

I.1 Die Scheide der Mikrofilarien

Ausschließlich die Erreger der lymphatischen Filarose setzen gescheidete Mikrofilarien (L1) frei. Die Scheide ist eine flexible, die Mikrofilarie allseitig umschließende, lose Hülle und stellt wegen ihrer Undurchlässigkeit für Antikörper die eigentliche Interaktionsfläche zwischen der Larve 1 und dem Immunsystem des Wirts dar.

I.2.1 Genese, Morphologie und Ultrastruktur

Die Scheide besteht aus zwei Schichten, der Basis- und der Partikelschicht, die jeweils unterschiedlicher Herkunft sind. Die Genese und Ultrastruktur der Scheiden von *L. sigmodontis* und *B. malayi* sind weitgehend homolog. Die innen liegende Basisschicht entsteht aus der Eihülle, die in der Embryonalentwicklung der Mikrofilarie zunächst auf eine Dicke von ca. 20 bzw. 35 nm anwächst. Durch Streckung der Mikrofilarie wird sie, vermutlich durch Dehnung, auf ca. 2-3 bzw. 7 nm ausgedünnt. In der späten Reifungsphase (s. Abb. 5) wird von Uterusepithelzellen sezerniertes Material auf die Basisschicht aufgelagert und somit die Partikelschicht gebildet (uterine Schicht). Sie erscheint perlenkettenartig mit einer „Perlendicke“ von ca. 40-80 nm [50].

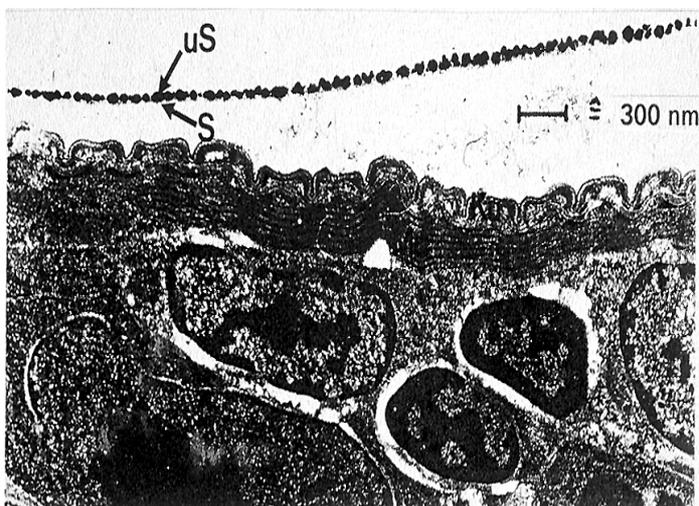


Abb. 5: Reife Mikrofilarie mit stark ausgedünnter Scheide (S) und aufgelagerter uteriner Schicht (uS) [50]

I.2.2 Histochemische Untersuchungen

Allen angeführten Untersuchungen liegt die Beobachtung zugrunde, daß die Mikrofilarienscheide generell eine polyanionische Oberfläche besitzt, mit Eigenschaften, die auf Kohlenhydrate hinweisen. Wie Simpson et al. folgerten, sollen die Mikrofilarienscheiden von *B. pahangi* und *B. patei* sulfatierte Proteoglykane enthalten [51]. Weiterhin wurden bei *B. pahangi*, *B. patei*, *L. loa* und *W. bancrofti* periodatsensitive Proteoglykane, sulfatierte Polymere, Schwefelproteine und komplexe Lipide postuliert, wobei der polyanionische Charakter nach Neuraminidase- oder Hyaluronidase-Behandlung erhalten blieb. Die Anwesenheit sulfatierter Kohlenhydrate wurde ebenfalls durch die positive Färbung mit Ruthenium-Rot und Lanthanhydroxid bestätigt [52,53]. Demgegenüber wurden bei *W. bancrofti* keinerlei vicinale OH-Gruppen gefunden, die als Indikator für Kohlenhydrate gelten könnten, während kationisiertes Ferritin an der polyanionischen Oberfläche gebunden wurde [54].

I.2.3 Lektinbindungsstudien

Die Ergebnisse der Lektinbindungsstudien sind recht uneinheitlich. Generell läßt sich aber sagen, daß sich *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) fluoreszenzmikroskopisch nachweisen, aber elektronenoptisch nicht bestätigen läßt. GlcNAc konnte sowohl bei *B. pahangi*, *W. bancrofti*, *L. sigmodontis* als auch *B. malayi* nachgewiesen werden [55-58]. Fuhrmann und Piessens schlossen aus Studien mit *B. malayi* auf die Anwesenheit von Chitin, jedoch konnte goldmarkiertes GlcNAc-spezifisches Lektin (WGA) nicht an *B. malayi* und *L. sigmodontis* binden [59].

I.2.4 Isolierung und biochemische Analysen

Für die chemische Analyse der Mikrofilarienscheiden von *L. sigmodontis* und *B. malayi* wurde von Bardehle et al. und Klonisch et al. eine Methode zur Isolierung reinen Scheidenmaterials entwickelt (s. II.1) [60], das die Grundlage aller nachfolgenden Untersuchungen darstellt.

Die Arbeiten von Bardehle et al. ergaben eine chemische Zusammensetzung der Mikrofilarienscheide von 55 Gewichts-% Aminosäuren (Protein) und ca. 11% anorganischen Bestand-

teilen, besonders Phosphat - neben wenig Kohlenhydraten (8 Gewichts-%) [61]. Darunter wurden *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) und Uronsäuren im Verhältnis 1:1 gefunden, was auf die Anwesenheit von glykosaminoglykanähnlichen Strukturen zurückgeführt wurde. Außerdem wurde ein Scheidenprotein ansequenziert (shp1), kloniert und immunhistologisch im basalen Bereich der Scheide lokalisiert [62-64]. Durch die Arbeiten von Hintz et al. ließen sich noch fünf weitere Scheidenproteine isolieren und identifizieren [65,66]. Auf Grund dieser Daten war ein erstes Modell über den Aufbau der Mikrofilarienscheide möglich. So konnte mit Seren infizierter Mäuse gezeigt werden, daß shp3 und shp3a die dominanten Polypeptide der Scheidenoberfläche sind [67]. Ein Sequenzvergleich weist sie als mucinähnlich aus, mit charakteristischen serin- und threoninreichen Wiederholungsmotiven, die – wie die Arbeiten von Hintz ergaben – hochgradig mit DMAE, einem biogenen Amin und *N*-Acetylgalactosamin modifiziert sind [65].

Scheidenpoly-peptid*	Molekülmasse/ kDa			Resultierende ptMs***	Mol-% DMAE	Mol/Mol GalN
	SDS- PAGE cDNA	MS**	aus			
shp1	25	12.9	11.8	1.3	-	ca. 4
shp1a	28	11.1	8.7	2.4	-	n.b. ^a
shp3	120	(220/110)?	25.2	?	ca.60 (430)	ca. 6 (43) ^b
shp3a	40	45		33.7	ca.50 (110)	ca. 5 (11)
	11.3					
shp4	34	21.5	12.8	8.7	-	n.b. ^a

*carboxymethyliert **MALDI-TOF-MS ***posttranslationale Modifikationen

^a nicht bestimmt ^b Teilchenzahl bezogen auf die Masse 220 bzw.110kDa

Tab.1: Übersicht über einige Daten der Scheidenproteine shp1- shp4

Wie aus der Tabelle hervorgeht, weisen alle Scheidenproteine posttranslationale Modifikationen auf, wobei die Oberflächenproteine shp3 und 3a selektiv mit DMAE modifiziert sind. Bisher konnten weder die zur Klärung der Gesamtmasse an Modifikationen ausstehenden Bestandteile noch die Verknüpfungsart des Bausteins DMAE mit dem Polypeptid bestimmt werden. Die Anwesenheit von GalNAc in allen shps läßt jedoch darauf schließen, daß *O*-Glykosylierung einen wesentlichen Anteil der Modifikationen ausmacht.

I.2.5 Modifikationen

I.2.5.1ε-(γ-Glutamyl)-Lysin

Aus Versuchen mit Inhibitoren konnte in adulten Mikrofilarien von *B. malayi* Transglutaminaseaktivität nachgewiesen werden, welche kovalente ε-(γ-Glutamyl)-Lysin-Isodipeptidbindungen zwischen Proteinen knüpft [68]. Dieser Quervernetzungstyp wurde für die Schwerlöslichkeit der Scheide in SDS/2-Mercaptoethanol diskutiert, und das Enzym wurde isoliert und charakterisiert [69].

I.2.5.2Glykosylierung

Zur näheren Erläuterung der Modifizierung von Proteinen durch Oligosaccharide sollen im folgenden deren Synthese und die Mechanismen der *N*- und der *O*-Glykosylierung kurz zusammengefaßt werden. Eine grafische Darstellung über den generellen Biosyntheseweg der Glykosylierung eines Proteins in der Zelle gibt Abb. 6. Glykoproteine werden an den membrangebundenen Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (RER) synthetisiert. Während der Synthese werden sie ins Lumen des RER verlagert, wo sie entweder an der Membran gebunden bleiben oder abgelöst werden, je nach Bestimmung (Zelloberfläche oder Sekretion). Die Biosynthese der *N*- und der *O*-Glykane ist zwar sehr unterschiedlich, jedoch läßt sich generell sagen, daß die Glykosylierung während oder nach der Proteinbiosynthese (Translation) im RER beginnt. Danach werden die Glykoproteine mittels sich umhüllender Vesikel zum Golgi transportiert, in dem die Prozessierung und letztendliche Glykosylierung vervollständigt wird. Vom Golgi werden Plasmamembran- und sekretorische Glykoproteine zur Zelloberfläche sowie lysosomale Enzyme zu den Lysosomen transportiert.

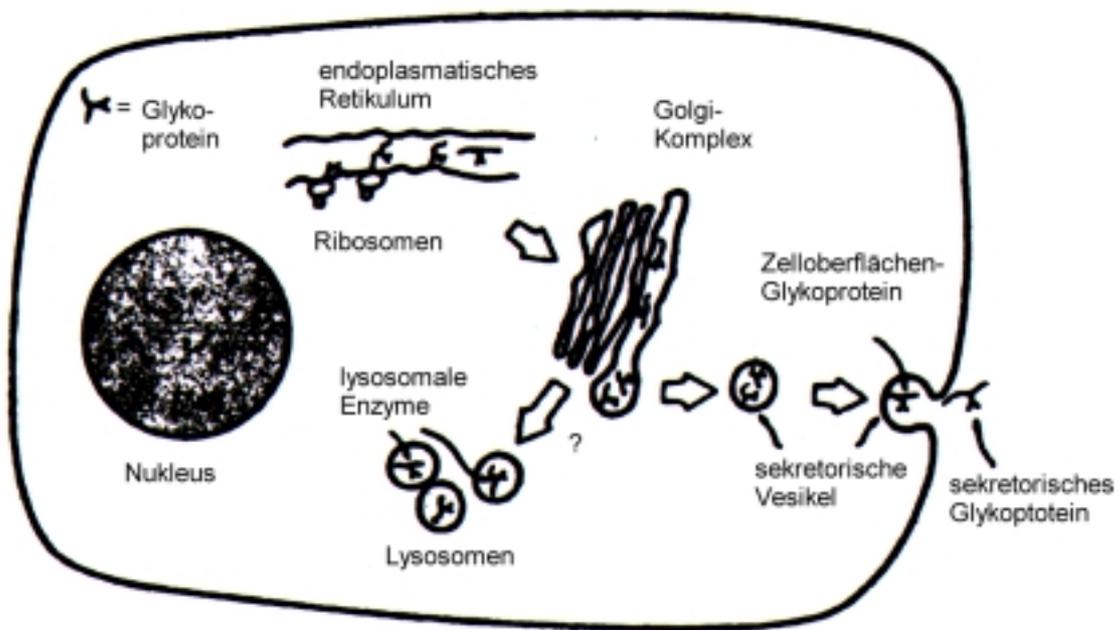


Abb. 6: Subzelluläre Lokalisation der Oligosaccharidbiosynthese

I.2.5.2.1 *N*-Glykosylierung

Die post- oder kotranslational ablaufende Biosynthese *N*-glykosidischer Oligosaccharide in Glykoproteinen kann allgemein in zwei Stadien unterteilt werden [70-81]. *N*-glykosidische Oligosaccharide werden aus einer lipidgebundenen Vorstufe, die aus drei Glucose-, neun Mannose- und zwei GlcNAc-Resten besteht [82,83], komplett auf die wachsende Polypeptidkette im RER auf Asparagin übertragen [84-86]. Das für eine Glykosylierung verwendete Sequon im Polypeptid besteht aus Asn-X-Ser/Thr, wobei X eine beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann [87,88]. Eine weitere Voraussetzung für die Glykosylierung ist eine für die Glykosyltransferasen zugängliche Sekundärstruktur. Dieses über Asparagin verknüpfte Glykoprotein-Oligosaccharid wird bereits im RER durch Glucosidasen und die ER-Mannosidase abgebaut und dann – in Vesikel verpackt - zum Golgi transportiert [88,89]. Das so „getrimmte“ Oligosaccharid kann dort unter Bildung von mannosereichen, hybriden oder Polylactosamin-Strukturen weiter prozessiert werden (s. Abb. 7). Die gemeinsame Kernstruktur der *N*-Glykane besteht aus: β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc – Asn

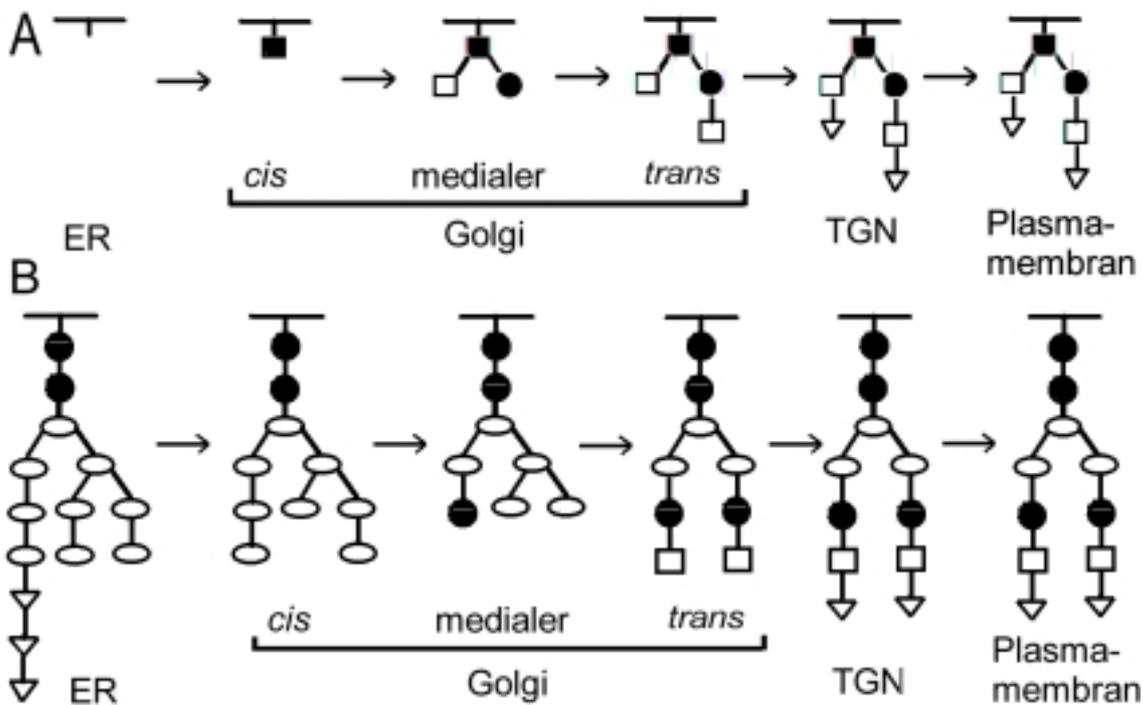


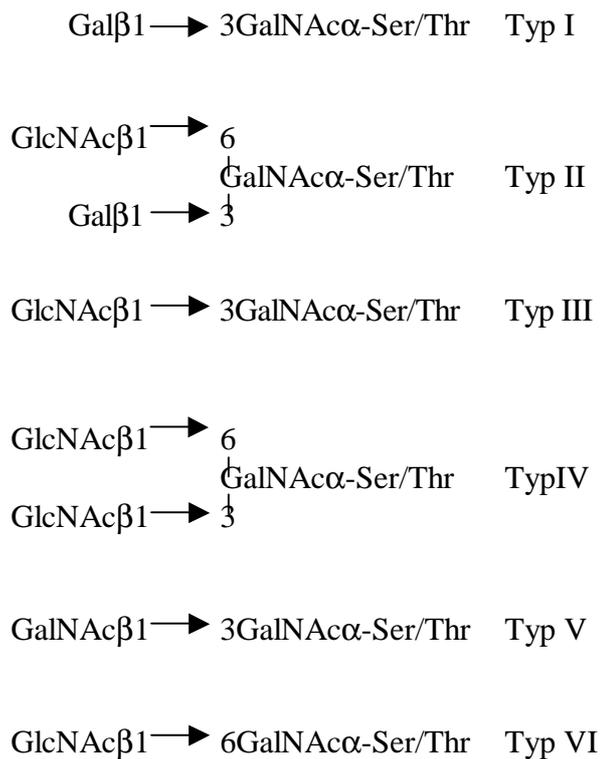
Abb. 7: Vereinfachtes Modell des Biosyntheseweges eines *O*-glykosidisch gebundenen Disialotetrasaccharids (A) und der Vergleich zur *N*-Glykosylierung (B). Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur einige Intermediate des *N*-Glykosylierungsweges gezeigt. Schwarze Quadrate: GalNAc, weiße Quadrate: Gal, schwarze Kreise: GlcNAc, weiße Ellipsen: Mannose, weiße Dreiecke: Sialinsäure

I.2.5.2.2 *O*-Glykosylierung

Im Gegensatz zu den *N*-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden verläuft die *O*-Glykosylierung posttranslational im ER oder *cis*-Golgi durch die schrittweise Übertragung von nukleotidaktivierten Monosacchariden mit Hilfe entsprechender Glykosyltransferasen [90]. Dabei stellt das jeweils gebildete Produkt das Substrat für den nächsten enzymatischen Transfer dar, so daß die Konzentration und die Aktivität der einzelnen Transferasen über den Aufbau bestimmter Strukturen entscheiden. Im ersten Schritt wird ein GalNAc-Rest (aus UDP-GalNAc) auf die Hydroxylgruppe eines Serins oder Threonins übertragen. Ein definiertes *O*-Glykosylier-

rungsmotiv wie bei *N*-Glykanen ist bisher nicht bekannt, jedoch zeigen Studien, daß durch Prolin flankierte serin- und threoninreiche Proteinregionen aufgrund der Bildung von sog. „ β -turns“ begünstigt sind, welche die Zugänglichkeit für die GalNAc-Transferase erleichtern. Weitere Substitutionen durch Gal/GlcNAc β 3 und/oder GlcNAc β 6 können folgen [89-96]. Die Biosynthese kann terminiert werden durch Transfer von Sialinsäure, Fucose und/oder Sulfat. Tab. 2 gibt einen Überblick über bisher gefundene Kernstrukturen.

Im Gegensatz zu den *N*- weisen *O*-glykosidisch substituierte Glykoproteinene also mehrere Kernstrukturen auf, die bis auf wenige Ausnahmen alle mit α -GalNAc an Serin/Threonin geknüpft beginnen [86]. Daneben kommen auch noch Proteoglykane mit *O*-Xylosyl-Serin(Threonin) [86,97], Kollagen mit *O*-Galactosyl-Hydroxylysin [86] und Kernporenproteine mit *O*-*N*-Acetylglucosaminyl-Serin als Verknüpfung vor [88].



Tab. 2: Es gibt mindestens sechs Kernstrukturen (Typ I-VI) in *O*-glykosidisch substituierten Glykoproteinen. Sie beginnen in der Regel am aglykonischen Ende mit einem α -GalNAc-Rest

I.2 Aufgabenstellung

Aus den bisherigen Analysedaten ergeben sich folgende Aufgaben:

- Zur Untersuchung auf Glykosaminoglykane und Teichonsäuren sollen möglichst sensitive mikroanalytische Methoden bzgl. Glycerol, Uronsäuren und Cholin erarbeitet werden.
- Es sollen die Strukturen der *O*-Glykane in den Mikrofilarienscheiden von *L. sigmodontis* analysiert und charakterisiert werden. Ferner sollen am isolierten Oberflächenprotein shp3a die zur Klärung der Gesamtmasse der Modifikationen noch fehlenden Bestandteile identifiziert werden. Auch hier sollen neue mikroanalytische Methoden, z.B. die der MALDI-TOF-Massenspektrometrie sowie der HPLC etabliert werden.
- Der Baustein DMAE und seine Verknüpfung im Fmoc-Derivat soll mit Hilfe der Protonen-Kernresonanzspektroskopie (¹H-NMR) strukturell aufgeklärt werden.
- Zwecks Gewinnung eines Antiserums gegen den Baustein DMAE sollen im Rahmen einer chemischen Synthese geeignete Hapten-Kopplungsmethoden für ein DMAE-tragendes Epitop erarbeitet und mit den im Hause verfügbaren Methoden charakterisiert werden.