

I Material und Methoden

I.1 Gewinnung von Mikrofilarienscheiden

Die Gewinnung mikrofilarienhaltigen Blutes mit Hilfe des in I.1.1 beschriebenen, aufrechterhaltenen Infektionszyklus wurde durch das Institut für Parasitologie der Universität Gießen (AG Zahner) gewährleistet.

Je nach Präparation wurden 10-15ml mikrofilarienhaltigen Blutes aus mit *Litomosoides sigmodontis* infizierten Mäusen in einem verschraubbaren 50ml Kunststoffzentrifugenröhrchen (NALGENE) geliefert und mit einer 46%-igen (m/v) Percoll-NaCl-Lösung der Dichte 1.061g/ml versetzt (SIGMA) und auf 25ml aufgefüllt. Nach Verschließen wurde ca. 60min bei 1000 x g zentrifugiert (Labofuge 6000, HERAEUS, Hanau). Die in einer deutlich sichtbar trüben Schicht aufkonzentrierten Mikrofilarien wurden abpipettiert und zum Waschen in einem neuen 50ml Kunststoffzentrifugenröhrchen mit azid-haltigem PBS¹⁾ auf 50ml aufgefüllt, gefolgt von 10min Sedimentation bei 1000 x g. Der Überstand wurde bis auf etwa 5ml mit einer wasserstrahlbetriebenen Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Die nunmehr dicht suspendierten Mikrofilarien wurden im Zentrifugenröhrchen durch schnelles Rotieren an einem Drehmotor in flüssigem Stickstoff als dünne Schicht an der Röhrchenwand schockgefroren und danach 20 Male abwechselnd auf 0°C aufgetaut und wieder schockartig gefroren. Eine grobe Vorreinigung dieses Gemenges wurde mittels fünfmaligen Zentrifugierens für 10-20s bei 2500 x g vorgenommen. Bei diesem Prozeß sedimentierten vorwiegend die Mikrofilarienkörper bzw. deren Trümmer, und der scheidenhaltige Überstand wurde jeweils vorsichtig abpipettiert und auf einem 5µm PTFE-Siebfilter eingeeengt (SARTORIUS, Göttingen); dabei sammelten sich die Mikrofilarienscheiden im Filtrat. Die Ultrafiltrationszelle (0.4ml, AMICON, Witten) wurde mit einem Filtrationsdruck von ca. 1bar betrieben. Anschließend wurde mit azid-haltigem PBS solange gewaschen, bis das Filtrat 50ml enthielt. Nach Sedimentation der Scheiden bei 5.500 x g für 10min wurde nunmehr durch ein 2µm-Siebfilter im gleichen Gerät filtriert und mit PBS gewaschen, bis erneut 50ml Filtrat entstanden. Das Filtrat wurde wie nach der ersten Filtration sedimentiert, das Sediment in 5ml azid-haltigem PBS suspendiert und in einem 5ml Gefrier Röhrchen (NALGENE) in flüssigem Stickstoff gelagert [60].

¹⁾ 8g NaCl, 0.2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄xH₂O, 0.2g KH₂PO₄, 0.5gNaN₃ auf 1000 ml Wasser

Die Reinheitskontrolle erfolgte anhand dreier Kriterien:

- ◆ Untersuchung des Filtrats auf evtl. vorhandene Mikrofilarienkörper im Phasenkontrastmikroskop
- ◆ Untersuchung des Bandenmusters aufgeschlossener Scheiden in der SDS-PAGE (s. II.4)
- ◆ Aminosäureanalyse (Gasphasenhydrolyse, s. II.3), bei der sich bei reinem Material ein Aminosäureprofil mit ca. 35Mol% Glutamat bzw. Prolin ergeben sollte

Das reine Scheidenmaterial befand sich im Filtrat und wurde in einem 4.5ml Kunststoffröhrchen in Flüssigstickstoff aufbewahrt.

II.2 Isolierung einzelner Scheidenproteine [65]

Das nach II.1 isolierte, reine Scheidenmaterial (ca. 1mg Proteinanteil) wurde in 2 Portionen zu je 500µg Protein pro Kunststoffmikroreaktionsgefäß (EPPENDORF) aufgeteilt, jeweils 30min bei 10000 x g sedimentiert und einmal durch Waschen mit 1ml Wasser von PBS befreit. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurden zu beiden Ansätzen jeweils 50µl ausschließlich Natriumionen enthaltendes PBS gegeben, um die Bildung eines schwerlöslichen Kalium-SDS-Niederschlags während der späteren Extraktion zu vermeiden. Danach wurden 400µl Denaturierungslösung (6M Guanidinhydrochlorid, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3; 1mM EDTA, 12.5µM Dithiothreitol) schnell hinzupipettiert, das Material ausgiebig suspendiert und nach Überschichten mit Argon 2h bei 37°C und 15min bei 100°C inkubiert. Die Alkylierung der freigesetzten Sulfhydryl-Gruppen erfolgte durch Zugabe von 55µl frisch bereiteter α -Iodessigsäure (SIGMA, 200mM in Denaturierungslösung ohne Dithiothreitol, pH 8.3, mit konz. NaOH eingestellt) und durch Inkubation für ca. 2h bei 37°C im Dunkeln unter Argon. Durch Zugabe von 2µl β -Mercaptoethanol (BIORAD) wurde die Reaktion gestoppt. Zur Entfernung gröberer Partikel wurde eine Filtration über 5µm Filtrationseinheiten (MILLIPORE) durchgeführt, welche zugleich den unlöslichen Anteil des Scheidenmaterials, der überwiegend aus dem quervernetzten shp2 bestand, von den löslichen Proteinen trennte. Das Filtrat wurde noch jeweils zweimal 30min bei 10.000 x g zentrifugiert, dessen Sediment bei 100°C mit 410µl Tris-HCl-Lösung (pH 8.5, 0.02%SDS) extrahiert und einmal 1h bei 100°C

mit Ultraschall behandelt. Nach jeder Extraktion erfolgte eine erneute Filtration über 5µm-Filter. Der Überstand nach jeder Zentrifugation wurde jeweils über 10.000Da-Filtrationseinheiten gegeben zur Aufkonzentration des löslichen Anteils (Ultrafree-MC, MILLIPORE). Alle Filtrate der Extraktionen wurden in einer 10.000Da-Filtrationseinheit vereinigt bzw. alle Filtrierrückstände in einer 5µm-Filtrationseinheit gesammelt und mit 200µl Tris-HCl (pH 8.5, 0.02% SDS) aufgenommen.

Die erste Fraktionierung des löslichen Anteils von 500µg Scheidenmaterial erfolgte mittels Gelfiltrations-HPLC (Geräte s. II.3 Normal-HPLC). Es wurde eine Diol-Säule (GF-250, ZORBAX, Bio Series) verwendet unter isokratischen Bedingungen mit einem 0.16M Phosphatpuffer (pH 7, 20% Acetonitril) als Eluenten, 1ml/min Flußrate. Während der Auftrennung – 200µl pro Injektion – wurden reproduzierbar stets vier Fraktionen zu je 0.6-1.2ml in jeweils einem 5ml Schliffgläschen mit Spitzboden unter Eiskühlung gesammelt und anschließend bei –20°C gelagert. Die Subfraktionierung erfolgte über reverse-phase-HPLC unter Verwendung einer 2.1x250mm Säule (C4 Phase, Vydac 300, MZ-ANALYSENTECHNIK, Mainz) mit den Eluenten A: 0.11% TFA (v/v) in Wasser, B: 0.08% TFA (v/v) in Acetonitril; Gradient: 0% B auf 100% B in 45min, Geräte s. II.3 Narrowbore HPLC.

II.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Normal-HPLC (Säuleninnendurchmesser > 4mm)

Die Analysen und präparativen Reinigungsschritte zur Isolierung von Scheidenkomponenten durch reverse-phase bzw. Gelfiltrationschromatographie erfolgten mit zwei HPLC-Anlagen, die im Hause unterhalten wurden. Für die Aminosäureanalytik und die präparative Vorfraktionierung einzelner Scheidenproteine wurde eine Anlage von GYNKOTEK (Germering) verwendet: Ternärer Gradientenformer Modell 250B, Hochdruckpumpe Modell 300C, RHEODYNE NZ 190 Einspritzventil, Säulenthmostat STH 585, UV-Detektor SP6, Fluoreszenzdetektor RF 1001, Spannungsschreiber (Servogor S, BROWN BOVERI, METRAWATT GmbH, Mannheim), Integrator-Software: Int450 (KONTRON)

„narrow bore“-HPLC (Säuleninnendurchmesser < 2.1mm)

Hierfür wurde eine Anlage von APPLIED BIOSYSTEMS (Weiterstadt) verwendet: Hochdruck-

Spritzendoppelkolbenpumpe 140B, Rheodyne 7125 Einspritzventil, UV-Detektor 785 A, Fluoreszenzdetektor 980 mit „cut off“-System, für jeden Detektor jeweils ein Integrator C-R3A (Gynkotec, Germering).

II.4 Fmoc-Aminosäureanalytik

Zur Quantifizierung der Menge des eingesetzten Scheidenproteins bzw. Aminosäuregehalts wurden 10µl in PBS suspendierte reine Mikrofilarien-Scheiden in einem geglähten gläsernen Hydrolyseröhrchen (50mm, 4mm I.D., MAGV) lyophilisiert und dieses zusammen mit einer Kunststoffhalterung in ein verschraubbares Polypropylen-Hydrolysegefäß (ROTH) überführt. Bei der Gasphasenhydrolyse wurden ca. 5ml 6M Salzsäure auf dem Gefäßboden vorgelegt und mit Argon entgast. Bei der Flüssigphasenhydrolyse wurde soviel Salzsäure vorgelegt, daß der Boden der Hydrolyseröhrchen darin eintauchte. Zusätzlich wurden 30µl Salzsäure auf das lyophilisierte Material im Röhrchen pipettiert. Das Polypropylengefäß wurde mit Argon befüllt, dann mit den darin befindlichen Glasröhrchen fest verschlossen und in einem Inkubationsofen bei 110°C für 10 bzw. 24h erhitzt.

In einer Rotationsvakuumpumpe (JOUAN, Unterhaching) wurde die überschüssige Salzsäure abgedampft und die Probe mit einem entsprechenden Aliquot einer 0.5M Boratlösung (pH 7.7) versetzt. Derivatisierung erfolgte durch Zugabe einer 25mM Fmoc-Lösung in Aceton. Überschüssiges Fmoc-Reagenz wurde nach 10min Reaktionszeit bei Raumtemperatur durch Zugabe einer 0.24M Adamantan-Hydrochloridlösung in Wasser abgefangen (Serva, Heidelberg). Dabei wurde jeweils ein Volumenverhältnis von 1:1:0.1 Probe zu Fmoc zu Adamantan-HCl eingehalten. Die bei der Aminosäureanalyse benötigte Mindestmenge beträgt ca. 40ng Protein bzw. 20ng Peptid [87,98-100]. Jeweils 10µl der mit Fmoc derivatisierten Lösung wurden mit Hilfe einer reverse-phase-Säule chromatographisch aufgetrennt und fluorimetrisch detektiert. Geräte s. II.3 Normal-HPLC. Trennsäule: 4x250mm, Superspher 100, C18 Phase endcapped (MERCK). Eluent A: 20mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 2.2mM Tetraethylammoniumhydrogensulfat, mit Phosphorsäure auf pH 2.8 eingestellt; Eluent B: wie A, pH 4.5, dann 20% des Puffervolumens durch Methanol ersetzt, Eluent C: Acetonitril. Gradient: von 73% A bzw. 27% C in 27min auf 60% A bzw. 40% C, dann 90s isokratisch. Anschließend von 64% B bzw. 36% C in 19min auf 25% B bzw. 75% C, dann 15min isokratisch; Fluß 1ml/min.

II.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Separation von Mikrofilarien-Scheidenproteinen und von chemischen Syntheseprodukten (s. II.10.1.1) wurde neben der HPLC (s. II.2 u. II.3) ausschließlich die SDS-PAGE herangezogen. Das verwendete Elektrophoresegerät war von BIORAD, München (Mini-Protean-II Modell 1000/500). Dabei wurde jeweils ein 12%-iges Trenngel mit 4%-igem Sammelgel verwendet. Hierfür wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

- Lösungen - A: 0.8g *N,N*-Methylenbisacrylamid in 100ml Acrylamid (30%)
 B: Tris-(hydroxyethyl)-aminomethan/HCl (36.3g in 100ml H₂O, pH 8.8)
 C: wie B (6g in 100ml H₂O, pH 6.8)
 D: 15g Tris-(hydroxyethyl)-aminomethan, 72g Glycin in 500ml H₂O
 E: 100µl SDS (10% w/v)
 F: (NH₄)₂S₂O₈ (10% w/v)
 G: *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin

Pipettierschema:

Trenngel: 4ml A + 2.5ml B + 3.35ml H₂O + 100µl E + 50µl F + 5µl G

Sammelgel: 1.3ml A + 2.5ml C + 6.1ml H₂O + 100µl E + 50µl F + 10µl G

Nach beendeter Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel aufgetragen. Das fertige Gel hatte eine Dicke von 0.75mm. Die zur elektrophoretischen Trennung nötige Stromzufuhr wurde jeweils 15min bei 100V und ca. 70min bei 150V gehalten.

II.6 Färbemethoden

II.6.1 Silberfärbung [101]

SDS-Polyacrylamidgele wurden in einem lichtundurchlässigen Gefäß mit 200ml einer wäßrigen Lösung aus 50% Methanol, 10% Essigsäure für ca. 2h fixiert, danach über Nacht mit Wasser gewaschen. Es folgte dreimaliges Waschen mit 50% Methanol (v/v) für je 10min und eine Vorbehandlung mit 0.8mM Natriumthiosulfatlösung sowie dreimaliges Waschen mit H₂O für jeweils 20s. Die Imprägnierung wurde mit einer 0.2%-igen (m/v) Silbernitratlösung (0.75% Formaldehyd, v/v) 10min durchgeführt. Anschließend wurde zweimal für 30s mit Wasser gewaschen und dann mit einer wäßrigen Lösung bestehend aus 566mM Natriumcarbo-

carbonat, 0.016mM Natriumthiosulfat und 0.05% (v/v) Formaldehyd für 3min entwickelt. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser für 30s wurde das Gel mit einer 50mM EDTA-Lösung für 10min behandelt und die Färbung durch Abgießen der Flüssigkeit gestoppt, anschließend erneut mit Wasser gewaschen.

II.6.2 Coomassie

Als Färbelösung wurden 0.05g Coomassie „brilliant blue“ R250 (Serva, Heidelberg) in 50ml einer Mischung bestehend aus Methanol, Essigsäure, Wasser (40:10:50; v/v) gelöst. Die Entfärbelösung enthielt keinen Coomassiefarbstoff. Die Gele wurden ca. 10-30min gefärbt und anschließend ca. 1h entfärbt.

II.6.3 Stains-All[®]-Färbung [102]

Hierzu wurde eine Stammlösung hergestellt, die 1g Stains-All (ICN) pro Liter Formamid enthielt und lichtgeschützt aufbewahrt wurde. Die wäßrige Färbelösung bestand aus 75ml Tris-(hydroxyethyl)-aminomethan/HCl, pH 8.8, 25% 2-Propanol (v/v), 5% Formamid (v/v) und 50ml Stammlösung. Die Gele wurden in lichtgeschützten Gefäßen behandelt und ca. 1h mit der in II.6.1.1 erwähnten Lösung fixiert und zweimal kurz mit Wasser gewaschen. Danach wurde über Nacht mit Färbelösung behandelt und ca. 10-30min mit Wasser entfärbt.

II.7 Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations – Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Zur Massenbestimmung isolierter Proteine, Peptide, Kohlenhydrate sowie Neokonjugate wurde ein Vision 2000-Gerät verwendet (FINNIGAN MAT, Bremen), das sowohl mit einem Reflektor als auch einem linearen Flugrohr ausgestattet ist. Für eine Messung wurde generell 1µl gelöstes Analysenmaterial (0.1% TFA, 75:25 Wasser:Acetonitril; v/v) mit 1µl DHBs-Lösung gemischt, welche aus 20mg 2,5-Dihydroxybenzoesäure (Gentisinsäure) und 2mg 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure - in 0.1% TFA und 50:50 Wasser:Acetonitril (v/v) gelöst -, bestand. Beim Eintrocknen der Mischung kokristallisiert die Probe mit diesen organischen Säuren und sollte idealerweise Einkristalle bilden. Das kristallisierte Gemenge wurde dann durch Stickstofflaserimpulse (3-10ns) durch Anregung bei 337nm desorbiert und gleichzeitig ionisiert. Durch ein Be-

schleunigungsspannungsfeld von 3kV wird das ionisierte Material ins Vakuum katapultiert und kann nun kräftefrei im linearen Flugrohr bzw. durch Anlegen einer Reflektorspannung im Detektor vermessen werden. Die Signalerzeugung gelingt mit einem Photoelektronendetektor. Der Vorteil dieser Art von Massenspektrometrie liegt – trotz geringerer Auflösung gegenüber der Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie (LSI-MS) – im sehr geringen Materialverbrauch, in der geringen Empfindlichkeit gegenüber Probenverunreinigungen und im weitreichenden Massenbereich bis ca. 200kDa [103].

II.8 Untersuchung auf Teichonsäure

II.8.1 Untersuchung auf Cholin

In mehreren Parallelansätzen wurden Mikrofilarienscheiden zu je 25µg bzgl. Protein aliquotiert, entsprechend einem Minimum an 0.1% Cholin, gereinigt (s. II.1) und einer modifizierten Hydrolyse nach SCHMIDT unterzogen, indem sie für 24h bei 110°C in einem Schraubverschlußgläschen mit Kunststoffdichtung mit 6M HCl unter Argon erhitzt wurden [104]. Ebenso wurden Ansätze in einem Polyethylen-Mikroreaktionsgefäß (EPPENDORF) über Nacht mit 48%(w/v) Flußsäure (HF) bei 4°C behandelt. Neben *Litomosoides* wurden ebenfalls Scheidenproben von *Brugia malayi* eingesetzt.

Nach anschließender Lyophilisation wurden die Proben mit 1ml deionisiertem Wasser aufgenommen – entsprechend einer theoretischen minimalen Menge von ca. 0.5 pmol Cholin/µl - und 30min mit einer Tischzentrifuge (HETTICH) bei 10.000 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden dann Aliquote von 40-100µl auf eine HPLC-Kationen-Austauschersäule gegeben (WHATMAN Partisphere SCX, 50µm sphärisch, 4.6x125mm I.D.; HPLC-Pumpe von GYNKOTEK Modell 300C, 143bar Säulendruck, 0.8mL Fluß, Puffer: 79mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 20mM NaH₂PO₄ x H₂O, 0.1mM EDTA und 4mM Tetramethylammoniumchlorid, pH 7.4, isokratischer Eluent).

Nach dem etablierten Verfahren von STADLER wurde dann das freigesetzte Cholin in einer Nachsäulen-Enzymreaktorkartusche (BIOMETRA, 30x12.5mm I.D.) mit immobilisierter Cholin-Oxidase quantitativ zu Betain und Wasserstoffperoxid umgesetzt, welches anschließend mit gepulster elektrochemischer Detektion an einer Platinelektrode (BIOMETRA EP 30) mit angeschlossenem Integrator gemessen wurde (Detektor: BIOMETRA PED 300;

Integrator: SHIMADZU C-R6 A Chromatopac). Als Referenzelektrode wurde eine Ag/AgCl-Elektrode eingesetzt [105]. Die Quantifizierung erfolgte durch Integration der Signale von analog präparierten Cholinstandards, mit deren Hilfe eine Kalibriergerade erstellt wurde (Cholinchlorid und DL- α -Lecithin).

II.8.2 Untersuchung auf Glycerol*

In vier parallelen Ansätzen und Kontrollen wurden jeweils 100 μ g Mikrofilarienscheidenprotein in 1.5ml-Polyethylen-Mikroreaktionsgefäßen (EPPENDORF) 30min bei 10.000 x g zentrifugiert, das Sediment einmal in 1ml deionisiertem Wasser suspendiert, erneut 30min zentrifugiert und das Wasser abgenommen. Das Sediment wurde mit ca. 50 μ l deionisiertem Wasser aufgenommen, in ein 2ml-Bördelgläschen überführt und anschließend über Silicagel im Exsikkator bei Ölpumpenvakuum getrocknet.

Nach Zugabe von 1ml 0.2M methanolischer KOH wurde das Gefäß mit einem Septum verschlossen und 1h bei 56°C erhitzt. Die Lösung wurde danach in ein Polyethylen-Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach Trockenziehen im Vakuum wurde die Probe mit ca. 30 μ l HF (48% w/v) versetzt und 24h bei 4°C belassen. Nach Entfernen der Flußsäure wurde dreimal mit je 500 μ l Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte über Na₂SO₄ getrocknet und in einer Pasteurpipette durch Glaswolle filtriert. Das Filtrat wurde sodann im Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand mit 200 μ l *N,N*-(Bis-trimethylsilyl)-trifluoracetamid (SIGMA) für 2h bei 80°C erhitzt und nach Abkühlen überschüssiges Reagenz mit Stickstoff abgeblasen.

Nach Aufnahme in einem definierten Volumen Chloroforms wurden Aliquote direkt in den Gaschromatographen injiziert (Modell 5890 HEWLETT-PACKARD, Temperaturgradient: von 55°C-220°C mit einer Aufheizrate von 10°C/s, 1min isotherm, Trägergas Helium mit 0.3 bar Säulenvordruck, Säule: Ultra-1, Methylsilicon-Beschichtung, 12m, 0.2mm I.D.).

Die Identifizierung des entstandenen trimethylsilylierten Glycerols im Gaschromatographen (GC) erfolgte über analog dargestellte Glycerolstandards und die Quantifizierung durch Integration der Signale in einem GC mit angeschlossenem Massenpektrometer (GC-MS, Modell 5970 HEWLETT-PACKARD). Die Spektren wurden mittels „electron impact“ (EI) Ionisation generiert und unter „autotune-Bedingungen“ aufgenommen.

*Die Glycerolanalysen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Moll am Forschungsinstitut Borstel durchgeführt.

Als interner Standard wurde für die Quantifizierung perdeuteriertes Glycerol verwendet, welches sich durch 5 Masseneinheiten vom nicht-deuterierten Glycerol unterschied, physikalisch jedoch identisch mit diesem ist. Die Auswertung erfolgte durch „total ion current“ (TIC) und „single ion monitoring“ (SIM).

II.9 Isolierung und Identifikation des Bausteins Dimethylaminoethanol (DMAE)

II.9.1 Präparative Gasphasenhydrolyse

Zur präparativen Isolierung von DMAE wurden mehrere, ca. 5-10 μ g Protein enthaltene Aliquote aus verschiedenen Scheidenpräparationen analog zu der in II.4 beschriebenen Methode der Aminosäureanalyse einer Gasphasenhydrolyse unterworfen, im Boratpuffer mit Fmoc derivatisiert und anschließend das Fmoc-DMAE-Derivat durch HPLC präparativ isoliert. Geräte: s. II.3; Chromatographiebedingungen s. II.4. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend im TFA-Acetonitrilgradienten auf derselben Säule entsalzt, gesammelt und lyophilisiert.

Analog dazu wurde käufliches DMAE (SIGMA) derivatisiert und isoliert.

II.9.2 NMR-Messung

Zur Bestimmung der Verknüpfung der Fmoc-Gruppe mit DMAE und damit der Struktur des Derivats wurde das in II.9.1 gesammelte Produkt bzw. der Standard in deuteriertem Chloroform (CDCl₃) aufgenommen, in ein Glasröhrchen überführt und in einem 400MHz-Kernresonanzspektrometer (BRUKER) vermessen. Dabei wurde sowohl ein eindimensionales ¹H-NMR als auch ein ¹H,¹H-Korrelationsspektrum (COSY-Experiment) aufgenommen. Die nötige Mindestmenge an reinem Material betrug ca. 20nmol und ist wiederverwertbar.

II.10 Analyse der Kohlenhydrate

Hierzu wurden jeweils 100 μ g Scheidenprotein vergleichend in einem Kunststoff-Mikroreaktionsgefäß lyophilisiert. Die Proteinmenge wurde entsprechend dem Gehalt an Aminozucker gewählt, der durch Fmoc-Aminosäureanalytik bestimmt wurde (s. II.4) und gut im Meßbereich lag. Eine der Proben wurde dann, wie in II.8.1 beschrieben, mit Flußsäure behandelt und auf-

bereitet. Anschließend wurden beide Proben in jeweils ein verschraubbares Hydrolyseglasröhrchen überführt, lyophilisiert und mit 500µl 0.25M Schwefelsäure in 85% Essigsäure (MERCK, Darmstadt) in einer Argonatmosphäre 16h bei 80°C erhitzt. Es folgte Zugabe von 550µl einer 0.5M Natronlauge (MERCK, Darmstadt), Trocknen in einer Vakuumzentrifuge (JOUAN, Unterhaching) und zur Entfernung der restlichen Essigsäure eine zweimalige Aufnahme in 500µl Wasser mit anschließender Lyophilisation. Die freigesetzten Monosaccharide wurden durch Zugabe von 500µl 300mM Natriumborhydrid-Lösung gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur reduziert. Nach Zugabe von 150µl 1M Essigsäure wurde lyophilisiert. Die entstandene Borsäure wurde dreimal mit jeweils 2ml Methanol (PROMOCHEM, Wesel), das 1% Essigsäure enthielt, aufgenommen und im Stickstoffstrom als Methylester abgedampft. Die Acetylierung erfolgte dann durch Zugabe von 400µl Acetanhydrid und 400µl Pyridin und Erhitzen auf 100°C für 1h. Die Alditolacetate wurden in 4ml Dichlormethan aufgenommen (PROMOCHEM) und die Lösung viermal mit 1ml Wasser gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase im Stickstoffstrom getrocknet und bis zur weiteren Analyse in 50µl Dichlormethan bei -20°C aufbewahrt. Die gewonnenen Alditolacetate wurden gaschromatographisch separiert und identifiziert. Die Trennungen erfolgten unter Verwendung von Quarzkapillaren mit chemisch gebundenen Phasen (DB1: 60m, DB 210: 30m; ICT, Frankfurt). Als Trägergas wurde Wasserstoff im Gaschromatographen mit einem Druck von 1bar bzw. Helium (GC/MS) mit einem Druck von 2bar eingesetzt. Die Proben wurden nach dem Prinzip der beweglichen Nadel, ein Aufgabesystem für schwer flüchtige Substanzen, auf die Säule gebracht. Temperaturgradient: von 130-200°C steigend bei 1,2°C/min, dann 5°C/min steigend bis 250°C. Die Ionisierung erfolgte unter einem NH₃-Quellendruck von 0.13mbar. Die Pseudomolekülonen wurden durch Single Ion Monitoring erfaßt.

II.10.1 Reduktive Beta-Eliminierung von *O*-Glykanen [45,106-108]

Ca. 1mg suspendiertes Scheidenmaterial wurde in einem Kunststoff-Mikroreaktionsgefäß durch Zentrifugation bei 10.000 x g sedimentiert, zur Entfernung von Salzen mit 1ml Wasser gewaschen und nach erneutem Sedimentieren lyophilisiert. Anschließend wurden 500µl 1M Natriumborhydrid-Lösung (in 0.05M Natronlauge) und 500µl 0.2M Natronlauge zugegeben. Nach 24h Inkubation bei 37°C erfolgte Zugabe von 200µl frischer Natriumborhydrid-Lösung,

gefolgt von weiteren 24h Inkubation. Die Lösung wurde mit wenigen Mikrolitern konzentrierter Essigsäure auf pH 6 eingestellt und die entstehende Borsäure wie in II.10 entfernt. Der Rückstand wurde in 200µl Wasser aufgenommen und durch Gelfiltration auf einer Bio-Gel P2-Säule (400 mesh, BioRad; 1x25cm) im Ammoniumacetatpuffer, 100mM, pH 6, fraktioniert. Untersuchungen an kleineren Aliquoten von *L. sigmodontis* hatten gezeigt, daß die negativ geladenen, substituierten Glykane - gegenüber reinem Wasser als Eluenten – bei Verwendung eines schwachen Puffers im Gel eine geringere Diffusion, und somit geringere Elutionsvolumina, aufwiesen. Zur Bestimmung der kohlenhydrat-haltigen Fraktionen wurden Aliquote, wie in II.4 beschrieben, analysiert und entsprechende Fraktionen vereinigt. Diese wurden dann über eine kleine reverse-phase Vorsäule (20x2 mm I.D., C18 Phase, LiChrospher 100, MERCK) vorgetrennt (Gerät: s. II.3 Narrowbore HPLC). Die Elution und Fraktionierung erfolgten durch 100mM Ammoniumacetat, pH 6.0, (Eluent A) und steigendem Acetonitrilgehalt (Eluent B: wie A mit 80% Acetonitril; v/v); Gradient: 0% B auf 100% B in 50min, 200µl/min Flußrate. Die kohlenhydrat-haltigen Fraktionen, die während der ersten 25 Minuten eluierten, wurden zu einer Stammfraktion im Schliffgläschen vereinigt, lyophilisiert und für die anschließenden Methylierungsanalysen bereit gehalten. Der Gehalt an GalNAc betrug mindestens 50µg.

II.10.2 Freisetzung der *O*-Glykane mit Hydrazin

Für jede der nachfolgenden, nicht reduzierenden Freisetzungen der *O*-Glykane wurden jeweils ca. 500µg Scheidenmaterial eingesetzt, entsprechend ca. 50µg GalNAc.

II.10.2.1 Methode nach Kobata [109,110]

Lyophilisiertes Scheidenmaterial wurde im Kunststoff-Mikroreaktionsgefäß mit 500µl wasserfreiem Hydrazin versetzt und nach Überschichtung mit Argon für 14 Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde das Hydrazin (SIGMA) in der Vakuumzentrifuge abgedampft und dreimal mit je 500µl Toluol (Uvasol, MERCK) azeotrop vertrieben.

II.10.2.2 Methode nach Patel [111]

Lyophilisiertes Scheidenmaterial wurde in einem 5ml Glasröhrchen mit Schraubverschluß (MAGV) mit 1ml wasserfreiem Hydrazin versetzt, mit Argon überschichtet, gut verschlossen und 4h im Inkubationsofen bei 95°C behandelt. Unter diesen Bedingungen wurden sowohl *O*- als auch *N*-Glykane als Hydrazone freigesetzt.

II.10.2.3 Methode nach Cooper [112]

Im Unterschied zu den beiden obigen Methoden wurde lyophilisiertes Scheidenmaterial mit 200µl 50% (v/v) wäßrigem Hydrazin in 0.4M Triethylamin (SIGMA) oder wahlweise 0.2M Natronlauge (MERCK) solubilisiert und 18h bei 45°C inkubiert. Anschließend wurde in einer Rotationsvakuumpumpe abgedampft und mit Toluol azeotrop abgedampft. Der mit Natronlauge behandelte Ansatz wurde mit 200µl 0.1M Salzsäure neutralisiert und in einer Bio-Gel P2-Gelfiltrationssäule fraktioniert (s. II.10.1); Fraktionen zu je 1ml wurden während der ersten 30 Minuten Elution gesammelt, in einem Schliffgläschen vereinigt und lyophilisiert.

Zur Entfernung der Hydrazongruppe wurden die nach II.10.2.1-II.10.2.3 entstandenen Hydrazone jeweils nach der Lyophilisation in einem Schliffgläschen mit 40µl gesättigter NaHCO₃-Lösung, die 2µl Acetanhydrid enthielt, versetzt und unter Eiskühlung 20min stehengelassen. Nach Aufnahme in 160µl Wasser wurde wie in II.10.1 gelfiltriert und gesammelt. Die *N*-acetylierten Glykane wurden dann mit 500µl 50% (v/v) wäßrigem Aceton im Kunststoffreaktionsgefäß versetzt, gut verschlossen und bei 50°C über Nacht inkubiert. Bei diesem Verfahren wurde das chemische Gleichgewicht vom acetylierten Osazon zum flüchtigen Aceton-Hydrazon verschoben. Nach Lyophilisation konnten die reduzierenden Glykane wie in II.10.4.1 und II.10.4.2 derivatisiert werden.

II.10.3 Methylierung von Glykanen [113-119]

Die freigesetzten und aufgearbeiteten Oligosaccharide wurden in 300µl gläserne Mikroreaktionsgefäße (ZINSSER, Frankfurt) pipettiert, lyophilisiert und über Nacht bei 37°C im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet (Sicapent, MERCK, Darmstadt). Nach Fluten mit getrocknetem Argon wurden in die Gefäße 50µl wasserfreies DMSO (Merck) gegeben und die Proben 90min im Ultraschallbad gelöst. Anschließend erfolgte Zugabe von 50µl 2M Butyllithium in DMSO und Abkühlen auf -20°C. Die Permethylierung wurde durchgeführt durch Zugabe von 50µl frisch destilliertem Iodmethan und 90min Inkubation im Ultraschallbad bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben mit 150µl Wasser versetzt und auf Chromabond C18ec-Säulen (15x100mm) gegeben, welche zuvor mit 5ml Wasser, 5ml Acetonitril, 5ml Methanol und wieder schließlich mit 10ml Wasser equilibriert worden waren. Die Säulen wurden mit 5ml Wasser gewaschen, dann nacheinander mit jeweils

5ml 10% (v/v) wäßrigem Acetonitril, 100% (v/v) Acetonitril und Chloroform eluiert. Die acetonitril- und chloroform-haltigen Fraktionen enthielten die methylierten Glykane, wurden vereinigt und im Stickstoffstrom getrocknet.

II.10.4 Derivatisierung freigesetzter Oligosaccharide

II.10.4.1 Derivatisierung mit 1-Phenyl-3-methyl-pyrazolin-5-on (PMP) [120]

Die nach II.10.2.1-II.10.2.3 freigesetzten Oligosaccharide wurden in einem Kunststoff-Reaktionsgefäß mit 30µl einer 0.5M methanolischen PMP-Lösung (ALDRICH) suspendiert und anschließend mit 30µl 0.3M NaOH-Lösung gemischt. Analog wurden mit dem käuflich erwerbbaaren Disaccharid Gal-GalNAc (SIGMA) und den Monosacchariden GalNAc, GlcNAc, Gal und Glc (jeweils SIGMA) als Referenzverbindungen verfahren. Das Kunststoff-Reaktionsgefäß wurde gut verschlossen und 2h bei 70°C inkubiert. Danach wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 0.3M HCl-Lösung neutralisiert und anschließend 5min bei 10.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200µl Wasser vermischt. Nach Zugabe von 300µl Ethylacetat und einigen Sekunden intensiven Mischens (Vortex) wurde die obere organische Phase abpipettiert und verworfen. Dieser Vorgang wurde noch weitere zwei Male wiederholt, um den größten Anteil an überschüssigem PMP-Reagenz zu entfernen. Die wäßrige Phase wurde dann lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Alternativ konnte die Probe auch direkt nach Extraktion auf eine reverse phase-HPLC-Säule injiziert werden. Eluent A bestand aus 0.1M Ammoniumacetat, pH 5.5 (10% Acetonitril, v/v); Eluent B bestand aus Eluent A mit 25% Acetonitril (v/v). Die Trennung der Oligosaccharide erfolgte auf einer 2.1x250mm Nucleosil C18, 5µm reverse phase-HPLC-Säule (BISCHOFF). Gradient: von 10% auf 100% B in 55 min bei 200µl/min; Geräte s. II.3 Narrowbore HPLC. Detektion erfolgte bei 245nm Extinktion. Um eine optimale Trennleistung der Säule zu gewährleisten, wurde vor jedem analytischen wie präparativen Lauf ein Gemisch der PMP-markierten Referenzsubstanzen aufgetrennt.

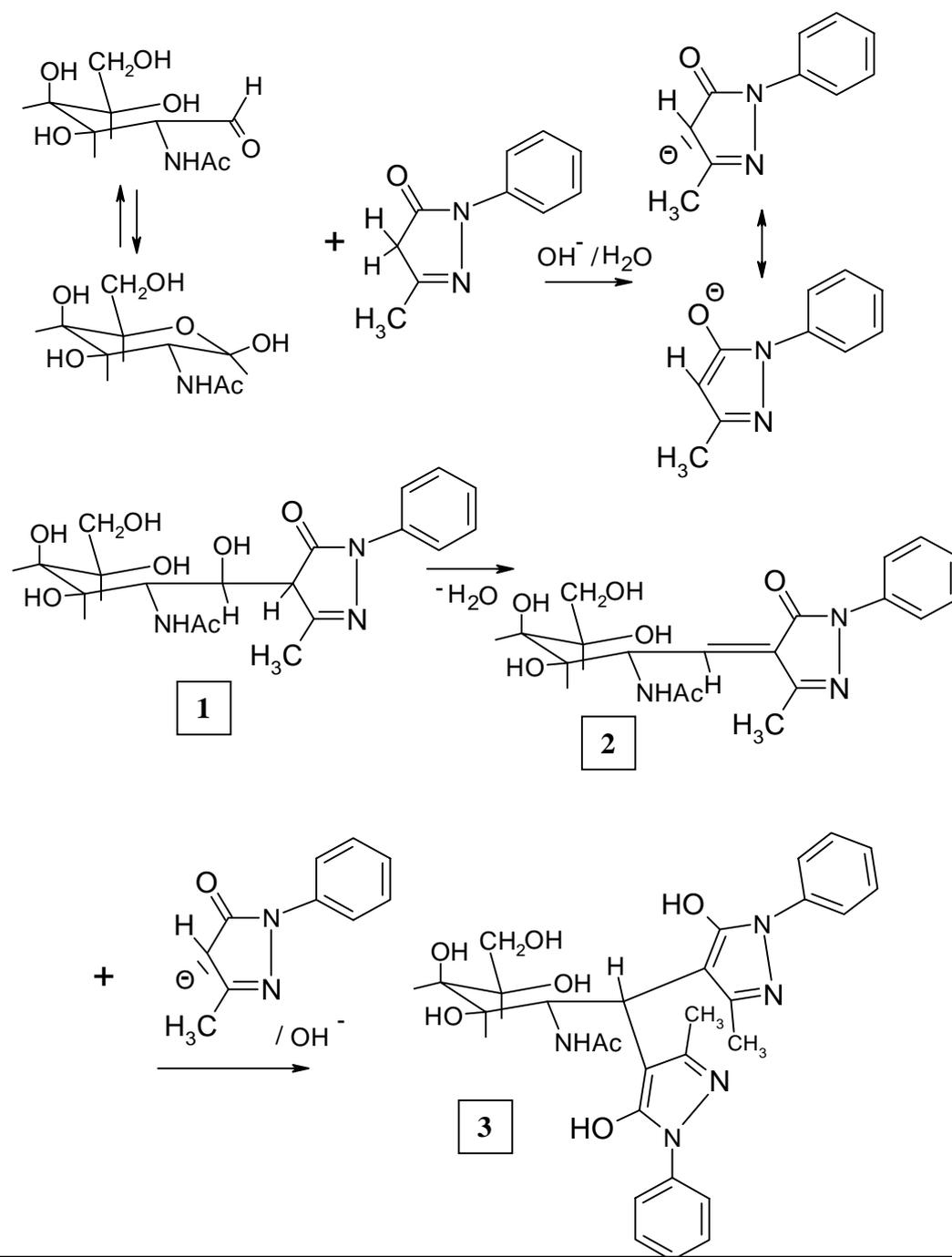


Abb. 8 : Schematische Darstellung der Derivatisierung von Kohlenhydraten mit PMP. Der basenkatalysierte Prozeß beinhaltet zunächst eine Aldoladdition, bei der ein erstes PMP-Molekül in Form des Enolat-Ions die Aldehydform des Glykans nukleophil angreift (1, Aldol). Anschließend erfolgt Wassereliminierung unter Bildung einer α,β -ungesättigten Verbindung (2), welche erneut vom Enolat-Ion eines zweiten PMP-Moleküls in β -Position nukleophil angegriffen wird (3, Michael-Produkt). Die Pyrazolongruppen des Produkts stabilisieren sich durch Bildung eines konjugierten Doppelbindungssystems.

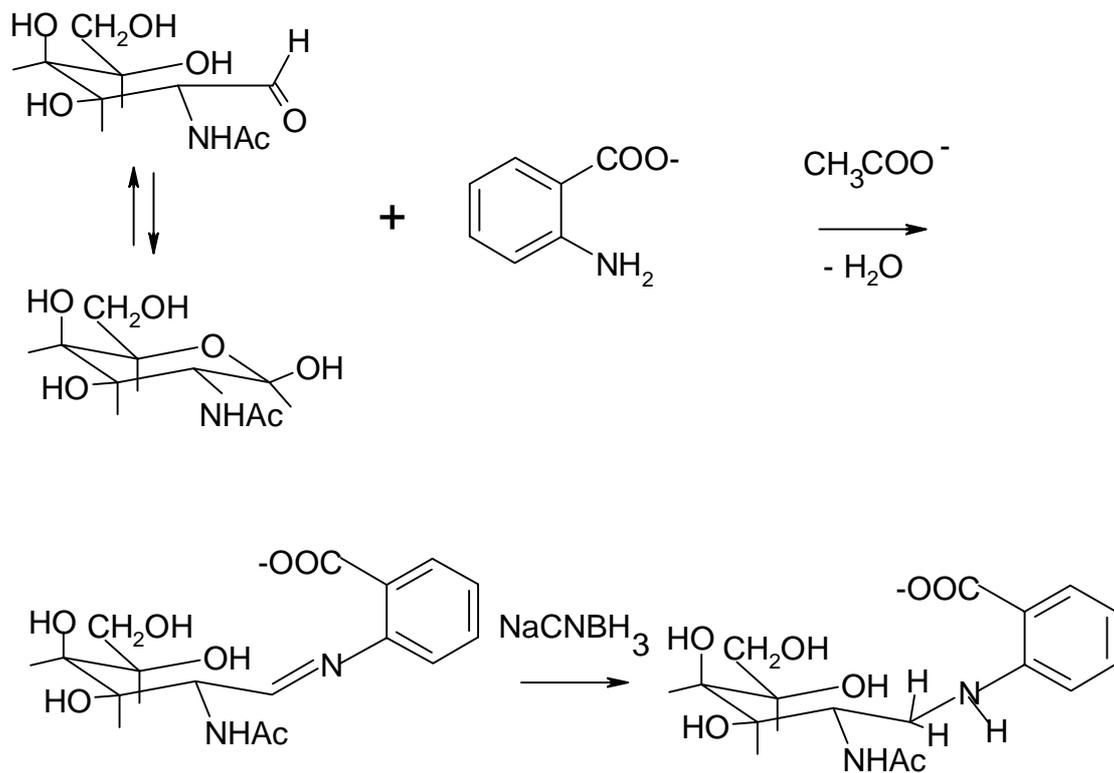


Abb. 9 : Schematische Darstellung der Derivatisierung von Kohlenhydraten mit Anthranilsäure durch reduktive Aminierung.

II.10.4.2 Bausteinanalyse mit Anthranilsäure-Derivatisierung [121]

Zwei Doppelansätze aus jeweils 100µg *L. sigmodontis*- Scheidenprotein wurden vergleichend mit bzw. ohne vorherige HF-Behandlung mit 4M Trifluoressigsäure versetzt, 4h bei 100°C hydrolysiert und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Derivatisierung wurde der Rückstand in 10µl 0.6% Na-Acetat-Lösung (w/v) aufgenommen, mit 50µl 43mM Anthranilsäure in 0.3M NaCNBH₃-Lösung versetzt (gelöst in methanolischer 2.4% Na-Acetat-/ 2% Borsäure-Lösung) und 45min bei 80°C erhitzt. Die Probe wurde dann auf 120µl mit Elutionspuffer A der nachfolgenden HPLC-Trennung verdünnt. Die Trennung der Monosaccharide erfolgte über eine 4x250mm HPLC-Säule, 4µm, Superspher100 RP18ec (MERCK, Darmstadt). Eluent A bestand aus 0.2% n-Butylamin, 0.5% Orthophosphorsäure und

1% Tetrahydrofuran (jeweils v/v). Eluent B bestand aus Eluent A mit 50% Acetonitril. Gradient: von 5% auf 18% B in 25min, auf 100% in 1min, 5min 100% isokratisch. Die Detektion erfolgte bei 360nm bzw. 425nm.

II.11 Chemische Synthesen

II.11.1 Direkte Kopplung von Phosphorsäure-*N,N*-dimethylaminoethylester

Das Prinzip der direkten Kopplung von Phosphorsäure-*N,N*-dimethylaminoethylester (Phospho-DMAE) beruht auf der Veresterung des aktiven, trifunktionellen Phosphorsäurehalogenids Phosphoroxychlorid mit der OH-Gruppe von DMAE. Das Produkt (Dichlorphosphorsäure-*N,N*-dimethylaminoethylester) kann direkt ohne aufwendige Aufreinigung ein zweites Mal verestert werden mit freien OH-Gruppen von Serin bzw. Threonin des gewünschten Polypeptids (s. Weg A in Abb.10). Eine zweite Möglichkeit besteht in der Kopplung des Phosphorsäureesters mit der OH-Gruppe von p-Aminophenol. Die freie aromatische Aminogruppe läßt sich leicht in das Isothiocyanat überführen und an andere freie Aminogruppen addieren (s. Weg B in Abb.10). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der direkten Methode besteht darin, daß sich bei der Kopplung in wäßriger Lösung arbeiten läßt, was die Löslichkeit von Polypeptiden und deren Produktausbeuten gegenüber wasserfreien Lösemitteln erhöhen sollte.

II.11.1.1 Kopplung mit Rinderinsulin, -serumalbumin und Ovalbumin

Ca. 3ml Phosphoroxychlorid (POCl_3 , ca. 30mmol), in 20ml Chloroform gelöst, wurden in einem 50ml Rundkolben bei Raumtemperatur mit ca. 1ml DMAE (10mmol) vorsichtig tropfenweise versetzt unter kräftigem Rühren. Das Produkt fiel als weißes Hydrochlorid aus und wurde portionsweise in Glaszentrifugenröhrchen mit Schliff pipettiert und abzentrifugiert (1min bei 3000U/min, Tischzentrifuge, HETTICH). Die schwerere, klare Chloroformphase, die noch Phosphoroxychlorid enthielt, ließ sich als untere Phase mit einer Pasteurpipette abpipettieren. Zur Entfernung des restlichen POCl_3 wurden in zweimaliger Wiederholung die Zentrifugengläschen vollständig mit frischem Chloroform aufgefüllt, mit einem Glasstopfen verschlossen und geschüttelt. Nach anschließendem Zentrifugieren wurde das Chloroform

erneut entfernt. Nach Abblasen des restlichen Chloroforms im Stickstoffstrom wurde der weiße Rückstand in 2ml Acetonitril, der 20% (v/v) TFA enthielt, gelöst. Mit 25ml der gleichen Lösung wurden in jeweils getrennten Ansätzen ca. 35mg Rinderinsulin (ca. 3.8 μ mol, entsprechend 11.3 μ mol OH-Gruppen), 0.5g Rinderserumalbumin (BSA, 70 μ mol bzw. 4.2mmol OH-Gruppen) und 0.1g Ovalbumin (3 μ mol bzw. 30 μ mol OH-Gruppen) in 50ml Rundkolben unter Rühren in Lösung gebracht. Danach wurden die 2ml gelösten Hydrochlorids langsam hinzugegeben und nach vorsichtiger Zugabe von ca. 3-5ml Triethylamin wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Vermeidung eines Niederschlags des Kopplungsprodukts wurde nach Beendigung der Reaktion ein Überschuss von ca. 10ml Triethylamin dazugegeben, um die restliche Trifluoressigsäure zu neutralisieren, und danach langsam mit 10ml Wasser versetzt. Die klare Lösung wurde in ein 100ml Becherglas gegeben. Von dieser Lösung wurden 20ml-Aliquote direkt über reverse-phase-HPLC gereinigt, nach vorherigem Ansäuern mit 200 μ l TFA. Die Chromatographiebedingungen für Insulin waren: Geräte s. II.3 Narrowbore HPLC; 2.1x250mm Säule, Nucleosil 100, C18 Phase, BISCHOFF); Eluent A: 0.1% TFA in Wasser, Eluent B: 0.08% TFA in Acetonitril, Gradient: 0% B auf 100% B in 45min, 200 μ l/min Flußrate. Detektion: UV/Fluoreszenz.

Für BSA und Ovalbumin: Geräte s. II.3 Normal-HPLC; 4x120mm Säule, C4 Phase, LiChrospher 300 endcapped, MERCK), Gradient: wie bei Insulin, 1ml/min Flußrate. Detektion: UV/Fluoreszenz.

Die Produktausbeuten bzw. der Gehalt an gebundenem DMAE wurden per Aminosäureanalytik bestimmt bzw. mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert. Außerdem erfolgte eine Kontrolle mit Hilfe der SDS-PAGE.

II.11.2 Kopplung von Phospho-DMAE über p-Aminophenol [122]

Analog zu II.11.1.1 hergestelltes Dichlor-Phospho-DMAE (ca. 10mmol) wurden in 10ml Acetonitril gelöst und in einen 50ml Rundkolben gegeben. Es folgte portionsweise Zugabe von 3mmol p-Aminophenol (MERCK), gelöst in 10ml Acetonitril, und unter Rühren 5ml Triethylamin, zum Neutralisieren der während der Reaktion entstehenden Salzsäure. Es wurde über Nacht gerührt, Acetonitril im Stickstoffstrom abgeblasen und mit 40ml Wasser hydrolysiert.

Anschließend folgte Entfernen des Wassers in der Rotationsvakuumpumpe bis zur Trockene. Das so entstandene Produkt, Dimethylaminoethyl-p-Aminophenyl-Phosphorsäurediester (DAP, Abb.10) wurde in 5ml 0.1M NaHCO₃-Lösung aufgenommen und in einem 50ml Rundkolben mit 5ml einer 3mM Lösung aus Thiophosgen in Chloroform versetzt. Nach festem Verschließen mit einem Glasstopfen wurde mit einem Magnetrührer für 1h so stark gerührt, daß beide Phasen intensiv in Berührung kamen. Bei diesem Prozeß wurde die aromatische Aminogruppe des p-Aminophenols in Isothiocyanat umgewandelt. Nach Beendigung der Reaktion wurde zur Trennung der beiden Phasen einige Minuten stehen gelassen und die schwerere Chloroformphase abpipettiert. Durch jeweils dreimalige Zugabe von 5ml frischen Chloroforms und Abblasen wurde überschüssiges Thiophosgen entfernt. Nach Zugabe von in 10ml wäßriger, hydrogencarbonat-gepufferter Lösung von BSA bzw. Ovalbumin wurde über Nacht unter leichtem Rühren die Kopplung durchgeführt. Die Reaktion erfolgte dabei an freien Aminogruppen der Polypeptide (an Lysin und / oder dem N-Terminus). Die Aufreinigung und Charakterisierung der Produkte erfolgte wie unter II.11.1.1 beschrieben (s. Bedingungen bei BSA).

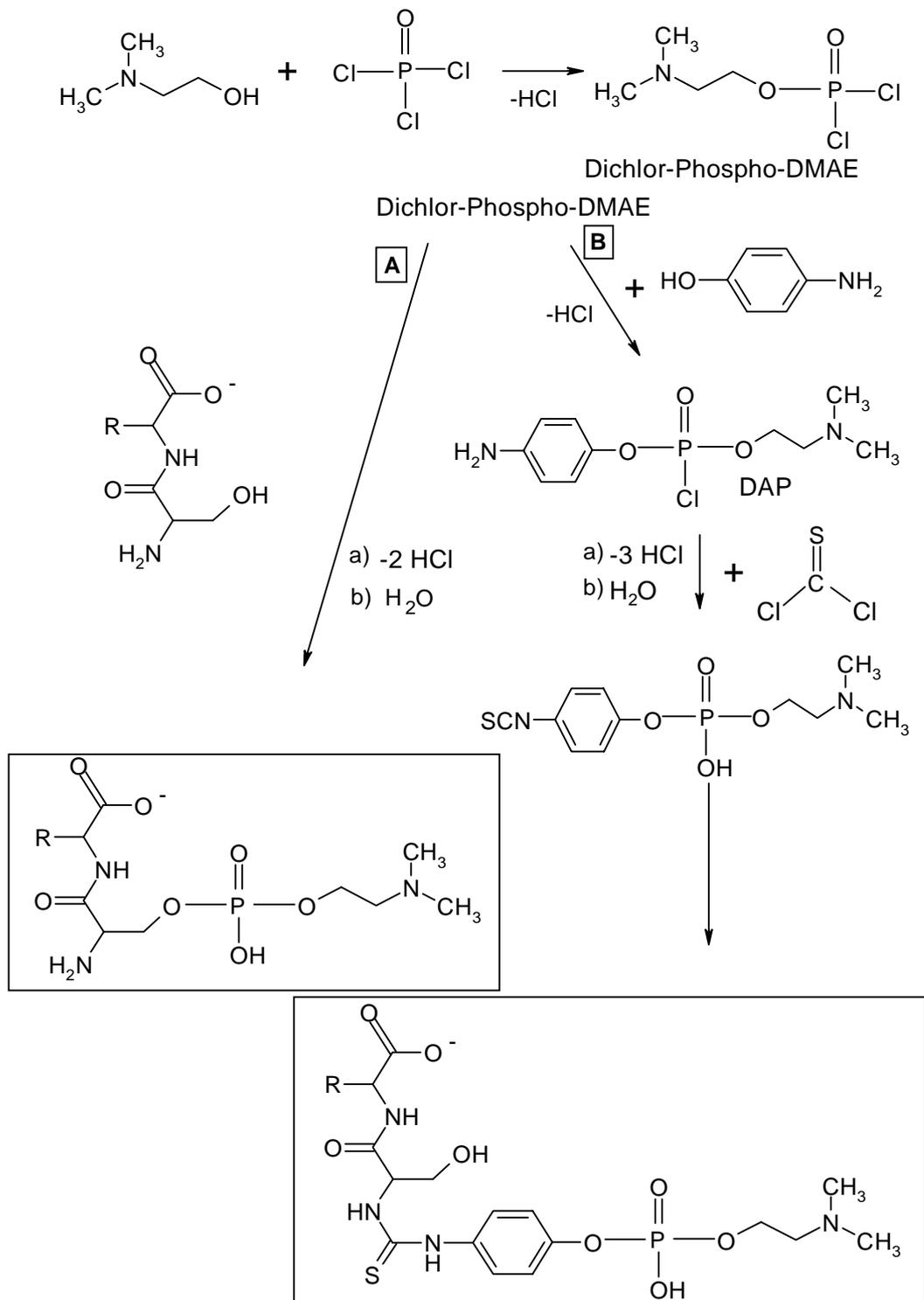


Abb. 10: Schematische Darstellung der direkten Kopplung von Phospho-DMAE (A) sowie über das Isothiocyanat des p-Aminophenols (B) an eine Polypeptidkette