpft eine Larve, die vor ihrer Reifung zur Nymphe eine Blutmahlzeit an Wirbeltieren benötigt. Die Nymphe entwickelt sich nach einer weiteren Blutmahlzeit zu einem adulten Tier, von denen das Weibchen vor der Eiablage ein drittes Mal Blut saugt. Jeweils nach der Blutmahlzeit verlassen die Zecken ihren Wirt und suchen sich nach der Metamorphose einen neuen. Beim Blutsaugen an einem mit *B. burgdorferi* infizierten Wirt kann *Ixodes ricinus* diese aufnehmen, sie verbleiben im Mitteldarm der Zecke und können bei der nächsten Blutmahlzeit auf den neuen Wirt übertragen werden (De Silva und Fikrig, 1995). Über eine transovariable Übertragung der Borrelien wurde berichtet (Magnarelli, 1990), sie scheint jedoch selten vorzukommen. Die Durchseuchung der *Ixodes* mit *B. burgdorferi* hängt vom Entwicklungsstadium ab. In Deutschland ist sie bei Larven sehr gering ( $\approx 1,5\%$ ), bei Nymphen 10 % und bei Adulten 20-30 % (Wilske, 2005; Fingerle u. a., 2008). In Mittelslowenien sind sogar fast 50 % der adulten Zecken borrelienpositiv (Strle, 1999).

### 1.3.2 Reservoir

Aufgrund der fehlenden Wirtsspezifität von *Ixodes ricinus* ist das natürliche Reservoir, in dem *B. burgdorferi* zirkuliert, sehr breit und reicht von verschiedenen Ordnungen der Säugetiere wie Kleinnager (Mäuse, Eichhörnchen, Hasen), Großwild (Rotwild, Rehe) und Insektenfresser (Igel, Spitzmäuse) über Vögel (Amsel) bis hin zu Reptilien (Eidechsen) (Lane u. a., 1991). Ob auch die wild lebenden Kleinsäuger – abseits einer Bakteriämie – Merkmale der Krankheit zeigen, ist umstritten.



Abbildung 1.2: **Gemeiner Holzbock (*Ixodes ricinus*)**. **A** nüchterne Nymphe, dorsal, **B** vollgesogenes Weibchen, ventral, Fotos: Dr. Jürgen Stübs, 1958

### 1.3.3 Übertragung

Wenn die Schildzecke einen Wirt und auf diesem eine geeignete Stelle gefunden hat, durchschneidet sie mit ihren Cheliceren (Mundwerkzeuge) die Epidermis und verankert das Hypostom mittels Widerhaken und über die Speicheldrüsen sezerniertem Sekret („Zement“) in der Dermis (Gray, 2002). Sofern die Zecke mit *B. burgdorferi* infiziert ist, können diese aus dem Mitteldarm durch die Hämolymphe in die Speicheldrüsen und etwa 24-48 h nach dem Biss durch den Mund in die Wunde des Wirtes wandern (De Silva und Fikrig, 1995; Schwan und Piesman, 2002). Mehrfachinfektionen mit verschiedenen Stämmen sind nicht ungewöhnlich – sowohl gleichzeitig (Seinost u. a., 1999; Ruzic-Sabljić u. a., 2005), vermutlich aufgrund mehrfachinfizierter Zecken (Stricker u. a., 2008), als auch nacheinander (Reinfektionen) (Nadelman und Wormser, 2007). Eine natürliche Übertragung von Mensch zu Mensch – auch sexuell, wie bei der Syphilis – kommt nicht vor.

### 1.3.4 Ausbreitung

Nach der Infektion eines neuen Wirtes ist *B. burgdorferi* im frühen Stadium an der Bissstelle lokalisiert. Im weiteren Verlauf der LB können sich die Borrelien innerhalb von Tagen und Wochen durch den Blutkreislauf, das lymphatische System oder das Bindegewebe im Wirt ausbreiten. Die periphere Ausbreitung in der Haut erfolgt mit wenigen Millimetern pro Tag.

## 1.4 Die Erkrankung – Lyme-Borreliose (LB)

### 1.4.1 Klinik

Nach der Ausbreitung von *B. burgdorferi* ausgehend von der Inokulationsstelle können sehr viele Organe von der LB betroffen sein – neben der Haut, das periphere und zentrale Nervensystem, die Gelenke, das Herz, insbesondere der Herzmuskel, seltener die Skelettmuskeln oder die Augen. Die klinischen Verläufe werden in drei Stadien eingeteilt: die lokalisierte Infektion (s. 1.4.1.1), die ausgebreiteten (s. 1.4.1.2, S. 12) und die chronischen Manifestationen (s. 1.4.1.3, S. 13), wobei jedes Stadium übersprungen werden kann. Auftretende Manifestationen können nach Wochen, Monaten oder Jahren selbstlimitierend abheilen (Robert-Koch-Institut, 2010) oder auch chronisch destruktiv werden (Steere, 2001).

#### 1.4.1.1 Stadium I – lokalisierte Borrelien

Als Frühstadium der LB wird der Zeitraum der ersten Wochen nach dem Zeckenbiss betrachtet, in dem die Borrelien im Wirt örtlich begrenzt sind. Die Infektion verursacht unspezifische grippeähnliche Allgemeinsymptome wie Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen, Abgeschlagenheit, Lymphknotenschwellungen sowie besonders charakteristische Hautmanifestationen, z. B. das Leitsymptom Erythema migrans. Die eigentliche Infektion mit Borrelien kann aber auch inapparent verlaufen.

**Erythema migrans (EM)** Das Erythema (chronicum) migrans ([Afzelius, 1910](#); [Lip-schütz, 1913](#)), umgangssprachlich Wanderröte, tritt innerhalb von 1-4 Wochen an der Stelle des Zeckenbisses auf ([Steere und Sikand, 2003](#)). Es ist ein sich ringförmig ausbreitendes Erythem, das im Krankheitsverlauf von innen her wieder verblasst und auch ohne Behandlung innerhalb von 3-4 Wochen wieder verschwindet ([Weber u. a., 1984](#)). Betroffen sind alle normal durchbluteten Körperstellen; bei Kindern eher der Oberkörper und der Kopf als bei Erwachsenen. Ursache des EM ist eine verstärkte Durchblutung aufgrund der Immunreaktion gegenüber den sich peripher ausbreitenden Borrelien, die in Biopsien aus den Randbereichen nachweisbar sind ([Asbrink und Hovmark, 1985](#)). Das EM ist die häufigste Manifestation der LB. Die Angaben zur Frequenz variieren je nach Datenbasis: 51 % in Deutschland bei einer Ärzteumfrage mit 4000 Patienten ([Priem u. a., 2003](#)), 70 % in den USA basierend auf 50 000 Patienten ([Centers for Disease Control and Prevention, 2007](#)), 77 % in Schweden ([Berglund u. a., 1995](#)) und 89 bzw. 90 % in Deutschland aufgrund von Studien und Meldepflicht ([Huppertz u. a., 1999](#); [Robert-Koch-Institut, 2010](#)).

#### 1.4.1.2 Stadium II – ausgebreitete Borrelien

Das zweite Stadium der LB beginnt mehrere Wochen oder Monate nach der Infektion und kennzeichnet sich nach der hämatogenen oder lymphatischen Ausbreitung der Borrelien durch den Befall verschiedener Organe. Das Leitsymptom sind die akuten Erkrankungen des peripheren und zentralen Nervensystems (Neuroborreliose), die gegenüber den Manifestationen der anderen Organe deutlich überwiegen.

**Frühe Neuroborreliose (NB)** Die frühe Neuroborreliose tritt innerhalb von 1-3 Monaten nach Zeckenbiss bei etwa jedem sechsten LB-Patienten in Europa auf. Sie ist im Wesentlichen von drei klinischen Manifestationen gekennzeichnet, die allein oder zusammen vorkommen können – eine lymphozytäre Meningitis, eine Radikuloneuritis und kraniale Neuritiden. Sehr selten kommt eine Enzephalomyelitis vor. Aufgrund der umfangreichen Krankheitsbeschreibung von [Bannwarth \(1941\)](#) wird die Meningoradikuloneuritis oder Meningopolyneuritis als Garin-Bujadoux-Bannwarth-Syndrom bezeichnet. Die NB äußert sich bei Erwachsenen in starken radikulären Schmerzen, Lähmungserscheinungen der Hirnnerven, besonders einer ein- oder beidseitigen Facialisparese, und/oder in neurologischen Ausfällen, während bei Kindern meningitische Verläufe häufig sind ([Kaiser, 1998](#)). Die NB ist eine häufige Manifestation und kommt in Deutschland bei 3-18 %, in Südschweden bei 16 % und den USA bei 13 % der LB-Fälle vor. Sie ist bei Kindern doppelt so häufig wie bei Erwachsenen (28 vs. 14 %), was darauf zurückgeführt wird, dass von Zecken Kinder häufiger in Kopf und Nackenregion gebissen werden ([Berglund u. a., 1995](#)). Zur Diagnose werden nach einer Lumbalpunktion die Lymphozyten und die borrelienspezifischen Antikörper in Serum und Liquor bestimmt (s. 1.4.2, S. 14).

**Lymphadenosis cutis benigna (LCB)** Die Lymphadenosis cutis benigna Bäfverstedt ([Bäfverstedt, 1943](#)), auch Borrelien-Lymphozytom genannt, ist eine typische, aber seltenere Hautmanifestation (2-5 % der LB-Fälle), die wenige Wochen bis Monate nach einer Borrelieninfektion solitär auftritt – gelegentlich mit einem EM. Es handelt sich um eine rötlich-livide, knotige oder flächenhafte Schwellung, die einem Geschwür ähnelt

und spontan ohne Behandlung abheilt – allerdings zeitlich verzögert. Von LCB sind vorwiegend Kinder, Jugendliche und Frauen am Kopf, besonders den Ohrläppchen, den Mamillen oder am Skrotum betroffen (Weber u. a., 1984). Verursacht wird sie durch eine Infiltration von Lymphozyten aufgrund der lokal begrenzten Ausbreitungsmöglichkeit der Borrelien.

**Karditis** In weniger als 1 % der LB-Fälle kommt es innerhalb von 1-3 Monaten allein oder in Kombination mit anderen Symptomen zu einer akuten Myokarditis oder Pankarditis. Die Myokarditis führt zu transienten Herzrhythmusstörungen und atrioventrikulären Blockierungen zweiten bis dritten Grades, die je nach Schwere erst Wochen später abklingen. Unbehandelt kann sie in seltenen Fällen zu einer Kardiomyopathie mit einer Myokardinsuffizienz samt Erweiterung der Herzinnenräume führen und tödlich verlaufen. Die Ursache der Karditis liegt in einem Eindringen der Borrelien in das Myokard (Nagi u. a., 1996), aus dem sie angezüchtet werden konnten (Stanek u. a., 1990).

**Multiple Erythema migrantia (MEM)** Noch während des Vorhandenseins eines lokalisierten EM oder nach dessen Abklingen können hämatogen ausgestreute Borrelien an einer oder mehreren Körperstellen die Haut erneut invadieren und zu weiteren EM (s. 1.4.1.1) führen (Sonck, 1965). In Nordamerika ist MEM häufiger als in Europa.

#### 1.4.1.3 Stadium III – chronische Manifestationen

Das Spätstadium der LB tritt etwa ein halbes bis mehrere Jahre nach der Infektion auf – teilweise auch bei Ausbleiben der früheren Stadien. Dieses Stadium ist von chronischen Verläufen gekennzeichnet, die direkt von den persistierenden Borrelien oder indirekt durch Autoimmunreaktionen zu progressiven Schädigungen führen. Die Leitsymptome sind die Lyme-Arthritis und die Acrodermatitis chronica atrophicans (Nau u. a., 2009).

**Lyme-Arthritis (LA)** Die Lyme-Arthritis ist eine Mono- oder Oligoarthritis der großen Gelenke, die häufig Monate oder Jahre nach einer Borrelieninfektion auftritt. Typisch ist ein intermittierender Verlauf der Gelenkschwellungen mit variabler Dauer der Episoden und das „Springen“ von Gelenk zu Gelenk, von denen das Knie am häufigsten betroffen ist. Die Symptome verschwinden oft nach Jahren wieder, aber in etwa 10 % kommt es zu einem chronischen Gelenkbefall (Schwellungen länger als ein Jahr) mit Knorpel- und Knochendestruktion (Steere u. a., 1987; Herzer, 1993). Bei einer Differentialdiagnose ist die LA von anderen Arthritiden abzugrenzen (Bestimmung der Rheumafaktoren und antinukleärer Antikörper) und durch eine Borrelien-Serologie zu bestätigen (s. 1.4.2, S. 14). Für die Symptomatik wird neben der direkten Schädigung durch Borrelien (Barthold u. a., 1990) auch ein Autoimmunmechanismus diskutiert, bei dem sich Antikörper gegen Borrelienstrukturen auch wirtseigene Strukturen binden (Szczepanski und Benach, 1991; Steere u. a., 2001). Die Inzidenz ist – im Gegensatz zur rheumatoiden Arthritis – nicht altersabhängig. In Deutschland hat die LA eine Prävalenz von 5-24 %, in Schweden von 7 % und in den USA sogar von 30 % der LB-Fälle.

**Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)** Die Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer ([Herxheimer und Hartmann, 1902](#)) ist eine chronisch-progressive, flächige Hauterkrankung, die in Europa bei 1-3 % der LB-Patienten Jahre nach der Infektion auftritt. Vorrangig betroffen sind die Streckseiten der Extremitäten – besonders in der Umgebung von Gelenken. Die ACA beginnt mit einem infiltrativen Stadium mit entzündlichen Hautschwellungen und geht in ein atrophisches Stadium über. Die Haut wird dabei sehr dünn, stark gefältet, zigarettenpapierartig und verfärbt sich bläulich-livid ([Jessner, 1921](#)). An ACA erkranken mehr Frauen als Männer ([Wilske, 2005](#)). Verursacht wird die ACA durch eine Infiltration mit *B. afzelii* ([Ohlenbusch u. a., 1996](#)) (s. [1.2.2.1](#), S. 8). Bei lange bestehender ACA können zusätzlich periphere Neuropathien auftreten.

**Chronische Neuroborreliose** Seltene Spätmanifestation nach einer Inkubationszeit von Jahren sind chronische Neuroborreliosen: eine progressive subakute Enzephalomyelitis, eine chronische Enzephalitis, Meningoenzephalitis oder Meningoradikuloneuritis. Sie führen zu Lähmungen der Extremitäten (Para- und Tetraparesen) oder Gedächtnisverlusten und stellen sich im Laborbefund durch eine deutliche Proteinerhöhung und eine Zellzahlerhöhung im Liquor dar ([Kaiser, 1998](#)).

## 1.4.2 Diagnostik

Die Diagnose einer Lyme-Borreliose wird zunächst im Rahmen der Anamnese aufgrund des klinischen Bildes gestellt. Im Fall einer frischen Infektion und einem typischen EM reicht dies für die Einleitung der Therapie vollkommen aus. In den späteren Stadien ist jedoch die Bestätigung durch einen Erregernachweis erforderlich. Die größte Bedeutung hat dabei der indirekte Erregernachweis mittels der Serologie (s. [1.4.2.1](#)). Direkte Erregernachweise mittels einer Borrelienkultur oder einer Polymerasekettenreaktion werden nur in den Fällen von Speziallaboratorien durchgeführt, wo die Serologie nicht hinreichend ist.

### 1.4.2.1 Serodiagnostik

Die Serologie auf IgM und IgG wird mit Serum und – bei Verdacht auf NB – im Liquor in einem zweistufigen Testverfahren durchgeführt – einem sensitiven Suchtest kann ein spezifischer Bestätigungstest angeschlossen werden. Bei dem Suchtest handelt es sich um einen IF-Test oder ELISA, der weitgehend automatisiert abläuft und die negativen Proben ausschließt. Die positiven oder grenzwertigen Proben werden dann mit einem Immunoblot – Western- oder Line-Blot – untersucht ([Wilske, 2003](#)).

Für die Western-Blots werden einzelne Borrelienstämmen kultiviert, die jedoch nur begrenzt die Heterogenität der Antigene zwischen und innerhalb der unterschiedlichen humanpathogenen Arten widerspiegeln können. Zusätzlich sind *in vitro* nicht zwangsläufig die gleichen Antigene exprimiert wie bei der Proliferation im Menschen ([Wilske, 2003](#)). Für die Line-Blots werden dagegen rekombinante Proteine verwendet: p100, p58, p41i, BmpA<sup>1</sup>, OspC, VlsE<sup>2</sup>, das vorrangig *in vivo* exprimiert wird, und DbpA<sup>3</sup>. Bei eini-

<sup>1</sup>basic membrane protein A

<sup>2</sup>variable major protein-like sequence, expressed

<sup>3</sup>decorin-binding protein A

gen werden mehrere Homologe verschiedener Borrelienarten eingesetzt (Goettner u. a., 2005). Nach den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie müssen für einen positiven IgG-Befund mindestens zwei Banden des Blots erkannt werden. Die Raten der positiven serologischen Befunde sind im Stadium I 20-50 %, im Stadium II 70-90 % und im Stadium III praktisch 100 % (Wilske u. a., 2007).

**Kreuzreaktionen** Zu falschpositiven serologischen Befunden aufgrund von kreuzreaktiven Antikörpern kommt es besonders bei Autoimmunerkrankungen, anderen Spirochätosen (z. B. Syphilis), Schwangeren oder auch viralen Infektionen (z. B. HIV, EBV<sup>4</sup>) (Raoult u. a., 1989).

### 1.4.3 Therapie

Die Behandlung der LB erfolgt durch Antibiotikagaben und ist in den frühen Stadien erfolgreicher als in den späteren. Die Therapie der lokalisierten LB erfolgt mit Tetracyclinen, z. B. Doxycyclin, sowie bei Kontraindikationen mit Amoxicillin oder Cefuroxim p. o. über die Dauer von 2-3 Wochen. Bei 8-29 % der behandelten EM-Patienten wurde eine Jarisch-Herxheimer-Reaktion beobachtet (Nadelman u. a., 1992). Bei der generalisierten LB werden Penicillin G, Doxycyclin oder Cephalosporine der dritten Generation, z. B. Cefotaxim, Ceftriaxon, p. o. oder – besonders bei NB – i. v. über 2-4 Wochen eingesetzt (Wormser u. a., 2006; Robert-Koch-Institut, 2007; Nau u. a., 2009). Bei der chronischen LB wird teilweise nur die i. v. Applikation der Antibiotika über 2-3 Wochen als gesichert wirksam erachtet und im Fall des Nichtanschlagens bis zu dreimal wiederholt. Konkret wurden von 1500 Patienten mit chronischer LB 82 % nach dem ersten Therapiezyklus, weitere 10 % nach dem zweiten, 5 % nach dem dritten und 3 % nach dem vierten als geheilt betrachtet. Lediglich drei Patienten mit Allergien blieben untherapiert (Hassler, 1998).

Ein Therapieerfolg wird ausschließlich über die Rückbildung der Symptome beobachtet. Die Antikörpertiter bleiben oft für lange Zeit stabil, so dass die Serologie zur Therapiekontrolle ungeeignet ist (Wilske, 2003).

### 1.4.4 Prophylaxe

Personen, die sich viel in der Natur aufhalten (z. B. Landwirte, Forstarbeiter, Wanderer oder Läufer), sind einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt. Ein Humanimpfstoff war von 1998 bis 2002 verfügbar, wurde dann jedoch zurückgezogen (s. 1.8.3, S. 27). Auch eine erfolgreich therapierte LB hinterlässt keine bleibende Immunität (Krause u. a., 2006). Die Prävention besteht daher in einer Expositionsprophylaxe gegenüber Zecken durch das Tragen geeigneter Kleidung, beinhaltet die Verwendung von Repellentien und endet mit dem Absuchen des Körpers nach Zecken und deren Entfernung (Hayes und Piesman, 2003). Für Tiere, z. B. Hunde, sind dagegen mindestens fünf Impfstoffe zugelassen, bei denen es sich entweder um Bakterine oder rekombinantes OspA handelt (Töpfer und Straubinger, 2007).

---

<sup>4</sup>Epstein-Barr-Virus

### 1.4.5 Epidemiologie

Informationen zur Epidemiologie der Lyme-Borreliose – besonders zur Inzidenz – sind nicht für das gesamte Verbreitungsgebiet vorhanden und dort am umfangreichsten, wo es eine Meldepflicht gibt – z. B. in den USA, in Deutschland in den östlichen Bundesländern<sup>5</sup> oder in Slowenien. Weitere Angaben beruhen auf regionalen, prospektiven Studien und Umfragen unter Ärzten.

#### 1.4.5.1 Geographische Verbreitung

LB ist eine endemische Infektionskrankheit, die in der gesamten nördlichen Hemisphäre vorkommt – in Nordamerika, in Europa auf dem Kontinent von Skandinavien bis Italien, im Osten bis zum Ural sowie auf den Inseln und in großen Teilen Asiens. Während in den USA *B. burgdorferi* s. s. der einzige Erreger ist, kommen in Europa alle fünf humanpathogenen Arten (s. 1.2.2.1, S. 7) vor, wobei *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii* und *B. garinii* die häufigsten Auslöser sind (Hubalek und Halouzka, 1997). In Asien wurden nur *B. afzelii* und *B. garinii* nachgewiesen (Masuzawa, 2004).

#### 1.4.5.2 Inzidenz

Die Anzahl der Neuerkrankungen schwankt sehr stark und ist in einzelnen Endemiegebieten, z. B. in den USA in zehn östlichen sowie nördlichen Staaten und in Deutschland in Baden-Württemberg und Bayern, am höchsten. Die jährliche Inzidenz ist in den östlichen Bundesländern – basierend auf den Daten der Meldepflicht – zwischen 2002-2008 von 17,8 auf 33,8 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner gestiegen, wobei einzelne Landkreise über 150 Fälle aufwiesen (im folgenden immer pro 100 000 Einwohner pro Jahr) (Robert-Koch-Institut, 2010). Im Raum Würzburg betrug diese Kennzahl aufgrund einer Studie von 1999 schon 111 Neuerkrankungen (Huppertz u. a., 1999). In Südschweden wurden in einer Studie von 1995 69 Neuerkrankungen mit regional bis zu 160 Fällen ermittelt (Berglund u. a., 1995), während in Slowenien durch die Meldepflicht eine Inzidenz von 155 bestimmt wurde (Strle, 1999). In zehn Referenzstaaten der USA beträgt die gemittelte Inzidenz für 2003-2005 nur 29, während sie im Staat Connecticut allein bei 74 liegt (Centers for Disease Control and Prevention, 2007). Zahlreiche Landkreise hatten eine Inzidenz von über 100, drei von über 300 und der Höchstwert wurde mit 595 Fällen für den Kreis Nantucket, MA, ermittelt (Bacon u. a., 2008) (lt. Centers for Disease Control and Prevention (1995) 1994 sogar 1198 Fälle).

In Gebieten mit einer Meldepflicht ist die Zahl der gemeldeten Fälle in den letzten 15 Jahren teilweise um über 100 % angestiegen. Neben einem wirklichen Anstieg der Neuinfektionen kommen auch andere Gründe in Frage: bessere Überwachung, gestiegenes Bewusstsein und Kenntnis seitens der Ärzte sowie der Öffentlichkeit oder verbesserte Diagnostik. Eine tatsächlich gestiegene Inzidenz kann verschiedene Ursachen haben: eine größere Durchseuchung der Zecken mit Borrelien und gestiegene Zeckenpopulationen aufgrund milder Winter oder eine weitere Ausdehnung des Siedlungsraums und erhöhte Freizeitaktivitäten in der Natur (Bacon u. a., 2008).

---

<sup>5</sup>bis zum 1.1.2009 waren nur EM und frühe NB meldepflichtig, seitdem auch LA



### 1.4.5.3 Alter und Geschlecht

Die Altersinzidenz weist in allen Berichten eine bimodale Verteilung auf – ein Gipfel besteht bei Kindern im Alter von 5-10 Jahren und ein zweiter bei älteren Menschen mit 60-70 Jahren (Berglund u. a., 1995; Priem u. a., 2003; Robert-Koch-Institut, 2010; Bacon u. a., 2008). Das gemittelte Erkrankungsalter liegt bei 43 Jahren (Priem u. a., 2003; Centers for Disease Control and Prevention, 2007). Mit Ausnahme der ACA bestehen bei den Betroffenen leichte Geschlechtsunterschiede (Wilske, 2005).

### 1.4.5.4 Saisonale Prävalenz

Die LB tritt aufgrund der langen Inkubationszeit der chronischen Verlaufsformen das ganze Jahr über auf. Die Neuinfektionen mit Borrelien geschehen jedoch in den Jahreszeiten, in denen die Zecken aktiv sind – normalerweise im Frühjahr und Frühsommer sowie im Spätsommer und Herbst, wenn die relative Luftfeuchtigkeit ( $> 80\%$ ) und die Temperatur ( $10-23\text{ °C}$ ) geeignet sind. Die Monate mit den meisten Neuinfektionen und damit EM-Diagnosen sind Juni, Juli und August – auch wegen einer verstärkten Exposition (Robert-Koch-Institut, 2010; Centers for Disease Control and Prevention, 2007).

## 1.5 Rückfallfieber

Beim Rückfallfieber (RF) wird zwischen dem epidemischen – durch Körperläuse übertragenen – und dem endemischen – durch Lederzecken übertragenen – unterschieden. Erreger des ersteren – *B. recurrentis* – wurde schon 1868 von Obermeier (1873) entdeckt. Das zweite wird in Europa u. a. durch *B. duttoni* und in Nordamerika durch *B. hermsii* verursacht (Southern und Sanford, 1969). Das RF weist eine andere Pathogenese als die LB auf. Charakteristisch für das RF ist eine asymptomatische Phase nach der Infektion, bei der die Borrelien im Blut auf mehr als  $10^8$  Zellen pro ml ansteigen<sup>6</sup> (Schwan u. a., 2003). Unbehandelt tritt dann starkes Fieber auf, das wieder abfällt und sich in mehreren Schüben wiederholen kann. Nach Antibiotikabehandlung kommt es zu einer ausgeprägten Jarisch-Herxheimer-Reaktion, die ebenfalls mit hohem Fieber verbunden ist (Schofield u. a., 1968; Bryceson, 1976). Entscheidend für beide Reaktionen sind ausgeschüttete Zytokine (Griffin, 1998), die durch zahlreiche Lipoproteine in der äußeren Membran induziert sein können (Shang u. a., 1998). Für die Rückfälle wird eine antigene Variation verantwortlich gemacht (Stoenner u. a., 1982), bei der nach der Vernichtung der ursprünglichen Population durch das erworbene Immunsystem eine neue mit modifizierten antigenen Lipoproteinen wächst (Barstad u. a., 1985).

## 1.6 Lipide

Lipide sind Biomoleküle, die gut in organischen Lösungsmitteln (z. B. Chloroform) aber schlecht in Wasser löslich sind. Zumeist sind sie amphiphil, d. h. sie weisen einen hydrophoben und einen hydrophilen Anteil auf, und bilden in wässriger Umgebung Mizellen

---

<sup>6</sup>*B. burgdorferi* erreicht Zahlen von weniger als  $10^5$  Zellen pro ml Blut

oder Lipiddoppelschichten. Ihre wichtigsten Aufgaben sind die Bildung der Membranen von Zellen – in Form von einer oder mehreren Zellmembranen und von subzellulären Organellen (z. B. Mitochondrien), die Verankerung von Biopolymeren in Membranen und die Speicherung von Energie (Voet und Voet, 1994).

Neben den Fettsäuren gibt es mehrere wichtige Klassen der Lipide – Glycerolipide (s. 1.6.1), Sphingolipide (s. 1.6.2, S. 18) und Steroide (s. 1.6.3, S. 18). Wenn Lipide glycosyliert sind, spricht man von Glycolipiden und falls Proteine einen Lipidanteil aufweisen von Lipoproteinen (s. 1.7, S. 20). Bei den Lipopolysacchariden (LPS) gramnegativer Bakterien handelt es sich um direkt acylierte Polysaccharide.

### 1.6.1 Glycerolipide

Die Diacyl-*sn*-glycerole (DAG) sind die verbreitetsten Membranlipide auf der Erde – als Phosphoglyceride in Tieren und Pilzen sowie als Glycosylglyceride in Pflanzen. Ein Phosphoglycerid ist ein in 3-Position mit Phosphorsäure verestertes DAG, dessen Phosphatgruppe wiederum mit einem Alkohol verestert sein kann, der dann namensgebend ist: Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI) (Voet und Voet, 1994). In Glycosylglyceriden ist die 3-Position des DAG dagegen glycosyliert. Die Glycone – Mono-, Di- oder Oligosaccharide – in  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Konfiguration sind sehr verschieden. In Pflanzen – besonders in deren Chloroplasten – machen  $\beta$ -Monogalactopyranosyl-DAG und  $\beta$ -Digalactopyranosyl-DAG (Carter u. a., 1956) etwa 75 % der Gesamtlipide aus (Dörmann und Benning, 2002). In Tieren wurde  $\beta$ -Monogalactopyranosyl-DAG im Rückenmark von Rindern und dem Gehirn anderer Säugetiere und dem Menschen nachgewiesen (Steim, 1967). In Bakterien wurde dagegen  $\alpha$ -Monogalactosyl-DAG gefunden (s. 1.6.4, S. 19).

### 1.6.2 Sphingolipide

Die einfachsten Sphingolipide, die Ceramide, sind N-acylierte Derivate des Aminoalkohols Sphingosin und können ähnlich dem DAG vielfältig substituiert sein. Die Sphingomyeline (Sphingophospholipide) sind Ceramide mit einem Phosphocholin oder -ethanolamin und bilden die Myelinscheide der Axone. Cerebroside (Sphingoglycolipide) sind einfache glycosylierte Ceramide, z. B. Galactocerebroside ( $\beta$ -Gal-Cer), die für die Zellmembran der Nervenzellen essentiell sind und an die *B. burgdorferi* binden kann (Garcia Monco u. a., 1992). Ganglioside sind komplexe glycosylierte Ceramide, die Sialinsäure<sup>7</sup> enthalten.

### 1.6.3 Steroide

Steroide sind Derivate des Sterans, die fast ausschließlich von Eukaryonten synthetisiert werden – von Tieren überwiegend Cholesterol, von Pflanzen hauptsächlich verwandte  $\Delta^5$ -Sterole wie Stigmasterol,  $\beta$ -Sitosterol oder Campesterol. Relevante Anteile an freiem

---

<sup>7</sup>N-Acetyl-neuraminsäure

oder glycosyliertem Cholesterol gibt es in obligat parasitären Bakterien<sup>8</sup>, die das Steroid jedoch vom Wirt aufnehmen, z. B. in *Brachyspira* (Plaza u. a., 1997), *Helicobacter* (Inamoto u. a., 1993) und in *Mycoplasma* (Rottem, 2002). Über die Synthese von Steroiden durch Prokaryonten gibt es wenige Berichte, die auch nur kleinste Mengen nachgewiesen haben (Schubert u. a., 1968; Hayami u. a., 1979). Neben Funktionen der Steroide als Vitamin, Gallsäuren oder Hormonen ist Cholesterol ein Hauptbestandteil der tierischen Zellmembran und beeinflusst deren Fluidität (Voet und Voet, 1994).

### 1.6.3.1 Sterylglycoside

Die verbreitetsten Steroide in Pflanzen sind Sterylglycoside mit  $\beta$ -glycosidischen Bindungen, die besonders in Blättern und Samen vorkommen. Auch acylierte Sterylglycoside werden synthetisiert, die zumeist an der 6-*O*-Position des Kohlenhydrates mit unterschiedlichen Fettsäuren verestert sind. In Kartoffelknollen wurden  $\beta$ -Glucoside des  $\beta$ -Sitosterol und Stigmasterol mit Palmitin-, Stearin- und Ölsäure an 6-*O*-Position (Le-page, 1964) und in Baumwollknospen und anderen Gattungen analoge  $\beta$ -Galactoside (Thompson u. a., 1970; Osman u. a., 1975) gefunden. In Blättern von Nachtschattengewächsen konnten in kleineren Anteilen acylierte Cholesteryl- $\beta$ -galactoside nachgewiesen werden (Köstens und Willuhn, 1973). Als Funktion der Sterylglycoside in Pflanzen wird angenommen, dass sie an der Anpassung der Membranfluidität an niedrige Temperaturen beteiligt sind. Speziell Sitosteryl- $\beta$ -glucosid ist das Startmolekül für die Zellulose-synthese in Pflanzen (Peng u. a., 2002).

In Bakterien wurden verschiedene acylierte und nichtacylierte Cholesterylglycoside identifiziert: Cholesteryl- $\beta$ -D-glucopyranosid in *Mycoplasma gallinarum* (Rothblat und Smith, 1961; Smith, 1971), Cholesteryl- $\alpha$ -glucopyranosid in *Acholeplasma axanthum* (Mayberry und Smith, 1983), nichtacyliertes und 6-*O*-acyliertes Cholesteryl- $\alpha$ -D-glucopyranosid in *Helicobacter pylori* (Hirai u. a., 1995). In der Hefe *Candida bogoriensis* wurde Cholesteryl- $\beta$ -glucosid (Kastelic-Suhadolc, 1980) und in Grün-, Braun- und Rotalgen wurden acylierte und nichtacylierte Cholesteryl- und Fucosteryl-glucoside gefunden (Duperon u. a., 1983). In Tieren wurde 6-*O*-acyliertes Cholesteryl- $\beta$ -D-glucosid in der Epidermis von Hühnern (Wert u. a., 1986) und Schlangen (Abraham u. a., 1987) nachgewiesen und eine Barrierefunktion gegen Wasserverlust diskutiert. Über die Wirkung der acylierten Sterylglycoside auf Zellen ist nur bekannt, dass sie hämolytisch wirken (Segal u. a., 1978; Hirai u. a., 1995), die Teilung von Krebszelllinien inhibieren (Rubnov u. a., 2001) oder in *H. pylori* der Umgehung des Immunsystems dienen (Wunder u. a., 2006).

### 1.6.4 Lipide von Spirochäten

Aufgrund ihrer speziellen Morphologie mit einer sehr großen Oberfläche im Verhältnis zum Zytoplasmavolumen sind Spirochäten reich an Lipiden. Diese machen bis zu 20 % der Trockenmasse der Zellen aus (Livermore und Johnson, 1974), in *B. burgdorferi* s. s. sogar 25-30 % (Hossain u. a., 2001). Der Lipidmetabolismus variiert deutlich innerhalb

---

<sup>8</sup>bezogen auf ihren natürlich Lebensraum. Zumeist sind diese auch *in vitro* mit entsprechenden reichhaltigen Medien oder Serumzusatz kultivierbar.

der Spirochäten: Die frei lebenden *Spirochaeta* sind fähig, Fettsäuren *de novo* und komplexe, polare Lipide zu synthetisieren. Für das Wachstum von *Borrelia*, *Treponema* und *Leptospira* sind langkettige – sowohl gesättigte als auch ungesättigte – Fettsäuren zwar essentiell, können jedoch selbst nicht biosynthetisiert werden (Pickett und Kelly, 1974; Johnson u. a., 1984a). Die komplexen Lipide, die sie mit den zumeist unveränderten Fettsäuren synthetisieren, sind vor allem Phospholipide (PC, PE, PG, Cardiolipin).

Jedoch werden verbreitet auch Glycolipide in Form der Monoglycosyldiacylglyceride synthetisiert: Monoglucosyl-DAG wurde in *Spirochaeta* sp. (Livermore und Johnson, 1974) und *T. innocens* (Matthews u. a., 1980) gefunden, während Monogalactosyl-DAG (MGalD) in *T. pallidum*, wo das  $\alpha$ -Anomer etwa 50 % der Lipide ausmacht (Johnson u. a., 1970), in *Brachyspira hyodysenteriae* (Matthews u. a., 1980) und in *Borrelia hermsii* (Livermore u. a., 1978) vorkommt. Steroide sind dagegen selten: Freies Cholesterol wurde in einem Stamm von *T. pallidum* gefunden (Matthews u. a., 1979), während acylierte und nichtacylierte Cholesterylglucoside in *B. hermsii* (Livermore u. a., 1978) nachgewiesen wurden. Erste Berichte zu zwei möglichen Glycolipiden in *B. burgdorferi* s. s. beschrieben diese ohne Strukturidentifizierung als Antigene für LB-Patienten-Seren (Eiffert u. a., 1991; Wheeler u. a., 1993; Honarvar u. a., 1994). Die chemische Strukturermittlung des einen Glycolipid-Antigens ergab MGalD (Hossain u. a., 2001) und des zweiten Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ACGal) (Schröder u. a., 2003; Ben-Menachem u. a., 2003). Darüber hinaus wurde von unserer Arbeitsgruppe ein nicht antigenes drittes Glycolipid identifiziert: Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid (CGal) (Schröder u. a., 2003).

Im Gegensatz zu den klassischen gramnegativen Bakterien besitzen *Borrelia* und *Treponema* in ihrer äußeren Membran kein Lipopolysaccharid (LPS) (Hardy und Levin, 1983; Takayama u. a., 1987), das von TLR-4 erkannt wird, während *L. interrogans* ein atypisches LPS aufweist, das von TLR-2 erkannt wird (Vinh u. a., 1986; Werts u. a., 2001; Que-Gewirth u. a., 2004).

## 1.7 Lipoproteine (LP) und Pathogenitätsfaktoren

Der Begriff Lipoprotein wird mehrdeutig verwendet. Zum einen versteht man darunter menschliche Lipidtransportproteine – nichtkovalente Aggregate eines Apolipoproteins mit über 1000 Molekülen Cholesterol und Triglycerid, die dem Transport dieser Lipide im menschlichen Plasma dienen, z. B. Low density lipoprotein (LDL) (Voet und Voet, 1994). Zum anderen bezeichnet man in Pro- und Eukaryonten so jene Proteine, die kovalent mit einem Lipid verknüpft sind, um sie in der Zellmembran zu verankern (Hayashi und Wu, 1990).

### 1.7.1 Bakterielle Lipoproteine

Der chemische Aufbau der bakteriellen Lipoproteine wurde von Hantke und Braun (1973) in *E. coli* aufgeklärt. Bei den diacylierten Lipoproteinen wird ein N-terminales Cystein des Proteins direkt über die Sulfhydrylgruppe mit einem Diacylglycerol (DAG) als Thioether verknüpft. Die Biosynthese erfolgt in zwei Schritten: Nach der Translation weist das Präprotein eine bis zu 20 Aminosäuren lange Signalsequenz auf, an deren

Cystein durch das Enzym Prolipoprotein-diacylglycerol-transferase (*lgt*) das DAG eines Phosphatidylglycerol übertragen wird. Danach wird durch das Enzym Prolipoprotein-Signal-Peptidase (*lsp*) das Signalpeptid abgespalten (Sankaran und Wu, 1994). Beide Enzyme sind in vielen grampositiven Bakterien vorhanden, für die zahlreiche diacylierte Lipoproteine vorhergesagt wurden (Madan Babu und Sankaran, 2002). Gramnegative Bakterien wie *E. coli* weisen dagegen zusätzlich ein drittes Enzym auf – Phospholipid:apolipoprotein-transacylase (*lnt*) – mit dem sie den N-Terminus des Proteins nochmals acylieren können und so triacylierte Lipoproteine entstehen.

### 1.7.2 Lipoproteine von *B. burgdorferi*

Die Lipoproteine von *B. burgdorferi* sind aufgrund ihrer Bedeutung Hauptgegenstand der Forschung hinsichtlich Serodiagnostik, Pathogenität (s. 1.7.3) und Impfstoffentwicklung (s. 1.8.3, S. 27). Für den sequenzierten Stamm B31 wurden über 132 potentielle LP vorhergesagt – 41 auf dem Chromosom und 91 auf Plasmiden, die fast 10 % des Genoms ausmachen (Casjens u. a., 2000). Der posttranslational angehängte Lipidanker ist dabei triacyliert, d. h. auch der N-Terminus des Proteins ist acyliert (Beermann u. a., 2000). Der Lipidanteil ist essentiell für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems (Weis u. a., 1994; Radolf u. a., 1995) und dadurch auch für die Immunogenität der LP wichtig (Erdile u. a., 1993).

Die borreliellen LP sind in der Membran verankerte Oberflächenproteine, über deren Funktion relativ wenig bekannt ist. Sie dienen dem Transport von Nährstoffen, der Adhäsion an Zellen des Wirtes oder der Bindung von löslichen Komponenten. Die Expression der LP hängt auch von Umweltfaktoren, z. B. dem pH-Wert (Carroll u. a., 1999) oder der Umgebungstemperatur, und vom Wirt ab (Schwan u. a., 1995).

Die bekanntesten LP sind die Outer Surface Proteine (Osp) – OspA-OspF (Howe u. a., 1985; Jauris-Heipke u. a., 1993; Norris u. a., 1992; Lam u. a., 1994) – die teilweise glycosyliert sind (OspA, OspB) (Brandt u. a., 1990; Sambri u. a., 1992). Die größte Schwierigkeit bei deren Einsatz für die Serodiagnostik und die Impfstoffentwicklung (s. 1.8.3, S. 27) ist deren Heterogenität (Barbour u. a., 1985) zwischen den Arten und teilweise sogar innerhalb dieser. OspA weist sieben unterschiedliche Serotypen auf (Wilske u. a., 1996) und ist bei Bbu und Baf homogen, während es bei Bga (und damit auch Bba) größere Untergruppen gibt (Will u. a., 1995). OspC weist 16 Serotypen auf (Wilske u. a., 1996), wobei sogar Diversitäten in lokalen Populationen von Bbu vorkommen (Wang u. a., 1999b). Eine weitere Familie bilden die Erp (OspEF related protein) (Stevenson u. a., 1996) bzw. CRASP (Complement regulator-acquiring surface protein) Proteine (Kraiczky u. a., 2002), von denen einige Faktoren des Komplementsystems binden und die Bakteriolysen über den alternativen Weg des Komplementsystems verhindern können. Aber auch diese sind nicht in allen Arten vorhanden.

### 1.7.3 Pathogenitätsfaktoren und Wirtsinteraktion

*B. burgdorferi* verfügt nicht über die bekannten Virulenzfaktoren gramnegativer und grampositiver Pathogene, z. B. Endotoxine (Takayama u. a., 1987) oder Sekretionssysteme bzw. Lipoteichonsäuren oder Protein A/G. Auch Exotoxine sind nicht bekannt, und im Genom wurden lediglich homologe Proteine zu bekannten Hämolytinen und „Ab-

flusspumpen“ («drug-efflux») gefunden (Fraser u. a., 1997). Die wesentlichen Merkmale der Pathogenität von *B. burgdorferi* sind die besondere Beweglichkeit und die Chemotaxis sowie die Kolonisation von Gewebe und die Umgehung des Immunsystems. Ein Teil der für die Wirtsinteraktion notwendigen Gene befindet sich auf Plasmiden und kann mit fortgesetzter Kultivierung *in vitro* verloren gehen und somit auch die Virulenz (Schwan u. a., 1988).

Durch die Übertragung nach einem Zeckenbiss muss *B. burgdorferi* nicht die Epidermis durchqueren, sondern kann direkt in das Gewebe eindringen, sich mittels Flagellenbewegung weiter ausbreiten und Nischen besetzen. Essentiell für die Infektion ist die Wanderung vom Darm der Zecke durch die Speicheldrüsen in den Wirt (Charon und Goldstein, 2002). Darüber hinaus verfügt *B. burgdorferi* über eine einmalig große Anzahl von Chemotaxisgenen (Fraser u. a., 1997). Mittels mehrerer Adhäsine können sie an Strukturen von Wirtszellen, z. B. an Glycosphingolipide, binden (Kaneda u. a., 1997; Antonara u. a., 2007). Andere Proteine dienen dazu, Wirtsfaktoren wie Plasminogen oder Proteoglycane zu binden, um die extrazelluläre Matrix zu durchdringen (Fuchs u. a., 1994; Brissette u. a., 2009; Shi u. a., 2008).

Um nicht vom Immunsystem des Wirtes vernichtet zu werden, setzt *B. burgdorferi* nicht auf eine ausgeprägte antigene Variation wie Rückfallfieberborrelien (Stoenner u. a., 1982), sondern weicht aus. *B. burgdorferi* verfügt außerdem über relativ wenige Liganden, die vom angeborenen Immunsystem erkannt werden (Benach u. a., 1988) – Lipoproteine über TLR-2 (Hirschfeld u. a., 1999), Flagellin über TLR-5 (Takeda und Akira, 2005; Shin u. a., 2008), CpG-DNA über TLR-9 (Bauer u. a., 2001; Shin u. a., 2008). Darüber hinaus verhindern einige Arten die antikörperunabhängige Abtötung durch das Komplementsystem (Kraiczy u. a., 2002). Bei einer chronischen LB ist auch das erworbene Immunsystem – trotz einer Vielzahl antiborrelialer Antikörper im Serum – nicht in der Lage, die Infektion zu beenden. Das dafür erforderliche Ausweichen vor dem Immunsystem und die Persistenz von Borrelien ist vermutlich nur im Gewebe möglich (Garcia-Monco und Benach, 1989).

Die LB-Symptome, z. B. das Erythem, zeugen allerdings davon, dass eine Infektion mit *B. burgdorferi* nicht unentdeckt bleibt. Jedoch ist es heute noch weitgehend unverstanden, wie es zu dieser Vielzahl unterschiedlicher Manifestationen in verschiedensten Organen kommt. Die lokalen Entzündungen werden direkt durch die Erkennung der Borrelienbestandteile nach der Phagozytose (Petzke u. a., 2009; Shin u. a., 2008; Batsford u. a., 2004) oder durch vermutete Autoimmunprozesse verursacht. Bei letzterem können Antikörper gegen borreliale Proteine, z. B. Flagellin, fälschlicherweise mit körpereigenen Antigenen des Nervensystems oder der Gelenke kreuzreagieren (Sigal und Tatum, 1988; Singh und Girschick, 2004).

## 1.8 Immunsystem

Das Immunsystem höherer Lebewesen (z. B. Pflanzen, Insekten, Wirbeltiere) dient der Abwehr von Mikroorganismen – Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten (Protozoen, Würmer). Während die höheren Gewebetiere nur ein unspezifisches Immunsystem – das angeborene Immunsystem (s. 1.8.1) – aufweisen, hat sich in Wirbeltieren darauf aufbauend ein spezifisches Immunsystem – das erworbene Immunsystem (s. 1.8.2, S. 24)

– entwickelt. Weiterhin unterteilt man die Immunantwort in eine zelluläre (Leukozyten) – z. B. Makrophagen und T-Zellen – sowie eine humorale (flüssige) – z. B. Antikörper und Komplement. Verschiedene Organe sind für Bildung, Reifung, Transport und Abbau dieser Komponenten wichtig: das Knochenmark, der Thymus, das Lymphgefäßsystem, die Blutgefäße und die Milz.

### 1.8.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem der Wirbeltiere umfasst zum einen die physischen Barrieren (Epithel, das den Organismus außen –Derma– und innen –Mukosa– begrenzt), die ein Eindringen von Pathogenen verhindern, und zum anderen Zellen sowie lösliche Komponenten, die in den Organismus eingedrungene Pathogene vernichten. Bei einer Infektion werden körperfremde Strukturen von Rezeptoren (s. 1.8.1.2, S. 24) auf Zellen (s. 1.8.1.1) erkannt, die dann mittels ausgeschütteter Zytokine (s. 1.8.1.3, S. 24) andere Immunzellen heranlocken und aktivieren. Die Pathogene werden entweder extrazellulär durch das Komplementsystem abgetötet oder in Phagozyten aufgenommen und verdaut.

#### 1.8.1.1 Zellen

Die „professionellen“ Zellen des angeborenen Immunsystems sind Monozyten, Makrophagen (MΦ), Dendritische Zellen (DC), Granulozyten (neutrophile, eosinophile, basophile), Mastzellen und NK-Zellen, die mit wenigen Ausnahmen von myeloiden Vorläufern im Knochenmark abstammen<sup>9</sup>. Dabei können die im Blut zirkulierenden Monozyten zu gewebständigen MΦ oder DC ausdifferenzieren. Im weiteren Sinne übernehmen auch Epithelzellen einzelne Funktionen des angeborenen Immunsystems. Die genannten Zellen haben die folgenden wichtigen Aufgaben: a) die Erkennung von eingedrungenen Mikroorganismen mittels Rezeptoren, b) die physische Beseitigung von Mikroorganismen, toten Zellen und großen Partikeln durch Phagozytose sowie c) die Aktivierung des erworbenen Immunsystems durch die Präsentation von Antigenen (s. 1.8.2.2, S. 25). Die wichtigsten Phagozyten – mit einem Anteil von über 50 % der Leukozyten – sind die neutrophilen Granulozyten, aber auch Monozyten, MΦ, DC und Mastzellen phagozytieren. Spezialisierte antigenpräsentierende Zellen (APC) sind die DC, aber auch Monozyten, MΦ und B-Zellen zählen zu den „professionellen“ APC. Bei einer Infektion können die im Gewebe vorhandenen Zellen durch Chemotaxis mittels Chemokinen (s. 1.8.1.3) weitere Zellen aus dem Blutkreislauf anlocken.

#### 1.8.1.2 Mustererkennungsrezeptoren

Mustererkennungsrezeptoren<sup>10</sup> sind membranständige oder zytoplasmatische keimbahnkodierte Proteine des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen konservierte Strukturen von Mikroorganismen<sup>11</sup> sofort beim ersten Kontakt – zumeist essentielle Motive der bakteriellen Zellwand, die enzymatisch synthetisiert wurden, DNA/RNA und einzelne Proteine.

---

<sup>9</sup>z. B. sind NK-Zellen Lymphozyten und es gibt auch plasmazytoide Dendritische Zellen

<sup>10</sup>auf englisch: pattern recognition receptor, PRR

<sup>11</sup>auf englisch: pathogen-associated molecular pattern, PAMP

**Toll-like Rezeptoren (TLR)** Die TLR bilden eine Familie von *Single-pass*-Transmembranproteinen mit einer Ectodomäne mit leucinreichen Wiederholungssequenzen (LRR<sup>12</sup>), einer Transmembrandomäne sowie einer zytoplasmatischen Domäne (TIR<sup>13</sup>), die entweder in der Zellmembran (z. B. TLR-1, -2, -4) oder in Endosomen (z. B. TLR-3, -9) lokalisiert sind (Medzhitov u. a., 1997; Rock u. a., 1998). Die elf im Menschen bekannten TLR erkennen mit der Ectodomäne körperfremde – bakterielle sowie virale – und möglicherweise auch körpereigene Liganden und initiieren nach deren Bindung über ihre TIR-Domäne und assoziierte Adaptermoleküle eine Signaltransduktion, die mittelbar zur Translation und Ausschüttung von Zytokinen führt (Takeda und Akira, 2005). Die ersten entdeckten Liganden waren Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien für TLR-4 (Poltorak u. a., 1998) und bakterielle Lipoproteine für TLR-2 (Janeway und Medzhitov, 1999).

Für die Erkennung der borreliellen Lipoproteine durch das angeborene Immunsystem ist die initiale Phagozytose der Borrelien ein wichtiger Schritt (Cruz u. a., 2008). Die LP werden dann von CD14 (Sellati u. a., 1998; Wooten u. a., 1998) und einem Rezeptorkomplex aus TLR-2 (Hirschfeld u. a., 1999; Lien u. a., 1999) und TLR-1 (Thomas und Fikrig, 2002) erkannt, der auf der zytoplasmatischen Seite über das Adaptermolekül MyD88 (Shin u. a., 2008) eine Signalkaskade anstößt. In deren Folge kommt es zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Norgard u. a., 1996; Wooten u. a., 1996) und letztendlich zur Translation und Sezernierung von Zytokinen, z. B. TNF- $\alpha$  (Radolf u. a., 1991).

### 1.8.1.3 Zytokine

Zytokine sind Botenstoffe, die u. a. der Signalübertragung an Zellen des Immunsystems dienen. Diese Peptide und Proteine werden von spezifischen Rezeptoren erkannt. Sie induzieren im Körper bei systemischen Entzündungen Fieber, führen zur Aktivierung, Differenzierung und Proliferation der Effektorzellen (durch z. B. Interleukine [IL], Interferone [IFN] oder Tumornekrosefaktoren [TNF]) bzw. dienen sie zur Chemotaxis (durch Chemokine, z. B. IL-8). Von lebenden Borrelien werden in humanen Monozyten u. a. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und IFN- $\beta$  induziert (Salazar u. a., 2009), wobei die Produktion von IFN- $\alpha$  und - $\beta$  vollständig von der Phagozytose und TLR-7 sowie TLR-9 abhängig ist (Petzke u. a., 2009).

## 1.8.2 Erworbenes Immunsystem

Das erworbene (angepasste/spezifische) Immunsystem wird vom angeborenen Immunsystem aktiviert und bildet innerhalb von Tagen nach einer Infektion eine spezifische Immunantwort auf einen eingedrungenen Mikroorganismus aus. Dazu werden diese von antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert und die Antigene den Lymphozyten (s. 1.8.2.1) präsentiert (s. 1.8.2.2). Ein wesentliches Merkmal des erworbenen Immunsystems sind die hochspezifischen Antikörper (s. 1.8.2.3), die bei einer Impfung zu einem langanhaltenden Schutz führen können (s. 1.8.2.4, S. 26).

---

<sup>12</sup>leucine-rich repeat

<sup>13</sup>Toll/IL-1 receptor



### 1.8.2.1 T- und B-Zellen

Die Zellen des erworbenen Immunsystems sind T- und B-Lymphozyten, die im Knochenmark entstehen. Durch somatische Rekombination weisen sie hochdiverse T- und B-Zellrezeptoren bzw. Antikörper (s. 1.8.2.3) auf – jede Zelle (Klon) einen einzigartigen. Die T-Zellen werden bei ihrer Reifung im Thymus selektioniert – positiv, die den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) erkennen können, und negativ, die die körpereigenen Antigene erkennen. Sie unterteilen sich danach in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die nach Aktivierung durch Antigene weiter ausdifferenzieren: in T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>), die B-Zellen aktivieren können, in zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>), die durch Viren oder Tumore veränderte Zellen abtöten können, in regulatorische T-Zellen, die die Immunantwort kontrollieren und unterdrücken können, oder in langlebige T-Gedächtniszellen.

Die B-Zellen durchlaufen im Knochenmark die Selektion und zirkulieren im Blut und den lymphatischen Geweben. Wenn die naiven B-Zellen fremde Antigene gebunden haben und durch antigenspezifische T-Helferzellen aktiviert werden, differenzieren sie in Plasmazellen, die Antikörper produzieren, und in B-Gedächtniszellen, die über Jahre oder lebenslang bestehen bleiben (Janeway u. a., 2005).

NKT-Zellen (Natürliche Killer-T-Zellen) sind eine kleine Population T-Lymphozyten, die sowohl  $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptoren als auch NK-Zellrezeptoren exprimieren. Sie durchlaufen die Thymusselektion, erkennen aber im Gegensatz zu den konventionellen T-Zellen nur von CD1d präsentierte Lipide (s. 1.8.2.2). Über IFN- $\gamma$  und IL-4 aktivieren sie Monozyten sowie B-Zellen und stellen ein Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar.

### 1.8.2.2 Antigenpräsentation

Antigene sind Moleküle, die von Antikörpern oder T- und B-Zellenrezeptoren gebunden werden können. Der Bereich des Antigens, an den diese Immunglobuline binden, wird als Epitop bezeichnet. Je größer ein Antigen ist, um so mehr Epitope weist es auf. Die wichtigsten Antigene sind Proteine und Polysaccharide, aber es gibt auch spezifische Antikörper gegen z. B. Glycolipide oder nicht natürliche Moleküle. Immunogene sind Antigene, die ausreichend groß sind, um selbstständig eine Immunantwort hervorzurufen. Wenn Antigene dafür hingegen zu klein sind, müssen diese Haptene zunächst an immunogene Träger (Proteine) gekoppelt werden.

Nach der Phagozytose extrazellulärer Mikroorganismen durch APC des angeborenen Immunsystems (s. 1.8.1.1, S. 23) wandern die Zellen in lymphatisches Gewebe und aktivieren T-Helferzellen. Dazu werden Proteine zu Peptiden verdaut und diese mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) der Klasse II auf der Zelloberfläche präsentiert. Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen, deren T-Zellrezeptor den MHC/Peptid-Komplex binden kann, werden über ein kostimulatorisches Signal (CD28) aktiviert, reifen zu T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) und proliferieren. Reife B-Zellen weisen auf ihrer Oberfläche einen B-Zellrezeptor auf, mit dem sie freie Antigene binden und über rezeptor-vermittelte Endozytose aufnehmen können. Peptide dieses Antigens werden über MHC-II präsentiert und daran bindende antigenspezifische T<sub>H</sub>2-Zellen können diese B-Zelle über ein kostimulatorisches Signal (CD40) und Zytokine aktivieren. Die aktivierten B-Zellen proliferieren stark („klonale Expansion“) und differenzieren schließlich zu Plasmazellen, die in großer Menge Antikörper mit derselben Spezifität sezernieren, sowie zu B-Gedächtniszellen

(Janeway u. a., 2005). MHC-Klasse-I Moleküle, die von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden, dienen der Präsentation von Peptiden veränderter intrazellulärer Proteine – tumoröse oder virale – und führen zur Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen.

Anders als Peptide werden Lipide und Glycolipide den T-Zellen von CD1 Molekülen präsentiert – Oberflächenproteinen, die strukturell den MHC-Klasse-I Molekülen ähneln. Im Menschen gibt es fünf Isoformen, die in zwei Gruppen eingeteilt werden: CD1a, CD1b, CD1c in Gruppe-1 und CD1d in Gruppe-2. Homologe CD1-Gene wurden in unterschiedlicher Anzahl in vielen Säugetieren gefunden. Während jedoch Kaninchen über Gene für die Gruppe-1 und Gruppe-2 verfügen, fehlen Mäusen die CD1-Gene der Gruppe-1 (Hayes und Knight, 2001). Die CD1d-Proteine sind im Menschen auf APC konstitutiv exprimiert (Neumann, 2008).

### 1.8.2.3 Antikörper

Antikörper sind Glycoproteine, die zur Klasse der Globuline gehören und aufgrund ihrer Funktion als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden. Die Antikörper werden von Plasmazellen sezerniert und haben die Eigenschaft mit hoher Spezifität und Affinität nicht kovalent an Antigene zu binden. Mit der Bindung an Mikroorganismen können sie diese für Phagozyten opsonieren oder das Komplementsystem aktivieren. Ein Antikörper-Monomer mit einer Masse von etwa 150 kDa besteht aus jeweils zwei gleichen schweren und leichten Proteinketten, die über Disulfidbindungen ähnlich einem Y verknüpft sind (Abb. 1.3). Die beiden Arme des Y bilden zwei identische variable Bereiche ( $F_{ab}$ ), die das Epitop des Antigens erkennen, während der Stamm des Y einen konstanten Bereich ( $F_c$ ) darstellt, der von  $F_c$ -Rezeptoren auf Leukozyten erkannt wird.

Beim Menschen gibt es fünf Isoformen der Immunglobuline (IgA, IgD, IgE, IgM, IgG), von denen zwei hauptsächlich im Serum vorkommen und daher für die Infektionserologie von Bedeutung sind: IgM sind Pentamere, die bis zu 10 % der Immunglobuline ausmachen und als erste Antikörper innerhalb weniger Tage nach einer Infektion gebildet werden. Ihr Nachweis im Serum ist ein Anzeichen für eine akute oder gerade überstandene Infektion. Wenige Wochen nach der Infektion kommt es zu einer Serokonversion, bei der die IgM durch IgG ersetzt werden, wobei in Einzelfällen auch eine IgM-Persistenz vorkommt. IgG sind Monomere (Abb. 1.3), die etwa 75 % der Immunglobuline darstellen und aufgrund der somatischen Hypermutation mit höherer Affinität als IgM binden. Die IgG-Titer können über Jahrzehnte bestehen und sind wesentlicher Bestandteil einer Immunität (Janeway u. a., 2005).

### 1.8.2.4 Immunisierungen

Bei aktiven Immunisierungen<sup>14</sup> gegen bakterielle Infektionen werden Lebendimpfstoffe mit abgeschwächten Bakterien, Impfstoffe mit abgetöteten Bakterien oder immunogene

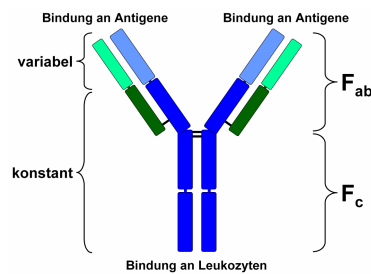


Abbildung 1.3: **Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.** Die schwere Kette ist blau, die leichte grün dargestellt.

<sup>14</sup>Im Gegensatz dazu werden bei einer passiven Immunisierung nur Antiserum oder isolierte Antikörper von anderen Menschen oder Tieren gespritzt und stehen umgehend zur Verfügung.

Bestandteile zusammen mit Adjuvanzen<sup>15</sup> in den Körper injiziert. Wiederholte Injektionen – Boosterungen – führen zu einer stärkeren Wirkung der Immunisierung. Das Ziel einer Impfung ist eine langdauernde Immunität durch die Ausbildung von spezifischen Gedächtnis-B-Zellen, die zu einer basalen Antikörperproduktion führen und nach Kontakt mit dem Erreger schnell zu einer Immunantwort führen (Janeway u. a., 2005).

Bei einer Immunisierung wird eine Vielzahl unterschiedlicher Antikörper gegen verschiedene Epitope des Immunogens gebildet. Diese stammen von genetisch unterschiedlichen Plasmazellen (Klonen) ab und werden daher als polyklonal bezeichnet. Um monoklonale Antikörper, die von einem einzigen Klon abstammen und ein Epitop erkennen, zu gewinnen, werden Plasmazellen mit Myelomzellen (Krebszellen) zu Hybridomzellen fusioniert. Diese teilen sich unbegrenzt und produzieren die monoklonalen Antikörper in großer Menge (Köhler und Milstein, 1975).

### 1.8.3 Impfstoffentwicklung gegen Lyme-Borreliose

Bereits kurz nach der Entdeckung von *B. burgdorferi* wurde geschildert, dass passive Immunisierungen und aktive Immunisierungen mit einem Zelllysate Versuchstiere vor experimenteller LB schützen können (Johnson u. a., 1986a,b). Später konnte gezeigt werden, dass rekombinantes OspA ausreicht, um Mäuse vor einer Infektion zu schützen (Fikrig u. a., 1990; Simon u. a., 1991). Eine klinische Phase-I Studie mit diesem Impfstoff an 36 Probanden belegte die Sicherheit und Immunogenität für Menschen (Keller u. a., 1994). Wenn bei der Immunisierung kein Adjuvans verwendet wird, ist der Lipidanteil des OspA essentiell. Diese Vakzine schützt Versuchstiere sowohl bei Spritzeninjektionen mit Bu als auch bei Bissen infizierter Zecken (Kramer u. a., 1996; Sadziene und Barbour, 1996). Zwar wird OspA von Borrelien nur in Zecken exprimiert und die Expression bei der Infektion des Wirtes herunterreguliert (Schwan u. a., 1995), aber mit der Blutmahlzeit gelangen die Antikörper in die Zecken und töten die Borrelien dort ab (Wormser, 1996). Zwei Phase-III Studien mit je über 10 000 Probanden wiesen nach drei Injektionen mit OspA innerhalb eines Jahres eine Wirksamkeit von 76 bzw. 92 % auf (Steele u. a., 1998; Sigal u. a., 1998) und führten 1998 in den USA zur Zulassung von LYMERix<sup>TM</sup> (Rutter, 1998). Im Jahr 2002 wurde dieser Impfstoff jedoch vom Hersteller<sup>16</sup> u. a. aufgrund von möglichen Nebenwirkungen (z. B. Autoimmunerkrankungen) und Sammelklagen möglicher Geschädigter vom Markt genommen (Abbott, 2006; Hanson und Edelman, 2003).

Da LB in Europa durch weitere Arten mit anderen Serotypen verursacht wird, ist dort ein multivalenter OspA-Impfstoff notwendig (Wallich u. a., 1996). Ein trivalenter Impfstoff wurde 2004 in Phase-II Studien getestet, aber nicht auf den Markt gebracht (Poggensee u. a., 2008). Ein ähnlicher Ansatz verfolgte einen OspA-basierten Impfstoff mit den sechs vorherrschenden Serotypen<sup>17</sup>, der das inkriminierte Epitop nicht enthält (Abbott, 2006) – bisher ohne Ergebnis. Ein anderer Impfstoffkandidat ist OspC, das in aktiven Immunisierungen schützend wirkt (Preac-Mursic u. a., 1992) und von Borrelien im Menschen hochreguliert wird (Schwan u. a., 1995), aber auch sehr heterogen ist (Wilske u. a., 1993b). Ein tetravalenter Impfstoff wurde entwickelt, aber nicht in klinischen Studien getestet (Earnhart u. a., 2007). Eine Immunisierung von Versuchstieren

<sup>15</sup>Zusatzstoffe, die das Immunsystem stimulieren und die Immunantwort unspezifisch verstärken

<sup>16</sup>GlaxoSmithKline Vaccines, London, Großbritannien

<sup>17</sup>Baxter Vaccines, Wien, Österreich, [http://www.baxtervaccines.com/?node\\_id=373](http://www.baxtervaccines.com/?node_id=373)

mit OspB hat nur einen schwachen und mit Flagellin keinen schützenden Effekt ([Fikrig u. a., 1992](#)).

Insgesamt wurden über 20 einzelne Proteine von *B. burgdorferi* in Versuchstieren auf ihre Effektivität untersucht, aber es wurde kein deutlicher Kandidat für einen verbesserten Impfstoff gegen LB identifiziert ([Hanson und Edelman, 2003](#)).

# Kapitel 2

## Zielstellung

Die durch Zecken übertragene Spirochäte *Borrelia burgdorferi* ist der Erreger der Lyme-Borreliose (LB). Die Serodiagnostik hat hier eine große Bedeutung bei der Bestätigung von klinischen Verdachtsfällen der fortgeschrittenen Krankheitsstadien. Zur Prävention einer LB gibt es heute und voraussichtlich in naher Zukunft keinen Humanimpfstoff. Daher sollten in dieser Arbeit die Glycolipide von *B. burgdorferi* eingehend analysiert und ihre Eignung zur Verbesserung der Serodiagnostik sowie als Impfstoff gegen LB untersucht werden.

**Strukturanalyse der Lipide** Zunächst waren in Erweiterung der Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zu *B. burgdorferi* s. s. (Schröder u. a., 2003) die Gesamtlipide von *B. burgdorferi* sensu lato zu analysieren. Mittels moderner analytischer Methoden sollten die Lipidstrukturen der wichtigsten LB-Erreger – *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii* und *B. garinii* – vergleichend mit dem Rückfallfiebererreger *B. hermsii* vollständig aufgeklärt und quantifiziert werden. Weiterhin sollte das Vorhandensein der gefundenen Glycolipide in weiteren möglicherweise pathogenen und nichtpathogenen *B. burgdorferi* s. l.-Arten und -Stämmen untersucht werden.

**Erkennung durch das Immunsystem** Es war an Zellkulturen zu untersuchen, ob die Lipide von Zellen des Immunsystems erkannt werden. Im Fall einer Aktivierung von Immunzellen sollten die beteiligten zellulären Rezeptoren identifiziert werden. Weiterhin waren mit LB-Patientenseren alle antigenen Lipide zu ermitteln. Außerdem sollten in einer großen Patientengruppe die Frequenz und die Titer der Antikörper im Serum in den einzelnen LB-Krankheitsstadien bestimmt werden.

**Synthese von Glycolipiden** Das Glycolipid ACGal sollte auf einem möglichst einfachen Weg chemisch synthetisiert werden, um die Antigenität des aufgereinigten ACGal zu bestätigen. Darauf aufbauend war eine Bibliothek von ACGal-Derivaten zu synthetisieren, um die minimale Erkennungsstruktur und die Spezifität der Antikörper mit Patientenseren zu charakterisieren. Außerhalb des Antikörperepitops sollte eine funktionelle Gruppe mit einfacher Schützungs- und Entschützungsstrategie angebracht werden, um dieses ACGal effizient an Trägerproteine zu konjugieren.

**Immunisierung von Versuchstieren** Es sollten Mäuse und Kaninchen mit den ACGal-Konjugaten immunisiert werden, um spezifische Antikörper gegen ACGal zu generieren. Der Erfolg der Immunisierung war zu überprüfen und die Anti-ACGal-Antikörper mittels Immunoblots hinsichtlich ihres Titers, des Antikörperepitops und ihrer Affinität zu den synthetischen Glycolipiden zu analysieren. Die Lokalisation des Antigens in ganzen Borrelien war mittels Immunofluoreszenztests zu untersuchen.

# Kapitel 3

## Materialien, Methoden und Reaktionen

Alle Firmen ohne Angabe des Landes haben ihren Sitz in Deutschland. Bei den Firmenangaben sind die Produktcodes durch ein vorangestelltes # gekennzeichnet. Die Daten wurden mit Microsoft Excel 2002 verarbeitet und die Diagramme mit Prism 3<sup>1</sup> erstellt. Die gesamte Bildbearbeitung wurde mit Paint Shop Pro 9<sup>2</sup> durchgeführt.

### 3.1 Biologische Materialien und Methoden

#### 3.1.1 Bakterienstämme

Für die Versuche wurden folgende Borrelienstämme verwendet:

*Borrelia burgdorferi sensu stricto* B31: ein Zeckenisolat<sup>3</sup>, wurde von Bettina Hammer<sup>4</sup> zur Verfügung gestellt.

*Borrelia garinii* A: ein Zeckenisolat, von R. Ackermann<sup>5</sup>.

*Borrelia afzelii* PKo: ein Hautisolat, von Bettina Wilske<sup>6</sup>.

*Borrelia hermsii* HS 1: ein Zeckenisolat, von ATCC<sup>7</sup> erworben.

*Borrelia bissettii* DN 127, *B. burgdorferi sensu stricto* B31 OspA Serotyp 1, *B. garinii* TN OspA Serotyp 6, *B. bavariensis* PBi OspA Serotyp 4, *B. japonica* HO 14, *B. lusitaniae* Poti B2 und Poti B3, *B. spielmanii* PSig II, *B. valaisiana* VS 116 und UK von Volker Fingerle<sup>8</sup>.

---

<sup>1</sup>GraphPad Software, La Jolla, CA, USA

<sup>2</sup>Jasc Software, heute Corel, Ottawa, Ontario, Kanada

<sup>3</sup>#ATCC 35210, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

<sup>4</sup>früher Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Berlin

<sup>5</sup>Universitätsklinik Köln, Köln

<sup>6</sup>früher Max von Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München

<sup>7</sup>s. Anm. 3

<sup>8</sup>Nationales Referenzzentrum für Borrelien, Bayerisches Landesamt für Gesundheit, München

### 3.1.2 Borrelienkultivierung

Als Kulturmedium für die Borrelien wurde BSK-H (Pollack u. a., 1993) mit Zusatz von 6 % Kaninchenserum verwendet<sup>9</sup>. Die Kultivierung der Borrelien erfolgte bei 34 °C unter mikroaerophilen Bedingungen, die entweder in offenen Gefäßen durch Gasaustausch mittels eines Automaten<sup>10</sup> oder in geschlossenen Gefäßen durch ein kleines Restvolumen Luft erreicht wurden. Zur Reaktivierung einer eingefrorenen Glycerol-Kultur wurden in einem 1,5 ml-Gefäß 200 µl der Kultur zu 800 µl BSK-H gegeben und im Brutschrank kultiviert. Nach etwa drei Tagen erfolgte ein Farbumschlag des Mediums und nach mikroskopischer Begutachtung<sup>11</sup> hinsichtlich Anzahl, Form und Beweglichkeit wurde die Kultur in ein 15 ml-Röhrchen mit 10 ml BSK-H überführt. Nach weiteren 4-5 Tagen und nach gleicher mikroskopischer Kontrolle wurde diese Kultur in ein 50 ml-Gefäß überführt. Schließlich wurde sie auf das Endvolumen mit 500 ml expandiert. Die Kontrolle der Reinheit der Kultur erfolgte zusätzlich zum Mikroskopieren durch Ausstreichen auf Columbia Blutagar Platten und Inkubation derselben bei 37 °C sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen. Die Borrelien wurden durch 30-minütige Zentrifugation mit 4000 x g bei 4 °C geerntet und zweimal mit PBS<sup>12</sup> gewaschen.

### 3.1.3 Borrelienmedienadaptierung

Um die Borrelien in Abwesenheit von BSA zu kultivieren, wurde ein Spezialmedium «BSK-H special» angefertigt<sup>13</sup>, das anstelle von BSA Kaninchenserumalbumin<sup>14</sup> und statt Neopepton das Proteose Pepton No 3<sup>15</sup> enthielt. Vor der Verwendung wurde das BSK-H special mit 6 % Kaninchenserum<sup>16</sup> versetzt. Um die Borrelien in 10 %-Schritten vom BSK-H (normal mit BSA) an das BSK-H special zu adaptieren, wurden Mischungen der beiden Medien hergestellt: 90 % BSK-H/10 % BSK-H special, 80 %/20 % bis hin zu 10 %/90 % und schließlich 5 %/95 %. Die Kulturen wurden nach dem Hochwachsen in den Mischungen und zum Schluss mehrfach in 100 % BSK-H special passagiert.

### 3.1.4 Borreliolyse

Frisch geerntete oder lyophilisierte Borrelienzellen wurden in 2-10 ml pyrogenfreiem Wasser suspendiert. Zur Lyse wurde ein Ultraschallstab<sup>17</sup> in die Suspension eingetaucht und die Zellen dreimal für je 5 min unter Eis/H<sub>2</sub>O Kühlung beschallt. Um die einzelnen Lysat-Präparationen zu vergleichen, wurde der Proteingehalt bestimmt (s. 3.1.9).

---

<sup>9</sup>BSK-H complete, #B8291, Sigma Aldrich, Taufkirchen

<sup>10</sup>Anoxomat, Spiral Biotech, Norwood, MA, USA

<sup>11</sup>Dunkelfeld, Vergrößerung 1:400

<sup>12</sup>Dulbecco's PBS, #H15-002, PAA, Pasching, Österreich

<sup>13</sup>#1-10S35-I, BioConcept, Allschwil, Schweiz

<sup>14</sup>Rabbit Serum Albumin, #RAB-0100, Gentaur Molecular Products, Brüssel, Belgien

<sup>15</sup>#212230, Becton Dickinson, Heidelberg

<sup>16</sup>Rabbit Serum, #16120-099, GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe

<sup>17</sup>250 W, Branson, Danbury, CT, USA, 5 mm Mikrospitze



### 3.1.5 Gesamtlipidextraktion

#### 3.1.5.1 Butanolextraktion

10 ml eines Borrelienlysates wurden mit 15 ml *n*-BuOH<sup>18</sup> versetzt und für 15 min bei RT intensiv gemischt. Zur Phasentrennung wurde das Gefäß mit 6200 x g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Am Boden des Gefäßes befand sich ein kleines Pellet, darüber die Wasserphase, dann eine feste Interphase und oben die Butanolphase, die mit einer Pipette abgenommen wurde. Die übrig gebliebenen Phasen wurden erneut mit 15 ml *n*-Butanol versetzt, gemischt und zentrifugiert. Diese Butanolphase wurde mit der ersten Butanolphase vereinigt und mit 15 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach Zentrifugation wurde die vereinigte Butanolphase abgenommen und im Vakuum eingengt.

#### 3.1.5.2 Folch-Extraktion

Die Extraktion der Gesamtlipide mittels CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O erfolgte wie beschrieben (Folch u. a., 1957). In ein Reagenzglas wurden zu 100 µl eines Borrelienlysates 0,7 ml H<sub>2</sub>O, 2 ml CHCl<sub>3</sub> und 1 ml MeOH gegeben und 15 min geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde das Reagenzglas 2 min mit 500 x g bei RT zentrifugiert. Die organische Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, in ein Reagenzglas überführt und im N<sub>2</sub>-Strom abgeblasen.

### 3.1.6 Zellkultur

Die Zellkultur erfolgte im Brutschrank bei 37 °C , 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit.

**RAW 264.7-Zellen** Die Kultur der RAW 264.7-Zellen<sup>19</sup>, einer murinen monozytären Makrophagenzelllinie, erfolgte in RPMI-1640<sup>20</sup> mit Zusätzen von 10 % FCS<sup>21</sup>, 1 mM Natriumpyruvat<sup>22</sup>, 2 mM L-Glutamin<sup>23</sup> sowie 1 % Penicillin/Streptomycin<sup>24</sup>. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen beim Mediaumaustausch 1:10 bis 1:15 verdünnt.

**HEK-293-Zellen** Die HEK-293-Zellen<sup>25</sup>, einer humanen embryonalen Nierenzelllinie, wurden in DMEM<sup>26</sup> mit denselben Zusätzen wie bei RPMI kultiviert. Wenn die Zellen konfluent gewachsen waren (nach etwa 2-3 Tagen), wurde das Medium gewechselt und die Zellen 1:4 verdünnt.

---

<sup>18</sup>LiChrosolv, Merck, Darmstadt

<sup>19</sup>#91062702, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK

<sup>20</sup>RPMI-1640, #E15-039, PAA, Pasching, Österreich

<sup>21</sup>Biochrom, Berlin

<sup>22</sup>Sodium Pyruvate 100 mM, #S11-003, PAA

<sup>23</sup>L-Glutamine 200 mM, #M11-004, PAA

<sup>24</sup>Penicillin/Streptomycin 100x (10 000 units/ml Pen./10 mg/ml Strep.), #P11-010, PAA

<sup>25</sup>#ACC 305, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

<sup>26</sup>DMEM High Glucose (4,5 g/l), #E15-009, PAA, Pasching, Österreich

**HEK-293-TLR2-Zellen** Für die stabil-transfizierten HEK-293-TLR2-Zellen wurden HEK-293-Zellen mit einem TLR2-Plasmid, das zusätzlich ein G418-Resistenzgen enthielt, transfiziert. Die Kultivierung erfolgte im Selektionsmedium, das auf DMEM-Komplettmedium basierte und 0,8 mM des Antibiotikums G418<sup>27</sup> enthielt.

### 3.1.7 Zellstimulationen

Die Zellstimulationen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden Medium bzw. Lösungsmittel (LM) und als Positivkontrolle Pam3Cys<sup>28</sup> verwendet.

**RAW 264.7-Zellen** In 96-Loch-Flachbodenplatten wurden 25 000 RAW-Zellen in 100  $\mu$ l Medium ausgesät und 2 h lang adhären gelassen. Für die Stimulation wurden Stammlösungen hergestellt und zu den Zellen jeweils 1-5  $\mu$ l als Triplikate pipettiert. Nach 16 h wurden die Überstände abgenommen und mTNF- $\alpha$ - oder mL-6-ELISA gemessen. Alternativ wurden die Lipidpools der Säulenchromatographie in Platten pipettiert, das LM verdampft und die Zellen ausgesät.

**HEK-293 und HEK-293-TLR2-Zellen** In einer 48-Loch-Flachbodenplatte wurden entweder 20 000 HEK-293- oder 50 000 HEK-293-TLR2-Zellen in 250  $\mu$ l des Mediums ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Die Stimulantien wurden in DMSO in höheren Konzentrationen gelöst und zu den Zellen 2-10  $\mu$ l als Duplikate pipettiert. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und hIL-8 im ELISA gemessen.

### 3.1.8 Zytokin-ELISA

Es wurden beschichtete 96-Lochplatten<sup>29</sup> und als Waschpuffer PBS<sup>30</sup> mit 0,05 % Tween<sup>31</sup> benutzt. Die Proteinlösung wurde mit 10 % FCS im Waschpuffer hergestellt. Der erste Antikörper (AK) wurde im Beschichtungspuffer verdünnt und davon 50  $\mu$ l pipettiert. Die Platte wurde 16 h bei 4 °C inkubiert, gewaschen und mit 200  $\mu$ l Proteinlösung 1 h bei RT blockiert. Der Standard und die Zellkulturüberstände wurden pipettiert, 2-4 h bei RT inkubiert, gewaschen, 100  $\mu$ l des verdünnten biotinylierten zweiten AK hinzupipettiert und 1-1,5 h inkubiert. Die Platte wurde gewaschen, mit 100  $\mu$ l des 1:1000 verdünnten Streptavidin-HRP-Konjugates<sup>32</sup> versetzt und 30 min geschwenkt. Vor der Färbereaktion wurde die ELISA-Platte gewaschen und mit 100  $\mu$ l TMB-Lösung<sup>33</sup> versetzt. Die Platte wurde im Dunkeln für 5-15 min stehen gelassen und mit 50  $\mu$ l einer 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung

<sup>27</sup>G418 sulphate solution (50 mg/ml), #P02-012, PAA

<sup>28</sup>Pam3CysSKKKK, #L2000, EMC Microcollections, Tübingen

<sup>29</sup>MaxiSorp<sup>TM</sup>, Nunc/Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark

<sup>30</sup>1:10 Verdünnung von 10-fach PBS: 160 g NaCl, 4 g KCl, 28,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Aqua dest. add 2 l

<sup>31</sup>Tween<sup>®</sup>20, #170-6531, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

<sup>32</sup>1 mg/ml, streptavidin-peroxidase labeled, #S5512-1MG, Sigma Aldrich, Taufkirchen

<sup>33</sup>SermunBlau slow (ELISA), #S-004-4-TMB, Seramun Diagnostica, Heidese

abgestoppt. Die OD wurde dann bei 450 nm gemessen<sup>34</sup> und daraus die Konzentrationen berechnet<sup>35</sup>.

**murines TNF- $\alpha$**  Beschichtungspuffer: 0,1 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,0; 1. AK: 1:166 Ratte Anti-Maus TNF- $\alpha$ -IgG<sup>36</sup>, 4 h Inkubation; 2. AK: 1:1000 biotinylierter Ratte Anti-Maus TNF- $\alpha$ -IgG<sup>37</sup>; Standard: murines TNF- $\alpha$ <sup>38</sup>.

**murines IL-6** Beschichtung: 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2; 1. AK: 1:250 Ratte Anti-Maus IL-6-IgG<sup>39</sup>, 2 h Inkubation; 2. AK: 1:500 biotinylierter Ratte Anti-Maus IL-6-IgG<sup>40</sup>; Standard: murines IL-6<sup>41</sup>.

**humanes IL-8** Beschichtung: 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,5; 1. AK: 1:250 Maus Anti-Mensch IL-8-IgG<sup>42</sup>, 2 h Inkubation; 2. AK: 1:500 biotinylierter Maus Anti-Mensch IL-8-IgG<sup>43</sup>; Standard: humanes IL-8<sup>44</sup>.

### 3.1.9 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit einem BCA-Kit<sup>45</sup> nach der Anleitung des Herstellers: Eine 96-Loch-Flachbodenplatte wurde mit je 25  $\mu$ l Probe sowie einer BSA-Standardreihe von 0,025-2 mg/ml eingesetzt und am Ende die Absorption bei 540 nm gegen Wasser gemessen. Über eine lineare Regression der Standardreihe wurde auf die Protein-Konzentrationen geschlossen.

### 3.1.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

**Anfertigung der Gele** Für die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Gele selbst gegossen. Diese bestanden aus einem 4%igem Sammelgel: 1,26 ml Sammelpuffer<sup>46</sup>, 1 ml 40%ige Acrylamidlösung, 100  $\mu$ l 10%ige SDS-Lösung, 10  $\mu$ l Tetramethylethyldiamin, 100  $\mu$ l 10%ige Ammoniumperoxidisulfatlösung, 7,54 ml H<sub>2</sub>O und einem 12,5%igem (oder 10%igem) Trenngel: 7,6 ml Trennpuffer<sup>47</sup>, 9,4 ml 40%ige Acrylamidlösung (7,6 ml), 300  $\mu$ l 10%ige SDS-Lösung, 12  $\mu$ l Tetramethylethyldiamin, 300  $\mu$ l 10%ige Ammoniumperoxidisulfatlösung, 12,4 ml H<sub>2</sub>O (14,2 ml).

<sup>34</sup>SPECTRAFluor Plus, Tecan, Crailsheim

<sup>35</sup>Magellan<sup>TM</sup>3, Tecan

<sup>36</sup>rat anti-mouse TNF- $\alpha$ , 0,5 mg/ml, #55 12 25, BD Pharmingen, Heidelberg

<sup>37</sup>biotin rat anti-mouse TNF- $\alpha$ , 0,5 mg/ml, #55 44 15, BD Pharmingen

<sup>38</sup>recombinant mouse TNF- $\alpha$ , 10  $\mu$ g/ml, #410-MT, R&D Systems, Wiesbaden

<sup>39</sup>rat anti-mouse IL-6, 0,5 mg/ml, #55 44 00, BD Pharmingen

<sup>40</sup>biotin rat anti-mouse IL-6, 0,5 mg/ml, #55 44 02, BD Pharmingen

<sup>41</sup>recombinant mouse IL-6, 20  $\mu$ g/ml, #55 45 82, BD Pharmingen

<sup>42</sup>mouse anti-human IL-8, 0,5 mg/ml, #55 47 16, BD Pharmingen

<sup>43</sup>biotin mouse anti-human IL-8, 0,5 mg/ml, #55 47 18, BD Pharmingen

<sup>44</sup>recombinant human IL-8, 20  $\mu$ g/ml, #55 46 09, BD Pharmingen

<sup>45</sup>BCA Protein Assay Kit, #23225, Thermo Fisher Scientific (früher Pierce), Rockford, IL, USA

<sup>46</sup>1 M Tris-HCl, pH 6,8

<sup>47</sup>1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

**Probenvorbereitung und Gellauf** Von den Proteinproben wurden 15-45  $\mu\text{l}$  mit 25 % eines vierfach konzentrierten Ladepuffers mit DTT<sup>48</sup> oder Mercaptoethanol<sup>49</sup> versetzt. Üblicherweise wurde der Ladepuffer mit DTT benutzt. Wenn bei Konjugationen der SMCC-Linker verwendet wurde, musste der Ladepuffer mit Mercaptoethanol eingesetzt werden, damit die Proteine nicht über freie Maleimidgruppen oligomerisierten. Die Proben wurden 10 min auf 95 °C erhitzt. Die Gelkammer<sup>50</sup> wurde mit Laufpuffer<sup>51</sup> aufgefüllt und die Proben hineinpipettiert. Zur Größenbestimmung bzw. -zuordnung der einzelnen Banden wurde ein vorgefärbter Proteinmarker<sup>52</sup> in eine Geltasche pipettiert. Das Netzteil der Gelapparatur wurde für die Wanderung der Bromphenolblaulauffront durch das Sammelgel auf 80-100 V und durch das Trenngel auf 100-150 V eingestellt. Das Trenngel wurde entweder mit Coomassie gefärbt oder für einen Western-Blot (s. 3.1.13, S. 38) verwendet.

**Anfärben der Gele** Das SDS-Gel wurde 1 h bei RT in einer Coomassie R 250-Lösung<sup>53</sup> geschwenkt. Nach dem Abdekantieren der Färbelösung wurde es 4-16 h mit einer Entfärbelösung<sup>54</sup> entfärbt, so dass die Proteinbanden sichtbar wurden.

### 3.1.11 Patientenseren

Für die serologischen Versuche standen mir Humanseren von zwei LB-Patientenkollektiven zur Verfügung. Außerdem wurden die Untersuchungen der Firma Virotech<sup>55</sup> mit einem dort vorhandenen dritten Patientenkollektiv durchgeführt. Die Zuordnung der Seren zu den einzelnen Manifestationen erfolgte aufgrund der Klinik und der Serodiagnostik (gemäß Wilske u. a. (2000) Screening-ELISA und bestätigender Immunoblot).

#### 3.1.11.1 Nationales Referenzzentrum für Borrelien

Zur initialen Bestimmung der Häufigkeit von Anti-ACGal-AK in LB-Patienten wurden kleinere Mengen von gut charakterisierten Patientenseren – 20 für EM, 19 für NB, 14 für ACA und 15 für LA – sowie 20 Seren von Gesunden vom Nationalen Referenzzentrum für Borrelien<sup>56</sup> zur Verfügung gestellt.

#### 3.1.11.2 Charité

Für sonstige Versuche erhielt ich vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene Seren von vier LB-Patienten im Spätstadium.

<sup>48</sup>0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 4 ml Glycerin, 8 % SDS, 0,4 M DTT, 1 mg Bromphenolblau, 6 ml Aqua dest.

<sup>49</sup>wie Anm. 48 nur 0,57 M Mercaptoethanol statt 0,4 M DTT

<sup>50</sup>Biometra, Göttingen

<sup>51</sup>50 ml 10x Puffer (2,5 M Glycin, 0,25 M Tris, pH 8,3), 5 ml 10%ige SDS-Lösung, 445 ml Aqua dest.

<sup>52</sup>SeeBlue® Plus2 pre stained standard, Invitrogen, Karlsruhe

<sup>53</sup>50 % MeOH, 10 % AcOH, 0,05 % Coomassie Brilliant Blue R 250, Aqua dest.

<sup>54</sup>30 % MeOH, 10 % AcOH, Aqua dest.

<sup>55</sup>Genzyme Virotech, Rüsselsheim, <http://www.virotech.de/>, Kontakt: Dr. Evelyn Rossmann

<sup>56</sup>früher am Max von Pettenkofer-Institut, LMU, München, heute am Bayerischen Landesamt für Gesundheit, München, Kontakt: Prof. Dr. Bettina Wilske, Dr. Volker Fingerle

### 3.1.11.3 Virotech

Das von der Firma Virotech benutzte Kollektiv umfasste als Kontrollen 41 Seren von gesunden Blutspendern und 62 kreuzreaktive Seren<sup>57</sup>. Bei den Patientenserren waren 24 dem Frühstadium<sup>58</sup> zugeordnet, 26 der NB, 27 der ACA und 29 der LA.

## 3.1.12 Immunisierungen von Versuchstieren

Bei den durchgeführten Immunisierungen handelte es sich um Eingriffe nach § 10a des Tierschutzgesetzes, die der zuständigen Behörde angezeigt wurden<sup>59</sup>. Die Tierhaltung erfolgte in den Ställen der Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin der Charité. Die Injektionen der Konjugate in die Versuchstiere wurden von R. Schade<sup>60</sup> durchgeführt.

### 3.1.12.1 Immunisierung von Mäusen

**Immunisierung mit nativem ACGal** Es wurden zehn C3H/HeN-Mäuse<sup>61</sup> (*Mus musculus*) in zwei Gruppen zu je fünf Tieren geteilt. Die erste Gruppe wurde mit je 10 µg nativem ACGal in 100 µl DMSO/PBS 1:1 (v/v) und die zweite Gruppe als Kontrolle nur mit 100 µl PBS immunisiert. Für die Erstinjektion «Prime» wurde dieses Volumen mit je 100 µl FCA<sup>62</sup> zu einer stabilen Emulsion gemacht und i. p. gespritzt. Für eine Wiederholungsinjektion «Boosterung» wurde vier Wochen später das Volumen mit je 100 µl FICA<sup>63</sup> zu einer Emulsion gemacht und ebenfalls i. p. injiziert. Zwei Wochen nach der letzten Injektion wurden die Tiere betäubt, getötet und aus dem Herz ausgeblutet.

**Immunisierung mit OVA-Konjugaten** Es wurden sechs C57BL/6-Mäuse<sup>64</sup> in drei Gruppen à zwei Tiere eingeteilt. Die erste Gruppe bekam das ACGal-OVA-Konjugat injiziert, die zweite das Cys-OVA-Konjugat (s. 3.2.10.2, S. 63) und die dritte stattdessen nur PBS. Für die Erstinjektion wurden 50 µl einer PBS-Lösung – enthaltend entweder etwa 10 µg ACGal gebunden an OVA, dieselbe Menge (bezogen auf OVA) Cystein gebunden an OVA oder nur PBS – mit 50 µl FCA zu einer stabilen Emulsion gemischt. Jede Maus bekam diese Dosis i. p. injiziert. Im Abstand von jeweils drei Wochen wurden drei Boosterungen durchgeführt, bei denen die Tiere dieselbe Menge Probe emulgiert in 50 µl FICA i. p. injiziert bekamen. Zwei Wochen nach der letzten Injektion wurden die Tiere mit Isofluran betäubt, getötet und entblutet.

---

<sup>57</sup>18 Epstein-Barr-Virus, 10 Rheumafaktor-Positive, 9 Autoimmunerkrankte, 9 Schwangere, 16 Syphilis

<sup>58</sup>3 EM, 14 ECM, 5 multiples EM, 2 zirkumskripte Sklerodermie

<sup>59</sup>Genehmigung H0069/03 des Landesamt für Gesundheit und Soziales für Prof. Dr. R. Schade

<sup>60</sup>Prof. Dr. Rüdiger Schade, Institut für Pharmakologie, Charité, Berlin

<sup>61</sup>weiblich, sechs Wochen alt, Charles River Laboratories, Sulzfeld

<sup>62</sup>Freund's Adjuvant, Complete, #F5881, Sigma

<sup>63</sup>Freund's Adjuvant, Incomplete, #F5506, Sigma

<sup>64</sup>weiblich, 5-6 Wochen alt, Harlan-Winkelmann, Borcheln

### 3.1.12.2 Immunisierung von Kaninchen

**Immunisierung mit KLH-Konjugat** Von einem Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) der Rasse „New Zealand white“<sup>65</sup> (NZW) wurde vor der Immunisierung Blut abgenommen und daraus Nullserum gewonnen. Für die Prime-Injektion wurden 300  $\mu\text{l}$  des ACGal-KLH-Konjugates (s. 3.2.10.1, S. 62) mit 300  $\mu\text{l}$  FCA in einer Spritze emulgiert und je zur Hälfte in die Nähe der linken und rechten nodi lymphatici poplitea injiziert. Im Abstand von jeweils sechs Wochen wurden drei Boosterungen gegeben, bei denen jeweils 150  $\mu\text{l}$  ACGal-KLH-Konjugat mit 150  $\mu\text{l}$  FICA emulgiert und intradermal in der Schulterregion als multiple Depots appliziert wurden. Acht Tage nach jeder Boosterung wurde Blut abgenommen und Serum gewonnen.

**Immunisierung mit BSA-Konjugaten** Zwei „New Zealand white“-Kaninchen<sup>66</sup> bekamen das ACGal-BSA-Konjugat (das „Antigen-Tier“) oder die gleiche Menge – auf das BSA bezogen – Cys-BSA-Konjugat (das „Kontroll-Tier“) injiziert (Konjugation s. 3.2.10.2, S. 62). Für die Prime-Injektion wurden je 300  $\mu\text{l}$  PBS, die 50  $\mu\text{g}$  Antigen in Form des Konjugates enthielten, mit 300  $\mu\text{l}$  FCA in einer Spritze emulgiert. Diese Emulsion wurde in die Nähe der Nodi lymphatici poplitea injiziert. Im Abstand von vier Wochen wurden drei Boosterungen intradermal in die Schulter-Region durchgeführt. Hierzu wurde dieselbe Menge Konjugat mit 300  $\mu\text{l}$  FICA emulgiert. Jeweils eine Woche nach einer Injektion wurde Serum gewonnen. Die Kaninchen wurden neun Wochen nach der letzten Injektion getötet und entblutet.

**Immunisierung mit OVA-Konjugaten** Die Immunisierung von zwei Kaninchen mit einem ACGal-OVA-Konjugat und einem Cys-OVA-Kontrollkonjugat (s. 3.2.10.2, S. 63) erfolgte wie für BSA beschrieben mit der Ausnahme, dass die Boosterungen alle drei Wochen durchgeführt wurden.

### 3.1.12.3 Gewinnung der Tierseren

Den Kaninchen wurde das Blut durch eine Punktion der Ohrarterie und den Mäusen durch eine Punktion des retrobulbären Venenplexus (Nöller, 1955) entnommen. Zur Gerinnung wurde das Blut 16 h bei 4 °C stehen gelassen, 10 min bei 1000 x g zentrifugiert und das Serum abgenommen.

## 3.1.13 Western-Blots (WB)

**Übertragung der Proteine** Die Proteine wurden in einer Blottingapparatur mit Kohleelektroden<sup>67</sup> im semidry-Verfahren vom SDS-Gel auf eine hydrophobe Membran übertragen. Das Gel wurde 15 min in Kathodenpuffer<sup>68</sup> geschwenkt. Die PVDF-Membran<sup>69</sup> wurde 15 s in MeOH eingetaucht, 2 min in H<sub>2</sub>O und 10 min in Anodenpuffer 2<sup>70</sup>

<sup>65</sup>CHbb:NZW, weiblich, 2-3 kg, Harlan-Winkelmann

<sup>66</sup>HsdIf:NZW, weiblich, 2,5-3 kg, Harlan-Winkelmann

<sup>67</sup>H. Hölzel, Wörth/Hörlkofen

<sup>68</sup>25 mM Tris, 40 mM Glycin, 10 % MeOH, pH 9,4

<sup>69</sup>Immobilon P, Millipore, Bedford, MA, USA

<sup>70</sup>25 mM Tris, 10 % MeOH, pH 10,4

geschwenkt. Auf die Anode wurden zwei mit Anodenpuffer 1<sup>71</sup> und ein mit Anodenpuffer 2 befeuchtete Chromatographiepapiere<sup>72</sup> aufgelegt. Darauf wurden die Membran, das Gel und drei in Kathodenpuffer getauchte Whatmanblätter unter die Kathode gelegt. Das Blotten wurde 16 h mit 80 mA durchgeführt.

**Immunfärbung** Die Membran mit den geblotteten Proteinen wurde 1 h bei RT mit Milchlösung<sup>73</sup> blockiert und mit PBS/Tween<sup>74</sup> gewaschen. Die Human- oder Tierseren wurden in Milchlösung 1:500 bis 1:4000 verdünnt, die Membran darin 2,5 h bei RT inkubiert und mit PBS/Tween gewaschen. Der sekundäre AK (IgG-HRP Konjugat<sup>75</sup>) wurde in Milchlösung 1:20 000 bis 1:50 000 verdünnt, die Membran darin 1,5 h bei RT inkubiert und mit PBS gewaschen. Die Membran wurde auf Whatmanpapier abgestreift, 4 min in ECL-Lösung<sup>76</sup> inkubiert und in Folie eingeschlagen. Damit wurden Röntgenfilme<sup>77</sup> mit üblichen Belichtungszeiten von 0,5, 2, 8 und 32 min belichtet und entwickelt<sup>78</sup>. Nach zweimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurden die AK mit Strippingpuffer<sup>79</sup> durch 45 min Inkubation entfernt. Nach Waschen wurde die Membran mit Coomassie R250 (s. 3.1.10, S. 36) gefärbt.

### 3.1.14 Dot-Blots

**Vorbereitung der Membranen** Eine PVDF-Membran wurde in 1 cm-Streifen geschnitten, 10 s vollständig in MeOH hydrophilisiert und in einer „Immuno-Schale“ 2 min in H<sub>2</sub>O sowie 5 min in PBS geschwenkt. Die aufzutragenden Substanzen lagen im Allgemeinen als 1 mg/ml Lösungen in PBS – für die hydrophilen – oder in *tert*-BuOH/H<sub>2</sub>O 5:1 (w/v) – für die hydrophoben – vor. Mit einer Pipette wurden 1 µl der Lösungen auf die leicht feuchten Streifen pipettiert und einziehen gelassen.

**Immunfärbung** Die Membran-Streifen wurden in „Immuno-Schalen“ gelegt, 1 h bei RT mit Milchlösung blockiert und mit PBS/Tween gewaschen. Die einzelnen Human- (s. 3.1.11, S. 36) oder Tierseren (s. 3.1.12, S. 37) wurden in Milchlösung 1:250 bis 1:512 000 verdünnt, die Streifen 2,5 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C darin inkubiert und mit 4 ml PBS/Tween gewaschen. Der sekundäre AK – Anti-IgG und HRP-konjugiert<sup>80</sup> – wurde in Milchlösung 1:5000 bis 1:100 000 verdünnt, die Streifen darin 1,5 h inkubiert und mit PBS gewaschen. Die Streifen wurden 4 min in ECL-Lösung<sup>81</sup> inkubiert und in Folie eingeschlagen. Die Filmbelichtung und Entwicklung erfolgte wie bei den Western-Blots beschrieben (s. 3.1.13, S. 39). Die Filme und die Dot-Blot-Streifen wurden eingescannt

<sup>71</sup>300 mM Tris, 10 % MeOH, pH 10,4

<sup>72</sup>3mmChr, Whatman, Dassel

<sup>73</sup>5 % Magermilchpulver (Fluka, Buchs, Schweiz), 0,05 % Tween<sup>®</sup> 20, PBS

<sup>74</sup>0,05 % Tween<sup>®</sup> 20, PBS (wie Anm. 12)

<sup>75</sup>rabbit anti-human, #sc-2769; goat anti-rabbit, #sc-2030; goat anti-mouse, #sc-2031; alle Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA

<sup>76</sup>SuperSignal<sup>®</sup> Chemiluminescent Substrat, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA

<sup>77</sup>CL-XPosure<sup>™</sup> film, Thermo Fisher Scientific (früher Pierce)

<sup>78</sup>Entwickler G153A und Schnellfixierbad G354, Agfa-Gevaert, München

<sup>79</sup>Restore<sup>™</sup> Western Blot Stripping Buffer, Thermo Fisher Scientific (früher Pierce)

<sup>80</sup>wie Anm. 75

<sup>81</sup>wie Anm. 76

und mittels digitaler Bildbearbeitung übereinander gelegt, um die Zuordnung der Streifen zu ermöglichen.

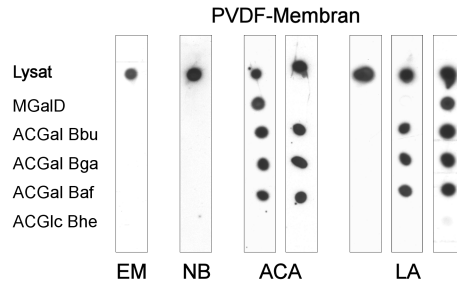


Abbildung 3.1: Dot-Blots der Glycolipide mit NRZ-Seren (Beispiele).

### 3.1.14.1 Reaktivität der 88 NRZ-Seren

Auf die Membranstreifen wurden 1  $\mu$ l folgender Lösungen in der Reihenfolge von oben nach unten aufpipettiert: 1 mg/ml Lysat von *B. burgdorferi* s. s. (Bbu) in PBS und jeweils 1 mg/ml in *tert*-BuOH/H<sub>2</sub>O 4:1 (v/v): MGalD von Bbu, ACGal von Bbu, von *B. garinii* (Bga) und von *B. afzelii* (Baf) sowie ACGlc von *B. hermsii* (Bhe). Die einzelnen NRZ-Seren (s. 3.1.11.1, S. 36) wurden jeweils 1:1000 und der sekundäre AK Anti-Mensch-IgG 1:5000 verdünnt (Abb. 3.1).

### 3.1.14.2 Erkennung der synthetischen Glycolipide

Die Immunoblots wurden auf Membranstreifen und auch auf einem Stück PVDF-Membran, auf dem mittels einer Schablone die Positionen markiert waren, durchgeführt. Aufpipettiert wurden je 1  $\mu$ l Lysat von Bbu in PBS mit 1,5 mg/ml Proteingehalt, 1  $\mu$ l Gesamtlipide von Bbu mit 1 mg/ml in CHCl<sub>3</sub>, 1  $\mu$ l isoliertes ACGal von Bbu, Bga und Baf sowie 1  $\mu$ l ACGlc von Bhe, alle als 1 mg/ml Lösungen in *tert*-BuOH/H<sub>2</sub>O 5:1 (w/v); weiterhin je 1  $\mu$ l von allen zehn synthetisierten Glycolipiden **13**, **14**, **15**, **16**, **17**, **18**, **19**, **4**, **20**, **21** als 1 mg/ml Lösungen in *tert*-BuOH/H<sub>2</sub>O sowie als Kontrollen 1  $\mu$ l Cholesterol 1 mg/ml in *tert*-BuOH/H<sub>2</sub>O und 1  $\mu$ l D-Galactose 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O. Die Charité-Patientenseren (s. 3.1.11.2, S. 36) und die Kaninchenseren wurden 1:4000 bzw. 1:2000 verdünnt, der sekundäre, Anti-IgG-AK jeweils 1:50 000.

### 3.1.14.3 Titerbestimmung der synthetischen Glycolipide

Auf Membranstreifen wurden je 1  $\mu$ l von 1 mg/ml Lösungen in *tert*-BuOH/H<sub>2</sub>O 5:1 (w/v) der synthetischen Glycolipide aufgebracht. Von den Human- (s. 3.1.11.2, S. 36) oder Tierseren (Antigen- und Kontrolltier) wurden seriell 1:2 Verdünnungen von 1:1000 bis 1:512 000 hergestellt und die Streifen darin 16-21 h bei 4 °C inkubiert. Die sekundären AK (Anti-Mensch-IgG oder Anti-Kaninchen-IgG) wurden 1:50 000 verdünnt.



### 3.1.15 Dünnschichtchromatogramm-Blots

Ein gelaufenes Aluminium-DC (s. 3.2.1, S. 44) wurde langsam in den Transferpuffer<sup>82</sup> eingetaucht, dort 10 s belassen und ablaufen gelassen bis sie nicht mehr glänzte. Auf das DC wurde eine PVDF-Membran<sup>83</sup> aufgelegt und zügig mit einem Glasstab festgerollt. Ein Glas-Microfiber-Blatt<sup>84</sup> wurde aufgelegt und ein auf 150 °C vorgeheiztes Bügeleisen wurde für 0,5-2 min draufgedrückt. Die Membran wurde abgelöst und das DC mit einem Fön getrocknet. Bei zügiger Arbeitsweise konnte ein DC bis zu viermal auf Membranen übertragen werden. Die Immunfärbung der in Streifen geschnittenen Membranen erfolgte wie für DB beschrieben (s. 3.1.14, S. 39).

### 3.1.16 Line-Blots

Die Line-Blots wurden von der Fa. Virotech mit deren Seren (s. 3.1.11.3, S. 37) durchgeführt. Eine 5 mg/ml ACGal-Lösung **14** in *tert*-BuOH/H<sub>2</sub>O 5:1 (w/v) wurde in acht Verdünnungen (1:20 - 1:2560) in einem Aufsprühpuffer oder *tert*-BuOH verdünnt und mit einer Mikroverteilungsmethode auf eine Nitrozellulosemembran aufgesprüht. Die Membran wurde blockiert, auf eine Trägerfolie aufgebracht, getrocknet und in 2 mm breite Streifen geschnitten. Die Seren (s. 3.1.11.3, S. 37) wurden 1:100 im Verdünnungspuffer verdünnt, 30 min bei RT mit den Streifen inkubiert und die Streifen mit Waschpuffer gewaschen. Der zweite, mit alkalischer Phosphatase konjugierte, Anti-Mensch-IgG Antikörper<sup>85</sup> wurde 1:100 im Verdünnungspuffer verdünnt und die Streifen darin 30 min bei RT inkubiert, gewaschen, mit H<sub>2</sub>O gespült, 10 min mit der BCIP/NBT-Substratlösung inkubiert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und 30 min trocknen gelassen. Eine immunreaktive Bande wurde als positiv gewertet, wenn sie im Vergleich mit einer Schablone<sup>86</sup> zwei „Virotech-Intensitäten“ erreicht hatte.

### 3.1.17 Indirekter ELISA mit ACGal-Seren

Eine 96-Loch-Flachbodenplatte wurde mit 50 µl einer 30 µg/ml Lösung von nativem ACGal in Beschichtungspuffer<sup>87</sup> 16 h bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde mit H<sub>2</sub>O gewaschen, mit 200 µl Blockierpuffer<sup>88</sup> versetzt, 1 h bei RT inkubiert und mit Waschpuffer<sup>89</sup> gewaschen. Die NRZ-Seren wurden 1:1000 in Waschpuffer verdünnt und 200 µl als Drei- bzw. Vierfachwerte in die Platte überführt und in weitere Löcher seriell 1:2 verdünnt, um Konzentrationen von 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16 000 und 1:32 000 zu erhalten. Die Platte wurde 2 h bei RT inkubiert und nach Waschen mit Waschpuffer wurden 100 µl einer 1:1000 Verdünnung von sekundärem AK (Kaninchen Anti-Mensch-IgG-HRP<sup>90</sup>) in Waschpuffer pipettiert. Nach Inkubation für 2 h wurde die Platte mit Waschpuffer gewaschen, mit 100 µl einer TMB-Lösung<sup>91</sup> versetzt und 45-60 min im

<sup>82</sup>25 mM Tris · HCl, pH 10,4, 20 % MeOH

<sup>83</sup>wie Anm. 69

<sup>84</sup>GF/A, Whatman, Brentford, UK

<sup>85</sup>alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgG, #WE400.62, Genzyme Virotech

<sup>86</sup>mit einer Scala von 0-5 Virotech-Intensitäten, Genzyme Virotech

<sup>87</sup>0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2

<sup>88</sup>0,05 M Hepes, 0,15 M NaCl, 10 mg/ml BSA, pH 7,4

<sup>89</sup>0,05 M Hepes, 0,15 M NaCl, 1 mg/ml BSA, pH 7,4

<sup>90</sup>#sc-2769, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA

<sup>91</sup>wie Anm. 33, S. 34

Dunkeln stehen gelassen. Bei kräftiger Blaufärbung wurden 50  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugegeben und die OD bei 450 nm gemessen.

### 3.1.18 Affinitätschromatographie

Um die Anti-BSA-AK aus den Kaninchenseren (s. 3.1.12.2, S. 38) zu entfernen, wurden zwei NHS-aktivierte Sepharose-Säulen<sup>92</sup> nach den Instruktionen des Herstellers mit BSA beladen. Es wurden 1 ml der Seren des ACGal-BSA- und des Cys-BSA-immunisierten Kaninchens mit Spritzen parallel durch die zwei Säulen gedrückt: (1) bei RT ohne Verweilzeit, (2) bei RT mit 35 min Verweilzeit, (3) bei 34 °C mit 95 min Verweilzeit, (4) bei 4 °C mit 16 h Verweilzeit in der Säule.

### 3.1.19 Radioaktiver Enzymtest

Eine Kultur von *B. burgdorferi* s. s. in 1,25 l BSK-H wurde abzentrifugiert und das Pellet mit Puffer A<sup>93</sup> gewaschen. Die Borrelien (500 mg Feuchtgewicht) wurden in 2 ml Puffer A aufgenommen und lysiert (s. 3.1.4, S. 32). Der folgende radioaktive Versuchsteil wurde zusammen mit D. Warnecke<sup>94</sup> im Radioaktivlabor des MPI für Infektionsbiologie<sup>95</sup> durchgeführt: Je 20  $\mu\text{l}$  des Lysates wurden in Reagenzgläsern mit 10  $\mu\text{l}$  Glycosyldonor, 5  $\mu\text{l}$  Glycosyl-Akzeptor und 65  $\mu\text{l}$  Puffer B<sup>96</sup> und in einem zweiten Ansatz zusätzlich mit 10  $\mu\text{l}$  einer 1%igen Triton-X-100-Lösung für 90 min bei 30 °C inkubiert. Als radioaktive Substanzen wurden 100 000 dpm UDP-Gal<sup>97</sup>/10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 100 000 dpm UDP-Glc<sup>98</sup>/10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 270 000 dpm Cholesteroll<sup>99</sup>/5  $\mu\text{l}$  EtOH und als nicht radioaktive 5 mM UDP-Gal<sup>100</sup> in  $\text{H}_2\text{O}$ , 5 mM UDP-Glc<sup>101</sup> in  $\text{H}_2\text{O}$ , 4 mM Cholesteroll in EtOH, 4 mM 1,2-Dioleoylglycerol<sup>102</sup> in EtOH verwendet. Die Gesamtlipide wurden mit einer Folch-Extraktion (s. 3.1.5.2, S. 33) extrahiert, in 15-20  $\mu\text{l}$   $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  2:1 gelöst und auf ein DC aufgetragen. Als Standards wurden CGal und CGlc verwendet. Das DC wurde 2 h einer Imagerplatte exponiert und die Radioaktivität mittels eines Phosphoimagers<sup>103</sup> gemessen.

### 3.1.20 Indirekter Immunofluoreszenztest

Borrelien wurden in BSK-H kultiviert (s. 3.1.2, S. 32), mit PBS gewaschen, in Fixierlösung mit EtOH/Formaldehyd<sup>104</sup> oder Paraformaldehyd<sup>105</sup> aufgenommen und je 1  $\mu\text{l}$

<sup>92</sup>HiTrap™ NHS-activated HP Columns, #17-0716-01, GE healthcare (früher Amersham), Freiburg im Breisgau

<sup>93</sup>50 mM Tris · HCl, pH 7,5, 15 % Glycerol

<sup>94</sup>Dr. Dirk Warnecke, Biozentrum Klein Flottbek, Hamburg

<sup>95</sup>Berlin, Kontakt: Dr. Yuri Churin

<sup>96</sup>50 mM Tris · HCl, pH 7,5

<sup>97</sup>Uridine diphospho-D-[U-<sup>14</sup>C]galactose  $\text{NH}_4^+$ , 11,4 GBq/mmol, #CFB129, Amersham

<sup>98</sup>Uridine diphospho-D-[U-<sup>14</sup>C]glucose  $\text{NH}_4^+$ , 11,4 GBq/mmol, #CFB102, Amersham

<sup>99</sup>[4-<sup>14</sup>C]-Cholesteroll, 2,15 GBq/mmol, #CFA128, Amersham

<sup>100</sup>Uridine 5'-diphosphogalactose disodium salt, #94333, Sigma

<sup>101</sup>Uridine 5'-diphosphoglucose disodium salt, #94335, Sigma

<sup>102</sup>1,2-Dioleoyl-rac-glycerol, #D8394, Sigma

<sup>103</sup>Fujix BAS 1000, Fuji, Tokyo, Japan

<sup>104</sup>50 % EtOH, 40 % PBS, 10 % Formaldehyd [37 %]

<sup>105</sup>4 % Paraformaldehyd, PBS, erhitzen auf 40 °C und zwei Tropfen 1 M NaOH

auf Objektträger<sup>106</sup> (OT) pipettiert. Die Bakterien wurden 20 min an der Luft getrocknet. Ein initiales Blockieren mit Milchlösung<sup>107</sup> oder BSA-Lösung ergab kaum Vorteile. Die Seren wurden in Milch- oder BSA-Lösung 1:100 bis 1:1000 verdünnt und 5  $\mu$ l auf den OT pipettiert. Der OT wurde 2 h bei RT oder 14-16 h bei 4 °C inkubiert und mit PBS/Tween gewaschen. Der sekundäre Anti-IgG-AK<sup>108</sup> war mit Cy3<sup>®</sup> oder FITC konjugiert und wurde 1:200 bis 1:1000 in Milch- oder BSA-Lösung verdünnt und 5  $\mu$ l auf den OT pipettiert. Der OT wurde 1,5 h bei RT in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Der OT wurde mit PBS gewaschen und 15 min bei 50 °C im Ofen getrocknet. Auf den OT wurden einige Tropfen Eindeckmedium mit DAPI<sup>109</sup> gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt. Bei der Mikroskopie der Bakterien wurde ein Epifluoreszenzmikroskop<sup>110</sup> mit 40-fach- und 100-fach-Objektiven<sup>111</sup> sowie Schmalbandfiltern<sup>112</sup> zur Messung der Fluoreszenz von DAPI, FITC und Cy3 benutzt. Mit der aufgebauten CCD-Kamera<sup>113</sup> wurden Fotos aufgenommen und mit der mitgelieferten Software<sup>114</sup> verarbeitet.

## 3.2 Chemische Methoden und Reaktionen

Ein Teil der chemisch-analytischen Arbeiten wurde gastweise in der Laborgruppe Immunchemie von Prof. Dr. Ulrich Zähringer am Forschungszentrum Borstel<sup>115</sup> durchgeführt. Die chemisch-synthetischen Arbeiten wurden gastweise in der Arbeitsgruppe Medizinische Chemie von Prof. Dr. Jörg Rademann am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie<sup>116</sup> durchgeführt.

Die Lösungsmittel (LM) wurden bei J. T. Baker<sup>117</sup>, Fisher Scientific<sup>118</sup>, Fluka<sup>119</sup>, Merck<sup>120</sup>, Riedel de Haën<sup>121</sup>, Roth<sup>122</sup> und Sigma-Aldrich<sup>123</sup> gekauft. Für den normalen Gebrauch wurde die Qualitätsstufe *reagent grade* ohne Aufreinigung verwendet, während für die Analytik die Qualitätsstufe *gradient grade* oder destillierte LM Verwendung fanden. Reinstwasser wurde einer entsprechenden Filtrationsanlage<sup>124</sup> entnommen. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Reaktionen in trockenen LM durchgeführt. Die

---

<sup>106</sup>Epoxy, 10 well, 6,7 mm, w'adhesion, Thermo Fisher Scientific

<sup>107</sup>wie Anm. 73

<sup>108</sup>goat pAb to rabbit IgG (Cy3<sup>®</sup>), #ab6939-100, abcam, Cambridge, UK; goat anti-rabbit IgG-FITC, #sc-2012; rabbit anti-human IgG-FITC, #sc-2778, beide Santa Cruz Biotechnologies

<sup>109</sup>VECTASHIELD<sup>®</sup> Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

<sup>110</sup>Axioplan 2 imaging MOT; Carl Zeiss, Jena, mit einer 100 W Quecksilberdampf Lampe (HBO103, Osram)

<sup>111</sup>Plan Neofluar, Carl Zeiss

<sup>112</sup>F31, HQ-F41-007, HQ-F41-001, AHF Analysentechnik, Tübingen

<sup>113</sup>AxioCam MRm, Carl Zeiss

<sup>114</sup>AxioVision 4.5, Carl Zeiss

<sup>115</sup>Forschungszentrum Borstel – Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, 23845 Borstel

<sup>116</sup>Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, 13125 Berlin-Buch

<sup>117</sup>Deventer, Niederlande

<sup>118</sup>Schwerte

<sup>119</sup>Buchs, Schweiz

<sup>120</sup>Darmstadt

<sup>121</sup>Seelze

<sup>122</sup>Karlsruhe

<sup>123</sup>Taufkirchen

<sup>124</sup>Milli-Q<sup>®</sup>, Millipore, Schwalbach am Taunus

Chemikalien ohne Nennung des Herstellers wurden von Acros Organics<sup>125</sup>, Fluka, Roth oder Sigma-Aldrich gekauft. Die Strukturformeln wurden mit dem Programm Chem-Draw Ultra 8.0<sup>126</sup> gezeichnet.

### 3.2.1 Dünnschichtchromatographie

Falls nicht extra angegeben, handelt es sich bei den Anteilen der Laufmittelgemische jeweils um Volumenanteile (v).

#### 3.2.1.1 Analytische Dünnschichtchromatographie

Die Chromatographie wurde auf Kieselgel-60-Aluminiumfolien<sup>127</sup> durchgeführt. Als Laufmittel wurden verwendet:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85:15 für Glycolipide, Hexan/EE 1:1 für Neutrallipide,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:4 für Phospholipide, Toluol/EtOH 85:15 zur Trennung von CGal und CGlc sowie Toluol/Aceton 3:1, Hexan/EE 3:1, Hexan/EE 1:1 und  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85:15 zur Reaktionskontrolle. Referenzsubstanzen, die auf den DC als Standards mitliefen, wurden bei Sigma-Aldrich (Cholesterol, Cholesteryloleat, PC, PG) oder Research Plus ( $\beta\text{CGlc}$ )<sup>128</sup> erworben oder von Dirk Warnecke<sup>129</sup> ( $\alpha\text{CGal}$ ) zur Verfügung gestellt.

#### 3.2.1.2 Präparative Dünnschichtchromatographie

Um CGlc aufzureinigen, musste nach der Säulenchromatographie der Gesamtlipide (s. 3.2.2, S. 45) eine präparative Dünnschichtchromatographie durchgeführt werden. Das Gemisch MGalD/CGlc wurde auf einer 20 x 20 cm großen HPTLC-Aluminiumfolie<sup>130</sup> aufgetragen und in einem Glaskasten mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85:15 entwickelt. Zeitgleich wurde ein 20 cm langes DC laufen gelassen, das nach dem Lauf mit Mostain gefärbt wurde. Gemäß den  $R_f$ -Werten des Referenz-DC wurde die CGlc Bande vom DC heruntergeschabt. Aus dem gesammelten Kieselgel wurde in einer Pore-4 Fritte mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  1:1 das CGlc herausgelöst und die Lösung durch einen PTFE Membranfilter<sup>131</sup> filtriert und eingeeengt.

#### 3.2.1.3 Färbungen

**Ethanolische Schwefelsäure** Dieses Verfahren wird zur Färbung von Kohlenhydraten verwendet, ist aber nicht spezifisch dafür. Das DC wurde in eine Tauchkammer mit EtOH/konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  85:15 eingetaucht, die Flüssigkeit ablaufen gelassen und in einem Ofen auf 200 °C erhitzt bis die Substanzflecken sich dunkel verfärbten.

**Mostain** Diese Färbung ist eine universelle Methode, die oftmals in der Kohlenhydratchemie Verwendung findet. Das DC wurde in eine Tauchkammer mit einer Lösung von 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 40 mM Ammoniumheptamolybdat ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ), 2,5 mM

<sup>125</sup>Geel, Belgien

<sup>126</sup>CambridgeSoft, Cambridge, MA USA

<sup>127</sup>TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>. #1.16834.001, Merck, Darmstadt

<sup>128</sup>Cholesteryl-3b-D-Glucoside, #11630-3, Research Plus, Manasquan, NJ, USA

<sup>129</sup>s. Anm. 94

<sup>130</sup>KG 60 F<sub>254</sub>, #1.05548.0001, Merck, Darmstadt

<sup>131</sup>TE 35, 0,2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schuell, Dassel

Cer(IV)-sulfat ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) eingetaucht, die Flüssigkeit ablaufen gelassen und mit einem Heißluftgebläse oder in einem Ofen auf  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt bis die Substanzflecken sich blau färbten.

### 3.2.2 Säulenchromatographie

**Trennung der Gesamtlipide** Eine Glassäule ( $\varnothing 2,2 \text{ cm}$ ) wurde mit  $125 \text{ cm}^3$  KG60<sup>132</sup> gefüllt und mit  $\text{CHCl}_3$  equilibriert. Die Säule wurde mit den mit *n*-BuOH-extrahierten Gesamtlipiden (s. 3.1.5.1, S. 33) beladen und stufenweise mit jeweils zwei CV von  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  49:1 (v/v), 48:2, 47:3, 46:4 und 12 CV von  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  39:10:1 (v/v/v) eluiert. Es wurden 10 ml-Fractionen gesammelt und mittels DC/Mostain auf ihren Lipidgehalt hin untersucht. Die Fractionen mit identischen Lipiden wurden vereinigt und filtriert.

**Reinigung der Syntheserohprodukte** Je nach der Rohproduktmasse wurden Glassäulen ( $\varnothing 0,5\text{-}6 \text{ cm}$ ) verwendet, die unten eine Fritte eingeschmolzen hatten oder mit Quarzwolle abgedichtet wurden. Diese wurden mit in dem LM-Gemisch solvatisiertem KG60<sup>133</sup> gefüllt. Die Rohprodukte wurden entweder in einem kleinen LM-Volumen oder auf KG60 „aufgezogen“ auf die Säule aufgetragen und im Allgemeinen isokratisch eluiert. Da die Fritten das solvatisierte KG60 nicht vollständig zurückhielten, wurden die Fractionen durch einen Membranfilter filtriert.

Verweilzeit (in min)	Integral	Anteil (in %)	Fettsäure
15,51	$9,81 \cdot 10^4$	2	Palmitoleinsäure (16:1)
15,94	$1,12 \cdot 10^6$	21	Palmitinsäure (16:0)
19,19	$2,32 \cdot 10^6$	44	Ölsäure (18:1)
19,66	$1,74 \cdot 10^6$	33	Stearinsäure (18:0)

Tabelle 3.1: Verteilung der Fettsäuren in Cholesteryl-6-O-acyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (ACGlc) aus *B. hermsii*. Nach Methanolyse und Peracetylierung wurden im Gaschromatogramm die Integrale der Signale ins Verhältnis gesetzt.

### 3.2.3 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GLC/MS)

Nach einer milden Methanolyse von  $100 \mu\text{g}$  der Glyco- oder Phospholipide mit  $1,5 \text{ ml}$   $0,5 \text{ M HCl}/\text{MeOH}$  in versiegelten Ampullen für  $1 \text{ h}$  bei  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde die Flüssigkeit im  $\text{N}_2$ -Strom abgeblasen. Die Proben wurden mit  $1 \text{ ml}$  Pyridin/Essigsäureanhydrid (2:1, v/v) für  $1 \text{ h}$  bei  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  peracetyliert und nach einer Aufkonzentration in einen Gaschromatographen<sup>134</sup> mit einer Kapillarsäule<sup>135</sup> und Helium als Trägergas injiziert. Mit dem Herstellerprogramm<sup>136</sup> wurde ein Temperaturgradient von  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $3 \text{ min}$ ) bis  $320 \text{ }^\circ\text{C}$  bei  $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  laufen gelassen und das Gaschromatogramm aufgenommen. Zusätzlich wurden von einem Massenspektrometer<sup>137</sup> Massenspektren mittels Elektronenstoß und chemischer Ionisierung im Massenbereich  $50\text{-}900 \text{ m/z}$  aufgezeichnet. Die Zuordnung der

<sup>132</sup>Kieselgel 60 f. d. Säulenchromatographie,  $40\text{-}63 \mu\text{m}$ , #P091.2, Roth, Karlsruhe

<sup>133</sup> $40\text{-}63 \mu\text{m}$ , Merck, Darmstadt oder Fluka, Buchs

<sup>134</sup>model 5890 Series II, Agilent (früher Hewlett Packard), Böblingen

<sup>135</sup>HP-5MS 30m 5 % phenyl methyl siloxane, Agilent

<sup>136</sup>ChemStation, Agilent

<sup>137</sup>HP 5989A, Agilent

Signale erfolgte aufgrund der Retentionszeiten im Gaschromatogramm im Vergleich mit externen Standards<sup>138</sup> (s. Tab. 3.1, S. 45) und aufgrund der Massenspektren.

### 3.2.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

**Lipidanalytik** Die säulenchromatographisch getrennten nativen Glyco- und Phospholipide wurden in 0,5 ml  $\text{CHCl}_3$ -*d*/MeOH-*d*<sub>4</sub> (9:1, v/v) beziehungsweise DMSO-*d*<sub>6</sub><sup>139</sup> gelöst und die NMR-Spektren in 5-mm Hochpräzisions-NMR-Röhrchen<sup>140</sup> bei 300 K gemessen. Protonen- (<sup>1</sup>H) und alle zweidimensionalen Spektren wurden an einem 600 MHz-Spektrometer<sup>141</sup> bei 600,5 MHz gemessen. Kohlenstoff- (<sup>13</sup>C) und DEPT-Spektren wurden an einem 360 MHz-Spektrometer<sup>142</sup> bei 90,6 MHz gemessen und sind <sup>1</sup>H-breitbandentkoppelt. Die Proben wurden gelockt, von Hand geschimmt und alle Experimente (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT 135, <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H TOCSY, <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HMQC, <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HMBC) mit Standardsoftware<sup>143</sup> gemessen. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich bei <sup>1</sup>H auf internes TMS ( $\delta_{\text{H}} = 0,00$  ppm) und bei <sup>13</sup>C auf das LM-Signal ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta_{\text{C}} = 77,00$  ppm, DMSO:  $\delta_{\text{C}} = 39,7$  ppm). Die vollständige Zuordnung aller Signale erfolgte aufgrund der zweidimensionalen Experimente und bei aufgrund der Spektren nicht eindeutig zuzuordnenden Signalen des Cholesterols unter Zuhilfenahme von Vergleichsdaten (Wilson u. a., 1996). (Abbildungen in Anhang A.1, S. 133ff)

**Synthesekontrolle** Die Substanzen wurden mit 100-200 mg/ml in  $\text{CHCl}_3$ -*d* oder Pyridin-*d*<sub>5</sub><sup>144</sup> gelöst und in 5-mm NMR-Röhrchen<sup>145</sup> bei 300 K gemessen. Die Messungen wurden aufgrund eines hohen Durchsatzes mittels der Automation durchgeführt, d.h. automatisch gelockt und geschimmt. Für alle synthetisierten Substanzen wurde ein vollständiger Satz an Spektren (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT 135, <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HMQC, <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HMBC) an einem 300 MHz-Spektrometer<sup>146</sup> bei 300,2 MHz (<sup>1</sup>H und alle zweidimensionalen Spektren) bzw. bei 75,5 MHz (<sup>13</sup>C, DEPT 135 und alle kohlenstoffdetektierenden zweidimensionalen Spektren; alle <sup>1</sup>H-breitbandentkoppelt) mit dem Programm des Herstellers<sup>147</sup> gemessen. Die angegebenen chemischen Verschiebungen sind für <sup>1</sup>H in Referenz zu internem TMS ( $\delta_{\text{H}} = 0,00$  ppm) und für <sup>13</sup>C zum entsprechenden LM-Signal ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta_{\text{C}} = 77,00$  ppm, Pyridin:  $\delta_{\text{C}} = 123,50$  ppm) angegeben. Die <sup>1</sup>H-Verschiebungen, Multiplizitäten und Kopplungskonstanten wurden im Allgemeinen den <sup>1</sup>H-Spektren und für die überlagerten Signale den HMQC-Spektren entnommen. Die <sup>13</sup>C-Verschiebungen sind den <sup>13</sup>C- und teilweise den besser aufgelösten DEPT-135-Spektren entnommen. Die vollständige Zuordnung der Signale erfolgte, wie oben angegeben, aufgrund der gemessenen Spektren und bei den überlagerten Cholesterolsignalen mit Hilfe der Vergleichstabellen. (Abbildungen in Anhang A.2, S. 139ff)

<sup>138</sup>Supelco, Bellefonte, PA, USA

<sup>139</sup>Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA

<sup>140</sup>Promochem, Wesel

<sup>141</sup>Avance DRX-600, Bruker, Karlsruhe

<sup>142</sup>DPX-360, Bruker

<sup>143</sup>XWinNMR 3.5, Bruker

<sup>144</sup>Deutero, Kastellaun oder Euriso-Top, Saarbrücken

<sup>145</sup>Norell, Landisville, NJ, USA

<sup>146</sup>Bruker Avance 300, Bruker, Karlsruhe

<sup>147</sup>TopSpin 2.1, Bruker

### 3.2.5 Massenspektrometrie (MS)

#### 3.2.5.1 MALDI-TOF

**Lipidanalytik** Die Massenspektren der säulenchromatographisch getrennten nativen Glyco- und Phospholipide wurden an einem MALDI-TOF-Spektrometer<sup>148</sup> in Reflektor-TOF Konfiguration und einer Beschleunigungsspannung von 20 kV im Positiv- und Negativmodus gemessen. Dazu wurden die Proben mit 10 mg/ml in CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15 (v/v) gelöst und auf dem Target mit einem gleichen Volumen DHB-Matrix gemischt. Die Gerätekalibrierung erfolgte extern mit Substanzen ähnlicher bekannter Struktur.

**Glycolipide** Die hochaufgelösten Massenspektren der Glycolipide wurden an einem MALDI-TOF-Spektrometer<sup>149</sup> mit dem Programm des Herstellers<sup>150</sup> im Positivmodus im Massenbereich von 500-4000 Da aufgenommen. Aufgrund einer internen Kalibrierung<sup>151</sup> betrug der Messfehler weniger als 10 ppm. Als Matrices wurden DHB<sup>152</sup> und THAP<sup>153</sup> verwendet. Von den in ACN gelösten Proben wurden 1  $\mu$ l auf dem Target 1:1 und die in *tert*-BuOH/H<sub>2</sub>O (5:1, w/v) gelösten Proben 1:3 mit der Matrix verdünnt. Auf die gemessenen Spektren wurden mit dem Herstellerprogramm eine Grundlinienkorrektur und ein Rauschfilter angewandt. Für den Messwert wurden die Na<sup>+</sup>-Signale der Messungen mit DHB und THAP-Matrix gemittelt. (Abbildungen in Anhang B, S. 145ff)

**Gesamtmassenbestimmung der Antigen-Konjugate** Die Gesamtmassenbestimmung der Antigen-Konjugate wurde am selben MALDI-TOF-Spektrometer im Massenbereich von 10-100 kDa durchgeführt. Die salzhaltigen Proben (PBS) wurden mittels ZipTips<sup>154</sup> nach den Gebrauchshinweisen des Herstellers entsalzt. Als Matrix wurde 0,5 M DHB in MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 verwendet. Die Kalibrierung erfolgte durch vier Massen im Bereich von 5,7-17 kDa. Bis auf eine zusätzliche Glättung der Spektren wurden die Messungen analog durchgeführt.

#### 3.2.5.2 Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS)

**Synthesekontrolle** Die Massenspektren der Synthesezwischenprodukte wurden an einer LC/MS-Anlage<sup>155</sup> mit einem Einfach-Quadrupol-Detektor und ESI mit dem Herstellerprogramm<sup>156</sup> aufgezeichnet. Da die Substanzen i. A. zu hydrophob für die angeschlossenen RP18-Säulen waren und außer den Carbonylgruppen keine UV-absorbierenden Gruppen enthielten, wurden die in ACN oder ACN/H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v) gelösten Proben direkt injiziert. Je nach Probe wurden die Messungen im Positiv- oder Negativmodus durchgeführt.

---

<sup>148</sup>Bruker Reflex III, Bruker Daltonics, Bremen

<sup>149</sup>AB 4700 MALDI-TOF/TOF<sup>TM</sup>, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA

<sup>150</sup>Data Explorer 4.8

<sup>151</sup>mit den Massen 717,405 und 1479,012 Da

<sup>152</sup>20 mg/ml 2,5-Dihydroxbenzoesäure in 50 % MeOH/0,1 % TFA

<sup>153</sup>15 mg/ml 2,4,6-Trihydroxyacetophenon in 60 % ACN/0,3 % TFA

<sup>154</sup>ZipTip<sub>C4</sub> Pipette Tips, #ZTC04S096, Millipore

<sup>155</sup>HP 1100 Series HPLC System, Agilent, Böblingen

<sup>156</sup>LC/MSD ChemStation Rev. B.01.01, Agilent

### 3.2.6 Synthese von Cholesteryl- $\beta$ -D-Galactopyranosid

#### 3.2.6.1 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (1)

Gekauftes 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranose<sup>157</sup> (3,9 g, 10 mmol) wurde in DMF (100 ml) gelöst und auf 50 °C erhitzt. Durch Zugabe von Hydrazinacetat (1,15 g, 12,5 mmol) wurde die Reaktion gestartet und unter Rühren 2 h bei 50 °C fortgesetzt. Aus der abgekühlten Reaktionslösung wurde das Produkt im Scheidetrichter mit 400 ml EE durch kräftiges Schütteln extrahiert. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase mit H<sub>2</sub>O und gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen und mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Die Lösung wurde im Vakuum einrotiert und letzte Reste DMF durch Koevaporation mit Toluol entfernt. Das Produkt **1** war ein klares, leicht gelbes Öl (3,34 g, 96 %) (Excoffier u. a., 1975; Herzner u. a., 1998).

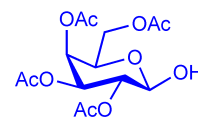


Abbildung 3.2: Strukturformel von **1**

**Summenformel:** C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>, M = 348,3 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,4 (Toluol/Aceton 3:1)

**ESI-MS:** exakte Masse: 348,11 Da; m/z gefunden: 371,1;  $\Delta$  m/z = 23,0 ([M+Na]<sup>+</sup>)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta_{\text{H}}$  = 5,50 (d, J<sub>1,2</sub> = 3,6 Hz, 1 H; Gal H-1), 5,47 (J<sub>2,3</sub> = 10,7 Hz, 1 H; Gal H-2), 5,40 (d, J<sub>4,5</sub> = 3 Hz, 1 H; Gal H-4), 5,15 (dd, J<sub>3,4</sub> = 3,3 Hz, 1 H; Gal H-3), 4,48 (t, J<sub>5,6a</sub> = 6,6 Hz, 1 H; Gal H-5), 4,38 (s, 1 H; Gal 1-OH), 4,11 (dd, J<sub>5,6b</sub> = 1,8 Hz, 1 H; Gal H-6b), 4,09 (1 H; Gal H-6a), 2,15 (s, 3 H; Ac2 H-2), 2,10 (s, 3 H; Ac3 H-2), 2,05 (s, 3 H; Ac6 H-2), 1,99 (s, 3 H; Ac4 H-2)  $\delta_{\text{C}}$  = 170,52 (Ac6 C-1), 170,39 (Ac3 C-1), 170,24 (Ac2 C-1), 170,03 (Ac4 C-1), 90,47 (Gal C-1), 68,36 (Gal C-3), 68,16 (Gal C-2), 67,24 (Gal C-4), 65,91 (Gal C-5), 61,68 (Gal C-6), 20,70 (Ac3 C-2), 20,54 (Ac4 C-2), 20,54 (Ac2 C-2), 20,54 (Ac6 C-2)

#### 3.2.6.2 1-*O*-Trichloracetimido-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranose (2)

Zu einer Lösung von Verbindung **1** (22,1 g, 63,5 mmol) in DCM (110 ml) wurden Trichloracetonitril (19,1 ml, 190 mmol) und eine katalytische Menge DBU<sup>158</sup> (0,4 ml, 2,5 mmol) schrittweise hinzugegeben. Die Lösung wurde 2 h bei RT gerührt und die Reaktion mit 10 ml Triethylamin gestoppt. Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie (Hexan/EE 1:1, 1 % Triethylamin) aufgereinigt. Das Produkt **2** wurde als farbloser, amorpher Feststoff (27,4 g, 88 %) erhalten (Schmidt und Michel, 1980; Ren und Liu, 1999).

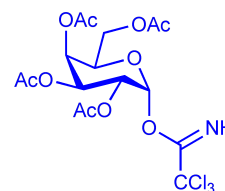


Abbildung 3.3: Strukturformel von **2**

**Summenformel:** C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>10</sub>, M = 492,69 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,52 (Toluol/Aceton 3:1)

**ESI-MS:** n. det. (instabil)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta_{\text{H}}$  = 8,71 (s, 1 H; Cl<sub>3</sub>ACN C-N-H), 6,60 (d, J<sub>1,2</sub> = 3 Hz, 1 H; Gal H-1 $\alpha$ ), 5,56 (s, 1 H; Gal H-4), 5,43 (dd, J<sub>2,3</sub> = 10,8 Hz, 1 H; Gal H-2), 5,36 (dd, J<sub>3,4</sub> = 3,3 Hz, 1 H; Gal H-3), 4,45 (t, J<sub>5,6a</sub> = 6,8 Hz, 1 H; Gal H-5), 4,17 (dd, J<sub>6b,5</sub> = 6,5, 2 H; Gal H-6b), 4,09 (dd, J<sub>6a,6b</sub> = 11,4 Hz, 1 H; Gal H-6a), 2,17 (s, 3 H; Ac4 H-2), 2,03 (s, 3 H; Ac3 H-2), 2,02 (s, 3 H; Ac6 H-2), 2,02 (s, 3 H; Ac2 H-2)  $\delta_{\text{C}}$  = 170,18 (Ac6 C-1), 169,99 (Ac3 C-1), 169,96 (Ac4 C-1), 169,86 (Ac2 C-1), 160,77 (Cl<sub>3</sub>ACN C-1), 93,39 (Gal C-1), 90,64 (Cl<sub>3</sub>ACN C-2), 68,89 (Gal C-5), 67,39 (Gal C-2), 67,27 (Gal C-

<sup>157</sup> #15861 1000, Acros

<sup>158</sup> 1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en, #33482, Sigma



4), 66,79 (Gal C-3), 61,15 (Gal C-6), 20,51 (Ac2 C-2), 20,48 (Ac6 C-2), 20,45 (Ac3 C-2), 20,40 (Ac4 C-2)

### 3.2.6.3 1-*O*-Cholesteryl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (**3**)

Das Produkt **2** (0,2 g, 0,4 mmol) und Cholesterol (0,13 g, 0,34 mmol) wurden in DCM (4 ml) gelöst. Die Reaktion wurde bei RT durch die Zugabe von TMSOTf<sup>159</sup> (5  $\mu$ l, 30  $\mu$ mol) gestartet.

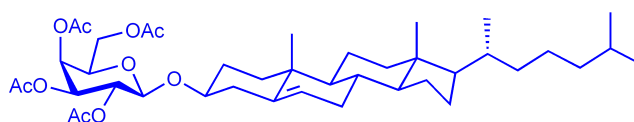


Abbildung 3.4: Strukturformel von **3**

Nach 1,5 stündigem Rühren wurde die

Reaktion durch Zutropfen von Triethylamin (5  $\mu$ l) beendet. Die Reaktionslösung wurde im Vakuum einrotiert und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Hexan/EE 1:1) aufgereinigt. Es wurde ein farbloser, kristalliner Feststoff als Produkt **3** (0,185 g, 77 %) erhalten (Deng u. a., 1999).

**Summenformel:** C<sub>41</sub>H<sub>64</sub>O<sub>10</sub>, M = 716,94 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,59 (Hexan/EE 3:1)

**ESI-MS:** exakte Masse: 716,45 Da; m/z gefunden: 739,4;  $\Delta$  m/z = 22,9 ([M+Na]<sup>+</sup>)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta_{\text{H}}$  = 5,37 (s, 1 H; Cho H-6), 5,37 (s, 1 H; Gal H-4), 5,17 (t, J<sub>2,3</sub> = 10,2 Hz, 1 H; Gal H-2), 5,03 (dd, J<sub>3,4</sub> = 3,0 Hz, 1 H; Gal H-3), 4,56 (d, J<sub>1,2</sub> = 7,8 Hz, 1 H; Gal H-1 $\beta$ ), 4,18 (m, J<sub>6b,5</sub> = 4,5 Hz, 1 H; Gal H-6b), 4,12 (m, J<sub>6a,6b</sub> = 11,1 Hz, 1 H; Gal H-6a), 3,90 (t, J<sub>5,6a</sub> = 6,6 Hz, 1 H; Gal H-5), 3,49 (m, 1 H; Cho H-3), 2,22 (1 H; Cho H-4a), 2,18 (1 H; Cho H-4b), 2,15 (s, 3 H; Ac4 H-2), 2,06 (s, 3 H; Ac2 H-2), 2,04 (s, 3 H; Ac6 H-2), 2,02 (d; Cho H-12b), 1,99 (s, 3 H; Ac3 H-2), 1,97 (Cho H-7b), 1,88 (1 H; Cho H-2a), 1,86 (d, 1 H; Cho H-1b), 1,61 (Cho H-2b), 1,56 (m; Cho H-15a), 1,52 (Cho H-11a), 1,51 (m; Cho H-7a), 1,51 (m; Cho H-25), 1,47 (Cho H-11b), 1,43 (d; Cho H-8), 1,36 (Cho H-20), 1,32 (m; Cho H-23R), 1,31 (Cho H-22R), 1,27 (d, J<sub>15b,16b</sub> = 11,7 Hz; Cho H-16b), 1,17 (Cho H-12a), 1,12 (d; Cho H-23S), 1,12 (Cho H-24), 1,08 (d; Cho H-17), 1,05 (Cho H-1a), 1,04 (Cho H-15b), 0,99 (d; Cho H-14), 0,99 (s, 3 H; Cho H-19), 0,99 (m; Cho H-22S), 0,92 (q; Cho H-9), 0,91 (d; Cho H-21), 0,88 (s, 3 H; Cho H-27), 0,85 (s, 3 H; Cho H-26), 0,68 (s, 3 H; Cho H-18)  $\delta_{\text{C}}$  = 170,60 (Ac6 C-1), 170,49 (Ac4 C-1), 170,29 (Ac3 C-1), 169,65 (Ac2 C-1), 139,94 (Cho C-5), 122,00 (Cho C-6), 99,85 (Gal C-1), 80,10 (Cho C-3), 70,88 (Gal C-3), 70,26 (Gal C-5), 68,97 (Gal C-2), 66,98 (Gal C-4), 61,14 (Gal C-6), 56,49 (Cho C-14), 55,91 (Cho C-17), 49,91 (Cho C-9), 42,06 (Cho C-13), 39,49 (Cho C-12), 39,24 (Cho C-24), 38,67 (Cho C-4), 36,91 (Cho C-1), 36,43 (Cho C-10), 35,92 (Cho C-22), 35,51 (Cho C-20), 31,67 (Cho C-7), 31,61 (Cho C-8), 29,22 (Cho C-2), 27,94 (Cho C-16), 27,71 (Cho C-25), 23,99 (Cho C-15), 23,53 (Cho C-23), 22,44 (Cho C-27), 22,19 (Cho C-26), 20,78 (Cho C-11), 20,43 (Ac2 C-2), 20,26 (Ac6 C-2), 20,23 (Ac4 C-2), 20,18 (Ac3 C-2), 19,00 (Cho C-19), 18,38 (Cho C-21), 11,52 (Cho C-18)

### 3.2.6.4 Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid (**4**)

Die Verbindung **3** (7,26 g, 10,1 mmol) wurde in MeOH (100 ml) gelöst. Der pH-Wert wurde mit 0,5 M CH<sub>3</sub>ONa in MeOH auf feuchtem pH-Papier auf 9-10 eingestellt und alles 3 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mittels mit

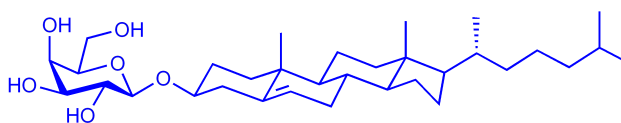


Abbildung 3.5: Strukturformel von **4**

<sup>159</sup>Trimethylsilyl-trifluormethansulfonat, #225649, Sigma

Protonen beladenem Ionenaustauscherharz<sup>160</sup> neutralisiert, filtriert und eingengt. Das farblose Rohprodukt (5,48 g, 99 %) erwies sich trotz DC-Kontrolle als nicht ganz sauber und wurde mit Säulenchromatographie (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 88:12) aufgereinigt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Cholesterylgalactosid in fast allen LM konnten nur 54 % (2,99 g) hochreines Produkt **4** wiedergewonnen werden. (Zemplén und Kunz, 1923)

**Summenformel:** C<sub>33</sub>H<sub>56</sub>O<sub>6</sub>, M = 548,79 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,18 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15)

**MALDI-TOF-MS:** exakte Masse: 548,408 Da; Masse gefunden: 548,396; Δ m/z = 22,2 ppm, (Abb. B.1, S. 145)

**NMR (Pyridin-d<sub>5</sub>):** δ<sub>H</sub> = 6,39 (s, 4 H; Gal OH), 5,35 (d, J<sub>6,7a</sub> = 4,2 Hz, 1 H; Cho H-6), 4,94 (d, J<sub>1,2</sub> = 7,6 Hz, 1 H; Gal H-1β), 4,58 (d, J<sub>4,5</sub> = 3,0 Hz, 1 H; Gal H-4), 4,46 (m, J<sub>6b,5</sub> = 4,8 Hz, 1 H; Gal H-6b), 4,44 (t, J<sub>2,3</sub> = 10,6 Hz, 1 H; Gal H-2), 4,42 (m, J<sub>6a,6b</sub> = 10,2 Hz, 1 H; Gal H-6a), 4,19 (dd, J<sub>3,4</sub> = 3,2 Hz, 1 H; Gal H-3), 4,08 (t, J<sub>5,6a</sub> = 5,9 Hz, 1 H; Gal H-5), 3,95 (m, 1 H; Cho H-3), 2,71 (dd, J<sub>4a,4b</sub> = 13,2 Hz, J<sub>4a,5a</sub> = 2,7 Hz, 1 H; Cho H-4a), 2,44 (t, J<sub>4a,4b</sub> = 12,2 Hz, 1 H; Cho H-4b), 2,14 (d, J<sub>2a,2b</sub> = 10,2 Hz, 1 H; Cho H-2a), 1,98 (d, J<sub>12a,12b</sub> = 12,6 Hz, 1 H; Cho H-12b), 1,92 (Cho H-7b), 1,81 (m; Cho H-16a), 1,73 (d, J<sub>1a,1b</sub> = 11,1 Hz; Cho H-1b), 1,73 (Cho H-2b), 1,56 (q; Cho H-15a), 1,54 (m; Cho H-25), 1,54 (d; Cho H-7a), 1,47 (Cho H-11a), 1,42 (Cho H-20), 1,40 (Cho H-11b), 1,39 (m; Cho H-23R), 1,38 (Cho H-22R), 1,37 (d; Cho H-8), 1,26 (Cho H-16b), 1,19 (d; Cho H-23S), 1,17 (m; Cho H-24), 1,09 (Cho H-15b), 1,09 (Cho H-12a), 1,08 (d; Cho H-17), 1,07 (Cho H-22S), 0,99 (Cho H-1a), 0,94 (q; Cho H-14), 0,94 (Cho H-19), 0,91 (q; Cho H-9), 0,91 (Cho H-26), 0,90 (Cho H-27), 0,67 (s, 1 H; Cho H-18) δ<sub>C</sub> = 141,00 (Cho C-5), 121,85 (Cho C-6), 103,18 (Gal C-1), 78,03 (Cho C-3), 76,89 (Gal C-5), 75,38 (Gal C-3), 72,67 (Gal C-2), 70,29 (Gal C-4), 62,50 (Gal C-6), 56,86 (Cho C-14), 56,39 (Cho C-17), 50,39 (Cho C-9), 42,50 (Cho C-13), 40,00 (Cho C-12), 39,75 (Cho C-24), 39,38 (Cho C-4), 37,53 (Cho C-1), 36,94 (Cho C-10), 36,51 (Cho C-22), 36,05 (Cho C-20), 32,21 (Cho C-7), 32,09 (Cho C-8), 30,30 (Cho C-2), 28,52 (Cho C-16), 28,25 (Cho C-25), 24,52 (Cho C-15), 24,16 (Cho C-23), 22,96 (Cho C-27), 22,71 (Cho C-26), 21,31 (Cho C-11), 19,44 (Cho C-19), 18,96 (Cho C-21), 12,00 (Cho C-18) (Abb. A.12, S. 139)

## 3.2.7 Synthese der Acetonoximester

### 3.2.7.1 Acetonoximoyl-oleat (**6**)

Ölsäure (4,81 ml, 15 mmol), Acetonoxim (1,1 g, 15 mmol), EDC (3,59 g, 18,8 mmol) und eine katalytische Menge DMAP (183 mg, 1,5 mmol) wurden in 40 ml DCM gelöst und 3 h bei

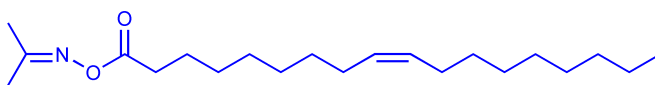


Abbildung 3.6: Strukturformel von **6**

RT gerührt. KG60 wurde hinzugefügt und alles im Vakuum einrotiert. Das Rohprodukt wurde mit Säulenchromatographie (Hexan/Aceton 10:1) aufgereinigt und **6** als klare, farblose Flüssigkeit (4,77 g, 94 %) erhalten.

**Summenformel:** C<sub>21</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>2</sub>, M = 337,54 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,82 (Toluol/Aceton 3:1)

**ESI-MS:** exakte Masse: 337,30 Da; m/z gefunden: 338,3; Δ m/z = 1,0 ([M+H]<sup>+</sup>)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> = 5,33 (t, J = 4,4 Hz, 2 H; FA H-9, H-10), 2,40 (t, J = 7,5 Hz, 2 H; FA H-2), 2,04 (s, 3 H; Oxim H-trans), 2,02 (4 H; FA H-8, H-11), 1,99 (s, 3 H; Oxim H-cis), 1,69 (m, J = 7,0 Hz, 2 H; FA H-3), 1,32 (2 H; FA H-4), 1,27 (m, 18 H; FA H-5 ... H-7, H-12 ... H-17), 0,88 (t, J = 6,3 Hz,

<sup>160</sup> Amberlite® IR-120(H<sup>+</sup>), #216534, Sigma

3 H; FA H-18)  $\delta_{\text{C}}$  = 170,67 (FA C-1), 163,05 (Oxim C-2), 129,58 (FA C-10), 129,32 (FA C-9), 32,60 (FA C-2), 31,56 (FA C-16), 29,42, 29,32, 29,18, 28,97 [2 C], 28,79, 28,76 (FA C-5 ... C-7, C-12 ... C-15), 28,72 (FA C-4), 26,86 (FA C-11), 26,80 (FA C-8), 24,58 (FA C-3), 22,33 (FA C-17), 21,56 (Oxim C-trans), 16,48 (Oxim C-cis), 14,05 (FA C-18)

### 3.2.7.2 Acetonoximoyl-palmitat (7)

Palmitinsäure (3,85 g, 15 mmol), Acetonoxim (1,1 g, 15 mmol), EDC (3,59 g, 18,8 mmol) und kat. DMAP (183 mg, 1,5 mmol) wurden in 40 ml DCM gelöst und 2 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und mittels Säulenchromatographie (Hexan/Aceton 10:1) gereinigt. Das Produkt **7** war ein farbloser Feststoff (4,52 g, 97 %).

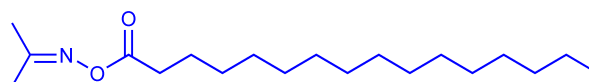


Abbildung 3.7: Strukturformel von **7**

**Summenformel:**  $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{NO}_2$ ,  $M = 311,5 \text{ g/mol}$

**DC:**  $R_f = 0,8$  (Toluol/Aceton 3:1)

**ESI-MS:** exakte Masse: 311,28 Da;  $m/z$  gefunden: 312,4;  $\Delta m/z = 1,1$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta_{\text{H}}$  = 2,40 (t,  $J = 7,5 \text{ Hz}$ , 2 H; FA H-2), 2,04 (s, 3 H; Oxim H-trans), 1,99 (s, 3 H; Oxim H-cis), 1,69 (m,  $J = 7,1 \text{ Hz}$ , 2 H; FA H-3), 1,32 (2 H; FA H-4), 1,26 (m, 22 H; FA H-5 ... H-15), 0,88 (t,  $J = 6,3 \text{ Hz}$ , 3 H; FA H-16)  $\delta_{\text{C}}$  = 170,78 (FA C-1), 163,15 (Oxim C-2), 32,68 (FA C-2), 31,64 (FA C-14), 29,41 [2 C], 29,38, 29,37 [2 C], 29,30, 29,17, 29,08, 28,95 (FA C-5 ... C-13), 28,85 (FA C-4), 24,67 (FA C-3), 22,39 (FA C-15), 21,63 (Oxim C-trans), 16,55 (Oxim C-cis), 13,79 (FA C-16)

### 3.2.7.3 Acetonoximoyl-15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoat (8)

Produkt **5** (2,08 g, 6,2 mmol) (s. 3.2.9.1, S. 60), Acetonoxim (454 mg, 6,2 mmol), EDC (1,79 g, 9,3 mmol) und kat. DMAP (75,9 mg, 0,6 mmol) wurden in DCM (20 ml) gelöst und

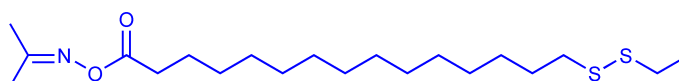


Abbildung 3.8: Strukturformel von **8**

bei RT 2 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 1 M AcOH (15 ml), halbgesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (20 ml) und zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung (je 20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und im Vakuum einrotiert. Es wurde eine klare, viskose, leicht gelbe Flüssigkeit als Produkt **8** erhalten (2,15 g, 89 %).

**Summenformel:**  $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{NO}_2\text{S}_2$ ,  $M = 389,66 \text{ g/mol}$

**DC:**  $R_f = 0,83$  (Toluol/Aceton 3:1)

**ESI-MS:** exakte Masse: 389,24 Da;  $m/z$  gefunden: 390,2;  $\Delta m/z = 1,0$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

**NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta_{\text{H}}$  = 2,69 (q,  $J = 6,9 \text{ Hz}$ , 2 H; Et H-1), 2,68 (t,  $J = 6,9 \text{ Hz}$ , 2 H; FA H-15), 2,40 (t,  $J = 7,5 \text{ Hz}$ , 2 H; FA H-2), 2,05 (s, 3 H; Oxim H-trans), 2,00 (s, 3 H; Oxim H-cis), 1,69 (m,  $J = 6,9 \text{ Hz}$ , 2 H; FA H-3), 1,67 (2 H; FA H-14), 1,38 (2 H; FA H-13), 1,34 (2 H; FA H-4), 1,32 (3 H; Et H-2), 1,26 (m, 16 H; FA H-5 ... H-12)  $\delta_{\text{C}}$  = 170,95 (FA C-1), 163,35 (Oxim C-2), 39,10 (FA C-15), 32,80 (FA C-2), 32,57 (Et C-1), 29,40 [2 C], 29,36 [2 C], 29,28, 29,23, 29,04, 29,02 (FA C-5 ... C-12), 29,02 (FA C-14), 28,92 (FA C-4), 28,31 (FA C-13), 24,75 (FA C-3), 21,78 (Oxim C-trans), 16,71 (Oxim C-cis), 14,26 (Et C-2)

### 3.2.7.4 Acetonoximoyl-decanoat (9)

Decansäure (2,58 g, 15 mmol), Acetonoxim (1,1 g, 15 mmol), EDC (3,59 g, 18,8 mmol) und kat. DMAP (183 mg, 1,5 mmol) wurden in DCM (25 ml) gelöst und für 2 h bei RT gerührt. KG60 wurde zur Lösung zugegeben, alles im Vakuum einrotiert und das Rohprodukt mittels einer Säulenchromatographie (Hexan/Aceton 10:1) gereinigt. Das Produkt **9** wurde als klare, farblose Flüssigkeit (3,17 g, 93 %) erhalten.

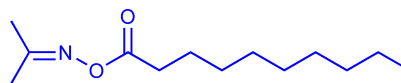


Abbildung 3.9: Strukturformel von **9**

**Summenformel:** C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>, M = 227,34 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,74 (Toluol/Aceton 3:1)

**ESI-MS:** exakte Masse: 227,19 Da; m/z gefunden: 228,2; Δ m/z = 1,0 ([M+H]<sup>+</sup>)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> = 2,40 (t, J = 7,5 Hz, 2 H; FA H-2), 2,05 (s, 3 H; Oxim H-trans), 2,00 (s, 3 H; Oxim H-cis), 1,69 (m, J = 7,1 Hz, 2 H; FA H-3), 1,33 (2 H; FA H-4), 1,27 (m, 10 H; FA H-5 ... H-9), 0,88 (t, J = 6,5 Hz, 3 H; FA H-10) δ<sub>C</sub> = 170,81 (FA C-1), 163,22 (Oxim C-2), 32,66 (FA C-2), 31,53 (FA C-8), 29,08, 28,91 [2 C] (FA C-5 ... C-7), 28,80 (FA C-4), 24,64 (FA C-3), 22,32 (FA C-9), 21,61 (Oxim C-trans), 16,54 (Oxim C-cis), 13,74 (FA C-10)

### 3.2.7.5 Acetonoximoyl-hexanoat (10)

Hexansäure (2,52 ml, 20 mmol), Acetonoxim (1,46 g, 20 mmol), EDC (4,79 g, 25 mmol) und kat. DMAP (244 mg, 2 mmol) wurden in DCM (20 ml) gelöst und 3 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit KG60 koevaporiert und nach einer Säulenchromatographie (Hexan/Aceton 10:1) Produkt **10** als klare, farblose Flüssigkeit (3,29 g, 96 %) erhalten.

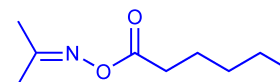


Abbildung 3.10: Strukturformel von **10**

**Summenformel:** C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>, M = 171,24 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,7 (Toluol/Aceton 3:1)

**ESI-MS:** exakte Masse: 171,13 Da; m/z gefunden: 172,1; Δ m/z = 1,0 ([M+H]<sup>+</sup>)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> = 2,41 (t, J = 7,7 Hz, 2 H; FA H-2), 2,06 (s, 3 H; Oxim H-trans), 2,02 (s, 3 H; Oxim H-cis), 1,70 (m, J = 7,2 Hz, 2 H; FA H-3), 1,34 (m, 2 H; FA H-5), 1,33 (m, 2 H; FA H-4), 0,91 (t, J = 6,8 Hz, 3 H; FA H-6) δ<sub>C</sub> = 170,47 (FA C-1), 162,97 (Oxim C-2), 32,27 (FA C-2), 30,63 (FA C-4), 23,99 (FA C-3), 21,64 (FA C-5), 21,25 (Oxim C-trans), 16,20 (Oxim C-cis), 13,12 (FA C-6)

### 3.2.7.6 Acetonoximoyl-butytrat (11)

Buttersäure (1,84 ml, 20 mmol), Acetonoxim (1,46 g, 20 mmol), EDC (4,79 g, 25 mmol) und kat. DMAP (244 mg, 2 mmol) wurden in DCM (18 ml) gelöst und 2 h bei RT gerührt. Zur Reaktionslösung wurde KG60 zugegeben und alles im Vakuum einrotiert. Nach einer Säulenchromatographie (Hexan/Aceton 10:1) wurde das saubere Produkt **11** als klare, farblose Flüssigkeit (2,42 g, 84,5 %) erhalten.

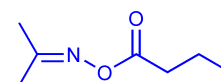


Abbildung 3.11: Strukturformel von **11**

**Summenformel:** C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>, M = 143,18 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,65 (Toluol/Aceton 3:1)

**ESI-MS:** exakte Masse: 143,10 Da; m/z gefunden: 144,2; Δ m/z = 1,1 ([M+H]<sup>+</sup>)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> = 2,40 (t, J = 7,4 Hz, 2 H; FA H-2), 2,05 (s, 3 H; Oxim H-trans), 2,01 (s, 3 H; Oxim H-cis), 1,73 (hex, J = 7,4 Hz, 2 H; FA H-3), 1,00 (t, J = 7,4 Hz, 3 H; FA H-4) δ<sub>C</sub> = 170,21 (FA

C-1), 162,93 (Oxim C-2), 34,13 (FA C-2), 21,20 (Oxim C-trans), 17,75 (FA C-3), 16,16 (Oxim C-cis), 12,95 (FA C-4)

### 3.2.7.7 Acetonoximoyl-acetat (**12**)

Acetonoxim (3,78 g, 51,7 mmol), Essigsäureanhydrid (30 ml, 319 mmol) und Pyridin (15 ml) wurden bei RT über Nacht (16 h) gerührt. Die Reaktionslösung wurde bei 50 °C im Vakuum einrotiert und zweimal mit Toluol (je 30 ml) koevaporiert. Das Produkt **12** wurde als klare, leicht gelbe Flüssigkeit (5,47 g, 92 %) erhalten.

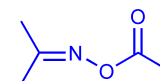


Abbildung 3.12: Strukturformel von **12**

**Summenformel:** C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>, M = 115,13 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,54 (Toluol/Aceton 3:1)

**ESI-MS:** exakte Masse: 115,06 Da; m/z gefunden: 116,2; Δ m/z = 1,1 ([M+H]<sup>+</sup>)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> = 2,16 (s, 3 H; FA H-2), 2,05 (s, 3 H; Oxim H-trans), 2,01 (s, 3 H; Oxim H-cis) δ<sub>C</sub> = 168,28 (FA C-1), 163,29 (Oxim C-2), 21,46 (Oxim C-trans), 19,14 (FA C-2), 16,47 (Oxim C-cis)

## 3.2.8 Regioselektive Acylierung der Galactopyranoside

### 3.2.8.1 Cholesteryl-6-*O*-oleoyl-β-D-galactopyranosid (**13**)

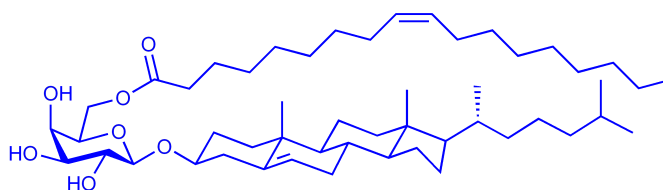


Abbildung 3.13: Strukturformel von **13**

CGal (**4**, 2,5 g, 4,6 mmol), Verbindung **6** (1,38 g, 4,1 mmol), Lipase Amano PS<sup>161</sup> (3 g) und eine Spatelspitze Molekularsieb wurden unter Argonatmosphäre in Pyridin (24 ml) gelöst bzw. suspendiert und 5 d bei 50 °C gerührt. Neue Lipase (2,5 g) und eine Spatelspitze Molekularsieb wurden hinzugefügt und alles erneut 5 d bei 50 °C gerührt. Die Lipase wurde mittels einer Pore-3 Fritte abfiltriert und die gelb-orange Lösung mit KG60 versetzt, im Vakuum einrotiert und letzte Pyridinspuren über Nacht (16 h) am HV entfernt. Das hellgelbe Pulver wurde mittels einer Säulenchromatographie (stufenweise Elution mit: CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 98:2, 95:5, 90:10 und 50:50) um das Produkt **13** als farblosen, amorphen Feststoff (0,53 g, 16 %) zu erhalten.

**Summenformel:** C<sub>51</sub>H<sub>88</sub>O<sub>7</sub>, M = 813,24 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,56 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15)

**MALDI-TOF-MS:** exakte Masse: 812,653 Da; Masse gefunden: 812,645; Δ m/z = 10,1 ppm, (Abb. B.2, S. 146)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> = 5,34 (FA H-9, H-10), 5,33 (Cho H-6), 4,38 (Gal H-6b), 4,31 (Gal H-1β), 4,24 (Gal H-6a), 3,90 (Gal H-4), 3,64 (Gal H-5), 3,62 (Gal H-2), 3,57 (Gal H-3), 3,53 (Cho H-3), 2,40 (Cho H-4α), 2,28 (FA H-2), 2,25 (Cho H-4β), 2,01 (Cho H-12β), 2,01 (FA H-8, H-11), 1,94 (Cho H-7β), 1,82 (Cho H-1β), 1,59 (Cho H-2α), 1,59 (FA H-3), 1,52 (Cho H-25), 1,47 (Cho H-7α), 1,47 (Cho H-11β),

<sup>161</sup> Amano Lipase PS, from *Burkholderia cepacia*, #534641, Sigma

1,38 (Cho H-8), 1,37 (Cho H-23R), 1,36 (Cho H-20), 1,32 (Cho H-22R), 1,292, 1,271 (FA H-4 ... H-7, H-12 ... H-17), 1,26 (Cho H-2 $\beta$ ), 1,13 (Cho H-16 $\beta$ ), 1,12 (Cho H-24), 1,12 (Cho H-12 $\alpha$ ), 1,12 (Cho H-23S), 1,08 (Cho H-17), 1,06 (Cho H-24), 1,02 (Cho H-1 $\alpha$ ), 1,00 (Cho H-15 $\beta$ ), 0,98 (Cho H-19), 0,96 (Cho H-14), 0,92 (Cho H-9), 0,91 (Cho H-21), 0,91 (Cho H-22S), 0,88 (Cho H-26), 0,88 (FA H-18), 0,84 (Cho H-27), 0,68 (Cho H-18)  $\delta_C = 173,51$  (FA C-1), 140,39 (Cho C-5), 129,96, 129,64 (FA C-9, C-10), 121,95 (Cho C-6), 101,79 (Gal C-1), 79,71 (Cho C-3), 73,51 (Gal C-3), 72,51 (Gal C-5), 70,95 (Gal C-2), 68,90 (Gal C-4), 63,16 (Gal C-6), 56,77 (Cho C-14), 56,23 (Cho C-17), 50,15 (Cho C-9), 42,30 (Cho C-13), 39,79 (Cho C-12), 39,49 (Cho C-24), 38,84 (Cho C-4), 37,31 (Cho C-1), 36,64 (Cho C-10), 36,19 (Cho C-22), 35,79 (Cho C-20), 34,23 (FA C-2), 31,88 (Cho C-7), 31,85 (Cho C-8), 29,79, 29,74, 29,52, 29,35, 29,29[4] (FA C-4 ... C-7, C-12 ... C-17), 29,63 (Cho C-2), 28,21 (Cho C-16), 27,97 (Cho C-25), 27,21[2] (FA C-8, C-11), 24,95 (FA C-3), 24,27 (Cho C-15), 23,87 (Cho C-23), 22,77 (Cho C-27), 22,65 (Cho C-11), 22,52 (Cho C-26), 19,37 (Cho C-19), 18,69 (Cho C-21), 14,08 (FA C-18), 11,83 (Cho C-18),  $^{13}\text{C}$  (Abb. A.13, S. 140), DEPT (Abb. A.14, S. 140)

### 3.2.8.2 Cholesteryl-6-O-palmitoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (14)

CGal (**4**, 4 g, 7,3 mmol) und Produkt **7** (2,03 g, 6,5 mmol) wurden in Pyridin (30 ml) gelöst. Lipase Amano PS (4 g) und Molekularsieb wurden unter Argon hinzugegeben. Die Suspension wurde unter Argonatmosphäre für 5 d bei 50 °C gerührt. Weitere Lipase (4 g), etwas Molekularsieb und Pyridin (10 ml) wurden hinzugegeben und alles erneut für 5 d bei 50 °C gerührt. Die Suspension wurde durch eine Pore-3 Fritte filtriert, mit KG60 versetzt, im Vakuum einrotiert, mit Toluol einmal koevaporiert und über Nacht am HV getrocknet. Das Rohprodukt wurde durch eine Säulenchromatographie (stufenweise Elution mit:  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  98:2, 95:5, 90:10 und 50:50) gereinigt, um das Produkt **14** als farbloses Pulver (0,43 g, 8,5 %) zu gewinnen.

**Summenformel:**  $\text{C}_{49}\text{H}_{86}\text{O}_7$ ,  $M = 787,2$  g/mol

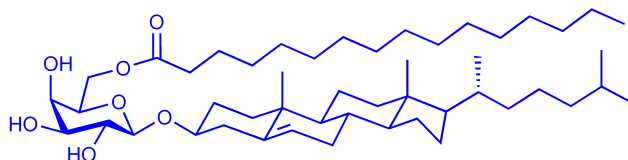


Abbildung 3.14: Strukturformel von **14**

**DC:**  $R_f = 0,54$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85:15)

**MALDI-TOF-MS:** exakte Masse: 786,637 Da; Masse gefunden: 786,634;  $\Delta m/z = 4,4$  ppm, (Abb. B.3, S. 146)

**NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta_H = 5,33$  (Cho H-6), 4,38 (Gal H-6b), 4,31 (Gal H-1 $\beta$ ), 4,24 (Gal H-6a), 3,90 (Gal H-4), 3,63 (Gal H-5), 3,63 (Gal H-3), 3,62 (Gal H-2), 3,53 (Cho H-3), 2,37 (Cho H-4 $\alpha$ ), 2,29 (FA H-2), 2,25 (Cho H-4 $\beta$ ), 2,02 (Cho H-12 $\beta$ ), 1,95 (Cho H-7 $\beta$ ), 1,82 (Cho H-1 $\beta$ ), 1,80 (Cho H-16 $\alpha$ ), 1,60 (Cho H-2 $\alpha$ ), 1,59 (FA H-3), 1,52 (Cho H-11 $\alpha$ ), 1,49 (Cho H-25), 1,46 (Cho H-7 $\alpha$ ), 1,46 (Cho H-11 $\beta$ ), 1,39 (Cho H-8), 1,37 (Cho H-15 $\alpha$ ), 1,36 (Cho H-20), 1,35 (Cho H-23R), 1,32 (FA H-4), 1,32 (Cho H-22R), 1,26 (Cho H-2 $\beta$ ), 1,26 (FA H-5 ... H-15), 1,17 (Cho H-16 $\beta$ ), 1,13 (Cho H-12 $\alpha$ ), 1,13 (Cho H-23S), 1,13 (Cho H-24), 1,08 (Cho H-17), 1,02 (Cho H-15 $\beta$ ), 1,02 (Cho H-1 $\alpha$ ), 0,99 (Cho H-19), 0,94 (Cho H-14), 0,92 (Cho H-22S), 0,91 (Cho H-21), 0,88 (Cho H-9), 0,88 (FA H-16), 0,86 (Cho H-26), 0,79 (Cho H-27), 0,68 (Cho H-18)  $\delta_C = 173,59$  (FA C-1), 140,40 (Cho C-5), 121,96 (Cho C-6), 101,75 (Gal C-1), 79,70 (Cho C-3), 73,47 (Gal C-3), 72,51 (Gal C-5), 71,03 (Gal C-2), 68,87 (Gal C-4), 63,13 (Gal C-6), 56,78

(Cho C-14), 56,25 (Cho C-17), 50,16 (Cho C-9), 42,31 (Cho C-13), 39,80 (Cho C-12), 39,50 (Cho C-24), 38,83 (Cho C-4), 37,32 (Cho C-1), 36,65 (Cho C-10), 36,20 (Cho C-22), 35,81 (Cho C-20), 34,27 (FA C-2), 31,92 (Cho C-7), 31,85 (Cho C-8), 29,82, 29,79[2], 29,75[2], 29,71, 29,69[2], 29,48, 29,37 (FA C-5 ... C-14), 29,64 (Cho C-2), 29,37 (FA C-4), 28,21 (Cho C-16), 27,97 (Cho C-25), 24,98 (FA C-3), 24,27 (Cho C-15), 23,89 (Cho C-23), 22,77 (Cho C-27), 22,67 (FA C-15), 22,52 (Cho C-26), 21,08 (Cho C-11), 19,37 (Cho C-19), 18,70 (Cho C-21), 14,08 (FA C-16), 11,83 (Cho C-18) (Abb. A.15, S. 141)

### 3.2.8.3 Cholesteryl-6-*O*-(15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (**15**)

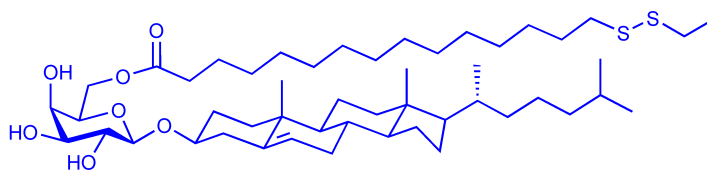


Abbildung 3.15: Strukturformel von **15**

CGal (**4**, 2,5 g, 4,6 mmol), Verbindung **8** (1,6 g, 4,1 mmol), Lipase Amano PS (2,5 g) und eine Spatelspitze Molekularsieb wurden in Pyridin (25 ml) gelöst bzw. suspendiert und die Reaktion 5 d bei 50 °C unter Rühren durchgeführt. Neue Lipase (2,5 g) und etwas Molekularsieb wurden hinzugegeben und die Reaktion für weitere 5 d unter den gleichen Bedingungen fortgeführt. Die Lipase wurde mit einer Pore-3 Fritte abfiltriert und die Reaktionslösung im Vakuum einrotiert. Das ockerfarbene Rohprodukt (3,78 g) wurde in Pyridin gelöst, KG60 hinzugegeben, erneut alles einrotiert, mit Toluol einmal koevaporiert und über Nacht am HV getrocknet. Nach einer Säulenchromatographie (stufenweise Elution mit: CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 98:2, 95:5, 90:10 und 50:50) wurde Produkt **15** als farbloser Feststoff (0,18 g, 5,1 %) erhalten.

**Summenformel:** C<sub>50</sub>H<sub>88</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>, M = 865,36 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,56 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15)

**MALDI-TOF-MS:** exakte Masse: 864,597 Da; Masse gefunden: 864,593; Δ m/z = 4,9 ppm, (Abb. B.4, S. 147)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> = 5,34 (Cho H-6), 4,34 (Gal H-6b), 4,32 (Gal H-1β), 4,29 (Gal H-6a), 3,89 (Gal H-4), 3,66 (Gal H-5), 3,62 (Gal H-2), 3,57 (Gal H-3), 3,54 (Cho H-3), 2,40 (Cho H-4α), 2,30 (FA H-2), 2,26 (Cho H-4β), 2,01 (Cho H-12β), 1,97 (Cho H-7β), 1,83 (Cho H-16α), 1,83 (Cho H-16α), 1,83 (Cho H-1β), 1,60 (Cho H-2α), 1,60 (FA H-3), 1,52 (Cho H-25), 1,51 (Cho H-11α), 1,46 (Cho H-7α), 1,45 (Cho H-11β), 1,40 (Cho H-8), 1,36 (Cho H-15α), 1,36 (Cho H-20), 1,33 (Cho H-23R), 1,32 (Cho H-22R), 1,26 (FA H-4 ... H-12), 1,16 (Cho H-12α), 1,12 (Cho H-24), 1,12 (Cho H-23S), 1,08 (Cho H-17), 1,06 (Cho H-24), 1,02 (Cho H-1α), 1,02 (Cho H-15β), 0,99 (Cho H-19), 0,92 (Cho H-22S), 0,92 (Cho H-14), 0,91 (Cho H-21), 0,91 (Cho H-9), 0,88 (Cho H-26), 0,84 (Cho H-27), 0,68 (Cho H-18) δ<sub>C</sub> = 173,70 (FA C-1), 140,34 (Cho C-5), 122,03 (Cho C-6), 101,56 (Gal C-1), 79,56 (Cho C-3), 73,25 (Gal C-3), 72,22 (Gal C-5), 71,31 (Gal C-2), 68,67 (Cho C-4), 68,46 (Gal C-4), 62,61 (Gal C-6), 56,62 (Cho C-14), 56,06 (Cho C-17), 50,02 (Cho C-9), 42,31 (Cho C-13), 39,63 (Cho C-12), 39,36 (Cho C-24), 39,18 (FA C-15), 37,14 (Cho C-1), 36,68 (Cho C-10), 36,05 (Cho C-22), 35,63 (Cho C-20), 34,11 (FA C-2), 32,66 (S-Et C-1), 31,79 (Cho C-7), 31,71 (Cho C-8), 29,55 (Cho C-2), 29,53, 29,48[2], 29,45[2], 29,38, 29,22, 29,11[2] (FA C-4 ... C-12), 29,11 (FA C-14), 28,39 (FA C-13), 28,07 (Cho C-16), 27,84 (Cho C-25), 24,81 (FA C-3),

24,13 (Cho C-15), 23,70 (Cho C-23), 22,65 (Cho C-27), 22,39 (Cho C-26), 20,92 (Cho C-11), 19,21 (Cho C-19), 18,56 (Cho C-21), 14,30 (S-Et C-2), 11,70 (Cho C-18) (Abb. A.16, S. 141)

### 3.2.8.4 Cholesteryl-6-*O*-decanoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (16)

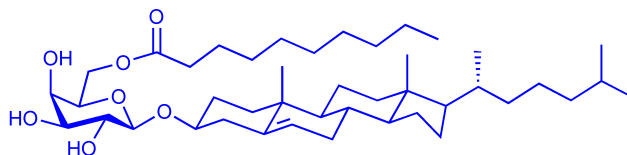


Abbildung 3.16: Strukturformel von 16

CGal (**4**, 2 g, 3,6 mmol), Produkt **9** (746 mg, 3,3 mmol), Lipase Amano PS (2 g) und Molekularsieb wurden unter Argonatmosphäre in Pyridin (20 ml) gelöst bzw. suspendiert und 5 d bei 50 °C gerührt. Es wurde einmal Lipase (2 g) zugegeben und die Reaktion 5 d fortgeführt. Das Rohprodukt wurde durch eine Pore-2 Fritte filtriert und im Vakuum eingengt. Die viskose Substanz wurde mittels einer Säulenchromatographie (stufenweise Elution mit: CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 98:2, 95:5, 90:10 und 80:20) aufgetrennt. Die Fraktionen mit dem sauberen Produkt wurden vereinigt und eingengt, um Produkt **16** als farbloses Pulver (0,32 g, 14 %) zu erhalten.

**Summenformel:** C<sub>43</sub>H<sub>74</sub>O<sub>7</sub>, M = 703,04 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,50 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15)

**ESI-MS:** exakte Masse: 702,54 Da; m/z gefunden: 725,5;  $\Delta$  m/z = 23,0 ([M+Na]<sup>+</sup>)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta_{\text{H}}$  = 5,34 (Cho H-6), 4,37 (Gal H-6b), 4,31 (Gal H-1 $\beta$ ), 4,24 (Gal H-6a), 3,86 (Gal H-4), 3,66 (Gal H-5), 3,56 (Gal H-3), 3,56 (Gal H-2), 3,47 (Cho H-3), 2,37 (Cho H-4 $\alpha$ ), 2,30 (FA H-2), 2,26 (Cho H-4 $\beta$ ), 2,02 (Cho H-12 $\beta$ ), 1,97 (Cho H-7 $\beta$ ), 1,85 (Cho H-16 $\alpha$ ), 1,83 (Cho H-1 $\beta$ ), 1,59 (Cho H-2 $\alpha$ ), 1,59 (FA H-3), 1,57 (Cho H-15 $\alpha$ ), 1,52 (Cho H-11 $\alpha$ ), 1,52 (Cho H-25), 1,47 (Cho H-7 $\alpha$ ), 1,46 (Cho H-11 $\beta$ ), 1,41 (Cho H-8), 1,36 (Cho H-22R), 1,32 (Cho H-23R), 1,32 (Cho H-20), 1,27 (Cho H-2 $\beta$ ), 1,27 (FA H-4 ... H-9), 1,21 (Cho H-16 $\beta$ ), 1,15 (Cho H-12 $\alpha$ ), 1,13 (Cho H-24), 1,12 (Cho H-23S), 1,08 (Cho H-17), 1,04 (Cho H-15 $\beta$ ), 1,03 (Cho H-24), 1,03 (Cho H-1 $\alpha$ ), 1,00 (Cho H-14), 1,00 (Cho H-19), 0,94 (Cho H-9), 0,92 (Cho H-22S), 0,92 (Cho H-21), 0,88 (Cho H-26), 0,88 (FA H-10), 0,85 (Cho H-27), 0,68 (Cho H-18)  $\delta_{\text{C}}$  = 173,75 (FA C-1), 140,28 (Cho C-5), 121,80 (Cho C-6), 101,58 (Gal C-1), 79,36 (Cho C-3), 73,37 (Gal C-3), 72,33 (Gal C-5), 71,04 (Gal C-2), 68,67 (Gal C-4), 63,06 (Gal C-6), 56,62 (Cho C-14), 56,03 (Cho C-17), 50,04 (Cho C-9), 42,15 (Cho C-13), 39,63 (Cho C-12), 39,35 (Cho C-24), 38,60 (Cho C-4), 37,16 (Cho C-1), 36,52 (Cho C-10), 36,02 (Cho C-22), 35,61 (Cho C-20), 34,13 (FA C-2), 31,77 (Cho C-7), 31,71 (Cho C-8), 29,48 (FA C-8), 29,39 (Cho C-2), 29,19[2], 29,10[2] (FA C-4 ... C-7), 28,04 (Cho C-16), 27,82 (Cho C-25), 24,80 (FA C-3), 24,10 (Cho C-15), 23,65 (Cho C-23), 22,60 (Cho C-27), 22,51 (FA C-9), 22,34 (Cho C-26), 20,91 (Cho C-11), 19,15 (Cho C-19), 18,51 (Cho C-21), 13,90 (FA C-10), 11,65 (Cho C-18) (Abb. A.17, S. 142)

### 3.2.8.5 Cholesteryl-6-*O*-hexanoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (17)

CGal (**4**, 1,7 g, 3,1 mmol), Verbindung **10** (477 mg, 2,8 mmol), Lipase Amano PS (1,7 g) und etwas Molekularsieb wurden unter Argon in Pyridin (17 ml) gelöst bzw. suspendiert und bei 50 °C für 5 d gerührt. Zusätzliche Lipase (1,7 g) wurde hinzugefügt



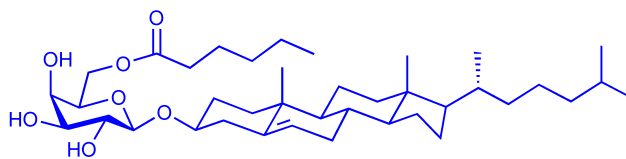


Abbildung 3.17: Strukturformel von 17

und die Reaktion 6 d fortgesetzt. Die abgekühlte Reaktionslösung wurde durch eine Pore-3 Fritte filtriert, mit KG60 versetzt, alles im Vakuum eingengt und einmal mit Toluol koevaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels einer Säulenchromatographie (stufenweise Elution mit: Hexan/EE 1:1, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 98:2, 95:5 und 90:10) gereinigt, um das Produkt **17** als farblosen, körnigen Feststoff (0,56 g, 31 %) zu erhalten.

**Summenformel:** C<sub>39</sub>H<sub>66</sub>O<sub>7</sub>, M = 646,94 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,47 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15)

**MALDI-TOF-MS:** exakte Masse: 646,481 Da; Masse gefunden: 646,463; Δ m/z = 27,5 ppm, (Abb. B.5, S. 147)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> = 5,33 (Cho H-6), 4,38 (Gal H-6b), 4,32 (Gal H-1β), 4,24 (Gal H-6a), 3,91 (Gal H-4), 3,65 (Gal H-5), 3,62 (Gal H-2), 3,59 (Gal H-3), 3,53 (Cho H-3), 2,36 (Cho H-4α), 2,29 (FA H-2), 2,23 (Cho H-4β), 2,01 (Cho H-12β), 1,95 (Cho H-7β), 1,86 (Cho H-16α), 1,82 (Cho H-1β), 1,60 (FA H-3), 1,58 (Cho H-2α), 1,54 (Cho H-7α), 1,54 (Cho H-15α), 1,51 (Cho H-11α), 1,50 (Cho H-25), 1,45 (Cho H-8), 1,45 (Cho H-11β), 1,36 (Cho H-20), 1,33 (Cho H-23R), 1,32 (Cho H-22R), 1,30 (FA H-4), 1,29 (FA H-5), 1,28 (Cho H-16β), 1,26 (Cho H-2β), 1,12 (Cho H-12α), 1,12 (Cho H-23S), 1,08 (Cho H-17), 1,06 (Cho H-24), 1,03 (Cho H-1α), 1,01 (Cho H-15β), 1,00 (Cho H-24), 0,98 (Cho H-19), 0,98 (Cho H-14), 0,92 (Cho H-9), 0,92 (Cho H-21), 0,91 (Cho H-22S), 0,89 (FA H-6), 0,88 (Cho H-26), 0,84 (Cho H-27), 0,68 (Cho H-18) δ<sub>C</sub> = 173,53 (FA C-1), 140,38 (Cho C-5), 121,93 (Cho C-6), 101,79 (Gal C-1), 79,69 (Cho C-3), 73,48 (Gal C-3), 72,48 (Gal C-5), 70,94 (Gal C-2), 68,90 (Gal C-4), 63,14 (Gal C-6), 56,77 (Cho C-14), 56,19 (Cho C-17), 50,13 (Cho C-9), 42,28 (Cho C-13), 39,77 (Cho C-12), 39,47 (Cho C-24), 38,84 (Cho C-4), 37,29 (Cho C-1), 36,61 (Cho C-10), 36,16 (Cho C-22), 35,75 (Cho C-20), 34,14 (FA C-2), 31,91 (Cho C-7), 31,83 (Cho C-8), 31,35 (FA C-4), 29,61 (Cho C-2), 28,18 (Cho C-16), 27,94 (Cho C-25), 24,56 (FA C-3), 24,24 (Cho C-15), 23,83 (Cho C-23), 22,76 (Cho C-27), 22,51 (Cho C-26), 22,31 (FA C-5), 21,04 (Cho C-11), 19,34 (Cho C-19), 18,67 (Cho C-21), 13,93 (FA C-6), 11,80 (Cho C-18) (Abb. A.18, S. 142)

### 3.2.8.6 Cholesteryl-6-*O*-butanoyl-β-D-galactopyranosid (18)

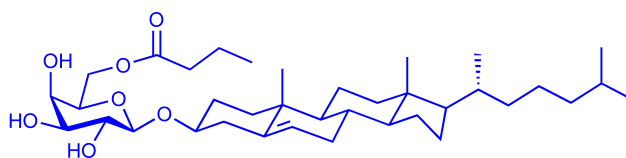


Abbildung 3.18: Strukturformel von 18

CGal (**4**, 1 g, 1,8 mmol), Produkt **11** (218 mg, 1,5 mmol), Lipase Amano PS (1 g) und eine Spatelspitze Molekularsieb wurden unter Argonatmosphäre in Pyridin (10 ml) gelöst bzw. suspendiert und 5 d bei 50 °C gerührt. Nach der Zugabe von neuer Lipase (1 g) wurde die Reaktion unter den gleichen Bedingungen 5 d fortgesetzt. Die Lipase

wurde mit einer Pore-3 Fritte abfiltriert, das klare, gelbe Filtrat mit KG60 versetzt und alles im Vakuum einrotiert. Das Rohprodukt wurde mittels einer Säulenchromatographie (stufenweise Elution mit jeweils zwei CV: Hexan/EE 1:1, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 98:2, 95:5, 90:10, 80:20) aufgereinigt, um das Produkt **18** als farblosen, amorphen Feststoff (0,27 g, 29 %) zu erhalten.

**Summenformel:** C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>O<sub>7</sub>, M = 618,88 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,44 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15)

**MALDI-TOF-MS:** exakte Masse: 618,450 Da; Masse gefunden: 618,441; Δ m/z = 14,5 ppm, (Abb. B.6, S. 148)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> = 5,34 (Cho H-6), 4,37 (Gal H-6b), 4,32 (Gal H-1β), 4,21 (Gal H-6a), 3,90 (Gal H-4), 3,66 (Gal H-5), 3,62 (Gal H-2), 3,61 (Gal H-3), 3,54 (Cho H-3), 2,40 (Cho H-4α), 2,28 (FA H-2), 2,25 (Cho H-4β), 2,01 (Cho H-12β), 1,96 (Cho H-7β), 1,86 (Cho H-16α), 1,82 (Cho H-1β), 1,63 (FA H-3), 1,59 (Cho H-2α), 1,55 (Cho H-15α), 1,51 (Cho H-11α), 1,50 (Cho H-25), 1,45 (Cho H-7α), 1,45 (Cho H-11β), 1,40 (Cho H-8), 1,36 (Cho H-20), 1,33 (Cho H-23R), 1,32 (Cho H-22R), 1,26 (Cho H-16β), 1,26 (Cho H-2β), 1,12 (Cho H-23S), 1,12 (Cho H-12α), 1,09 (Cho H-24), 1,08 (Cho H-17), 1,06 (Cho H-24), 1,03 (Cho H-1α), 1,01 (Cho H-15β), 0,99 (Cho H-19), 0,98 (Cho H-14), 0,93 (FA H-4), 0,92 (Cho H-22S), 0,92 (Cho H-21), 0,90 (Cho H-9), 0,88 (Cho H-26), 0,84 (Cho H-27), 0,68 (Cho H-18) δ<sub>C</sub> = 173,42 (FA C-1), 140,37 (Cho C-5), 121,99 (Cho C-6), 101,69 (Gal C-1), 79,59 (Cho C-3), 73,48 (Gal C-3), 72,44 (Gal C-5), 71,04 (Gal C-2), 68,84 (Gal C-4), 63,01 (Gal C-6), 56,76 (Cho C-14), 56,19 (Cho C-17), 50,15 (Cho C-9), 42,30 (Cho C-13), 39,78 (Cho C-12), 39,49 (Cho C-24), 38,81 (Cho C-4), 37,28 (Cho C-1), 36,64 (Cho C-10), 36,18 (Cho C-22), 36,06 (FA C-2), 35,76 (Cho C-20), 31,93 (Cho C-7), 31,85 (Cho C-8), 29,60 (Cho C-2), 28,20 (Cho C-16), 27,97 (Cho C-25), 24,26 (Cho C-15), 23,83 (Cho C-23), 22,78 (Cho C-27), 22,53 (Cho C-26), 21,05 (Cho C-11), 19,35 (Cho C-19), 18,70 (Cho C-21), 18,39 (FA C-3), 13,70 (FA C-4), 11,83 (Cho C-18) (Abb. A.19, S. 143)

### 3.2.8.7 Cholesteryl-6-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosid (**19**)

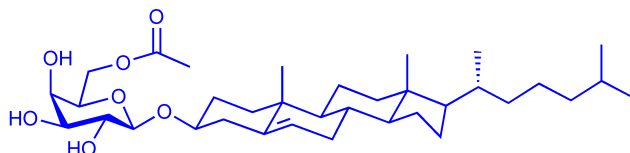


Abbildung 3.19: Strukturformel von **19**

CGal (**4**, 1,7 g, 3,1 mmol), Produkt **12** (321 mg, 2,8 mmol), Lipase Amano PS (1,7 g) und etwas Molekularsieb wurden unter Argon in Pyridin (17 ml) gelöst bzw. suspendiert und bei 50 °C für 5 d gerührt. Weitere Lipase (1,7 g) wurde hinzugefügt und die Reaktion 6 d fortgeführt. Die Reaktionslösung wurde durch eine Pore-3 Fritte filtriert, das Filtrat mit KG60 versetzt, im Vakuum eingengt und einmal mit Toluol koevaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (stufenweise Elution mit je zwei CV: Hexan/EE 1:1, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 98:2, 95:5, 90:10 und 80:20) gereinigt, um das Produkt **19** als leicht gelben, amorphen Feststoff (0,12 g, 7,5 %) zu gewinnen.

**Summenformel:** C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>7</sub>, M = 590,83 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,39 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15)

**MALDI-TOF-MS:** exakte Masse: 590,418 Da; Masse gefunden: 590,416; Δ m/z = 3,5 ppm, (Abb. B.7, S. 148)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta_{\text{H}}$  = 5,34 (Cho H-6), 4,36 (Gal H-6b), 4,32 (Gal H-1 $\beta$ ), 4,23 (Gal H-6a), 3,92 (Gal H-4), 3,66 (Gal H-5), 3,64 (Gal H-3), 3,62 (Gal H-2), 3,54 (Cho H-3), 2,37 (Cho H-4 $\alpha$ ), 2,22 (Cho H-4 $\beta$ ), 2,05 (FA H-2), 2,01 (Cho H-12 $\beta$ ), 1,95 (Cho H-7 $\beta$ ), 1,83 (Cho H-16 $\alpha$ ), 1,82 (Cho H-1 $\beta$ ), 1,58 (Cho H-2 $\alpha$ ), 1,56 (Cho H-15 $\alpha$ ), 1,51 (Cho H-11 $\alpha$ ), 1,50 (Cho H-25), 1,47 (Cho H-7 $\alpha$ ), 1,45 (Cho H-11 $\beta$ ), 1,40 (Cho H-8), 1,36 (Cho H-20), 1,33 (Cho H-22R), 1,33 (Cho H-23R), 1,26 (Cho H-16 $\beta$ ), 1,26 (Cho H-2 $\beta$ ), 1,13 (Cho H-12 $\alpha$ ), 1,12 (Cho H-23S), 1,09 (Cho H-24), 1,08 (Cho H-17), 1,06 (Cho H-24), 1,02 (Cho H-1 $\alpha$ ), 1,02 (Cho H-15 $\beta$ ), 0,99 (Cho H-19), 0,98 (Cho H-14), 0,92 (Cho H-22S), 0,92 (Cho H-21), 0,91 (Cho H-9), 0,87 (Cho H-26), 0,80 (Cho H-27), 0,68 (Cho H-18)  $\delta_{\text{C}}$  = 170,85 (FA C-1), 140,40 (Cho C-5), 121,97 (Cho C-6), 101,79 (Gal C-1), 79,67 (Cho C-3), 73,46 (Gal C-3), 72,32 (Gal C-5), 70,91 (Gal C-2), 68,81 (Gal C-4), 63,24 (Gal C-6), 56,76 (Cho C-14), 56,19 (Cho C-17), 50,11 (Cho C-9), 42,29 (Cho C-13), 39,76 (Cho C-12), 39,47 (Cho C-24), 38,85 (Cho C-4), 37,27 (Cho C-1), 36,62 (Cho C-10), 36,16 (Cho C-22), 35,76 (Cho C-20), 31,91 (Cho C-7), 31,83 (Cho C-8), 29,61 (Cho C-2), 28,19 (Cho C-16), 27,95 (Cho C-25), 24,24 (Cho C-15), 23,83 (Cho C-23), 22,76 (Cho C-27), 22,51 (Cho C-26), 21,05 (Cho C-11), 20,85 (FA C-2), 19,35 (Cho C-19), 18,68 (Cho C-21), 11,83 (Cho C-18) (Abb. A.20, S. 143)

### 3.2.8.8 Methyl-6-*O*-(15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (**20**)

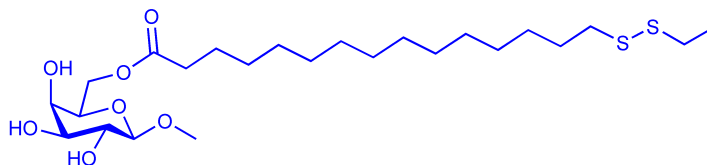


Abbildung 3.20: Strukturformel von **20**

Gekauftes Methyl- $\beta$ -D-galactopyranosid<sup>162</sup> (0,61 g, 3,2 mmol), Verbindung **8** (0,99 g, 2,5 mmol) und Lipase Amano PS (1,3 g) wurden unter Argon in Pyridin (10 ml) gelöst bzw. suspendiert und 8 d bei 50 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch eine Pore-3 Fritte filtriert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde mit einer Säulenchromatographie (stufenweise Elution mit: CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 98:2, 95:5, 90:10 und 80:20) gereinigt und das Produkt **20** als farbloses Pulver (0,83 g, 64 %) erhalten.

**Summenformel:** C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>, M = 510,75 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,39 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15)

**MALDI-TOF-MS:** exakte Masse: 510,269 Da; Masse gefunden: 510,266;  $\Delta$  m/z = 4,6 ppm, (Abb. B.8, S. 149)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta_{\text{H}}$  = 4,33 (m, 1 H; Gal H-6a), 4,26 (m, 1 H; Gal H-6b), 4,15 (d, J<sub>1,2</sub> = 7,2 Hz, 1 H; Gal H-1 $\beta$ ), 3,91 (s, 1 H; Gal H-4), 3,66 (t, J<sub>5,6a</sub> = 6,8 Hz, 1 H; Gal H-5), 3,62 (d, J<sub>2,3</sub> = 8,4 Hz, 1 H; Gal H-2), 3,58 (1 H; Gal H-3), 3,53 (s, 3 H; Me), 2,70 (q, J = 6,9 Hz, 1,9 H; Et H-1), 2,68 (t, J = 7,2 Hz, 1,9 H; FA H-15), 2,31 (t, J = 7,5 Hz, 2 H; FA H-2), 1,67 (m, J = 7,2 Hz, 2 H; FA H-14), 1,60 (m, J = 6,9 Hz, 2 H; FA H-3), 1,37 (2 H; FA H-13), 1,32 (t, J = 7,5 Hz, 3 H; Et H-2), 1,26 (m, 18 H; FA H-4 ... H-12)  $\delta_{\text{C}}$  = 173,66 (FA C-1), 103,90 (Gal C-1), 73,32 (Gal C-3), 72,50 (Gal C-5), 70,87 (Gal C-2), 68,80 (Gal C-4), 63,09 (Gal C-6), 56,93 (Me), 39,17 (FA C-15), 34,04 (FA C-2), 32,66 (Et C-1),

<sup>162</sup>#66920, Fluka

29,54 [3 C], 29,49, 29,40 [2 C], 29,22, 29,13 [2 C] (FA C-4 ... C-12), 29,08 (FA C-14), 28,41 (FA C-13), 24,80 (FA C-3), 14,36 (Et C-2) (Abb. A.21, S. 144)

### 3.2.8.9 Phenyl-6-*O*-(15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (**21**)

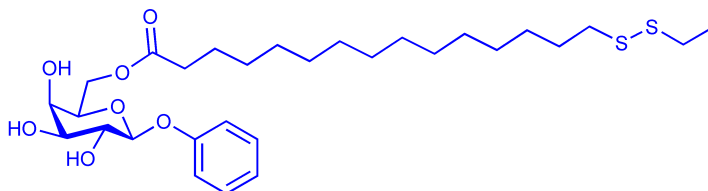


Abbildung 3.21: Strukturformel von **21**

Kommerziell erworbenes Phenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid<sup>163</sup> (0,87 g, 3,4 mmol), Verbindung **8** (1,05 g, 2,7 mmol) und Lipase Amano PS (1,4 g) wurden unter Argonatmosphäre in Pyridin (10 ml) gelöst bzw. suspendiert und für 8 d bei 50 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch eine Pore-3 Fritte filtriert, am Rotationsverdampfer eingengt und mittels einer Säulenchromatographie (stufenweise Elution mit: CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 98:2, 95:5, 90:10 und 80:20) gereinigt und das Produkt **21** als farbloses Pulver (0,80 g, 52 %) erhalten.

**Summenformel:** C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>, M = 572,81 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,44 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15)

**MALDI-TOF-MS:** exakte Masse: 572,284 Da; Masse gefunden: 572,265;  $\Delta$  m/z = 33,8 ppm, (Abb. B.9, S. 149)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta_{\text{H}}$  = 7,15 (t, J = 7,7 Hz, 2 H; Ph H-3, H-5), 6,97 (d, J = 8,1 Hz, 2 H; Ph H-2, H-6), 6,96 (s, 1 H; Ph H-4), 4,73 (d, J<sub>1,2</sub> = 7,5 Hz, 1 H; Gal H-1 $\beta$ ), 4,33 (t, J<sub>6a,6b</sub> = 9,6 Hz, 1 H; Gal H-6a), 4,14 (d, J<sub>6a,6b</sub> = 8,7 Hz, 1 H; Gal H-6b), 4,03 (t, J<sub>2,3</sub> = 8,4 Hz, 1 H; Gal H-2), 3,96 (s, 1 H; Gal H-4), 3,73 (d, J<sub>2,3</sub> = 9,3 Hz, 1 H; Gal H-3), 3,63 (s, 1 H; Gal H-5), 2,69 (q, J = 6,9 Hz, 1,9 H; Et H-1), 2,68 (t, J = 6,6 Hz, 1,9 H; FA H-15), 2,21 (t, J = 7,5 Hz, 2 H; FA H-2), 1,67 (m, J = 7,1 Hz, 2 H; FA H-14), 1,53 (t, J = 6,8 Hz, 2 H; FA H-3), 1,37 (t, J = 7,5 Hz, 2 H; FA H-13), 1,32 (t, J = 7,5 Hz, 3 H; Et H-2), 1,24 (m, 18 H; FA H-4 ... H-12)  $\delta_{\text{C}}$  = 173,58 (FA C-1), 157,06 (Ph C-1), 129,67 (Ph C-3, C-5), 122,69 (Ph C-4), 117,04 (Ph C-2, C-6), 101,24 (Gal C-1), 73,29 (Gal C-3), 72,80 (Gal C-5), 70,80 (Gal C-2), 68,80 (Gal C-4), 63,08 (Gal C-6), 39,23 (FA C-15), 34,03 (FA C-2), 32,71 (Et C-1), 29,59 [3 C], 29,53, 29,46, 29,44, 29,24, 29,17 [2 C] (FA C-4 ... C-12), 29,16 (FA C-14), 28,45 (FA C-13), 24,70 (FA C-3), 14,38 (Et C-2) (Abb. A.22, S. 144)

## 3.2.9 Schützung und Entschützung der Mercaptogruppe

### 3.2.9.1 15-(2-Ethyl-disulfanyl)pentadecansäure (**5**)

15-Mercaptopentadecansäure (97 %, 5 g, 17,7 mmol) und Diethyl-disulfid (4,4 ml, 35,3 mmol) wurden in Triethylamin (50 ml) aufgelöst und bei 70 °C für 17 h gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum einrotiert und am HV getrocknet. Ohne Aufreinigung wies das Produkt **5** im NMR keine Eduktsignale mehr auf, so dass von einem vollständigen Umsatz (100 %, 17,7 mmol) ausgegangen werden kann.

<sup>163</sup>#78552, Fluka

**Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, M = 334,58 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,65 (Toluol/Aceton 3:1)

**ESI-MS:** exakte Masse: 334,20 Da; m/z gefunden: 333,2; Δ m/z = -1,0 ([M-H]<sup>-</sup>)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> = 12,71 (s, 1 H; FA H-1), 3,11 (q, J = 7,3 Hz, 1,8 H; Et H-1), 2,51 (t, J = 7,1 Hz, 1,6 H; FA H-15), 2,27 (t, J = 7,4 Hz, 2 H; FA H-2), 1,60 (m, 2 H; FA H-3), 1,60 (m, 2 H; FA H-14), 1,38 (2 H; FA H-13), 1,31 (2 H; FA H-4), 1,26 (m, 16 H; FA H-5 ... H-12), 1,25 (d, J = 10,7 Hz, 3 H; Et H-2) δ<sub>C</sub> = 178,52 (FA C-1), 44,73 (Et C-1), 35,12 (FA C-2), 33,79 (FA C-14), 29,36 [3 C], 29,32, 29,25 [2 C], 29,10, 29,06 (FA C-5 ... C-12), 28,81 (FA C-4), 28,11 (FA C-13), 25,12 (FA C-3), 24,34 (FA C-15), 8,12 (Et C-2)

### 3.2.9.2 Entschützung des 2-Ethylidisulfanyl-Restes (23)

Zu Verbindung **8** (22,9 mg, 58,8 μmol) wurden 165 μl einer Mischung Pyridin/H<sub>2</sub>O 9:1 (v/v) und 64,7 μl einer 1,0 M Triethylphosphinlösung in THF<sup>164</sup> (7,6 mg, 64,7 μmol) zugegeben und alles gerührt. Gemäß DC- und NMR-Kontrolle war die Entschützung bereits nach 6 min beendet und nach 1 h wurde die Flüssigkeit am HV verdampft. Im NMR wurden keine Signale des Phosphins oder des Phosphinoxides mehr beobachtet.

**Summenformel:** C<sub>18</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>2</sub>S, M = 329,54 g/mol

**DC:** R<sub>f</sub> = 0,78 (Toluol/Aceton 3:1)

**ESI-MS:** exakte Masse: 329,24 Da; m/z gefunden: 330,2; Δ m/z = +1,0 ([M+H]<sup>+</sup>)

exakte Masse (Disulfid): 656,46 Da; m/z gefunden: 657,3; Δ m/z = +0,84 ([M+H]<sup>+</sup>)

**NMR (CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> = 2,52 (q, J = 7,1 Hz, 2 H; FA H-15), 2,40 (t, J = 7,5 Hz, 2 H; FA H-2), 2,05 (s, 3 H; Oxim H-trans), 1,99 (s, 3 H; Oxim H-cis), 1,69 (m, J = 7,2 Hz, 2 H; FA H-3), 1,61 (m, J = 7,4 Hz, 2 H; FA H-14), 1,32 (SH), 1,26 (m, 20 H; FA H-4 ... H-13) δ<sub>C</sub> = 171,20 (FA C-1), 163,58 (Oxim C-2), 34,02 (FA C-14), 33,01 (FA C-2), 29,58 [2 C], 29,54 [2 C], 29,48, 29,41, 29,20, 29,12 (FA C-5 ... C-12), 29,04 (FA C-4), 28,35 (FA C-13), 24,94 (FA C-3), 24,62 (FA C-15), 21,98 (Oxim C-trans), 16,90 (Oxim C-cis)

### 3.2.9.3 Cholesteryl-6-O-(15-mercaptopentadecanoyl)-β-D-galactopyranosid (22)

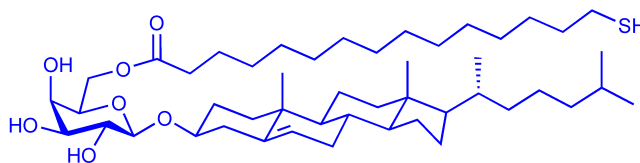


Abbildung 3.23: Strukturformel von **22**

Verbindung **15** (24,6 mg, 28,4 μmol) wurde in Pyridin/H<sub>2</sub>O 9:1 (217 μl) aufgelöst und unter Rühren wurden 28,4 μl einer 1,0 M Triethylphosphinlösung in THF (3,36 mg, 28,4 μmol) hinzugefügt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei RT wurde die Reaktionslösung im Vakuum einrotiert und über Nacht am HV getrocknet. Die abgespaltene Schutzgruppe und sowohl nicht umgesetztes Triethylphosphin als auch entstandenes Triethylphosphinoxid waren vollständig verdampft und nur das leicht gelbe Produkt **22** blieb zurück (94,1 % nach NMR). Da das Produkt oxidationsempfindlich war, wurde es

<sup>164</sup>Triethylphosphin Lösung, 1.0 M in THF, #346179, Aldrich

gleich für die Konjugation weiter verwendet.

**Summenformel:**  $C_{48}H_{84}O_7S$ ,  $M = 805,24$  g/mol

**DC:**  $R_f = 0,53$  ( $CHCl_3/MeOH$  85:15)

**ESI-MS:** n. det. (oxidationsempfindlich)

**NMR ( $CDCl_3$ ):** Aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit von Produkt **22** wurde nur von einem geringen Anteil ( $\approx 2$  mg) ein  $^1H$ -NMR-Spektrum gemessen, das nicht zur vollständigen Signalzuordnung ausreichte. Die Signale der Mercaptofunktion stimmten jedoch mit denen von **23** überein, während die Signale der Schutzgruppe kaum noch nachweisbar waren.

### 3.2.10 Konjugation von ACGal an Trägerproteine

#### 3.2.10.1 Verwendung voraktivierter Trägerproteine

**Konjugation an maleimidaktiviertes KLH** Die Konjugation wurde nach Anweisungen des Herstellers des KLH-Kits<sup>165</sup> durchgeführt. Das entschützte, mercaptofunktionalisierte ACGal **22** (2,53 mg, 3,1  $\mu$ mol) (s. 3.2.9.3) wurde in DMSO (100  $\mu$ l) gelöst und mit Konjugationspuffer (100  $\mu$ l) versetzt. Der Niederschlag löste sich nach 30 min weitgehend auf. Es wurden 2 mg KLH in 200  $\mu$ l  $H_2O$  zugegeben und alles 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde in ein Ultrafiltrationsgefäß<sup>166</sup> überführt sowie mit 3,6 ml einer 5%igen DMSO-Lösung in Reinigungs-Salzpuffer verdünnt und vermischt. Die Gefäße wurden für 1 h mit 3200 x g und 4 °C zentrifugiert und die 250  $\mu$ l Retentat erneut mit 3,75 ml verdünnt. Die Aufkonzentration und Verdünnung wurden einmal wiederholt.

**Konjugation an maleimidaktiviertes BSA** Das ACGal **22** (22,9 mg, 28,4  $\mu$ mol) wurde in DMSO (100  $\mu$ l) gelöst und maleimidaktiviertes BSA<sup>167</sup> (5 mg in 500  $\mu$ l Puffer) durch ein Septum hinzugefügt. Die Lösung, die sich relativ schnell eintrübte, wurde 2 h bei RT gerührt, in ein Ultrafiltrationsgefäß überführt, mit 5 % DMSO in PBS auf 4 ml aufgefüllt (1:6,6 Verdünnung) und für 1 h bei 3200 x g, 4 °C zentrifugiert. Das Retentat wurde zweimal mit einer 5%igen DMSO-Lösung in PBS 1:15 verdünnt, gemischt und zentrifugiert, um die in der Reaktionslösung vorhandene Ethylendiamintetraessigsäure heraus zu verdünnen.

#### 3.2.10.2 Verwendung von SMCC als Linker

Das funktionalisierte ACGal **22** wurde zunächst an SMCC<sup>168</sup> gekoppelt und diese Verbindung mit dem Protein zum ACGal-Protein-Konjugat verknüpft (Abb. 3.24, S. 63).

**Konjugation an BSA** Das geschützte, mercaptofunktionalisierte ACGal **15** (2 mg, 2,3  $\mu$ mol) wurde in 50  $\mu$ l Pyridin/ $H_2O$  9:1 (v/v) aufgelöst. Zur reduktiven Entschützung wurden 2,2  $\mu$ l einer 1 M Triethylphosphinlösung in THF<sup>169</sup> zugegeben, 1 h bei 33 °C

<sup>165</sup>Imject® Maleimide-Activated mKLH Kit, #77611, Thermo Fisher Scientific (früher Pierce Biotechnology), Bonn

<sup>166</sup>Amicon Ultra-4 centrifugal device 30 K NWC0, 4 ml, #UFC803008, Millipore

<sup>167</sup>Imject® Maleimide-Activated Bovine Serum Albumin, #77115, Thermo Fisher Scientific

<sup>168</sup>Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat, #22360, Thermo Fisher Scientific

<sup>169</sup>wie Anm. 164

geschüttelt und die Flüssigkeit 30 min im N<sub>2</sub>-Strom abgeblasen. Unverzüglich wurden 36,8  $\mu$ l einer 59,8 mM SMCC-Lösung in DMF zupipettiert und 2,5 h bei 33 °C geschüttelt. Die eine Hälfte davon wurde mit 100  $\mu$ l einer 1%igen SDS/BSA<sup>170</sup>-Lösung<sup>171</sup> und die andere mit 100  $\mu$ l einer 10%igen SDS/BSA-Lösung<sup>172</sup> versetzt, kräftig gemischt und 16 h bei 34 °C geschüttelt. Es wurden eine ziemlich trübe (1 % SDS) und eine klare, aber mit sichtbaren Aggregaten durchsetzte, (10 % SDS) Lösung erhalten. Parallel dazu wurden ein Kontrollkonjugat mit L-Cystein (0,48 mg, 4  $\mu$ mol) sowie eine Blindprobe vollkommen ohne Thiol mit den identischen Mengen Linker- und SDS-Lösung sowie gleichen Reaktionszeiten hergestellt. Die erhaltenen Lösungen waren klar und farblos.

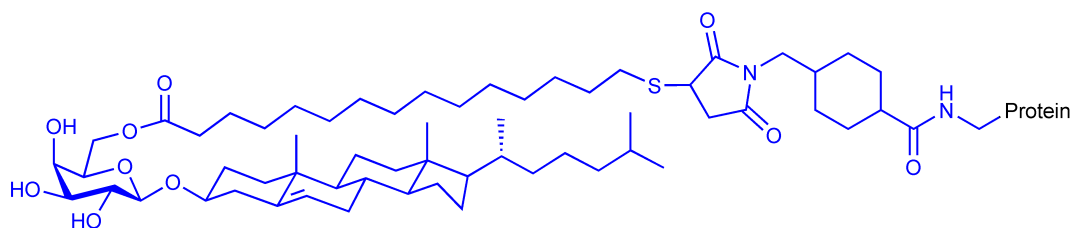


Abbildung 3.24: **Strukturformel eines ACGal-Protein-Konjugates.** Das geschützte, funktionalisierte ACGal wurde mit dem Linker SMCC über dessen Maleimid-Funktion gekoppelt. Diese Verbindung wurde über die NHS-Funktion des Linkers mit dem Protein konjugiert. Die verwendeten Proteine waren BSA, OVA und KLH.

**Konjugation an KLH** Die Konjugation von ACGal an KLH erfolgte ähnlich der BSA-Konjugation: Verbindung **15** (3,4 mg, 3,93  $\mu$ mol) wurde in 50  $\mu$ l Pyridin/H<sub>2</sub>O 9:1 gelöst, mit Triethylphosphin (3,73  $\mu$ l 1 M in THF, 3,73  $\mu$ mol) versetzt, 1 h bei 32 °C geschüttelt und abgeblasen. SMCC (62,4  $\mu$ l 59,8 mM in DMF, 3,73  $\mu$ mol) wurde zugegeben und alles 2,5 h bei 32 °C geschüttelt. Von dieser Lösung wurden 22  $\mu$ l (35,3 % des Ansatzes entsprechend 1,39  $\mu$ mol **15**) mit 120  $\mu$ l einer 10%igen SDS/KLH<sup>173</sup>-Lösung<sup>174</sup> versetzt, kräftig gemischt und 19 h bei 34 °C geschüttelt. Es wurde eine farblose, opaleszente Lösung erhalten.

**Konjugation an OVA** Die Konjugation von ACGal an das Trägerprotein OVA wurde analog der BSA-Konjugation durchgeführt: die Verbindung **15** (2,63 mg, 3,04  $\mu$ mol) wurde in 50  $\mu$ l Pyridin/H<sub>2</sub>O 9:1 gelöst, mit Triethylphosphin (3,0  $\mu$ l 1 M in THF, 3,0  $\mu$ mol) versetzt, 1 h bei 35 °C geschüttelt und abgeblasen. SMCC (48,5  $\mu$ l 59,8 mM in DMF, 2,9  $\mu$ mol) wurde zugegeben und die Lösung 2,5 h bei 35 °C geschüttelt. Je eine Hälfte (entsprechend 1,5  $\mu$ mol **15**) wurde mit 130  $\mu$ l einer 10%igen SDS/OVA<sup>175</sup>-Lösung<sup>176</sup> versetzt, intensiv gemischt und 19 h bei 35 °C geschüttelt. Die Lösung war am Ende farblos und opaleszent. Mit den gleichen Mengen Linker und Proteinlösung wurden parallel dazu ein Kontrollkonjugat mit L-Cystein (0,68 mg, 5,6  $\mu$ mol) und eine

<sup>170</sup>Albumin from bovine serum, Cohn's Analog<sup>TM</sup>, Fraction V, #A1479, Sigma

<sup>171</sup>10 mg/ml SDS, 10 mg/ml BSA in PBS

<sup>172</sup>100 mg/ml SDS, 10 mg/ml BSA in PBS

<sup>173</sup>Hemocyanin from Megathura crenulata (keyhole limpet), #H7017, Sigma

<sup>174</sup>100 mg/ml SDS, 10 mg/ml KLH in 31 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4

<sup>175</sup>Albumin from chicken egg white, Grade VI, #A2512, Sigma, später Albumin from chicken egg white, for use as a marker in SDS-PAGE, #A7642, Sigma

<sup>176</sup>100 mg/ml SDS, 10 mg/ml OVA in PBS

Blindprobe vollkommen ohne Thiol hergestellt, die zu klaren und farblosen Lösungen geführt haben.

**Entfernung des SDS aus den Konjugaten** Das SDS in den Konjugationslösungen wurde durch wiederholtes Herunterverdünnen und Aufkonzentrieren mittels Ultrafiltrationsgefäßen<sup>177</sup> entfernt. Die Konjugationslösungen wurden in die Gefäße überführt und für 30 min bei 13 000 x g und RT bis auf ein Restvolumen von etwa 30  $\mu$ l zentrifugiert. Es wurden 300  $\mu$ l einer 20%igen ACN-Lösung in PBS dazugegeben und die Flüssigkeit mit einer Pipette intensiv vermischt. Die Gefäße wurden erneut für 45-60 min bei 13 000 x g zentrifugiert und die so durchgeführte Verdünnung (1:11) 5- bis 15-mal wiederholt.

### 3.2.11 Bromcyanspaltung

In einem Eppendorfgefäß wurden 5  $\mu$ l ACGal-Protein-Konjugat, 45  $\mu$ l PBS und 50  $\mu$ l 189 mM BrCN<sup>178</sup> in TFA 13 h bei RT gerührt. Zum Gefäß wurden 50  $\mu$ l ACN zugegeben und alles 15 min gerührt. Die Flüssigkeit wurde abgeblasen, die Probe in 10  $\mu$ l ACN aufgenommen und im Massenspektrometer vermessen. Parallel dazu wurde das unkonjugierte (maleimidaktivierte) Trägerprotein identisch behandelt und als Referenz verwendet.

---

<sup>177</sup>Biomax 5k NMWL membrane 0,5ml, Ultrafree centrifugal filter, #UFV5BCC25, Millipore

<sup>178</sup>Bromcyan, #16774, Fluka



# Kapitel 4

## Ergebnisse

Am Anfang der Untersuchungen wurden die Lipidstrukturen von vier pathogenen Borrelienarten chemisch qualitativ und quantitativ analysiert und miteinander verglichen (s. 4.1). Daran schloss sich kurz ein Nachweis der Enzymaktivität einer Cholesterol-Glycosyltransferase in *B. burgdorferi* s. s. an (s. 4.2, S. 77). Mit Zellkulturen wurde dann die Erkennung der Gesamtlipide durch die Toll-like Rezeptoren des angeborenen Immunsystems untersucht (s. 4.3, S. 78). Auf eine Identifizierung der Lipid-Antigene mit LB-Patientenseren folgte eine eingehende Bestimmung der Frequenz und des Titers der Antikörper (AK) in den Krankheitsstadien (s. 4.4, S. 80). Danach wurden die natürlichen Strukturen des wichtigsten Glycolipides Cholesteryl-6-*O*-acyl-galactopyranosid (ACGal) sowie eine Bibliothek künstlicher Unterstrukturen chemisch synthetisiert (s. 4.5, S. 84). Auf die Bestätigung der Antigenität von synthetischem ACGal und der Bestimmung des AK-Epitops (s. 4.5.5, S. 90) folgte die Synthese von einem funktionalisiertem ACGal (s. 4.5.6, S. 92) und dessen Konjugation an immunogene Trägerproteine (s. 4.6.1, S. 95). Mit den Konjugaten wurden Versuchstiere immunisiert (s. 4.6.2, S. 99) und die AK umfassend mit den Lipidstrukturen charakterisiert (s. 4.6.3, S. 100). Um die Eignung von ACGal als Impfstoff zu beurteilen, wurde die Bindung der spezifischen AK an intakte Borrelien in der Immunofluoreszenz untersucht (s. 4.7, S. 102).

### 4.1 Chemische Strukturanalyse der Borrelienlipide

Zuerst erfolgte die Trennung und Identifizierung der Gesamtlipide von *B. burgdorferi* s. s. (Bbu) (s. 4.1.1). Da auch *B. afzelii* (Baf) und *B. garinii* (Bga) LB verursachen, wurden deren Lipide – mit Schwerpunkt auf ACGal – mit denen von Bbu qualitativ und quantitativ verglichen (s. 4.1.2, S. 72). Auch ein Erreger von Rückfallfieber – *Borrelia hermsii* (Bhe) – wurde vergleichend mit einbezogen. Ein Nachweis von ACGal in sechs weiteren Borrelienarten erfolgte nur serologisch (s. 4.4.4, S. 83).

#### 4.1.1 Strukturanalyse der Gesamtlipide von *B. burgdorferi*

*B. burgdorferi* s. s. B31 (s. 3.1.1, S. 31) wurde in BSK-H kultiviert, gefriergetrocknet (s. 3.1.2, S. 32) und aus 603 mg Bakterientrockenmasse wurden durch Butanolextraktion 161 mg Lipide (26,7 %) gewonnen (s. 3.1.5.1, S. 33). Auf die Analyse der Gesamtlipide auf Dünnschichtchromatogrammen folgte die säulenchromatographische Trennung (S. 66)

und Quantifizierung (S. 73) der einzelnen Lipide. Diese isolierten Lipide wurden mittels GLC/MS, NMR und MALDI-TOF-MS chemisch analysiert (S. 67-71) und teilweise mit Referenzsubstanzen verglichen.

#### 4.1.1.1 Dünnschichtchromatographie

Die Gesamtlipide wurden auf Dünnschichtchromatogramme (DC) aufgetüpfelt und mit verschiedenen Laufmitteln entwickelt (s. 3.2.1, S. 44). Durch die Einführung der sensitiveren Mostainfärbung (s. 3.2.1.3, S. 44) konnten selbst bei kleinen Mengen Gesamtlipid ( $4 \mu\text{g}$ ) einzelne Lipide deutlich angefärbt werden, die bei der zuvor benutzten Schwefelsäurefärbung (s. 3.2.1.3) sogar bei großen Mengen ( $40 \mu\text{g}$ ) nur sehr vage sichtbar waren. Auf den DC in den unterschiedlichen Laufmitteln (Abb. 4.4, S. 72) konnten mit Mostain insgesamt acht Lipide deutlich angefärbt werden. Die Verwendung weiterer DC-Färbungen wie Joddampf (für Lipide), Ninhydrin (für  $\text{NH}_2$ -Funktionen) oder Dittmer-Lester-Reagenz (für Phospholipide) offenbarte keine weiteren Lipide.

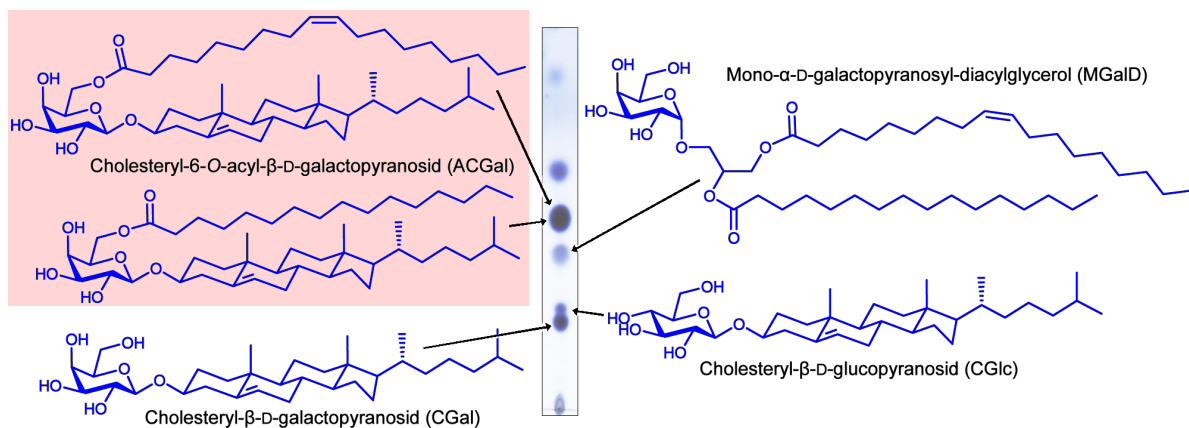


Abbildung 4.1: **Dünnschichtchromatogramm der Glycolipide von *B. burgdorferi* s. s.** Nach einer Butanolextraktion wurden  $5 \mu\text{g}$  der Gesamtlipide von *B. burgdorferi* s. s. auf ein DC aufgetragen. Das DC wurde in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85:15 (v/v) entwickelt und mit Mostain angefärbt (s. 3.2.1.1, S. 44). Die gefundenen Glycolipide sind mit Strukturformeln bezeichnet.

Die zwei Lipide mit den größten  $R_f$ -Werten, die sich am besten mit einem unpolaren Laufmittel (Hexan/EE 1:1) auftrennten, wurden als Neutrallipide (S. 70) identifiziert. Bei den zwei Lipiden mit den geringsten  $R_f$ -Werten, die erst in einem sehr polaren Laufmittel ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:4) mitwanderten, handelt es sich um Phospholipide (S. 71). Die anderen vier Lipide mit  $R_f$ -Werten dazwischen, trennten sich besonders gut mit dem Laufmittel  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85:15 auf (Abb. 4.1, S. 66). Dabei handelt es sich um Glycolipide, die den Schwerpunkt der folgenden Analysen bildeten.

#### 4.1.1.2 Trennung der Gesamtlipide

Vor der chemischen Analyse der Strukturen mussten die einzelnen Lipide isoliert werden. Die präparative Dünnschichtchromatographie eignet sich gut für kleinere Probenmengen und wenn es darum geht, nur wenige Substanzen zu trennen. Bei dem vorliegenden komplexen Substanzgemisch bestand ein erstes Problem darin, die Banden vor dem Herauskratzen zu identifizieren, denn keine der Substanzen ist fluoreszenzaktiv. Zudem

wäre es unmöglich, ein Gemisch mit so unterschiedlich polaren Substanzen in einem Schritt umfassend zu trennen.

Aus diesen Gründen wurde eine säulenchromatographische Trennung („Flashchromatographie“) der Gesamtlipide etabliert. Nach der Beladung einer Kieselsäule mit den Lipiden erfolgte die stufenweise Elution mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Gemischen – am Ende der Trennung mit  $\text{H}_2\text{O}$ -Anteil – mit zunehmender Polarität (s. 3.2.2, S. 45). Die gesammelten Fraktionen wurden mit DC auf die enthaltenen Lipide untersucht und die Fraktionen mit den gleichen Lipiden vereinigt (s. Tab. 4.1, S. 67), verdampft und ausgewogen.

Pool	Lipid	Pool	Lipid	Pool	Lipid
1	Cholesterylester	5	ACGal & MGalD	9	<b>CGal</b>
2	Cholesterol	6	<b>MGalD</b>	10	Phospholipide
3	-	7	MGalD & CGlc	11	Nachlauf 1
4	<b>ACGal</b>	8	CGlc & CGal	12	Nachlauf 2

Tabelle 4.1: **Lipidpools der Säulenchromatographie der Gesamtlipide von *B. burgdorferi* s. s.** Der Lipidinhalt der einzelnen Fraktionen der Säulenchromatographie von *B. burgdorferi* s. s. (s. 3.2.2, S. 45) wurde mit DC analysiert und die Fraktionen gleichen Inhalts vereinigt. Angegeben sind die Nummer des Pools und die enthaltenen Lipide, deren Struktur anschließend bestimmt wurde.

Mit dieser Methode konnten die Neutral- und Glycolipide – mit Ausnahme von CGlc – jeweils sauber gewonnen werden, wobei bei MGalD und CGal auch wenige Mischfraktionen auftraten, so dass keine 100%ige Trennung erreicht wurde. Nach der Auswage der Lipidpools war durch die Abschätzung der Anteile der gemischten Pools aufgrund der DC dennoch eine Quantifizierung der Einzellipide möglich (s. Tab. 4.2). Die Phospholipide erstreckten sich trotz stark erhöhter Polarität des Lösungsmittelgemisches teilweise über viele Mischfraktionen und wurden – außer in sauberen Fraktionen für die chemische Analytik – nicht separiert (s. 4.1.2.2, S. 73). Die sauberen Lipidpools wurden für die chemischen Analysen und die Serologie (s. 4.4, S. 80) verwendet, während mit allen Lipidpools die Erkennung durch das angeborene Immunsystem untersucht wurde (s. 4.3, S. 78).

#### 4.1.1.3 Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ACGal)

Eine GLC/MS-Analyse (s. 3.2.3, S. 45) des unpolarsten (obersten) der vier Glycolipide (Abb. 4.1, S. 66) ergab nach Methanolyse und Peracetylierung die zwei Fettsäuren Ölsäure (*cis*- $\Delta^9$ -18:1, 57,8 % der FA) und Palmitinsäure (16:0, 42,2 % der FA) sowie das Kohlenhydrat Galactose und das Steroid Cholesterol (Abb. 4.2). Die gemessenen NMR-Spektren (s. 3.2.4, S. 46) stimmten vollständig sowohl mit den von uns für *B. burgdorferi* s. s. publizierten Daten (Schröder u. a., 2003) als auch später mit den Daten der synthetischen ACGal mit Öl- (s. 3.2.8.1) und Palmitinsäure (s. 3.2.8.2) überein (Abb. des  $^1\text{H}$ -Spektrums – A.1, S. 133). Bestätigt wurde diese Interpretation durch MALDI-TOF-MS (s. 3.2.5.1, S. 47), die die beiden erwarteten exakten Massen 812,653 Da (für Oleoyl-CGal) und 786,637 Da (für Palmitoyl-CGal) belegte:  $m/z = 811,653$  ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) bzw.  $m/z = 786,640$  ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ). Aufgrund dieser Analysen konnte somit das unpolarste Glycolipid als Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ACGal) mit den Fettsäuren Palmitinsäure und Ölsäure, aber – im Gegensatz zu Schröder u. a. (2003) – ohne Linolensäure bestätigt werden (Abb. 4.1, S. 66).

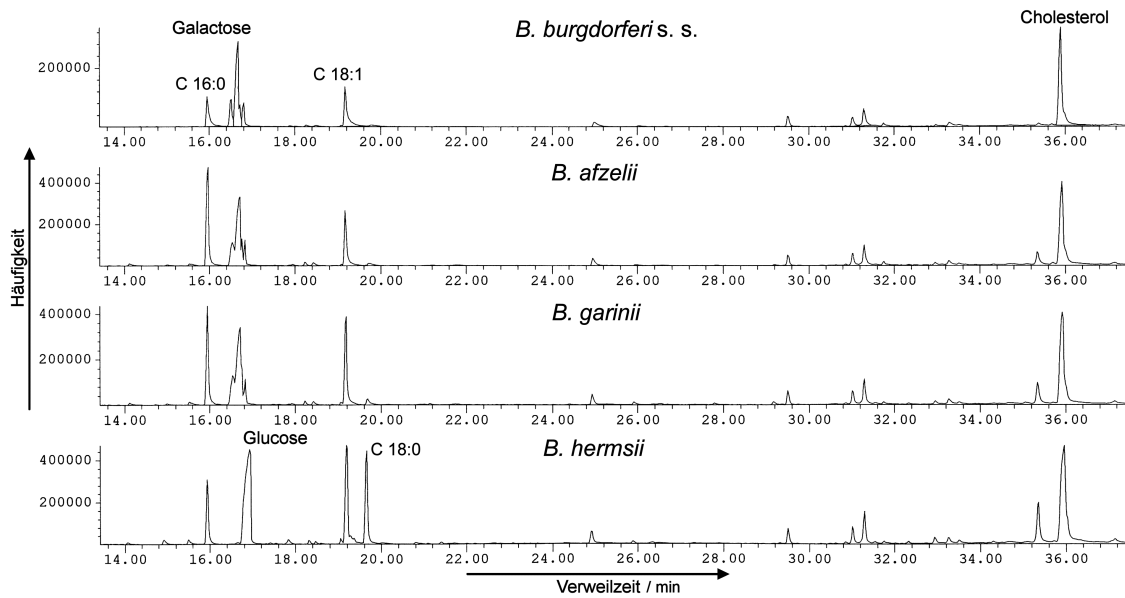


Abbildung 4.2: Vergleichende Gaschromatogramme des ACGal/ACGlc der vier Borrelienspezies. Aus den Gesamtlipiden von *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. hermsii* wurde die ACG-Fraktion durch Säulenchromatographie isoliert. Nach einer milden, sauren Methanolyse und einer Peracetylierung wurden die Proben mittels GLC/MS analysiert. Die Zuordnung der Signale erfolgte aufgrund der Retentionszeiten im Vergleich mit externen Standards und der Massenspektren. [C16:0, Palmitinsäure; C18:1, Ölsäure; C18:0, Stearinsäure] (s. 3.2.3)

#### 4.1.1.4 Mono- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-diacylglycerol (MGalD)

Das dritt-polarste Glycolipid (zweites von oben auf den DC, Abb. 4.1, S. 66) wurde ebenfalls nach Methanolyse und Peracetylierung qualitativ mit GLC/MS analysiert. Dabei konnten Signale von Glycerol, drei verschiedenen Fettsäuren – Ölsäure (63,2 % der FA), Palmitinsäure (31,5 % der FA) und Stearinsäure (18:0, 5,3 % der FA) – und von Galactose, aber kein Cholesterol, detektiert werden. Die NMR-Spektren (Abb. des  $^1\text{H}$ -Spektrums – A.8, S. 137) stimmten wiederum vollständig mit den von uns publizierten Daten des Mono- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-diacylglycerol von *B. burgdorferi* s. s. überein (Schröder u. a., 2003), mit dem Unterschied, dass Linolsäure<sup>1</sup> nur in Spuren gefunden wurde. Diese mikroheterogene Struktur konnte durch MALDI-TOF-MS bestätigt werden. Die gefundene Masse  $m/z = 755,570$  entspricht dem pseudomolekularen Ion  $[\text{M}-\text{H}]^-$  der Struktur mit je einer Öl- und Palmitinsäure (exakte Masse = 756,575 Da), während die gefundene Masse  $m/z = 781,584$  mit  $[\text{M}-\text{H}]^-$  des MGalD mit zwei Oleoylresten (exakte Masse = 782,591 Da) korrespondierte. Bei diesem Glycolipid handelt es sich somit um Mono- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-diacylglycerol mit den veresterten Fettsäuren Öl- und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 und kleinen Anteilen Stearin- und Linolsäure.

#### 4.1.1.5 Cholesteryl- $\beta$ -D-glucopyranosid (CGlc)

Das zweit-polarste (zweit-unterste) der vier Glycolipide (Abb. 4.1, S. 66) war vorher nicht beschrieben worden und machte mit knapp 3 % nur einen geringen Teil der Gesamtlipide aus (s. Tab. 4.2, S. 73). Die Probleme für die Analyse bestanden zum einen in der geringen Menge und zum anderen im sehr ähnlichen  $R_f$ -Wert verglichen mit CGal

<sup>1</sup>charakteristisches Signal von  $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$  (H-11) bei  $\delta_{\text{H}} = 2,70$  ppm

und somit einer entsprechend schwierigen Trennung. Nach der Säulenchromatographie wurde zunächst als hauptsächlicher Pool nur ein Gemisch aus MGalD und diesem Lipid erhalten (s. 4.1.1.2, S. 66). Dieses wurde mit GLC/MS analysiert (s. 3.2.3, S. 45). Das Chromatogramm zeigte neben den Signalen, die bereits bei MGalD (s. 4.1.1.4) gefunden wurden – Glycerol, Galactose und Fettsäuren – Signale von Glucose<sup>2</sup> und Cholesterol. Eine MALDI-TOF-Messung ergab wiederum die von MGalD bekannten Massen –  $m/z = 755,569$  und  $m/z = 781,584$  – und Massen, die zu einem Cholesterylhexosid passen –  $m/z = 547,397$  als  $[M-H]^-$  der exakten Masse von 548,408 Da – vergleichbar mit dem MS-Spektrum von CGal (s. 4.1.1.6).

Aufgrund von GLC/MS und MS kamen somit als Strukturen Cholesteryl- $\alpha$ -galactosid, das im Gegensatz zum gefundenen  $\beta$ CGal (s. 4.1.1.6) auf Normalphasen-DC einen etwas höheren  $R_f$ -Wert hat, sowie Cholesteryl- $\alpha$ - und - $\beta$ -glucosid in Betracht<sup>3</sup>. Auf analytischen DC mit synthetischen Standards (s. 3.2.1.1, S. 44) konnte  $\alpha$ -CGal ausgeschlossen werden, während der  $\beta$ CGlc-Standard in mehreren Laufmitteln jeweils identische  $R_f$ -Werte mit dem zu analysierenden Glycolipid aufwies.

Ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Gemisches aus MGalD und diesem Lipid (Abb. A.9, S. 137) enthielt neben den Signalen von MGalD (Abb. A.8, S. 137) typische Signale<sup>4</sup> von Cholesterol und einem weiteren Kohlenhydrat, wobei die Kopplungskonstante ( $J_{1,2} = 7,8$  Hz) des anomeren Protons ( $\delta_H = 4,33$  ppm) auf eine  $\beta$ -D-Konfiguration hindeutete, jedoch keine weitere Deduktion möglich war. Mit präparativer Dünnschichtchromatographie (s. 3.2.1.2, S. 44) konnte aus dem Gemisch das zu analysierende Glycolipid in geringer Menge aufgereinigt werden. In dem gemessenen <sup>1</sup>H-Spektrum (Abb. A.11, S. 138) tauchte aber ein sehr intensives Signal<sup>5</sup> bei  $\delta_H = 3,13$  ppm auf, das für die geringe Menge Glycolipid zu einem sehr schlechten Signal/Rausch-Verhältnis führte und noch weniger eine Deduktion des Kohlenhydrates zuließ. Der Vergleich mit einem Referenzspektrum von synthetischem  $\beta$ CGlc (Abb. A.10, S. 138) zeigte eine sehr gute Übereinstimmung in der chemischen Verschiebung der Signale – speziell der Protonen H-1 ( $\delta_H = 4,35$  ppm)<sup>6</sup> und der H-6b/H-6a ( $\delta_H = 3,80/3,73$  ppm)<sup>7</sup>, die die Glycosylierung belegen.

#### 4.1.1.6 Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid (CGal)

Vom polarsten (untersten) der vier Glycolipide (Abb. 4.1, S. 66) wurde analog eine GLC/MS-Analyse durchgeführt, wobei das Chromatogramm Signale von Galactose, Cholesterol und drei Fettsäuren (16:0, 50,0 % der FA; 18:0, 43,3 % der FA; *cis*- $\Delta^9$ -18:1, 6,7 % der FA) aufwies. Das Gesamtintegral der Fettsäuren lag allerdings – zwischen den Präparationen schwankend – nur im einstelligen Prozentbereich verglichen mit dem in ACGal<sup>8</sup> (s. 4.1.1.3, S. 67), so dass von einer Kontamination auszugehen war. Die gemessenen NMR-Spektren ähnelten denen von ACGal mit dem wesentlichen Unterschied, dass die Integrale der Fettsäuren ( $\delta_H \approx 1,20$  ppm) geringer waren und keine

<sup>2</sup>lt. Integral 43,7 % der beiden Hexosen, d. h. Verhältnis von Gal zu Glc 1:0,78

<sup>3</sup>Da Pyranoside gegenüber Furanosiden aufgrund der bisherigen Daten deutlich wahrscheinlicher waren, wurden letztere nicht berücksichtigt.

<sup>4</sup>Verhältnis von MGalD zu analysierendem Glycolipid aufgrund der Integrale 1:0,84

<sup>5</sup>eventuell „Füllstoffe“ von den DC oder Rückstände der Lösungsmittel

<sup>6</sup>in Glc des ACGlc (s. 4.1.2.4, S. 74) liegt H-1 bei  $\delta_H = 4,29$  ppm

<sup>7</sup>in der 6-O-acylierten Glc des ACGlc sind diese auf  $\delta_H = 4,28/4,19$  ppm tieffeldverschoben

<sup>8</sup>im Verhältnis zu dem Integral von Galactose

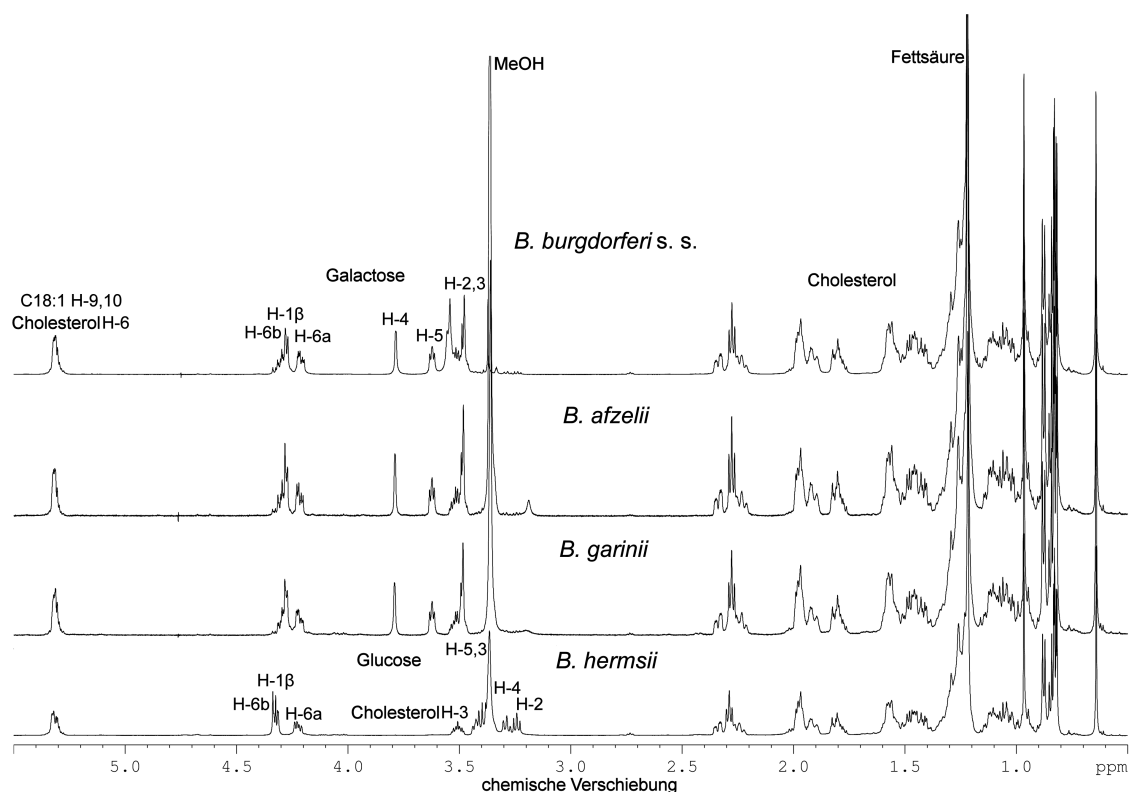


Abbildung 4.3: Vergleichende  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des ACGal/ACGlc der vier Borrelienspezies. Die ACG-Fractionen von *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. hermsii* wurden in  $\text{CHCl}_3\text{-}d/\text{MeOH-}d_4$  9:1 (v/v) gelöst und  $^1\text{H}$ -Spektren mit einem 600 MHz NMR-Spektrometer gemessen. Die Verschiebung ist bezogen auf internes TMS und die Zuordnung der Signale erfolgte aufgrund der weiteren 1D- ( $^{13}\text{C}$ , DEPT 135) und 2D-Spektren (COSY, HMQC, HMBC). (s. 3.2.4, S. 46)

Tieffeldverschiebung der Gal H-6a/H-6b Protonen zu beobachten war. Dies deutete auf ein nichtacyliertes Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid hin. Die Interpretation der NMR-Spektren stimmte vollständig mit den publizierten Daten (Schröder u. a., 2003) überein. Die MALDI-TOF-Messung mit der gefundenen Masse von  $m/z = 547,397$  ( $[\text{M-H}]^-$ ) bestätigte diese postulierte Struktur mit der exakten Masse von  $m = 548,408$  Da.

#### 4.1.1.7 Neutrallipide

Unter den Gesamtlipiden von Bbu befanden sich zwei sehr unpolare Lipide (Abb. 4.4, S. 72), die in Anteilen von nur 2-3 % anwesend waren (s. Tab. 4.2, S. 73). Nach der säulenchromatographischen Trennung ergaben erste GLC/MS-Analysen für beide Substanzen Signale von Cholesterol und zum Teil Fettsäuren, so dass die Gesamtlipide mit gekauften Standards von Cholesterol, Cholesteryloleat und weiteren Lipiden auf den DC verglichen wurden (s. 3.2.1.1, S. 44).

**Cholesterylester** Auf analytischen DC zeigte sich, dass das unpolarste angefärbte Lipid in unterschiedlichen Laufmitteln<sup>9</sup> die gleichen  $R_f$ -Werte aufwies wie gekauftes Cholesteryloleat. Auch in den aus dem Kulturmedium (BSK-H) extrahierten Lipiden

<sup>9</sup> $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85:15, Hexan/EE 1:1 und Hexan/Diethylether/AcOH 70:30:10

gab es einen Substanzspot mit dem gleichen  $R_f$ -Wert. Ohne weitere Analysen wurde dieses Lipid als Cholesterylester betrachtet.

**Cholesterol** Das zweitpolarste der gefundenen Gesamtlipide (Abb. 4.4, S. 72) lief auf den DC mit verschiedenen Laufmitteln vollkommen gleich wie freies Cholesterol. Ebenso fand sich auf den DC mit Lipiden, die aus BSK-H extrahiert wurden, ein Substanzspot mit diesem  $R_f$ -Wert. Bei diesem Lipid handelt es sich somit um freies Cholesterol.

#### 4.1.1.8 Phospholipide

Die Analyse der Gesamtlipide von Bbu mittels Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:4 (v/v/v) zeigte zwei deutliche Spots in dem Bereich der Phospholipide (s. 4.4, S. 72). Nach Isolierung mittels Säulenchromatographie wurden die Strukturen durch Vergleich mit Referenzsubstanzen auf den DC identifiziert und durch chemische Strukturanalysen bestätigt.

**Phosphatidylglycerol** Das als Phosphatidylglycerol (PG) identifizierte Lipid lief auf den DC identisch mit einer PG-Referenz. Bei den chemischen Analysen zeigte die GLC/MS-Analyse Glycerol und als Fettsäuren Palmitinsäure (91 % der FA) und Ölsäure (9 % der FA). Für die NMR-Messungen ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, TOCSY, HMQC,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{31}\text{P}$ - $^1\text{H}$ -HMQC) wurde die Probe in  $\text{DMSO}-d_6$  gelöst. Alle Signale ließen sich eindeutig wie folgt zuordnen:  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{DMSO } \delta=2,51$ ) = 5,38 (s, 1,6H; FA 18:1 H-9/-10), 5,09 (s, 1H; Gro H-2), 4,29 (m, 1,2H; Gro H-1b), 4,10 (m, 1,7H; Gro H-1a), 3,78 (s, 2H; Gro H-3), 3,70 (m, 1H; Gro' H-1b), 3,64 (m, 1H; Gro' H-1a), 3,50 (s, 1,4H; Gro' H-2), 3,31 (s, 1H; Gro' H-3), 2,27 (m, 4,4H; FA H-2), 1,98 (m, 3,5H; FA 18:1 H-10/-11), 1,50 (m, 5H; FA H-3), 1,25 (m, 4H; FA H- $\omega$ -1), 1,23 (m, 48H; FA H-4...), 1,22 (m, 4H; FA H- $\omega$ -2), 0,86 (s, 6H; Fa H- $\omega$ ),  $\delta_{\text{C}}$  ( $\text{DMSO } \delta=40,5$ ) = 174,2 (FA C-1), 130,3 (FA 18:1 C-9/-10), 71,9 (Gro' C-2), 71,1 (Gro C-2), 66,6 (Gro' C-1), 63,7 (Gro C-3), 63,1 (Gro C-1), 63,0 (Gro' C-3), 34,2 (FA C-2), 31,9 (FA C- $\omega$ -2), 29,4 (FA C-4...), 27,2 (FA 18:1 C-10/-11), 25,1 (FA C-3), 22,7 (FA C- $\omega$ -1), 15 (FA C- $\omega$ ). Die Bestätigung der Struktur erfolgte mittels MALDI-TOF-MS im Negativ-Modus, wobei die gefundenen Massen  $m/z = 721,504$  (2 x 16:0,  $\text{C}_{38}\text{H}_{75}\text{O}_{10}\text{P}$ , exakte Masse = 722,510 Da) und  $m/z = 747,518$  (1 x 16:0, 1 x 18:1,  $\text{C}_{40}\text{H}_{77}\text{O}_{10}\text{P}$ , exakte Masse = 748,525 Da) den berechneten  $[\text{M-H}]^-$  entsprachen.

**Phosphatidylcholin** Das zweite Phospholipid, das als Phosphatidylcholin (PC) identifiziert wurde, lief auf den DC identisch mit einem PC-Standard. Die Fettsäureverteilung war laut GLC/MS-Analyse 94 % Palmitinsäure und 6 % Ölsäure. Die NMR-Messungen wurden wie bei PG durchgeführt und die Signale wie folgt zugeordnet:  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{DMSO } \delta=2,51$ ) = 5,33 (s, 2,7H; FA 18:1 H-9/-10), 5,08 (s, 1H; Gro H-2), 4,30 (m, 1H; Gro H-1b), 4,11 (m, 2H; Gro H-1a), 4,05 (m, 2H; Gro  $\text{OCH}_2$ ), 3,73 (m, 2H; Gro H-3), 3,51 (s, 2H; Gro  $\text{NCH}_2$ ), 3,14 (Gro  $\text{NMe}_3$ ), 2,28 (m, 5H; FA H-2), 1,99 (m, 6,1H; FA 18:1 H-10/-11), 1,51 (m, 6H; FA H-3), 1,25 (FA H- $\omega$ -1), 1,23 (FA H- $\omega$ -2), 1,18 (m; FA H-4...), 0,86 (s, 8H; Fa H- $\omega$ ),  $\delta_{\text{C}}$  ( $\text{DMSO } \delta=40,5$ ) = 174,3 (FA C-1), 130,4 (FA 18:1 C-9/-10), 71,2 (Gro C-2), 66,2 (Gro  $\text{NCH}_2$ ), 63,3 (Gro C-3), 63,2 (Gro C-1), 59,0 (Gro  $\text{OCH}_2$ ), 53,8 (Gro  $\text{NMe}_3$ ), 34,1 (FA C-2), 31,9 (FA C- $\omega$ -2), 29,4 (FA C-4...), 27,2 (FA 18:1 C-10/-11), 25,1 (FA C-3), 22,7 (FA C- $\omega$ -1), 14,6 (FA C- $\omega$ ).

### 4.1.2 Vergleichende Analyse der Gesamtlipide von vier Borreliensarten

Zusätzlich zur Strukturanalyse der Lipide von *B. burgdorferi* s. s. (s. 4.1) wurden auch *B. afzelii* (Baf), *B. garinii* (Bga) und *B. hermsii* (Bhe) im BSK-H Medium kultiviert, die Zellen geerntet und lyophilisiert (s. 3.1.2). Es folgte die qualitative Nachweis der einzelnen Lipide auf Dünnschichtchromatogrammen (s. 4.1.2.1) und die quantitative Bestimmung von deren Massen nach Säulenchromatographien (s. 4.1.2.2). Die chemischen Strukturen der acylierten Cholesterylglycoside (ACG) wurden eingehend mit GLC/MS, NMR und MALDI-MS untersucht (s. 4.1.2.3 u. 4.1.2.4).

#### 4.1.2.1 Nachweis der Lipide auf Dünnschichtchromatogrammen

Die Butanolextraktionen ergaben für Baf 11,3 mg, für Bga 16,6 mg und für Bhe 25,0 mg Gesamtlipide. Davon sowie von der Butanolphase von Bbu wurden gleiche Mengen auf ein DC aufgetragen und diese zur Auftrennung der Glycolipide in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85:15 sowie der polaren Lipide in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:4 entwickelt und mit Mostain gefärbt (Abb. 4.4).

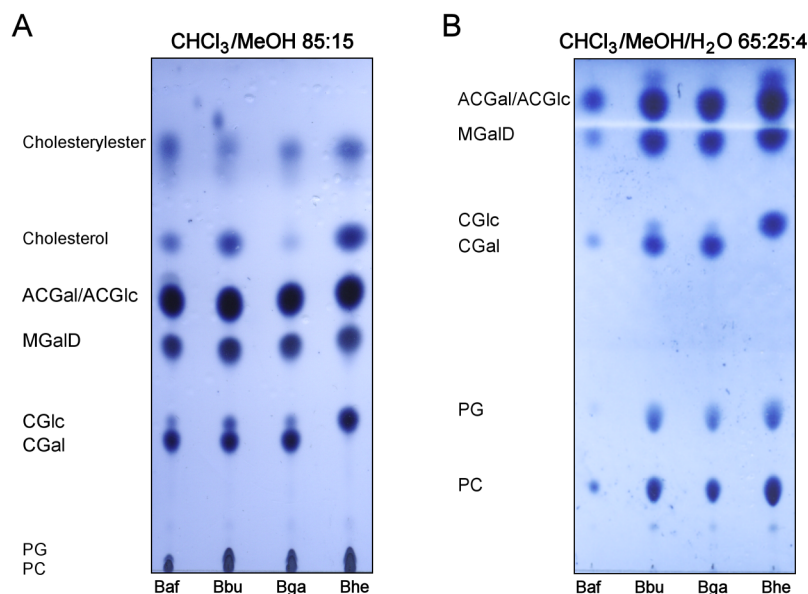


Abbildung 4.4: Dünnschichtchromatogramme der Lipide von *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. hermsii*. Nach einer Butanolextraktion wurden 10  $\mu\text{l}$  der Gesamtlipide der vier Borrelienspezies auf DC aufgetragen. Diese wurden in A  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85:15 (v/v), B  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  65:25:4 (v/v/v) entwickelt und mit Mostain gefärbt (s. 3.2.1.1, S. 44).

Alle gefärbten Spots der Gesamtlipide von Bga und Baf liefen mit denselben  $R_f$ -Werten wie die Lipide von Bbu, wohingegen die relative Intensität der Färbung bei einzelnen Spots variierte (Abb. 4.4). Ohne weitere chemische Untersuchungen kann man daraus schließen, dass die Gesamtlipide aller drei eng verwandten Arten mit hoher Wahrscheinlichkeit identisch sind. Nur für das wichtigste Glycolipid – das hier im Fokus stehende ACGal – wurde dies mittels chemischer Strukturanalysen bewiesen (s. 4.1.2.3, S. 74).

Die Spots von Bbu und Bhe unterschieden sich jedoch bei den Cholesterylglycosiden in ihren  $R_f$ -Werten – mehr bei dem nicht acylierten und weniger bei dem acylierten (Abb. 4.4). Bei Bhe gab es keinen Spot für CGal. Dafür war der Spot auf Höhe von



CGlc so groß wie die CGal-Spots der anderen Arten. Daraus kann man ableiten, dass Bhe kein CGal, sondern stattdessen nur CGlc synthetisiert. Ähnlich lief der mit ACGal von Bbu korrespondierende Spot bei Bhe etwas höher als das ACGal. Die Annahme, dass es sich um acyliertes CGlc (ACGlc) handelt, konnte an anderer Stelle durch eine chemische Strukturanalyse belegt werden (s. 4.1.2.4, S. 74). Die restlichen Spots von Bhe stimmten in ihren  $R_f$ -Werten exakt mit denen von Bbu überein.

#### 4.1.2.2 Anteile der einzelnen Lipide

Die vollständige Trennung der Gesamtlipide von Bbu, Baf, Bga und Bhe erfolgte mittels Säulenchromatographie. Die gesammelten Fraktionen der einzelnen Lipide wurden gepoolt, einrotiert und ausgewogen (s. 4.1.1.2, S. 66). Die Zusammensetzung der nicht reinen Lipidpools wurde anhand der DC abgeschätzt und die anteiligen Massen den reinen Substanzen zugeschlagen. Die Phospholipide konnten mit diesem Verfahren nicht hinreichend separiert werden (s. Tab. 4.2).

	Gesamtlipidanteil in %				Trockengewichtsanteil in %			
	Bbu	Baf	Bga	Bhe	Bbu	Baf	Bga	Bhe
Cholesterylester	2	2	3	3	0,5	0,5	0,9	0,9
Cholesterol	2	2	0	4	0,5	0,5	0	1,2
ACGal/ACGlc	23	23	19	23	6,1	5,7	5,4	6,6
MGalD	13	14	13	9	3,5	3,5	3,7	2,6
CGlc	3	2	2	7	0,8	0,5	0,6	2,0
CGal	10	12	11	0	2,7	3,0	3,1	0
PG & PC	47	43	48	54	12,5	10,6	13,7	15,6
alle Lipide					26,7	24,7	28,6	28,8

Tabelle 4.2: **Anteile der einzelnen Lipide an den Gesamtlipiden und dem Trockengewicht der Borrelien.** Die Gesamtlipide wurden mit einer Butanolextraktion isoliert und mittels der Säulenchromatographie fraktioniert. Fraktionen mit den gleichen Lipiden wurden vereinigt, eingedampft und ausgewogen (s. 4.1.1.2, S. 66). PG = Phosphatidylglycerol; PC = Phosphatidylcholin

Wie schon auf den DC zu sehen war (Abb. 4.4), unterschied sich die Verteilung der Gesamtlipide in Baf und Bga nicht grundsätzlich von der in Bbu. Bei Baf machten die Glycolipide etwas über die Hälfte der Lipide aus, während die Phospholipide 43 % darstellten. ACGal war mit 23 % das häufigste Glycolipid, gefolgt von MGalD und CGal. Bei Bga waren die Anteile von Glycolipiden (45 %) und Phospholipiden (48 %) fast gleich und ACGal (19 %) war wieder das häufigste Glycolipid. Bei Bhe waren mehr als die Hälfte der Gesamtlipide Phospholipide (54 %), wobei das Glycolipid ACGlc trotzdem knapp ein Viertel der Lipide (23 %) ausmachte. Der Anteil von CGlc bei Bhe (7 %) war nur halb so groß wie der Anteil von CGal und CGlc in den LB-Borrelien (13-14 %).

Der ermittelte Anteil der Gesamtlipide am Trockengewicht der Borrelien lag zwischen 25 und 29 %. Dadurch machten ACGal bzw. ACGlc etwa 6 % der Borrelien (ohne Wasser) aus, während der Anteil von Phosphatidylglycerol und Phosphatidylcholin zusammen bei 11-16 % lag (s. Tab. 4.2). Diese relativen Angaben berücksichtigen nicht, dass Bhe morphologisch viel größer ist als Bbu und somit die absoluten Lipidmassen für eine *B. hermsii*-Zelle deutlich über der einer *B. burgdorferi*-Zelle liegen.

#### 4.1.2.3 Nachweis von Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ACGal) in *B. afzelii* und *B. garinii*

Die gepoolten ACG-Fractionen der Säulenchromatographie von Bbu, Baf und Bga wurden einer Methanolyse und Peracetylierung unterworfen und die Proben in eine GLC/MS-Anlage injiziert. Die Signale in den Chromatogrammen von Baf und Bga glichen denen von Bbu vollständig – bei allen wurde als Kohlenhydrat Galactose, als dominante Fettsäuren Palmitin- und Ölsäure sowie als Steroid Cholesterol gefunden (Abb. 4.2, S. 68). Die genaue Verteilung der Fettsäuren aufgrund der Integrale war die folgende: für Baf 66 % Palmitin-/34 % Ölsäure und für Bga 48 % Palmitin-/48 % Öl-/4 % Stearinsäure. Die Signale der gemessenen NMR-Spektren von ACG aus Baf (Abb. A.2, S. 134) und Bga (Abb. A.3, S. 134) stimmten ebenfalls mit denen von ACGal aus Bbu vollständig überein (Vergleichende  $^1\text{H}$ -Spektren s. Abb. 4.3, S. 70). Schließlich passten auch die MALDI-Massen von  $m/z = 785,636$  (Baf) und  $785,637$  (Bga) für das Palmitoyl-CGal ( $\text{C}_{49}\text{H}_{86}\text{O}_7$ , exakte Masse: 786,637 Da) bzw.  $m/z = 811,653$  (Baf) und  $811,654$  (Bga) für das Oleoyl-CGal ( $\text{C}_{51}\text{H}_{88}\text{O}_7$ , exakte Masse: 812,653 Da) als  $[\text{M-H}]^-$  zu den postulierten Strukturen. Damit ist eindeutig, dass es sich bei den ACG-Strukturen in *B. afzelii* und *B. garinii* ebenfalls um Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ACGal) mit den Fettsäuren Palmitin- und Ölsäure handelt.

#### 4.1.2.4 Nachweis von Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (ACGlc) in *B. hermsii*

Aus den butanolextrahierten Gesamtlipiden von *B. hermsii* wurde säulenchromatographisch das ACG gewonnen und zuerst mittels GLC/MS analysiert (s. 3.2.3, S. 45). Im Gaschromatogramm (Abb. 4.2, S. 68) war erkennbar, dass dieses ACG als Kohlenhydrat nur Glucose und keine Galactose aufweist. Bei den Fettsäuren kamen drei in großen Anteilen vor: Ölsäure (44 % der FA), Palmitinsäure (21 %) <sup>10</sup> und Stearinsäure (33 %), während Palmitoleinsäure nur in sehr kleinem Anteil (2 %) nachweisbar war (s. Tab. 3.1, S. 45). Die Signale des Cholesterols und seiner GLC-bedingten Zersetzungsprodukte waren identisch mit denen des ACGal. Es wurden eindimensionale –  $^1\text{H}$  (Abb. A.4, S. 135),  $^{13}\text{C}$  (Abb. A.5, S. 135) – und zweidimensionale – COSY, HMQC (Abb. A.6, S. 136) und HMBC (Abb. A.7, S. 136) – NMR-Experimente durchgeführt (s. 3.2.4, S. 46) und die detektierten Signale vollständig zugeordnet (s. Tab. 4.3, S. 75). Im  $^1\text{H}$ -Spektrum waren übereinstimmend mit dem GLC/MS drei Signalbereiche zu erkennen: 0,7-2,3 ppm mit der Mehrzahl der Steroid- und Fettsäuresignale, 3,2-4,3 ppm mit den Kohlenhydratsignalen und dem H-3 des Cholesterols sowie bei 5,3 ppm mit den Signalen der Doppelbindungen des Steroids und der Ölsäure. Darüber hinaus belegten die Integrale, dass das Verhältnis Kohlenhydrat zu Steroid zu Fettsäure etwa 1:1:1 betrug.

Bei dem Steroid handelte es sich aufgrund der Signale selbst, dem Vergleich mit Referenzspektren von Cholesterol unter identischen Bedingungen sowie in vollkommener Übereinstimmung mit den publizierten Daten (Wilson u. a., 1996) zweifelsfrei um Cholesterol (Cho). Beispielsweise sind bei einem  $\Delta^5$ -Sterol für die Hydroxylgruppe das H-3 ( $\delta_{\text{H}} = 3,5$  ppm) und für die  $\Delta^5$ -Doppelbindung das H-6 ( $\delta_{\text{H}} = 5,3$  ppm) und die C-5 ( $\delta_{\text{C}} = 140,3$  ppm) sowie C-6 ( $\delta_{\text{C}} = 121,9$  ppm) sehr charakteristisch. Zwei korrespondierende

<sup>10</sup>Öl- und Palmitinsäure sind die wesentlichen Fettsäuren im ACGal von *B. burgdorferi*.

	Proton	$\delta$ $^1\text{H}$ [ppm]		Carbon	$\delta$ $^{13}\text{C}$ [ppm]	
<b>Glucose</b>	H-1 $\beta$	4,29	$J_{1,2} = 7,8$ Hz	C-1	101,17	
	H-2	3,20	$J_{2,3} = 8,4$ Hz	C-2	73,28	
	H-3	3,36		C-3	76,27	
	H-4	3,25	$J_{4,5} = 9,2$ Hz	C-4	70,18	
	H-5	3,38	$J_{5,6a} = 6,6$ Hz	C-5	73,64	
	H-6a	4,19	$J_{6a,6b} = 12,0$ Hz	C-6	63,55	
	H-6b	4,28	$J_{6b,5} = 2,4$ Hz			
<b>Cholesterol</b>	H-1a	0,98		C-1	37,15	
	H-1b	1,77				
	H-2a	1,86		C-2	29,36	
	H-2b	1,53				
	H-3	3,47		C-3	79,47	
	H-4a	2,30		C-4	38,61	
	H-4b	2,20				
	-	-		C-5	140,26	
	H-6	5,27		C-6	121,88	
	H-7a	1,45		C-7	31,78	
	H-7b	1,90				
	H-8	1,38		C-8	31,73	
	H-9	0,84		C-9	50,05	
	-	-		C-10	36,56	
	H-11a	1,41		C-11	20,92	
	H-11b	1,36				
	H-12a	1,10		C-12	39,63	
	H-12b	1,94				
	-	-		C-13	42,17	
	H-14	0,90		C-14	56,62	
	H-15a	1,46		C-15	24,10	
	H-15b	0,99				
	H-16a	1,75		C-16	28,05	
	H-16b	1,17				
	H-17	1,01		C-17	56,04	
	H-18	0,61		C-18	11,65	
	H-19	0,93		C-19	19,12	
H-20	1,29		C-20	35,63		
H-21	0,83		C-21	18,52		
H-22R	1,26		C-22	36,03		
H-22S	0,89					
H-23R	1,26		C-23	23,67		
H-23S	1,07					
H-24	1,06		C-24	39,35		
H-24	0,97					
H-25	1,43		C-25	27,83		
H-26	0,77		C-26	22,33		
H-27	0,73		C-27	22,50		
<b>Fettsäure 16:0</b>	-	-		C-1	174,26	
	H-2	2,25		C-2	34,11	
	H-3	1,52		C-3	24,78	
	H-4 ...	1,18		C-4	29,57	... 29,03
	H-15	1,22		C-15	22,58	
	H-16	0,79		C-16	13,87	
<b>Fettsäure 18:1</b>	H-8, H-11	1,93		C-8, C-11	27,04	
	H-9, H-10	5,28		C-9, C-10	129,87	129,55
	H-17	1,22		C-17	22,58	
	H-18	0,79		C-18	13,87	

Tabelle 4.3: Chemische Verschiebungen und Glucose-Kopplungskonstanten von Cholesteryl-6-O-acyl- $\beta$ -D-glucopyranosid aus *B. hermsii* in  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  9:1 [600 MHz für  $^1\text{H}$ ,  $\delta_{\text{H}}$  (TMS) = 0,00 ppm, 90,6 MHz für  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 77,00 ppm, 300 K]

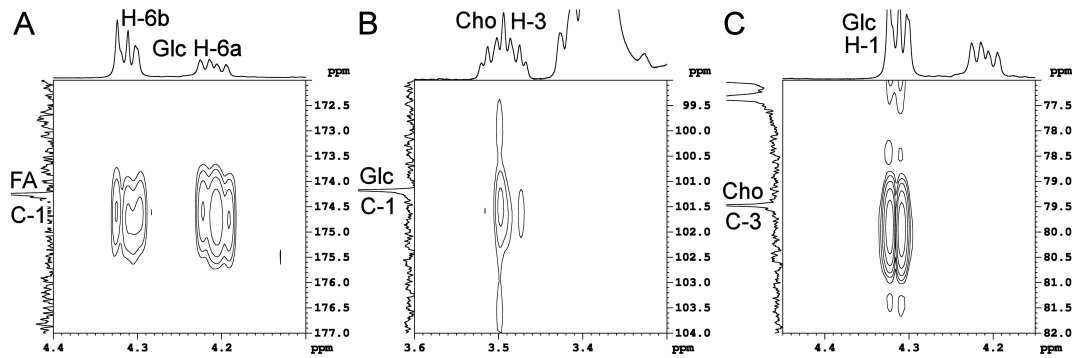


Abbildung 4.5: Ausschnitte aus dem HMBC-NMR-Spektrum (Abb. A.7, S. 136) von ACGlc aus *B. hermsii*. Das ACGlc wurde in  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  9:1 gelöst und ein HMBC-Experiment durchgeführt [für  $^1\text{H}$ : 600 MHz,  $\delta_{\text{H}}$  (TMS) = 0,00 ppm, für  $^{13}\text{C}$ : 90,6 MHz,  $\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 77,0 ppm, 300 K] (s. 3.2.4, S. 46). Die Ausschnitte zeigen die Kreuzsignale **A** des C-1 der Fettsäure mit den beiden H-6 Protonen der Glucose, **B** des C-1 der Glucose mit dem H-3 des Cholesterols und **C** des C-3 des Cholesterols mit dem H-1 der Glucose.

Kreuzsignale im HMBC-Spektrum bei  $\delta_{\text{H}} = 3,5$  ppm (Cho H-3) und  $\delta_{\text{C}} = 101,2$  ppm (Kohlenhydrat C-1) (Abb. 4.5B, S. 76) bzw. bei  $\delta_{\text{H}} = 4,3$  ppm (Kohlenhydrat H-1) und  $\delta_{\text{C}} = 79,5$  ppm (Cho C-3) (Abb. 4.5C) bewiesen die Bindung der 3-OH-Gruppe des Sterols an das anomere Zentrum des Kohlenhydrates und lassen somit auf ein Cholesterylglucosid schließen.

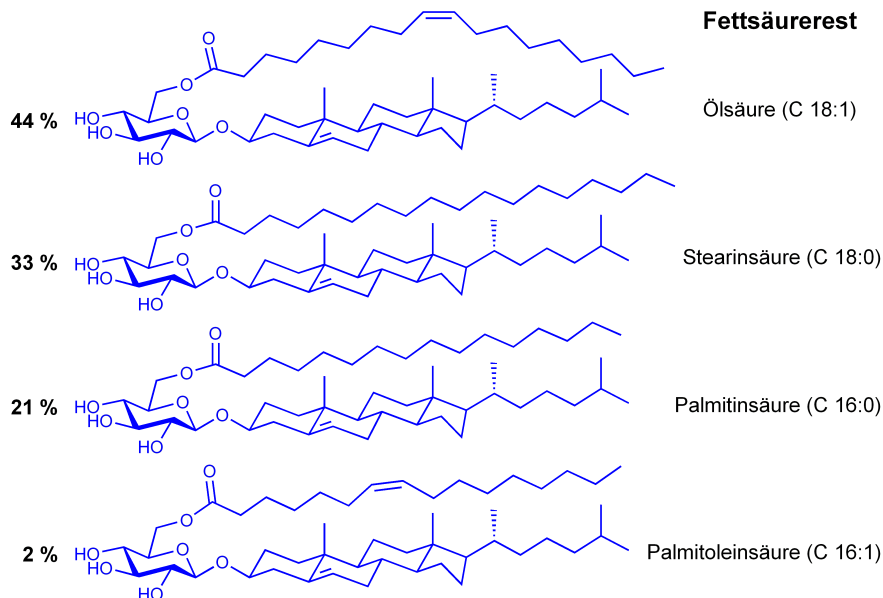


Abbildung 4.6: Strukturformeln der Cholesteryl-6-O-acyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (ACGlc) in *B. hermsii*. Die chemische Struktur der ACG-Fraktion von *B. hermsii* wurde mittels GLC/MS, 1D- und 2D-NMR sowie MALDI-TOF als ACGlc identifiziert. Die genaue Verteilung der Fettsäuren konnte aus den Integralen der entsprechenden Signale im Gaschromatogramm errechnet werden. (s. 3.2.3, S. 45)

Die chemische Verschiebung des anomeren Protons des Kohlenhydrates ( $\delta_{\text{H}} = 4,29$  ppm) und dessen Kopplungskonstante ( $J_{1,2} = 7,8$  Hz) im  $^1\text{H}$ -Spektrum belegen eine  $\beta$ -Konfiguration, während die Kreuzsignale der zweidimensionalen Spektren (CO-SY, HMBC) die Pyranoseform implizieren. Der Vergleich der gemessenen Verschiebungen und Kopplungskonstanten der Ringprotonen mit publizierten Referenzdaten von Methyl-D-Hexopyranosiden im  $^1\text{H}$  (Bock und Thøgersen, 1982) und  $^{13}\text{C}$  (Bock und Pe-

dersen, 1983) beweisen zusätzlich, dass es sich eindeutig um ein  $\beta$ -D-Glucopyranosid handeln muss. Die Verknüpfung mit der Fettsäure konnte eindeutig durch HMBC-Kreuzsignale des C-1 der Fettsäure mit den H-6b/H-6a der Glucose (Abb. 4.5A, S. 76) als 6-*O*-Acylierung der Glucose identifiziert werden. Weiter untermauert wird dies durch die markante  $^1\text{H}$  Tieffeldverschiebung der H-6a/H-6b Protonen der Glucose von  $\delta_{\text{H}} = 3,80/3,73$  ppm im nichtacylierten Cholesterylglucosid (Abb. A.10, S. 138) auf  $\delta_{\text{H}} = 4,28/4,19$  ppm in diesem acylierten Cholesterylglucosid (Abb. A.4, S. 135).

In MALDI-TOF-Messungen (s. 3.2.5.1, S. 47) wurden Massen von  $m/z = 785,637$  und  $811,653$  gefunden, die den pseudomolekularen Ionen  $[\text{M-H}]^-$  der ACGlc-Strukturen mit Palmitinsäure ( $\text{C}_{49}\text{H}_{86}\text{O}_7$ , exakte Masse: 786,637 Da) und Ölsäure ( $\text{C}_{51}\text{H}_{88}\text{O}_7$ , exakte Masse: 812,653 Da) entsprechen. Damit konnte das ACG von *B. hermsii* in Übereinstimmung aller Analysen zweifelsfrei als Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-glucopyranosid mit einer Mikroheterogenität im Fettsäureanteil identifiziert werden (Abb. 4.6, S. 76).

## 4.2 Glycosyltransferaseaktivität

Zum Nachweis der Aktivität einer Cholesterol- $\beta$ -Glycosyltransferase wurde ein Borrelienlysate mit radioaktiven und nichtradioaktiven Glycosyldonoren und -akzeptoren inkubiert und die Radioaktivität der gebildeten Lipide gemessen (s. 3.1.19, S. 42).

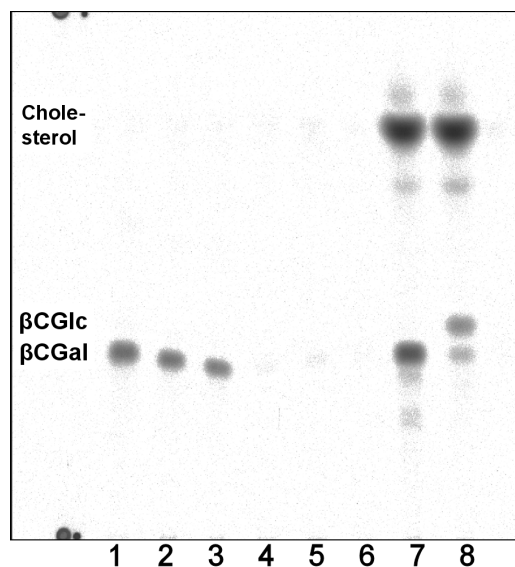


Abbildung 4.7: Radiogramm der Cholesterol- Glycosyltransferaseaktivität in Borrelienlysate. Zu je  $20 \mu\text{l}$  eines Borrelienlysates wurden  $5 \mu\text{l}$  der folgenden Glycosylakzeptoren sowie  $10 \mu\text{l}$  des Glycosyldonors gegeben und 90 min bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert.

Akzeptor	Donor
1 -	UDP- $^{14}\text{C}$ Galactose
2 Cholesterol	UDP- $^{14}\text{C}$ Galactose
3 Diacylglycerol	UDP- $^{14}\text{C}$ Galactose
4 -	UDP- $^{14}\text{C}$ Glucose
5 Cholesterol	UDP- $^{14}\text{C}$ Glucose
6 Diacylglycerol	UDP- $^{14}\text{C}$ Glucose
7 $^{14}\text{C}$ Cholesterol	UDP-Galactose
8 $^{14}\text{C}$ Cholesterol	UDP-Glucose

Die Gesamtlipide wurden extrahiert, auf ein DC aufgetragen, in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  80:20 entwickelt und die Radioaktivität gemessen (s. 3.1.19, S. 42).

Durch zugesetztes radioaktives UDP-Gal wurde radioaktives CGal gebildet (1-3); sogar mit dem im Lysat vorhandenen Cholesterol (1). Eine Acylierung des radioaktiven CGal zum ACGal wurde nicht detektiert (1-3) – wohl wegen einer zu geringen Menge oder, weil die Lipase unter diesen Bedingungen nicht aktiv war. Ebenfalls wurde UDP-Gal nicht mit DAG zum MGalD umgesetzt (3). Ein Umsatz von radioaktivem UDP-Glc ( $1,4 \mu\text{M}$ ) zu radioaktivem CGlc konnte ebenfalls nicht detektiert werden (4-6) – vermutlich aufgrund zu geringer Menge, denn in (8) wurde die Reaktion grundsätzlich nachgewiesen. Radioaktives Cholesterol führte hingegen mit nichtradioaktivem UDP-Gal und UDP-Glc ( $500 \mu\text{M}$ ) zur Synthese von CGal (7) bzw. CGlc (8). Beide Male (7-8) fanden sich zwei kleine Spots ober- und unterhalb von Cholesterol, die eventuell ACGal (unter-

halb) und Cholesterylestern (oberhalb) entsprechen. Im Ansatz mit nichtradioaktivem UDP-Glc (8) wurde auch im Lysat vorhandenes UDP-Gal zum CGal umgesetzt. Die Radioaktivität von CGal (7) betrug 12 000 dpm, die von CGlc (8) 1900 dpm. Unter diesen Bedingungen sind somit eine oder mehrere Cholesterol- $\beta$ -Glycosyltransferasen aktiv, die 6,3-mal mehr UDP-Gal als UDP-Glc zu den entsprechenden Cholesterylglycosiden umsetzt.

### 4.3 Erkennung der Borrelienlipide durch das angeborene Immunsystem

An Zelllinien wurde untersucht, ob die Borrelienlipide vom angeborenen Immunsystem erkannt werden. Sowohl die Zellkultur als auch die Stimulation erfolgte in gepufferten, wässrigen Systemen. Für die Applikation der Lipide musste daher zuerst ein biokompatibles, organisches Lösungsmittel etabliert werden. In Vorversuchen konnte bestätigt werden, dass dabei DMSO und *tert*-BuOH/H<sub>2</sub>O als nicht zelltoxische Lösungsmittel in Frage kommen. Allerdings zeigte sich, dass DMSO in höheren Konzentrationen die Produktion von Zytokinen durch synthetische Lipopeptide hemmte, so dass mit Endkonzentrationen von kleiner als 0,5 % gearbeitet werden musste. Zusätzlich wurde vollständig ohne Lösungsmittel gearbeitet, indem die Lipide als Feststoff vorgelegt und darauf die Zellen ausgesät wurden.

#### 4.3.1 Aktivierung von Makrophagen

Makrophagen verfügen über eine vollständige Ausstattung an Toll-like-Rezeptoren (TLR). Alle Lipidpools der säulenchromatographischen Trennung der Gesamtlipide von *B. burgdorferi* s. s. (s. 4.1.1.2, S. 66) wurden in DMSO gelöst. Zur Stimulation wurden die Lösungen zu der RAW 264.7-Zelllinie pipettiert (Abb. 4.8A) oder in den Mikrotiterplatten vorgelegt und das Lösungsmittel verdampft (Abb. 4.8B). Nach Inkubation der Zellen wurden TNF- $\alpha$  und IL-6 mittels ELISA gemessen (s. 3.1.7 und 3.1.8, S. 34).

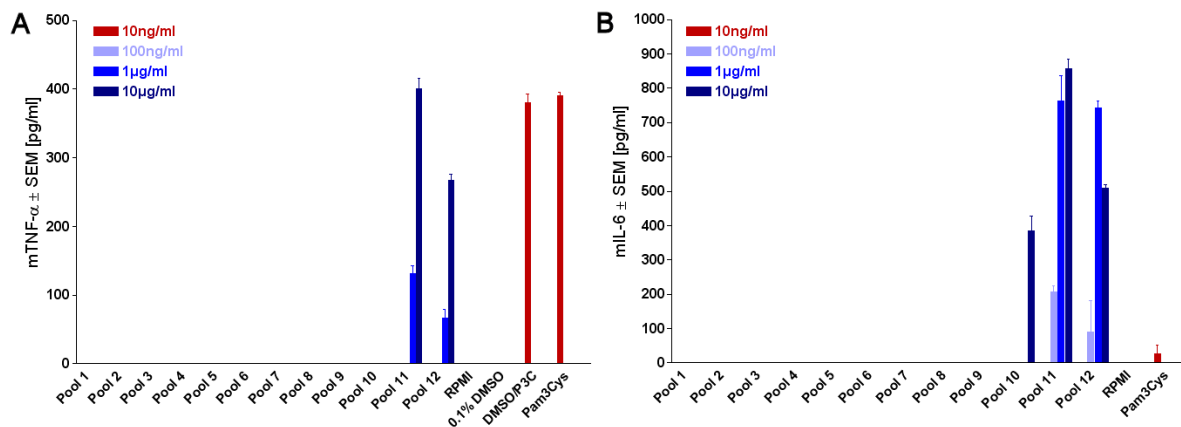


Abbildung 4.8: Zytokinausschüttung nach Stimulation von RAW-Zellen mit Borrelienlipiden. **A** In Mikrotiterplatten wurden 25 000 RAW-Zellen ausgesät, mit den Lipidpools (s. 4.1.1.2, S. 66) stimuliert und nach 8 h TNF- $\alpha$  gemessen. **B** Die Lipidpools wurden in die Platten pipettiert, im Vakuum getrocknet, 25 000 RAW-Zellen ausgesät und nach 16 h IL-6 gemessen.

Selbst mit hohen Konzentrationen von 0,1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  wies keiner der Pools 1-9, die die unpolaren Lipide und die Glycolipide umfassten, eine biologische Aktivität in Makrophagen auf. Der Pool 10 mit den Phospholipiden zeigte eine leichte Aktivität. Die Pools 11-12, die mit hohem Anteil polarer Lösungsmittel eluiert wurden und Reste der Phospholipide und den Nachlauf enthielten, wiesen dagegen eine deutliche Aktivität auf (Abb. 4.8).

#### 4.3.1.1 Inaktivität von CGlc

In weiteren Stimulationen wurde untersucht, ob speziell CGlc von Makrophagen erkannt wird. Es wurden CGlc von *B. burgdorferi* s. s. und *B. hermsii* aufgereinigt, in *tert*-BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und RAW-Zellen mit 0,1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  stimuliert. Die Messung von TNF- $\alpha$  und IL-6 ergab, dass CGlc diese Zellen nicht aktiviert (ohne Abb.).

### 4.3.2 TLR-2 Abhängigkeit

Die Wildtyp HEK-293-Zellen exprimieren die TLR entweder gar nicht oder dysfunktional. Durch eine Transfektion mit entsprechenden Plasmiden können somit gezielt TLR überexprimiert und die Zellaktivierung der von Wildtyp-Zellen gegenübergestellt werden. Zur Stimulation wurden die in DMSO gelösten Lipidpools (s. 4.1.1.2, S. 66) verwendet und nach der Inkubation in den Überständen IL-8 gemessen (s. 3.1.7, S. 34).

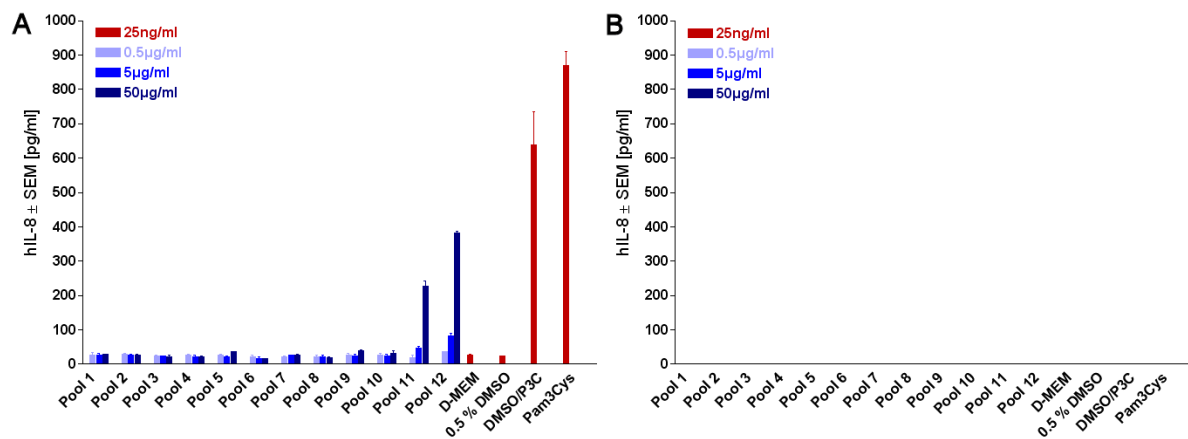


Abbildung 4.9: **Chemokinausschüttung nach Stimulation von HEK-Zellen mit Borrelienlipiden.** **A** In Mikrotiterplatten wurden 50 000 TLR-2-HEK-Zellen ausgesät, mit den Lipidpools (s. 4.1.1.2, S. 66) in DMSO stimuliert und nach 24 h IL-8 gemessen. [P3C = Pam3Cys] **B** 20 000 (wild-typ) HEK-Zellen wurden mit den Lipidpools stimuliert und nach 24 h IL-8 gemessen.

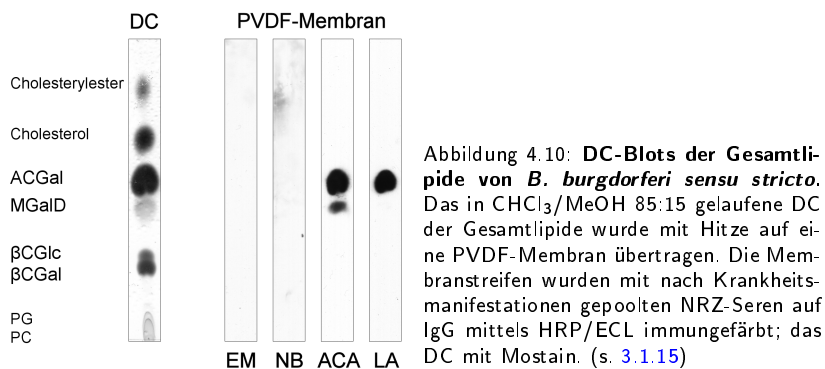
Die Experimente zeigten, dass in den Wildtypzellen keinerlei IL-8 produziert wurde (Abb. 4.9B), wobei die TLR-2-transfizierten Zellen auf die Stimulation reagierten (Abb. 4.9A). Jedoch wurde durch die Pools 1-10 kein IL-8 oberhalb der Basalaktivität induziert, während der Nachlauf (Pools 11-12) – wie die Kontrolle Pam<sub>3</sub>Cys – eine hohe IL-8-Ausschüttung bewirkten. Der mit polaren Lösungsmitteln eluierte Nachlauf beinhaltet somit TLR-2-Liganden. Bei diesen hydrophileren Fraktionen muss es sich jedoch nicht mehr um die analysierten Lipide handeln (Diskussion s. 5.3.6.1, S. 123).

## 4.4 Serologie mit natürlichen Borrelienlipiden

Es wurde mit Patientenseren ermittelt, ob während der LB Antikörper (AK) gegen die Borrelienlipide gebildet wurden. Zunächst mussten die antigenen Lipide mittels Blots der Gesamtlipide identifiziert werden (4.4.1). Danach wurden die nach Krankheitsmanifestation klassifizierten Einzelseren verschiedener Patientenkollektive auf die Reaktivität gegenüber den aufgereinigten Antigenen (AG) hin untersucht (4.4.2, 4.4.3). Mit den so gewonnenen Informationen über die Spezifität der Seren konnte ACGal chemisch-serologisch in insgesamt neun Mitgliedern der Familie *B. burgdorferi* s. l. nachgewiesen werden (s. 4.4.4).

### 4.4.1 Identifizierung der Lipid-Antigene

Für die Identifizierung von Lipid-AG gibt es mit dem DC-Blot ein Verfahren, bei dem ein Lipidgemisch zuerst auf einem DC aufgetrennt, dieses durch Hitze auf eine Membran geblottet und letztere schließlich immungefärbt wird. Mittels dieses Verfahrens wurden die Gesamtlipide von *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii* mit den nach Krankheitsmanifestationen (EM, NB, ACA, LA) gepoolten NRZ-Seren auf antigene Strukturen hin untersucht (s. 3.1.15).



Es konnten dabei in den Krankheitsstadien Erythema migrans (EM) und Neuroborreliose (NB) keine spezifischen AK gegen eines der Lipide beobachtet werden. Dagegen war das Glycolipid ACGal in den Spätstadien Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) und Lyme Arthritis (LA) als das dominante Glycolipid-AG zu erkennen. Darüber hinaus reagierten AK der ACA-Seren auch deutlich mit MGalD. Sowohl die Glycolipide CGal und CGlc als auch die Neutral- und Phospholipide wurden von keinem der Serenpools messbar erkannt. (Abb. 4.10 für *B. burgdorferi* s. s.; die anderen Spezies reagierten vergleichbar und sind nicht abgebildet.)

### 4.4.2 Bestimmung der Antikörperfrequenz in den einzelnen Krankheitsstadien

Die Anwesenheit von Serum-AK gegen ACGal wurde in verschiedenen Patientenkollektiven (NRZ und Virotech) mittels verschiedener Methoden (Dot-Blots und Line-Blots) untersucht. Die Patienten waren vorher jeweils klinisch und serologisch in die einzelnen Krankheitsmanifestationen klassifiziert worden (s. 3.1.11, S. 36).



#### 4.4.2.1 Dot-Blots mit den NRZ-Seren

In den NRZ-Patientenseren (s. 3.1.11.1, S. 36) wurden die AK gegen ACGal und auch MGalD mittels Dot-Blots nachgewiesen. Um die Spezifität der Anti-ACGal-AK einschätzen zu können, wurde ACGlc von *B. hermsii* mit verwendet. Als Positivkontrolle wurde ein Zellysate von *B. burgdorferi* s. s. benutzt. Konkret wurden also das Borrelienlysate, Lösungen der aufgereinigten Glycolipide ACGal von allen drei chemisch untersuchten *B. burgdorferi* (Bbu, Bga, Baf), MGalD von *B. burgdorferi* s. s. und ACGlc als Punkte auf Membranstreifen pipettiert. Die Membranen wurden mit den einzelnen LB-Patientenseren vom NRZ auf IgG-AK immungefärbt (s. 3.1.14.1, Abb. 3.1, S. 40). Die Ergebnisse der einzelnen Dot-Blots sind in Tab. 4.4 zusammengefasst.

Seren	Anzahl					Anteil (in %)				
	Gesund	EM	NB	ACA	LA	Gesund	EM	NB	ACA	LA
Seren	20	20	19	14	15					
Lysat	8	9	19	14	15	40	45	100	100	100
MGalD		2		3	3	0	10	0	21	20
ACGal Bbu		1	4	11	13	0	5	21	79	87
ACGal Bga		1	4	11	13	0	5	21	79	87
ACGal Baf		1	4	11	13	0	5	21	79	87
ACGlc Bhe				1		0	0	0	7	0

Tabelle 4.4: **Positive Anti-Glycolipid Reaktivität der NRZ-Seren bei einzelnen Krankheitsmanifestationen in Dot-Blots.** Borrelienlysate von Bbu, natives MGalD von Bbu, natives ACGal von Bbu, Bga und Baf sowie ACGlc von Bhe wurden auf Membranstreifen aufgebracht. Diese wurden mit den einzelnen Seren von Gesunden und Patienten unterschiedlicher Manifestationen inkubiert und die IgG mittels HRP/ECL immungefärbt. Als positiv wurden die Seren gewertet, bei denen auf den Filmen Signale zu sehen waren. (s. 3.1.14)

In dem durchgeführten serologischen Test zeigten 8 von 20 der Gesunden (40 %) eine Kreuzreaktion mit dem Borrelienlysate, wobei weder ACG noch MGalD von einem der Gesunden erkannt wurde. Die serologische Spezifität gegenüber den Glycolipiden betrug somit 100 %.

Gegen MGalD gerichtete AK wiesen insgesamt nur 8 von 68 Seren auf. Damit lag die Sensitivität hinsichtlich MGalD nur bei 12 %, wobei diese im Spätstadium (ACA, LA) mit 21 % (6 von 29) am größten ist (Tab. 4.4).

Im Gegensatz dazu lag die Gesamtsensitivität hinsichtlich ACGal bei 43 % (29 von 68 Patientenseren) mit einem Schwerpunkt im Spätstadium. Im Frühstadium (EM) hatten nur 5 % und im zweiten Stadium (NB) 21 % der Patienten IgG-AK gegen ACGal gebildet. Beachtlich war allerdings die Anwesenheit von Anti-ACGal IgG-AK in den Seren von 83 % (24 von 29) der Patienten im Spätstadium (ACA 79 %, LA 87 %). Zwischen den ACGal-Präparationen der einzelnen Arten (Baf, Bbu, Bga) gab es keine Unterschiede. Das Serum von einem ACA-Patienten wies überraschenderweise AK auf, die spezifisch nur an ACGlc von *B. hermsii* banden, jedoch nicht an ACGal (Tab. 4.4). IgM-AK konnten nicht detektiert werden.

#### 4.4.2.2 Line-Blots mit den Virotech-Seren

Die Referenzseren von Virotech (s. 3.1.11.3, S. 37) untersuchte die Firma selbst mittels Line-Blots auf ihre Sensitivität und Spezifität hinsichtlich ACGal. Dazu wurde syn-

thetisches ACGal mit Palmitinsäure **14** in verschiedenen Verdünnungen in Puffer oder *tert*-BuOH auf Membranen gesprüht und diese in Streifen geschnitten. Auf die Inkubation der Membranstreifen mit 106 LB-Patientenseren, 41 Seren von Gesunden und 62 kreuzreaktiven Seren folgte die Immunfärbung der gebundenen IgG-AK und die Bewertung (s. 3.1.16, S. 41). Die nach Krankheitsmanifestationen und Kontrollen gruppierten Einzeldaten wurden in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

	Anzahl			Anteil (in %)	
	insgesamt	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv
Gesunde	41	40	1	97,6	2,4
Kreuzreaktive	62	62	0	100,0	0,0
alle Kontrollen	103	102	1	99,0	1,0
Frühstadium	24	22	2	91,7	8,3
NB	26	19	7	73,1	26,9
ACA	27	10	17	37,0	63,0
LA	29	11	18	37,9	62,1
alle Kranken	106	62	44	58,5	41,5

Tabelle 4.5: **Reaktivität der Virotech-Seren in einzelnen Krankheitsmanifestationen auf ACGal in Line-Blots.** Synthetisches ACGal **14** wurde auf Membranen gesprüht. Die Membranstreifen wurden mit den 209 Seren inkubiert und die IgG mittels AP/BCIP/NBT immungefärbt. Die als positiv gewerteten Seren mussten mindestens 2 „Virotech-Intensitäten“ erreicht haben. (s. 3.1.16)

Bei der Betrachtung der ermittelten Daten fällt zuerst die hohe Zahl der negativen Kontrollen auf. Lediglich ein Serum von 41 Gesunden war positiv (2 %), während unter den 62 kreuzreaktiven Seren – die u. a. Syphilis, Autoimmunerkrankungen, Schwangere und Rheumafaktorpositive umfassen – kein einziges mit ACGal reagierte. Mit einer Gesamtspezifität von 99 % war der Test damit hoch valide.

Die Frequenz der Seropositiven unter den LB-Patienten war wieder erst im Spätstadium recht hoch – 63 % bei den Acrodermatitiden (ACA) und 62 % bei den Arthritiden (LA). Die Zahlen sind gegenüber den mittels Dot-Blot erhobenen Ergebnissen der NRZ-Seren vermindert (79 % resp. 87 %). Im Frühstadium, das hier nicht nur EM, sondern u. a. auch multiples EM umfasst, waren 8 % der Seren ACGal-positiv und damit mehr als bei den NRZ-Seren (5 %). Für das zweite LB-Stadium (NB), in dem die Borrelien sich schon ausgebreitet haben, lagen die Werte mit 27 % in der Mitte und leicht erhöht gegenüber den NRZ-Seren (21 %). Die Gesamtsensitivität des ACGal in diesem Test betrug nur 42 % (43 % NRZ).

### 4.4.3 Bestimmung der Antikörpertiter in den ACGal-positiven Seren

In den Patientenseren, die in den Dot-Blots positiv waren, wurden die AK-Titer mittels eines selbst aufgebauten ELISA bestimmt (s. 3.1.17, S. 41), der mit den gesunden Kontrollen validiert wurde.

Der Schwellenwert, oberhalb dessen eine bestimmte Serumverdünnung als positiv gewertet wurde, war die doppelte Standardabweichung über dem Mittelwert der gepoolten Kontrollen bei derselben Verdünnung. Ein EM-Patient zeigte einen Titer von  $< 1000$ . Von den NB-, ACA- und LA-Patienten wiesen etwa 2/3 einen Titer von  $\geq 1000$  auf. Bei

	Anzahl				Anteil (in %)			
	EM	NB	ACA	LA	EM	NB	ACA	LA
positive Seren	1	4	11	13				
1000		2	2	4	0	50	18	31
2000				1	0	0	0	8
4000		1	4	2	0	25	36	15
8000			1		0	0	9	0
16 000					0	0	0	0
32 000				2	0	0	0	15
$\geq 1000$	0	3	7	9	0	75	64	69
$< 1000$	1	1	4	4	100	25	36	31

Tabelle 4.6: **Anti-ACGal-AK-Titer der Dot-Blot-positiven NRZ-Seren bei einzelnen Krankheitsmanifestationen in ELISA.** Mikrotiterplatten wurden mit nativem ACGal beschichtet, als Vierfachwerte mit den Seren in den genannten Verdünnungen inkubiert, die gebundenen IgG mittels HRP/TMB/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gefärbt und die OD<sub>450nm</sub> gemessen und gemittelt. Als OD-Schwellenwert für die positive Beurteilung eines Serums mit einer bestimmten Konzentration wurde die doppelte Standardabweichung der gesunden Kontrollen bei derselben Verdünnung verwendet. (s. 3.1.17)

ACA und LA zusammen hatten 38 % der Dot-Blot-Positiven einen Titer von  $\geq 4000$  und bei LA zwei Patienten einen Titer von 32 000 (Tab. 4.6).

#### 4.4.4 Serologischer Nachweis von ACGal in weiteren Borrelienarten

Es wurden die ACG-Strukturen von neun Arten mit insgesamt 13 Stämmen der Gruppe *B. burgdorferi* s. l. untersucht. Aufgrund des hohen Aufwandes für eine Borrelienkultivierung im großen Maßstab sowie für die Isolierung, Reinigung und chemisch-apparative Analyse des ACGal wurde stattdessen eine kombinierte chemisch-serologische Methode ohne Trennung angewandt. Es wurden dafür zehn zusätzliche Borrelienstämme im Maßstab von 1-4 mg Trockengewicht kultiviert (s. 3.1.2, S. 32) und mittels der Folch-Extraktion (s. 3.1.5.2, S. 33) die Gesamtlipide isoliert. Zusätzlich zu diesen Extrakten wurden noch die butanolextrahierten Gesamtlipide der drei chemisch analysierten Spezies (Baf, Bbu, Bga) und als Negativkontrolle von *B. hermsii* verwendet. Als ACGal-Referenz und zur Sensitivitätsabschätzung wurden 2 und 5  $\mu\text{g}$  Palmitoyl-CGal 14 aufgetragen. Der DC-Blot wurde mit dem Serum eines LB-Patienten (Abb. 4.11, S. 84) oder den vier gepoolten Seren entwickelt.

Das DC mit den Gesamtlipiden aller zehn Borrelienarten wiesen nach Lauf in CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15 (v/v) und Mostainfärbung Spots bei den vier Glycolipiden ACG, MGalD, CGal bzw. CGlc in etwa gleichen Anteilen auf (ohne Abb.). Auf den DC-Blots sah man deutlich, dass – mit Ausnahme von *B. hermsii* – auf der Höhe jedes ACG-Spots auch ein Signal der Immunfärbung lag (Abb. 4.11). Da die AK im Serum spezifisch mit ACGal und nicht mit ACGlc reagierten, implizieren die Experimente, dass alle untersuchten *B. burgdorferi* s. l. ACGal in großen Mengen aufwiesen.

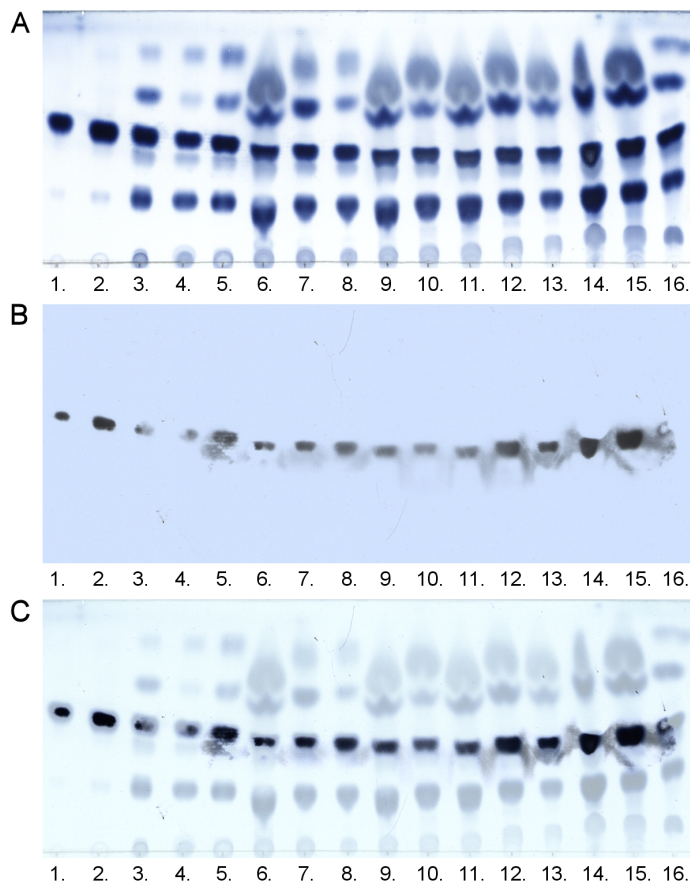


Abbildung 4.11: DC-Blot der Gesamtlipide von 13 verschiedenen Borreliestämmen. **A** Die Gesamtlipide wurden mittels Butanol- (3-5, 16) oder Folch-Extraktion (6-15) isoliert. Sie wurden mit etwa gleichen Massen auf das DC getüpfelt und das DC in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85:15 (v/v) laufen gelassen. Das DC wurde 2 min lang mit einem Bügeleisen auf eine PVDF-Membran übertragen und anschließend mit Mostain gefärbt. (s. 3.1.15, S. 41), **B** Die Membran wurde mit dem ACGal-positiven Serum eines LB-Patienten (1:750, 13,3 h, 4 °C) und sekundärem AK (Kaninchen Anti-Mensch-IgG, 1:50 000, 1,5 h, RT) inkubiert und mittels ECL Filme belichtet und entwickelt. Abgebildet ist ein Film mit 1 min Belichtungszeit. (s. 3.1.13) **C** Digitale Überlagerung von DC (unten) und Film (nach automatischer Kontrastverstärkung) mit 70 % Transparenz.

- 1 2  $\mu\text{g}$  synth. ACGal **14**
- 2 5  $\mu\text{g}$  synth. ACGal **14**
- 3 *B. burgd.* s. s. B31
- 4 *B. garinii* A
- 5 *B. afzelii* PKo
- 6 *B. spielmanii* PSig II
- 7 *B. lusitaniae* Poti B2
- 8 *B. lusitaniae* Poti B3
- 9 *B. valaisiana* VS 116
- 10 *B. valaisiana* UK
- 11 *B. burgd.* s. s. B31 OspA Serotyp 1
- 12 *B. garinii* TN OspA Serotyp 6
- 13 *B. bavariensis* PBi
- 14 *B. japonica* HO 14
- 15 *B. bissettii* DN 127
- 16 *B. hermsii* HS 1

## 4.5 Synthese von ACGal, Serologie mit Humanseren

Bei der ACGal-Synthese wurde Cholesterol zuerst zum CGal glycosyliert (s. 4.5.1) und danach regioselektiv an der 6-*O*-Position der Galactose acyliert (s. 4.5.2, S. 85). Nach der Bestätigung der Antigenität des synthetischen ACGal (s. 4.5.3, S. 87) erfolgte die Synthese einer Glycolipidbibliothek mit insgesamt zehn Derivaten (s. 4.5.4, S. 88). Damit wurde die Bestimmung des ACGal-Epitops möglich (s. 4.5.5, S. 90). Ein funktionalisiertes ACGal konnte konzipiert und inklusive einer einfachen Schützungs- und Entschützungs-methode synthetisiert werden (s. 4.5.6, S. 92). Die erfolglosen Syntheseschritte wurden aus Platzgründen nicht im Methodenteil aufgeführt, stattdessen wird auf die im Folgenden zitierte Originalliteratur verwiesen.

### 4.5.1 Synthese von Cholesterylgalactosid (CGal)

Zuerst wurde die anomere Acetylgruppe der Pentaacetylgalactose mit Hydrazinacetat (in DMF, 2 h, 50 °C) chemoselektiv entfernt (Excoffier u. a., 1975). Nach der Aufreinigung durch Extraktion und Waschen wurden 96 % 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose **1** erhalten (s. 3.2.6.1, S. 48). Dann erfolgte mittels der Trichloracetimidat-Methode die diastereoselektive Aktivierung des anomeren Zentrums und die Umsetzung mit Cholesterol (Schmidt und Michel, 1980). Dazu wurde das Halbacetal **1** mit einer katalytischen Menge der starken Base DBU deprotoniert und mit Trichloracetonitril (in DCM, 2 h, RT) umgesetzt (Ren und Liu, 1999). Unter diesen Bedingungen und mit diesen Schutzgruppen (Acetyl) verlief die Reaktion diastereospezifisch zum thermody-

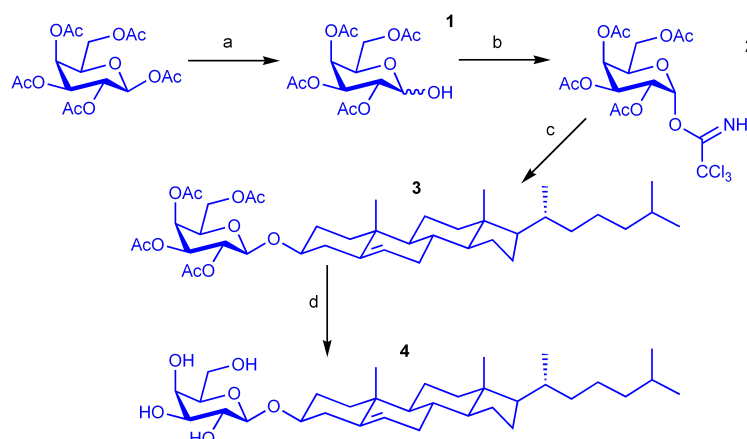


Abbildung 4.12: **Syntheschema für Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid.** **a)** in DMF, Pentaacetylgalactose, 1,25 äq. Hydrazinacetat, 2 h bei 50 °C, Extraktion mit EE, 96 % (s. 3.2.6.1, S. 48). **b)** in DCM, **1**, 3 äq. Trichloracetimidat, kat. DBU, 2 h bei RT, Säule, 88 % (S. 48). **c)** in DCM, **2**, 0,85 äq. Cholesterin, kat. TMSOTf, 1,5 h bei RT, Triethylamin, Säule, 77 % (S. 49). **d)** in MeOH, **3**, Natriummethanolat, pH 9-10, 3 h bei RT, IR-120(H<sup>+</sup>), Säule, 54 % (S. 49).

namisch stabileren  $\alpha$ -Trichloracetimidat<sup>11</sup> **2**, das mit 88 % Ausbeute nach Aufreinigung erhalten wurde (s. 3.2.6.2, S. 48). Intermediär wurde auch das instabilere  $\beta$ -Produkt gebildet; es zerfiel aber wieder. Die Glycosylierung von Cholesterin mit dem Galactosyldonor **2** erfolgte säurekatalysiert (TMSOTf, in DCM, 1,5 h, RT) unter vollständiger Inversion der anomeren Konfiguration nach einem S<sub>N</sub>1-Mechanismus (Deng u. a., 1999). Zunächst wurde im  $\alpha$ -Trichloracetimidat **2** durch die starke Lewis-Säure TMSOTf Trichloracetamid (als Abgangsgruppe) abgespalten. Das verbliebene Carbeniumion wurde durch die Nachbargruppe (in 2-Position) stabilisiert. Dadurch konnte die Annäherung des Cholesterins ausschließlich in äquatorialer Position erfolgen und führte irreversibel zur selektiven Bildung der glycosidischen Bindung in  $\beta$ -Konfiguration. Nach dem Beenden der Reaktion mit Triethylamin und Säulenchromatographie wurden 77 % 1-O-Cholesteryl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid **3** erhalten (s. 3.2.6.3, S. 49). Die oft beschriebene Bildung von Orthoestern konnte nicht nachgewiesen werden. Sehr wohl wurde die Ausbeute aber durch die  $\beta$ -Eliminierung von Cholesterin vermindert. Schließlich wurden die verbliebenen Acetylgruppen unter Zemplén Bedingungen entfernt (Zemplén und Kunz, 1923): In Methanol gelöst wurde die Entschüttung durch Zugabe von Natriummethanolat bei pH 9-10<sup>12</sup> gestartet und nach drei Stunden durch Neutralisation mit saurem Ionenaustauscherharz gestoppt. Obwohl die Reaktion nach DC-Kontrolle vollständig abgelaufen war, konnten nach Säulenchromatographie nur 54 % hochgereinigtes Cholesterylgalactosid **4** erhalten werden (s. 3.2.6.4, S. 49). (Abb. 4.12) Die Strukturen der Reaktionsprodukte wurden mit ein- und zweidimensionalen NMR-Messungen bzw. Signalzuordnungen und ESI-MS- bzw. MALDI-TOF-Messungen bestätigt.

#### 4.5.2 Regioselektive Acylierung von Cholesterylgalactosid

Die selektive Acylierung in der 6-O-Position der Galactose – der einzigen primären Hydroxylgruppe – sollte allein auf der unterschiedlichen Reaktivität basierend möglich

<sup>11</sup> „Mit Natriumhydrid als Base und arylsubstituierten Ketenimininen wurden ausschließlich die  $\beta$ -Imidate gebildet“ (Schmidt und Michel, 1980)

<sup>12</sup> gemessen auf feuchtem pH-Papier

sein. Da die chemische Acylierung jedoch nicht selektiv verlief (s. 4.5.2.1), wurde eine enzymatische Acylierung unter Verwendung einer Lipase etabliert (s. 4.5.2.2).

#### 4.5.2.1 Chemische Acylierung in 6-*O*-Gal-Position

Zuerst wurde die direkte Acylierung von CGal mit freier Palmitinsäure durch DCC (in Dioxan bei RT) ausprobiert (Kasai u. a., 1981). Dabei konnte allerdings keine Umsetzung beobachtet werden. Als nächstes wurde der zweistufige Weg versucht, bei dem die Palmitinsäure erst mit 2,4-Dinitrophenol aktiviert wird (mit DCC, in DCM, RT) und dann eine Umesterung an CGal mit DMAP katalysiert (in Pyridin, RT) werden sollte (Xia und Hui, 1995). Jedoch zeigte sich auch hier in der zweiten Stufe keine Bildung des gewünschten Produktes. Im Gegensatz dazu führte die Kombination von Carbodiimid (EDC) und Katalysator (DMAP) beim Einsatz von Palmitinsäure (in Pyridin, RT) zwar zu einem Reaktionsumsatz, allerdings in hohem Maße zu Mehrfachacylierungen von CGal. Durch die Mehrfachacylierungen wurde zum einen die Ausbeute stark verringert und zum anderen die Aufreinigung erschwert. Versuche mit verschiedenen Carbodiimiden (DCC, EDC, Bis(trimethylsilyl)-carbodiimid), unterschiedlichen Lösungsmitteln (Pyridin, Dioxan, DCM, DMSO, Sulfolan) oder auch verringerten Reaktionstemperaturen (RT bis zu -20 °C) führten bei DMAP-Katalyse nicht zur gewünschten regioselektiven Acylierung von CGal in 6-*O*-Position.

#### 4.5.2.2 Enzymatische Acylierung in 6-*O*-Gal-Position

Bei der Acylierung von Kohlenhydraten mittels Lipasen werden grundsätzlich auch freie Fettsäuren mit der 6-*OH*-Gruppe verestert. Allerdings ist die Umesterung einer vorher aktivierten Fettsäure an diese Hydroxylgruppe effektiver (Gotor und Pulido, 1991). Als Aktivierungsreagenz wurde daher Acetonoxim benutzt. Die Synthese der Acetonoximester erfolgte bei gleichen Stoffmengen Palmitinsäure und Acetonoxim mit 1,25 äq. EDC und kat. DMAP (in DCM, 2 h, RT) (Abb. 4.13). Nach der Säulenchromatographie wurden 97 % des Acetonoximoylpalmitats **7** erhalten.

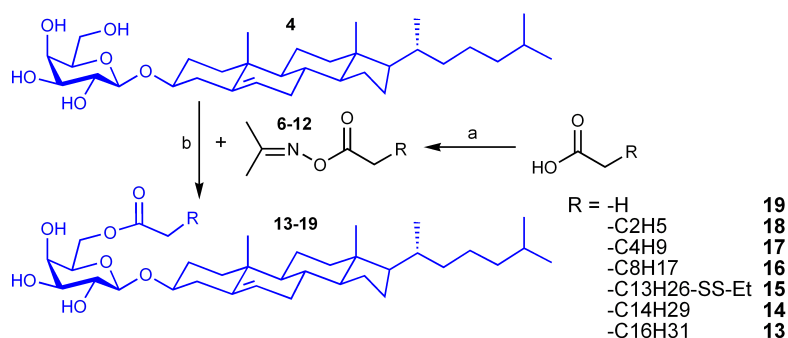


Abbildung 4.13: **Syntheschema der regioselektiven Acylierung von CGal.** a) in DCM, Fettsäure, 1 äq. Acetonoxim, 1,25 äq. EDC, kat. DMAP, 2 h bei RT, Säule, 84-97 % (s. 3.2.7.1ff, S. 50-53). b) in Pyridin, **4**, 0,9 äq. **6-12**, Lipase Amano PS, 10 d bei 50 °C, Filtration, Säule, 5-31 % (s. 3.2.8.1ff, S. 53-58).

Vor einer präparativen Acylierung wurden zwei gebräuchliche Lipasen – Amano Lipase PS aus *Burkholderia cepacia*<sup>13</sup> und Amano Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* – in analytischen Reaktionen ausprobiert und verglichen. Mit der Reaktionskontrolle durch

<sup>13</sup>früher als *Pseudomonas cepacia* klassifiziert

DC wurde bei beiden Enzymen Einfachacylierung und keine Mehrfachacylierungen beobachtet, wobei die Reaktionsumsätze recht gering waren. Von beiden Lipasen wies die Amano Lipase PS den etwas höheren Umsatz auf und wurde für die folgenden Reaktionen ausgewählt. Die enzymatische Acylierung wurde präparativ wie folgt durchgeführt. CGal **4** und der Acetonoximester der Palmitinsäure **7** wurden in trockenem Pyridin gelöst und auf 50 °C erhitzt. Die Lipase und das Molekularsieb wurden unter Argon hinzugefügt und alles bei 50 °C 5 d gerührt. Um die Ausbeute noch weiter zu steigern, wurde nochmals die gleiche Menge Lipase mit Molekularsieb zugegeben und die Reaktion unter denselben Bedingungen 5 d fortgesetzt. Die Lipase wurde durch eine Pore-3 Fritte abfiltriert, das Filtrat mit Kieselgel koevaporiert und dieses Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Abb. 4.13). Für das 6-*O*-palmitoylierte CGal **14** betrug die Ausbeute nach der Aufreinigung lediglich 8,5 % (s. 3.2.8.2, S. 54). Die Bildung von Nebenprodukten wurde nicht beobachtet. Bei der Säulenchromatographie konnten jedoch in großer Menge nicht umgesetzte Edukte – CGal und Acetonoximester – wiedergewonnen werden (Diskussion s. 5.2.1.2, S. 110).

Die Charakterisierung des ACGal erfolgte aufgrund der vollständigen Signalzuordnung der ein- und zweidimensionalen NMR-Experimente – für das Cholesterol unter Zuhilfenahme von Referenzdaten (s. 3.2.4, S. 46). Die Strukturen wurden durch MALDI-TOF-MS bestätigt (s. 3.2.5.1, S. 47). Im ESI der LC/MS war das intensivste Signal bei  $m/z = [M+18]^+$ , bei dem es sich um  $\text{NH}_4^+$ -Addukt handeln könnte. Im hochauflösenden ESI-MS war die Probe gar nicht messbar.

Mit diesem synthetischen 6-*O*-palmitoylierten Cholesterylalactosid konnte die Antigenität des nativen ACGal mittels Dot-Blots bestätigt werden (s. 4.5.3, S. 87).

### 4.5.3 Bestätigung der Antigenität

Bisher wurde lediglich gezeigt, dass die aus *B. burgdorferi* isolierte ACGal-Fraktion ein AG ist (s. 4.4, S. 80). Durch die ACGal-Synthese konnten diese nativen Strukturen mit gut definiertem, synthetischem ACGal verglichen und dessen Antigenität bestätigt werden. Dazu wurden in Dot-Blots dieselben Massen von nativem ACGal von *B. garinii*<sup>14</sup> (s. 4.1.2.3, S. 74), synthetischem Palmitoyl-CGal **14** und synthetischem CGal **4** mit dem Serum von vier einzelnen LB-Patienten im Spätstadium inkubiert und die IgG-AK immungefärbt (s. 3.1.14, S. 39).

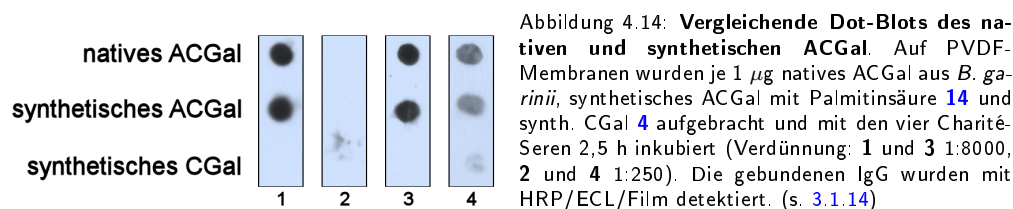


Abbildung 4.14: Vergleichende Dot-Blots des nativen und synthetischen ACGal. Auf PVDF-Membranen wurden je 1  $\mu\text{g}$  natives ACGal aus *B. garinii*, synthetisches ACGal mit Palmitinsäure **14** und synth. CGal **4** aufgebracht und mit den vier Charité-Seren 2,5 h inkubiert (Verdünnung: **1** und **3** 1:8000, **2** und **4** 1:250). Die gebundenen IgG wurden mit HRP/ECL/Film detektiert. (s. 3.1.14)

Von den vier Seren des LB-Spätstadiums (s. 3.1.11.2, S. 36) wiesen zwei einen sehr hohen ACGal-Titer auf ( $\geq 8000$ ), eines einen kleinen ( $\geq 250$ ) und eines war negativ. In allen vier Seren war die Reaktivität gegenüber nativem und synthetischem ACGal identisch – sowohl in der Kinetik der ECL-Filmentwicklung als auch in der Intensität der Signale (Abb. 4.14). Somit war ACGal – das wichtigste Glycolipid von *B. burgdorferi* – als AG in

<sup>14</sup>ein Gemisch von ACGal mit Palmitin- (48 %), Öl- (48 %) und Stearinsäure (4 %)

Lyme-Borreliose verifiziert und die Voraussetzung zur Synthese einer ACGal-Bibliothek (s. 4.5.4) gegeben.

#### 4.5.4 Synthese einer Glycolipidbibliothek

Für die Bestimmung des immunreaktiven Epitops von ACGal wurde eine Bibliothek mit Glycolipidderivaten synthetisiert. Zur Untersuchung der minimalen Fettsäurelänge wurden Derivate mit variierenden Fettsäuren synthetisiert (s. 4.5.4.1). Um die Notwendigkeit des Cholesterylanteils zu beurteilen, wurden Methyl- und Phenylgalactosid acyliert (s. 4.5.4.2, S. 89). Die unterschiedliche Hydrophobizität der Glycolipide veranschaulicht ein Dünnschichtchromatogramm (Abb. 4.17, S. 90).

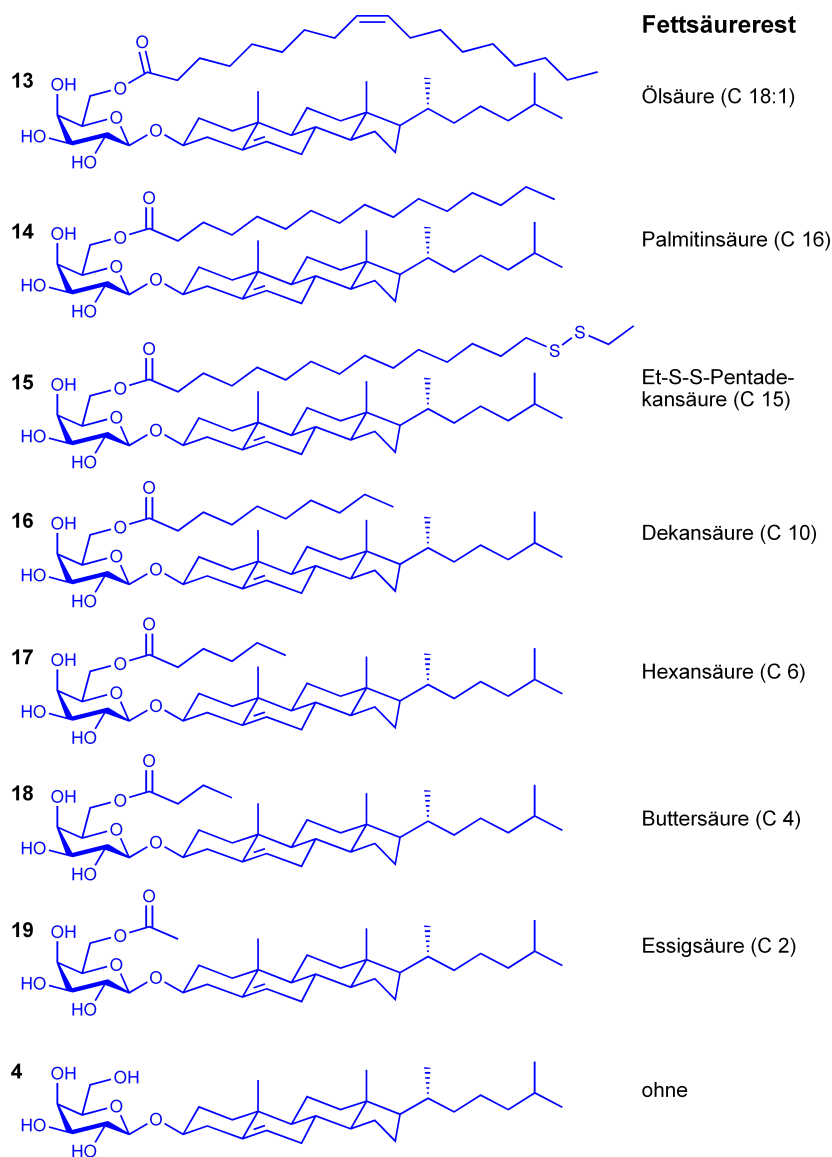


Abbildung 4.15: **Strukturformeln der synthetisierten Cholesterylglycolipide.** Die Grundstruktur Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid **4** wurde in *B. burgdorferi* auch mit Öl- und Palmitinsäure 6-O-acyliert vorgefunden. Zusätzlich zu diesen drei Strukturen wurden Derivate mit Carbonsäuren von C 2 bis C 10 und einer  $\omega$ -mercaptofunktionalisierten Pentadecansäure chemoenzymatisch synthetisiert. (s. 3.2.8)



#### 4.5.4.1 Synthese von ACGal-Derivaten

Für die Synthese der sieben Fettsäurederivate von ACGal (Abb. 4.15, S. 88) wurde CGal **4** mit Acetonoximestern der Carbonsäuren regioselektiv acyliert.

Die Aktivierungen der Ölsäure bis Buttersäure mit Acetonoxim erfolgten mittels Carbodiimid (s. 3.2.7, S. 50). Nach der Säulenchromatographie konnten die reinen Acetonoximester **6-11** in Ausbeuten von 85-97 % erhalten werden (s. 3.2.7.1-3.2.7.6, S. 50ff). Der Acetonoximester der Essigsäure **12** wurde durch Reaktion von Acetonoxim mit Acetanhydrid in Pyridin mit 92 % Ausbeute dargestellt (s. 3.2.7.7, S. 53). Die lipasekatalysierten Umesterungen der Fettsäureester an die 6-*O*-Position des CGal (Abb. 4.13, S. 86) wurden wie beschrieben durchgeführt (s. 4.5.2.2, S. 86). Die Reaktionsausbeuten nach der Säulenchromatographie variierten deutlich. Die höchsten Ausbeuten konnten für die kurzen Derivate C6-ACGal **17** und C4-ACGal **18** mit 31 % bzw. 29 % erhalten werden. Geringere Ausbeuten von 16 und 14 % wurden bei Verwendung der ungesättigten (C18:1-ACGal **13**) bzw. der mittellangen (C10-ACGal **16**) Fettsäure erzielt. Relativ geringe Ausbeuten wurden hingegen bei den langen Fettsäuren und – als Ausnahme – für das Acetylderivat ermittelt: 8,5 % bei C16-ACGal **14**, 7,5 % bei C2-ACGal **19** und 5,1 % bei (Et-SS-C15)-ACGal **15** (Diskussion s. 5.2.1.2, S. 110).

#### 4.5.4.2 Synthese von cholesterolfreien acylierten Galactosiden

Für die Synthese der cholesterolfreien Glycolipide (Abb. 4.16) wurden Methyl- und Phenyl- $\beta$ -D-galactosid gekauft. Die 6-*O*-Acylierung wurde gleich mit dem Acetonoximester der funktionalisierten Pentadecansäure (C15-SS-Et, **8**) (s. 3.2.8.8-3.2.8.9, S. 59f) durchgeführt, um bei einer Erkennung durch Seren direkt die Konjugation zu ermöglichen. Die Ausbeuten dieser enzymkatalysierten Reaktionen nach Säulenchromatographie waren höher als bei den CGal-Derivaten (s. 4.5.4.2) – 64 % für das acylierte Methyl- $\beta$ -D-galactopyranosid **20** und 52 % für das acylierte Phenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid **21**. Auch hier wurden keine Nebenprodukte beobachtet und nicht umgesetzte Edukte wurden bei der Säulenchromatographie zurückgewonnen.

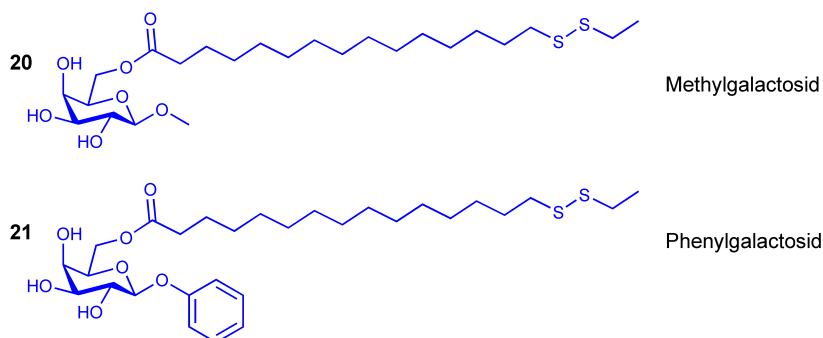


Abbildung 4.16: **Strukturformeln der synthetisierten cholesterolfreien Glycolipide.** Es wurden zwei Derivate mit der funktionalisierten Fettsäure **8** synthetisiert, bei denen der Cholesterylrest entweder durch Methyl oder Phenyl ersetzt worden war. (s. 3.2.8, S. 53)

Mit Hilfe dieser zehn Strukturen und der nativen ACGal-Präparationen wurden in Immunoblots wertvolle Informationen über das ACGal-Epitop der AK gewonnen (s. 4.5.5).

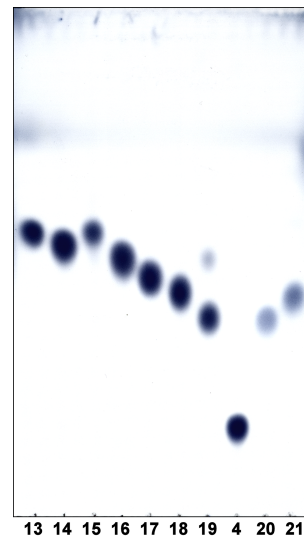


Abbildung 4.17:

**Dünnschichtchromatogramm der synthetisierten Glycolipide.**

Die säulenchromatographisch gereinigten Glycolipide wurden auf ein DC aufgetragen, in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  85:15 (v/v) entwickelt und mit Mostain gefärbt (s. 3.2.1.1).

Nr.	Glycolipid	$R_f$
13	Oleoyl-CGal	0,56
14	Palmitoyl-CGal	0,54
15	Et-S-S-Pentadecanoyl-CGal	0,56
16	Decanoyl-CGal	0,50
17	Hexanoyl-CGal	0,47
18	Butyl-CGal	0,44
19	Acetyl-CGal	0,39
4	CGal	0,18
20	Et-S-S-Pentadecanoyl-MeGal	0,39
21	Et-S-S-Pentadecanoyl-PhGal	0,44

### 4.5.5 Erkennung der Glycolipide durch Humanseren

Zur Identifizierung des Epitops der humanen AK wurde mit den synthetisierten ACGal-Derivaten die für die Erkennung minimale Länge der Fettsäuren ermittelt (s. 4.5.5.1, S. 90). Mit der gesamten Glycolipidbibliothek und den nativen Strukturen erfolgte die Eingrenzung des Epitops (s. 4.5.5.2, S. 91). Vor dem Hintergrund einer diagnostischen Anwendung von ACGal wurden von den synthetischen Glycolipiden die Titer der AK bestimmt (s. 4.5.5.3, S. 91).

#### 4.5.5.1 Bestimmung der minimalen Fettsäurelänge

Bislang wurde demonstriert, dass die AK in den LB-Patientenseren an CGal nicht binden, während sie acyliertes CGal (ACGal) sehr wohl erkennen. Ungeklärt war, wie lang die Fettsäure an 6-O-CGal mindestens sein muss, damit die AK daran binden können. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die synthetischen ACGal mit den unterschiedlich langen Fettsäureresten – Acetyl- (C2, 19), Butanoyl- (C4, 18), Hexanoyl- (C6, 17), Decanoyl- (C10, 16), Palmitoyl- (C16, 14) und Oleoyl- (C18:1, 13) – sowie CGal 4 (Abb. 4.15, S. 88) auf Dot-Blots aufgebracht, mit LB-Patientenseren inkubiert und die IgG-AK detektiert.

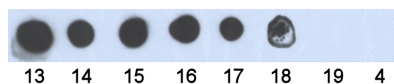


Abbildung 4.18: **Dot-Blots aller Cholesteryl- $\beta$ -D-galactoside mit Patientenseren.** Auf eine PVDF-Membran wurden je  $1 \mu\text{g}$  der Glycolipide aufgebracht, mit den Charité-Patientenseren (1:4000) inkubiert und mit sekundärem AK (1:50 000) und ECL/Film die Bindung detektiert. Oleoyl-CGal 13, Palmitoyl-CGal 14, Et-S-S-Pentadecanoyl-CGal 15, Decanoyl-CGal 16, Hexanoyl-CGal 17, Butyl-CGal 18, Acetyl-CGal 19, CGal 4, (s. 3.1.14)

Das Ergebnis des Versuches war, dass alle ACGal-Derivate mit einer Fettsäurekettenlänge  $\geq 4$  von den AK erkannt wurden (Abb. 4.18). Dabei spielte es offenbar keine Rolle, ob sich abweichend von den gesättigten und unsubstituierten Fettsäuren (C16, C10, C6) im Ölsäurederivat 13 an  $\Delta^9$  eine Doppelbindung oder bei C15-SSEt 15 terminal eine funktionelle Gruppe befindet. Das Buttersäurederivat 18 wurde hier scheinbar schwächer erkannt, aber in späteren, ähnlichen Experimenten (ohne Abb.) unterschied

sich das Signal nicht von den ACGal-Derivaten mit längerer Fettsäure, so dass von einer vollwertigen Erkennung auszugehen ist. Nicht ausreichend für eine Erkennung durch Humanserum waren aber ein Acetylrest am CGal **19** und ein unsubstituiertes CGal **4**.

#### 4.5.5.2 Ermittlung der minimalen Erkennungsstruktur der Humanserum

Nach Erkenntnissen zu nativen ACG (s. 4.4.2.1, S. 81) und dem Fettsäureanteil in synthetischen ACGal-Derivaten (s. 4.5.5.1) fehlten noch Informationen zur Erfordernis des Cholesterylanteils. Daher wurden unter Einbeziehung der cholesterolfreien Glycolipide (Abb. 4.16, S. 89) und weiterer Kontrollen in einem umfassenden Versuch die Minimalstruktur, die noch von AK erkannt wird, ermittelt. Hierfür wurden auf einer Membran gleiche Mengen von Borrelienlysate, von allen vorhandenen Lipiden – Gesamtlipide, native ACG aller vier chemisch untersuchten Spezies, alle synthetischen Lipide – sowie Galactose und Cholesterol aufgebracht (s. Abb. 4.19). Die Membranen wurden zum einen mit dem gepoolten Serum der beiden ACGal-hochtitrigen LB-Patienten und als Kontrolle mit dem gepoolten Serum des negativen und des schwach ACGal-positiven LB-Patienten (als Kontrolle) inkubiert. Die gebundenen IgG-AK wurden durch sekundäre AK/HRP/ECL auf Filmen detektiert (s. 3.1.14.2, S. 40).

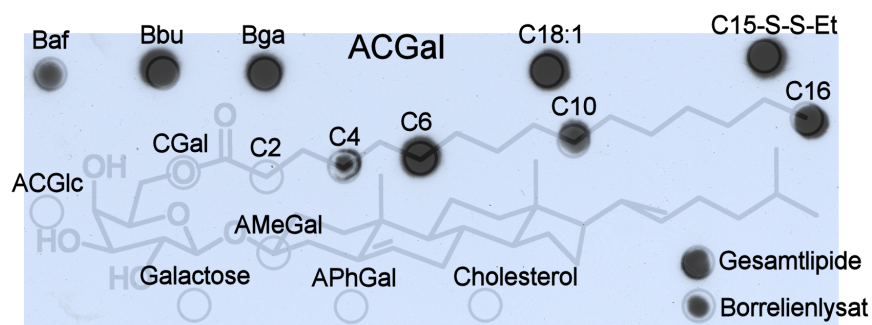


Abbildung 4.19: **Schablonen-Dot-Blot der Lipide mit LB-Patientenserum.** Auf eine PVDF-Membran wurde eine Schablone aufgelegt und an den bezeichneten Stellen je 1 µg der Substanzen aufgebracht: natives ACGal von *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s. s. und *B. garinii*, natives ACGlc von *B. hermsii*, die synthetisierten Cholesterylglycolipide (**4**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**, **18**, **19**) – bezeichnet nach ihrer Fettsäurelänge, die synthetisierten cholesterolfreien Glycolipide (**20**, **21**) – AMeGal und APhGal, die Gesamtlipide und ein Borrelienlysate von *B. burgdorferi* s. s., freies Cholesterol und freie Galactose. Die Membran wurde mit dem ACGal-positiven Charité-Patientenserum (1:4000, 2 h) und sekundärem AK (1:50 000) inkubiert und mittels ECL Filme belichtet (s. 3.1.14.2). Abgebildet ist die digitale Übereinanderlegung der der Schablone zugrunde liegenden Strukturformel mit einem Film (Belichtung: 32 min).

Die Kontrolle zeigte bei keiner der Strukturen Signale, wobei das Borrelienlysate wohl allein aufgrund der relativ hohen Verdünnung der Seren nicht erkannt wurde (ohne Abb.). Von den stark ACGal-positiven Patienten wurden dagegen wie erwartet alle nativen Substanzen erkannt, die ACGal enthalten – Lysate, Gesamtlipide, ACGal-Fractionen von Baf, Bbu und Bga. Das ACGlc von *B. hermsii* und die beiden cholesterolfreien Glycolipide (**20** und **21**) wurden nicht erkannt. Ebenfalls reichen weder freies Cholesterol noch freie Galactose für eine Bindung aus (Abb. 4.19). Die Aussagen zur Fettsäure weichen nicht von denen in 4.5.5.1 ab.

#### 4.5.5.3 Titerbestimmung der synthetischen Lipide mit Patientenserum

Da sich die AK-Titer der erkannten ACGal-Derivate bei den Kaninchenserum stark unterschieden (s. 4.6.3.2, S. 101), wurde untersucht, ob die AK in den LB-Patientenserum

ähnlich variierende Affinitäten aufweisen. In analogen Dot-Blots wurde mit den ACGal-Derivaten und seriellen Verdünnungen der Humansenen von 1:1000 bis 1:512 000 die Bindung der IgG detektiert (s. 3.1.14.3, S. 40).

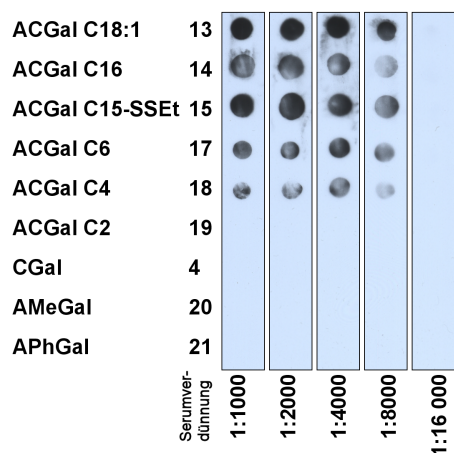


Abbildung 4.20: **Titerbestimmung der synthetischen Glycolipide mittels Dot-Blot mit LB-Patientenseren.** Auf PVDF-Membranen wurden je 1  $\mu\text{g}$  der Glycolipide 4, 13-15, 17-21 aufgebracht, 21 h bei 4 °C mit zehn Verdünnungen (1:1000-1:512 000) der gepoolten Charité-Patientenseren inkubiert und mit sekundärem Anti-IgG-AK (1:50 000) und ECL/Film immungefärbt (s. 3.1.14.3, S. 40). Gezeigt sind nur die digital ausgeschnittenen Filmstreifen der Verdünnungen 1:1000-1:16 000, da bei 1:16 000-1:512 000 keine Reaktion beobachtet wurde.

Auch in diesem Experiment (Abb. 4.20) wurden CGal 4 und 6-*O*-Acetyl-CGal 19 sowie die beiden cholesterolfreien Lipide 20, 21 bei einer Serenverdünnung  $\geq$  1:1000 nicht erkannt. Die benutzten ACGal-Derivate mit Buttersäure oder einer länger-kettigen Fettsäure (13, 14, 15, 17, 18) wurden von den Patientenseren alle mit einem Titer von 1:8000 erkannt.

#### 4.5.6 Synthese eines funktionalisierten ACGal

Für die Kopplung eines funktionalisierten ACGal an die Trägerproteine sollten deren Lysinseitenketten genutzt werden. Da keine der verwendeten funktionellen Gruppen direkt mit den freien Aminofunktionen reagierte, mussten entweder entsprechend aktivierte Proteine gekauft oder bei der Konjugation homo- oder hetero-bifunktionale Hilfsreagenzien eingesetzt werden.

Zunächst sollte ein mit einer Aminogruppe funktionalisiertes ACGal mittels Glutaraldehyd an die Lysine des Proteins gebunden werden. Ausgehend von einer gekauften  $\omega$ -(Boc-amino)-undecansäure wurden der Acetonoximester und danach das noch Boc-geschützte  $\omega$ -Aminoundecanoyl-CGal synthetisiert. Dieses degradierte aber bei der Boc-Entschützung (TFA in DCM, 2h, RT) oder der Aufarbeitung.

Danach war geplant, die Aminogruppen des Proteins mittels 2-Iminothiolan in Mercaptofunktionen umzuwandeln, die mit Maleimidgruppen reagieren können. Die Verwendung einer Schutzgruppe war nicht notwendig. Die Synthese eines ACGal-Derivates mit  $\omega$ -Maleimidoundecansäure scheiterte allerdings daran, dass währenddessen die Doppelbindung des Maleimides laut NMR großteils degradierte.

Schließlich wurde der umgekehrte Weg verfolgt – maleimidaktivierte Trägerproteine waren kommerziell erhältlich und könnten mit einem mercaptofunktionalisierten ACGal reagieren. Vor der Aktivierung der gekauften  $\omega$ -Mercaptofettsäuren als Acetonoximester wurde die Mercaptofunktion geschützt (s. 4.5.6.1). Die Schutzgruppe musste dann vor der Konjugation wieder entfernt werden (s. 4.5.6.2, S. 93).

#### 4.5.6.1 Schützung der Mercaptogruppe als Disulfid

Zuerst wurde die 2,4-Dinitrothiophenyl-Schutzgruppe (DNP-S-) erfolgreich mit 2,4-Dinitrophenylsulfenylchlorid an der Mercaptogruppe von  $\omega$ -Mercaptoundecansäure angebracht (88 % Ausbeute) (Fontana u. a., 1968). Auch die weitere Veresterung (90 %) sowie enzymatische Acylierung zum  $\omega$ -(DNP-S-S)-ACGal (7 %) verliefen glatt. Nach der erfolgreichen reduktiven Entschützung des Produktes war es jedoch nicht möglich, die freie Schutzgruppe vollständig mittels Säulenchromatographie zu entfernen und das saubere ACGal-SH zu erhalten (s. 4.5.6.2, S. 93). Dieser Weg konnte somit nicht für Konjugationen eingesetzt werden.

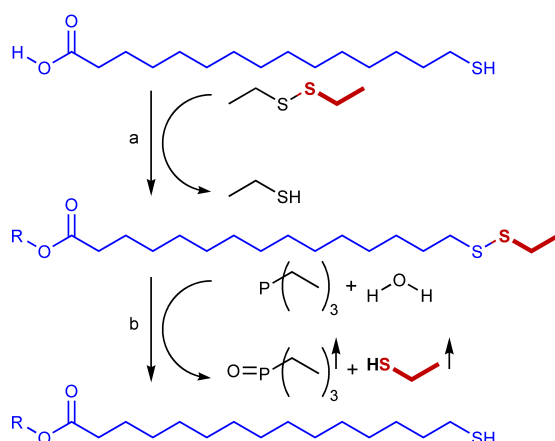


Abbildung 4.21: **Schema der Schützung und Entschützung der Mercaptofunktion.** a) in TEA, 15-Mercaptopentadecansäure, 2 äq. Diethyldisulfid, 17 h bei 70 °C rühren, Evaporation (s. 3.2.9.1, S. 60) b) in Pyridin/H<sub>2</sub>O 9:1 (v/v), 1 äq. 1 M Triethylphosphinlösung in THF, 30 min bei RT schütteln, Evaporation oder Abblasen im N<sub>2</sub>-Strom (s. 3.2.9.2, S. 61) R = H (Schützung) bzw. CGal (Entschützung)

Letztendlich wurde die flüchtige Thioethyl-Schutzgruppe mit Erfolg verwendet (Abb. 4.21, S. 93). Die Schützung von  $\omega$ -Mercaptopentadecansäure erfolgte durch Erhitzen mit Diethyldisulfid in TEA (Su u. a., 2004). Nach Einrotieren der Reaktionslösung konnte ohne Aufreinigung die saubere 15-(2-Ethylthioethyl)-pentadecansäure **5** quantitativ erhalten werden (s. 3.2.9.1, S. 60). Die Aktivierung zum Acetonoximester **8** erfolgte mit 89 % Ausbeute (s. 3.2.7.3, S. 51). Die enzymatische Acylierung von CGal damit ergab nach chromatographischer Reinigung 180 mg (5,1 %)  $\omega$ (Et-S-S)-ACGal **15**.

#### 4.5.6.2 Reduktive Entschützung des Disulfides

Eine reduktive Entschützung des DNP-S-geschützten ACGal (s. 4.5.6.1, S. 93) mit DTT gelang auch mit großem Überschuss nicht. Die Reduktionsmittel NaBH<sub>4</sub> oder NaCNBH<sub>3</sub> waren ebenfalls nicht effektiv genug. Die Reduktion mit Tributylphosphin in DMF mit 5 % H<sub>2</sub>O zeigte jedoch innerhalb weniger Minuten eine quantitative Entschützung. Da sowohl das entschützte Glycolipid (ACGal-SH) als auch die verbliebene Schutzgruppe (DNP-SH) um die Maleimidgruppen des Trägerproteins konkurrieren würden, musste die Schutzgruppe entfernt werden. Die unüberwindbare Schwierigkeit bestand darin, dass es bei Kontakt mit Luft – beim Einengen der Reaktionslösung und bei der Säulenchromatographie – zur Reoxidation kam. Es bildete sich nicht nur die Ausgangsverbindung (ACGal-S-S-DNP) zurück, sondern auch ein symmetrisches Glycolipiddimer (ACGal-S-S-ACGal). Zwar konnte bei der Aufarbeitung die Zugabe eines Überschusses DTT dies verhindern, jedoch würde nicht oxidiertes DTT ebenfalls mit den Maleimidgruppen reagieren und eine Konjugation von ACGal-SH verhindern.

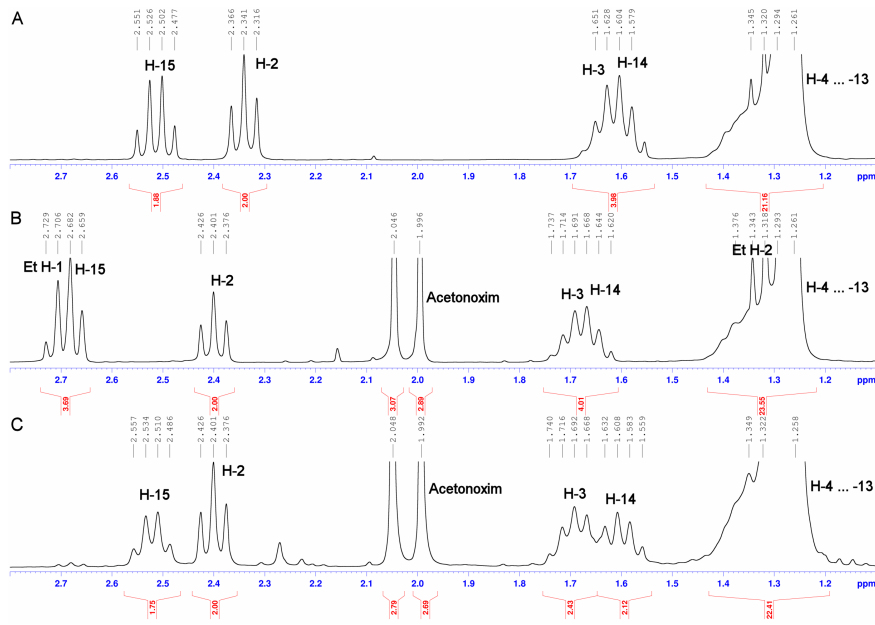


Abbildung 4.22: **Vergleichende  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der un- und geschützten Mercaptofettsäuren bzw. Acetonoximester.** Die Mercaptofettsäuren wurden in  $\text{CDCl}_3$  gelöst, im 300 MHz NMR-Spektrometer gemessen und die Verschiebungen auf internes TMS referenziert. **A** 15-Mercaptopentadecansäure (s. 3.2.9.1, S. 60), **B** Acetonoximester der 15-(2-Ethylidisulfanyl)pentadecansäure **8**, das FA H-2 Signal ist im Oximester von 2,34 nach 2,40 ppm verschoben, das FA H-15 im Disulfid von 2,51 nach 2,68 ppm, das Ethyl H-1 hat eine Verschiebung von 2,69 ppm und das H-2 von 1,32 ppm, **C** Acetonoximester der 15-Mercaptopentadecansäure **23**, das FA H-15 Signal ist wieder bei 2,52 ppm, das H-2 als Oximester bei 2,40 ppm.

Die Reduktion der flüchtigen Thioethyl-Schutzgruppe (Abb. 4.21, S. 93) wurde mit dem geschützten Fettsäureester **8** mittels NMR-Experimenten etabliert (Abb. 4.22, S. 94). Dabei wurden die Eigenschaften verschiedener Phosphine analysiert: Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP)<sup>15</sup>, Triphenylphosphin<sup>16</sup>, Tri(n-butyl)-phosphin<sup>17</sup> und Triethylphosphin<sup>18</sup>. Hinsichtlich des Reduktionsvermögens waren alle Phosphine bei 1-1,1 Moläquivalenten gleich effektiv. Ausschlaggebend für die Auswahl war, dass sowohl Triethylphosphin als auch sein Oxidationsprodukt Triethylphosphinoxid im HV flüchtig waren und einfach entfernt werden konnten (lt. NMR). Als Lösungsmittel wurde Pyridin/ $\text{H}_2\text{O}$  9:1 (v/v) ausgewählt und Verbindung **15** (ACGal-S-S-Et) zu Verbindung **22** (ACGal-SH) mit einem Umsatz von 94 % entschützt (s. 3.2.9.3, S. 61).

## 4.6 Konjugation von ACGal, Immunisierung von Versuchstieren und Serologie mit Tierseren

Da ACGal selbst nicht immunogen ist, musste es zunächst über eine funktionelle Gruppe an immunogene Trägerproteine konjugiert werden (s. 4.6.1, S. 95). Mit diesen Konjugaten wurden Mäuse und Kaninchen immunisiert, um spezifische Anti-ACGal-AK zu generieren (s. 4.6.2, S. 99). Die Seren wurden eingehend mittels Immunoblots mit den

<sup>15</sup>erhältlich als an Agarose immobilisiertes Reagenz, das abfiltriert werden kann

<sup>16</sup>bei RT fest

<sup>17</sup>bei RT flüssig, Siedetemperatur 150 °C

<sup>18</sup>bei RT flüssig, Siedetemperatur 127-128 °C

Glycolipiden untersucht (s. 4.6.3, S. 100) und für Immunofluoreszenztests mit ganzen Borrelien verwendet (s. 4.7, S. 102).

### 4.6.1 Konjugation von ACGal an Trägerproteine

Es war das Ziel, das funktionalisierte ACGal **22** mit seiner Mercaptogruppe an Trägerproteine zu konjugieren. Zunächst wurden erfolglos maleimidaktivierte Proteine ausprobiert (s. 4.6.1.1) und dann die Konjugation in zwei Schritten mittels des Linkermoleküls SMCC<sup>19</sup> mit mehreren Trägerproteinen durchgeführt (s. 4.6.1.2, S. 96). Die Proteine waren: BSA – Rinderserumalbumin (Molekulargewicht: 66,5 kDa), KLH – Keyhole Limpet Hemocyanin (1-5 MDa) – und OVA – Ovalbumin (44,3 kDa).

#### 4.6.1.1 Konjugation an maleimidaktivierte Trägerproteine

Bereits maleimidaktivierte Proteine waren kommerziell erhältlich<sup>20</sup> und schienen der einfachste Weg für die Konjugation zu sein.

**Konjugation an maleimidaktiviertes KLH** Die Reaktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit den mitgelieferten Reagenzien durchgeführt (s. 3.2.10.1, S. 62). Als Lösungsmittel für ACGal **22** wurde DMSO gewählt, das mit dem wässrigen Puffer des KLH mischbar ist. Trotzdem fiel während des Mischens der Lösungen ein farbloser Niederschlag unbekannter Zusammensetzung aus. Bei der Beurteilung der Konjugation erwies sich als großes Problem, dass KLH aufgrund des großen Molekulargewichtes nicht in der PAGE läuft und in Dot-Blots auch ungebundenes ACGal nachgewiesen werden würde. Eine qualitative Aussage sollte daher mittels der Tandem-Massenspektrometrie der KLH-Fragmente getroffen werden. Ein tryptischer Verdau der beiden verschiedenen KLH-Untereinheiten würde zu 387 Spaltprodukten führen. Da aber für eine Bromcyan-spaltung (BrCN) nur 155 theoretische Schnittstellen vorhanden sind, wurde diese angewendet (s. 3.2.11, S. 64). Diese große Anzahl Peptide inklusive der Isotopensignale führte jedoch zusammen mit der Heterogenität der Maleimidsubstitution an den Lysin zu einer unüberschaubaren Anzahl Signale im Massenspektrum. Der Vergleich der Fragmente des BrCN-gespaltenen KLH-Konjugates mit gleich behandeltem maleimidaktiviertem KLH erlaubte keine Aussage über die Konjugation.

**Konjugation an maleimidaktiviertes BSA** Die Reaktion erfolgte auf ähnliche Weise wie bei KLH, wobei es auch Löslichkeitsprobleme des Gemisches gab (s. 3.2.10.1, S. 62). Mit BSA und den ACGal- sowie Cystein-Konjugaten wurde eine PAGE durchgeführt und die Banden für einen tryptischen Verdau zur Tandem-Massenspektrometrie ausgeschnitten (ohne Abb.). Es konnten mehrere Cys-Maleimid-Peptide identifiziert werden, allerdings keine ACGal-Maleimid-Peptide.

<sup>19</sup>4-(*N*-Maleimidomethyl)cyclohexancarbonsäure *N*-hydroxysuccinimid-ester – ein heterobifunktionaler Crosslinker

<sup>20</sup>Die Firma Pierce bot aktiviertes KLH mit  $\geq 400$ , BSA mit 15-25 und OVA mit 5-15 Maleimid-funktionen pro Mol Protein an.

#### 4.6.1.2 Konjugation mit SMCC an Trägerproteine

In der ersten Reaktion reagierte Mercapto-ACGal **22** mit der Maleimidfunktion von SMCC und dann wurde die Bindung von SMCC an das Protein geknüpft (Abb. 4.23). Die Analyse der Konjugate erfolgte mittels PAGE (s. 3.1.10, S. 35), Western-Blots (s. 3.1.13, S. 38) und Gesamtmassenbestimmungen (s. 3.2.5.1, S. 47).

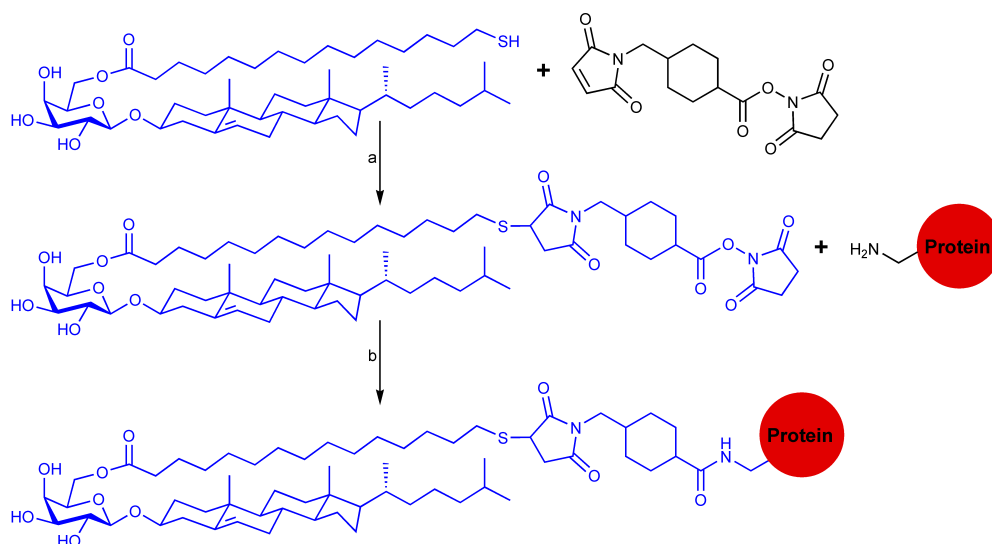


Abbildung 4.23: **Schema der Konjugation von funktionalisiertem ACGal mit SMCC an ein Trägerprotein.** a) Entschütztes  $\omega$ -mercaptotetherisiertes ACGal **22**, 1 äq. SMCC in DMF, 2,5 h bei 35 °C Schütteln. b) 1 Massen-äq. Protein einer Lösung 100 mg/ml SDS, 10 mg/ml Protein in PBS, heftiges Mischen, 16 h bei 35 °C Schütteln (s. 3.2.10.2).

**Etablierung mit BSA und Detergenzien** Nach der reduktiven Entschützung von 1 mg ACGal **15** zum freien Mercaptan **22** wurde *in situ* die Addition an die Maleimidgruppe von 1 Mol-äq. SMCC in DMF durchgeführt. Danach wurden 0,1 ml einer 10 mg/ml PBS-Lösung des Trägerproteins dazugegeben (d. h. 1 mg  $\hat{=}$  1 Massen-äq.) und alles intensiv gemischt. Die Bindung der NHS-aktivierten Carboxylgruppe des ACGal-SMCC an die freien Aminogruppen der Lysine erfolgte über Nacht bei 35 °C. Die durchgeführte PAGE und WB mit Patientenseren belegten grundsätzlich eine Bildung des Konjugates. Allerdings war die Quantifizierung schwierig, denn WB-Banden lagen teilweise auf derselben Höhe (Größe) wie BSA allein (auf der gefärbten Membran) oder die Intensität der WB-Färbung korrelierte nicht mit der Größe des Konjugates im Gel. Auch die Reproduzierbarkeit war nicht gegeben.

Hilfreich für die Optimierung des Konjugationsweges durch die Variation verschiedener Parameter war die Gesamtmassenbestimmung der Konjugate mittels MALDI-TOF (s. 3.2.5.1, S. 47). Pyridin, DMSO oder Acetonitril als Lösungsmittel für die ACGal-SMCC-Reaktion und anschließende Kopplung an BSA ergaben keine Vorteile. Wasser als Solvens des Trägerproteins – um die Löslichkeit nicht zusätzlich durch Phosphat-Salze zu reduzieren – war einer PBS-Lösung nicht überlegen. Die Verwendung von Sulfo-SMCC<sup>21</sup> – mit einer zusätzlichen Sulfonsäuregruppe an 3-NHS zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit – zeigte keine Verbesserung. Eine deutliche Reduktion der Trübung bei dem

<sup>21</sup>wie SMCC aber mit 3-Sulfo-NHS-Ester, #M6035, Sigma



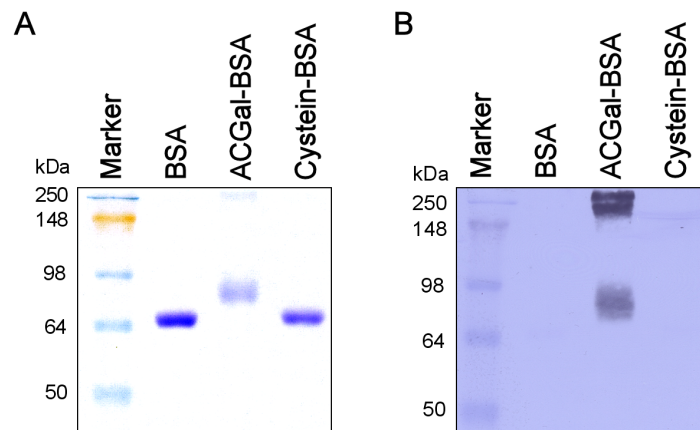


Abbildung 4.24: **Analyse der BSA-Konjugate mit SDS-PAGE und Western-Blot.** **A** Ein 12,5%iges SDS-Gel mit 1,25  $\mu\text{g}$  BSA, ACGal-BSA und Cys-BSA nach Konjugation mit SMCC in 1 % SDS durchgeführt und Coomassie gefärbt (s. 3.1.10). **B** Ein 12,5%iges SDS-Gel mit 312 ng BSA, ACGal-BSA und Cys-BSA durchgeführt und geblottet. Die Membran wurde mit Patientenserum inkubiert und die Anti-ACGal-IgG mittels HRP/ECL/Film detektiert (s. 3.1.13). Die mit Coomassie gefärbte Membran und der Film wurden mittels digitaler Bildbearbeitung übereinander gelegt.

zweiten Konjugationsschritt und Erhöhung der Anzahl der ACGal-Moleküle pro Molekül BSA brachte erst der Einsatz von Detergenzien. Der Effekt von nichtionischen Detergenzien wie Triton<sup>®</sup>X-114<sup>22</sup>, Triton<sup>®</sup>X-100<sup>23</sup>, Tween<sup>®</sup>20<sup>24</sup>, Cyclodextrin<sup>25</sup> oder *n*-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid<sup>26</sup> war weniger stark ausgeprägt gegenüber dem von ionischen Detergenzien – Natriumdeoxycholat<sup>27</sup> und Natriumdodecylsulfat (SDS). Der Einsatz von SDS führte dazu, dass die vormals trüben Reaktionslösungen nun opaleszent bis klar wurden. Durch die Verwendung der Detergenzien wurde es jedoch notwendig, diese vor der Gesamtmassenbestimmung (oder Immunisierung) aus den Proben in mehreren Ultrafiltrationszyklen zu entfernen.

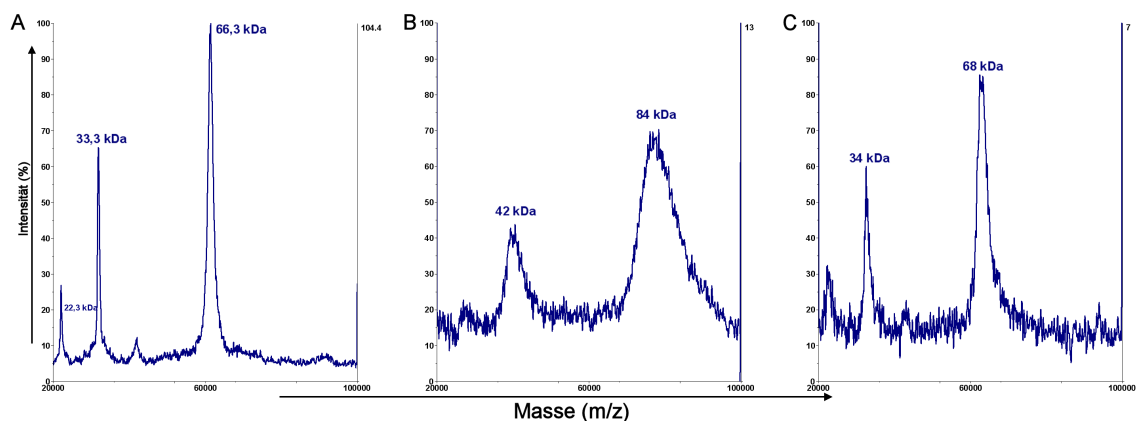


Abbildung 4.25: **Analyse der BSA-Konjugate mit MALDI-TOF-MS.** Nach Entsalzung mit ZipTips wurden **A** BSA in PBS, **B** ACGal-BSA nach Konjugation mit SMCC in 1 % SDS, **C** Cys-BSA nach Konjugation mit SMCC in 1 % SDS (s. 3.2.10.2) mit DHB auf dem Target 1:1 gemischt und die Gesamtmasse ermittelt. (s. 3.2.5.1)

<sup>22</sup> n = 7-8, #93422, Fluka

<sup>23</sup> n = 9-10, #T9284 Sigma-Aldrich

<sup>24</sup> #P7949, Sigma-Aldrich

<sup>25</sup> #28707, Fluka

<sup>26</sup> #75083, Fluka

<sup>27</sup> #71725 Fluka

Das beste Ergebnis der Konjugation wurde mit 10 % SDS (100 mg/ml) in der 10 mg/ml BSA-PBS-Lösung erzielt. Bei dieser hohen Konzentration war es trotz aufwändiger SDS-Entfernung nicht mehr möglich, ein Massenspektrum aufzunehmen. Bei einer Konjugation mit 1 % SDS in der Lösung (Abb. 4.24, S. 97) wurde für das ACGal-BSA-Konjugat die häufigste Masse bei 84 kDa gemessen (mit einer Breite des Signale von 75,5 kDa bis etwa 100 kDa) (Abb. 4.25). Bei einer BSA-Masse von 66,3 kDa entspricht diese Massendifferenz einer Substitution eines Moleküls BSA im Modalwert<sup>28</sup> 17,3 Molekülen ACGal<sup>29</sup> (bzw. einer Spannweite von 9 bis 33 ACGal pro BSA für das gesamte Signal). Für die Reaktion mit 10 % SDS kann man im direkten Vergleich im WB (Abb. 4.26, S. 98) erkennen, dass die 10 %-Bande nicht nur deutlich intensiver gefärbt, sondern auch 3-4 kDa zu höheren Massen verschoben ist. Der Modalwert der Konjugation mit 10 % SDS liegt daher bei etwa 20-21 Mol ACGal pro Mol BSA .

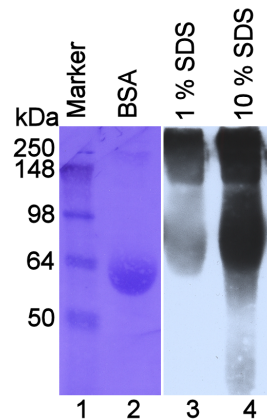


Abbildung 4.26: **Vergleich der ACGal-BSA Konjugationen mit 1 % und 10 % SDS im Western-Blot.** Ein 12,5%iges SDS-Gel mit 15  $\mu$ g BSA, ACGal-BSA der Konjugation mit 1 % SDS und ACGal-BSA der Konjugation mit 10 % SDS (s. 3.2.10.2, S. 62) durchgeführt und geblottet. Die Membran wurde mit Charité-Patientenserum (1:1000), sek. AK (1:20 000) und HRP/ECL Filme entwickelt (s. 3.1.13). Die Coomassie gefärbte Membran (1-2) ist neben dem Film (3-4) abgebildet.

**Konjugation von ACGal mit SDS an KLH** Nach diesem etablierten Verfahren wurde ACGal an KLH konjugiert (s. 3.2.10.2, S. 63), wobei das Protein am Ende der Reaktion zu mehreren Klumpen verklebt war. Weder durch vorsichtiges Vortexen, Ultraschall oder Resuspendieren mit einer Pipette konnte das Konjugat in Lösung gebracht werden, so dass es nicht aliquotier- oder applizierbar war.

**Konjugation von ACGal mit SDS an OVA** Die Konjugation von ACGal an OVA erfolgte nach dem für BSA entwickelten Verfahren. Da die Reaktion für eine maximale ACGal-Beladung von OVA mit 10 % SDS durchgeführt wurde (s. 3.2.10.2, S. 63), waren keine Gesamtmassenbestimmungen erfolgreich. Die Qualität des Konjugates konnte nur mittels PAGE und WB beurteilt werden (Abb. 4.27). Bei der oberen der beiden OVA-Banden im Gel handelte es sich um Plakalbumin<sup>30</sup>, die untere war das OVA mit 44,3 kDa. Die ACGal-OVA-Bande im Gel hatte die maximale Breite bei etwa 54-55 kDa, so dass im Mittel von 10-11 ACGal-Molekülen pro Molekül OVA auszugehen war.

<sup>28</sup>Der Modalwert ist der häufigste Wert in einer Verteilung.

<sup>29</sup> $\Delta$  molare Masse für ACGal-SMCC-substituiert = 1023,478 Da

<sup>30</sup>ein Spaltprodukt von Ovalbumin mit deutlich veränderten Eigenschaften

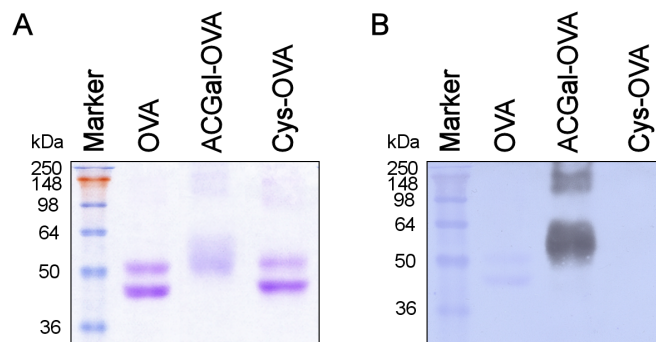


Abbildung 4.27: **Analyse der OVA-Konjugate mit SDS-PAGE und Western-Blot.** **A** Ein 16%iges SDS-Gel wurde mit OVA (2,5  $\mu\text{g}$ ), ACGal-OVA (4  $\mu\text{g}$ ) und Cys-OVA (2  $\mu\text{g}$ ) (s. 3.2.10.2, S. 63) beladen, laufen gelassen und mit Coomassie gefärbt. (s. 3.1.10), **B** Ein 16%iges SDS-Gel wurde mit 5  $\mu\text{g}$  OVA und je 250 ng ACGal-OVA sowie Cys-OVA beladen, laufen gelassen und auf eine Membran geblottet. Die Membran wurde mit den vier gepoolten Patientenseren inkubiert und die Anti-ACGal-IgG detektiert (s. 3.1.13). Die Membran wurde mit Coomassie gefärbt. Die Scans von Membran und Film wurden digital übereinander gelegt.

## 4.6.2 Immunisierung von Versuchstieren

Zur Generierung von spezifischen Anti-ACGal-AK wurden Versuchstiere immunisiert. Mäuse boten den Vorteil, dass mit ihnen LB-Tiermodelle etabliert sind und eine schützende Wirkung der Immunisierung über die Krankheitsmanifestationen beurteilt werden könnte. Bei den Kaninchen war hingegen die Injektion und Blutentnahme einfacher sowie die Serummenge deutlich größer.

### 4.6.2.1 Immunisierung von Mäusen mit nativem ACGal

Um anfangs möglichst einfach AK gegen ACGal zu erhalten, wurden C3H/HeN-Mäuse nur mit nativem ACGal und FCA i. p. immunisiert (s. 3.1.12.1, S. 37). In den Mäuseseren konnten IgG-AK mittels Dot-Blots in Schalen und Mikrotiterplatten bei Verdünnungen von 1:200 resp. 1:15 jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (ohne Abb.).

### 4.6.2.2 Immunisierung von Kaninchen mit ACGal-KLH-Konjugat

Nach der Konjugation von ACGal an gekauftes, maleimidaktiviertes KLH (s. 3.2.10.1, S. 62) wurde ein Kaninchen damit immunisiert (s. 3.1.12.2, S. 38). Im Immuneserum konnte zunächst mittels eines ACGal-ELISA (s. 3.1.17, S. 41) eine stärkere IgG-AK-Bindung gegenüber dem Nullserum gemessen werden<sup>31</sup>. In Dot-Blots (s. 3.1.14, S. 39) war aber keine spezifische Bindung von IgG-AK an ACGal nachweisbar (ohne Abb.).

### 4.6.2.3 Immunisierung von Kaninchen mit ACGal-BSA-Konjugat

Nach der Konjugation von ACGal mit SMCC an BSA (s. 3.2.10.2, S. 62) wurde ein Kaninchen mit dem ACGal-BSA-Konjugat und ein zweites mit dem Cys-BSA-Konjugat immunisiert und Serum gewonnen (s. 3.1.12.2, S. 38). In den Dot-Blots mit dem ACGal-BSA-Serum wurde ein IgG-AK-Titer gegen Palmitoyl-CGal **14** von  $\geq 4000$  festgestellt. Das Serum des mit Cys-BSA immunisierten Kaninchens wies bei einer Verdünnung

<sup>31</sup>bis zu einer Verdünnung von mind. 1:2000 lag die Absorption des Immuneserums deutlich über der jeweiligen Absorption + doppelten Standardabweichung des Nullserums

von  $\leq 1:1000$  in Dot-Blots erwartungsgemäß keine Reaktivität gegenüber ACGal auf. Das ACGal-BSA-Serum wurde eingehend mit nativen und synthetischen Glycolipiden charakterisiert (s. 4.6.3, S. 100). In der vergleichenden Immunofluoreszenz beider Seren gab es aufgrund der gegen das Trägerprotein gerichteten AK große Probleme (s. 4.7, S. 102).

#### 4.6.2.4 Immunisierung von Kaninchen mit ACGal-OVA-Konjugat

Um die in der Immunofluoreszenz störenden Anti-BSA-AK im Serum zu vermeiden, wurden zwei Kaninchen mit ACGal-OVA- sowie Cys-OVA-Konjugaten (s. 3.2.10.2, S. 63) immunisiert (s. 3.1.12.2, S. 38) und nach der Tötung Serum gewonnen. Im ACGal-OVA-Serum betrug die mittels Dot-Blots ermittelten IgG-AK-Titer gegen Oleoyl-CGal **13** und Palmitoyl-CGal **14**  $\geq 128\ 000$  bzw.  $\geq 16\ 000$  (Abb. 4.29, S. 102). Das Cys-OVA-Kontrollserum reagierte bei einer Verdünnung von  $\leq 1:1000$  mit keinem der synthetischen Glycolipide. Das ACGal-OVA-Serum wurde mit allen synthetischen ACGal-Derivaten untersucht (s. 4.6.3.2, S. 101) und zur Immunofluoreszenz verwendet (s. 4.7, S. 102).

#### 4.6.2.5 Immunisierung von Mäusen mit ACGal-OVA-Konjugat

Um nach den erfolgreichen Immunisierungen von Kaninchen auch mit Mäusen etablierte LB-Tiermodelle nutzen zu können, wurden Mäuse mit ACGal-OVA- und Cys-OVA-Konjugat (s. 3.2.10.2, S. 63) sowie PBS als Kontrolle i. p. immunisiert (s. 3.1.12.1, S. 37)). Nach Erstinjektion und drei Boosterungen konnten bei den ACGal-OVA immunisierten Tieren in Dot-Blots mit einer Serenverdünnung von 1:25 keinerlei IgG gegen Palmitoyl-CGal **14** beobachtet werden. Lediglich für Hexanoyl-CGal **17** wurde mit derselben Methode ein Titer von  $\geq 50$  bei deutlichem Hintergrund ermittelt<sup>32</sup> (ohne Abb.). Die erzielten Titer sind für eine weitere Verwendung der Mausseren zu gering.

### 4.6.3 Erkennung der Glycolipide durch Kaninchenserum

Die Seren der mit ACGal-BSA- und ACGal-OVA-Konjugaten immunisierten Kaninchen wurden mittels Dot-Blots untersucht. Nach der Bestätigung einer erfolgreichen Generierung spezifischer Anti-ACGal-AK wurden die AK mit den nativen und synthetischen Glycolipiden hinsichtlich ihres Erkennungsmusters (s. 4.6.3.1) und ihres Titers (s. 4.6.3.2, S. 101) charakterisiert. Es wurden dabei sowohl Gemeinsamkeiten mit als auch Unterschiede zu den Humanseren (s. 4.5.5, S. 90) festgestellt.

#### 4.6.3.1 Ermittlung der minimalen Erkennungsstruktur der Kaninchenserum

Die Untersuchung des Epitops der Kaninchen-AK war ähnlich der bei den Humanseren angewandten Vorgehensweise (s. 4.5.5.2, S. 91). Auf zwei Membranen wurden die dort benutzten Substanzen genauso aufgebracht und zum einen mit dem ACGal-BSA-Immuserum und als Kontrolle mit dem Cys-BSA-Serum (s. 4.6.2.3, S. 99) inkubiert und die IgG-AK immungefärbt (s. 3.1.14.2, S. 40).

<sup>32</sup>bei Butanoyl-CGal **18** lag der Titer zwischen 25 und 50

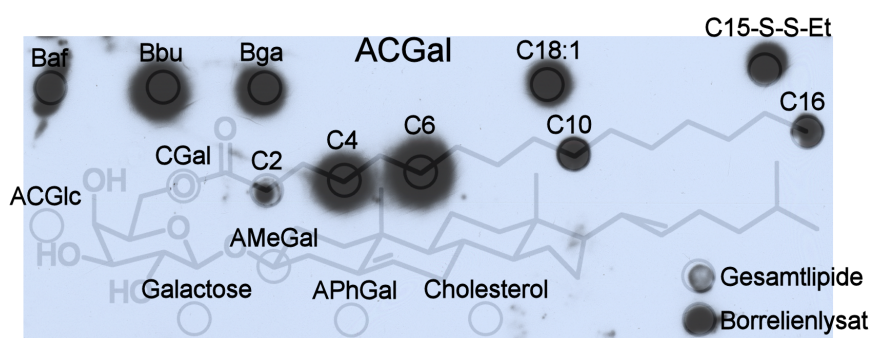


Abbildung 4.28: **Schablonen-Dot-Blot der Lipide mit Kaninchen-Immunsereum.** Analog der Abb. 4.19 wurden die Lipide auf eine Membran aufgebracht. Diese wurde mit dem Serum des ACGal-BSA immunisierten Kaninchens (1:2000, 2 h) und sekundärem AK (1:50 000) inkubiert und mit dem ECL-System Filme belichtet (s. 3.1.14.2). Abgebildet ist eine digitale Überlagerung der Schablone mit einem Film (Belichtung: 8 min).

Das Serum des mit dem Cys-BSA-Konjugat immunisierten Kontrollkaninchens erkannte lediglich das Borrelienlysat aufgrund des darin enthaltenen BSA und der Anti-BSA-AK im Serum (ohne Abb.). Das ACGal-BSA-Serum wies fast die gleiche Spezifität wie das LB-Patientenserum auf (Abb. 4.28): Alle nativen Substanzen mit ACGal wurden erkannt – Borrelienlysat<sup>33</sup>, Gesamtlipide und die isolierten ACGal-Fractionen aus Baf, Bbu, Bga. Bei der Erkennung der synthetischen ACGal-Derivate gab es hinsichtlich der Fettsäuren gegenüber den Humansen (s. 4.5.5.1) den kleinen Unterschied, dass die Kaninchenserum auch das ACGal mit Essigsäure (19) erkannten. Gleich wie bei den LB-Patientenserum wurden aber das ACGlc von Bhe, die beiden cholesterolfreien Glycolipide AMeGal 20 und APhGal 21 sowie freies Cholesterol und freie Galactose von diesen AK nicht erkannt. Dagegen erkannte das ACGal-OVA-Serum (s. 4.6.2.4, S. 100) bei derselben Verdünnung von 1:2000 auch APhGal und bei 1:1000 sogar zusätzlich AMeGal (Abb. 4.29, S. 102) und zeigte somit ein breiteres Erkennungsspektrum.

#### 4.6.3.2 Titerbestimmung der synthetischen Lipide mit Kaninchenserum

In den Schablonen-Dot-Blots (Abb. 4.28) fiel auf, dass für das Kaninchenserum die Spots der ACGal-Derivate mit kurzen FA gegenüber den länger-kettigen Derivaten außergewöhnlich groß waren. Zur Untersuchung dieses Phänomens erfolgte die vergleichende Bestimmung der Titer der synthetischen Lipide in Dot-Blots. Dazu wurden die einzelnen Glycolipide auf Membranstreifen pipettiert, mit den ACGal-OVA-Kaninchenserum in zehn seriellen 1:2 Verdünnungen (1:1000-1:512 000) inkubiert und die IgG-AK detektiert (s. 3.1.14.3, S. 40).

In diesen Versuchen zeigte sich (Abb. 4.29, S. 102), dass die Titer der einzelnen Glycolipide stark variierten. Die größten Titer mit 1:512 000 wiesen die kurzkettigen ACGal-Derivate mit Butter- 18 und Hexansäure 17 auf. Danach folgte das Ölsäurederivat 13 mit einem Titer von 1:128 000. Mittlere Titer von 1:16 000 wurden bei ACGal mit Palmitinsäure 14, dem funktionalisierten ACGal 15 und dem kurzkettigsten ACGal 19 gefunden. Mit dem (nichtacylierten) CGal 4 reagierten die AK bei  $\leq 1:1000$  hingegen gar nicht. Die cholesterolfreien ACGal-Derivate hatten maximale Titer von  $\geq 4000$  bei

<sup>33</sup>Das Lysat wurde jedoch – wie für die Kontrolle beschrieben – schon allein aufgrund des enthaltenen BSA aus dem Kulturmedium von den AK gegen das Trägerprotein BSA erkannt.

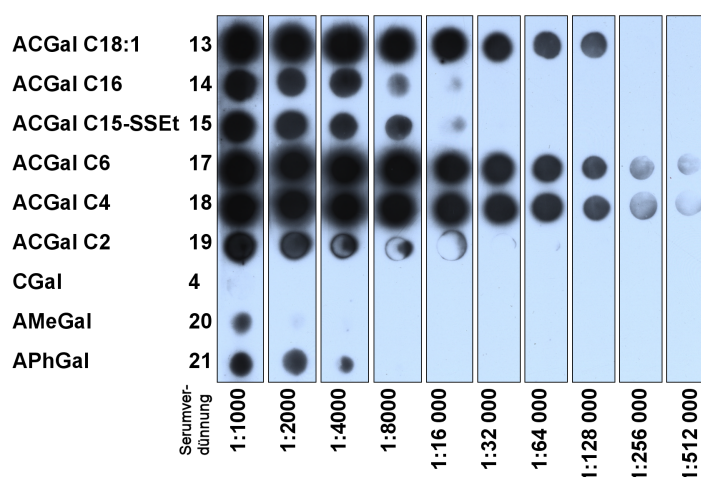


Abbildung 4.29: **Titerbestimmung der synthetischen Glycolipide mittels Dot-Blot mit Kaninchenserum.** Auf PVDF-Membranen wurden je 1  $\mu\text{g}$  der Glycolipide 4, 13-15, 17-21 aufgebracht, 17,5 h bei 4  $^{\circ}\text{C}$  mit zehn Verdünnungen des Serums des mit ACGal-OVA immunisierten Kaninchens inkubiert und mit sekundärem Anti-IgG-AK (1:50 000) und ECL/Film immungefärbt (s. 3.1.14.3, S. 40). Aus dem gescannten Film (Belichtungszeit: 41 h) sind Ausschnitte entsprechend den zehn Membranstreifen abgebildet.

APhGal **21** und  $\geq 1000$  bei AMeGal **20**. Die in dem ACGal-BSA-Serum bestimmten Titer waren nicht ganz so hoch, zeigten aber die gleichen Auffälligkeiten (ohne Abb.). Auch dort wiesen die Derivate **17** und **18** die höchsten Titer von  $\geq 128\,000$  bzw.  $\geq 64\,000$  auf und waren in diesem Experiment 32-mal größer als der Titer von **14** mit  $\geq 4000$ .

## 4.7 Indirekte Immunofluoreszenz (IF)

Es sollte untersucht werden, ob das ACGal-Epitop in ganzen Borrelien so exponiert ist, dass die spezifischen Anti-ACGal-AK daran binden können. Dazu wurden die Seren der mit Antigen- oder Kontrollkonjugat immunisierten Kaninchen (s. 4.6.2, S. 99) mittels indirekter Immunofluoreszenz (IF) verglichen (s. 3.1.20, S. 42). Die Borrelien wurden durch DAPI<sup>34</sup>, einem sich an die DNA anlagernden Fluoreszenzfarbstoff, unspezifisch angefärbt (blau). Die an die Borrelien gebundenen Serum-AK wurden durch Carbocyanin 3 (Cy3)-markierte sekundäre AK detektiert (orange).

Bei der ersten erfolgreichen Immunisierung war BSA als Trägerprotein verwendet worden (s. 4.6.2.3, S. 99), jedoch war mit diesen Antiseren in der IF trotz Variation zahlreicher Parameter kein Unterschied zwischen Antigen- und Kontrollserum zu sehen (ohne Abb.). Da im Kulturmedium der Borrelien (s. 3.1.2, S. 32) BSA mit 50 mg/ml enthalten war, störten vermutlich die gegen das Trägerprotein gerichteten Anti-BSA-AK. Weder ein Versuch, das BSA durch gutes Waschen der Borrelien zu entfernen, noch die Entfernung der Anti-BSA-AK aus den Seren durch eine Voradsorption an lösliches BSA oder durch eine BSA-Affinitätschromatographie (s. 3.1.18, S. 42) zeigten eine Verbesserung. In Dot-Blots wurde ersichtlich, dass die BSA-Voradsorption oder die Affinitätschromatographie zwar zu einer kompletten Reduktion der BSA-Reaktivität führten, sich aber auch die ACGal-Reaktivität des Serums deutlich reduzierte. Außerdem wurde bei einer zur Kompensation notwendigen längeren Inkubations- oder Belichtungszeit wieder

<sup>34</sup>4',6-Diamidin-2-phenylindol

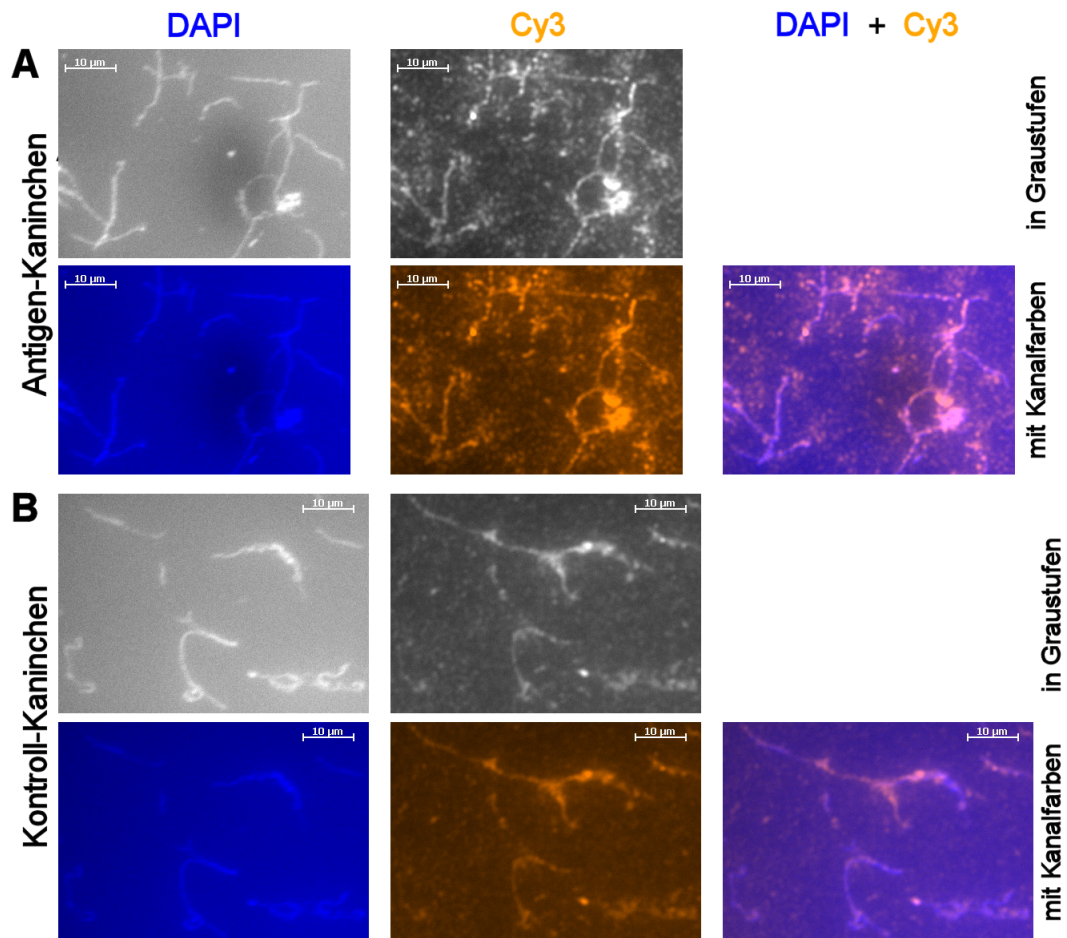


Abbildung 4.30: **Indirekte Immunofluoreszenz mit den Seren der OVA-immunisierten Kaninchen.** Auf einem OT wurden fixierte Bbu 1 h mit 5%iger BSA-Lsg. blockiert, mit dem 1:1000 in BSA-Lsg. verdünnten Serum des **A** mit ACGal-OVA- oder des **B** mit Cys-OVA-Konjugat immunisierten Kaninchens 14 h bei 4 °C inkubiert, mit dem 1:600 in BSA-Lsg. verdünnten sekundären Cy3-konjugierten AK mit 7,5 nM DAPI 1,5 h inkubiert, 15 min bei 50 °C getrocknet und mit Eindeckmedium ohne DAPI eingedeckt. Die Fotos wurden mit 400-facher Vergrößerung bei Belichtungszeiten von 2,1 s (DAPI) bzw. 1,97 s (Cy3) aufgenommen (s. 3.1.20, S. 42). Abgebildet sind die DAPI-Färbung (links), die Cy3-Färbung (Mitte) und beide übereinander gelegt (rechts); in der jeweils ersten Reihe als Graustufen (Helligkeitswerte) und in der zweiten Reihe mit den Kanalfarben.

BSA von verbliebenen AK detektiert. Danach wurde versucht, die Borrelien in einem BSK-H-Spezialmedium mit Kaninchenserumalbumin statt BSA zu kultivieren. Bei der schrittweisen Medienadaptierung (s. 3.1.3, S. 32) zeigte sich, dass die Borrelien mit steigendem Anteil des BSA-freien Mediums immer langsamer proliferierten und schließlich gar nicht mehr wuchsen. Mit diesen fast BSA-frei kultivierten Borrelien gelang die IF auch nicht. Ein Versuch der Permeabilisierung der Membran mittels Triton X100 zeigte im IF-Test keinen deutlicheren Unterschied zwischen den Kaninchenserum.

Da AK gegen BSA und Ovalbumin (OVA) nicht kreuzreagieren, wurden die Konjugationen von ACGal und Cys mit OVA als Trägerprotein wiederholt (s. 4.6.1.2, S. 98). Mit diesen OVA-Konjugaten wurden zwei Kaninchen immunisiert und die Seren gewonnen (s. 4.6.2.4, S. 100). Das Antigen- und das Kontrollserum wurden in der IF auf demselben OT und unter identischen Versuchsbedingungen untersucht (Abb. 4.30, S. 103). Der Hintergrund der DAPI-Färbung war zwar deutlich sichtbar, aber die Borrelien konnten klar identifiziert werden. Die Anzahl der Zellen auf dem OT und deren Morphologie

waren gut. Die Cy3-Färbung wies einen geringeren Hintergrund auf, aber teilweise waren undefinierte Partikel schwach gefärbt („Schmutz“). Auch waren die Borrelien in der Cy3-Färbung mit dem ACGal-OVA-Serum nicht so leuchtend, wie man das von etablierten IF-Tests mit monoklonalen AK (z. B. Anti-OspA) kennt. Bei diesem Antigeneserum waren aber alle in der DAPI-Färbung sichtbaren Borrelien auch in Cy3 angefärbt (Abb. 4.30A). Beim Kontrollserum wiesen die Borrelien in der Cy3-Färbung dagegen nur eine leichte Autofluoreszenz auf oder einige wenige waren auch schwach angefärbt (Abb. 4.30B). Beim Vergleichen des Gesamtbildes unter dem Mikroskop war das spezifische Cy3-Signal der Borrelien beim Antigeneserum aber klar, jedoch nicht sehr deutlich, stärker als beim Kontrollserum. Aufgrund dieses Unterschiedes kann man schon sagen, dass die Anti-ACGal-AK an ganze Borrelien binden, wobei die Qualität der IF noch nicht ganz zufriedenstellend ist und vor einem endgültigen Ergebnis verbessert werden muss.



# Kapitel 5

## Diskussion

Die vorliegende Arbeit enthält die erste vollständige qualitative und die erste quantitative Analyse der Lipide von *B. burgdorferi* s. s.. Zudem ist es das erste Mal, dass vergleichend die Lipide anderer Arten aus der Gruppe *B. burgdorferi* sensu lato untersucht und die Struktur des ACGal-ähnlichen Moleküls in *B. hermsii* chemisch vollständig analysiert wurden (s. 5.1). Der von mir etablierte effiziente Syntheseweg des wichtigsten Glycolipides ACGal erlaubte die Synthese einer Glycolipidbibliothek und erstmals Studien zum antigenen Epitop von ACGal. Daraus folgend wurde ein funktionalisiertes ACGal an verschiedene Trägerproteine zu einem semisynthetischen Impfstoffkandidaten konjugiert (s. 5.2, S. 109). Damit konnten erstmals Versuchstiere erfolgreich immunisiert werden. Die generierten Antikörper (AK) wurden vergleichend mit denen der LB-Patientenseren mit den nativen und synthetischen Glycolipiden analysiert. Außerdem wurde die biologische Aktivität der Glycolipide in Bezug auf Zellen untersucht (s. 5.3, S. 114). Durch diese Experimente konnten Informationen zum Einsatz der Glycolipide, speziell ACGal, in der Serodiagnostik und als neuartiger Impfstoff gegen Lyme-Borreliose gewonnen werden (s. 5.4, S. 125).

### 5.1 Analytik der Borrelienlipide

Die von mir mittels Butanolextraktion isolierten Gesamtlipide von vier Borrelienarten stellen 25-29 % des Trockengewichtes der Borrelien dar (s. Tab. 4.2, S. 73). Dies stimmt mit publizierten Angaben (25-30 %) für mittels der Bligh-Dyer-Methode extrahierte Lipide aus *B. burgdorferi* s. s. überein (Hossain u. a., 2001). Die wesentlichen neuen Aspekte der analytischen Untersuchungen waren neben der Einbeziehung von zehn Borrelienarten die Anwendung einer sensitiveren Färbemethode für die Dünnschichtchromatographie (s. 4.1.1.1, S. 66), durch die mehr Lipide visualisiert werden konnten, und die Einführung einer vollständigen säulenchromatographischen Trennung und Quantifizierung (s. 4.1.2.2, S. 73), durch die die Strukturen aller acht relevanten Lipide analysiert werden konnten (Abb. 4.4, S. 72). Alle neun untersuchten Arten der Gruppe *B. burgdorferi* s. l. weisen dabei ein sehr ähnliches Lipidprofil auf und unterscheiden sich bei ihren Glycolipiden nur minimal in den Anteilen (s. 4.1.2.1, S. 72).

### 5.1.1 Glycolipide

Nach der Isolierung der Glycolipide erfolgte die Identifizierung dieser Strukturen (Abb. 4.1, S. 66) mittels moderner Analytikmethoden wie GLC/MS, NMR und MALDI-TOF. Die Glycolipide haben in den untersuchten LB-Erregern einen Anteil von 45-51 % und in *B. hermsii* von immerhin noch 39 % der Gesamtlipide. Zwar stimmt dies nominell mit den 50 % für *B. burgdorferi* s. s. bei Hossain u. a. (2001) überein, jedoch wurden dort nur zwei Glycolipide als solche betrachtet und nur eines (MGalD) chemisch korrekt identifiziert. Erst später wurden in *B. burgdorferi* s. s. zwei weitere (ACGal und CGal) von insgesamt vier vorhandenen Glycolipiden von unserer Arbeitsgruppe aufgeklärt (Schröder u. a., 2003). Das vierte Glycolipid (CGlc) wurde von mir zuerst beschrieben (Stübs u. a., 2009). Eine Besonderheit der Borrelien ist die Synthese von Sterylglycosiden (s. 1.6.3.1, S. 19) mit Cholesterol des Wirtes oder des Mediums – nur eines der Glycolipide enthält kein Steroid. Aufgrund dieser Glycosylierung sind es sehr seltene wirtsfremde Strukturen, die sogar 11-13 % der gesamten Borrelienmasse (ohne H<sub>2</sub>O) ausmachen. Für die Immunologie sind daher sie von großem Interesse.

#### 5.1.1.1 Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ACGal)

Das Glycolipid Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-galactopyranosid wurde von mir chemisch (s. 4.1.1.3, S. 67 und 4.1.2.3, S. 74) und chemisch/serologisch (s. 4.4.4, S. 83) in neun Arten der Gruppe *B. burgdorferi* s. l. zweifelsfrei nachgewiesen. Unter den analysierten Arten befanden sich alle fünf humanpathogenen, die drei möglicherweise humanpathogenen Arten und eine nichtpathogene Art mit zusammen drei unterschiedlichen OspA-Serotypen (s. 1.2.2, S. 7). Da ACGal in dem nahe verwandten Rückfallfiebererreger *B. hermsii* nicht vorkommt, stellt es eine für *B. burgdorferi* s. l. und somit LB-Erreger fast einzigartige Struktur<sup>1</sup> dar, die von AK hochspezifisch erkannt wird (s. 5.3.2.2, S. 117).

ACGal macht in den drei LB-Erregern 42-47 % der Glycolipide sowie 19-23 % der Gesamtlipide aus (s. 4.1.2.2, S. 73) und ist neben den Phospholipiden das mengenmäßig dominante Lipid. Mit einem Anteil von 5-6 % am Trockengewicht der Borrelien ist es eines der häufigsten Moleküle in Borrelien überhaupt.

#### 5.1.1.2 Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid (CGal)

Das Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid ist das dritthäufigste Glycolipid und wurde auf den DC mit vergleichbaren Mengen in allen neun *B. burgdorferi* s. l. Arten, aber nicht in *B. hermsii* nachgewiesen. Es stellt die nichtacylierte Unterstruktur von ACGal dar (s. 4.1.1.6, S. 69), ist jedoch mit seinem Anteil von 10-12 % an den Gesamtlipiden ( $\approx$  50 % von ACGal) und etwa 3 % der Zellmasse (s. Tab. 4.2, S. 73) nicht nur eine biosynthetische Vorstufe, sondern ein eigenständiger Bestandteil der Membranen.

Die Aktivität einer Cholesterol- $\beta$ -Glycosyltransferase konnte in einem Experiment durch die Umsetzung von UDP-Galactose mit Cholesterol zum CGal mittels Radioaktivität nachgewiesen werden (s. 4.2, S. 77). Dieser Sachverhalt wurde später kurz von Östberg u. a. (2007) erwähnt. Weitere Versuche oder eine geplante Klonierung der möglichen Gene zur Untersuchung des Enzyms wurden nicht mehr durchgeführt.

<sup>1</sup>ACGal wurde bisher nur in kleinen Anteilen in einer Pflanze nachgewiesen (s. 1.6.3.1, S. 19).

### 5.1.1.3 Cholesteryl- $\beta$ -D-glucoopyranosid (CGlc)

Das Cholesteryl- $\beta$ -D-glucoopyranosid wurde erstmals für *B. burgdorferi* beschrieben, wobei das Molekül bereits aus verschiedenen anderen Organismen isoliert worden war (s. 1.6.3.1, S. 19). Die Identifizierung der Struktur erfolgte durch die Summe verschiedener Daten, hätte jedoch durch ein besseres NMR-Spektrum unter Anwendung von Vorsättigung vermutlich zweifelsfrei geführt werden können (s. 4.1.1.5, S. 68). Der Anteil von CGlc an den Gesamtlipiden ist mit 2-3 % etwa fünfmal geringer als der von CGal. Dieses Ergebnis korreliert mit einem etwa sechsfach geringeren Umsatz der Glycosyltransferase mit UDP-Glc als mit UDP-Gal (s. 4.2, S. 77).

Es ist wahrscheinlich, dass beide Cholesteryl- $\beta$ -D-glycoside in *B. burgdorferi* durch dasselbe Enzym synthetisiert werden, das eine unvollständige Substratspezifität aufweist. Da die phylogenetisch ältere *B. hermsii* nur CGlc synthetisiert, kann man spekulieren, dass beide Bakterien homologe Glycosyltransferasen aufweisen, deren Variante in *B. burgdorferi* s. l. durch Mutationen eine zunehmende Spezifität für Galactose entwickelt hat.

### 5.1.1.4 Mono- $\alpha$ -D-galactosyldiacylglycerol (MGalD)

Das Mono- $\alpha$ -D-galactosyldiacylglycerol ist das zweithäufigste Glycolipid und war in allen zehn untersuchten Borrelienarten – d. h. auch in *B. hermsii* – nachweisbar (s. 4.1.1.4, S. 68). In *B. burgdorferi* s. l. weist es einen Anteil von 13-14 % an den Gesamtlipiden und 3,5-3,7 % am Zellrockengewicht auf, während diese Anteile bei *B. hermsii* bei 9 bzw. 2,6 % liegen (s. Tab. 4.2, S. 73). Das Gen für die MGalD synthetisierende  $\alpha$ -Galactosyltransferase (*mgs*, TIGR BB0454) wurde in *B. burgdorferi* s. s. identifiziert und Homologien zu Enzymen in grampositiven Bakterien erwähnt (Östberg u. a., 2007). In der Tat wurde MGalD in weiteren Bakterien gefunden (s. 1.6.4, S. 19), was die Bedeutung dieses AG für die Serodiagnostik mindert.

### 5.1.1.5 6-O-acyliertes Cholesteryl- $\beta$ -D-glucoopyranosid (ACGlc)

Von Livermore u. a. (1978) wurde für *B. hermsii* basierend auf einer GLC-Analyse ein acyliertes Cholesterylglucosid genannt, jedoch blieben weitere Angaben wie die anomere Konfiguration oder die Konnektivität offen. Die von mir mittels NMR (s. Tab. 4.3, S. 75) durchgeführte vollständige und zweifelsfreie Identifizierung dieser aus *B. hermsii* isolierten Struktur als 6-O-acyliertes Cholesteryl- $\beta$ -D-glucoopyranosid stellt auch die Erstbeschreibung in Bakterien dar (s. 4.1.2.4, S. 74). Nur für wenige andere Organismen überhaupt wurde ACGlc mit  $\beta$ -Konfiguration erwähnt (s. 1.6.3.1, S. 19). Hinsichtlich der FA weist dieses Molekül eine Mikroheterogenität auf, die von den im Kulturmedium vorhandenen FA abhängt (Abb. 4.6, S. 76). In *B. hermsii* ersetzt ACGlc mit einem identischen Anteil von 23 % der Gesamtlipide praktisch das in *B. burgdorferi* s. l. gefundene ACGal.

Aufgrund der Biosynthese von CGlc in *B. burgdorferi* könnte dieses dort in geringen Mengen ebenfalls zum ACGlc acyliert werden. Ein Nachweisversuch wurde nicht geführt, jedoch gibt es verschiedene Hinweise darauf. Auf den durchgeführten DC von *B. burgdorferi* würde ACGlc, das leicht höher läuft als ACGal, vermutlich von dem relativ langgezogenen Fleck von ACGal überdeckt – nur bei *B. afzelii* gab es einen kleinen

Schatten (Abb. 4.4, S. 72). In der GLC der drei LB-Borrelien gibt es neben dem Signal für Gal (Retentionszeit 16,67 min) ein kleines weiteres Signal (16,83 min), das jedoch nicht exakt mit dem Glc-Signal (16,91 min) übereinstimmt (Abb. 4.2, S. 68). Von Östberg u. a. (2007) wurde *B. burgdorferi* in Anwesenheit von radioaktiver Glc kultiviert und auf den DC der extrahierten Lipide ein – von ihm nicht identifiziertes – Lipid X oberhalb von MGalD gefunden<sup>2</sup>. Allerdings sind die Laufmittel so ungünstig gewählt, dass ein optischer Vergleich mit ACGal unmöglich ist. Theoretisch könnte eine Epimerase das radioaktive Glc in Gal konvertieren, dagegen spricht jedoch, dass *B. burgdorferi* zwar mit Glucose und Mannose, aber nicht mit Galactose als Energiequelle wächst (von Lackum und Stevenson, 2005). Ein einfacher Vorversuch, für den jedoch eine größere Menge natives ACGal zerstört werden müsste, wäre die basische Deacylierung von ACGal sowie die Trennung von entstandenem CGal und CGlc auf den DC.

## 5.1.2 Neutral- und Phospholipide

Bei den Neutral- und Phospholipiden handelt es sich – selbst wenn sie von *B. burgdorferi* synthetisiert oder modifiziert wurden – sämtlichst um endogene Strukturen des Wirtes. Sie haben für immunologische Betrachtungen daher keine Bedeutung.

### 5.1.2.1 Neutrallipide

Die Neutrallipide wurden bisher dem Medium zugeschrieben und nicht weiter untersucht (Schröder u. a., 2003). Sie wurden nun als Cholesterol und Cholesterylester identifiziert (s. 4.1.1.7, S. 70). Das Cholesterol ist mit einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  bzw. einem Anteil von 2,4 ppm an den Feststoffen im BSK-H-Medium<sup>3</sup> enthalten. Cholesterylester sind unter den definierten Zutaten nicht explizit genannt und gelangen vermutlich durch das Kaninchenserum ins Medium; eventuell werden sie zum Teil durch *B. burgdorferi* selbst synthetisiert (s. 4.2, S. 77).

Die Anteile der Neutrallipide an den Gesamtlipiden variieren stärker unter den Borrelienarten. Bei *B. burgdorferi* s. s. und *B. afzelii* machen beide Substanzen jeweils etwa 2 % der Gesamtlipide bzw. 0,5 % des Zellrockengewichtes aus (s. 4.1.2.2, S. 73). Für Cholesterol entspricht dieser Anteil (etwa 5000 ppm) einer Anreicherung um den Faktor  $\approx 2000$ . Es handelt sich daher nicht um eine Kontamination, sondern das Cholesterol muss auch Bestandteil der Membranen sein. Von Östberg u. a. (2007) wurde Cholesterol in der Zellwand ebenfalls erwähnt.

### 5.1.2.2 Phospholipide

In *B. burgdorferi* s. s. wurden Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylglycerol (PG) bereits von Belisle u. a. (1994) mittels Standards und von Hossain u. a. (2001) mittels Massenspektrometrie identifiziert, aber in späteren Studien zu Lipiden gar nicht oder unvollständig berücksichtigt. In dieser Arbeit wurden beide Strukturen mittels NMR bestätigt (s. 4.1.1.8, S. 71) und in allen vier chemisch untersuchten Arten nachgewiesen.

<sup>2</sup>Jedoch wurden bei der Kultivierung mit radioaktiver Gal oder Glc weder Signale von CGal noch von CGlc gefunden.

<sup>3</sup>lt. Datenblatt der Fa. Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/b3528dat.pdf>, Zugriff: 12. April 2010

Die quantitative Analyse ergab für PC und PG zusammen Anteile von 43-54 % an den Gesamtlipiden (s. Tab. 4.2, S. 73) und damit deutlich mehr als die publizierten 22 %, die auf einer densitometrischen Abschätzung beruhten (Hossain u. a., 2001). Die beiden Lipide stellen somit 11-16 % der gesamten Borrelientrockenmasse dar. Die Gene der entsprechenden Synthesen wurden bereits von Wang u. a. (2004) identifiziert – Phosphatidylcholinsynthase (*pcs*, BB0249) und Phosphatidylglycerolphosphatsynthase (*pgs*, BB0721).

## 5.2 Synthese der Glycolipide und Konjugation

Durch die Synthese von Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ACGal) (Abb. 5.1, S. 110) sollte sowohl dessen Antigenität bewiesen als auch zwecks Immunisierung eine Konjugation an Trägerproteine ermöglicht werden. Für die dazu erforderliche Funktionalisierung von ACGal außerhalb des antigenen Epitops wurde zunächst anhand einer Glycolipidbibliothek die von AK minimal erkannte Struktur definiert (s. 5.3.5, S. 121).

### 5.2.1 Synthese von acyliertem Cholesterylgalactosid

Die Synthese von ACGal sollte möglichst effizient durchgeführt werden. Dazu wurde im ersten Schritt das Cholesterol glycosyliert, um im zweiten Schritt bei der Acylierung hinsichtlich der Fettsäure flexibel zu bleiben. Für die Acylierung sollte die erhöhte Reaktivität der primären (6-*O*) gegenüber den sekundären Hydroxylgruppen (2-, 3-, 4-*O*) ausgenutzt und ohne Schutzgruppen gearbeitet werden. Rein chemische Synthesewege wurden von Pozsgay u. a. (2005) kurz vor und von Kulkarni und Gervay-Hague (2008) nach meinen Synthesen publiziert.

#### 5.2.1.1 Glycosylierung des Cholesterols zum CGal

Anstelle der Koenigs-Knorr-Methode, die von Iga u. a. (2005) und Pozsgay u. a. (2005) mit 24 % Ausbeute angewendet wurde, kam die Trichloracetimidat-Methode (Schmidt und Michel, 1980) mit Cholesterol als Aglycon zum Einsatz (Abb. 4.12, S. 85). In vier Stufen wurde ausgehend von Pentaacetylgalactose diastereospezifisch über das  $\alpha$ -Trichloracetimidat **2** unter Inversion des anomeren Zentrums das Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid **4** (CGal) synthetisiert (s. 4.5.1, S. 84). Die Gesamtausbeute der Reaktionen betrug 65 %. Jedoch wurden bei der chromatographischen Reinigung des Endproduktes aufgrund dessen sehr schlechter Löslichkeit<sup>4</sup> nur 54 % zurückgewonnen (effektive Ausbeute insgesamt somit 35 %). Zur Vermeidung dieses Verlustes wäre es ratsam, noch länger zu entschützen (z. B. 24 h) und dann ohne Aufreinigung die Acylierung mit dem Rohprodukt durchzuführen.

Auf einem neuen Weg wurde von Kulkarni und Gervay-Hague (2008) CGal in vier Stufen über per-*O*-TMS-Galactosyljodid mit 56 % Ausbeute aber noch 10 %  $\alpha$ -Anomer erhalten. Bei dieser und der Koenigs-Knorr-Methode werden aber zur Glycosylierung Schwermetallsalze verwendet, die mit der von mir genutzten Methode ohne Einschränkungen bei Ausbeute und Anomerenreinheit vermieden wurden.

---

<sup>4</sup>CGal ist praktisch nur in Pyridin gut löslich.

### 5.2.1.2 Regioselektive Acylierung des CGal

Die regioselektive Acylierung an der 6-*O*-Position der Galactose wurde zunächst auf chemischem Weg versucht (s. 4.5.2.1, S. 86). Die Veresterung von freier oder aktivierter Palmitinsäure mittels Carbodiimid (DCC) bzw. Katalysator (DMAP) ergab jedoch keinen Reaktionsumsatz (Kasai u. a., 1981; Xia und Hui, 1995). Dagegen führte die Veresterung mit Carbodiimid (EDC) und DMAP zu einer unerwünschten Mehrfachacylierung, die auch durch Veränderung der Carbodiimide und der Reaktionsbedingungen nicht gemindert werden konnte. Die Trennung des Gemisches erschien wegen des geringen Anteils des 6-*O*-Produktes nicht sinnvoll. Über eine Mehrfachacylierung von ungeschütztem  $\beta$ -Sitoseryl- $\beta$ -D-glucosid berichtete auch Kiribuchi u. a. (1967), der dennoch die Trennung mit 12 % Ausbeute durchgeführt hatte. Später wurde von Kulkarni und Gervay-Hague (2008) die 6-*O*-Acylierung von CGal mit freier Palmitinsäure doch mit DCC/DMAP ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Pyridin, 0 °C/RT, 2 d) beschrieben. Die Ausbeute betrug 43 %, jedoch wurden überhaupt keine Angaben zur erzielten Regioselektivität oder zu Nebenprodukten gemacht.

Erfolgreich war die für CGal adaptierte enzymkatalysierte Acylierung von Glucosiden mittels Lipasen nach Gotor und Pulido (1991) (Abb. 4.13, S. 86). Acetonoxim diente zur Aktivierung der Fettsäuren, deren Ester sich leicht mit EDC und katalytischen Mengen DMAP in 85-97 % Ausbeute herstellen ließen. Die Umesterung an CGal wurde mit Amano Lipase PS aus *B. cepacia* bei 50 °C in Pyridin über 8-10 Tage durchgeführt (s. 4.5.2.2, S. 86). Es wurden ausschließlich die 6-*O*-acylierten CGal-Derivate erhalten. Es gab keine Nebenprodukte und auch die Edukte (CGal, Acetonoximester) wurden nicht degradiert. Bei der Säulenchromatographie konnten so nicht umgesetzte Edukte wiedergewonnen werden. Da weder die Edukte noch die Produkte aufgrund ihrer Hydrophobizität auf der Standard-LC/MS (RP C-18/C-8) liefen, konnte der Reaktionsumsatz nicht auf physikalischen Messmethoden basierend verfolgt werden. Auf den DC schien es, als ob die gegenüber der Literaturangabe (3 d) verlängerte Reaktionszeit und die Zugabe neuer Lipase die Ausbeute noch etwas erhöhen würde. Nach welcher Reaktionszeit genau die maximale Ausbeute erreicht wird bzw. sich das Reaktionsgleichgewicht eingestellt hat, bleibt aber offen.

Die Ausbeuten der einzelnen Acylierungen unterschieden sich deutlich und waren stark von Acylakzeptor und Acylrest abhängig. Die höchste Ausbeute wurde bei den cholesterolfreien Derivaten AMeGal **20** (64 %) und APhGal **21** (52 %) erreicht (s. 4.5.4.2, S. 89). Die dafür verwendete funktionalisierte Fettsäure **5** war zwar langkettig, aber das Aglycon (Me oder Ph) sehr klein. Mit dem Aglycon Cholesterol und derselben Fettsäure betrug die Ausbeute hingegen nur noch 5,1 % (ACGal-SS-Et **15**). Wenn bei konstantem Acylakzeptor (CGal) die Fettsäuren variiert wurden, dann war die Ausbeute bei den kurzkettigen am größten (C6 – 31 %, C4 – 29 %). Eine Ausnahme davon bildete das kürzeste Derivat (C2 – 7,5 %). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass der

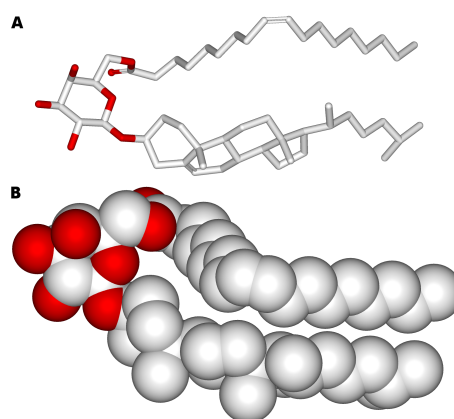


Abbildung 5.1: 3-Dimensionale Darstellung eines Modells von ACGal mit Ölsäure. A Sticks- und B Ballsdarstellungen aufgrund Molecular Modelling-Berechnungen von B. Rupp (Stübs u. a., 2010)

Acetonoximester der Essigsäure **12** (s. 3.2.7.7, S. 53) nicht ganz frei von Acetanhydrid war und dieses das Reaktionsmilieu oder das aktive Zentrum beeinflusst haben könnte. Deutlich geringer wurden die Ausbeuten bei den länger werdenden Fettsäuren (C10 – 14 %, C16 – 8,5 %, C15-SS-Et – 5,1 %) mit Ausnahme des Ölsäurederivates (C18:1 – 16 %) (s. 4.5.4.1, S. 89). Dies könnte daran liegen, dass der Ölsäureester aufgrund der cis- $\Delta^9$ -Doppelbindung in der Bindungstasche der Lipase günstiger orientiert ist oder die geringere Rigidität vorteilhaft ist.

Lipasen sind Enzyme, die in wässrigen Lösungen Esterbindungen (z. B. von Triacylglycerolen) spalten. In wasserfreien Systemen können sie dagegen auch Estersynthesen oder Transesterifizierungen katalysieren. Bei der angewandten lipasekatalysierten regio-selektiven Acylierung handelt es sich somit um eine Gleichgewichtsreaktion. Allerdings werden die entstandenen Lipide in der Natur an der Wasser/Lipid-Interphase umgehend entfernt, während die Einstellung des Gleichgewichtes im Reaktionsgefäß durch die Eigenschaften der Reaktionspartner bestimmt wird. Konkurrenzreaktionen wurden nicht beobachtet und eine Inaktivierung des Enzyms (durch H<sub>2</sub>O oder O<sub>2</sub>) wurde durch die Arbeit mit trockenen Lösungsmitteln, Molekularsieb und Schutzgas verhindert. In Bezug auf die Fettsäure scheint das verwendete Enzym die kurzkettigen zu bevorzugen, was bei der orthologen Lipase in *B. burgdorferi* offenbar nicht der Fall ist<sup>5</sup>. Hinsichtlich des Alkohols (Acylakzeptors) führte die Verwendung von CGal zu einem drastischen Einbruch der Ausbeute, was entweder durch die sterische Hinderung oder wohl eher durch die große Hydrophobizität hervorgerufen wird. Insgesamt gilt: Je hydrophober (größer) die Edukte waren, um so geringer war die Reaktionsausbeute. Dieser geringen Ausbeute – gerade beim funktionalisierten ACGal – stehen aber die Einfachheit des Syntheseweges ohne Schutzgruppen bzw. der geringe Aufwand und die vollständige Regioselektivität entgegen. Außerdem können alle Ausgangsstoffe und die Lipase<sup>6</sup> günstig erworben sowie unumgesetzte Edukte wiedergewonnen werden.

In einer späteren Publikation wurden zur 6-*O*-Acylierung von CGlc Lipasen aus den Pilzen *Candida antarctica* und *Rhizomucor miehei* verwendet. Die Fettsäuren waren nicht aktiviert, aber in 80-fachem Überschuss eingesetzt. Die erzielten Ausbeuten betragen nominell 64-92 % (Paczkowski u. a., 2007), jedoch ist die Bestimmung der Ausbeute bei dem genutzten 1  $\mu$ mol-Maßstab schwierig. Für eine Serologie zur Epitopbestimmung sollte diese Menge ausreichen; bei einem Hochskalieren für die Immunisierung würden sich die Ausbeuten wahrscheinlich auch verringern.

Von Pozsgay u. a. (2005) wurde CGal mit Palmitin- und Ölsäure mittels einer komplizierteren Schutzgruppenstrategie (2-*O*-Allyl-3,4-*O*-isopropyliden-6-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl) in sieben Reaktionsstufen zum ACGal acyliert. Die Gesamtausbeute dieser chemischen Acylierung (DCC) lag mit 47 % höher als bei der enzymatischen Reaktion, jedoch war der Aufwand deutlich größer und würde sich bei der Synthese einer Glycolipidbibliothek mit vielen Derivaten noch potenzieren.

### 5.2.2 Synthese einer Glycolipidbibliothek

Für die Immunisierung von Versuchstieren war ACGal über eine funktionelle Gruppe an ein Trägerprotein zu konjugieren. ACGal verfügt zwar über drei freie Hydroxylgruppen

<sup>5</sup>Dort wurden in den Lipiden nur langkettige Fettsäuren mit alternierenden Verhältnissen C18:1/C16 gefunden, s. 4.1.1.3, S. 67 und 4.1.2.3, S. 74 sowie in *B. hermsii* s. 4.1.2.4, S. 76.

<sup>6</sup>Lipasen werden im großen Maßstab für Waschmittel produziert

(2-, 3-, 4-*O*-Gal), diese könnten aber Teil des antigenen Epitops sein. Eine Veränderung des Epitops würde dazu führen, dass bei einer Immunisierung keine oder andere AK gebildet werden. Durch die Synthese von ACGal-Derivaten und deren serologische Untersuchung mit Patientenseren (s. 5.3.5, S. 121) sollte vor der Immunisierung eine geeignete Stelle zur Funktionalisierung gefunden werden.

Der Fettsäureanteil des ACGal lässt sich aufgrund des Syntheseweges am leichtesten modifizieren. Die dargestellten Derivate enthalten die natürlich vorkommenden Fettsäuren (Palmitin- und Ölsäure), nicht in Borrelien nachgewiesene Carbonsäuren mit abnehmender Kettenlänge (C10 bis C2) und später das funktionalisierte ACGal (Abb. 4.15, S. 88). Längere (als C18) oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren wurden nicht eingesetzt, weil so weit abseits der Esterbindung scheinbar viele Freiheitsgrade vorhanden sind. Schließlich wurden auch keine anderen Acylierungspositionen probiert, nachdem deutlich wurde, dass die 6-*O*-Acylierung essentiell ist.

Eine Untersuchung des für die AK-Bindung minimal notwendigen Cholesterolanteils wurde dadurch erschwert, dass Unterstrukturen (z. B. die Ringe A und B) nicht kommerziell erhältlich waren. Für Aussagen zur Erfordernis dieses Aglycons wurden daher nur 6-*O*-acyliertes Methyl- und Phenylgalactosid synthetisiert (Abb. 4.16, S. 89). Um im Fall einer Erkennung gleich die Konjugation und eine Immunisierung von Versuchstieren zu ermöglichen, wurden die regioselektiven Acylierungen gleich und ausschließlich mit der funktionalisierten Fettsäure **5** bzw. **8** durchgeführt (s. 4.5.4.2, S. 89).

### 5.2.3 Funktionalisierung von ACGal

Die Kenntnis des antigenen Epitops zeigte (s. 5.3.5, S. 121), dass im ACGal vermutlich die Fettsäure und eventuell auch das Cholesterol entfernt von den Bindungsstellen zur Galactose funktionalisiert werden können. Am einfachsten würde dies durch die Verwendung von funktionalisierten Synthesebausteinen (modifiziertes Cholesterol oder modifizierte Fettsäure) gelingen. Zwar ist Cholesterol mit Hydroxylgruppen in der Seitenkette verfügbar, aber nur in kleinen Mengen, und es ist sehr teuer. Dagegen sind Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge mit zahlreichen verschiedenen  $\omega$ -funktionellen Gruppen kostengünstig erwerbbar. Auch aufgrund der 6-*O*-Acylierung als letztem Syntheseschritt wurde dieser Ansatz verfolgt. Da nukleophile Gruppen bei der Aktivierung der Fettsäuren als Acetonoximester (EDC/DMAP) zur Polymerisation führen können, müssen sie zunächst geschützt werden.

Bei den Trägerproteinen sind die freien Aminogruppen der zahlreichen Lysinseitenketten die bevorzugten Reaktionspartner. Diese müssen allerdings entweder komplementär zu den gewählten funktionellen Gruppen am ACGal aktiviert sein oder bei einer zweistufigen Konjugation muss ein entsprechendes homo- oder heterobifunktionales Reagenz („Linker“) verwendet werden. Der einfachste Weg schien die Synthese eines  $\omega$ -Amino-ACGal und die Bindungsknüpfung mittels Glutaraldehyd sowie die Reduktion der Schiff'schen Basen zu sein. Trotz erfolgreicher Vorversuche kam es bei der stark sauren Entschützung (TFA) des  $\omega$ -(Boc-amino)-ACGal bzw. der Aufarbeitung vermutlich zu einer Spaltung der glycosidischen Bindung (S. 92). Eine Boc-Entschützung mit HCl oder anderen Säuren wurde nicht versucht. Im nächsten Ansatz sollte ohne Schutzgruppen  $\omega$ -Maleimido-ACGal synthetisiert werden, um es an mercaptoaktivierte Proteine



zu konjugieren. Jedoch hydrolysierten unter den Synthesebedingungen vermutlich die Doppelbindungen der Maleimide, so dass keine Addition der Mercaptogruppen mehr möglich war (S. 92).

Für eine Entschützung weiterer funktioneller Gruppen kamen wegen des Fettsäureesters auch Basen nicht in Frage. Bei der Wahl einer orthogonalen Methode wurde eine milde reduktive Entschützung favorisiert, die die Doppelbindung im Cholesterol nicht angreift. Dafür geeignet sind Mercaptogruppen (-S-H), die sich leicht als Disulfide schützen lassen. Die Trägerproteine müssen dann maleimidaktiviert sein oder es muss zur Konjugation ein Linker mit einer Maleimidfunktion verwendet werden. Von einer symmetrischen Mercaptoschutzung (R-S-S-R) wurde Abstand genommen, da diese durch die deutlich größere Hydrophobizität und sterische Hinderung die Ausbeute der enzymatischen Umesterung noch stärker reduzieren könnte. Bei der zunächst angewandten unsymmetrischen Schützung von  $\omega$ -Mercaptofettsäuren mit einer nichtflüchtigen Schutzgruppe (2,4-Dinitrothiophenyl, DNP) verlief die Synthese des geschützten mercaptofunktionalisierten ACGal glatt (s. 4.5.6.1, S. 93). Nach der erfolgreichen Entschützung war es aber unmöglich die freie Schutzgruppe (DNP-S-H), die mit dem entschützten ACGal-S-H um die Maleimidreste am Protein konkurrieren würde, chromatographisch zu entfernen. Offenbar durch kaum vermeidbaren Luftzutritt reoxidierte das ACGal-S-H ungewöhnlich schnell – sowohl zum Edukt als auch zum symmetrischen Disulfid. Es konnte somit weder rein gewonnen werden noch mit Maleimiden reagieren (s. 4.5.6.2, S. 93).

Schließlich war die Verwendung einer flüchtigen Mercaptoschutzgruppe – Thioethyl (-S-Et) – erfolgreich. Diese konnte leicht mit Diethyldisulfid quantitativ an der  $\omega$ -Mercaptopentadecansäure angebracht werden **5** (Abb. 4.21, S. 93). Auf dem beschriebenen Syntheseweg wurde damit das funktionalisierte ACGal-S-S-Et **15** hergestellt. Für die reduktive Entschützung der Thioschutzgruppen reichten DTT, NaBH<sub>4</sub> oder NaCNBH<sub>3</sub> nicht aus. Aufgrund von NMR-Experimenten erwiesen sich jedoch Phosphine als Mittel der Wahl, die innerhalb weniger Minuten zur vollständigen Reduktion der Disulfide führten (Abb. 4.22, S. 94). Besonders geeignet war Triethylphosphin, da sowohl überschüssiges Reagenz als auch das Oxidationsprodukt Triethylphosphinoxid im Feinvakuum verdampft werden konnten. Da die gewählte Thioethylschutzgruppe leicht flüchtig war, führte die Entschützung ohne weitere Aufreinigung zu einem fast vollständig sauberen ACGal-S-H **22** (94 % laut NMR) (Abb. 4.21, S. 93). Es ist damit gelungen, ACGal so zu funktionalisieren, dass es in einfacher Weise – im medizinischen Labor auch durch Abblasen im N<sub>2</sub>-Strom – an beliebige maleimidaktivierte Moleküle gebunden werden kann.

#### 5.2.4 Konjugation an Trägerproteine

Eine initiale Immunisierung von Versuchstieren mit nativem ACGal war nicht erfolgreich – vermutlich aufgrund mangelnder Immunogenität von ACGal (s. 5.3.3.1, S. 119). Daher musste das hierzu funktionalisierte ACGal **22** zunächst kovalent an immunogene Proteine gebunden werden. Als Trägerproteine wurden die gebräuchlichen verwendet: KLH (etwa 400 aktivierbare Lysine), BSA und OVA. Die Mercaptofunktion des ACGal-SH **22** kann allerdings nicht direkt mit diesen freien Aminogruppen reagieren, die daher zunächst in Maleimidgruppen „umgewandelt“ werden müssen. Die größte Schwierigkeit bei der Kopplung bestand darin, das hydrophobe Glycolipid mit dem hydrophilen Protein

in Lösung zu halten und beide zur Reaktion zu bringen.

Ein erster Ansatz mit gekauften, maleimidaktivierten Proteinen (KLH, BSA) war nicht erfolgreich, da ein oder beide Edukte im Wasser/DMSO-System als Niederschlag ausfielen und die Mercapto- und Maleimidfunktion nicht miteinander reagieren konnten (s. 4.6.1.1, S. 95). Bei einer danach verfolgten zweistufigen Reaktion konnte zunächst die Mercaptofunktion des ACGal **22** mit der Maleimidfunktion des heterobifunktionalen Linkers (SMCC) in organischen LM reagieren – offenbar der kritische Schritt. Erst danach wurde *in situ* die zweite Funktion des Linkers – die NHS-aktivierte Carbonsäure – mit den Aminofunktionen des Proteins im wässrigen System zur Reaktion gebracht (Abb. 4.23, S. 96). Es kam nun zu erfolgreichen Konjugationen, jedoch gab es weiterhin Probleme mit der Löslichkeit. Die Ergebnisse waren hinsichtlich des Konjugationsgrades (Anzahl ACGal pro Molekül Protein) hochgradig unreproduzierbar – das Mischen war ein entscheidender Faktor. Erst durch die Solubilisierung des Glycolipides mit ionischen Detergenzien wie SDS gelang es reproduzierbar und mit hohen Konjugationsgraden ACGal zu konjugieren (s. 4.6.1.2, S. 96). Die Massenzunahme und damit der Konjugationsgrad ließ sich sehr gut durch eine Gesamtmassenbestimmung mittels MALDI-TOF (Abb. 4.25, S. 97) und PAGE (Abb. 4.24, S. 97) bestimmen, während der spezifische Nachweis mittels WB (Abb. 4.26, S. 98) geführt wurde.

Mit diesem einfachen Verfahren ist es ohne Aufreinigungen gelungen, im Mittel 20-21 Moleküle ACGal kovalent an ein Molekül BSA zu koppeln (15-25 Maleimidreste in kommerziellen Produkten) und damit etwa ein Da ACGal pro drei Da Protein. Der Konjugationsgrad von OVA lag im Mittel bei 10-11 (5-15 bei gekauftem maleimidaktiviertem OVA) und mit etwa einem Da pro vier Da Protein weniger effizient beladen als BSA. Parallel zu meiner Arbeit ist eine Publikation von [Pozsgay und Kubler-Kielb \(2007\)](#) erschienen, in der die Konjugation von im Mittel nur 18 Molekülen ACGal an ein Molekül BSA beschrieben wurde. Dort wurde ACGal in einem komplizierteren Prozess mit einer  $\omega$ -Aldehydfunktion versehen und über diese mittels einer „umgekehrten Mizellen“-Technik („reverse micelles’ technique“) an aminoxypropyliertes BSA konjugiert.

## 5.3 Biologische Aktivität der Glycolipide

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit waren Untersuchungen, ob und wie die Borrelienlipide mit dem menschlichen Immunsystem interagieren. Zunächst wurde die Erkennung der nativen und synthetischen Glycolipide durch AK von LB-Patientenseren eingehend analysiert (s. 5.3.2, S. 116). Nach der Induzierung von spezifischen AK gegen ACGal in Versuchstieren (s. 5.3.3, S. 119) wurden diese vergleichend charakterisiert (s. 5.3.4, S. 120) und mit Hilfe der Glycolipidbibliothek das Epitop des ACGal definiert (s. 5.3.5, S. 121). Schließlich wurde untersucht, ob die Borrelienlipide auch von zellulären Rezeptoren erkannt werden (s. 5.3.6, S. 123). Zunächst werden jedoch die zahlreich genutzten serologischen Methoden und deren Aussagekraft kritisch betrachtet.

### 5.3.1 Einsatz der unterschiedlichen serologischen Methoden

Für die serologischen Untersuchungen wurden verschiedene Analysemethoden – zumeist Blottingverfahren – verwendet.

### 5.3.1.1 Dot-Blots

Dot-Blots werden eingesetzt, um eine spezifische Bindung von Serum-AK eines Isotypes an isolierte AG nachzuweisen. Die Bindung wird kinetisch durch eine enzymatische Nachweisreaktion über Absorption (Farbniederschlag), Lichtemission (Chemolumineszenz = ECL) oder radioaktiv detektiert (s. 3.1.14, S. 39). Die ECL ist – abgesehen von der Radioaktivität – das sensitivste Detektionsverfahren (Abb. 3.1, S. 40). Das mehrstufige Verfahren bietet vielfältigste Variationsmöglichkeiten – von der Wahl der Materialien (Membran, Puffer, AG, etc.), über Inkubationszeiten und Verdünnungen (Serum und sekundärer AK) bis hin zu Belichtungs- und Entwicklungszeiten der Filme bei der ECL. Vergleiche hinsichtlich der Signalintensität sind nur innerhalb eines Versuches möglich. Wenn in einem Versuch bei identischer AG-Menge die Verdünnung der AK verändert wird, korreliert die Intensität der Färbung direkt mit der Anzahl der AK. Dadurch ist es möglich, für ein Serum die maximale Verdünnung zu ermitteln, bei der noch Signale nachweisbar sind. Dieser Wert entspricht jedoch nur näherungsweise dem Titer und muss mit  $\geq$  angegeben werden, denn es ist weder ein Endpunktverfahren noch wird ein Vergleich mit Kontrollen oder einem Standard gemacht. Durch eine Änderung der Parameter könnte es möglich sein, eine noch größere Verdünnung zu bestimmen.

Andererseits ist bei einer Variation der AG-Struktur die Intensität der Dot-Blot-Signale ein ungefähres Maß für die Bindungsaffinität. Bei einer höheren Affinität binden die AK das AG stärker; zudem binden mehr AK und es werden weniger AK gewaschen, so dass die Flecken auch größer werden können (Abb. 4.28, S. 101). Die Bindung des AG an die Membran selbst bzw. ein mögliches Abwaschen des AG von der Membran hat keinen Einfluss. Die hydrophoben Membranen binden vielfältigste Strukturen – von polaren Proteinen, über Oligosaccharide bis hin zu neutralen Lipiden, so dass die relativ geringe Variation der Hydrophobizität der synthetischen Glycolipide (Abb. 4.17, S. 90) hierbei nicht ins Gewicht fällt. Zudem sind die aufgetragenen 1  $\mu$ g ein mindestens hundertfacher Überschuss über der für die Erkennung minimal notwendigen AG-Menge, und die Signalintensität weist über einen Mengenbereich von fast drei Zehnerpotenzen keinen Unterschied auf (Daten nicht gezeigt).

### 5.3.1.2 Western-Blots (WB)

Die WB sind ein in der Routinediagnostik (s. 1.4.2.1, S. 14) eingesetztes Verfahren, um die spezifische Bindung von AK an elektrophoretisch getrennte und auf Membranen übertragene Proteingemische zu untersuchen. Die erkannten AG werden u. a. mittels Standards über die Größe identifiziert (s. 3.1.13, S. 38). In dieser Arbeit wurden die WB verwendet, um die Qualität der Konjugate von ACGal an BSA und OVA zu beurteilen. Während der Etablierung des Konjugationsverfahrens wurde untersucht, ob auf dem Blot Immunfärbungen vorhanden sind, die Mono- oder Multimeren der Trägerproteine entsprechen könnten. Dot-Blots des Reaktionsgemisches würden keine Aussage über eine kovalente Bindung zwischen ACGal und dem Protein erlauben. Bei der Verbesserung der Konjugationseffizienz wurde mit dem WB nach dem größten Massenunterschied (d. h. Verschiebung auf dem Gel aufgrund der unterschiedlichen Beladung mit SDS) zwischen Trägerprotein und Konjugaten gesucht (Abb. 4.24, S. 97) und dieser zur Quantifizierung genutzt.

### 5.3.1.3 Line-Blots

Die Line-Blots sind eine Weiterentwicklung der WB, bei der rekombinante Proteine oder andere Moleküle als Streifen an definierte Stellen auf Membranen gesprüht werden. Dadurch wird die Reproduzierbarkeit deutlich verbessert und die Zuordnung der Immunsignale erleichtert. Die Line-Blots von ACGal wurden nicht von mir durchgeführt, sondern von der Fa. Virotech (s. 3.1.16, S. 41), basierend auf der Technologie für kommerzielle Line-Blots (z. B. für Borreliose) mit der Zielstellung der Verwendung in derartigen Serodiagnostikkits (s. 5.4.1, S. 125).

### 5.3.1.4 Dünnschichtchromatogramm-Blots (DC-Blots)

Die DC-Blots stellen für lipophile Moleküle eine ähnliche Methode dar wie der WB, werden allerdings nicht routinemäßig eingesetzt. Der Vorteil der Übertragung von den DC auf Membranen (s. 3.1.15, S. 41) ist, dass keine isolierten AG vorliegen müssen. Die Nachteile sind, dass die Lipide in unterschiedlicher Menge vorliegen – nämlich in dem Verhältnis des Gemisches, dass die Lipide nicht so fokussiert sind wie die Punkte auf den Dot-Blots und dass die Übertragung von den Aluminium-DC auf die Membran mittels Hitze weniger effizient ist. Die Methode wurde von mir bei den LB-Patientenseren für eine Vorauswahl der Lipid-AG genutzt (Abb. 4.10, S. 80). Bei DC-Blots mit Kaninchenseren gab es eine vollständige Hintergrundfärbung, so dass sie nur für Humanseren eingesetzt werden konnten (Abb. 4.11, S. 84).

### 5.3.1.5 Indirekter ELISA

Grundsätzlich werden indirekte ELISA in der Routinediagnostik (s. 1.4.2.1, S. 14) angewendet; dieser mit einem neuen AG musste aber selbst etabliert werden. Bei der Methode wird die Bindung von Kontroll- und Patientenseren an beschichtetes ACGal über die OD der Immunfärbung vergleichend untersucht. Besonders kritisch ist die Wahl des Schwell- bzw. Vergleichswertes und dessen Validierung, damit der Test eine hohe serologische Spezifität<sup>7</sup> und eine möglichst hohe Sensitivität<sup>8</sup> aufweist. Da der ELISA ein kinetisch-enzymatischer Test ist und auch unspezifische Bindungen mit einfließen, besteht die Gefahr, zu viele positive Ergebnisse zu liefern. Von mir wurde ein ACGal-ELISA zur Bestimmung der Titer verwendet und von Jones u. a. (2009) ähnliche zur Bestimmung von ACGal- und MGalD-positiven Seren.

## 5.3.2 Erkennung durch Antikörper in Patientenseren

Frühere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe hinsichtlich der Antigenität benutzen die drei bis dato bekannten Glycolipide von *B. burgdorferi* s. s. (s. 1.6.4, S. 19) und eine geringe Anzahl Seren. Dabei wurden MGalD und ACGal als AG identifiziert (Schröder u. a., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst alle Borrelienlipide der relevanten humanpathogenen Arten mit Patientenseren untersucht (s. 5.3.2.1). Die identifizierten AG wurden dann mit einer großen Anzahl nach Krankheitsstadien klassifizierten Seren analysiert (s. 5.3.2.2) und die AK-Titer bestimmt (s. 5.3.2.3, S. 118).

<sup>7</sup>Anteil der negativ bestimmten Kontrollen

<sup>8</sup>Anteil der positiv bestimmten LB-Patienten

Durch die Synthese von ACGal konnte dessen Antigenität bestätigt und die Bindung mit den Glycolipiden der Bibliothek untersucht werden (s. 5.3.2.4, S. 118).

### 5.3.2.1 Identifizierung der Antigene

Die Gesamtlipide von Bbu, Baf, Bga und Bhe wurden auf DC aufgetrennt, auf eine Blottingmembran übertragen und mit nach Krankheitsmanifestationen (EM, NB, ACA, LA) gepoolten NRZ-Seren immungefärbt (s. 3.1.15, S. 41). Es zeigte sich dabei, dass bei den LB-Erregern nur MGalD und – dominant – ACGal im Spätstadium (ACA, LA) mit den Seren reagierten (Abb. 4.10, S. 80). Sowohl die Neutral-, Phospho- oder nichtacylierten Glycolipide als auch die Seren der Stadien I (EM) und II (NB) zeigten keine Reaktion (s. 4.4.1, S. 80). Ebenfalls reagierte keines der Bhe Glycolipide mit den Seren.

Zwar ist durch das mengenbedingte „Poolen“ die Sensitivität des Testes verringert (verglichen mit Einzelseren), aber ACGal und MGalD können als die einzigen relevanten Lipid-AG der drei *B. burgdorferis*. 1.-Arten betrachtet werden. Die folgenden serologischen Untersuchungen wurden daher auf diese beiden Moleküle beschränkt.

### 5.3.2.2 Bestimmung der Antikörper der einzelnen Stadien

Die Bestimmung der ACGal-positiven LB-Patienten umfasste die Einzelseren zweier Kollektive. Es wurden 88 vom Nationalen Referenzzentrum für Borrelien (s. 3.1.11.1, S. 36) zur Verfügung gestellte Proben von mir mittels Dot-Blots (s. 3.1.14.1, S. 40) und 209 Seren von der Fa. Virotech (s. 3.1.11.3, S. 37) mittels Line-Blots untersucht (s. 3.1.16, S. 41). Auf den Dot-Blots wurde zudem MGalD und als Kontrolle ACGlc von Bhe eingesetzt. Bei den Patienten war klinisch und serologisch bestätigt eine LB diagnostiziert (s. 1.4.2, S. 14) und der Manifestation zugeordnet. Die Kontrollseren waren von Gesunden oder von Kranken, deren Krankheiten häufig serologisch mit LB Kreuzreaktionen aufweisen (s. 1.4.2.1).

In beiden Kollektiven wurden IgG-AK gegen ACGal in allen LB-Krankheitsstadien, aber in keiner bzw. 1 % (Virotech) der Kontrollen detektiert (s. Tab. 4.4 und 4.5, S. 81f). Bei beiden Untersuchungen zeigte sich, dass die Anzahl der ACGal-positiven Patientenseren mit Fortschreiten der Krankheit zunimmt (Abb. 5.2) – 5 bzw. 8 % im Stadium I (EM, MEM), 21 bzw. 27 % im Stadium II (NB) und sogar 83 bzw. 62 % im Spätstadium (ACA, LA). In den Dot-Blots wurden Anti-MGalD IgG-AK dagegen nur in 12 % der gesamten LB-Patientenseren gefunden – 10 % im Stadium I und 21 % im Stadium III. MGalD ist somit ein deutlich schwächeres AG als ACGal und wurde außerdem in weiteren pathogenen Bakterienarten nachgewiesen (s. 1.6.4, S. 19). Da es kein Alleinstellungsmerkmal von *B.*

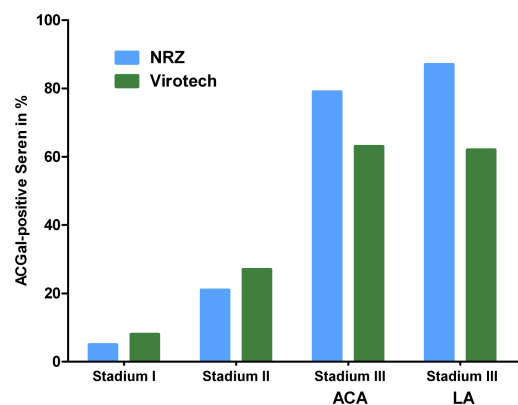


Abbildung 5.2: Anteil der ACGal-positiven LB-Patientenseren in den einzelnen Krankheitsstadien. Basierend auf insgesamt 68 bzw. 106 Patientenseren vom Nationalen Referenzzentrum f. Borrelien (NRZ) und der Fa. Virotech, Rüsselsheim. (ACA = Acrodermatitis chronica atrophicans, LA = Lyme Arthritis)

*burgdorferi* und daher für die Serodiagnostik wenig interessant ist, wurde es bei den weiteren serologischen Versuchen nicht mehr berücksichtigt. ACGlc aus Bhe wurde in den Dot-Blots nur von einem einzigen Patientenserum detektiert, das zudem keine Reaktion mit ACGal zeigte. Eine Kreuzreaktivität zwischen ACGal und ACGlc, die sich lediglich in der Konfiguration der Hydroxylgruppe an C-4 der Hexose unterscheiden, kann daher ausgeschlossen werden – die AK sind hochspezifisch für ACGal.

Nach der Veröffentlichung dieser Daten (Stübs u. a., 2009) erschien eine Publikation, die sich nur auf die in Nordamerika vorkommende Bbu sowie die Seren der drei Manifestationen EM, NB und LA (194 Seren) beschränkte und als Messmethode ELISA benutzte (Jones u. a., 2009): Die hier aufgeführten Daten zu ACGal wurden im Wesentlichen bestätigt: EM – 10 % (5 % hier), NB – 29 % (21 %) und LA – 96 % (87 %) mit einer Spezifität von 97 % (100 %). Die Angaben zu MGalD liegen dagegen deutlich über meinen hier erzielten Ergebnissen: EM – 29 % (5 %), NB – 54 % (0 %) und LA – 99 % (20 %), wobei besonders der Wert von 99 % in der serologischen Praxis außergewöhnlich hoch ist. Da die Spiegel der Anti-ACGal- und Anti-MGalD-AK nach der Behandlung nur langsam sinken, eignen sich beide AG somit nicht als Aktivitätsmarker.

### 5.3.2.3 Bestimmung der Titer mittels ELISA

Von den LB-Patienten, die im Dot-Blot ACGal-positiv waren, wurden mittels eines selbst etablierten und validierten ELISA die AK-Titer bestimmt (s. 3.1.17, S. 41). Aufgrund der unterschiedlichen Testverfahren war es nicht ungewöhnlich, dass die Ergebnisse nicht komplett übereinstimmte. Während im Dot-Blot bei einer Verdünnung von 1:1000 29 LB-Patienten positiv waren, hatten im ELISA von diesen zehn einen gemessenen Titer von < 1000 (s. 4.6, S. 83). Die Ergebnisse der Titerbestimmung sind daher als konservativ zu betrachten (s. 4.4.3, S. 82). Es zeigte sich, dass die Anzahl der seropositiven Patienten im Verlauf der LB wie erwartet zunahm, andererseits aber auch die Höhe des Titers anstieg. Der höchste bei NB gemessene Titer lag bei 4000, während zwei LA-Patienten einen Titer von 32 000 aufwiesen. Für ein AG mit einer so kleinen Strukturgröße bzw. einem einzigen Epitop (s. 5.3.5, S. 121) sind die Titer gegen das Glycolipid ACGal als hoch zu bewerten. Leider war es mir aufgrund der fehlenden Dokumentation nicht möglich, die Höhe des Titers mit Patientendaten z. B. hinsichtlich der Schwere der Erkrankung zu korrelieren.

### 5.3.2.4 Erkennung der synthetischen Glycolipide durch Antikörper

In biologischen Systemen kommt es vor, dass eine kleine chemisch nicht nachgewiesene Verunreinigung für die biologische Aktivität einer vermeintlichen Reinsubstanz verantwortlich sein kann. Ein primäres Anliegen der Synthese von ACGal war daher die Bestätigung dessen Antigenität. Dazu wurden in Dot-Blots identische Mengen von aus *Borrelia* isoliertem ACGal und synthetischem ACGal **14** mit einzelnen LB-Patientenseren immungefärbt und verglichen (s. 4.5.3, S. 87). Aufgrund der identischen Reaktivität der beiden chemisch weitgehend gleichen Moleküle<sup>9</sup> (Abb. 4.14, S. 87), kann eine Kontamina-

<sup>9</sup>Das native ACGal enthält als Fettsäure ein Gemisch aus Öl- und Palmitinsäure. Das synthetische ACGal **14** ist dagegen nur palmitoylsubstituiert.

tion ausgeschlossen und ACGal zweifelsfrei als wichtigstes Lipid-AG von *B. burgdorferi* betrachtet werden.

Nach der Synthese der Glycolipidbibliothek (s. 5.2.2, S. 111) wurden alle synthetischen ACGal-Derivate mit absteigenden Verdünnungen der gepoolten LB-Seren in Dot-Blots untersucht (s. 4.5.5.3, S. 91). Es zeigte sich, dass nur die ACGal mit einer Fettsäurelänge von  $\geq$  vier erkannt wurden und alle denselben Titer (8000) aufwiesen (Abb. 4.20, S. 92). Die AK hatten somit für alle Derivate ungefähr die gleiche Affinität – im Gegensatz zu den Kaninchen-AK (s. 5.3.4, S. 120). Die Glycolipide mit Methyl- oder Phenyl- statt Cholesterylrest wurden nicht erkannt. Für weitere Ausführungen zum Epitop siehe 5.3.5, S. 121.

### 5.3.3 Generierung von Antikörpern in Versuchstieren

Nach dem Nachweis von Anti-ACGal-AK in LB-Patientenseren (s. 5.3.2, S. 116) sollten spezifische AK in Versuchstieren induziert werden. Diese polyklonalen Antiseren, die im Gegensatz zu Patientenseren keine anderen Borrelien-AG erkennen dürften, sollten die grundsätzliche Möglichkeit einer Immunisierung beweisen und für funktionelle Charakterisierungen verwendet werden. Als Versuchstiere wurden Mäuse und Kaninchen verwendet, weil sie ein dem Menschen verwandtes Immunsystem besitzen, oft für diese Zwecke verwendet werden und entsprechende Immunisierungsprotokolle etabliert sind.

#### 5.3.3.1 Immunisierung mit nativem ACGal

Initial wurden fünf C3H/HeN-Mäuse, die für Lyme Arthritis empfänglich sind (Barthold u. a., 1990), mit aus *B. burgdorferi* s. s. isoliertem ACGal immunisiert (s. 3.1.12.1, S. 37), aber es waren keine spezifischen AK im Serum nachweisbar (s. 4.6.2.1, S. 99). Das genutzte Verfahren war zwar als erfolgreich beschrieben worden; jedoch ohne geeignete Kontrollen und bei sehr geringer Serenverdünnung (Ben-Menachem u. a., 2003). Der Grund für das Nichtproduzieren von Anti-ACGal-AK dürfte darin liegen, dass ACGal ein Hapten ist und in der unkonjugierten Form keine vollständige Immunantwort auslösen kann.

#### 5.3.3.2 Immunisierung mit ACGal-KLH-Konjugat

Anschließend wurde ein Kaninchen mit dem ACGal-KLH-Konjugat immunisiert (s. 3.1.12.2, S. 38), wobei die Kontrolle der Qualität und auch Quantität der Konjugation aufgrund der riesigen KLH-Masse nicht gelang. Ein zunächst im ACGal-ELISA beobachteter Anstieg der AK-Bindung ist wohl durch gegen das Adjuvans (FCA) gerichtete unspezifische AK verursacht, denn in Dot-Blots konnten keine spezifischen Anti-ACGal-AK nachgewiesen werden (s. 4.6.2.2, S. 99). Das Misslingen der Immunisierung rührt vermutlich aus einer nicht oder nur unzureichend stattgefundenen Konjugation von ACGal an maleimidaktiviertes KLH her.

#### 5.3.3.3 Immunisierung mit ACGal-BSA-Konjugat

Nach der Umstellung der Konjugation auf das Verknüpfen mit SMCC und der Verwendung von BSA als Trägerprotein wurden Kaninchen mit dem ACGal- oder Kontrollkon-

jugat immunisiert (s. 3.1.12.2, S. 38). Während die Immunisierung mit dem Kontrollkonjugat (Cys-BSA) keine messbaren AK gegen natives ACGal induzierte, konnte beim ACGal-BSA im Antiserum mittels Dot-Blots ein Titer von  $\geq 4000$  ermittelt werden (s. 4.6.2.3, S. 99). Die Immunisierung mit ACGal ist somit grundsätzlich gelungen und die ganze Kaskade von der AG-Präsentation bis hin zur Differenzierung von B-Zellen und der Sezernierung der spezifischen Anti-ACGal-AK durchlaufen (s. 1.8.2.2, S. 25). Der bestimmte Titer kann als gut betrachtet werden und liegt in dem Bereich, der auch in LB-Patienten gefunden wurde.

#### 5.3.3.4 Immunisierung mit ACGal-OVA-Konjugat

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Immunofluoreszenz mit ganzen Borrelien durch AK gegen das Trägerprotein BSA wurden Kaninchen mit den OVA-Konjugaten (s. 3.1.12.2, S. 38) erfolgreich immunisiert. Die AK-Titer waren viermal so hoch wie bei dem BSA-Konjugat (s. 4.6.2.4, S. 100). Mit diesen polyklonalen AK wurde die Bindung an die nativen und synthetischen ACGal untersucht (s. 5.3.4) und die Immunofluoreszenz mit intakten Borrelien durchgeführt (s. 4.7, S. 102). Die NZW-Kaninchen bilden reproduzierbar und mit verschiedenen Trägerproteinen hohe AK-Titer gegen ACGal und wären für weitere Tierversuche in Bezug auf die schützende Wirkung einer ACGal-Immunisierung geeignet. Für Experimente mit borrelieninfizierten Zecken wurde diese Kaninchenrasse bereits verwendet (Burgdorfer, 1984).

Da jedoch viele etablierte LB-Tiermodelle Mäuse verwenden, wurden sechs Mäuse mit OVA-Konjugaten (drei AG, drei Kontrollen) immunisiert (s. 3.1.12.1, S. 37). Die Wahl fiel auf C57BL/6 Mäuse, weil sie oft für Immunisierungen verwendet wurden (Ma u. a., 1998), sie einfacher in der Handhabung und die injizierten Substanzmengen geringer sind als in Kaninchen. Obwohl ein nur leicht abgewandeltes Immunisierungsprotokoll verwendet wurde, konnten überraschenderweise keine AK gegen die nativen ACGal-Strukturen nachgewiesen werden. Eine Reaktion auf die kurzen, synthetischen ACGal war an der Nachweisgrenze (s. 4.6.2.5, S. 100). Momentan läuft eine Wiederholung dieser Immunisierung mit intramuskulärer Injektion, doppelter Substanzmenge und einer zusätzlichen Boosterung. Sofern dabei auch keine AK gebildet werden, muss man davon ausgehen, dass eine Stufe der Kaskade – vermutlich die AG-Präsentation – in Mäusen nicht funktioniert. (s. Ausblick, S. 130)

#### 5.3.4 Erkennung durch Antikörper in Tierseren

Nach der Generierung gegen ACGal gerichteter AK in den mit ACGal-BSA- und ACGal-OVA-Konjugaten immunisierten Kaninchen wurde untersucht, welche Glycolipide von den Antiseren erkannt werden und wie hoch die Titer sind. Dazu wurden die ACGal-Derivate in Dot-Blots mit zehn Verdünnungen (1:1000-1:512 000) dieser Kaninchenseren analysiert (s. 4.6.3.2, S. 101). Das Muster der erkannten Strukturen stimmte bei den ACGal-BSA-Seren mit denen der LB-Seren überein; ging bei ACGal-OVA aber deutlich darüber hinaus (Abb. 4.29, S. 102). Bei letzterem wurden alle ACGal-Derivate stark und die cholesterolfreien Strukturen **20** und **21** schwächer erkannt. Darüber hinaus war auffällig, dass die Titer der einzelnen erkannten Glycolipide – im Gegensatz zu den Humanseren (s. 4.5.5.3, S. 91) – sehr deutlich variierten. Dabei hatten bei ACGal-OVA



das zur Immunisierung verwendete funktionalisierte ACGal **15** und das in Borrelien vorkommende palmitoylierte CGal **14** einen um Faktor 32 niedrigeren Titer ( $\geq 16\ 000$ ) als die nicht natürlich vorkommenden ACGal-Derivate mit Butter- **18** und Hexansäure **17** mit dem höchsten gemessenen Titer ( $\geq 512\ 000$ ). Das auch natürlich vorkommende ACGal mit Ölsäure **13** lag mit  $\geq 128\ 000$  dazwischen.

Bis auf CGal **4** ( $< 1000$ ) wurden alle Glycolipide von den hochtitrigen Kaninchenserum erkannt. Die ACGal-spezifischen AK variierten in ihrem Titer um Faktor 32 und somit in ihrer Affinität gegenüber den unterschiedlichen ACGal-Derivaten. Anders als bei den Humanseren wurden die kurzkettigen Fettsäurederivate am stärksten gebunden.

### 5.3.5 Definition des ACGal-Epitops

Um die Synthese eines Impfstoffkandidaten möglicherweise zu vereinfachen und um eine Position für die Funktionalisierung von ACGal zu finden, wurde das Epitop der Anti-ACGal-AK bestimmt. Dazu wurden die Bindung der LB-Patienten- sowie Kaninchenserum an die nativen Lipide und die Glycolipidderivate analysiert. Das ACGal selbst wird durch Kondensation von drei Bausteinen gebildet, die in allen tierischen Organismen vorkommenden: Fettsäuren, Galactose und Cholesterol. Alle diese ACGal-Anteile lagen in unterschiedlicher Anzahl modifiziert entweder in der Glycolipidbibliothek oder aus Borrelien isoliert vor. Über die von den AK minimal erkannte Struktur ermöglichten sie indirekt die Aussagen zum Epitop. Zur Bestimmung dieser Minimalstruktur wurden alle Moleküle in identischer Menge auf Membranen aufgebracht und mit einer Verdünnung der gepoolten LB-Seren (1:4000) (s. 4.5.5.2, S. 91) oder ACGal-BSA-Antiserum (1:2000) (s. 4.6.3.1, S. 100) immungefärbt. Die Erkenntnisse zum ACGal-OVA-Serum ergeben sich aus der Titerbestimmung der synthetischen Lipide (s. 4.6.3.2, S. 101).

Die von den Seren erkannte Minimalstruktur ist in dem verwendeten Testverfahren von der Höhe des Titers abhängig, wie man deutlich an den beiden Kaninchenserum erkennen kann. Das mit ACGal-BSA-Konjugat immunisierte Kaninchen wies nur einen Titer von  $\geq 4000$  für Palmitoyl-CGal **14** auf, da das eingesetzte Konjugat in der Anfangsphase in Bezug auf den Konjugationsgrad noch stetig verbessert wurde (Abb. 4.28, S. 101). Das andere Kaninchen wurde dagegen durchweg mit einem optimalen ACGal-OVA-Konjugat immunisiert, erreichte einen viermal höheren Titer ( $\geq 16\ 000$ ) und erkannte noch mehr Strukturen (Abb. 4.29, S. 102). Daraus ein unterschiedliches Epitop herzuleiten, wäre ein Trugschluss. Außer dem Trägerprotein gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Kaninchen und daher sollten die beiden Epitope identisch sein. Der höhere Titer erlaubt es nur, eine schwächere Bindung noch nachzuweisen.

#### 5.3.5.1 Notwendigkeit einer Carbonsäure

Die Anzahl der synthetisierten ACGal-Derivate mit modifizierten Fettsäuren ist recht groß. Mit Ölsäure **13** liegt eine langkettige, ungesättigte FA vor; mit Palmitinsäure **14** eine langkettige, gesättigte. Die für die Konjugation verwendete Mercaptopentadecansäure **15** weist mit und ohne Schutzgruppe eine terminale Modifikation auf und die gesättigten, kurzkettigen Carbonsäuren reichen von der Hexan-, über die Butter- bis zur Essigsäure. Alle diese Derivate wurden von den Kaninchenserum erkannt – allerdings mit unterschiedlicher Affinität. Bei den LB-Seren war eine Bindung bei Butter-

säure nur schwach und bei Essigsäure gar nicht detektierbar (s. 4.5.5.1, S. 90). Es ist jedoch möglich, dass bei LB-Patienten mit höherem Titer oder bei geringerer Serenverdünnung (die kleinste genutzte war 1:1000) eine Bindung nachweisbar wäre. Gar keine AK-Bindung war jedoch bei CGal **4** nachweisbar. Die 6-*O*-Substitution der Galactose mit einer Carbonsäure scheint notwendig zu sein, aber es ist egal, mit welcher. Offen ist, ob ein Ameisensäure-Derivat für eine Bindung ausreichen würde. Dann wäre nur die Carbonylgruppe Bestandteil des Epitops.

### 5.3.5.2 Notwendigkeit einer Galactose

Die Aussagefähigkeit über die notwendige Hexose ist aufgrund der lediglich zwei dort variierenden Strukturen – ACGal und ACGlc aus *B. hermsii* (beides  $\beta$ -Anomere) – sehr eingeschränkt. In den Experimenten zeigte sich jedoch, dass ACGlc (Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-glucopyranosid) von den ACGal-positiven LB-Seren (Abb. 4.19, S. 91) und den Kaninchenseren (Abb. 4.28, S. 101) nicht detektiert wird. Andererseits erkannte ein einziges LB-Patientenserum das ACGlc, jedoch nicht gleichzeitig auch das ACGal (s. 5.3.2.2, S. 117). Beide AK – sowohl die Anti-ACGal als auch die Anti-ACGlc – sind somit hochspezifisch für ein Epimer und unzweifelhaft ist die Galactose Bestandteil des Epitops. Ob hingegen ein  $\alpha$ -Anomer oder eine andere Hexose, z. B. die in der Natur häufig vorkommende  $\beta$ -Mannose, von diesen AK gebunden wird, bleibt offen. Es ist eher unwahrscheinlich, dass ein Galactofuranosid oder in Invertebraten seltenes L-Galactopyranosid von den AK erkannt werden.

### 5.3.5.3 Notwendigkeit eines hydrophoben Aglycons

Es standen zwei ACGal-Derivate zur Verfügung, in denen im Vergleich zum funktionalisierten ACGal **15** nur das Cholesterol durch Methyl (AMeGal) **20** oder Phenyl (APhGal) **21** substituiert war. In den Blots wurde deutlich, dass die LB-Patienten (Abb. 4.19, S. 91) und die ACGal-BSA-Seren (Abb. 4.28, S. 101) die beiden Glycolipide nicht erkennen. Das hochtitrige ACGal-OVA-Serum erkannte hingegen APhGal **21** mit  $\geq 4000$  und AMeGal **20** schwach mit  $\geq 1000$  (Abb. 4.29, S. 102). Das Ersetzen des Cholesteryl- (**15**) durch einen Phenylrest (**21**) führte somit nur zu einer Minderung des Titers um den Faktor vier. Wenn vom Cholesterol (**15**) hingegen nur das „C-3 (Methyl) übrig bleibt“ (**20**), ist fast keine Bindung mehr nachweisbar.

Das Aglycon Cholesterol wird somit am besten erkannt – wohl aufgrund der Vielzahl aliphatischer Ringe und Gruppen. Das scheint jedoch für die AK-Bindung nicht zwingend erforderlich zu sein. Offenbar reicht stattdessen ein ausreichend hydrophober Rest – idealerweise noch hydrophober als Phenyl. Zusätzlich kann man davon ausgehen, dass ein zweiter hydrophober Arm im ACGal für dessen Gesamtkonformation und damit die Erkennung durch die AK essentiell ist. Schließlich ist Cholesterol ein körpereigenes Steroid, das natürlich allein nicht erkannt werden darf, da es sonst zu Autoimmunreaktionen kommt.

### 5.3.5.4 Minimalstruktur

Das ACGal besitzt ein einziges Epitop, das sowohl von AK in LB-Patienten- als auch in Kaninchenseren erkannt wird. Die Minimalstruktur, die von diesen hochspezifischen

Anti-ACGal-AK gebunden wird, besteht aus einem hydrophoben 6-*O*-acyliertem  $\beta$ -D-Galactopyranosid. Die Länge, Sättigung und Funktionalisierung der Carbonsäure spielen für die Erkennung durch Humanseren keine Rolle (wenn es mindestens Buttersäure ist), während die AK von Tierseren deutlich unterschiedliche Affinitäten dafür aufweisen. Offenbar wird hier die AK-AG-Bindungsstärke aufgrund sterischer Effekte außerhalb des Epitops beeinflusst.

Diese empirischen Daten sind auch ohne Konkurrenzexperimente ausreichend, um das Epitop der AK von ACGal-immunisierten Kaninchen als weitgehend gleich mit LB-Patienten-AK zu betrachten. Weitere Untersuchungen zum ACGal-Epitop wären nach der Generierung von monoklonalen AK in Bindungsstudien mit anderen Methoden, wie z. B. der Sättigungstransfer-Differenz-Kernresonanzspektroskopie (STD-NMR), möglich.

### 5.3.6 Interaktionen mit zellulären Rezeptoren

Eine Erkennung der Glycolipide durch Mustererkennungsrezeptoren (s. 1.8.1.2, S. 23) und die Ausschüttung von Zytokinen würde das Immunsystem aktivieren. Dies hätte nicht nur Relevanz für die Immunabwehr gegen Borrelien und die Pathogenese der LB, sondern auch Auswirkungen bei der Applikation der Glycolipide als Impfstoff. Die prominentesten TLR-Liganden der Borrelien sind die Lipoproteine (TLR-2). Allerdings verfügen die Borrelien nicht über Lipopolysaccharide (LPS) (Takayama u. a., 1987), die in gramnegativen Bakterien die äußere Schicht der äußeren Membran bilden – einen der potentesten TLR-Liganden überhaupt (TLR-4). Es war daher wichtig zu untersuchen, ob die Glycolipide Makrophagen (s. 5.3.6.1) oder Natürliche-Killer-T-Zellen (s. 5.3.6.2, S. 124) ähnlich potent aktivieren können.

#### 5.3.6.1 Nichterkennung der Glycolipide durch Toll-like Rezeptoren

Die Fragestellung, ob Borrelienlipide durch TLR erkannt werden, war in unserer Arbeitsgruppe schon untersucht worden, aber nicht endgültig geklärt. Von den drei damals identifizierten Glycolipiden waren ACGal und MGalD inaktiv. Bei CGal zeigte sich insofern eine Diskrepanz als aufgereinigtes CGal eine TLR-2-abhängige Aktivität aufwies; das durch Deacylierung von ACGal erhaltene CGal aber nicht (Schröder u. a., 2003). Die Ursache könnte das von mir entdeckte CGlc sein, das auf den DC nur einen leicht höheren  $R_f$ -Wert als CGal hat (Abb. 5.3) und dann im aufgereinigten CGal als Kontamination für die gefundene Aktivität verantwortlich wäre.

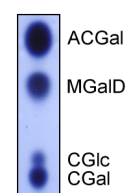


Abbildung 5.3: DC der Glycolipide von Bbu – Ausschnitt aus Abb. 4.4A, S. 72

In der vorliegenden Untersuchung (s. 4.3, S. 78) wurden alle Fraktionen der säulenchromatographischen Trennung der Gesamtlipide von *B. burgdorferi* s. s. (s. 4.1.1.2, S. 66) verwendet, um auch auf den DC eventuell nicht sichtbare Substanzen einzuschließen. Jedoch weder die Neutral- noch die Glycolipide führten zur Ausschüttung von Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-6) und konnten die Makrophagen somit nicht aktivieren (s. 4.3.1, S. 78). Eine ursächliche hemmende Wirkung der genutzten organischen Lösungsmittel (DMSO, *tert*-BuOH) konnte auch durch lösungsmittelfreies Arbeiten ausgeschlossen werden. Eine Analyse von aufgereinigtem CGlc – aus *B. burgdorferi* und aus *B. hermsii*

– ergab ebenfalls keine Anzeichen einer Zellaktivierung (s. 4.3.1.1, S. 79), so dass keines der Glycolipide von TLR erkannt wird.

In sehr großen Konzentrationen zeigten lediglich die Phospholipide (Pool 10) eine schwache und der Nachlauf der Chromatographie (Pools 11 und 12) mit Resten der Phospholipide eine deutliche Aktivierung von Makrophagen. Diese Aktivität erwies sich in Versuchen mit transfizierten HEK-Zellen als TLR-2-abhängig (s. 4.3.2, S. 79). Da alle diese Fraktionen mit höherem Wasseranteil eluiert wurden, könnten auch amphiphile Substanzen in die Präparation hineingelangt sein. Bekannte hochaktive TLR-2-Liganden der Borrelien sind in der äußeren Membran verankerte Lipoproteine und -peptide (s. 1.7, S. 20), die zum Teil nur etwa 7 kDa schwer sind (Katona u. a., 1992; Lahdenne u. a., 1997). Aber auch größere Lipoproteine könnten durch Proteolyse deutlich hydrophober werden, ohne dass das aktivitätstragende Prinzip (Lipidanker) zerstört wird. Außerdem wurde in einer früheren Trennung der Gesamtlipide eine TLR-2-abhängige Aktivität von MGalD gefunden, die später nicht mehr reproduzierbar war. Zusammengenommen erscheint es sehr wahrscheinlich, dass in den aufgereinigten Lipiden gefundene TLR-2-Aktivitäten durch eine Kontamination mit geringen Mengen Lipopeptide hervorgerufen wurden.

### 5.3.6.2 Erkennung von MGalD durch NKT-Zellen

Es war beschrieben, dass CD1d-defiziente Mäuse im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen eine höhere Bakterienlast aufweisen und für Lyme Arthritis empfänglich sind (Kumar u. a., 2000). Da CD1d Lipid-AG für NKT-Zellen (s. 1.8.2.1, S. 25) präsentiert, könnte eines der Borrelielipide als Agonist der NKT-Zellen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr spielen. Der wahrscheinlichste Kandidat war MGalD, das eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem bekannten NKT-Zell-Liganden  $\alpha$ -Galactosylceramid (Abb. 5.4) und besonders die notwendige  $\alpha$ -Konfiguration des anomeren Zentrums aufweist (Kawano u. a., 1997). In einer Zusammenarbeit wurden daraufhin von S. Joyce<sup>10</sup> die von mir isolierten Glycolipide von *B. burgdorferi* s. s. dahingehend untersucht. Das Ergebnis war, dass sich unfraktionierte Milzzellen von Wildtyp-Mäusen im Gegensatz zu denen von iNKT- und CD1d-defizienten Mäusen mit MGalD und CGal zur Proliferation und zur Bildung von IFN- $\gamma$  anregen ließen. ACGal erwies sich in diesen Tests als inaktiv. Der Effekt von isoliertem CGal beruhte vermutlich auch nur auf einer kleinen MGalD-Verunreinigung bei der Säulenchromatographie. Eine IL-4-Sekretion wurde nur von der Kontrolle  $\alpha$ -Galactosylceramid induziert. Eine umfassendere Untersuchung mit synthetischen MGalD-Derivaten wurde kurze Zeit später publiziert (Kinjo u. a., 2006). Es wurde darin zweifelsfrei gezeigt, dass MGalD murine und humane NKT-Zellen aktiviert – allerdings schwächer als  $\alpha$ -Galactosylceramid. Die Präsentation erfolgt direkt über CD1d und ist TLR-unabhängig. Weiterhin bekommen iNKT-defiziente Mäuse eine schwerere LA und haben eine verminderte Fähigkeit, die Borrelien zu beseitigen sowie höhere Antikörpertiter ge-

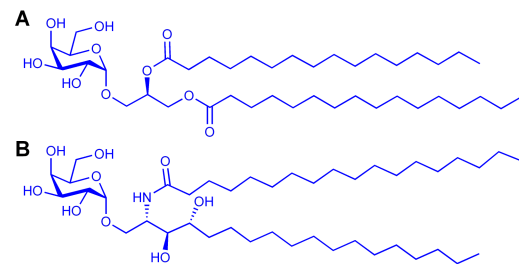


Abbildung 5.4: Strukturformeln von (A)  $\alpha$ -Galactosyldipalmitoylglycerol und (B)  $\alpha$ -Galactosylceramid

<sup>10</sup>Prof. Dr. Sebastian Joyce, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA

gen Protein- und Glycolipid-Antigene (Tupin u. a., 2008). (Ich vermute, dass letzteres aufgrund der längeren und stärkeren Antigenpräsentation eher ein sekundärer Effekt ist.)

Da MGalD über CD1d aber den NKT- und nicht den B-Zellen präsentiert wird, ist dies nicht der Mechanismus zur Bildung der AK gegen MGalD. Jedoch scheint die direkte Aktivierung von B-Zellen durch über CD1d aktivierte NKT-Zellen ein wichtiger Schritt für die Produktion von lipidspezifischen AK zu sein (Leadbetter u. a., 2008). Für *B. hermsii* wurde gezeigt, dass in CD1d-defizienten Mäusen nur minimal *B. hermsii*-spezifische IgM produziert werden (Belperron u. a., 2005) – auch *B. hermsii* verfügt über den CD1d-Liganden MGalD (Abb. 4.4, S. 72).

## 5.4 Mögliche Verwendung von ACGal

Die Arbeiten zu den Glycolipiden von *B. burgdorferi* waren nicht allein akademisch motiviert, sondern sollten nach den ersten Ergebnissen auch hinsichtlich einer möglichen praktischen Einsetzbarkeit geführt werden. Für ein AG kommen sofort zwei Anwendungszwecke in Betracht: als Impfstoff (s. 5.4.2, S. 126) und – falls die Serologie eine labormedizinische Relevanz hat – in der Serodiagnostik (s. 5.4.1). Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen scheint das AG ACGal für beide Zwecke ein idealer Kandidat zu sein. Es ist eine einmalige Struktur innerhalb aller Bakterien. Es ist eine – im Gegensatz zu den heterogenen Protein-AG – in allen *B. burgdorferi* s. l. konservierte Struktur und es kommt in diesen Borrelien in sehr großen Mengen vor (s. 5.1, S. 105).

### 5.4.1 Verwendung von ACGal in der Serodiagnostik

In der Diagnostik der LB gibt es heute noch gravierende Defizite – besonders was das Frühstadium sowie den Verlauf bzw. Aktivitätsmarker zur Therapiekontrolle angeht (Poggensee u. a., 2008). In den von mir durchgeführten Experimenten mit nativen Glycolipiden konnte ich mittels diverser immunologischer Methoden zeigen, dass sich ACGal für die Verbesserung der LB-Serodiagnostik eignet. Das Antigen weist eine sehr hohe Spezifität auf und eine besonders hohe Seroprävalenz im Spätstadium der LB. Um die klinische Verwendbarkeit zu beurteilen, hat die Fa. Virotech in einer Zusammenarbeit das synthetische ACGal 14 mittels einer kommerziell eingesetzten Technologie (Line-Blot) und über 200 Seren evaluiert (s. 4.4.2.2, S. 81). Die hohe Spezifität (99 %) und die gute Sensitivität im Spätstadium (62-63 %) wurden als sehr positiv bewertet. Jedoch ist ACGal bekannterweise kein frühes AG Die Serodiagnostik des zweiten und dritten Stadiums konnte hingegen in den letzten Jahren durch die Einführung von homologen rekombinanten Proteinen deutlich verbessert werden (Goettner u. a., 2005). Gegenüber diesen verwendeten Protein-AG bot das Glycolipid ACGal nach Ansicht der Fa. Virotech keinen Zusatznutzen, so dass sie es im Moment nicht einsetzt. Zum Zeitpunkt der Beurteilung war allerdings noch nicht bekannt, dass ACGal auch in den „möglicherweise humanpathogenen“ *B. burgdorferi* s. l. (s. 1.2.2, S. 7) vorhanden ist und gerade diese bleiben von der gegenwärtigen Serodiagnostik unberücksichtigt. Die Fa. EUROIMMUN<sup>11</sup>

<sup>11</sup>EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck

hingegen verwendet in einem kommerziellen Line-Blot für die Borreliendiagnostik<sup>12</sup> zwei nicht spezifizierte native Lipide oder Lipidgemische von Bbu und Baf. Auch auf Tagungspostern wurde die aktive Struktur nicht offengelegt. Es kann sich aber praktisch nur um ACGal handeln, denn MGalD ist für *B. burgdorferi* nicht spezifisch und die anderen Lipide sind keine Antigene. Gegenüber einer umständlichen Gewinnung von nativem ACGal durch Borrelienkultivierung, Lipidextraktion und anschließende Chromatographie, ist ACGal dagegen chemisch auf dem von mir etablierten Syntheseweg einfach, in reproduzierbarer Qualität und in großem Maßstab darstellbar (s. 5.2.1, S. 109). Eine zweite Firma wollte das synthetische ACGal 14 für den Einsatz in Screening-ELISA austesten, hat jedoch keine Ergebnisse mitgeteilt.

### 5.4.2 Verwendung von ACGal als Impfstoff

Ein Humanimpfstoff gegen LB ist momentan nicht verfügbar; wird aber aufgrund der hohen Prävalenz der LB in Endemiegebieten benötigt. Zum einen gibt es bei den aktuell erforschten Lipoproteinen keinen wirklich guten Kandidaten und zum anderen weisen diese zum Teil sehr große Heterogenitäten auf, so dass für verschiedene Erdteile polyvalente Impfstoffe notwendig wären. Der Impfstoffkandidat ACGal hätte nicht nur den Vorteil, dass dieses Antigen identisch in allen LB-Erregern in großer Menge vorkommt, sondern es wäre im Gegensatz zu rekombinanten Proteinen auch sehr günstig herstellbar. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Untersuchungen begonnen, ob sich ACGal als Impfstoff gegen LB eignen würde. Zunächst wurde eine Methode etabliert, mittels der das nichtimmunogene ACGal auf einfache Weise effektiv und reproduzierbar an immunogene Trägerproteine konjugiert werden kann. Die für Tierversuche genutzten Trägerproteine waren BSA und OVA, wobei hinsichtlich eines Humanimpfstoffes andere Proteine, z. B. Tetanustoxoid, geeigneter sein würden. Die Immunisierungen von Kaninchen mit zwei ACGal-Konjugaten führten zur Bildung von spezifischen Anti-ACGal-AK mit teils sehr hohen Titern. Es wurde somit grundsätzlich bewiesen, dass diese Vorgehensweise bei Kaninchen – aber nicht bei Mäusen – erfolgreich ist. Während der Immunisierungen wurde allerdings nicht der Anstieg der AK-Titer verfolgt, so dass der Verlauf noch unklar ist. Die absolute Anzahl von jeweils vier Injektionen ist für einen Einsatz bei Menschen u. a. aufgrund der problematischen Folgsamkeit („Compliance“) sicherlich zu hoch. Da ACGal selbst keine Zytokine induziert – weder in Makrophagen noch in NKT-Zellen – und das Immunsystem selbst nicht aktiviert, sind diesbezügliche Nebenwirkungen ausgeschlossen. Dadurch ist – anders als beim Lipoprotein OspA – bei einer Immunisierung die Verwendung eines Adjuvans notwendig, was aber kein Nachteil ist. In Folgeuntersuchungen in Richtung Humanimpfstoff muss das FCA allerdings durch ein milderer Adjuvans, z. B. Aluminiumhydroxid oder QS21, ersetzt werden – mit Auswirkungen auf die Stärke der Immunantwort.

Die generierten Anti-ACGal-AK erweisen sich als hochspezifisch für ACGal, allerdings muss dessen Epitop in den Borrelien für eine wirksame Impfung so lokalisiert und präsentiert sein, dass die AK an intakte Borrelien binden. Die ersten Versuche der Immunofluoreszenz mit ganzen Borrelien zeigen dies, sind aber nicht ganz zweifelsfrei (s. 4.7, S. 102). Wie bei Protein-AG auch, sind besonders im LB-Spätstadium Anti-ACGal-

---

<sup>12</sup>Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT, <http://www.euroimmun.de/index.php?id=42&L=0&uid=176>, Zugriff: 20. April 2010

AK im Serum nachweisbar, ohne dass die Borrelien dadurch eradiziert werden können. Dies bedeutet nicht, dass die Anti-ACGal-AK selbst wirkungslos sind, denn vermutlich halten sich die Borrelien im chronischen Krankheitsstadium in anderen Kompartimenten auf und weichen den AK so aus. Das Ziel einer Impfung mit ACGal ist jedoch, dass die AK zum Zeitpunkt der Infektion vorhanden sind. Die Borrelien könnten dann durch die AK lokal an der Infektionsstelle oder – wie beim OspA-Impfstoff – durch das aufgenommene Blut in der Zecke abgetötet werden.

Durch die Identifizierung des Epitops der Anti-ACGal-AK (s. 5.3.5, S. 121) ist es möglich, autoreaktive Strukturen im Menschen zu postulieren. Bei einem derartigen Molekül müsste es sich um 6-*O*-veresterte  $\beta$ -Galactoside mit hydrophobem Aglycon handeln. Tatsächlich wurden 6-*O*-acylierte  $\beta$ -Galactocerebroside (Abb. 5.5) aus dem Gehirn von Menschen (Klenk und Löhr, 1967), Rindern sowie Walen (Yasugi u. a., 1982, 1983) isoliert. Die Cerebroside insgesamt (s. 1.6.2, S. 18) machen je nach Lebensalter 12,4-21,5 % der Gesamtlipide der weißen Substanz des menschlichen Gehirns aus (Pilz, 1968). Davon stellen die unterschiedlich veresterten Cerebroside nur 1,2 % mit einem Anteil der 6-*O*-Acylierung daran von 25 % (Klenk und Doss, 1966; Klenk und Löhr, 1967). Der effektive Anteil der 6-*O*-acylierten  $\beta$ -Galactocerebroside ist mit  $\approx 0,04$ - $0,06$  % der Gesamtlipide daher sehr gering. Die Lokalisation dieses Moleküls im – vermutlich – Myelin und die mögliche Exposition für Anti-ACGal-AK ist ebenfalls noch unbekannt.

Gegen wirkliche Autoimmunprozesse sprechen allerdings fehlende Berichte über gehäufte Assoziationen von LA- und ACA-Patienten mit neurologischen Symptomen. Die ermittelte Seroprävalenz für ACGal bei früher NB ist sogar deutlich geringer als im LB-Spätstadium (s. 5.3.2, S. 116). Hinzu kommt, dass die – aufgrund einer Infektion oder Impfung – im Blut vorhandenen AK die Blut-Hirn-Schranke nur zu einem geringen Maß passieren können. Trotz einer vermuteten und noch zu untersuchenden Kreuzreaktion der Anti-ACGal-AK mit 6-*O*-acylierten  $\beta$ -Galactocerebroside aus dem Gehirn des Menschen erscheint eine Autoimmunreaktion somit recht unwahrscheinlich.

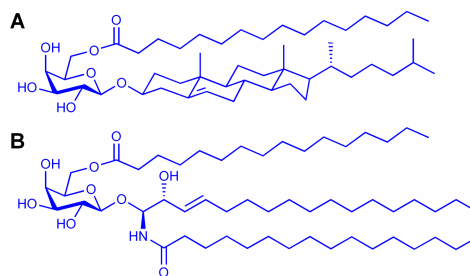


Abbildung 5.5: Strukturformeln von (A) 6-*O*-acyliertem Cholesteryl- $\beta$ -galactosid und (B) 6-*O*-acyliertem  $\beta$ -Galactocerebroside





# Kapitel 6

## Ausblick

Die chemischen Analysen zu den Glycolipidstrukturen von *B. burgdorferi* s. l. können mit dieser Arbeit als im Wesentlichen abgeschlossen betrachtet werden. Die vier Glycolipide sind chemisch analysiert und in den unterschiedlichen Borrelienarten in einer ähnlichen Zusammensetzung nachgewiesen. Es wurde jedoch noch nicht untersucht, ob sich die Zusammensetzung der Lipide bei den natürlichen Umgebungstemperaturen der Borrelien ( $\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ändert. Weiterhin sollte untersucht werden, ob andere Rückfallfieberborrelien außer *B. hermsii* ebenfalls über CGlc/ACGlc statt CGal/ACGal verfügen. Zudem wäre es von Interesse, ob ACGlc ein Antigen ist und in Rückfallfieber-Patienten Antikörper nachweisbar sind.

Bisher sind wenige bzw. keine Informationen über die Bildung, Lokalisation und Funktion der Sterylglycoside von *B. burgdorferi* bekannt. Wahrscheinlich ist der erste Schritt der Biosynthese die Inkorporation von Cholesterol in die äußere Membran. Danach erfolgt vermutlich in der Zellwand die Glycosylierung zum CGal und die lipasekatalysierte Acylierung zum ACGal. Eine Klonierung der putativen Gene würde Vergleiche mit anderen Bakterien oder die Überexpression und Inhibition der entsprechenden Enzyme mit kleinen Molekülen (als „Screening“) erlauben. Da ACGal ein Viertel der Gesamtlipide stellt, könnte es – analog dem LPS – vollständig eine der vier Lipidschichten ausmachen und eine Barrierefunktion haben. Andererseits könnte es auch über eine oder beide Membranen verteilt sein und deren Eigenschaften insgesamt modulieren. Es ist grundsätzlich bekannt, dass Cholesterol die Fluidität von Membranen senkt und daher ist es denkbar, dass CGal/ACGal für die außergewöhnliche Beweglichkeit der Borrelien durch Gewebe und viskose Flüssigkeiten essentiell sind. Zur Klärung dieser Fragestellung sollte die genaue Lokalisation von ACGal in den Borrelien mittels einer Immunogoldfärbung mit spezifischen Anti-ACGal-Antikörpern und Elektronenmikroskopie ermittelt werden.

Eine mögliche direkte oder indirekte (durch Anti-ACGal-AK) Beteiligung von ACGal an der Pathogenese der LB ist bisher ebenfalls kaum betrachtet worden. Da ACGal auch in nichtpathogenen Borrelien vorkommt, sind für die Infektiosität andere Faktoren (z. B. LP) entscheidend. Jedoch dürfte ACGal nach einer Borrelieninfektion im menschlichen Körper in größeren Mengen frei werden – bei der Teilung oder dem Absterben der Borrelien, nach der Phagozytose oder nach Antibiotikagabe. Folgende Fragen stellen sich: Wäre es möglich den ACGal-Plasmaspiegel von LB-Patienten trotz eines einzigen ACGal-Epitops zu messen? Könnte das ACGal als Lipid mit menschlichen Membra-

nen interagieren? Es gibt Berichte, dass Sterylglycoside hämolytisch wirken (Segal u. a., 1978) und andererseits auch *B. burgdorferi* eine hämolytische Aktivität aufweist (Williams und Austin, 1992). Es sollte daher untersucht werden, ob CGal/ACGal dafür verantwortlich sind und wie stark dieser Effekt ist. Einen ersten Hinweis darauf, ob die Anti-ACGal-AK am Krankheitsgeschehen beteiligt sind, könnte man durch die – mir nicht mögliche – Korrelation der spezifischen AK-Titer mit der Schwere der LA bzw. ACA bekommen. Aufgrund der hohen ACGal-Seroprevalenz im Spätstadium wäre es denkbar, dass gerade die LB-Patienten, die im früheren Stadium Anti-ACGal-AK bilden, ins Spätstadium kommen. Daher erscheint es notwendig – besonders hinsichtlich einer ACGal-Immunsierung – serologisch das Vorhandensein von Autoantigenen (z. B. 6-O-acylierte  $\beta$ -Galactocerebroside) im Menschen auszuschließen.

Die gesammelten Erkenntnisse zur Serologie der Glycolipide zeigen, dass ACGal in kommerziellen Serodiagnostikkits eingesetzt werden kann und auch wird. Da die Antikörper in den Kaninchenserum jedoch die größte Bindungsaffinität für die ACGal-Derivate mit Butan- **18** und Hexansäure **17** aufwiesen, sollte eingehender untersucht werden, ob bei Humanserum nicht auch die Derivate mit kürzeren Fettsäuren eine höhere Sensitivität zeigen. Darüber hinaus würde der Einsatz von definierten synthetischen ACGal-Derivaten in den Serodiagnostikkits im Gegensatz zu aufgereinigtem nativem ACGal eine bessere Reproduzierbarkeit versprechen. Die Verwendung von ACGal-enthaltenden Line-Blots in klinischen Laboratorien würde nach Konzeption einer prospektiven Studie die Evaluierung des ACGal-Nutzens mit einer deutlich größeren LB-Patientenanzahl als bisher erlauben. Weiterhin sollte mit einer großen Anzahl europäischer LB-Seren zu unterschiedlichen Zeiten nach einer Antibiotikatherapie untersucht werden, ob sich ACGal als Verlaufsmarker eignet.

Die Untersuchungen zur Eignung von ACGal als Impfstoff befinden sich noch im experimentellen Stadium. Zunächst sollte die Immunofluoreszenz der Borrelien mit den Immunsereum der Kaninchen verbessert werden; sie könnte alternativ mit Patientensereum durchgeführt werden. Um jedoch die Verfälschung durch darin enthaltene andere Anti-Borrelien-AK zu vermeiden, müssten die spezifischen Anti-ACGal-AK mittels einer Affinitätschromatographie – in Form von an ein Säulenmaterial konjugiertem ACGal – aus den Humanserum aufgereinigt werden. Auch die Generierung monoklonaler Anti-ACGal-AK sollte überlegt werden. An die Immunofluoreszenz sollte sich ein funktionaler *in vitro*-Test mit lebenden Borrelien anschließen, in dem untersucht wird, ob die Anti-ACGal-AK die Borrelien opsonieren oder abtöten können. Sofern dieser Test erfolgreich ist, wäre der nächste logische Schritt zu *in vivo*-Versuchen überzugehen. In einem experimentellen Tiermodell würden geeignete Versuchstiere mit ACGal- oder Kontroll-Konjugaten immunisiert und mit *B. burgdorferi* infiziert. Im einfachsten Fall könnte eine schützende Wirkung von ACGal durch einen Vergleich der Bakterienlast in den Organen beurteilt werden. Sofern ein richtiges LB-Tiermodell zur Verfügung steht, könnten die konkreten Manifestationen, z. B. eine Gelenkschwellung, verglichen werden. Auch das noch einfacher zu synthetisierende cholesterolfreie ACGal-Derivat **21** sollte bei der Forschung an einem ACGal-basierten Impfstoff nicht von vornherein ausgeklammert werden.

Im Zusammenhang mit der Immunsierung von Tieren und später möglicherweise Menschen sollte die Antigenpräsentation von ACGal (und MGalD) erforscht werden. Aufgrund der nicht erfolgreichen Generierung von AK in Mäusen kann man vermuten,

dass die antigenpräsentierenden Moleküle zur Gruppe-1 der CD1 (CD1a, CD1b oder CD1c) gehören, die dort nicht vorhanden sind (s. [1.8.2.2](#), S. 25). Eine Identifizierung des antigenpräsentierenden Moleküls könnte daher z. B. mit transgenen Mäusen erfolgen, die die einzelnen CD1-Proteine des Menschen exprimieren.

Zusammengenommen ist das Glycolipid ACGal ein sehr bedeutsames Antigen, das die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose verbessern kann und sich nach weiteren Untersuchungen möglicherweise als neuartiger Impfstoff gegen Lyme-Borreliose eignen könnte.



# Anhang A

## NMR-Spektren

### A.1 NMR-Spektren der natürlichen Strukturen

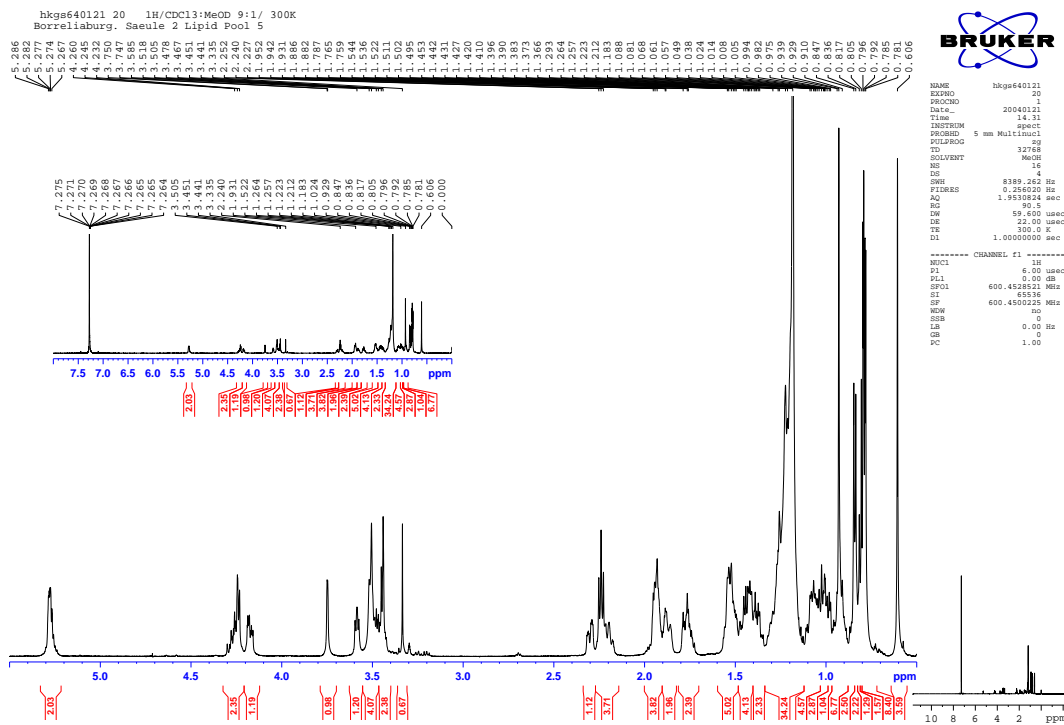


Abbildung A.1:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ACGal) aus *B. burgdorferi* s. s. in  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  9:1 [600 MHz,  $\delta_{\text{H}}$  (TMS) = 0,00 ppm, 300 K] (s. 4.1.1.3, S. 67)





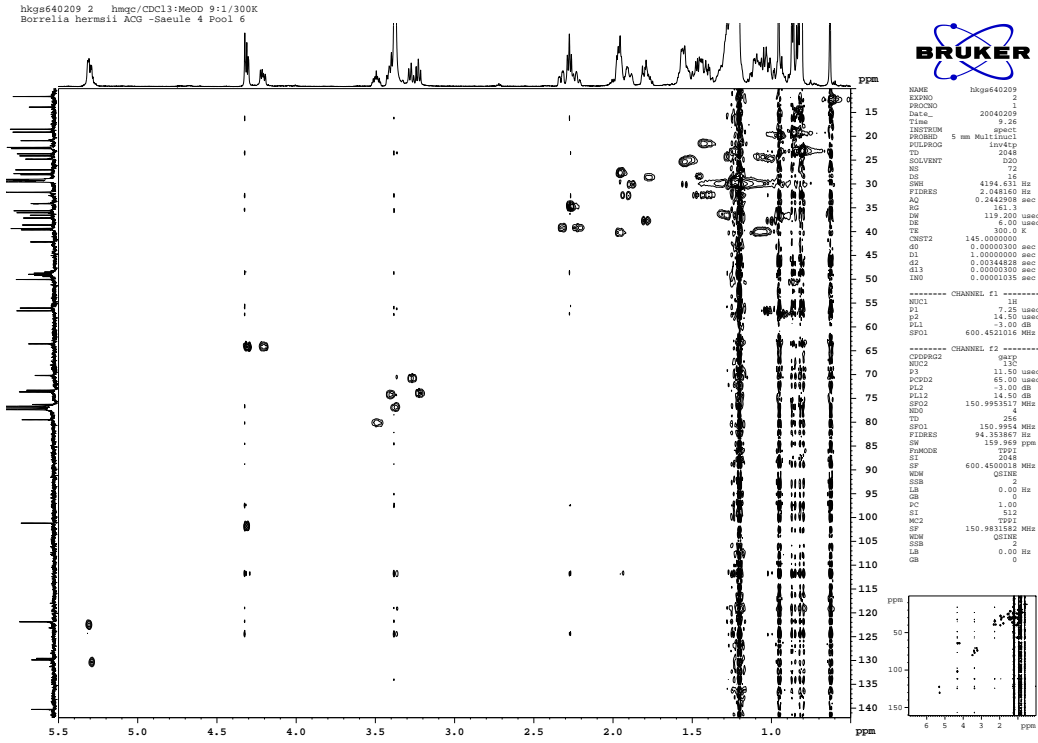


Abbildung A.6: HMQC-NMR-Spektrum von Cholesteryl-6-O-acyl-β-D-glucopyranosid (ACGlc) aus *B. hermsii* in CDCl<sub>3</sub>/MeOD 9:1 [für <sup>1</sup>H: 600 MHz, δ<sub>H</sub> (TMS) = 0,00 ppm, für <sup>13</sup>C: 90,6 MHz, δ<sub>C</sub> (CDCl<sub>3</sub>) = 77,0 ppm, 300 K]

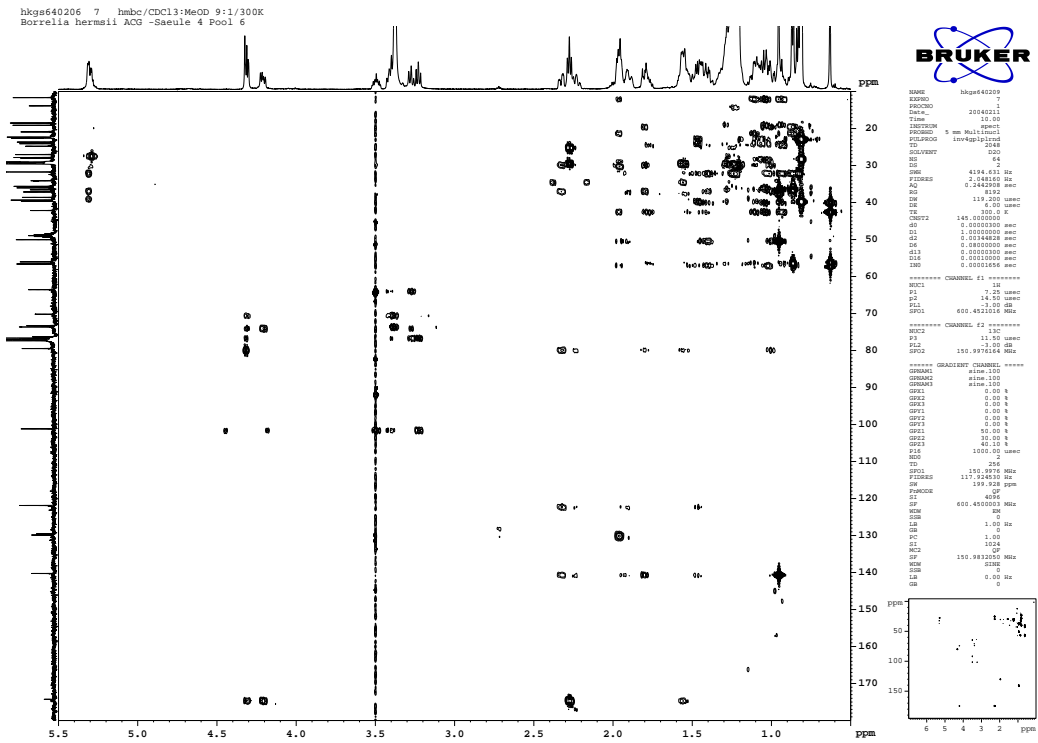


Abbildung A.7: HMBC-NMR-Spektrum von Cholesteryl-6-O-acyl-β-D-glucopyranosid (ACGlc) aus *B. hermsii* in CDCl<sub>3</sub>/MeOD 9:1 [für <sup>1</sup>H: 600 MHz, δ<sub>H</sub> (TMS) = 0,00 ppm, für <sup>13</sup>C: 90,6 MHz, δ<sub>C</sub> (CDCl<sub>3</sub>) = 77,0 ppm, 300 K]













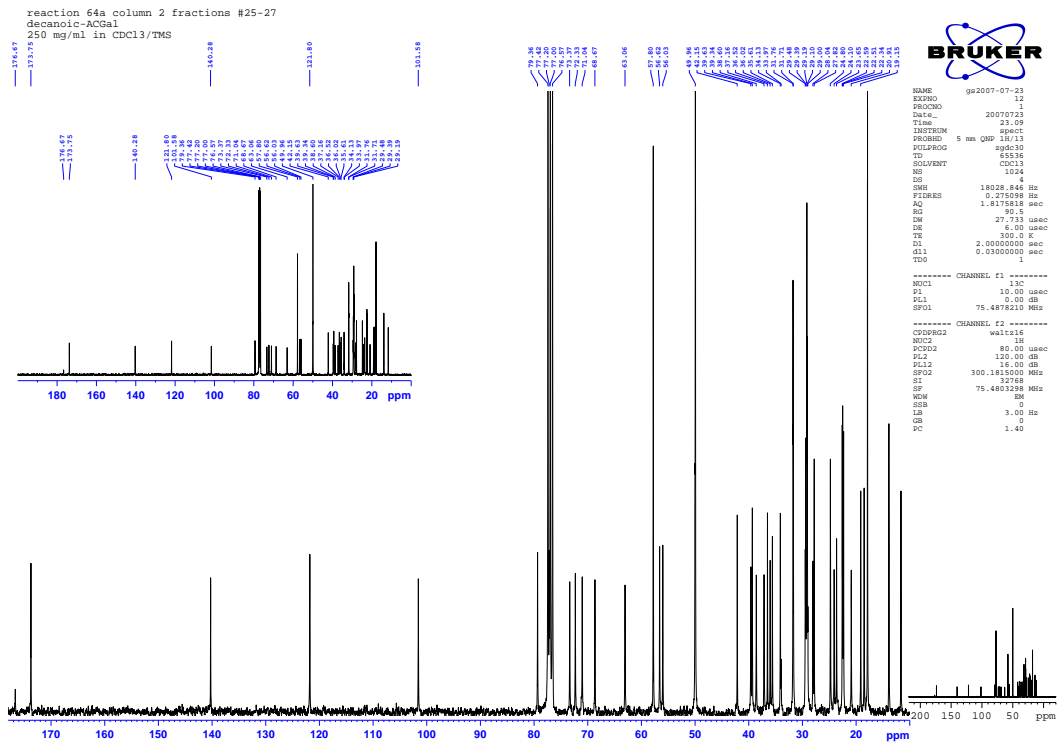


Abbildung A.17: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Cholesteryl-6-*O*-decanoil-β-D-galactopyranosid **16** in CDCl<sub>3</sub> [75,5 MHz, δ<sub>C</sub>(CDCl<sub>3</sub>) = 77,0 ppm, 300 K] (s. 3.2.8.4, S. 56)

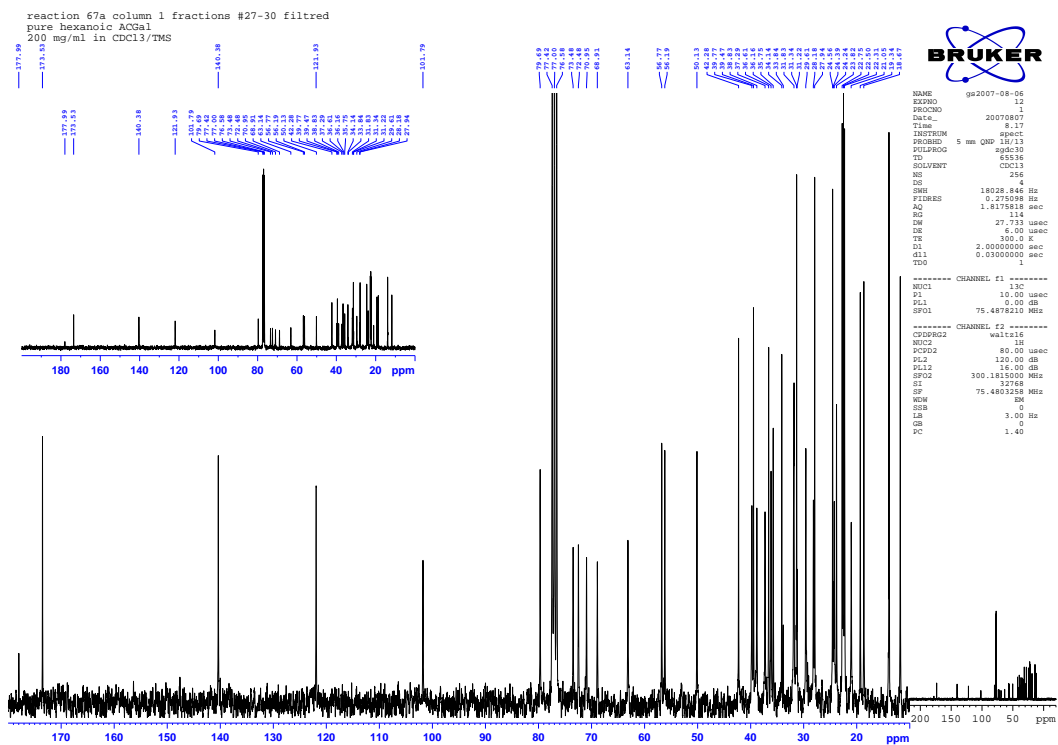


Abbildung A.18: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Cholesteryl-6-*O*-hexanoil-β-D-galactopyranosid **17** in CDCl<sub>3</sub> [75,5 MHz, δ<sub>C</sub>(CDCl<sub>3</sub>) = 77,0 ppm, 300 K] (s. 3.2.8.5, S. 56)

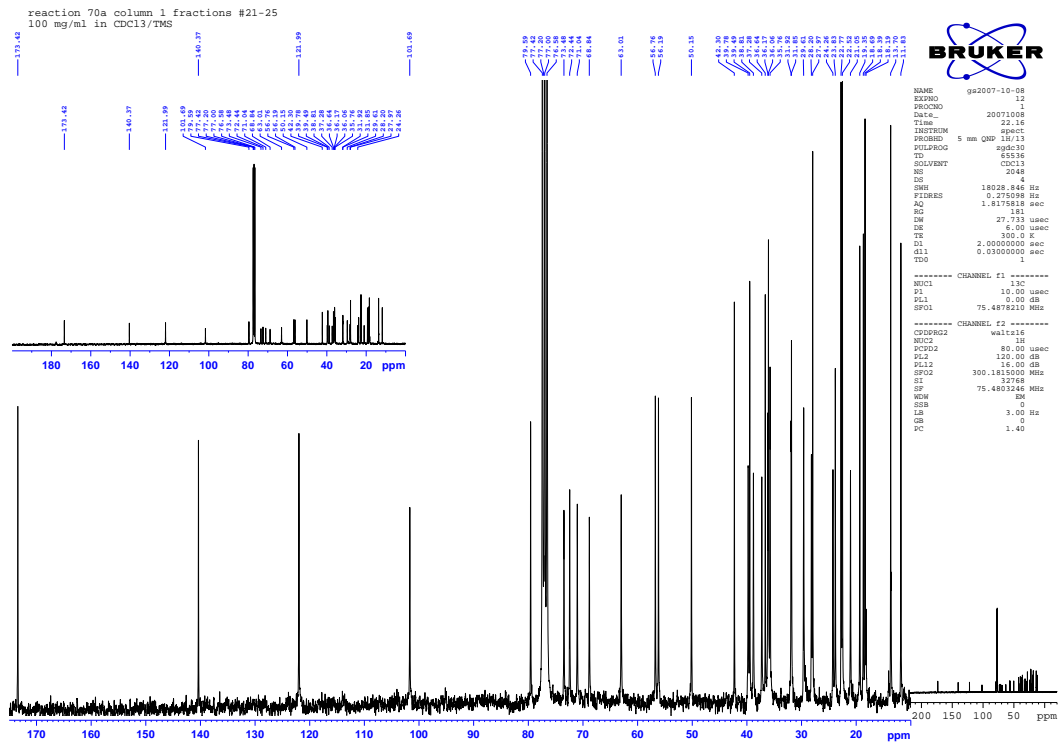


Abbildung A.19:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Cholesteryl-6-*O*-butanyl- $\beta$ -D-galactopyranosid **18** in  $\text{CDCl}_3$  [75,5 MHz,  $\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 77,0 ppm, 300 K] (s. 3.2.8.6, S. 57)

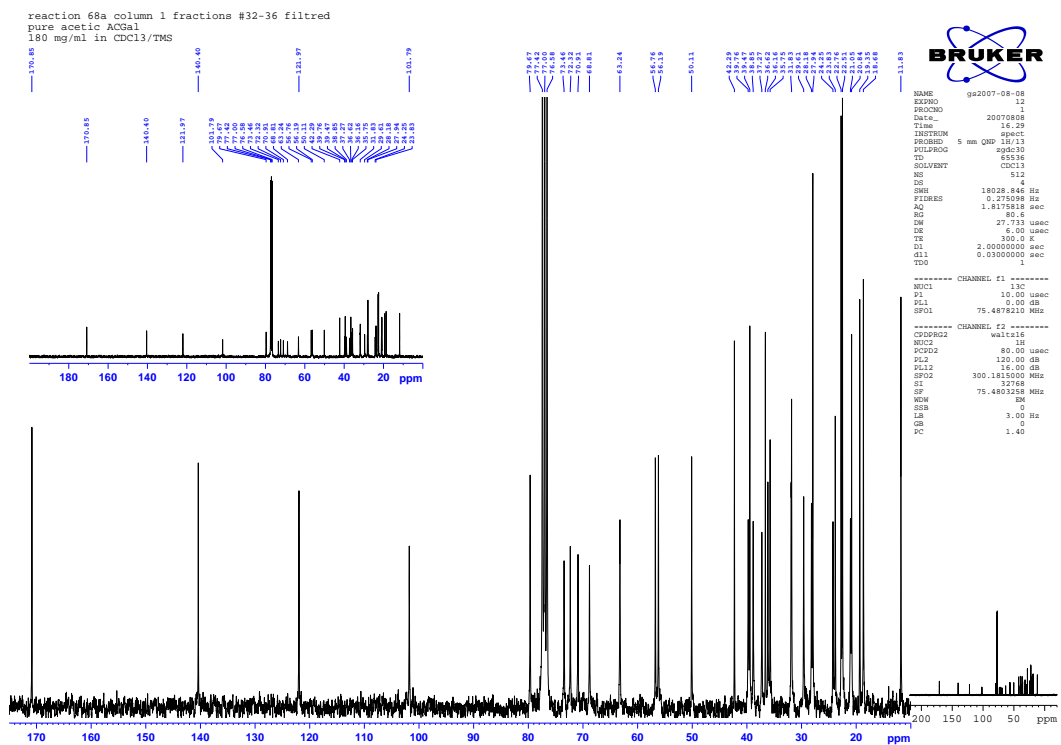


Abbildung A.20:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Cholesteryl-6-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid **19** in  $\text{CDCl}_3$  [75,5 MHz,  $\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) = 77,0 ppm, 300 K] (s. 3.2.8.7, S. 58)

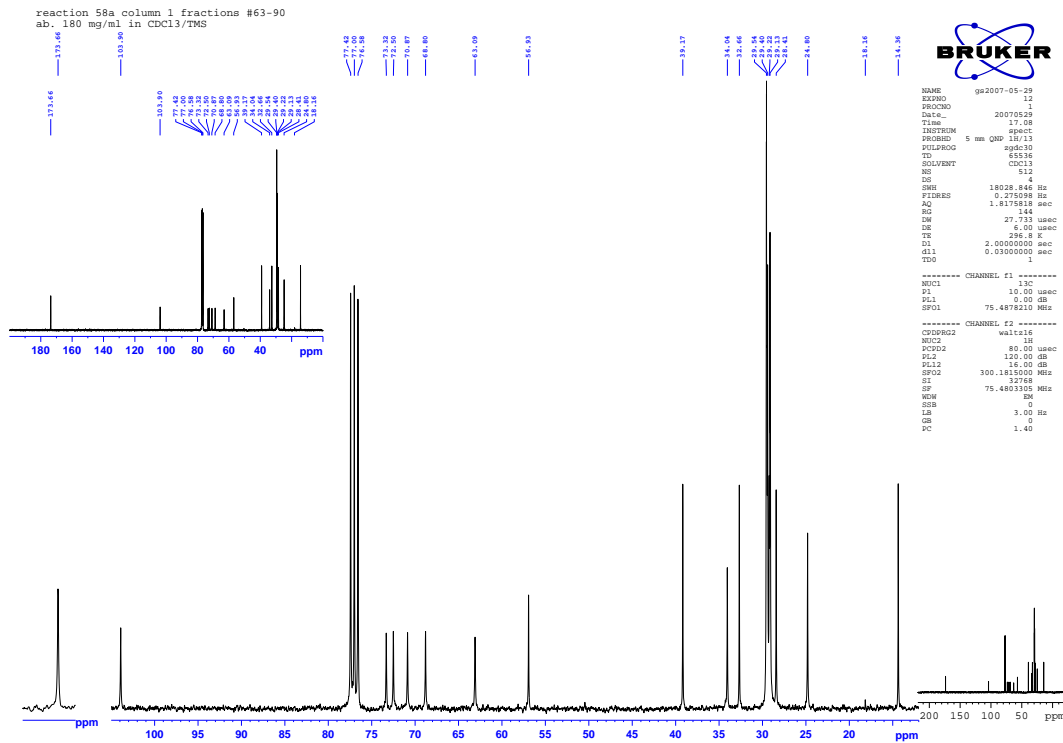


Abbildung A.21: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Methyl-6-*O*-(15-(2-ethylidysulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid **20** in CDCl<sub>3</sub> [75,5 MHz,  $\delta_C$  (CDCl<sub>3</sub>) = 77,0 ppm, 300 K] (s. 3.2.8.8, S. 59)

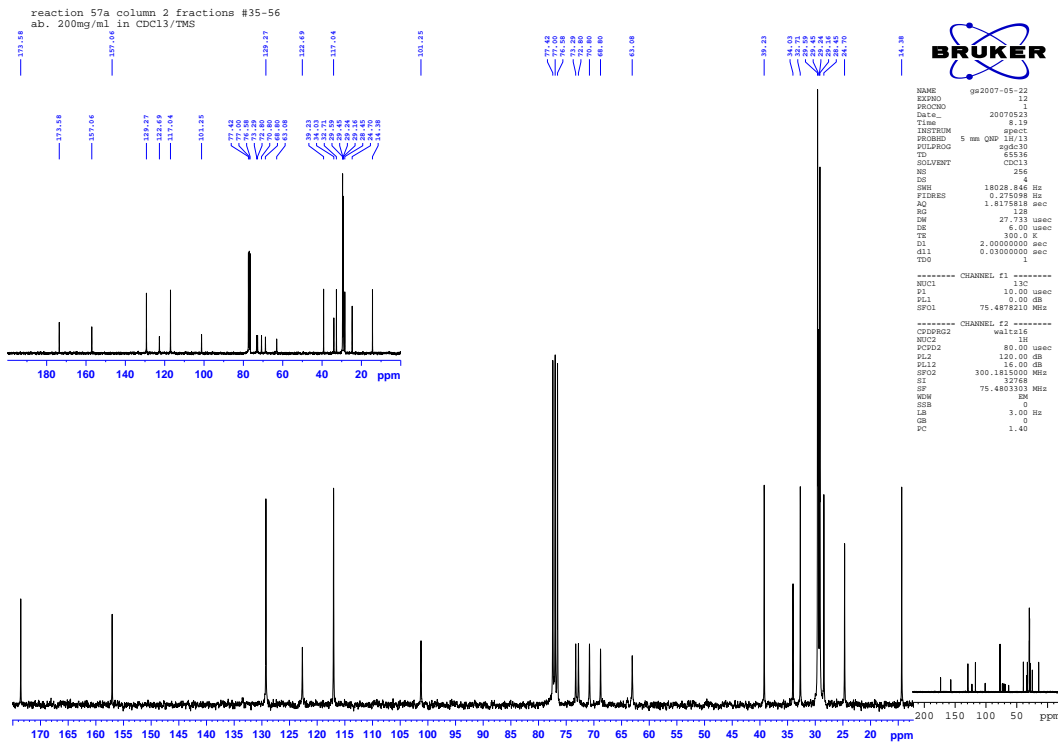


Abbildung A.22: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Phenyl-6-*O*-(15-(2-ethylidysulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid **21** in CDCl<sub>3</sub> [75,5 MHz,  $\delta_C$  (CDCl<sub>3</sub>) = 77,0 ppm, 300 K] (s. 3.2.8.9, S. 60)



# Anhang B

## Massenspektren

MALDI-TOF-MS  
sample: 4 (0,3 mg/ml)

Matrix: 15 mg/ml THAP in 60% ACN / 0,3 % TFA  
SpotSet: HS\_Stuebs\_200409, Spot 23  
4700 Reflector Spec #1 MC=>BC=>NF0.7[BP = 613.0, 2730]

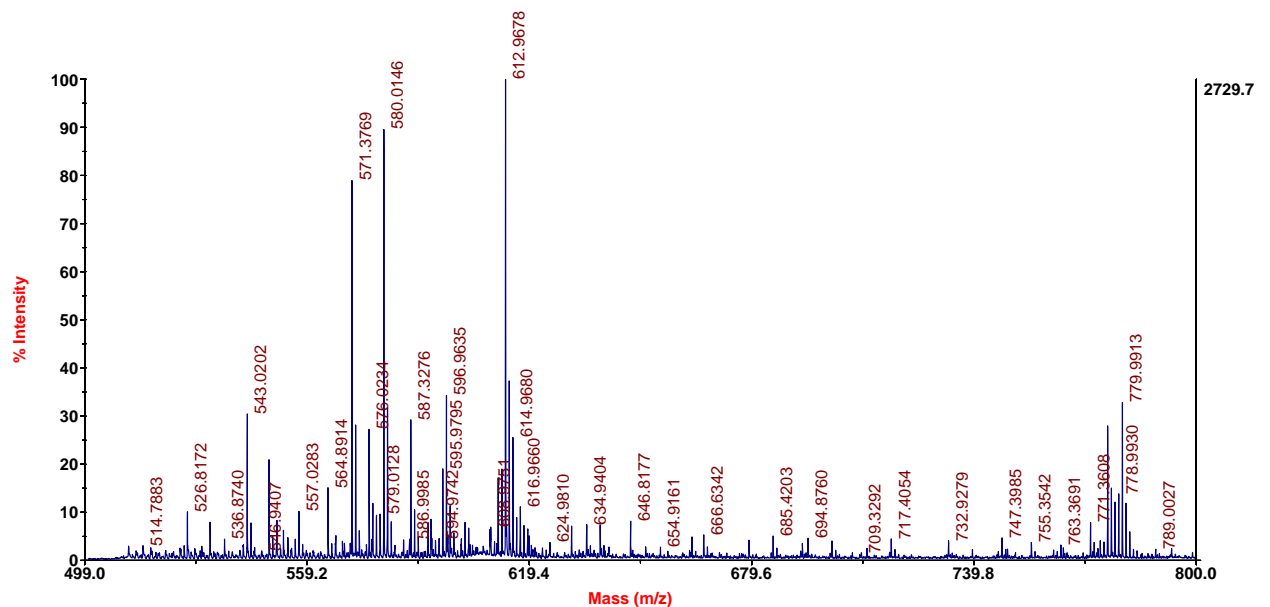


Abbildung B.1: MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid **4** (exakte Masse: 548,408 Da) (s. 3.2.6.4, S. 49) mit THAP in ACN/TFA im Positivmodus (s. 3.2.5.1, S. 47)

MALDI-TOF-MS  
sample: 66 (0,3 mg/ml)

Matrix: 15 mg/ml THAP in 60% ACN / 0,3 % TFA  
SpotSet: HS\_Stuebs\_200409, Spot 27

4700 Reflector Spec #1 MC=>BC=>NF0.7[BP = 613.0, 4660]

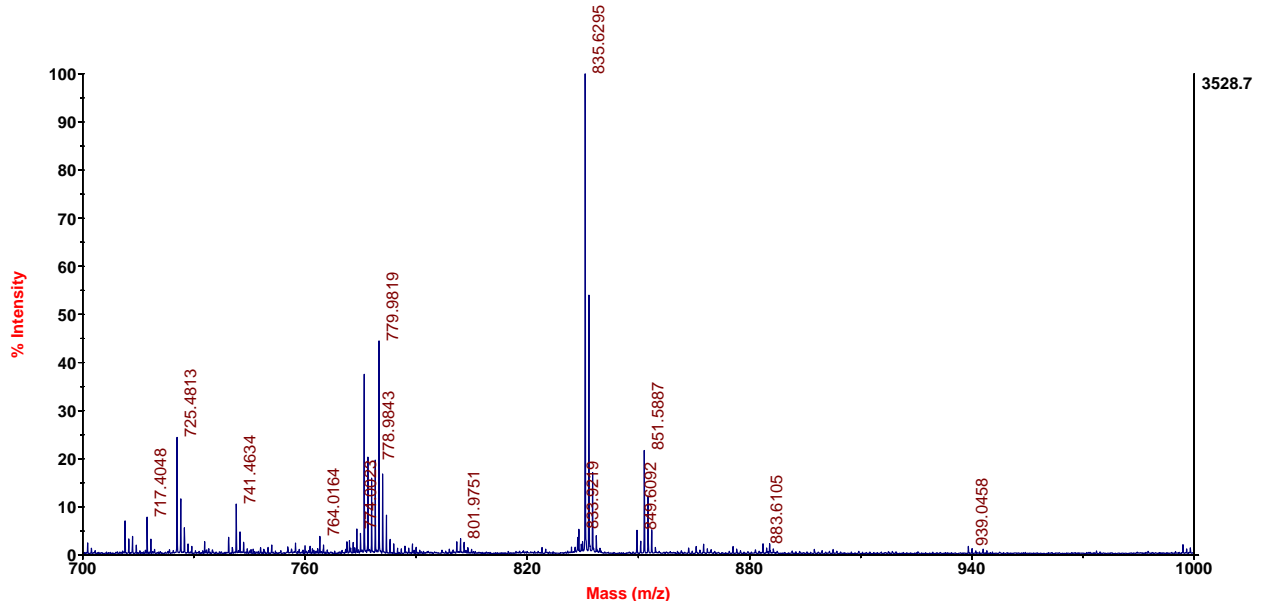


Abbildung B.2: MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl-6-O-oleoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid **13** mit THAP in ACN/TFA im Positivmodus (exakte Masse: 812,653 Da) (s. 3.2.8.1, S. 53)

MALDI-TOF-MS  
sample: GS Rkt 21b\_ACGal (1mg/ml)

Matrix: 20 mg/ml DHB in 50% MeOH / 0,1 % TFA  
SpotSet: HS\_Stuebs\_030309, Spot 43

4700 Reflector Spec #1 MC=>BC=>NF0.7[BP = 1501.0, 10457]

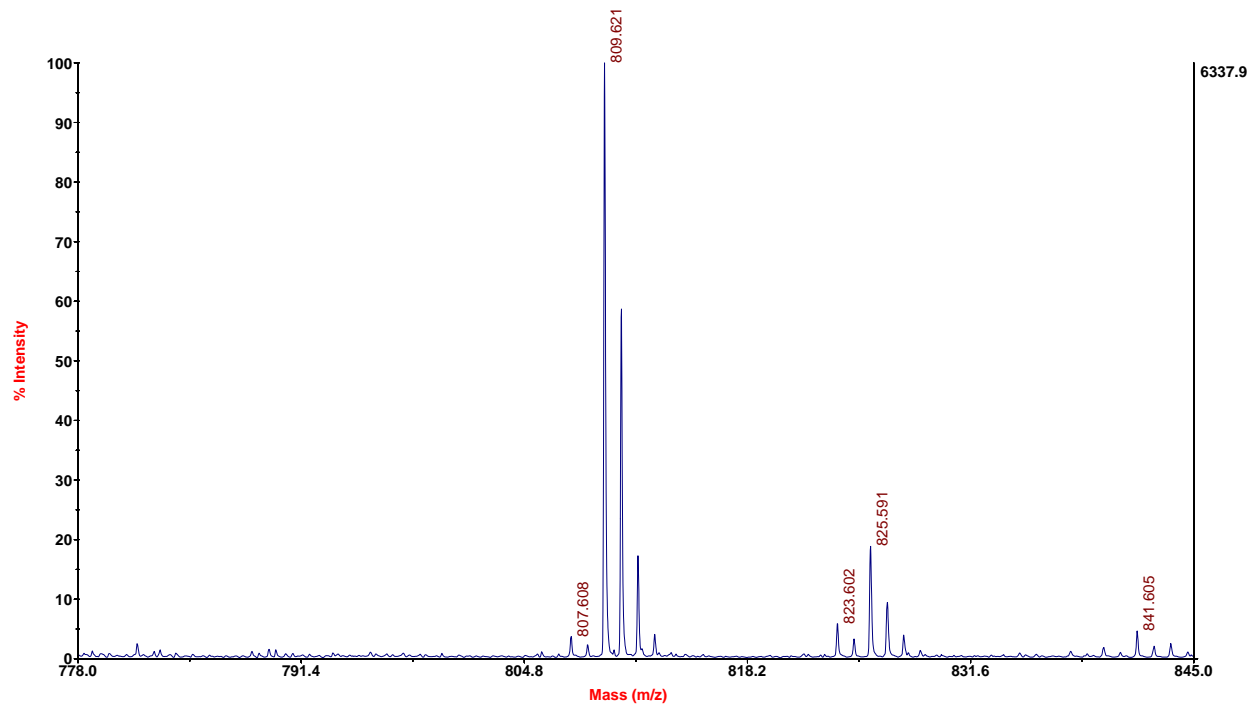


Abbildung B.3: MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl-6-O-palmitoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid **14** mit DHB in MeOH/TFA im Positivmodus (exakte Masse: 786,637 Da) (s. 3.2.8.2, S. 54)

MALDI-TOF-MS  
sample: 65 (0,3 mg/ml)

Matrix: 15 mg/ml THAP in 60% ACN / 0,3 % TFA  
SpotSet: HS\_Stuebs\_200409, Spot 26

4700 Reflector Spec #1 MC=>BC=>NF0.7[BP = 613.0, 9024]

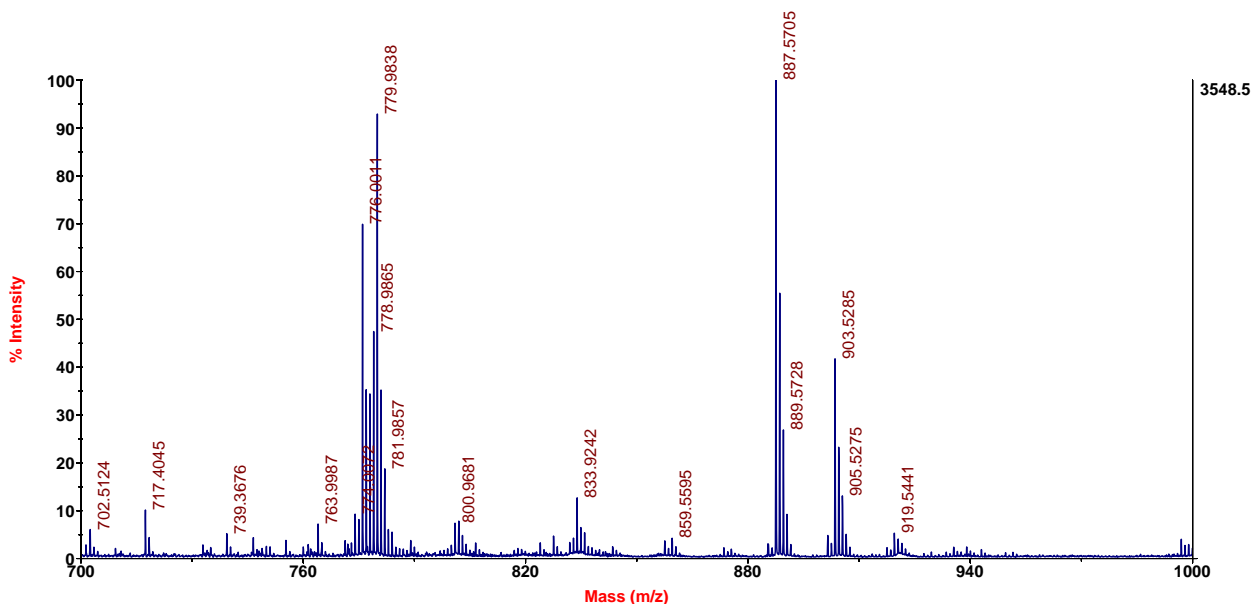


Abbildung B.4: MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl-6-O-(15-(2-ethylsulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid **15** mit THAP in ACN/TFA im Positivmodus (exakte Masse: 864,597 Da) (s. 3.2.8.3, S. 55)

MALDI-TOF-MS  
sample: 67 (0,3 mg/ml)

Matrix: 15 mg/ml THAP in 60% ACN / 0,3 % TFA  
SpotSet: HS\_Stuebs\_200409, Spot 28

4700 Reflector Spec #1 MC=>BC=>NF0.7[BP = 669.4, 8417]

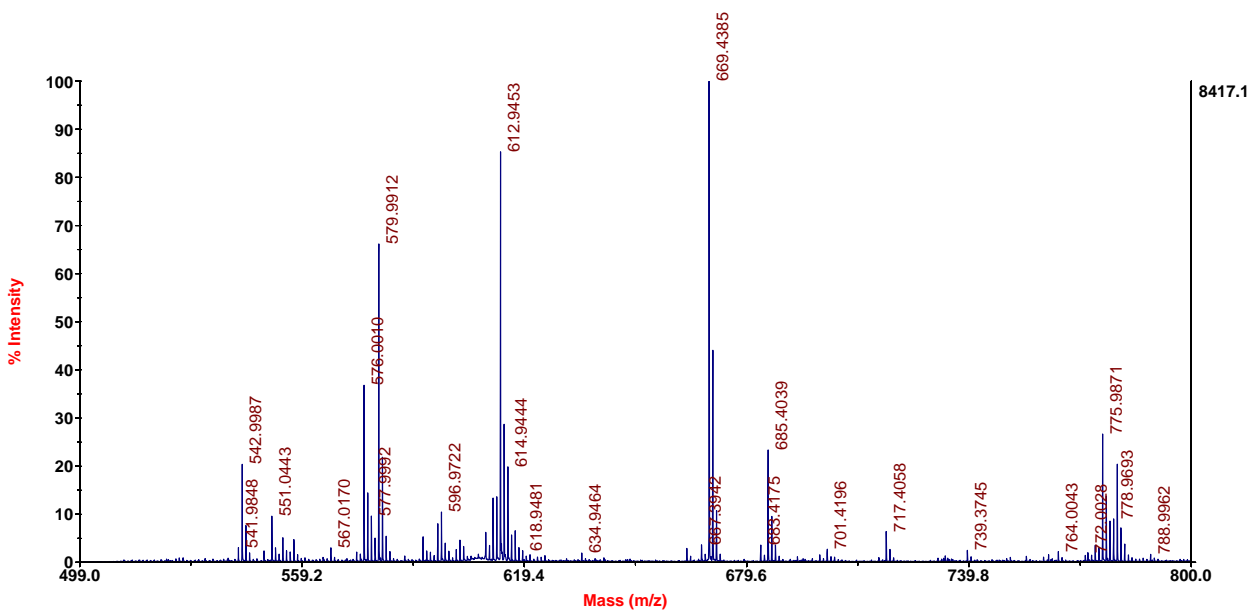


Abbildung B.5: MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl-6-O-hexanoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid **17** mit THAP in ACN/TFA im Positivmodus (exakte Masse: 646,481 Da) (s. 3.2.8.5, S. 56)

MALDI-TOF-MS  
sample: 70 (0,3 mg/ml)

Matrix: 15 mg/ml THAP in 60% ACN / 0,3 % TFA  
SpotSet: HS\_Stuebs\_200409, Spot 44

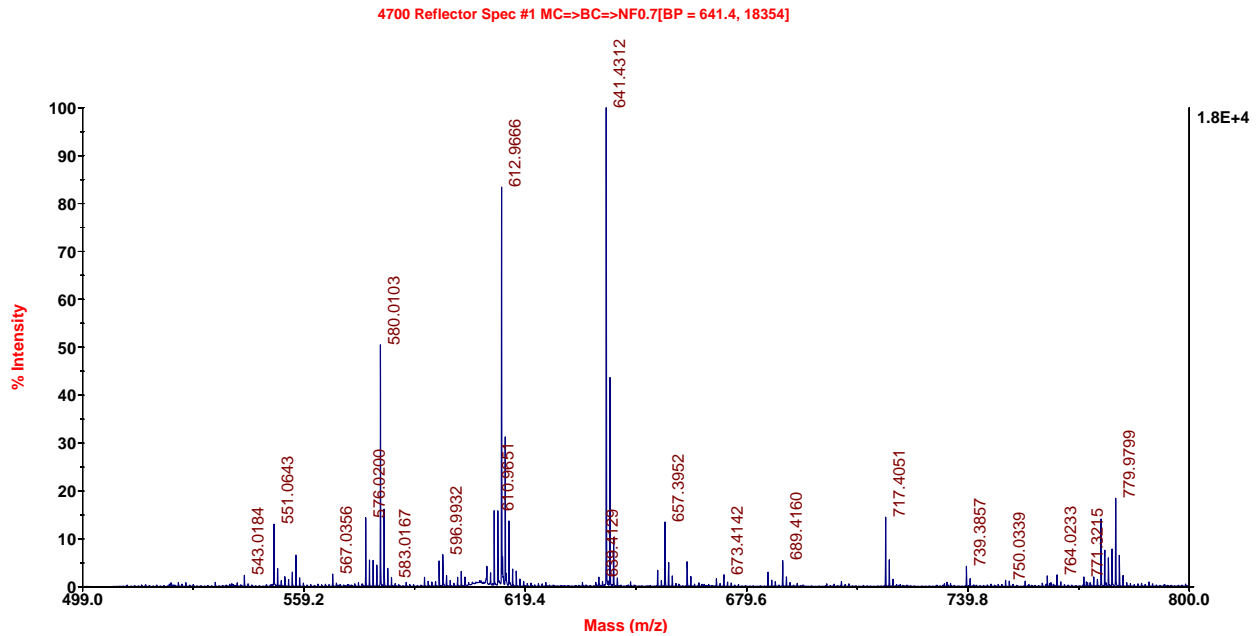


Abbildung B.6: MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl-6-*O*-butanoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid **18** mit THAP in ACN/TFA im Positivmodus (exakte Masse: 618,450 Da) (s. 3.2.8.6, S. 57)

MALDI-TOF-MS  
sample: 68 (0,3 mg/ml)

Matrix: 15 mg/ml THAP in 60% ACN / 0,3 % TFA  
SpotSet: HS\_Stuebs\_200409, Spot 43

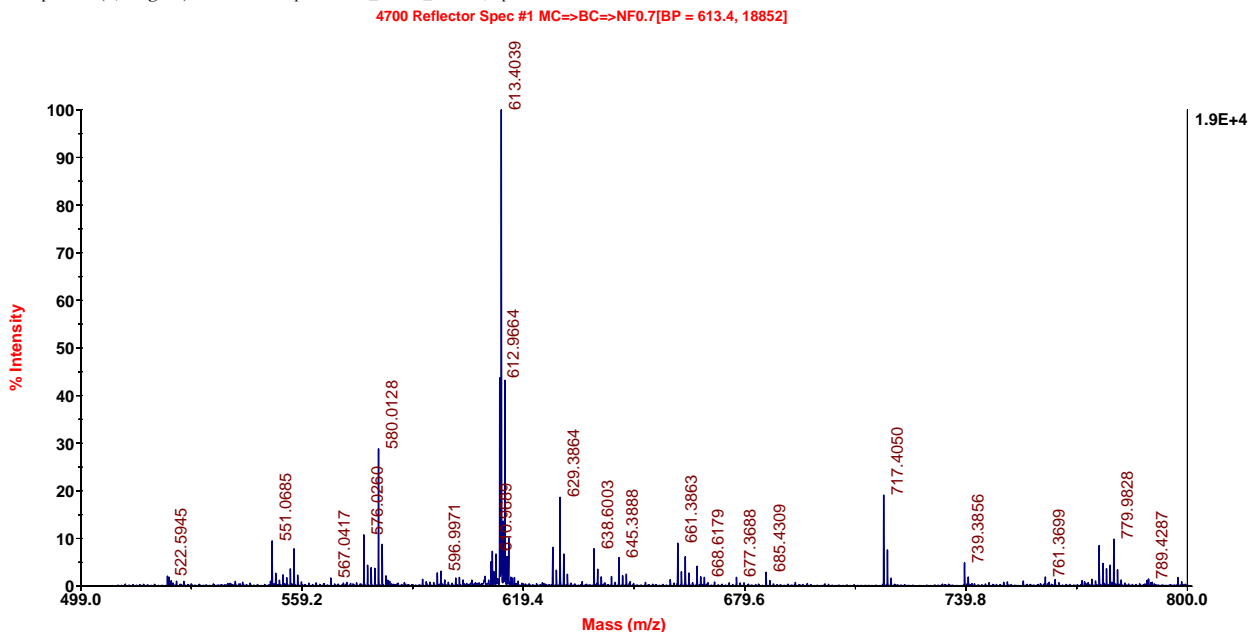


Abbildung B.7: MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl-6-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid **19** mit THAP in ACN/TFA im Positivmodus (exakte Masse: 590,418 Da) (s. 3.2.8.7, S. 58)

MALDI-TOF-MS  
sample: 58 (0,3 mg/ml)

Matrix: 15 mg/ml THAP in 60% ACN / 0,3 % TFA  
SpotSet: HS\_Stuebs\_200409, Spot 25

4700 Reflector Spec #1 MC=>BC=>NF0.7[BP = 533.2, 54471]

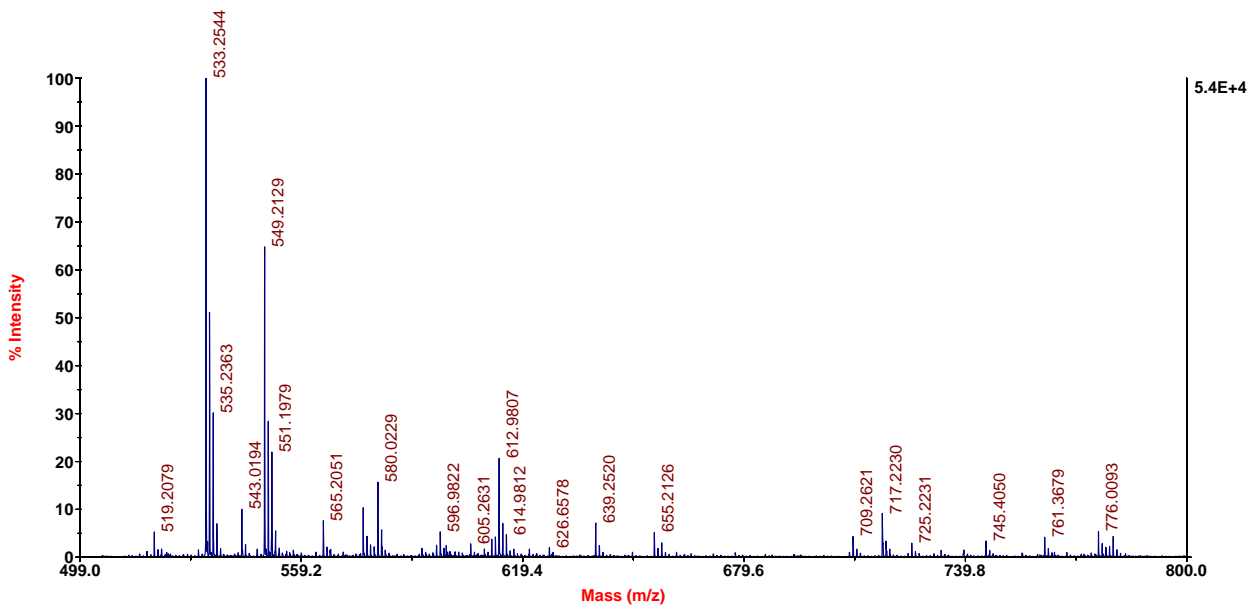


Abbildung B.8: MALDI-TOF-Spektrum von Methyl-6-O-(15-(2-ethylsulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid 20 mit THAP in ACN/TFA im Positivmodus (exakte Masse: 510,269 Da) (s. 3.2.8.8, S. 59)

MALDI-TOF-MS  
sample: 57 (0,3 mg/ml)

Matrix: 15 mg/ml THAP in 60% ACN / 0,3 % TFA  
SpotSet: HS\_Stuebs\_200409, Spot 24

4700 Reflector Spec #1 MC=>BC=>NF0.7[BP = 595.2, 7088]

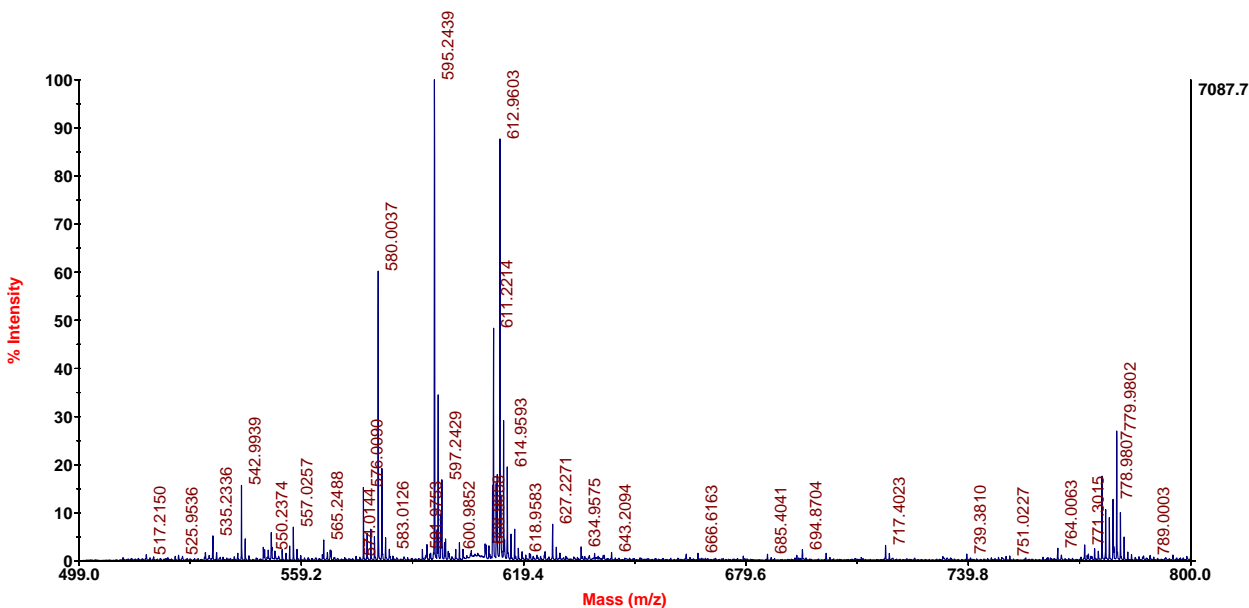


Abbildung B.9: MALDI-TOF-Spektrum von Phenyl-6-O-(15-(2-ethylsulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid 21 mit THAP in ACN/TFA im Positivmodus (exakte Masse: 572,284 Da) (s. 3.2.8.9, S. 60)



# Literaturverzeichnis

- [Abbott 2006] ABBOTT, A.: Lyme disease: uphill struggle. In: *Nature* 439 (2006), Nr. 7076, S. 524–5
- [Abraham u. a. 1987] ABRAHAM, W. ; WERTZ, P. W. ; BURKEN, R. R. ; DOWNING, D. T.: Glucosylsterol and acylglucosylsterol of snake epidermis: structure determination. In: *J. Lipid. Res.* 28 (1987), Nr. 4, S. 446–9
- [Adam u. a. 1991] ADAM, T. ; GASSMANN, G. S. ; RASIAH, C. ; GÖBEL, U. B.: Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from various sources. In: *Infect. Immun.* 59 (1991), Nr. 8, S. 2579–85
- [Afzelius 1910] AFZELIUS, Arvid: Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. In: *Arch. Dermatol. Syph.* 101 (1910), Nr. 2-3, S. 404
- [Afzelius 1921] AFZELIUS, Arvid: Erythema chronicum migrans. In: *Acta. Derm. Venereol. (Stockh.)* 2 (1921), S. 120–125
- [Antonara u. a. 2007] ANTONARA, S. ; CHAFEL, R. M. ; LAFRANCE, M. ; COBURN, J.: *Borrelia burgdorferi* adhesins identified using in vivo phage display. In: *Mol. Microbiol.* 66 (2007), Nr. 1, S. 262–76
- [Asbrink und Hovmark 1985] ASBRINK, E. ; HOVMARK, A.: Successful cultivation of spirochetes from skin lesions of patients with erythema chronicum migrans Afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans. In: *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B* 93 (1985), Nr. 2, S. 161–3
- [Bacon u. a. 2008] BACON, R. M. ; KUGELER, K. J. ; MEAD, P. S.: Surveillance for Lyme disease—United States, 1992–2006. In: *MMWR Surveill. Summ.* 57 (2008), Nr. 10, S. 1–9
- [Bärfverstedt 1943] BÄRFVERSTEDT, B.: Über Lymphadenosis benigna cutis. In: *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh.)* 11 (1943), S. 1–202
- [Balban 1911] BALBAN, W.: Erythema annulare, entstanden durch Insektenstiche. In: *Arch. Dermatol. Syph.* 105 (1911), Nr. 3, S. 423–430
- [Bannwarth 1941] BANNWARTH, A.: Chronische lymphocytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und Rheumatismus. In: *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* 113 (1941), Nr. 2, S. 284–376
- [Baranton u. a. 1992] BARANTON, G. ; POSTIC, D. ; SAINT GIRONS, I. ; BOERLIN, P. ; PIFFARETTI, J. C. ; ASSOUS, M. ; GRIMONT, P. A.: Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. In: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42 (1992), Nr. 3, S. 378–83
- [Barbour 1984] BARBOUR, A. G.: Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. In: *Yale J. Biol. Med.* 57 (1984), Nr. 4, S. 521–5
- [Barbour und Hayes 1986] BARBOUR, A. G. ; HAYES, S. F.: Biology of *Borrelia* species. In: *Microbiol. Rev.* 50 (1986), Nr. 4, S. 381–400
- [Barbour u. a. 1985] BARBOUR, A. G. ; HEILAND, R. A. ; HOWE, T. R.: Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: a molecular analysis of North American and European isolates. In: *J. Infect. Dis.* 152 (1985), Nr. 3, S. 478–84
- [Barbour u. a. 1984] BARBOUR, A. G. ; TESSIER, S. L. ; HAYES, S. F.: Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochetes. In: *Infect. Immun.* 45 (1984), Nr. 1, S. 94–100
- [Barstad u. a. 1985] BARSTAD, P. A. ; COLIGAN, J. E. ; RAUM, M. G. ; BARBOUR, A. G.: Variable major proteins of *Borrelia hermsii*. Epitope mapping and partial sequence analysis of CNBr peptides. In: *J. Exp. Med.* 161 (1985), Nr. 6, S. 1302–14
- [Barthold u. a. 1990] BARTHOLD, S. W. ; BECK, D. S. ; HANSEN, G. M. ; TERWILLIGER, G. A. ; MOODY, K. D.: Lyme borreliosis in selected strains and ages of laboratory mice. In: *J. Infect. Dis.* 162 (1990), Nr. 1, S. 133–8

- [Batsford u. a. 2004] BATSFORD, S. ; DUNN, J. ; MIHATSCH, M.: Outer surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* vary in their ability to induce experimental joint injury. In: *Arthritis Rheum.* 50 (2004), Nr. 7, S. 2360–9
- [Bauer u. a. 2001] BAUER, S. ; KIRSCHNING, C. J. ; HACKER, H. ; REDECKE, V. ; HAUSMANN, S. ; AKIRA, S. ; WAGNER, H. ; LIPFORD, G. B.: Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001), Nr. 16, S. 9237–42
- [Beermann u. a. 2000] BEERMANN, C. ; LOCHNIT, G. ; GEYER, R. ; GROSCURTH, P. ; FILGUEIRA, L.: The lipid component of lipoproteins from *Borrelia burgdorferi*: structural analysis, antigenicity, and presentation via human dendritic cells. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267 (2000), Nr. 3, S. 897–905
- [Belisle u. a. 1994] BELISLE, J. T. ; BRANDT, M. E. ; RADOLF, J. D. ; NORGARD, M. V.: Fatty acids of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. In: *J. Bacteriol.* 176 (1994), Nr. 8, S. 2151–7
- [Belperron u. a. 2005] BELPERRON, A. A. ; DAILEY, C. M. ; BOCKENSTEDT, L. K.: Infection-induced marginal zone B cell production of *Borrelia hermsii*-specific antibody is impaired in the absence of CD1d. In: *J Immunol* 174 (2005), Nr. 9, S. 5681–6
- [Ben-Menachem u. a. 2003] BEN-MENACHEM, G. ; KUBLER-KIELB, J. ; COXON, B. ; YERGEY, A. ; SCHNEERSON, R.: A newly discovered cholesteryl galactoside from *Borrelia burgdorferi*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003), Nr. 13, S. 7913–8
- [Benach u. a. 1983] BENACH, J. L. ; BOSLER, E. M. ; HANRAHAN, J. P. ; COLEMAN, J. L. ; HABICHT, G. S. ; BAST, T. F. ; CAMERON, D. J. ; ZIEGLER, J. L. ; BARBOUR, A. G. ; BURGENDORFER, W. ; EDELMAN, R. ; KASLOW, R. A.: Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. In: *N. Engl. J. Med.* 308 (1983), Nr. 13, S. 740–2
- [Benach u. a. 1988] BENACH, J. L. ; COLEMAN, J. L. ; GARCIA-MONCO, J. C. ; DEPONTE, P. C.: Biological activity of *Borrelia burgdorferi* antigens. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539 (1988), S. 115–25
- [Berglund u. a. 1995] BERGLUND, J. ; EITREM, R. ; ORNSTEIN, K. ; LINDBERG, A. ; RINGER, A. ; ELMRUD, H. ; CARLSSON, M. ; RUNEHAGEN, A. ; SVANBORG, C. ; NORRBY, R.: An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. In: *N. Engl. J. Med.* 333 (1995), Nr. 20, S. 1319–27
- [Bianchi 1950] BIANCHI, G. E.: Die Penicillinbehandlung der Lymphozytome. In: *Dermatologica* 100 (1950), S. 270–273
- [Biberstein 1923] BIBERSTEIN, H.: Lymphozytome. In: *Zentralbl. Hautkr.* 6 (1923), S. 70–71
- [Binder u. a. 1955] BINDER, E. ; DOEPFMER, R. ; HORNSTEIN, O.: Übertragung des Erythema Chronicum Migrans von Mensch zu Mensch in zwei Passagen. In: *Klin. Wochenschr.* 33 (1955), Nr. 29/30, S. 727–8
- [Bock und Pedersen 1983] BOCK, K. ; PEDERSEN, C.: Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. In: TIPSON, R. S. (Hrsg.) ; HORTON, D. (Hrsg.): *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* Bd. 41. Academic Press, 1983, S. 27–66
- [Bock und Thøgersen 1982] BOCK, K. ; THØGERSEN, H.: Nuclear magnetic resonance spectroscopy in the study of mono- and oligosaccharides. In: WEBB, G. A. (Hrsg.): *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* Bd. 13. London, New York : Academic Press, 1982, S. 1–57
- [Brandt u. a. 1990] BRANDT, M. E. ; RILEY, B. S. ; RADOLF, J. D. ; NORGARD, M. V.: Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. In: *Infect. Immun.* 58 (1990), Nr. 4, S. 983–91
- [Brissette u. a. 2009] BRISSETTE, C. A. ; HAUPT, K. ; BARTHEL, D. ; COOLEY, A. E. ; BOWMAN, A. ; SKERKA, C. ; WALLICH, R. ; ZIPFEL, P. F. ; KRAICZY, P. ; STEVENSON, B.: *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. In: *Infect. Immun.* 77 (2009), Nr. 1, S. 300–6
- [Bryceson 1976] BRYCESON, A. D.: Clinical pathology of the Jarisch-Herxheimer reaction. In: *J. Infect. Dis.* 133 (1976), Nr. 6, S. 696–704
- [Buchwald 1883] BUCHWALD, Alfred: Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. In: *Arch. Dermatol. Syph.* 10 (1883), Nr. 1, S. 553–556
- [Burgdorfer 1984] BURGENDORFER, W.: The New Zealand white rabbit: an experimental host for infecting ticks with Lyme disease spirochetes. In: *Yale J. Biol. Med.* 57 (1984), Nr. 4, S. 609–12



- [Burgdorfer u. a. 1982] BURGDORFER, W. ; BARBOUR, A. G. ; HAYES, S. F. ; BENACH, J. L. ; GRUNWALDT, E. ; DAVIS, J. P.: Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? In: *Science* 216 (1982), Nr. 4552, S. 1317–9
- [Burgdorfer u. a. 1983] BURGDORFER, W. ; BARBOUR, A. G. ; HAYES, S. F. ; PETER, O. ; AESCHLI-MANN, A.: Erythema chronicum migrans—a tickborne spirochetosis. In: *Acta. Trop.* 40 (1983), Nr. 1, S. 79–83
- [Busch u. a. 1996] BUSCH, U. ; HIZO-TEUFEL, C. ; BOEHMER, R. ; FINGERLE, V. ; NITSCHKO, H. ; WILSKE, B. ; PREAC-MURSIC, V.: Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. In: *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996), Nr. 5, S. 1072–8
- [Canica u. a. 1993] CANICA, M. M. ; NATO, F. ; MERLE, L. du ; MAZIE, J. C. ; BARANTON, G. ; POSTIC, D.: Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. In: *Scand. J. Infect. Dis.* 25 (1993), Nr. 4, S. 441–8
- [Carroll u. a. 1999] CARROLL, J. A. ; GARON, C. F. ; SCHWAN, T. G.: Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. In: *Infect. Immun.* 67 (1999), Nr. 7, S. 3181–7
- [Carter u. a. 1956] CARTER, H. E. ; MCCLUER, R. H. ; SLIFER, E. D.: Lipids of Wheat Flour. I. Characterization of Galactosylglycerol Components. In: *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956), Nr. 15, S. 3735–3738
- [Casjens u. a. 2000] CASJENS, S. ; PALMER, N. ; VUGT, R. van ; HUANG, W. M. ; STEVENSON, B. ; ROSA, P. ; LATHIGRA, R. ; SUTTON, G. ; PETERSON, J. ; DODSON, R. J. ; HAFT, D. ; HICKEY, E. ; GWINN, M. ; WHITE, O. ; FRASER, C. M.: A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. In: *Mol. Microbiol.* 35 (2000), Nr. 3, S. 490–516
- [Centers for Disease Control and Prevention 1995] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: Lyme Disease - United States, 1994. In: *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 44 (1995), Nr. 24, S. 459–462
- [Centers for Disease Control and Prevention 2007] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: Lyme disease - United States, 2003–2005. In: *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 56 (2007), Nr. 23, S. 573–6
- [Charon und Goldstein 2002] CHARON, N. W. ; GOLDSTEIN, S. F.: Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. In: *Annu. Rev. Genet.* 36 (2002), S. 47–73
- [Collares-Pereira u. a. 2004] COLLARES-PEREIRA, M. ; COUCEIRO, S. ; FRANCA, I. ; KURTENBACH, K. ; SCHAFFER, S. M. ; VITORINO, L. ; GONCALVES, L. ; BAPTISTA, S. ; VIEIRA, M. L. ; CUNHA, C.: First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. In: *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004), Nr. 3, S. 1316–8
- [Cruz u. a. 2008] CRUZ, A. R. ; MOORE, M. W. ; LA VAKE, C. J. ; EGGERS, C. H. ; SALAZAR, J. C. ; RADOLF, J. D.: Phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, potentiates innate immune activation and induces apoptosis in human monocytes. In: *Infect. Immun.* 76 (2008), Nr. 1, S. 56–70
- [De Silva und Fikrig 1995] DE SILVA, A. M. ; FIKRIG, E.: Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in Ixodes ticks during blood feeding. In: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53 (1995), Nr. 4, S. 397–404
- [Deng u. a. 1999] DENG, S. ; YU, B. ; XIE, J. ; HUI, Y.: Highly Efficient Glycosylation of Sapogenins. In: *J. Org. Chem.* 64 (1999), Nr. 19, S. 7265–7266
- [Diza u. a. 2004] DIZA, E. ; PAPA, A. ; VEZYRI, E. ; TSOUNIS, S. ; MILONAS, I. ; ANTONIADIS, A.: *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. In: *Emerg. Infect. Dis.* 10 (2004), Nr. 9, S. 1692–3
- [Dörmann und Benning 2002] DÖRMANN, P. ; BENNING, C.: Galactolipids rule in seed plants. In: *Trends Plant Sci.* 7 (2002), Nr. 3, S. 112–8
- [Duperon u. a. 1983] DUPERON, Robert ; THIERSAULT, Martine ; DUPERON, Paulette: Occurrence of steryl glycosides and acylated steryl glycosides in some marine algae. In: *Phytochemistry* 22 (1983), Nr. 2, S. 535–538
- [Earnhart u. a. 2007] EARNHART, C. G. ; BUCKLES, E. L. ; MARCONI, R. T.: Development of an OspC-based tetravalent, recombinant, chimeric vaccinogen that elicits bactericidal antibody against diverse Lyme disease spirochete strains. In: *Vaccine* 25 (2007), Nr. 3, S. 466–80
- [Eiffert u. a. 1991] EIFFERT, H. ; LOTTER, H. ; JARECKI-KHAN, K. ; THOMSEN, R.: Identification

- of an immunoreactive non-proteinaceous component in *Borrelia burgdorferi*. In: *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 180 (1991), Nr. 5, S. 229–37
- [Erdile u. a. 1993] ERDILE, L. F. ; BRANDT, M. A. ; WARAKOMSKI, D. J. ; WESTRACK, G. J. ; SADZIENE, A. ; BARBOUR, A. G. ; MAYS, J. P.: Role of attached lipid in immunogenicity of *Borrelia burgdorferi* OspA. In: *Infect. Immun.* 61 (1993), Nr. 1, S. 81–90
- [Excoffier u. a. 1975] EXCOFFIER, G. ; GAGNAIRE, D. ; UTILLE, J.-P.: Coupure sélective par l'hydrazine des groupements acétyles anomères de résidus glycosyles acétylés. In: *Carbohydr. Res.* 39 (1975), Nr. 2, S. 368–373
- [Fikrig u. a. 1990] FIKRIG, E. ; BARTHOLD, S. W. ; KANTOR, F. S. ; FLAVELL, R. A.: Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. In: *Science* 250 (1990), Nr. 4980, S. 553–6
- [Fikrig u. a. 1992] FIKRIG, E. ; BARTHOLD, S. W. ; MARCANTONIO, N. ; DEPONTE, K. ; KANTOR, F. S. ; FLAVELL, R. A.: Roles of OspA, OspB, and flagellin in protective immunity to Lyme borreliosis in laboratory mice. In: *Infect. Immun.* 60 (1992), Nr. 2, S. 657–61
- [Fingerle u. a. 2008] FINGERLE, V. ; SCHULTE-SPECHTEL, U. C. ; RUZIC-SABLJIC, E. ; LEONHARD, S. ; HOFMANN, H. ; WEBER, K. ; PFISTER, K. ; STRLE, F. ; WILSKE, B.: Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. In: *Int. J. Med. Microbiol.* 298 (2008), Nr. 3-4, S. 279–90
- [Folch u. a. 1957] FOLCH, J. ; LEES, M. ; SLOANE STANLEY, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. In: *J. Biol. Chem.* 226 (1957), Nr. 1, S. 497–509
- [Fontana u. a. 1968] FONTANA, A. ; SCOFFONE, E. ; BENASSI, C. A.: Sulfenyl halides as modifying reagents for polypeptides and proteins. II. Modification of cysteinyl residues. In: *Biochemistry* 7 (1968), Nr. 3, S. 980–6
- [Fraser u. a. 1997] FRASER, C. M. ; CASJENS, S. ; HUANG, W. M. ; SUTTON, G. G. ; CLAYTON, R. ; LATHIGRA, R. ; WHITE, O. ; KETCHUM, K. A. ; DODSON, R. ; HICKEY, E. K. ; GWINN, M. ; DOUGHERTY, B. ; TOMB, J. F. ; FLEISCHMANN, R. D. ; RICHARDSON, D. ; PETERSON, J. ; KERLAVAGE, A. R. ; QUACKENBUSH, J. ; SALZBERG, S. ; HANSON, M. ; VUGT, R. van ; PALMER, N. ; ADAMS, M. D. ; GOCAYNE, J. ; WEIDMAN, J. ; UTTERBACK, T. ; WATTHEY, L. ; McDONALD, L. ; ARTIACH, P. ; BOWMAN, C. ; GARLAND, S. ; FUJI, C. ; COTTON, M. D. ; HORST, K. ; ROBERTS, K. ; HATCH, B. ; SMITH, H. O. ; VENTER, J. C.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. In: *Nature* 390 (1997), Nr. 6660, S. 580–6
- [Fuchs u. a. 1994] FUCHS, H. ; WALLICH, R. ; SIMON, M. M. ; KRAMER, M. D.: The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), Nr. 26, S. 12594–8
- [Fukunaga u. a. 1996] FUKUNAGA, M. ; HAMASE, A. ; OKADA, K. ; NAKAO, M.: *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. In: *Microbiol. Immunol.* 40 (1996), Nr. 11, S. 877–81
- [Garcia-Monco und Benach 1989] GARCIA-MONCO, J. C. ; BENACH, J. L.: The pathogenesis of Lyme disease. In: *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 15 (1989), Nr. 4, S. 711–26
- [Garcia Monco u. a. 1992] GARCIA MONCO, J. C. ; FERNANDEZ VILLAR, B. ; ROGERS, R. C. ; SZCZEPANSKI, A. ; WHEELER, C. M. ; BENACH, J. L.: *Borrelia burgdorferi* and other related spirochetes bind to galactocerebroside. In: *Neurology* 42 (1992), Nr. 7, S. 1341–8
- [Garcia-Monco u. a. 1990] GARCIA-MONCO, J. C. ; VILLAR, B. F. ; ALEN, J. C. ; BENACH, J. L.: *Borrelia burgdorferi* in the central nervous system: experimental and clinical evidence for early invasion. In: *J. Infect. Dis.* 161 (1990), Nr. 6, S. 1187–93
- [Garin und Bujadoux 1922] GARIN, C H. ; BUJADOUX, C H.: Paralyse par les tiques. In: *J. Med. Lyon.* 71 (1922), S. 765–767
- [Goettner u. a. 2005] GOETTNER, G. ; SCHULTE-SPECHTEL, U. ; HILLERMANN, R. ; LIEGL, G. ; WILSKE, B. ; FINGERLE, V.: Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. In: *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005), Nr. 8, S. 3602–9
- [Gotor und Pulido 1991] GOTOR, V. ; PULIDO, R.: An Improved Procedure for Regioselective Acylation of Carbohydrates: Novel Enzymatic Acylation of alpha-D-Glucopyranose and Methyl alpha-D-Glucopyranoside. In: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1991), Nr. 2, S. 491–492

- [Götz 1954] GÖTZ, H.: Die Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer als Infektionskrankheit. In: *Hautarzt* 5 (1954), S. 491–504
- [Gray 2002] GRAY, J. S.: Biology of Ixodes species ticks in relation to tick-borne zoonoses. In: *Wien. Klin. Wochenschr.* 114 (2002), Nr. 13-14, S. 473–8
- [Griffin 1998] GRIFFIN, G. E.: Cytokines involved in human septic shock—the model of the Jarisch-Herxheimer reaction. In: *J. Antimicrob. Chemother.* 41 Suppl A (1998), S. 25–9
- [Hanson und Edelman 2003] HANSON, M. S. ; EDELMAN, R.: Progress and controversy surrounding vaccines against Lyme disease. In: *Expert Rev. Vaccines* 2 (2003), Nr. 5, S. 683–703
- [Hantke und Braun 1973] HANTKE, K. ; BRAUN, V.: Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the Escherichia coli outer membrane. In: *Eur. J. Biochem.* 34 (1973), Nr. 2, S. 284–96
- [Hardy und Levin 1983] HARDY, JR. ; LEVIN, J.: Lack of endotoxin in Borrelia hispanica and Treponema pallidum. In: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 174 (1983), Nr. 1, S. 47–52
- [Hassler 1998] HASSLER, D.: *Langzeitbeobachtungen zum Krankheitsbild der Lyme-Borreliose in einem Endemiegebiet. Daten zur Vektorökologie, Epidemiologie, Serologie und Klinik, Therapie und Therapiekontrolle*, Universität Heidelberg, Habil.-Schr., 1998
- [Hauser 1955] HAUSER, Walter: Zur Klinik, Ätiologie und Pathogenese der Akrodermatitis chronica atrophicans. In: *Hautarzt* 6 (1955), Nr. 2, S. 77–80
- [Hayami u. a. 1979] HAYAMI, M. ; OKABE, A. ; SASAI, K. ; HAYASHI, H. ; KANEMASA, Y.: Presence and synthesis of cholesterol in stable staphylococcal L-forms. In: *J. Bacteriol.* 140 (1979), Nr. 3, S. 859–63
- [Hayashi und Wu 1990] HAYASHI, S. ; WU, H. C.: Lipoproteins in bacteria. In: *J. Bioenerg. Biomembr.* 22 (1990), Nr. 3, S. 451–71
- [Hayes und Piesman 2003] HAYES, E. B. ; PIESMAN, J.: How can we prevent Lyme disease? In: *N. Engl. J. Med.* 348 (2003), Nr. 24, S. 2424–30
- [Hayes und Knight 2001] HAYES, S. M. ; KNIGHT, K. L.: Group 1 CD1 genes in rabbit. In: *J Immunol* 166 (2001), Nr. 1, S. 403–10
- [Hellerström 1930] HELLERSTRÖM: Erythema chronicum migrans Afzelii. In: *Acta Derm. Venereol. (Stockh.)* 11 (1930), S. 315–321
- [Herxheimer und Hartmann 1902] HERXHEIMER, Karl ; HARTMANN, Kuno: Ueber Acrodermatitis chronica atrophicans. In: *Arch. Dermatol. Syph.* 61 (1902), Nr. 1, S. 57–76, 255–300
- [Herzer 1993] HERZER, P.: Rheumatic manifestations in Lyme borreliosis. In: *Clin. Dermatol.* 11 (1993), Nr. 3, S. 401–6
- [Herzner u. a. 1998] HERZNER, H. ; EBERLING, J. ; SCHULTZ, M. ; ZIMMER, J. ; KUNZ, H.: Oligosaccharide synthesis via electrophile-induced activation of glycosyl-N-allylcarbamates. In: *J. Carbohydr. Chem.* 17 (1998), Nr. 4&5, S. 759–776
- [Hirai u. a. 1995] HIRAI, Y. ; HAQUE, M. ; YOSHIDA, T. ; YOKOTA, K. ; YASUDA, T. ; OGUMA, K.: Unique cholesteryl glucosides in Helicobacter pylori: composition and structural analysis. In: *J. Bacteriol.* 177 (1995), Nr. 18, S. 5327–33
- [Hirschfeld u. a. 1999] HIRSCHFELD, M. ; KIRSCHNING, C. J. ; SCHWANDNER, R. ; WESCHE, H. ; WEIS, J. H. ; WOOTEN, R. M. ; WEIS, J. J.: Cutting edge: inflammatory signaling by Borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. In: *J. Immunol.* 163 (1999), Nr. 5, S. 2382–6
- [Hollström 1951] HOLLSTRÖM, E.: Successful treatment of erythema migrans Afzelii. In: *Acta Derm. Venereol. (Stockh.)* 31 (1951), S. 235–243
- [Honarvar u. a. 1994] HONARVAR, N. ; SCHAIBLE, U. E. ; GALANOS, C. ; WALLICH, R. ; SIMON, M. M.: A 14,000 MW lipoprotein and a glycolipid-like structure of Borrelia burgdorferi induce proliferation and immunoglobulin production in mouse B cells at high frequencies. In: *Immunology* 82 (1994), Nr. 3, S. 389–96
- [Hossain u. a. 2001] HOSSAIN, H. ; WELLENSIEK, H. J. ; GEYER, R. ; LOCHNIT, G.: Structural analysis of glycolipids from Borrelia burgdorferi. In: *Biochimie* 83 (2001), Nr. 7, S. 683–92
- [Howe u. a. 1985] HOWE, T. R. ; MAYER, L. W. ; BARBOUR, A. G.: A single recombinant plasmid expressing two major outer surface proteins of the Lyme disease spirochete. In: *Science* 227 (1985), Nr. 4687, S. 645–6

- [Hubalek und Halouzka 1997] HUBALEK, Z. ; HALOUZKA, J.: Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. In: *Eur. J. Epidemiol.* 13 (1997), Nr. 8, S. 951–7
- [Huppertz u. a. 1999] HUPPERTZ, H. I. ; BÖHME, M. ; STANDAERT, S. M. ; KARCH, H. ; PLOTKIN, S. A.: Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. In: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18 (1999), Nr. 10, S. 697–703
- [Iga u. a. 2005] IGA, D. P. ; IGA, S. ; SCHMIDT, R. R. ; BUZAS, M. C.: Chemical synthesis of cholesteryl beta-D-galactofuranoside and -pyranoside. In: *Carbohydr. Res.* 340 (2005), Nr. 12, S. 2052–4
- [Inamoto u. a. 1993] INAMOTO, Y. ; ARIYAMA, S. ; HAMANAKA, Y. ; OKITA, K. ; KANETA, Y. ; NAGATE, T. ; KONDOU, I. ; TAKEMOTO, T.: Lipid analysis of *Helicobacter pylori*. In: *J. Clin. Gastroenterol.* 17 Suppl 1 (1993), S. S136–9
- [Janeway u. a. 2005] JANEWAY, C. A. ; TRAVERS, P. ; WALPORT, M. ; SHLOMCHIK, M. J.: *Immunobiology - the immune system in health and disease*. 6th edition. New York : Garland, 2005
- [Janeway und Medzhitov 1999] JANEWAY, Jr. ; MEDZHITOV, R.: Lipoproteins take their toll on the host. In: *Curr. Biol.* 9 (1999), Nr. 23, S. R879–82
- [Jauris-Heipke u. a. 1993] JAURIS-HEIPKE, S. ; FUCHS, R. ; MOTZ, M. ; PREAC-MURSIC, V. ; SCHWAB, E. ; SOUTSCHEK, E. ; WILL, G. ; WILSKE, B.: Genetic heterogeneity of the genes coding for the outer surface protein C (OspC) and the flagellin of *Borrelia burgdorferi*. In: *Med. Microbiol. Immunol.* 182 (1993), Nr. 1, S. 37–50
- [Jessner 1921] JESSNER, M.: Zur Kenntnis der Akrodermatitis chronica atrophicans. In: *Arch. Dermatol. Syph.* 134 (1921), Nr. 1, S. 478–487
- [Johnson 1977] JOHNSON, R. C.: The spirochetes. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 31 (1977), S. 89–106
- [Johnson u. a. 1984a] JOHNSON, R. C. ; HYDE, F. W. ; RUMPEL, C. M.: Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. In: *Yale J. Biol. Med.* 57 (1984), Nr. 4, S. 529–37
- [Johnson u. a. 1986a] JOHNSON, R. C. ; KODNER, C. ; RUSSELL, M.: Active immunization of hamsters against experimental infection with *Borrelia burgdorferi*. In: *Infect. Immun.* 54 (1986), Nr. 3, S. 897–8
- [Johnson u. a. 1986b] JOHNSON, R. C. ; KODNER, C. ; RUSSELL, M.: Passive immunization of hamsters against experimental infection with the Lyme disease spirochete. In: *Infect. Immun.* 53 (1986), Nr. 3, S. 713–4
- [Johnson u. a. 1970] JOHNSON, R. C. ; LIVERMORE, B. P. ; JENKIN, H. M. ; EGGEBRATEN, L.: Lipids of *Treponema pallidum* Kazan 5. In: *Infect. Immun.* 2 (1970), Nr. 5, S. 606–609
- [Johnson u. a. 1973] JOHNSON, R. C. ; RITZI, D. M. ; LIVERMORE, B. P.: Outer envelope of virulent *Treponema pallidum*. In: *Infect. Immun.* 8 (1973), Nr. 2, S. 291–5
- [Johnson u. a. 1984b] JOHNSON, R. C. ; SCHMID, G. P. ; HYDE, F. W. ; STEIGERWALT, A. G. ; BRENNER, D. J.: *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. In: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34 (1984), S. 496–497
- [Jones u. a. 2009] JONES, K. L. ; SEWARD, R. J. ; BEN-MENACHEM, G. ; GLICKSTEIN, L. J. ; COSTELLO, C. E. ; STEERE, A. C.: Strong IgG antibody responses to *Borrelia burgdorferi* glycolipids in patients with Lyme arthritis, a late manifestation of the infection. In: *Clin. Immunol.* 132 (2009), Nr. 1, S. 93–102
- [Kahle 1942] KAHLE, Rudolf H.: *Pallidareaktion bei peripheren Durchblutungsstörungen der Haut, insbesondere bei Akrodermatitis atrophicans*, Universität Halle, 4°, 1942
- [Kaiser 1998] KAISER, R.: Neuroborreliosis. In: *J. Neurol.* 245 (1998), Nr. 5, S. 247–55
- [Kaneda u. a. 1997] KANEDA, K. ; MASUZAWA, T. ; YASUGAMI, K. ; SUZUKI, T. ; SUZUKI, Y. ; YANAGIHARA, Y.: Glycosphingolipid-binding protein of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: *Infect. Immun.* 65 (1997), Nr. 8, S. 3180–5
- [Kasai u. a. 1981] KASAI, T. ; OKUDA, M. ; SAKAMURA, S.: 6-O-Malonyl-beta-methyl-d-glucopyranoside from roots of *Rumex obtusifolius*. In: *Phytochemistry* 20 (1981), Nr. 5, S. 1131–1132
- [Kastelic-Suhadolc 1980] KASTELIC-SUHADOLC, Tatjana: Cholesteryl glucoside in *Candida bogoriensis*. In: *Biochim. Biophys. Acta* 620 (1980), Nr. 2, S. 322–325
- [Katona u. a. 1992] KATONA, L. I. ; BECK, G. ; HABICHT, G. S.: Purification and immunological characterization of a major low-molecular-weight lipoprotein from *Borrelia burgdorferi*. In: *Infect. Immun.* 60 (1992), Nr. 12, S. 4995–5003

- [Kawabata u. a. 1993] KAWABATA, H. ; MASUZAWA, T. ; YANAGIHARA, Y.: Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. In: *Microbiol. Immunol.* 37 (1993), Nr. 11, S. 843–8
- [Kawano u. a. 1997] KAWANO, T. ; CUI, J. ; KOEZUKA, Y. ; TOURA, I. ; KANEKO, Y. ; MOTOKI, K. ; UENO, H. ; NAKAGAWA, R. ; SATO, H. ; KONDO, E. ; KOSEKI, H. ; TANIGUCHI, M.: CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. In: *Science* 278 (1997), Nr. 5343, S. 1626–9
- [Keller u. a. 1994] KELLER, D. ; KOSTER, F. T. ; MARKS, D. H. ; HOSBACH, P. ; ERDILE, L. F. ; MAYS, J. P.: Safety and immunogenicity of a recombinant outer surface protein A Lyme vaccine. In: *JAMA* 271 (1994), Nr. 22, S. 1764–8
- [Kinjo u. a. 2006] KINJO, Y. ; TUPIN, E. ; WU, D. ; FUJIO, M. ; GARCIA-NAVARRO, R. ; BENHIA, M. R. ; ZAJONC, D. M. ; BEN-MENACHEM, G. ; AINGE, G. D. ; PAINTER, G. F. ; KHURANA, A. ; HOEBE, K. ; BEHAR, S. M. ; BEUTLER, B. ; WILSON, I. A. ; TSUJI, M. ; SELLATI, T. J. ; WONG, C. H. ; KRONENBERG, M.: Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. In: *Nat. Immunol.* 7 (2006), Nr. 9, S. 978–86
- [Kiribuchi u. a. 1967] KIRIBUCHI, T. ; YASUMATSU, N. ; FUNAHASHI, S.: Synthesis of 6-O-palmitoyl-beta-D-glucosyl beta-sitosterol. In: *Agr. Biol. Chem.* 31 (1967), Nr. 10, S. 1244–1247
- [Klaviter und Johnson 1979] KLAVITER, E. C. ; JOHNSON, R. C.: Isolation of the outer envelope, chemical components, and ultrastructure of *Borrelia hermsi* grown in vitro. In: *Acta Trop.* 36 (1979), Nr. 2, S. 123–31
- [Klenk und Doss 1966] KLENK, E. ; DOSS, M.: Über das Vorkommen von Estercerebrosiden im Gehirn. In: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 346 (1966), Nr. 1-2, S. 296–8
- [Klenk und Löhr 1967] KLENK, E. ; LÖHR, J. P.: Über die Estercerebroside des Gehirns. In: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348 (1967), Nr. 12, S. 1712–4
- [Köhler und Milstein 1975] KÖHLER, G. ; MILSTEIN, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: *Nature* 256 (1975), Nr. 5517, S. 495–7
- [Köstens und Willuhn 1973] KÖSTENS, J. ; WILLUHN, G.: Steringlykoside und Acyl-Steringlykoside in Blättern von *Solanum dulcamara*. In: *Planta Med.* 24 (1973), Nr. 3, S. 278–85
- [Kraiczny u. a. 2002] KRAICZY, P. ; SKERKA, C. ; ZIPFEL, P. F. ; BRADE, V.: Complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*: a new protein family involved in complement resistance. In: *Wien. Klin. Wochenschr.* 114 (2002), Nr. 13-14, S. 568–73
- [Kramer u. a. 1996] KRAMER, M. D. ; WALLICH, R. ; SIMON, M. M.: The outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi*: a vaccine candidate and bioactive mediator. In: *Infection* 24 (1996), Nr. 2, S. 190–4
- [Krause u. a. 2006] KRAUSE, P. J. ; FOLEY, D. T. ; BURKE, G. S. ; CHRISTIANSON, D. ; CLOSTER, L. ; SPIELMAN, A.: Reinfection and relapse in early Lyme disease. In: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75 (2006), Nr. 6, S. 1090–4
- [Kulkarni und Gervay-Hague 2008] KULKARNI, S. S. ; GERVAY-HAGUE, J.: Two-step synthesis of the immunogenic bacterial glycolipid BbGL1. In: *Org. Lett.* 10 (2008), Nr. 21, S. 4739–42
- [Kumar u. a. 2000] KUMAR, H. ; BERPERRON, A. ; BARTHOLD, S. W. ; BOCKENSTEDT, L. K.: Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*. In: *J. Immunol.* 165 (2000), Nr. 9, S. 4797–801
- [Kurtenbach u. a. 2002] KURTENBACH, K. ; DE MICHELIS, S. ; ETTI, S. ; SCHAFFER, S. M. ; SEWELL, H. S. ; BRADE, V. ; KRAICZY, P.: Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato—the key role of host complement. In: *Trends Microbiol.* 10 (2002), Nr. 2, S. 74–9
- [von Lackum und Stevenson 2005] LACKUM, K. von ; STEVENSON, B.: Carbohydrate utilization by the Lyme borreliosis spirochete, *Borrelia burgdorferi*. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 243 (2005), Nr. 1, S. 173–9
- [Lahdenne u. a. 1997] LAHDENNE, P. ; PORCELLA, S. F. ; HAGMAN, K. E. ; AKINS, D. R. ; POPOVA, T. G. ; COX, D. L. ; KATONA, L. I. ; RADOLF, J. D. ; NORGARD, M. V.: Molecular characterization of a 6.6-kilodalton *Borrelia burgdorferi* outer membrane-associated lipoprotein (lp6.6) which appears to be downregulated during mammalian infection. In: *Infect. Immun.* 65 (1997), Nr. 2, S. 412–21
- [Lam u. a. 1994] LAM, T. T. ; NGUYEN, T. P. ; MONTGOMERY, R. R. ; KANTOR, F. S. ; FIKRIG, E. ; FLAVELL, R. A.: Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. In: *Infect. Immun.* 62 (1994), Nr. 1, S. 290–8

- [Lane u. a. 1991] LANE, R. S. ; PIESMAN, J. ; BURGDORFER, W.: Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. In: *Annu. Rev. Entomol.* 36 (1991), S. 587–609
- [Le Fleche u. a. 1997] LE FLECHE, A. ; POSTIC, D. ; GIRARDET, K. ; PETER, O. ; BARANTON, G.: Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. In: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1997), Nr. 4, S. 921–5
- [Leadbetter u. a. 2008] LEADBETTER, E. A. ; BRIGL, M. ; ILLARIONOV, P. ; COHEN, N. ; LUTERAN, M. C. ; PILLAI, S. ; BESRA, G. S. ; BRENNER, M. B.: NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008), Nr. 24, S. 8339–44
- [Lebech u. a. 1994] LEBECH, A. M. ; HANSEN, K. ; WILSKE, B. ; THEISEN, M.: Taxonomic classification of 29 *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients with Lyme borreliosis: a comparison of five different phenotypic and genotypic typing schemes. In: *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 183 (1994), Nr. 6, S. 325–41
- [Lennhoff 1948] LENNHOF, Carl: Spirochaetes in aetiologically obscure diseases. In: *Acta. Derm. Venereol. (Stockh.)* 28 (1948), Nr. 3, S. 295–324
- [Lepage 1964] LEPAGE, M.: Isolation and Characterization of an Esterified Form of Steryl Glucoside. In: *J. Lipid. Res.* 5 (1964), S. 587–92
- [Lien u. a. 1999] LIEN, E. ; SELLATI, T. J. ; YOSHIMURA, A. ; FLO, T. H. ; RAWADI, G. ; FINBERG, R. W. ; CARROLL, J. D. ; ESPEVIK, T. ; INGALLS, R. R. ; RADOLF, J. D. ; GOLENBOCK, D. T.: Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. In: *J. Biol. Chem.* 274 (1999), Nr. 47, S. 33419–25
- [Lipschütz 1913] LIPSCHÜTZ, Benjamin: Über eine seltene Erythemform (*Erythema chronicum migrans*). In: *Arch. Dermatol. Syph.* 118 (1913), Nr. 1, S. 349–357
- [Livermore u. a. 1978] LIVERMORE, B. P. ; BEY, R. F. ; JOHNSON, R. C.: Lipid metabolism of *Borrelia hermsi*. In: *Infect. Immun.* 20 (1978), Nr. 1, S. 215–20
- [Livermore und Johnson 1974] LIVERMORE, B. P. ; JOHNSON, R. C.: Lipids of the Spirochaetales: comparison of the lipids of several members of the genera *Spirochaeta*, *Treponema*, and *Leptospira*. In: *J. Bacteriol.* 120 (1974), Nr. 3, S. 1268–73
- [Ma u. a. 1998] MA, Y. ; SEILER, K. P. ; EICHWALD, E. J. ; WEIS, J. H. ; TEUSCHER, C. ; WEIS, J. J.: Distinct characteristics of resistance to *Borrelia burgdorferi*-induced arthritis in C57BL/6N mice. In: *Infect. Immun.* 66 (1998), Nr. 1, S. 161–8
- [Madan Babu und Sankaran 2002] MADAN BABU, M. ; SANKARAN, K.: DOLOP–database of bacterial lipoproteins. In: *Bioinformatics* 18 (2002), Nr. 4, S. 641–3
- [Magnarelli 1990] MAGNARELLI, L. A.: Serologic testing for Lyme disease. In: *Postgrad. Med.* 87 (1990), Nr. 6, S. 149–50, 153, 156
- [Marconi u. a. 1995] MARCONI, R. T. ; LIVERIS, D. ; SCHWARTZ, I.: Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. In: *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995), Nr. 9, S. 2427–34
- [Margos u. a. 2009] MARGOS, G. ; VOLLMER, S. A. ; CORNET, M. ; GARNIER, M. ; FINGERLE, V. ; WILSKE, B. ; BORMANE, A. ; VITORINO, L. ; COLLARES-PEREIRA, M. ; DRANCOURT, M. ; KURTENBACH, K.: A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009), Nr. 16, S. 5410–6
- [Masuzawa 2004] MASUZAWA, T.: Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia. In: *Jpn. J. Infect. Dis.* 57 (2004), Nr. 6, S. 229–35
- [Masuzawa u. a. 2001] MASUZAWA, T. ; TAKADA, N. ; KUDEKEN, M. ; FUKUI, T. ; YANO, Y. ; ISHIGURO, F. ; KAWAMURA, Y. ; IMAI, Y. ; EZAKI, T.: *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2001), Nr. Pt 5, S. 1817–24
- [Matthews u. a. 1979] MATTHEWS, H. M. ; YANG, T. K. ; JENKIN, H. M.: Unique lipid composition of *Treponema pallidum* (Nichols virulent strain). In: *Infect. Immun.* 24 (1979), Nr. 3, S. 713–9
- [Matthews u. a. 1980] MATTHEWS, H. M. ; YANG, T. K. ; JENKIN, H. M.: *Treponema innocens* lipids and further description of an unusual galactolipid of *Treponema hyodysenteriae*. In: *J. Bacteriol.* 143 (1980), Nr. 3, S. 1151–5

- [Mayberry und Smith 1983] MAYBERRY, W. R. ; SMITH, P. F.: Structures and properties of acyl diglucosylcholesterol and galactofuranosyl diacylglycerol from *Acholeplasma axanthum*. In: *Biochim. Biophys. Acta* 752 (1983), Nr. 3, S. 434–43
- [Medzhitov u. a. 1997] MEDZHITOV, R. ; PRESTON-HURLBURT, P. ; JANEWAY, Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. In: *Nature* 388 (1997), Nr. 6640, S. 394–7
- [Motaleb u. a. 2000] MOTALEB, M. A. ; CORUM, L. ; BONO, J. L. ; ELIAS, A. F. ; ROSA, P. ; SAMUELS, D. S. ; CHARON, N. W.: *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000), Nr. 20, S. 10899–904
- [Nadelman u. a. 1992] NADELMAN, R. B. ; LUGER, S. W. ; FRANK, E. ; WISNIEWSKI, M. ; COLLINS, J. J. ; WORMSER, G. P.: Comparison of cefuroxime axetil and doxycycline in the treatment of early Lyme disease. In: *Ann. Intern. Med.* 117 (1992), Nr. 4, S. 273–80
- [Nadelman und Wormser 2007] NADELMAN, R. B. ; WORMSER, G. P.: Reinfection in patients with Lyme disease. In: *Clin. Infect. Dis.* 45 (2007), Nr. 8, S. 1032–8
- [Nagi u. a. 1996] NAGI, K. S. ; JOSHI, R. ; THAKUR, R. K.: Cardiac manifestations of Lyme disease: a review. In: *Can. J. Cardiol.* 12 (1996), Nr. 5, S. 503–6
- [Nau u. a. 2009] NAU, R. ; CHRISTEN, H. J. ; EIFFERT, H.: Lyme-Borreliose - aktueller Kenntnisstand. In: *Dtsch. Ärztebl.* 106 (2009), Nr. 5, S. 72–81
- [Neumann 2008] NEUMANN, J.: *Immunbiologie - Eine Einführung*. Berlin : Springer, 2008 (Springer-Lehrbuch)
- [Nöller 1955] NÖLLER, H.-G.: Die Blutentnahme aus dem Retroorbitalen Venenplexus. In: *Klin. Wochenschr.* 33 (1955), Nr. 31/32, S. 770–771
- [Norgard u. a. 1996] NORGDARD, M. V. ; ARNDT, L. L. ; AKINS, D. R. ; CURETTY, L. L. ; HARRICH, D. A. ; RADOLF, J. D.: Activation of human monocytic cells by *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides proceeds via a pathway distinct from that of lipopolysaccharide but involves the transcriptional activator NF-kappa B. In: *Infect. Immun.* 64 (1996), Nr. 9, S. 3845–52
- [Norris u. a. 1992] NORRIS, S. J. ; CARTER, C. J. ; HOWELL, J. K. ; BARBOUR, A. G.: Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. In: *Infect. Immun.* 60 (1992), Nr. 11, S. 4662–72
- [Obermeier 1873] OBERMEIER, O.: Vorkommen feinsten eine Eigenbewegung zeigender Faden im Blute von Rekurrenkranken. In: *Zbl. med. Wiss.* 11 (1873), S. 145–155
- [Ohlenbusch u. a. 1996] OHLENBUSCH, A. ; MATUSCHKA, F. R. ; RICHTER, D. ; CHRISTEN, H. J. ; THOMSEN, R. ; SPIELMAN, A. ; EIFFERT, H.: Etiology of the acrodermatitis chronica atrophicans lesion in Lyme disease. In: *J. Infect. Dis.* 174 (1996), Nr. 2, S. 421–3
- [Osman u. a. 1975] OSMAN, A. M. ; EL-GARBY YOUNES, M. ; MOKHTAR, A.: Sitosterol-beta-D-Galactoside from *Hibiscus sabdariffa*. In: *Phytochemistry* 14 (1975), Nr. 3, S. 829–830
- [Östberg u. a. 2007] ÖSTBERG, Y. ; BERG, S. ; COMSTEDT, P. ; WIESLANDER, A. ; BERGSTRÖM, S.: Functional analysis of a lipid galactosyltransferase synthesizing the major envelope lipid in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 272 (2007), Nr. 1, S. 22–9
- [Paczkowski u. a. 2007] PACZKOWSKI, C. ; MUSIAL, A. ; WLODKOWSKI, L. ; KALINOWSKA, M. ; WOJCIECHOWSKI, Z. A.: Lipase-catalyzed regioselective synthesis of steryl (6'-O-acyl)glucosides. In: *Biotechnol. Lett.* 29 (2007), Nr. 9, S. 1403–8
- [Paschoud 1957] PASCHOUD, J.-M.: Die Lymphadenosis benigna cutis als übertragbare Infektionskrankheit. In: *Hautarzt* 8 (1957), S. 197–211
- [Paster und Dewhirst 2000] PASTER, B. J. ; DEWHIRST, F. E.: Phylogenetic foundation of spirochetes. In: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2 (2000), Nr. 4, S. 341–4
- [Peng u. a. 2002] PENG, L. ; KAWAGOE, Y. ; HOGAN, P. ; DELMER, D.: Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. In: *Science* 295 (2002), Nr. 5552, S. 147–50
- [Petzke u. a. 2009] PETZKE, M. M. ; BROOKS, A. ; KRUPNA, M. A. ; MORDUE, D. ; SCHWARTZ, I.: Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells. In: *J. Immunol.* 183 (2009), Nr. 8, S. 5279–92
- [Picken u. a. 1996] PICKEN, R. N. ; CHENG, Y. ; STRLE, F. ; PICKEN, M. M.: Patient isolates of

- Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities of strain 25015. In: *J. Infect. Dis.* 174 (1996), Nr. 5, S. 1112–5
- [Pickett und Kelly 1974] PICKETT, J. ; KELLY, R.: Lipid catabolism of relapsing fever borreliae. In: *Infect. Immun.* 9 (1974), Nr. 2, S. 279–85
- [Pilz 1968] PILZ, H.: Dünnschichtchromatographische Lipoidstudien vom normalen Hirngewebe und Myelin des Menschen. In: *Dtsch. Z. Nervenheilkd.* 194 (1968), Nr. 2, S. 150–66
- [Plaza u. a. 1997] PLAZA, H. ; WHELCHER, T. R. ; GARCZYNSKI, S. F. ; HOWERTH, E. W. ; GHERARDINI, F. C.: Purified outer membranes of *Serpulina hyodysenteriae* contain cholesterol. In: *J. Bacteriol.* 179 (1997), Nr. 17, S. 5414–21
- [Poggensee u. a. 2008] POGGENSEE, G. ; FINGERLE, V. ; HUNFELD, K. P. ; KRAICZY, P. ; KRAUSE, A. ; MATUSCHKA, F. R. ; RICHTER, D. ; SIMON, M. M. ; WALLICH, R. ; HOFMAN, H. ; KOHN, B. ; LIERZ, M. ; LINDE, A. ; SCHNEIDER, T. ; STRAUBINGER, R. K. ; STARK, K. ; SÜSS, J. ; TALASKA, T. ; JANSEN, A.: Lyme-Borreliose: Forschungsbedarf und Forschungsansätze. Ergebnisse eines interdisziplinären Expertentreffens am Robert-Koch-Institut. In: *Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* 51 (2008), S. 1329–1339
- [Pollack u. a. 1993] POLLACK, R. J. ; TELFORD, 3rd ; SPIELMAN, A.: Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. In: *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993), Nr. 5, S. 1251–5
- [Poltorak u. a. 1998] POLTORAK, A. ; HE, X. ; SMIRNOVA, I. ; LIU, M. Y. ; VAN HUFFEL, C. ; DU, X. ; BIRDWELL, D. ; ALEJOS, E. ; SILVA, M. ; GALANOS, C. ; FREUDENBERG, M. ; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. ; LAYTON, B. ; BEUTLER, B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. In: *Science* 282 (1998), Nr. 5396, S. 2085–8
- [Postic u. a. 2007] POSTIC, D. ; GARNIER, M. ; BARANTON, G.: Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates—description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. In: *Int. J. Med. Microbiol.* 297 (2007), Nr. 4, S. 263–71
- [Postic u. a. 1998] POSTIC, D. ; RAS, N. M. ; LANE, R. S. ; HENDSON, M. ; BARANTON, G.: Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). In: *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998), Nr. 12, S. 3497–504
- [Pozsgay und Kubler-Kielb 2007] POZSGAY, V. ; KUBLER-KIELB, J.: Synthesis of an experimental glycolipoprotein vaccine against Lyme disease. In: *Carbohydr. Res.* 342 (2007), Nr. 3–4, S. 621–6
- [Pozsgay u. a. 2005] POZSGAY, Vince ; KUBLER-KIELB, Joanna ; COXON, Bruce ; EKBORG, Göran: Synthesis of two glycolipid antigens of the causative agent of Lyme disease. In: *Tetrahedron* 61 (2005), Nr. 44, S. 10470–10481
- [Preac-Mursic u. a. 1992] PREAC-MURSIC, V. ; WILSKE, B. ; PATSOURIS, E. ; JAURIS, S. ; WILL, G. ; SOUTSCHEK, E. ; RAINHARDT, S. ; LEHNERT, G. ; KLOCKMANN, U. ; MEHRAEIN, P.: Active immunization with pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gerbils against *B. burgdorferi* infection. In: *Infection* 20 (1992), Nr. 6, S. 342–9
- [Priem u. a. 2003] PRIEM, S. ; MUNKELT, K. ; FRANZ, J. K. ; SCHNEIDER, U. ; WERNER, T. ; BURMESTER, G. R. ; KRAUSE, A.: Epidemiologie und Therapie der Lyme-Arthritis und anderer Manifestationen der Lyme-Borreliose in Deutschland: Ergebnisse einer bundesweiten Ärzteamfrage. In: *Z. Rheumatol.* 62 (2003), Nr. 5, S. 450–8
- [Que-Gewirth u. a. 2004] QUE-GEWIRTH, N. L. ; RIBEIRO, A. A. ; KALB, S. R. ; COTTER, R. J. ; BULACH, D. M. ; ADLER, B. ; GIRONS, I. S. ; WERTS, C. ; RAETZ, C. R.: A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. In: *J. Biol. Chem.* 279 (2004), Nr. 24, S. 25420–9
- [Radolf u. a. 1995] RADOLF, J. D. ; ARNDT, L. L. ; AKINS, D. R. ; CURETTY, L. L. ; LEVI, M. E. ; SHEN, Y. ; DAVIS, L. S. ; NORGARD, M. V.: *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. In: *J. Immunol.* 154 (1995), Nr. 6, S. 2866–77
- [Radolf u. a. 1991] RADOLF, J. D. ; NORGARD, M. V. ; BRANDT, M. E. ; ISAACS, R. D. ; THOMPSON, P. A. ; BEUTLER, B.: Lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* activate cachectin/tumor necrosis factor synthesis. Analysis using a CAT reporter construct. In: *J. Immunol.* 147 (1991), Nr. 6, S. 1968–74
- [Raoult u. a. 1989] RAOULT, D. ; HECHEMY, K. E. ; BARANTON, G.: Cross-reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with human immunodeficiency virus infection, syphilis, and leptospirosis. In: *J. Clin. Microbiol.* 27 (1989), Nr. 10, S. 2152–5



- [Ren und Liu 1999] REN, T. ; LIU, D.: Synthesis of targetable cationic amphiphiles. In: *Tetrahedron Letters* 40 (1999), Nr. 43, S. 7621–7625
- [Revel u. a. 2002] REVEL, A. T. ; TALAAT, A. M. ; NORGARD, M. V.: DNA microarray analysis of differential gene expression in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002), Nr. 3, S. 1562–7
- [Richter u. a. 2006] RICHTER, D. ; POSTIC, D. ; SERTOUR, N. ; LIVEY, I. ; MATUSCHKA, F. R. ; BARANTON, G.: Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 (2006), Nr. Pt 4, S. 873–81
- [Richter u. a. 2004] RICHTER, D. ; SCHLEE, D. B. ; ALLGOWER, R. ; MATUSCHKA, F. R.: Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004), Nr. 11, S. 6414–9
- [Robert-Koch-Institut 2007] ROBERT-KOCH-INSTITUT: *Lyme-Borreliose*. Berlin : Robert-Koch-Institut, 2007 (RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten. Merkblätter für Ärzte)
- [Robert-Koch-Institut 2010] ROBERT-KOCH-INSTITUT: Lyme-Borreliose: Analyse der gemeldeten Erkrankungsfälle der Jahre 2007 bis 2009 aus den sechs östlichen Bundesländern. In: *Epid. Bull.* (2010), Nr. 12, S. 101–107
- [Rock u. a. 1998] ROCK, F. L. ; HARDIMAN, G. ; TIMANS, J. C. ; KASTELEIN, R. A. ; BAZAN, J. F.: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), Nr. 2, S. 588–93
- [Rothblat und Smith 1961] ROTHBLAT, G. H. ; SMITH, P. F.: Nonsaponifiable lipids of representative pleuropneumonia-like organisms. In: *J. Bacteriol.* 82 (1961), S. 479–91
- [Rottem 2002] ROTTEM, S.: Sterols and acylated proteins in mycoplasmas. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292 (2002), Nr. 5, S. 1289–92
- [Rubnov u. a. 2001] RUBNOV, S. ; KASHMAN, Y. ; RABINOWITZ, R. ; SCHLESINGER, M. ; MECHOU-LAM, R.: Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: isolation and structure elucidation. In: *J. Nat. Prod.* 64 (2001), Nr. 7, S. 993–6
- [Rudenko u. a. 2009a] RUDENKO, N. ; GOLOVCHENKO, M. ; GRUBHOFFER, L. ; OLIVER, Jr.: *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato complex from the southeastern region of the United States. In: *J. Clin. Microbiol.* 47 (2009), Nr. 1, S. 134–41
- [Rudenko u. a. 2009b] RUDENKO, N. ; GOLOVCHENKO, M. ; LIN, T. ; GAO, L. ; GRUBHOFFER, L. ; OLIVER, Jr.: Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Complex, *Borrelia americana* sp. nov. In: *J. Clin. Microbiol.* 47 (2009), Nr. 12, S. 3875–80
- [Rudenko u. a. 2008] RUDENKO, N. ; GOLOVCHENKO, M. ; MOKRACEK, A. ; PISKUNOVA, N. ; RUZEK, D. ; MALLATOVA, N. ; GRUBHOFFER, L.: Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. In: *J. Clin. Microbiol.* 46 (2008), Nr. 10, S. 3540–3
- [Rutter 1998] RUTTER, T.: Lyme disease vaccine given guarded approval in the US. In: *BMJ* 316 (1998), Nr. 7146, S. 1695
- [Ruzic-Sabljić u. a. 2005] RUZIC-SABLJIC, E. ; ARNEZ, M. ; LOGAR, M. ; MARASPIN, V. ; LOTRIC-FURLAN, S. ; CIMPERMAN, J. ; STRLE, F.: Comparison of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from specimens obtained simultaneously from two different sites of infection in individual patients. In: *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005), Nr. 5, S. 2194–200
- [Sadziene und Barbour 1996] SADZIENE, A. ; BARBOUR, A. G.: Experimental immunization against Lyme borreliosis with recombinant Osp proteins: an overview. In: *Infection* 24 (1996), Nr. 2, S. 195–202
- [Salazar u. a. 2009] SALAZAR, J. C. ; DUHNAM-EMS, S. ; LA VAKE, C. ; CRUZ, A. R. ; MOORE, M. W. ; CAIMANO, M. J. ; VELEZ-CLIMENT, L. ; SHUPE, J. ; KRUEGER, W. ; RADOLF, J. D.: Activation of human monocytes by live *Borrelia burgdorferi* generates TLR2-dependent and -independent responses which include induction of IFN-beta. In: *PLoS Pathog.* 5 (2009), Nr. 5, S. e1000444
- [Sambri u. a. 1992] SAMBRI, V. ; STEFANELLI, C. ; CEVENINI, R.: Detection of glycoproteins in *Borrelia burgdorferi*. In: *Arch. Microbiol.* 157 (1992), Nr. 3, S. 205–8
- [Sankaran und Wu 1994] SANKARAN, K. ; WU, H. C.: Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. In: *J. Biol. Chem.* 269 (1994), Nr. 31, S. 19701–6

- [Schmidt und Michel 1980] SCHMIDT, R. R. ; MICHEL, J.: Einfache Synthese von alpha- und beta-O-Glykosylimidaten; Herstellung von Glykosiden und Disacchariden. In: *Angew. Chem.* 92 (1980), Nr. 9, S. 763–764
- [Schofield u. a. 1968] SCHOFIELD, T. P. ; TALBOT, J. M. ; BRYCESON, A. D. ; PARRY, E. H.: Leucopenia and fever in the Jarisch-Herxheimer reaction of louse-borne relapsing fever. In: *Lancet* 1 (1968), Nr. 7533, S. 58–62
- [Schröder u. a. 2003] SCHRÖDER, N. W. ; SCHOMBEL, U. ; HEINE, H. ; GÖBEL, U. B. ; ZÄHRINGER, U. ; SCHUMANN, R. R.: Acylated cholesteryl galactoside as a novel immunogenic motif in *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. In: *J. Biol. Chem.* 278 (2003), Nr. 36, S. 33645–53
- [Schubert u. a. 1968] SCHUBERT, K. ; ROSE, G. ; WACHTEL, H. ; HORHOLD, C. ; IKEKAWA, N.: Zum Vorkommen von Sterinen in Bakterien. In: *Eur. J. Biochem.* 5 (1968), Nr. 2, S. 246–51
- [Schwan u. a. 2003] SCHWAN, T. G. ; BATTISTI, J. M. ; PORCELLA, S. F. ; RAFFEL, S. J. ; SCHRUMPF, M. E. ; FISCHER, E. R. ; CARROLL, J. A. ; STEWART, P. E. ; ROSA, P. ; SOMERVILLE, G. A.: Glycerol-3-phosphate acquisition in spirochetes: distribution and biological activity of glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) among *Borrelia* species. In: *J. Bacteriol.* 185 (2003), Nr. 4, S. 1346–56
- [Schwan u. a. 1988] SCHWAN, T. G. ; BURGDORFER, W. ; GARON, C. F.: Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. In: *Infect. Immun.* 56 (1988), Nr. 8, S. 1831–6
- [Schwan und Piesman 2002] SCHWAN, T. G. ; PIESMAN, J.: Vector interactions and molecular adaptations of lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. In: *Emerg. Infect. Dis.* 8 (2002), Nr. 2, S. 115–21
- [Schwan u. a. 1995] SCHWAN, T. G. ; PIESMAN, J. ; GOLDE, W. T. ; DOLAN, M. C. ; ROSA, P. A.: Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), Nr. 7, S. 2909–13
- [Segal u. a. 1978] SEGAL, R. ; SHUD, F. ; MILO-GOLDZWEIG, I.: Hemolytic properties of synthetic glycosides. In: *J. Pharm. Sci.* 67 (1978), Nr. 11, S. 1589–92
- [Seinost u. a. 1999] SEINOST, G. ; GOLDE, W. T. ; BERGER, B. W. ; DUNN, J. J. ; QIU, D. ; DUNKIN, D. S. ; DYKHUIZEN, D. E. ; LUFT, B. J. ; DATTWYLER, R. J.: Infection with multiple strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in patients with Lyme disease. In: *Arch. Dermatol.* 135 (1999), Nr. 11, S. 1329–33
- [Sellati u. a. 1998] SELLATI, T. J. ; BOUIS, D. A. ; KITCHENS, R. L. ; DARVEAU, R. P. ; PUGIN, J. ; ULEVITCH, R. J. ; GANGLOFF, S. C. ; GOYERT, S. M. ; NORGARD, M. V. ; RADOLF, J. D.: *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytic cells via a CD14-dependent pathway distinct from that used by lipopolysaccharide. In: *J. Immunol.* 160 (1998), Nr. 11, S. 5455–64
- [Shang u. a. 1998] SHANG, E. S. ; SKARE, J. T. ; EXNER, M. M. ; BLANCO, D. R. ; KAGAN, B. L. ; MILLER, J. N. ; LOVETT, M. A.: Isolation and characterization of the outer membrane of *Borrelia hermsii*. In: *Infect. Immun.* 66 (1998), Nr. 3, S. 1082–91
- [Shi u. a. 2008] SHI, Y. ; XU, Q. ; SEEMANAPLLI, S. V. ; MCSHAN, K. ; LIANG, F. T.: Common and unique contributions of decorin-binding proteins A and B to the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*. In: *PLoS One* 3 (2008), Nr. 10, S. e3340
- [Shin u. a. 2008] SHIN, O. S. ; ISBERG, R. R. ; AKIRA, S. ; UEMATSU, S. ; BEHERA, A. K. ; HU, L. T.: Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptors 2, 5, and 9 in phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* and cytokine induction. In: *Infect. Immun.* 76 (2008), Nr. 6, S. 2341–51
- [Sigal und Tatum 1988] SIGAL, L. H. ; TATUM, A. H.: Lyme disease patients' serum contains IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* that cross-react with neuronal antigens. In: *Neurology* 38 (1988), Nr. 9, S. 1439–42
- [Sigal u. a. 1998] SIGAL, L. H. ; ZAHRADNIK, J. M. ; LAVIN, P. ; PATELLA, S. J. ; BRYANT, G. ; HASELBY, R. ; HILTON, E. ; KUNKEL, M. ; ADLER-KLEIN, D. ; DOHERTY, T. ; EVANS, J. ; MOLLOY, P. J. ; SEIDNER, A. L. ; SABETTA, J. R. ; SIMON, H. J. ; KLEMPNER, M. S. ; MAYS, J. ; MARKS, D. ; MALAWISTA, S. E.: A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. Recombinant Outer-Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium. In: *N. Engl. J. Med.* 339 (1998), Nr. 4, S. 216–22
- [Simon u. a. 1991] SIMON, M. M. ; SCHAIBLE, U. E. ; KRAMER, M. D. ; ECKERSKORN, C. ; MUSE-TEANU, C. ; MULLER-HERMELINK, H. K. ; WALLICH, R.: Recombinant outer surface protein a from

- Borrelia burgdorferi induces antibodies protective against spirochetal infection in mice. In: *J. Infect. Dis.* 164 (1991), Nr. 1, S. 123–32
- [Singh und Girschick 2004] SINGH, S. K. ; GIRSCHICK, H. J.: Lyme borreliosis: from infection to autoimmunity. In: *Clin. Microbiol. Infect.* 10 (2004), Nr. 7, S. 598–614
- [Smith 1971] SMITH, P. F.: Biosynthesis of cholesteryl glucoside by Mycoplasma gallinarum. In: *J. Bacteriol.* 108 (1971), Nr. 3, S. 986–91
- [Sonck 1965] SONCK, C. E.: Erythema chronicum migrans with multiple lesions. In: *Acta Derm. Venereol.* 45 (1965), Nr. 1, S. 34–6
- [Southern und Sanford 1969] SOUTHERN, Paul M. ; SANFORD, Jay P.: Relapsing fever. A clinical and microbiological review. In: *Medicine <Baltimore>* 48 (1969), Nr. 2, S. 129–49
- [Stanek u. a. 1990] STANEK, G. ; KLEIN, J. ; BITTNER, R. ; GLOGAR, D.: Isolation of Borrelia burgdorferi from the myocardium of a patient with longstanding cardiomyopathy. In: *N. Engl. J. Med.* 322 (1990), Nr. 4, S. 249–52
- [Steere 2001] STEERE, A. C.: Lyme disease. In: *N. Engl. J. Med.* 345 (2001), Nr. 2, S. 115–25
- [Steere u. a. 1978] STEERE, A. C. ; BRODERICK, T. F. ; MALAWISTA, S. E.: Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. In: *Am. J. Epidemiol.* 108 (1978), Nr. 4, S. 312–21
- [Steere u. a. 1983] STEERE, A. C. ; GRODZICKI, R. L. ; KORNBLATT, A. N. ; CRAFT, J. E. ; BARBOUR, A. G. ; BURGDOFFER, W. ; SCHMID, G. P. ; JOHNSON, E. ; MALAWISTA, S. E.: The spirochetal etiology of Lyme disease. In: *N. Engl. J. Med.* 308 (1983), Nr. 13, S. 733–40
- [Steere u. a. 2001] STEERE, A. C. ; GROSS, D. ; MEYER, A. L. ; HUBER, B. T.: Autoimmune mechanisms in antibiotic treatment-resistant lyme arthritis. In: *J. Autoimmun.* 16 (2001), Nr. 3, S. 263–8
- [Steere und Malawista 1979] STEERE, A. C. ; MALAWISTA, S. E.: Cases of Lyme disease in the United States: locations correlated with distribution of Ixodes dammini. In: *Ann. Intern. Med.* 91 (1979), Nr. 5, S. 730–3
- [Steere u. a. 1977] STEERE, A. C. ; MALAWISTA, S. E. ; SNYDMAN, D. R. ; SHOPE, R. E. ; ANDIMAN, W. A. ; ROSS, M. R. ; STEELE, F. M.: Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. In: *Arthritis Rheum.* 20 (1977), Nr. 1, S. 7–17
- [Steere u. a. 1987] STEERE, A. C. ; SCHOEN, R. T. ; TAYLOR, E.: The clinical evolution of Lyme arthritis. In: *Ann. Intern. Med.* 107 (1987), Nr. 5, S. 725–31
- [Steere und Sikand 2003] STEERE, A. C. ; SIKAND, V. K.: The presenting manifestations of Lyme disease and the outcomes of treatment. In: *N. Engl. J. Med.* 348 (2003), Nr. 24, S. 2472–4
- [Steere u. a. 1998] STEERE, A. C. ; SIKAND, V. K. ; MEURICE, F. ; PARENTI, D. L. ; FIKRIG, E. ; SCHOEN, R. T. ; NOWAKOWSKI, J. ; SCHMID, C. H. ; LAUKAMP, S. ; BUSCARINO, C. ; KRAUSE, D. S.: Vaccination against Lyme disease with recombinant Borrelia burgdorferi outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. In: *N. Engl. J. Med.* 339 (1998), Nr. 4, S. 209–15
- [Steim 1967] STEIM, J. M.: Monogalactosyl diglyceride: a new neurolipid. In: *Biochim. Biophys. Acta* 144 (1967), Nr. 1, S. 118–26
- [Stevenson u. a. 1996] STEVENSON, B. ; TILLY, K. ; ROSA, P. A.: A family of genes located on four separate 32-kilobase circular plasmids in Borrelia burgdorferi B31. In: *J. Bacteriol.* 178 (1996), Nr. 12, S. 3508–16
- [Stoenner u. a. 1982] STOENNER, H. G. ; DODD, T. ; LARSEN, C.: Antigenic variation of Borrelia hermsii. In: *J. Exp. Med.* 156 (1982), Nr. 5, S. 1297–311
- [Stricker u. a. 2008] STRICKER, R. B. ; CORSON, A. F. ; JOHNSON, L.: Reinfection versus relapse in patients with lyme disease: not enough evidence. In: *Clin. Infect. Dis.* 46 (2008), Nr. 6, S. 950; author reply 950–1
- [Strle 1999] STRLE, F.: Lyme borreliosis in Slovenia. In: *Zentralbl. Bakteriol.* 289 (1999), Nr. 5–7, S. 643–52
- [Stübs u. a. 2009] STÜBS, G. ; FINGERLE, V. ; WILSKE, B. ; GÖBEL, U. B. ; ZÄHRINGER, U. ; SCHUMANN, R. R. ; SCHRÖDER, N. W.: Acylated cholesteryl galactosides are specific antigens of borrelia causing lyme disease and frequently induce antibodies in late stages of disease. In: *J. Biol. Chem.* 284 (2009), Nr. 20, S. 13326–34

- [Stübs u. a. 2010] STÜBS, G. ; RUPP, B. ; SCHUMANN, R. R. ; SCHRÖDER, N. W. ; RADEMANN, J.: Chemoenzymatic synthesis of a glycolipid library and elucidation of the antigenic epitope for construction of a vaccine against Lyme disease. In: *Chemistry* 16 (2010), Nr. 11, S. 3536–44
- [Su u. a. 2004] SU, C. ; WU, P. ; YEH, C.: pH Dependence of Interparticle Coupling for Gold Nanoparticle Assemblies Formation: Electrostatic Attraction and Hydrogen Bonding. In: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 77 (2004), Nr. 1, S. 189–193
- [Svartz 1946] SVARTZ, N.: Penicillinbehandlung vid dermatitis atrophicans Herxheimer. In: *Nord. Med.* 32 (1946), S. 2783
- [Szczepanski und Benach 1991] SZCZEPANSKI, A. ; BENACH, J. L.: Lyme borreliosis: host responses to *Borrelia burgdorferi*. In: *Microbiol. Rev.* 55 (1991), Nr. 1, S. 21–34
- [Takayama u. a. 1987] TAKAYAMA, K. ; ROTHENBERG, R. J. ; BARBOUR, A. G.: Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. In: *Infect. Immun.* 55 (1987), Nr. 9, S. 2311–3
- [Takeda und Akira 2005] TAKEDA, K. ; AKIRA, S.: Toll-like receptors in innate immunity. In: *Int. Immunol.* 17 (2005), Nr. 1, S. 1–14
- [Thomas und Fikrig 2002] THOMAS, V. ; FIKRIG, E.: The Lyme disease vaccine takes its toll. In: *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2 (2002), Nr. 4, S. 217–22
- [Thompson u. a. 1970] THOMPSON, A. C. ; HENSON, R. D. ; GUELDNER, R. C. ; HEDIN, P. A.: Sterol galactosides and sterol esters of the cotton bud. In: *Lipids* 5 (1970), Nr. 2, S. 283–4
- [Thyresson 1949] THYRESSON, N.: The penicillin treatment of acrodermatitis atrophicans chronica (Herxheimer). In: *Acta. Derm. Venereol. (Stockh.)* 29 (1949), Nr. 6, S. 572–621
- [Töpfer und Straubinger 2007] TÖPFER, K. H. ; STRAUBINGER, R. K.: Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. In: *Vaccine* 25 (2007), Nr. 2, S. 314–26
- [Tupin u. a. 2008] TUPIN, E. ; BENHIA, M. R. ; KINJO, Y. ; PATSEY, R. ; LENA, C. J. ; HALLER, M. C. ; CAIMANO, M. J. ; IMAMURA, M. ; WONG, C. H. ; CROTTY, S. ; RADOLF, J. D. ; SELLATI, T. J. ; KRONENBERG, M.: NKT cells prevent chronic joint inflammation after infection with *Borrelia burgdorferi*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008), Nr. 50, S. 19863–8
- [Vinh u. a. 1986] VINH, T. ; ADLER, B. ; FAINE, S.: Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. In: *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986), Nr. 1, S. 103–9
- [Voet und Voet 1994] VOET, D. ; VOET, J. G.: *Biochemie*. 1. Aufl. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft, 1994
- [Wallich u. a. 1996] WALLICH, R. ; KRAMER, M. D. ; SIMON, M. M.: The recombinant outer surface protein A (lipOspA) of *Borrelia burgdorferi*: a Lyme disease vaccine. In: *Infection* 24 (1996), Nr. 5, S. 396–7
- [Wallis u. a. 1978] WALLIS, R. C. ; BROWN, S. E. ; KLOTTER, K. O. ; MAIN, Jr.: Erythema chronicum migrans and lyme arthritis: field study of ticks. In: *Am. J. Epidemiol.* 108 (1978), Nr. 4, S. 322–7
- [Wang u. a. 1999a] WANG, G. ; DAM, A. P. van ; DANKERT, J.: Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with lyme borreliosis. In: *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999), Nr. 9, S. 3025–8
- [Wang u. a. 1997] WANG, G. ; DAM, A. P. van ; LE FLECHE, A. ; POSTIC, D. ; PETER, O. ; BARANTON, G. ; BOER, R. de ; SPANJAARD, L. ; DANKERT, J.: Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). In: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1997), Nr. 4, S. 926–32
- [Wang u. a. 1999b] WANG, I. N. ; DYKHUIZEN, D. E. ; QIU, W. ; DUNN, J. J. ; BOSLER, E. M. ; LUFT, B. J.: Genetic diversity of ospC in a local population of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. In: *Genetics* 151 (1999), Nr. 1, S. 15–30
- [Wang u. a. 2004] WANG, X. G. ; SCAGLIOTTI, J. P. ; HU, L. T.: Phospholipid synthesis in *Borrelia burgdorferi*: BB0249 and BB0721 encode functional phosphatidylcholine synthase and phosphatidylglycerolphosphate synthase proteins. In: *Microbiology* 150 (2004), Nr. Pt 2, S. 391–7
- [Weber u. a. 1984] WEBER, K. ; SCHIERZ, G. ; WILSKE, B. ; PREAC-MURSIC, V.: European erythema migrans disease and related disorders. In: *Yale J. Biol. Med.* 57 (1984), Nr. 4, S. 463–71

- [Weis u. a. 1994] WEIS, J. J. ; MA, Y. ; ERDILE, L. F.: Biological activities of native and recombinant *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A: dependence on lipid modification. In: *Infect. Immun.* 62 (1994), Nr. 10, S. 4632–6
- [Werts u. a. 2001] WERTS, C. ; TAPPING, R. I. ; MATHISON, J. C. ; CHUANG, T. H. ; KRAVCHENKO, V. ; SAINT GIRONS, I. ; HAAKE, D. A. ; GODOWSKI, P. J. ; HAYASHI, F. ; OZINSKY, A. ; UNDERHILL, D. M. ; KIRSCHNING, C. J. ; WAGNER, H. ; ADEREM, A. ; TOBIAS, P. S. ; ULEVITCH, R. J.: Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. In: *Nat. Immunol.* 2 (2001), Nr. 4, S. 346–52
- [Wertz u. a. 1986] WERTZ, P. W. ; STOVER, P. M. ; ABRAHAM, W. ; DOWNING, D. T.: Lipids of chicken epidermis. In: *J. Lipid. Res.* 27 (1986), Nr. 4, S. 427–35
- [Wheeler u. a. 1993] WHEELER, C. M. ; GARCIA MONCO, J. C. ; BENACH, J. L. ; GOLIGHTLY, M. G. ; HABICHT, G. S. ; STEERE, A. C.: Nonprotein antigens of *Borrelia burgdorferi*. In: *J. Infect. Dis.* 167 (1993), Nr. 3, S. 665–74
- [Will u. a. 1995] WILL, G. ; JAURIS-HEIPKE, S. ; SCHWAB, E. ; BUSCH, U. ; ROSSLER, D. ; SOUTSCHEK, E. ; WILSKE, B. ; PREAC-MURSIC, V.: Sequence analysis of ospA genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii* species. In: *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 184 (1995), Nr. 2, S. 73–80
- [Williams und Austin 1992] WILLIAMS, L. R. ; AUSTIN, F. E.: Hemolytic activity of *Borrelia burgdorferi*. In: *Infect. Immun.* 60 (1992), Nr. 8, S. 3224–30
- [Wilske 2003] WILSKE, B.: Diagnosis of lyme borreliosis in europe. In: *Vector Borne Zoonotic Dis.* 3 (2003), Nr. 4, S. 215–27
- [Wilske 2005] WILSKE, B.: Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. In: *Ann. Med.* 37 (2005), Nr. 8, S. 568–79
- [Wilske u. a. 1991] WILSKE, B. ; ANDERSON, J. F. ; BARANTON, G. ; BARBOUR, A. G. ; HOVIND-HOUGEN, K. ; JOHNSON, R. C. ; PREAC-MURSIC, V.: Taxonomy of *Borrelia* spp. In: *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 77 (1991), S. 108–29
- [Wilske u. a. 1996] WILSKE, B. ; BUSCH, U. ; FINGERLE, V. ; JAURIS-HEIPKE, S. ; PREAC MURSIC, V. ; ROSSLER, D. ; WILL, G.: Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. In: *Infection* 24 (1996), Nr. 2, S. 208–12
- [Wilske u. a. 2007] WILSKE, B. ; FINGERLE, V. ; SCHULTE-SPECHTEL, U.: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. In: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49 (2007), Nr. 1, S. 13–21
- [Wilske u. a. 1993a] WILSKE, B. ; PREAC-MURSIC, V. ; GOBEL, U. B. ; GRAF, B. ; JAURIS, S. ; SOUTSCHEK, E. ; SCHWAB, E. ; ZUMSTEIN, G.: An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. In: *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993), Nr. 2, S. 340–50
- [Wilske u. a. 1993b] WILSKE, B. ; PREAC-MURSIC, V. ; JAURIS, S. ; HOFMANN, A. ; PRADEL, I. ; SOUTSCHEK, E. ; SCHWAB, E. ; WILL, G. ; WANNER, G.: Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. In: *Infect. Immun.* 61 (1993), Nr. 5, S. 2182–91
- [Wilske u. a. 1985] WILSKE, B. ; PREAC-MURSIC, V. ; SCHIERZ, G.: Antigenic heterogeneity of European *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients and ticks. In: *Lancet* 1 (1985), Nr. 8437, S. 1099
- [Wilske u. a. 1988] WILSKE, B. ; PREAC-MURSIC, V. ; SCHIERZ, G. ; KUHBECK, R. ; BARBOUR, A. G. ; KRAMER, M.: Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539 (1988), S. 126–43
- [Wilske u. a. 2000] WILSKE, B. (Hrsg.) ; ZÖLLER, L. (Hrsg.) ; BRADE, V. (Hrsg.) ; EIFFERT, H. (Hrsg.) ; GÖBEL, U. B. (Hrsg.) ; STANEK, G. (Hrsg.): *MiQ / Expertengremium Mikrobiologische-Infektiologische Qualitätsstandards*. Bd. 12: *Lyme-Borreliose*. Stuttgart : Fischer, 2000
- [Wilson u. a. 1996] WILSON, W. K. ; SUMPTER, R. M. ; WARREN, J. J. ; ROGERS, P. S. ; RUAN, B. ; SCHROEPFER, Jr.: Analysis of unsaturated C27 sterols by nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: *J. Lipid. Res.* 37 (1996), Nr. 7, S. 1529–55
- [Wooten u. a. 1996] WOOTEN, R. M. ; MODUR, V. R. ; MCINTYRE, T. M. ; WEIS, J. J.: *Borrelia burgdorferi* outer membrane protein A induces nuclear translocation of nuclear factor-kappa B and inflammatory activation in human endothelial cells. In: *J. Immunol.* 157 (1996), Nr. 10, S. 4584–90

- [Wooten u. a. 1998] WOOTEN, R. M. ; MORRISON, T. B. ; WEIS, J. H. ; WRIGHT, S. D. ; THIERINGER, R. ; WEIS, J. J.: The role of CD14 in signaling mediated by outer membrane lipoproteins of *Borrelia burgdorferi*. In: *J. Immunol.* 160 (1998), Nr. 11, S. 5485–92
- [Wormser 1996] WORMSER, G. P.: Lyme disease vaccine. In: *Infection* 24 (1996), Nr. 2, S. 203–7
- [Wormser u. a. 2006] WORMSER, G. P. ; DATTWYLER, R. J. ; SHAPIRO, E. D. ; HALPERIN, J. J. ; STEERE, A. C. ; KLEMPNER, M. S. ; KRAUSE, P. J. ; BAKKEN, J. S. ; STRLE, F. ; STANEK, G. ; BOCKENSTEDT, L. ; FISH, D. ; DUMLER, J. S. ; NADELMAN, R. B.: The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. In: *Clin. Infect. Dis.* 43 (2006), Nr. 9, S. 1089–134
- [Wunder u. a. 2006] WUNDER, C. ; CHURIN, Y. ; WINAU, F. ; WARNECKE, D. ; VIETH, M. ; LINDNER, B. ; ZÄHRINGER, U. ; MOLLENKOPF, H. J. ; HEINZ, E. ; MEYER, T. F.: Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. In: *Nat. Med.* 12 (2006), Nr. 9, S. 1030–8
- [Xia und Hui 1995] XIA, J. ; HUI, Y.: A new highly regioselective reaction of unprotected sugars for chemical synthesis of 6-acyl-d-glycopyranosides. In: *Synth. Commun.* 25 (1995), Nr. 15, S. 2235–2251
- [Yasugi u. a. 1983] YASUGI, E. ; KASAMA, T. ; KOJIMA, H. ; YAMAKAWA, T.: Occurrence of 2-O-acyl galactosyl ceramide in human and bovine brains. In: *J. Biochem.* 93 (1983), Nr. 6, S. 1595–9
- [Yasugi u. a. 1982] YASUGI, E. ; SAITO, E. ; KASAMA, T. ; KOJIMA, H. ; YAMAKAWA, T.: Occurrence of 2-O-acyl galactosyl ceramide in whale brain. In: *J. Biochem.* 91 (1982), Nr. 4, S. 1121–7
- [Zemplén und Kunz 1923] ZEMPLÉN, G. ; KUNZ, A.: Über die Natriumverbindungen der Glucose und die Verseifung der acylierten Zucker. In: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 56 (1923), Nr. 7, S. 1705–1710

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung einer Spirochäte . . . . .	7
1.2	Gemeiner Holzbock ( <i>Ixodes ricinus</i> ) . . . . .	10
1.3	Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers . . . . .	26
3.1	Dot-Blots der Glycolipide mit Patienten-Seren . . . . .	40
3.2	Strukturformel von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose . . . . .	48
3.3	Strukturformel von 1- <i>O</i> -Trichloracetimido-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranose . . . . .	48
3.4	Strukturformel von 1- <i>O</i> -Cholesteryl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	49
3.5	Strukturformel von Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	49
3.6	Strukturformel von Acetoximoyl-oleat . . . . .	50
3.7	Strukturformel von Acetoximoyl-palmitat . . . . .	51
3.8	Strukturformel von Acetoximoyl-15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoat . . . . .	51
3.9	Strukturformel von Acetoximoyl-decanoat . . . . .	52
3.10	Strukturformel von Acetoximoyl-hexanoat . . . . .	52
3.11	Strukturformel von Acetoximoyl-butyrat . . . . .	52
3.12	Strukturformel von Acetoximoyl-acetat . . . . .	53
3.13	Strukturformel von Cholesteryl-6- <i>O</i> -oleoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	53
3.14	Strukturformel von Cholesteryl-6- <i>O</i> -palmitoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	54
3.15	Strukturformel von Cholesteryl-6- <i>O</i> -(15-(2-Ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	55
3.16	Strukturformel von Cholesteryl-6- <i>O</i> -decanoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	56
3.17	Strukturformel von Cholesteryl-6- <i>O</i> -hexanoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	57
3.18	Strukturformel von Cholesteryl-6- <i>O</i> -butanoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	57
3.19	Strukturformel von Cholesteryl-6- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	58
3.20	Strukturformel von Methyl-6- <i>O</i> -(15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	59
3.21	Strukturformel von Phenyl-6- <i>O</i> -(15-(2-Ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	60
3.23	Strukturformel von Cholesteryl-6- <i>O</i> -(15-mercaptopentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	61
3.24	Strukturformel eines ACGal-Protein-Konjugates . . . . .	63
4.1	Dünnschichtchromatogramm der Glycolipide von <i>B. burgdorferi</i> s. s. . . . .	66
4.2	Vergleichende Gaschromatogramme des ACGal/ACGlc der vier Borrelienspezies nach Methanolyse und Peracetylierung . . . . .	68
4.3	Vergleichende <sup>1</sup> H-NMR-Spektren des ACGal/ACGlc der vier Borrelienspezies . . . . .	70
4.4	Dünnschichtchromatogramme der Gesamtlipide der vier Borrelienspezies . . . . .	72
4.5	Ausschnitte aus dem HMBC-NMR-Spektrum von ACGlc aus <i>B. hermsii</i> . . . . .	76
4.6	Strukturformeln der Cholesteryl-6- <i>O</i> -acyl- $\beta$ -D-gluco-pyranoside (ACGlc) in <i>B. hermsii</i> . . . . .	76
4.7	Radiogramm der Cholesterol-Glycosyltransferaseaktivität in Borrelienlysats . . . . .	77

4.8	Zytokinausschüttung nach Stimulation von RAW-Zellen mit Borrelienlipiden . . .	78
4.9	Chemokinausschüttung nach Stimulation von HEK-Zellen mit Borrelienlipiden . . .	79
4.10	DC-Blots der Gesamtlipide von <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> . . . . .	80
4.11	DC-Blot der Gesamtlipide von 13 Borrelienstämmen . . . . .	84
4.12	Syntheschema für Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	85
4.13	Syntheschema der regioselektiven Acylierung von CGal . . . . .	86
4.14	Vergleichende Dot-Blots des nativen und synthetischen ACGal . . . . .	87
4.15	Strukturformeln der synthetisierten Cholesterylglycolipide . . . . .	88
4.16	Strukturformeln der synthetisierten cholesterolfreien Glycolipide . . . . .	89
4.17	Dünnschichtchromatogramm der synthetisierten Glycolipide . . . . .	90
4.18	Dot-Blots aller Cholesteryl- $\beta$ -D-galactoside mit Patientenserum . . . . .	90
4.19	Schablonen-Dot-Blot der Lipide mit LB-Patientenserum . . . . .	91
4.20	Titerbestimmung der synthetischen Glycolipide mittels Dot-Blot mit Patientenserum . . . . .	92
4.21	Schema der Schützung und Entschützung der Mercaptofunktion . . . . .	93
4.22	Vergleichende $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der un- und geschützten Mercaptofettsäuren . . . . .	94
4.23	Schema der Konjugation von funktionalisiertem ACGal an ein Trägerprotein . . . . .	96
4.24	Analyse der BSA-Konjugate mit SDS-PAGE und Western-Blot . . . . .	97
4.25	Analyse der BSA-Konjugate mit MALDI-TOF-MS . . . . .	97
4.26	Vergleich der ACGal-BSA Konjugationen mit 1 % und 10 % SDS im Western-Blot . . . . .	98
4.27	Analyse der OVA-Konjugate mit SDS-PAGE und Western-Blot . . . . .	99
4.28	Schablonen-Dot-Blot der Lipide mit Kaninchen-Immunsrum . . . . .	101
4.29	Titerbestimmung der synthetischen Glycolipide mittels Dot-Blot mit Kaninchen-serum . . . . .	102
4.30	Indirekte Immunofluoreszenz mit den OVA-Kaninchenserum . . . . .	103
5.1	3-Dimensionale Darstellung eines ACGal-Modells . . . . .	110
5.2	ACGal-positive LB-Patientenserum nach Krankheitsstadien . . . . .	117
5.3	DC-Ausschnitt der Glycolipide von <i>B. burgdorferi s. s.</i> . . . . .	123
5.4	Strukturformeln von MGalD und $\alpha$ -Gal-Cer . . . . .	124
5.5	Strukturformeln von ACGal und 6- <i>O</i> -acyliertem $\beta$ -Gal-Cer . . . . .	127
A.1	$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von ACGal aus <i>B. burgdorferi s. s.</i> . . . . .	133
A.2	$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von ACGal aus <i>B. afzelii</i> . . . . .	134
A.3	$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von ACGal aus <i>B. garinii</i> . . . . .	134
A.4	$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von ACGlc aus <i>B. hermsii</i> . . . . .	135
A.5	$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von ACGlc aus <i>B. hermsii</i> . . . . .	135
A.6	HMQC-NMR-Spektrum von ACGlc aus <i>B. hermsii</i> . . . . .	136
A.7	HMBC-NMR-Spektrum von ACGlc aus <i>B. hermsii</i> . . . . .	136
A.8	$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von MGalD aus <i>B. burgdorferi s. s.</i> . . . . .	137
A.9	$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Gemischs von MGalD und CGlc aus <i>B. burgdorferi s. s.</i> . . . . .	137
A.10	$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von kommerziellem CGlc als Referenz . . . . .	138
A.11	$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von natürlichem CGlc aus <i>B. burgdorferi s. s.</i> . . . . .	138
A.12	$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	139
A.13	$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -oleoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	140
A.14	DEPT-135-NMR-Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -oleoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	140
A.15	$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -palmitoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	141
A.16	$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -(15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	141
A.17	$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -decanoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	142
A.18	$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -hexanoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	142
A.19	$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -butanoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	143
A.20	$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	143



A.21	<sup>13</sup> C-NMR-Spektrum von Methyl-6- <i>O</i> -(15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	144
A.22	<sup>13</sup> C-NMR-Spektrum von Phenyl-6- <i>O</i> -(15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	144
B.1	MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	145
B.2	MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -oleoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	146
B.3	MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -palmitoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	146
B.4	MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -(15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	147
B.5	MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -hexanoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	147
B.6	MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -butanoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	148
B.7	MALDI-TOF-Spektrum von Cholesteryl-6- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	148
B.8	MALDI-TOF-Spektrum von Methyl-6- <i>O</i> -(15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	149
B.9	MALDI-TOF-Spektrum von Phenyl-6- <i>O</i> -(15-(2-ethyl-disulfanyl)pentadecanoyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid . . . . .	149



# Tabellenverzeichnis

3.1	Verteilung der Fettsäuren in Cholesteryl-6- <i>O</i> -acyl- $\beta$ -D-glucoopyranosid (ACGlc) aus <i>B. hermsii</i> . . . . .	45
4.1	Lipidpools der Säulenchromatographie der Gesamtlipide von <i>B. burgdorferi</i> s. s. . . . .	67
4.2	Anteile der einzelnen Lipide an den Gesamtlipiden und dem Trockengewicht der Borrelien . . . . .	73
4.3	Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten von ACGlc aus <i>B. hermsii</i> . . . . .	75
4.4	Positive Anti-Glycolipid Reaktivität der NRZ-Seren bei einzelnen Krankheitsmanifestationen in Dot-Blots . . . . .	81
4.5	Reaktivität der Virotech-Seren in einzelnen Krankheitsmanifestationen auf ACGal in Line-Blots . . . . .	82
4.6	Anti-ACGal Antikörper-Titer der Dot-Blot-positiven NRZ-Seren bei einzelnen Krankheitsmanifestationen in ELISA . . . . .	83



# Veröffentlichungen

## Erstautor von Zeitschriftenartikeln

**Stübs, G.;** Fingerle, V.; Wilske, B.; Göbel, U. B.; Zähringer, U.; Schumann, R. R.; Schröder, N. W.: Acylated cholesteryl galactosides are specific antigens of borrelia causing lyme disease and frequently induce antibodies in late stages of disease.  
In: The Journal of Biological Chemistry 284 (2009), Nr. 20, S. 13326–34

**Stübs, G.;** Rupp, B.; Schumann, R. R.; Schröder, N. W.; Rademann, J.: Chemoenzymatic synthesis of a glycolipid library and elucidation of the antigenic epitope for construction of a vaccine against Lyme disease.  
In: Chemistry – A European Journal 16 (2010), Nr. 11, S. 3536–44

**Stübs, G.;** Fingerle, V.; Schumann, R. R.; Rademann, J.; Schröder, N. W.: Acylated cholesteryl galactosides are ubiquitous glycolipid antigens among *Borrelia burgdorferi* sensu lato.  
(Eingereicht bei *FEMS Immunology and Medical Microbiology*)

**Stübs, G.;** Schade, R.; Krause, E.; Schumann, R. R.; Rademann, J.; Schröder, N. W.: Vaccination with acylated cholesteryl galactoside – the major glycolipid of *Borrelia burgdorferi*.  
(In Vorbereitung für *Vaccine*)

## Koautor von Zeitschriftenartikeln

Schröder, N. W.; Eckert, J.; **Stübs, G.;** Schumann, R. R.: Immune responses induced by spirochetal outer membrane lipoproteins and glycolipids.  
In: Immunobiology 213 (2008), Nr. 3-4, S. 329–40

Dehus, O.; Pfitzenmaier, M.; **Stuebs, G.;** Fischer, N.; Schwaeble, W.; Morath, S.; Hartung, T.; Geyer, A.; Hermann, C.: Growth temperature-dependent expression of structural variants of *Listeria monocytogenes* lipoteichoic acid.  
In: Immunobiology 216 (2011), Nr. 1-2, S. 24-31



# Stichwortverzeichnis

- ACA, **5**, **8**, **14**, **127**  
Patientenseren, **36**, **37**, **80–83**, **117**, **130**
- Acetonoximester, **86**, **89**, **93**, **110**  
Synthese, **50–53**
- ACGal, **106**, **107**  
Anti-ACGal, *siehe* Antikörper  
Antigenität, **80–83**, **87**, **88**, **91**, **101**, **117**, **118**  
Antigenpräsentation, **130**  
biologische Aktivität, **123**, **124**, **126**  
Biosynthese, **77**, **78**, **129**  
Deacylierung, **108**, **123**  
Derivate, **88**, **89–91**, **101**, **111**, **119**, **120**, **130**  
ELISA, *siehe* ELISA  
Entschützung, **61**, **93**, **113**  
Epitop, **88**, **102**, **112**, **121**, **121**, **122**, **126**  
humane AK, **90**, **91**  
Kaninchen-AK, **100**  
Funktion, **129**  
Funktionalisierung, **112**  
GLC/MS, **67**, **68**, **74**  
Immunisierung, **37**, **99**, **119**, **126**  
Kaninchen, **38**, **99**, **100**, **119**, **120**  
Mäuse, **37**, **99**, **100**, **113**, **119**, **120**  
Impfstoffkandidat, **125**, **126**  
Konjugation, **62**, **94**, **95**, **113**, **119**, *siehe auch* Konjugate  
MALDI, **53–55**, **57**, **58**, **67**, **74**, **87**, **146–148**  
NMR, **53–59**, **67**, **70**, **74**, **87**, **133**, **134**, **140–143**  
Plasmaspiegel, **129**  
Quantifizierung, **73**  
Strukturanalyse, **19**, **20**, **67**, **74**, **83**, **106**  
Strukturformeln, **66**  
Synthese, **53–58**, **84**, **85**, **89**, **109–111**  
Titerbestimmung, *siehe* Antikörper  
Verwendung, **125**, **130**
- ACGal-BSA, *siehe* Konjugate  
ACGal-OVA, *siehe* Konjugate  
ACGlc, **107**  
 $\alpha$ -Konfiguration, **19**  
Anti-ACGlc, *siehe* Antikörper  
Antigenität, **81**, **91**, **101**, **129**  
Biosynthese, **107**  
GLC/MS, **68**, **74**  
MALDI, **77**  
NMR, **70**, **74–76**, **135**, **136**  
Quantifizierung, **73**  
Strukturanalyse, **20**, **73**, **74**  
Strukturformeln, **76**
- Acrodermatitis chronica atrophicans, *siehe* ACA  
acyliertes Cholesteryl- $\beta$ -D-galactosid, *siehe* ACGal  
acyliertes Cholesteryl- $\beta$ -D-glucosid, *siehe* ACGlc  
acyliertes Methyl- $\beta$ -D-galactosid  
MALDI, **59**, **149**  
NMR, **59**, **144**  
Synthese, **59**, **89**  
acyliertes Phenyl- $\beta$ -D-galactosid  
MALDI, **60**, **149**  
NMR, **60**, **144**  
Synthese, **60**, **89**
- Affinitätschromatographie, **42**, **102**, **130**  
Aktivitätsmarker, **118**, **125**  
Antibiotika, **15**  
Antigen, **25**, **80**, **115**, **116**, **125**  
Antigenpräsentation, **25**, **120**  
Antikörper, **26**, **80**, **115**  
Anti-ACGal, **80–82**, **99**, **101**, **102**, **117–122**, **126**, **127**, **130**  
Titer, **82**, **87**, **91**, **99–101**, **118**, **120**  
Titerbestimmung, **40**, **41**, **116**  
Anti-ACGlc, **81**, **118**, **122**, **129**

- Anti-BSA, 102
- Anti-MGalD, 80, 81, 117, 118, 125
- Bindungsaffinität, 115, 119, 121, 130
- Titerbestimmung, 115
- Arthritis, 13, *siehe auch* LA
- Autoimmun, 13, 15, 22, 37, 127, 130
- B-Zellen, 25, 120, 125
- Borrelia*, 7, *siehe auch* Borrelien
  - B. afzelii*, 8, 14, 31, 72
    - ACGal, 68, 70, 74, 81
    - ACGlc, 108
    - Lipide, 73, 80, 84
  - B. bavariensis*, 8, 31, 84
  - B. bissettii*, 8, 31, 84
  - B. burgdorferi* s. l., 6, 83, 105–107, 129
  - B. burgdorferi* s. s., 6, 7, 31, 42, 65
    - ACGal, 68, 70, 81
    - CGlc, 79
    - Glycolipide, 124
    - Lipide, 20, 66, 73, 78, 80, 84, 106
    - MGalD, 107
    - Phospholipide, 108
  - B. garinii*, 8, 31, 72
    - ACGal, 68, 70, 74, 81
    - Lipide, 73, 80, 84
  - B. hermsii*, 17, 31, 72, 91, 106, 125
    - ACGlc, 68, 70, 81, 101, 107
    - CGlc, 72, 79, 107
    - Lipide, 20, 73, 84, 106, 129
    - MGalD, 107
  - B. japonica*, 9, 31, 84
  - B. lusitaniae*, 9, 31, 84
  - B. spielmanii*, 8, 31, 84
  - B. valaisiana*, 8, 31, 84
- Borrelien, 7, *siehe auch* *Borrelia*
  - Übertragung, 11
  - Infektion, 10
  - Kultivierung, 9, 14, 32, 72, 83, 103
  - Lebensraum, 9
  - Lipide, *siehe* Lipide
  - Lipoproteine, *siehe* Lipoproteine
  - Lysat, 32, 77, 101
  - Medienadaptierung, 32, 103
  - Membranen, 108, 129
  - nichtpathogene Arten, 9, 106
    - pathogene Arten, 7, 106
    - Stämme, 31, 83
- Bromcyanspaltung, 64, 95
- BSA, 32, 42, 95, 101
  - Trägerprotein, 62, 95, 102, 113, 119, 126
  - Voradsorption, 102
- BSK-H, 9, 32, 42, 70, 71, 108
- BSK-H special, 32, 103
- Butanolextraktion, 33, 65, 72, 105
- CD1, 26, 131
  - CD1d, 25, 26, 124, 125
- Ceramide, 18
- Cerebroside, 18, 127
- CGal, 42, 68, 106
  - Acylierung, 53–58, 85, 109, 110, 129
  - Antigenität, 80, 87, 91, 121
  - biologische Aktivität, 123, 124
  - Biosynthese, 72, 77, 106, 107, 129
  - GLC/MS, 69
  - MALDI, 50, 70, 145
  - NMR, 50, 69, 139
  - Quantifizierung, 73
  - Strukturanalyse, 20, 69, 83, 106
  - Strukturformel, 66
  - Synthese, 48, 49, 84, 109
- CGlc, 42, 44, 106, 107
  - Antigenität, 80
  - biologische Aktivität, 79, 123
  - Biosynthese, 73, 77
  - GLC/MS, 69
  - MALDI, 69
  - NMR, 69, 107, 137, 138
  - Quantifizierung, 73
  - Strukturanalyse, 19, 20, 68, 83
  - Strukturformel, 66
- Cholesterol, 18, 101, 122
  - Glycosylierung, 19, 42, 49, 77, 85, 106, 109, 129
  - Identifizierung, 71, 108
  - Medienbestandteil, 9, 108
  - Membranbestandteil, 20, 108, 129
  - NMR, 46, 74, 75
  - Quantifizierung, 73
- Cholesteryl-6-*O*-acyl- $\beta$ -D-galactosid, *siehe* ACGal



- Cholesteryl- $\beta$ -D-galactosid, *siehe* CGal  
 Cholesteryl- $\beta$ -D-glucosid, *siehe* CGlc  
 Cholesterylester, 78  
     Identifizierung, 70, 108  
     Quantifizierung, 73  
 Coomassiefärbung, 36  
 Cy3-Färbung, 104  
  
 Dünnschichtchromatographie, *siehe* DC  
 DC, 41, 44  
     native Lipide, 42, 66, 69, 72, 73, 80, 83, 106, 107, 123  
     synthetische Lipide, 87, 90  
 DC-Blot, 41, 80, 83  
     Methodenkritik, 116  
 Detergenzien, 96, 97  
 Dot-Blot, 39  
     Limitierungen, 95, 115  
     Methodenkritik, 115  
     native Lipide, 81, 117, 119  
     native vs. synthetische Lipide, 87  
     synthetische Lipide, 90, 92, 99, 100, 119, 120  
  
 ECL, 39, 87, 115  
 ELISA, 14  
     ACGal, 41, 82, 118, 119  
     Methodenkritik, 116  
     MGalD, 118  
     Zytokine, 34, 78, 79  
 EM, 5, 12, 14  
     Patientenseren, 36, 37, 80, 81, 117, 118  
 Enzymtest, 42, *siehe auch* Glycosyltransferase  
 Erythema migrans, *siehe* EM  
 Euroimmun, 125  
  
 Facialisparese, 12  
 Folch-Extraktion, 33, 42, 83  
  
 $\alpha$ -Galactosylceramid, 124  
 $\alpha$ -D-Galactosyldiacylglycerol, *siehe* MGalD  
 Genzyme Virotech, *siehe* Virotech  
 GLC/MS, 45, 106  
 Glycerolipide, 18  
 Glycolipidbibliothek, *siehe* ACGal-Derivate  
 Glycolipide, 18, *siehe auch* Lipide  
  
 Antigenpräsentation, 26  
     native, 20, 46, 47, 67, 73, 106  
     biologische Aktivität, 79  
     synthetische, *siehe* ACGal-Derivate  
 Glycosyltransferase, 77, 106, 107  
  
 Hämolyse, 130  
 Hapten, 25  
 HEK-293-Zellen, 33, 34, 79, 124  
 Humanseren, *siehe* Patientenseren  
  
 Immunfärbung, 39  
 Immunisierung, 26, *siehe auch* ACGal  
 Immunofluoreszenz, 42, 100, 102, 126, 130  
 Immunogen, 25  
 Immunogoldfärbung, 129  
 Immunsystem, 22, 114  
     angeborenes, 23, 78  
     erworbenes, 24  
 Impfstoff, *siehe* Lyme-Borreliose  
 Infektion, *siehe* Borrelien  
 Ixodes, *siehe* Schildzecken  
  
 Jarisch-Herxheimer-Reaktion, 15, 17  
  
 Kaninchenseren, 38, 40, 100–102, 116, 121  
 Karditis, 13  
 Kernresonanzspektroskopie, *siehe* NMR  
 KLH, 62, 63, 95, 113  
 Konjugate, *siehe auch* ACGal/Konjugation  
     ACGal-BSA, 115  
     Anti-Seren, 101, 102  
     Immunisierung, 38, 99, 120  
     Masse, 98  
     Synthese, 62, 96, 114  
     ACGal-KLH, 95, 98, 99, 114, 119  
     ACGal-OVA, 115  
     Anti-Seren, 101, 103  
     Immunisierung, 37, 38, 100, 120  
     Masse, 98, 99  
     Synthese, 63, 98, 114  
     Massenbestimmung, 47, 95, 96, 98  
 Kultivierung, *siehe* Borrelien  
  
 LA, 6, 13, 124, 127  
     Patientenseren, 36, 37, 80–83, 117, 118, 130  
 LC/MS, 47, 85

- Lederzecken, 17
- Line-Blot, 14, **41**, 81, 117, 130  
 Methodenkritik, **116**
- Lipase, 53–60, 86, 89, 110, 111, 129
- Lipide, **17**  
 biologische Aktivität, 78, 123  
 Extraktion, **33**  
 Quantifizierung, 19, 73, 105  
 Serologie, **80**, **116**  
 Strukturanalyse, 20, 46, 47, **65**, 105  
 Trennung, **45**
- Lipoproteine, **18**, **20**, 24, 124, 126  
 OspA, 27, 126  
 Impfstoff, *siehe* Lyme-Borreliose  
 Serotypen, 21, 27, 31, 84, 106
- Liquor cerebrospinalis, 12, 14
- Lyme-Arthritis, *siehe* LA
- Lyme-Borreliose, 11  
 Diagnostik, 14  
 Epidemiologie, 16  
 Geschichte, 5  
 Hautmanifestation, 11–14  
 Impfstoff, 21, **27**, 121, **126**, 130  
 OspA, 15, 27, 127  
 Inzidenz, 16  
 Klinik, 11  
 Meldepflicht, 16  
 Pathogenese, 129  
 Prophylaxe, 15  
 Serodiagnostik, 12, 13, **14**, 21, 107, 116, **125**, 130  
 Stadium I, 11, 15, 82, 117, 125  
 Stadium II, 12, 15, 117  
 Stadium III, 13, 15, 80, 117, 126, 130  
 Therapie, 15  
 Verbreitung, 16
- Lymphozyten, **25**
- Lymphozytom, 5, **12**
- Makrophagen, 23, 33, 78, 79, 123
- MALDI, **47**, 85, 106, 145
- Mausseren, **38**, 99, 100, 119, 120
- Membranen, 18
- Meningitis, 12
- Mercaptogruppe  
 Schätzung, **60**, 93, 113
- MGalD, 20, 44, **107**, 126  
 Anti-MGalD, *siehe* Antikörper  
 Antigenität, 80, 81, 117  
 Antigenpräsentation, 130  
 $\beta$ -Konfiguration, 18  
 biologische Aktivität, 123–125  
 Biosynthese, 77, 107  
 GLC/MS, 68  
 MALDI, 68  
 NMR, 68, 137  
 Quantifizierung, 73  
 Strukturanalyse, 20, **68**, 83, 106  
 Strukturformel, 66  
 Synthese, 124
- Mono- $\alpha$ -D-galactosyldiacylglycerol, *siehe* MGalD
- Mostain, **44**, 66
- Multiple Erythema migrantia, **13**, 82  
 Patientenseren, **37**
- Myokarditis, 13
- NB, 5, 8, **12**, **14**, 127  
 Patientenseren, **36**, **37**, 80–83, 117, 118
- Neuroborreliose, *siehe* NB
- Neutrallipide, 66, 67, **70**, 80, **108**
- NKT-Zellen, **25**, 124
- NMR, **46**, 85, 106, 113, 133
- NRZ für Borrelien  
 Borrelienstämme, 31, 84  
 Patientenseren, **36**, 40, 41, 81, 82, 117
- OspA, *siehe* Lipoproteine
- OVA, 95  
 Trägerprotein, 63, 103, 113, 126
- PAGE, **35**, 95, 96, 98, 115
- Patientenseren, **36**, 40, 41, 80–83, 90, 91, 101, 116, 117, 121, 130
- Permeabilisierung, 103
- Phosphatidylcholin  
 Biosynthese, 109  
 NMR, 71  
 Quantifizierung, 73  
 Strukturanalyse, **71**, 108
- Phosphatidylglycerol  
 Biosynthese, 109  
 MALDI, 71

- NMR, [71](#)
- Quantifizierung, [73](#)
- Strukturanalyse, [71](#), [108](#)
- Phospholipide, [18](#), [80](#), [106](#), [108](#)
  - biologische Aktivität, [79](#)
  - Quantifizierung, [73](#)
  - Strukturanalyse, [46](#), [47](#), [66](#), [71](#)
  - Trennung, [67](#)
- Polyacrylamid-Gelelektrophorese, *siehe*  
PAGE
- Proteinbestimmung, [32](#), [35](#)
  
- Rückfallfieber, [17](#), [129](#)
- RAW 264.7-Zellen, [33](#), [34](#), [78](#), [79](#)
  
- Säulenchromatographie, [45](#), [67](#), [73](#), [105](#)
- Schildzecken, [9](#), [10](#)
- SDS-Gel, *siehe* PAGE
- Serodiagnostik, *siehe* Lyme-Borreliose
- Sphingolipide, [18](#)
- Sphingomyelin, [18](#)
- Spirochäten, [7](#)
  - Lipide, [19](#)
  - Morphologie, [7](#)
  - Taxonomie, [7](#)
- Steroide, [18](#), [20](#)
- Sterylglycoside, [19](#), [106](#), [130](#)
  - Funktion, [19](#)
- Syphilis, [7](#), [15](#), [37](#)
  
- T-Zellen, [25](#)
- Thioethyl-Schutzgruppe, [60](#), [93](#)
- Thiolgruppe, *siehe* Mercaptogruppe
- Tierseren, [38](#), *siehe auch* Kaninchen- und  
Mausseren
- Toll-like Rezeptor, [20](#), [24](#), [34](#), [78](#), [79](#), [123](#),  
[124](#)
- Trägerproteine, [25](#), [95](#), [113](#), [126](#)
  - maleimidaktivierte, [95](#)
  
- Virotech, [36](#), [37](#), [41](#), [81](#), [116](#), [117](#), [125](#)
  
- Wanderröte, [12](#)
- Western-Blot, [14](#), [38](#), [96](#), [98](#), [116](#)
  - Methodenkritik, [115](#)
  
- Zecken, *siehe* Schildzecken
- Zellkultur, [33](#), [78](#)
  
- Zellstimulationen, [34](#), [78](#)
- Zytokine, [24](#), [34](#)