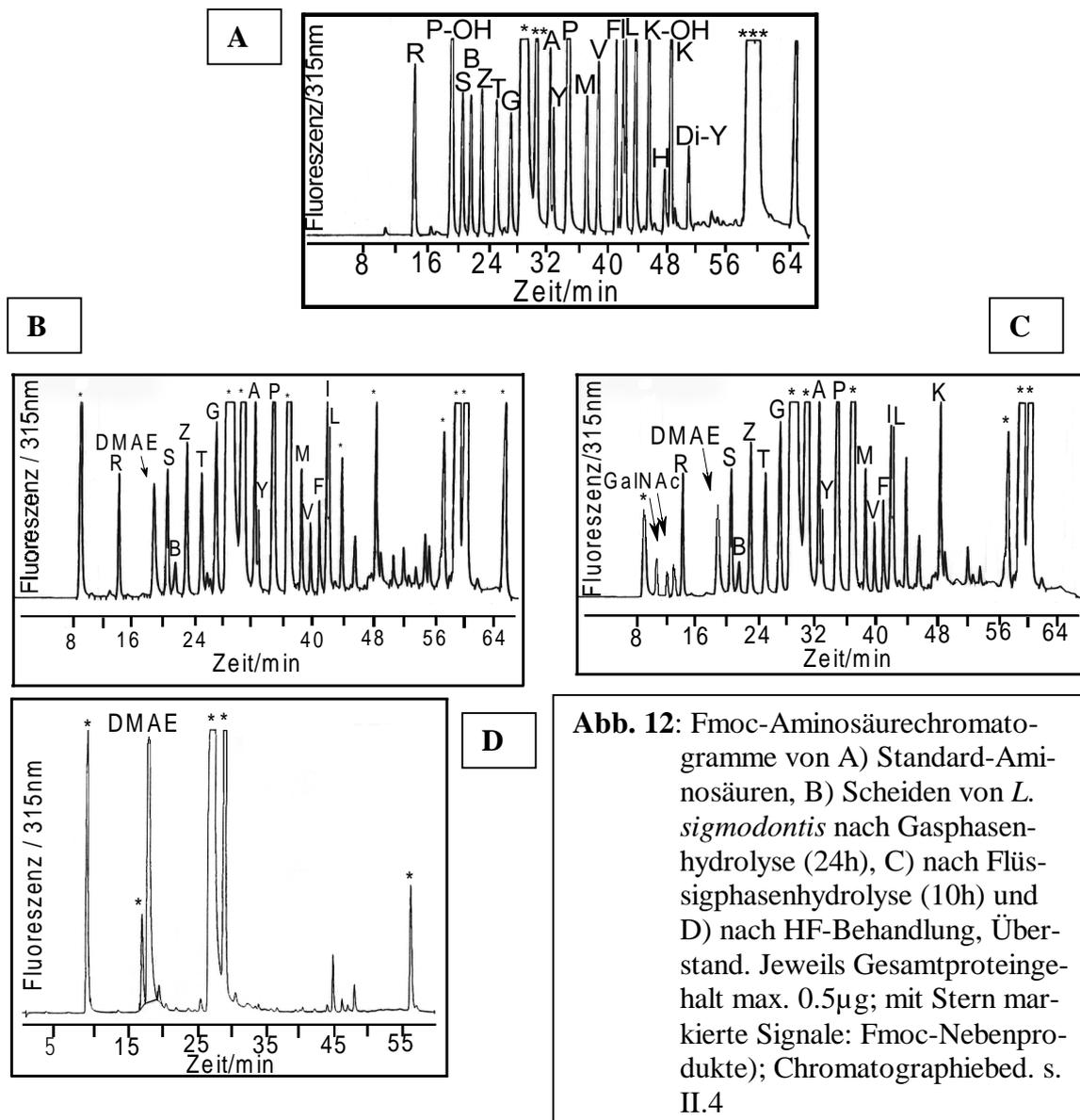
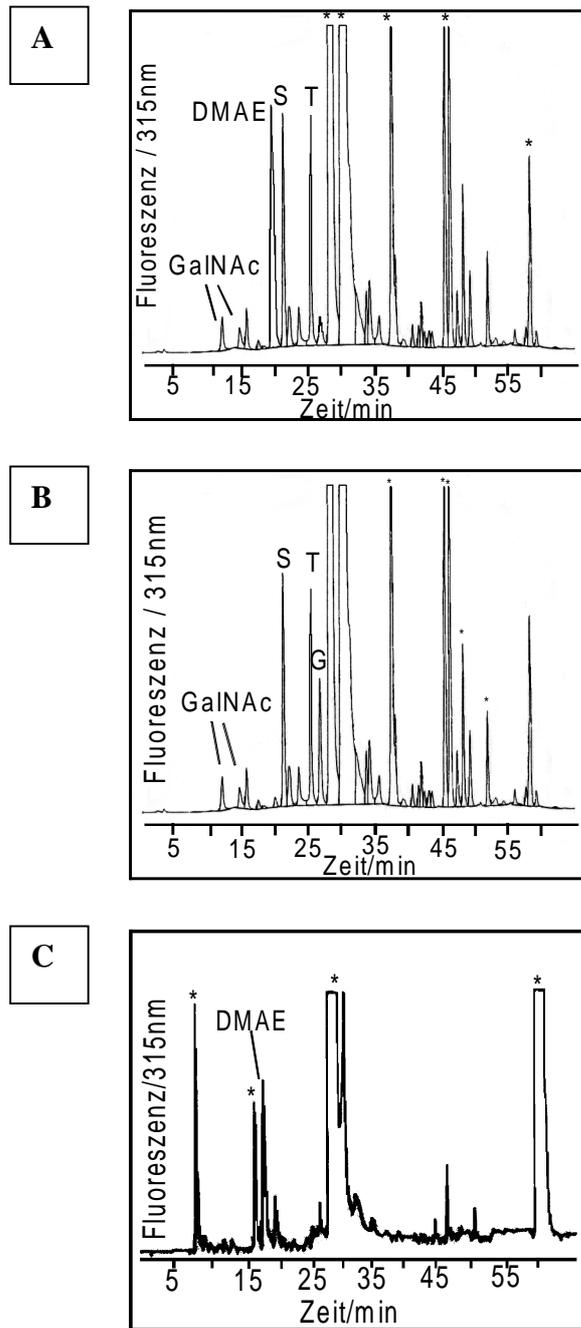


### III.2 Fmoc-Aminosäureanalyse

Ein Vergleich beider HCl-Hydrolysen von *L. sigmodontis*-Scheidenmaterial zeigte, daß bei der Flüssigphasenhydrolyse neben Aminosäuren auch Amino Zucker als Fmoc-Derivate detektierbar waren. Die Hydrolysekinetik ergab weiterhin, daß bereits nach ca. 10h Hydrolyse mit flüssiger 6M HCl eine quantitative Freisetzung aller Aminosäuren erfolgte. Im Vergleich dazu waren 24h Hydrolyse in der Gasphase nötig (vgl. Abb.12 B,C). Bei der Hydrolyse mit HF war bemerkenswert, daß ausschließlich DMAE detektiert wurde, neben wenigen Verunreinigungen (s. Abb.12D). Massenspektrometrische Daten belegen, daß Polypeptide durch 48% HF überwiegend schonend dephosphoryliert werden (s. Abb.25).





**Abb. 13:** Fmoc-Analysen von shp3a A) vor HF-Behandlung, ca. 25pmol, B) nach HF-Behandlung und Mikrodialyse (max. 30pmol) und C) vom Dialysat nach HF-Behandlung (max. 30pmol; mit Stern markierte Signale: Fmoc-Nebenprodukte) Chromatographiebedingungen s. II.4

Wie die Aminosäurezusammensetzung von shp3a zeigt, sind neben einem großen Anteil DMAE Serin und Threonin die dominierenden Bestandteile (Abb.13A). Demgegenüber weist die Primärstruktur nur minimale Mengen anderer Aminosäuren auf. Auch der Aminosucker GalNAc ist gut detektierbar. Nach Dephosphorylierung mit HF und anschließender Entfernung von DMAE durch Mikrodialyse bleibt das Verhältnis Serin:Threonin weitgehend erhalten und ebenso der GalNAc-Anteil (s. Abb.13B). Die Untersuchung des Dialysats ergab DMAE als einzige Komponente, neben Verunreinigungen (s. Abb.13C). Wie die spätere massenspektrometrische Analyse des Retentats (s. Abb.25) ergab, sollten mit der HF-Behandlung quantitativ alle über Phosphodiester gebundenen Substituenten, einschließlich DMAE, auf shp3a entfernt worden sein. Ein entsprechender Nachweis für den durch HF-Behandlung erfolgten Verlust negativer Ladung, und damit Stains-All negativ färbender Proteinbanden im Polyacrylamidgel, gelang nicht. Das durch HF verursachte veränderte Laufverhalten der Scheidenproteine führte zum Verschmieren der Banden, was einen Vergleich mit den nicht dephosphorylierten Proteinen unmöglich machte. Jedoch fiel die Stains-All-Färbung negativ aus und vorhandenes Protein konnte durch Silberfärbung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

### III.3 Glycerol- und Cholin-Analysen

Die Cholin-Analyse der Scheiden von *L. sigmodontis* ergab für 100µg Scheidenprotein einen Anteil von ca. 0.4%, wobei die entsprechenden Reagenzienkontrollen keine Cholin-kontaminationen aufwiesen. Die Glycerol-Analysen ergaben keine signifikante Anwesenheit von Glycerol. Die Kontrollwerte dagegen wiesen relativ höhere Werte auf, welche auf „Kontaminationen“ aus dem Percoll zurückzuführen waren, das bei der Gewinnung von Scheidenmaterial verwendet wurde.

Die Spuren von Cholin sowie das Nichtvorhandensein von Glycerol widerlegen eindeutig die ursprüngliche Vorstellung von vorhandener Teichonsäure. Nachgewiesenes Cholin könnte jedoch Bestandteil von Phospholipiden in der Mikrofilarienscheide sein oder ein Metabolit, der sich von DMAE ableitet.

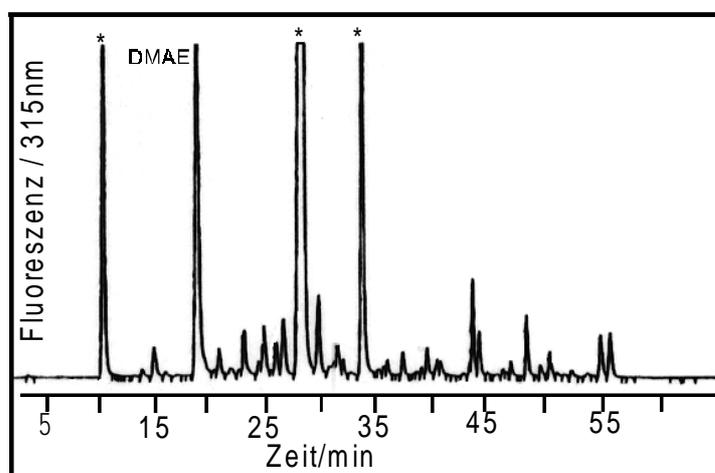
### III.4 Isolierung und Strukturbestimmung des Bausteins DMAE als Fmoc-Derivat

Wie frühere Beobachtungen bei Einsatz unterschiedlicher Mengen an hydrolysiertem Schei-

---

denmaterial ergaben, läßt sich fast ausschließlich Fmoc-DMAE aus einem Hydrolysat gewinnen, wenn das Scheidenmaterial gegenüber dem Fmoc-Reagenz in hohem Überschuß vorliegt. Mit Hilfe präparativer HPLC konnten 0.1µmol an Fmoc-DMAE und 1mmol Standard in reiner Form gewonnen werden (s. Abb. 14).

Wie die  $^1\text{H}$ -NMRSpektren eindeutig zeigen, sind Standard und Probe identisch, weisen also die gleichen chemischen Verschiebungen (shifts) auf (vgl. Abb.15A,B und Tab.3).Darüber hinaus ließen sich anhand eines  $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -Kopplungsspektrums (COSY) bei dem Standard die einzelnen Strukturbestandteile des Moleküls nachweisen. Für eine entsprechende Anwendung



**Abb.14:** Präparative Isolierung von Fmoc-DMAE aus ca. 100µg Scheidenhydrolysat. Deutlich ist das umgekehrte Derivatisierungsverhältnis gegenüber einem analytischen Lauf (max. 0.5µg) zu sehen. (vgl. Abb.12B,C; mit Stern markierte Signale: Nebenprodukte); Chromatographiebedingungen siehe II.4

dieses Experiments auf die zu untersuchende Probe war die isolierte Menge nicht ausreichend. Aus dem  $^1\text{H}$ -Spektrum geht eindeutig hervor, daß das Fmoc-Molekül offenbar mit der OH-Gruppe des DMAE verknüpft ist, da im Spektrum einerseits kein breites Signal einer freien OH-Gruppe zu beobachten ist und andererseits die beiden Methylgruppen des DMAE hochfeldverschoben sind (s. Abb. 15B). Bei einer Derivatisierung des Stickstoffatoms (Quarternisierung) würde der umgekehrte Fall vorliegen.

Wie dem COSY-Experiment zu entnehmen ist, entsprechen die Signale, die auf der Diagonalen liegen, den Protonengruppen, die zum eigentlichen Molekül Fmoc-DMAE gehören. Und nur die zur Diagonalen sich spiegelbildlich verhaltenden Signale stellen die