

Charakterisierung
stadienspezifisch exprimierter Glykolipide
des Humanparasiten *Schistosoma mansoni*

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät (Fachbereich Biologie)
der Justus Liebig Universität Gießen

vorgelegt von
Dipl. Biochem. Manfred Wuhler
aus Rottweil

1999

D26

Dekan: Prof. Dr. W. Clauß
1. Gutachter: Prof. Dr. A. Pingoud
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Geyer

Tag der mündlichen Prüfung:

Bisherige Publikationen und Kongreßbeiträge

Publikationen

Geyer, H., Schmitt, S., Wuhrer, M. und Geyer, R. (1999)
Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS. *Anal. Chem.*, **71**, 476-482.

Wuhrer, M., Dennis, R. D., Doenhoff, M. J., Bickle, Q., Lochnit, G., Geyer, R. (1999)
Immunochemical characterisation of *Schistosoma mansoni* glycolipid antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **103**, 155-169.

Wuhrer, M., Dennis, R. D., Doenhoff, M. J., Lochnit, G., Geyer, R. (2000)
Schistosoma mansoni cercarial glycolipids are dominated by Lewis X and pseudo-Lewis Y structures. *Glycobiology*, **10**, 89-101.

Kongreßbeiträge

Wuhrer, M., Dennis, R. D., Lochnit, G. und Geyer, R.
"Structural analysis of antigenic glycolipids from *Schistosoma mansoni*." 8th Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten, the Groupe Lillois de Glycobiologie and the Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, 9. und 10. Dezember, 1996, Rauschholzhäusen.

Wuhrer, M., Dennis, R. D., Lochnit, G., Doenhoff, M. J. und Geyer, R.
"Strukturanalyse antigener Glykolipide von *Schistosoma mansoni*." 18. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, 24. bis 28. März 1998, Dresden.

Wuhrer, M., Dennis, R. D., Lochnit, G., Doenhoff, M. J. und Geyer, R.
"Structural analysis of antigenic glycolipids from *Schistosoma mansoni*." GlycoBioTechnology Symposium 98, 3. bis 8. Mai, 1998, Braunschweig.

Wuhrer, M., Geyer, R. und Geyer, H.
Structural analysis of carbohydrate chains by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS." GlycoBioTechnology Symposium 98, 3. bis 8. Mai, 1998, Braunschweig.

Wuhrer, M., Dennis, R. D., Doenhoff, M. J., Lochnit, G. und Geyer, R.
"Structural analysis of stage-specifically expressed glycolipids from *Schistosoma mansoni*." 10th Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten, the Groupe Lillois de Glycobiologie and the Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, 9. und 10. November, 1998, Nyland, Niederlande.

Wuhrer, M., Dennis, R. D., Doenhoff, M. J. und Geyer, R.
"Lewis^X-containing glycosphingolipid species isolated from *Schistosoma mansoni* cercariae". British Society for Parasitology, Spring Meeting, 11. bis 14. April, 1999, Warwick, England.

Öffentlichkeitsarbeit im Graduiertenkolleg "Molekulare Biologie und Pharmakologie"

Appel, N., Decker, K., Eberl, M., Freist, A., Geis, S., Haas, M., Hackl, M., Kost, H., Kriese, J., Krumscheid, R., Linnertz, H., Starke, D., Tyczka, J. und Wuhrer, M. (1998)
BSE, Creutzfeldt-Jakob & Co. oder ist Wahnsinn übertragbar? Aktuelle Forschungsergebnisse verständlich dargestellt. Graduiertenkolleg Molekulare Biologie und Pharmakologie, Justus-Liebig-Universität Gießen. 1. Aufl., Gießen, Kletsmeier, ISBN 3-930494-44-2.

Linnertz, H., Wuhrer, M. und Krumscheid, R. (1998)
BSE, Creutzfeldt-Jakob & Co. Spiegel der Forschung, Gießen, **15/1**, 117-121.

Krumscheid, R., Wuhrer, M. und Linnertz, H. (1998)
Ein Graduiertenkolleg macht Öffentlichkeitsarbeit. *BIOspektrum*, **1998/1**, 56.

Abkürzungen

<i>A. suum</i>	<i>Ascaris suum</i>
ATT	6-Aza-2-thiothymin
BSA	Rinderserumalbumin
CDH	Ceramid-Dihexosid
CHH	Ceramid-Hexahexosid
CIS	Serum chronisch infizierter Mäuse
CM	Chloroform/Methanol
CMH	Ceramid-Monohexosid
CMW	Chloroform/Methanol/Wasser
CPH	Ceramid-Pentahexosid
CTetH	Ceramid-Tetrahexosid
CTH	Ceramid-Trihexosid
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCE	1,2-Dichlorethan
DEPDA	N,N'-Diethyl- <i>p</i> -phenylendiamin
dHex	Deoxyhexose
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fuc	L-Fucose
Gal	D-Galactose
GalCer	Galactosylcerebrosid
GalNAc	2-Acetamido-2-deoxy-D-galactose (<i>N</i> -Acetylgalactosamin)
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Glc	D-Glucose
GlcNAc	2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose (<i>N</i> -Acetylglucosamin)
Hex	Hexose
HexNAc	<i>N</i> -Acetylhexosamin
HPLC	high-performance liquid chromatography
HPTLC	high-performance thin layer chromatography
HRP	horseradish peroxidase; Meerrettich-Peroxidase
ID	Innendurchmesser
IHW	Isopropanol/n-Hexan/Wasser
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KLH	keyhole limpet haemocyanin; Hämocyanin der Schnecke <i>Megathura crenulata</i>
Le ^X	Lewis X
Le ^X D	Le ^X -Dihexadecanoylphosphatidylethanolamin-Neoglykolipid
Le ^X H	Le ^X -Hexadecylanilin-Neoglykolipid
Le ^Y	Lewis Y
mAk	monoklonaler Antikörper
Man	D-Mannose
MS	Massenspektrometrie
OPA	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
PA	2-Aminopyridin; Pyridylamin
<i>p. a.</i>	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PC	Phosphocholin
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
<i>p. i.</i>	<i>post infectionem</i>
PMAA	partiell methylierte Alditolacetate
RP	reverse-phase
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Schistosoma</i>
SSIS	mouse single-sex infection serum
SDS	sodium dodecylsulfate; Natriumdodecylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
TUP	theoretical upper phase
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Bilharziose	1
1.1.1	Krankheitsbild.....	1
1.1.2	Geschichte.....	2
1.1.3	Geographische Verbreitung	2
1.2	Der Parasit <i>Schistosoma mansoni</i>	3
1.2.1	Stellung des Parasiten <i>S. mansoni</i> innerhalb der Helminthen	3
1.2.2	Lebenszyklus und Entwicklung des Parasiten <i>S. mansoni</i>	4
1.2.3	Anatomie von Schistosomen	5
1.2.4	Das Tegument von Schistosomen	6
1.3	Diagnose der Schistosomiasis	7
1.3.1	Direkte Diagnoseverfahren	7
1.3.2	Indirekte Diagnoseverfahren	7
1.4	Bekämpfung der Schistosomiasis	8
1.4.1	Chemotherapie	8
1.4.2	Vakzinierung.....	9
1.4.3	Kontrolle des Zwischenwirtes	9
1.5	Glykokonjugate von Schistosomen	10
1.5.1	Charakteristische Bausteine der Glykokonjugate von Schistosomen	10
1.5.2	Lektinbindungsstudien	10
1.5.3	O-Glykane von Schistosomen	11
1.5.4	N-Glykane von Schistosomen	12
1.5.5	Glykolipide von Schistosomen	12
1.5.6	GPI-Anker von Schistosomen	14
1.5.7	Glykosyltransferasen von Schistosomen	14
1.6	Kohlenhydratantigene von Schistosomen.....	14
1.6.1	Oberflächenantigene von Cercarien	15
1.6.2	Oberflächenantigene von Miracidien	15
1.6.3	Oberflächenantigene von Schistosomula und adulten Würmern	15
1.6.4	Das Le ^X -Antigen bei Schistosomen	16
1.6.5	Zirkulierende Antigene	17
1.6.6	Eiantigene und Granulombildung	18
1.6.7	Das 128C3/3-Epitop	19
1.6.8	Das E1-Epitop.....	19
1.6.9	Mit KLH kreuzreagierende Antigene.....	20
1.7	Problemstellung	20
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	21
2.1	Geräte und Chemikalien	21
2.2	Extraktion und Reinigung der Glykolipide von <i>S. mansoni</i>	21
2.2.1	Gewinnung der unterschiedlichen Schistosomen-Stadien	21
2.2.2	Extraktion der Lipide	21
2.2.3	Verseifung des Rohextraktes.....	22
2.2.4	Reverse-phase-Chromatographie	22
2.2.5	Anionenaustauschchromatographie.....	23
2.2.6	Kieselgel-Chromatographie	23
2.2.7	Florisil-Chromatographie.....	25

II

2.2.8	Auftrennung von Glykolipid-Fractionen durch HPTLC.....	25
2.3	Färbe- und Detektionsmethoden	26
2.3.1	Chemische Färbemethoden für die Dünnschichtchromatographie.....	26
2.3.2	Immunologische Färbung auf der Dünnschichtplatte	26
2.3.3	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	28
2.3.4	Immunhistochemische Färbung <i>in vitro</i> transformierter Schistosomula.....	29
2.3.5	Verwendete Antikörper, Seren und Neoglykolipid-Standards.....	30
2.3.6	Trennung und Färbung von Proteinextrakten	31
2.4	Derivatisierung von Glykolipiden.....	33
2.4.1	Peracetylierung.....	33
2.4.2	Deacylierung von Glykolipiden zur Herstellung von Lyso-Glykolipiden	33
2.4.3	<i>N</i> -Acetylierung des Lysoglykolipids	33
2.4.4	Peracetylierung des Lysoglykolipids	34
2.4.5	Verseifung peracetylierter Lyso-Glykolipide	34
2.4.6	Milde saure Hydrolyse	34
2.4.7	Behandlung mit Exoglykosidasen	34
2.4.8	Chromtrioxid-Oxidation.....	34
2.5	Analyse von PA-Oligosacchariden	35
2.5.1	Abbau der Glykolipide mit Endoglykoceramidase.....	35
2.5.2	Herstellung von PA-Oligosacchariden	35
2.5.3	HPLC-Trennung von PA-Oligosacchariden.....	36
2.5.4	Abbau der PA-Oligosaccharide mit Exoglykosidasen.....	36
2.6	Kohlenhydrat-Strukturanalyse	37
2.6.1	Bausteinanalyse peracetylierter Alditolacetate.....	37
2.6.2	Bausteinanalyse mittels reduktiver Aminierung mit Anthranilsäure.....	38
2.6.3	Methylierungsanalyse.....	39
2.6.4	Flüssigkeitssekundärionen-Massenspektrometrie.....	39
2.6.5	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	40
2.6.6	Enzymatischer Abbau von Glykokonjugaten auf der MALDI-TOF-MS-Probenscheibe ...	40
2.7	Sphingoidbasen- und Fettsäureanalyse.....	41
3	ERGEBNISSE	43
3.1	Isolierung und Reinigung der Glykolipide.....	43
3.2	Strukturanalyse der kleinen Glykolipide verschiedener Stadien von <i>S. mansoni</i>	46
3.2.1	Analyse der Gesamtfractionen	46
3.2.2	Fraktionierung der kleinen Glykolipide von <i>S. mansoni</i>	51
3.2.3	Entwicklung einer Methode zum enzymatischen Abbau von Glykolipiden auf der MALDI-TOF-MS-Probenscheibe	57
3.2.4	Enzymatischer Abbau von CDH auf der MALDI-TOF-MS-Probenscheibe	60
3.2.5	Analyse deacylierter Ceramid-Monohexoside.....	64
3.2.6	Sphingoidbasen-Analytik	67
3.2.7	Fettsäure-Analytik	70
3.2.8	Struktur der CMH-Hauptkomponenten	72
3.3	Analyse komplexer Glykolipide	73
3.3.1	Antigenität und Periodat-Sensitivität der <i>S. mansoni</i> Glykolipide	73
3.3.2	Analyse der <i>S. mansoni</i> Glykolipide durch zweidimensionale HPTLC	75
3.3.3	Stadienspezifische Expression der Le ^X -Antigene.....	76
3.3.4	Kreuzreaktivität der <i>S. mansoni</i> Glykolipide mit <i>S. haematobium</i>	84
3.3.5	Reaktivität von anti-Glykoprotein Hyperimmunseren mit <i>S. mansoni</i> Glykolipiden	86
3.3.6	Kreuzreaktivität mit Antigenen des Hämocyanins der Schnecke <i>Megathura crenulata</i>	89
3.3.7	Kreuzreaktivität von <i>S. mansoni</i> Glykolipiden mit dem anti-Meerrettich-Peroxidase Serum	95
3.3.8	Test von <i>S. mansoni</i> Glykolipiden auf Phosphocholin-Epitope	96

3.3.9	Bausteinanalyse komplexer Glykolipide.....	96
3.3.10	Immunchemische Analyse der komplexen Glykolipide von <i>S. mansoni</i> vor und nach Defucosylierung.....	100
3.4	Analyse der komplexen Glykolipide von Adultwürmern und Cercarien nach Fraktionierung durch Normalphase-HPLC.....	109
3.5	Analyse der aus den Glykolipiden von Cercarien gewonnenen PA-Oligosaccharide.....	116
3.5.1	Endoglykoceramidase-Spaltung und PA-Markierung.....	116
3.5.2	HPLC-Trennung der PA-Oligosaccharide	117
3.5.3	Enzymatische und chemische Hydrolyse der PA-Oligosaccharide	121
3.5.4	Methylierungsanalyse der aus den Glykolipiden von Cercarien gewonnenen PA-Oligosaccharide	125
3.5.5	Enzymatischer Abbau der PA-Oligosaccharide auf der MALDI-TOF-MS-Probenscheibe	127
3.6	Analyse der aus den Glykolipiden adulter Würmer gewonnenen PA-Oligosaccharide.....	131
4	DISKUSSION.....	135
4.1	Methodische Aspekte	135
4.1.1	Extraktion, Reinigung und Trennung der Glykolipide	135
4.1.2	MALDI-TOF-MS	135
4.1.3	Kombination von enzymatischem Abbau von Glykokonjugaten auf der Probenscheibe und MALDI-TOF-MS	136
4.1.4	Defucosylierung.....	136
4.1.5	Freisetzung des Kohlenhydrateils von Glykolipiden	137
4.1.6	Methylierungsanalyse	137
4.1.7	Fettsäureanalytik	137
4.2	Strukturen der Ceramid-Mono- und -Dihexoside von <i>S. mansoni</i>.....	138
4.3	Immunchemische Charakterisierung von <i>S. mansoni</i> Glykolipiden	138
4.4	Strukturen der komplexen Glykolipide von <i>S. mansoni</i> Cercarien.....	141
4.5	Biosynthese der Glykolipide von <i>S. mansoni</i>.....	142
5	ZUSAMMENFASSUNG	144
6	LITERATUR.....	145

1 Einleitung

1.1 Die Bilharziose

Bilharziose ist eine Erkrankung von Tieren und Menschen, die durch Würmer der Gattung *Schistosoma* hervorgerufen wird und die bei den etwa 200 Millionen infizierten Menschen weltweit [1] zu unterschiedlichen pathologischen Erscheinungen führt. Neben der Malaria stellt die Bilharziose die wichtigste und schwerste parasitäre Infektionskrankheit in tropischen und subtropischen Ländern dar. Für die Bilharziose, die nach ihrem Erreger auch Schistosomiasis genannt wird, ist noch kein Impfstoff im Einsatz, jedoch gibt es Medikamente, die zur Abtötung des Erregers führen (siehe 1.4.1). Das wichtigste unter diesen Medikamenten ist Praziquantel. Leider reichen diese Medikamente oft nicht aus, die Krankheit in den Griff zu bekommen, denn nach medikamentöser Behandlung kommt es häufig zur Reinfektion. In den letzten zwanzig Jahren wurden viele Schistosomen-Antigene untersucht, um ein besseres Verständnis der Immunantwort gegen diesen Parasiten zu erlangen. Dadurch erhofft man sich, einen Impfstoff entwickeln zu können, der die Infektion und Reinfektion verhindern oder zumindest einschränken kann (1.4.2). Dies sollte den gefährdeten Menschen einen dauerhaften Schutz gegen Bilharziose geben.

1.1.1 Krankheitsbild

Verschiedene Stadien im Entwicklungszyklus (1.2.2) von Schistosomen tragen zum Krankheitsbild bei. Die Cercarien verlieren beim Eindringen in die Haut ihren Schwanz und werden zu Schistosomula. An den Hautstellen, die mit dem Cercarien-belasteten Wasser in Kontakt kommen, entsteht ein fleckiger Ausschlag, wobei die Flecken später anschwellen [2]. Bei den humanpathogenen Arten dauert diese Dermatitis zwei bis drei Tage. Auch Schistosomula von vogelpathogenen Arten können beim Menschen zu einem stark juckenden Hautausschlag führen [3]. Humanpathogene Schistosomula reifen im Körper zu adulten Würmern heran und beginnen nach vier bis fünf Wochen mit der Eiproduktion (1.2.2). Für die meisten Komplikationen und klinisch relevanten Symptome sind die erwachsenen Würmer (im folgenden kurz Adultwürmer genannt) und die von diesen produzierten Eier verantwortlich. Die Pathologie bei Schistosomiasis ist komplex und von Patient zu Patient stark unterschiedlich. Dies hängt mit der Schwere und Dauer der Infektion, mit dem Ernährungszustand des Wirts, mit Immunität und Hypersensitivität und dem Vorkommen anderer Infektionen zusammen [2,4,5]. Zu einer akuten, fiebrigen Erkrankung kommt es, wenn Personen beim Schwimmen einer großen Zahl von Cercarien ausgesetzt waren. Die Inkubationszeit beträgt hierbei etwa vier Wochen, und parallel mit dem Beginn des Fiebers starten die heranwachsenden Würmer mit der Eiproduktion. Die Eier können in verschiedene Gewebe gelangen, sie können in der Darmwand (*S. mansoni*, *S. japonicum*) oder in der Blasenwand (*S. haematobium*) vorliegen, sind aber auch in großen Mengen in der Leber und in geringeren Mengen in anderen Organen zu finden, in die sie mit dem Blutstrom gelangen, z. B. in der Lunge und in seltenen Fällen auch im Gehirn. Um die Eier herum kommt es zur Granulombildung, die sehr unterschiedlich verlaufen kann: Die Eier können von eosinophilen Granulozyten (eosinophile Hepatitis) umgeben sein, wobei

peripher am Granulom eine gemischte eosinophile und neutrophile Entzündungsreaktion vorliegt. Eier können von einer epithelartigen Schicht umgeben sein, an die sich Lymphozyten anlagern, und es kann zur Fibrose kommen. Wenn Miracidien in den Eiern abgestorben sind, klingt die entzündliche Reaktion ab, und es kommt oft zu einer Verkalkung der Eischale. In der Leber kommt es durch die Granulombildung zu einer Vernarbung und einer Hypertension der Pfortader. Neben den Eiern führen bei Schistosomiasis auch Adultwürmer zu einer Leberschädigung, wenn sie durch die Pfortader in die Leber geschwemmt werden. Dies ist vermehrt nach Chemotherapie der Fall, wenn viele absterbende Würmer simultan in die Leber gelangen [6]. Neben schweren Fällen von Schistosomiasis, die durch eine massive Schädigung innerer Organe auch zum Tod führen können, tritt diese Erkrankung oft subklinisch auf und wird bei Routineuntersuchungen diagnostiziert. Bei Schistosomiasis haematobium ist das Auftreten von Blasenkrebs eine häufige Folge der Erkrankung [7].

1.1.2 Geschichte

Schon in den frühen Hochkulturen am unteren Nil und in Mesopotamien traten chronische Hämaturie und Blasenleiden auf. Hämaturie wird in einem Papyrus von etwa 1900 v. Chr. beschrieben. In zwei ägyptischen Mumien der Zwanzigsten Dynastie (1250 bis 1000 v. Chr.) wurden verkalkte Eier nachgewiesen. Die Napoleonischen Truppen zeigten bei der Invasion Ägyptens, 1799 bis 1801, Symptome, die auf eine Schistosomiasis schließen lassen [3]. Aber erst 1851 wurde von Theodor Bilharz in einem Kairoer Krankenhaus der Erreger *Schistosoma haematobium* (damals *Distoma haematobium* genannt) bei einer Autopsie in den Mesenterialvenen gefunden [8]. 1902 wurde von Manson die Existenz einer zweiten Schistosomenart (*Schistosoma mansoni*) postuliert, was 1915 von Leiper bestätigt wurde. *Schistosoma japonicum*, der Erreger des Katayama-Fiebers, wurde 1904 erstmals isoliert. 1923 wurde dann *S. intercalatum* und 1978 *S. mekongi* erstmals beschrieben [3].

1.1.3 Geographische Verbreitung

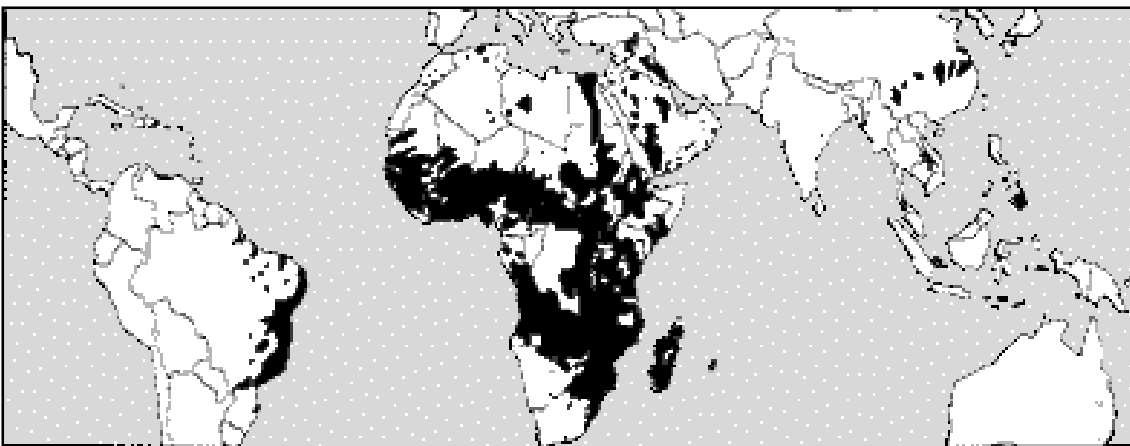


Abb. 1 Geographische Verbreitung von humaner Schistosomiasis (<http://www.quarks.de>; WDR).

Schistosomiasis kommt endemisch in 74 Entwicklungsländern vor, und 200 Millionen Menschen sind weltweit infiziert. Hiervon sind 20 Millionen schwer erkrankt, und 120 Millionen zeigen Symptome [1]. Die Zahl der jährlichen Todesfälle wird mit etwa 200 000 angegeben. Die Erfolge bei der Bekämpfung der Erkrankung sind regional höchst

unterschiedlich: Die Kontrolle der Schistosomiasis in der Karibik ist erfolgreich, es gibt nur noch wenige Gebiete, hauptsächlich auf Puerto Rico und in der Dominikanischen Republik, in denen Schistosomiasis vorkommt [1]. Weiterhin tritt diese Erkrankung in mehreren Gegenden Südamerikas, vornehmlich in Brasilien auf [9]. In Afrika ist die Schistosomiasis weit verbreitet, und die Schistosomiasis *mansoni* nahm lokal stark zu, in erster Linie durch Eingriffe des Menschen, z. B. durch den Bau des Assuan-Staudammes, der zwar zu einer Abnahme von *S. haematobium*-Infektionen, aber zu einer starken Zunahme von *S. mansoni* im Nildelta führte. Im Senegal und in Mauretanien führte der Bau des Diama-Dammes, der den Senegal-Fluss staut, zur Entstehung eines für *S. mansoni* stark endemischen Gebietes [1]. *S. haematobium* ist in Nordafrika und dem Mittleren Osten verbreitet. In Ghana ließ der Bau eines Staudammes am Voltafluß in den 60er Jahren die Prävalenz der *S. haematobium*-Infektion von unter 10 % auf über 90 % ansteigen. Ähnliche Beispiele gibt es für viele Gegenden in Afrika [1]. *S. japonicum* kommt auf den Philippinen, in Indonesien und in China vor, und die Kontrolle wird dadurch erschwert, daß die *S. japonicum*-Infektion eine Zoonose ist, wobei verschiedene Säuger, unter anderem Rinder und Wasserbüffel, infiziert sind und als Reservoir für die Parasiten dienen [10].

1.2 Der Parasit *Schistosoma mansoni*

1.2.1 Stellung des Parasiten *S. mansoni* innerhalb der Helminthen

Schistosomen gehören innerhalb der Trematoden zu den Digenea und sind getrenntgeschlechtlich. Sie sind in der Familie der Schistosomatidae zusammengefaßt. Alle 12 Gattungen der Schistosomatidae kommen parasitär im Blutgefäßsystem von Vertebraten vor. Sieben dieser Gattungen haben Vögel als Hauptwirte, die fünf anderen Gattungen befallen Säuger. Es gibt über 85 Schistosomenarten. Alle humanpathogenen Schistosomen gehören der Gattung *Schistosoma* an, die 18 Arten umfaßt [11]. Die bedeutendsten humanpathogenen Arten sind *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* und *S. intercalatum*. Eingeteilt werden diese 18 Schistosomenarten nach der Morphologie der Eier und nach der Verwandtschaft der Zwischenwirte (1.2.2) in vier Gruppen:

Die *S. haematobium*-Gruppe umfaßt die beiden humanpathogenen Arten *S. haematobium* und *S. intercalatum*, sowie die bei Paarhufern (*Artiodactyla*) parasitär vorkommenden Arten *S. mattheei*, *S. bovis*, *S. curassoni*, *S. margrebowiei* und *S. leiperi*. *S. bovis* befällt in erster Linie Rinder und Schafe, während *S. margrebowiei* häufig bei den Antilopen Zentralafrikas gefunden wird. Bei diesen Parasiten kommt es nur selten zur Infektion von Menschen [3]. Zur *S. mansoni*-Gruppe gehören die Arten *S. mansoni*, *S. rodhaini*, *S. edwardiense* und *S. hippopotami*. Die *S. indicum*-Gruppe enthält die tierpathogenen Arten *S. indicum*, *S. spindale*, *S. nasale* und *S. incognitum*. Der *S. japonicum*-Gruppe werden die Arten *S. japonicum*, *S. mekongi* und *S. sinensium* zugerechnet. Neben diesen säugerpathogenen Schistosomenarten können auch die Cercarien verschiedener Vogelschistosomen der Gattungen *Trichobilharzia*, *Gigantobilharzia* und *Ornithobilharzia* die menschliche Haut durchdringen und so eine Dermatitis hervorrufen (siehe 1.1.1).

Neben den Gattungen und Arten können auch Isolate und Stämme unterschieden werden. Verschiedene Isolate können auf ihre Ähnlichkeit bzw. Verwandtschaft anhand des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus der mitochondrialen DNA des Parasiten untersucht werden [12,13]. Weiterhin können Stämme und Arten anhand von

PCR-Bandenmustern (Polymerase-Kettenreaktion) unterschieden werden [14-16]. Ob die genetischen Unterschiede innerhalb einer Art einen starken Effekt auf die Immunologie haben, ist umstritten [17].

1.2.2 Lebenszyklus und Entwicklung des Parasiten *S. mansoni*

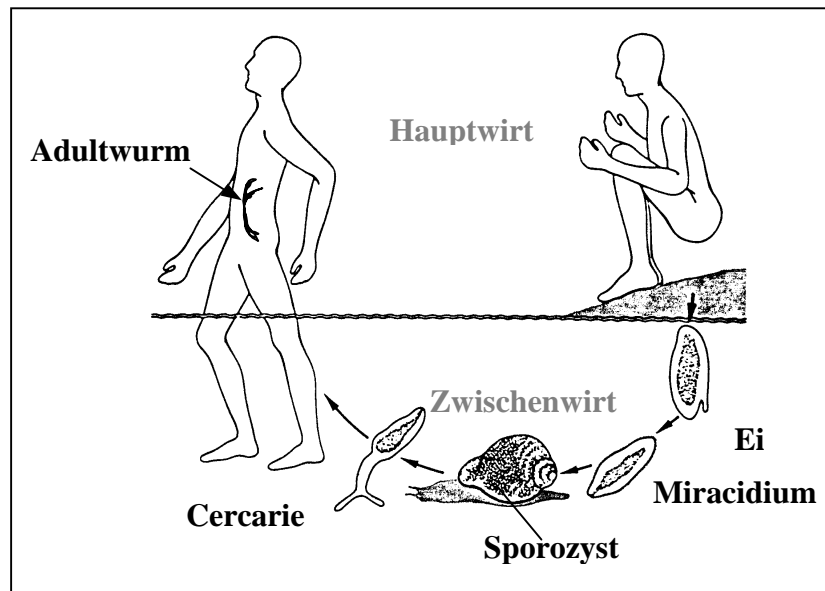


Abb. 2 Lebenszyklus von *S. mansoni*.

Schistosomen haben einen komplexen Lebenszyklus. Der Wirbeltier-Wirt wird beim Kontakt mit Süßwasser infiziert, in dem sich die Larven des Parasiten (Cercarien) befinden. Die Cercarien durchdringen die Haut [18-21] und wandeln sich dabei in Schistosomula um, wobei sie ihren Schwanz abwerfen. Die Schistosomula bleiben 2-3 Tage im Unterhautgewebe und wandern dann in Blutgefäße und mit dem Blutstrom in die Lungen. Dort halten sich die Schistosomula mehrere Tage auf. Die Parasiten wandern danach aus der Lunge über den Blutkreislauf durch das Herz und die Mesenterien des Darms und gelangen in die Leber, wo sie sich an der Blutgefäßwand mit ihren Saugnäpfen festhalten. Männliche und weibliche Würmer finden sich zu permanenten Pärchen zusammen und wandern im Pfortadersystem gegen den Blutstrom in die Darmmesenterien. Dort gelangen die Pärchen zur Geschlechtsreife, und vier bis fünf Wochen nach der Infektion beginnen die weiblichen Würmer mit der Eiablage. Bei den meisten Schistosomen-Arten entwickeln sich ungepaarte Weibchen nicht zur Geschlechtsreife [22]. Wenn jedoch ein Schistosomen-Weibchen mit einem Männchen einer anderen Schistosomenart ein Pärchen bildet, was in der Natur durchaus vorkommen kann, gelangt das Weibchen häufig zur Geschlechtsreife [23]. In diesem Fall produzieren die Weibchen "matroklonalen" Nachwuchs ihrer Art, es kommt also zur Parthenogenese. Die von Schistosomen produzierten Eier werden mit dem Stuhl abgegeben. Bei schweren *S. mansoni* Infektionen wurden beim Menschen mehrere tausend Wurmpärchen gefunden, und hierbei werden etwa 1000 Eier pro Gram Stuhlprobe ausgeschieden [24]. Bei Kontakt mit Süßwasser schlüpfen aus den Eiern begeißelte Miracidien, die dann den Zwischenwirt, eine Schnecke, infizieren [25-27]. In der Schnecke entwickeln sich die Miracidien erst zu Sporozysten, später zu Tochter-Sporozysten. In diesem Stadium findet eine ungeschlechtliche Vermehrung statt, und

bei entsprechendem Licht- und Wärmereiz treten hunderte von Cercarien aus der Schnecke in das Süßwasser aus.

Die Parasiten der Gattung *Schistosoma* unterscheiden sich nicht nur in ihrer Spezifität für den Hauptwirt, auch beim Zwischenwirt zeigen sie Unterschiede: die Zwischenwirte von *S. mansoni* gehören zur Gattung *Biomphalaria*, bei *S. haematobium* gehört der Zwischenwirt zur Gattung *Bulinus*, bei *S. japonicum* zur Gattung *Oncomelania*. Die Schneckengattungen *Biomphalaria* und *Bulinus* gehören zur Familie der *Planorbidae*, während die Zwischenwirte der *S. japonicum*-Gruppe zur Familie der *Pomatiopsidae* zählen.

1.2.3 Anatomie von Schistosomen

Adulte *S. mansoni* Männchen sind 6 bis 28 mm lang und haben einen Durchmesser von etwa 0.25 bis 1 mm. Bei *S. mansoni* und *S. haematobium* ist das Tegument des Männchens mit Erhebungen und Tuberkeln besetzt [3]. Die Männchen von *S. japonicum* sowie die Weibchen aller drei Arten haben eine glatte Oberfläche. Adulte *S. mansoni* Würmer besitzen zwei Saugnäpfe, einen oralen Saugnapf, der sich in den Darm öffnet, und einen ventralen Saugnapf, mit dem sie sich an der Blutgefäßwand anhaften. Die Männchen haben eine ventrale Furche, den gynäkophoren Kanal, in dem das Weibchen liegt.

Das Verdauungssystem besteht aus einem kurzen Ösophagus, an den sich der Darm anschließt. Der Darm teilt sich vor dem ventralen Saugnapf, und die beiden Darmschenkel vereinigen sich hinter den Gonaden wieder zu einem kurzen Blinddarm. Die Verdauung findet hauptsächlich im Lumen des Darmes durch Proteinasen statt [28-34]. Das Exkretionssystem besteht aus Flammzellen, aus Sammelkanälen, einer Blase und einer Öffnung nach außen [35].

Das Nervensystem folgt dem bei Trematoden üblichen Bauschema. Am Ösophagus liegt ein Ganglienpaar vor, die Ganglien sind durch eine dorsale Kommissur verbunden. Von jedem der Ganglien gehen je ein dorsaler und ein ventraler Hauptnerv in anteriorer und posteriorer Richtung ab [36-40].

Beim Männchen kommen sechs bis neun Hoden vor, die über ein *vas deferens* in einen Samenbehälter münden, der sich posterior vom ventralen Saugnapf in einem eingefalteten Cirrus nach außen öffnet [11,41,42]. Im Ovar des Weibchens finden sich kleine Oogonien am anterioren Ende. Bei ihrer Reifung zu Oozyten wandern sie in Richtung posteriores Ende, gelangen in den Eileiter, der sich zu einem Samen-Speichergefäß erweitert. Der Eileiter umrundet das Ovar halb und vereinigt sich mit

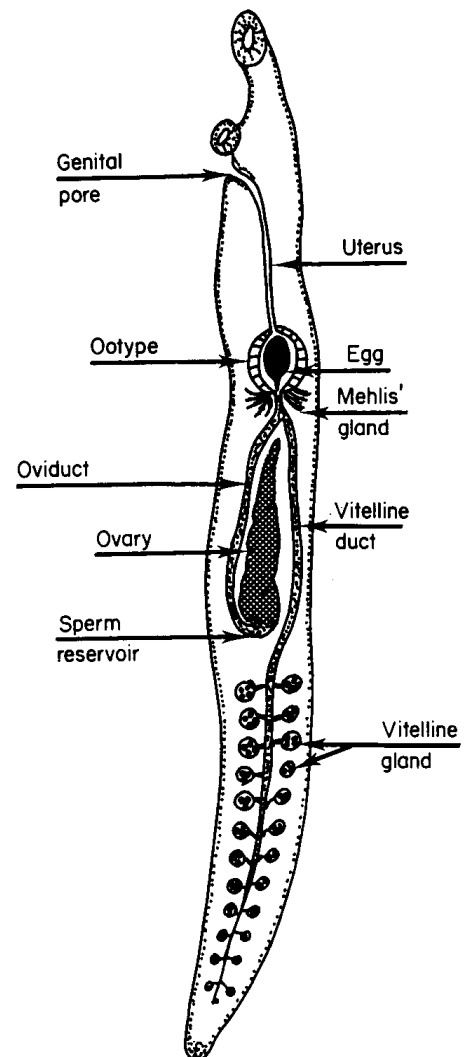


Abb. 3 Morphologie eines *S. mansoni* Weibchens [11].

dem Dottergang. Der Dottergang mit den alternierend abgehenden Dotterdrüsen füllt das gesamte posteriore Ende des weiblichen Wurmes. Nach der Vereinigung von Dottergang und Ovidukt lagern sich im Ootyp die Nährzellen zusammen mit Sekreten der Mehlisschen Drüsen an die befruchteten Eizellen. Die Embryonalzellen teilen sich und bilden die im Ei vorliegenden Miracidien, und die Eier gelangen über den Uterus nach außen.

Die Eier der Schistosomen haben eine in etwa ovale Gestalt und eine Länge von ca. 100 µm. Ein adultes *S. haematobium* Weibchen produziert täglich zwischen 20 und 200 Eier, die einen endständigen Haken haben, bei *S. mansoni* sind es 100 bis 800 Eier pro Tag, mit einem seitlichen Haken, und *S. japonicum* Weibchen bringen es auf täglich 500 bis 3500 Eier, die jeweils nur einen kleinen seitlichen Knopf haben [3].

1.2.4 Das Tegument von Schistosomen

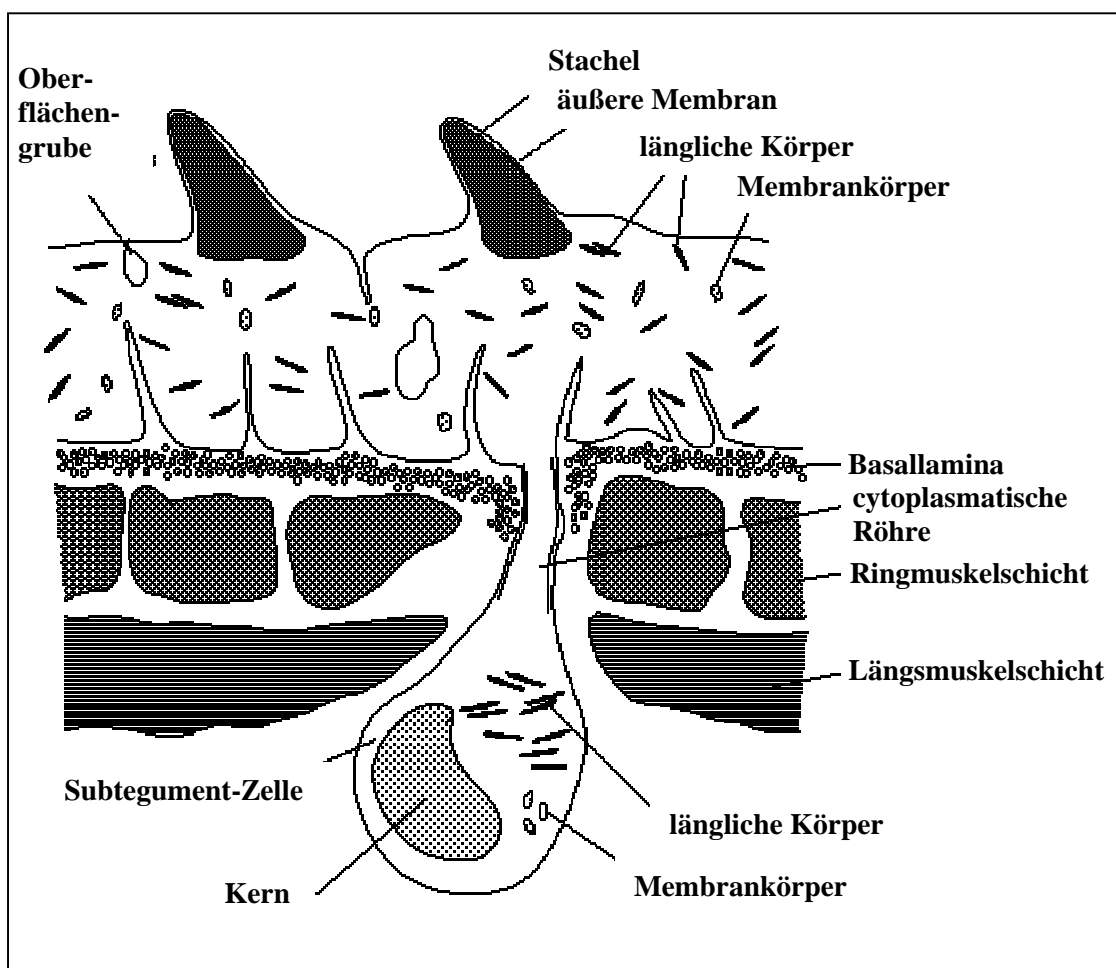


Abb. 4 Anatomie des Teguments adulter Schistosomen. (Dr. T. Stewart; <http://www.path.cam.ac.uk>).

Das Tegument adulter Schistosomen wird von einer doppelten Lipid-Doppelmembran gebildet und besitzt keine Glykokalyx. Im Elektronenmikroskop sind diese zwei aufeinanderliegenden Doppelmembranen als heptalaminare Struktur zu sehen [43-45], im Gegensatz zu normalen Doppelmembranen, die als trilaminare Strukturen zu sehen sind. Die Tuberkel sind Ausstülpungen, die im Tegument von männlichen *S. mansoni* und *S. haematobium* Würmern vorkommen. Die Tuberkel sind von den Stacheln des

äußeren Teguments bedeckt [46]. Cercarien besitzen in ihrem Tegument sensorische Papillen mit ein oder zwei Cilien [47,48]. Die Membran von Cercarien ist trilaminar, besteht also aus einer einfachen Doppelmembran. Unter dem Tegument der Cercarien gelegene Zellkörper enthalten Membranvesikel [45], und etwa 30 min nach dem Eindringen der Larve in die Haut sind diese Membranen an die Oberfläche transportiert worden und bilden die heptalaminare Membran. Parallel zu diesem Wechsel entwickeln die Schistosomula einen Schutz gegen Antikörper-vermittelte Schädigung [43].

Im Tegument von Adultwürmern macht Sphingomyelin etwa 20 % der Phospholipide aus, und Cholesterin und Phospholipide kommen etwa in gleichen molaren Mengen vor, ein Verhältnis, das allgemein für Plasmamembranen typisch ist [49]. Viele Arten der Gattungen *Schistosoma* und *Fasciola* können durch ihr Tegument eine Vielzahl von Substanzen aufnehmen: Monosaccharide, Aminosäuren und Nukleinsäure-Basen [50].

1.3 Diagnose der Schistosomiasis

1.3.1 Direkte Diagnoseverfahren

Aufgrund der verschiedenen klinischen Manifestationen der Schistosomiasis kann es zu einer Verwechslung mit vielen anderen Erkrankungen kommen [3]. Eine direkte Diagnose von Schistosomiasis kann durch den Nachweis von Eiern in Körper-Exkreten und -Sekreten geschehen, wobei die Eier der verschiedenen Schistosomenarten sich in ihrer Gestalt unterscheiden (1.2.3). Zur Unterscheidung der verschiedenen Schistosomenarten sind zudem molekularbiologische Methoden geeignet [51]. Eine weiterer direkter Nachweis detektiert zirkulierenden Antigene von Schistosomen in Serum oder Urin. Bei diesen Antigenen handelt es sich um die glykosylierten Antigene CCA (circulating cathodic antigen) und CAA (circulating anodic antigen) [52-60] und ein drittes glykosyliertes Antigen, das durch den monoklonalen Antikörper 128C3/3 definiert ist [61,62]. Ob andere, von verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelte mAk und Tests teilweise die gleichen Antigene detektieren, ist nicht klar [60-67]. Diese Tests haben den Vorteil, daß sie durch die Verwendung von Urinproben nicht invasiv sind, daß die Menge an zirkulierendem Antigen meist gut mit Wurmbelastung und Eiproduktion korreliert und daß dadurch der Erfolg einer Chemotherapie getestet werden kann [57].

1.3.2 Indirekte Diagnoseverfahren

Einen Hinweis auf eine *S. haematobium* Infektion kann auch der Nachweis von Hämoglobin im Urin geben [3]. Viele weitere Diagnosemethoden basieren auf dem Nachweis von Schistosomen-spezifischen Antikörpern im Serum [68]. Der Nachweis kann durch Immunfluoreszenz an histologischen Schnitten von Adultwürmern, durch Präzipitationstechniken, anhand der Cercarienhüllreaktion oder durch indirekte Hämagglutination [3], durch ELISA [69-79] oder einen Tüpfel-Test erfolgen [55,80]. In jüngster Zeit wurden Kohlenhydratantigene von Schistosomen für Diagnosezwecke chemisch synthetisiert und sollen in Zukunft auf ihre Eignung für die Diagnose getestet werden [81,82].

1.4 Bekämpfung der Schistosomiasis

1.4.1 Chemotherapie

In den letzten fünfzig Jahren hat die Zahl der an Schistosomiasis Erkrankten weltweit von 114 Millionen auf 200 Millionen zugenommen [1]. Die Bekämpfung der Krankheit stellt heute eine große Herausforderung dar. Bei der Behandlung von Schistosomiasis ist die Medikation mit Praziquantel üblich, das unter anderem als Biltricide (Bayer AG), als Distocide oder Cesticide (ShinPoong Pharmaceutical Co. Ltd) und als Cysticide, Cesol oder Cestox (Merck) auf dem Markt ist [3]. Die einmalige oder mehrmalige Gabe von Praziquantel führt zur Abtötung eines Großteils der adulten Würmer.

Im Gegensatz zur Situation bei Malaria, wo aufgrund der häufigen Resistenzen gegen herkömmliche Medikamente intensiv nach neuen Therapie-Ansätzen gesucht wird [83,84], halten sich bei Schistosomiasis die Berichte über mögliche Resistenzen in Grenzen. Bei im Senegal aufgetretenen Praziquantel-Resistenzen [57,85-89] war eine alternative Behandlung mit Oxamniquin erfolgreich [90]. Möglicherweise kann die Entstehung dieser resistenten Stämme auf den Einsatz subkurativer Praziquantel-Dosen zurückgeführt werden [91]. Neben Praziquantel kommen nur noch Metrifonat und Oxamniquin in größerem Umfang zum Einsatz [92]. Aufgrund des seltenen Auftretens von Resistenzen gegen Praziquantel wurden andere, alternative Substanzen zur Bekämpfung von Schistosomen kaum erprobt und eingesetzt [93].

Zum Wirkmechanismus von Praziquantel gibt es mehrere Untersuchungen. So führt dieses Chemotherapeutikum bei Schistosomen wenige Minuten nach der Applikation zu einem Calcium-Einstrom durch das Tegument [93,94]. *In vitro* führt Praziquantel bei Schistosomen zu einer Muskelkontraktion [95], die mit dem Calcium-Einstrom assoziiert zu sein scheint. Magnesium kann die Praziquantel-induzierte Kontraktion inhibieren, indem es spezifisch Calcium-permeable Stellen im Tegument und in den sarkoplasmatischen Membranen blockt [95]. Für die Abtötung der Schistosomen ist ein Zusammenwirken des Praziquantels mit dem humoralen Immunsystem wichtig [96-98], und so können Praziquantelgabe und Immunisierung synergistisch wirken [99,100]. Dies kann damit zusammenhängen, daß Praziquantel die Oberflächenstruktur des Adultwurms ändert [101], was möglicherweise in einer erhöhten Expression vieler parasitärer Antigene an der Wurmoberfläche resultiert [102].

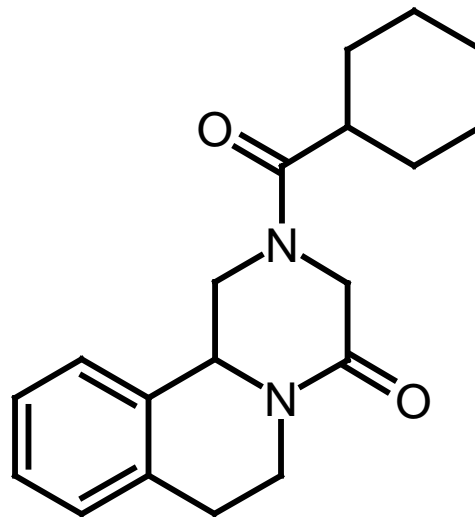


Abb. 5 Struktur von Praziquantel

1.4.2 Vakzinierung

Da die Chemotherapie mit Praziquantel eine Reinfektion nicht verhindert, sind in endemischen Gebieten regelmäßige Behandlungen mit diesem Wirkstoff notwendig. Neben der Optimierung der Diagnose ist es deshalb das Hauptziel der Schistosomiasis-Forschung, durch Vakzinierung eine Immunität zu erreichen. Auch im normalen Verlauf einer Schistosomiasis-Infektion kann es zur Entwicklung eines zumindest partiellen Schutzes gegen Reinfektion kommen. Die Rolle von IgE-Antikörpern bei der Entwicklung einer solchen partiellen Immunität wird dabei kontrovers diskutiert [103], wobei El Ridi *et al.* den IgE-Antikörpern keine entscheidende Rolle zusprechen ([104] und dort zitierte Arbeiten).

Viele Peptid- und Kohlenhydratantigene von *S. mansoni* wurden darauf getestet, ob eine gegen sie gerichtete Immunantwort protektiv sein könnte, ob sie also eventuell für die Entwicklung einer Vakzine in Frage kommen. Die effizienteste Bekämpfung des Parasiten durch das Immunsystem findet gegen das Schistosomula-Stadium, insbesondere im Lungenstadium statt [105,106], aber auch das Adultwurm-Stadium kann teilweise erfolgreich durch das Immunsystem attackiert werden ([107] und dort zitierte Arbeiten). Mehrere Studien haben gezeigt, daß verschiedene Kohlenhydratantigene von Schistosomen und anderen Parasiten hochgradig immunogen sind und daß die gegen sie gerichtete Immunantwort zu einer protektiven Immunität führen kann [108-111]. Eine mögliche Schutzfunktion eines Antigens kann dadurch überprüft werden, daß polyklonale Seren oder mAk durch passiven Transfer daraufhin getestet werden, ob sie die Infektion durch Cercarien reduzieren können. Hierbei erwiesen sich gegen *S. mansoni* Eier gerichtete mAk als protektiv [111-115]. Bei der Schistosomiasis von Mäusen vermittelte die Vakzinierung mit strahlungsattenuierten Cercarien bisher den besten Schutz gegen eine Infektion [116-121], und die in diesem Modell vom Immunsystem erkannten Antigene sind potentielle Vakzinkandidaten [117,122]. Es gibt Hinweise, daß der durch die Vakzinierung mit attenuierten Cercarien vermittelte Schutz teilweise auf die Erkennung von Kohlenhydrat-Epitopen zurückzuführen sein könnte, da nach einer solchen Vakzinierung im Serum Antikörper gegen die Kohlenhydratketten der schistosomalen Glutathion-S-Transferase gefunden wurden [118,119]. Antigenpräparationen aus Adultwürmern [123,124], Schistosomula [125] und Eiern [126] wurden als protektive Antigene beschrieben, ebenso eine Serinprotease aus Cercarien [127], die Triosephosphatisomerase von Schistosomen [128], das Hämocyanin der Schnecke *Megathura crenulata* [129] sowie rekombinante *S. mansoni* Peptid- [130] und Proteinantigene [131,132]. Nach anfänglichem Optimismus bei der Entwicklung von Vakzinen [133-135] dämpften neuere Ergebnisse die Hoffnung auf einen baldigen, klinischen Einsatz effektiver Impfstoffe gegen Schistosomiasis. Daher werden neue, alternative Vakzinkandidaten erwogen [122,136-139].

1.4.3 Kontrolle des Zwischenwirtes

Eine weitere Möglichkeit zur Bekämpfung der Schistosomiasis ist es, das Zwischenwirt-Stadium zu kontrollieren [140]. In diesem Kontext wurden inzwischen Methoden zur Detektion infizierter Schnecken mittels ELISA [141] und PCR [142-144] entwickelt. Der Einsatz von Molluskiziden hat zur Kontrolle von Schistosomiasis in verschiedenen Gebieten beigetragen [145]. Alternativ konnte durch den Einsatz von Fischen, denen die Schnecken als Nahrung dienen, die Schneckenpopulation dezimiert werden. Auch schneckenpathogene Echinostomen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, Schneckenzahlen zu reduzieren [145].

1.5 Glykokonjugate von Schistosomen

1.5.1 Charakteristische Bausteine der Glykokonjugate von Schistosomen

Untersuchungen zur Biochemie von Schistosomen behandeln den Membrantransport [50], den Energiehaushalt [146-149], den Lipidstoffwechsel und die Lipidzusammensetzung [49,150-167] sowie die mögliche Funktion von Lipiden [168-170], die Proteinsynthese und den Aminosäurestoffwechsel [50,171,172], den Cholinmetabolismus [173], den Nukleotidstoffwechsel [50] und den Kohlenhydratstoffwechsel [146-149,174]. Stoffwechselwege, die von ihrer Enzymausstattung und den Endprodukten her für den Parasiten charakteristisch sind und beim Wirt nicht vorkommen, könnten in der Chemotherapie Angriffspunkte für spezifische, neuartige Inhibitoren sein, und charakteristische Stoffwechselprodukte könnten auch für die Diagnose von Nutzen sein. Bei Schistosomen fallen insbesondere die Glykokonjugate durch einzigartige und antigene Strukturen auf. Charakteristisch für die Glykanstrukturen von Schistosomen sind große Mengen des Bausteins Fucose, hingegen konnten bisher keine Sialinsäuren nachgewiesen werden [175-180].

1.5.2 Lektinbindungsstudien

Um einen Überblick über die Expression von Kohlenhydrat-Strukturen an der Oberfläche verschiedener Schistosomen-Stadien zu gewinnen, wurden bei Schistosomen Lektin-Bindungsstudien durchgeführt. Simpson und Smithers [181] berichteten über die Bindung von Con A (Concanavalin A aus *Canavalia ensiformis*, Schwertbohnen; bindet an α -Man und α -Glc), RCA-II (*Ricinus communis* Agglutinin; bindet an Gal β - und GalNAc α β -), PNA (Erdnuß Agglutinin aus *Arachis hypogaea*; bindet an das T-antigen, Gal β 3GalNAc-) und SBA (Sojabohnen Agglutinin aus *Glycine max*; bindet an GalNAc α β -) an das Tegument von *S. mansoni* Adultwürmern. LTL (*Lotus tetragonolobus* [purpureas] Lektin; bindet an Fucose, insbesondere an Le^X [182]) band nicht an das Tegument von Adultwürmern. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen MacGregor *et al.* [183]: Sie fanden eine Bindung von PNA, Con A und SBA an die Parasitenoberfläche. Hayunga und Sumner [184] beobachteten eine Tegumentbindung für Con A, LCH (*Lens culinaris* Hämagglutinin; bindet an Man α -, Glc α - und GlcNAc α -), SBA, RCA-I und RCA-II. In Ultrastrukturstudien [185] wurde die Bindung von ECL (*Erythrina cristagalli* Lektin; erkennt Gal β 4GlcNAc-) und DSL (*Datura stramonium* Lektin; erkennt Gal β 4GlcNAc) an die Adultwurm-Oberfläche nachgewiesen, was auf das Vorkommen von *N*-Acetyllactosamin (Gal β 4GlcNAc) deutet. Außerdem banden WGA (wheat germ Agglutinin aus *Triticum vulgare*), sowie SBA und RCA-I, die ebenfalls eine hohe Affinität zu *N*-Acetyllactosamin haben. Für LTL und UEA-I (aus *Ulex europaeus*; bindet an Fuc) konnte in dieser Studie, wie auch in allen anderen Studien, keine Oberflächenbindung nachgewiesen werden. Auch bei *S. japonicum* wurden Lektine für elektronenmikroskopische Untersuchungen eingesetzt [186]. Glykopeptide von *S. mansoni* Sporocysten, die mit Komponenten der Hämolymphe des Zwischenwirtes wechselwirken, wurden ebenfalls mit Lektinen charakterisiert, und die teilweise Bindung des Lotus-Lektins LTL deutet auf die Anwesenheit von Fucose hin [186]. Die Fucose-spezifischen Lektine von *Lotus tetragonolobus* und *Anguilla anguilla* zeigten

bei *S. mansoni* Cercarien eine starke Bindung an den Kopf und nur eine schwache Bindung an den Schwanz [187].

1.5.3 O-Glykane von Schistosomen

Bei Schistosomen konnte GlcNAc β 1-Ser/Thr nachgewiesen werden [175]. Diese Struktur findet sich häufig bei intrazellulären und nukleären Glykoproteinen von Säugerzellen und wird dort als ein zur Ser/Thr-Phosphorylierung gegenläufiges regulatorisches Signal bei Eukaryoten diskutiert [188,189]. Zusätzlich tragen viele an der Oberfläche vorkommende Schistosomen-Glykoproteine die einfachen O-Glykane GalNAc α -Ser/Thr und Gal β 3GalNAc α -Ser/Thr, die auch auf vielen Säuger-Glykoproteinen nachgewiesen wurden und beim Menschen die Namen Tn- beziehungsweise T-Antigen tragen [175].

Während Radiomarkierungen gezeigt haben, daß bei adulten Schistosomen viele Glykoproteine mit jedem der drei [3 H]-substituierten Monosaccharide Glucosamin, Galactose und Mannose markiert werden [175], führten bei *Schistosomula* nur die tritiierten Zucker Glucosamin und Mannose, aber nicht Galactose zu einer Markierung vieler Glykoproteine [176]. Ein Grund liegt darin, daß die meisten *Schistosomula* Glykoproteine-O-Glykane GalNAc α 3Ser/Thr (Tn-Antigen), und nur sehr wenig Gal β 3GalNAc α 1-Ser/Thr (T-Antigen) enthalten [176].

Zusätzlich zu den kurzkettigen O-Glykanen kommen bei adulten Schistosomen auch andere, hochglykosylierte Proteine vor: das CCA (circulating cathodic antigen), das hauptsächlich dem Darm weiblicher Schistosomen entstammt, trägt hochmolekulare O-Glykane. Etwa 80% der Masse des CCA sind Kohlenhydrate, die meist O-glykosidisch an Threonin gebunden sind [190]. Die O-Glykane bauen auf die Struktur GlcNAc β 3Gal β 3GalNAc α -Thr/Ser auf. Die Ketten bestehen aus N-Acetylactosaminwiederholungseinheiten (Typ 2; [-3Gal β 4GlcNAc β -] $_n$), und viele der GlcNAc-Reste sind durch eine α 3-gebundene Fucose substituiert, so daß sich polyLe^X-Strukturen ergeben.

CAA (circulating anodic antigen), das ebenfalls aus dem Darm stammt, ist völlig anders glykosyliert. Es hat einen Kohlenhydratanteil von 30%. Die Hauptkomponenten sind GalNAc und Glucuronsäure, mit geringen Mengen an Fuc, Gal, GlcNAc, Xyl und Glc [191]. Wahrscheinlich sind die vielen Glucuronsäuren für den anionischen Charakter des Moleküls verantwortlich. Die Art der Verankerung des Polysaccharids am Protein ist nicht geklärt, aber die Glykane sollen nach Meinung der Autoren [191] statt über das bei O-Glykanen übliche GalNAc über ein GlcNAc gebunden sein.

Die Glykokalyx von Cercarien ist 1-2 μ m stark und enthält große Mengen an Fucose [187,192-195]. Die O-Glykane von Cercarien-Glykoproteinen können eine Größe von 60 Kohlenhydratbausteinen und mehr haben. Die Oligosaccharide enthalten als Rückgrat Wiederholungseinheiten des ungewöhnlichen Trisaccharids (-3GalNAc β 4GlcNAc β 3Gal α -) $_n$, wobei GlcNAc mit einer Kette von 2 oder 3 Fucosen substituiert ist (\pm Fuc α 2Fuc α 2Fuc α 3-), so daß sich als repetitive Einheit -3GalNAc β 4[\pm Fuc α 2Fuc α 2Fuc α 3]GlcNAc β 3Gal α - ergibt. Als terminale Struktur wurde \pm Fuc α 2Fuc α 3GalNAc β 4(\pm Fuc α 2Fuc α 2Fuc α 3)GlcNAc β 3Gal α - gefunden, wobei die Zahl der Fucosen zwischen drei und fünf variiert. Ungewöhnlich an diesen Strukturen sind die α -Galactosylierung des N-Acetylgalactosamins sowie die Oligofucosyl-Seitenketten [196].

1.5.4 N-Glykane von Schistosomen

Schistosomen besitzen sowohl Mannose-reiche *N*-Glykane ($\text{Man}_{5,9}\text{GlcNAc}_2$) [177] als auch solche vom komplexen Typ. Viele der komplexen Strukturen sind ungewöhnlich: Sie enthalten viel Fucose und GalNAc und keine Sialinsäuren. GalNAc ist meist terminal vorhanden [178]. Bei adulten männlichen Würmern wurden diantennäre *N*-Glykane mit dem Lac β diNAc-Motiv ($\text{GalNAc}\beta 4\text{GlcNAc}\beta$ -) in beiden Antennen gefunden [178], das auch auf menschlichen *N*-Glykanen vorkommt [197]. In solchen Lac β diNAc-Motiven auf *N*-Glykanen von Schistosomen können die subterminalen GlcNAc-Reste auch durch $\alpha 3$ -gebundene Fucose substituiert sein [198]. Fucosyliertes Lac β diNAc wurde weiterhin bei *Dirofilaria immitis* gefunden [199]. Eine Gruppe von *N*-Glykanen adulter Schistosomen ist tri- oder tetraantennär und trägt Poly-*N*-Acetyllactosamin als Wiederholungseinheit, wobei die GlcNAc-Reste meist fucosyliert sind [179]. Diese *N*-Glykane tragen also das Le^X-Antigen an ihrem nicht-reduzierenden Ende, während die Kette oligo-Le^X-Strukturen enthält. Diese Glykanstrukturen ähneln damit stark denen von CCA [190].

1.5.5 Glykolipide von Schistosomen

Die Glykolipide von Schistosomen unterscheiden sich insofern von den Glykolipiden anderer Organismen, als bei *S. mansoni* Adultwürmern für das Ceramid-Dihexosid (CDH) die Struktur $\text{GalNAc}\beta 4\text{Glc}1\text{Cer}$ gefunden wurde [200]. Bei Säuger-Glykolipiden hat das CDH die Struktur $\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta 1\text{Cer}$ [201,202]. Bei Mollusken, Arthropoden und bei Nematoden wurde die Struktur $\text{Man}\beta 4\text{Glc}1\text{Cer}$ gefunden [203-208], wohingegen die Cestoden die Strukturen $\text{Gal}\beta 4\text{Gal}1\text{Cer}$ oder $\text{Gal}\beta 6\text{Gal}1\text{Cer}$ als CDH exprimieren [208-210]. Bei Spirometren wurden Glykolipide mit der Disaccharid-Struktur $\text{Glc}\beta 3\text{Gal}\beta 1\text{Cer}$ gefunden [211].

Neben Ceramid-Monohexosid (CMH) und CDH kommen in *S. mansoni* Adultwürmern, Cercarien und Eiern eine Vielzahl antigenen Glykolipide vor [212]. HPTLC-Immunfärbung (high performance thin-layer chromatography) mit monoklonalen Antikörpern belegte, daß in allen drei untersuchten Stadien von *S. mansoni* (Adultwürmer, Cercarien und Eier) ein dominantes Epitop vorkommt [212], welches mit Ei-Glykoproteinen verschiedener Schistosomenarten serologisch kreuzreagiert [213]. Bei ersten Strukturanalysen von Glykolipiden aus *S. mansoni* Eiern, die durch Immunitätsreinigung mit dem monoklonalen Antikörper 128C3/3 identifiziert wurden, ergab sich ein repetitiver Aufbau [214]. Für das sich wiederholende Element, das terminale Fucose, 2-substituierte Fucose und 3,4-disubstituiertes *N*-Acetylglucosamin enthält, wurden zwei Strukturvorschläge gemacht: Beim ersten Strukturvorschlag ($-2\text{Fuc}\alpha 4[\pm\text{Fuc}\alpha 3]\text{GlcNAc}\beta$ -) befindet sich die 2-substituierte Fucose innerhalb der Hauptkette, während beim zweiten Strukturvorschlag ($-4[\pm\text{Fuc}\alpha 2\text{Fuc}\alpha 3]\text{GlcNAc}\beta$ -) die Hauptkette aus sich wiederholenden $-4\text{GlcNAc}\beta 1$ -Elementen besteht, wobei die Seitenkette die interne Fucose enthält. In einer neuerlichen Strukturanalyse von Glykolipiden aus *S. mansoni* Eiern [215] wurde dann der letztgenannte Strukturvorschlag bestätigt. Hierbei ähnelt die letztere Struktur einem für die Glykokalyx von Cercarien gefundenen Strukturmotiv [196]. Für das nicht-reduzierende Ende der Ei-Glykolipide wurde die Struktur $\pm\text{Fuc}\alpha 2\text{Fuc}\alpha 3\text{GalNAc}\beta 1$ - nachgewiesen ([215]; Abb. 6A). Allen Strukturen und Strukturvorschlägen ist gemeinsam, daß sie in ungewöhnlicher Weise einen internen Fucose-Rest enthalten. Diese Oligofucosyl-Strukturen sind es wahrscheinlich auch, welche die Antigenität der Glykolipide ausmachen. Aufgrund der guten Erkennung von *S. mansoni* Glykolipiden durch Schistosomiasis-Infektionsseren wurden

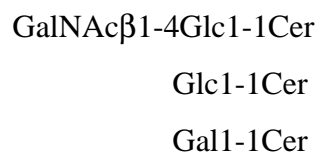
die Eignung von Adultwurm-Glykolipid-Präparaten für die Serodiagnose getestet. Es ergab sich hierbei eine hohe Sensitivität und Spezifität, da die Adultwurm-Glykolipide mit keinem anderen helminthischen Infektionsserum Kreuzreaktivitäten zeigten [77].

Neben dem dominanten Epitop, das auf den Glykolipiden aller untersuchten Stadien vorkommt, deuteten schwache Signale bei der Immunfärbung mit einem anderen monoklonalen Antikörper darauf hin, daß Cercarien-Glykolipide zusätzlich ein anderes, stadienspezifisch exprimiertes Epitop tragen [212]. Spätere Studien ergaben, daß dieser mAk das Le^X-Antigen erkennt [216].

Auch bezüglich der Lokalisation und des Stoffwechsels von *S. mansoni* Glykolipiden gibt es in der Literatur erste Hinweise. Markierungsversuche mit frisch transformierten Schistosomula ergaben, daß Lipide spezifisch nach Periodat-Oxidation durch Reduktion mit Tritium markierbar sind [217]. Dies läßt auf ihre Lokalisation an der Oberfläche der Schistosomula schließen. In der Untersuchung wurde davon ausgegangen, daß diese Lipide Glykolipide sind. Die markierten Substanzen zeigten in der Dünnschichtchromatographie eine apparente Größe eines CMH bis CTH (Ceramid-Trihexosid). Bei *in vitro*-Kultivierung der oberflächenmarkierten Schistosomula ergab sich für die markierten Lipide, wie auch für markierte Proteine, eine Halbwertszeit von etwa 15 Stunden [217].

Von anderen Organismen ist bekannt, daß Glykosphingolipide unterschiedliche Funktionen haben können: Sie spielen eine Rolle bei der Zelladhäsion [218-220] und können die Signalübertragung modulieren [221]. Sie wirken als Antigene [222] und funktionieren als Rezeptoren [223]. Oftmals sind sie mit Krebs assoziiert [224-227].

A



B

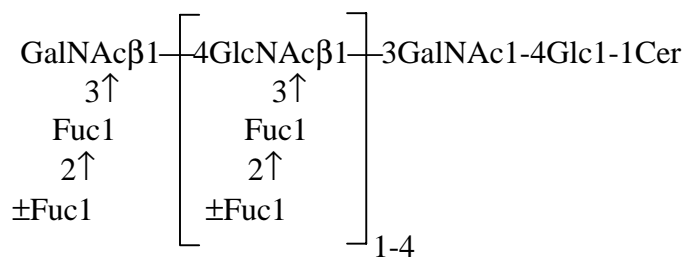


Abb. 6 Struktur der Glykolipide von *S. mansoni*. (A) Struktur der einfachen, neutralen Glykolipide aus *S. mansoni* Adultwürmern [200]. Die anomere Konfiguration wurde für die Lipid-verknüpfte Glucose bzw. Galactose nicht bestimmt. (B) Struktur der komplexen, neutralen Glykolipide aus *S. mansoni* Eiern [215]. Die anomeren Konfigurationen wurden in dieser Untersuchung weder für die Fucosylseitenketten noch für die Grundstruktur GalNAc1-4Glc1-1Cer bestimmt.

Parallel zur Präsentation von immunogenen Peptiden durch MHC Klasse I und II Moleküle und ihrer Erkennung durch $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptoren wurde eine Präsentation von Lipiden durch CD1-Moleküle beschrieben [228]. Solche von CD1-Molekülen präsentierten Lipide werden von CD4⁺CD8⁻ $\alpha\beta$ -T-Zellen und von $\gamma\delta$ -T-Zellen erkannt [228-233]. Inwiefern diese Präsentationsmechanismen auch für Glykosphingolipide relevant sind, ist noch nicht klar.

Während die Glykosphingolipide von *S. mansoni* in erster Linie durch ihre einzigartigen, antigenen Kohlenhydratketten Aufmerksamkeit erlangen und für den Ceramidteil von Glykosphingolipiden kaum Funktionen bekannt sind [234], haben die Metaboliten anderer Sphingolipide wie die des Phospholipids Sphingomyelin Funktionen als Signalmoleküle und "second messenger" [235-242].

1.5.6 GPI-Anker von Schistosomen

Als weitere Gruppe von Glykokonjugaten wurden bei Schistosomen Proteine mit Glykosyl-Phosphatidylinositol-Ankern beschrieben [243-247]. Wie Untersuchungen an anderen Organismen ergaben, spielen GPI-Anker eine Rolle beim intrazellulären Transport und können den Zielort des verankerten Proteins bestimmen [248,249]. Schistosomen besitzen auch die entsprechenden Phospholipase-Aktivitäten, um GPI-verankerte Proteine freizusetzen [246,250]. Es ist nicht bekannt, ob Glykosyl-Phosphatidylinositol bei Schistosomen auch in größeren Mengen als freie Glykolipide vorkommen, wie dies bei anderen Organismen beschrieben wurde [251-255].

1.5.7 Glykosyltransferasen von Schistosomen

Viele der Glykokonjugate von Schistosomen haben ungewöhnliche Kohlenhydrat-Strukturen, so daß sie allein bei diesen Parasiten vorzukommen scheinen. Bei erwachsenen Schistosomen wurde eine α 3-Fucosyltransferase-Aktivität charakterisiert [256]. Bei *Trichobilharzia ocellata*, einem Vogelparasiten aus der Familie der Schistosomatidae, konnte neben einer α 3- auch eine α 2-Fucosyltransferase nachgewiesen werden. Die GalNAc-Transferase von *Trichobilharzia ocellata* hat Sequenzhomologien zu β -Galactosyltransferasen von Säugern [257], und kann wie diese durch α -Lactalbumin in ihrer Akzeptorspezifität moduliert werden [258]. Weiterhin wurden eine Galactosyltransferase [259] und eine Mannosyltransferase [260] sowie weitere Glykosyltransferasen bei *S. mansoni* nachgewiesen [261]. Inzwischen ist bereits eine Fucosyltransferase kloniert und charakterisiert worden [262], die eine so hohe Sequenzähnlichkeit zur humanen und murinen Fucosyltransferase VII besitzt, daß heute vermutet wird, daß die klonierte Fucosyltransferase murinen Ursprungs ist und es sich um eine Kontamination handelt. In *Trichobilharzia ocellata* wurden zwei Fucosyltransferasen nachgewiesen, die gemeinsam die Struktur Fuc α 2Fuc α 3GlcNAc synthetisieren können. Eine Fucosyltransferase, die Fucose auf die 3-Position von GalNAc überträgt, so daß Strukturen wie die von Glykolipiden aus *S. mansoni* Eiern entstehen, ist bisher nicht für Schistosomen beschrieben worden.

1.6 Kohlenhydratantigene von Schistosomen

Für verschiedene pathogene Organismen, unter anderem für Parasiten, gibt es Hinweise auf die spezifische Rolle und Funktion von Glykokonjugaten. Bei Trypanosomen schützen Glykokonjugate den Parasiten gegen das Immunsystem des Wirts [263], bei Leishmanien interagieren sie mit bestimmten Wirtszelltypen [255]. Bei Schistosomiasis ist der Hauptteil der humoralen Immunantwort gegen Kohlenhydratantigene gerichtet [111,264-266]. Verschiedene Kohlenhydratantigene werden vom Parasiten stadienspezifisch an der Oberfläche exprimiert oder sekretiert. Je nach Immunstatus des Wirts kann die Immunantwort daher sehr unterschiedlich sein [105,267-271]. Teilweise sollen gegen Kohlenhydratantigene von Schistosomen gerichtete Antikörper andere Epitope blockieren und dadurch die Entwicklung einer Immunität mit effizienter Bekämpfung

des Parasiten verhindern [105,272]. Insgesamt wechselwirken die *S. mansoni* Kohlenhydratantigene in breitgefächerter Weise mit dem Immunsystem, was am besten für das Le^X-Antigen untersucht wurde (siehe 1.6.4).

1.6.1 Oberflächenantigene von Cercarien

Die Glykokalyx von Cercarien ist stark immunogen [112,194,195,273,274]. Monoklonale Antikörper, die Kohlenhydratstrukturen der Glykokalyx erkennen, reagieren auch mit Glykokonjugaten von *S. mansoni* Eiern [112,114,212,213]. Gegen die Glykokalyx gerichtete Antikörper wirken *in vitro* auf Schistosomula cytotoxisch [266]. Demgegenüber zeigt die Glykokalyx von Cercarien bei Immunisierungsexperimenten keine Protektion, sondern führt zu einer erhöhten Wurmzahl [275], was auf eine mögliche immunsuppressive Wirkung dieser Strukturen hindeutet [194]. Weiterhin unterdrücken die bei *in-vitro*-Transformation von den Cercarien abgegebenen Substanzen die Proliferation von peripheren Blutlymphozyten [194]. Die Glykokalyx von *S. mansoni* Cercarien scheint in einer späten Entwicklungsphase von den Cercarien selbst hergestellt zu werden [192]. Weder die Sporozysten noch das Hepatopankreas der Wirtsschnecke werden von einem gegen die Glykokalyx gerichteten Hyperimmunserum erkannt. Auch frühe Cercarienformen werden nicht erkannt, und erst späte Cercarien weisen die entsprechenden Antigene an der Oberfläche auf [192]. Die in der Cercarienglykokalyx gefundene terminale Struktur $\pm\text{Fuc}\alpha\text{2Fuc}\alpha\text{3GalNAc}\beta\text{4}(\pm\text{Fuc}\alpha\text{2Fuc}\alpha\text{2Fuc}\alpha\text{3})\text{GlcNAc}\beta\text{3Gal}\alpha-$ ist vermutlich ein dominantes Antigen. Diese Struktur steht im Einklang mit der Zusammensetzung der Cercarien-Glykokalyx, die Fucose als Hauptkomponente aufweist. Die Glykokalyx von Cercarien enthält keine Sialinsäuren [187]. Eine Fraktionierung der Glykokalyx zeigte allerdings, daß der Cercarienschwanz eine völlig andere Kohlenhydrat-Zusammensetzung hat: Er enthält fast ausschließlich Glucose und Galactose und kaum Fucose [187].

1.6.2 Oberflächenantigene von Miracidien

Auch Miracidien besitzen eine Glykokalyx [276], die Antigene mit der Cercarien-Glykokalyx [216] sowie der Schistosomula-Oberfläche [277] gemeinsam hat. Diese Glykokalyx befindet sich unter anderem auf den Oberflächen-Platten der Miracidien und wird mit diesen bei der Transformation abgestreift [276]. Jedoch bleiben Teile der Glykokalyx noch nach der Transformation auf der Oberfläche erhalten [276]. Die Miracidienoberfläche reagiert mit Seren, die gegen Schneckenantigene hergestellt wurden [278].

1.6.3 Oberflächenantigene von Schistosomula und adulten Würmern

Bei der Penetration der Haut erfährt der Körper der Cercarie eine Transformation zum Schistosomulum, wobei es zu einem schnellen Wechsel vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel kommt. Der Anstieg der Salzkonzentration ist ein Stimulus, der die Transformation begünstigt [21]. Bei dieser Transformation verändert sich auch die Expression von Glykokonjugaten auf der Oberfläche des Parasiten, viele Oberflächen-Glykoproteine verschwinden innerhalb von Stunden [279,280], die Anfärbbarkeit mit Periodat-Schiffreagenz (PAS) geht verloren [281]. Andere Antigene werden an der Oberfläche von frisch transformierten Schistosomula exprimiert [282-284] oder kommen spezifisch im Lungenstadium vor [285]. Auf der Oberfläche von Schistosomula wurde ein Analogon der menschlichen E-Selektine entdeckt [286]. Beim

Adultwurm richtet sich die erste Immunantwort gegen Darmantigene, unter anderem eine Cystein-Proteinase (SMw32), gegen die schon drei Wochen *p. i.* hohe Antikörpertiter vorliegen [28]. Mehrere Glykoproteine zeigen eine spezifische Expression an der Oberfläche erwachsener Schistosomen [265,283,287-290], und einige Oberflächenproteine werden spezifisch im gynäkophoren Kanal exprimiert [291-293]. An der Oberfläche adulter Würmer wurde ein dem TGF- β -Rezeptor (transforming growth factor β receptor) homologes Protein gefunden [294], die leichte Ketten von Dynein [295], eine ATP-Diphosphohydrolase [296] und eine Acetylcholinesterase, die über Phosphatidylinositol im Tegument verankert ist ([247] und dort zitierte Arbeiten).

Die bei Glykokonjugaten von Endoparasiten gefundenen Strukturen können vom Parasiten selbst hergestellt sein, sie können aber auch vom Wirt übernommen worden sein. Eine solche Aufnahme von wirtseigenen Glykokonjugaten ist für Leishmanien nachgewiesen, die das Forssman-Glykolipid von Makrophagen aufnehmen [255,297]. Auch bei Schistosomen wurde für Blutgruppen- und andere Kohlenhydratantigene, die an der Oberfläche des Parasiten gefunden werden, nachgewiesen, daß sie vom Wirt stammen [298-303]. Schistosomula übernehmen unter anderem auch MHC (major histocompatibility complex) Moleküle des Wirtes und präsentieren sie an ihrer Oberfläche [304].

Die bisher bei Schistosomen analysierten Glyko-Strukturen enthielten keine Sialinsäuren [175-180,305]. Lediglich in einer Arbeit wurden geringe Mengen an Sialinsäure in Adultwürmern nachgewiesen, die aber von aufgenommenen Erythrozyten stammen könnten [306]. Mit Lektinen wurde weiterhin bei Lungenstadien-Schistosomula und Adultwürmern Sialinsäure nachgewiesen, die bei frisch transformierten Schistosomula nicht vorhanden war [181,307,308]. Diese Befunde deuten darauf, daß die bei Schistosomen gefundenen Sialinsäuren vom Wirt stammen.

Neben der Möglichkeit, daß die Maskierung des Parasiten mit Wirtsmolekülen seine nur geringe Erkennung durch das Immunsystem bedingt, könnte auch das Abgeben der Oberflächenantigene durch Schistosomula die geringe Erkennung bewirken [309]. In manchen Studien weist die abnehmende Bindung von Lektinen an die Schistosomulum-Oberfläche im Laufe der Entwicklung auf die Abnahme der an der Oberfläche exprimierten Kohlenhydratepitope hin [284,308,309]. Es gibt aber auch Oberflächenantigene, die erst im Laufe der Entwicklung des Schistosomulums auf der Oberfläche mit Lektinen nachgewiesen werden können [183,284]. Kurz nach dem Eintreten der Parasiten in die Blutbahn nimmt die Lektinbindung verstärkt ab, was auf die Freisetzung der Oberflächenantigene zurückgeführt wird [309].

Parallel zu den Lektin-Bindestudien sind die Ergebnisse aus Antikörper-Bindestudien zu sehen: Die Fähigkeit, verschiedene Antikörper zu binden, ist bei Schistosomula kurz nach der Transformation am höchsten und nimmt dann schnell ab [280,309,310]. *S. mansoni* Adultwürmer exprimieren an ihrer Oberfläche das Le^X-Epitop (siehe 1.6.4), *N*-Acetyllactosamin [185] und Fucosyllactose, die auch bei Cercarien vorkommt [311-313]. Die Fucosyllactose-Struktur (Fuc α 2Gal β 4Glc-) hat Ähnlichkeiten mit dem Blutgruppe H Antigen und wird von einem Lektin des Zwischenwirtes *Biomphalaria glabrata* erkannt [311-313].

1.6.4 Das Le^X-Antigen bei Schistosomen

Bei Schistosomen wurden mehrere verschiedene Glykokonjugate beschrieben, die eine α 3-Fucose enthalten, darunter das Blutgruppen-Antigen Le^X [109]. Das Le^X-Epitop kommt sowohl beim Wirt als auch bei *S. mansoni* vor. Eine solche starke Ähnlichkeit von Wirts- und Parasitantigenen wird mit dem Begriff "molecular mimicry" umschrie-

ben und kann einen Beitrag zur Immunevasion leisten [314,315]. Obwohl Le^X ein körpereigenes Antigen ist, können hohe anti-Le^X Antikörper-Titer induziert werden [316]. Das Le^X-Antigen wurde auf Glykolipiden von *S. mansoni* Cercarien [212] sowie auf Glykoproteinen verschiedener Stadien von *S. mansoni* nachgewiesen [213]. Die gegen Le^X gerichteten Antikörper im Infektionsserum gehören hauptsächlich zur IgM-Klasse [120], können aber auch der IgG-Klasse angehören [317]. Der monoklonale Antikörper 504B1 erkennt das Le^X-Epitop [216]. Er bindet an sekretiertes Material an den Öffnungen der Acetabular-Drüsen von Cercarien, markiert aber ansonsten die Oberfläche der Cercarien nicht und erkennt also nicht die Glykokalyx [216]. Innerhalb von 3 Stunden nach der Transformation wird das Le^X-Epitop an der Oberfläche der Schistosomula exprimiert, jedoch nicht auf dem eventuell noch anhängenden Cercarienschwanz [216]. Nicht nur die Schistosomula bedecken sich beim Eindringen in den Säugetier-Wirt mit dem wirtseigenen Le^X-Epitop, sondern auch auf dem eindringenden Miracidium findet sich ein Kohlenhydratepitop, das dieses mit dem Zwischenwirt, einer Süßwasserschnecke, gemeinsam hat [318]. Auch hier scheint also "molecular mimicry" stattzufinden. Das Le^X-Epitop findet sich auch an der Oberfläche und im Darmepithel des adulten Wurms. Der anti-Le^X IgM monoklonale Antikörper E.5 erkennt ein Glykoprotein mit einer apparenten Molekülmasse von 200 kDa an der Oberfläche der Schistosomen [109]. Auf Miracidien konnte Le^X nicht nachgewiesen werden.

Beim Menschen kommt Le^X auf Granulocyten vor, wo es für Autoantikörper zugänglich sein sollte [319]. Weiterhin findet es sich im Gehirn, dem Verdauungstrakt und den distalen Tubuli der Niere [319]. Anti-Le^X Antikörper können bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie die Neutrophilenzahl erniedrigen, sind aber sonst kaum toxisch [109]. Für Granulozyten wird eine Antikörper-abhängige, Komplement-vermittelte Lyse durch anti-Le^X-Antikörper postuliert [320].

Inwieweit Le^X-Antigene für die Vakzinierung eingesetzt werden können, ist unklar, da es zu einer Autoimmunantwort kommen kann [109,216,321]. Vakzinierungsexperimente mit attenuierten Cercarien deuten darauf hin, daß anti-Le^X-Antikörper eine protektive Rolle haben könnten [120]. Der monoklonale Antikörper E.5 und andere Antikörper, die gegen Le^X gerichtet sind, schützen bei passiven Übertragungsexperimenten Mäuse gegen Schistosomiasis [109,111,112,120,322]. Weiterhin vermitteln Antikörper gegen Le^X *in vitro* die Tötung von Schistosomula durch Effektorzellen [109]. Ein Oligosaccharid mit dem Le^X-Epitop läßt B-Zellen proliferieren und die Milz Interleukin (IL)10 und Prostaglandin E2 produzieren, zwei Substanzen, welche die Th-1-Antwort herunterregulieren [323]. Unter den B-Zellen scheinen hauptsächlich die B-1 Zellen IL 10 zu produzieren [324]. Sie produzieren verschiedene Autoantikörper, aber auch Antikörper gegen bakterielle Polysaccharide [324-328]. Generell scheinen die von B-1 Zellen produzierten Antikörper durch die Interaktion mit Pathogenen und weniger durch die Wechselwirkung mit körpereigenen Antigenen induziert zu werden [329].

Die Le^X-Glykokonjugate von Schistosomen scheinen bei vielen essentiellen Schritten im Lebenszyklus des Parasiten eine Rolle zu spielen. Ein Beispiel ist hier die Wanderung des Parasiten im Säugetierwirt [120]. Auf Eiern vorkommendes Le^X-Antigen scheint für die Haftung am Endothel wichtig zu sein [330].

1.6.5 Zirkulierende Antigene

Die sekretierten Antigene CCA (circulating cathodic antigen) und CAA (circulating anodic antigen) werden von adulten Schistosomen gebildet und kommen dort auch im Darm vor [52-58,331,332]. Der Nachweis von CCA und CAA wird in der Diagnostik verwendet (1.3.1). In der Literatur sind auch andere Darmantigene beschrieben, die sich deutlich von CCA und CAA unterscheiden. [66,264,333]. Die Abgabe von CCA und

CAA in die Blutzirkulation geschieht wahrscheinlich durch regelmäßiges Erbrechen der Mageninhalt des Parasiten [334]. CCA besteht zu 80 % aus *O*-Glykanen, die über GalNAc an Threonin gebunden sind und aus etwa 25 Wiederholungseinheiten der Le^X-Struktur bestehen [190]. Wahrscheinlich ist CCA identisch mit dem in der Literatur beschriebenen zirkulierenden M-Antigen [335]. Ähnliche fucosylierte Poly- oder Oligo-*N*-acetylactosamin-Strukturen kommen auch auf *N*-Glykanen von adulten Würmern vor [179]. Die für CCA ermittelte Struktur zeigt starke Ähnlichkeit mit einem Hauptoberflächenantigen von Granulocyten [336], das ebenfalls polyfucosylierte *N*-Acetylactosamin-Glykane trägt. Diese strukturelle Ähnlichkeit ist wahrscheinlich die Ursache dafür, daß gegen CCA und somit gegen poly-Le^X gerichtete Antikörper - wie bereits oben angesprochen - eine Komplement-abhängige Lyse von Granulocyten induzieren [320].

CAA ist stark negativ geladen und konnte im Glomerulus, im Urin, sowie in den Kupferzellen der Leber infizierter Wirte nachgewiesen werden [56].

1.6.6 Eiantigene und Granulombildung

Pro Tag werden von einem *S. mansoni* Wurm-pärchen zwischen 100 und 800 Eier abgegeben [3,337]. Bei der *S. mansoni*-Infektion kommt es zu einer zellulären und zu einer humoralen Immunantwort gegen die adulten Würmer sowie gegen die produzierten Eier. Der Titer der gegen Schistosomen gerichteten Antikörper steigt mit dem Beginn der Eiablage an [103,338-340]. Viele der Kohlenhydrat-Eiantigene, gegen die eine humorale Immunantwort stattfindet, sind *S. mansoni* und *S. haematobium* gemeinsam [113,213,341,342].

Die von adulten Würmern abgegebenen Eier können unterschiedliche Schicksale erfahren: Sie können an venösen Blutgefäßwänden hängenbleiben und die Bildung eines kleinen Blutthrombus hervorrufen, der langsam von Fibroblasten infiltriert und von Endothelzellen überwachsen wird [343]. Welche biochemischen Prozesse bei der Wechselwirkung der Eier mit dem Endothel ablaufen, ist kaum verstanden. Ein Teil der Eier haftet der Gefäßwand an, wird dann aus dem Gefäß ausgestoßen und von einem Granulom umgeben. Wenn sich das Granulom in den Darm bzw. die Blase eröffnet und so die Darm- bzw. Blasenwand durchdrungen ist, wird das Ei mit Stuhl bzw. Urin ausgeschieden. Wichtig für diese Wanderung der *S. mansoni* Eier aus den Mesenterien in den Darm ist eine Immunantwort des Wirtes. Je stärker die Immunantwort supprimiert wird, desto schlechter laufen die Ausstoßung des Eies aus dem Blutgefäß und der Transport durch Gewebe und Darmwand ab [344]. Die Parasiten scheinen also das Immunsystem des Wirtes dafür auszunutzen, ihren Lebenszyklus zu schließen [314,345]. Es konnte aber gezeigt werden, daß Blutplättchen durch Eier zur Aggregation angeregt werden [346]. Die Blutplättchen scheinen dann beim Transport der Eier eine Rolle zu spielen [346-348]. Eine Inaktivierung von Blutplättchen durch anti-Blutplättchen Kaninchen Hyperimmunseren oder durch Medikamente vermindert die Zahl der Eier, die es schaffen, in den Stuhl zu gelangen, erheblich [346]. Viele Eier bleiben auf der Wanderung zwischen Blutgefäß und Blasen-bzw. Darmlumen stecken oder adhären nicht an die Blutgefäßwand und werden mit dem Blutstrom in die Leber oder in andere Organe transportiert.

Wenn ein Ei nicht an die Blutgefäßwand adhärert, kann es in die Leber geschwemmt werden. Eier, die in der Leber oder in anderen Geweben steckenbleiben, induzieren eine Granulombildung, die zum Großteil eine zellvermittelte Immunantwort auf sekretierte Eiantigene, unter anderem Glykoproteine, darstellt [349,350]. Die Eisekrete werden zum Teil durch das sich entwickelnde Miracidium hergestellt und treten durch Mikroporen in der Eischale aus [351,352]. Mit dem Einsetzen der Eiablage kommt es in

der Maus zur gesteigerten Produktion von Th2 Cytokinen [353]. Hierzu paßt die Beobachtung, daß lösliche Eiantigene basophile Zellen gesunder Donoren zur Produktion von Histamin und IL-4 anregen und so wahrscheinlich zum Wechsel von Th1 nach Th2 beitragen [354]. Weiterhin wurde gezeigt, daß TNF α eine wichtige Rolle bei der Bildung von Granulomen spielt [355,356]. Ein Protease-sensitiver, aber Periodat-resistenter Bestandteil des löslichen Eiantigens stimuliert die Proliferation von Endothelzellen *in vitro* und könnte auch die Neovaskularisierung der Leber fördern [357]. Durch die Poren in der Eischale treten nicht nur Parasitenproteine aus, sondern auch Wirtsproteine ein. L-Selektin wird in den Zellen, die ein Ei-Granulom umgeben, gefunden, aber überraschenderweise auch innerhalb der Eischale an der Oberfläche des Miracidiums [358]. Durch sulfatiertes Le^X, nicht aber durch Le^X selbst konnte L-Selektin von der Miracidienoberfläche abgelöst werden [358]. Dies steht in Einklang mit Bindungsstudien, laut denen L-Selektine an sulfatiertes oder sialyliertes, nicht aber an unsubstituiertes Le^X binden [359,360]. Die Granulom-Bildung in der Leber wird durch CCA und CAA gefördert [361], was zu der Beobachtung paßt, daß präpatente *S. mansoni* Infektionen die Granulombildung fördern [362,363].

1.6.7 Das 128C3/3-Epitop

Der monoklonale Antikörper 128C3/3 wurde nach Immunisierung mit Cercarienantigenen hergestellt [364]. Seren von infizierten Menschen und Mäusen enthalten große Mengen von Antikörpern, die eine ähnliche Epitopspezifität aufweisen [212,213]. Dieser monoklonale Antikörper bindet an Strukturen der Cercarien-Glykokalyx, an das Tegument von Schistosomula und an die Oberfläche von Miracidien. [114]. Bei der Inkubation mit Cercarien führt dieser Antikörper zur Bildung einer Hyalinscheide um Körper und Schwanz der Cercarien [216]. Diese Hülle löst sich mit der Zeit von den Cercarien ab, ein Effekt, der auch durch Infektionsserum ausgelöst und als Cercarien-Hüllreaktion bezeichnet wird [216]. Werden die Cercarien fixiert, so bindet 128C3/3 gleichmäßig an die ganze Cercarienoberfläche [216]. Dieser Antikörper bindet auch an 3 Stunden alte Schistosomula. Bei erwachsenen Schistosomen werden keine Oberflächenkomponenten erkannt, sondern bei Männchen und Weibchen das verzweigte exkretorische System sowie Teile des Nervensystems, vorrangig cytoplasmatische Ausläufer, markiert, die in den Tuberkeln enden [216]. Zwei Antikörper aus der Arbeitsgruppe von A. M. Deelder, Universität Leiden, scheinen eine vergleichbare Spezifität zu haben und zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster im Adultwurm und in Cercarien [365]. Antigene, die von diesem monoklonalen Antikörper erkannt werden, kommen im Serum von Schistosomiasis-Patienten vor und lassen sich für diagnostische Zwecke nutzen [61,62].

1.6.8 Das E1-Epitop

Der monoklonale Antikörper E1 erkennt ein Epitop, das auf den Cercarien-Schwänzen sowie an der Oberfläche von *S. mansoni* Schistosomula nach der Transformation 96 Stunden lang vorkommt [112]. E1 bindet auch an Oberflächenkomponenten von *S. japonicum* und *S. haematobium* Schistosomula und von Cercarienschwänzen. Das E1-Epitop ist damit nicht artspezifisch. E1 tötet *in vitro* Schistosomula ab und verleiht bei passivem Transfer Mäusen Immunität [112].

1.6.9 Mit KLH kreuzreagierende Antigene

Das auf dem 38 kDa großen Oberflächenprotein von *S. mansoni* Schistosomula vorhandene Kohlenhydratepitop, das vom monoklonalen Antikörper IPLSm1 (Ratte) IgG2a erkannt wird [273,366], kommt mit leicht variierendem Molekulargewicht in verschiedenen Stadien des Parasiten vor [108,273,308,322]. Dieser Antikörper kreuzreagiert mit dem Hämocyanin der Meeresschnecke *Megathura crenulata* (keyhole limpet haemocyanin, KLH). Die Kreuzreaktivität beruht auf Kohlenhydratepitopen [322], die nicht nur auf dem Hämocyanin der Schnecke *M. crenulata*, sondern auch auf den Hämocyaninen der Schnecken *Lymnaea stagnalis* (Zwischenwirt von *Trichobilharzia ocellata*), *Bulinus truncatus* (Zwischenwirt von *S. haematobium*) und bei *Lymnaea limosa* vorkommen [318]. Am Hämocyanin gebundene Glykane wurden für mehreren Molluskenarten strukturell aufgeklärt [367-372]. Welche von diesen Strukturen die kreuzreagierenden Epitope darstellen, ist nicht klar. Weiterhin scheint eine Kreuzreaktivität zwischen *Trichinella spiralis*, KLH und Schistosomen zu bestehen [373]. Antikörper und Lektine, die das T-Antigen erkennen, reagieren auch mit KLH [374], und beim Hämocyanin der Schnecke *L. stagnalis* konnte die T-Antigen-Struktur Gal β 3GalNAc auf N-Glykanen nachgewiesen werden [369]. Eine starke Immunantwort gegen das 38 kDa Schistosomula Oberflächenantigen wurde in Mäusen und Menschen nachgewiesen [115,375]. Antikörper gegen KLH vermitteln eine Eosinophilen-abhängige Cytotoxizität, sowie bei passiver Übertragung eine Immunität gegen *S. mansoni* Infektion [322].

Verschiedene monoklonale Antikörper, die von Dr. Quentin Bickle (London School of Hygiene and Tropical Medicine) hergestellt wurden, erkennen ebenfalls ein 38 kDa Oberflächenantigen von Schistosomula [376] und scheinen damit die gleiche Spezifität wie der IgG2a monoklonale Maus-Antikörper IPLSm1 aus der Gruppe von André Capron (Institut Pasteur, Lille Cedex, Frankreich) zu haben [273,366].

1.7 Problemstellung

Die Glykolipide von *Schistosoma mansoni* sind einzigartig in ihrer Struktur und Antigenität. Ein möglicher Ansatz der Chemotherapie von Schistosomiasis wäre es deshalb, die Synthese dieser Kohlenhydratepitope zu hemmen. Die Schistosomen-spezifischen Glykolipid-Antigene bieten sich aber auch für eine mögliche Immunisierung an. Weiterhin haben *S. mansoni* Glykolipid-Antigene, wie bereits gezeigt werden konnte, ein Potential für die Serodiagnose [77]. Voraussetzung für diese verschiedenen Anwendungen von *S. mansoni* Glykolipid-Antigenen ist jedoch eine detaillierte strukturelle und immunologische Charakterisierung. Die wichtigsten Epitope der antigenen Glykolipide sollen identifiziert und die Glykolipide auf ihre stadienspezifische Expression hin untersucht werden. Insbesondere die Glykolipide von Cercarien, die sich stark von den bereits charakterisierten Ei-Glykolipiden unterscheiden, sollen detailliert analysiert werden. Hierfür soll das Gemisch an verschiedenen Kohlenhydrat-Strukturen aufgetrennt und die resultierenden Einzelkomponenten strukturell aufgeklärt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

Für die HPLC wurden die LKB HPLC-Pumpen 2150 und 2249 (Pharmacia, Freiburg i. Br.), der Rheodyne-Injektor 7161, sowie das Gynkotek Fluoreszenz-Durchflußphotometer RF 1001 verwendet. Die HPLC-Säulen wurden mit einem Füllgerät (Shandon, Frankfurt) gepackt. Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in *p. a.*-Qualität von der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Das verwendete Wasser wurde mit der Filtrieranlage "Milli-Q Ultra-pure water system" (Millipore, Eschborn) aufbereitet. Die verwendeten Gase Stickstoff, Helium und Argon (Linde, Höllriegelskreuth) hatten den Reinheitsgrad 4.6.

2.2 Extraktion und Reinigung der Glykolipide von *S. mansoni*

2.2.1 Gewinnung der unterschiedlichen Schistosomen-Stadien

Für die Extraktion von Glykolipiden wurden von *S. mansoni* (Puertoricanischer Stamm) die drei Stadien Cercarien, adulte Würmer und Eier verwendet. Das für die Arbeit verwendete Ausgangsmaterial wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit von Dr. M. J. Doenhoff, School of Biological Sciences, University of North Wales, Bangor, UK, bereitgestellt. Alternativ wurden von Prof. Dr. Fouad Yousif (Schistosome Biological Supply Program, Theodor Bilharz Research Institute, Guiza, Ägypten) lyophilisierte *S. mansoni* Adultwürmer bezogen, die aus Hamstern gewonnen wurden. Der *S. mansoni* Lebenszyklus wurde mittels Passage durch beliebig gekreuzte Mäuse und *Biomphalaria glabrata* Schnecken aufrechterhalten. Erwachsene Mäuse wurden über die Haut infiziert, indem die Cercarien in einigen 100 µl Wasser auf den rasierten Bauch der Mäuse gegeben wurden [377]. Adulte *S. mansoni* Würmer, Puertoricanischer Stamm, wurden aus Labormäusen durch Perfusion gewonnen [378]. Die Würmer wurden in Perfusionsflüssigkeit gewaschen, um Erythrozyten zu entfernen. Dann wurden sie mit deionisiertem Wasser gewaschen und lyophilisiert [378]. Cercarien wurden in großen Mengen aus mit *S. mansoni* infizierten patenten *B. glabrata* Schnecken durch Licht- und Wärmereiz gewonnen und lyophilisiert [379]. *S. mansoni* Eier wurden aus den präparierten Lebern infizierter Mäuse durch Trypsinabbau des Lebergewebes und anschließende Filtration gewonnen und dann lyophilisiert; die Mäuse wurden 2 Tage vor der Eigewinnung mit 2.5 mg Hydrocortison pro Maus behandelt [379].

2.2.2 Extraktion der Lipide

Lyophilisiertes *S. mansoni* Ausgangsmaterial, d. h. adulte Würmer, Cercarien oder aus Mäuselebern isolierte Eier, wurde bis zur Extraktion bei -20°C gelagert. Das Ausgangsmaterial wurde für die Extraktion je nach Ansatzgröße in Pyrexröhrchen oder metallene GSA-Rotorbecher gegeben. Pro Parasitenmaterial von 1 g Trockengewicht

wurden etwa 10 ml Wasser zugesetzt. Der Ansatz wurde 1 min geschüttelt, anschließend wurde das zehnfache Volumen an Methanol zugegeben, der Ansatz wurde ein zweites Mal 1 min geschüttelt. Nach Zugabe des gleichen Volumens an Chloroform wurde der Ansatz ein drittes Mal 1 min geschüttelt.

Das durch die aufeinanderfolgende Zugabe der unterschiedlichen Lösungsmittel in Chloroform/Methanol/Wasser (CMW; 10:10:1, v/v/v) suspendierte Parasiten-Material wurde 15 min mit Ultraschall (Zell-Homogenisator B15, Microspitze; Branson, Danbury, USA.) behandelt und hierbei im Eisbad gekühlt. Sowohl adulte Würmer als auch Cercarien und Eier wurden durch die Ultraschallbehandlung in eine homogene Suspension überführt. Die Suspension wurde unter gelegentlichem Schütteln 30 min in einem Wasserbad bei 50°C inkubiert. Durch eine 10minütige Zentrifugation bei 4000 g (Labofuge I, Heraeus) wurden die unlöslichen Rückstände sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment wurde beim zweiten Extraktionsschritt im zwanzigfachen Volumen an CMW (10:10:1, v/v/v) resuspendiert, wie oben mit Ultraschall behandelt, 30 min bei 50°C inkubiert und 10 min bei 4000 g zentrifugiert. Beim dritten Extraktionsschritt wurde das zwanzigfache Volumen an Isopropanol/n-Hexan/Wasser (IHW; 55:20:25, v/v/v; untere Phase) verwendet, ansonsten wurde wie beim zweiten Extraktionsschritt vorgegangen. Beim vierten Extraktionsschritt wurde das gleiche Volumen an Sol-B (CMW 30:60:8, v/v/v, wäßriger Anteil 0.8 M Natriumacetat-Lösung) zugegeben. Nach der Ultraschallbehandlung wurde der Ansatz über Nacht bei 4°C gelagert und anschließend zentrifugiert. Die Überstände der vier Extraktionsschritte wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer (Rotavapor, Büchi) zur Trockne eingengt.

2.2.3 Verseifung des Rohextraktes

Die Lipide wurden in 90 ml Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von 10 ml 1 M Natriumhydroxid (suprapurum, Merck) in Methanol wurde der Ansatz kurz mit Ultraschall behandelt und dann 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert gemessen, der auch zum Ende der Verseifung noch über dem Wert von 12 liegen sollte. Der Ansatz wurde dann mit 96%iger Essigsäure auf pH 5-7 gebracht und anschließend durch Reverse-phase-Chromatographie entsalzt.

2.2.4 Reverse-phase-Chromatographie

Für die Entsatzung kleinerer Lipidmengen wurden Chromabond C18_{ec} Kartuschen (Macherey & Nagel, Düren) mit 100 oder 500 mg Säulenmaterial verwendet, für die Entsatzung größerer Lipidmengen wurde mit Reverse-phase-Material (RP-Material RC18_{ec}; Macherey & Nagel) eine Säule selbst gepackt.

Vorbereitung der Säule:

Pro 1g Lipid wurden mindestens 100 g RP-Material verwendet (Lipidbindekapazität 1-2 g/100 g RP-Material). Für die Packung wurde das RP-Material in Methanol aufgeschlemmt und in eine Glassäule gegeben. Sowohl die gepackten Säulen als auch die Kartuschen wurden wie folgt gewaschen: 10 Säulenvolumen Methanol, 10 Säulenvolumen CM (2:1, v/v), 10 Säulenvolumen Methanol, 10 Säulenvolumen CM (2:1, v/v) und 10 Säulenvolumen Methanol.

Vorbereitung der Probe für die Entsatzung:

Der Ansatz wurde für die Entsatzung mit TUP (theoretical upper phase; CMW; 3:98:74, v/v/v; ca. 2 Säulenvolumen) versetzt und für 10 min mit Ultraschall behandelt. Durch eine 10minütige Zentrifugation bei 2500 g wurden unlösliche Bestandteile sedimentiert.

Das Sediment wurde ein zweites mal mit TUP versetzt, resuspendiert, 10 min mit Ultraschall behandelt und wiederum 10 min bei 2500 g zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt.

Auftrag, Waschung und Elution:

Die Säule wurde vor dem Auftragen der Probe mit 5 Säulenvolumen TUP äquilibriert. Direkt im Anschluß wurde die in TUP gelöste Probe aufgegeben. Der Durchlauf wurde ein zweites Mal über die Säule gegeben. Dann wurde die Säule mit mindestens zehn Säulenvolumen Wasser gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 Säulenvolumen Methanol und in einem zweiten Elutionsschritt mit 10 Säulenvolumen CM (2:1, v/v). Die Eluate wurden in einem Glasgefäß aufgefangen, im Rotationsverdampfer oder im N₂-Strom bei jeweils 37°C eingengt und bei 4°C gelagert.

2.2.5 Anionenaustauschchromatographie

2.2.5.1 Schwacher Anionenaustauscher

Für die Chromatographie an einem schwachen Anionenaustauscher wurde DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia) in der Acetat-Form eingesetzt [201,380]. Der Glykolipid-Extrakt wurde in CMW (30:60:8, v/v/v; Sol-A) aufgenommen und auf eine Säule (0.8x5 cm) gegeben, die mit DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Freiburg; OH-Form) gepackt und mit demselben Laufmittel äquilibriert war. Die Säule wurde erst mit 10 Säulenvolumen desselben Laufmittels (neutrale Fraktion), dann mit 10 Säulenvolumen CMW (30:60:8, v/v/v, 0.8 M Natriumacetat in Wasseranteil; Sol-B) eluiert (saure Fraktion). Die Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingengt, die geladene Fraktion wurde entsalzt (2.2.4), und die Fraktionen wurden durch HPTLC-Immunfärbung analysiert

2.2.5.2 Starker Anionenaustauscher

Um weitere anionische Verunreinigungen abzutrennen, wurden die neutralen Glykolipide durch QAE-Sephadex-Chromatographie gereinigt [381]. Nach der Entsalzung wurde der Glykolipid-Extrakt in CMW (30:60:8, v/v/v; Sol-A) aufgenommen und auf eine QAE-Sephadex-Säule (0.8x5 cm) aufgegeben, die mit Sol-A äquilibriert war. Die Säule wurde erst mit 10 Säulenvolumen Sol-A, dann mit 2 Säulenvolumen Methanol eluiert. Die beiden Eluate wurden vereinigt und als neutrale Fraktion bezeichnet. Weiter wurde mit 5 Säulenvolumen 0.45 M Ammoniumacetat in Methanol eluiert (geladene Fraktion). Die Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingengt, die geladene Fraktion wurde entsalzt (2.2.4), und die Fraktionen wurden durch HPTLC-Immunfärbung analysiert.

2.2.6 Kieselgel-Chromatographie

Bei der Kieselgel-Chromatographie trennen sich Glykolipide nach ihrer Polarität. In der Regel wurden Kieselgel-Kartuschen verwendet. Wo die Trennleistung der Kartuschen nicht ausreichte, kam eine Iatrobeds-HPLC-Säule zum Einsatz.

2.2.6.1 Normalphase-Chromatographie an Kieselgelkartuschen

Die Kieselgelkartusche (1 g SepPak-Kartuschen; Waters, Milford, MA, USA) wurde mit 10 ml Chloroform äquilibriert, die Probe wurde in 5 ml Chloroform oder in CM

(98:2, v/v) aufgenommen und aufgegeben. Es wurde stufenweise mit jeweils 20 ml eluiert, erst mit CM, dann mit CMW zunehmender Polarität.

Fraktion	Lösungsmittel	Mischungs- verhältnis (v/v)	Fraktion	Lösungsmittel	Mischungs- verhältnis (v/v)
1	CM	100:0	10	CM	60:40
2	CM	98:02	11	CM	55:45
3	CM	95:05	12	CM	50:50
4	CM	90:10	13	CM	40:60
5	CM	85:15	14	CMW	65:25:4
6	CM	80:20	15	CMW	60:35:8
7	CM	75:25	16	CMW	30:60:8
8	CM	70:30	17	CMW	10:70:20
9	CM	65:35			

Tab. 1 Elutionsschritte an einer Kieselgelkartusche zur Fraktionierung von Lipiden

2.2.6.2 Normalphase-Chromatographie mit einer Iatrobeds-Säule (HPLC)

Zur präparativen Trennung von Glykolipiden, die sich durch Normalphase-Chromatographie an einer Kieselgel-Kartusche nicht vollständig trennen ließen, wurde eine Kieselgel-HPLC-Säule verwendet (0.46x50 cm, Vorsäule 0.46x10 cm, Partikelgröße 10 µm, Macherey & Nagel; [382]). Für die Trennung der kleinen, neutralen Glykolipide und der komplexen Glykolipide von *S. mansoni* wurden unterschiedliche Chromatographiebedingungen gewählt. Nach der Trennung wurden die einzelnen Fraktionen mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Iod- und Orcinolfärbung oder Immunfärbung sowie durch MALDI-TOF-MS analysiert, einander entsprechende Fraktionen wurden vereinigt.

2.2.6.2.1 Trennung kleiner, neutraler Glykolipide von *S. mansoni*

Als Laufmittel A wurde Chloroform, als Laufmittel B Methanol eingesetzt. Die Chromatographie wurde bei 37°C und bei einem Fluß von 1 ml/min durchgeführt. Die Fraktionsgröße betrug 2 ml. Folgender Gradient wurde verwendet:

t/min	0	15	75	95	105
%B	2	2	38	100	100

Tab. 2 Gradient zur Trennung kleiner, neutraler Glykolipide

2.2.6.2.2 Trennung komplexer Glykolipide von *S. mansoni*:

Als Laufmittel A wurde IHW (55:44:1, v/v/v), als Laufmittel B IHW (55:20:25, v/v/v, untere Phase) eingesetzt. Die Chromatographie wurde bei 37°C und einem Fluß von 1 ml/min durchgeführt. Die Fraktionsgröße betrug 2 ml. Folgender Gradient wurde verwendet:

t/min	0	10	80	85	100
%B	0	20	45	100	100

Tab. 3 Gradient zur Trennung komplexer Glykolipide

2.2.7 Florisil-Chromatographie

Neutrale Glykolipide wurden über Nacht über P_2O_5 getrocknet und zur Peracetylierung mit 2 ml Pyridin (Roth) und 1 ml Essigsäurehydrid (Sigma) über Nacht bei RT unter Argon im Dunkeln inkubiert. Die Lösungsmitteln wurden entweder im Stickstoffstrom abgeblasen oder nach Zugabe von 5 ml Toluol (Roth) im Vakuum bei 37°C abrotiert. Der Rückstand wurde über P_2O_5 getrocknet.

Für die Florisil-Chromatographie [383] wurden 3 g Florisil (Merck) in 20 ml 1,2-Dichlorethan (DCE)/n-Hexan (4:1, v/v) aufgeschwemmt. Dann wurde ein Säulenrohr (8x100 mm) gepackt, die Säule wurde mit 50 ml DCE/n-Hexan (4:1, v/v) gespült. Die peracetylierten Glykolipide wurden in 2 ml DCE/n-Hexan (4:1, v/v) aufgenommen und aufgegeben und in mehreren Stufen eluiert. Die Fraktionen wurden abrotiert und über P_2O_5 getrocknet. Zur Deacetylierung wurden die Fraktionen in 1.8 ml Methanol aufgenommen, mit 200 µl 30%igem Natriummethylat (Merck) versetzt und 3 h bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 10%iger Essigsäure in Methanol wurde der Ansatz neutralisiert. Die Lösungsmittel wurden abrotiert, und die Proben wurden entsalzt (2.2.4) und durch HPTLC-Immunfärbung (2.2.8; 2.3.2) auf Glykolipide getestet, wobei Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin (alle von Sigma) als Standards verwendet wurden.

Fraktion	Lösungsmittel	Mischungsverhältnis (v/v)
F I	DCE/n-Hexan	4:1
F II	DCE/n-Hexan	1:1
F III	DCE	
F IV	DCE/Aceton	1:1
F V	DCE/Methanol	1:1
F VI	DCE/Methanol	1:2
F VII	DCE/Methanol	2:8
F VIII	DCE/Methanol/Wasser	2:8:1

Tab. 4 Adsorptionschromatographie an Florisil

2.2.8 Auftrennung von Glykolipid-Fractionen durch HPTLC

Für chemische und immunologische Anfärbungen wurden die Lipidfraktionen zuvor durch Dünnschichtchromatographie getrennt [202,384,385]. Auf einer HPTLC-Platte (10x20 cm, Merck) wurden für den Probenauftrag 5 mm breite Striche mit einem Bleistift markiert. Um Randeffekte zu vermeiden, waren die äußersten Spuren mindestens 15 mm vom seitlichen Plattenrand entfernt. Vom unteren Plattenrand wurde ein Abstand von 15 mm eingehalten. Die Lipidproben wurden in CMW (10:10:1, v/v/v) aufgenommen und kurz mit Ultraschall behandelt. Die Glykolipide wurden in einem Volumen von 1 bis 10 µl gleichmäßig mit einer Microliterspritze (Hamilton) im warmen Luftstrom aufgegeben.

Zur Entwicklung wurde ein automatisches Entwicklungsgerät (DC-MAT; Baron, Reichenau) verwendet. In den Laufmittelbehälter wurden 24 ml des gewählten Laufmittels gegeben. Für die Konditionierung wurde ein in der Laufkammer eingesetztes Filterpapier mit 8 ml Laufmittel getränkt. Das Gerät wurde so programmiert, daß nach einer 10minütigen Konditionierungszeit der Lauf gestartet wurde. Sobald die Lauffront 10 mm unterhalb der Plattenoberkante angelangt war, wurde die Platte vom DC-MAT automatisch aus dem Laufmitteltank herausgehoben und 10 min

durch ein Gebläse getrocknet. Die Detektion der Glykolipide erfolgte durch chemische (2.3.1) oder immunologische (2.3.2) Färbung.

2.3 Färbe- und Detektionsmethoden

2.3.1 Chemische Färbemethoden für die Dünnschichtchromatographie

Iodfärbung zur Detektion von Lipiden:

Durch Inkubation der DC-Platte für 30 min bis zu 16 h bei RT in einer mit Iod gesättigten Atmosphäre ließen sich Lipide zerstörungsfrei durch Gelb- bzw. Braunfärbung nachweisen. Die Detektionsgrenze lag bei etwa 1 µg. Die Färbung war reversibel, nach der Dokumentation ließ sich das Iod leicht im warmen Luftstrom wieder entfernen. Die DC-Platte konnte nun einer anderen Färbeprozedur unterzogen werden.

Orcinolfärbung zur Detektion von Kohlenhydraten:

Freie Kohlenhydrate sowie Glykokonjugate ließen sich durch die Orcinolfärbung anhand ihrer blauviolettten Färbung nachweisen. Die Detektionsgrenze lag bei etwa 200 ng. Die entwickelte DC-Platte wurde mit einer Lösung von Orcinol (Sigma) in 2 M Schwefelsäure (0.2 g Orcinol/100 ml 2 M H₂SO₄) angesprüht, bis die Platte völlig benetzt war. Die Platte wurde dann 5 bis 15 min auf 110°C erhitzt, bis die zuckerspezifische blauviolette Färbung sichtbar wurde. Die Dünnschichtplatten wurden photographisch dokumentiert und bei -20°C gelagert.

Ninhydrinfärbung zum Nachweis primärer Aminogruppen:

Die Dünnschichtplatte wurde mit einer 3%igen Lösung von Ninhydrin in n-Butanol/3 % Eisessig besprüht und bei 110°C für 30 s bis 5 min inkubiert. Primäre Aminogruppen wurden dabei durch eine violette Färbung nachgewiesen.

Molybdatfärbung zum Nachweis von organisch gebundenem Phosphat:

Zur Herstellung des Färbereagenzes nach Dittmer und Lester wurden 2 g MoO₃ (Sigma) in 50 ml rauchender Schwefelsäure (25 N H₂SO₄) gelöst (=Lösung A). Lösung B enthielt 0.178 g Mo (Sigma) in 25 ml Lösung A. Erst wurden zu 50 ml Lösung A 25 ml Lösung B dazugegeben. Dann wurden im Eisbad langsam unter Rühren 100 ml Wasser zugegeben. Mit dem nun fertigen Sprühreagenz wurde die Dünnschichtplatte aus etwa 50 cm Entfernung mit einer fein zerstäubenden Düse schwach angesprüht. Nach 2-10 min Inkubation bei RT zeichneten sich phosphathaltige Komponenten durch eine Blaufärbung gegen den weißen Plattenhintergrund ab. Die Färbung ist nur für etwa 2 h haltbar.

2.3.2 Immunologische Färbung auf der Dünnschichtplatte

PBS: 100 mM NaH₂PO₄
150 mM NaCl, pH 7.2, mit NaOH eingestellt

PBST: 0,5 % Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat; Sigma) in PBS (v/v)

Dünnschichtchromatographisch getrennte Glykolipide lassen sich durch Antikörper detektieren [386,387]. Die entwickelte Dünnschichtplatte wurde 5 min im Warmluftstrom getrocknet und dann 60 s in eine 0.5%ige Polyisobutylmethacrylat-Lösung (Plexigum P28; Aldrich) in n-Hexan/Chloroform (9:1) getaucht. Die Dünnschichtplatte

wurde mindestens 2 min im Warmluftstrom getrocknet, und die Beschichtung mit Polyisobutylmethacrylat wurde wiederholt, anschließend wurde die Dünnschichtplatte 10 min im Warmluftstrom getrocknet. Das Kieselgel war durch die hydrophobe Beschichtung stabilisiert und konnte nun in wäßrigen Lösungen eingetaucht werden, ohne daß es sich vom Träger ablöste.

Die Dünnschichtplatte wurde in PBST/2%BSA mindestens 1 h bei RT eingetaucht, wodurch unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden. Die Dünnschichtplatte wurde dann mit einigen Millilitern des in PBST/2%BSA verdünnten Erstantikörpers überschichtet und 2 h bei RT inkubiert. Sowohl die Blockierlösung als auch die Erstantikörperlösung wurden nach Zugabe von 1/1000 Volumen einer 20%igen Natriumazidlösung bei 4°C einige Wochen gelagert und in dieser Zeit mehrmals verwendet. Zur Entfernung von nicht gebundenem Erstantikörper wurde die Dünnschichtplatte 6 mal mit 10 ml PBST gewaschen. Anschließend wurde die Dünnschichtplatte mit einer Lösung des an Peroxidase- oder alkalische Phosphatase gekoppelten Zweitantikörpers (1:1000; v/v) in PBST/2%BSA überschichtet und 2 h bei RT inkubiert. Dann wurde eine der folgenden Färbungen durchgeführt:

2.3.2.1 Färbung bei Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper

2.3.2.1.1 Färbung mit dem Substrat *N,N'*-Diethyl-*p*-phenylendiamin

Die mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper überschichtete Dünnschichtplatte wurde 2 mal mit PBS und 1 mal mit Citratpuffer gewaschen. Dann wurde die Dünnschichtplatte mit DEPDA-Färbelösung (*N,N'*-Diethyl-*p*-phenylendiamin) überschichtet [388]. Innerhalb von 5-60min färbten sich die Glykolipidbanden durch den produzierten unlöslichen Farbstoff blau. Die Färbung wurde gestoppt, indem die Dünnschichtplatte mehrmals mit Leitungswasser gewaschen wurde.

Citratpuffer	100 mM Natriumcitrat, pH 6 (21.14 g/l Citronensäure-Monohydrat, mit NaOH titriert)
DEPDA-Färbelösung	10 ml Citratpuffer 240 µl DEPDA-Stammlösung 8 µl H ₂ O ₂ (30% ig; Perhydrol; Merck)
DEPDA-Stammlösung	97.5 mg 4-Chloro-1-naphthol (Sigma) 60 mg DEPDA (<i>N,N'</i> -Diethyl- <i>p</i> -phenylendiamin; Sigma) 9 ml Acetonitril 1 ml Methanol, bei -20°C gelagert

2.3.2.1.2 Färbung mit dem Substrat 3,3'-Diaminobenzidin

Die mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper überschichtete Dünnschichtplatte wurde 3 mal mit PBS gewaschen und dann mit DAB-Färbelösung (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) überschichtet. Innerhalb von 5 bis 60 min färbten sich die Banden durch Bildung eines unlöslichen Farbstoffs rotbraun.

DAB-Färbelösung	20 ml PBS 100 µl NiCl ₂ -Lösung 400 µl DAB-Stammlösung 6 µl H ₂ O ₂ (30% ig)
NiCl ₂ -Lösung	800 mg NiCl ₂ ·6H ₂ O in 10 ml Wasser; bei -20°C gelagert
DAB-Stammlösung	400 mg 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in 10 ml Wasser; bei -20°C gelagert

2.3.2.2 Färbung bei Alkalischer-Phosphatase-gekoppeltem Zweitantikörper

Nach dem Absaugen des überschüssigen Zweitantikörpers wurde die Dünnschichtplatte zweimal mit PBST und anschließend zweimal mit auf 37°C vorgewärmtem Glycinpuffer gewaschen. Durch die Waschschrte mit Glycinpuffer sollte Phosphat entfernt werden, das die Alkalische Phosphatase inhibiert. Zur Färbung wurde die Dünnschichtplatte mit 0.1% BCIP (w/v; 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, Toluidin-Salz; Biomol, Hamburg) und 0.05% NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid; Sigma) in Glycinpuffer überschichtet. Innerhalb von 5 min bis 3 h erschien eine violette, stabile Färbung. Zur Beendigung der Färbung wurde mehrmals mit Leitungswasser gewaschen. Mit Filterpapier wurden Pufferreste von der Platte abgesaugt, die Platte trocknete dann bei RT [385,389].

Glycinpuffer	0.1 M Glycin
	1 mM ZnCl ₂
	1 mM MgCl ₂ , pH 10.4 mit NaOH

2.3.2.3 Periodat-Spaltung

Periodat zerstört selektiv Kohlenhydrate, indem es zwischen zwei vicinalen Hydroxylgruppen die Kohlenstoffkette oxidativ spaltet und so Aldehydgruppen generiert [386]. Nach dünn-schichtchromatographischer Trennung wurde die getrocknete HPTLC-Platte mit Polymethylacrylat beschichtet (2.3.2), wieder getrocknet und dann 10 min in 100 mM Natriumacetat-Lösung, pH 5.5 inkubiert. Die Periodat-Oxidation erfolgte durch Inkubation mit 100 mM Natriumacetat-Lösung, pH 5.5, die 20 mM an Natrium-Metaperiodat war (Merck; frisch ansetzen), 1 h bei 37°C im Dunkeln. Anschließend wurde die HPTLC-Platte viermal mit je 10 ml Natriumacetat-Lösung, pH 5.5, gewaschen und für die HPTLC-Immunfärbung eingesetzt (2.3.2).

2.3.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Für ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) wurden Glykolipide bzw. Neoglykolipide (gelöst in CMW; 10:10:1, v/v/v) mit n-Propanol auf etwa 40 pg/μl bzw. 1 ng/μl verdünnt, so daß in der verdünnten Glykolipidlösung nicht mehr als 5 % Chloroform vorhanden waren. In der Regel wurden von diesen Verdünnungen jeweils 20 μl pro Vertiefung auf eine 96-Well Polysorp ELISA-Platte (Nunc, Wiesbaden) gegeben. Die ELISA-Platte wurde 1 h bei 37°C ohne Deckel inkubiert, um das Lösungsmittel abdampfen zu lassen. Nachdem das Lösungsmittel vollständig abgedampft war (charakterischer Propanolgeruch nicht mehr feststellbar), wurde die Platte wie unten beschrieben gewaschen und blockiert.

An Protein-Antigenen wurden Le^X-BSA (Dextra Laboratories, Reading, UK), KLH (Sigma), sowie SDS-β-Mercaptoethanol-Probenpufferextrakte der verschiedenen Stadien von *S. mansoni* (2.3.6.1) eingesetzt. Die Proteinantigene wurden in Carbonatpuffer verdünnt, pro Vertiefung wurden 100 μl Proteinlösung aufgegeben, die Platte wurde 2 h bei 37°C mit Deckel inkubiert. (Alle im folgenden genannten Volumina beziehen sich auf jeweils einen der maximal 96 Probenansätze.) Anschließend wurde die Flüssigkeit abgenommen und die Platte 4 mal 2 min mit jeweils 250 μl TBS gewaschen. Zum Blockieren wurde die Platte mit 250 μl TBS-B 1 h bei 37°C inkubiert. Die Blockierlösung wurde abgenommen und die Platte 2 mal mit 250 μl TTBS-10 gewaschen.

Es wurden je 100 μl des in TTBS-10B verdünnten 1. Antikörpers zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde die Flüssigkeit abgenommen, und die Platte wurde 5 x 2 min

mit jeweils 250 µl TTBS-10 gewaschen. Der 2. Antikörper (konjugiert an Peroxidase oder alkalische Phosphatase) wurde ebenfalls in TTBS-10B verdünnt, es wurden jeweils 100 µl aufgegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 5 mal je 2 min mit 250 µl TTBS-10 gewaschen.

Carbonatpuffer	0.1 M Na ₂ CO ₃ , pH 9.6 mit HCl
TBS	25 mM TRIS-HCl, pH 7.5; 100 mM NaCl
TBS -B	TBS; 0,5% (w/v) BSA
TTBS-10	TBS 1:10 verdünnt; 0.05% Tween 20
TTBS-10B	TTBS-10; 0.25% BSA

2.3.3.1 Detektion mittels Peroxidase

Zur Färbung wurden 100 µl Substrat-Fertiglösung pro Reaktionsansatz zugegeben (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin; Sigma), es entstand eine blaue Färbung. Nach 5 bis 60 min wurden 100 µl Stopplösung (12.5 % H₂SO₄; 7.0 ml H₂SO₄ konz. ad 100 ml H₂O) zugegeben, wodurch sich die Färbung von blau nach gelb änderte. Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen.

2.3.3.2 Detektion mittels Alkalischer Phosphatase

Zur Färbung wurden 100 µl 0.1% *p*-Nitrophenylphosphat (Biomol) in 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ pro Ansatz zugegeben. Nach 5 bis 60 min wurden 100 µl Stopplösung (10 mM EDTA in Wasser) zugegeben. Die Extinktion wurde bei 410 nm gemessen.

2.3.3.3 Inhibitions-ELISA

Um zu testen, inwieweit zwei Antigene um einen mAb oder die Antikörper eines polyklonalen Serums konkurrieren, und um die Epitopspezifität von mAb und polyklonalen Seren zu definieren, wurde ein Inhibitions-ELISA durchgeführt [390-392]. Hierzu wurde das eine Antigen an die ELISA-Platte adsorbiert. Nach dem Blockierschritt wurde das zweite, lösliche Antigen in je 50 µl TTBS-10B auf die ELISA-Platte gegeben. Anschließend wurde der Erstantikörper in 50 µl TTBS-10B zugegeben. Die weiteren Inkubationsschritte sowie die Färbung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.3.4 Immunhistochemische Färbung *in vitro* transformierter Schistosomula

Für die Transformation von Cercarien zu Schistosomula gibt es verschiedene Methoden [21,393]. Hier wurde die Methode von Clegg und Smithers [394] verwendet: Eine Maus wurde mit CO₂ getötet. Anschließend wurde das Fell am Bauch, an der Brust und dem Seitenbereich abrasiert, die Haut großflächig abgezogen und auf einer Glaspetrischale mit der Fellseite nach unten ausgebreitet. Da die Schistosomula in der Fett- und Bindegewebsschicht nach der Penetration hängen bleiben würden, wurden diese Schichten wie folgt entfernt: Die Spitze einer Pinzette wurde mit chirurgischer Gaze umwickelt, in Perfusionsmedium getränkt, und damit die Gewebsschichten von der Haut heruntergeschabt. Mit Perfusionsmedium wurde die Haut abgespült, um Zellreste zu entfernen.

In ein konisches Glasgefäß wurde 37°C warmes Perfusionsmedium bis zum Rand gefüllt. Darüber wurde die Maushaut gespannt, so daß sich keine Luftblasen darunter

befanden, in die Schistosomula fallen würden. Ein Glaszylinder wurde mit einer Klammer darauf gespannt, so daß die Haut zwischen den beiden Glasteilen wie eine Membran gespannt war. Um die Haut zu reinigen, goß man in den oberen Glaszylinder destilliertes Wasser und zog es wieder ab. Nun wurden Cercarien in einem möglichst kleinen Volumen in den Glaszylinder gegossen. Die Konstruktion wurde in ein 37°C Wasserbad gestellt, so daß der untere Teil mit dem Perfusionsmedium im warmen Wasser stand, während der Zylinder-Teil mit den Cercarien in die Luft herausragte. Die Apparatur wurde dunkel gehalten, damit die Cercarien nicht nach oben in die der Haut abgewandte Richtung schwammen.

Mehrfach wurde im Laufe des Tages das Cercarien-haltige Wasser abgenommen und durch Wasser mit frisch entlassenen Cercarien ersetzt. Um die Schistosomula für den Immunfluoreszenz-Test zu sammeln, wurde der obere Zylinder abgenommen, die Haut verworfen und das Medium unter dem Mikroskop mit einer ausgezogenen Pasteurpipette absaugt. Die Schistosomula wurden für 1 h bei 37°C mit Erstantikörper in Perfusionsmedium inkubiert, anschließend 5 mal mit Perfusionsmedium gewaschen, eine weitere Stunde bei 37°C mit Zweitantikörper (Ziege anti-Maus-IgG, Fluorescein-Konjugat; Dianova, Hamburg) inkubiert, wiederum 5 mal mit Perfusionsmedium gewaschen und dann im Fluoreszenzmikroskop untersucht und fotografiert (Axioskop mit Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 50 und Kameraaufsatz MC 100 Spot; Zeiss, Jena).

Perfusionsmedium: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco, Eggenstein)
0.02 M HEPES (Roth)
0.01 % (v/v) Heparin (Braun, Melsungen),
pH 7.3 mit NaOH eingestellt
5% (v/v) Serum von neugeborenen Kälbern (NCS; Gibco)

2.3.5 Verwendete Antikörper, Seren und Neoglykolipid-Standards

Chronisches Infektionsserum wurde etwa 10 Wochen *p. i.* von 8 Mäusen gewonnen, die mit etwa 30 Cercarien infiziert worden waren (chronic infection sera, CIS1-8). Außerdem wurden Seren von 8 Mäusen, die nur mit männlichen Würmern infiziert waren, eingesetzt (single-sex infection sera, SSIS 1-8). Als Kontrolle dienten Seren von vier nicht-infizierten Mäusen (normal mouse sera, NS 1-4). Die Mäuseseren wurden in der Regel vereinigt.

Der monoklonale Antikörper KCS ist gegen lösliches Eiantigen von *S. mansoni* hergestellt und wurden von Prof. Dr. Andreas Ruppel und Jürgen Schmitt, Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt [141,395]. Die monoklonalen Antikörper E2, C3 und C8 sind gegen lösliches Eiantigen von *S. haematobium* hergestellt und wurden ebenfalls von Jürgen Schmitt, Universität Heidelberg, erhalten. Die monoklonalen Antikörper G8G12 und M2D3H wurden nach Infektion von Mäusen mit *S. mansoni* hergestellt [376,396] und von Dr. Q. Bickle (London School of Hygiene and Tropical Medicine) zur Verfügung gestellt. Der monoklonale Antikörper YZ1, der eine spezifische Core-Struktur von *N*-Glykanen erkennt [397,398], stammte von Prof. Dr. Friedrich Altmann, Universität Wien. Der monoklonale Antikörper 1B2, der *N*-Acetyllactosamin (Typ 2 Kette von *N*-Glykanen; [399-402]) erkennt, sowie der anti-CD15 monoklonale Antikörper 4D1 (IgM, 33mg/ml), der das Le^X-Antigen erkennt, wurden von Dr. Bernhard Kniep, Technische Universität Dresden, erhalten. Der Le^X-spezifische anti-CD15 mAk BRA4F1 stammte von der Firma Biogenex, San Ramon, Ca, USA. Der Phosphocholin-spezifische mAk TEPC 15 wurde von Sigma bezogen.

Die Kaninchen Hyperimmunseren wurden von Dr. M. J. Doenhoff (University of North Wales, Bangor, UK) zur Verfügung gestellt. Die Immunisierung der Kaninchen, die Kontrolle der Antikörperantwort, die Gewinnung der Seren und die Lagerung erfolgte wie beschrieben [403]. Die Antiseren gegen spezifische *S. mansoni* Eiantigene wurde durch die Immunisierung von Kaninchen mit spezifischen Immunpräzipitationsbögen hergestellt, die durch Immunelektrophorese gewonnen wurden und die keine nachweisbaren Verunreinigungen mit anderen Antigenen zeigten. Die Antigene wurden als Emulsion in Freundschem Adjuvans wie beschrieben appliziert [272,404,405]. Eingesetzt wurden anti-Sm480 Hyperimmunseren [405], Hyperimmunseren gegen verschiedene *S. mansoni* Antigene [403,404,406], ein gegen das Hämocyanin der Schnecke *M. crenulata* (KLH) gewonnenes Hyperimmunserum, sowie ein anti-HRP (horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase) Hyperimmunserum (Sigma).

Als Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper wurden anti-Maus Ig des Kaninchens (P0260; Dako Diagnostics, Hamburg) und anti-Kaninchen Ig der Ziege (Sigma) verwendet. Mit alkalischer Phosphatase waren die Zweitantikörper Ziege anti-Maus Ig (D0486; Dako) und Ziege gegen Kaninchen Ig (Sigma) konjugiert.

Die Le^X-Neoglykolipide Le^XD (Dihexadecanoylphosphatidylethanolamin-Neoglykolipid) und Le^XH (Le^X-Hexadecylanilin-Neoglykolipid) wurden von Tobias Bausch (Biochemisches Institut am Klinikum, Universität Giessen) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sie wurden als Standards bei der HPTLC-Immunfärbung und in ELISA-Experimenten verwendet.

2.3.6 Trennung und Färbung von Proteinextrakten

2.3.6.1 Herstellung von Protein-Extrakten

Je 20 mg lyophilisiertes Parasitenmaterial aus adulten Würmern, Schistosomula, Cercarien und Eiern wurde von Dr. M. J. Doenhoff zur Verfügung gestellt (siehe 2.2.1). Die verwendeten Schistosomula waren hier durch *in vitro*-Transformation von Cercarien durch Scherkräfte gewonnen worden [407,408]. Das Material wurde in 2 ml 1x-Probenpuffer (2.3.6.2; enthält β -Mercaptoethanol und SDS) aufgenommen und für 5 min mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier). Die Proben wurden 5 min bei 4 000 g zentrifugiert (Tischzentrifuge; Eppendorf, Hamburg), und die Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; [409]) wurde eine Minigel-Apparatur (Keutz, Reiskirchen) verwendet. Für die Herstellung des Trenngels wurden 4 ml Acrylamid-Stammlösung, 2.5 ml Trenngelpuffer und 3.35 ml Wasser zusammengegeben und 5 min im Ultraschallbad entgast. Dann wurden 100 μ l einer 10%igen SDS-Lösung, 50 μ l Ammoniumperoxodisulfat (AMPS) und 5 μ l *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zugegeben. Das Trenngel (8x6 cm) wurde gegossen, mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet und 1 h stehengelassen. Die Sammelgellösung wurde aus 1.3 ml Acrylamid-Stammlösung, 2.5 ml Sammelgelpuffer und 6.1 ml Wasser hergestellt und ebenfalls 5 min im Ultraschallbad entgast. Die Oberfläche des polymerisierten Trenngels wurde mehrfach mit Wasser und einmal mit Sammelgelpuffer gespült. Die Sammelgellösung wurde mit 100 μ l 10%iger SDS-Lösung, 50 μ l Ammoniumperoxodisulfat (AMPS) und 10 μ l TEMED versetzt. Das Sammelgel wurde gegossen und der Kamm eingesetzt. Das Gel wurde 45 min stehengelassen. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in die

Apparatur eingesetzt, es wurde 1x-Elektrophorese-Laufpuffer zugegeben, und die Probenaschen wurden gespült. Die Proben wurden mit 1/3 Volumen 4x-Probenpuffer versetzt, 5 min im kochenden Wasserbad inkubiert und in die Probenaschen gegeben. Mit aufgetragen wurde ein Molekulargewichtsstandard (low molecular weight; BioRad, München). Für die Elektrophorese wurde 90 min eine Spannung von 100 V angelegt.

Acrylamid-Stammlösung	0.8 g <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid in 100 ml Acrylamid - Lösung, 30%ig (75 ml Acrylamid 40%ig + 25 ml Wasser)
Trenngelpuffer	36.3 g Tris mit Wasser in ca. 80 ml lösen, pH 8.8 mit HCl einstellen, auf 100 ml auffüllen
Sammelgelpuffer	6.0 g Tris mit Wasser in ca. 90 ml lösen, pH 6,8 mit HCl einstellen, auf 100 ml auffüllen
Ammoniumperoxodisulfat-Lösung	10 mg AMPS pro 100 µl Wasser (frisch ansetzen!)
10x-Elektrophorese-Laufpuffer	(ohne SDS) 15 g Tris und 72 g Glycin in 500 ml Wasser lösen
1x-Elektrophorese-Laufpuffer	100 ml 10x-Elektrophorese-Laufpuffer, 10 ml 10%ige SDS-Lösung, mit Wasser auf 1000 ml auffüllen
4x-Probenpuffer für SDS-PAGE	83 µl 3 M Tris/HCl, pH6.8 (Endkonz. 63 mM) 280 µl Glycerin (100%ig; Endverd. 7 %) 33 µl SDS-Lösung (24%ig, Endkonz. 2 %) 40 µl 100 mM Na ₂ EDTA (Endkonz. 1 mM) 12.5 µl Bromphenolblau-Lösung (2%ig) mit Wasser ad 800 µl; gelagert bei -20°C) 200 µl β-Mercaptoethanol frisch zugeben.

2.3.6.3 Coomassie-Färbung

Das Gel wurde für 10 min in Färbelösung und anschließend in Entfärbelösung geschwenkt. Wenn die gewünschte Färbung erreicht war, wurde das Gel für mehrere Stunden gewässert und dann getrocknet.

Entfärbelösung	400 ml Methanol 100 ml Essigsäure 96 % Wasser ad 1000 ml
Färbelösung	0.1% Coomassie-Brilliant Blau (R-250; Serva, Heidelberg) in Färbelösung

2.3.6.4 Blot und Immunfärbung

Die im Gel elektrophoretisch getrennten Proteine wurden mit einer "semi-dry"-Blotapparatur (Keutz, Reiskirchen) auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierzu wurden die Gele 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Folie (Immobilon-P; Millipore) wurde wenige Sekunden in Methanol getaucht, anschließend wurden PVDF-Membran und Filterpapiere (Gel-Blotting-Papier; Schleicher-Schüll, Dassel) ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Auf die Anoden-Graphitplatte wurden drei Filterpapierstücke gelegt, darauf die PVDF-Membran, das Gel und weitere drei Filterpapiere. Oben wurde die Kathoden-Graphitplatte aufgelegt, anschließend wurde für 60 bis 90 min bei 0.8 mA/cm² geblottet. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C in PBS/1%BSA blockiert, 3 mal 5 min mit je etwa 15 ml PBS gewaschen und mit dem Erstantikörper in PBS/1%BSA 2 h bei RT inkubiert. Die PVDF-Membran wurde 5 mal 5 min mit je 15 ml PBS gewaschen. Der in PBS/1%BSA verdünnte Zweitantikörper (Peroxidase- oder

alkalische Phosphatase-gekoppelt) wurde zugegeben. Nach weiteren 2 h Inkubation bei RT wurde 5 x 5 min mit je etwa 15 ml PBS gewaschen. Die Färbereagenzien und die Prozedur entsprach der bei der HPTLC-Immunfärbung (2.3.2).

Transferpuffer: 2.9 g Glycin
5.8 g Tris
1.85 ml SDS-Lösung, 10 %ig (w/v)
200 ml Methanol
Wasser *ad* 1000 ml

2.4 Derivatisierung von Glykolipiden

2.4.1 Peracetylierung

Die getrocknete Probe wurde mit 1 Volumen Essigsäureanhydrid (Sigma) und 2 Volumina Pyridin (Roth) versetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Die Probe wurde im Stickstoffstrom getrocknet, in 2 ml Dichlormethan oder Chloroform aufgenommen und die organische Phase viermal mit je 2 ml Wasser gewaschen. Das organische Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom abgeblasen.

2.4.2 Deacylierung von Glykolipiden zur Herstellung von Lyso-Glykolipiden

Zur Abspaltung der Amid-gebundenen Fettsäure wurde die Glykosphingolipid-Probe in einem 13 mm Pyrex-Röhrchen mit Teflon-beschichtetem Schraubdeckel mit 1 ml 1 M KOH (suprapurum, Merck) in Methanol versetzt [410-412], fest verschraubt und über Nacht bei 100°C inkubiert [413]. Zur Neutralisierung wurde 37%ige HCl mit 11 Volumen Methanol versetzt, so daß eine 1 M HCl-Lösung entstand. Nachdem die Glykosphingolipid-Probe abgekühlt war, wurden von der 1 M HCl Lösung 900 µl zugegeben, worauf Kaliumchlorid ausfiel. Nach Zugabe eines 10µl-Aliquots an 96%iger Essigsäure (suprapurum) wurde der pH kontrolliert. Die Zugabe von je 10 µl Essigsäure wurde gegebenenfalls wiederholt, bis sich ein pH zwischen 4 und 6 einstellte. Mit 3 ml n-Hexan wurden die Fettsäuren extrahiert, die zu den entsprechenden Methylestern umgesetzt (2.7.1.1) und mittels GC/MS nachgewiesen wurden (2.6.1.5). Die Methanolphasen wurden entweder über RC18_{cc} RP-Kartuschen entsalzt oder durch Peracetylierung und anschließende Phasenverteilung von Salzresten gereinigt (s. 2.4.4). Für das Auftragen auf die RP-Kartusche wurde die Probe im N₂-Strom abgeblasen, in 2 ml TUP (2.2.4) aufgenommen und mit 100 µl 25%iger Ammoniaklösung versetzt, um die Aminogruppe der Sphingoidbasen zu deprotonieren (siehe weiterhin 2.2.4).

2.4.3 N-Acetylierung des Lysoglykolipids

Die durch die Hydrolyse freigewordene Aminogruppe der Sphingoidbase wurde N-acetyliert. Hierzu wurden die Lyso-Glykolipide in 190 µl Wasser, 10 µl Pyridin und 20 µl Essigsäureanhydrid aufgenommen und 30 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und durch MALDI-TOF-MS analysiert.

2.4.4 Peracetylierung des Lysoglykolipids

Nach der Herstellung von Lyso-Glykolipiden (2.4.2) wurden alternativ zur Entsalzung über RP-Kartuschen die in der Methanolphase befindlichen Lyso-Glykolipide durch Peracetylierung und anschließende Phasenverteilung von Salz befreit und für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie vorbereitet. Hierzu wurde die Methanolphase im Stickstoffstrom zur Trockne abgeblasen. Nach Zugabe von 1 ml Wasser und 1 ml wassergesättigtem n-Butanol wurde die untere Wasserphase abgenommen und verworfen. Nach einer weiteren Extraktion der Butanolphase mit 1 ml Wasser wurde die Butanolphase im Stickstoffstrom getrocknet. Durch diese Butanol/Wasser-Phasenverteilung konnte ein Großteil der Salze entfernt werden.

Durch Inkubation mit 500 μ l Pyridin und 250 μ l Essigsäureanhydrid über Nacht bei RT und unter Schutzgas (Argon) wurden die Lyso-Glykolipide peracetyliert. Die Probe wurde am nächsten Tag im Stickstoffstrom getrocknet, in 2 ml Chloroform aufgenommen und 4 mal mit je 2 ml H₂O extrahiert. Die Chloroform-Phase wurde im Stickstoffstrom getrocknet und durch MALDI-TOF-MS analysiert.

2.4.5 Verseifung peracetylierter Lyso-Glykolipide

Um selektiv die *O*-Acetylgruppen abzuspalten, wurde eine Verseifung der peracetylierten Glykolipide durchgeführt. Damit auf den Aufreinigungsschritt über die RP-Kartusche verzichtet werden kann (siehe 2.2.4), wurde als flüchtige Base Ammoniak eingesetzt. Peracetylierte Lyso-Glykolipide wurden mit 500 μ l CMW (10:10:3; v/v/v; 25 % Ammoniak im Wasserteil) versetzt, mit Ultraschall behandelt und 90 min bei 100°C inkubiert. Nachdem die Probe abgekühlt war, wurden die Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen. Die *N*-acetylierten Lyso-Glykolipide wurden ohne weitere Reinigung für MALDI-TOF-MS eingesetzt.

2.4.6 Milde saure Hydrolyse

Glykolipide wurden in 100 μ l einer wässrigen TFA-Lösung aufgenommen, für 40 min bei 100°C inkubiert und im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt [190,196]. Das Produkt wurde durch MALDI-TOF-MS analysiert.

2.4.7 Behandlung mit Exoglykosidasen

Die komplexen Glykolipide wurden entweder mit α -Fucosidase aus Rindernieren (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), aus Nebenhoden von Rindern (Sigma), aus Mandeln (Oxford Glycosystems) oder mit β -Galactosidase aus Schwertbohnen (Sigma) behandelt. Die getrocknete Glykolipid-Probe wurde in 50 μ l 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5.0; 1 g/l an Natriumtaurodeoxycholat) bei 37°C für 24 h inkubiert.

2.4.8 Chromtrioxid-Oxidation

Das getrocknete Glykolipid wurde peracetyliert (siehe 2.4.1) und im Stickstoffstrom wieder zur Trockne eingengt. Die Probe wurde dann in 100 μ l Eisessig aufgenommen, mit 10 mg CrO₃ versetzt, kurz mit Ultraschall behandelt und anschließend 2 h bei 50°C inkubiert [203,414-419]. Danach wurden je 300 μ l Wasser und CHCl₃ zugegeben. Die organische Phase wurde dreimal mit je 300 μ l H₂O gewaschen und danach im Stickstoffstrom getrocknet.

2.5 Analyse von PA-Oligosacchariden

Der Kohlenhydratanteil von Glykolipiden kann zur strukturellen Analyse enzymatisch freigesetzt werden. Das dadurch entstehende reduzierende Ende kann durch Tritierung oder durch reduktive Aminierung mit einer fluoreszierenden oder stark UV-absorbierenden Substanz markiert werden. Für die Fluoreszenzmarkierung werden unter anderem 2-Aminopyridin (PA; [420-436]) und 2-Aminobenzamid [437,438] verwendet. Weiterhin kommen bifunktionelle Fluoreszenzmarker zum Einsatz [439,440].

2.5.1 Abbau der Glykolipide mit Endoglykoceramidase

Die Endoglykoceramidase spaltet bei Glykosphingolipiden die *O*-glykosidische Bindung zwischen Kohlenhydratteil und Ceramidteil [441-446]. Glykolipide wurden im Stickstoffstrom getrocknet und in 100 µl 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5.0; 0.1 % Natriumtaurodeoxycholat) aufgenommen, 5 min bei 50°C mit Ultraschall behandelt, mit 20 mU Enzym (Endoglykoceramidase II aus *Rhodococcus spp.*; Takara Shuzu, Otsu, Shiga, Japan) versetzt und 72 h bei 37°C inkubiert. Die Enzymzugabe wurde nach 24 h wiederholt. Zum Reaktionsansatz wurden dann 400 µl Wasser zugegeben. Mit wassergesättigtem *n*-Butanol wurden 3 mal freigesetztes Ceramid, ungespaltene Glykolipide sowie ein Teil des Detergens extrahiert. Die vereinigten Butanolphasen wurden 1 mal mit 400 µl Wasser rückextrahiert. Die Butanolphasen wurden durch Immunfärbung auf die Vollständigkeit der Oligosaccharid-Freisetzung getestet. Die vereinigten wäßrigen Phasen mit den freigesetzten Oligosacchariden wurden für die PA-Markierung eingesetzt.

Alternativ zur *n*-Butanol-Extraktion wurden die freigesetzten Oligosaccharide durch Reverse-phase-Chromatographie von den nicht umgesetzten Glykolipiden getrennt (siehe 2.2.4). Hierbei enthielt die Waschfraktion die freigesetzten Oligosaccharide, Glykolipide und Detergens wurden mit den üblichen organischen Lösungsmitteln eluiert.

2.5.2 Herstellung von PA-Oligosacchariden

Durch Endoglykoceramidase freigesetzte Oligosaccharide wurden mit PA fluoreszenzmarkiert. Hierzu wurde die wäßrige Phase, welche die Oligosaccharide (0.05 - 100 nmol) enthielt, mit 20 µl Kupplungsreagenz versetzt (200 mg 2-Aminopyridin in 53 µl Essigsäure (100%ig); 2-Aminopyridin wurde hierfür durch Sublimation gereinigt und aliquotiert bei -20°C gelagert [434], alternativ zur zweimaligen Umkristallisation in Hexan [424,427]) Die Reaktionslösung wurde 60 min auf 90°C erhitzt.

Der Reaktionsansatz kühlte 5 min bei RT ab und wurde dann mit 70 µl Reduktionsreagenz versetzt und 35 min bei 80°C inkubiert. Das Reduktionsreagenz wird aus 200 mg Boran-Dimethylamin-Komplex, 50 µl Wasser und 80 µl Essigsäure frisch angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit 2.5%igem Ammoniak auf pH 10 gebracht und mit Wasser auf ein Volumen von 200 µl verdünnt. Überschüssiges Reagenz wurde 6 mal mit je 2 Volumen Chloroform extrahiert. Die Probe wurde anschließend für Aminphasen-HPLC verwendet.

2.5.3 HPLC-Trennung von PA-Oligosacchariden

2.5.3.1 Trennung von PA-Oligosacchariden durch RP-Chromatographie

Die PA-Oligosaccharide wurden an einer Octadecyl-Silicasäule (C₁₈, 4.6x250 mm; Hypersil, Runcorn, Cheshire, UK) getrennt. Als Laufmittel A wurde 50 mM Essigsäure-Triethylamin (pH 5.0), als Laufmittel B 50 mM Essigsäure-Triethylamin (pH 5.0) mit 0.5 % 1-Butanol verwendet. Die Chromatographie erfolgte bei 40°C und einem Fluß von 1 ml/min. Die Säule wurde mit Laufmittel A äquilibriert. Innerhalb von 50 min wurde ein Gradient von 0 auf 50 % Laufmittel B gefahren, für weitere 15 min wurde isokratisch bei 50 % Laufmittel B eluiert. Die PA-markierten Oligosaccharide wurden fluoreszenzspektrophotometrisch bei einer Extinktionswellenlänge von 320 nm und einer Emissionswellenlänge von 400 nm detektiert. Alternativ wurde die Säule mit 0.01 % wäßriger TFA äquilibriert und ein Gradient von 0 % auf 3 % Acetonitril in 0.01% TFA in 150 min verwendet (RT, 0.8 ml/min). Die eluierten Fraktionen wurden durch MALDI-TOF-MS und Bausteinanalyse untersucht.

2.5.3.2 Trennung von PA-Oligosacchariden durch Aminophasen-HPLC

Alternativ zur RP-HPLC wurden die PA-Oligosaccharide an einer Aminophasen-HPLC-Säule (4.6x250 mm; Nucleosil-Carbohydrate, Macherey & Nagel) fraktioniert. Dabei eluierten erst Reste von 2-Aminopyridin. PA-markierte Kohlenhydrate wurden hier nach Größe getrennt: erst eluierten Mono-, dann Disaccharide, gefolgt von Oligosacchariden. Die Chromatographie erfolgte bei RT und einem Fluß von 1 ml/min, PA-Oligosaccharide wurden fluoreszenzspektrophotometrisch detektiert (Extinktionswellenlänge 310nm, Emissionswellenlänge 380nm). Die Probe wurde in Acetonitril:Wasser (75:25, v/v) aufgenommen und vor dem Auftrag zentrifugiert. Nach 30 min Äquilibrierung mit Laufmittel A wurde die Probe injiziert, und innerhalb von 60 min wurde der Gehalt von Laufmittel B kontinuierlich auf 100 % erhöht. Für 10 min wurden 100 % Laufmittel B beibehalten, dann wurde die Säule 30 min mit Laufmittel A äquilibriert.

Laufmittel A 25% 200 mM Essigsäure, mit Triethylamin auf pH 7.3 eingestellt
75% Acetonitril

Laufmittel B 60% 200 mM Essigsäure, mit Triethylamin auf pH 7.3 eingestellt
40% Acetonitril

2.5.4 Abbau der PA-Oligosaccharide mit Exoglykosidasen

Für den Nachweis der Monosaccharidsequenz und der anomeren Konfigurationen wurden PA-Oligosaccharide mit Exoglykosidasen enzymatisch abgebaut [447,448]. Hierzu wurden die α -Fucosidase aus Rindernieren (pH 5.0; Roche Diagnostics GmbH) oder mit β -Galactosidase aus *Escherichia coli* (pH 7.2; Sigma) 4 h gegen einen 25 mM Ammonium-Acetat Puffer dialysiert, dessen pH auf den für das Enzym empfohlenen Wert eingestellt war. Die trockene PA-Oligosaccharid-Probe wurde in 50 μ l der dialysierten Enzymlösung aufgenommen. Nach 6 bis 18 h bei 37°C wurde der Erfolg des enzymatischen Abbaus durch MALDI-TOF-MS (2.6.5) überprüft. Bei unvollständiger Spaltung wurde nochmals Enzym zugegeben und die Spaltung fortgesetzt. Die Abbauprodukte wurden durch HPLC gereinigt (2.5.3.1 oder 2.5.3.2).

2.6 Kohlenhydrat-Strukturanalyse

2.6.1 Bausteinanalyse peracetylierter Alditolacetate

Die kohlenhydrathaltige Probe (100-1000 ng) wurde in einem verschraubbaren Röhrchen im Stickstoffstrom, im Lyophilisator oder in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend unter Verwendung von TFA (2.6.1.1) oder Schwefelsäure (2.6.1.2) hydrolysiert, reduziert (2.6.1.3), acetyliert (2.6.1.4) und durch GC analysiert (2.6.1.5).

2.6.1.1 TFA-Hydrolyse

Die trockene Probe wurde in 0.5 ml 4 M Trifluoressigsäure (TFA; Merck) aufgenommen, mit Ultraschall behandelt und 4 h bei 100°C inkubiert. Die Probe wurde in der Vakuumzentrifuge zur Trockne gebracht und anschließend reduziert (2.6.1.3).

2.6.1.2 Schwefelsäurehydrolyse

Die trockene Probe wurde in 500 µl 0.5 N Schwefelsäure in 85%iger Essigsäure (beide suprapurum; Merck) aufgenommen, mit Ultraschall behandelt und unter einer Argonatmosphäre über Nacht bei 80°C inkubiert. Die Probe wurde mit 550 µl 0.5 M Natronlauge (suprapurum; Merck) versetzt und in der Vakuumzentrifuge bei 20°C zur Trockne gebracht. Zur Entfernung der restlichen Essigsäure wurde die Probe noch zweimal in 500 µl Wasser aufgenommen und wieder in der Vakuumzentrifuge getrocknet (2.6.1.3).

2.6.1.3 Reduktion

Die durch die Hydrolyse entstandenen Monosaccharide wurden mit NaBH₄ zu den entsprechenden Alditolen reduziert. Dazu wurde die Probe in 500 µl NaBH₄-Lösung (300 mM, frisch zubereitet) aufgenommen und über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Essigsäure (suprapurum, Merck) wurden die Ansätze in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Dann wurde die Probe in 2 ml Methanol (nanograde; Promochem) mit 1 % Essigsäure aufgenommen und im Stickstoffstrom getrocknet. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt, um die entstandene Borsäure als flüchtige Methylester zu entfernen.

2.6.1.4 Peracetylierung

Die reduzierte Probe (2.6.1.3) wurde mit 400 µl Essigsäureanhydrid und 400 µl Pyridin versetzt, unter Argon über Nacht bei RT inkubiert, im Stickstoffstrom getrocknet und in 4 ml Dichlormethan (nanograde; Promochem) aufgenommen. Die organische Phase wurde 4 mal mit 2 ml Wasser gewaschen, im Stickstoffstrom getrocknet.

2.6.1.5 GC- und GC/MS-Analyse

Peracetylierte Alditole wurden durch Gaschromatographie mittels Flammenionisationsdetektor nachgewiesen. Als Trägergas wurde Helium mit einem Druck von 30 kPa eingesetzt. Die Probenaufgabe geschah mit einem "moving needle"-Injektor mittels einer beweglichen Nadel, die in den 260°C heißen Injektorblock abgesenkt wurde. Für die Trennungen wurden Kapillarsäulen mit chemisch gebundener Phase verwendet (DB 1, 0.25 mm ID, 60 m, ICT, Bad Homburg; DB 210, 0.25 mm ID, 30 m, ICT).

Partiell methylierte Alditolacetate wurden durch kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) nach chemischer Ionisation mit Ammoniak anhand ihrer Pseudomolekülonen ($[M+NH_4]^+$ bzw. $[M+NH_4]^+$ und $[M+H]^+$) nachgewiesen und quantifiziert. Die Identifizierung erfolgte mit Hilfe von Standards anhand der Retentionszeiten. Säulen und Injektor waren wie oben beschrieben. Als GC/MS-Gerät wurde das Modell 4021 von Finnigan MAT, Bremen, genutzt. Für die DB1-Säule wurde ein Temperaturgradient von 1.2 K/min von 130°C bis 200°C und von 5 K/min von 200°C bis 250°C verwendet. Für die DB210-Säule wurde ein Temperaturgradient von 1.5 K/min von 130°C bis 250°C verwendet.

Die durch die Hydrolyse nach Gaver und Sweeley [449] gewonnenen Fettsäuremethyl-ester wurden acetyliert (2.6.1.4) und durch Gaschromatographie/Massenspektrometrie nachgewiesen [450,451]. Gerät, Säule und Injektor waren wie oben beschrieben. Die Temperatur in der Säulenkammer wurde mit 7 K/min von 100°C auf 300°C gesteigert. Es kam sowohl chemische Ionisation (CI) mit Ammoniak als auch Elektronenstoß-Ionisation (electron impact; EI) zum Einsatz. Die Identifizierung erfolgte anhand von Standards durch den Vergleich von Retentionszeiten und zugehörigen Massenspektren. Als Standards dienten C12:0 bis C30:0 Fettsäuren (Fluka, Neu-Ulm), sowie die Fettsäuren C24h:0 (2-Hydroxytetracosansäure; ICT) und C16h:0 (2-Hydroxyhexadecan-säure; ICT).

2.6.2 Bausteinanalyse mittels reduktiver Aminierung mit Anthranil-säure

Die Proben, die 10 bis 1000 ng je Kohlenhydrat-Baustein enthielten, wurden mit 100 μ l 4 M Trifluoressigsäure versetzt, 1 min mit Ultraschall behandelt und 4 h bei 100°C inkubiert. Die TFA-Lösung wurde im Stickstoffstrom abgeblasen. Die trockenen Proben wurden in 10 μ l 0.6% Natriumacetat-Lösung aufgenommen, mit 50 μ l frisch angesetztem Derivatisierungslösung versetzt, 1 min mit Ultraschall behandelt und 45 min bei 80°C inkubiert [452].

Derivatisierungsreagenz Anthranilsäure 6 mg/ml
 Natriumcyanoborhydrid 20 mg/ml
 in Methanol mit 4 % Natriumacetat, 2 % Borsäure

Die Ansätze wurden mit 60 μ l Laufmittel A auf 120 μ l aufgefüllt. Die Anthranilsäure-derivate wurden durch RP-HPLC getrennt. Hierfür wurde eine Superspher C18_{ec} RP-Säule (4 μ m Partikelgröße, 4x250 mm; Merck) bei RT und einem Fluß von 1 ml/min unter Einsatz eines Gradienten (Tab. 5) verwendet. Die fluoreszenzphotometrische Detektion erfolgte bei 425 nm (Anregungswellenlänge 360 nm).

Laufmittel A 0.3 % 1-Butylamin, 0.5 % Phosphorsäure, 1 % Tetrahydrofuran (v/v)
 Laufmittel B Laufmittel A/Acetonitril 50:50 (v/v)

t /min	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0	95	5
7	95	5
25	82	18
26	0	100
31	0	100
32	95	5
45	95	5

Tab. 5 Gradient zur Trennung von Monosaccharid-Anthranilsäurederivaten

2.6.3 Methylierungsanalyse

Durch die Methylierungsanalyse ließen sich die Verknüpfungspositionen der Monosaccharidbausteine einer Kohlenhydratkette nachweisen [453-461]. Hierzu wurden alle freien Hydroxygruppen methyliert, dann wurde die Kohlenhydratkette hydrolysiert, die methylierten Monosaccharide reduziert, und die nun freigewordenen Hydroxygruppen acetyliert. Die so entstandenen partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) wurden durch GC/MS identifiziert.

2.6.3.1 Permethylierung

Für die Permethylierung wurde die Probe in ein Mikroreaktionsgefäß (300 µl; Zinsser, Frankfurt) mit einem Teflon-beschichteten Septum überführt und über Nacht bei RT unter Vakuum über Phosphorpentoxid (Sicapent; Merck) getrocknet. Der Exsikkator wurde mit Argon geflutet, in das verschlossene Mikroreaktionsgefäß wurden durch das Septum 50 µl wasserfreies Dimethylsulfoxid (maximal 0.03 % H₂O; Merck) gegeben. Durch 90 min Inkubation bei RT im Ultraschallbad wurde die Probe gelöst. Nach Zugabe von 50 µl Lithium-Dimethylsulfinylat-Lösung (ca. 2 M Butyllithium in Dimethylsulfoxid gelöst) wurde die Probe für weitere 90 min bei RT im Ultraschallbad inkubiert und anschließend auf -20°C abgekühlt. Dann wurden 50 µl Methyljodid zugegeben, und die Probe wurde 90 min bei RT im Ultraschallbad inkubiert.

Die permethylierten Glykokonjugate wurden durch RP-Chromatographie aufgearbeitet. Hierzu wurde eine Chromabond C18_{ec}-Kartusche (100 mg) mit 5 ml Wasser, 5 ml Acetonitril 5 ml Methanol und wiederum 10 ml Wasser gewaschen. Der Permethylierungsansatz wurde mit 150 µl Wasser versetzt und aufgegeben. Dann wurde die Säule mit 5 ml Wasser, 2 ml 10% Acetonitril, 2 ml 100% Acetonitril und je 2 ml Methanol und Chloroform gespült. Die eluierten Fraktionen wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und durch MALDI-TOF-MS analysiert. Hydrolyse (2.6.1.1), Reduktion (2.6.1.3) und Peracetylierung (2.6.1.4) wurden wie für Bausteinanalysen beschrieben durchgeführt. Die GC/MS-Analyse der PMAAs ist unter 2.6.1.5 beschrieben.

2.6.4 Flüssigkeitssekundärionen-Massenspektrometrie

Durch LSI/MS (liquid secondary ion mass spectrometry; Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie) permethylierter PA-Oligosaccharide, sowie permethylierter und nativer Glykolipide wurden Pseudomolekülonen ($[M+H]^+$ und $[M-H]^-$) und charakteristische Fragmentationen nachgewiesen [462-465]. Die Messungen wurden an dem doppeltfocussierenden Hochfeld-Massenspektrometer MAT 900 (Finnigan MAT) mit einem DEC-2100-Datensystem durchgeführt. Zur Kalibrierung wurde CsI verwendet. In die Probenhalterung wurden einige Microliter Nitrobenzylalkohol (Aldrich) für Messungen im Positiv-Modus oder Triethanolamin (Merck) für Messungen im Negativ-Modus vorgelegt. Dann wurden mehrere Microliter der gelösten Probe zugegeben. Die Ionisierung erfolgte im Hochvakuum durch einen mit 23 kV beschleunigten Cäsiumionen-Strahl, bei einem Emissionsstrom von 2 bis 3 µA. Die Beschleunigungsspannung für die Sekundärionen betrug 5 kV. Für den Nachweis der Ionen wurde ein Sekundärionen-Vervielfacher eingesetzt. Die Auflösung lag in der Regel bei 3000.

2.6.5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry) ist eine bewährte Methode für die Massenbestimmung verschiedener Biomoleküle [466-480], unter anderem für Oligosaccharid-Derivate und Glykokonjugate [423,465,467,481-497]. Für MALDI-TOF-MS-Experimente wurden 0.5 μl (5 mg/ml in Wasser) der 6-Aza-2-thiothymin-Matrix (ATT; Sigma; [482,498,499]) auf die Edelstahl-Probenscheibe gegeben. Etwa 1 μl (1-10 pmol) der PA-Oligosaccharide in wäßrigen Lösungsmitteln wurden zum Matrixtropfen dazugegeben und in einem schwachen Kaltluftstrom getrocknet. Glykolipide wurden in CMW (10:10:1, v/v/v) gelöst, und 1 μl der Lösung (1-20 pmol) wurde im Warmluftstrom zum trockenen Matrix-Fleck zugegeben. Die MALDI-TOF-MS-Experimente wurden an einem Vision 2000 Time-of-flight Massenspektrometer (Finnigan/MAT, Bremen) durchgeführt, das mit einem UV-Laser (337 nm) ausgerüstet war. Das Gerät wurde, wenn nicht anders vermerkt, im positiven Reflektron-Modus betrieben. Alle Spektren sind Summenspektren aus 3-100 Einzelmessungen, und die angegebenen Molekülmassen sind gemittelte Massen, auf eine Nachkommastelle gerundet. Die Kalibrierung wurde mit dem monoisotopischen Peak von Angiotensin I (m/z 1296.7; Sigma) und einem Matrixsignal (m/z 285.1) durchgeführt.

2.6.6 Enzymatischer Abbau von Glykokonjugaten auf der MALDI-TOF-MS-Probenscheibe

Im Anschluß an eine MALDI-TOF-MS-Messung (siehe 2.6.5) wurden PA-Oligosaccharid- und Glykolipid-Proben auf der Edelstahl-Probenscheibe mit Exoglykosidasen behandelt [495,498,500,501]. Einer Inkubation mit einer Exoglykosidase folgte eine MALDI-TOF-MS-Messung des Abbauproduktes. Es wurden mehrere Zyklen mit verschiedenen Exoglykosidase-Behandlungen und MALDI-Messungen durchgeführt, bis der Kohlenhydratteil vollständig enzymatisch abgebaut war.

Nach der Massenbestimmung wurde hierzu der Fleck aus ATT-Matrix und Probe mit 2 μl Enzymlösung überschichtet. Die Exoglykosidasen wurden zuvor 4 h gegen einen 25 mM Ammonium-Acetat Puffer dialysiert, dessen pH auf den für das Enzym empfohlenen Wert eingestellt war. Die Proben wurden auf der Probenscheibe 2-6 Stunden oder, alternativ dazu, über Nacht bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit dem Enzym in etwa 2 μl Gesamtvolumen inkubiert. Bei der Analyse von PA-Oligosacchariden wurde die Probe im Kaltluftstrom getrocknet, und ein Massenspektrum wurde aufgenommen. Nach Zugabe der nächsten Enzymlösung wurde wiederum in der wassergesättigten Atmosphäre inkubiert. Ohne Zugabe neuer Matrix-Lösung wurde ein weiteres Massenspektrum aufgenommen.

Bei der Analyse von Glykolipiden wurde die Enzymlösung nach der Inkubation abgenommen. Um die Intensität des MALDI-TOF-MS Signales zu verstärken wurde in manchen Fällen 1 μl einer 4 mM LiCl-Lösung zugegeben und getrocknet, was zur Messung von Lithium-Addukten anstelle von Natrium-Addukten führte. Zum trockenen Fleck wurde mit einer Glas-Microliter-Spritze 1 μl organisches Lösungsmittel-Gemisch (CMW; 10:10:1, v/v/v) zugegeben. Diese Zugabe erfolgte im Warmluftstrom, so daß das organische Lösungsmittel innerhalb weniger Sekunden trocknete, was zu einem amorphen Probenfleck führte. Im Warmluftstrom wurde der Probenfleck mit 1 μl ATT-Matrixlösung überschichtet. Dann wurde die Probe im Massenspektrometer gemessen. Nach der MALDI-TOF-MS Messung wurde der Probenfleck mit dem nächsten dialysierten Enzym überschichtet, und in der Gegenwart der ATT Matrix wurde der

enzymatische Abbau fortgesetzt, bis die Sequenz des Kohlenhydrat-Teiles vollständig bestimmt war.

Für die Etablierung der Methode wurden folgende Standards verwendet: Von Claudia Friedl (Biochemisches Institut am Klinikum, Universität Gießen) wurden zwitterionische Glykolipide des Schweinespulwurms *Ascaris suum* zur Verfügung gestellt, die wie beschrieben [502] aufgereinigt worden waren. Zunächst wurden 36 µg der *A. suum* zwitterionischen Glykolipide mit 100 µl Flußsäure (48 %) bei 4°C über Nacht behandelt, um die als Phosphodiester gebundenen Phosphocholin- und Phosphoethanolamin-Substituenten abzuspalten. Die Probe wurde im Stickstoffstrom getrocknet, in 100 µl Methanol wieder aufgenommen und nochmals getrocknet. Es wurden 400 µl wassergesättigtes n-Butanol und 400 µl Wasser zugegeben, so daß sich eine Phasenverteilung ergab. Die Glykolipide wurden aus der oberen organischen Phase gewonnen. Mit CMW (10:10:1, v/v/v) wurden die in der Butanolphase gelösten Glykolipide auf 10 pmol/µl verdünnt. Von Tetraosylglobosid (Sigma) wurde ebenfalls eine Lösung von 10 pmol/µl hergestellt. Davon wurde 1 µl für den enzymatischen Abbau auf der Probenscheibe eingesetzt.

Beim Abbau der PA-Oligosaccharide von Cercarien mit β -N-Acetylhexosaminidase wurden vom Enzym aus der Schwertbohne die höchsten Aktivitäten eingesetzt (130 mU/µl; Sigma), gefolgt vom Rindernieren-Enzym (50 mU/µl; Roche Diagnostics GmbH). Vom *Diplococcus pneumoniae* Enzym kamen nur geringe Mengen zum Einsatz (1 mU/µl; Roche Diagnostics GmbH; [503]). Weiterhin wurden α -Galactosidase aus grünen Kaffeebohnen (Roche Diagnostics GmbH), β -Mannosidase aus Schnecken (Sigma) und β -Galactosidase von *D. pneumoniae* (Roche Diagnostics GmbH; [503]) verwendet.

2.7 Sphingoidbasen- und Fettsäureanalyse

Aus Glykosphingolipiden wurden durch saure Hydrolyse die Fettsäuren und Sphingoidbasen freigesetzt. Etwa 1 bis 10 µg Glykosphingolipid wurden im Stickstoffstrom getrocknet und mit Hydrolyselösung (s. 2.7.1.1) versetzt. Nach der Hydrolyse wurden durch dreimalige Extraktion mit je 1 ml n-Hexan die freien Fettsäuren gewonnen. Die Hydrolyselösung wurde durch Zugabe 25%iger Ammoniaklösung stark alkalisch gemacht, und die Sphingoidbasen wurden durch dreimalige Extraktion mit je 1 ml Chloroform gewonnen. Die Sphingoidbasen wurden durch MALDI-TOF-MS analysiert oder mit *o*-Phthaldialdehyd derivatisiert, durch HPLC getrennt und wiederum durch MALDI-TOF-MS identifiziert.

2.7.1.1 Hydrolyse nach Gaver und Sweeley

Die Glykosphingolipide wurden 16 h bei 100°C in 0.5 ml Hydrolyselösung (1 M HCl in Methanol, 10 M H₂O) inkubiert [449]. Die Hydrolyselösung wurde jeweils frisch angesetzt: 9.4 ml Wasser, 8.6 ml 37%ige HCl (w/v), ad 100 ml mit Methanol. Die Fettsäuren lagen nach der Hydrolyse als Methylester vor. Die Gaver-Sweeley-Hydrolyselösung wurde auch eingesetzt, um freie Fettsäuren in die entsprechenden Methylester zu überführen. Hierzu wurde nur 15 min in 100 µl Hydrolyselösung bei 100°C inkubiert, anschließend wurde die Probe im Stickstoffstrom ohne Erwärmung getrocknet, um die kurzkettigen Fettsäuremethylester nicht zu verlieren. Die GC/MS-Analyse der Fettsäuremethylester ist beschrieben unter 2.6.1.5. Für die Analyse von Hydroxyfettsäuren wurden die entsprechenden Hydroxyfettsäuremethylester acetyliert (siehe Peracetylierung, 2.6.1.4), durch Phasenverteilung gereinigt, im Stickstoffstrom getrocknet und durch GC/MS analysiert (2.6.1.5).

2.7.1.2 Hydrolyse nach Ando

Die Glykosphingolipide wurden 2 h bei 75°C in 0.3 ml Hydrolyselösung (0.5 M HCl in Acetonitril, 4 M H₂O) inkubiert [504]. Die Hydrolyselösung wurde jeweils frisch angesetzt: 4.14 ml Wasser, 4.09 ml 37%ige HCl (w/v), mit Acetonitril ad 100 ml. Nach der Hydrolyse lagen die Fettsäuren in freier Form vor und wurden durch Inkubation mit Gaver-Sweeley-Hydrolysereagenz (2.7.1.1) in Fettsäuremethylester überführt und im Stickstoffstrom getrocknet.

2.7.1.3 Analyse von Sphingoidbasen als *o*-Phthaldialdehyd-Derivate

Die getrockneten Sphingoidbasen wurden mit 50 µl Methanol und 50 µl Derivatisierungsreagenz versetzt. Nach 5 min wurde die Reaktionslösung mit 400 µl methanolischer Phosphatlösung versetzt (Methanol/5 mM Natriumphosphat, pH 7.0; 90:10, v/v) und auf einer LiChrospher RP-18 Säule (4.6x250 mm; Merck; Fluß 1 ml/min) bei RT isokratisch mit dem Laufmittel Methanol/5 mM Natriumphosphat, pH 7.0 (90:10, v/v) getrennt. Die Detektion erfolgte fluorezenzspektrophotometrisch (340 nm/455 nm). Als Standards dienten die *o*-Phthaldialdehyd-Derivate (OPA) von C18-Sphingosin, -Sphinganin und -Phytosphingosin. Die eluierten Komponenten wurden gesammelt und durch MALDI-TOF-MS analysiert (2.6.5).

Derivatisierungsreagenz 50 mg OPA/ml Ethanol
 5 µl β-Mercaptoethanol (frisch ansetzen!)

2.7.1.4 Periodat-Oxidation von Sphingoidbasen

Die nach der Hydrolyse durch Phasenverteilung gewonnenen Sphingoidbasen wurden in 100 µl Methanol aufgenommen, mit 20 µl 0.2 M Natriummetaperiodat versetzt und 2 h bei RT in Dunkelheit inkubiert [414,505]. Danach wurden 400 µl Dichlormethan und 200 µl Wasser zugegeben. Die in der organischen Phase befindlichen Aldehyde wurden im Stickstoffstrom getrocknet und durch die Rudloff-Oxidation (2.7.1.5) zu Fettsäuren umgesetzt.

2.7.1.5 Rudloff-Oxidation von Sphingoidbasen nach Periodat-Oxidation

Die nach Periodat-Oxidation gewonnenen Reaktionsprodukte wurden in 100 µl n-Butanol aufgenommen und mit 300 µl 0.02 M Na₂CO₃-Lösung versetzt [506-510]. Nach Zugabe von 135 µl Periodat-Permanganat-Lösung (2.5 mg Natriummetaperiodat, 0.2 mg KMnO₄) und von 85 µl Wasser wurde bei RT über Nacht unter Lichtausschluß inkubiert. Dann wurden 50 µl einer 6 N Salzsäurelösung zugegeben, um die gebildeten Fettsäuren zu protonieren, und die Fettsäuren wurden 3 mal mit je 1 ml n-Hexan extrahiert. Aus den Sphingosin-Basen sind um 4 Kohlenstoffatome verkürzte Alkylketten entstanden, Phytosphingosin-Basen wurden um 3 Kohlenstoffatome und Sphinganin-Basen um 2 Kohlenstoffatome verkürzt [414]. Zur Überführung in die Fettsäuremethylester wurden die Proben mit Gaver-Sweeley-Lösung behandelt (2.7.1.1) und anschließend durch GC/MS analysiert (2.6.1.5).

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und Reinigung der Glykolipide

Das als Glykolipid-Quelle dienende Parasitenmaterial wurde aus Großbritannien (Dr. M. J. Doenhoff, School of Biological Sciences, University of North Wales, Bangor, UK) bzw. aus Ägypten (Schistosome Biological Supply Program, Theodor Bilharz Research Institute, Guiza) erhalten. Die Isolierung und Reinigung folgte dem in Abb. 7 dargestellten Schema. In mehreren kleinen Ansätzen wurden insgesamt 1.1 g lyophilisierte adulte *S. mansoni* Würmer aus Hamstern, ca. 3.2 g lyophilisierte adulte Würmer aus Mäusen, ca. 3.6 g lyophilisierte Cercarien und 0.4 g lyophilisierte *S. mansoni* Eier (2.2.1) für die Extraktion (2.2.2) verwendet. Neben unbehandelten, lyophilisierten Eiern, die aus der Leber infizierter Mäuse gewonnen wurden, wurde auch das unlösliche Material, das bei der Extraktion von Eiern mit wäßrigem Puffer zur Herstellung von löslichem Eiantigen (soluble egg antigen, SEA) übrigblieb, auf seine Eignung als Glykolipid-Quelle getestet. Hierzu wurde parallel eine Extraktion von Glykolipiden und eine anschließende HPTLC-Immunfärbung durchgeführt (Abb. 8). Es zeigte sich, daß das Material, das ohne Einsatz von Detergentien wäßrig extrahiert worden war, für die Gewinnung von Ei-Glykolipiden eine ähnlich gute Quelle wie unbehandelte Eier darstellt. Die Extraktionsrückstände nach SEA-Gewinnung waren selbst an den großen, komplexen Lipiden, die nur eine kurze Laufstrecke zurücklegen und einen großen, hydrophilen Kohlenhydrateil besitzen, nicht merklich verarmt.

Der durch die Extraktion aus den verschiedenen lyophilisierten Parasitenmaterialien gewonnene Rohextrakt, der große Mengen verschiedener Lipide enthielt, wurde verseift (2.2.3) und durch RP-Chromatographie entsalzt (2.2.4). Anschließend wurden die Glykolipide durch Chromatographie an einem schwachen (2.2.5.1) und einem starken (2.2.5.2) Anionenaustauscher weiter gereinigt.

Die neutrale Fraktion enthielt dabei den weitaus größten Teil der antigenen Glykolipide (nicht gezeigt) und wurde im weiteren genauer untersucht. Die Glykolipide der neutralen Fraktion wurden durch Kieselgel-Chromatographie in einer Kartusche fraktioniert (2.2.6.1). Die Fraktionen mit den neutralen, kleinen Glykolipiden, die zuerst eluierten, wurden vereinigt. Die Fraktionen mit den komplexen Glykolipiden, die zum Teil mit Phospholipiden verunreinigt waren, wurden ebenfalls vereinigt.

Die kleinen, neutralen Glykolipide von adulten Würmern, Cercarien und Eiern wurden durch Iatrobeads-HPLC fraktioniert (2.2.6.2), wobei mehrere Ceramid-Monohexoside (CMH) und mehrere Ceramid-Dihexosid-Fraktionen (CDH) erhalten wurden. Die offensichtlich große Heterogenität der Ceramide dieser kleinen Glykolipide wurde im folgenden im Detail untersucht.

Eine erste Analyse der komplexen Glykolipide von Schistosomen erfolgte anhand der grob gereinigten Gesamtfractionen komplexer Glykolipide (3.3) der drei untersuchten Stadien. Dabei konnte eine stadienspezifische Expression von Glykolipiden immunologisch und strukturanalytisch nachgewiesen werden.

In einem weiteren Reinigungsschritt wurden die Gesamtfractionen komplexer Glykolipide von adulten Würmern und Cercarien peracetyliert, über Florisil-Chromatographie gereinigt (2.2.7) und deacetyliert. Die antigenen Glykolipide wurden durch Iatrobeads-HPLC in 5 Fraktionen aufgeteilt (3.4 und 2.2.6.2). Nach diesem

Reinigungsschritt und der Fraktionierung waren die Fraktionen genügend rein, um durch MALDI-TOF-MS analysiert zu werden. Allerdings enthielt jede Fraktion noch mehrere Komponenten, so daß in der Regel keine vollständige Strukturaufklärung von Einzelkomponenten möglich war. Nur das durch Iatrobeads-HPLC-Reinigung erhaltene Ceramid-Pentahexosid (CPH) wurde in einer homogenen Fraktion in ausreichender Menge erhalten, um die Struktur aufklären zu können.

Als alternativer Ansatz zur Analyse einzelner Glykolipid-Glykanstrukturen wurden die Ceramide der komplexen Glykolipide von adulten Würmern und Cercarien enzymatisch abgespalten (3.4 und 2.5). Die enzymatisch freigesetzten Oligosaccharide wurden fluoreszenzmarkiert (PA-Oligosaccharide), durch HPLC getrennt und strukturell analysiert. Für mehrere Cercarien-Glykolipide gelang so die detaillierte Strukturanalyse des Kohlenhydratanteils.

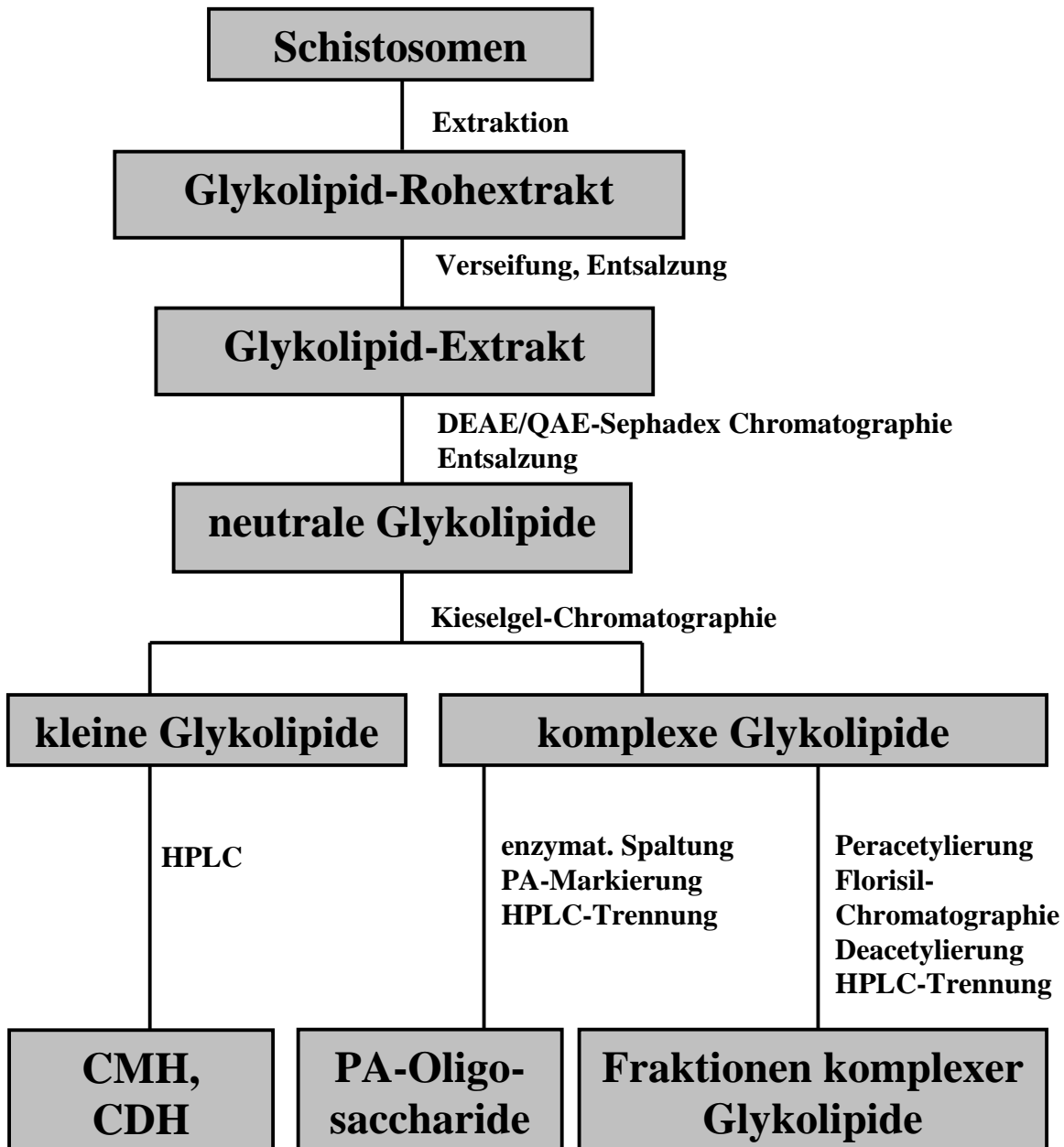


Abb. 7 Schematische Darstellung der Glykolipid-Reinigung.

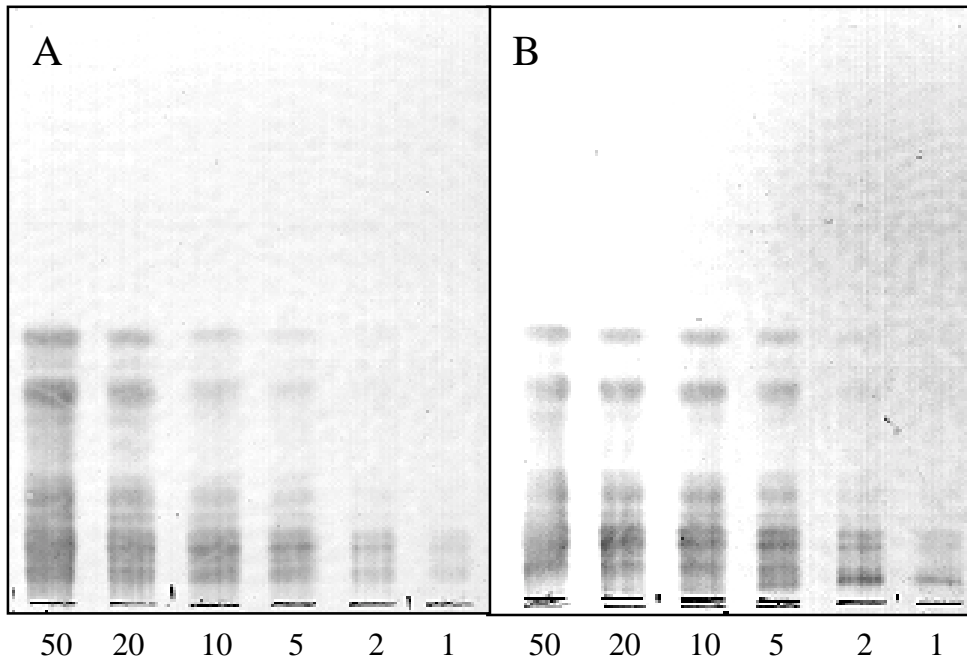


Abb. 8 HPTLC-Immundefärbung von Rohextrakten (A) aus lyophilisierten Eiern, die aus Mäuselebern gewonnen wurden, und (B) aus Extraktionsrückständen nach Gewinnung von löslichem Eiantigen (soluble egg antigen, SEA). Angegeben sind die Auftragsmengen in μg -Äquivalenten an lyophilisiertem Parasitenmaterial. Laufmittel CMW (50:40:10, 0.25%KCl im Wasseranteil, v/v/v). Die Detektion erfolgte mit einem Kaninchen Hyperimmuns serum (anti-Sm480Ei).

3.2 Strukturanalyse der kleinen Glykolipide verschiedener Stadien von *S. mansoni*

Beim CMH von Schistosomen bildet Glc1Cer die Hauptkomponente und Gal1Cer die Nebenkompente. CDH hat die Struktur GalNAc β 4Glc1Cer, Galactose-haltiges CDH wird nicht gefunden. CMH aller drei untersuchten Stadien besitzt C18- oder C20-Phytosphingosin, wobei bei Adultwürmern C18-Phytosphingosin, bei Cercarien und Eiern C20-Phytosphingosin überwiegt. Bei Adultwürmern kommt zusätzlich C18-Sphingosin, bei Cercarien C19-Phytosphingosin vor. α -Hydroxyhexadecansäure ist beim CMH aller drei Stadien die Hauptkomponente der vorhandenen Fettsäuren, und die Komplexität des CMH-Fettsäurespektrums nimmt von Eiern über Adultwürmer zu Cercarien zu. CMH von Cercarien besitzt weiterhin eine Vielfalt teilweise α -hydroxylierter Fettsäuren von 24 bis 30 C-Atomen Länge. Beim CDH von Cercarien sind Ceramide mit solch langkettigen Fettsäuren die Hauptkomponenten. Auch bei Adultwürmern und Eiern unterscheidet sich die Ceramid-Zusammensetzung von CMH und CDH stark.

3.2.1 Analyse der Gesamtfractionen

Gesamtes CMH und CDH der drei untersuchten Stadien von *S. mansoni* wurden durch MALDI-TOF-MS untersucht (Abb. 11 und Abb. 12). Hierbei ergaben sich für CMH Unterschiede zwischen den drei untersuchten Stadien. Das CMH von adulten Würmern liefert als Hauptkomponente ein Pseudomolekülion $[M+Na]^+$ bei m/z 756.5. Daß es sich bei diesem Ion wirklich um ein Natriumaddukt handelt, zeigte sich nach Zugabe von LiCl zum Probenfleck und nochmaliger Massenspektrometrie. Nun wurde das Pseudomolekülion $[M+Li]^+$ bei m/z 740.5 gemessen. Die Differenz von 16 Da ist auf den Massenunterschied der mittleren Atommassen von Natrium (23 Da) und Lithium (7 Da) zurückzuführen. Beim CMH von Cercarien wurden mehrere Pseudomolekülionen $[M+Na]^+$ von ähnlicher Intensität gemessen. Intensiver als das Signal bei m/z 756.6, das bei CMH von Cercarien und CMH von adulten Würmern gemeinsam auftrat, waren Signale bei m/z 770.6 und 784.6, wobei das letztere das Hauptsignal darstellte. Das CMH von Eiern lieferte dominante Pseudomolekülionen $[M+Na]^+$, nach abnehmender Intensität gegliedert, bei m/z 768.7, 784.7 und 740.7.

Die Untersuchung von CDH durch MALDI-TOF-MS (Abb. 12) deutete auf eine unterschiedliche Ceramid-Zusammensetzung hin, sowohl in Relation zum entsprechenden CMH als auch im Vergleich der CDH-Spezies der verschiedenen Stadien miteinander. Insbesondere fällt das CDH der Cercarien auf (Abb. 12C, D), das eine noch größere Heterogenität als das entsprechende CMH (Abb. 11C, D) zeigt und dessen Ceramide auch deutlich höhere Molekülmassen aufweisen.

CMH und CDH wurden auf die Struktur ihrer Kohlenhydratanteile hin untersucht (Tab. 6 und Tab. 7). Für CMH aller drei Stadien ergab sich als Hauptkomponente Glc1Cer und als Nebenkompente Gal1Cer (Cer = Ceramid), während für CDH jeweils die Struktur GalNAc4Glc1Cer gefunden wurde. Die CDH-Fraktion von Eiern wies sowohl in der Bausteinanalyse als auch in der Methylierungsanalyse größere Mengen an Galactose auf (Tab. 6 und Tab. 7), was vermutlich auf eine Kontamination mit CMH zurückzuführen ist. Die Strukturen der Kohlenhydratanteile von CMH und CDH stimmen mit den von Makaanu *et al.* [200] für Adultwürmer beschriebenen Strukturen überein (Abb. 6A).

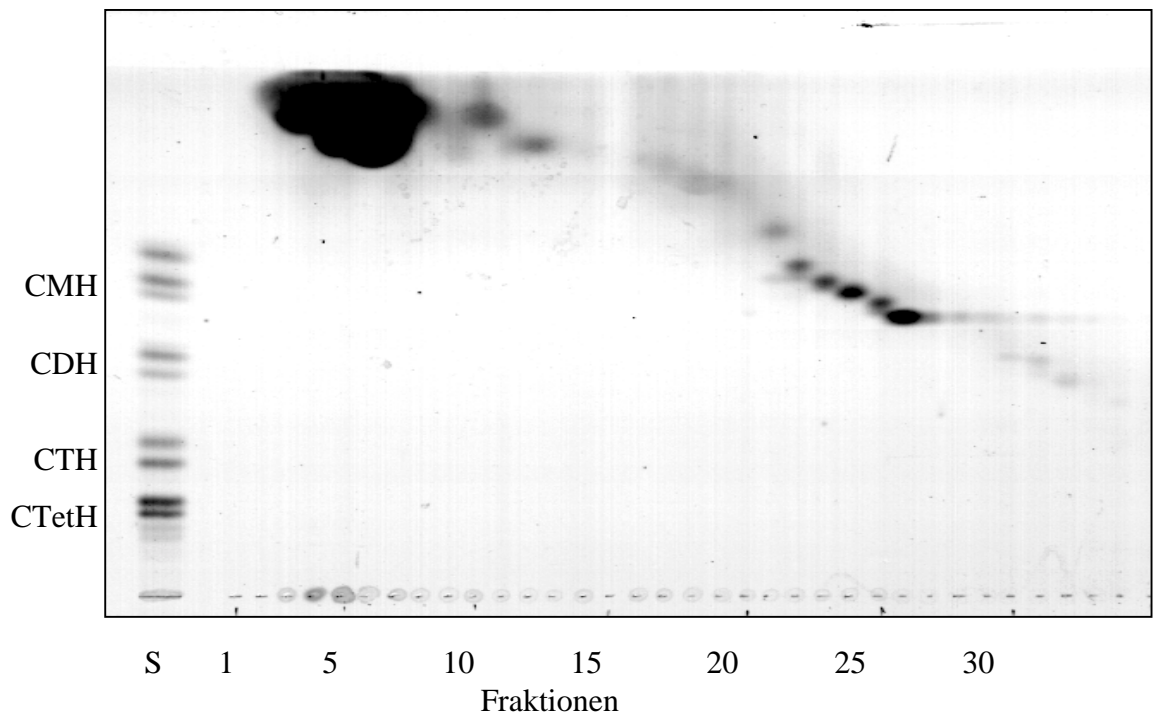


Abb. 9 Dünnschichtchromatographie der Ceramid-Mono- und -Dihexoside von adulten Würmern nach Iatrobeads HPLC-Fraktionierung. Je 5 % der HPLC-Fractionen wurden durch Dünnschichtchromatographie (Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser, 65:25:4, v/v/v) getrennt und durch Orcinolfärbung detektiert. (S), Globosidstandard.

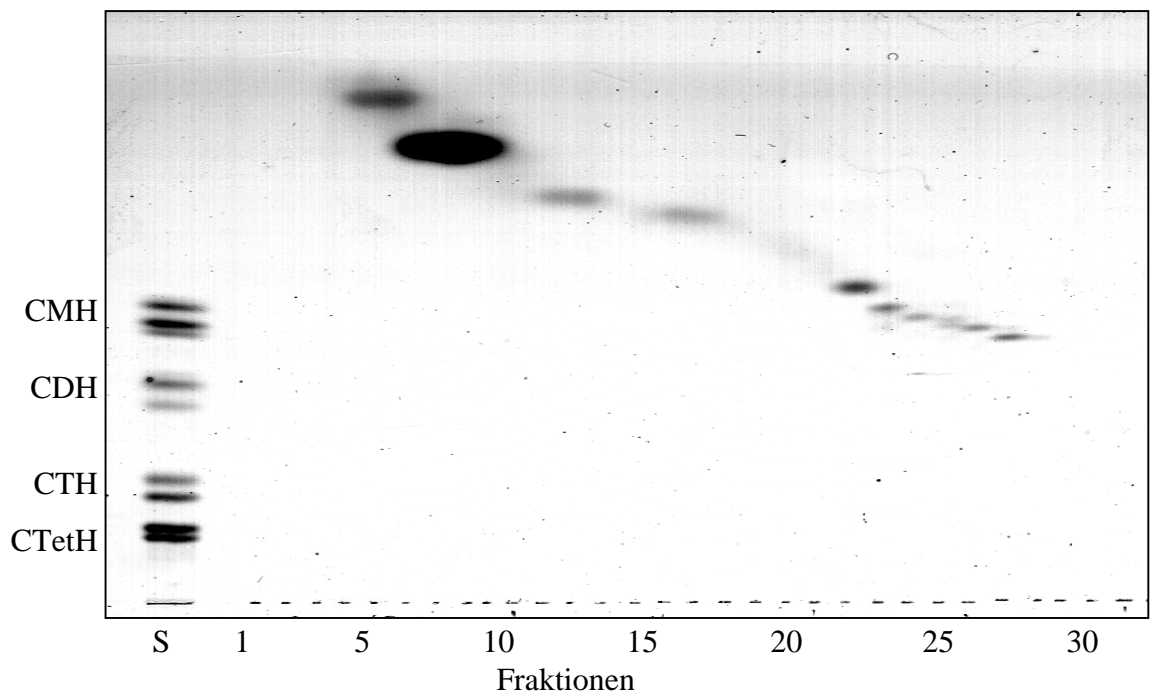
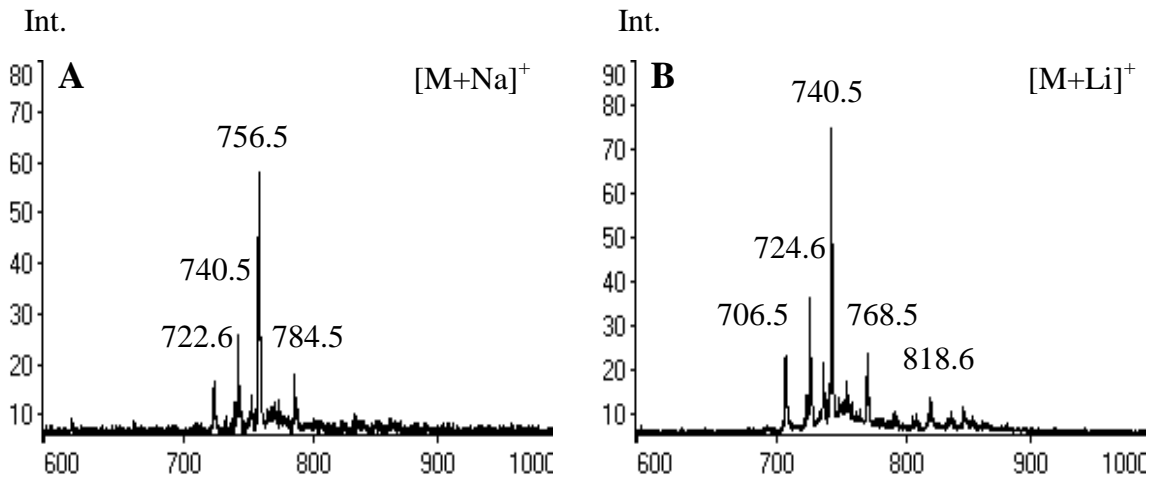
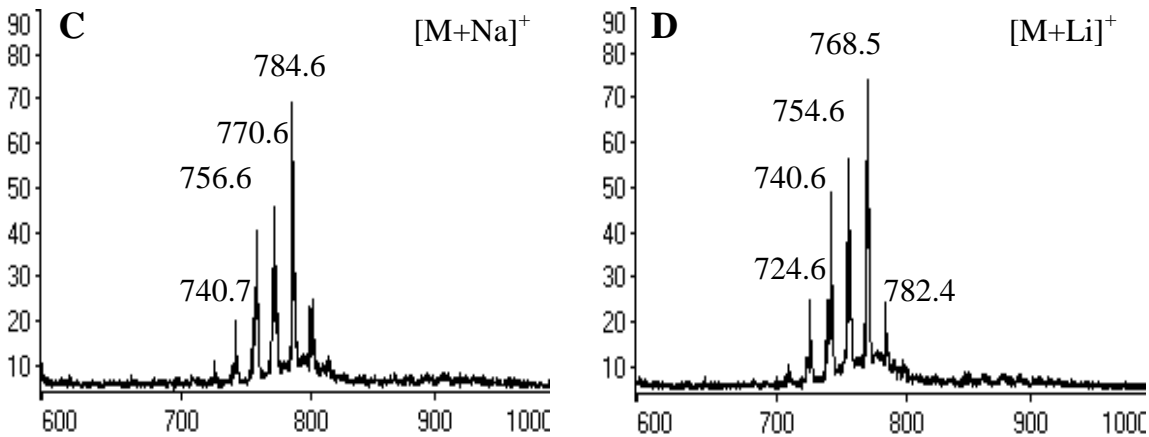


Abb. 10 Dünnschichtchromatographie der Ceramid-Monohexoside von Cercarien nach Iatrobeads HPLC-Fraktionierung. Je 5 % der HPLC-Fractionen wurden durch Dünnschichtchromatographie (Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser, 65:25:4, v/v/v) getrennt und durch Orcinolfärbung detektiert. (S), Globosidstandard.

CMH von adulten Würmern



CMH von Cercarien



CMH von Eiern

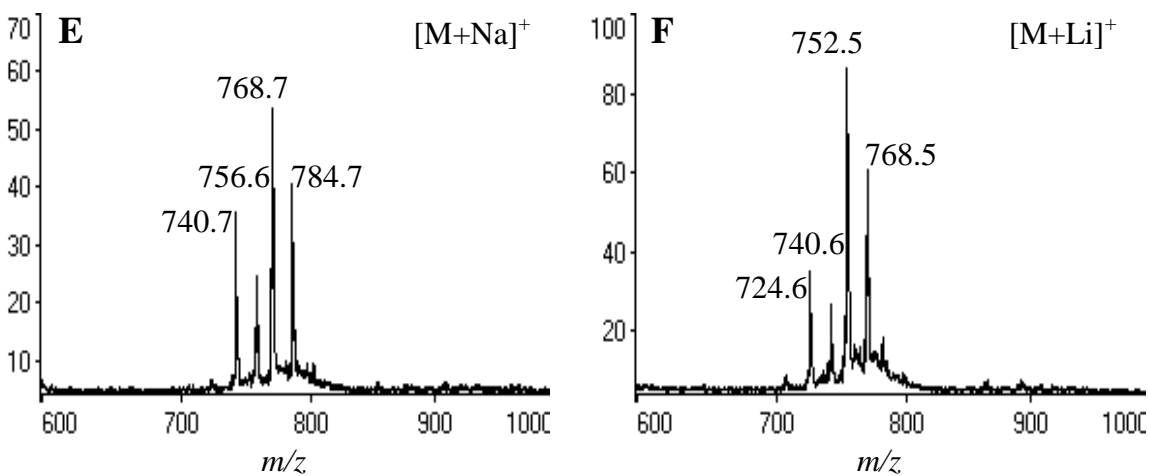
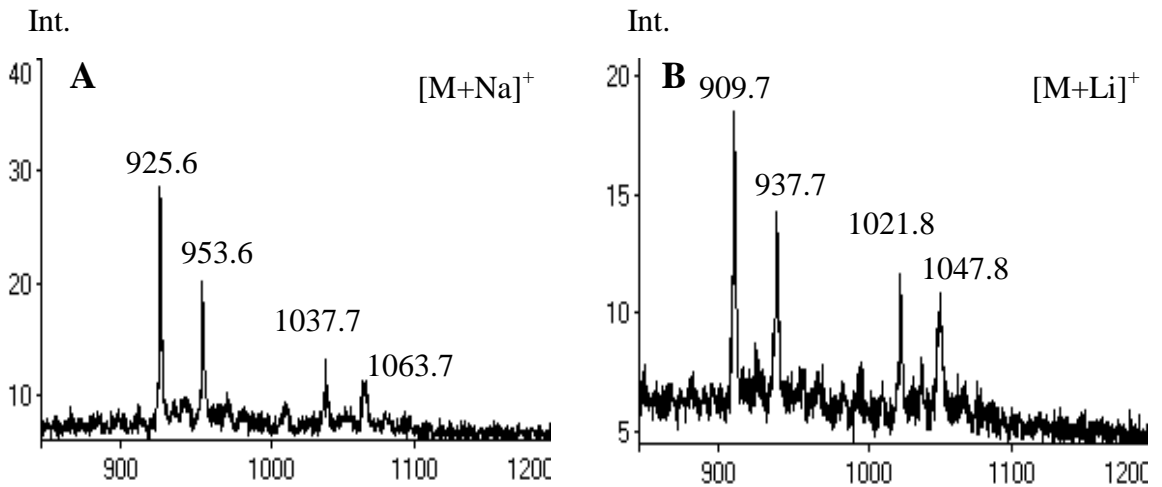
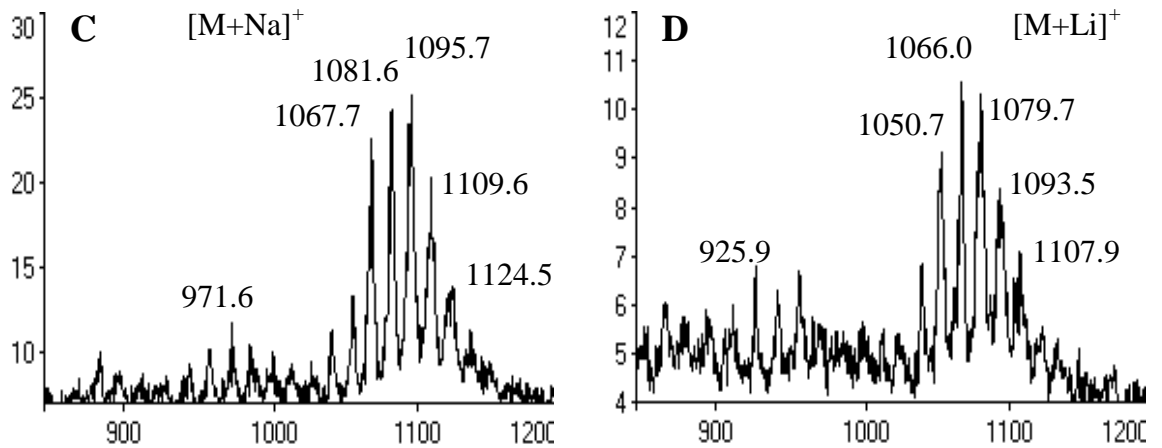


Abb. 11 MALDI-TOF Massenspektren von CMH. Die Ceramid-Monohexoside von adulten Würmern (A, B), Cercarien (C,D) und Eiern (E, F) wurden vor (A, C, E) und nach Zugabe (B, D, F) von 1 μ l 4 mM LiCl zum Probenfleck für die MALDI-TOF Massenspektrometrie eingesetzt. Als Matrix wurde ATT verwendet. Die Messungen wurden im Reflektor-Betrieb durchgeführt. Die Massen der Pseudomolekülonen sind auf eine Nachkommastelle gerundet angegeben.

CDH von adulten Würmern



CDH von Cercarien



CDH von Eiern

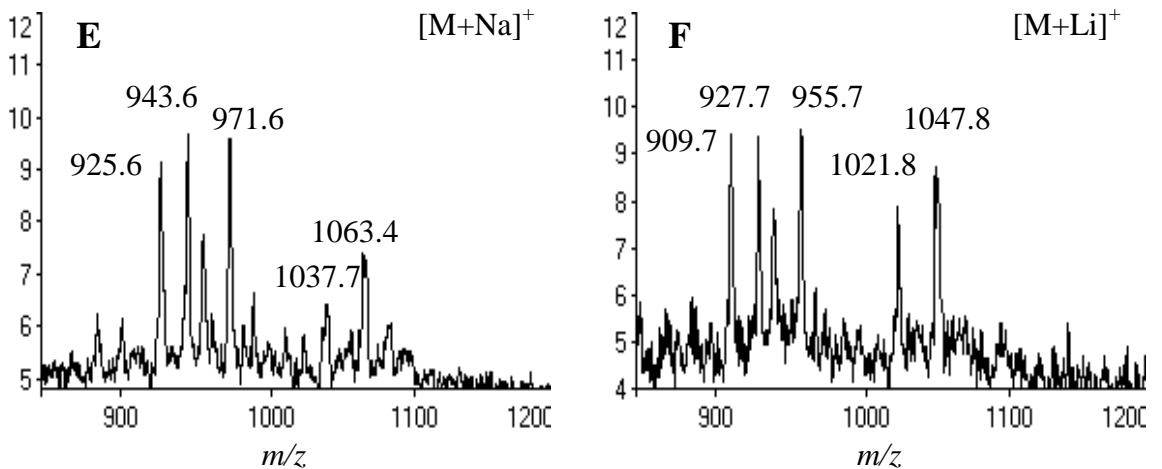


Abb. 12 MALDI-TOF Massenspektren von CDH. Ceramid-Dihexoside von adulten Würmern (A, B), Cercarien (C, D) und Eiern (E, F) wurden vor (A, C, E) und nach Zugabe (B, D, F) von 1 μ l 4 mM LiCl zum Probenfleck für die MALDI-TOF Massenspektrometrie eingesetzt. Als Matrix wurde ATT verwendet. Die Messungen wurden im Reflektor-Betrieb durchgeführt. Die Massen der Pseudomolekülonen sind auf eine Nachkommastelle gerundet.

Monosaccharid	Glykosphingolipide verschiedener Stadien					
	Adultwürmer		Cercarien		Eier	
	CMH	CDH	CMH	CDH	CMH	CDH
Glc	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gal	0.25	-	0.1	-	0.15	0.25
GalNAc	-	0.85	-	0.35	-	0.5

Tab. 6 Bausteinanalyse der Ceramid-Mono- und -Dihexoside von *S. mansoni*. Die nach Hydrolyse, Reduktion und Peracetylierung erhaltenen Alditolacetate wurden durch Gaschromatographie analysiert. Die Trennung erfolgte unter Verwendung von Quarz-Kapillarsäulen mit chemisch gebundener Phase (DB-1 Säule, 0.25 mm ID, 60 m und DB-210 Säule, 0.25 mm ID, 30 m). Zur Detektion wurde ein Flammenionisationsdetektor eingesetzt. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeiten der Alditolacetate.

Verknüpfung	Glykosphingolipide verschiedener Stadien						Partiell methylierte Alditolacetate
	Adultwürmer		Cercarien		Eier		
	CMH	CDH	CMH	CDH	CMH	CDH	
Glc(1-	1.0	0.15	1.0	0.1	1.0	0.4	2,3,4,6-Glc
Gal(1-	0.15	-	0.05	-	0.45	0.25	2,3,4,6Gal
-4)Glc(1-	-	1.0	-	1.0	-	1.0	2,3,6Glc
GalNAc(1-	-	0.2	-	0.1	-	0.65	3,4,6GalN(Me)AcOH

Tab. 7 Methylierungsanalyse der Ceramid-Mono -und -Dihexoside von *S. mansoni*. Die nach Methylierung (2.6.3), Hydrolyse, Reduktion und Peracetylierung erhaltenen Alditolacetate wurden durch Gaschromatographie (2.6.1.5) analysiert. Die Trennung erfolgte unter Verwendung von Quarz-Kapillarsäulen mit chemisch gebundener Phase (DB-1 Säule, 0.25 mm ID, 60 m und DB-210 Säule, 0.25 mm ID, 30 m). Die Detektion wurde nach chemischer Ionisation mit Ammoniak durch Einzelionenmessung der Pseudomolekülonen $[M+NH_4]^+$ (Hexitolacetate) bzw. $[M+H]^+$ und $[M+NH_4]^+$ (Aminohexitolacetate) durchgeführt. Die Identifizierung wurde anhand der Retentionszeiten der PMAAs vorgenommen.

3.2.2 Fraktionierung der kleinen Glykolipide von *S. mansoni*

Die kleinen Glykolipide wurden durch HPLC-Trennung fraktioniert und gereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden durch HPTLC-Orcinolfärbung (Abb. 9 und Abb. 10) und MALDI-TOF-MS auf Glykolipide getestet. Durch HPLC-Trennung wurden jeweils mehrere Fraktionen der CMH- und CDH-Spezies von *S. mansoni* adulten Würmern, Cercarien und Eiern erhalten. Die Fraktionen, die zuerst von der Iatrobeads-Säule eluierten, liefen auch auf der Dünnschichtplatte am weitesten. Dem unterschiedlichen Laufverhalten der verschiedenen Fraktionen entsprach ein unterschiedlicher Aufbau des Ceramids von CMH, wie aus den MALDI-TOF-Massenspektren zu sehen ist (Abb. 13, Abb. 14 und Abb. 15). Für die CDH-Spezies wurden ebenfalls die erhaltenen Fraktionen durch MALDI-TOF-MS untersucht. Die beobachteten Pseudomoleküle $[M+Na]^+$ und $[M+Li]^+$ der Haupt- und Nebenkomponenten von CMH und CDH von adulten Würmern (Tab. 8), Cercarien (Tab. 9) und Eiern (Tab. 10) sind tabellarisch zusammengestellt. Es fällt auf, daß bei CMH und CDH von Cercarien eine starke Heterogenität besteht und eine Vielzahl von Nebenkomponenten zu beobachten ist. Für das CMH von Cercarien variierten die Ceramide über einen Massenbereich von 260 Da mit über 60 verschiedenen Komponenten, beim CDH ist es ein Bereich von 210 Da mit über 40 verschiedenen Komponenten. CMH und CDH von adulten Würmern zeigen eine deutlich geringere Variabilität und erstrecken sich auch über einen geringeren Massenbereich. Bei CMH und CDH von Eiern wurde die geringste Heterogenität gefunden.

Die CMH-Spezies von adulten Würmern und Cercarien wurden zusätzlich nach Peracetylierung durch MALDI-TOF-MS analysiert. Aus der Zahl der Hydroxylgruppen, die einer Derivatisierung zugänglich waren, ließen sich Rückschlüsse auf die Ceramidstruktur ziehen: Bei 5 acetylierbaren Gruppen (Hydroxylgruppen) im CMH liegt weder Phytosphingosin noch eine Hydroxyfettsäure vor. Bei 6 Hydroxylgruppen besitzt das CMH entweder einen Phytosphingosin- oder einen Hydroxyfettsäure-Rest. Der Einbau von 7 Acetylgruppen läßt vermuten, daß das Ceramid aus Phytosphingosin und einer Hydroxyfettsäure aufgebaut ist.

Die Fraktionen 22 und 23 des CMH von adulten Würmern (Abb. 9) enthalten Hauptkomponenten, die nach Peracetylierung eine um 210 Da größere Molekülmasse aufweisen, was dem Einbau von 5 Acetylgruppen entspricht ($[M+Na]^+$ von 750.9 Da auf 960.8 Da bzw. von 722.8 Da auf 933.1 Da, siehe Tab. 8). Die Fraktionen 24 und 25 enthalten Hauptkomponenten, die nach Peracetylierung eine um 252 Da größere Masse haben und somit 6 Acetylgruppen aufgenommen haben ($[M+Na]^+$ von 740.8 Da auf 992.6 Da bzw. von 736.6 Da auf 988.9 Da, siehe Tab. 8). Die Hauptkomponenten der CMH-Fraktionen 26 bis 29, die nach MALDI-TOF-MS identische Zusammensetzung aufweisen, enthalten je 7 acetylierbare Gruppen (Hydroxylgruppen). Die Massen der Na^+ -Addukte vergrößern sich von 756.6 Da auf 1050.6 Da bzw. von 784.8 auf 1078.8 Da nach Peracetylierung. Diese zunehmende Polarität der CMH-Spezies in den späteren Fraktionen paßt gut zu ihrem Laufverhalten auf der Dünnschichtplatte (Abb. 9). Auch beim CMH von Cercarien ist zu beobachten, daß polarere CMH-Komponenten später eluieren und ein stärker acetylierbares Ceramid besitzen (Abb. 10, Abb. 14 und Tab. 9). Wegen der komprimierten Wiedergabe der Spektren konnten nicht alle Signale aufgelöst und beschriftet werden (Abb. 13 und Abb. 14 und Abb. 15). Die gefundenen Signale wurden deshalb tabellarisch zusammengestellt (Tab. 8, Tab. 9 und Tab. 10).

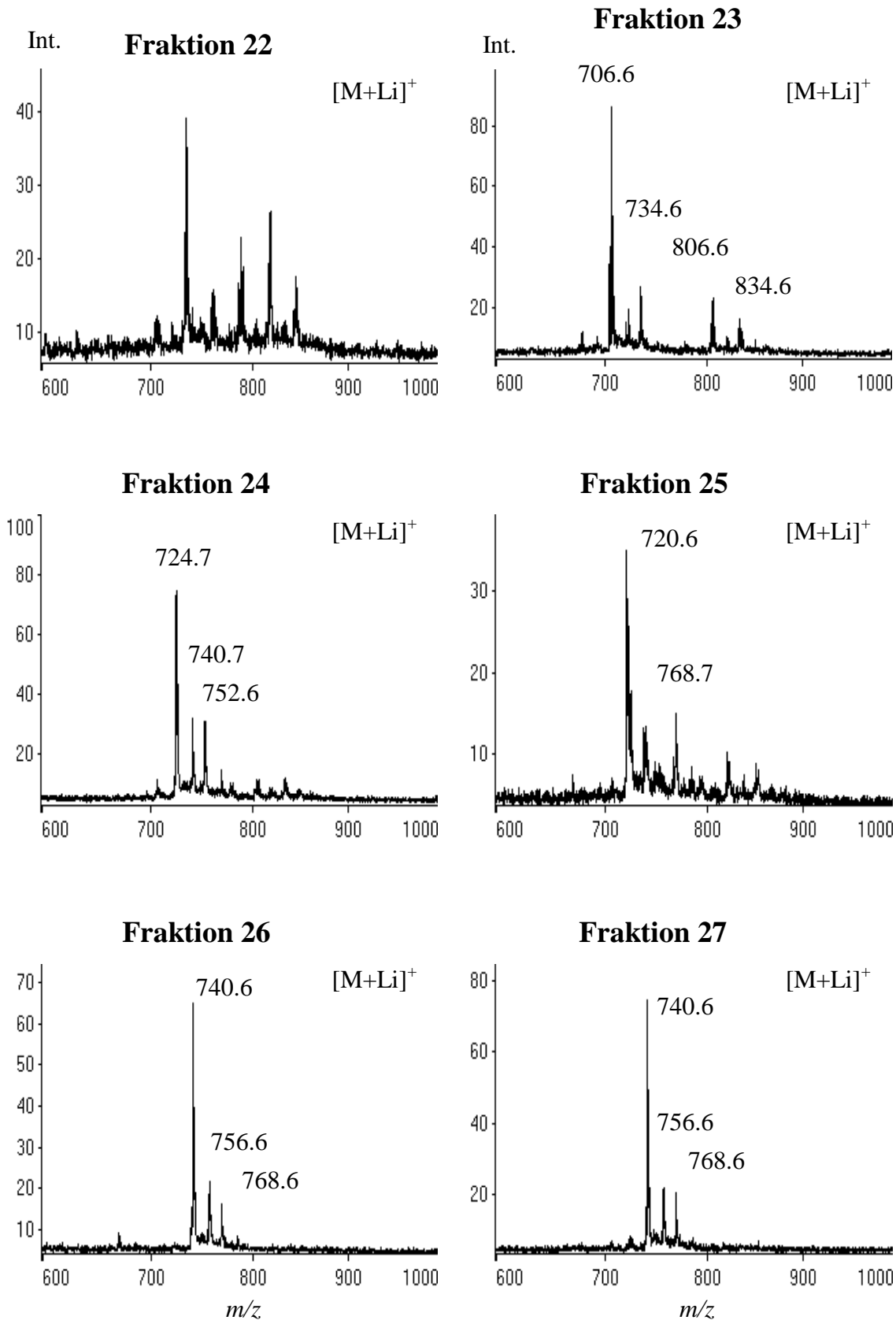


Abb. 13 MALDI-TOF-MS der HPLC-Fractionen mit unterschiedlichen CMH-Komponenten von adulten Würmern. Die verschiedenen Komponenten des Ceramid-Monohexosids von adulten Würmern wurden chromatographisch in sechs Fractionen (Fraktion 22-27) getrennt (Abb. 10). Die einzelnen Fractionen wurden für MALDI-TOF-MS Messungen verwendet. Als Matrix kam ATT zum Einsatz, es wurden Pseudomolekülonen $[M+Li]^+$ registriert, deren m/z -Werte auf eine Nachkommastelle gerundet wurden.

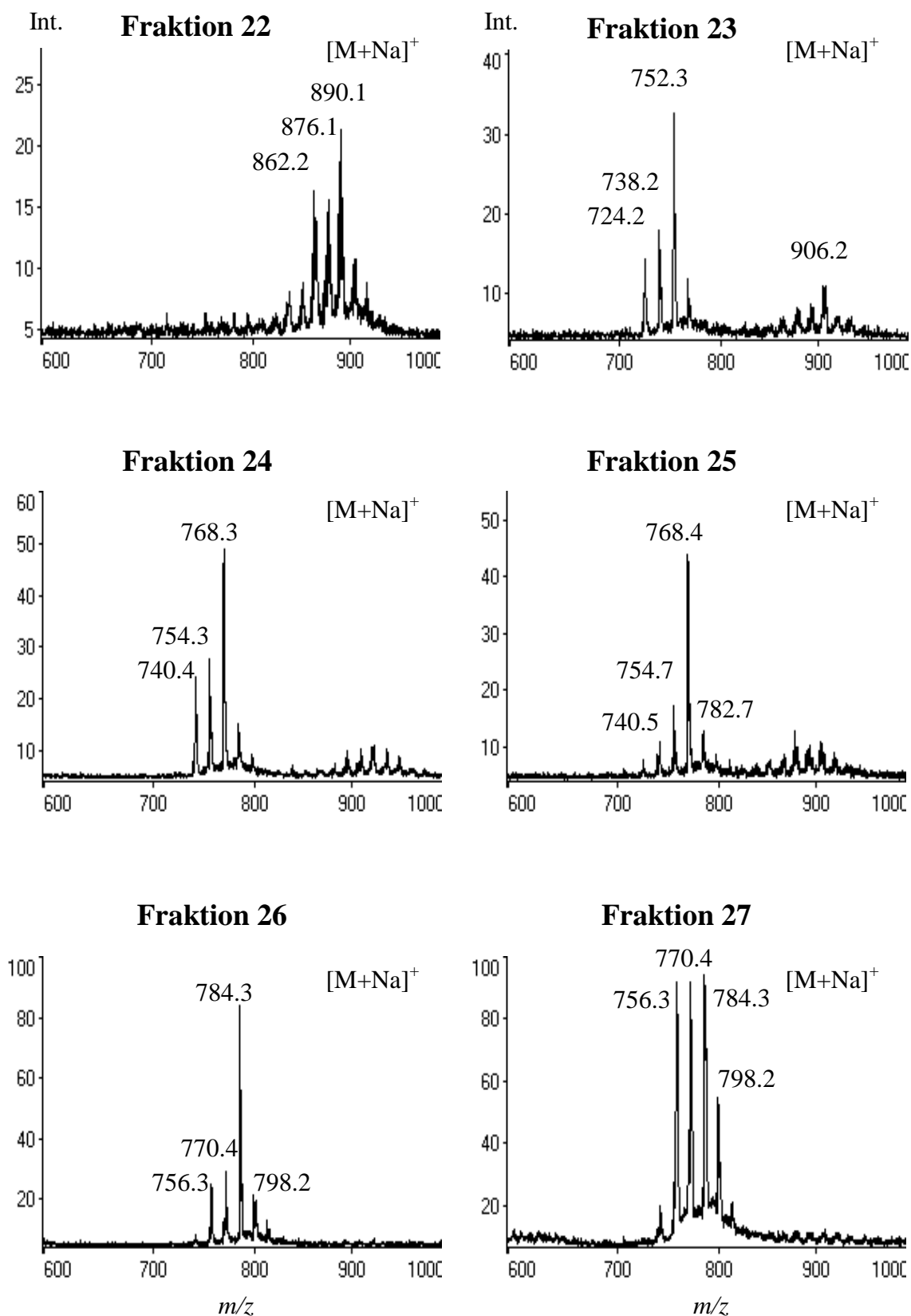


Abb. 14 MALDI-TOF-MS der HPLC-Fractionen mit unterschiedlichen CMH-Komponenten von Cercarien. Die verschiedenen Komponenten des Ceramid-Monohexosids von Cercarien wurden chromatographisch in sechs Fractionen (Fraktion 22-27) getrennt (Abb. 10). Die einzelnen Fractionen wurden für MALDI-TOF-MS Messungen verwendet. Als Matrix kam ATT zum Einsatz, es wurden Pseudomolekülonen [M+Na]⁺ registriert, deren m/z-Werte auf eine Nachkommastelle gerundet wurden.

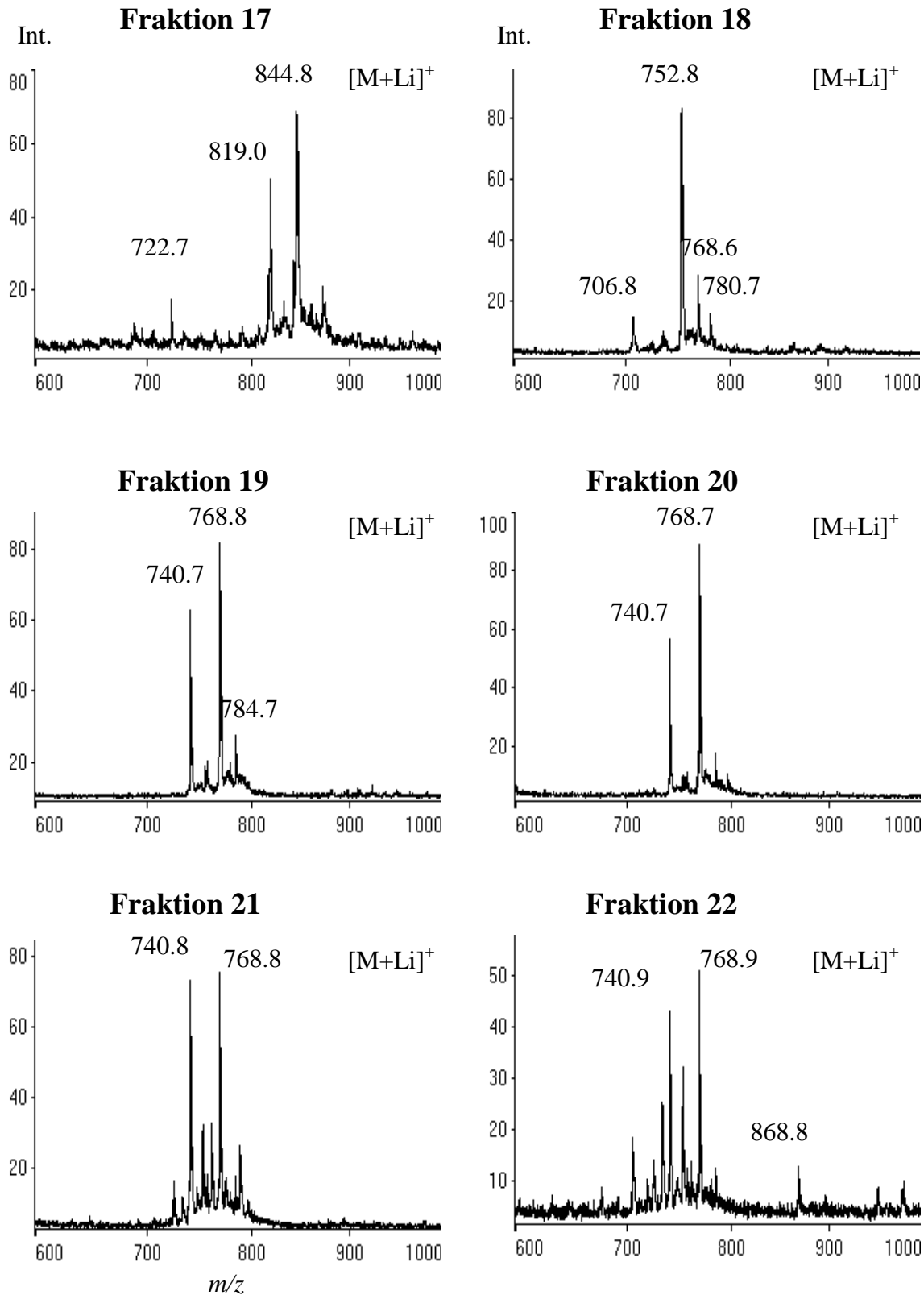


Abb. 15 MALDI-TOF-MS der HPLC-Fraktionen mit unterschiedlichen CMH-Komponenten von Eiern. Die verschiedenen Komponenten des Ceramid-Monohexosids von Eiern wurden chromatographisch in sechs Fraktionen (Fraktion 17-22) getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden für MALDI-TOF-MS Messungen verwendet. Als Matrix kam ATT zum Einsatz, es wurden hauptsächlich Pseudomolekülonen $[M+Li]^+$ registriert, deren m/z -Werte auf eine Nachkommastelle gerundet wurden. Bei den schwächeren Signalen handelt es sich zum Teil um Na^+ -Addukte.

CMH			CDH		CMH			CDH	
Addukt		Per-acetyliert	Addukt		Addukt		Per-acetyliert	Addukt	
Na ⁺	Li ⁺		Na ⁺	Li ⁺	Na ⁺	Li ⁺		Na ⁺	Li ⁺
694.6	678.5*								
708.6	692.5*					820.8	804.5*	1023.8	1007.9
720.6	704.5		923.9		822.8	806.6			
722.8	706.6	933.1 (5)	925.7	909.8	824.9				
			927.7	911.9	830.8				
726.5	710.6*				832.8	816.7*		1035.8	1019.8
732.9					834.9	818.6		1037.7	1021.9
736.6	720.6	988.9 (6)			836.8	820.5*			
738.8	722.5*	990.9 (6)	941.9	926.3		822.6*			
740.8	724.7*	992.6 (6)	943.7		840.8	824.7*	1134.7 (7)		
	726.6*				848.8	832.6*		1051.7	
748.7	732.6*		951.7		850.8	834.6			
750.9	734.6	960.8 (5)	953.9	938.3	852.8	836.7*			
756.6	740.7	1050.6 (7)		951.7	854.7	838.5*	1148.7 (7)		
766.8	750.7*		970.2	953.9	858.8	842.6*		1061.8	1045.9
768.8	752.6	1020.6 (6)	971.7		860.8	844.6		1063.8	1047.9
	754.7*				862.8	846.7*		1065.9	1049.7
772.6	756.6				864.9	848.5*			
	758.5*				866.6	850.6*			
776.8	760.5*		979.7	963.9	868.8	852.8*	1162.9 (7)		
778.9	762.9*		981.8	966.0				1079.9	
	766.6*				878.7			1081.7	
784.8	768.7	1078.8 (7)			880.8				
796.6	780.7*	1048.5 (6)			884.6	868.6*			
	782.7*				888.1			1091.8	
802.7	786.5*			989.6	892.1				
804.7	788.6		1007.8	991.8	896.8	880.7*	1190.9 (7)		
806.9	790.6*		1009.8	993.9	904.1				
812.7		1106.9 (7)			906.1				
	802.6*				918.1				

Tab. 8 MALDI-TOF-MS Untersuchungen der nativen und peracetylierten CMH- sowie der nativen CDH-Spezies von *S. mansoni* adulten Würmern. Die durch Iatrobeds-HPLC fraktionierten CMH-Komponenten (Abb. 9) wurden nativ (Abb. 13) bzw. peracetyliert (2.4.1) durch MALDI-TOF-MS analysiert. Natives CMH wurde erst als Na⁺-Addukt und nach Zugabe von LiCl als Li⁺-Addukt gemessen. Für peracetyliertes CMH wurden ebenfalls Na⁺- und Li⁺-Addukte gemessen; in der Tabelle sind die Na⁺-Addukte angegeben. Die Massendifferenz zum nativen CMH gibt Aufschluß über die Anzahl der addierten Acetylgruppen (Inkrement 42 Da). Die durch Iatrobeds-HPLC fraktionierten CDH-Spezies wurden nativ als Na⁺- und Li⁺-Addukte gemessen und den CMH-Spezies zugeordnet, die offensichtlich das gleiche Ceramid-Gerüst haben. Dadurch ergeben sich in jeder Zeile zwischen den entsprechenden Addukten von CMH und CDH Massenunterschiede von etwa 203 Da. Die mit Stern (*) markierten Signale sind in Abb. 13 nicht beschriftet.

CMH			CDH		CMH			CDH	
Addukt		Per-acetyliert	Addukt		Addukt		Per-acetyliert	Addukt	
Na ⁺	Li ⁺		Na ⁺	Li ⁺	Na ⁺	Li ⁺		Na ⁺	Li ⁺
722.9*	706.8								
724.2	708.9	934.7 (5)	927.8	911.9	868.9*	852.7			
736.8*	720.8				874.3*	858.8	1168.5 (7)	1077.8	
738.2	722.9	948.7 (5)	941.7	926.1	876.1*	860.8	1128.6 (6)	1079.8	1064.0
740.4	724.9	992.7 (6)	943.6	928.0	878.3*	863.0	1130.6 (6)	1081.9	1066.0
748.2*					880.3*	865.0	1132.6 (6)	1084.0	1068.0
750.7*					882.6*	866.7	1134.6 (6)		
752.3*	736.9	962.7 (5)	955.9	939.9			1176.8 (7)		
754.3	738.9	1006.7 (6)	957.8	941.8	884.7*				
756.4	740.7	1050.6 (7)	959.6			872.8			
764.9*					888.9*	874.8		1091.8	
766.9*	750.9		969.9	953.9	890.1*	876.8	1142.6 (6)	1093.8	1078.0
768.3	752.9	1020.7 (6)	971.8	955.9			1190.7 (7)		
770.4	754.4	1064.6 (7)	973.8		892.9*	878.8	1144.7 (6)	1095.5	1079.9
780.8*	764.9	990.7 (5)	983.8	967.9	894.3*		1146.7 (6)	1098.1	1081.9
782.7*	766.6	1034.6 (6)	985.7	969.8	896.2*	880.8			
784.3	768.9	1078.7 (7)	987.7		902.9*			1105.8	
			997.8	982.4	904.9*	888.9	1114.6 (5)	1107.7	1091.9
796.0*	780.8		999.8	983.8			1156.7 (6)		
798.2	782.6	1092.6 (7)	1001.6		906.2	890.9	1116.6 (5)	1109.8	1093.9
800.6*	784.6	1094.6 (7)					1158.7 (6)		
			1009.8	993.9	908.2*	892.9	1160.7 (6)	1111.8	1095.8
			1011.8	995.9	910.2*	894.7	1204.7 (7)		
	792.9				916.9*				
	794.8	1104.7 (7)			918.9*	902.8	1128.6 (5)	1121.7	1105.8
812.7*	796.6	1106.6 (7)			920.9*	904.9	1130.6 (5)	1123.7	1107.8
							1172.4 (6)		
820.8*	804.7		1023.7		922.4*	906.9	1174.4 (6)	1125.7	
822.8*	806.7		1025.8	1009.9	924.4*	908.7	1218.8 (7)		
	808.7				933.0*	916.8			
	810.7				934.9*	918.8		1137.9	1121.8
832.8*	816.9				936.9*	920.8	1230.8 (7)		
834.8*	818.9	1086.7 (6)	1038.0	1022.0	938.6*	922.7	1232.7 (7)		
836.8*	820.8	1088.7 (6)	1039.8	1024.0	946.7*				
838.8*	822.8	1090.7 (6)			948.9*	932.7			
	824.7				950.9*	934.8			
846.9*	830.8				952.7*	936.8	1246.6 (7)		
848.9*	832.8	1100.7 (6)	1051.7	1036.1	964.7*	948.8	1258.7 (7)		
850.9*	834.8	1060.7 (5)	1053.8	1038.1	966.7*	950.7			
		1102.7 (6)				962.8			
852.9*	836.7	1104.7 (6)	1055.9		878.8*		1272.6 (7)		
860.9*	844.9	1114.7 (6)	1063.8	1048.0	980.6*	964.8	1274.4 (7)		
862.2*	846.9	1074.8 (5)	1065.8	1050.0			1286.7 (7)		
864.9*	848.9		1068.0	1052.0			1288.7 (7)		
866.9*	850.9	1118.7 (6)	1069.7	1053.9			1300.7 (7)		

Tab. 9 MALDI-TOF-MS Untersuchungen der nativen und peracetylierten CMH- sowie der nativen CDH-Spezies von *S. mansoni* Cercarien. Die durch Iatrobeds-HPLC fraktionierten CMH-Komponenten (Abb. 10) wurden nativ (Abb. 14) bzw. peracetyliert (2.4.1) durch MALDI-TOF-MS analysiert. Für weitere Angaben siehe Tab. 8. Die mit Stern (*) markierten Signale sind in Abb. 14 nicht beschriftet.

CMH Addukt		CDH Addukt	
Na ⁺	Li ⁺	Na ⁺	Li ⁺
		923.9	907.9
722.7	706.8	925.9	909.9
	722.7	941.9	925.9
740.6	724.7*	943.9	927.8
750.7	734.9*	953.8	937.9
754.6	738.9*		
756.6	740.7		
768.7	752.6	972.0	955.9
772.8			
780.6	764.6*		
784.7	768.8	987.9	
796.8	780.6		
832.7	816.8*		
834.7	819.0	1038.3	1022.1
	832.9*		
	842.8*		
860.8	844.8	1064.3	1048.0
862.8	846.8*	1066.3	1050.0
885.3	868.8		
900.9	884.9*		

Tab. 10 MALDI-TOF-MS Untersuchungen der nativen CMH- und CDH-Spezies von *S. mansoni* Eiern. Die durch Iatrobeads-HPLC fraktionierten CMH-Komponenten wurden nativ (Abb. 15) durch MALDI-TOF-MS analysiert. Natives CMH wurde erst als Na⁺-Addukt und nach Zugabe von LiCl als Li⁺-Addukt gemessen. Die durch Iatrobeads-HPLC fraktionierten CDH-Spezies wurden nativ als Na⁺- und Li⁺-Addukte gemessen und den entsprechenden CMH-Spezies zugeordnet. Dadurch ergeben sich in jeder Zeile zwischen den entsprechenden Addukten von CMH und CDH Massenunterschiede von etwa 203 Da. Die mit Stern (*) markierten Signale sind in Abb. 15 nicht beschriftet.

3.2.3 Entwicklung einer Methode zum enzymatischen Abbau von Glykolipiden auf der MALDI-TOF-MS-Probenscheibe

Zur Bestimmung der anomeren Konfiguration der glykosidischen Bindung im CDH, wurden die Ceramid-Dihexoside der drei untersuchten Stadien von *S. mansoni* enzymatisch abgebaut. Die gängige Methode hierfür ist der Abbau in Gegenwart von 0.1 % Natrium-Taurodeoxycholat [511]. Die Detektion geschieht hier in der Regel durch HPTLC und anschließende chemische Färbung mit Orcinol. Diese Methode erfordert minimal 1 µg Glykolipid-Material. Um die enzymatische Sequenzbestimmung mit weniger Probenmaterial durchführen zu können, wurde eine Methode entwickelt, welche die MALDI-TOF-Massenspektrometrie mit dem enzymatischen Abbau verbindet. Hierzu wurden zwei Beobachtungen ausgenutzt: Yang und Orlando [501] fanden, daß die meisten Exoglykosidasen in 25 mM Ammoniumacetat-Puffer aktiv sind. Da dieser Puffer weitgehend flüchtig ist, können die Puffersalze aus der Probe entfernt werden und stören somit nicht bei einem nachfolgenden MALDI-TOF-MS-Experiment. Glocker *et al.* [498] beschrieben, daß Trypsin in Gegenwart der Matrix 6-Aza-2-thiothymin aktiv bleibt, und daß bei dieser Matrix auch nicht-kovalente Protein-Protein-Wechselwirkungen weitestgehend erhalten bleiben. Diese Matrix schien also eine weniger denaturierende Wirkung als viele andere Matrices zu haben. Es stellte sich nun die Frage, ob bei Zugabe von 6-Aza-2-thiothymin als Matrix und Ammoniumacetat als Puffersubstanz zusammen mit einer Exoglykosidase zu einer Glykolipid-Probe auf dem

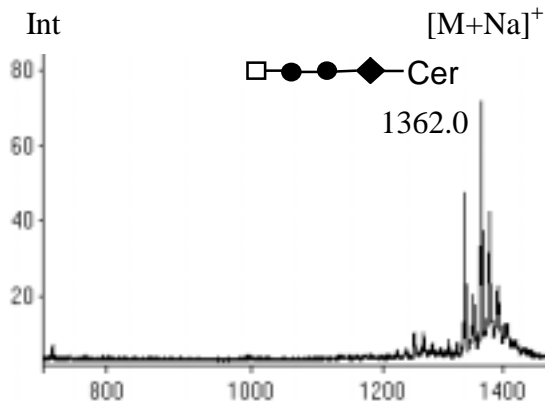
Probenteller abwechselnd MALDI-TOF-MS und enzymatische Abbaurunden mit der Glykolipid-Probe durchgeführt werden könnten. Dieses Konzept wurde zunächst anhand von zwei Glykolipid-Standards getestet (Abb. 16).

Als erste bekannte Probe wurde Tetraosylglobosid ($\text{GalNAc}\beta 3\text{Gal}\alpha 4\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta 1\text{Cer}$) verwendet und erst unbehandelt für MALDI-TOF-MS eingesetzt (Abb. 16, linke Spalte). Die beobachtete Vielzahl von Signalen rührt von der Heterogenität des Ceramidteils her. Der Kohlenhydrateil des Glykolipids wurde nacheinander mit β -*N*-Acetylhexosaminidase, α -Galactosidase und β -Galactosidase abgebaut, so daß sich als Endprodukt $\text{Glc}\beta 1\text{Ceramid}$ ergab. Nach dem Abbau mit β -*N*-Acetylhexosaminidase ergaben sich zwei Produkte, die dem Verlust eines HexNAc bzw. dem Verlust eines HexNAc und einer Hexose entsprachen. Offensichtlich enthielt die verwendete Enzympräparation α -Galactosidase-Nebenaktivität bzw. eine Verunreinigung. Die von *A. suum* verwendete Glykolipid-Fraktion enthielt drei Komponenten, die sich in der Länge der Kohlenhydratkette unterschieden (Abb. 16, rechte Spalte; Struktur des Ceramid-Pentahexosids: $\text{Gal}\alpha 3\text{GalNAc}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 3\text{Man}\beta 4\text{Glc}\beta 1\text{Cer}$). Nach Abbau mit α -Galactosidase verschwand das Signal des CPH bei m/z 1567.9, und es wurde ein intensives Signal bei m/z 1405.3 beobachtet, was der Abspaltung einer Hexose entspricht. Bei nachfolgender Behandlung mit β -*N*-Acetylhexosaminidase wurden ein bzw. zwei HexNAc abgespalten, wodurch ein neues Signal bei m/z 982.9 entstand. *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylgalactosamin konnten durch dieses Enzym nicht unterschieden werden. Eine letzte Inkubation mit β -Mannosidase führte zur Abspaltung einer Hexose, so daß ein Signal bei m/z 820.6 resultierte. Bei diesem Produkt handelte es sich um CMH, $\text{Glc}\beta 1\text{Ceramid}$, das enzymatisch nicht weiter zu spalten ist.

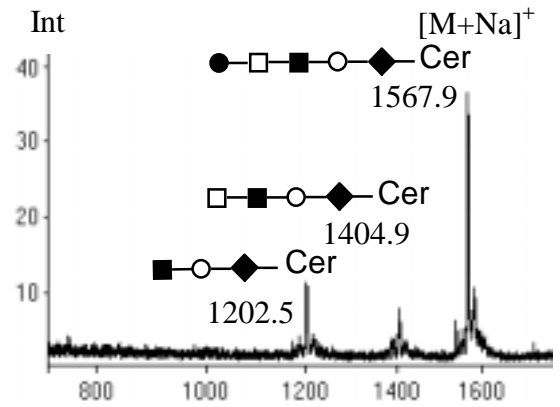
Folgende Schlüsse lassen sich aus diesem Experiment ziehen: Bei der Analyse auf dem MALDI-Probenteller reichen etwa 10 ng (ca. 10 pmol) Glykolipid als Ausgangssubstanz für die Bestimmung der Oligosaccharidsequenz sowie der anomeren Verknüpfungen aus. Die Signalintensitäten lassen vermuten, daß auch geringere Mengen an Glykolipid für eine Sequenzbestimmung ausreichen würden. Neben der 100fach höheren Sensitivität im Vergleich zur Analyse der Produkte durch HPTLC-Orcinolfärbung erlaubt diese Methode, da Detergentien vermieden werden, eine direkte massenspektrometrische Analyse der Abbauprodukte, ohne die Probe zuvor aufzureinigen zu müssen. Aufgrund ihrer Hydrophobizität haften die Glykolipide gut am Probenteller. Dadurch lassen sich Pufferkomponenten und Enzyme selektiv mit Wasse abwaschen, wodurch stärkere Signalintensitäten erzielt werden. Die Methode ist vielseitig einsetzbar und wurde inzwischen publiziert [500].

Abb. 16 (folgende Seite) Enzymatischer Abbau von Standard-Glykolipidgemischen. Für die Etablierung des enzymatischen Abbaus von Glykolipiden auf der MALDI-TOF-MS Probenscheibe wurden als Standard-Glykolipide Tetraosylglobosid (linke Spalte) und Zwitterionische Glykolipide von *A. suum* nach HF-Spaltung (rechte Spalte; [502]) eingesetzt. Für den Verdau wurden 1.5 mU α -Galactosidase aus grünen Kaffeebohnen (6 h), 80 mU β -*N*-Acetylhexosaminidase aus Schwertbohnen (über Nacht), 3.5 mU β -Mannosidase aus Schnecken (über Nacht) und 0.4 mU β -Galactosidase von *D. pneumoniae* (über Nacht) eingesetzt. Für die gesamte Analyse wurden jeweils 2-10 pmol Glykolipid verwendet. In einigen Fällen wurde 1 μ l einer 4 mM LiCl-Lösung zum Probenfleck zugegeben, um statt der Pseudomolekülonen $[\text{M}+\text{Na}]^+$ die Pseudomolekülonen $[\text{M}+\text{Li}]^+$ zu generieren, was eine erhöhte Sensitivität zur Folge hatte. Die MALDI-TOF-MS Messungen wurden im positiven Reflektormodus durchgeführt. Symbolschlüssel: ● = Gal, ■ = GlcNAc, O = Man, ◆ = Glc, □ = GalNAc, Cer = Ceramid.

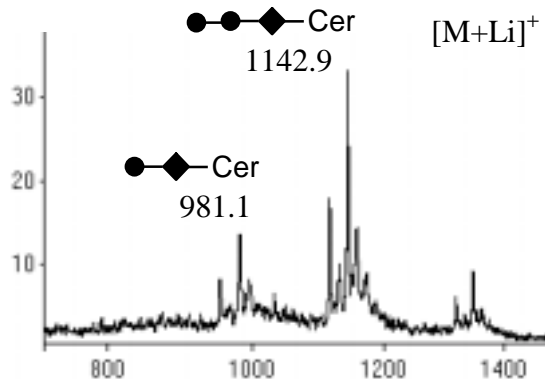
Tetraosylglobosid



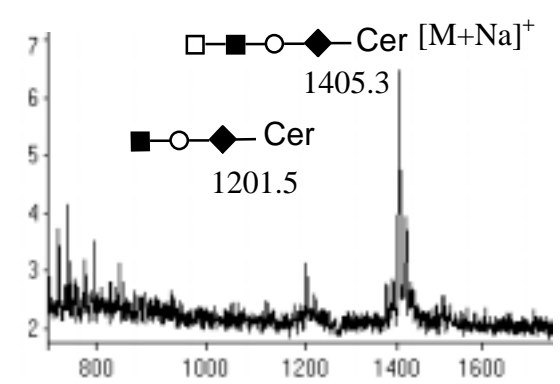
***A. suum* Glykolipide**



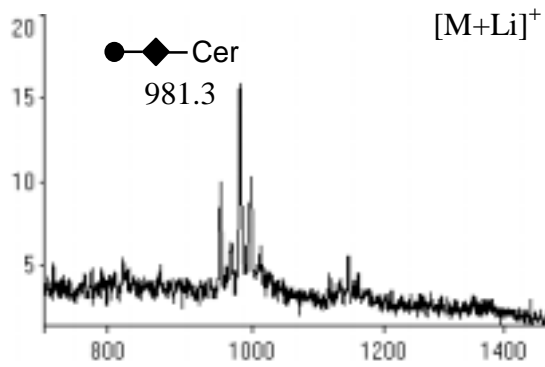
β-N-Acetylhexosaminidase



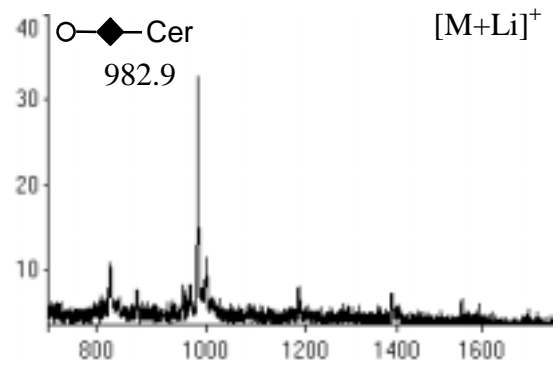
α-Galactosidase



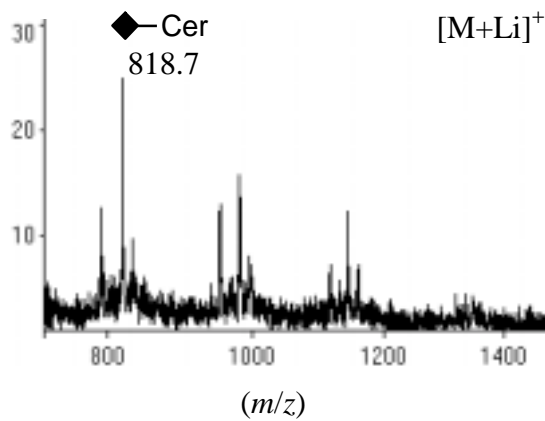
α-Galactosidase



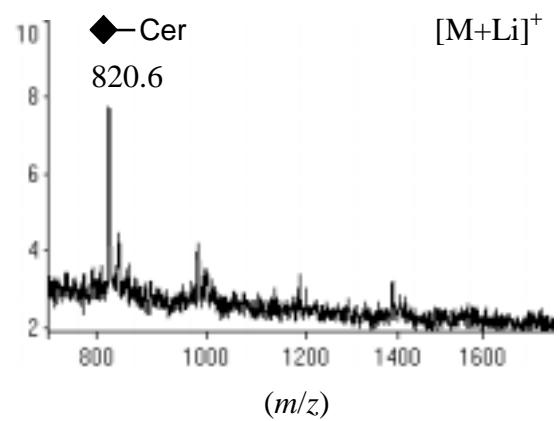
β-N-Acetylhexosaminidase



β-Galactosidase



β-Mannosidase



3.2.4 Enzymatischer Abbau von CDH auf der MALDI-TOF-MS-Probenscheibe

Die CDH-Komponenten von *S. mansoni* adulten Würmern, Cercarien und Eiern wurden durch enzymatischen Abbau auf dem MALDI-TOF-MS-Probensteller in die entsprechenden CMH-Komponenten überführt. Dadurch wurde die β -anomere Konfiguration der GalNAc4Glc-Bindung ermittelt. Bei den beobachteten Pseudomolekülonen wurde dabei eine charakteristische Differenz der m/z -Werte von 203 beobachtet.

Beim CDH von adulten Würmern wurden zwei Fraktionen nach HPLC-Trennung der kleinen Glykolipide für den enzymatischen Abbau auf der Probenscheibe verwendet. Es handelte sich hierbei um die Fraktionen 30 (Abb. 17A, B) und 32 (Abb. 17C, D). Während die Fraktionen 22 bis 29 hauptsächlich CMH enthielten (siehe Abb. 9 und Abb. 13), enthielt Fraktion 30 vergleichbare Mengen an CMH und CDH, und in den Fraktionen 31 bis 33 überwog CDH. Die CDH-Komponenten der Fraktion 30 lieferten als Hauptsignal Pseudomolekülonen $[M+Na]^+$ bei m/z 1037.7 und 1063.8 (Abb. 17A). Nach enzymatischem Abbau mit β -*N*-Acetylhexosaminidase wurden Pseudomolekülonen $[M+Na]^+$ bei m/z 834.5 und 860.6 gemessen. CMH-Spezies mit korrespondierenden Molekülmassen wurden in der ersten Ceramid-Monohexosid-Fraktion (Abb. 13A, Fraktion 22) gefunden ($[M+Li]^+$ bei m/z 818.6 und 844.6). CDH der Fraktion 32 mit Pseudomolekülonen $[M+Na]^+$ bei m/z 925.7 und 953.9 (Abb. 17C) ergab nach enzymatischem Abbau Pseudomolekülonen $[M+Na]^+$ bei m/z 722.5 und 750.5 (Abb. 17D). CMH-Spezies mit entsprechenden Molekülmassen wurden in der zweiten CMH-Fraktion (Abb. 13B, Fraktion 23) gefunden ($[M+Li]^+$ bei m/z 706.6 und 734.6).

Bei den Ceramid-Dihexosiden von *S. mansoni* Cercarien wurden drei Einzelfraktionen nach HPLC-Trennung für den enzymatischen Abbau auf dem MALDI-TOF-MS-Probensteller verwendet (Abb. 18). Bei Cercarien wurden CMH und CDH in zwei separaten HPLC-Läufen getrennt, weshalb die in Abb. 18 angegebenen Fraktionen nicht den Fraktionen in Abb. 10 entsprechen. CDH der Fraktion 24 führte zu Pseudomolekülonen $[M+Na]^+$ bei m/z 1068.0, 1081.9, 1095.5 und 1109.8 (Abb. 18A). Es wurden jeweils auch Pseudomolekülonen $[M+Na]^+$ bei einem um 2 niedrigeren m/z -Wert gemessen (siehe Tab. 11). Nach enzymatischem Abbau mit β -*N*-Acetylhexosaminidase wurden Pseudomolekülonen $[M+Na]^+$ bei m/z 864.7, 878.6, 892.6 und 906.6 (Abb. 18B) sowie bei jeweils um 2 Masseneinheiten niedrigeren m/z -Werten (Tab. 11) gemessen. CMH-Spezies mit vergleichbaren Molekülmassen wurden in der ersten CMH-Fraktion von Cercarien (Abb. 14, Fraktion 22) gefunden (s. $[M+Na]^+$ bei m/z 862.2, 864.2, 876.1, 878.1, 890.1, 892.1, 904.1 und 906.1). Die Ceramid-Dihexoside der Fraktion 27 (Abb. 18C) mit Pseudomolekülonen $[M+Na]^+$ bei m/z 944.0, 957.8, 971.8 und 985.7 entsprachen nach enzymatischem Abbau Pseudomolekülonen $[M+Na]^+$ bei m/z 740.7, 754.6, 768.6 und 782.4 (Abb. 18D). CMH-Komponenten mit gleichen Molekülmassen wurden in der dritten und vierten CMH-Fraktion (Abb. 14, Fraktion 24 und 25) gefunden (s. $[M+Na]^+$ bei m/z 740.4, 754.3 und 768.3). In der Fraktion 28 (Abb. 18E) wurden CDH-Spezies mit Pseudomolekülonen $[M+Na]^+$ bei m/z 943.6, 959.6, 973.8, 987.7 und 1001.6 registriert. Nach enzymatischem Abbau waren Pseudomolekülonen $[M+Na]^+$ bei m/z 770.6 und 784.6 nachweisbar (Abb. 18F), die auch bei den CMH-Spezies der Fraktionen 26 und 27 (Abb. 14) vorkamen (s. $[M+Na]^+$ bei m/z 756.3, 770.4, 784.3 und 798.2).

Bei CDH von *S. mansoni* Eiern wurden ebenfalls drei Einzelfraktionen der HPLC-Trennung für den enzymatischen verwendet. Die Fraktionen 17 bis 22 enthielten hauptsächlich CMH (siehe Abb. 15). Ab Fraktion 23 dominierten dann die CDH-

Komponenten. CDH der Fraktion 23 lieferte als Hauptspezies Pseudomolekülonen $[M+Li]^+$ bei m/z 1022.1 und 1048.0 (Abb. 19A). Ceramid-Dihexoside mit gleichen Molekülmassen wurden auch für CDH adulter Würmer gemessen (Abb. 17A, Fraktion 30; s. $[M+Na]^+$ bei m/z 938.0, 1037.7 und 1063.8). Nach enzymatischem Abbau mit β -*N*-Acetylhexosaminidase wurden Pseudomolekülonen $[M+Li]^+$ bei m/z 734.9, 818.9 und 844.9 gemessen (Abb. 19B). Analoge Signale wurden auch bei Analyse der ersten CMH-Fraktion von Eiern gefunden (Abb. 15A, Fraktion 17; s. $[M+Li]^+$ bei m/z 819.0 und 844.8). Gleiches gilt für CDH der Fraktionen 24 (Abb. 19C) und 25 (Abb. 19E), die vor Enzymabbau Pseudomolekülonen $[M+Li]^+$ bei m/z 909.9 und 955.9 bzw. 927.8 und 955.8 und nach enzymatischem Abbau Pseudomolekülonen $[M+Li]^+$ bei m/z 706.8 und 752.8 (Abb. 19D) bzw. m/z 724.8 und 752.9 (Abb. 19F) lieferten. CMH-Komponenten mit vergleichbaren Molekülmassen waren bereits in der zweiten CMH-Fraktion (Abb. 15B, Fraktion 18) gefunden worden.

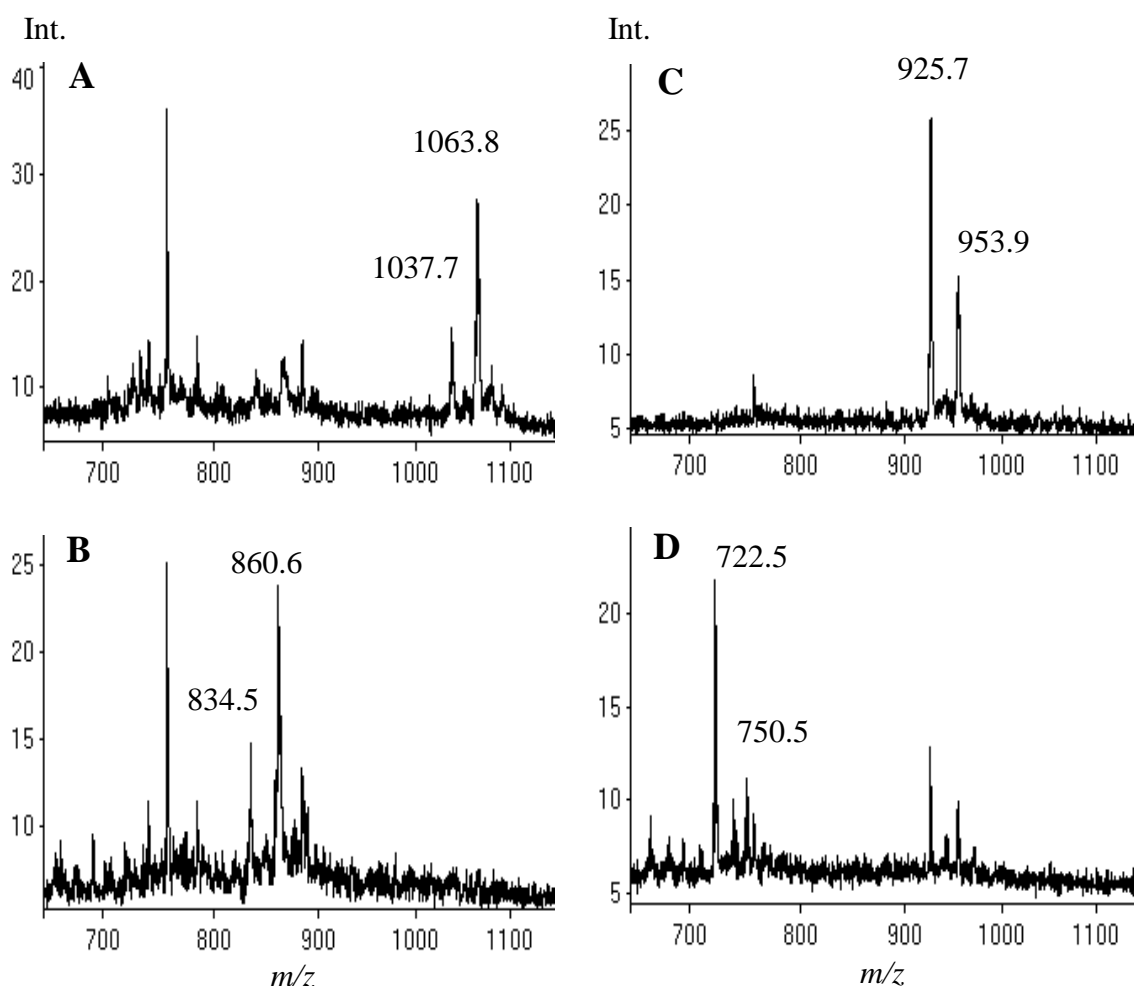


Abb. 17 Enzymatischer Abbau von *S. mansoni* Ceramid-Dihexosiden adulter Würmer mit β -*N*-Acetylhexosaminidase auf der MALDI-TOF-MS Probenscheibe. 2 bis 10 pmol der durch HPLC gewonnenen CDH-Fraktionen wurden für MALDI-TOF-MS im Reflektor-Modus eingesetzt. Als Matrix wurde ATT verwendet. In den CDH-Fraktionen waren durchweg auch CMH-Spezies vorhanden. Durch enzymatischen "on-target"-Abbau mit β -*N*-Acetylhexosaminidase aus Schwertbohnen über Nacht wurden die CDH in CMH-Komponenten überführt. Es wurde jeweils ein charakteristischer Massenunterschied von 203 Da der registrierten Na^+ -Addukte beobachtet. Iatrobeads HPLC-Fraktion 30 (A, B) und 32 (C, D) von *S. mansoni* Glykolipiden adulter Würmer vor (A, C) und nach (B, D) enzymatischer Spaltung.

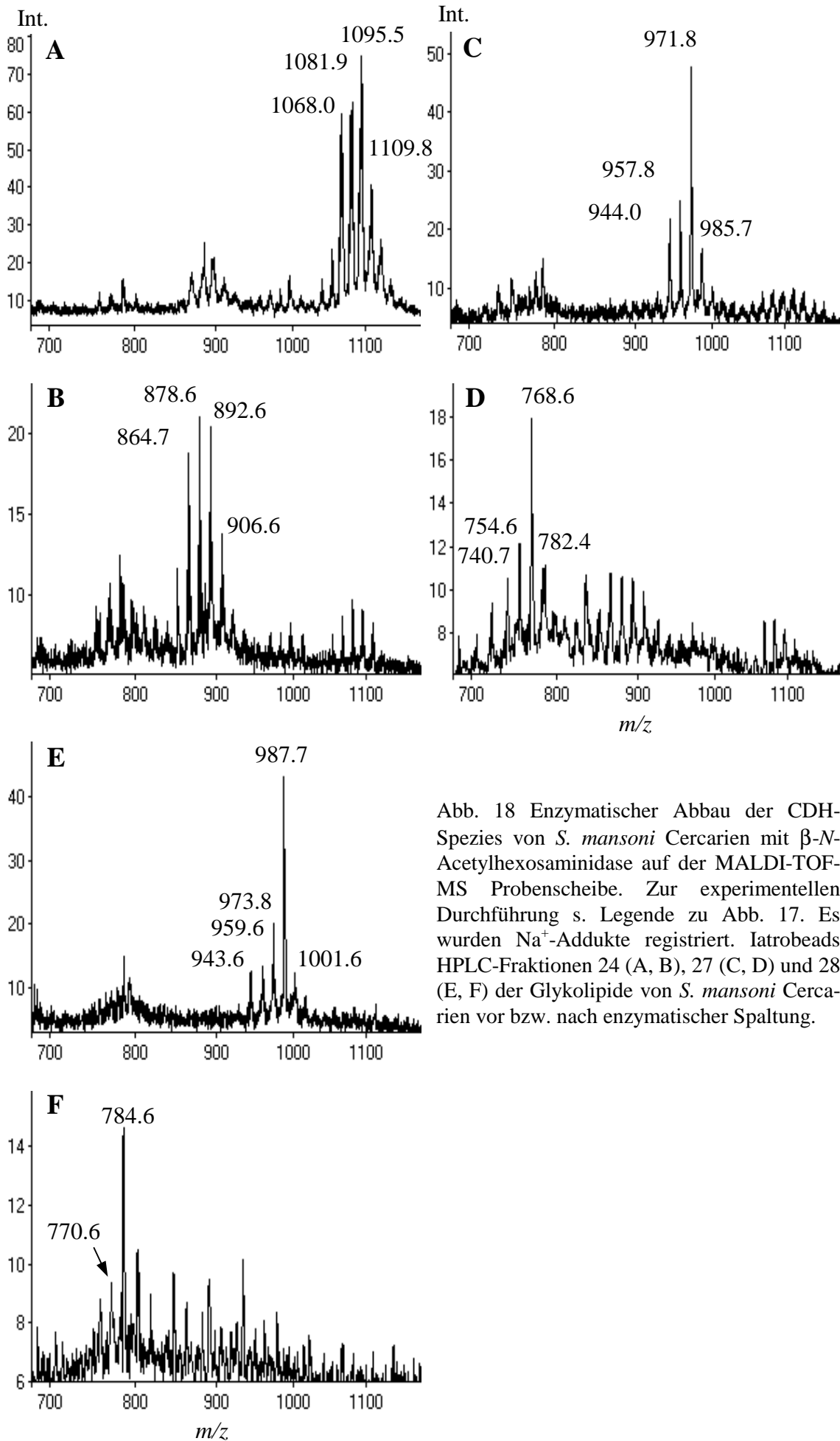


Abb. 18 Enzymatischer Abbau der CDH-Spezies von *S. mansoni* Cercarien mit β -*N*-Acetylhexosaminidase auf der MALDI-TOF-MS Probenscheibe. Zur experimentellen Durchführung s. Legende zu Abb. 17. Es wurden Na^+ -Addukte registriert. Iatrobeads HPLC-Fractionen 24 (A, B), 27 (C, D) und 28 (E, F) der Glykolipide von *S. mansoni* Cercarien vor bzw. nach enzymatischer Spaltung.

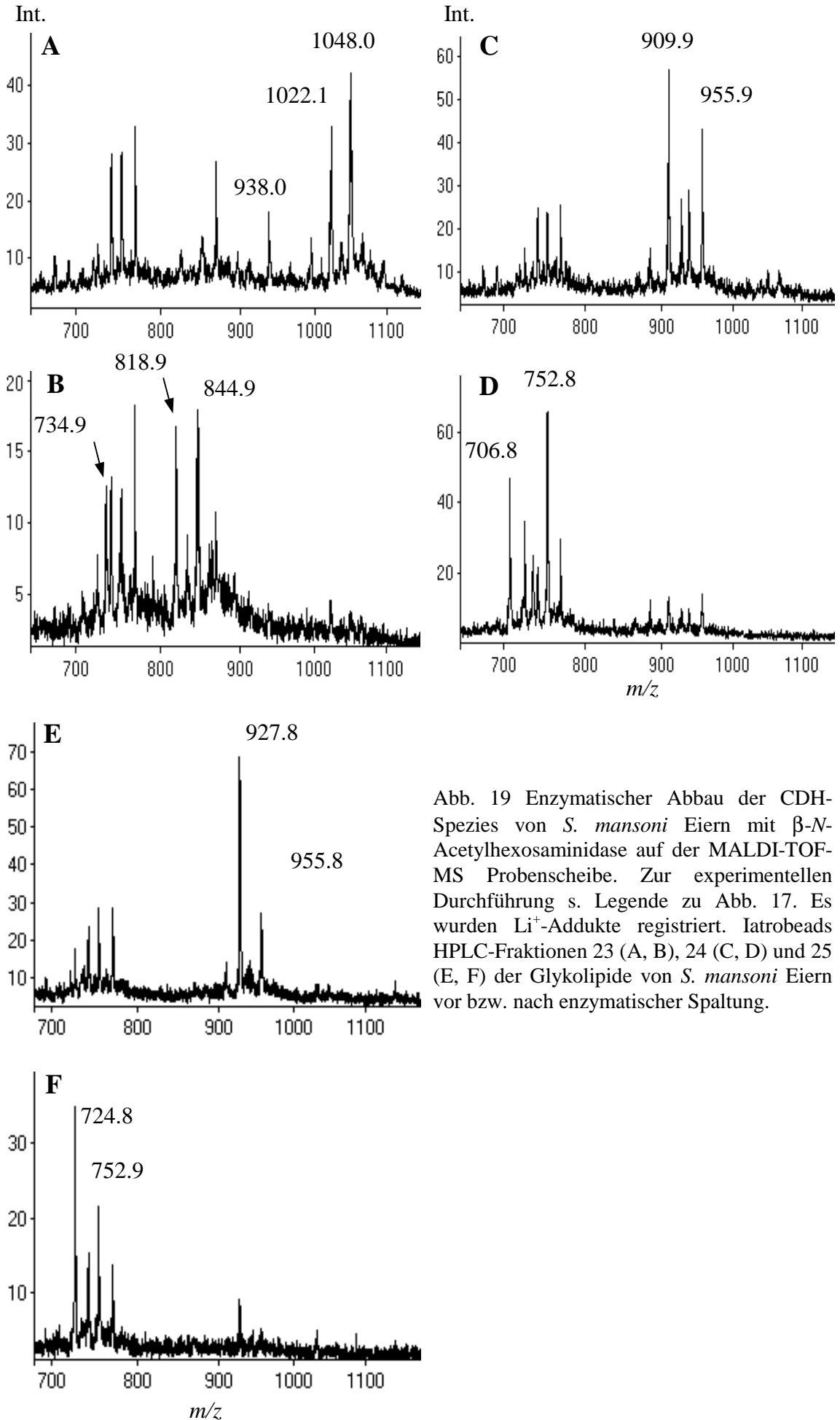


Abb. 19 Enzymatischer Abbau der CDH-Spezies von *S. mansoni* Eiern mit β -*N*-Acetylhexosaminidase auf der MALDI-TOF-MS Probenscheibe. Zur experimentellen Durchführung s. Legende zu Abb. 17. Es wurden Li^+ -Addukte registriert. Iatrobeds HPLC-Fractionen 23 (A, B), 24 (C, D) und 25 (E, F) der Glykolipide von *S. mansoni* Eiern vor bzw. nach enzymatischer Spaltung.

Glykolipid	Signale vor Abbau		Neue Signale nach Abbau
	CMH [M+Na] ⁺	CDH [M+Na] ⁺	CDH-HexNAc Na ⁺ -Addukt
Cercarien	(756.9)	1039.9	
Fraktion 24	(770.5)	1053.9	850.6
	(784.5)	1066.0	862.7
	(800.4)	1068.0	864.7
		1079.9	876.6
		1081.9	878.6
		1093.9	890.6
		1095.5	892.6
		1107.8	904.6
		1109.8	906.6
		1121.7	918.7
	1135.8		
Cercarien	(732.4)	944.0	740.7
Fraktion 27	(750.2)	957.8	754.6
	(748.2)	971.8	768.6
	(768.7)	985.7	782.4
	(770.7)	999.8	
	(776.5)		
	(784.8)		
Cercarien	(777.6)	943.6	
Fraktion 28	(784.9)	959.6	756.5
	(791.6)	971.6	
		973.8	770.6
		987.7	784.6
	1001.6		

Tab. 11 Enzymatischer Abbau der CDH-Spezies von *S. mansoni* Cercarien mit β -N-Acetylhexosaminidase auf der MALDI-TOF-MS Probenscheibe. Zusammenfassung der gewonnenen Daten (vergl. Abb. 18). Zur experimentellen Durchführung siehe Legende zu Abb. 17. Signale, die auf Kontamination der Fraktionen mit CMH beruhen, sind in Klammern angegeben. CDH-HexNAc: CDH nach Abspaltung eines N-Acetylhexosamins.

3.2.5 Analyse deacylierter Ceramid-Monohexoside

Um feststellen zu können, inwieweit die beobachtete Heterogenität der CMH- und CDH-Spezies, die im Cercarien-Stadium am ausgeprägtesten war, auf eine Variation der Fettsäure und/oder der Sphingoidbase zurückzuführen ist, wurden die CMH-Spezies der drei untersuchten Stadien deacyliert (2.4.2) und dann entweder als deacylierte Ceramid-

Monohexoside (Lyso-CMH) oder als peracetylierte Lyso-Ceramid-Monohexoside (2.4.4) durch MALDI-TOF-MS untersucht.

Als Standardsubstanz wurde Galactosylcerebrosid verwendet. Die gemessene Masse von Lyso-Galactosylcerebrosid betrug 484.4 ($[M+Na]^+$; nicht gezeigt) bzw. 468.3 ($[M+Li]^+$; nicht gezeigt). Diese Massen deuteten auf das Vorkommen von Sphingosin in Galactosylcerebrosid hin. Im folgenden wurde das Sphingosin mit einem 18-Kohlenstoffatom-Grundgerüst mit d18:1 abgekürzt, wobei "d" die Zahl der Hydroxygruppen (Dihydroxy-) und "1" die Zahl der Doppelbindungen in der Kohlenwasserstoffkette angab.

Für die Analyse der Ceramid-Heterogenität der Glykolipide von *S. mansoni* wurde CMH von adulten Würmern, Cercarien und Eiern deacyliert und die Produkte durch MALDI-TOF-MS analysiert (Abb. 20). Die massenspektrometrische Untersuchung zeigte für CMH von adulten Würmern Pseudomolekülonen $[M+Li]^+$ bei m/z 468.7, 486.6 und 514.7 (Abb. 20A). Zieht man die Massen des addierten Lithium-Ions (7 Da) und des Kohlenhydratanteils (162 Da) ab, so ergeben sich für die entsprechenden Sphingoidbasen Massen von 299 Da, 317 Da und 345 Da, die anhand von Standards, sowie rechnerisch den Sphingoidbasen C18-Sphingosin (d18:1), C18-Phytosphingosin (t18:0) und C20-Phytosphingosin (t20:0) zugeordnet werden können. Daß es sich bei den gemessenen Pseudomolekülonen um Sphingoidbasen handelte, wurde dadurch unterstützt, daß nach partieller *N*-Acetylierung Lyso-Glykolipide mit einer jeweils um 42 Da höheren Masse gefunden wurden (Einbau einer Acetylgruppe; Abb. 20B). Die entsprechenden Analysen von Lyso-CMH und *N*-acetyliertem Lyso-CMH wurden auch für Cercarien (Abb. 20C, D) und Eier (Abb. 20E, F) durchgeführt. Die darauffolgende Peracetylierung überführte das Lyso-Glykolipid mit C18-Sphingosin in ein Derivat mit insgesamt sechs Acetylgruppen (Abb. 21A, $[M+Li]^+$ 720.8). Entsprechende Produkte mit insgesamt sieben eingebauten Acetylgruppen ergaben sich für die Lyso-Glykolipide mit C18-Phytosphingosin (t18:0; z. B. Abb. 21A, $[M+Li]^+$ 780.8), C19-Phytosphingosin (t19:0; Abb. 21B, $[M+Li]^+$ 795.3) und C20-Phytosphingosin (t20:0; z. B. Abb. 21C, $[M+Li]^+$ 808.9). Beim Vergleich der Stadien läßt sich sagen, daß bei den adulten Würmern anscheinend die Sphingoidbasen d18:1 und t18:0 überwiegen, während bei Cercarien und Eiern t18:0 und t20:0 dominieren.

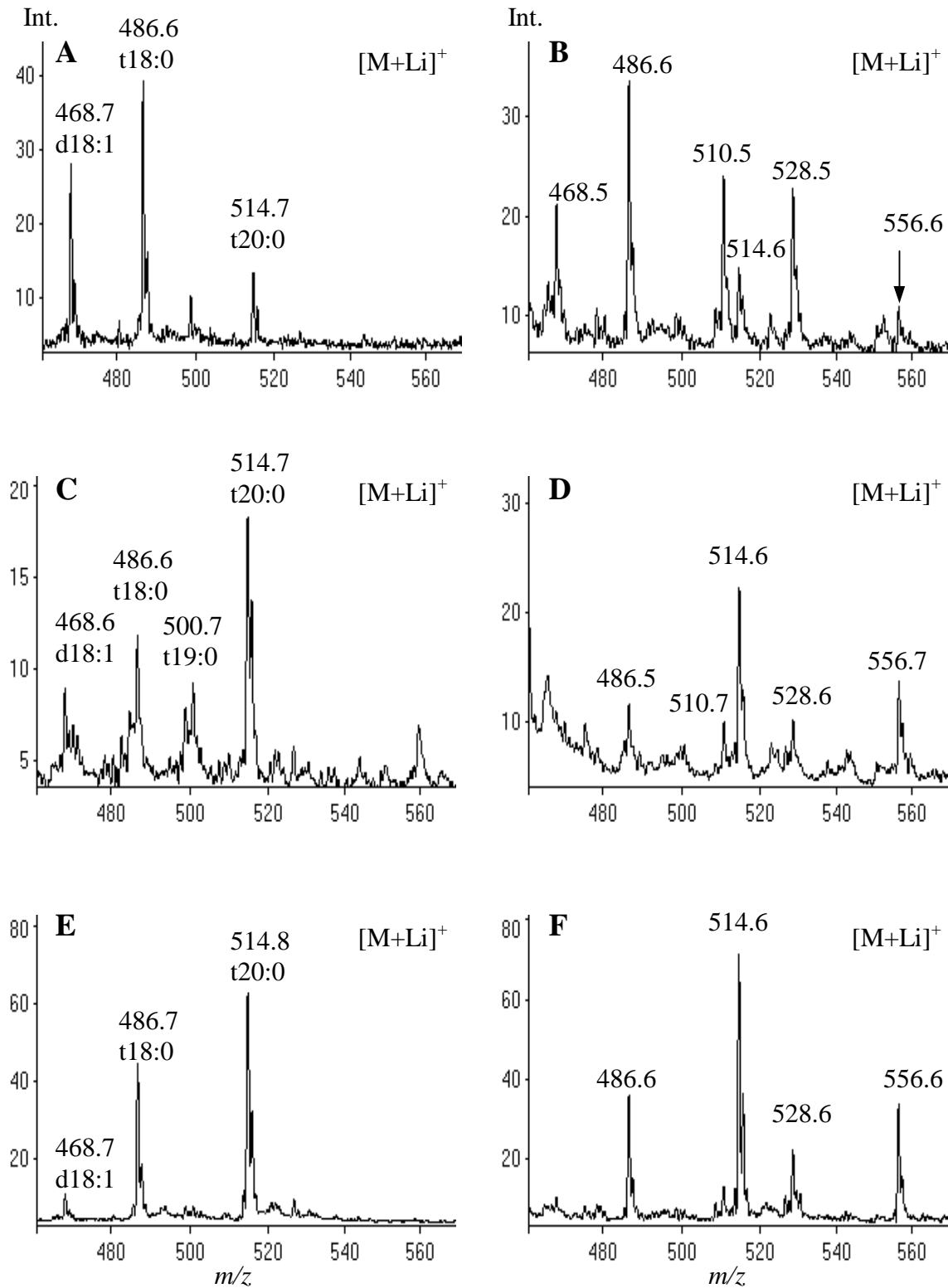


Abb. 20 Analyse von Lyso-CMH und partiell *N*-acetyliertem Lyso-CMH durch MALDI-TOF-MS. Ceramid-Monohexoside von *S. mansoni* adulten Würmern (A, B), Cercarien (C, D) und Eiern (E, F) wurden alkalisch deacyliert und im positiven Reflektormodus mit ATT als Matrix und 4 nmol LiCl pro Probenfleck analysiert (A, C, E). Die Pseudomolekülonen ($[M+Li]^+$) stellen monoisotopische Massen dar. Alternativ wurden die Proben erst partiell *N*-acetyliert und dann unter den gleichen Bedingungen analysiert (B, D, F).

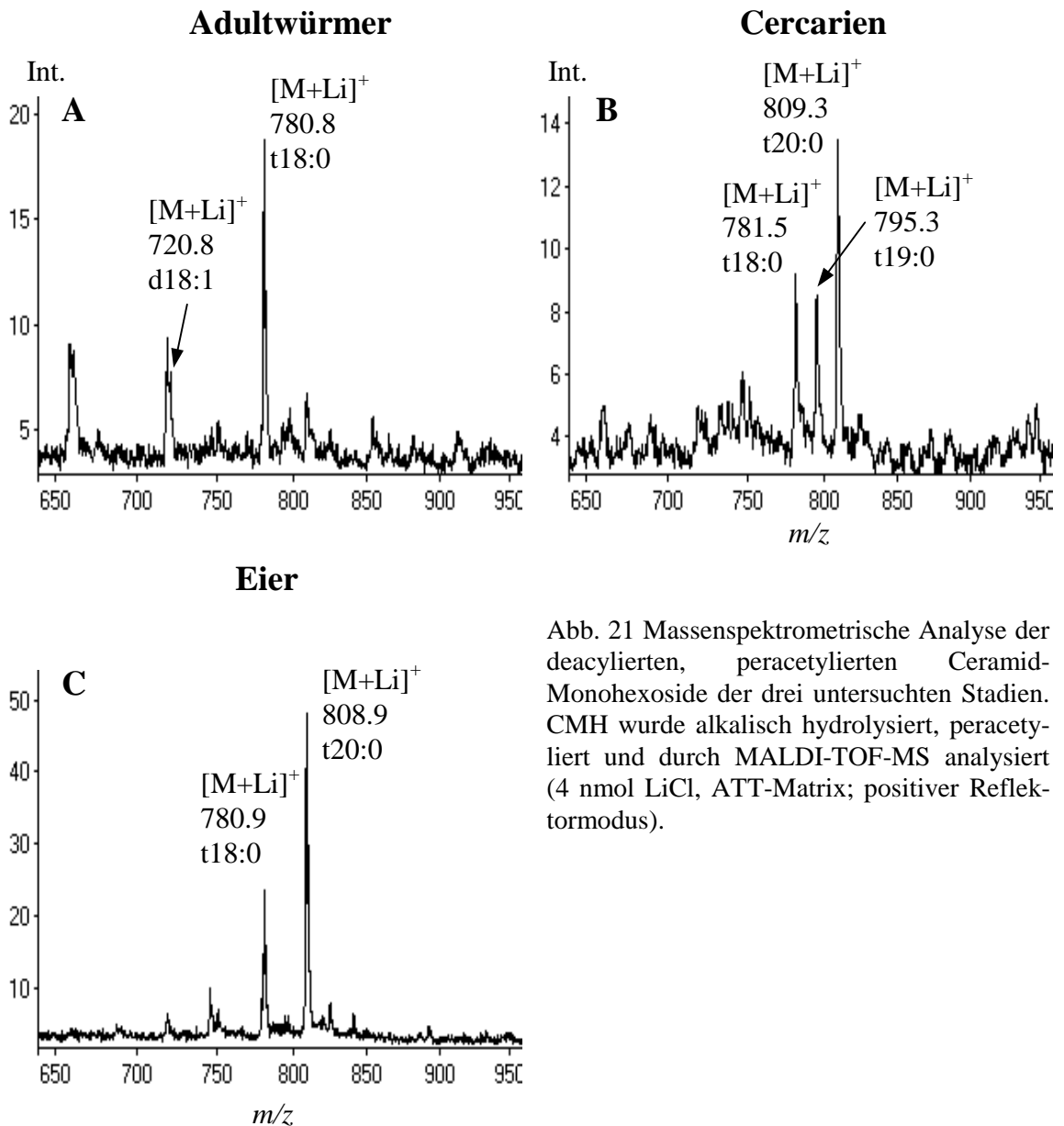


Abb. 21 Massenspektrometrische Analyse der deacylierten, peracetylierten Ceramid-Monohexoside der drei untersuchten Stadien. CMH wurde alkalisch hydrolysiert, peracetyliert und durch MALDI-TOF-MS analysiert (4 nmol LiCl, ATT-Matrix; positiver Reflektormodus).

3.2.6 Sphingoidbasen-Analytik

Die Sphingoidbasen wurden durch Hydrolyse nach Ando (2.7.1.2) freigesetzt und als Gemisch durch MALDI-TOF-MS analysiert (Abb. 22). Beim CMH adulter Würmer wurden C18-Phytosphingosin und C18-Sphingosin sowie geringe Mengen C20-Phytosphingosin nachgewiesen. Beim CMH von Cercarien wurden C18-Phytosphingosin und C20-Phytosphingosin gefunden. Das C18-Sphingosin wurde als Protonenaddukt nach Wasserabspaltung detektiert (m/z 282.1). Diese Eliminierung scheint sich im Zuge der Ionisation durch Laser-Beschuß zu ereignen und wurde nicht nur beim CMH adulter Würmer, sondern auch beim C18-Sphingosin-Standards beobachtet (Abb. 22). Für Lithium-Addukte von C18-Sphingosin wurde keine um 18 Da erniedrigte Masse gefunden ($[M+Li]^+$ bei m/z 306.1, aber kein Signal $[M+Li-18]^+$ bei m/z 288).

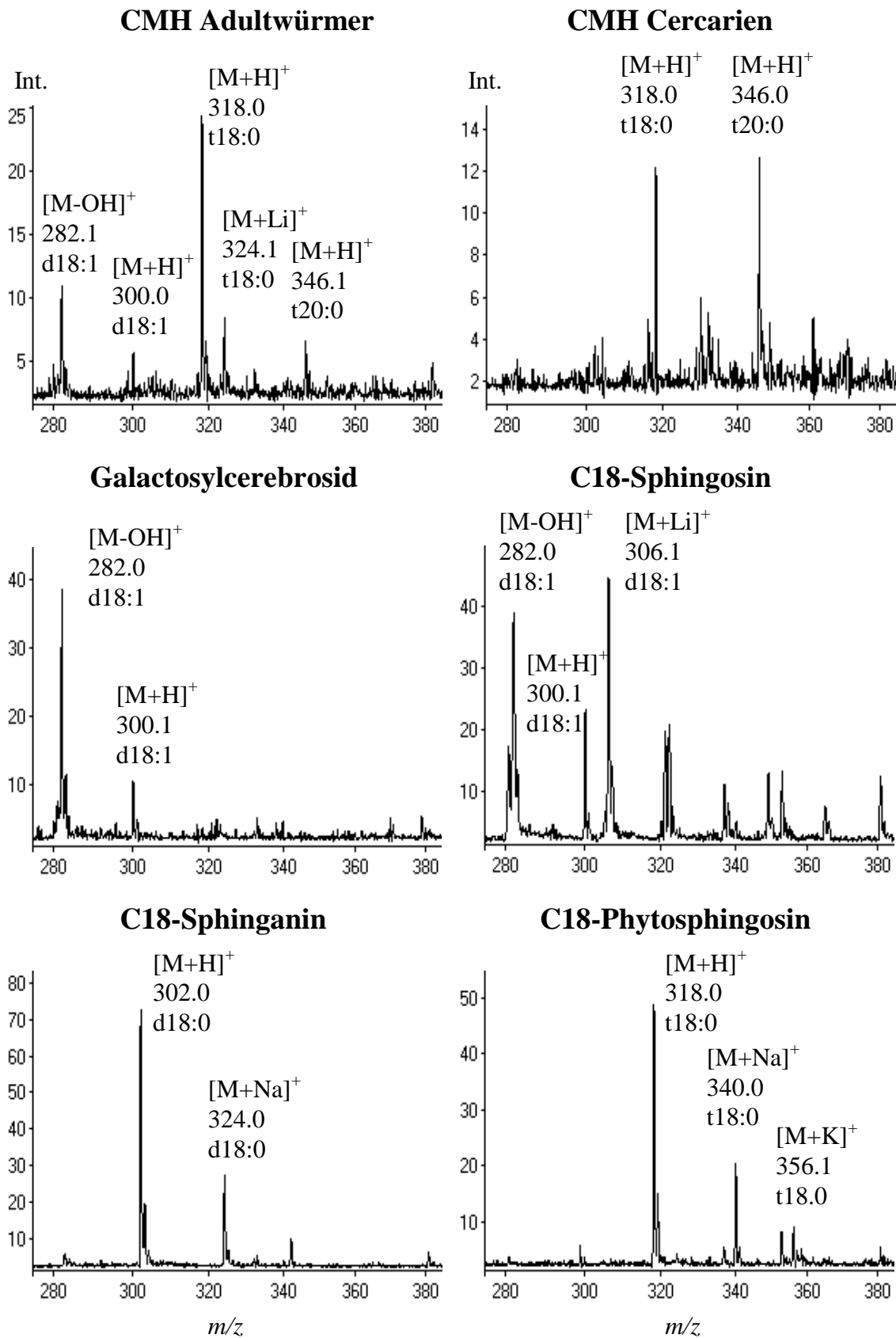


Abb. 22 MALDI-TOF-MS-Analyse der freien Sphingoidbasen aus CMH von Adultwürmern und Cercarien. Die durch die Hydrolyse nach Ando freigesetzten Sphingoidbasen wurden im positiven Reflektormodus gemessen. Als Standards wurden die Sphingoidbasen C18-Sphingosin, C18-Sphinginin und C18-Phytosphingosin sowie Sphingoidbasen von Galactosylcerebrosid verwendet.

Neben der Analyse als freie Sphingoidbasen wurden die Sphingoidbasen mit *o*-Phthaldialdehyd derivatisiert, durch RP-HPLC getrennt (nicht gezeigt) und durch den Vergleich der Retentionszeiten sowie der Molekülmassen identifiziert. Beim CMH von Adultwürmern wurden C18-Phytosphingosin (416.2; CMH Adultwurm 1) und C20-Phytosphingosin (444.0; CMH Adultwurm 2) nachgewiesen. Das dem C18-Sphingosin entsprechende Derivat konnte nur durch HPLC, nicht durch MALDI-TOF-MS nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum nativen C18-Sphingosin (Abb. 22) wurde OPA-derivatisiertes C18-Sphingosin protoniert ohne Wasserabspaltung detektiert (Abb. 23; m/z 398.1).

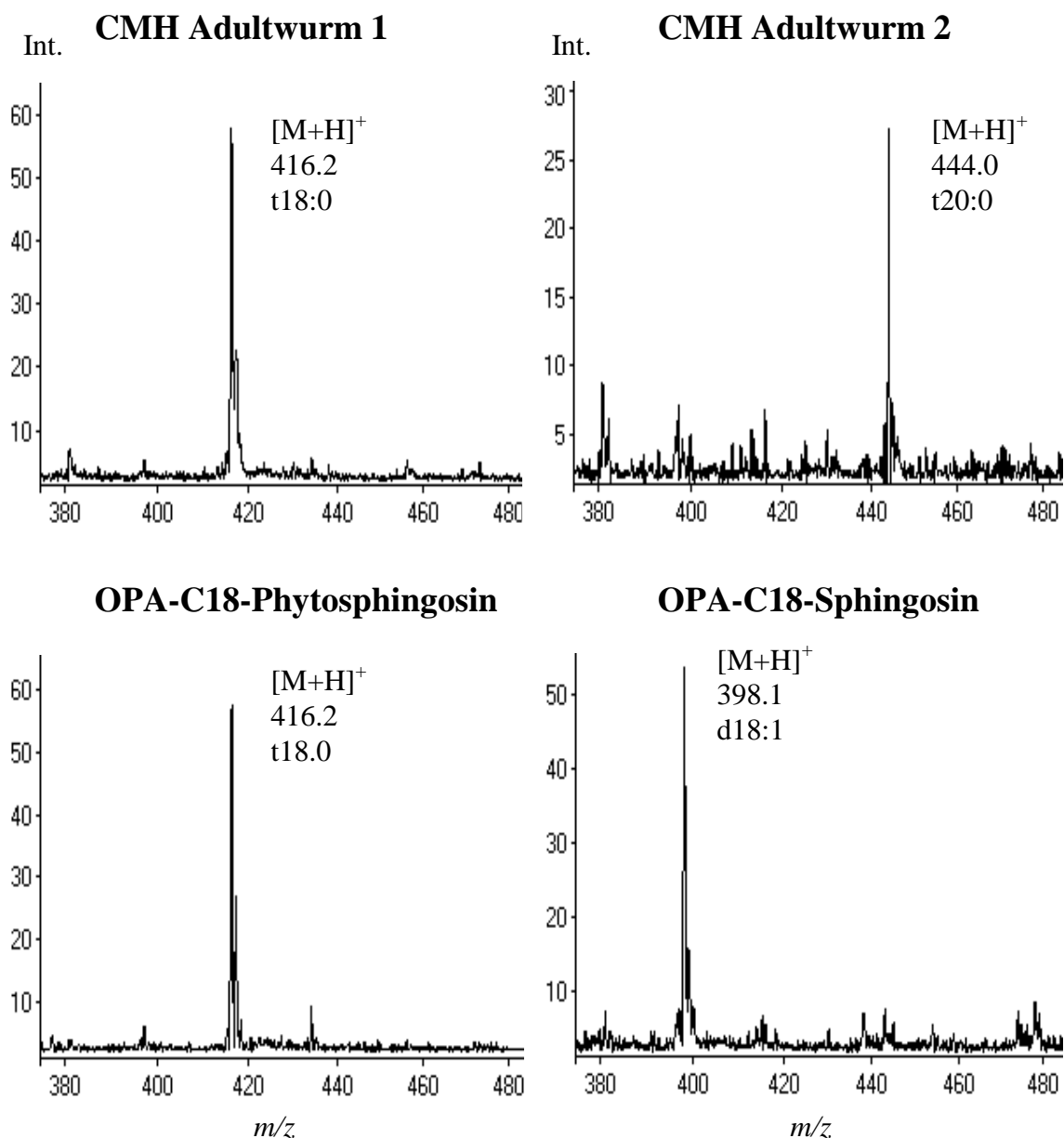


Abb. 23 MALDI-TOF-MS-Analyse der OPA-derivatisierten Sphingoidbasen aus CMH adulter Würmer. Die durch die Hydrolyse nach Ando freigesetzten Sphingoidbasen wurden mit *o*-Phthaldialdehyd derivatisiert und durch HPLC getrennt. Gezeigt sind die MALDI-TOF-MS-Spektren zweier Fraktionen mit C18-Phytosphingosin (CMH Adultwurm-1) und C20-Phytosphingosin (CMH Adultwurm-2). Die Identifizierung geschah anhand der durch MALDI-TOF-MS bestimmten Massen, und, soweit möglich, anhand der durch Standards ermittelten charakteristischen Retentionszeiten.

Weiterhin wurden die Sphingoidbasen durch Periodat/Rudloff-Oxidation in Fettsäuren überführt und durch GC/MS analysiert. Beim CMH von Adultwürmern sowie beim Galactosylcerebrosid-Standard wurde C14:0-Fettsäure nachgewiesen, die aus C18-Sphingosin nach oxidativer Spaltung der Doppelbindung hervorgeht. Außerdem wurden beim CMH von Adultwürmern und Cercarien die Fettsäuren C15:0 und C17:0 nachgewiesen, die durch Periodatspaltung von C18- bzw. C20-Phytosphingosin und nachfolgende Oxidation zur Säure entstehen.

Fettsäuremethylester	[M+NH ₄] ⁺	GalCer	CMH	
			Adultwürmer	Cercarien
C14:0	260	+	+	-
C15:0	274	-	+	+
C16:0	288	(+)	(+)	(+)
C17:0	302	-	+	+
C18:0	316	(+)	(+)	(+)

Tab. 12 Fettsäuremuster nach Oxidation der Sphingoidbasen mittels Periodat/Rudloff-Oxidation. CMH-Spezies von *S. mansoni* Adultwürmern und Cercarien wurden nach Ando (2.7.1.2) hydrolysiert. Die Sphingoidbasen wurden durch Periodat-Oxidation (2.7.1.4) und Rudloff-Oxidation (2.7.1.5) in Fettsäuren überführt, zu Methylestern umgesetzt (2.7.1.1) und durch GC/MS analysiert (2.6.1.5). Bei den C16:0- und C18:0-Fettsäuren handelt es sich um Kontaminationen, die deshalb in Klammern angegeben sind. GalCer: Galactosylcerebrosid.

3.2.7 Fettsäure-Analytik

Die Fettsäuren wurden durch Hydrolyse nach Gaver und Sweeley gewonnen (2.7.1.1) und als acetylierte Fettsäuremethylester mittels GC/MS analysiert (Tab. 13). CMH aller drei untersuchten Stadien enthielt C16-Hydroxyfettsäure (C16h:0) als Hauptkomponente. Alle Stadien wiesen weiterhin gesättigte C16-Fettsäure (C16:0), gesättigte C14-Fettsäure (C14:0) und C18-Hydroxyfettsäure (C18h:0) auf. Während für das CMH von Eiern insgesamt nur 4 unterschiedliche Fettsäuren nachgewiesen werden konnten, die Kohlenstoffketten von 14 bis 18 C-Atomen aufwiesen, zeigte das CMH der Adultwürmer mit dem zusätzlichen Nachweis von C14h:0, C18:0, C24:0 und C24h:0 eine höhere Variabilität. Das CMH von Cercarien fiel durch eine Vielzahl langkettiger, meist gesättigter Fettsäuren auf, die zum Teil hydroxyliert waren.

Zur Identifizierung der Hydroxyfettsäuren wurden die beiden acetylierten α -Hydroxyfettsäuremethylester C16h:0 und C24h:0 als Standardsubstanzen eingesetzt und zeigten bei GC/MS (CI) gleiche Massen und Retentionszeiten wie die entsprechenden Komponenten von CMH der drei untersuchten Stadien (Tab. 13). Um die Hydroxylgruppe zu lokalisieren, wurden die nicht-acetylierten Fettsäuremethylester von Adultwürmern durch GC/MS nach Elektronenstoßionisation analysiert (nicht gezeigt). Das Massenspektrum des Hydroxyhexadecansäuremethylesters zeigte ein schwaches Signal bei m/z 286 ([M]⁺) und ein starkes Signal bei m/z 227 ([M-59]⁺; Verlust des Carbomethoxy-Radikals CH₃OC=O[•]). Das Ion bei m/z 90, das aus der McLafferty-Umlagerung und der Spaltung der 2,3-Bindung resultierte, zeigte deutlich, daß es sich

bei der entsprechenden Fettsäure um ein α -Hydroxy-Derivat handelt [414,451,505]. Starke Signale bei m/z 55, 69, 83, 97, 111 und 125 gehörten zur C_nH_{2n-1} -Serie ($n = 4-9$). Die anderen Hydroxyfettsäuren der drei Stadien ergaben aufgrund der geringen Mengen bei der Analyse als Methylester durch GC/MS (EI) keine signifikanten Signale.

[M+NH ₄] ⁺	Acetylierte Fettsäuremethylester	CMH		
		Adultwürmer	Cercarien	Eier
260	C14:0	1.6	0.8	1.4
318	C14h:0	0.8	1.6	
288	C16:0	6.7	7.8	12.3
346	C16h:0	79.4	63.4	82.7
360	C17h:0	-	0.3	-
316	C18:0	1.6	-	-
374	C18h:0	1.4	2.3	3.5
400	C24:0	1.5	0.8	-
458	C24h:0	6.8	3.1	-
426	C26:1	-	5.5	-
428	C26:0	-	2.3	-
486	C26h:0	-	7.8	-
456	C28:0	-	0.1	-
514	C28h:0	-	3.9	-
484	C30:0	-	0.3	-

Tab. 13 Prozentuale Verteilung der Fettsäuren der Ceramid-Monohexoside von Adultwürmern, Cercarien und Eiern. Die Fettsäuremethylester wurden durch Hydrolyse der Ceramid-Monohexoside nach Gaver und Sweeley gewonnen (2.7.1.1), acetyliert (2.4.1) und durch GC/MS nachgewiesen (2.6.1.5).

3.2.8 Struktur der CMH-Hauptkomponenten

In Tab. 14 sind die dominanten Ceramidstrukturen für CMH aller drei untersuchten Stadien aufgeführt. Während die CMH-Spezies mit C18-Phytosphingosin ($[M+Na]^+$ 740.5, 756.5) und C20-Phytosphingosin ($[M+Na]^+$ 784.5) in allen drei Stadien zu den Hauptkomponenten gehören, kommt bei Adultwürmern zusätzlich ein CMH mit C18-Sphingosin vor ($[M+Na]^+$ 722.6). Bei Cercarien enthalten zwei der dominanten CMH-Spezies C19-Sphingoidbasen ($[M+Na]^+$ 770.6, 798.6), die bei Adultwürmern und Eiern nicht gefunden wurden. CMH von Eiern enthält größere Ceramid-Mengen mit Palmitinsäure (C16:0) substituiertem C20-Phytosphingosin ($[M+Na]^+$ 768.7). Ob sich die für CMH aller drei Stadien gefundenen Monosaccharide Glucose und Galactose (Tab. 6 und Tab. 7) gleichmäßig oder ungleichmäßig auf die unterschiedlichen Ceramide verteilen, wurde nicht untersucht.

	CMH		Lyso-CMH	Sphingoidbase		Δm	Fettsäure		
	Nativ		peracetyl.	Nativ	Struktur		GC/MS		
	$[M+Na]^+$	$[M+Li]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+Li]^+$			$[M+NH_4]^+$		
Ad	722.6	706.5	993.1 (5)	468.7	282.1	d18:1	238	288	C16:0
	740.5	724.6	992.6 (6)	486.6	318.0	t18:0	238	288	C16:0
	756.5	740.5	1050.6 (7)	486.6	318.0	t18:0	254	346	C16h:0
	784.5	768.5	1078.8 (7)	514.7	346.1	t20:0	254	346	C16h:0
Ce	740.7	724.6	992.7 (6)	486.6	318.0	t18:0	238	288	C16:0
	756.6	740.6	1050.6 (7)	486.6	318.0	t18:0	254	346	C16h:0
	770.6	754.6	1064.6 (7)	500.7	-	t19:0	254	346	C16h:0
	784.6	768.5	1078.7 (7)	514.7	346.0	t20:0	254	346	C16h:0
	798.6	782.4	1092.6 (7)	500.7	-	t19:0	254	346	C18h:0
Ei	740.7	724.6	n. d.	486.7	n. d.	t18:0	238	288	C16:0
	756.6	740.6	n. d.	486.7	n. d.	t18:0	254	346	C16h:0
	768.7	752.5	n. d.	514.7	n. d.	t20:0	238	288	C16:0
	784.7	768.5	n. d.	514.7	n. d.	t20:0	254	346	C16h:0

Tab. 14 Identifizierung der Ceramid-Heterogenität der dominanten CMH-Komponenten verschiedener Stadien. Die Massen von nativem CMH sind Abb. 13 und Abb. 14 entnommen. Die Massen von peracetyliertem CMH entstammen Tab. 8 und Tab. 9. Die Zahl der eingebauten Acetylgruppen ist in Klammern angegeben. Weiterhin wurde die Masse des CMH nach Deacylierung (Lyso-CMH; Abb. 20) sowie die Masse der freien Sphingoidbasen (Abb. 22) bestimmt, woraus die chemische Natur der Sphingoidbase (Struktur) ermittelt wurde. Aus der Massendifferenz zwischen nativem und deacyliertem CMH (Δm) wurde die Fettsäure des Ceramidteils abgeleitet, die durch GC/MS der acetylierten Fettsäuremethylester bestätigt wurde. CMH von Eiern wurde weder peracetyliert noch nach Gewinnung der freien Sphingoidbasen analysiert (n. d.). Adultwürmer (Ad), Cercarien (Ce), Eier (Ei).

3.3 Analyse komplexer Glykolipide

Schistosoma mansoni besitzt stark antigene Glykolipide mit fünf oder mehr Kohlenhydrat-Bausteinen, wobei Fucose ein Bestandteil der meisten antigenen Determinanten zu sein scheint. Während bei den komplexen Glykolipiden von Eiern und adulten Würmern hauptsächlich die repetitiven Einheiten $-4[\text{Fuc}\alpha 3]\text{GlcNAc}\beta 4-$ und $-4[\text{Fuc}\alpha 2\text{Fuc}\alpha 3]\text{GlcNAc}\beta 4-$ die antigenen Strukturen auszumachen scheinen, dominieren bei Cercarien Glykolipide mit dem Le^{X} -Antigen ($\text{Gal}\beta 4[\text{Fuc}\alpha 3]\text{GlcNAc}\beta 4-$). Auf Proteinebene ist das Le^{X} -Antigen am stärksten im Ei-Stadium exprimiert. Glykolipide aller drei Stadien kreuzreagieren mit *S. mansoni* Glykoproteinen, mit dem Hämocyanin der Schnecke *Megathura crenulata*, sowie mit *N*-Glykanen der Meerrettich-Peroxidase, die am innersten *N*-Acetylglucosamin ihrer *N*-Glykane an C3 fucosyliert sind.

3.3.1 Antigenität und Periodat-Sensitivität der *S. mansoni* Glykolipide

Die neutralen Glykolipidfraktionen von *S. mansoni* Eiern, Cercarien und adulten Würmern wurden durch QAE-Sephadex-Chromatographie gereinigt (siehe 2.2.5 und Abb. 7) und durch HPTLC-Immunfärbung auf ihre chromatographischen und immunochemischen Eigenschaften hin untersucht (Abb. 24C). Bei chemischer Anfärbung mit Orcinol dominierte eine Komponente mit den Laufeigenschaften eines CMH. Daneben kamen auch langsam wandernde Komponenten in geringen Mengen vor (Abb. 24A, Spur 2). Bei Iodfärbung der neutralen Glykolipidfraktion von Eiern waren Lipidverunreinigungen zu sehen (Abb. 24B). Immunochemisch konnten nur Komponenten mit fünf oder mehr Zuckern ($\geq \text{CPH}$) detektiert werden. Zur Detektion wurde ein polyklonales anti-Sm480Ei Kaninchen Hyperimmunserum verwendet. Für die drei untersuchten Stadien von *S. mansoni* Glykolipiden ergaben sich unterschiedliche Bandenmuster (Abb. 24C, Spur1-3). Die Haupterkennung liegt für das Ei-Stadium bei deutlich größeren Glykolipiden als bei Adultwürmern und Cercarien. Daß die auf den Glykolipiden erkannten Epitope aus Kohlenhydraten bestehen, legt ihre Sensitivität gegenüber einer Periodatoxidation nahe (Abb. 24D, Spur1-3; siehe 2.3.2.3). Die komplexen Glykolipide von *S. mansoni* aus den drei untersuchten Stadien reagierten unterschiedlich stark mit Infektionsserum (nicht gezeigt) und anti-Sm480Ei Kaninchen-Hyperimmunserum, was sowohl auf die unterschiedlichen Mengen als auch auf die unterschiedlich starke Erkennung verschiedener Glykolipide durch die Seren zurückzuführen ist. Bezogen auf die Menge an lyophilisiertem Parasiten-Ausgangsmaterial läßt sich das folgendermaßen ausdrücken: Glykolipide von 1 μg Eiern reagierten etwa genauso stark mit Infektionsserum wie Glykolipide von 10 μg Cercarien oder 100 μg Adultwürmern (Abb. 28). Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten HPTLC-Immunfärbungen wurde in etwa diese Relation der Glykolipidmengen, bezogen auf jeweilige Äquivalente an lyophilisiertem Parasitenmaterial, beibehalten (z. B. Abb. 24).

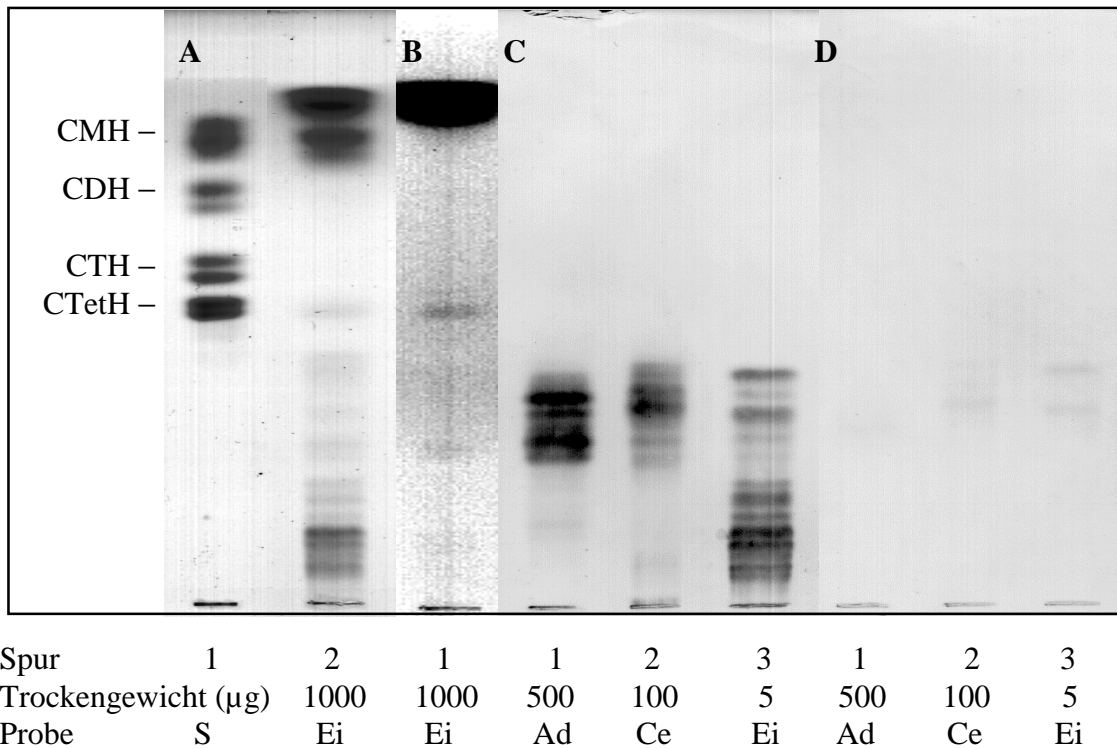


Abb. 24 Immunreaktivität und Periodat-Sensitivität der HPTLC-getrennten, neutralen Glykolipide von *S. mansoni*. Bei jeder Spur ist die äquivalente Menge an lyophilisiertem Parasitenmaterial in µg Trockengewicht angegeben, die der aufgetragenen Glykolipidmenge entspricht. Laufmittel Chloroform/Methanol/0.25 % KCl in Wasser (50:40:10, v/v/v). (A) Orcinolfärbung des Globosid-Standardgemisches (S) und der Glykolipide aus Eiern (Ei); (B) Iodfärbung der Glykolipide von Eiern; (C, D) Immunfärbung der Glykolipide von adulten Würmern (Ad), Cercarien (Ce) und Eiern (Ei) mit anti-Sm480Ei Hyperimmunserum (1:1000). Die Glykolipide wurden (C) nativ bzw. (D) nach Behandlung mit Natrium-Periodat (20 mM, pH 5.5, 1 h, 37°C) analysiert. Die Standardkomponenten CMH bis CTetH entsprechen Ceramid-Mono-, -Di-, -Tri- und -Tetrahexosiden.

3.3.2 Analyse der *S. mansoni* Glykolipide durch zweidimensionale HPTLC

Für alle drei Stadien von *S. mansoni* wurde jeweils eine Vielzahl von antigenen Glykolipid-Banden detektiert (Abb. 24). Zur weiteren Charakterisierung der Glykolipide wurden diese einer zweidimensionalen HPTLC unterzogen. Danach lagen die komplexen Glykolipide von adulten *S. mansoni* Würmern sowohl bei der Verwendung eines sauren Laufmittels als auch eines alkalischen Laufmittels annähernd auf einer Linie (Abb. 25B, D), was gegen die Anwesenheit basischer bzw. saurer funktioneller Gruppen spricht.

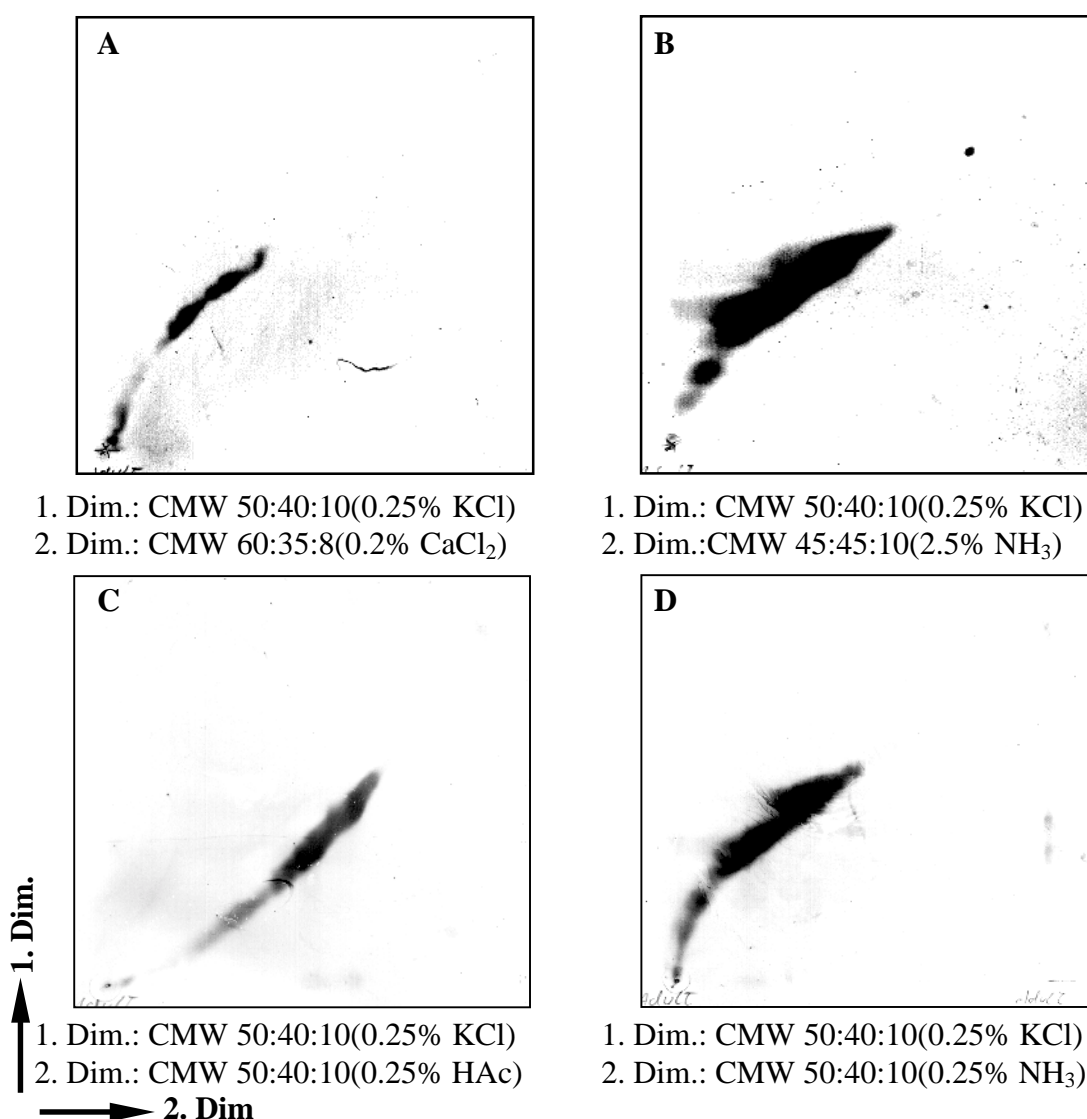


Abb. 25: Zweidimensionale HPTLC komplexer Glykolipide von adulten Schistosomen mit anschließender Immunfärbung. Die verwendeten Laufmittel für die 1. bzw. 2. Dimension sind jeweils unter den Abbildungen angegeben. Für die Färbung wurde ein anti-Sm480Ei Hyperimmunserum verwendet. HAc: Essigsäure. Die Prozentangaben für KCl, CaCl₂, HAc und NH₃ beziehen sich jeweils auf den Wasseranteil.

3.3.3 Stadienspezifische Expression der Le^X-Antigene

3.3.3.1 Herstellung und Charakterisierung von Le^X-Neoglykolipiden als Standard

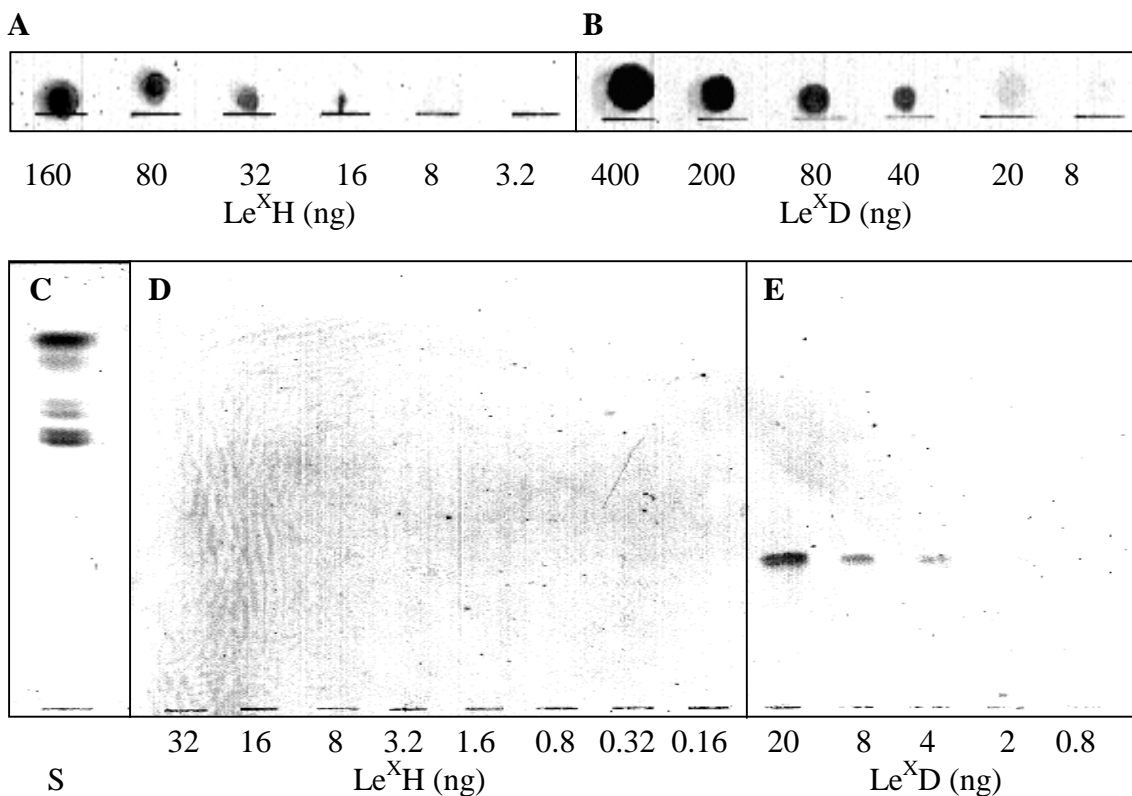


Abb. 26 Der monoklonale Antikörper G8G12 erkennt das Neoglykolipid Le^XD, aber nicht Le^XH. (A, B) Chemischer Nachweis von Kohlenhydraten. Die Le^X-Neoglykolipide Le^XH (A) und Le^XD (B) wurden in unterschiedlichen Mengen punktförmig auf die Dünnschichtplatte aufgegeben. Die aufgrund der Bausteinanalyse berechneten Kohlenhydratmengen sind in ng angegeben. Ohne chromatographische Trennung wurden die Kohlenhydrate durch Orcinolfärbung detektiert. (C) Orcinol-gefärbter Globosidstandard. (D, E) Immunfärbung von Le^X-Neoglykolipiden auf der Dünnschichtplatte mit dem anti-Le^X mAk G8G12, (1:500); Laufmittel CMW (, 50:40:10, 0.25% KCl im Wasser, v/v/v).

Da Schistosomen unter anderem Le^X als Kohlenhydratantigen auf verschiedenen Proteinen tragen (siehe 1.6.4), sollten auch die Glykolipide der drei untersuchten Stadien von *S. mansoni* auf das Vorkommen des Le^X-Antigens hin getestet werden. Als Positivkontrolle für die HPTLC-Immunfärbungen wurden zwei Le^X-Neoglykolipide verwendet. Für ihre Herstellung wurde das reduzierende Ende des Pentasaccharids Lacto-*N*-fucopentaose III (Galβ4[Fucα3]GlcNAcβ3Galβ4Glc) durch reduktive Aminierung an ein Lipid gekoppelt, das eine primäre Aminogruppe besitzt. Als Lipide wurden Dihexadecyl-Phosphatidylethanolamin (DHPE, ergab Le^XD) und Hexadecylanilin (HDA, lieferte Le^XH) verwendet. Die Neoglykolipide wurden durch Kieselgelchromatographie gereinigt (2.2.6.1), durch HPTLC-Orcinolfärbung sowie MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert und durch Bausteinanalyse nach TFA-Hydrolyse quantifiziert (2.6.1 und 2.6.1.1). Die aufgrund der Komponentenanalysen berechneten Neoglykolipidmengen (auf den Kohlenhydratteil bezogen) wurden qualitativ durch die zuckerspezifische Orcinolfärbung bestätigt (Abb. 26A, B). Nach chromatographischer Trennung wurden die Neoglykolipide auf ihre Reaktivität mit dem

Le^X-spezifischen monoklonalen Antikörper G8G12 getestet. Nur Le^XD wurde erkannt und erwies sich als brauchbare Positivkontrolle. Le^XH reagierte in diesem wie auch in allen weiteren Versuchen nicht mit Le^X-spezifischen Antikörpern.

3.3.3.2 Stadienspezifische Expression von Le^X auf Glykolipiden von *S. mansoni* Cercarien

Die antigenen Glykolipide der drei untersuchten Stadien wurden auf das Vorkommen des Le^X-Epitops untersucht. Während chronisches Infektionsserum (Abb. 27), ebenso wie das Kaninchen anti-Sm480Ei Hyperimmunserum (Abb. 28), die Glykolipide aller drei Stadien erkannte (Abb. 27A), konnte Le^X nur auf den Glykolipiden von Cercarien nachgewiesen werden (Abb. 27B und Abb. 28B). Diese stadienspezifische Expression von Le^X auf den Glykolipiden von Cercarien wurde mit einem weiteren, Le^X-spezifischen monoklonalen Antikörper bestätigt (Abb. 27C). Diese Antikörper unterschieden sich zum Teil in ihren Erkennungsmustern. Das kleinste erkannte Glykolipid hatte die Laufeigenschaften eines CPH und reagierte stark mit dem mAk G8G12, schwach mit dem anti-Le^X mAk BRA4F1 und unter den verwendeten Bedingungen nur sehr schwach mit dem anti-Le^X mAk 4D1. Demgegenüber erkannten alle verwendeten anti-Le^X Antikörper gleichermaßen die großen, langsam-wandernden Glykolipide (Abb. 27C).

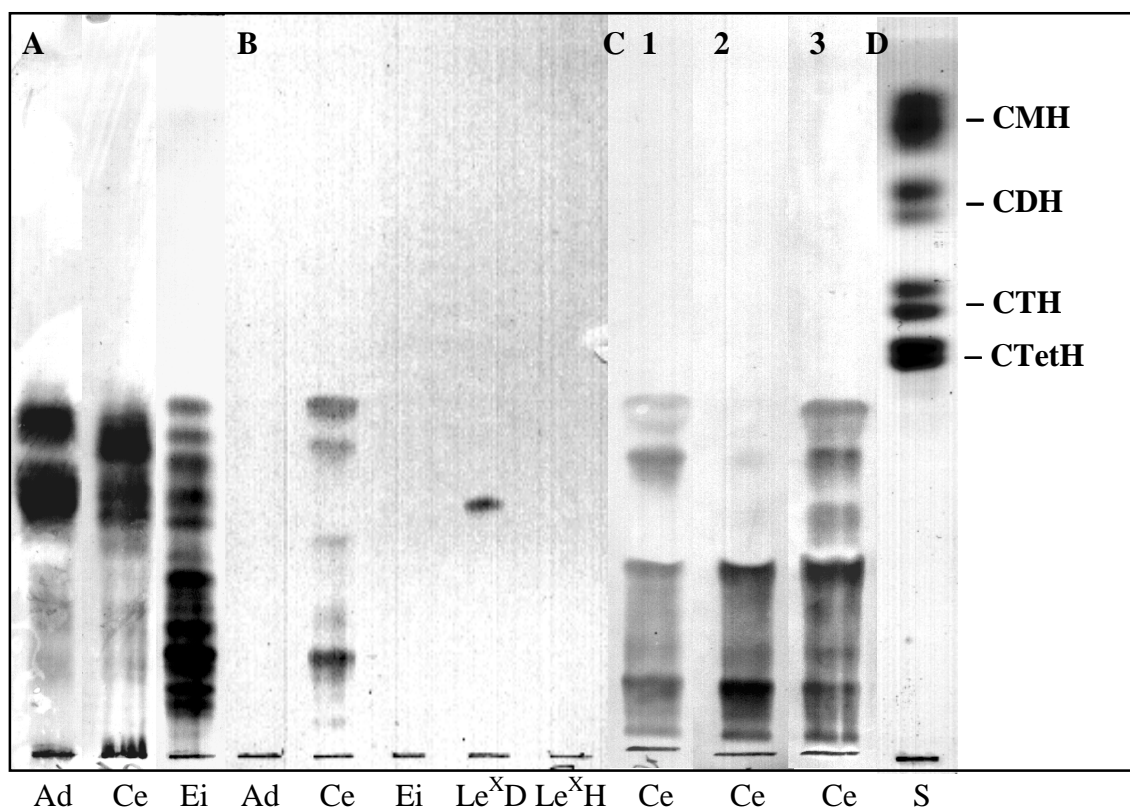


Abb. 27 HPTLC-Immundefärbung mit chronischem Infektionsserum und Le^X-spezifischen monoklonalen Antikörpern. Die verwendeten Aliquots der komplexen Glykolipidfraktionen von Adulten (Ad), Cercarien (Ce) und Eiern (Ei) entsprachen einem lyophilisierten Parasitenmaterial von je 500, 50 und 5 µg. Le^XD und Le^XH wurden als Kontrollen verwendet. Die in (C) eingesetzte Menge von Cercarien Glykolipiden entsprach 500 µg lyophilisiertem Parasitenmaterial. Zur Detektion wurden folgende Antikörper verwendet: (A) eine Mischung der Seren von 8 chronisch infizierten Mäusen (CIS; 1:500); (B und C1) anti-Le^X mAk BRA4F1 (1:200); (C2) anti-Le^X mAk 4D1 (1:200); (C3) anti-Le^X mAk G8G12 (1:500). (D) Orcinol-gefärbter Globosidstandard (S).

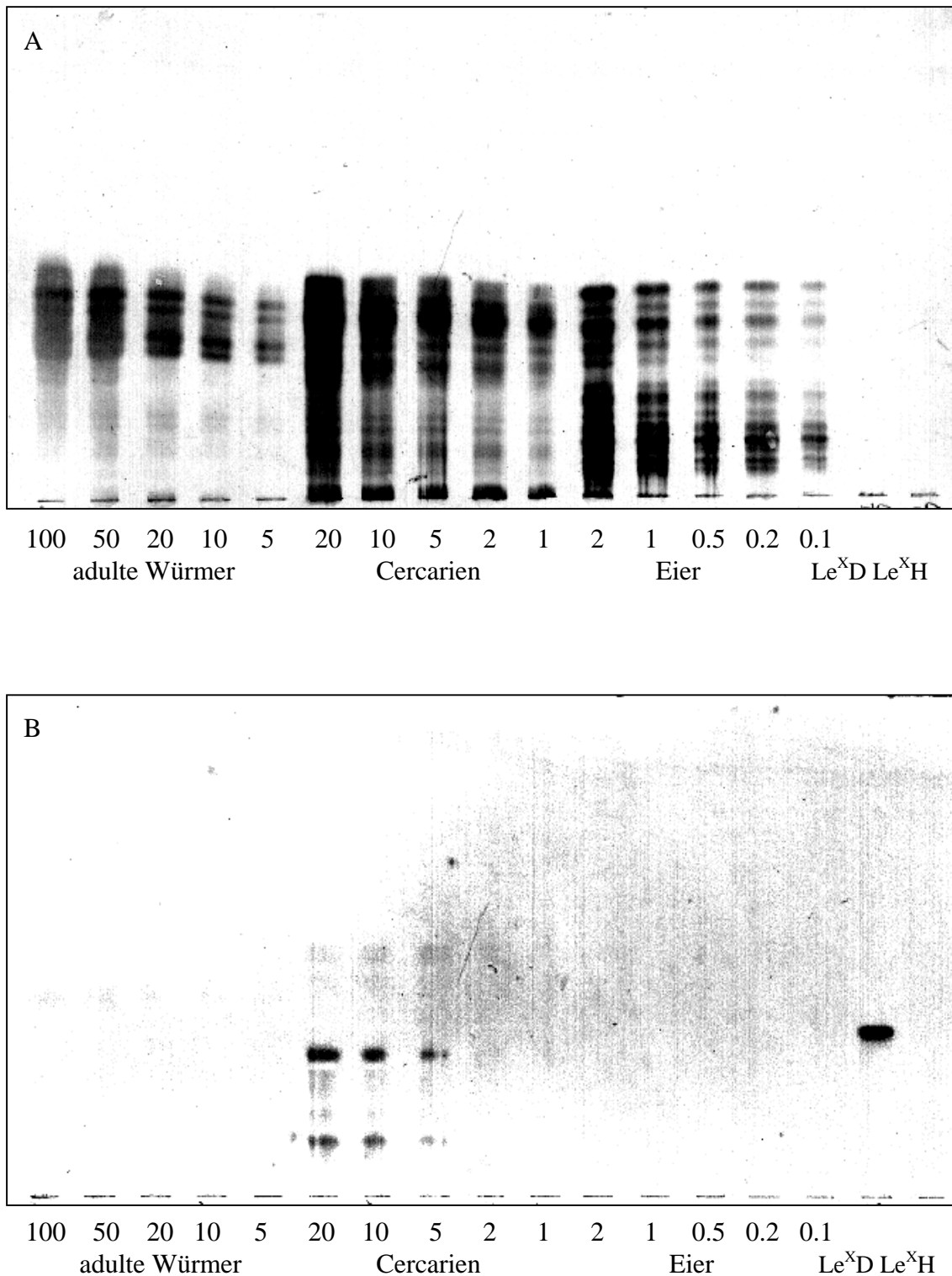


Abb. 28 Vergleichende HPTLC-Immunfärbung der antigenen Glykolipide verschiedener Stadien von *S. mansoni*. Angegeben sind die drei Stadien mit den jeweiligen äquivalenten Mengen an lyophilisiertem Parasiten-Ausgangsmaterial in μg . Die Detektion der Glykolipide erfolgte mit (A) anti-Sm480Ei Hyperimmuns serum (1:1000) oder (B) dem anti-Le^X mAk 4D1 (1:500). Laufmittel CMW (50:40:10, 0.25 % KCl in Wasser, v/v/v).

3.3.3.3 Stadienspezifische Expression von Le^X auf Glykoproteinen von *S. mansoni*

Die verschiedenen Stadien von *S. mansoni* wurden nicht nur daraufhin untersucht, ob das Le^X-Antigen auf den Glykolipiden des Parasiten vorkommt, sondern es wurden auch Proteinextrakte der verschiedenen Stadien auf Le^X-Antigene hin untersucht. Während das Le^X-Antigen auf Glykolipid-Ebene stadienspezifisch von Cercarien exprimiert wurde, erkannten die mAk G8G12, 4D1 und BRA4F1 am stärksten die aus Eiern extrahierten Proteine (Abb. 29C, D, E). Le^X kommt somit in großen Mengen auf den Glykolipiden von Cercarien und auf den Glykoproteinen von Eiern vor. Neben den SDS-Extrakten aus adulten Würmern, Cercarien und Eiern wurden auch Extrakte aus Schistosomula untersucht, die im Western Blot mit den verschiedenen Le^X-Antikörpern ein sehr ähnliches Muster an Glykoproteinbanden wie Cercarien-Extrakte zeigten (Abb. 29C-E).

Im Western Blot war bei Cercarien und Schistosomula jeweils nahe der Lauffront eine leichte Anfärbung mit den verschiedenen anti-Le^X-Antikörpern zu sehen (Abb. 29C-E). Die Vermutung war, daß diese Anfärbung auf Glykolipide zurückzuführen ist, die gewöhnlicherweise zusammen mit SDS-Probenpuffer extrahiert werden und in der Elektrophorese bekanntermaßen mit der Lauffront wandern. Um die Glykolipide in den Probenpuffer-Extrakten nachzuweisen, wurden sie mit organischen Lösungsmitteln extrahiert. Die so erhaltenen Proben wurden durch HPTLC getrennt und mit einem anti-Sm480Ei Kaninchen Hyperimmunserum auf Glykolipide getestet (Abb. 30). Die Glykolipide konnten in allen vier Stadien dargestellt werden. Wie schon im Western Blot (Abb. 29C-E) und in der Coomassie-Färbung (Abb. 29A) zeigte sich auch im Glykolipidmuster kein Unterschied zwischen dem Cercarien- und dem Schistosomula-Stadium (Abb. 30).

Für das M2D3H-Epitop ergab sich eine weniger ausgeprägte stadienspezifische Verteilung auf Proteinebene, wobei, wie beim Le^X-Epitop, die stärkste Erkennung beim Ei-Stadium vorlag (Abb. 31). Eine ähnliche Verteilung gilt für das M2D3H-Epitop auf Lipidebene: auch hier liegt die stärkste Erkennung beim Ei-Stadium vor (siehe Abb. 51). Während also das Le^X-Epitop auf Protein- und Lipidebene in unterschiedlichen Stadien am stärksten exprimiert wird, ist beim M2D3H-Epitop die stadienspezifische Verteilung auf Protein- und Lipidebene ähnlich.

Beide Epitope sind bei einer Schistosomen-Infektion Ziel einer humoralen Immunantwort, die beim Le^X-Antigen eine Autoimmunreaktion darstellt (siehe 1.6.4). Die Kinetik der Bildung von Antikörpern gegen komplexe Glykolipide von adulten Würmern (M2D3H-Typ) wurde bei der experimentellen Infektion von Mäusen mit *S. mansoni* gemessen [77]. Während der ersten Wochen sind noch keine Antikörper vom M2D3H-Typ zu messen. Erst mit dem Beginn der Patenz steigt die Antikörper-Menge gegen komplexe Glykolipide von adulten Würmern steil an. Dies deutete an, daß die Antikörper vom M2D3H-Typ eventuell in Reaktion auf gebildete *S. mansoni* Eier und/oder sekretierte Antigene, die im Zusammenhang mit der Eiproduktion stehen und nicht durch die heranwachsenden Würmer induziert werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die humorale Antwort bei einer chronischen *S. mansoni* Infektion mit derjenigen bei Infektion mit nur männlichen Würmern verglichen. Bei der chronischen Infektion sind die Mäuse über einen Zeitraum von mehreren Monaten mit etwa dreißig Adultwürmern infiziert. Durch die lange Infektion kommt es zu einer Anhäufung von Eiern in den Geweben. Während das Immunsystem bei der chronischen Infektion vielen Eiern ausgesetzt ist, sollte es bei der Infektion mit über 100 ausschließlich männlichen Würmern (male single-sex infection) zu einer Immunreaktion auf das juvenile bzw. Adultstadium kommen.

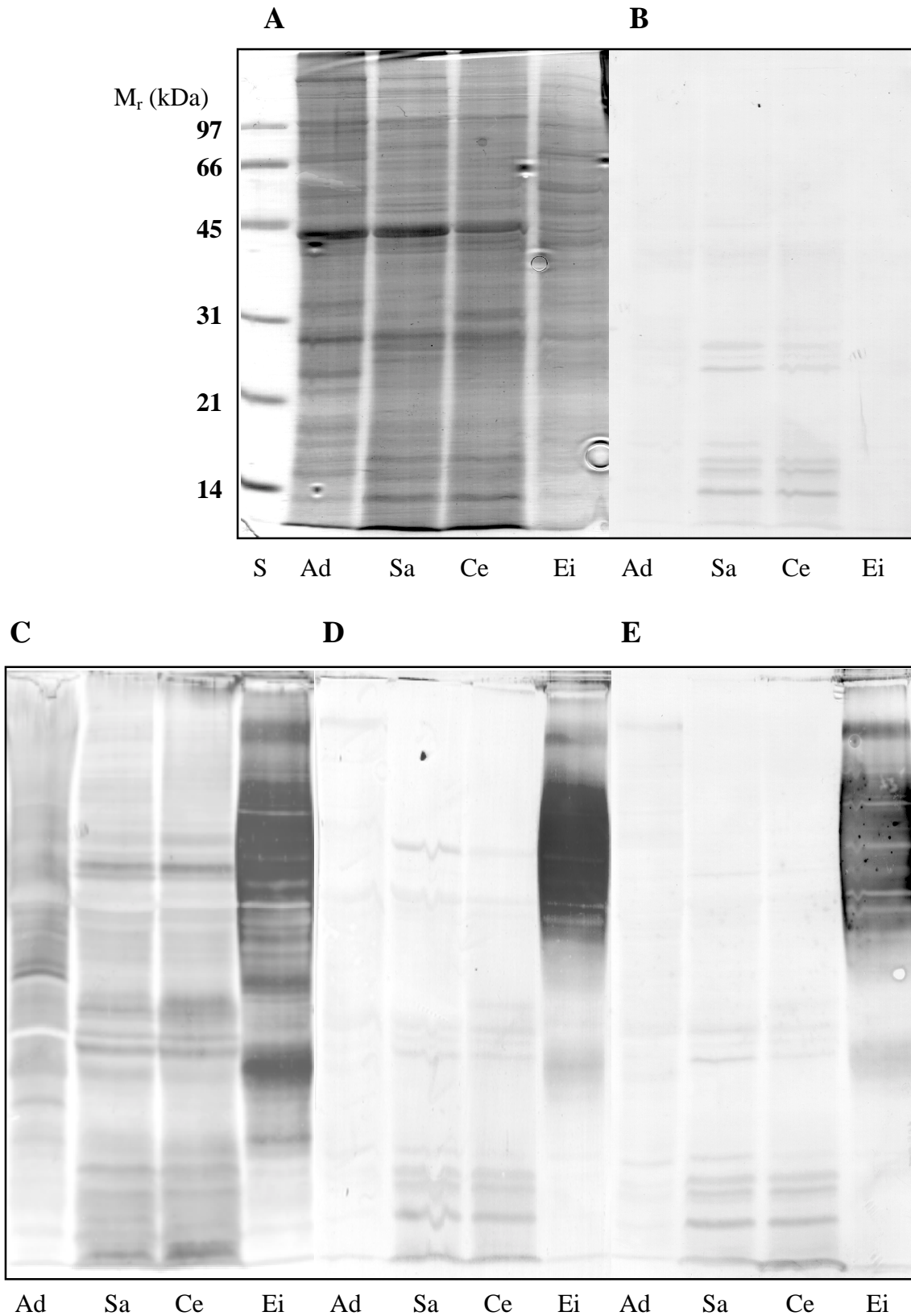


Abb. 29 Analyse von SDS-Probenpuffer-Extrakten verschiedener *S. mansoni* Stadien im Western Blot. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einem 12%igen Polyacrylamidgel. Aufgetragen ist SDS-Probenpufferextrakt aus 100 µg lyophilisiertem Parasitenmaterial je Spur; (A) Coomassie-Färbung; (B) Zweitantikörperkontrolle Dako D0486 Ziege gegen Maus, Alkalische-Phosphatase-Konjugat, 1:1 000; (C) anti-Le^X mAk G8G12 (1:200); (D) anti-Le^X mAk 4D1 (1:200); (E) anti-Le^X mAk BRA4F1 (1:200). S: Biorad LMW Standard; Ad: Adultwürmer; Sa: Schistosomula; Ce: Cercarien; Ei: Eier.

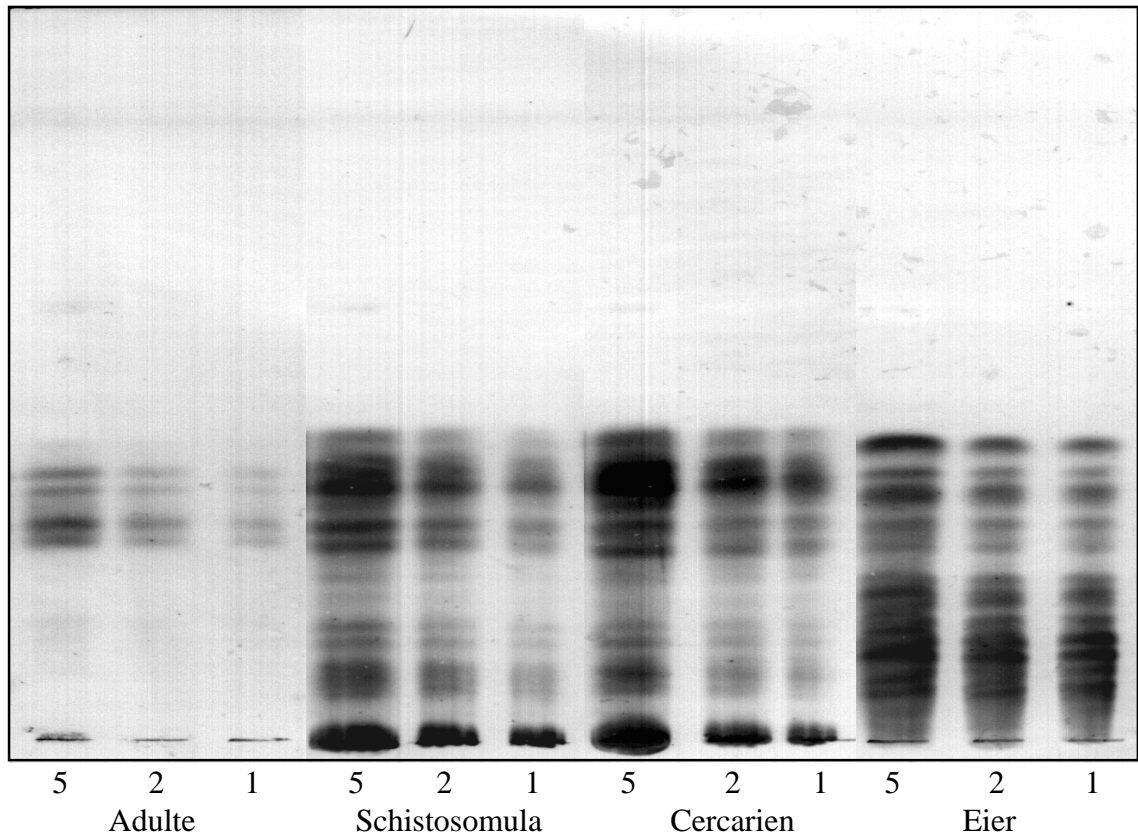


Abb. 30 HPTLC-Immunoanfärbung von SDS- β -Mercaptoethanol-Extrakten verschiedener Stadien von *S. mansoni*. Angegeben sind die äquivalenten Mengen an lyophilisiertem Ausgangsmaterial, die den aufgetragenen Glykolipid-Mengen entsprechen. Aliquots der SDS- β -Mercaptoethanol-Extrakte (10 μ g Trockengewicht-Äquivalente/ μ l) wurden mit 5 Volumen Methanol und 4 Volumen Chloroform versetzt, mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen (1 μ g Trockengewicht-Äquivalente/ μ l) und 5, 2 bzw. 1 μ l wurden aufgetragen und durch HPTLC unter Verwendung des Laufmittels CMW (50:40:10, 0,25 % KCl im Wasser, v/v/v) getrennt. Angegeben sind die Auftragsmengen in μ g Trockengewicht-Äquivalenten. Die Glykolipide wurden mit dem Sm480Ei Kaninchen Hyperimmunserum (1:2000) detektiert.

Tatsächlich zeigten CIS (chronic infection serum) und SSIS (single-sex infection serum) im direkten Vergleich ein stark unterschiedliches Erkennungsmuster der beiden Kohlenhydratantigene. Bei der Infektion mit nur männlichen Würmern ergab sich eine starke Erkennung des Le^X-Epitops, während das M2D3H-Epitop nur schwach erkannt wurde (Abb. 32A). Diese Dominanz des Le^X-Epitops überrascht nicht, da sowohl Tegument als auch Darmepithel des Adultwurmes das Le^X-Antigen tragen und Le^X somit ein wichtiges Oberflächenantigen des Adultwurmes darstellt (siehe 1.6.3). Außerdem sekretiert der Adultwurm ein zirkulierendes Antigen, das ebenfalls Le^X trägt (siehe 1.6.4). Bei der chronischen Infektion hingegen ergab sich eine starke Immunantwort gegen das M2D3H-Epitop und nur eine schwache Antwort gegen das Le^X-Epitop. Basierend auf der Annahme, daß bei der chronischen Infektion die Adultwürmer eine eher untergeordnete Rolle spielen und daß ein Großteil der Immunantwort gegen die im Gewebe gefangenen Eier gerichtet ist, legt dies die Vermutung nahe, daß das M2D3H-Epitop vom Ei-Stadium in einer stark immunogenen Form präsentiert wird. Ob diese Epitope im Ei-Stadium auf Proteinebene oder auf Lipidebene für die Antikörperproduktion verantwortlich sind, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Sowohl die komplexen Glykolipide von adulten Würmern als auch die von Eiern wurden durch

CIS stärker als durch SSIS erkannt, was darauf hindeutet, daß beide Träger des M2D3H-Epitops sind (Abb. 32A B).

In einem weiteren Experiment zur Expression des Le^X-Antigens wurde die von Köster und Strand [216] beschriebene Bindung eines anti-Le^X mAk an die Oberfläche von Schistosomula experimentell bestätigt. Während der anti-Le^X mAk 4D1 in einem punktförmigen Muster an die Oberflächen von Schistosomula adhärierte, (Abb. 33B) zeigte der Kontrollantikörper H226 [76] in der Immunfluoreszenz keine Erkennung (ohne Abbildung).

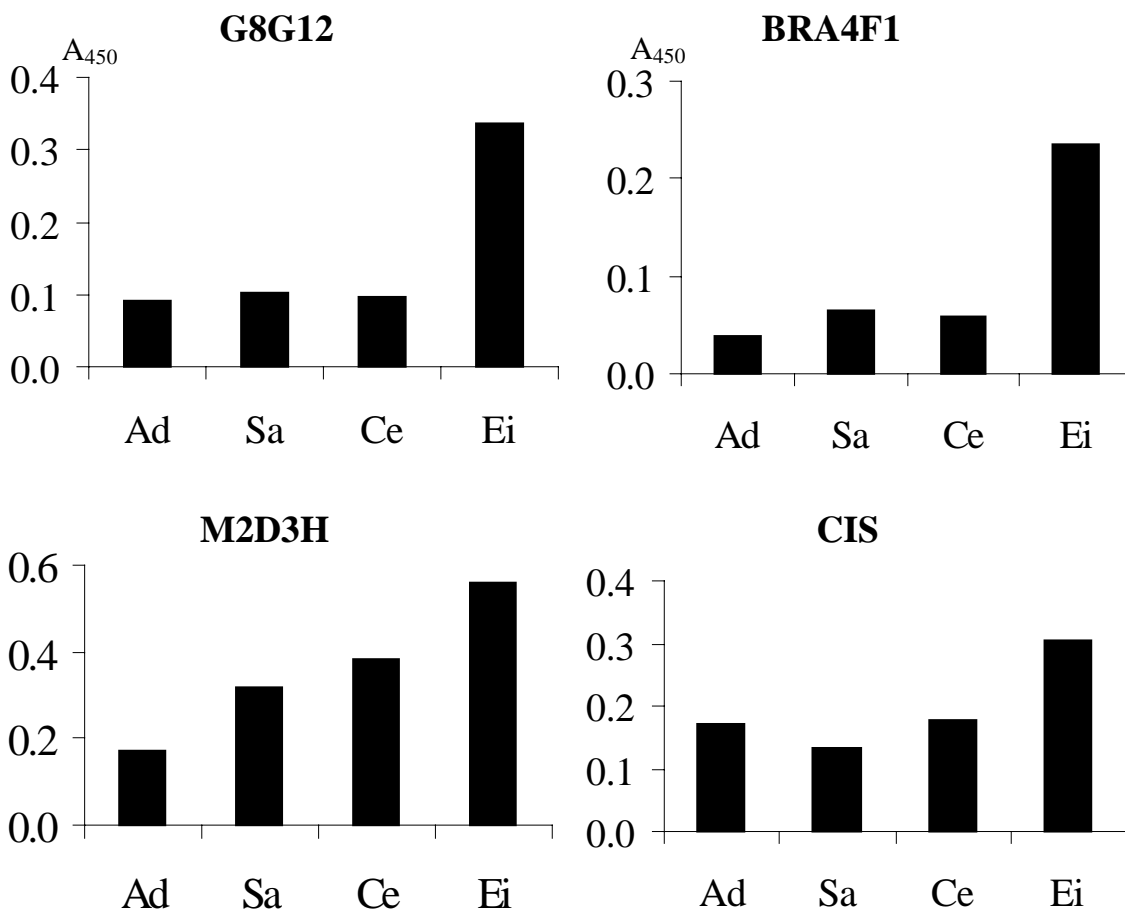


Abb. 31 Analyse von SDS-Probenpuffer-Extrakten verschiedener *S. mansoni* Stadien im ELISA. Die adsorbierte Menge pro Vertiefung entsprach für jedes Stadium 100 ng an lyophilisiertem Parasitenmaterial. Als Erstantikörper wurden die Le^X-spezifischen monoklonalen Antikörper G8G12 (1:2 000) sowie BRA4F1 (1:2 000), der monoklonale Antikörper M2D3H (1:10 000), sowie sechs vereinigte Infektionsseren chronisch mit *S. mansoni* infizierter Mäuse (CIS; 1:50 000) eingesetzt. Bei den angegebenen Werten ist jeweils die unspezifische Bindung an die ELISA-Platte (ohne adsorbiertes Protein) bereits abgezogen. (Ad) adulte Würmer, (Sa) Schistosomula, (Ce) Cercarien, (Ei) Eier.

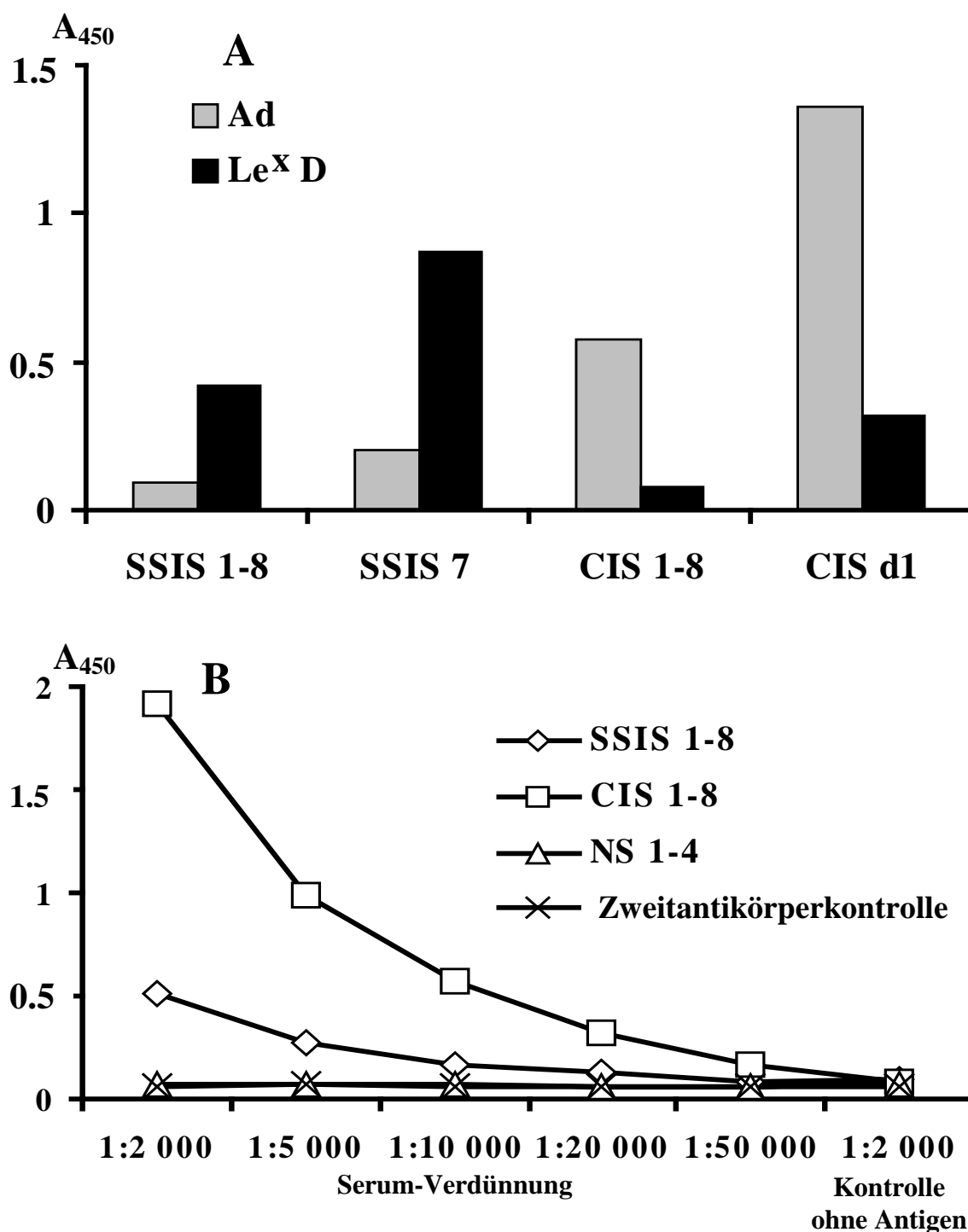


Abb. 32 Bestimmung der relativen Antikörperreaktivität gegen komplexe Glykolipide von *S. mansoni* Adultwürmern bzw. Eiern und gegen Le^x bei chronischer Infektion von Mäusen bzw. bei Infektion mit nur männlichen Würmern. Es wurden Seren von nur mit männlichen Würmern infizierten Mäusen (male single sex infection sera; SSIS 1-8) sowie von chronisch mit Würmern beiderlei Geschlechts infizierten Mäusen (CIS 1-8) im ELISA eingesetzt. Exemplarisch sind mit SSIS 7 und CIS d1 auch die Ergebnisse für zwei einzelne Seren angegeben. Als Kontrolle wurde ein Gemisch von vier Mäuse-Normalseren (NS 1-4) verwendet. (A) Die Infektionsseren wurden in einer Verdünnung von 1:2000 im ELISA auf das Vorkommen von Antikörpern gegen die komplexen Glykolipide adulter *S. mansoni* Würmer (Ad, adulte Würmer; 100 ng an Kohlenhydrat/Vertiefung) und gegen ein Le^x-Neoglykolipid, Le^xD, (60 ng an Kohlenhydrat/Vertiefung) getestet. (B) Die Antikörper-Titer gegen die komplexe Glykolipid-Fraktion von Eiern (20 ng an Kohlenhydrat/Vertiefung) wurde für CIS 1-8, SSIS 1-8 und NS 1-4 halbquantitativ durch Verdünnungsreihen bestimmt.

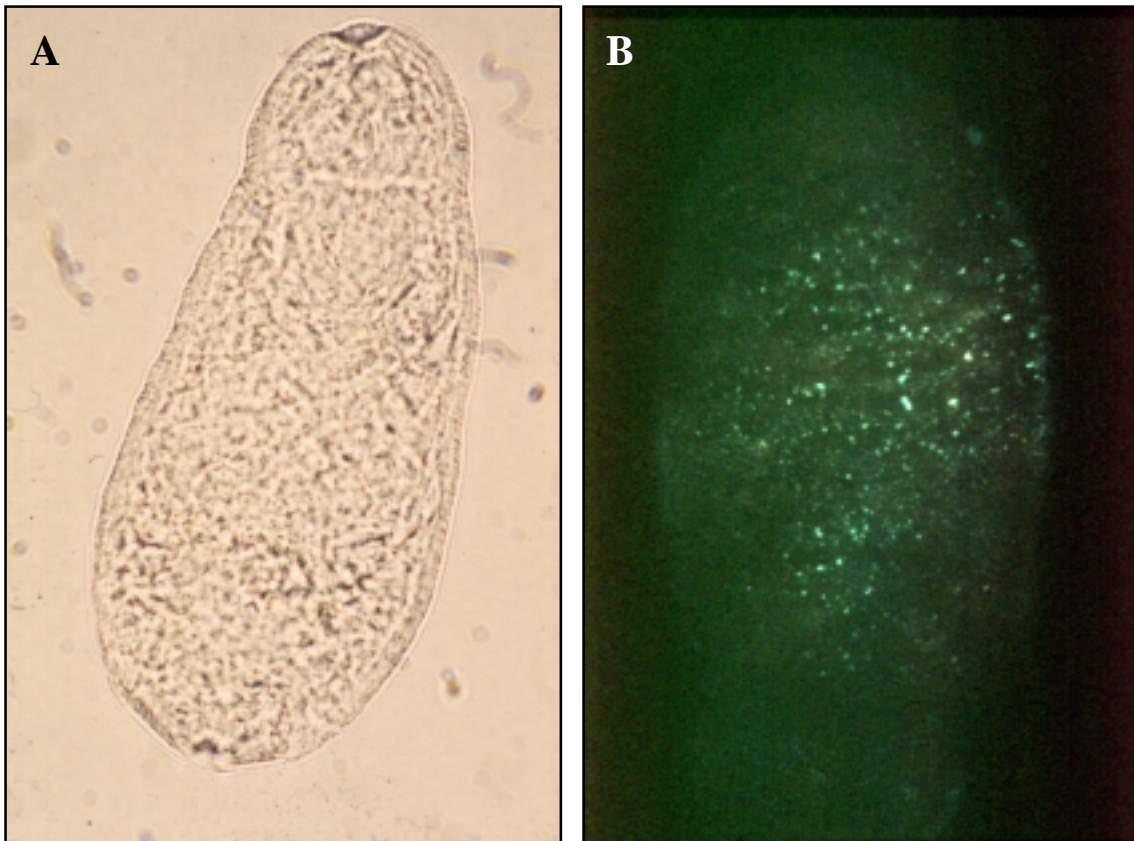
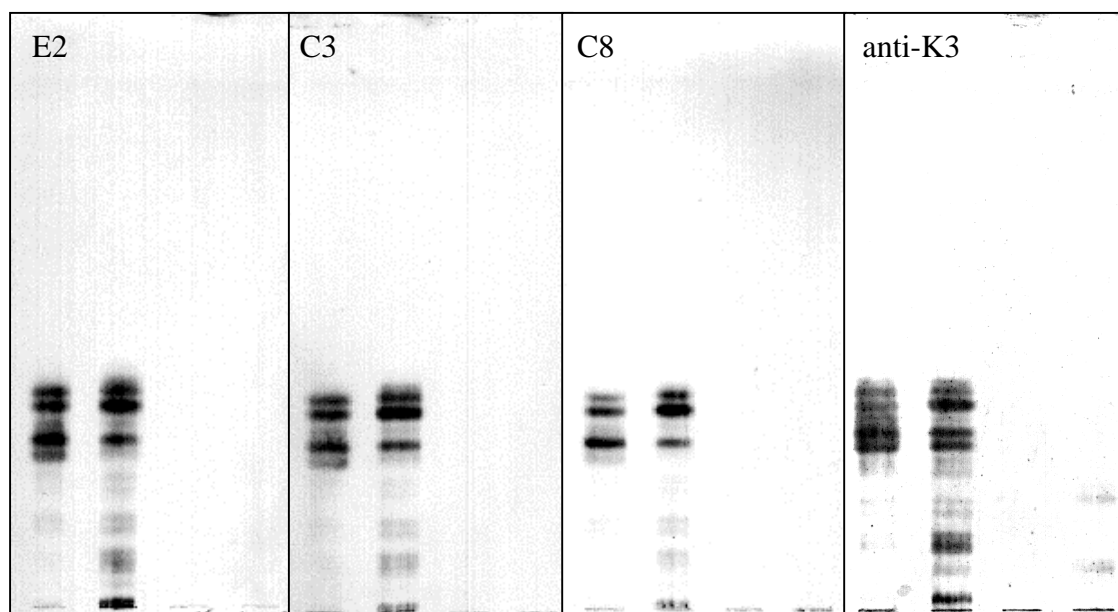


Abb. 33 Detektion des Le^X-Antigens an der Oberfläche der Hautschistosomula von *S. mansoni*. (A) Hautschistosomulum im Phasenkontrast, Vergrößerung 1:1000, Ölimmersion. (B) Fluoreszenzaufnahme eines Hautschistosomulums Vergrößerung 1:1000, Ölimmersion, Belichtungszeit 60 s. Erstantikörper anti-Le^X mAk 4D1, 1:50; Zweitantikörper Ziege anti-Maus-IgG, FITC-Konjugat, 1:100.

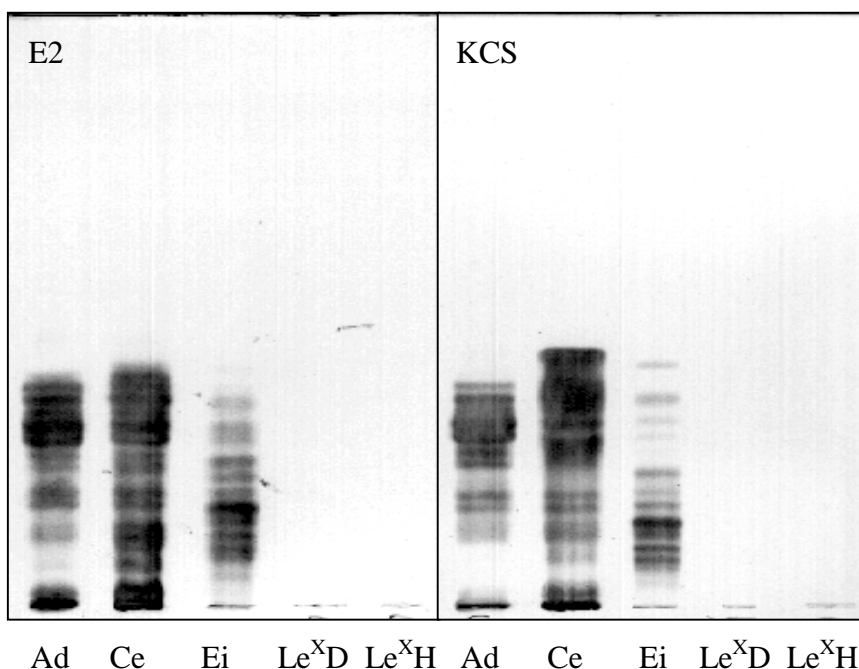
3.3.4 Kreuzreaktivität der *S. mansoni* Glykolipide mit *S. haematobium*

Drei monoklonale Antikörper (E2, C3 und C8), die durch Immunisierung mit löslichem Eiantigen von *S. haematobium* hergestellt und von Jürgen Schmitt und Dr. Andreas Ruppel, Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt worden waren, reagierten in der HPTLC-Immunfärbung mit Glykolipiden von *S. mansoni* adulten Würmern und Cercarien (Abb. 34). Sie erkannten nicht das Le^X-Antigen und auch nicht komplexe Glykolipide von *A. suum* und zeigten ein annähernd identisches Bandenmuster in der HPTLC-Immunfärbung. Ein weiterer monoklonaler Antikörper, KCS, der gegen SEA (soluble egg antigen; lösliches Eiantigen) von *S. mansoni* hergestellt wurde, zeigte ein sehr ähnliches Erkennungsmuster, erkannte aber im Cercarien- und im Ei-Stadium jeweils eine Bande hoher Mobilität, die von den *S. haematobium* monoklonalen Antikörpern E2, C3 und C8 nicht erkannt wurde (Abb. 34). Lösliches Eiantigen von *S. haematobium* scheint also Epitope mit *S. mansoni* Glykolipiden gemein zu haben.



Ad Ce Le^XD ASZW Ad Ce Le^XD ASZW Ad Ce Le^XD ASZW Ad Ce Le^XD ASZW

Abb. 34 HPTLC Immunfärbung von *S. mansoni* Glykolipiden mit *S. haematobium* monoklonalen Antikörpern sowie mit einem anti-K3 Hyperimmunserum von Kaninchen. Die eingesetzten Antikörper wurden folgendermaßen verdünnt: mAk E2 (1:10), mAk C3 (1:10), mAk C8 (1:10), anti-K3 Kaninchenhyperimmunserum 1025 C (3) (1:1000; s. Abb. 36D). Folgende Glykolipide wurden verwendet: (Ad) komplexe Glykolipide von adulten Würmern; (Ce) komplexe Glykolipide von Cercarien; (Le^XD) Le^X-Neoglykolipid; (ASZW) *A. suum* zwitterionische Glykosphingolipid-Fraktion.



Ad Ce Ei Le^XD Le^XH Ad Ce Ei Le^XD Le^XH

Abb. 35 Immunfärbung von *S. mansoni* Glykolipiden mit *S. haematobium*-spezifischen monoklonalen Antikörpern. Die eingesetzten Antikörper wurden folgendermaßen verdünnt: mAk E2 (unverdünnt), mAk KCS (1:200). Folgende Glykolipide wurden verwendet: (Ad) komplexe Glykolipide von adulten Würmern; (Ce) komplexe Glykolipide von Cercarien; (Ei) komplexe Glykolipide von Eiern; Le^X-Neoglykolipide Le^XD und Le^XH.

3.3.5 Reaktivität von anti-Glykoprotein Hyperimmunseren mit *S. mansoni* Glykolipiden

Da für Schistosomen bekannt ist, daß die auf Glykolipiden vorkommenden Antigene zum Teil auch auf den Glykoproteinen dieser Parasiten zu finden sind, wurden anti-*S. mansoni*-Glykoprotein Kaninchen Hyperimmunseren darauf getestet, ob sie *S. mansoni* Glykolipide erkennen. Außerdem wurde ein gegen das Hämocyanin der Schnecke *Megathura crenulata* gerichtetes Hyperimmunserum getestet. Auch komplexe Glykolipide von *Ascaris suum* wurden eingesetzt, die, wie die Glykolipide von Schistosomen, terminale Fucosen tragen. Weiterhin wurde das Le^X-Neoglykolipid Le^XD verwendet.

Keines der getesteten Seren erkannte das Le^X-Antigen im ELISA (nicht gezeigt) oder in der HPTLC-Immunfärbung (Abb. 36). Einige der Seren reagierten mit den Glykolipiden von *Ascaris suum* (siehe Abb. 36). Meist waren das die Seren, die auch mit *S. mansoni* Glykolipiden reagierten. Diese Erkennung könnte auf dem Vorkommen von Fucose auf den komplexen Glykolipiden von *A. suum* beruhen [414]. Für "K3", "K5" und "Ω1" zeigten die getesteten Hyperimmunseren jeweils eine starke Erkennung der *S. mansoni* komplexen Glykolipide aus Adulten, Cercarien und Eiern (Abb. 36 und Abb. 37). Während für "α1" die Ergebnisse nicht eindeutig waren, zeigten die gegen "α4" und den "near anodal arc" gerichteten Seren keine Erkennung. Interessant war eine Beobachtung bei den gegen Sm480 gerichteten Seren: Die mit Sm480Ei hergestellten Seren zeigten eine zum Teil sehr starke Erkennung der *S. mansoni* Glykolipide, aber das einzige gegen das Sm480 des Adultwurmes hergestellte Serum zeigte keine Erkennung.

Um zu überprüfen, ob dieser für Sm480 gefundene Unterschied zwischen den Seren des adulten und des Ei-Stadiums systematisch ist, wurden 13 anti-Sm480 Hyperimmunseren mittels ELISA gegen *S. mansoni* Glykolipide aus adulten Würmern, Cercarien und Eiern getestet (Abb. 38). Für die Glykolipide aller drei Stadien ergab sich eine starke Erkennung durch die anti-Sm480Ei Seren und keine oder nur eine schwache Erkennung durch die anti-Sm480Wurm Seren.

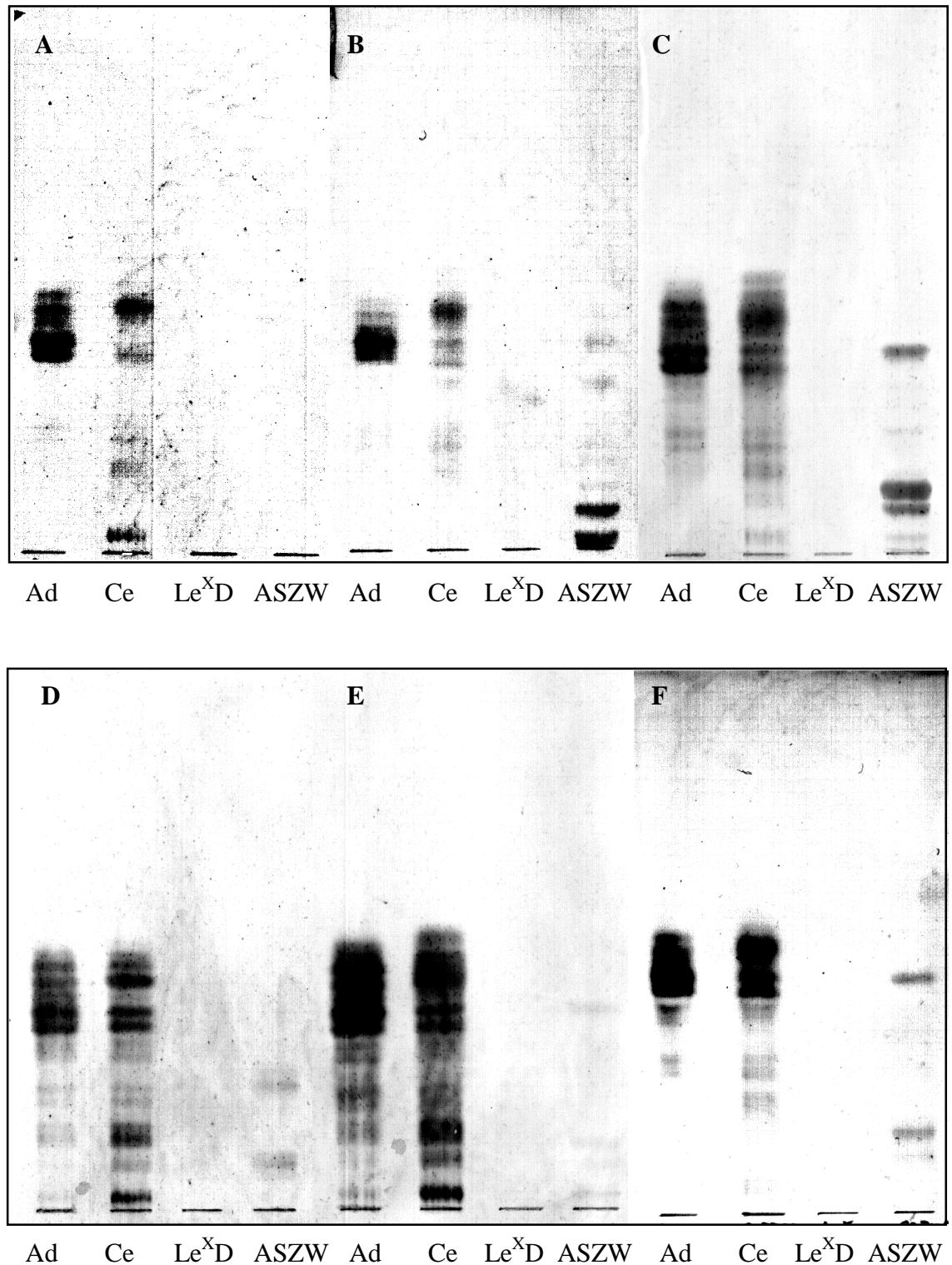


Abb. 36 HPTLC. Serologische Kreuzreaktivität zwischen den komplexen Glykolipiden von *S. mansoni* Adultwürmern und Cercarien und Hyperimmunsereen gegen *S. mansoni* Ei-Glykoproteine sowie das Hämocyanin von *M. crenulata*. Die Glykolipide wurden mit Kaninchen Hyperimmunsereen detektiert. (A), anti- α 1 BR 114 (1:500); (B), anti- ω 1 BR 16 (1:500); (C), anti-KLH (1:1000); (D), anti-k3 1025 C (3) (1:1000); (E), anti-Sm480egg 1142 C (1:500); (F), anti-k5 917 Y (1:500). Folgende Glykolipide wurden verwendet: (Ad) komplexe Glykolipide von adulten Würmern; (Ce) komplexe Glykolipide von Cercarien; (Le^XD) Le^X-Neoglykolipid; (ASZW) *A. suum* zwitterionische Glykosphingolipid-Fraktion.

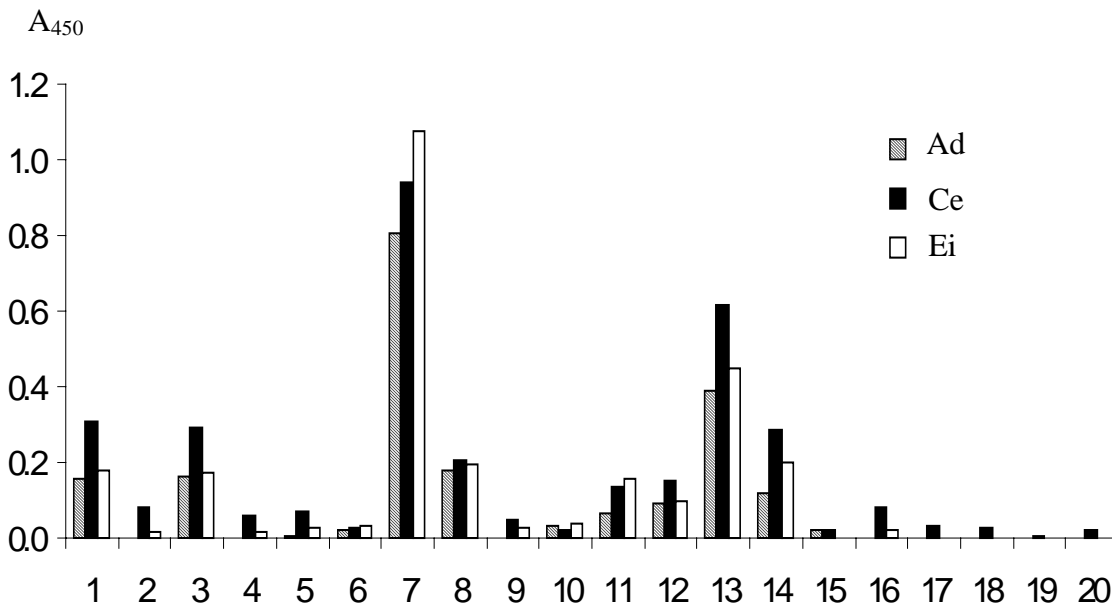


Abb. 37 Reaktivität von anti-*S. mansoni* Glykoprotein Kaninchen Hyperimmunseren gegen *S. mansoni* Glykolipide im ELISA. Komplexe Glykolipide aus Eiern (Ei), adulten Würmern (Ad) und Cercarien (Ce) wurden adsorbiert. Die verwendeten Glykolipid-Mengen pro Well entsprachen 1/10 der für die HPTLC eingesetzten Mengen. Die gegen *S. mansoni* Glykoproteine bzw. gegen das Hämocyanin der Schnecke *Megathura crenulata* gerichteten Seren wurden in der Verdünnung 1:1 000 000 eingesetzt. Die Spezifität ist in Anführungszeichen angegeben, gefolgt von der Bezeichnung (1) "near anodal arc" 889 Y; (2) "near anodal arc" 977 P; (3) "K3" 1025 C; (4) " α 1" 942 Y; (5) "near anodal arc" 917 K; (6) "K5" BR 15; (7) "Sm480Ei" 1142C; (8) "Hämocyanin der Schnecke *Megathura crenulata* (KLH)"; (9) "near anodal arc" 793 I; (10) "near anodal arc" 882 M; (11) "Sm480Ei" BR21; (12) "K3" BR 2; (13) "Sm480Ei" BR 6; (14) "K5" 917 Y; (15) "Sm480Wurm" BR 32; (16) " α 1" BR 114; (17) " Ω 1" BR 16; (18) " α 1" 728 R; (19) " α 4" 553 J; (20) " α 4" 1155 A.

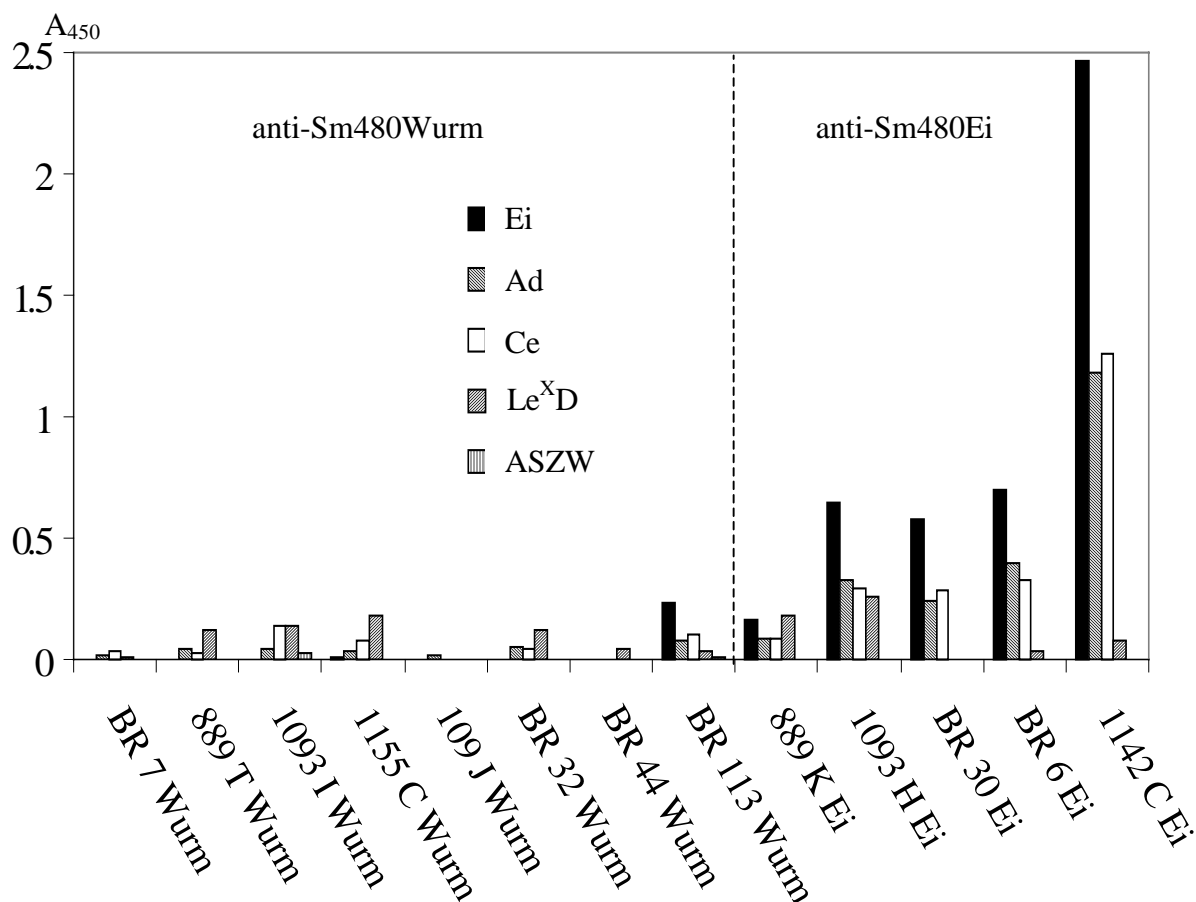


Abb. 38 Vergleich der Reaktivität von anti-Sm480Wurm und anti-Sm480Ei Hyperimmunsereen gegen komplexe *S. mansoni* Glykolipide im ELISA. Komplexe Glykolipide aus Eiern (Ei), adulten Würmern (Ad) und Cercarien (Ce) sowie ein Le^X-Neoglykolipid (Le^XD) und komplexe Glykolipide von *A. suum* (ASZW) wurden adsorbiert. Die verwendeten Glykolipid-Mengen pro Well entsprachen 10% der für die HPTLC eingesetzten Mengen. Als Primärantikörper wurden 13 verschiedene anti-Sm480 Kaninchen Hyperimmunsereen in einer Verdünnung von 1:1 000 000 eingesetzt. Neun der verwendeten Seren waren gegen Sm480Wurm, fünf gegen Sm480Ei hergestellt. Die gezeigten Daten stellen jeweils das aus Doppelwerten gebildete Mittel dar.

3.3.6 Kreuzreaktivität mit Antigenen des Hämocyanins der Schnecke *Megathura crenulata*

Die Tatsache, daß das Hämocyanin der Schnecke *M. crenulata* (KLH) von *S. mansoni* Infektionsseren erkannt wird, ist in der Literatur hinreichend beschrieben [318,322,512], und mehrfach wurde mit KLH immunisiert [110,513] und versucht, diese Kreuzreaktivität für verschiedene Serodiagnoseverfahren auszunutzen [70,72]. Da ein anti-KLH Hyperimmunsereum von Kaninchen eine starke Erkennung von *S. mansoni* Glykolipiden zeigte, die dem Bandenmuster nach Einsatz eines chronischen Infektionsserums (CIS), eines anti-Sm480Ei Kaninchensereum, oder des mAk M2D3H entsprach, ergab sich die Vermutung, daß das M2D3H-Epitop mit dem kreuzreagierenden KLH-Epitop identisch ist. Mehrere Ergebnisse bestätigten diese Vermutung:

1. Die beiden Kaninchen Hyperimmunseren anti-Sm480Ei und anti-KLH zeigten im ELISA eine ähnlich gute Erkennung von KLH (Abb. 39).
2. Die Bindung des mAk M2D3H an komplexe *S. mansoni* Glykolipide auf der Dünnschichtplatte konnte durch KLH inhibiert werden. Auch die Bindung von CIS, anti-KLH und anti-Sm480Ei Kaninchen Serum ließ sich inhibieren. Nicht inhibieren ließ sich dagegen die Bindung des anti-Le^X mAk G8G12 (Abb. 40).
3. Die durch HPTLC-Immunfärbung erhaltenen Ergebnisse (Abb. 40) wurden durch ELISA bestätigt: Nach Etablierung eines Inhibitions-ELISA unter Verwendung von KLH als Inhibitor (Abb. 41A) ließ sich zeigen, daß die Bindung des mAk M2D3H sowie die von Antikörpern des chronischen Infektionsserums an die Glykolipide von adulten *S. mansoni* Würmern, Cercarien und Eiern hemmbar war (Abb. 42). Die Bindung des anti-Le^X mAk 4D1 an Cercarien Glykolipide ließ sich hingegen im ELISA, wie schon in der HPTLC-Immunfärbung, nicht inhibieren (Abb. 41B).

Nachdem gezeigt war, daß das M2D3H-Epitop zur Erkennung von KLH durch *S. mansoni* Infektionsseren beiträgt, sollte getestet werden, inwieweit andere Epitope für die Kreuzreaktivität eine Rolle spielen. Die Methylierungsanalyse bestätigte, daß die Kohlenhydratanteile von KLH größere Mengen terminaler sowie 2-substituierter Fucosen aufweisen (ohne Abbildung). Da eine Abspaltung von Fuc durch partielle saure Hydrolyse die Erkennung von *S. mansoni* Glykolipiden sowohl durch M2D3H als auch durch chronisches Infektionsserum unterbindet, sollten die Fuc-haltigen M2D3H-Epitope auch auf KLH selektiv zerstört werden. Die selektive Freisetzung von Fuc wurde durch Nachweis der detektierbaren Fuc-Derivate nach partieller Hydrolyse, reduktiver Aminierung mit Anthranilsäure und HPLC-Trennung verifiziert (Tab. 15). Dabei ergab sich mit steigender Säurekonzentration ein ansteigender Prozentsatz an abgespaltener Fuc. Der Einsatz von 1.0 bzw. 1.5 M TFA (40 min, 80°C) setzte jeweils 74% der Fucose frei und schien für die selektive Fucose-Abspaltung optimal zu sein. Die Methylierungsanalyse bestätigte die Ergebnisse der Bausteinanalyse und wies eine starke Abnahme der terminalen Fucose nach partieller Hydrolyse auf (ohne Abbildung). Wie erwartet wurde mit der Abspaltung von Fuc-Resten das M2D3H-Epitop auf KLH zerstört, was dazu führte, daß die Erkennung von KLH durch anti-Sm480Ei Hyperimmunserum stark abnahm (Abb. 43). Als Kontrolle wurde die Bindung der anti-KLH Kaninchen-Antikörper an partiell hydrolysiertes KLH gemessen. Im Vergleich zum anti-Sm480Ei Hyperimmunserum ergab sich hier nur eine mäßige Abnahme der Erkennung. Dies zeigte, daß KLH nicht vollständig degradiert wurde, sondern daß ein Großteil der erkannten Epitope erhalten blieb, und daß offenbar selektiv das M2D3H-Epitop zerstört worden war. Diese selektive Defucosylierung führt mit der Zerstörung des M2D3H-Epitops zum Verlust der Antikörper-Kreuzreaktivität zwischen KLH und *S. mansoni*: chronisches Infektionsserum erkennt partiell hydrolysiertes KLH fast nicht mehr, wie durch Dot-Blot nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt).

Abb. 39 (folgende Seite) Detektion von KLH durch zwei Hyperimmunseren im ELISA. 100 bzw. 10 ng KLH wurden an die ELISA-Platte adsorbiert. Ein anti-Sm480Ei Hyperimmunserum sowie ein gegen das Hämocyanin der Meeresschnecke *Megathura crenulata* (KLH) hergestelltes Hyperimmunserum wurden als Erstantikörper in Verdünnungsstufen von 1:20 000 (1:20) bis 1:2 000 000 (1:2 000) eingesetzt. Als Kontrolle wurde auf den Erstantikörper verzichtet (-). Zweitantikörper Ziege gegen Kaninchen, 1:10 000. Es wurde jeweils das Mittel der Werte von Doppelmessungen gebildet.

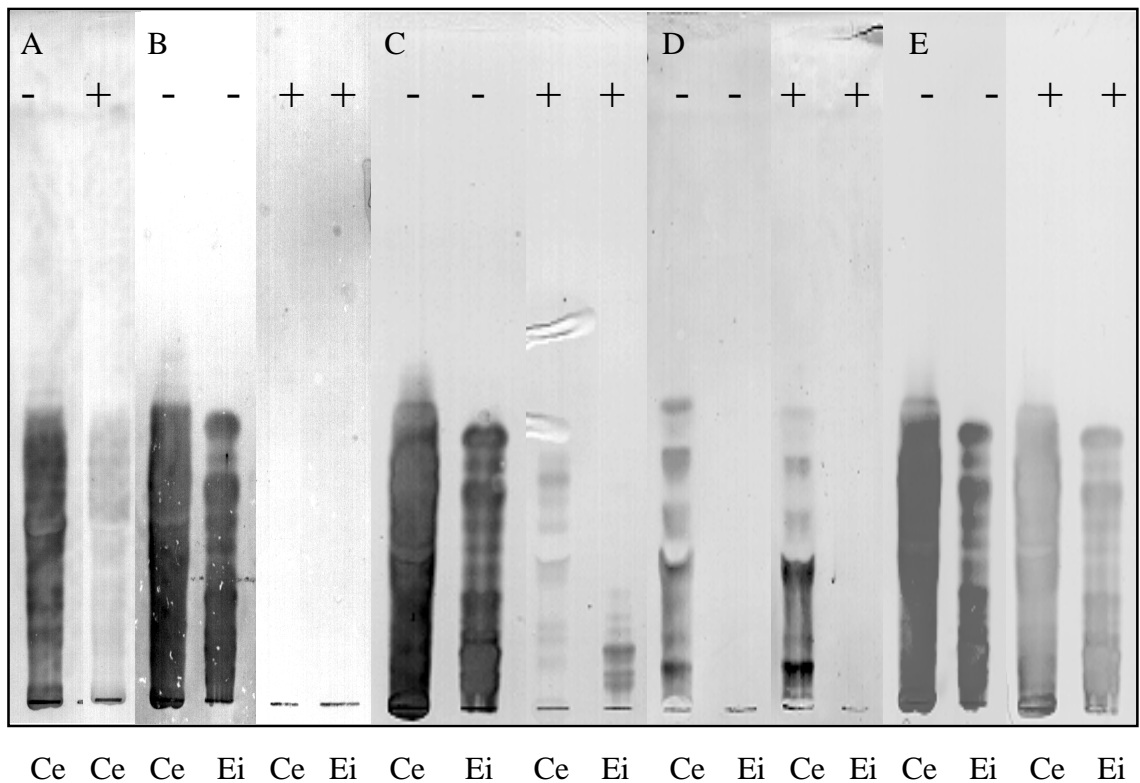
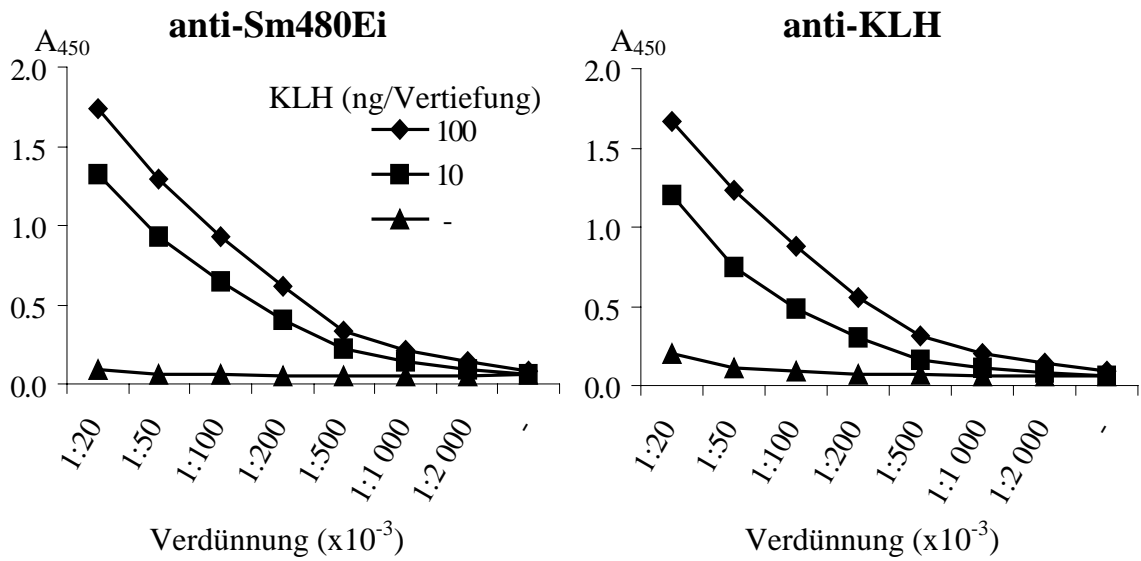


Abb. 40 Inhibition der Antikörperbindung an komplexe *S. mansoni* Glykolipide durch KLH in der HPTLC-Immunsfärbung. Komplexe Glykolipide von Cercarien (Ce) und Eiern (Ei) wurden durch HPTLC getrennt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper geschah auf der Dünnschichtplatte mit (+) oder ohne (-) 1 mg/ml KLH. Als Erstantikörper wurden (A) chronisches Mäuse-Infektionsserum (1:500), (B) anti-KLH Kaninchenserum (1:2000), (C) mAk M2D3H (1:5000), (D) der mAk G8G12 (1:500) und (E) anti-Sm480Ei Kaninchen Hyperimmunserum (1:2000) eingesetzt.

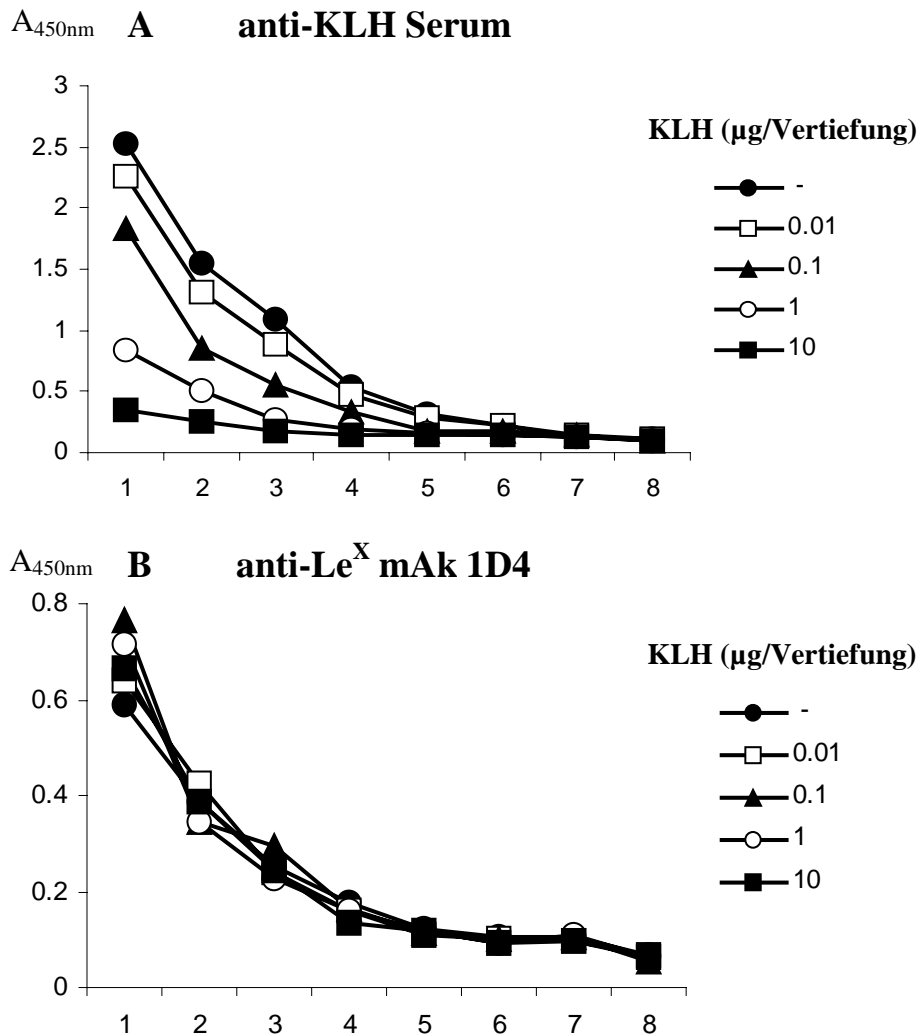


Abb. 41 Verwendung von KLH als Inhibitor im ELISA. Die eingesetzten Mengen an KLH-Inhibitor sind jeweils neben den Diagrammen angegeben. (A) Als Antikörperquelle wurde anti-KLH Kaninchenserum verwendet, dessen Bindung an KLH inhibiert wurde. 50 ng KLH /Vertiefung wurden adsorbiert. Das Serum wurde in den Verdünnungen (1) 1:50 000, (2) 1:100 000, (3) 1:200 000, (4) 1:500 000, (5) 1:1 000 000 und (6) 1:2 000 000 zugegeben. Bei (7) handelt es sich um die Zweitantikörper-Kontrolle (kein Erstantikörper), (8) ist eine Kontrolle ohne Antigen (Erstantikörper 1:50 000). (B) Als Antikörper wurde der anti-Le^X mAk 4D1 eingesetzt, dessen Bindung an komplexe Cercarien-Glykolipide (50 ng Kohlenhydrat/Vertiefung) auf ihre Inhibierbarkeit durch KLH getestet wurde. Der mAk 4D1 wurde in folgenden Verdünnungen eingesetzt: (1) 1:1 000, (2) 1:2 000, (3) 1:5 000, (4) 1:10 000 und (5) 1:20 000. Bei (6) handelt es sich um die Zweitantikörper-Kontrolle (kein Erstantikörper), (7, 8) sind Kontrollen ohne Antigen (Erstantikörper 1:1 000 bzw. 1:2 000).

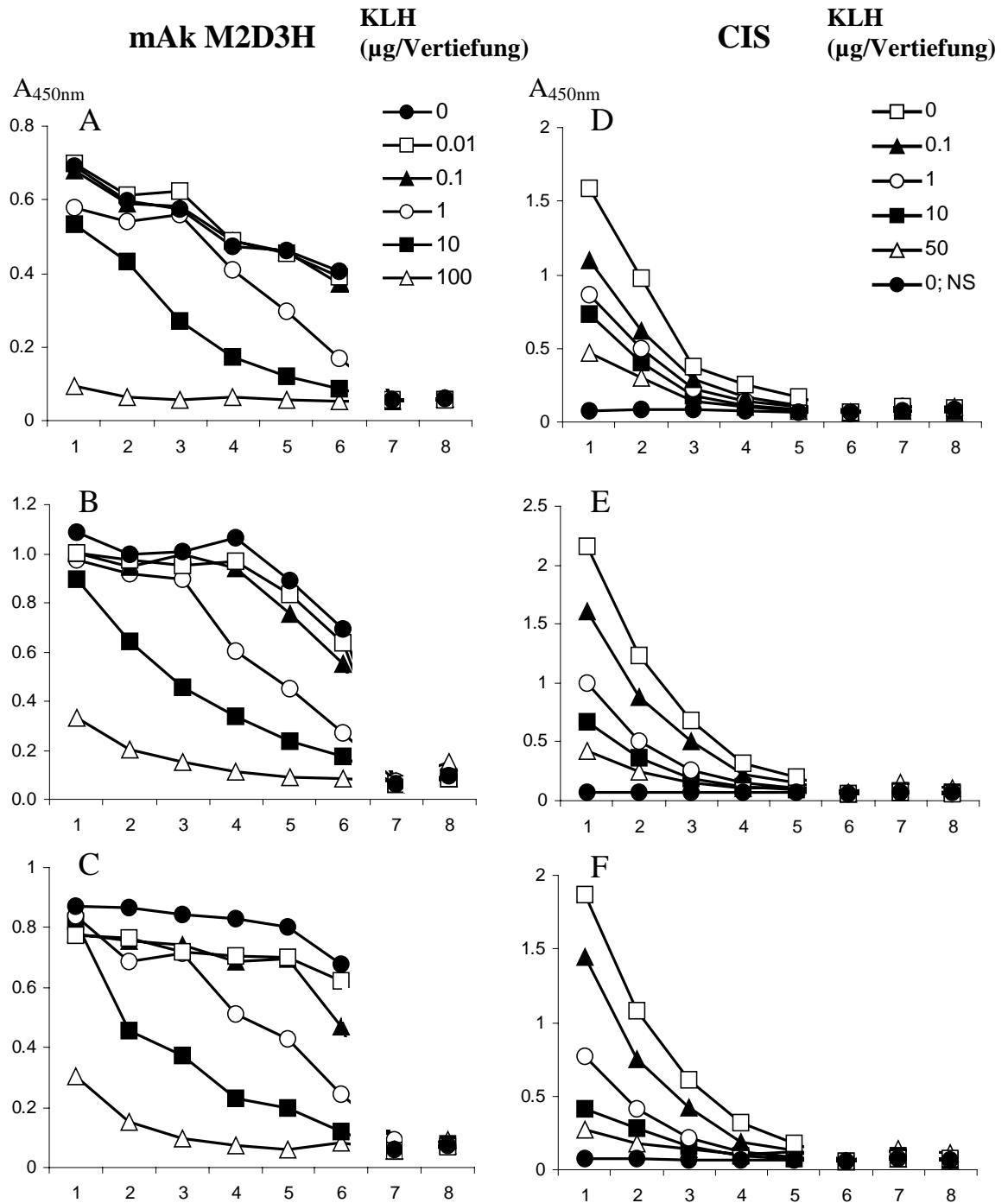


Abb. 42 Inhibition der Antikörperbindung an *S. mansoni* Glykolipide im ELISA durch KLH. Als Antikörper wurden der mAb M2D3H sowie chronisches Mäuse-Infektionsserum (CIS) eingesetzt. Mäuse-Normalserum (NS) diente als Kontrolle. Glykolipide von adulten *S. mansoni* Würmern (A, 1 ng/Vertiefung; D, 10 ng/Vertiefung), von Cercarien (B, 10 ng/Vertiefung; E, 100 ng/Vertiefung) und von Eiern (C, 1 ng/Vertiefung; F, 10 ng/Vertiefung) wurden adsorbiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte ohne KLH oder in Gegenwart unterschiedlicher Mengen von KLH in einem Volumen von 100 µl. Die eingesetzten Verdünnungen des monoklonalen Antikörpers M2D3H (A, B, C) waren (1) 1:1 000, (2) 1:2 000, (3) 1:5 000, (4) 1:10 000, (5) 1:20 000 und (6) 1:50 000. Bei (7) handelt es sich um die Zweitantikörper-Kontrolle (kein Erstantikörper), (8) ist eine Kontrolle ohne Antigen (Erstantikörper 1:1 000). Die eingesetzten Verdünnungen für CIS waren (1) 1:1 000, (2) 1:2 000, (3) 1:5 000, (4) 1:10 000 und (5) 1:20 000. (6) Zweitantikörper-Kontrolle, (7) Kontrolle ohne Antigen (Erstantikörper 1:1 000), (8) Kontrolle ohne Antigen (Erstantikörper 1:2 000).

Molarität der TFA (mM)	Freigesetzte Fucose (%)	Monosaccharidmenge (ng)						
		Fuc	Xyl	Glc	Man	Gal	GalN	GlcN
0		-						
10	2	5						
30	5	16						
100	20	64						
300	45	145						
1000	67	213						
1500	73	232						
2000	74	237					36	
4000	100	319	20	59	379	316	130	464

Tab. 15 Spezifische Fucose-Abspaltung von KLH durch partielle saure Hydrolyse. Je 50 µg KLH wurden mit TFA verschiedener Molarität für 40 min bei 80°C inkubiert. Die Inkubation mit 4 M TFA erfolgte für 4 h bei 100°C, um eine vollständige Hydrolyse zu erreichen. Durch die Hydrolyse freigesetzte Zucker wurden als Anthranilsäure-Derivate nachgewiesen (siehe 2.6.2). Für jedes Monosaccharid wurden anhand eines Standards Response-Faktoren bestimmt, mittels derer die Quantifizierung der Monosaccharide durchgeführt wurde.

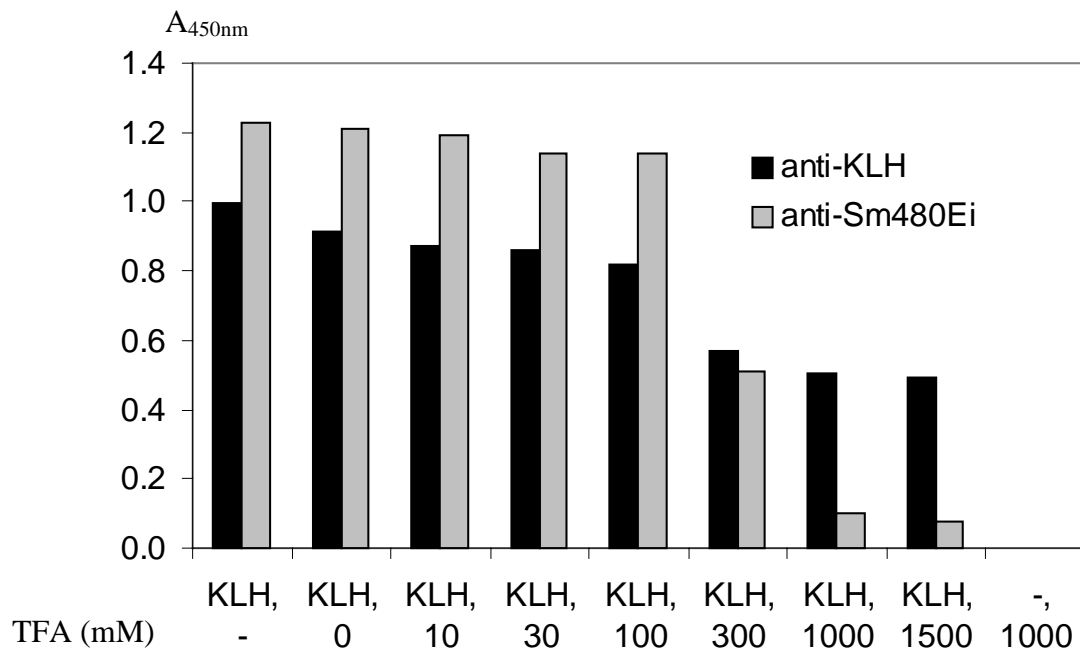


Abb. 43 Immunologische Detektion von partiell hydrolysiertem KLH. KLH wurde unbehandelt (KLH, -) oder nach 40minütiger partieller Hydrolyse bei 80°C getestet. Die Molarität der für die partielle Hydrolyse eingesetzten TFA variierte von 0 bis 1500 mM und ist für jede Probe angegeben. Für den Leerwert (-, 1000) wurde 1000 mM TFA ohne Probe eingesetzt. Für den ELISA (A) wurden pro Vertiefung 50 ng KLH adsorbiert, für die Detektion wurde anti-Sm480Ei Hyperimmunserum (1:50 000) und anti-KLH Hyperimmunserum (1:50 000) verwendet.

3.3.7 Kreuzreaktivität von *S. mansoni* Glykolipiden mit dem anti-Meerrettich-Peroxidase Serum

Frühere Studien haben gezeigt, daß polyfucosylierte Glykosphingolipide den Großteil der Glykolipide von *S. mansoni* Eiern ausmachen (siehe 1.5.5). Deshalb wurden die Glykolipide aller drei untersuchten Stadien auf das Vorkommen der strukturellen Einheit -4[Fuc α 3]GlcNAc β - hin untersucht. Hierzu wurden der mAk YZ1 und ein polyklonales Kaninchen Hyperimmunserum (anti-HRP), das gegen die Meerrettich-Peroxidase hergestellt worden war, getestet (Abb. 44A). Beide erkennen die α 3-gebundene Fucose, die am innersten GlcNAc der mit Xylose-substituierten Trimannosyl-*N*-Glykan-Grundstruktur von Pflanzen-Glykoproteinen hängt [397,398]. Der mAk YZ1 war in der HPTLC-Immunfärbung negativ (ohne Abbildung), aber das anti-HRP Serum war für die komplexen Glykolipide aller drei Stadien positiv (Abb. 44A). Als Positivkontrolle wurde ein anti-Sm480Ei Hyperimmunserum eingesetzt (Abb. 44B).

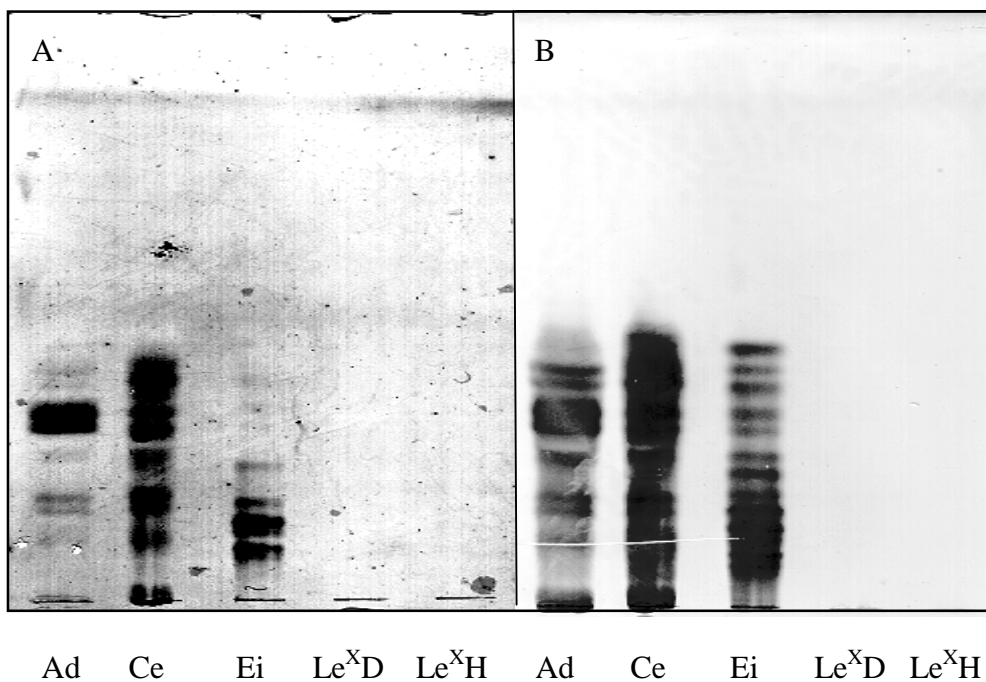
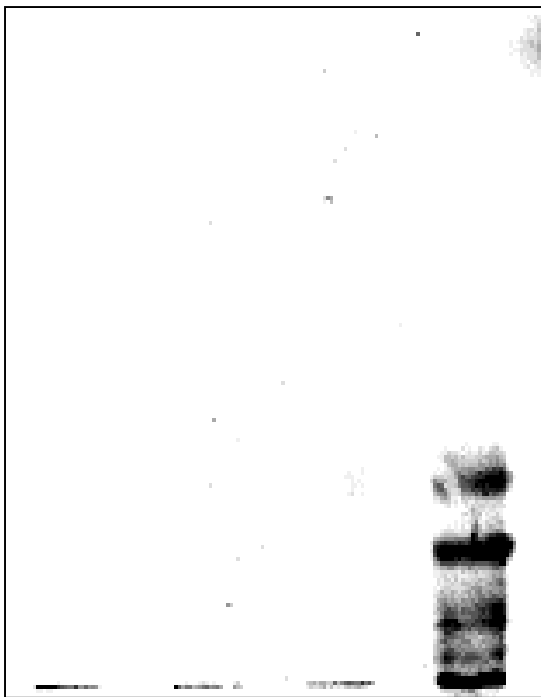


Abb. 44 HPTLC-Immunfärbung der komplexen *S. mansoni* Glykolipide von adulten Würmern (Ad), Cercarien (Ce) und Eiern (Ei) mit einem anti-HRP bzw. anti-Sm480Ei Hyperimmunserum. *S. mansoni* Glykolipide verschiedener Stadien sowie die beiden Le^X-Neoglykolipide Le^XD und Le^XH wurden durch HPTLC getrennt (Laufmittel CMW ,50:40:10, 0.25 % KCl im Wasser) und mit (A) anti-HRP Hyperimmunserum (1:500) bzw. (B) mit anti-Sm480Ei Hyperimmunserum (1:1000) immunchemisch detektiert. Die Färbung wurde mit alkalischer Phosphatase durchgeführt (2.3.2.2).

3.3.8 Test von *S. mansoni* Glykolipiden auf Phosphocholin-Epitope

Da es in der Literatur Hinweise gibt, daß Phosphocholin auch bei Schistosomen vorkommen könnte [514,515], wurden die komplexen Glykolipide von *S. mansoni* Cercarien und adulten Würmern mit einem monoklonalen anti-Phosphocholin Antikörper in der HPTLC-Immunfärbung getestet. Die *S. mansoni* Glykolipide waren negativ und scheinen somit kein Phosphocholin zu tragen (Abb. 45).



Ad Ce Le^XD ASZW
500 50

Abb. 45 HPTLC-Immunfärbung der komplexen Glykolipide von *S. mansoni* adulten Würmern und Cercarien mit einem Phosphocholin-spezifischen mAk. Komplexe Glykolipide von *S. mansoni* adulten Würmern (Ad) und Cercarien (Ce) wurden durch HPTLC aufgetrennt (Laufmittel CMW, 50:40:10, 0.25% KCl im Wasser, v/v/v). Weiter wurden das Le^X-Neoglykolipid Le^XD sowie komplexe Glykolipide von *A. suum* verwendet (ASZW; Positivkontrolle). Angegeben sind jeweils die äquivalenten Mengen an lyophilisiertem Parasiten-Material in µg. Die Detektion erfolgte mit dem mAk TEPC15 (1:500).

3.3.9 Bausteinanalyse komplexer Glykolipide

3.3.9.1 Vergleich verschiedener Baustein-Analysemethoden

Bei der Bausteinanalyse der komplexen Glykolipide wurde anfänglich eine Schwefelsäurehydrolyse durchgeführt. Dies führte zu niedrigen, nicht reproduzierbaren Werten für die *N*-Acetylhexosamine. Wie die am Beispiel einzelner Fraktionen der komplexen Glykolipide von Cercarien (3.4) gewonnenen Ergebnisse zeigen (s. Tab. 16), waren im Fall der *N*-Acetylhexosamin-Bausteine, wenn überhaupt, nur substöchiometrische Mengen nachweisbar. Dies ließ die Vermutung aufkommen, daß die routinemäßig verwendete Schwefelsäurehydrolyse für die Hydrolyse der Glykanstrukturen der *S. mansoni* Glykolipide nicht geeignet ist. Deshalb wurden vier andere Hydrolysemethoden auf ihre Eignung für *S. mansoni* Glykolipide getestet.

Monosaccharid	Komplexe Glykolipid-Fractionen von Cercarien				
	C1	C2	C3	C4	C5
Fuc	2.0	2.5	3.0	2.3	1.0
Glc	1.2	1.0	1.0	1.0	1.8
Gal	1.0	0.3	+	-	0.1
GlcNAc	+	+	-	-	-
GalNAc	+	+	-	-	-

Tab. 16 Bausteinanalyse der fraktionierten, komplexen Glykolipide von *S. mansoni* Cercarien. Die Glykolipide wurden nach Schwefelsäurehydrolyse reduziert, peracetyliert, als Alditolacetate durch Gaschromatographie getrennt mit einem Flammen-Ionisationsdetektor nachgewiesen und anhand eines Standards quantifiziert. Spuren (≤ 0.1) sind mit (+) angegeben.

Die Hydrolysen wurden jeweils 4 h bei 100°C durchgeführt. Die Hydrolyseprodukte wurden gaschromatographisch als Alditolacetate nachgewiesen und quantifiziert (Tab. 17). Während alle Hydrolysemethoden Fuc und Gal sowie Glc in größeren Mengen freisetzen, zeigten sich bei den *N*-Acetylhexosaminen große Unterschiede: Bei Verwendung von 4 M TFA wurden für Hexosen und *N*-Acetylhexosamin vergleichbare Mengen detektiert. Nach Hydrolyse mit Ameisensäure/Wasser/TFA (3:2:1, v/v/v) wurden etwas geringere Mengen an *N*-Acetylhexosaminen gefunden, allerdings waren hier auch für Fuc und Gal die erhaltenen Werte niedriger als im Fall der Hydrolyse mit 4 M TFA. Im Gegensatz zu den Hydrolysemethoden, bei denen TFA verwendet wurde, lieferten die Hydrolysen mit Salzsäure deutlich geringere Mengen an *N*-Acetylhexosaminen (6 M HCl) bzw. gar keine *N*-Acetylhexosamine (4 M HCl). Im weiteren wurde deshalb 4 M TFA für die Hydrolyse der komplexen *S. mansoni* Glykolipide eingesetzt.

Mono-saccharid	4 M TFA	Ameisensäure/Wasser/TFA (3:2:1, v/v/v)	4 M HCl	6 M HCl
Fuc	91.9 (1.0)	73.8 (1.0)	65.4 (1.0)	73.8 (1.0)
Glc	51.9 (0.55)	17.8 (0.25)	32.2 (0.5)	44.8 (0.6)
Gal	24.0 (0.25)	14.8 (0.2)	33.0 (0.50)	18.4 (0.25)
GlcNAc	55.7 (0.6)	44.7 (0.6)	-	7.6 (0.1)
GalNAc	49.2 (0.55)	32.3 (0.45)	-	9.8 (0.15)

Tab. 17 Vergleich verschiedener Hydrolysemethoden in der Bausteinanalyse von *S. mansoni* Glykolipiden. Jeweils 1 % der Fraktion C2 der komplexen Glykolipide von Cercarien wurde unter Verwendung von 0.5 ml verschiedener Hydrolyselösungen 4 h bei 100°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und danach reduziert, peracetyliert und durch GC mit Flammenionisationsdetektor nachgewiesen. Angegeben sind gemittelte Mengen (DB1- und DB210-Säule) der Alditolacetate in ng. In Klammern sind die relativen Verhältnisse angegeben (Fuc=1.0).

3.3.9.2 Bausteinanalyse komplexer Glykolipide von *S. mansoni* nach TFA-Hydrolyse

Um bei allen drei untersuchten Stadien einen Einblick in die chemische Zusammensetzung der dominanten Epitope der komplexen Glykolipide zu bekommen, wurden die Glykolipide durch Kohlenhydrat-Bausteinanalyse, Chromtrioxid-Oxidation und Methylierungsanalyse untersucht. Die Bausteinanalyse zeigte, daß die Monosaccharide Glucosamin, Galactosamin, Galactose, Mannose, Glucose und Fucose in unterschiedlichen Verhältnissen in den Glykolipiden der drei Stadien vorkommen (Abb. 46 und Tab. 18). Besonders auffällig ist der hohe Grad an Fucosylierung in allen drei Stadien, das Fehlen von Mannose und die nur geringen Mengen an Galactose in den Glykolipiden des Ei-Stadiums, die geringen Mengen an Mannose und die großen Mengen an Galactose bei Cercarien-Glykolipiden, sowie die deutliche Präsenz von Mannose und Galactose in der Adultwurm-Glykolipid-Fraktion.

Um die in Tab. 18 angegebenen Kohlenhydrat-Mengen zu gewinnen, mußten 1.6g lyophilisierte Adultwürmer, 3.2 g lyophilisierte Cercarien bzw. 300 mg lyophilisierte Eier extrahiert werden. Während die Glykolipid-Ausbeuten für Eier und Cercarien bei etwa 0.6 mg Glykolipid pro Gramm lyophilisierten Parasitenmaterials lagen, waren die Ausbeuten bei Adultwürmern etwa um eine Zehnerpotenz niedriger.

Monosaccharid	Lebenszyklus-Stadium		
	Ad	Ce	Ei
GlcN	22 µg	442 µg	51 µg
GalN	22 µg	345 µg	28 µg
Gal	11 µg	354 µg	8 µg
Man	15 µg	47 µg	-
Glc	12 µg	181 µg	14 µg
Fuc	44 µg	894 µg	91 µg
Gesamt	126 µg	2263 µg	192 µg

Tab. 18 Bausteinanalyse komplexer Glykolipide der drei untersuchten Stadien von *S. mansoni*. Die Monosaccharid-Zusammensetzung wurde nach TFA-Hydrolyse und Anthranilsäure-Derivatisierung durch RP-Chromatographie der fluoreszenzmarkierten Komponenten ermittelt. Anhand eines Standardgemisches wurde für die einzelnen Monosaccharid-Derivate eine Kalibrierung vorgenommen, was eine Quantifizierung der Komponenten ermöglichte. Ad, adulte Würmer; Ce, Cercarien; Ei, Eier.

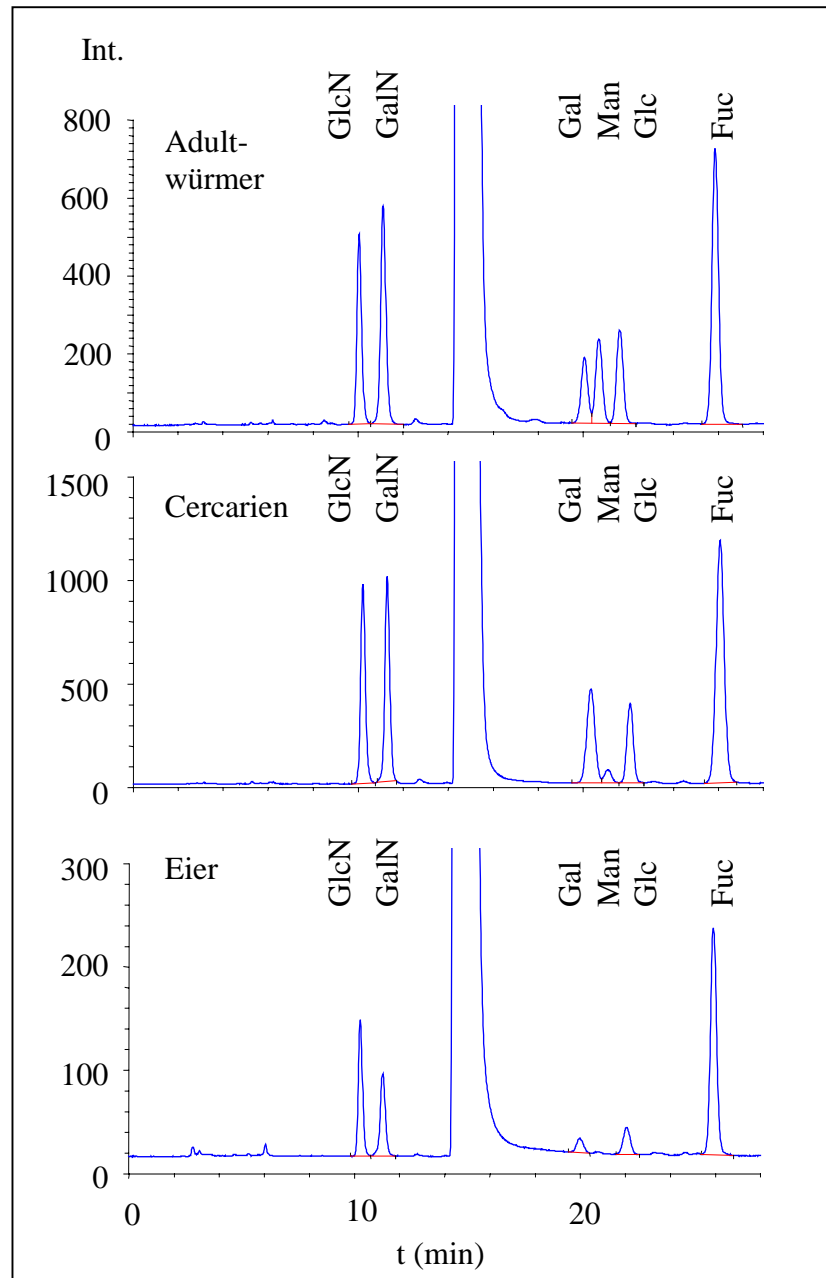


Abb. 46 Bausteinanalyse der komplexen Glykolipide der drei untersuchten Stadien von *S. mansoni*. Die Monosaccharid-Derivate wurden nach TFA-Hydrolyse und Anthranilsäure-Markierung durch RP-Chromatographie getrennt. Mittels eines Standardgemisches wurden für die einzelnen Monosaccharid-Derivate eine Kalibrierung vorgenommen, was eine Quantifizierung der Komponenten ermöglichte (siehe Tab. 18).

3.3.9.3 Bausteinanalyse nach Chromtrioxid-Oxidation

Um die anomere Konfigurationen der in den Glykolipiden vorkommenden Monosaccharide zu bestimmen, wurde eine Chromtrioxid-Oxidation durchgeführt. In peracetylierten Oligosacchariden werden durch Chromtrioxid-Oxidation β -gebundene Zuckerreste zerstört, α -gebundene Zuckerreste bleiben erhalten [414,415]. Glykolipide aller drei Stadien wurden durch diese Methode auf die Konfiguration am anomeren C-Atom hin untersucht. Nach der Oxidation wurden die Produkte einer Bausteinanalyse unterzogen. GlcNAc, GalNAc, Gal, Man und Glc wurden durch die CrO_3 -Behandlung weitgehend

zerstört (β -anomere Form), während Fuc als einziger Kohlenhydrat-Baustein überwiegend erhalten blieb (α -anomere Form; siehe Tab. 19).

Monosaccharid	Molare Verhältnisse					
	Nativ			CrO ₃ -Oxidation		
	Ad	Ce	Ei	Ad	Ce	Ei
GlcN	0.65	0.55	0.5	-	+	+
GalN	0.7	0.5	0.3	-	-	-
Gal	0.3	0.5	+	-	+	-
Man	0.4	+	-	0.2	+	-
Glc	0.45	0.25	0.2	0.3	+	+
Fuc	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Tab. 19 Anomere Konfigurationsanalyse der komplexen Glykolipide von *S. mansoni*. Für die nativen Glykolipide sind die Mittelwerte von zwei unterschiedlich durchgeführten Einzelbestimmungen angegeben. Die Bausteine wurden hierbei einerseits als Anthranilsäure-Derivate nach RP-HPLC, andererseits als peracetylierte Alditole nach GC bestimmt. Die molaren Verhältnisse sind relativ zu Fucose=1.0 angegeben. Nach CrO₃-Oxidation der Glykolipide wurden die Alditolacetate durch GC bestimmt. Die Komponenten wurden unter Verwendung eines Standards quantifiziert. Alle Werte ≤ 0.1 sind als Spuren angegeben (+). Ad, Adulte; Ce, Cercarien; Ei, Eier.

3.3.10 Immunchemische Analyse der komplexen Glykolipide von *S. mansoni* vor und nach Defucosylierung

3.3.10.1 Partielle Hydrolyse und Methylierungsanalyse der komplexen Glykolipide von *S. mansoni*

Die Methylierungsanalyse der komplexen Glykolipide von *S. mansoni* zur Bestimmung der Verknüpfungspositionen ergab als gemeinsame Charakteristika bei allen untersuchten Stadien terminale und monosubstituierte Fucose-Reste sowie 3,4-disubstituiertes *N*-Acetylglucosamin als Verzweigungspunkt (Abb. 48 und Tab. 20). Die monosubstituierte Fucose wurde durch GC/MS nach Elektronenstoßionisation (EI) weiter untersucht. Ein Vergleich des Fragmentierungsmusters mit publizierten Daten [516] und mit einem in einer Datenbank hinterlegten Massenspektrum (Carbbank, Complex Carbohydrate Research Center, Athens, Georgia, USA) zeigte, daß es sich um eine 2-substituierte Fuc handelte (1,2,5-Tri-*O*-acetyl-3,4-di-*O*-methylfucitol; Abb. 47). Bei Cercarien und adulten Würmern wurden weiterhin terminale und 3-substituierte Gal-Reste gefunden. Durch partielle saure Hydrolyse mit TFA ließ sich selektiv die Fucose von den komplexen Glykolipiden abspalten. Eine Fraktion der komplexen Glykolipide von Cercarien (Fraktion C2; siehe 3.4, Abb. 57) wurde eingesetzt, um die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Die Spaltprodukte wurden durch MALDI-TOF-MS detektiert (Abb. 49). Als Standard wurde Globopentaosylceramid (Forssman-Antigen, GalNAc α -3GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer) eingesetzt. Beim Forssman-Antigen erfolgte bei

Inkubation mit 1.0 M TFA (40 min, 100°C) eine fortschreitende Degradation über CTetH (1360.2 Da), CTH (1157.1 Da), CDH (995.1 Da) bis zum CMH (833.3 Da) (Abb. 49B, D). Die Fraktion C2 wurde im positiven Linear-Modus gemessen, da sich im Reflektor-Modus nur sehr schwache Signale ergaben. Die native Probe zeigte Signale bei etwa 1678 Da, 1820 Da und 1970 Da. Die vorliegenden Massenunterschiede zwischen diesen Komponenten lagen bei etwa 146 Da, was dem Masseninkrement einer Fuc entspricht. Die drei Komponenten der Fraktion C2 schienen sich also im Grad der Fucosylierung zu unterscheiden. Nach Behandlung mit 0.5 M TFA (100°C, 40 min; Abb. 49C) oder mit 2.0 M TFA (Abb. 49E) zeigte sich ein starkes Signal bei etwa 1668 Da. Diese Bedingungen schienen also geeignet, selektiv Fuc von *S. mansoni* Glykolipiden abzuspalten, wobei der Rest des Glykolipids intakt zu bleiben scheint.

Diese Stabilität des Rückgrats ist offensichtlich über einen breiten Säurekonzentrationsbereich gegeben. Im folgenden wurden eine mittlere TFA-Konzentration zur Defucosylierung der komplexen Glykolipid-Fractionen von adulten Würmern, Cercarien und Eiern angewendet (1.0 M TFA, 100°C, 40 min) und die Hydrolyseprodukte zur Methylierungsanalyse eingesetzt (Abb. 48 und Tab. 20). Zu sehen war eine Abnahme der terminalen und der 2-substituierten Fucose-Reste sowie des 3,4-disubstituierten GlcNAc und ein reziproker Anstieg des 4-substituierten GlcNAc bei allen drei untersuchten Stadien. Die abgespaltenen Fucosen hängen also einzeln oder in 1,2-verknüpften Ketten an internen GlcNAc-Resten, da dies der einzige Baustein war, bei dem die partielle Hydrolyse eine Substitutionsstelle freisetzte. Dieses -4[Fuc3]GlcNAc-Motiv scheint in den komplexen Glykolipiden aller drei untersuchten Stadien vorzukommen. Terminales GlcNAc wurde in keinem Fall gefunden, terminales GalNAc war nur bei Adultwürmern in kleinen Mengen nachweisbar. Es wurde aber durch die partielle Hydrolyse nicht in größeren Mengen gebildet.

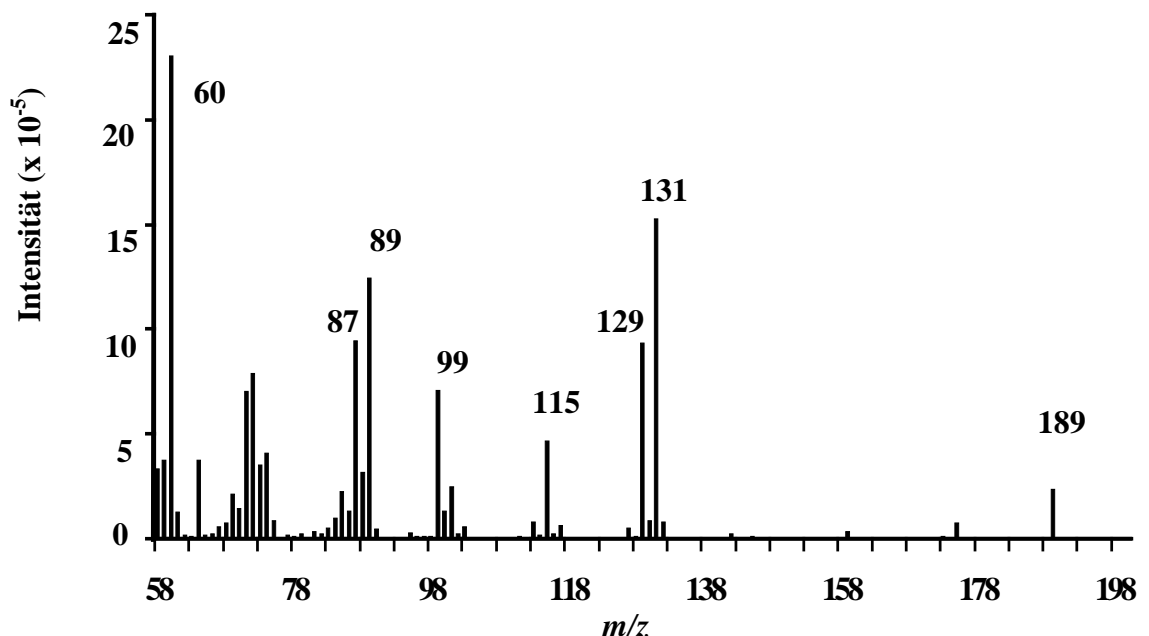


Abb. 47 Massenspektrum von 1,2,5-Tri-*O*-acetyl-3,4-di-*O*-methylfucitol nach GC/MS und Elektronenstoß-Ionisation. Neben der Analyse durch chemische Ionisation, in der monosubstituierte Fucose durch das charakteristische Ammoniumaddukt $[M+NH_4]^+$ bei 338 Da identifiziert wurde (Peak 2 in Abb. 48C und Tab. 20), wurde auch eine GC/MS-Analyse (Kapillarsäule DB1, 60 m) nach Elektronenstoßionisation durchgeführt, bei der sich ein für 2-substituierte Fuc charakteristisches Fragmentionen-Muster ergab.

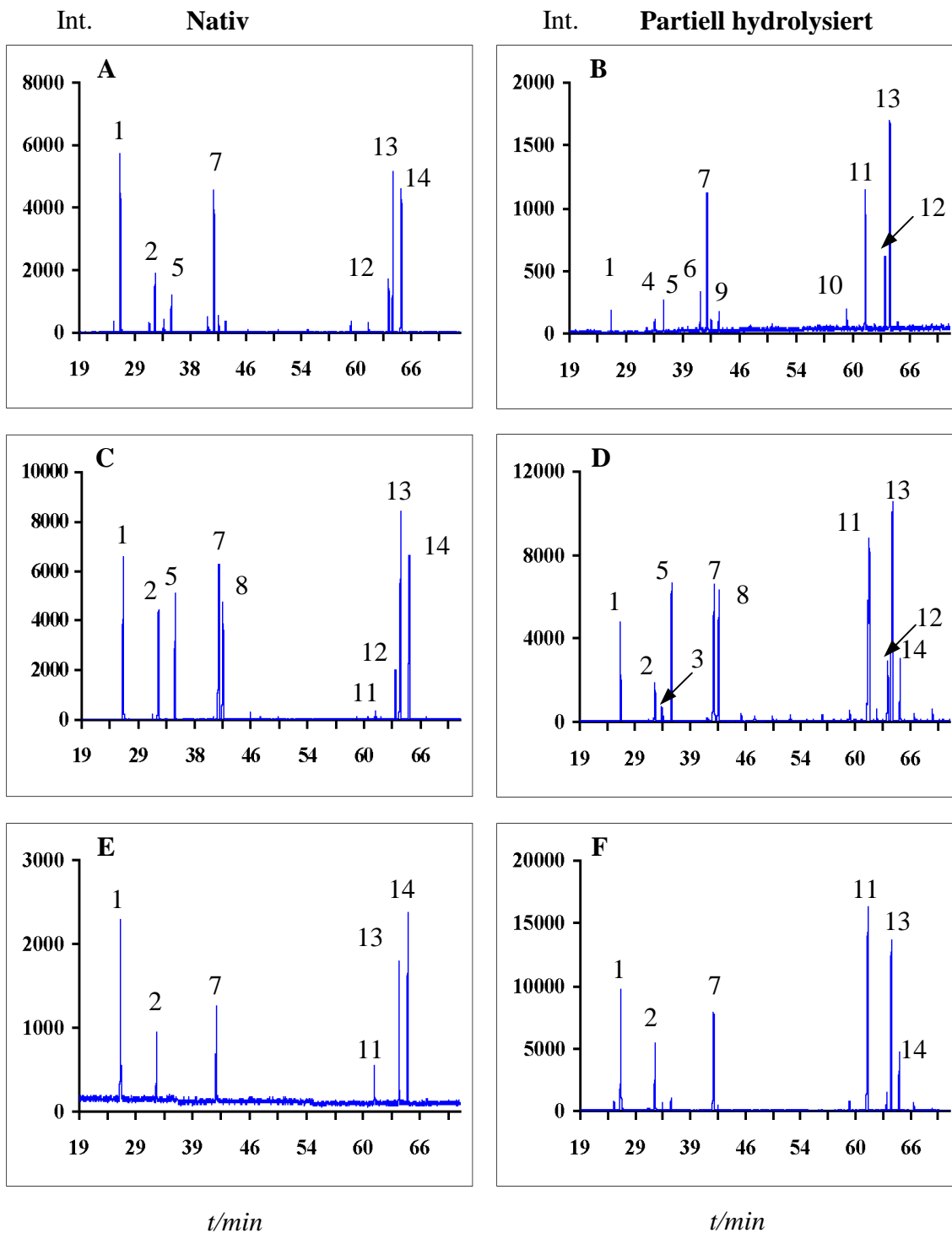


Abb. 48 Methylierungsanalyse der komplexen Glykolipide verschiedener Stadien von *S. mansoni*. Komplexe Glykolipide von adulten Würmern (A, B), Cercarien (C, D) und Eiern (E, F) wurden nativ (A; C; E) beziehungsweise nach partieller Hydrolyse (B, D, F; 1.0 M TFA, 40 min, 100°C) für die Methylierungsanalyse eingesetzt. Durch Permethylierung, Hydrolyse, Reduktion und Peracetylierung wurden PMAAs gewonnen, die durch GC/MS analysiert wurden. (1) terminale Fucose, (2) 2-substituierte Fucose, (3) terminale Glucose, (4) terminale Mannose, (5) terminale Galactose, (6) 2-substituierte Mannose, (7) 4-substituierte Glucose, (8) 3-substituierte Galactose, (9) 6-substituierte Mannose, (10) terminales GalNAc, (11) 4-substituiertes GlcNAc, (12) 3-substituiertes GlcNAc, (13) 3-substituiertes GalNAc, (14) 3,4-disubstituiertes GlcNAc.

	Verknüpfung	Mengenverhältnisse						PMAA
		Nativ			Partielle Hydrolyse			
		Ad	Ce	Ei	Ad	Ce	Ei	
1	term. Fuc	1.55	1.3	2.8	0.15	0.4	0.95	2,3,4,-FucOH
		(1.45)	(0.85)	(2.75)	(0.30)	(0.20)	(1.45)	
2	2-subst. Fuc	0.55	0.65	0.9	+	0.15	0.35	3,4-FucOH
		(0.2)	(0.2)	(0.75)	(+)	(+)	(0.45)	
3	term. Glc	-	-	-	+	-	-	2,3,4,6-GlcOH
		(+)	(-)	(-)	(0.30)	(+)	(0.15)	
4	term. Man	-	-	-	+	-	-	2,3,4,6-ManOH
		(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	
5	term. Gal	0.3	0.6	-	0.2	0.55	-	2,3,4,6-GalOH
		(0.4)	(0.35)	(-)	(0.2)	(-)	(-)	
6	2-subst. Man	+	-	-	0.2	-	-	3,4,6-ManOH
		(+)	(-)	(-)	(0.2)	(-)	(-)	
7	4-subst. Glc	1	1.1	1.05	0.9	0.8	0.85	2,3,6-GlcOH
		(2.5)	(1.25)	(2.7)	(3.25)	(1.0)	(2.15)	
8	3-subst. Gal	+	0.65	-	+	0.6	-	2,4,6-GalOH
		(0.25)	(0.5)	(-)	(0.2)	(0.55)	(-)	
9	6-subst. Man	+	-	-	0.15	-	-	2,3,4-ManOH
		(+)	(-)	(-)	(0.2)	(-)	(-)	
10	term. GalNAc	-	-	-	+	-	-	3,4,6-GalN(Me)AcOH
		(+)	(-)	(-)	(0.15)	(-)	(-)	
11	4-subst. GlcNAc	-	-	0.3	0.65	0.35	1.7	3,6-GlcN(Me)AcOH
		(+)	(+)	(0.3)	(0.95)	(1.05)	(2.75)	
12	3-subst. GlcNAc	0.3	0.2	-	0.25	0.2	+	4,6-GlcN(Me)AcOH
		(0.25)	(0.2)	(-)	(0.4)	(0.2)	(+)	
13	3-subst. GalNAc	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	4,6-GalN(Me)AcOH
		(1.0)	(1.0)	(1.0)	(1.0)	(1.0)	(1.0)	
14	3,4-subst. GlcNAc	0.9	0.55	1.6	-	+	0.15	6-GlcN(Me)AcOH
		(1.05)	(0.5)	(2.5)	(+)	(+)	(0.3)	

Tab. 20 Methylierungsanalyse der komplexen Glykolipide verschiedener Stadien von *S. mansoni*. Komplexe Glykolipide wurden nativ beziehungsweise nach partieller Hydrolyse (1.0 M TFA, 40 min, 100°C) für die Methylierungsanalyse eingesetzt. Hierzu wurden die Glykolipide permethyliert und dann mit TFA (4 M, 4 h, 100°C) vollständig hydrolysiert, reduziert und peracetyliert. Alternativ wurde die Hydrolyse mit Schwefelsäure-Eisessig durchgeführt (siehe 2.6.1.2). Die Ergebnisse sind als relative Mengen angegeben, basierend auf 3-subst. GalNAc = 1.0. Unter den Ergebnissen für die TFA-Hydrolyse sind jeweils die Ergebnisse für die Schwefelsäurehydrolyse in Klammern angegeben. Term., terminal; subst., substituiert; term. Gal entspricht 2,3,4,6-GalOH oder 2,3,4,6-Tetra-O-methylgalactitol als Alditolacetat, etc.; term. GalNAc entspricht 3,4,6-GalN(Me)AcOH oder 2-Deoxy-2-(N-methyl)acetamido-3,4,6-tri-O-methylgalactitol, etc. Signifikante Mengenänderungen einzelner Komponenten im Vergleich nativer zu den partiell hydrolysierten Glykolipiden sind fett hervorgehoben. Werte ≤0.1 sind als Spuren (+) angegeben. Ad, Adulte; Ce, Cercarien; Ei, Eier. Die in der linken Spalte angegebenen Nummern der Komponenten entsprechen denen in Abbildung Abb. 48.

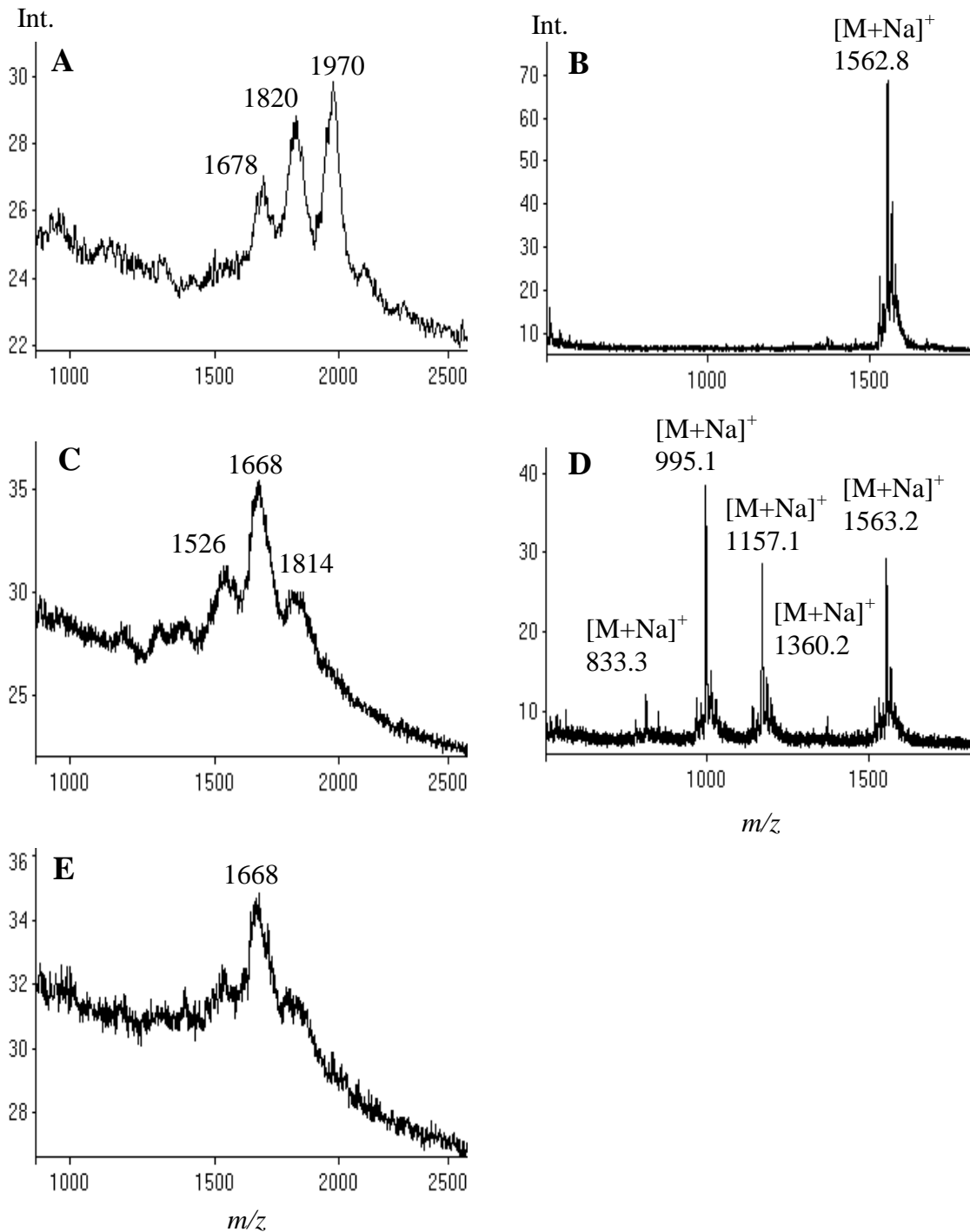


Abb. 49 Detektion der Produkte nach partieller saurer Hydrolyse von Glykolipiden durch MALDI-TOF-MS. Die Fraktion C2 der komplexen Glykolipide von Cercarien wurde nativ (A; positiv-Ion Linearmodus) bzw. nach partieller Hydrolyse (40 min, 100°C) mit 0.5 M TFA (C) oder 2.0 M TFA (E) eingesetzt. Als Standardsubstanz wurde Globopentaosylceramid (Forssman-Antigen) verwendet. Das Forssman-Antigen wurde nativ (B) und nach partieller Hydrolyse (D; 1.0 M TFA, 100°C, 40 min) durch MALDI-TOF-MS (positiver Reflektormodus) analysiert.

3.3.10.2 HPTLC-Immunfärbung von Glykolipiden nach Defucosylierung durch partielle saure Hydrolyse

Um zu überprüfen, ob die Fucose-Reste, die terminal und subterminal an internem GlcNAc hängen, immunologisch relevant sind, d. h. ob sie einen Teil der dominanten Epitope der komplexen Glykolipide darstellen, wurden die Glykolipide vor der HPTLC-Immunfärbung partiell hydrolysiert (Abb. 50, Abb. 51 und Abb. 52). Die partielle Hydrolyse wurde mit TFA bei 100°C für 40 min durchgeführt (0.5 oder 2.0 M). Anschließend wurden die Glykolipide mit anti-Sm480Ei Hyperimmunserum (Abb. 50), murinem CIS (Abb. 51) oder dem mAk M2D3H (Abb. 52) detektiert. Bei den komplexen Glykolipid-Fractionen von adulten Würmern und Cercarien führte eine partielle Hydrolyse mit 0.5 M TFA zum beinahe vollständigen Verschwinden der Immunreaktivität, nach Hydrolyse mit 2.0 M TFA war keine Reaktion mehr zu beobachten. Bei den komplexen Glykolipiden von Eiern reichte auch eine partielle Hydrolyse mit 2.0 M TFA nicht aus, die Immunreaktivität gänzlich verschwinden zu lassen. Es kam hier jedoch zu einer Änderung des Bandenmusters. Diese Ergebnisse zeigen die Ähnlichkeit von murinem CIS, anti-Sm480Ei Hyperimmunserum und dem mAk M2D3H hinsichtlich ihrer Immunreaktivitäts-Muster gegenüber *S. mansoni* Glykolipiden und die Bedeutung von Fucose als Bestandteil dominanter Epitope der Glykolipide aller drei Stadien.

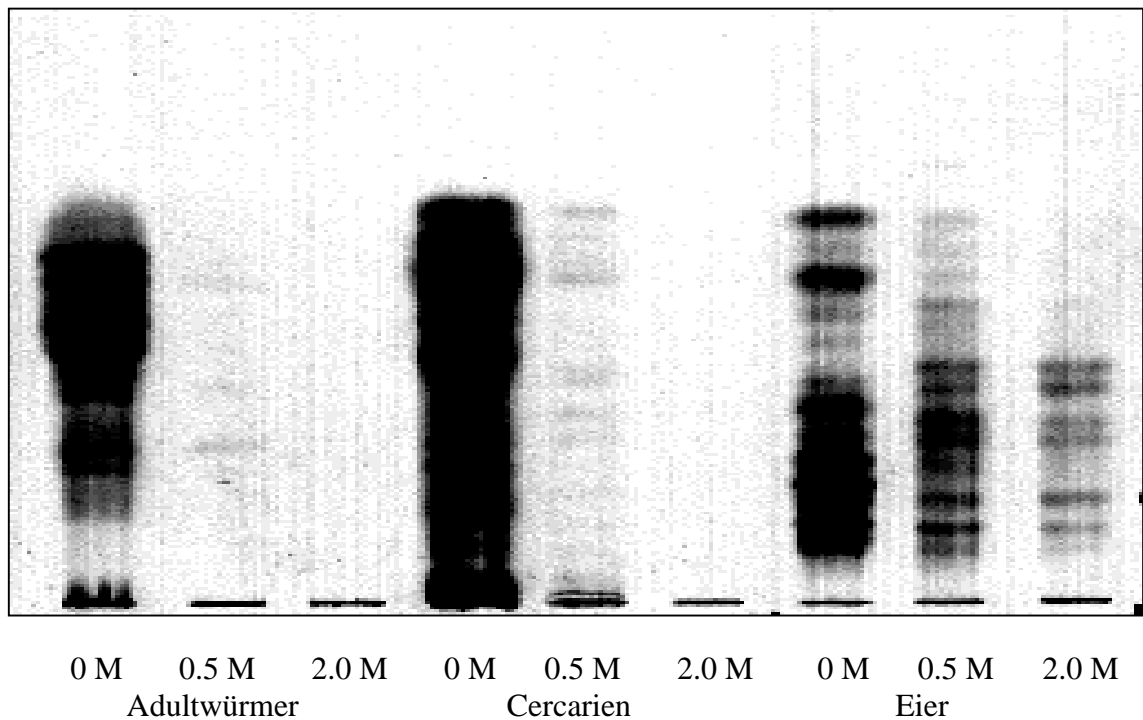


Abb. 50 HPTLC-Immunfärbung der partiell hydrolysierten, komplexen *S. mansoni* Glykolipide mit einem anti-Sm480Ei Hyperimmunserum. Glykolipid-Fractionen wurden mit wässriger TFA unterschiedlicher Molaritäten für 40 min bei 100°C vorbehandelt. Die Molarität der TFA-Lösung ist direkt unter jeder Spur angegeben (0 M, Hitzebehandlung ohne Säure). Die Glykolipide wurden mit einem anti-Sm480Ei Kaninchen Hyperimmunserum (1:1 000) detektiert. Die aufgetragenen Glykolipid-Mengen entsprachen 100 µg (Adultwürmer), 10 µg (Cercarien) bzw. 1 µg (Eier) lyophilisiertem Parasiten-Material. Laufmittel CMW, 50:40:10, 0.25% KCl im Wasser, v/v/v.

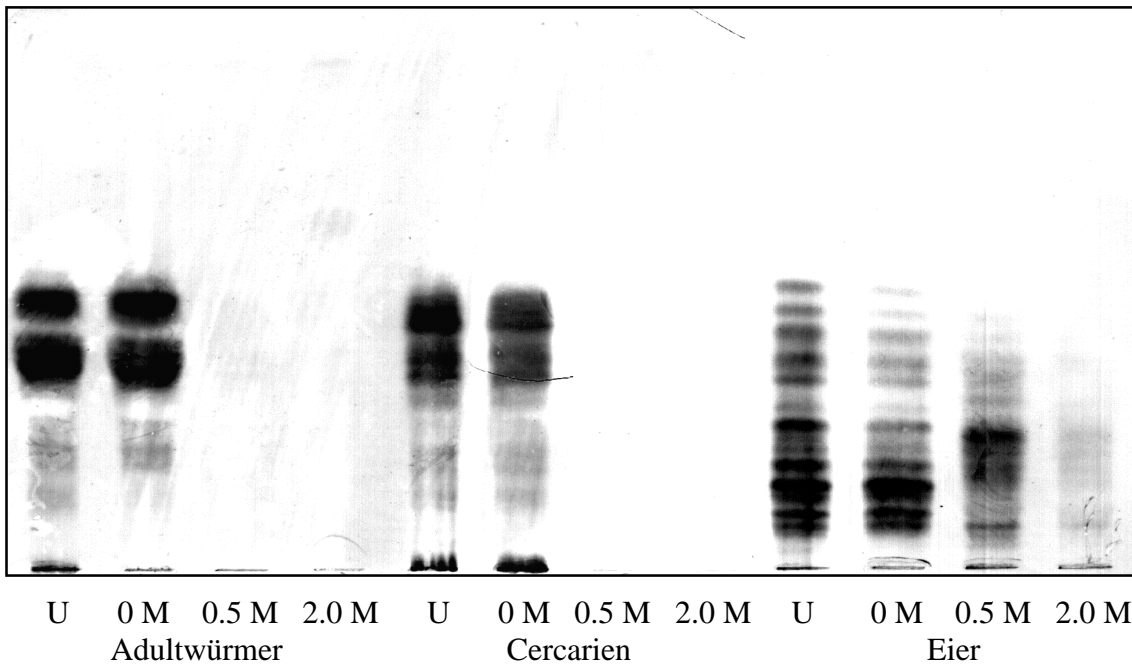


Abb. 51 HPTLC-Immurfärbung der partiell hydrolysierten, komplexen *S. mansoni* Glykolipide mit Mäuse-Infektionsserum. Glykolipid-Fractionen wurden mit wäßriger TFA unterschiedlicher Molarität für 40 min bei 100°C vorbehandelt. Die Molarität der TFA-Lösung ist direkt unter jeder Spur angegeben (U, unbehandelte Probe; 0 M, Hitzebehandlung ohne Säure). Die Glykolipide wurden mit einer Mischung von acht Seren chronisch mit *S. mansoni* infizierter Mäuse detektiert (1:500). Die aufgetragenen Glykolipid-Mengen entsprachen 100 µg (Adultwürmer), 10 µg (Cercarien) bzw. 1 µg (Eier) lyophilisiertem Parasiten-Material. Laufmittel CMW, 50:40:10, 0.25% KCl im Wasser, v/v/v.

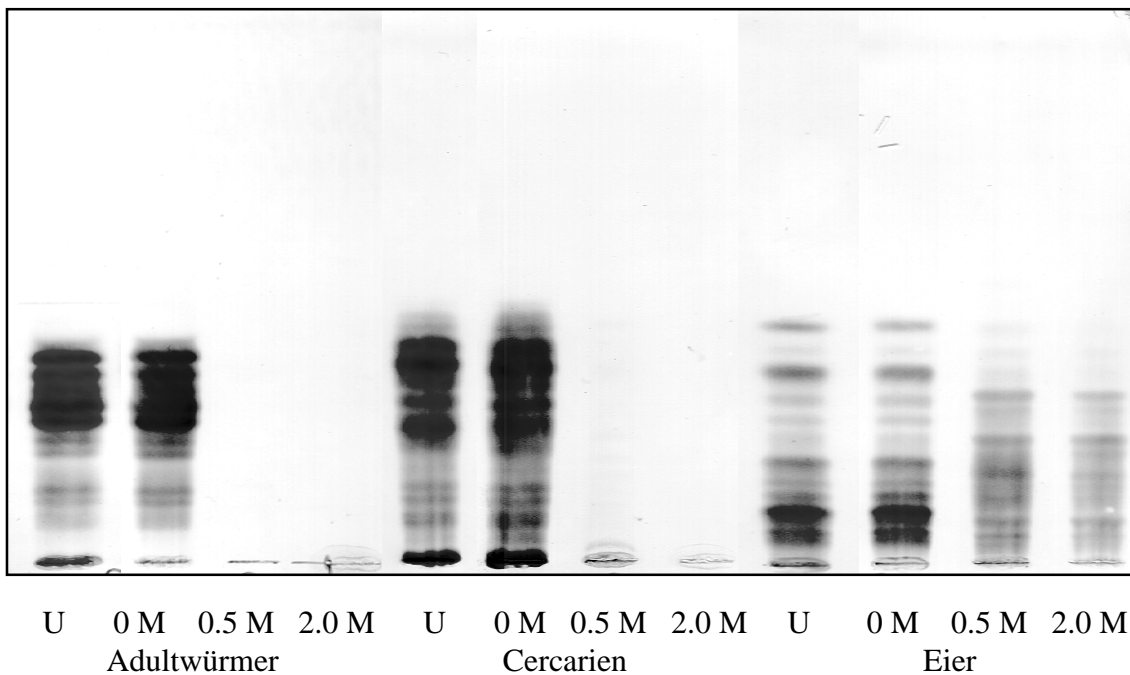


Abb. 52 HPTLC-Immurfärbung der partiell hydrolysierten, komplexen *S. mansoni* Glykolipide mit dem mAk M2D3H. Glykolipid-Fractionen wurden mit wäßriger TFA unterschiedlicher Molarität für 40 min bei 100°C vorbehandelt. Die Molarität der TFA-Lösung ist direkt unter jeder Spur angegeben (U, unbehandelte Probe; 0 M, Hitzebehandlung ohne Säure). Die aufgetragenen Glykolipid-Mengen entsprachen 100 µg (Adultwürmer), 10 µg (Cercarien) bzw. 1 µg (Eier) lyophilisiertem Parasiten-Material. Laufmittel CMW, 50:40:10, 0.25% KCl im Wasser, v/v/v.

3.3.10.3 HPTLC-Immunfärbung von Glykolipiden nach α -Fucosidase-Behandlung

Die Bedeutung der Fucose in den dominanten Epitopen von *S. mansoni* Glykolipiden wurde durch enzymatische Hydrolyse und anschließende HPTLC-Immunfärbung bestätigt (Abb. 53). Wenn mit β -Galactosidase inkubiert wurde, war das Muster der immunreaktiven Banden unverändert (Abb. 53, B). Nach Behandlung mit α -Fucosidase hingegen waren viele Banden deutlich schwächer ausgeprägt, und bei den komplexen Glykolipiden von Eiern ergab sich ein deutlich verändertes Bandenmuster. Daß die Signalabnahme nicht so deutlich ausfällt wie nach Defucosylierung durch partielle Säurehydrolyse (Abb. 50, Abb. 51 Abb. 52), beruht wahrscheinlich auf einer unvollständigen Defucosylierung durch die Behandlung mit α -Fucosidase. Die Fucosidasen aus der Nebennierenrinde von Rindern oder aus Mandeln zeigten keine Aktivität mit Glykolipiden von *S. mansoni* (ohne Abbildung).

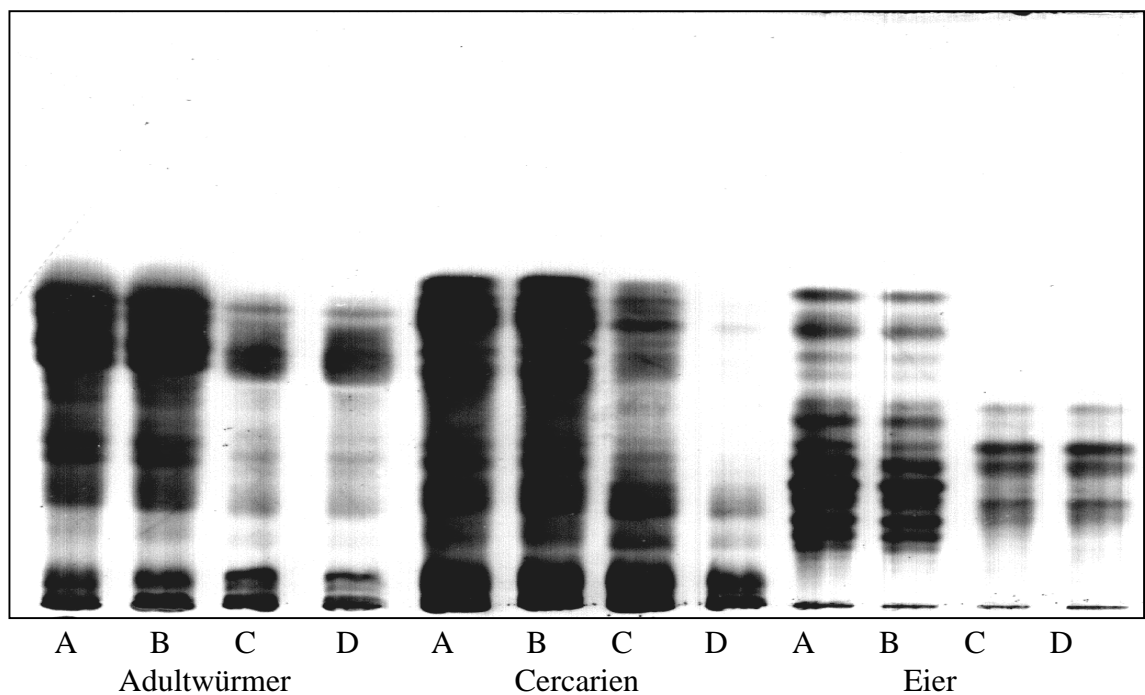


Abb. 53 HPTLC-Immunfärbung von *S. mansoni* Glykolipiden verschiedener Stadien nach enzymatischer Hydrolyse mit anti-Sm480Ei Hyperimmunserum. Glykolipide wurden für 24 h mit β -Galactosidase (B; Schwertbohnen, 50 mU) oder für 24 h (C) bzw. 48 h (D) mit α -Fucosidase (Rinderniere, 80 mU) behandelt. Glykolipide wurden nativ (A) oder nach Enzymbehandlung durch HPTLC (Laufmittel CMW, 50:40:10, 0.25% KCl im Wasser, v/v/v) getrennt. Zur Detektion wurde anti-Sm480Ei Hyperimmunserum (1:1000) verwendet. Die aufgetragenen Glykolipid-Mengen entsprachen 100 μ g (Adultwürmer), 10 μ g (Cercarien) bzw. 1 μ g (Eier) lyophilisiertem Parasiten-Material.

3.3.10.4 Detektion der durch partielle Hydrolyse entstandenen *N*-Acetyllactosamingruppe durch HPTLC-Immunfärbung

Das bei den komplexen Glykolipiden von Cercarien vorkommende Le^X ist die fucosylierte Form des *N*-Acetyllactosamins (Gal β 4GlcNAc-, Typ-2 Kette; [399,400,517,518]). Glykolipide von Cercarien wurden auf das Vorkommen von *N*-Acetyllactosamin-Einheiten vor sowie nach partieller Hydrolyse getestet (Abb. 54B). Das Le^X -Neoglykolipid Le^{XD} wurde analog durch die partielle Hydrolyse in eine *N*-Acetyllactosamin-Struktur überführt. Diese konnte in der Immunfärbung detektiert werden. Das nach partieller Hydrolyse gewonnene Produkt lief etwas höher auf der Dünnschichtplatte als das native Le^{XD} . Das Le^X -Neoglykolipid Le^{XH} wurde ebenfalls partiell hydrolysiert, aber weder das Edukt (Abb. 54A wie auch Abb. 26) noch das Produkt (Abb. 54B) konnten immunologisch detektiert werden. Ähnlich wie für Le^{XD} konnte auch bei den Cercarien-Glykolipiden nach partieller Hydrolyse eine Bande detektiert werden, die etwa in der Höhe der CTetH-Bande des Standards (Abb. 54C) läuft. Native Cercarien Glykolipide zeigten keine Färbung mit dem *N*-Acetyllactosamin-spezifischen Antikörper.

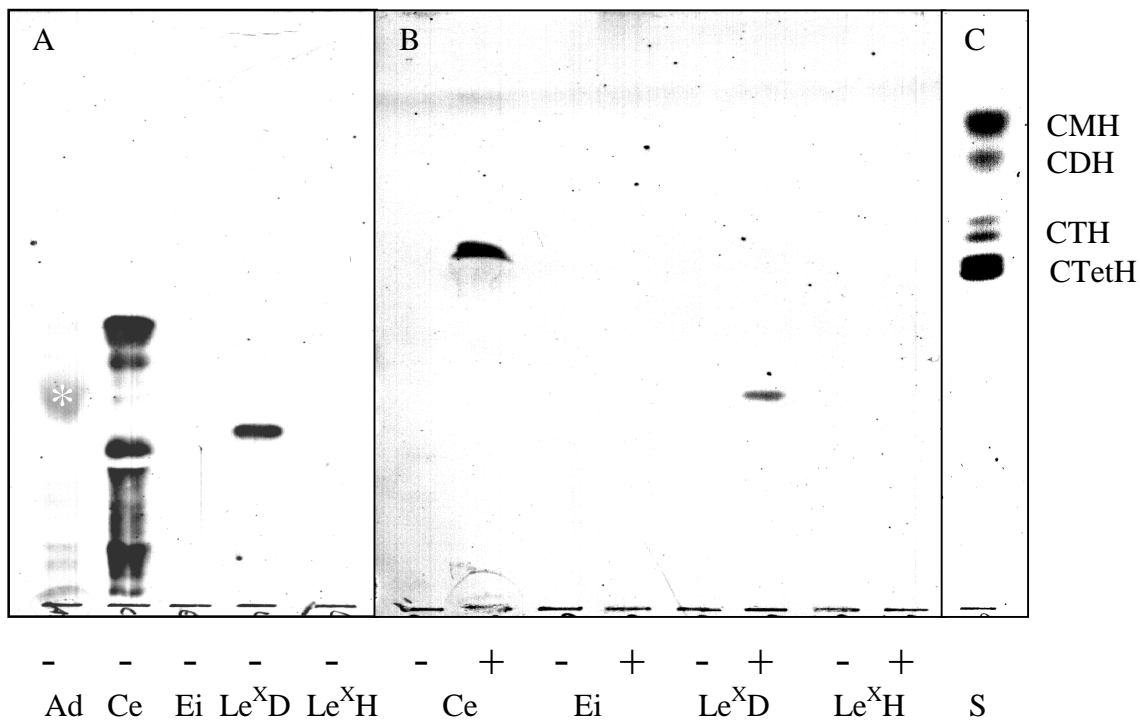


Abb. 54 Immunfärbung zur Detektion der *N*-Acetyllactosamin-Epitope nach partieller Hydrolyse von Cercarien Glykolipiden. Glykolipide wurden unbehandelt (-) oder nach partieller Hydrolyse ([+]; 1.0 M TFA, 40 min, 100°C) durch HPTLC (Laufmittel CMW, 50:40:10, 0.25% KCl im Wasser, v/v/v) getrennt. Der Globosidstandard (S) wurde durch Orcinolfärbung detektiert (C). Die Immunfärbung wurde mit dem Le^X -spezifischen mAk 4D1 (A; 1:500) bzw. mit dem mAk 1B2 (B; 1:200) durchgeführt, der *N*-Acetyllactosamin (Typ 2-Kette von *N*-Glykanen) erkennt. Ad, adulte Würmer; Ce, Cercarien; Ei, Eier. Als Kontrollen wurden die Le^X -Neoglykolipide Le^{XD} und Le^{XH} verwendet. Der Stern (*) weist auf eine Lipidkontamination bei den komplexen Glykolipiden von Adultwürmern hin.

3.4 Analyse der komplexen Glykolipide von Adultwürmern und Cercarien nach Fraktionierung durch Normalphase-HPLC

Um die Heterogenität der komplexen Glykolipide von adulten Würmern und von Cercarien zu reduzieren und sie weiter strukturell zu charakterisieren, wurden die Glykolipid-Fractionen durch Peracetylierung und Florisil-Chromatographie von kontaminierenden Lipidkomponenten gereinigt. Die einzelnen Fractionen wurden nach Florisil-Chromatographie verseift und entsalzt, durch HPTLC getrennt und auf verschiedene Weise angefärbt (Abb. 55). Während bei der Florisilchromatographie von komplexen Glykolipiden adulter Würmer die peracetylierten, antigenen Glykolipide in den Fractionen 4-6 eluierten (Abb. 55A), konnte eine Phospholipid-Komponente, die in Fraction 8 (Abb. 55C) eluierte, sowie eine große Menge hydrophober Verunreinigungen in den Fractionen 1-3 (Abb. 55B) abgetrennt werden.

Die so gereinigten Glykolipide wurden durch Iatrobeads-HPLC präparativ getrennt (Abb. 56). Es wurden je fünf Fractionen gebildet, die für die HPTLC-Immunfärbung (Abb. 57) sowie für MALDI-TOF-MS eingesetzt wurden (Abb. 58 und Tab. 21). Die fünf Fractionen der komplexen Glykolipide von Adultwürmern (A1-A5) wurden zusätzlich durch Methylierungsanalyse untersucht.

Die von den Fractionen A2-A4 gewonnenen MALDI-Spektren erlaubten die Ableitung von Summenformeln (Tab. 21). Die starke Heterogenität der komplexen Cercarien-Glykolipide erschwerte die Ableitung von Summenformeln. Die Kohlenhydrat-Zusammensetzungen eines CPH und eines Ceramid-Hexahexosids konnten jedoch abgeleitet und später durch die Analyse der PA-Oligosaccharide bestätigt werden (siehe 3.5, Tab. 27). Weiterhin wurde ein Ceramid-Octahexosid postuliert, was sich durch die Analyse der PA-Oligosaccharide nicht bestätigen ließ. Mit den komplexen Glykolipid-Fractionen adulter Würmer wurde eine Methylierungsanalyse durchgeführt, die jedoch aufgrund der Heterogenität der einzelnen Fractionen keine Strukturvorschläge einzelner Komponenten erlaubte (Tab. 22).

In einer Cercarien-Glykolipid-Fraction, die bei der Iatrobeads-HPLC-Reinigung kleiner Glykolipide (3.2.2) von Cercarien erhalten wurde (nicht gezeigt), konnte durch HPTLC-Immunfärbung das Le^X-Antigen nachgewiesen werden (Abb. 59). MALDI-TOF-Analysen zeigten, daß diese Glykolipid-Fraction bezüglich ihrer Kohlenhydrat-Zusammensetzung weitgehend homogen war (Abb. 60 und Tab. 21). Der Vergleich mit einer isolierten CDH-Fraction von Cercarien zeigte eine identische Heterogenität des jeweiligen Ceramid-Anteils (Abb. 60B). Aus dem MALDI-Spektrum ließ sich die Summenformel dHexHex₂HexNAC₂Cer ableiten. In der Bausteinanalyse wurden die Zucker Fucose, Galactose, Glucose, GlcNAC und GalNAC nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Methylierungsanalyse bestätigte das Vorkommen des Le^X-Trisaccharids, das offensichtlich mit der 3-Position des GalNAC-Restes im CDH verknüpft ist (Tab. 26). Die hieraus postulierte Struktur Galβ4[Fucα3]GlcNACβ3GalNACβ4Glc1Cer des CPH wurde durch die Strukturanalyse der PA-Oligosaccharide bestätigt (3.5).

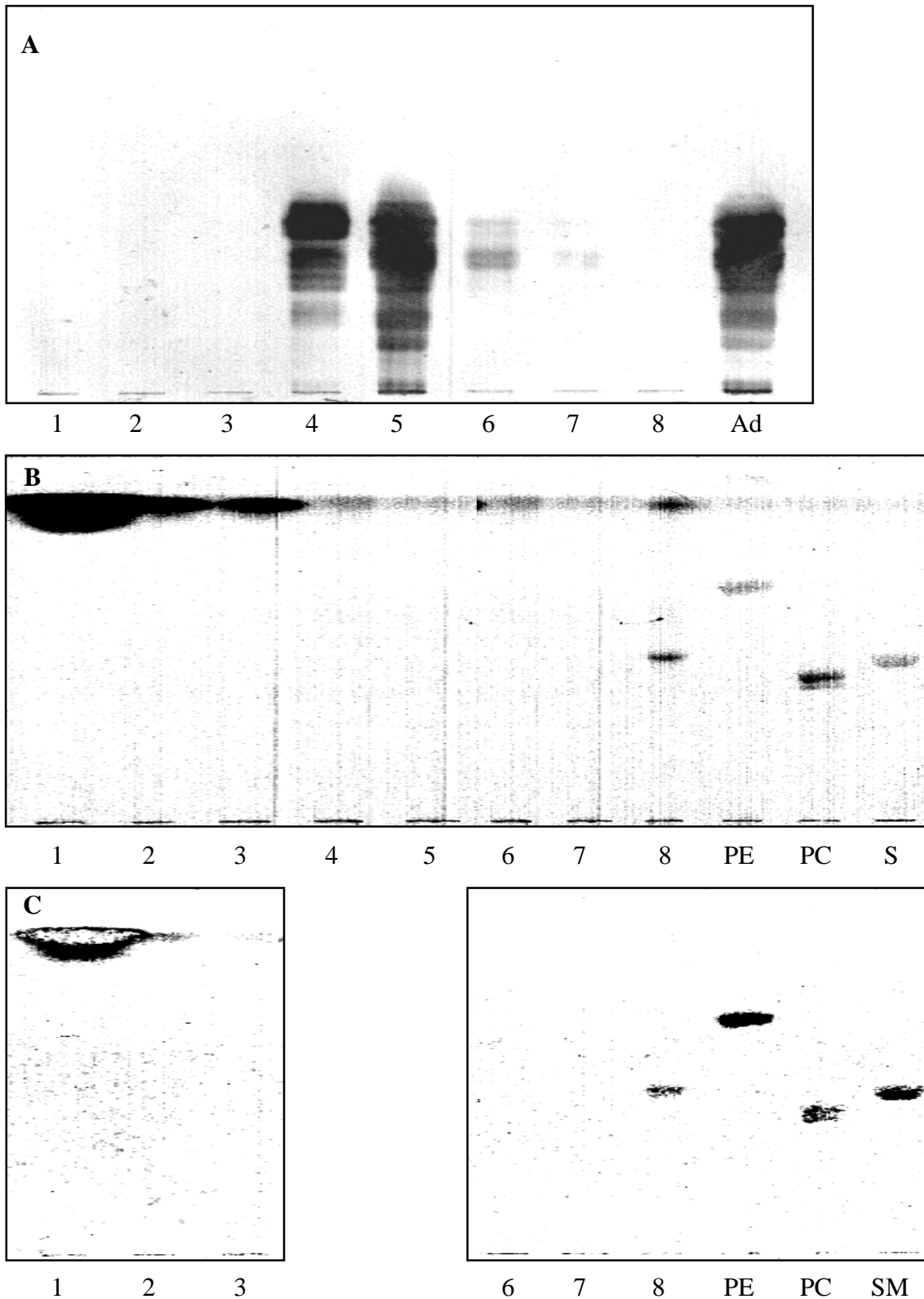


Abb. 55 Reinigung der komplexen Glykolipide adulter Würmer durch Florisil-Chromatographie. Die Elution wurde durchgeführt wie in 2.2.7 beschrieben. Die einzelnen Fraktionen wurden durch HPTLC (Laufmittel CMW, 50:40:10, 0.25% KCl im Wasser, v/v/v) getrennt. Die Detektion erfolgte durch (A) Immunfärbung mit anti Sm480Ei Kaninchen Hyperimmunserum, (B) Iodfärbung oder (C) Phosphatfärbung. Als Standards wurden Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) eingesetzt. Ad, adulte Würmer.

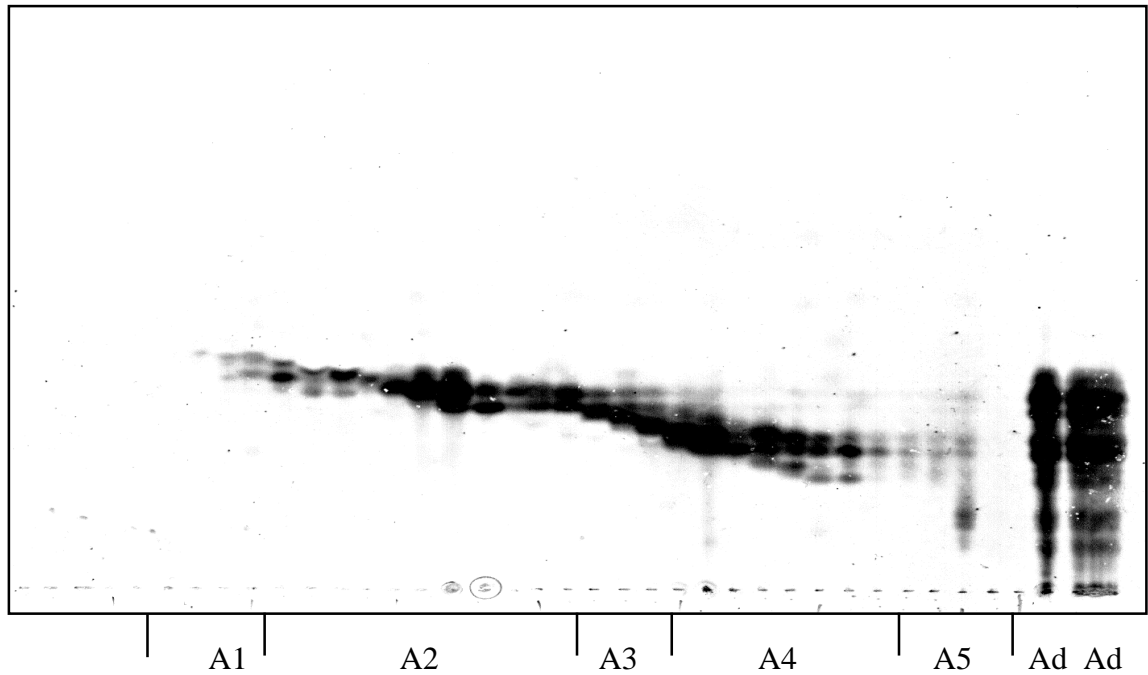


Abb. 56 HPTLC-Immundefärbung der komplexen Glykolipide adulter *S. mansoni* Würmer nach Iatrobeads-HPLC Trennung. Die Glykolipide wurden durch Normalphase-HPLC an einer Iatrobeads-Säule getrennt und fraktioniert. Die Fraktionen wurden mittels HPTLC (Laufmittel CMW, 50:40:10, 0.25 % KCl im Wasser) und Immundefärbung mit einem anti-Sm480Ei Hyperimmenserum auf die Gegenwart antigener Glykolipide getestet. Die einzelnen Fraktionen wurden wie oben angedeutet vereinigt (Fraktionen A1 bis A5). Die Gesamtfraction komplexer Glykolipide von Adulten (Ad) wurde als Standard punktförmig wie alle Fraktionen und daneben auch als Strich auf der Auftragslinie aufgegeben.

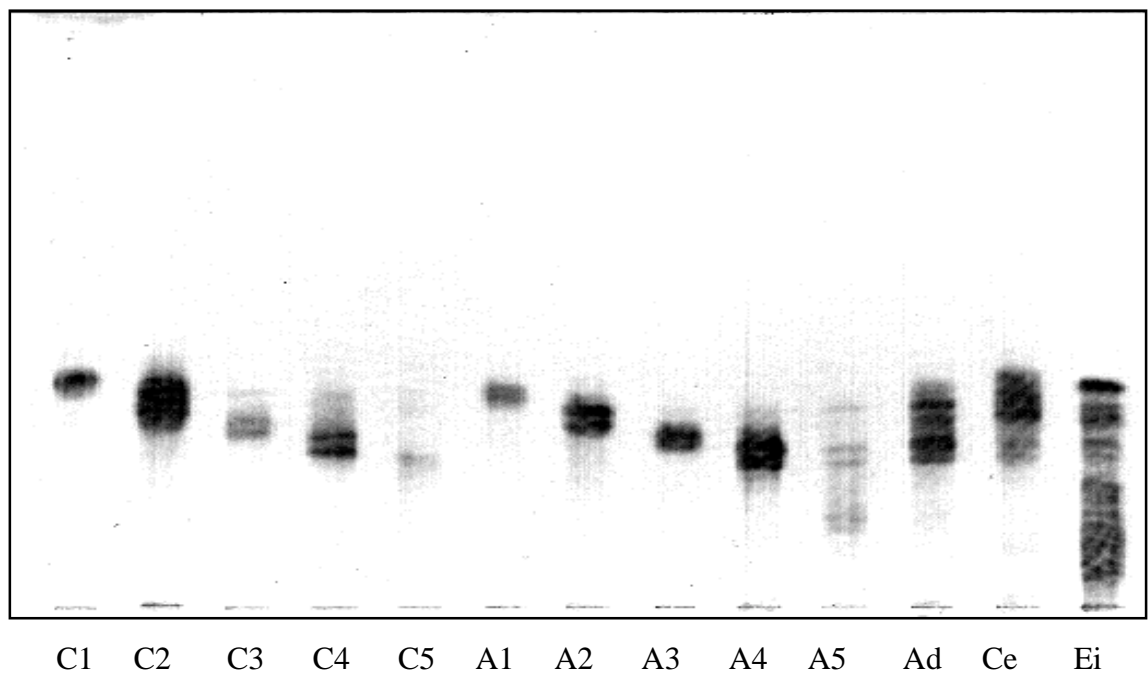


Abb. 57 HPTLC-Immundefärbung der komplexen Glykolipide von Adultwürmern und Cercarien nach Iatrobeads-HPLC Trennung mit anti-Sm480Ei Hyperimmenserum (1:1000). Laufmittel CMW, 50:40:10, 0.25% KCl im Wasser, v/v/v; C1-C5, Fraktionen C1 bis C5 der komplexen Glykolipide von Cercarien; A1-A5, Fraktionen A1 bis A5 der komplexen Glykolipide von adulten Würmern; Ad, Ce, Ei, komplexe Glykolipid-Gesamtfractionen von adulten Würmern (Ad), Cercarien (Ce) und Eiern (Ei).

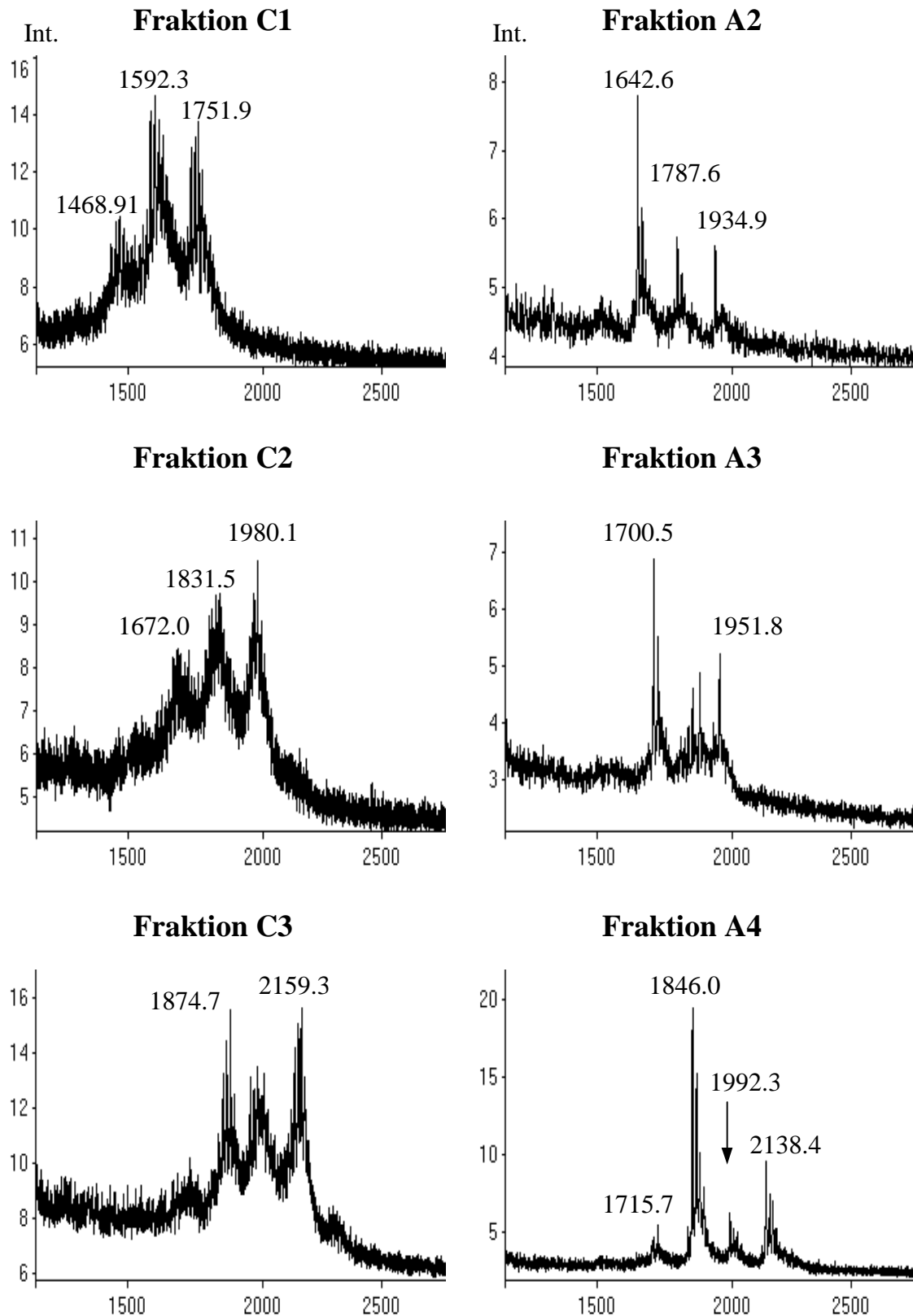


Abb. 58 MALDI-TOF^{m/z}-Massenspektren der fraktionierten, komplexen^{m/z} Glykolipide von adulten Würmern und Cercarien. Die durch HPLC-Trennung erhaltenen Fraktionen C1, C2 und C3 von Cercarien und A2, A3 und A4 von adulten Würmern wurden im positiven Reflektor-Modus durch MALDI-TOF-MS analysiert. Als Matrix wurde ATT verwendet.

Fraktion	Gemessene Massen	Kohlenhydrat- Zusammensetzung
A2	1642.6; 1658.4; 1670.2	dHex ₂ HexNAc ₃ Hex ₁
	1787.6; 1804.0	dHex ₃ HexNAc ₃ Hex ₁
	1934.9; 1950.8	dHex ₄ HexNAc ₃ Hex ₁
A3	1700.5; 1715.7	dHex ₁ HexNAc ₄ Hex ₁
	1846.7; 1874.8	dHex ₂ HexNAc ₄ Hex ₁
	1951.8	dHex ₄ HexNAc ₃ Hex ₁
A4	1699.4; 1715.7	dHex ₁ HexNAc ₄ Hex ₁
	1846.0; 1861.5; 1873.3; 1890.1	dHex ₂ HexNAc ₄ Hex ₁
	1992.3; 2007.6; 2019.5	dHex ₃ HexNAc ₄ Hex ₁
	2138.4; 2154.3; 2166.2; 2181.8	dHex ₄ HexNAc ₄ Hex ₁
CPH	1579.5; 1593.7; 1607.7; 1621.6	dHex ₁ HexNAc ₂ Hex ₂
C1	1440.5; 1455.4; 1468.9; 1483.4; 1495.7	dHex ₁ HexNAc ₂ Hex ₂
	1550.4; 1564.7; 1577.1; 1592.3; 1606.5; 1620.8	dHex ₁ HexNAc ₂ Hex ₂
	1723.9; 1739.1; 1751.9; 1766.2; 1779.8	dHex ₂ HexNAc ₂ Hex ₂
C2	1643.1; 1658.3; 1672.0; 1685.6; 1699.4; 1712.1	
	1793.5; 1803.0; 1817.9; 1831.5; 1846.4; 1859.7	
	1951.1; 1966.0; 1980.1; 1994.0	
C3	1846.2; 1860.4; 1874.7; 1888.6	
	1951.8; 1965.9; 1979.6; 1993.4; 2006.5	
	2117.4; 2131.8; 2145.5; 2159.3; 2173.3	dHex ₂ HexNAc ₄ Hex ₂

Tab. 21 MALDI-TOF-MS Untersuchungen der fraktionierten komplexen Glykolipide von *S. mansoni* adulten Würmern und Cercarien. Die durch Iatrobeads-HPLC fraktionierten Glykolipide (Abb. 57) wurden als Na⁺-Addukte durch MALDI-TOF-MS gemessen. Die Massen der intensivsten Signale sind aufgelistet. Signale von Komponenten, die sich wahrscheinlich nur im Ceramidteil unterscheiden, wurden jeweils in einer Zeile zusammengefaßt. Aufgrund der starken Heterogenität ließ sich für mehrere komplexe Cercarien-Glykolipide keine Summenformel ableiten. Für CPH s. Text.

Verknüpfung	Fraktion					PMAA
	A1	A2	A3	A4	A5	
Fuc(1-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2,3,4-FucOH
-2)Fuc(1-	0.15	0.55	0.35	0.50	0.4	3,4-FucOH
Glc(1-					0.9*	2,3,4,6-GlcOH
Gal(1-	0.3	0.4				2,3,4,6-GalOH
-4)Glc(1-	1.2	2.25*	1.5	1.45	2.05*	2,3,6-GlcOH
-3)GlcNAc(1-	0.4	0.45	0.65	0.35	0.15	4,6-GlcN(Me)AcOH
-4)GlcNAc(1-	0.15	0.1	0.15			3,6-GlcN(Me)AcOH
-3)GalNAc(1-	0.5	0.9	0.8	0.4	0.35	4,6-GalN(Me)AcOH
-3,4)GlcNAc(1-	0.4	1.4	0.95	0.85	1.0	6-GlcN(Me)AcOH

Tab. 22 Methylierungsanalyse der fraktionierten komplexen Glykolipide von *S. mansoni* adulten Würmern. PMAAs wurden durch GC/MS analysiert. Die Ergebnisse sind als die relativen Peakflächen der gefundenen Monosaccharid-Derivate ausgedrückt und auf 2,3,4-FucOH=1.0 bezogen. Terminale Fucose oder Fuc(1- entspricht 2,3,4FucOH als Alditolacetat, etc.; 3-substituiertes GlcNAc oder -3)GlcNAc(1- entspricht 4,6-GlcN(Me)AcOH als Alditolacetat, etc; (*), + Glc-Verunreinigungen.

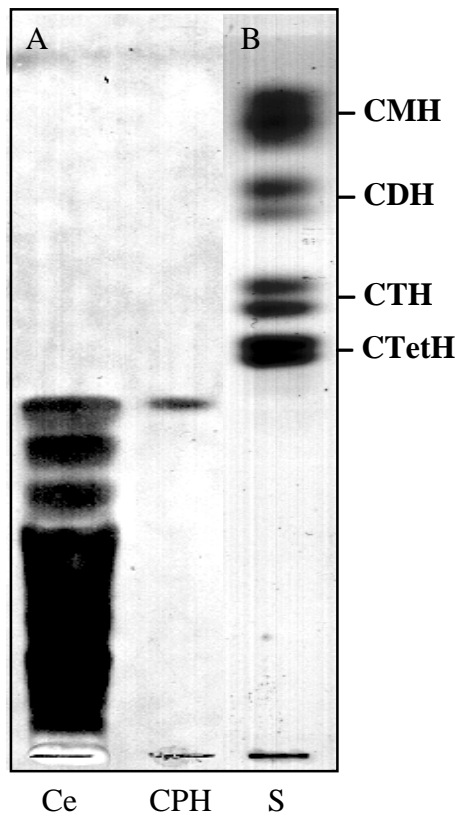


Abb. 59 HPTLC-Immundefärbung des CPH von Cercarien mit dem Le^X-spezifischen mAk G8G12. (A) 20 ng des gereinigten CPH von Cercarien sowie die Gesamtfraction komplexer Glykolipide von *S. mansoni* Cercarien (Ce, etwa 500 ng) wurden für die HPTLC-Immundefärbung mit dem Le^X-spezifischen mAk G8G12 (1:500) eingesetzt. (B) Orcinol-gefärbter Globosidstandard (S).

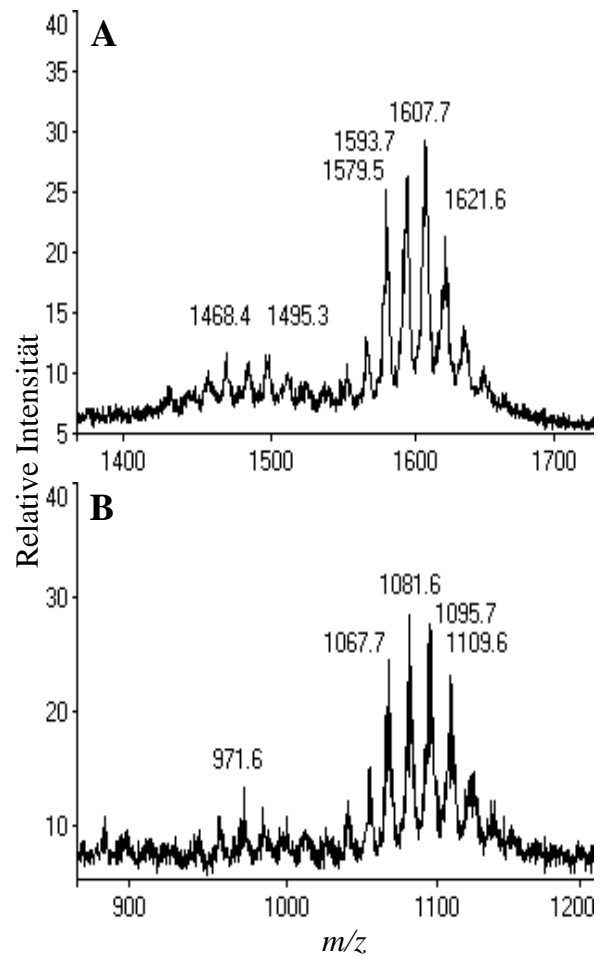


Abb. 60 MALDI-TOF-Massenspektren von CPH (A) und CDH (B). Zu sehen ist das identische Muster der Ceramidheterogenität.

3.5 Analyse der aus den Glykolipiden von Cercarien gewonnenen PA-Oligosaccharide

Zur Analyse der Oligosaccharidstrukturen der Glykolipide von Cercarien wurden durch Endoglykoceramidase-Spaltung freie Oligosaccharide gewonnen und diese mit 2-Aminopyridin markiert. Die pyridylaminierten (PA-) Oligosaccharide durch Methylierungsanalyse, partielle Hydrolyse, Exoglykosidase-Behandlung, "on-target" Exoglykosidase-Spaltung bestimmt und MALDI-TOF-MS analysiert. Die folgenden sechs dominanten Strukturen wurden gefunden: GalNAc β 4Glc1PA; GlcNAc β 3GalNAc β 4Glc1PA; Gal β 4GlcNAc β 3GalNAc β 4Glc1PA; Gal β 4[Fuc α 3]GlcNAc β 3GalNAc β 4Glc1PA (Le^X-Pentasaccharid-Struktur); Gal β 4[Fuc α 3]GlcNAc β 3GlcNAc β 3GalNAc β 4Glc1PA (Le^X-Hexasaccharid-Struktur); und Fuc α 3Gal β 4[Fuc α 3]GlcNAc β 3GalNAc β 4Glc1PA (Pseudo-Lewis Y [Le^Y-] Hexasaccharid-Struktur). Diese Kohlenhydrat-Ketten gehören alle zur beschriebenen Schisto-Serie. Die Le^X- und Pseudo-Le^Y-Glykolipide sind offensichtlich stadienspezifisch im Cercarien-Stadium exprimiert und sind nur schwach im Adultwurm-Stadium und nicht im Ei-Stadium nachweisbar.

3.5.1 Endoglykoceramidase-Spaltung und PA-Markierung

Komplexe Glykolipide von Cercarien wurden nach Trennung durch Normalphase-Kartuschen (2.2.6.1) beziehungsweise nach HPLC-Trennung an einer Kieselgelsäule (Iatrobeads; 2.2.6.2; Abtrennung von CMH und CDH) zur Herstellung von Pyridylamin-(PA-)Oligosacchariden eingesetzt. Die Glykolipide wurden mit Endoglykoceramidase gespalten (2.5.1), um dadurch den heterogenen Lipidteil vom Oligosaccharidteil zu trennen und eine Untersuchung einzelner Glykanstrukturen zu ermöglichen. Für die Abtrennung ungespaltener Glykolipide und der durch die Spaltung entstandenen freien Ceramide von den Oligosacchariden wurde die Probe an einer RP-C18-Kartusche fraktioniert (2.2.4). Die freigesetzten Oligosaccharide wurden im Durchlauf und in der Wasser-Waschfraktion gesammelt, während die ungespaltenen Glykolipide durch Elution mit organischen Lösungsmitteln wiedergewonnen wurden. Die in Form freigesetzter Glykane und ungespaltener Glykolipide vorliegenden Monosaccharide wurden durch Bausteinanalyse als Anthranilsäure-Derivate quantifiziert (Tab. 15), wobei sich für die verschiedenen Monosaccharide eine durchschnittliche Effizienz der Glykanfreisetzung von etwa 80% ergab. Die freigesetzten Oligosaccharide wurden durch reduktive Aminierung kovalent mit dem Fluoreszenzmarker PA (siehe 2.5.2), versehen.

Mono- saccharid	Komplexe Glykolipide von Cercarien	Monosaccharid-Menge (μg)		Abgespaltene Menge (%)
		Wäßrige Phase	Organische Phase	
GalN	(1.0)	147 (1.0)	21 (1.0)	88
GlcN	(1.3)	127 (0.9)	33 (1.6)	79
Gal	(1.0)	165 (1.1)	42 (2.0)	79
Man	(0.1)	-	16 (0.8)	-
Glc	(0.5)	176 (1.2)	68 (3.2)	72
Fuc	(2.6)	294 (2.0)	46 (2.2)	87

Tab. 23 Nachweis der Effizienz der Endoglykoceramidase-Spaltung der komplexen Glykolipide von Cercarien durch Bausteinanalyse. Komplexe Glykolipide von Cercarien wurden mit Endoglykoceramidase gespalten und die Reaktionsprodukte an einer RP-Kartusche fraktioniert. Die Monosaccharid-Zusammensetzung der wäßrigen sowie der mit organischen Lösungsmitteln eluierten Fraktion wurde durch Bausteinanalyse mit derjenigen der Ausgangsfraktion komplexer Glykolipide von Cercarien verglichen. Die Menge an Monosacchariden ist in μg angegeben, und die relativen Mengen sind in Klammern aufgeführt (GalN=1.0). GalN, Galactosamin; GlcN, Glucosamin.

3.5.2 HPLC-Trennung der PA-Oligosaccharide

Nach der enzymatischen Spaltung und der Fluoreszenzmarkierung wurden die PA-Oligosaccharide durch Aminophasen-HPLC fraktioniert (Abb. 61). Die gesammelten Fraktionen (**1** bis **17**; die Fraktionen werden weiterhin nur mit der jeweiligen Nummer angegeben) wurden durch MALDI-TOF-MS analysiert und durch Bausteinanalyse als Anthranilsäurederivate auf ihre Monosaccharid-Zusammensetzung hin untersucht. Die Fraktionen **1** bis **5** enthielten keine Kohlenhydrate, und als Hauptkomponente wurde das PA-Pentasaccharid **12** gefunden. Um die Heterogenität der einzelnen Fraktionen zu reduzieren und um möglichst reine Komponenten zu erhalten, wurden die Aminophasen-HPLC-Fraktionen **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **13** und **14** durch RP-HPLC subfraktioniert (2.5.3.1 und Abb. 62; Chromatogramm der Rechromatographie von Fraktion **9** nicht gezeigt). Die erhaltenen Subfraktionen (bezeichnet mit **6-1**, z. B., für Subfraktion 1 der Fraktion **6**) wurden erneut durch MALDI-TOF-MS und Bausteinanalyse untersucht. Aus den gemessenen Pseudomolekülen konnte die Zusammensetzung der PA-Oligosaccharide abgeleitet werden ($\text{C}_n\text{H}_m\text{O}_p$), und ausgewählte Komponenten wurden auf ihre Kohlenhydrat-Bestandteile hin untersucht (Tab. 17). Das PA-Disaccharid **6-1**, das PA-Trisaccharid **8-5**, das PA-Tetrasaccharid **10-2** und die PA-Hexasaccharide **13-2** und **14-3**, die so erhalten wurden, waren die Hauptkomponenten der entsprechenden Fraktionen **6**, **8**, **13** und **14**. Zusammen mit dem PA-Pentasaccharid **12** waren diese die Hauptkomponenten, und die gewonnenen Daten erlaubten eine detaillierte strukturelle Analyse dieser Komponenten. Die Fraktionen **15** und **16** (Tab. 16) enthielten jeweils geringe Mengen unterschiedlicher Komponenten, die keine detaillierte Strukturanalyse erlaubten.

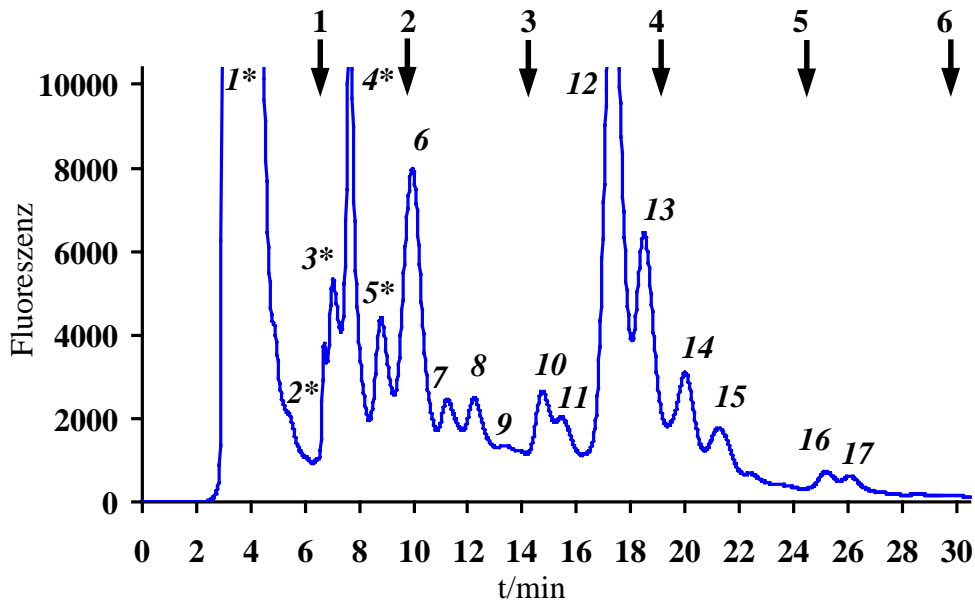


Abb. 61 HPLC-Trennung der aus Cercarien Glykolipiden gewonnenen PA-Oligosaccharide an einer Aminophasen-Säule. Die Elutionspositionen des PA-markierten Dextranhydrolysat-Standards verschiedener Kettenlänge sind durch Pfeile angegeben. Bei den mit einem Stern (*) markierten Fraktionen 1-5 handelt es sich um Kontaminationen. Diese Fraktionen enthalten keine Zucker, wie sich in der Baueinanalyse zeigte.

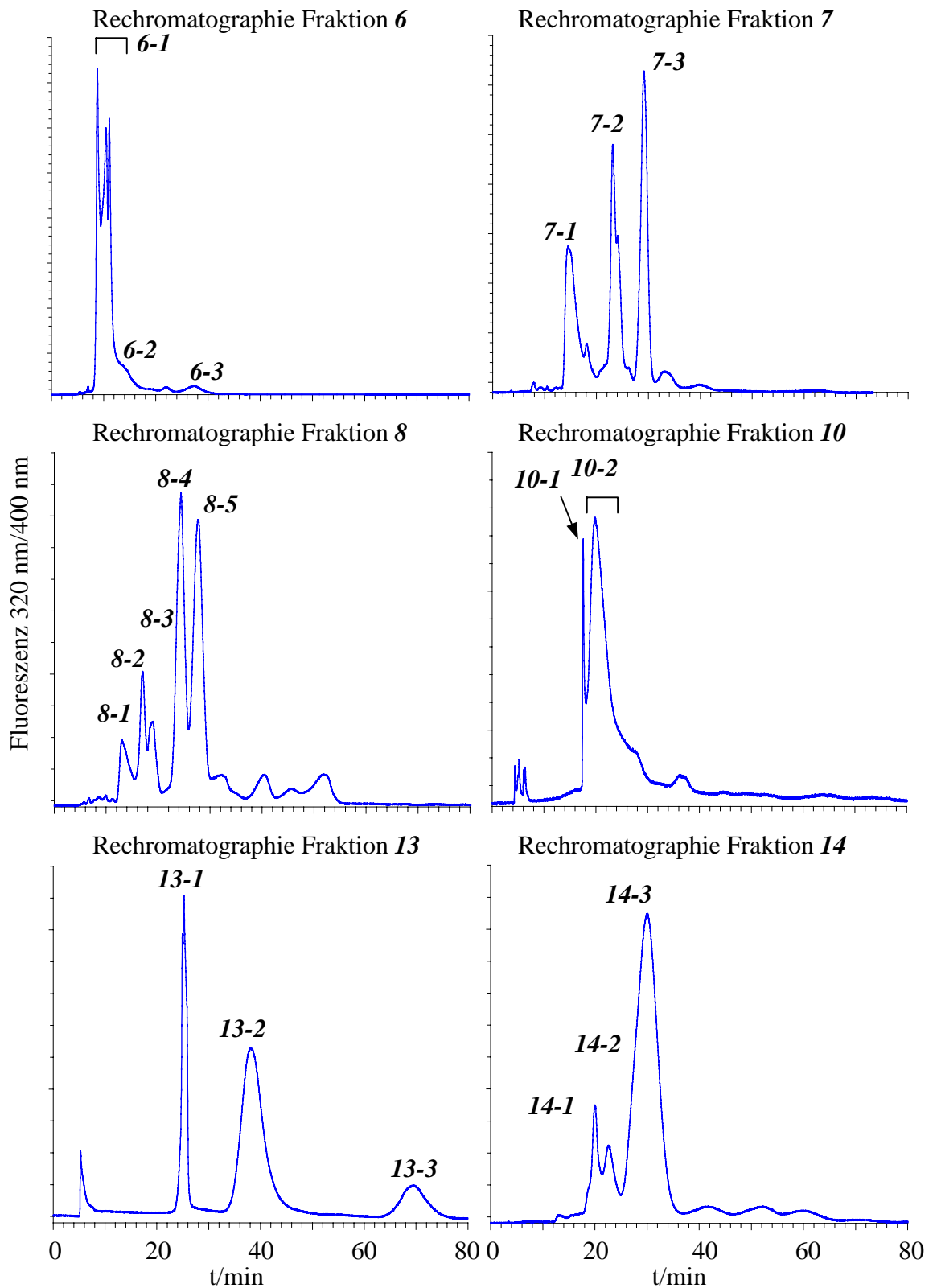


Abb. 62 Rechromatographie der aus den Glykolipiden von Cercarien gewonnenen PA-Oligosaccharide durch RP-HPLC. Die durch Aminophasen-HPLC (Abb. 61) gewonnenen Fraktionen **6**, **7**, **8**, **10**, **13** und **14** enthielten teilweise mehrere Komponenten und wurden durch Reverse-phase-HPLC (2.5.3.1) subfraktioniert.

Fraktion	Gemessene Masse [Addukt] (Theoret. Masse)	Zusammensetzung
6-1	468.3 [M+Li] ⁺ (468.2); 462.2 [M+H] ⁺ (462.2)	Hex ₁ HexNAC ₁ PA
7-2	671.6 [M+Li] ⁺ (671.3)	Hex ₁ HexNAC ₂ PA
8-4	468.3 [M+Li] ⁺ (468.2)	Hex ₁ HexNAC ₁ PA
8-5	671.3 [M+Li] ⁺ (671.3); 665.3 [M+H] ⁺ (665.3)	Hex ₁ HexNAC ₂ PA
9-5	1020.4 [M+Li] ⁺ (1020.4); 1036.3 [M+Na] ⁺ (1036.4)	Hex ₁ HexNAC ₃ dHex ₁ PA
10-2	833.4 [M+Li] ⁺ (833.3); 849.4 [M+Na] ⁺ (849.3)	Hex ₂ HexNAC ₂ PA
10-2-Gal	687.4 [M+Na] ⁺ (687.3); 703.3 [M+K] ⁺ (703.3)	Hex ₁ HexNAC ₂ PA
11	979.2 [M+Li] ⁺ (979.4);	Hex ₂ HexNAC ₂ dHex ₁ PA
12	979.4 [M+Li] ⁺ (979.4); 1011.2 [M+K] ⁺ (1011.4)	Hex ₂ HexNAC ₂ dHex ₁ PA
12-Fuc	833.7 [M+Li] ⁺ (833.3); 827.3 [M+H] ⁺ (827.3)	Hex ₂ HexNAC ₂ PA
12-Fuc-Gal	671.8 [M+Li] ⁺ (671.3); 687.7 [M+Na] ⁺ (687.3)	Hex ₁ HexNAC ₂ PA
13-1	1166.5 [M+Li] ⁺ (1166.5); 1182.4 [M+Na] ⁺ (1182.5)	Hex ₁ HexNAC ₃ dHex ₂ PA
13-2	1125.6 [M+Li] ⁺ (1125.5); 1141.3 [M+Na] ⁺ (1141.5)	Hex ₂ HexNAC ₂ dHex ₂ PA
13-2-Fuc	979.2 [M+Li] ⁺ (979.4); 995.4 [M+Na] ⁺ (995.4)	Hex ₂ HexNAC ₂ dHex ₁ PA
13-3	1458.4 [M+Li] ⁺ (1458.6)	Hex ₁ HexNAC ₃ dHex ₄ PA
13-3-Fuc	1182.4 [M+Na] ⁺ (1182.5); 1198.4 [M+K] ⁺ (1198.5)	Hex ₁ HexNAC ₃ dHex ₂ PA
14-1	979.3 [M+Li] ⁺ (979.4)	Hex ₂ HexNAC ₂ dHex ₁ PA
14-2	1181.2 [M+Li] ⁺ (1182.5)	Hex ₂ HexNAC ₃ dHex ₁ PA
14-3	1182.5 [M+Li] ⁺ (1182.5); 1198.4 [M+Na] ⁺ (1198.5)	Hex ₂ HexNAC ₃ dHex ₁ PA
14-3-Fuc	1052.2 [M+Na] ⁺ (1052.4); 1136.4 [M+Li] ⁺ (1136.5)	Hex ₂ HexNAC ₃ PA
14-3-Fuc-Gal	890.0 [M+Na] ⁺ (890.3); 906.1 [M+K] ⁺ (906.3)	Hex ₁ HexNAC ₃ PA
15	979.8 [M+Li] ⁺ (979.4)	Hex ₂ HexNAC ₂ dHex ₁ PA
	1182.5 [M+Li] ⁺ (1182.4)	Hex ₂ HexNAC ₃ dHex ₁ PA
	1329.5 [M+Li] ⁺ (1328.5); 1344.8 [M+Na] ⁺ (1344.5)	Hex ₂ HexNAC ₃ dHex ₂ PA
	1370.5 [M+Li] ⁺ (1369.6); 1402.5 [M+K] ⁺ (1401.6)	Hex ₁ HexNAC ₄ dHex ₂ PA
	1516.1 [M+Li] ⁺ (1515.6); 1547.7 [M+K] ⁺ (1547.6)	Hex ₁ HexNAC ₄ dHex ₃ PA
	1662.1 [M+Li] ⁺ (1661.7); 1693.7 [M+K] ⁺ (1693.7)	Hex ₁ HexNAC ₄ dHex ₄ PA
16	1491.1 [M+Li] ⁺ (1490.6)	Hex ₃ HexNAC ₃ dHex ₂ PA
	1532.6 [M+Li] ⁺ (1531.6); 1548.3 [M+Na] ⁺ (1547.6)	Hex ₂ HexNAC ₄ dHex ₂ PA
	1718.8 [M+Li] ⁺ (1718.7); 1735.6 [M+Na] ⁺ (1734.7)	Hex ₁ HexNAC ₅ dHex ₃ PA

Tab. 24 (vorhergehende Seite) MALDI-TOF-MS-Analyse der aus den Glykolipiden von Cercarien gewonnenen PA-Oligosaccharide. Die Massen wurden auf eine Nachkommastelle gerundet. Die Art der Pseudomolekülonen ist jeweils in eckigen Klammern und die berechnete, monoisotopische Masse in runden Klammern angegeben. Einige Fraktionen wurden nach Abspaltung von Fuc und/oder Gal (siehe 3.5.3) erneut analysiert, z. B. **10-2**-Gal, **10-2** nach Abspaltung von Galactose.

PA-Oligosaccharid-Fraktion	Molare Verhältnisse				
	GlcN	GalN	Gal	Glc	Fuc
8-5	1.0	1.0	0.1	0.1	0.1
10-2	1.9	1.0	1.0	0.2	0.2
12	1.1	1.0	1.0	0.1	1.1
13-1	1.0	1.0	0.4	0.4	1.0
13-2	1.3	0.7	1.0	-	2.0
14-3	2.0	1.0	0.6	0.1	1.0

Tab. 25 Bausteinanalyse einiger der aus den Glykolipiden von Cercarien gewonnenen PA-Oligosaccharide. Die molaren Verhältnisse wurden nach TFA-Hydrolyse durch RP-Trennung der Anthranilsäure-derivatisierten Monosaccharide bestimmt.

3.5.3 Enzymatische und chemische Hydrolyse der PA-Oligosaccharide

Die gereinigten PA-Oligosaccharide **10-2**, **12**, **13-2**, **13-3** und **14-3** wurden in präparativen Mengen enzymatisch oder alternativ durch partielle saure Hydrolyse gespalten. Die Inkubationen mit Enzym erfolgten in Ammoniumacetat-Puffer, was ohne weitere Aufreinigung die Analyse eines Aliquots der inkubierten Probe durch MALDI-TOF-MS erlaubte. Somit konnte die Effizienz der enzymatischen Spaltung anhand der Massensignale abgeschätzt werden. Wenn die Spaltung erfolgreich war, wurden die Produkte durch Aminophasen- oder Reverse-phase-HPLC gereinigt. Unter den Inkubationsbedingungen der partiellen Hydrolyse (0.1 bis 0.2 M TFA, 80°C, 40 bis 80 min) wurden nur 10 bis 60 % der Fucose-Reste vom PA-Pentasaccharid **12** (Abb. 63A) und dem PA-Hexasaccharid **14-3** abgespalten (ohne Abb.). Wegen der Unvollständigkeit der Fucoseabspaltung bei der partiellen Hydrolyse wurde alternativ versucht, Fucose-Reste durch α -Fucosidase abzuspalten. Die eine der beiden terminalen Fucosen im PA-Hexasaccharid **13-2** konnte zu 80 % durch Inkubation mit α -Fucosidase (über Nacht) entfernt werden, während die zweite terminale Fucose am Oligosaccharid verankert blieb (Abb. 63B und Tab. 16). Das PA-Octasaccharid **13-3** konnte durch enzymatische Behandlung nur partiell defucosyliert werden, eine zwanzigtägige Inkubation mit α -Fucosidase führte zu einem PA-Hexasaccharid mit der Masse 1182.4

Da ($[M+Na]^+$), von dem zwei Fucosen abgespalten wurden, und an dem noch zwei Fuc-Reste verankert blieben (Abb. 64D und Tab. 16).

Eine quantitative Defucosylierung des PA-Hexasaccharids **14-3** erforderte eine sechstägige Behandlung mit α -Fucosidase, während eine dreitägige Behandlung des PA-Pentasaccharids **12** die terminale Fucose nur zu 20 % entfernte. Die chemisch und enzymatisch defucosylierten Produkte wurden vereinigt und mit **14-3-Fuc** beziehungsweise **12-Fuc** bezeichnet. Die HPLC-gereinigten Produkte wurden durch MALDI-TOF-MS analysiert (Abb. 65 und Tab. 16). Aliquots von **12-Fuc**, **14-3-Fuc** und **10-2** wurden mit β -Galactosidase (*Escherichia coli*) behandelt, was über Nacht zu einer annähernd vollständigen Abspaltung der terminalen Gal führte. Auch diese Abbauprodukte wurden durch HPLC gereinigt und mit **12-Fuc-Gal**, **14-3-Fuc-Gal** beziehungsweise **10-2-Gal** bezeichnet. Die Produkte nach Abspaltung von Fuc oder nach Abspaltung von Fuc und Gal wurden durch MALDI-TOF-MS untersucht (Abb. 65 und Tab. 16) und für die Methylierungsanalyse eingesetzt (3.5.4).

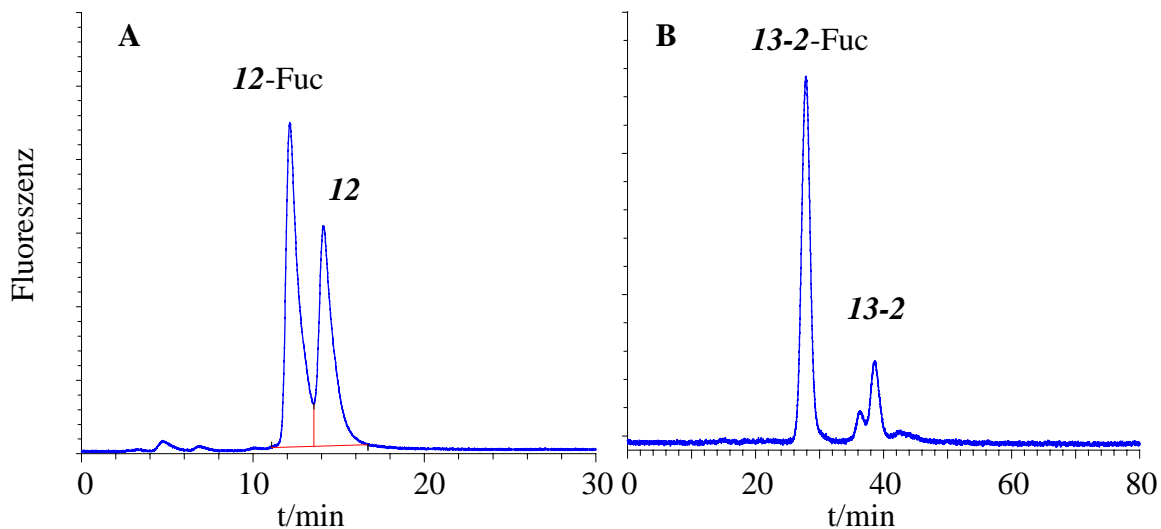


Abb. 63 HPLC-Reinigung der aus Glykolipiden von Cercarien gewonnenen PA-Oligosaccharide nach Defucosylierung. (A) Das PA-Pentasaccharid **12** wurde nach chemischer Defucosylierung (60 min, 0.1 M TFA, 80°C) durch Aminophasen-HPLC (2.5.3.2) fraktioniert in nicht gespaltenes (**12**) und gespaltenes (**12-Fuc**) PA-Oligosaccharid. (B) Vom PA-Hexasaccharid **13-2** wurde durch Über-Nacht-Inkubation mit α -Fucosidase zu 80 % eine der beiden terminalen Fucosen abgespalten. Produkt (**13-2-Fuc**) und Edukt (**13-2**) wurden durch RP-HPLC (2.5.3.1) voneinander getrennt.

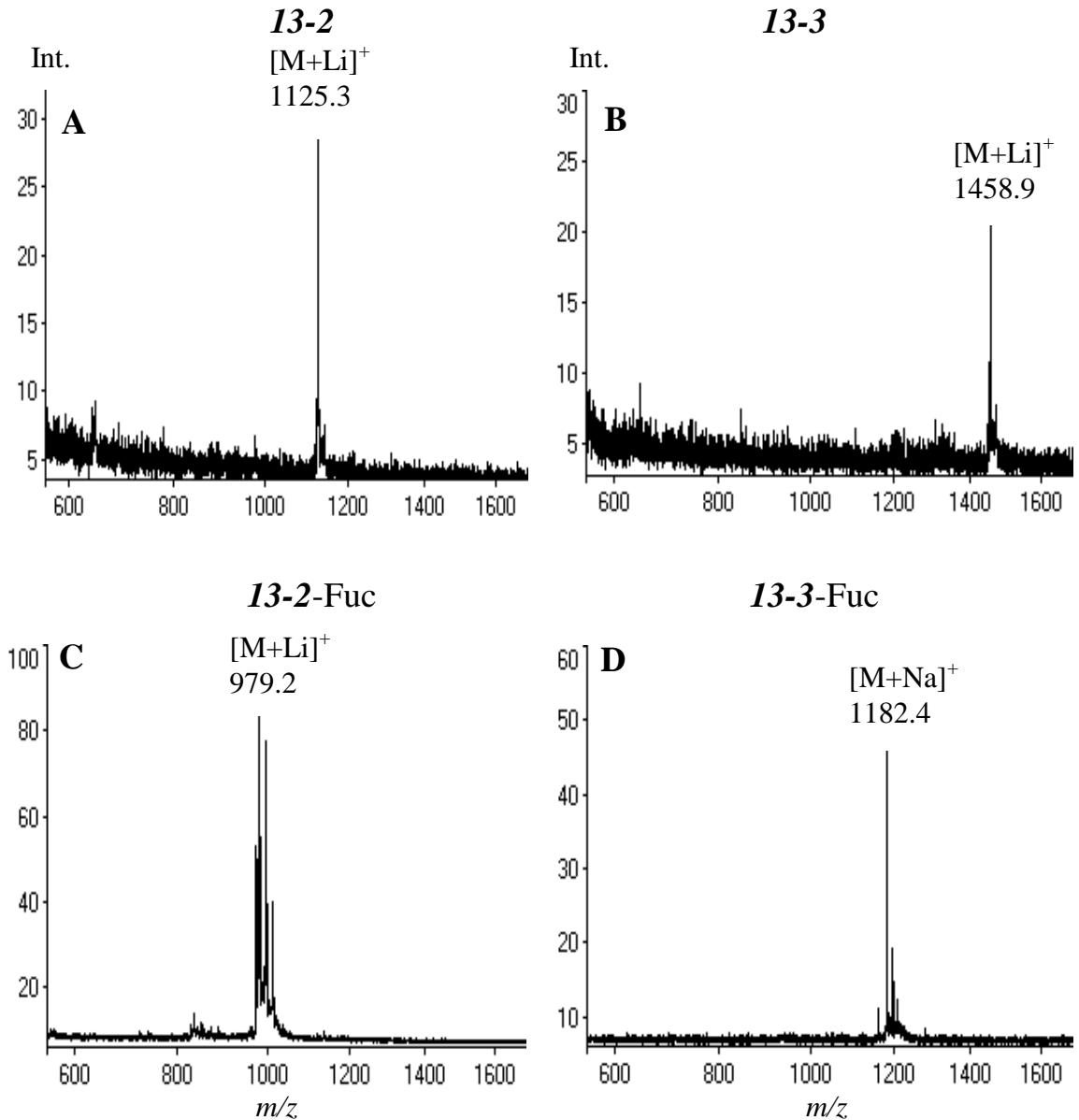
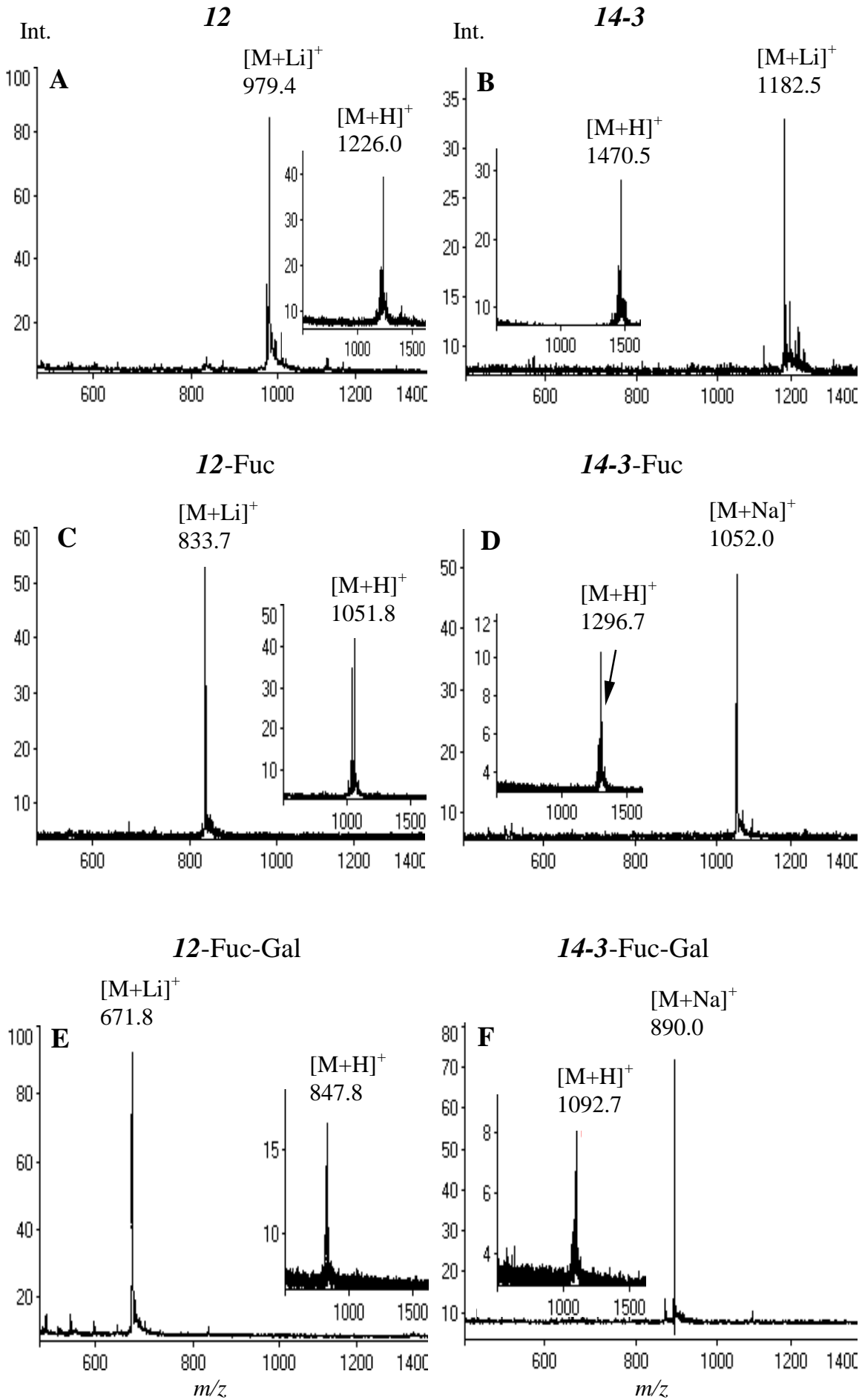


Abb. 64 MALDI-TOF-MS Analyse des PA-Hexasaccharids **13-2** und des PA-Octasaccharids **13-3** vor und nach α -Fucosidase-Behandlung und HPLC-Reinigung. (A) PA-Hexasaccharid **13-2**; (B) PA-Octasaccharid **13-3**; (C) **13-2** nach partieller Defucosylierung; (D) **13-3** nach partieller Defucosylierung. Alle Abbauprodukte wurden durch HPLC gereinigt. Die Massen der Pseudomolekülonen sind auf eine Nachkommastelle gerundet.

Abb. 65 (folgende Seite) MALDI-TOF-MS Analyse des PA-Pentasaccharids **12** und des PA-Hexasaccharids **14-3** vor und nach enzymatischer/chemischer Spaltung und HPLC-Reinigung. Die Spektren A-F zeigen die PA-Oligosaccharide, die Einschübe die entsprechenden permethylierten PA-Oligosaccharide. (A) PA-Pentasaccharid **12**; (B) PA-Hexasaccharid **14-3**; (C) **12** nach Defucosylierung durch α -Fucosidase-Behandlung bzw. partieller Hydrolyse; (D) **14-3** nach α -Fucosidase-Behandlung; (E) **12**-Fuc-Gal (**12** nach Defucosylierung und β -Galactosidase-Behandlung); (F) **14-3**-Fuc-Gal (**14-3** nach α -Fucosidase- und β -Galactosidase-Behandlung). Alle Spaltprodukte wurden durch HPLC gereinigt. Die Massen der Pseudomolekülonen sind auf eine Nachkommastelle gerundet angegeben.



3.5.4 Methylierungsanalyse der aus den Glykolipiden von Cercarien gewonnenen PA-Oligosaccharide

Die PA-Oligosaccharide sowie deren Abbauprodukte nach Abspaltung von Fuc oder von Fuc und Gal wurden permethyliert und auf die Verknüpfungspositionen der Monosaccharide hin untersucht (Tab. 26). GC/MS-Analyse der PMAAs ergab für das dem CDH entsprechende PA-Disaccharid **6-1** terminales GalNAc (Tab. 26 und Tab. 27). Der aufgrund der Schisto-Serie zu erwartende 4-substituierte Glucose_Rest konnte aufgrund seiner Modifikation durch reduktive Aminierung mit 2-Aminopyridin nicht bestimmt werden, wurde aber bei der Methylierungsanalyse des intakten Glykolipids bestätigt (Tab. 26). Alle weiteren Ergebnisse der Methylierungsanalyse wurden nach dem Konzept einer gemeinsamen biosynthetischen Reihe interpretiert. Deshalb werden von einem Oligosaccharid zum nächsten nur die Änderungen benannt werden.

Im PA-Trisaccharid **8-5** ist ein terminales GlcNAc an die 3-Position eines subterminalen GalNAc gebunden (Tab. 26 und Tab. 27). Das PA-Tetrasaccharid **10-2** besitzt eine terminale Gal, und das subterminale GlcNAc ist 4-substituiert. Die Entfernung der Galactose bewirkte eine Umwandlung des 4-substituierten GlcNAc in ein terminales GlcNAc, und das resultierende Trisaccharid **10-2-Gal** entsprach der Struktur **8-5** (Tab. 26 und Tab. 27).

Das PA-Pentasaccharid **12** besitzt zwei terminale Zucker, Fuc und Gal, und das GlcNAc ist 3,4-disubstituiert. Auch das entsprechende Glykolipid CPH wurde isoliert, und wie beim CDH unterschied sich die Methylierungsanalyse nur im Vorkommen einer 4-substituierten Glc vom PA-Oligosaccharid (Tab. 26). Dies beruhte wieder auf der Modifikation der Glucose im PA-Oligosaccharid durch reduktive Aminierung mit 2-Aminopyridin, wodurch sie nicht detektiert wurde. Die Methylierungsanalyse von **12-Fuc** zeigte, daß das 3,4-disubstituierte GlcNAc in ein 4-substituiertes GlcNAc umgewandelt war, was darauf hinweist, daß die Fuc an die 3-Position des GlcNAc geknüpft ist. Eine Behandlung mit β -Galactosidase ergab das PA-Trisaccharid **12-Fuc-Gal** und überführte das 4-substituierte GlcNAc in ein terminales GlcNAc. Dies zeigte, daß die Galactose an die 4-Position des GlcNAc gebunden ist. Das PA-Trisaccharid **12-Fuc-Gal** ist mit den PA-Trisacchariden **8-5** und **10-2-Gal** identisch (Tab. 26 und Tab. 27). Aus diesen Analysen ergab sich, daß das strukturelle Element Gal β 4[Fuc α 3]GlcNAc (Le^X-Trisaccharid) im PA-Pentasaccharid **12** vorhanden ist. Dies korrelierte mit der Erkennung des CPH durch verschiedene Le^X-spezifische mAk (siehe 3.3.3.2 und 3.4).

Verglichen mit dem PA-Pentasaccharid **12** enthielt das PA-Hexasaccharid **13-2** eine zusätzliche Fucose, und die Galactose war nicht terminal, sondern 3-substituiert (Tab. 26 und Tab. 27). Die enzymatische Entfernung eines Fucose-Restes ergab **13-2-Fuc**, und die in der Methylierungsanalyse nachgewiesene terminale Galactose ließ erkennen, daß die Fucose an die 3-Position der Galactose gebunden ist. **13-2-Fuc** war identisch mit dem Le^X-PA-Pentasaccharid **12** (Tab. 26 und Tab. 27). Dadurch ergab sich für das PA-Hexasaccharid **13-2** das strukturelle Element Fuc α 3Gal β 4[Fuc α 3]GlcNAc-, was ein Isomer des Lewis Y- (Le^Y-)Epitopes Fuc α 2Gal β 4[Fuc α 3]GlcNAc- ist. Hierbei ist der zweite Fucose-Rest in **13-2** an die 3-Position statt wie bei Le^Y an die 2-Position der Galactose gebunden.

PMAA	PA-Oligosaccharid-Fraktion							Verknüpfung			
	<i>6-1</i>	<i>8-5</i>	<i>10-2</i>	<i>10-2</i>	<i>12</i>	<i>12</i>	<i>12</i>	<i>13-2</i>	<i>13-2</i>		
				-Gal	-Fuc	-Fuc		-Fuc			
						-Gal					
2,3,4-FucOH		(0.4)	(0.1)		1.0			1.5	1.0	Fuc(1-	
3,4-FucOH										-2)Fuc(1-	
2,3,4,6-GalOH		(0.3)	1.2		1.1	0.6			1.7	Gal(1-	
2,4,6GalOH								1.0		-3)Gal(1-	
2,3,4GalOH								(0.1)		-6)Gal(1-	
2,3,6-GlcOH	*	*	*					*	*	*	-4)Glc(1-
3,4,6-GlcN(Me)AcOH		1.0		0.8				1.0			GlcNAc(1-
3,4,6-GalN(Me)AcOH	1.0										GalNAc(1-
3,6-GlcN(Me)AcOH			0.8			1.0					-4)GlcNAc(1-
4,6-GalN(Me)AcOH		0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	0.4	+	0.7		-3)GalNAc(1-
6-GlcN(Me)AcOH		(0.2)	(0.3)		0.8				+	0.6	-3,4)GlcNAc(1-

PMAA	PA-Oligosaccharid-Fraktion					Glykolipid			Verknüpfung	
	<i>13-3</i>	<i>14-3</i>	<i>14-3</i>	<i>14-3</i>	<i>16</i>	LNT	CDH	CPH	Le ^x	D
				-Fuc	-Fuc					
				-Gal						
2,3,4-FucOH	2.4	1.3			2.5			1.0	0.7	Fuc(1-
3,4-FucOH	2.0									-2)Fuc(1-
2,3,4,6-GalOH		1.0	0.7		1.9	0.7		0.9	1.0	Gal(1-
2,4,6GalOH					1.0	1.0			1.4	-3)Gal(1-
2,3,6-GlcOH				*	1.3	1.0	1.0	1.1		-4)Glc(1-
3,4,6-GlcN(Me)AcOH				0.9						GlcNAc(1-
4,6-GlcN(Me)AcOH		0.9	0.8	1.0	+	+				-3)GlcNAc(1-
3,6-GlcN(Me)AcOH			1.2		+					-4)GlcNAc(1-
4,6-GalN(Me)AcOH	1.3	0.8	1.0	0.8	+			+		-3)GalNAc(1-
6-GlcN(Me)AcOH	0.6	0.7			+			+	+	-3,4)GlcNAc(1-

Tab. 26 Methylierungsanalyse von Cercarien PA-Oligosacchariden und Glykolipiden. PMAAs wurden durch GC/MS analysiert. Die Ergebnisse sind als relative Peakflächen der gefundenen Alditolacetate ausgedrückt. Terminale Gal oder Gal(1- entspricht 2,3,4,6-GalOH oder 2,3,4,6-tetra-*O*-methylgalactitol als Alditolacetat, etc.; 3-substituiertes GlcNAc oder -3)GlcNAc(1- entspricht 4,6-GlcN(Me)AcOH oder 2-Deoxy-2-(*N*-methyl)acetamido-4,6-di-*O*-methylglucitol als Alditolacetat, etc. Spuren von *N*-Acetylhexosamin-Spezies sind durch ein (+) angegeben, und Glucoseverunreinigungen sind durch ein Sternchen (*) markiert. Lacto-*N*-tetraose (LNT) wurde als Standard für die Identifizierung von 4,6-GlcN(Me)AcOH verwendet. Die in Klammern angegebenen Komponenten sind auf die Kontamination der Fraktionen *8-5*, *10-2* und *13-2* mit dem Le^x-PA-Pentasaccharid *12* zurückzuführen.

Ein zweites PA-Hexasaccharid (**14-3**) unterschied sich vom PA-Pentasaccharid **12** nur durch das zusätzliche Vorkommen eines 3-substituierten GlcNAc-Restes. Die Entfernung der terminalen Fucose überführte das 3,4-disubstituierte GlcNAc in ein 4-substituiertes GlcNAc (**14-3-Fuc**). Daran zeigte sich, daß der Fucose-Rest 3-gebunden am disubstituierten GlcNAc hängt. Eine zusätzliche Entfernung der terminalen Galactose ergab ein PA-Tetrasaccharid mit einem terminalen GlcNAc. Wie beim PA-Pentasaccharid **12** zeigte die Spaltung mit α -Fucosidase und β -Galactosidase zusammen mit der Methylierungsanalyse, daß die Le^X-Struktur in **14-3** vorkommt (Tab. 26 und Tab. 27). Das PA-Tetrasaccharid **14-3-Fuc-Gal** unterscheidet sich von den PA-Trisacchariden **8-5**, **10-2-Gal** und **12-Fuc-Gal** nur im Vorkommen des zusätzlichen 3-substituierten GlcNAc. Wenn angenommen wird, daß **14-3** auf dem Schisto-CDH-Motiv basiert, und diese Struktur wurde auch in den analysierten PA-derivatisierten Di-, Tri-, Tetra- und Pentasacchariden gefunden (Tab. 27), kann die Struktur von **14-3** als Gal β 4[Fuc α 3]GlcNAc3GlcNAc3GalNAc4Glc-PA angegeben werden. Für das PA-Octasaccharid **13-3** wurden zwei interne und zwei terminale Fucose-Reste gefunden (Tab. 26). Eine zwanzigtägige Inkubation mit α -Fucosidase entfernte zwei dieser Fucosen (**13-3-Fuc**; Tab. 26). Das PA-Octasaccharid **13-3** wich von der biosynthetischen Reihe ab, welche die anderen analysierten PA-Oligosaccharide verband, da es zwei 3-substituierte *N*-Acetylgalactosamin-Reste aufwies. Die erhaltenen Daten reichten jedoch nicht aus, um die komplette Struktur von **13-3** zu bekommen. Bei Fraktion **16** deuteten die aus den MALDI-TOF-MS-Daten abgeleiteten Summenformeln (Tab. 24) und die Daten aus der Methylierungsanalyse (Tab. 26) auf Strukturen mit längerem HexNAc-Rückgrat hin, aber aufgrund der Komplexität und Heterogenität dieser Fraktionen und der geringen Mengen an vorhandenem Material konnten die Strukturen nicht im Detail aufgeklärt werden.

3.5.5 Enzymatischer Abbau der PA-Oligosaccharide auf der MALDI-TOF-MS-Probenscheibe

Um die anomeren Konfigurationen der glykosidischen Bindungen im *N*-Acetylhexosamin-Rückgrat zu bestimmen, wurden die PA-Oligosaccharide auf der MALDI-TOF-MS-Probenscheibe durch β -*N*-Acetylhexosaminidasen gespalten (siehe 2.6.6). Das PA-Disaccharid **6-1** (Abb. 66A) konnte durch die β -*N*-Acetylhexosaminidase aus Rindernieren gespalten werden. Das Spaltprodukt war ein PA-Monosaccharid, das durch MALDI-TOF-MS in seiner protonierten Form nachgewiesen wurde (259.2 Da; Abb. 66C). Das Pseudomolekülion bei m/z 259 kam nicht in der PA-Disaccharid-Probe vor (Abb. 66A, Ausschnitt) und auch nicht in der Enzymkontrolle, die kein PA-Oligosaccharid als Substrat enthielt (Abb. 66G, Ausschnitt). Obwohl das PA-Monosaccharid als Abbauprodukt im Matrixbereich des Spektrums liegt, zeigte das starke Signal bei m/z 259 in Abb. 66C, zusammen mit den Kontrollmessungen in Abb. 66A und G, daß das PA-Disaccharid durch die verwendete β -*N*-Acetylhexosaminidase gespalten wurde.

Das PA-Trisaccharid **8-5** ($[M+Li]^+$ 671.3 Da; Abb. 66B) wurde auf dieselbe Weise untersucht und ergab Produkt-Ionen derselben Masse ($[M+H]^+$ 259.3 Da; Abb. 66D). Daraus wurde abgeleitet, daß sowohl das terminale GlcNAc als auch das subterminale, 3-substituierte GalNAc β -glykosidisch gebunden sind (Tab. 26), woraus sich für **8-5** die Struktur GlcNAc β 3GalNAc β 4Glc-PA ergab (Tab. 27). Für **10-2-Gal**, das die gleiche Masse (Tab. 24) sowie die gleichen Methylierungsdaten (Tab. 26) wie **8-5** ergab, führte der Verdau mit β -*N*-Acetylhexosaminidase aus Rindernieren ebenfalls zu einem

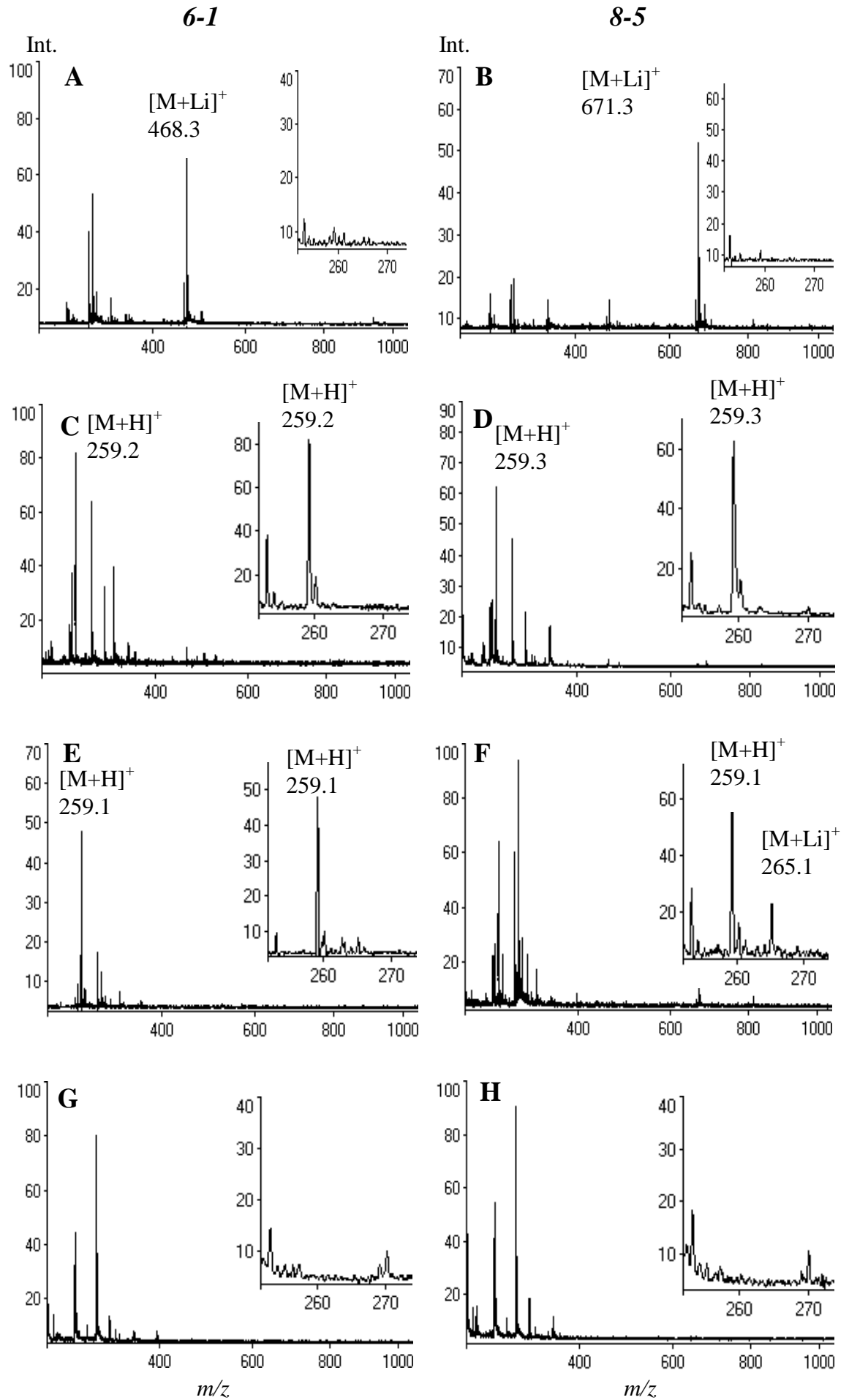
Pseudomolekülion bei m/z 259, so daß sich eine mit dem PA-Trisaccharid **8-5** identische Struktur ergab (Daten nicht gezeigt). Das PA-Trisaccharid **12-Fuc-Gal** ($[M+Li]^+$ 671.8 Da; Abb. 67A) wurde durch die Spaltung auf der Probenscheibe ebenfalls in das protonierte PA-Monosaccharid überführt (259.2 Da; Abb. 67C). Zusammen mit den Methylierungsdaten (Tab. 26), konnte für **12-Fuc-Gal** die Struktur $\text{GlcNAc}\beta\text{3GalNAc}\beta\text{4Glc-PA}$ ermittelt werden, die identisch mit **8-5** und **10-2-Gal** ist.

Auch beim PA-Tetrasaccharid **14-3-Fuc-Gal** konnten alle Bindungen mit β -*N*-Acetylhexosaminidase gespalten werden, was durch das beobachtete protonierte PA-Monosaccharid-Produkt belegt wurde (Abb. 67D). Zusammen mit den Daten der Methylierungsanalyse (Tab. 26) ergab sich daraus der Strukturvorschlag $\text{GlcNAc}\beta\text{3GlcNAc}\beta\text{3GalNAc}\beta\text{4Glc-PA}$.

Alle diese enzymatischen Spaltungen auf der Probenscheibe wurden ebenfalls mit den β -*N*-Acetylhexosaminidasen von *Diplococcus pneumoniae* und aus Schwertbohnen durchgeführt. Wie das Enzym aus Rindernieren waren auch diese beiden Enzyme imstande, die PA-Oligosaccharide **6-1**, **8-5**, **10-2-Gal**, **12-Fuc-Gal** und **14-3-Fuc-Gal** in einer 150 min dauernden Inkubation zu spalten. Die mit dem Schwertbohnen-Enzym erhaltenen Daten sind in Abb. 66E (**6-1**) und F (**8-5**) bzw. Abb. 67E (**12-Fuc-Gal**) und F (**14-3-Fuc-Gal**) gezeigt. Während das Enzym aus Schwertbohnen etwa so effizient wie die β -*N*-Acetylhexosaminidase aus Rindernieren arbeitete, war die Spaltung durch das *D. pneumoniae* Enzym weniger vollständig, wahrscheinlich aufgrund der geringeren eingesetzten Enzymmengen (s. 2.6.6). Alle Enzyme wurden zuvor dialysiert, wodurch sich die Volumina nur geringfügig veränderten, und dann unverdünnt für den Verdau auf der MALDI-Probenscheibe eingesetzt.

Die gewonnenen Resultate führten zur Strukturaufklärung von PA-Oligosacchariden, die in Tab. 27 aufgelistet sind. Neben den neuen Le^{X} - und $\text{Pseudo-Le}^{\text{Y}}$ -Strukturen scheinen auch im Cercarien-Stadium Glykolipide mit ähnlichen Strukturen vorzukommen, wie sie für *S. mansoni* Eier Glykolipide beschrieben wurden [215]. Dies wurde durch das Vorkommen 2-substituierter Fucose in der Methylierungsanalyse und durch die für das PA-Octasaccharid erhaltenen Daten (Tab. 26) nahegelegt.

Abb. 66 (folgende Seite) Enzymatische Spaltung auf der Probenscheibe und MALDI-TOF-MS des PA-Disaccharids **6-1** und des PA-Trisaccharids **8-5**. Die nativen PA-Oligosaccharide **6-1** (A) und **8-5** (B) wurden durch MALDI-TOF-MS analysiert. Die Probenflecken wurden anschließend für 150 min bei 37°C mit β -*N*-Acetylhexosaminidase aus Rindernieren inkubiert, getrocknet und nochmals gemessen (C, **6-1-HexNAc**; D, **8-5-HexNAc**). Bei der Verwendung der β -*N*-Acetylhexosaminidase aus Schwertbohnen ergaben sich die Massenspektren (E) für **6-1** und (F) für **8-5**. Wenn die Enzyme ohne Substrat mit der Matrix inkubiert wurden, zeigten die entsprechenden Massenspektren für die β -*N*-Acetylhexosaminidase aus Schwertbohnen (G) und Rindernieren (H) keine Signale bei 259 Da, die bei der Messung der Abbauprodukte (C-F) gestört hätten.



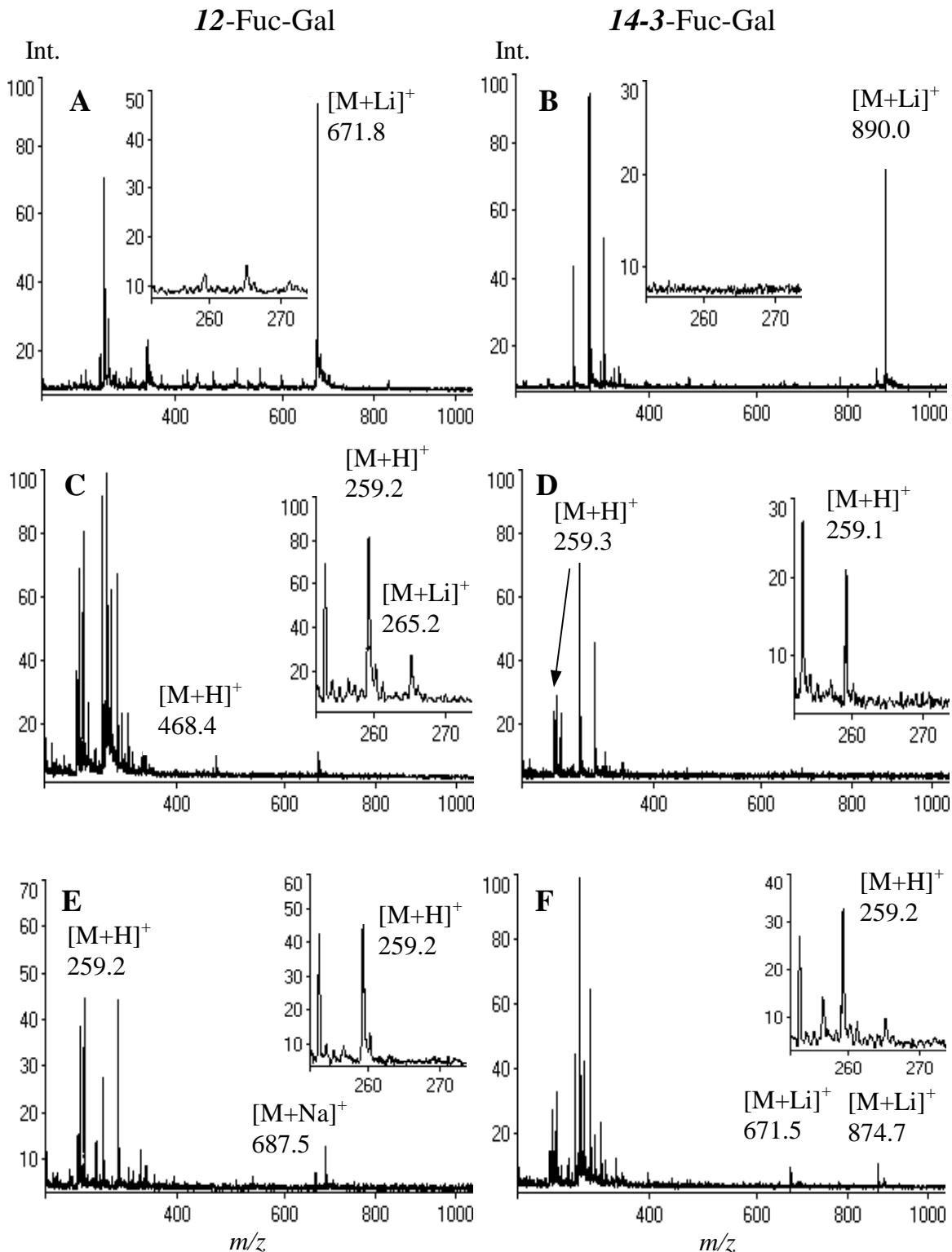


Abb. 67 Enzymatische Spaltung auf dem Probensteller und MALDI-TOF-MS des PA-Trisaccharids *12*-Fuc-Gal und des PA-Tetrasaccharids *14-3*-Fuc-Gal. Die PA-Oligosaccharide *12*-Fuc-Gal (A) und *14-3*-Fuc-Gal (B) wurden durch MALDI-TOF-MS analysiert. Die Probenflecken wurden anschließend für 150 min bei 37°C mit β -*N*-Acetylhexosaminidase aus Rindernieren inkubiert, getrocknet und nochmals gemessen (C, *12*-Fuc-Gal; D, *14-3*-Fuc-Gal). Bei der Verwendung der β -*N*-Acetylhexosaminidase aus Schwertbohnen ergaben sich die Massenspektren (E) für *12*-Fuc-Gal und (F) für *14-3*-Fuc-Gal. Für die Enzymkontrollen ohne Substrat siehe Abb. 66G, H.

Struktur der PA-Oligosaccharide	Fraktion
GalNAc(β 1-4)Glc-PA	6-1
GlcNAc(β 1-3)GalNAc(β 1-4)Glc-PA	8-5
Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)GalNAc(β 1-4)Glc-PA	10-2
Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)GalNAc(β 1-4)Glc-PA	12
Fuc(α 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)GalNAc(β 1-4)Glc-PA	13-2
Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)GalNAc(β 1-4)Glc-PA	14-3

Tab. 27 Strukturen der aus den Glykolipiden von Cercarien gewonnenen PA-Oligosaccharide.

3.6 Analyse der aus den Glykolipiden adulter Würmer gewonnenen PA-Oligosaccharide

Neben den komplexen Glykolipiden von Cercarien (3.5) wurden auch die komplexen Glykolipide adulter Würmer (entsprechend 1.0 g lyophilisiertem Ausgangsmaterial aus Hamstern) für die Herstellung von PA-Oligosacchariden verwendet. Die PA-Oligosaccharide wurden durch Aminophasen-HPLC getrennt (Abb. 68). Hauptfraktionen wurden durch MALDI-TOF-MS analysiert (Abb. 69 und Tab. 28). Die Fraktion Ad**6** enthielt ein PA-Nonasaccharid (Tab. 28) und war weitgehend homogen (Abb. 69A). Die HPLC-Fractionen Ad**4** und Ad**5** wurden jeweils durch RP-HPLC subfraktioniert. Ausgewählte Subfraktionen wurden ebenfalls durch MALDI-TOF-MS analysiert (Abb. 69 und Tab. 28). Aus den Molekülmassen wurden die Summenformeln abgeleitet (Tab. 28). Die erhaltenen Mengen an PA-Oligosacchariden reichten allerdings nicht für eine komplette Strukturanalyse aus. Jedoch ließen sich aufgrund der Summenformeln Ähnlichkeiten zu den Cercarien-Glykolipidstrukturen erkennen. So scheinen die PA-Tetrasaccharide Ad**4-4** von Adulten (Tab. 28) und **10-2** von Cercarien (Tab. 24) homolog zu sein. Das PA-Pentasaccharid Ad**4-5** (Tab. 28) entspricht dem Le^X-PA-Pentasaccharid **12** (Tab. 24). Alle anderen bei den PA-Oligosacchariden von Adultwürmern gefundenen Strukturen basieren auf der Summenformel Hex₁ HexNac_X dHex_Y, sie besitzen also nur eine Hexose. Auch die meisten dieser Strukturen finden Entsprechungen bei den PA-Oligosacchariden von Cercarien, was man an der Korrelation der PA-Oligosaccharide Hex₁ HexNac₃ dHex₂ bzw. ₄ und Hex₁ HexNac₄ dHex_{2,3} bzw. ₄ der Fraktionen Ad**4-6**, Ad**5** und Ad**6** mit Komponenten der Fraktionen **13-3**, **15** und **16** bei Cercarien sieht.

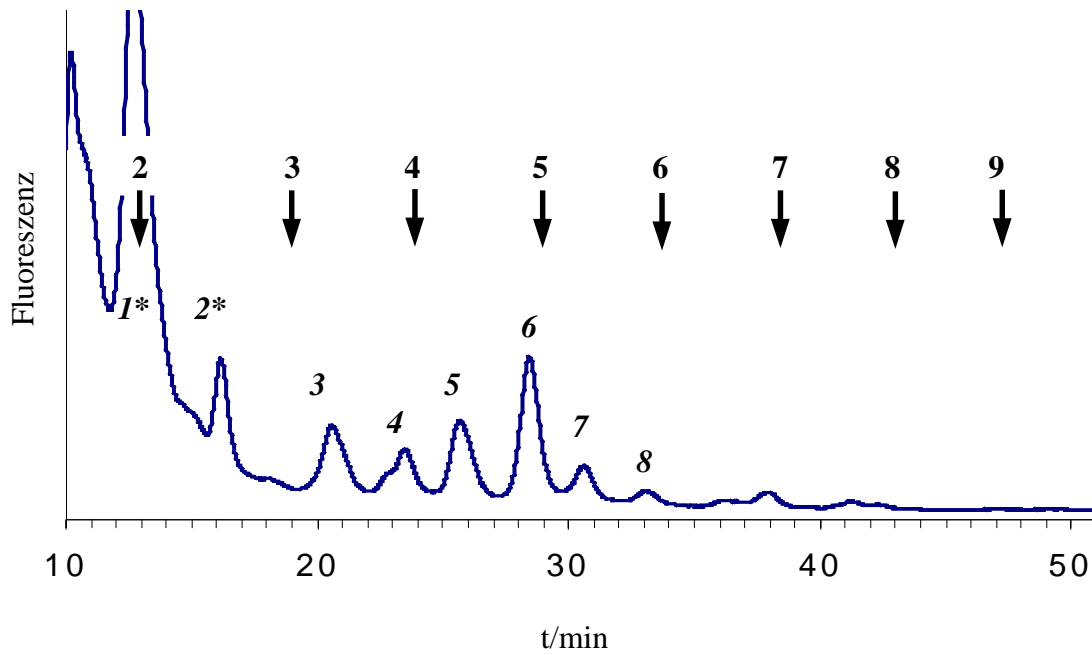


Abb. 68 HPLC-Trennung der aus den Glykolipiden adulter Würmer gewonnenen PA-Oligosaccharide an einer Aminophasen-Säule. Bei den mit einem Stern (*) markierten Fraktionen 1 und 2 handelt es sich um Kontaminationen, da diese Fraktionen keine Zucker enthalten, wie sich in der Bausteinanalyse zeigte.

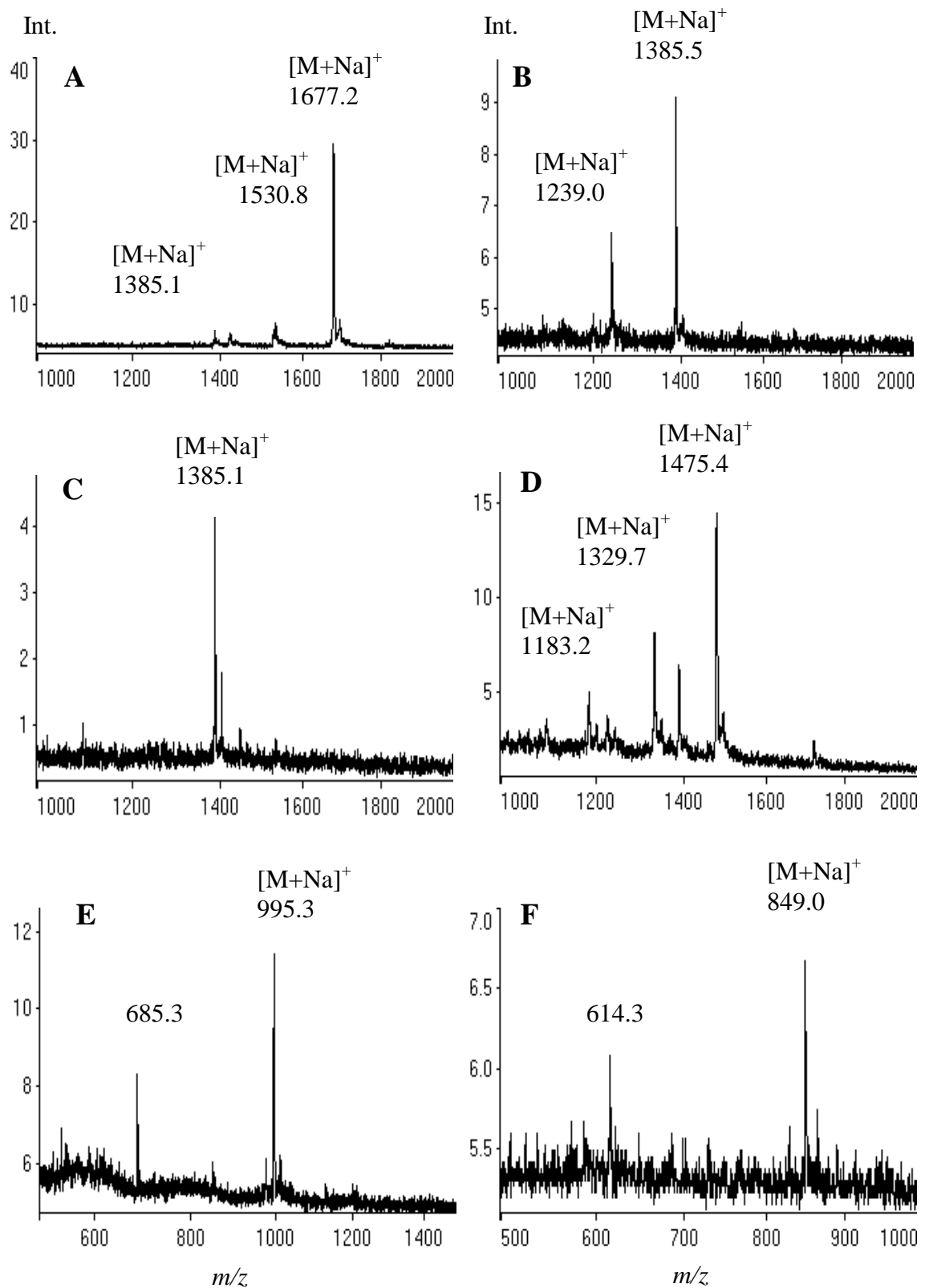


Abb. 69 MALDI-TOF-MS verschiedener PA-Oligosaccharid-Fractionen der Glykolipide adulter *S. mansoni* Würmer. (A) Fraktion Ad6; (B) Fraktion Ad5; (C) Fraktion Ad5-5; (D) Fraktion Ad4-6; (E) Fraktion Ad4-5; (F) Fraktion Ad4-4.

Fraktion	Gemessene Masse	[Addukt]	(Theoretische Masse)	Zusammensetzung
Ad4-4	849.0 ^a	[M+Na] ⁺	(849.3)	Hex ₂ HexNAc ₂ PA
	828.1 ^a	[M+H] ⁺	(827.3)	Hex ₂ HexNAc ₂ PA
Ad4-5	995.3	[M+Na] ⁺	(995.4)	Hex ₂ HexNAc ₂ dHex ₁ PA
Ad4-6	1183.2	[M+Na] ⁺	(1182.5)	Hex ₁ HexNAc ₃ dHex ₂ PA
	1329.3	[M+Na] ⁺	(1328.5)	Hex ₁ HexNAc ₃ dHex ₃ PA
	1386.2	[M+Na] ⁺	(1385.5)	Hex ₁ HexNAc ₄ dHex ₂ PA
	1475.3	[M+Na] ⁺	(1474.6)	Hex ₁ HexNAc ₃ dHex ₄ PA
Ad5	1239.0	[M+Na] ⁺	(1239.5)	Hex ₁ HexNAc ₄ dHex ₁ PA
	1385.5	[M+Na] ⁺	(1385.5)	Hex ₁ HexNAc ₄ dHex ₂ PA
Ad6	1385.1	[M+Na] ⁺	(1385.5)	Hex ₁ HexNAc ₄ dHex ₂ PA
	1530.8	[M+Na] ⁺	(1531.6)	Hex ₁ HexNAc ₄ dHex ₃ PA
	1677.2 ^b	[M+Na] ⁺	(1677.6)	Hex ₁ HexNAc ₄ dHex ₄ PA
	1693.7 ^b	[M+K] ⁺	(1693.6)	Hex ₁ HexNAc ₄ dHex ₄ PA

Tab. 28 MALDI-TOF-MS-Analyse der aus den Glykolipiden von adulten Würmern gewonnenen PA-Oligosaccharide. Die Massen wurden auf eine Nachkommastelle gerundet. Die Art der Pseudomolekülonen ist jeweils in eckigen Klammern und die berechnete, monoisotopische Masse in runden Klammern angegeben. Bei den mit ^(a) und ^(b) markierten Pseudomolekülonen handelt es sich jeweils um unterschiedliche Addukte des gleichen Moleküls.

4 Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Extraktion, Reinigung und Trennung der Glykolipide

Rückstände von Parasitenmaterial nach Extraktion mit wäßrigen Puffern erwiesen sich in dieser Arbeit als in etwa ebensogute Quelle für die Gewinnung von Glykolipiden wie unbehandeltes, lyophilisiertes Parasitenmaterial. Auch große Glykolipide (≥ 10 Monosaccharid-Bausteine) waren in diesen bereits wäßrig extrahierten Proben in den erwarteten Mengen vorhanden und offensichtlich nicht verloren gegangen. Anionenaustausch-Chromatographie führte zu keiner Fraktionierung der *S. mansoni* Glykolipide, da alle Glykolipide in der Neutralfraktion verblieben und in den mit Salz eluierten Fraktionen mittels Bausteinanalyse keine Kohlenhydrate gefunden wurden. Die QAE-Ionenaustausch-Chromatographie eignete sich aber, einen Großteil der Verunreinigungen abzutrennen. Die durch Chromatographie an einer Kieselgelkartusche gewonnenen komplexen Glykolipide waren noch stark mit anderen Lipiden verunreinigt, was bei Baustein- und Methylierungsanalyse sowie bei der immunchemischen Charakterisierung nicht störte. Für die Analyse durch Massenspektrometrie eigneten sich die komplexen Glykolipide erst nach Reinigung durch Florisil-Chromatographie mit nachfolgender HPLC-Trennung. Die Iatrobeads-HPLC-Trennung zeigte eine hohe Trennleistung bei kleinen, neutralen Glykolipiden und ermöglichte die Fraktionierung von CMH und CDH nach ihrer Ceramid-Zusammensetzung in jeweils mehrere Fraktionen. Dieses stellt eine Alternative zur Subfraktionierung durch RP-HPLC dar [519].

4.1.2 MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS erwies sich als sehr sensitive Methode zur Analyse von neutralen Glykolipiden, Glykolipidderivaten und PA-markierten Oligosacchariden im Positiv-Modus bei einem Probenbedarf von 1 bis 10 pmol. Für MALDI-TOF-MS sind je nach Substanzklasse und Laserfrequenz unterschiedliche Matrices üblich. Für die hier untersuchten Substanzen zeigte 6-Aza-2-thiothymin [496,498,520] als Matrix eine ähnlich gute Eignung wie die häufig verwendete 2,5-Dihydroxybenzoesäure [488,494,499,502,505,521,522]. Die analysierten Substanzen unterschieden sich in ihren Ionisierungseigenschaften. Ohne Zugabe von Alkalisalzen ließen sich neutrale Glykolipide meist als Natriumaddukte detektieren. Nach Zugabe von Lithium-, Kalium- oder Caesiumchlorid ließen sich die entsprechenden Alkali-Addukte nachweisen. Eine Überführung der Proben in definierte Alkali-Addukte wurde häufig eingesetzt, um eindeutige Molekülmassen zu erhalten. Auch peracetylierte Glykolipide, Lyso-Glykolipide (deacylierte Glykolipide) und PA-Oligosaccharide bildeten Alkali-Addukte. PA-Oligosaccharide konnten im Gegensatz zu Glykolipiden teilweise als Protonen-Addukte analysiert werden. Auch permethylierte PA-Oligosaccharide und DHPE-Neoglykolipide führten meist zu intensiven MALDI-TOF-MS-Signalen, wobei hier Massen gefunden wurden, die sich mit einem quarternären Ammoniumion und somit einer permanent positiven Ladung vereinbaren ließen. Freie Sphingoidbasen ließen sich

als Protonen-Addukte nachweisen und wurden nach Lithiumchlorid-Zugabe nur partiell als Lithium-Addukte detektiert. MALDI-TOF-MS erwies sich weiterhin aufgrund der hohen Sensitivität und der schnellen und einfachen Durchführbarkeit als geeignete Methode, um Fraktionen z. B. nach Iatrobeads-HPLC auf Glykolipide zu testen, und ersetzte so die HPTLC-Orcinolfärbung.

4.1.3 Kombination von enzymatischem Abbau von Glykokonjugaten auf der Probenscheibe und MALDI-TOF-MS

Neben der Bausteinanalyse und der Methylierungsanalyse zeichnete sich insbesondere die konventionelle Methode des enzymatischen Abbaus von Glykolipiden durch einen sehr hohen Substanzverbrauch aus. Glykolipide werden dazu in Natriumacetat- oder Citratpuffern mit 0.1 % Natriumtaurodeoxycholat aufgenommen, dadurch in Micellen eingebunden und mit Exoglycosidasen inkubiert. Der hohe Substanzverbrauch ergibt sich aus der Detektionsmethode, der HPTLC-Orcinolfärbung [511]. Insbesondere bei der Durchführung mehrerer Abbauschritte in Folge ergibt sich daraus ein Probenbedarf von mehreren Microgramm.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode des "on-target" enzymatischen Abbaus von Glykolipiden [500] bietet gegenüber der konventionellen Methode mehrere Vorteile:

- Der Substanzverbrauch für den vollständigen Exoglycosidase-Abbau eines Glykolipids beträgt etwa 10 pmol und liegt damit etwa um drei Zehnerpotenzen unter den bei der konventionellen Methode benötigten Mengen.
- Durch den Einsatz flüchtiger Puffer und durch den Verzicht auf Detergentien ist es möglich ohne Aufarbeitungsschritte den Verdauansatz für MALDI-TOF-MS einzusetzen. Die Analyse durch MALDI-TOF-MS erlaubt ferner eine viel genauere Charakterisierung des Abbauprodukts als die HPTLC-Orcinolfärbung.
- Die Verwendung von 6-Aza-2-thiothymin als Matrix ermöglicht es, den enzymatischen Abbau in Gegenwart der Matrix fortzusetzen. Dadurch können mehrere Abbau- und Messzyklen mit einem Probenfleck durchgeführt werden. Nach der MALDI-TOF-MS-Analyse wird zum Probenfleck ein weiteres Enzym zugegeben, und nach der Inkubation kann wiederum eine MALDI-TOF-Massenbestimmung durchgeführt werden.

4.1.4 Defucosylierung

Sequentieller Abbau der Glykane vom nicht-reduzierenden Ende kann einen wichtigen Beitrag zur Strukturanalyse in Kombination mit Massenspektrometrie und Methylierungsanalyse liefern [205,206,210,502,505,521,522]. Bei den Glykolipiden von *S. mansoni* war die Defucosylierung mit α -Fucosidase aus Rindernieren nur bedingt möglich. Auch lange Inkubationszeiten mit großen Enzymmengen führten zu einer höchstens teilweisen Fucose-Abspaltung. PA-Oligosaccharide von Cercarien ließen sich ebenfalls häufig nur partiell defucosylieren. Bei mehrfach fucosylierten Strukturen war meist nur ein Teil der Fucosen abspaltbar, so daß sich spezifische, partiell defucosylierte Strukturen anhäuferten. Die Fucosidasen aus den Nebenhoden von Rindern und aus Mandeln zeigten keine Aktivität gegenüber Glykolipiden von *S. mansoni*. Alternativen bieten die Periodat-Spaltung verbunden mit Reduktion und anschließendem Smith-Abbau [196] oder die partielle saure Hydrolyse. Für die erste Methode ist zu erwarten, daß Periodat bei PA-Oligosacchariden nicht nur die terminalen Fucosen, sondern auch die PA-derivatisierte Glucose spaltet, was zu einem Verlust der Fluoreszenzmarkierung führt. Bei komplexen Glykolipiden von *S. mansoni* kommt es durch die Periodatspal-

tung zur Zerstörung des Lipidteils, da der Großteil der Glykolipide Phytosphingoidbasen besitzt, die durch Periodat spaltbar sind [215]. Für die Glykolipide von Adultwürmern, Cercarien und Eiern wurden mit der partiellen sauren Hydrolyse unter Verwendung von Trifluoressigsäure [196] Bedingungen gefunden, die zu einer weitgehenden Defucosylierung führten und das Rückgrat intakt ließen. Leider führten ähnlich harsche Bedingungen bei den analogen PA-Oligosaccharide zu einem Verlust der Fluoreszenzmarkierung, weshalb hier deutlich mildere Bedingungen gewählt werden mußten, die dann wiederum die Effizienz der Fucoseabspaltung beeinträchtigten. Eventuell führt eine erhöhte Säurelabilität der Bindung zwischen der offenkettigen, PA-markierten Glucose und dem *N*-Acetylgalactosamin zur Fragmentierung. Bei PA-markierten *N*-Glykanen wurde allerdings von keiner erhöhten Säurelabilität dieser Bindung des PA-markierten *N*-Acetylglucosamins [429] berichtet.

4.1.5 Freisetzung des Kohlenhydratteils von Glykolipiden

Um die Glykanstrukturen der Glykolipide von Cercarien in Form von PA-Oligosacchariden untersuchen zu können, wurde der Kohlenhydratteil vom Ceramidteil enzymatisch abgespalten. Diese Spaltung geschah durch die *Rhodococcus sp.* Endoglykoceramidase II mit hoher Effizienz. Von diesem Enzym war bekannt, daß es gegenüber Glykosphingolipiden der Ganglio-, Globo- und Lacto- [441] sowie der Arthro-Serie [522] Aktivität zeigt, aber nicht gegenüber Glykolipiden der *gala*-Serie, Cerebrosiden oder Sulphatiden [441]. Eine oxidative Freisetzung der Glykolipide [414,523-525] kam für die Glykolipide von *S. mansoni* nicht in Frage, da diese Methoden Sphingosin als Base voraussetzen.

4.1.6 Methylierungsanalyse

Die Methylierungsanalyse war bei den durchgeführten Analysen von Glykanstrukturen die Methode mit dem höchsten Substanzverbrauch. Etwa 100 ng jedes Monosaccharid-Bausteins in der Ausgangsprobe war die Mindestmenge, die noch eine Identifizierung der partiell methylierten Alditolacetate in der GC/MS-Analyse nach chemischer Ionisation erlaubte. Eine Analyse unbekannter Monosaccharid-Derivate durch Elektronenstoßionisation zur Identifizierung anhand des Fragmentierungsmusters benötigte um eine Zehnerpotenz höhere Substanzmengen und war deshalb nur mit Gesamtfractionen durchführbar.

4.1.7 Fettsäureanalytik

Die α -Hydroxyfettsäuren, die bei den Glykolipiden von *S. mansoni* überwogen, wurden als Methylester analysiert. Hierbei erwies es sich als essentiell, die Hydroxylgruppe zu acetylieren. Die käuflichen Standards α -Hydroxyhexadecansäure und α -Hydroxytetracosansäure ergaben bei verschiedenen Trennbedingungen in der GC/MS-Analyse jeweils mehrere Minuten breite Signale. Dasselbe wurde für *S. mansoni* Glykolipid-Proben beobachtet, wo die Signale anderer, nichthydroxylierter Fettsäuren diese breiten Signale überlagerten. Nach Acetylierung ergaben sich hingegen gut auswertbare Chromatogramme.

4.2 Strukturen der Ceramid-Mono- und -Dihexoside von *S. mansoni*

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ceramid-Monohexoside von *S. mansoni* strukturell analysiert und auf stadienspezifische Charakteristika hin untersucht. Die Ceramid-Monohexoside zeigten im Kohlenhydratteil keine Auffälligkeiten. In allen drei Stadien wurden Ceramid-Monohexoside mit Glucose und Galactose gefunden. Diese Strukturen sind weit verbreitet [526]. Bei der Maus spielen Galactosylcerebroside sowie dessen sulfatierte Form, Sulfatid, eine wichtige Rolle bei der Ausbildung funktioneller, stabiler Myelinscheiden [527]. Galactosylcerebroside scheinen außerdem, zusammen mit anderen neutralen Glykolipiden, eine Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion zu spielen [528]. Die für den Kohlenhydratteil der Ceramid-Dihexoside gefundene Struktur GalNAc β 4Glc- bestätigt die in der Literatur beschriebene Schisto-Serie für *S. mansoni* Glykolipide ([200,214,215] und 1.5.5). Im Lipidteil unterscheiden sich die Ceramid-Monohexoside der drei untersuchten Stadien deutlich voneinander. Auffällig ist, daß ungeradzahlige Sphingoidbasen nur im Cercarien-Stadium vorkommen, und daß das CMH von Cercarien sowohl im Hinblick auf die Sphingoidbasen-Heterogenität als auch die Fettsäure-Heterogenität die anderen beiden Stadien übertrifft. Aus der Kombination dieser beiden heterogenen Bausteine resultiert eine große Zahl an verschiedenen Ceramid-Spezies, die für das CMH von Cercarien in dieser Arbeit detailliert untersucht wurden. Bei den Ceramiden der kleinen Glykolipide ergaben sich nicht nur Unterschiede zwischen den Stadien, sondern auch zwischen CMH und CDH der jeweiligen Stadien zeigten sich Unterschiede. Am deutlichsten wird das wiederum beim Cercarienstadium. Beim Ceramid-Monohexosid dominierten Ceramide mit unter 40 C-Atomen, während beim Ceramid-Dihexosid und allen anderen, größeren Glykolipiden von Cercarien die Spezies mit solchen Ceramiden überwogen, die über 40 C-Atome besaßen.

Glykosphingolipide von *S. mansoni* besitzen eine große Menge an α -Hydroxyfettsäuren, hauptsächlich α -Hydroxyhexadecansäure, aber auch α -Hydroxyfettsäuren mit 14, 18, 24, 26 und 28 Kohlenstoffatomen. α -Hydroxyfettsäuren sind bei Galactosylceramiden weit verbreitet [528-534]. Ein beschriebener mAk bindet selektiv an Galactosylcerebroside mit α -Hydroxyfettsäuren und nicht an solche mit unhydroxylierten Fettsäuren [535]. Eine Kombination von α -Hydroxyfettsäuren mit Phytosphingosin-Basen, wie sie bei Schistosomen vorkommt, wurde auch für die Ceramide von Säugern wie z. B. beim Rind und beim Menschen beschrieben [534-537].

4.3 Immunchemische Charakterisierung von *S. mansoni* Glykolipiden

S. mansoni Glykolipide werden von Infektionsseren gut erkannt, und für die Glykolipide adulter Würmer wurde gezeigt, daß sie Schistosomen-spezifische Antigene darstellen [77]. Ein Ziel dieser Arbeit war es zu erfassen, welches die wichtigsten Epitope dieser Glykolipide sind und inwieweit sich die Glykolipide der drei untersuchten Stadien des Parasiten unterscheiden. Eine erste Beobachtung war die unterschiedliche Antigenität in der Immunfärbung: Glykolipide aus 100 μ g adulten Würmern reagieren in etwa so stark mit Infektionsserum wie Glykolipide aus 10 μ g Cercarien oder aus 1 μ g Eiern. Auch unter Berücksichtigung der Mengenunterschiede, die sich aus der Bausteinanalyse

ergaben, sind die Eier von *S. mansoni* damit die Glykolipid-Quelle erster Wahl. Deshalb gingen die beiden bisher veröffentlichten strukturanalytischen Arbeiten anderer Arbeitsgruppen von Ei-Glykolipiden aus [214,215].

Die Antigenepitope der Glykolipide aller drei Stadien scheinen aus Kohlenhydraten zu bestehen und sind durch Periodat zerstörbar (3.3.1). Darin unterscheiden sich die Glykolipide von Schistosomen von den Glykolipid-Antigenen vieler Nematoden [502,538,539], die neben Kohlenhydrat-Resten auch Phosphocholin (PC) tragen, das durch Periodat-Behandlung nicht zerstört wird. Auch Glykolipide von Arthropoden werden in ihrer Antigenität von Phosphocholin und Phosphoethanolamin dominiert [205,206,208,540-542]. Hinweise auf das Vorkommen von Phosphocholin bei Schistosomen ergaben sich aus einer Immun-Diffusionsanalyse nach Ouchterlony von Péry *et al.* [514], sowie aus einer immunologischen Untersuchung von Lal *et al.* [515]. Eine Western-Blot-Analyse mit einem PC-spezifischen monoklonalen Antikörper ergab bei *S. mansoni* ebenso wie bei *Strongyloides stercoralis*, *Trichinella spiralis*, *Onchocerca volvulus* und *Brugia malayi* jeweils eine Vielzahl PC-positiver Polypeptid-Banden [514]. Weiterhin konnten bei 2 von 21 *S. mansoni*-infizierten Patienten große Mengen PC-positiver zirkulierender Antigene im Blutkreislauf nachgewiesen werden.[514]. In der vorliegenden Arbeit wurde durch HPTLC-Immunfärbung gezeigt, daß die diesbezüglich untersuchten Glykolipide von *S. mansoni* Cercarien und adulten Würmern kein Phosphocholin tragen.

Für *S. mansoni* ist beschrieben worden, daß ein monoklonaler Antikörper nur Glykolipide des Cercarien-Stadiums erkennt, während andere monoklonale Antikörper, unter anderem der monoklonale Antikörper 128C3/3, Glykolipide aller drei untersuchten Stadien erkennen, wobei das Muster der Erkennung sowie die unterschiedlich starke Reaktion der jeweiligen Glykolipide ähnlich wie bei Infektionsserum ist [212]. Später wurde erkannt, daß das auf die Glykolipide von Cercarien beschränkte Epitop Le^X ist [216]. Diese Le^X-Antigene sind in dieser Arbeit näher untersucht worden (3.3.3, 3.3.10.1 und 3.5). Während die Struktur des Le^X-Antigens bekannt ist, gibt es für das zweite Antigen-Epitop, das durch Infektionsserum stark erkannt wird, eine Fülle von monoklonalen Antikörpern, die alle ähnliche Bindungsspezifitäten zu haben scheinen, wobei die genaue Struktur des Epitopes nicht bekannt ist. Für dieses Antigen gibt es keinen allgemein akzeptierten Namen. In dieser Arbeit wird es deshalb nach einem monoklonalen Antikörper, der dieses zweite Antigen erkennt, mit M2D3H-Epitop bezeichnet [376]. In der Literatur ist dieses Epitop unter anderem als 128C3/3-Epitop, ebenfalls nach einem monoklonalen Antikörper, benannt ([212,213,216]; siehe 1.6.7 und 1.6.9). Monoklonale Antikörper dieser Spezifität wurden nicht nur bei der Behandlung von Mäusen mit löslichem Eiantigen von *S. mansoni* erhalten (KCS-Antikörper, [141,395]), sondern auch nachdem den Mäusen Ei-Homogenat von *Schistosoma haematobium* injiziert wurde (E2-, C3- und C8-Antikörper; siehe 3.3.4). Sowohl für das Le^X-Antigen als auch für das M2D3H-Antigen ergab sich eine stadienspezifische Expression: Während das Le^X-Epitop auf Lipidebene spezifisch im Cercarien-Stadium exprimiert wird, liegt auf Proteinebene das Expressionsmaximum beim Ei-Stadium. Ebenfalls im Ei-Stadium wird das M2D3H-Epitop am stärksten exprimiert, und zwar sowohl auf Lipid- als auch auf Proteinebene. Für mehrere Ei-Glykoproteine legt ein zweidimensionaler Western Blot nahe, daß sich das Le^X-Antigen und das 128C3/3-Antigen (ähnlich dem M2D3H-Antigen) auf demselben Protein befinden können [213].

Während nach einer eingeschlechtlichen Infektion von Mäusen mit nur männlichen Würmern ein hoher anti-Le^X-Antikörpertiter vorhanden ist, ist dieser Titer bei einer beidgeschlechtlichen Infektion deutlich niedriger. Der Antikörpertiter gegen Glykolipide von adulten Würmern und Eiern (Träger des M2D3H-Epitops) ist hingegen bei einer

beidgeschlechtlichen Infektion hoch, bei einer Infektion mit nur männlichen Würmern hingegen deutlich niedriger. Dies läßt vermuten, daß die Antikörper, die *S. mansoni* Glykolipide erkennen, nicht durch adulte männliche Würmer hervorgerufen werden, sondern durch die abgegebenen Eier oder die Weibchen induziert werden. Wahrscheinlich scheint, daß es sich um Antigene von Eiern handelt, insbesondere, da der Titer von anti-Glykolipid-Antikörpern mit der Patenz, d. h. mit dem Auftreten von Eiern im Stuhl, ansteigt [77]. Mit der Patenz ist auch ein signifikanter Anstieg der gesamten, gegen Schistosomen gerichteten Antikörper-Antwort zu beobachten [103,338-340,543]. Dieser Vergleich der Antikörper-Reaktion in chronischem Infektionsserum und bei Infektion mit nur männlichen Würmern legte also nahe, daß in erster Linie die Adultwürmer mit ihren Le^X-Oberflächenantigenen (1.6.3 und 1.6.4) und ihren sekretierten, Le^X-tragenden Glykoproteinen (CCA, 1.6.4 und 1.6.5) die Immunantwort gegenüber Le^X hervorrufen, während Eier zu einer Immunantwort auf das M2D3H-Epitop führen. Für *S. mansoni* Ei-Glykoproteine [213] sowie für die Oberfläche des sich im Ei befindenden Miracidiums [216] wurde durch einen monoklonalen Antikörper gezeigt, daß sie mit *S. mansoni* Glykolipiden kreuzreagierten. Somit könnten sowohl die Glykolipide als auch die Glykoproteine von Eiern die Bildung dieser Antikörper hervorrufen. Außerdem kann nicht unterschieden werden, ob es von den Miracidien/Eiern präsentierte Kohlenhydratstrukturen [216] oder von den Eiern sekretierte und im Kreislauf zirkulierende Antigene [61,62] sind, die primär immunogen wirken.

Eine Reihe von Kaninchen Hyperimmunseren, die gegen *S. mansoni* Ei-Glykoproteine hergestellt wurden, sind auf die Erkennung von *S. mansoni* Glykolipiden getestet worden, um einen Einblick in gemeinsame Glykosylierungsmuster von Proteinen und Lipiden zu gewinnen (3.3.5). Insbesondere für Hyperimmunseren gegen Sm480Eiantigen wurde eine sehr starke Erkennung von *S. mansoni* Glykolipiden gefunden, was gut mit der starken Expression des M2D3H-Epitops auf den Glykoproteinen des Ei-Stadiums korrelierte [213]. Diese Seren scheinen sehr hohe Titer an Antikörpern des M2D3H-Typs zu besitzen. Eines dieser anti-Sm480Ei Seren wurde aufgrund dieses hohen Antikörpertiters in dieser Arbeit für den empfindlichen Nachweis von *S. mansoni* Glykolipiden verwendet.

Ein Mechanismus, durch den die hohe Expression des M2D3H-Epitops in *S. mansoni* Eiern zustandekommt, scheint die stadienspezifische Glykosylierung zu sein: Während das Sm480-Antigen [405] aus adulten Würmern, in Kaninchen injiziert, nur in niedrigen Antikörpertitern des M2D3H-Typs resultierte, führte das entsprechende Antigen, aus dem Ei-Stadium isoliert, zu sehr hohen Antikörper-Titern dieses Typs (3.3.5). Anscheinend wird die Expression dieses M2D3H-Epitops auf dem Sm480-Antigen vom Adultwurm zum Ei stadienspezifisch hochreguliert.

Einen Hinweis auf die mögliche Funktion des auf den Glykolipiden des Ei-Stadiums stark exprimierten M2D3H-Antigens liefert die Beobachtung, daß *S. mansoni* Ei-Glykolipide mit dem Hämocyanin (KLH) der Schnecke *Megathura crenulata* kreuzreagiert, das ebenfalls das M2D3H-Antigen trägt (3.3.6). Eine solche Kreuzreaktivität mit einem *S. mansoni* Kohlenhydratantigen ist für eine ganze Reihe von Hämocyaninen beschrieben, unter anderem auch für das Hämocyanin des Zwischenwirtes von *S. mansoni*, *Biomphalaria glabrata* [282,318,322,366]. Das Konzept des "molecular mimicry", gemäß dem *S. mansoni* durch die Expression von Le^X, unter anderem auf den Glykolipiden von Cercarien, eine Antigen-Struktur des Hauptwirtes präsentiert, könnte also auch bei den Glykolipid-Antigenen von Eiern bzw. Miracidien durch die Imitation eines Kohlenhydratantigens des Zwischenwirtes gegeben sein.

Da laut Literatur in den Glykolipiden der Eier von Schistosomen 3-fucosyliertes GlcNAc vorkommt [214,215] und da diese Glykolipide stark antigen sind, war es denkbar, daß *S. mansoni* Glykolipide mit anderen Antigenen, die ebenfalls 3-

fucosyliertes GlcNAc besitzen, kreuzreagieren. Eine Gruppe von Allergenen besitzt als Gemeinsamkeit einen Fuc-Rest an C-3 des innersten GlcNAc von *N*-Glykanen [544,545]. Die zugehörigen Proteine werden durch den monoklonalen Antikörper YZ1 sowie durch ein gegen Meerrettich-Peroxidase hergestelltes Hyperimmunserum erkannt [397,398]. Gegen Meerrettich-Peroxidase hergestellte Hyperimmunseren erkennen Strukturen im Gehirn von *Drosophila* und anderen Insekten [546]. Während der mAk YZ1 *S. mansoni* Glykolipide nicht erkannte, ergab sich mit dem Hyperimmunserum eine schwache, aber deutliche Erkennung.

Durch Defucosylierung verlieren die *S. mansoni* Glykolipide ihre Antigenität und werden kaum oder überhaupt nicht mehr durch Infektionsserum erkannt. Das beweist, daß Fucose ein wichtiger Bestandteil aller *S. mansoni* Glykolipid-Epitope ist.

Die weitere Reinigung und Fraktionierung der komplexen Glykolipide erlaubte es, Massenspektren von mehreren Fraktionen zu erhalten. Während die für die Glykolipide adulter Würmer gewonnenen Massen die Angabe einer Summenformel erlaubten, war dies bei den komplexen Glykolipiden von Cercarien aufgrund der großen Heterogenität oft nicht möglich.

Die Erkennung von KLH durch *S. mansoni* Infektionsseren scheint nicht, wie vermutet, auf der gemeinsamen Expression des T-Antigens zu beruhen [305], sondern auf dem gemeinsamen Vorkommen des M2D3H-Epitops auf den Glykanen von KLH und auf Glykolipiden und Glykoproteinen von *S. mansoni*, insbesondere vom Ei-Stadium.

4.4 Strukturen der komplexen Glykolipide von *S. mansoni* Cercarien

In dieser Arbeit sind die Strukturen der komplexen, antigenen Glykolipide von *S. mansoni* analysiert worden. Sie liefert damit die erste strukturelle Untersuchung der komplexen Glykolipide des Cercarien-Stadiums, da die beiden früheren Berichte in der Literatur sich ausschließlich mit der Strukturanalyse der Glykolipide des Ei-Stadiums befaßten [214,215]. Es konnte gezeigt werden, daß sich die komplexen Glykolipide von Cercarien stark von den Glykolipiden des Ei-Stadiums unterscheiden, da sie große Mengen an terminaler und 3-substituierter Galactose enthalten. Da Galactose an den aus Eiern isolierten Glykolipiden nicht gefunden wurde [215], ergeben sich somit stadienspezifische Unterschiede, die sich am deutlichsten im Vorkommen von Le^X-Strukturen in Cercarien-Glykolipiden und in deren Fehlen in Ei-Glykolipiden manifestieren.

Während die Oberfläche von *S. mansoni* Cercarien mit einem anti-Le^X monoklonalen Antikörper nur an der Öffnung der Acetabulardrüse reagiert, ist das Le^X-Epitop nach der Transformation fleckenartig auf der ganzen Oberfläche des Parasiten exprimiert [216]. Das in dieser Arbeit identifizierte Glykolipid-gebundene Le^X (Tab. 27) des Cercarien-Stadiums könnte für diese Oberflächen-Expression von Le^X nach der Transformation verantwortlich sein. Es ist aber nicht geklärt, inwieweit diese Erkennung auf Lipid- oder auf Protein-gebundene Le^X-Epitope zurückzuführen ist. Wie bereits oben angesprochen, paßt das Vorkommen von Le^X an der Oberfläche des Pärchenegels *S. mansoni* damit in das Konzept des "molecular mimicry" [314,315], da Le^X in vielen Geweben von Maus und Mensch exprimiert ist [219,222,227,319,321,464,547-554]. Le^X ist daher ein Autoantigen: Menschliche Granulozyten tragen Le^X, oft zusammen mit Sialyl-Le^X, auf Glykoproteinen [336,555] sowie auf Glykolipiden [224,556] an ihrer Oberfläche. Für dieses Epitop wurde gezeigt, daß es bei der Zell-Zell-Adhäsion homophile Interaktionen eingeht [219], und es wurde strukturell auf den *N*-Glykanen des Leukozyten-Zelladhäsions-Moleküls identifiziert [557]. Le^X wurde mittlerweile bei verschiedenen

Organismen nachgewiesen: Die meisten Parallelitäten bietet *Helicobacter pylori*. Dieses Bakterium ist wie *S. mansoni* humanpathogen und exprimiert ebenfalls Le^X [558-560]. Da das Le^X-Epitop dem Säuger-Hauptwirt und dem Parasiten gemein ist, kommt es während der Infektion mit Schistosomen zu einer anti-Le^X Immunreaktion und wahrscheinlich zu einer Komplement-abhängigen Lyse von Neutrophilen des Wirtes. Einen Hinweis darauf gibt die Beobachtung, daß hohe anti-Le^X Antikörper-Titer mit der Schwere der Neutropenie korrelieren [561]. Auch für die *Helicobacter pylori*-Infektion ist beschrieben worden, daß anti-Le^X-Antikörper induziert werden [562,563].

4.5 Biosynthese der Glykolipide von *S. mansoni*

Neben den Le^X- und Pseudo-Le^Y-Strukturen, die für *S. mansoni* Cercarien zum ersten Mal beschrieben wurden (Tab. 27), kamen auch solche Glykolipide im Cercarien-Stadium vor, die den in Eiern gefundenen Glykolipiden ähneln [215]. Allerdings erlaubten die Mengen dieser Glykolipide keine detaillierte Strukturanalyse. Die gefundenen Unterschiede sind in einem spekulativen Biosyntheseweg zusammengefaßt (Abb. 70). Bei *S. mansoni* Glykolipiden kommen unterschiedliche Strukturen des *N*-Acetylhexosamin-Rückgrats vor. Im Ei-Stadium sind die Ketten aus der repetitiven Einheit -4GlcNAc β - aufgebaut, die mit der Schisto-Disaccharid-Grundstruktur (-3GalNAc β 4Glc1Cer) verknüpft ist. *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc β -) dient hier als Terminations-Signal und schließt das *N*-Acetylhexosamin-Rückgrat ab [215]. Bei Cercarien wurde eine andere Rückgrat-Struktur gefunden: das Le^X-Ceramid-Hexahexosid, das dem PA-Hexasaccharid **14-3** entspricht (Tab. 27), besitzt eine GlcNAc β 3GlcNAc-Einheit, die zuvor bei Schistosomen nicht beschrieben wurde, im Gegensatz zu den Glykolipiden des Ei-Stadiums, bei denen GlcNAc β 4GlcNAc-Verknüpfungen vorliegen [215]. Parallel hierzu war das Vorkommen von 3-substituiertem *N*-Acetylglucosamin in der Gesamtfraction komplexer Glykolipide von Cercarien und in den PA-Oligosacchariden der Fraktion **16** (Abb. 48C und Tab. 20) und sein Fehlen in komplexen Glykolipiden des Ei-Stadiums (Abb. 48E und Tab. 20; [215]). Bei Schistosomen vorkommende β 3- oder β 4-*N*-Acetylglucosaminyltransferasen sind bisher nicht beschrieben worden. Bei der Schnecke *Lymnaea stagnalis*, dem Zwischenwirt des Vogel-Schistosomen *Trichobilharzia ocellata*, wurde jedoch eines dieser Enzyme kloniert und charakterisiert [564,565]. Es wurde gezeigt, daß dieses Enzym GlcNAc auf GlcNAc β - überträgt, so daß sich die Chitobiose-Struktur GlcNAc β 4GlcNAc β - ergibt. Für die Synthese der bei Schistosomen beschriebenen LacdiNAc-Strukturen (GalNAc β 4GlcNAc β -) ist ebenfalls noch kein Enzym beschrieben worden, während in *Lymnaea stagnalis* eine entsprechende β 4-GalNAc-Transferase nachgewiesen wurde [257,258].

Neben den Unterschieden im *N*-Acetylhexosamin-Rückgrat, differieren die Glykolipide von Eiern und Cercarien im Grad der Galactosylierung: während die Eier-Glykolipide keine Galactose tragen, weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, daß eine β 4-Galactosyltransferase das terminale *N*-Acetylglucosamin des *N*-Acetylhexosamin-Rückgrats von Cercarien-Glykolipiden als Akzeptor nutzt (Abb. 70). Eine β 4-Galactosyltransferase-Aktivität ist in Extrakten adulter Würmer gemessen worden [259]. Es wurde ferner gezeigt, daß dieses Enzym in der Lage ist, *N*-Acetylglucosamin-Strukturen (Gal β 4GlcNAc β -) zu synthetisieren. Diese Enzymaktivität könnte die Galactosylierung des Zirkulierenden Kathodischen Antigens (CCA; [52,53,56,58,60,190,331,334,361,566,567]) beim adulten Wurm durchführen und auch bei der Biosynthese der Glykolipide von Cercarien beteiligt sein (Abb. 70). Der Galactosylierung folgt die Fucosylierung, so daß sich die Le^X-Strukturen ergeben.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur sowie die antigenen Eigenschaften der Glykolipide des Humanparasiten *S. mansoni* analysiert. Kleine sowie komplexe Glykolipide wurden aus adulten Würmern, aus Cercarien und aus Eiern aufgereinigt. Die Hauptkomponenten der Ceramid-Monohexoside wurden durch Analyse der vorhandenen Fettsäuren und Sphingoidbasen strukturell aufgeklärt. Beim CMH des Adultwurmes überwogen die Sphingoidbasen C18-Sphingosin und C18-Phytosphingosin, bei Cercarien waren es C18-, C19- und C20-Phytosphingosin, und CMH von Eiern hatte fast ausschließlich C18- und C20-Phytosphingosin. In allen drei Stadien dominierte C16- α -Hydroxyfettsäure über C16-Fettsäure (Palmitinsäure). Auch C18- α -Hydroxyfettsäure wurde in allen Stadien gefunden. Bei Cercarien kamen zusätzlich Ceramide mit C24-, C26- und C28-Fettsäuren sowie den entsprechenden Hydroxyfettsäuren vor. Während diese Ceramide mit über 40 C-Atomen beim CMH von Cercarien nur Nebenkomponten bildeten, waren dies die hauptsächlichen Ceramide bei CDH und komplexen Glykolipiden von Cercarien.

Bei der Analyse des Kohlenhydrateils der kleinen Glykolipide wurde bei allen Stadien als CMH-Hauptkomponente Glc1Cer und als Nebenkomponten Gal1Cer gefunden. Das CDH aller Stadien hatte die Struktur GalNAc β 4Glc1Cer.

Die Analyse der komplexen Glykolipide ergab eine stadienspezifische Expression des Le^X-Antigens auf Glykolipiden von *S. mansoni* Cercarien. Im Gegensatz dazu war Protein-gebundenes Le^X hauptsächlich im Ei-Stadium exprimiert. Ein weiteres Fucosehaltiges Antigen war durch den monoklonalen Antikörper M2D3H definiert und kam auf den Glykolipiden aller untersuchten Stadien vor. Sowohl auf Lipid- als auch auf Protein-Ebene war die Expression dieses M2D3H-Epitops im Ei-Stadium am stärksten. Dieses Epitop wurde auch stark durch chronisches *S. mansoni* Infektionsserum erkannt. Es konnte nachgewiesen werden, daß dieses Fucosehaltige M2D3H-Epitop auch auf dem Hämocyanin der Schnecke *Megathura crenulata* vorkommt und für die starke Erkennung des Hämocyanins durch *S. mansoni* Infektionsserum verantwortlich ist.

Die komplexen Glykolipide von Cercarien wurden strukturell als PA-Oligosaccharide analysiert. Im einzelnen wurden folgende Strukturen identifiziert: GalNAc β 4Glc1Cer (CDH), GlcNAc β 3GalNAc β 4Glc1Cer (CTH), Gal β 4GlcNAc β 3GalNAc β 4Glc1Cer (CTetH); Gal β 4[Fuc α 3]GlcNAc β 3GalNAc β 4Glc1Cer (CPH; Le^X-Pentasaccharid-Struktur); Gal β 4[Fuc α 3]GlcNAc β 3GlcNAc β 3GalNAc β 4Glc1Cer (CHH; Le^X-Hexasaccharid-Struktur); Fuc α 3Gal β 4[Fuc α 3]GlcNAc β 3GalNAc β 4Glc1Cer (CHH; Pseudo-Le^Y-Hexasaccharid-Struktur). Die letzte Struktur unterscheidet sich vom Le^Y-Antigen darin, daß die Fucose an die 3-Position und nicht wie in Le^Y an die 2-Position der Galactose geknüpft ist.

6 Literatur

- [1] Savioli, L., Renganathan, E., Montresor, A., Davis, A. und Behbehani, K. (1997) Control of schistosomiasis - a global picture. *Parasitol. Today* **13**, 444-448.
- [2] Frenkel, J. K., Taraschewski, H. und Voigt, W. P. (1998) Important pathologic effects of parasitic infections of man. in *Parasitology in Focus: Facts and Trends* (Mehlhorn, H., Ed.), 538-590, Springer Verlag, Berlin.
- [3] Davis, A. (1996) Schistosomiasis. in *Manson's Tropical Diseases*, 20th Ed., 1413-1456, WB Saunders, London.
- [4] Stephenson, L. S., Latham, M. C., Kurz, K. M., Kinoti, S. N., Oduori, M. L. und Crompton, D. W. (1985) Relationships of *Schistosoma haematobium*, hookworm and malarial infections and metrifonate treatment to growth of Kenyan school children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**, 1109-1118.
- [5] Chunge, R. N., Karumba, N., Ouma, J. H., Thiongo, F. W., Sturrock, R. F. und Butterworth, A. E. (1995) Polyparasitism in two rural communities with endemic *Schistosoma mansoni* infection in Machakos district, Kenya. *J. Trop. Med. Hyg.* **98**, 440-444.
- [6] Andrade, Z. A. und Brito, P. A. (1981) Evolution of schistosomal hepatic vascular lesions after specific chemotherapy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**, 1223-1227.
- [7] Mostafa, M. H., Sheweita, S. A. und O. Connor, P. J. (1999) Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 97-111.
- [8] Bilharz, T. M. (1852) Fernere Beobachtungen über das die Pfortader des Menschen bewohnende *Distomum haematobium* und sein Verhältnis zu gewissen pathologischen Bildungen aus brieflichen Mitteilungen an Professor v. Siebold vom 29. März 1852. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie, Leipzig* **4**, 72-76.
- [9] Andrade, Z. A. (1998) The situation of hepatosplenic schistosomiasis in Brazil today. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **93**, Suppl. 1, 313-316.
- [10] DeBont, J. und Vercruyse, J. (1997) The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. *Parasitol. Today* **13**, 255-262.
- [11] Rollinson, D. und Simpson, A. J. G. (1987) *The Biology of Schistosomes - from Genes to Latrines*, Academic Press, London.
- [12] Desprès, L., Imbert-Establet, D., Combes, C., Bonhomme, F. und Monnerot, M. (1991) Isolation and polymorphism in mitochondrial DNA from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **47**, 139-142.
- [13] Desprès, L., Imbert-Establet, D. und Monnerot, M. (1993) Molecular characterisation of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**, 221-230.
- [14] Neto, E. D., de Souza, C. P., Rollinson, D., Katz, M., Pena, S. D. J. und Simpson, A. J. G. (1992) The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**, 83-88.
- [15] Pena, H. B., Souza, C. P. d., Simpson, A. J. G. und Pena, S. D. J. (1995) Intracellular promiscuity in *Schistosoma mansoni*: nuclear transcribed DNA sequences are part of a mitochondrial minisatellite region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 915-919.
- [16] Pillay, D. und Pillay, B. (1994) *Schistosoma mansoni*: PCR amplification shows intraspecific variation among geographical isolates. *Exp. Parasitol.* **79**, 57-58.
- [17] Read, A. F. und Viney, M. E. (1996) Helminth immunogenetics: why bother? *Parasitol. Today* **12**, 337-343.
- [18] Kusel, J. R. (1970) The penetration of human epidermal sheets by the cercariae of *Schistosoma mansoni* and the collection of schistosomula. *Parasitology* **60**, 89-96.
- [19] Haas, W. (1998) Host finding - a physiological effect. in *Parasitology in Focus: Facts and Trends* (Mehlhorn, H., Ed.), 454-464, Springer Verlag, Berlin.
- [20] Haas, W. und vandeRoemer, A. (1998) Invasion of the vertebrate skin by cercariae of *Trichobilharzia ocellata*: penetration processes and stimulating host signals. *Parasitol. Res.* **84**, 787-795.
- [21] Samuelson, J. C. und Stein, L. D. (1989) *Schistosoma mansoni*: increasing saline concentration signals cercariae to transform to schistosomula. *Exp. Parasitol.* **69**, 23-29.
- [22] Tchuem Tchuente, L.-A. (1996) Mating behaviour in schistosomes: are paired worms always faithful? *Parasitol. Today* **12**, 231-236.
- [23] Jourdane, J., Imbert-Establet, D. und Tchuente, L. A. T. (1995) Parthenogenesis in Schistosomatidae. *Parasitol. Today* **11**, 427-430.

- [24] Gryseels, B. und de Vlas, S. J. (1996) Worm burdens in schistosome infections. *Parasitol. Today* **12**, 115-117.
- [25] Haas, W., Haberl, B., Kalbe, M. und Körner, M. (1995) Snail-host-finding by miracidia and cercariae: chemical host cues. *Parasitol. Today* **11**, 468-472.
- [26] Kalbe, M., Haberl, B. und Haas, W. (1996) *Schistosoma mansoni* miracidial host-finding: species specificity of an Egyptian strain. *Parasitol. Res.* **82**, 8-13.
- [27] Wikel, S. K. und Bogitsh, B. J. (1974) *Schistosoma mansoni* penetration apparatus and epidermis of the miracidium. *Exp. Parasitol.* **36**, 342-354.
- [28] Chappell, C. L. und Dresden, M. H. (1988) Antibody response to a purified parasite proteinase (SMw32) in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39**, 66-73.
- [29] Ghoneim, H. und Klinkert, M.-Q. (1995) Biochemical properties of purified cathepsin B from *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* **25**, 1515-1519.
- [30] Lipps, G., Füllkrug, R. und Beck, E. (1996) Cathepsin B of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **271**, 1717-1725.
- [31] Michel, A., Ghoneim, H., Resto, M., Klinkert, M.-Q. und Kunz, W. (1995) Sequence, characterization and localization of a cysteine proteinase cathepsin L in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **73**, 7-18.
- [32] Dalton, J. P., Smith, A. M., Clough, K. A. und Brindley, P. J. (1995) Digestion of haemoglobin by schistosomes: 35 years on. *Parasitol. Today* **11**, 299-303.
- [33] Klinkert, M.-Q. und Kunz, W. (1996) Digestion of haemoglobin by schistosomes. *Parasitol. Today* **12**, 165.
- [34] Wasilewski, M. M., Lim, K. C., Phillips, J. und McKerrow, J. H. (1996) Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation *in vitro* and decrease worm burden and egg production *in vivo*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **81**, 179-189.
- [35] MachadoSilva, J. R., PelajoMachado, M., Lenzi, H. L. und Gomes, D. C. (1998) Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **93**, Suppl. 1, 303-307.
- [36] Halton, D. W., Maule, A. G. und Shaw, C. (1997) Trematode Neurobiology. in *Advances in Trematode Biology* (Fried, B., and Graczyk, T. K., Ed.), 345-382, CRC Press, New York.
- [37] Dei-Cas, E., Dhainaut-Courtois, N. und Vernes, A. (1980) Contribution à l'étude du système nerveux des formes adultes et larvaires de *Schistosoma mansoni*. *Annal. de Parasitol.* **55**, 69-86.
- [38] und Fripp, P. J. (1967) Histochemical localization of esterase activity in Schistosomes. *Exp. Parasitol.* **21**, 380-390.
- [39] Gustafsson, M. K. (1987) Immunocytochemical demonstration of neuropeptides and serotonin in the nervous system of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* **74**, 168-174.
- [40] Johnston, C. F., Shaw, C., Halton, D. W. und Fairweather, I. (1990) Confocal scanning laser microscopy and helminth neuroanatomy. *Parasitol. Today* **6**, 305-308.
- [41] Nollen, P. M. (1997) Reproductive physiology and behavior of digenetic trematodes. in *Advances in Trematode Biology* (Fried, B., and Graczyk, T. K., Ed.), 118-147, CRC Press, Boca Raton.
- [42] Smyth, J. D. (1994) 16. Digenea: Schistosomatidae. in *Introduction to Animal Parasitology* (Smyth, J. D., Ed.), 236-253, University Press, Cambridge.
- [43] Hockley, D. J. (1973) Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma*. *Adv. Parasitol.* **11**, 233-305.
- [44] McLaren, D. J. und Hockley, D. J. (1977) Blood flukes have a double outer membrane. *Nature* **269**, 147-149.
- [45] Wilson, R. A. und Barnes, P. E. (1974) The tegument of *Schistosoma mansoni*: observations on the formation, structure and composition of cytoplasmic inclusions in relation to tegument function. *Parasitology* **68**, 239-258.
- [46] Morris, G. P. und Threadgold, L. T. (1968) Ultrastructure of the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **54**, 15-27.
- [47] Cousin, C. E. und Dorsey, C. (1987) An unsheathed biciliated sensory papilla associated with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **73**, 675-677.
- [48] Hong, S.-J., Lee, D.-H., Hong, S.-T., Chai, J.-Y. und Lee, S.-H. (1996) Surface ultrastructure of the cercaria of *Neodiplostomum seoulense* (Trematoda: Neodiplostomidae). *J. Parasitol.* **82**, 837-840.
- [49] Allan, D., Payares, G. und Evans, W. H. (1987) The phospholipid and fatty acid composition of *Schistosoma mansoni* and of its purified tegumental membranes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **23**, 123-128.
- [50] Pappas, P. W. (1975) Membrane transport in helminth parasites: a review. *Exp. Parasitol.* **37**, 469-530.

- [51] Barral, V., This, P., Imbert-Establet, D., Combes, C. und Delseny, M. (1993) Genetic variability and evolution of the *Schistosoma* genome by using random amplified polymorphic DNA markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 211-222.
- [52] Deelder, A. M., van Dam, G. J., Kornelis, D. und Fillié, Y. E. (1996) *Schistosoma*: analysis of monoclonal antibodies reactive with the circulating antigens CAA and CCA. *Parasitology* **112**, 21-35.
- [53] de Jonge, N., Kreamsner, P. G., Krijger, F. W., Schommer, G., Fillié, Y. E., Kornelis, D., van Zeyl, R. J., van Dam, G. J., Feldmeier, H. und Deelder, A. M. (1990) Detection of the schistosome circulating cathodic antigen by enzyme immunoassay using biotinylated monoclonal antibodies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**, 815-818.
- [54] Abdeen, H. H., Attallah, A.-F. M., El-Mohamady, H. I., Harrison, R. A. und Mansour, M. M. (1998) *Schistosoma mansoni*: the circulating cathodic antigen forms an abundant product of 41/42 kDa in the urine of infected patients. *Exp. Parasitol.* **90**, 286-289.
- [55] Attallah, A. M., Ismail, H., El Masry, S. A., Rizk, H., Handousa, A., El Bendary, M., Tabll, A. und Ezzat, F. (1999) Rapid detection of a *Schistosoma mansoni* circulating antigen excreted in urine of infected individuals by using a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 354-357.
- [56] Deelder, A. M. und Kornelis, D. (1980) *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster, and human infections. *Exp. Parasitol.* **50**, 16-32.
- [57] Gryseels, B., Stelma, F., Talla, I., Polman, K., van Dam, G., Sow, S., Diaw, M., Sturrock, R. F., Decam, C., Niang, M. und Deelder, A. M. (1995) Immuno-epidemiology of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in Senegal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **90**, 271-276.
- [58] van Dam, G. J., Bogitsh, B. J., van Zeyl, R. J., Rotmans, J. P. und Deelder, A. M. (1996) *Schistosoma mansoni*: *in vitro* and *in vivo* excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. *J. Parasitol.* **82**, 557-564.
- [59] Ndhlovu, P., Cadman, H., Gundersen, S. G., Vennervald, B., Friis, H., Christensen, N., Mutasa, G., Haagensen, I., Chandiwana, S. K. und Deelder, A. M. (1995) Optimization of the magnetic bead antigen capture enzyme immuno assay for the detection of circulating anodic antigens in mixed *Schistosoma* infections. *Acta Trop.* **59**, 223-235.
- [60] Nourel Din, M. S. A., Kornelis, D., van Zeyl, R. J. M. und Deelder, A. M. (1994) Immunologic characterization of two monoclonal antibodies reactive with repetitive carbohydrate epitopes of circulating *Schistosoma mansoni* egg antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**, 487-498.
- [61] Hassan, M. M., Medhat, A., Makhlof, M. M., Shata, T., Nafeh, M. A., Osman, O. A., Deaf, E. A., Galal, N. und Fouad, Y. M. (1998) Detection of circulating antigens in patients with active *Schistosoma haematobium* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**, 295-301.
- [62] Hassan, M. M., Badawi, M. A. und Strand, M. (1992) Circulating schistosomal antigen in diagnosis and assessment of cure in individuals infected with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46**, 737-744.
- [63] Shaker, Z. A., Kaddah, M. A., Hanallah, S. B. und El Khodary, M. I. (1998) Production of monoclonal antibodies against target schistosomal antigen secreted in the urine of *Schistosoma mansoni*-infected patients. *Int. J. Parasitol.* **28**, 1893-1901.
- [64] Fu, C. und Carter, C. E. (1990) Detection of a circulating antigen in human schistosomiasis japonica using a monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**, 347-351.
- [65] Li, Y. L., Idris, M. A., Corachan, M., Han, J. J., Kirschfink, M. und Ruppel, A. (1996) Circulating antigens in schistosomiasis: detection of 31/32-kDa protein in sera from patients infected with *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, or *S. intercalatum*. *Parasitol. Res.* **82**, 14-18.
- [66] Nash, T. N. und Deelder, A. M. (1985) Comparison of four schistosome excretory-secretory antigens: phenol sulfuric test active peak, cathodic circulating antigen, gut-associated proteoglycan, and circulating anodic antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**, 236-241.
- [67] Attallah, A. M., El Masry, S. A., Ismail, H., Attia, H., Abdel Aziz, M., Shehatta, A. S., Tabll, A., Soltan, A. und El Wassif, A. (1998) Immunochemical purification and characterization of a 74.0-kDa *Schistosoma mansoni* antigen. *J. Parasitol.* **84**, 301-306.
- [68] Yazdanbakhsh, M. und Deelder, A. M. (1998) Advances in schistosomiasis research. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **11**, 541-546.
- [69] ElSayed, L. H., Ghoneim, H., Demian, S. R., ElSayed, M. H., Tawfik, N. M., Sakr, I., AbouBasha, L. M., Renganathan, E., Klinkert, M.-Q. und AbouRawash, N. (1998) Diagnostic significance of *Schistosoma mansoni* proteins Sm31 and Sm32 in human schistosomiasis in an endemic area in Egypt. *Trop. Med. Int. Health* **3**, 721-727.
- [70] Alves-Brito, C. F., Simpson, A. J. G., Bahia-Oliveira, L. M. G., Rabello, A. L. T., Rocha, R. S., Lambertucci, J. R., Gazzinelli, G., Katz, N. und Correa-Oliveira, R. (1992) Analysis of anti-

- keyhole limpet haemocyanin antibody in Brazilians supports its use for the diagnosis of acute schistosomiasis mansoni. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**, 53-56.
- [71] Xue, C. G., Taylor, M. G., Bickle, Q. D., Sacioli und Renaganthan, E. A. (1993) Diagnosis of *Schistosoma haematobium* infection: evaluation of ELISA using keyhole limpet haemocyanin or soluble egg antigen in comparison with detection of eggs or haematuria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**, 654-658.
- [72] Verweij, J. J., Polderman, A. M., Vissert, L. G. und Deelder, A. M. (1995) Measurement of antibody response to keyhole limpet haemocyanin was not adequate for early diagnosis of schistosomiasis in a group of Dutch visitors to Mali. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**, 48-50.
- [73] McLaren, M. L., Lillywhite, J. E., Dunne, D. W. und Doenhoff, M. J. (1981) Serodiagnosis of human *Schistosoma mansoni* infections: enhanced sensitivity and specificity in ELISA using a fraction containing *S. mansoni* egg antigens omega 1 and alpha 1. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**, 72-79.
- [74] Doenhoff, M. J., Butterworth, A. E., Hayes, R. J., Sturrock, R. F., Ouma, J. H., Koech, D. und Prentice, M. (1993) Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using crude and purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**, 42-48.
- [75] Köster, B., Hall, M. R. T. und Strand, M. (1993) *Schistosoma mansoni*: immunoreactivity of human sera with the surface antigen Sm23. *Exp. Parasitol.* **77**, 282-294.
- [76] Ruppel, A., Breternitz, U. und Burger, R. (1987) Diagnostic Mr 31,000 *Schistosoma mansoni* proteins: requirement of infection, but not immunization, and use of the "miniblot" technique for the production of monoclonal antibodies. *J. Helminthol.* **61**, 95-101.
- [77] Dennis, R. D., Baumeister, S., Lauer, G., Richter, R. und Geyer, E. (1996) Neutral glycolipids of *Schistosoma mansoni* as feasible antigens in the detection of schistosomiasis. *Parasitology* **112**, 295-307.
- [78] Mansour, M. A., Ali, P. O., Farid, Z., Simpson, A. J. G. und Woody, J. W. (1989) Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis mansoni by antibody responses to keyhole limpet hemocyanin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41**, 338-344.
- [79] Yuesheng, L., Rabello, A. L. T., Simpson, A. J. G. und Katz, N. (1994) The serological differentiation of acute and chronic *Schistosoma japonicum* infection by ELISA using keyhole limpet haemocyanin as antigen. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**, 249-251.
- [80] Rabello, A. L. T., Garcia, M. M. A., Neto, E. D., Roche, R. S. und Katz, N. (1993) Dot-dye-immunoassay and dot-ELISA for the serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis mansoni using keyhole limpet haemocyanin as antigen. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**, 279-281.
- [81] Halkes, K. M., Lefeber, D. J., Fransen, C. T. M., Kamerling, J. P. und Vliegthart, J. F. G. (1998) Synthesis of the spacer-containing beta-D-GalpNAc-(1->4)-beta-D-GlcpNAc-(1->3)-alpha-D-Galp moiety, representing the non-fucosylated backbone trisaccharide of the glycocalyx glycan of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Carbohydr. Res.* **308**, 329-338.
- [82] Halkes, K. M., Vermeer, H. J., Slaghek, T. M., van Hooft, P. A., Loof, A., Kamerling, J. P. und Vliegthart, J. F. (1998) Preparation of spacer-containing di-, tri-, and tetrasaccharide fragments of the circulating anodic antigen of *Schistosoma mansoni* for diagnostic purposes. *Carbohydr. Res.* **309**, 175-188.
- [83] Meshnick, S. R., Jefford, C. W., Posner, G. H., Avery, M. A. und Peters, W. (1996) Second-generation antimalarial endoperoxides. *Parasitol. Today* **12**, 79-81.
- [84] Meshnick, S. M., Taylor, T. E. und Kamchonwongpaisan, S. (1996) Artemisin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiol. Rev.* **60**, 301-315.
- [85] Fallon, P. G., Tao, L.-F., Ismail, M. M. und Bennett, J. L. (1996) *Schistosoma* resistance to praziquantel: fact or artifact? *Parasitol. Today* **12**, 316-320.
- [86] Fallon, P. G., Sturrock, R. F., Capron, A., Niang, M. und Doenhoff, M. J. (1995) Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**, 61-62.
- [87] Stelma, F. F., Talla, I., Sow, S., Kongs, A., Niang, M., Polman, K., Deelder, A. M. und Gryseels, B. (1995) Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**, 167-170.
- [88] Fallon, P. G. (1998) Schistosome resistance to praziquantel. *Drug Resist. Updates* **1**, 236-241.
- [89] Fallon, P. G. und Doenhoff, M. J. (1994) Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**, 83-88.

- [90] Stelma, F. F., Sall, S., Daff, B., Sow, S., Niang, M. und Gryseels, B. (1997) Oxamniquine cures *Schistosoma mansoni* infection in a focus in which cure rates with praziquantel are unusually low. *J. Infect. Dis.* **176**, 304-307.
- [91] Doenhoff, M. J. (1998) Is schistosomicidal chemotherapy sub-curative? Implications for drug resistance. *Parasitol. Today* **14**, 434-435.
- [92] Davis, A. (1993) Antischistosomal drugs and clinical practice. in *Human Schistosomiasis* (Jordan, P., Webbe, G., and Sturrock, R. F., Ed.), 367-404, CAB International, Wallingford.
- [93] Cioli, D. (1998) Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol. Today* **14**, 418-422.
- [94] Redman, C. A., Robertson, A., Fallon, P. G., Modha, J., Kusel, J. R., Doenhoff, M. J. und Martin, R. J. (1996) Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol. Today* **12**, 14-20.
- [95] Blair, K. L., Bennett, J. L. und Pax, R. A. (1992) Praziquantel: physiological evidence for its site(s) of action in magnesium-paralysed *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **104**, 59-66.
- [96] Brindley, P. J., Strand, M., Norden, A. P. und Sher, A. (1989) Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* **34**, 99-108.
- [97] Brindley, P. J. (1994) Relationships between chemotherapy and immunity in schistosomiasis. *Adv. Parasitol.* **34**, 133-161.
- [98] Brindley, P. J. und Sher, A. (1987) The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J. Immunol.* **139**, 215-220.
- [99] Fallon, P. G. und Doenhoff, M. J. (1995) Active immunization of mice with *Schistosoma mansoni* worm membrane antigens enhances efficacy of praziquantel. *Parasite Immunol.* **17**, 261-268.
- [100] Fallon, P. G., Cooper, R. O., Probert, A. J. und Doenhoff, M. J. (1992) Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitology* **105**, S41-S48.
- [101] Lima, S. F., Viera, L. Q., Harder, A. und Kusel, J. R. (1994) Altered behaviour of carbohydrate-bound molecules and lipids in areas of the tegument of adult *Schistosoma mansoni* worms damaged by praziquantel. *Parasitology* **109**, 469-477.
- [102] Harnett, W. und Kusel, J. R. (1986) Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel *in vitro*. *Parasitology* **93**, 401-405.
- [103] Rousseaux-Prevost, R., Capron, M., Bazin, H. und Capron, A. (1978) IgE in experimental schistosomiasis II. Quantitative determination of specific IgE antibodies against *S. mansoni*: a follow-up study of two strains of infected rats. Correlation with protective immunity. *Immunology* **35**, 33-39.
- [104] El Ridi, R., Ozaki, T. und Kamiya, H. (1998) *Schistosoma mansoni* infection on IgE-producing and IgE-deficient mice. *J. Parasitol.* **84**, 171-174.
- [105] Butterworth, A. E. (1993) Immunology of schistosomiasis. in *Human Schistosomiasis* (Jordan, P., Webbe, G., and Sturrock, R. F., Ed.), 331-366, CAB International, Wallingford.
- [106] Fouad Ahmed, S., Oswald, I. P., Caspar, P., Hieny, S., Keefer, L., Sher, A. und James, S. L. (1996) Developmental differences determine larval susceptibility to nitric oxide-mediated killing in a murine model of vaccination against *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* **65**, 219-226.
- [107] Cioli, D., Liberti, P. und Festucci, A. (1987) Stage-specific schistosome antigens. *Acta Trop.* **44**, Suppl. 12, 70-74.
- [108] Grzych, J. M., Capron, M., Lambert, P. H., Dissous, C., Torres, S. und Capron, A. (1985) An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature* **316**, 74-76.
- [109] Ko, A. I., Dräger, U. C. und Harn, D. A. (1990) A *Schistosoma mansoni* epitope recognized by a protective monoclonal antibody is identical to the stage-specific embryonic antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4159-4163.
- [110] Ko, A. I. und Harn, D. A. (1987) Characterization of protective and non-protective surface membrane carbohydrate epitopes of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **82**, Suppl. 4, 115-119.
- [111] Omer-Ali, P., Smithers, S. R., Bickle, Q., Phillips, S. M., Harn, D. und Simpson, A. J. G. (1988) Analysis of the anti-*Schistosoma mansoni* surface antibody response during murine infection and its potential contribution to protective immunity. *J. Immunol.* **140**, 3273-3279.
- [112] Harn, D. A., Mitsuyama, M. und David, J. R. (1984) *Schistosoma mansoni* anti-egg monoclonal antibodies protect against cercarial challenge *in vivo*. *J. Exp. Med.* **159**, 1371-1387.
- [113] Norden, A. P. und Strand, M. (1984) *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum*: identification of genus- and species-specific antigenic egg glycoproteins. *Exp. Parasitol.* **58**, 333-344.
- [114] Dalton, J. P., Lewis, S. A., Aronstein, W. S. und Strand, M. (1987) *Schistosoma mansoni*: immunogenic glycoproteins of the cercarial glycocalyx. *Exp. Parasitol.* **63**, 215-226.

- [115] Omer-Ali, P., Magee, A. I., Kelly, C. und Simpson, A. J. G. (1986) A major role for carbohydrate epitopes preferentially recognized by chronically infected mice in the determination of *Schistosoma mansoni* schistosomulum surface antigenicity. *J. Immunol.* **137**, 3601-3607.
- [116] Dean, D. A., Mangold, B. L., Harrison, R. A. und Ricciardone, M. D. (1996) Homologous and heterologous protective immunity to Egyptian strains of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* induced by ultraviolet-irradiated cercariae. *Parasite Immunol.* **18**, 403-410.
- [117] Richter, D., Harn, D. A. und Matuschka, F. R. (1995) The irradiated cercariae vaccine model: looking on the bright side of radiation. *Parasitol. Today* **11**, 288-293.
- [118] Richter, D., Reynolds, S. R. und Harn, D. A. (1993) Candidate vaccine antigens that stimulate the cellular immune response of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **151**, 256-265.
- [119] Richter, D., Incani, R. N. und Harn, D. A. (1993) Isotype responses to candidate vaccine antigens in protective sera obtained from mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* **61**, 3003-3011.
- [120] Richter, D., Incani, R. N. und Harn, D. A. (1996) Lacto-N-fucopentaose III (Lewis^x), a target of the antibody response in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* **64**, 1826-1831.
- [121] Sher, A., Hieny, S., James, S. L. und Asofsky, R. (1982) Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. II. Analysis of immunity in hosts deficient in T lymphocytes, B lymphocytes, or complement. *J. Immunol.* **128**, 1880-1884.
- [122] El Ridi, R. (1998) More on the search for a schistosomiasis vaccine. *Parasitol. Today* **14**, 436.
- [123] Amory Soisson, L. M., Masterson, C. P., Tom, T. D., McNally, M. T., Lowell, G. H. und Strand, M. (1992) Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J. Immunol.* **149**, 3612-3620.
- [124] Gustavson, S., Correa-Oliveira, S., Alves, J. B. und Goes, A. M. (1998) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection by antigens purified from PIII, a fraction of adult worm, associated to the downregulation of granuloma formation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **93**, Suppl.1, 191-196.
- [125] Inal, J. und Bickle, Q. (1995) Sequence and immunogenicity of the 23-kDa transmembrane antigen of *Schistosoma haematobium*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **74**, 217-221.
- [126] Ferreira, C. C., Santoro, M. M. und Goes, A. M. (1998) Protective immunity induced in mice by F8.1 and F8.2 antigens purified from *Schistosoma mansoni* eggs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **93**, Suppl. 1, 185-189.
- [127] Darani, H. Y., Curtis, R. H. C., McNeice, C., Price, H. P., Sayers, J. R. und Doenhoff, M. J. (1997) *Schistosoma mansoni*: anomalous immunogenic properties of a 27 kDa larval serine protease associated with protective immunity. *Parasitology* **115**, 237-247.
- [128] Reynolds, S. R., Dahl, C. E. und Harn, D. A. (1994) T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase. *J. Immunol.* **152**, 193-200.
- [129] Bashir, M., Bushara, H., Cook, L., Fuhui, S., He, D., Huggins, M., Jiaojiao, L., Malik, K., Moloney, A., Mukhtar, M., Ping, Y., Shoutai, X., Taylor, M. und Yaochuan, S. (1994) Evaluation of defined antigen vaccines against *Schistosoma bovis* and *S. japonicum* in bovines. *Trop. Geogr. Med.* **46**, 255-258.
- [130] TarrabHazardai, R., Schechtman, D. und Arnon, R. (1998) Synthesis and characterization of a protective peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* **66**, 4526-4530.
- [131] Grezel, D., Capron, M., Grzych, J.-M., Fontaine, J., Lecocq, J.-P. und Capron, A. (1993) Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur. J. Immunol.* **23**, 454-460.
- [132] Webster, M., Fulford, A. J. C., Braun, G., Curtis Kariuki, H., Havercoft, J. C., Gachuhi, K., Sturrock, R. F., Butterworth, A. E. und Dunne, D. W. (1996) Human immunoglobulin E responses to a recombinant 22.6 kilodalton antigen from *Schistosoma mansoni* adult worms are associated with low intensities of reinfection after treatment. *Infect. Immun.* **64**, 4042-4046.
- [133] Bergquist, N. R. (1995) Controlling schistosomiasis by vaccination: a realistic option? *Parasitol. Today* **11**, 191-194.
- [134] Capron, A., Dessaint, J. P., Capron, M., Ouma, J. H. und Butterworth, A. E. (1987) Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. *Science* **238**, 1065-1072.
- [135] Butterworth, A. E. (1988) Control of schistosomiasis in man. in *The Biology of Parasitism*, 43-59, Alan R. Liss, New York.
- [136] Doenhoff, M. J. (1998) A vaccine for schistosomiasis: alternative approaches. *Parasitol. Today* **14**, 105-109.

- [137] Abath, F. G. C., Montenegro, S. M. L. und Gomes, Y. M. (1998) Vaccines against human parasitic diseases: an overview. *Acta Trop.* **71**, 237-254.
- [138] Bergquist, N. R. (1998) Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **93**, Suppl. 1, 95-101.
- [139] Capron, A. (1998) Schistosomiasis: forty years' war on the worm. *Parasitol. Today* **14**, 379-384.
- [140] Lardans, V. und Dissous, C. (1998) Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission. *Parasitol. Today* **14**, 413-417.
- [141] Hamburger, J., Weil, M., Turetzky, T., Ouma, J. H., Koech, D. K., Klumpp, R., Siongok, T. K. und Sturrock, R. F. (1989) Identification of snails infected with schistosomes by ELISA employing monoclonal antibodies: *Schistosoma mansoni* in laboratory snails (*Biomphalaria glabrata*) and in field snails (*Biomphalaria pfeifferi*) from Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**, 613-619.
- [142] Hamburger, J., He, N., Xin, X. Y., Ramzy, R. M., Jourdane, J. und Ruppel, A. (1998) A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**, 872-876.
- [143] Hamburger, J., Xu, Y. X., Ramzy, R. M., Jourdane, J. und Ruppel, A. (1998) Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**, 468-473.
- [144] Hamburger, J., Turetski, T., Kapeller, I. und Deresiewicz, R. (1991) Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. *Mol. Biochem. Parasitol.* **44**, 73-80.
- [145] Perrett, S. und Whitfield, P. J. (1996) Currently available molluscicides. *Parasitol. Today* **12**, 156-159.
- [146] Tielens, A. G. M. und van den Bergh, S. G. (1989) Carbohydrate metabolism in adult schistosomes of different strains and species. *Int. J. Parasitol.* **19**, 447-449.
- [147] Tielens, A. G. M., Horemans, A. M. C., Dunnewijk, R., van der Meer, P. und van den Bergh, S. G. (1992) The facultative anaerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**, 49-58.
- [148] Tielens, A. G. M. (1994) Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol. Today* **10**, 346-351.
- [149] Skelly, P. J., Tielens, A. G. M. und Shoemaker, C. B. (1998) Glucose transport and metabolism in mammalian-stage schistosomes. *Parasitol. Today* **14**, 402-406.
- [150] Haseeb, M. A., Fried, B. und Eveland, L. K. (1986) Histochemical and thin-layer chromatographic analyses of neutral lipids in *Schistosoma japonicum* adults and their worm-free incubates [published erratum appears in *Int. J. Parasitol.* 1986 Dec;16(6):665]. *Int. J. Parasitol.* **16**, 231-236.
- [151] Golan, D. E., Brown, C. S., Cianci, C. M., Furlong, S. T. und Caulfield, J. P. (1986) Schistosomula of *Schistosoma mansoni* use lysophosphatidylcholine to lyse adherent human red blood cells and immobilize red cell membrane components. *J. Cell Biol.* **103**, 819-828.
- [152] Chen, G.-Z. und Bennet, J. L. (1993) Characterization of mevalonate-labeled lipids isolated from parasite proteins in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 287-292.
- [153] Brouwers, J. F. H. M., Smeenk, I. M. B., van Golde, L. M. G. und Tielens, A. G. M. (1997) The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **88**, 175-185.
- [154] Brouwers, J. F. H. M., Van Hellemond, J. J., van Golde, L. M. G. und Tielens, A. G. M. (1998) Ether lipids and their possible physiological function in adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **96**, 49-58.
- [155] Gobert, G. N., Stenzel, D. J., Jones, M. K. und McManus, D. P. (1997) Immunolocalisation of the fatty acid-binding protein Sj-FABPc within adult *Schistosoma japonicum*. *Parasitology* **115**, 33-39.
- [156] Hara, I., Hara, S., Salafsky, B. und Shibuya, T. (1993) *Schistosoma mansoni*: fatty acid-induced cercarial tail loss does not involve eicosanoid production and chemoreceptors. *Exp. Parasitol.* **77**, 484-488.
- [157] Smith, T. M., Brooks, T. J. und White, H. B. (1966) Thin-layer and gas-liquid chromatographic analysis of lipid from cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **15**, 307-313.
- [158] Smith, T. M., Brooks, T. J. und White, H. B. (1969) Fatty acid composition of adult *Schistosoma mansoni*. *Lipids* **4**, 31-36.
- [159] Baset, H. A., O'Neill, G. P. und Ford-Hutchinson, A. W. (1995) Characterization of arachidonic acid-metabolizing enzymes on adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **73**, 31-41.
- [160] Furlong, S. T., Thibault, K. S. und Rogers, R. A. (1992) Fluorescent phospholipids preferentially accumulate in sub-tegumental cells of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Cell Sci.* **103**, 823-830.
- [161] Furlong, S. T. und Caulfield, J. P. (1988) *Schistosoma mansoni*: sterol and phospholipid composition of cercariae, schistosomula, and adults. *Exp. Parasitol.* **65**, 222-231.

- [162] Furlong, S. T. und Caulfield, J. P. (1989) *Schistosoma mansoni*: synthesis and release of phospholipids, lysophospholipids, and neutral lipids by schistosomula. *Exp. Parasitol.* **69**, 65-77.
- [163] Parra, J. F. C., Franca, R. C. S., Kusel, J. R., Gomez, M. V., Figueiredo, E. A. und Mota-Santos, T. A. (1986) *Schistosoma mansoni*: phospholipid methylation and the escape of schistosomula from *in vitro* cytotoxic reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* **21**, 151-159.
- [164] Redman, C. A., Kennington, S., Spathopoulou, T. und Kusel, J. R. (1997) Interconversion of sphingomyelin and ceramide in adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **90**, 145-153.
- [165] Rogers, M. V. und McLaren, D. J. (1987) Analysis of total and surface membrane lipids of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **22**, 273-288.
- [166] Rogers, R. A., Jack, R. M. und Furlong, S. T. (1993) Lipid and membrane protein transfer from human neutrophils to schistosomes is mediated by ligand binding. *J. Cell Sci.* **106**, 485-492.
- [167] Wiest, P. M., Li, Y., Burnham, D. C., Olds, G. R. und Bowen, W. D. (1992) *Schistosoma mansoni*: characterization of phosphoinositide response. *Exp. Parasitol.* **74**, 38-45.
- [168] Belley, A. und Chadee, K. (1995) Eicosanoid production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation? *Parasitol. Today* **11**, 327-334.
- [169] Billecocq, A. (1987) Protection by phospholipids of *Schistosoma mansoni* schistosomula against the action of cytotoxic antibodies and complement. *Mol. Biochem. Parasitol.* **25**, 133-142.
- [170] Furlong, S. T. (1991) Unique roles for lipids in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Today* **7**, 59-62.
- [171] Blanton, R. E. und Licate, L. S. (1992) Developmental regulation of protein synthesis in schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**, 201-208.
- [172] Bouchon, B., Jaquinod, M., Klarskov, K., Trottein, F., Klein, M., Dorsselaer, A. V., Bischoff, R. und Roitsch, C. (1994) Analysis of the primary structure and post-translational modifications of the *Schistosoma mansoni* antigen Smp28 by electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **662**, 279-290.
- [173] Ancelin, M. L., Torpier, G., Vial, H. J. und Capron, A. (1987) Choline incorporation by *Schistosoma mansoni*: distribution of choline metabolites during development and after sexual differentiation. *J. Parasitol.* **73**, 530-535.
- [174] Jiang, J., Skelly, P. J., Shoemaker, C. B. und Caulfield, J. P. (1996) *Schistosoma mansoni*: the glucose transport protein SGP4 is present in tegumental multilamellar bodies, discoid bodies, and the surface lipid bilayers. *Exp. Parasitol.* **82**, 201-210.
- [175] Nyame, K., Cummings, R. D. und Damian, R. T. (1987) *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing terminal *O*-linked *N*-acetylglucosamine residues. *J. Biol. Chem.* **262**, 7990-7995.
- [176] Nyame, K., Cummings, R. D. und Damian, R. T. (1988) Characterization of the *N*- and *O*-linked oligosaccharides in glycoproteins synthesized by *Schistosoma mansoni* schistosomula. *J. Parasitol.* **74**, 562-572.
- [177] Nyame, K., Cummings, R. D. und Damian, R. T. (1988) Characterization of the high mannose asparagine-linked oligosaccharides synthesized by *Schistosoma mansoni* adult male worms. *Mol. Biochem. Parasitol.* **28**, 265-274.
- [178] Nyame, K., Smith, D. F., Damian, R. T. und Cummings, R. D. (1989) Complex-type asparagine-linked oligosaccharides in glycoproteins synthesized by *Schistosoma mansoni* adult males contain terminal β -linked *N*-acetylgalactosamine. *J. Biol. Chem.* **264**, 3235-3243.
- [179] Srivatsan, J., Smith, D. F. und Cummings, R. D. (1992) The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing the Lewis X antigen. *J. Biol. Chem.* **267**, 20196-20203.
- [180] Khoo, K. H., Chatterjee, D., Caulfield, J. P., Morris, H. R. und Dell, A. (1997) Structural mapping of the glycans from the egg glycoproteins of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*: identification of novel core structures and terminal sequences. *Glycobiology* **7**, 663-677.
- [181] Simpson, A. J. G. und Smithers, S. R. (1980) Characterization of the exposed carbohydrates on the surface membrane of adult *Schistosoma mansoni* by analysis of lectin binding. *Parasitology* **81**, 1-15.
- [182] Bhattacharyya, L., Fant, J., Lonn, H. und Brewer, C. F. (1990) Binding and precipitating activities of Lotus tetragonolobus isolectins with L-fucosyl oligosaccharides. Formation of unique homogeneous cross-linked lattices observed by electron microscopy. *Biochemistry* **29**, 7523-7530.
- [183] MacGregor, A. N., Stott, D. I. und Kusel, J. R. (1985) Lectin binding to glycoproteins in the surface membrane of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **16**, 163-172.
- [184] Hayunga, E. G. und Sumner, M. P. (1986) Characterization of surface glycoproteins on *Schistosoma mansoni* adult worms by lectin affinity chromatography. *J. Parasitol.* **72**, 283-291.
- [185] Schmidt, J. (1995) Glycans with *N*-acetylglucosamine type 2-like residues covering adult *Schistosoma mansoni*, and glycomimesis as a putative mechanism of immune evasion. *Parasitology* **111**, 325-336.

- [186] Johnston, L. A. und Yoshino, T. P. (1996) Analysis of lectin- and snail plasma-binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **112**, 469-479.
- [187] Nanduri, J., Dennis, J. E., Rosenberry, T. L., Mahmoud, A. A. und Tartakoff, A. M. (1991) Glycocalyx of bodies versus tails of *Schistosoma mansoni* cercariae. Lectin-binding, size, charge, and electron microscopic characterization. *J. Biol. Chem.* **266**, 1341-1347.
- [188] Hart, G. W., Haltiwanger, R. S., Holt, G. D. und Kelly, W. G. (1989) Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 841-874.
- [189] Hart, G. W. (1997) Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 315-335.
- [190] van Dam, G. J., Bergwerff, A. A., Thomas-Oates, J. E., Rotmans, J. P., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. und Deelder, A. M. (1994) The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis x as repeating unit. *Eur. J. Biochem.* **225**, 467-482.
- [191] Bergwerff, A. A., van Dam, G. J., Rotmans, J. P., Deelder, A. M., Kamerling, J. P. und Vliegthart, J. F. G. (1994) The immunologically reactive part of immunopurified circulating anodic antigen from *Schistosoma mansoni* is a threonine-linked polysaccharide consisting of -6)-(β -D-GlcpA-(1-3))- β -D-GalpNAc-(1- repeating units. *J. Biol. Chem.* **269**, 31510-31517.
- [192] Caulfield, J. P., Yuan, H. C., Cianci, C. M. und Hein, A. (1988) *Schistosoma mansoni*: development of the cercarial glycocalyx. *Exp. Parasitol.* **65**, 10-19.
- [193] Caulfield, J. P., Cianci, C. M., McDiarmid, S. S., Suyemitsu, T. und Schmid, K. (1987) Ultrastructure, carbohydrate, and amino acid analysis of two preparations of the cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **73**, 514-522.
- [194] Xu, X., Stack, R. J., Rao, N. und Caulfield, J. P. (1994) *Schistosoma mansoni*: fractionation and characterization of the glycocalyx and glycogen-like material from cercariae. *Exp. Parasitol.* **79**, 399-409.
- [195] Samuelson, J. C. und Caulfield, J. P. (1985) The cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *J. Cell Biol.* **100**, 1423-1434.
- [196] Khoo, K. H., Sarda, S., Xu, X., Caulfield, J. P., McNeil, M. R., Homans, S. W., Morris, H. R. und Dell, A. (1995) A unique multifucosylated -3GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3Gal α 1- motif constitutes the repeating unit of the complex O-glycans derived from the cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **270**, 17114-17123.
- [197] Tomiya, N., Awaya, J., Kurono, M., Hanzawa, H., Shimada, I., Arata, Y., Yoshida, T. und Takahashi, N. (1993) Structural elucidation of a variety of GalNAc-containing N-linked oligosaccharides from human urinary kallidinogenase. *J. Biol. Chem.* **268**, 113-126.
- [198] Srivatsan, J., Smith, D. F. und Cummings, R. D. (1992) *Schistosoma mansoni* synthesizes novel biantennary Asn-linked oligosaccharides containing terminal β -linked N-acetylgalactosamine. *Glycobiology* **2**, 445-452.
- [199] Kang, S., Cummings, R. D. und McCall, J. W. (1993) Characterization of the N-linked oligosaccharides in glycoproteins synthesized by microfilariae of *Dirofilaria immitis*. *J. Parasitol.* **79**, 815-828.
- [200] Makaanu, C. K., Damian, R. T., Smith, D. F. und Cummings, R. D. (1992) The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes a novel type of glycosphingolipid. *J. Biol. Chem.* **267**, 2251-2257.
- [201] Schnaar, R. L. (1994) Isolation of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* **230**, 348-370.
- [202] Schnaar, R. L. und Needham, L. K. (1994) Thin-layer chromatography of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* **230**, 371-389.
- [203] Itasaka, O., Sugita, M., Yoshizaki, H. und Hori, T. (1976) Determination of the anomeric configurations of *Corbicula* ceramide di- and trihexoside by chromium trioxide oxidation. *J. Biochem.* **80**, 935-936.
- [204] Wiegandt, H. (1992) Insect glycolipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1123**, 117-126.
- [205] Dennis, R. D., Geyer, R., Egge, H., Menges, H., Stirm, S. und Wiegandt, H. (1985) Glycosphingolipids in insects: chemical structures of ceramide monosaccharide, disaccharide and trisaccharide from pupae of *Calliphora vicina*. (Insecta: Diptera). *Eur. J. Biochem.* **146**, 51-58.
- [206] Dennis, R. D., Geyer, R., Egge, H., Peter-Katalinic, J., Li, S.-C., Stirm, S. und Wiegandt, H. (1985) Glycosphingolipids in insects. chemical structures of ceramide tetra-, penta-, hexa-, and heptasaccharides from *Calliphora vicina* pupae (Insecta: Diptera). *J. Biol. Chem.* **260**, 5370-5375.
- [207] Dennis, R. D., Geyer, R., Egge, H., Peter-Katalinic, J., Keller, M., Menges, H. und Wiegandt, H. (1987) Insects: animals without gangliosides - preliminary data. in *Gangliosides and Modulation of Neuronal Function* (Rahmann, H., Ed.) **H7**, 351-358, Springer Verlag, Berlin.

- [208] Dennis, R. D. und Wiegandt, H. (1993) Glycosphingolipids of the invertebrata as exemplified by a cestode platyhelminth, *Taenia crassiceps*, and a dipteran insect, *Calliphora vicina*. *Adv. Lipid Res.* **26**, 321-351.
- [209] Persat, F., Bouhours, J.-F., Mojon, M. und Petavy, A.-F. (1992) Glycosphingolipids with Gal β 1-6Gal sequences in metacestodes of the parasite *Echinococcus multilocularis*. *J. Biol. Chem.* **267**, 8764-8769.
- [210] Dennis, R. D., Baumeister, S., Geyer, R., Peter-Katalinic, J., Hartmann, R., Egge, H., Geyer, E. und Wiegandt, H. (1992) Glycosphingolipids in cestodes - Chemical structures of ceramide mono-saccharide, disaccharide, trisaccharide and tetrasaccharide from metacestodes of the fox tapeworm, *Taenia crassiceps* (Cestoda: Cyclophyllidae). *Eur. J. Biochem.* **207**, 1053-1062.
- [211] Kawakami, Y., Nakamura, K., Kojima, H., Suzuki, M., Inagaki, F., Suzuki, A., Ikuta, J., Uchida, A., Murata, Y. und Tamai, Y. (1996) A novel fucosyltetrahexosylceramide in plerocercoids of the parasite *Spirometra erinacei*. *Eur. J. Biochem.* **239**, 905-911.
- [212] Weiss, J. B., Magnani, J. L. und Strand, M. (1986) Identification of *Schistosoma mansoni* glycolipids that share immunogenic carbohydrate epitopes with glycoproteins. *J. Immunol.* **136**, 4275-4282.
- [213] Weiss, J. B. und Strand, M. (1985) Characterization of developmentally regulated epitopes of *Schistosoma mansoni* egg glycoprotein antigens. *J. Immunol.* **135**, 1421-1429.
- [214] Lavery, S. B., Weiss, J. B., Salyan, M. E. K., Roberts, C. E., Hakomori, S., Magnani, J. L. und Strand, M. (1992) Characterization of a series of novel fucose-containing glycosphingolipid immunogens from eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **267**, 5542-5551.
- [215] Khoo, K. H., Chatterjee, D., Caulfield, J. P., Morris, H. R. und Dell, A. (1997) Structural characterization of glycosphingolipids from the eggs of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Glycobiology* **7**, 653-661.
- [216] Köster, B. und Strand, M. (1994) *Schistosoma mansoni*: immunolocalization of two different fucose-containing carbohydrate epitopes. *Parasitology* **108**, 433-446.
- [217] Samuelson, J. C. und Caulfield, J. P. (1982) Loss of covalently labeled glycoproteins and glycolipids from the surface of newly transformed schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Cell Biol.* **94**, 363-369.
- [218] Hakomori, S. (1981) Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 733-764.
- [219] Hakomori, S. (1992) Le(X) and related structures as adhesion molecules. *Histochem. J.* **24**, 771-776.
- [220] Eggens, I., Fenderson, B., Toyokuni, T., Dean, B., Stroud, M. und Hakomori, S. (1989) Specific interaction between Le^x and Le^x determinants. A possible basis for cell recognition in preimplantation embryos and in embryonal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 9476-9484.
- [221] Hakomori, S. und Igarashi, Y. (1995) Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J. Biochem.* **118**, 1091-1103.
- [222] Hakomori, S. und Kannagi, R. (1986) Carbohydrate antigens in higher animals. in *Handbook of Experimental Immunology* (Weir, D. M., Ed.) **1**, 9.1-9.39, Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- [223] Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S. und Prinetti, A. (1998) New insights in glycosphingolipid function: "glycosignaling domain", a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules, involved in cell adhesion coupled with signaling. *Glycobiology* **8**, XI-XIX.
- [224] Symington, F. W., Hedges, D. L. und Hakomori, S. (1985) Glycolipid antigens of human polymorphonuclear neutrophils and the inducible HL-60 myeloid leukemia line. *J. Immunol.* **134**, 2498-2506.
- [225] Hakomori, S. (1998) Cancer-associated glycosphingolipid antigens: their structure, organization, and function. *Acta Anat.* **161**, 79-90.
- [226] Hakomori, S., Nudelman, E., Lavery, S. B. und Kannagi, R. (1984) Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. I. Glycolipids with di- or trifucosylated type 2 chain. *J. Biol. Chem.* **259**, 4672-4680.
- [227] Singhal, A. K., Oerntoft, T. F., Nudelman, E., Nance, S., Schibig, L., Stroud, M. R., Clausen, H. und Hakomori, S. (1990) Profiles of Lewis^x-containing glycoproteins and glycolipids in sera of patients with adenocarcinoma. *Cancer Res.* **50**, 1375-1380.
- [228] Beckmann, E. M., Porcelli, S. A., Morita, C. T., Behar, S. M., Furion, S. T. und Brenner, M. B. (1994) Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted $\alpha\beta^+$ T cells. *Nature* **372**, 691-694.
- [229] Sieling, P. A., Chatterjee, D., Porcelli, S. A., Prigozy, T. I., Mazzaccaro, R. J., Soriano, T., Bloom, B. R., Brenner, M. B., Kronenberg, M., Brennan, P. J. und Modlin, R. L. (1995) CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* **269**, 227-230.

- [230] Burdin, N., Brossay, L., Koezuka, Y., Smiley, S. T., Grusby, M. J., Gui, M., Taniguchi, M., Hayakawa, K. und Kronenberg, M. (1998) Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. *J. Immunol.* **161**, 3271-3281.
- [231] Grant, E. P., Degano, M., Rosat, J. P., Stenger, S., Modlin, R. L., Wilson, I. A., Porcelli, S. A. und Brenner, M. B. (1999) Molecular recognition of lipid antigens by T cell receptors. *J. Exp. Med.* **189**, 195-205.
- [232] Porcelli, S. A., Morita, C. T. und Modin, R. L. (1996) T-cell recognition of non-peptide antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 510-516.
- [233] Porcelli, S. A., Segelke, B. W., Sugita, M., Wilson, I. A. und Brenner, M. B. (1998) The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. *Immunol. Today* **19**, 362-368.
- [234] Kannagi, R., Nudelman, E. und Hakomori, S. (1982) Possible role of ceramide in defining structure and function of membrane glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3470-3474.
- [235] Kolesnick, R. und Golde, D. W. (1994) The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* **77**, 325-328.
- [236] Ballou, L. R., Chao, C. P., Holness, M. A., Barker, S. C. und Raghow, R. (1992) Interleukin-1-mediated PGE2 production and sphingomyelin metabolism. *J. Biol. Chem.* **267**, 20044-20050.
- [237] Ballou, L. R., Laulederkin, S. J. F., Rosloniec, E. F. und Raghow, R. (1996) Ceramide signalling and the immune response. *Biochim. Biophys. Acta* **1301**, 273-287.
- [238] Serhan, C. N., Haeggström, J. Z. und Leslie, C. C. (1996) Lipid mediator networks in cell signalling: update and impact of cytokines. *FASEB J.* **10**, 1147-1158.
- [239] Spiegel, S., Foster, D. und Kolesnick, R. (1996) Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 159-167.
- [240] Spiegel, S. und A. H. Merrill, J. (1996) Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.* **10**, 1388-1397.
- [241] Hannun, Y. A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**, 1855-1859.
- [242] Pushkareva, M., Ebeid, L. M. und Hannun, Y. A. (1995) Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunol. Today* **16**, 294-297.
- [243] Tanaka Hall, T. M., Joseph, G. T. und Strand, M. (1995) *Schistosoma mansoni*: molecular cloning and sequencing of the 200 kDa chemotherapeutic target antigen. *Exp. Parasitol.* **80**, 242-249.
- [244] Espinoza, B., Tarrab-Hazdai, R., Silman, I. und Arnon, R. (1988) Acetylcholinesterase in *Schistosoma mansoni* is anchored to the membrane via covalently attached phosphatidylinositol. *Mol. Biochem. Parasitol.* **29**, 171-179.
- [245] Sauma, S. Y. und Strand, M. (1990) Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**, 199-210.
- [246] Sauma, S. Y., Tanaka, T. M. und Strand, M. (1991) Selective release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored antigen from the surface of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**, 73-80.
- [247] Camacho, M., Tarrab-Hazdai, R., Espinoza, B., Arnon, R. und Agnew, A. (1994) The amount of acetylcholine esterase on the parasite surface reflects the differential sensitivity of schistosome species to metrifonate. *Parasitology* **108**, 153-160.
- [248] Nosjean, O., Briolay, A. und Roux, B. (1997) Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1331**, 153-186.
- [249] Brown, D. A. und Rose, J. K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544.
- [250] Hawn, T. R. und Strand, M. (1993) Detection and partial characterization of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase activities from *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 73-82.
- [251] Redman, C. A., Schneider, P., Mehlert, A. und Ferguson, M. A. J. (1995) The glycoinositol-phospholipids of *Phytomonas*. *Biochem. J.* **311**, 495-503.
- [252] Costello, C. E., Glushka, J., van Halbeek, H. und Singh, B. N. (1993) Structural characterization of novel inositol phosphosphingolipids of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Glycobiology* **3**, 261-269.
- [253] Xavier da Silveira, E., Jones, C., Wait, R., Previato, J. O. und Mendonca-Previato, L. (1998) Glycoinositol phospholipids from *Endotrypanum* species express epitopes in common with saccharide side chains of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *Biochem. J.* **329**, 665-673.
- [254] Uhrig, M. L., Couto, A. S., Colli, W. und de Lederkremer, R. M. (1996) Characterization of inositolphospholipids in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms. *Biochim. Biophys. Acta* **1300**, 233-239.

- [255] Winter, G., Fuchs, M., Conville, M. J. M., Stierhof, Y.-D. und Overath, P. (1994) Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. *J. Cell Sci.* **107**, 2471-2482.
- [256] DeBose-Boyd, R., Nyame, A. K. und Cummings, R. D. (1996) *Schistosoma mansoni*: characterization of an α 1-3 fucosyltransferase in adult parasites. *Exp. Parasitol.* **82**, 1-10.
- [257] Neeleman, A. P., van der Knaap, W. P. W. und van den Eijnden, D. H. (1994) Identification and characterization of a UDP-GalNAc:GlcNAc β -R β 1-4-N-acetylgalactosaminyltransferase from cercariae of the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Catalysis of a keystone in the synthesis of N,N'-diacetyllactosedi amino (lacdiNAc)-type glycans. *Glycobiology* **4**, 641-651.
- [258] Neeleman, A. P. und van den Eijnden, D. H. (1996) α -Lactalbumin affects the acceptor specificity of *Lymnaea stagnalis* albumen gland UDP-GalNAc:GlcNAc β -R β 1-4-N-acetylgalactosaminyltransferase: synthesis of GalNAc β 1-4Glc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10111-10116.
- [259] Rivera-Marrero, C. A. und Cummings, R. D. (1990) *Schistosoma mansoni* contains a galactosyltransferase activity distinct from that typically found in mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **43**, 59-67.
- [260] Rumjanek, F. D. und Smithers, S. R. (1978) Mannosyl transferase activity in homogenates of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **77**, 75-86.
- [261] Rumjanek, F. D., Broomfield, K. E. und Smithers, S. R. (1979) *Schistosoma mansoni*: glycosyl transferase activity and the carbohydrate composition of the tegument. *Exp. Parasitol.* **47**, 24-35.
- [262] Marques, E. T. A., Weiss, J. B. und Strand, M. (1998) Molecular characterization of a fucosyltransferase encoded by *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **93**, 237-250.
- [263] Gomes, N. A., Previato, J. O., Zingales, B., Previatop, L. M. und DosReis, G. A. (1996) Down-regulation of T lymphocyte activation *in vitro* and *in vivo* induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* **156**, 628-635.
- [264] Nash, T. E., Lunde, M. N. und Cheever, A. W. (1981) Analysis and antigenic activity of a carbohydrate fraction derived from adult *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **126**, 805-810.
- [265] Aronstein, W. S., Norden, A. P. und Strand, M. (1983) Tegumental expression in larval and adult stages of a major schistosome structural glycoprotein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**, 334-342.
- [266] Hussein, A. H., Kaddah, M. A., Hamadto, H. H., El-Hayawan, I. A., Strickland, P. T., Abubaker, S. und Schiff, C. J. (1997) *Schistosoma mansoni*: The immune response against cercarial glycocalyx. *J. Parasitol.* **83** (3), 424-429.
- [267] Brunet, L. R., Dunne, D. W. und Pearce, E. J. (1998) Cytokine interaction and immune responses during *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol. Today* **14**, 422-427.
- [268] Kaplan, M. H., Whitfield, J. R., Boros, D. L. und Grusby, M. J. (1998) Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response. *J. Immunol.* **160**, 1850-1856.
- [269] McKerrow, J. H. (1997) Cytokine induction and exploitation in schistosome infections. *Parasitology* **115**, S107-112.
- [270] Moyes, R. B., Alves-Oliveira, L. F., Parra, J. C., Gazzinelli, G. und Doughty, B. L. (1996) HPLC fractionated soluble egg antigen from *Schistosoma mansoni* elicits a heterogeneous human immune response. *Parasite Immunol.* **18**, 625-633.
- [271] Wynn, T. A., Reynolds, A., James, S., Cheever, A. W., Caspar, P., Hieny, S., Jankovic, D., Strand, M. und Sher, A. (1996) IL-12 enhances vaccine-induced immunity to schistosomes by augmenting both humoral and cell-mediated immune responses against the parasite. *J. Immunol.* **157**, 4068-4078.
- [272] Dunne, D. W., Bickle, Q. D., Butterworth, A. E. und Richardson, B. A. (1987) The blocking of human antibody-dependent, eosinophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by monoclonal antibodies which cross-react with a polysaccharide-containing egg antigen. *Parasitology* **94**, 269-280.
- [273] Grzych, J. M., Capron, M., Bazin, H. und Capron, A. (1982) *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*Schistosoma mansoni* antibodies. *J. Immunol.* **129**, 2739-2743.
- [274] Horak, P., Kovar, L., Kolarova, L. und Nebesarova, J. (1998) Cercaria-schistosomulum surface transformation of *Trichobilharzia szidati* and its putative immunological impact. *Parasitology* **116**, 139-147.
- [275] Harn, D. A., Cianci, C. M. und Caulfield, J. P. (1989) *Schistosoma mansoni* immunization with cercarial glycocalyx preparation increases the adult worm burden. *Exp. Parasitol.* **68**, 108-110.
- [276] Chiang, C. P. und Caulfield, J. P. (1988) *Schistosoma mansoni*: ultrastructural demonstration of a miracidial glycocalyx that cross-reacts with antibodies raised against the cercarial glycocalyx. *Exp. Parasitol.* **67**, 63-72.

- [277] Yi, X., Omer-Ali, P., Kelly, C., Simpson, A. J. G. und Smithers, S. R. (1986) IgM antibodies recognizing carbohydrate epitopes shared between schistosomula and miracidia of *Schistosoma mansoni* that block *in vitro* killing. *J. Immunol.* **137**, 3946-3954.
- [278] Yoshino, T. P. und Bayne, C. J. (1983) Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* **5**, 317-328.
- [279] Foley, M., Kusel, J. R. und Garland, P. B. (1988) Changes in organization of the surface membrane upon transformation of cercariae to schistosomula of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **96**, 85-97.
- [280] Langley, J. G. und Dunne, D. W. (1992) Temporal variation in the carbohydrate and peptide surface epitopes in antibody-dependent, eosinophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunol.* **14**, 185-200.
- [281] Gilbert, B., Rosa, M. N. D. und Borojevic, R. (1972) *Schistosoma mansoni*: *in vitro* transformation of cercariae into schistosomula. *Parasitology* **64**, 333-339.
- [282] Dissous, C. und Capron, A. (1981) Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.* **3**, 215-225.
- [283] Payares, G., McLaren, D. J., Evans, W. H. und Smithers, S. R. (1985) Changes in the surface antigen profile of *Schistosoma mansoni* during maturation from cercaria to adult worm. *Parasitology* **91**, 83-99.
- [284] Payares, G. und Simpson, A. J. G. (1985) *Schistosoma mansoni* surface glycoproteins. Analysis of their expression and antigenicity. *Eur. J. Biochem.* **153**, 195-201.
- [285] Aronstein, W. S. und Strand, M. (1983) Lung-stage expression of a major schistosome surface antigen. *J. Parasitol.* **69**, 1027-1032.
- [286] Trottein, F., Nutten, S., Papin, J. P., Lepoertier, C., Poulain-Godefroy, O., Capron, A. und Capron, M. (1997) Role of adhesion molecules of the selectin-carbohydrate families in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to schistosome targets. *J. Immunol.* **159**, 804-811.
- [287] Tanaka, T. M., Skubitz, A. P. N. und Strand, M. (1993) *Schistosoma*: a 200-kDa chemotherapeutic target antigen is differentially localized in African vs Oriental species. *Exp. Parasitol.* **76**, 293-301.
- [288] Aronstein, W. S., Dalton, J. P. und Strand, M. (1985) A *Schistosoma mansoni* surface glycoprotein cross-reactive with a T1 antigen of *Fasciola hepatica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**, 889-897.
- [289] Aronstein, W. S., Dalton, J. P., Weiss, J. B. und Strand, M. (1985) Identification and characterization of a major *Schistosoma mansoni* glycoprotein antigen cross-reactive with *Fasciola hepatica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**, 879-888.
- [290] Norden, A. P., Aronstein, W. S. und Strand, M. (1982) *Schistosoma mansoni*: identification, characterization, and purification of the spine glycoprotein by monoclonal antibody. *Exp. Parasitol.* **54**, 432-442.
- [291] Aronstein, W. S. und Strand, M. (1985) A glycoprotein antigen of *Schistosoma mansoni* expressed on the gynecophoral canal of mature male worms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**, 508-512.
- [292] Bostic, J. R. und Strand, M. (1996) Molecular cloning of a *Schistosoma mansoni* protein expressed in the gynecophoral canal of male worms. *Mol. Biochem. Parasitol.* **79**, 79-89.
- [293] Gupta, B. C. und Basch, P. F. (1987) Evidence for transfer of a glycoprotein from male to female *Schistosoma mansoni* during pairing. *J. Parasitol.* **73**, 674-675.
- [294] Davies, S. J., Shoemaker, C. B. und Pearce, E. J. (1998) A divergent member of the transforming growth factor beta receptor family from *Schistosoma mansoni* is expressed on the parasite surface membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 11234-11240.
- [295] Hoffmann, K. F. und Strand, M. (1996) Molecular identification of a *Schistosoma mansoni* tegumental protein with similarity to cytoplasmic dynein light chains. *J. Biol. Chem.* **271**, 26117-26123.
- [296] Vasconcelos, E. G., Ferreira, S. T., de Carvalho, T. M. U., de Souza, W., Kettlun, A. M., Mancilla, M., Valenzuela, M. A. und Verjovski-Almeida, S. (1996) Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **271**, 22139-22145.
- [297] Haslam, D. B. und Baenziger, J. U. (1996) Expression cloning of Forssman glycolipid synthetase: a novel member of the histo-blood group AB0 gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10697-10702.
- [298] Bogitsh, B. J. (1993) The feeding of A type red blood cells *in vitro* and the ability of *Schistosoma mansoni* schistosomules to acquire A epitopes on their surfaces. *J. Parasitol.* **79**, 946-948.
- [299] Clegg, J. A., Smithers, S. R. und Terry, R. J. (1971) Acquisition of human antigens by *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *Nature* **232**, 653-654.
- [300] Goldring, O. L., Clegg, J. A., Smithers, S. R. und Terry, R. J. (1976) Acquisition of human blood group antigens by *Schistosoma mansoni*. *Clin. Exp. Immunol.* **26**, 181-187.

- [301] Goldring, O. L., Kusel, J. R. und Smithers, S. R. (1977) *Schistosoma mansoni*: origin *in vitro* of host-like surface antigens. *Exp. Parasitol.* **43**, 82-93.
- [302] Dean, D. A. und Sell, K. W. (1972) Surface antigens on *Schistosoma mansoni*. II. Adsorption of a Forssman-like host antigen by schistosomula. *Clin. Exp. Immunol.* **12**, 525-540.
- [303] Bianco, A. E. und Maizels, R. M. (1989) Parasite development and adaptive specialization. *Parasitology* **99**, S113-S123.
- [304] Sher, A., Hall, B. F. und Vadas, M. A. (1978) Acquisition of murine major histocompatibility complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* **148**, 46-57.
- [305] Cummings, R. D. und Nyame, A. K. (1996) Glycobiology of schistosomiasis. *FASEB J.* **10**, 838-848.
- [306] Robertson, N. P. und Cain, G. D. (1985) Isolation and characterization of glycosaminoglycans from *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **82**, 299-306.
- [307] McDiarmid, S. S. und Podesta, R. B. (1984) Identification of a sialic acid containing glycocalyx on the surface of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **10**, 33-43.
- [308] Simpson, A. J. G., Correa-Oliveira, R., Smithers, S. R. und Sher, A. (1983) The exposed carbohydrates of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their modification during maturation *in vivo*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **8**, 191-205.
- [309] Pearce, E. J., Basch, P. F. und Sher, A. (1986) Evidence that the reduced surface antigenicity of developing *Schistosoma mansoni* schistosomula is due to antigen shedding rather than host molecule acquisition. *Parasite Immunol.* **8**, 79-94.
- [310] Bickle, Q. D. und Ford, M. J. (1982) Studies on the surface antigenicity and susceptibility to antibody-dependent killing of developing schistosomula using sera from chronically infected mice and mice vaccinated with irradiated cercariae. *J. Immunol.* **128**, 2101-2106.
- [311] Mansour, M. H. (1996) Purification and characterization of SM 37: a fucosyllactose determinant-bearing glycoprotein probed by *Biomphalaria alexandria* lectin on adult male schistosomes. *J. Parasitol.* **82**, 586-593.
- [312] Mansour, M. H., Negm, H. I., Saad, A. H. und Taalab, N. I. (1995) Characterization of *Biomphalaria alexandria*-derived lectins recognizing a fucosyllactose-related determinant on schistosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **69**, 173-184.
- [313] Negm, H. I. (1996) Characterization of fucosyllactose determinant-bearing glycoproteins probed by a *Biomphalaria alexandria* lectin in *Schistosoma mansoni* cercariae. *Dev. Comp. Immunol.* **20**, 87-96.
- [314] Damian, R. T. (1987) Immunological aspects of host-schistosome relationships. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **82**, Suppl. 4, 13-16.
- [315] Damian, R. T. (1989) Molecular mimicry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **145**, 101-115.
- [316] Umeda, M., Diego, I. und Marcus, D. M. (1986) The occurrence of anti-3-fucosyllactosamine antibodies and their cross-reactive idiotopes in preimmune and immune mouse sera. *J. Immunol.* **137**, 3264-3269.
- [317] Nyame, A. K., Pilcher, J. B., Tsang, V. C. W. und Cummings, R. D. (1996) *Schistosoma mansoni* infection in humans and primates induces cytolytic antibodies to surface Le^x determinants on myeloid cells. *Exp. Parasitol.* **82**, 191-200.
- [318] Dissous, C., Grzych, J. M. und Capron, A. (1986) *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature* **323**, 443-445.
- [319] Fox, N., Damjanov, I., Knowles, B. B. und Solter, D. (1983) Immunohistochemical localization of the mouse stage-specific embryonic antigen 1 in human tissues and tumors. *Cancer Res.* **43**, 669-678.
- [320] van Dam, G. J., Claas, F. H., Yazdanbakhsh, M., Kruize, Y. C., van Keulen, A. C., Ferreira, S. T., Rotmans, J. P. und Deelder, A. M. (1996) *Schistosoma mansoni* excretory circulating cathodic antigen shares Lewis-x epitopes with a human granulocyte surface antigen and evokes host antibodies mediating complement-dependent lysis of granulocytes. *Blood* **88**, 4246-4251.
- [321] Skubitz, K. M. und Snook, R. W. D. (1987) Monoclonal antibodies that recognize lacto-N-fucopentaose III (CD15) react with the adhesion-promoting glycoprotein family (LFA-1/HMac-1/gp 150,95) and CR1 on human neutrophils. *J. Immunol.* **139**, 1631-1639.
- [322] Grzych, J. M., Dissous, C., Capron, M., Torres, S., Lambert, P. H. und Capron, A. (1987) *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *J. Exp. Med.* **165**, 865-878.
- [323] Velupillai, P. und Harn, D. A. (1993) Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220⁺ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4⁺ T-cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 18-22.

- [324] Velupillai, P., Sucor, W. E., Horauf, A. M. und Harn, D. A. (1997) B-1 cell (CD5⁺B220⁺) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylysosamine sugars. *J. Immunol.* **158**, 338-344.
- [325] Hardy, R. R. und Hayakawa, K. (1986) Development and physiology of LY-1 B and its human homolog, LEU-1 B. *Immunol. Rev.* **93**, 53-79.
- [326] Herzenberg, L. A., Stall, A. M., Lalor, P. A., Sidman, C., Moore, W. A., Pakks, D. R. und Herzenberg, L. A. (1986) The LY-1 B-Cell Lineage. *Immunol. Rev.* **93**, 81-102.
- [327] Sidman, C. L., Schultz, L. D., Hardy, R. R., Hayakawa, K. und Herzenberg, L. A. (1986) Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1⁺ B cells in viable motheaten and normal mice. *Science* **232**, 1423-1425.
- [328] Allison, A. C. und Nawata, Y. (1992) Cytokines mediating the proliferation and differentiation of B-1 lymphocytes and their role in ontogeny and phylogeny. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **651**, 200-219.
- [329] Murakami, M. und Honjo, T. (1995) Involvement of B-1 cells in mucosal immunity and autoimmunity. *Immunol. Today* **16**, 534-539.
- [330] Lejoly-Boisseau, H., Appriou, M., Seigneur, M., Pruvost, A., Tribouley-Duret, J. und Tribouley, J. (1999) *Schistosoma mansoni*: *in vitro* adhesion of parasite eggs to the vascular endothelium. subsequent inhibition by a monoclonal antibody directed to a carbohydrate epitope. *Exp. Parasitol.* **91**, 20-29.
- [331] de Water, R., Fransen, J. A. und Deelder, A. M. (1986) Ultrastructural localization of the circulating anodic antigen in the digestive tract of *Schistosoma mansoni* using monoclonal antibodies in an immunogold labeling procedure. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**, 549-558.
- [332] de Water, R., Fransen, J. A. und Deelder, A. M. (1986) Ultrastructural localization of the circulating cathodic antigen in the digestive tract of various life-cycle stages of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* **72**, 635-646.
- [333] Nash, T. E., Ottesen, E. A. und Cheever, A. W. (1978) Antibody response to a polysaccharide antigen. II. Modulation of antibody response. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**, 944-950.
- [334] van Dam, G. J., Kornelis, D., Zeyl, R. J. M. v. und Deelder, A. M. (1993) *Schistosoma mansoni*: analysis of monoclonal antibodies reactive with gut-associated antigens. *Parasitol. Res.* **79**, 55-62.
- [335] Carlier, Y., Bout, D., Strecker, G., Debray, H. und Capron, A. (1980) Purification, immunochemical, and biologic characterization of the *Schistosoma* circulating M antigen. *J. Immunol.* **124**, 2442-2450.
- [336] Spooncer, E., Fukuda, M., Klock, J. C., Oates, J. E. und Dell, A. (1984) Isolation and characterization of polyfucosylated lactosaminoglycan from human granulocytes. *J. Biol. Chem.* **259**, 4792-4801.
- [337] Loker, E. S. (1983) A comparative study of the life-histories of mammalian schistosomes. *Parasitology* **87**, 343-369.
- [338] Oberlin, U.-P. und Weiss, N. (1977) Schistosomiasis mansoni in the hamster: cellular and humoral immune responses to soluble egg antigens (SEA). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**, 1179-1182.
- [339] Bout, D., Rousseaux, R., Carlier, Y. und Capron, A. (1980) Kinetics of classes and sub-classes of total immunoglobulins and specific antibodies to *Schistosoma mansoni* during murine infection. *Parasitology* **80**, 247-256.
- [340] Suzuki, T. und Damian, R. T. (1981) Schistosomiasis mansoni in baboons IV. The development of antibodies to *Schistosoma mansoni* adult worm, egg, and cercarial antigens during acute and chronic infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**, 825-835.
- [341] Hamburger, J., Lustigman, S., Arap Siongok, T. K., Ouma, J. H. und Mahmoud, A. F. (1982) Characterization of a purified glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs: specificity, stability, and the involvement of carbohydrate and peptide moieties in its serologic activity. *J. Immunol.* **128**, 1864-1869.
- [342] Carter, C. E. und Colley, D. G. (1979) Partial purification and characterization of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen with Con A-Sepharose chromatography. *J. Immunol.* **122**, 2204-2209.
- [343] File, S. (1995) Interaction of schistosome eggs with vascular endothelium. *J. Parasitol.* **81**, 234-238.
- [344] Doenhoff, M. J., Hassounah, O., Murare, H., Bain, J. und Lucas, S. (1986) The schistosome egg granuloma: immunopathology in the cause of host protection or parasite survival? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**, 503-514.
- [345] Hirata, M., Kage, M., Habe, S., Agatsuma, T. und Fukuma, T. (1996) *In vivo* and *in vitro* cellular response to *Schistosoma japonicum* eggs in hosts with differing susceptibilities. *Parasite Immunol.* **18**, 431-438.
- [346] Ngaiza, J. R. und Doenhoff, M. J. (1990) Blood platelets and schistosome egg excretion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **193**, 73-79.

- [347] Ngaiza, J. R. und Doenhoff, M. J. (1987) *Schistosoma mansoni*-induced thrombocytopenia in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**, 655-656.
- [348] Ngaiza, J. R., Doenhoff, M. J. und Jaffe, E. A. (1993) *Schistosoma mansoni* egg attachment to cultured human umbilical vein endothelial cells: an *in vitro* model of an early step of parasite egg excretion. *J. Infect. Dis.* **168**, 1576-1580.
- [349] Rumbley, C. A., Zekavat, S. A., Sugaya, H., Perrin, P. J., Ramadan, M. A. und Phillips, S. M. (1998) The schistosome granuloma: characterization of lymphocyte migration, activation, and cytokine production. *J. Immunol.* **161**, 4129-4137.
- [350] Weiss, J. B., Aronstein, W. S. und Strand, M. (1987) *Schistosoma mansoni*: stimulation of artificial granuloma formation *in vivo* by carbohydrate determinants. *Exp. Parasitol.* **64**, 228-236.
- [351] Kusel, J. R. (1970) Studies on the structure and hatching of the eggs of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **60**, 79-88.
- [352] Race, G. J., Martin, J. H., Moore, D. V. und Larsh, J. E. (1971) Scanning and transmission electron microscopy of *Schistosoma mansoni* eggs, cercariae, and adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **20**, 914-924.
- [353] Sher, A., Fiorentino, D., Caspar, P., Pearce, E. und Mosman, T. (1991) Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J. Immunol.* **147**, 2713-2716.
- [354] Falcone, F. H., Dahinden, C. A., Gibbs, B. F., Noll, T., Amon, U., Hebestreit, H., Abrahamsen, O., Klauke, J., Schlaak, M. und Haas, H. (1996) Human basophils release interleukin-4 after stimulation with *Schistosoma mansoni* egg antigen. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1147-1155.
- [355] Sher, A. (1992) Parasitizing the cytokine system. *Nature* **356**, 565-566.
- [356] Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D. und McKerrow, J. H. (1992) Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* **356**, 604-607.
- [357] Freedman, D. O. und Ottesen, E. A. (1988) Eggs of *Schistosoma mansoni* stimulate endothelial cell proliferation *in vitro*. *J. Infect. Dis.* **158**, 556-562.
- [358] El Ridi, R., Velupillai, P. und Harn, D. A. (1996) Regulation of schistosome egg granuloma formation: host-soluble L-selectin enters tissue-trapped eggs and binds to carbohydrate antigens on surface membranes of miracidia. *Infect. Immun.* **64**, 4700-4705.
- [359] Green, P. J., Tamatani, T., Watanabe, T., Miyasaka, M., Hasegawa, A., Kiso, M., Yuen, C. T., Stoll, M. S. und Feizi, T. (1992) High affinity binding of the leucocyte adhesion molecule L-selectin to 3'-sulphated-Le(a) and -Le(x) oligosaccharides and the predominance of sulphate in this interaction demonstrated by binding studies with a series of lipid-linked oligosaccharides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 244-251.
- [360] Sanders, W. J., Katsumoto, T. R., Bertozzi, C. R., Rosen, S. D. und Kiessling, L. L. (1996) L-selectin-carbohydrate interactions: relevant modifications of the Lewis x trisaccharide. *Biochemistry* **35**, 14862-14867.
- [361] Jacobs, W., van Dam, G., Bogers, J., Deelder, A. M. und van Marck, E. (1999) Schistosomal granuloma modulation. I. *Schistosoma mansoni* worm antigens CAA and CCA prime egg-antigen-induced hepatic granuloma formation. *Parasitol. Res.* **85**, 7-13.
- [362] Lukacs, N. W. und Boros, D. L. (1991) Identification of larval cross-reactive and egg-specific antigens involved in granuloma formation in murine *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* **59**, 3237-3242.
- [363] Leptak, C. L. und McKerrow, J. H. (1997) Schistosome egg granulomas and hepatic expression of TNF- α are dependent on immune priming during parasite mutation. *J. Immunol.* **158**, 301-307.
- [364] Strand, M., McMillan, A. und Pan, X. (1982) *Schistosoma mansoni*: reactivity with infected human sera and monoclonal antibody characterization of a glycoprotein in different developmental stages. *Exp. Parasitol.* **54**, 145-156.
- [365] Bogers, J. J. P. M., Nibbeling, H. A. M., Deelder, A. M. und van Marck, E. A. E. (1995) Immunohistochemical and ultrastructural localisation of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens processed by the infect host. *Parasitology* **112**, 537-543.
- [366] Dissous, C., Grzych, J. M. und Capron, A. (1982) *Schistosoma mansoni* surface antigen defined by a rat monoclonal IgG2a. *J. Immunol.* **129**, 2232-2234.
- [367] van Kuik, J. A., van Halbeek, H., Kamerling, J. P. und Vliegenthart, J. F. G. (1985) Primary structure of the low-molecular-weight carbohydrate chains of *Helix pomatia* α -Hemocyanin. *J. Biol. Chem.* **260**, 13984-13988.
- [368] van Kuik, J. A., Sijbesma, R. P., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J. F. G. und Wood, E. J. (1986) Primary structure of a low-molecular-mass N-linked oligosaccharide from hemocyanin of *Lymnaea stagnalis*. 3-O-methyl-D-mannose as a constituent of the xylose-containing core structure in an animal glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* **160**, 621-625.

- [369] van Kuik, J. A., Sijbesma, R. P., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G. und Wood, E. J. (1987) Primary structure determination of seven novel *N*-linked carbohydrate chains derived from hemocyanin of *Lymnaea stagnalis*. 3-*O*-methyl-D-galactose and *N*-acetyl-D-galactosamine as constituents of xylose-containing *N*-linked oligosaccharides in an animal glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* **169**, 399-411.
- [370] van Kuik, J. A., van Halbeek, H., Kamerling, J. P. und Vliegthart, J. F. G. (1986) Primary structure of the neutral carbohydrate chains of hemocyanin from *Panulirus interruptus*. *Eur. J. Biochem.* **159**, 297-301.
- [371] van Kuik, J. A., Breg, J., Kolsteeg, C. E. M., Kamerling, J. P. und Vliegthart, J. F. G. (1987) Primary structure of the acidic carbohydrate chain of hemocyanin from *Panulirus interruptus*. *FEBS Lett.* **221**, 150-154.
- [372] Lommerse, J. P., Thomas-Oates, J. E., Gielens, C., Preaux, G., Kamerling, J. P. und Vliegthart, J. F. G. (1997) Primary structure of 21 novel monoantennary and diantennary *N*-linked carbohydrate chains from alpha D-hemocyanin of *Helix pomatia*. *Eur. J. Biochem.* **249**, 195-222.
- [373] Thors, C. und Linder, E. (1998) Cross reacting antibodies against keyhole limpet haemocyanin may interfere with the diagnostics of acute schistosomiasis. *Parasite Immunol.* **20**, 489-496.
- [374] Wirguin, I., Suturkova-Milosevic, L., Briani, C. und Latov, N. (1995) Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(beta 1-3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* **40**, 307-310.
- [375] Khalife, J., Capron, M., Capron, A., Grzych, J. M., Butterworth, A. E., Dunne, D. W. und Ouma, J. H. (1986) Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.* **164**, 1626-1640.
- [376] Bickle, Q. D. und Andrews, B. J. (1988) Characterisation of *Schistosoma mansoni* monoclonal antibodies which block in-vitro killing: failure to demonstrate blockage of immunity *in vivo*. *Parasite Immunol.* **10**, 151-168.
- [377] Smithers, S. R. und Terry, R. J. (1965) The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* **55**, 695-700.
- [378] Doenhoff, M. J., Bickle, Q., Long, E., Bain, J. und McGregor, A. (1978) Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. I. Demonstration of resistance to reinfection using a model system that involves perfusion of mice within three weeks of challenge. *J. Helminthol.* **52**, 173-186.
- [379] Doenhoff, M. J., Pearson, S., Dunne, D. W., Bickle, Q., Lucas, S., Bain, J., Musallam, R. und Hassounah, O. (1981) Immunological control of hepatotoxicity and parasite egg excretion in *Schistosoma mansoni* infections: stage specificity of the reactivity of immune serum in T-cell deprived mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**, 41-53.
- [380] Hakomori, S. I. und Siddiqui, B. (1974) Isolation and characterization of glycosphingolipid from animal cells and their membranes. *Methods Enzymol.* **32**, 345-367.
- [381] Itonori, S., Nishizawa, M., Suzuki, M., Inagaki, F., Hori, T. und Sugita, M. (1991) Polar glycosphingolipids in insect: chemical structures of glycosphingolipid series containing 2'-aminoethylphosphoryl-(\rightarrow 6)-*N*-acetylglucosamine as polar group from larvae of the green-bottle fly, *Lucilia caesar*. *J. Biochem.* **110**, 479-485.
- [382] Watanabe, K. und Arao, Y. (1981) An new solvent system for the separation of neutral glycosphingolipids. *J. Lipid Res.* **22**, 1020-1024.
- [383] Saito, T. und Hakomori, S. (1971) Quantitative isolation of total glycosphingolipids from animal cells. *J. Lipid Res.* **12**, 257-259.
- [384] MÜthing, J. (1996) High-resolution thin-layer chromatography of gangliosides. *J. Chromatogr. A* **720**, 3-25.
- [385] MÜthing, J. (1998) TLC in structure and recognition studies of glycosphingolipids. in *Glycoanalysis Protocols* (Hounsell, E. F., Ed.) **76**, 183-195, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [386] Kniep, B. und Mühlrad, P. F. (1990) Immunochemical detection of glycosphingolipids on thin-layer chromatograms. *Anal. Biochem.* **188**, 5-8.
- [387] Kniep, B. und Ebel, F. (1993) Lipids and glycolipids. in *Methods of Immunological Analysis* (Masseyeff, R. F., Albert, W. H., and Staines, N. A., Ed.) **2**, 90-105, VCH, Weinheim.
- [388] Conyers, S. M. und Kidwell, D. A. (1991) Chromogenic substrates for horseradish peroxidase. *Anal. Biochem.* **192**, 207-211.
- [389] Bethke, U., MÜthing, J., Schauder, B., Conradt, P. und Mühlrad, P. F. (1986) An improved semi-quantitative enzyme immunostaining procedure for glycosphingolipid antigens on high performance thin layer chromatograms. *J. Immunol. Methods* **89**, 111-116.
- [390] de Frutos, M., Paliwal, S. K. und Regnier, F. E. (1996) Analytical Immunology. *Methods Enzymol.* **271**, 82-101.

- [391] Abdel-Hafez, S. K., Phillips, S. M. und Zodda, D. M. (1983) *Schistosoma mansoni*: detection and characterization of antigens and antigenemia by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (IELISA). *Exp. Parasitol.* **55**, 219-232.
- [392] Abdel-Hafez, S. K., Phillips, S. M. und Zodda, D. M. (1984) *Schistosoma mansoni*: detection and characterization of schistosome derived antigens by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (IELISA) utilizing monoclonal antibodies. *Parasitol. Res.* **70**, 105-117.
- [393] Ramalho-Pinto, F. J., Gazzinelli, G., Howells, R. E., Mota-Santos, T. A., Figueiredo, E. A. und Pellegrino, J. (1974) *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **36**, 360-372.
- [394] Clegg, J. A. und Smithers, S. R. (1968) Death of schistosome cercariae during penetration of the skin. II. Penetration of mammalian skin by *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **58**, 111-128.
- [395] Hamburger, J., Weil, M., Anton, M. und Turetzky, T. (1989) *Schistosoma mansoni* antigens recognized in *Biomphalaria glabrata* hemolymph by monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**, 605-612.
- [396] Bickle, Q. D., Andrews, B. J. und Taylor, M. G. (1986) *Schistosoma mansoni*: characterization of two protective monoclonal antibodies. *Parasite Immunol.* **8**, 95-107.
- [397] Kurosaka, A., Yano, A., Itoh, N., Kuroda, Y., Nakagawa, T. und Kawasaki, T. (1991) The structure of a neural specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase recognized by anti-horseradish peroxidase antiserum. *J. Biol. Chem.* **266**, 4168-4172.
- [398] Wilson, I. B., Harthill, J. E., Mullin, N. P., Ashford, D. A. und Altmann, F. (1998) Core α 1,3-fucose is a key part of the epitope recognized by antibodies reacting against plant N-linked oligosaccharides and is present in a wide variety of plant extracts. *Glycobiology* **8**, 651-661.
- [399] Kong, R. K. M., Barrios, A., Knapp, W. und Macher, B. A. (1993) Fucosylated glycosphingolipids of human myeloid cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 677-683.
- [400] Stockl, J., Majdic, O., Rosenkranz, A., Fiebiger, E., Kniep, B., Stockinger, H. und Knapp, W. (1993) Monoclonal antibodies to the carbohydrate structure Lewis(x) stimulate the adhesive activity of leukocyte integrin CD11b/CD18 (CR3, Mac-1, $\alpha_m \beta_2$) on human granulocytes. *J. Leukoc. Biol.* **53**, 541-549.
- [401] Plendl, J. und Sinowatz, F. (1998) Glycobiology of the olfactory system. *Acta Anat.* **161**, 234-253.
- [402] Bouhours, D., Hansson, G. C., Angström, J., Jovall, P.-A. und Bouhours, J.-F. (1992) Two novel decaglycosylceramides with a blood group A-active tetrasaccharide repeat in the epithelial cells of the small intestine of inbred rats. *J. Biol. Chem.* **267**, 18533-18540.
- [403] Dunne, D. W., Agnew, A. M., Mohda, J. und Doenhoff, M. J. (1986) *Schistosoma mansoni* egg antigens: preparation of rabbit antisera with monospecific immunoprecipitating activity, and their use in antigen characterization. *Parasite Immunol.* **8**, 575-586.
- [404] Dunne, D. W., Jones, F. M. und Doenhoff, M. J. (1991) The purification, characterization, serological activity and hepatotoxic properties of two cationic glycoproteins (α_1 and ω_1) from *Schistosoma mansoni* eggs. *Parasitology* **103**, 225-236.
- [405] Curtis, R. H. C., Fallon, P. G. und Doenhoff, M. J. (1996) Sm480: a high molecular weight *Schistosoma mansoni* antigen associated with protective immunity. *Parasite Immunol.* **18**, 149-157.
- [406] Dunne, D. W., Lucas, S., Bickle, Q., Pearson, S., Madgwick, L., Bain, J. und Doenhoff, M. J. (1981) Identification and partial purification of an antigen (omega 1) from *Schistosoma mansoni* eggs which is putatively hepatotoxic in T-cell deprived mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**, 54-71.
- [407] Fallon, P. G., Teixeira, M. M., Neice, C. M., Williams, T. J., Hellewell, P. G. und Doenhoff, M. J. (1996) Enhancement of *Schistosoma mansoni* infectivity by intradermal injections of larval extracts: a putative role for larval proteases. *J. Infect. Dis.* **173**, 1460-1466.
- [408] Teixeira, M. M., Doenhoff, M. J., McNeice, C., Williams, T. J. und Hellewell, P. G. (1993) Mechanisms of the inflammatory response induced by extracts of *Schistosoma mansoni* larvae in guinea pig skin. *J. Immunol.* **151**, 5525-5534.
- [409] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-688.
- [410] Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (1996) Lysogangliosides: synthesis and use in preparing labeled gangliosides. *Methods Enzymol.* **138**, 319-341.
- [411] Taketomi, T., Hara, A., Uemura, K.-I., Kurahashi, H. und Sugiyama, E. (1996) A microwave-mediated saponification of galactosylceramide and galactosylceramide I³-sulfate and identification of their lyso-compounds by delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**, 462-467.

- [412] Taketomi, T., Hara, A., Uemura, K.-I., Kurahashi, H. und Sugiyama, E. (1997) Preparation of various lysogangliosides including lyso-fucosyl GM1 and delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometric analysis. *J. Biochem.* **121**, 264-269.
- [413] Nores, G. A., Hanai, N., Levery, S. B., Eaton, H. L., Salyan, M. E. K. und Hakomori, S.-I. (1989) Synthesis and characterization of ganglioside GM₃, and other compounds. *Methods Enzymol.* **179**, 242-253.
- [414] Lochnit, G. (1996) Doktorarbeit: *Strukturanalyse von Glykolipiden parasitärer Nematoden am Beispiel des Schweinespulwurms Ascaris suum*. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- [415] Beeley, J. G. (1985) *Glycoprotein and Proteoglycan Techniques*. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Burdon, R. H., and van Knippenberg, P. H., Eds.), **16**, Elsevier, Amsterdam.
- [416] Khoo, K. H., Maizels, R. M., Page, A. P., Taylor, G. W., Rendell, N. B. und Dell, A. (1991) Characterization of nematode glycoproteins: the major O-glycans of *Toxocara* excretory-secretory antigens are O-methylated trisaccharides. *Glycobiology* **1**, 163-171.
- [417] Masui, T. (1963) Stero-bile acids and bile sterols. *J. Biochem.* **54**, 41-46.
- [418] Hoffman, J., Lindberg, B. und Svensson, S. (1972) Determination of the anomeric configuration of sugar residues in acetylated oligo- and polysaccharides by oxidation with chromium trioxide in acetic acid. *Acta Chem. Scand.* **26**, 661-666.
- [419] Hsieh, T. C. Y., Kaul, K., Laine, R. A. und Lester, R. L. (1978) Structure of a major glycoposphoceramide from tobacco leaves, PSL-I: 2-deoxy-2-acetamido-D-glucopyranosyl(α1-4)-D-glucuronopyranosyl(α1-2)myoinositol-1-O-phosphoceramide. *Biochemistry* **17**, 3575-3581.
- [420] Fan, J.-Q., Huynh, L. H. und Lee, Y. C. (1995) Purification of 2-aminopyridine derivatives of oligosaccharides and related compounds by cation-exchange chromatography. *Anal. Biochem.* **232**, 65-68.
- [421] Kon, A., Takagaki, K., Kawasaki, H., Nakamura, T. und Endo, M. (1991) Application of 2-aminopyridine fluorescence labeling to glycosaminoglycans. *J. Biochem.* **110**, 132-135.
- [422] Morelle, W., Lemoine, J. und Strecker, G. (1998) Structural analysis of O-linked oligosaccharide-alditols by electrospray-tandem mass spectrometry after mild periodate oxidation and derivatization with 2-aminopyridine. *Anal. Biochem.* **259**, 16-27.
- [423] Okamoto, M., Takahashi, K., Doi, T. und Takimoto, Y. (1997) High-sensitivity detection and postsource decay of 2-aminopyridine-derivatized oligosaccharides with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **69**, 2919-2926.
- [424] Hase, S. (1993) Analysis of sugar chains by pyridylation. *Meth. Mol. Biol.* **14**, 69-80.
- [425] Kuraya, N., Omichi, K., Nishimura, H., Iwanaga, S. und Hase, S. (1993) Structural analysis of O-linked sugar chains in human blood clotting Factor IX. *J. Biochem.* **114**, 763-765.
- [426] Nishimura, H., Takao, T., Hase, S., Shimonishi, Y. und Iwanaga, S. (1992) Human Factor IX has a tetrasaccharide O-glycosidically linked to serine 61 through the fucose residue. *J. Biol. Chem.* **267**, 17520-17525.
- [427] Hase, S. (1994) High-performance liquid chromatography of pyridylaminated saccharides. *Methods Enzymol.* **230**, 225-236.
- [428] Kuraya, N. und Hase, S. (1996) Analysis of pyridylaminated O-linked sugar chains by two-dimensional sugar mapping. *Anal. Biochem.* **233**, 205-211.
- [429] Makino, Y., Kuraya, N., Omichi, K. und Hase, S. (1996) Classification of sugar chains of glycoproteins by analyzing reducing end oligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis. *Anal. Biochem.* **238**, 54-59.
- [430] Natsuka, S. und Hase, S. (1998) Analysis of N- and O-glycans by pyridylation. in *Glycoanalysis Protocols* (Hounsell, E. F., Ed.) **76**, 101-113, Humana Press, Totowa, NJ.
- [431] Makino, Y., Omichi, K. und Hase, S. (1998) Analysis of oligosaccharide structures from the reducing end terminal by combining partial acid hydrolysis and a two-dimensional sugar map. *Anal. Biochem.* **264**, 172-179.
- [432] Ohara, K., Sano, M., Kondo, A. und Kato, I. (1991) Two-dimensional mapping by high-performance liquid chromatography of pyridylamino oligosaccharides from various glycosphingolipids. *J. Chromatogr. A* **586**, 35-41.
- [433] El Rassi, Z., Tedford, D., An, J. und Mort, A. (1991) High-performance reversed-phase chromatographic mapping of 2-pyridylamino derivatives of xyloglucan oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **215**, 25-38.
- [434] Sauer, A. (1997) Diplomarbeit: *Trennung und massenspektrometrische Charakterisierung verschiedener Oligosaccharid-Derivate*. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- [435] Takahashi, N. (1996) Three-dimensional mapping of N-linked oligosaccharides using anion-exchange, hydrophobic and hydrophilic interaction modes of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **720**, 217-225.

- [436] Yanagida, K., Ogawa, H., Omichi, K. und Hase, S. (1998) Introduction of a new scale into reversed-phase high-performance liquid chromatography of pyridylamino sugar chains for structural assignment. *J. Chromatogr. A* **800**, 187-198.
- [437] Guile, G. R., Harvey, D. J., O'Donnell, N., Powell, A. K., Hunter, A. P., Zamze, S., Fernandes, D. L., Dwek, R. A. und Wing, D. R. (1998) Identification of highly fucosylated *N*-linked oligosaccharides from the human parotid gland. *Eur. J. Biochem.* **258**, 623-656.
- [438] Kotani, N. und Takasaki, S. (1998) Analysis of 2-aminobenzamide-labeled oligosaccharides by high-pH anion-exchange chromatography with fluorometric detection. *Anal. Biochem.* **264**, 66-73.
- [439] Shinohara, Y., Sota, H., Gotoh, M., Hasebe, M., Tosu, M., Nakao, J. und Hasegawa, Y. (1996) Bifunctional labeling reagent for oligosaccharides to incorporate both chromophore and biotin groups. *Anal. Chem.* **68**, 2573-2579.
- [440] Leteux, C., Childs, R. A., Chai, W., Stoll, M. S., Kogelberg, H. und Feizi, T. (1998) Biotinyl-L-3-(2-naphthyl)-alanine hydrazide derivatives of *N*-glycans: versatile solid probes for carbohydrate-recognition studies. *Glycobiology* **8**, 227-236.
- [441] Ito, M. und Yamagata, T. (1989) Endoglycoceramidase from *Rhodococcus* species GT-74-2. *Methods Enzymol.* **179**, 488-496.
- [442] Ito, M. und Yamagata, T. (1989) Purification and characterization of glycosphingolipid-specific endoglycosidases (endoglycoceramidas) from a mutant strain of *Rhodococcus* sp. - evidence for three molecular species of endoglycoceramidase with different specificities. *J. Biol. Chem.* **264**, 9510-9519.
- [443] Basu, S. S., Dastgheib-Hosseini, S., Hoover, G., Li, Z. und Basu, S. (1994) Analysis of glycosphingolipids by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis using ceramide glycanase from *Mercenaria mercenaria*. *Anal. Biochem.* **222**, 270-274.
- [444] Li, Y.-T. und Li, S. C. (1989) Ceramide glycanase from leech, *Hirudo medicinalis*, and earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Methods Enzymol.* **179**, 479-487.
- [445] Zhou, B., Li, S.-C., Laine, R. A., Huang, R. T. C. und Li, Y.-T. (1989) Isolation and characterization of ceramide glycanase from leech, *Macrobodella decora*. *J. Biol. Chem.* **264**, 12272-12277.
- [446] Carter, B. Z., Li, S.-C. und Li, Y.-T. (1992) Ceramide glycanase from the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Biochem. J.* **285**, 619-623.
- [447] Kobata, A. (1979) Use of endo- and exoglycosidases for structural studies of glycoconjugates. *Anal. Biochem.* **100**, 1-14.
- [448] Li, S.-C. und Li, Y.-T. (1970) Studies on the glycosidases of jack bean meal. *J. Biol. Chem.* **245**, 5153-5160.
- [449] Gaver, R. C. und Sweeley, C. C. (1965) Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long-chain bases by gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**, 294-298.
- [450] Ryhage, R. und Stenhagen, E. (1960) Mass spectrometry studies: VI. Methyl esters of normal chain oxo-, hydroxy-, methoxy- and epoxy-acids. *Arkiv för Kemi* **15**, 545-574.
- [451] Ryhage, R. und Stenhagen, E. (1963) Mass spectrometry of long-chain esters. in *Mass Spectrometry of Organic Ions* (McLafferty, F. W., Ed.), 399-452, Academic Press, New York.
- [452] Anumula, K. R. (1994) Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection. *Anal. Biochem.* **220**, 275-283.
- [453] Björndal, H., Hellerqvist, C. G., Lindberg, B. und Svensson, S. (1970) Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie bei der Methylierungsanalyse von Polysacchariden. *Angew. Chem.* **82**, 643-674.
- [454] Paz-Parente, J., Cardon, P., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B. und Ricard, G. (1985) A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methyl-sulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* **141**, 41-47.
- [455] Geyer, R. und Geyer, H. (1994) Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques. *Methods Enzymol.* **230**, 86-107.
- [456] Lavery, S. B. und Hakomori, S. (1987) Microscale methylation analysis of glycolipids using capillary gas chromatography-chemical ionization mass fragmentography with selected ion monitoring. *Methods Enzymol.* **138**, 13-25.
- [457] Lindberg, B. und Lonngren, J. (1978) Methylation analysis of complex carbohydrates: general procedure and application for sequence analysis. *Methods Enzymol.* **50**, 3-33.
- [458] Geyer, R., Geyer, H., Kühnhardt, S., Mink, W. und Stirn, S. (1983) Methylation analysis of complex carbohydrates in small amounts: Capillary gas chromatography - mass fragmentography of methylalditol acetates obtained from *N*-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides. *Anal. Biochem.* **133**, 197-207.

- [459] Geyer, R., Geyer, H., Kühnhardt, S., Mink, W. und Stirm, S. (1982) Capillary gas-chromatography of methylhexitol acetates obtained upon methylation of *N*-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides. *Anal. Biochem.* **121**, 263-274.
- [460] Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. und Montreuil, J. (1981) Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. *Anal. Biochem.* **116**, 489-502.
- [461] Hansson, G. C., Li, Y. T. und Karlsson, H. (1989) Characterization of glycosphingolipid mixtures with up to ten sugars by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry as permethylated oligosaccharides and ceramides released by ceramide glycanase. *Biochemistry* **28**, 6672-6678.
- [462] Dell, A., Reason, A. J., Khoo, K.-H., Panico, M., McDowell, R. A. und Morris, H. R. (1994) Mass spectrometry of carbohydrate-containing biopolymers. *Methods Enzymol.* **230**, 108-131.
- [463] Dell, A., Morris, H. R., Easton, R. L., Panico, M., Patankar, M., Oehninger, S., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M. und Clark, G. F. (1995) Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodefin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive and contraceptive activities. *J. Biol. Chem.* **270**, 24116-24126.
- [464] Haeuw-Fievre, S., Wieruszkeski, J.-M., Michalski, J.-C., Montreuil, J. und Strecker, G. (1993) Primary structure of human milk octa-, dodeca- and trisdecaaccharides determined by a combination of ¹H-NMR spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. Evidence for a new core structure, the *para*-lacto-*N*-octaose. *Eur. J. Biochem.* **215**, 361-371.
- [465] Peter-Katalinic, J. und Egge, H. (1990) Desorption mass spectrometry of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* **193**, 713-733.
- [466] Patterson, S. D. und Aebersold, R. (1995) Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis* **16**, 1791-1814.
- [467] Jepersen, S., Niessen, W. M. A., Tjaden, U. R. und J. van der Greef, J. (1995) Quantitative bioanalysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **30**, 357-364.
- [468] Gusev, A. I., Wilkinson, W. R., Proctor, A. und Hercules, D. M. (1995) Improvement of signal reproducibility and matrix/comatrix effects in MALDI analysis. *Anal. Chem.* **67**, 1034-1041.
- [469] Gusev, A. I., Vasseur, O. J., Proctor, A., Sharkey, A. G. und Hercules, D. M. (1995) Imaging of thin-layer chromatograms using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **67**, 4565-4570.
- [470] Fu, D.-J., Tang, K., Braun, A., Reuter, D., Darnhofer-Demar, B., Little, D. P., O'Donnell, M. J., Cantor, C. R. und Köster, H. (1998) Sequencing exons 5 to 8 of the p53 gene by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **16**, 381-384.
- [471] Cano, L., Swiderek, K. M. und Shively, J. E. (1995) Comparison of ESI-MS, LSIMS and MALDI-TOF-MS for the primary structure analysis of a monoclonal antibody. *Technics in Protein Chemistry VI*, 22-30.
- [472] Annan, R. S. und Carr, S. A. (1996) Phosphopeptide analysis by matrix-assisted laser desorption time-of flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **68**, 3413-3421.
- [473] Harvey, D. J. (1995) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of phospholipids. *J. Mass Spectrom.* **30**, 1333-1346.
- [474] Andersen, J. S., Svensson, B. und Roepstorff, P. (1996) Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: powerful analytical tools in recombinant protein chemistry. *Nat. Biotechnol.* **14**, 449-457.
- [475] Liang, X., Bai, J., Liu, Y. H. und Lubman, D. M. (1996) Characterization of SDS-PAGE-separated proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **68**, 1012-1018.
- [476] Redeker, V., Toullec, J. Y., Vinh, J., Rossier, J. und Soye, D. (1998) Combination of peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and immunodetection on single glands or cells. *Anal. Chem.* **70**, 1805-1811.
- [477] Rosinke, B., Strupat, K., Hillenkamp, F., Rosenbusch, J., Dencher, N., Krüger, U. und Galla, H.-J. (1995) Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry (MALDI-MS) of membrane proteins and non-covalent complexes. *J. Mass Spectrom.* **30**, 1462-1468.
- [478] Wang, B. H. und Biemann, K. (1994) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of chemically modified oligonucleotides. *Anal. Chem.* **66**, 1918-1924.
- [479] Warren, M. E., Brockman, A. H. und Orlando, R. (1998) On-probe solid-phase extraction/MALDI-MS using ion-pairing interactions for the cleanup of peptides and proteins. *Anal. Chem.* **70**, 3757-3761.
- [480] Nonami, H., Fukui, S. und Erra-Balsells, R. (1997) B-carboline alkaloids as matrices for matrix-assisted ultraviolet laser desorption time-of-flight mass spectrometry of proteins and sulfated

- oligosaccharides: a comparative study using phenylcarbonyl compounds, carbazoles and classical matrices. *J. Mass Spectrom.* **32**, 287-296.
- [481] Chen, P., Baker, A. G. und Novotny, M. V. (1997) The use of osazones as matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Anal. Biochem.* **244**, 144-151.
- [482] Dai, Y., Whittal, R. M., Brudges, C. A., Isogai, Y., Hindsgaul, O. und Li, L. (1997) Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for the analysis of monosulfated oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **304**, 1-9.
- [483] Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V. und Gordon, D. B. (1996) The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1584-1586.
- [484] Field, M., Papac, D. und Jones, A. (1996) The use of high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to monitor and identify oligosaccharide degradation. *Anal. Biochem.* **239**, 92-98.
- [485] Stults, J. T. (1995) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 691-698.
- [486] Smirnov, I. P., Roskey, M. T., Jushasz, P., Takach, E. J. und Martin, S. A. (1996) Sequencing oligonucleotides by exonuclease digestion and delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **238**, 19-25.
- [487] Spengler, B., Kirsch, D. und Kaufmann, R. (1995) Structure analysis of branched oligosaccharides using post-source decay in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **30**, 782-787.
- [488] Harvey, D. J., Küster, B. und Naven, T. J. P. (1998) Perspectives in the glycosciences - matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry of carbohydrates. *Glycoconj. J.* **15**, 333-338.
- [489] Küster, B., Hunter, A. P., Wheeler, S. F., Dwek, R. A. und Harvey, D. J. (1998) Structural determination of *N*-linked carbohydrates by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry following enzymatic release within sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis gels: application to species-specific glycosylation of alpha1-acid glycoprotein. *Electrophoresis* **19**, 1950-1959.
- [490] Lemoine, J., Chirat, F. und Domon, B. (1996) Structural analysis of derivatized oligosaccharides using post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **31**, 908-912.
- [491] Mo, W., Takao, T., Sakamoto, H. und Shimonishi, Y. (1998) Structural analysis of oligosaccharides derivatized with 4-aminobenzoic acid 2-(diethylamino)ethyl ester by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **70**, 4520-4526.
- [492] Moertz, E., Sareneva, T., Julkunen, K. und Roepstorff, P. (1996) Does matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry allow analysis of carbohydrate heterogeneity in glycoproteins? A study of natural human interferon- γ . *J. Mass Spectrom.* **31**, 1109-1118.
- [493] Rouse, J. C. und Vath, J. E. (1996) On-the-probe sample cleanup strategies for glycoprotein-released carbohydrates prior to matrix-assisted laser desorption-ionization time-of flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **238**, 82-92.
- [494] Harvey, D. J., Naven, T. J. P. und Küster, B. (1996) Identification of oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization and electrospray MS. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 905-912.
- [495] Küster, B., Naven, T. J. P. und Harvey, D. J. (1996) Rapid approach for sequencing neutral oligosaccharides by exoglycosidase digestion and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spec.* **31**, 1131-1140.
- [496] Papac, D. I., Wong, A. und Jones, A. J. S. (1996) Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **68**, 3215-3223.
- [497] Papac, D. I., Briggs, J. B., Chin, E. T. und Jones, A. J. S. (1998) A high-throughput microscale method to release *N*-linked oligosaccharides from glycoproteins for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis. *Glycobiology* **8**, 445-454.
- [498] Glocker, M. O., Bauer, S. H. J., Kast, J., Volz, J. und Przybylski, M. (1996) Characterization of specific noncovalent protein complexes by UV matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **31**, 1221-1227.
- [499] Pfenninger, A., Karas, M., Finke, B., Stahl, B. und Sawatzki, G. (1999) Matrix optimization for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligosaccharides from human milk. *J. Mass Spectrom.* **34**, 98-104.
- [500] Geyer, H., Schmitt, S., Wuhler, M. und Geyer, R. (1999) Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS. *Anal. Chem.* **71**, 476-482.

- [501] Yang, Y. und Orlando, R. (1996) Simplifying the exoglycosidase digestion/MALDI-MS procedures for the sequencing *N*-linked carbohydrate side chains. *Anal. Chem.* **68**, 570-572.
- [502] Lochnit, G., Dennis, R. D., Ulmer, A. J. und Geyer, R. (1998) Structural elucidation and monokine-inducing activity of two biologically active zwitterionic glycosphingolipids derived from the porcine parasitic nematode *Ascaris suum*. *J. Biol. Chem.* **278**, 466-474.
- [503] Glasgow, L. R., Paulson, J. C. und Hill, R. L. (1977) Systematic purification of five glycosidases from *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **252**, 8615-8623.
- [504] Kadowaki, H., Bremer, E. G., Evans, J. E. und Jungalwala, F. B. (1983) Acetonitrile-hydrochloric acid hydrolysis of gangliosides for high performance liquid chromatographic analysis of their long chain bases. *J. Lipid Res.* **24**, 1389-1397.
- [505] Lochnit, G., Dennis, R. D., Zähringer, U. und Geyer, R. (1997) Structural analysis of neutral glycosphingolipids from *Ascaris suum* adults. (Nematoda: Ascaridida). *Glycoconj. J.* **14**, 389-399.
- [506] Lemieux, R. U. und von Rudloff, E. (1955) Periodate-permanganate oxidations. I. Oxidations of olefins. *Can. J. Chem.* **33**, 1701-1709.
- [507] Lemieux, R. U. und von Rudloff, E. (1955) Periodate-permanganate oxidations. II. Determination of terminal methylene groups. *Can. J. Chem.* **33**, 1710-1713.
- [508] von Rudloff, E. (1955) Periodate-permanganate oxidations. III. Determination of isopropylidene groups. *Can. J. Chem.* **33**, 1714.
- [509] von Rudloff, E. (1956) Periodate-permanganate oxidations. V. Oxidation of lipids in media containing organic solvents. *Can. J. Chem.* **34**, 1413-1418.
- [510] von Rudloff, E. (1965) Permanganate-periodate oxidation. VI. The oxidation of various aliphatic compounds. *Can. J. Chem.* **43**, 1784-1791.
- [511] Uda, Y., Li, S. C. und Li, Y. T. (1977) Alpha-*N*-acetylgalactosaminidase from the limpet, *Patella vulgata*. *J. Biol. Chem.* **252**, 5194-5200.
- [512] Hamilton, J. V., Chiodini, P. L., Fallon, P. G. und Doenhoff, M. J. (1999) Periodate-sensitive immunological cross-reactivity between keyhole limpet haemocyanin (KLH) and serodiagnostic *Schistosoma mansoni* egg antigens. *Parasitology* **118**, 83-90.
- [513] Bushara, H. O., Bashir, M. E. N., Malik, K. H. C., Mukhtar, M. M., Trottein, F., Capron, A. und Taylor, M. G. (1993) Suppression of *Schistosoma bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione S-transferase or keyhole limpet haemocyanin. *Parasite Immunol.* **15**, 383-390.
- [514] Péry, P., Luffau, G., Charley, J., Petit, A., Rouze, P. und Bernard, S. (1979) Phosphorylcholine antigens from *Nippostrongylus brasiliensis*. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* **130 C**, 889-900.
- [515] Lal, R. B. und Ottesen, E. A. (1989) Phosphocholine epitopes on helminth and protozoal parasites and their presence in the circulation of infected human patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**, 652-655.
- [516] Hellerqvist, C. G. (1990) Linkage analysis using Lindberg method. *Methods Enzymol.* **193**, 554-573.
- [517] Le Pendu, J., Lambert, F., Samuelsson, B., Breimer, M. E., Seitz, R. C., Urdaniz, M. P., Suesa, N., Ratcliffe, M., Francois, A., Poschmann, A., Vinas, J. und Oriol, R. (1986) Monoclonal antibodies specific for type 3 and type 4 chain-based blood group determinants: relationship to the A1 and A2 subgroups. *Glycoconjugate J* **3**, 255-271.
- [518] Ramphal, R., Carnoy, C., Fiebre, S., Michalski, J.-C., Houdert, N., Lamblin, G., Stecker, G. und Roussel, P. (1991) *Pseudomonas aeruginosa* recognizes carbohydrate chains containing type 1 (Gal β 1-3GlcNAc) or type 2 (Gal β 1-4GlcNAc) disaccharide units. *Infection and Immunity* **59**, 700-704.
- [519] Chitwood, D. J., Lusby, W. R., Thompson, M. J., Kochansky, J. P. und Howarth, O. W. (1995) The glycosylceramides of the nematode *Caenorhabditis elegans* contain an unusual, branched-chain sphingoid base. *Lipids* **30**, 567-573.
- [520] Juhasz, P. und Costello, C. E. (1993) Generation of large radical ions from oligometalloenes by matrix-assisted laser desorption ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7**, 343-351.
- [521] Lochnit, G., Nispel, S., Dennis, R. D. und Geyer, R. (1998) Structural analysis and immunohistochemical localization of two acidic glycosphingolipids from the porcine, parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Glycobiology* **8**, 891-899.
- [522] Gerdt, S., Lochnit, G., Dennis, R. D. und Geyer, R. (1997) Isolation and structural analysis of three neutral glycosphingolipids from a mixed population of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditida). *Glycobiology* **7**, 265-275.
- [523] Hakomori, S. I. und Siddiqui, B. (1972) Release of oligosaccharides from gangliosides. *Methods Enzymol.* **28**, 156-159.

- [524] Kishimoto, Y. und Mitry, M. T. (1974) A new procedure for synthesis of 3-Keto derivatives of sphingolipids and its application for study of fatty acid composition of brain ceramides and cerebrosides containing dihydrosphingosine or sphingosine. *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 426-434.
- [525] Iwamori, M., Moser, H. W., McCluer, R. H. und Kishimoto, Y. (1975) 3-Ketosphingolipids: application to the determination of sphingolipids which contain 4-sphingenine. *Biochim. Biophys. Acta* **380**, 308-319.
- [526] Stults, C. L. M., Sweeley, C. C. und Macher, B. A. (1989) Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties. *Methods Enzymol.* **179**, 167-214.
- [527] Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Suzuki, K. und Popko, B. (1996) Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell* **86**, 209-219.
- [528] Yamaji, T., Miyake, Y., Kozutsumi, Y. und Kawasaki, T. (1997) Neutral glycosphingolipids induce cell-cell aggregation of a variety of hematopoietic cell lines. *Eur. J. Biochem.* **247**, 21-29.
- [529] Shah, J., Atienza, J. M., Rawlings, A. V. und Shipley, G. G. (1995) Physical properties of ceramides: effect of fatty acid hydroxylation. *J. Lipid Res.* **36**, 1945-1955.
- [530] Angstrom, J., Teneberg, S., Milh, M. A., Larsson, T., Leonardsson, I., Olsson, B. M., Halvarsson, M. O., Danielsson, D., Aslund, N., Ljungh, A., Wadstrom, T. und Karlsson, K. A. (1998) The lactosylceramide binding specificity of *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* **8**, 297-309.
- [531] Bosio, A., Binczek, E., Haupt, W. F. und Stoffel, W. (1998) Composition and biophysical properties of myelin lipid define the neurological defects in galactocerebroside- and sulfatide-deficient mice. *J. Neurochem.* **70**, 308-315.
- [532] Uchida, Y., Iwamori, M. und Nagai, Y. (1990) Activation of keratinization of keratinocytes from fetal rat skin with *N*-(*O*-linoleoyl) omega-hydroxy fatty acyl sphingosyl glucose (lipokeratinogenoside) as a marker of epidermis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 162-168.
- [533] Kendler, A. und Dawson, G. (1990) Progressive hypoxia inhibits the de novo synthesis of galactosylceramide in cultured oligodendrocytes. *J. Biol. Chem.* **265**, 12259-12266.
- [534] Mikami, M., Tukazaki, K., Nozawa, S., Iwamori, M. und Nagai, Y. (1992) Menstrual cycle-associated expression of 2-hydroxy fatty acyl phytosphingosine-containing GlcCer, LacCer and Gb₃Cer in human uterine endometrium. *Biochim. Biophys. Acta* **1125**, 104-109.
- [535] Nakakuma, H., Arai, M., Kawaguchi, T., Horikawa, K., Hidaka, M., Sakamoto, K., Iwamori, M., Nagai, Y. und Takatsuki, K. (1989) Monoclonal antibody to galactosylceramide: discrimination of structural difference in the ceramide moiety. *FEBS Lett.* **258**, 230-232.
- [536] van der Bijl, P., Strous, G. J., Lopes-Cardozo, M., Thomas-Oates, J. und van Meer, G. (1996) Synthesis of non-hydroxy-galactosylceramides and galactosyldiglycerides by hydroxy-ceramide galactosyltransferase. *Biochem. J.* **317**, 589-597.
- [537] Breimer, M. E., Karlsson, K. A. und Samuelsson, B. E. (1975) Presence of phytosphingosine combined with 2-hydroxy fatty acids in sphingomyelins of bovine kidney and intestinal mucosa. *Lipids* **10**, 17-19.
- [538] Gerdt, S. (1997) Doktorarbeit: *Isolierung und strukturelle Charakterisierung von Glykosphingolipiden aus einzelnen Larvenstadien von Caenorhabditis elegans*. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- [539] Baumeister, S., Dennis, R. D., Klunder, R., Schares, G., Zahner, H. und Geyer, E. (1994) *Litomosoides carinii*: macrofilariae-derived glycolipids - chromatography, serology and potential in the evaluation of anthelmintic efficacy. *Parasite Immunol.* **16**, 629-641.
- [540] Helling, F., Dennis, R. D., Weske, B., Nores, G., Peter-Katalinic, J., Dabrowski, U., Egge, H. und Wiegandt, H. (1991) Glycosphingolipids in insects - The amphoteric moiety, *N*-acetylglucosamine-linked phosphoethanolamine, distinguishes a group of ceramide oligosaccharides from the pupae of *Calliphora vicina* (Insecta: Diptera). *Eur. J. Biochem.* **200**, 409-421.
- [541] Sickmann, T., Weske, B., Dennis, R. D., Mohr, C. und Wiegandt, H. (1992) Chemical distribution of glycosphingolipids in third-instar larval organs of the blowfly, *Calliphora vicina* (Insecta: Diptera). *J. Biochem.* **111**, 662-669.
- [542] Weske, B., Dennis, R. D., Helling, F., Keller, M., Nores, G. A., Peter-Katalinic, J., Egge, H., Dabrowski, U. und Wiegandt, H. (1990) Glycosphingolipids in insects. Chemical structures of two variants of a glucuronic-acid-containing ceramide hexasaccharide from a pupae of *Calliphora vicina* (Insecta: Diptera), distinguished by a *N*-acetylglucosamine-bound phosphoethanolamine sidechain. *Eur. J. Biochem.* **191**, 379-388.
- [543] James, S. und Lichtenberg, F. V. (1965) Host response to eggs of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **14**, 727-735.
- [544] Ishihara, H., Takahashi, N., Oguri, S. und Tejima, S. (1979) Complete structure of the carbohydrate moiety of stem bromelain. *J. Biol. Chem.* **254**, 10715-10719.

- [545] Tretter, V., Altmann, F., Kubelka, V., März, L. und Becker, W. M. (1993) Fucose α 1,3-linked to the core region of glycoprotein *N*-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **102**, 259-266.
- [546] Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1982) Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2700-2704.
- [547] Ariga, T., Bhat, S., Kanda, T., Yamawaki, M., Tai, T., Kushi, Y., Kasama, T., Handa, S. und Yu, R. K. (1996) Expression and localization of Lewis(x) glycolipids and GD1a ganglioside in human glioma cells. *Glycoconj. J.* **13**, 135-145.
- [548] Ariga, T., Tao, R. V., Lee, B. C., Yamawaki, M., Yoshino, H., Scarsdale, N. J., Kasama, T., Kushi, Y. und Yu, R. K. (1994) Glycolipid composition of human cataractous lenses. Characterization of Lewis X glycolipids. *J. Biol. Chem.* **269**, 2667-2675.
- [549] Dasgupta, S., Hogan, E. L. und Spicer, S. S. (1996) Stage-specific expression of fuco-neolacto- (Lewis X) and ganglio-series neutral glycosphingolipids during brain development: characterization of Lewis X and related glycosphingolipids in bovine, human and rat brain. *Glycoconj. J.* **13**, 367-375.
- [550] Nyame, A. K., Pilcher, J. B., Tsang, V. C. W. und Cummings, R. D. (1997) Rodents infected with *Schistosoma mansoni* produce cytolytic IgG and IgM antibodies to the Lewis X antigen. *Glycobiology* **7**, 207-215.
- [551] Hanfland, P., Kordowicz, M., Peter-Katalinic, J., Pfannschmidt, G., Crawford, R. J., Graham, H. A. und Egge, H. (1986) Immunochemistry of the Lewis-group system: isolation and structures of Lewis-c active and related glycosphingolipids from the plasma of blood-group O Le(a-b-) nonsecretors. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 655-672.
- [552] Streit, A., Yuen, C. T., Loveless, R. W., Lawson, A. M., Finne, J., Schmitz, B., Feizi, T. und Stern, C. D. (1996) The Le(x) carbohydrate sequence is recognized by antibody to L5, a functional antigen in early neural development. *J. Neurochem.* **66**, 834-844.
- [553] Thurl, S., Henker, J., Siegel, M., Tovar, K. und Sawatzki, G. (1997) Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconj. J.* **14**, 795-799.
- [554] Smalheiser, N. R., Haslam, S. M., Sutton Smith, M., Morris, H. R. und Dell, A. (1998) Structural analysis of sequences O-linked to mannose reveals a novel Lewis X structure in cranin (dystroglycan) purified from sheep brain. *J. Biol. Chem.* **273**, 23698-23703.
- [555] Fukuda, M., Spooncer, E., Oates, J. E., Dell, A. und Klock, J. C. (1984) Structure of sialylated fucosyl lactosaminoglycan isolated from human granulocytes. *J. Biol. Chem.* **259**, 10925-10935.
- [556] Fukuda, M. N., Dell, A., Oates, J. E., Wu, P., Klock, J. C. und Fukuda, M. (1985) Structures of glycosphingolipids isolated from human granulocytes. The presence of a series of linear poly-*N*-acetyllactosaminylceramide and its significance in glycolipids of whole blood cells. *J. Biol. Chem.* **260**, 1067-1082.
- [557] Asada, M., Furukawa, K., Kantor, C., Gahmberg, C. G. und Kobata, A. (1991) Structural study of the sugar chains of human leukocyte cell adhesion molecules CD11/CD18. *Biochemistry* **30**, 1561-1571.
- [558] Monteiro, M. A., Chan, K. H., Rasko, D. A., Taylor, D. E., Zheng, P. Y., Appelmelk, B. J., Wirth, H. P., Yang, M., Blaser, M. J., Hynes, S. O., Moran, A. P. und Perry, M. B. (1998) Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between *H. pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *J. Biol. Chem.* **273**, 11533-11543.
- [559] Chan, N. W., Stangier, K., Sherburne, R., Taylor, D. E., Zhang, Y., Dovichi, N. J. und Palcic, M. M. (1995) The biosynthesis of Lewis X in *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* **5**, 683-688.
- [560] Sherburne, R. und Taylor, D. E. (1995) *Helicobacter pylori* expresses a complex surface carbohydrate, Lewis X. *Infect. Immun.* **63**, 4564-4568.
- [561] Borojevic, R., Santos-da-Silva, C. und Carvalho, E. A. (1983) Chronic schistosomiasis mansoni: splenic myelopoiesis and inhibition of neutrophil granulocytopoiesis mediated by the sera of patients. *J. Infect. Dis.* **148**, 422-426.
- [562] Chmiela, M., Wadstrom, T., Folkesson, H., Planeta Malecka, I., Czkwianianc, E., Rechcinski, T. und Rudnicka, W. (1998) Anti-Lewis X antibody and Lewis X-anti-Lewis X immune complexes in *Helicobacter pylori* infection. *Immunol. Lett.* **61**, 119-125.
- [563] Moran, A. P., Prendergast, M. M. und Appelmelk, B. J. (1996) Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**, 105-115.
- [564] Bakker, H., Agterberg, M., van Tetering, A., Koeleman, C. A., van den Eijnden, D. H. und van Die, I. (1994) A *Lymnaea stagnalis* gene, with sequence similarity to that of mammalian β 1-4-galactosyltransferases, encodes a novel UDP-GlcNAc:GlcNAc β -R β 1-4-*N*-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* **269**, 30326-30333.

- [565] Bakker, H., van Tetering, A., Agterberg, M., Smit, A. B., van den Eijnden, D. H. und van Die, I. (1997) Deletion of two exons from the *Lymnaea stagnalis* β 1-4-*N*-acetylglucosaminyltransferase gene elevates the kinetic efficiency of the encoded enzyme for both UDP-sugar donor and acceptor substrates. *J. Biol. Chem.* **272**, 18580-18585.
- [566] de Water, R., van Marck, E. A., Fransen, J. A. und Deelder, A. M. (1987) Ultrastructural localization of the circulating anodic antigen and the circulating cathodic antigen in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*: a sequential study. *Exp. Parasitol.* **64**, 499-509.
- [567] Deelder, A. M., van Zeyl, R. J., Fillie, Y. E., Rotmans, J. P. und Duchenne, W. (1989) Recognition of gut-associated antigens by immunoglobulin M in the indirect fluorescent antibody test for schistosomiasis mansoni. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**, 364-367.
- [568] Hokke, C. H., Neeleman, A. P., Koeleman, C. A. M. und van den Eijnden, D. H. (1998) Identification of an α 3-fucosyltransferase and a novel α 2-fucosyltransferase activity in cercariae of the schistosome *Trichobilharzia ocellata*: biosynthesis of the Fuc α 1-2Fuc α 1-3[Gal(NAc) β 1-4]GlcNAc sequence. *Glycobiology* **8**, 393-406.

Danksagung

Prof. Dr. Rudolf Geyer danke ich herzlich für die Themenstellung, für seine Hilfsbereitschaft, seine engagierte Betreuung, seine ansteckende Begeisterung für biochemische Analytik sowie für die sehr guten Arbeitsbedingungen in seiner Gruppe.

Herzlich bedanke ich mich weiterhin bei PD Dr. Roger Dennis für sein großes Engagement, sein stetes Interesse, seine Diskussionsbereitschaft und die vielfältige Unterstützung, die diese Arbeit erst möglich machte.

Dr. Günter Lochnit danke ich für seine kompetenten Ratschläge und seine Hilfe, die ich häufig in Anspruch nahm.

Werner Mink, Peter Käse und Siegfried Kühnhardt danke ich für die Durchführung verschiedener Analysen sowie für ihre Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch Markus Schwinn, Daniela Zimmer, Katharina Ruckelshausen, Christian Elmshäuser, Valentina Kempf, Christian Röhrich, Christian Haug und Birgit Müller für die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit.

Bei Dr. Hildegard Geyer, Dr. Stefan Gerdt, Dr. Andrea Pahmeier, Dr. Jutta Hensel, Annette Sauer, Claudia Friedl, Sonja Nispel, Sandra Rickhoff, Clemens Berkefeld und Tobias Bausch bedanke ich mich für die Unterstützung und die Diskussionen.

Herrn Dr. M. J. Doenhoff (University of North Wales, Bangor, UK) danke ich für die großzügigen und zuverlässigen Lieferungen von Parasitenmaterial, für seine Anregungen und seine Gastfreundschaft.

Bei Prof. Dr. A. Pingoud bedanke ich mich für die Betreuung der Arbeit seitens des Fachbereichs Biologie.

Dr. Bernhard Kniep (Technische Universität Dresden), Dr. Quentin Bickle (London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK), Dr. David Dunne (University of Cambridge, UK), Friedrich Altmann (Universität Wien), sowie Dr. Andreas Ruppel und Jürgen Schmitt (Universität Heidelberg) danke ich für die Bereitstellung von Antikörpern.

Bei allen Hochschullehrern des Graduiertenkollegs "Molekulare Biologie und Pharmakologie", insbesondere bei Prof. Dr. Manfred Kröger, bedanke ich mich, daß ich von den angebotenen Seminaren und Praktika profitieren durfte.

Prof. Dr. Rudolf Geyer, PD Dr. Roger Dennis, Claudia Friedl, Sandra Rickhoff, Rita Krumscheid, Holger Linnertz, Beate Böhm und meiner Ehefrau, Helene Wuhler, danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meiner Ehefrau danke ich für die vielfältige Unterstützung während der gesamten Doktorarbeitszeit.