

Abb. 19: Gaschromatographische Analyse der Monosaccharid-Komponenten von *L. sigmodontis*-Scheiden (A) und isoliertem shp3a (B), jeweils vor und nach HF-Behandlung. Chromatographiebedingungen siehe II.10.1

Die Bausteinanalyse von *L. sigmodontis*-Scheidenmaterial hatte nach der in II.8 beschriebenen Hydrolysemethode lediglich das Vorhandensein von GalNAc ergeben. Erst nach vorheriger Dephosphorylierung mit HF war zusätzlich Galaktose nachweisbar, verbunden mit einem weiteren Anstieg von GalNAc. Der insgesamt größte Anteil der Kohlenhydrate ist demnach phosphoryliert und somit nach der standardisierten Hydrolyse gaschromatographisch nicht erfaßbar. In Analogie zu den Analysen ganzer Scheiden läßt sich auch bei shp3a erst nach vorheriger Dephosphorylierung neben GalNAc auch Galaktose nachweisen. Da shp3a sowie shp3 als einzige Polypeptide in den Scheiden von *L. sigmodontis* DMAE-Reste über Phosphodiesterbrücken tragen, ist das Analyseergebnis ganzer Scheiden auf den Anteil von shp3a und 3 zurückzuführen. Aus den durch reduktive Beta-Eliminierung freigesetzten, methylierten und partiell acetylierten Kohlenhydraten der Scheiden wurden gaschromatographisch vor und nach HF-Behandlung sowohl modifiziertes als auch unmodifiziertes GalNAc identifiziert. Das gleiche Ergebnis zeigte Galaktose. Zudem wurde eine interne Galaktose identifiziert, was auf das Vorhandensein eines größeren Saccharids schließen ließ (s. Abb.20 und III.6).

Ein Vergleich der beiden Freisetzungsmethoden für *O*-Glykane aus *L. sigmodontis*-Scheidenproteinen mit anschließender Methylierung bzw. PMP-Derivatisierung ergab sowohl für die Hydrazinolyse als auch die reduktive Beta-Eliminierung eine vergleichbar sensitive Detektion.

Vielfache Quantifizierungen des Galaktose- und GalNAc-Anteils ganzer Scheiden mittels Gaschromatographie und Fmoc-Aminosäureanalyse haben ein reproduzierbares Verhältnis GalNAc:Gal von 2:1 ergeben. In jeweils 100µg-Aliquoten Scheiden wurden experimentell ca. 6µg *N*-Acetylgalaktosamin und ca. 3µg Galaktose detektiert (Uronsäuren s. III.5.3). Demgegenüber wurde gaschromatographisch in shp3a ein Verhältnis von ca. 1:5 gefunden, was jedoch angesichts der stark mengenabhängigen Detektion von GalNAc als nicht verlässlich angesehen werden konnte. Auf Grund mangelnden Materials konnten mit shp3a keine analogen Fmoc-Aminosäureanalysen durchgeführt werden.

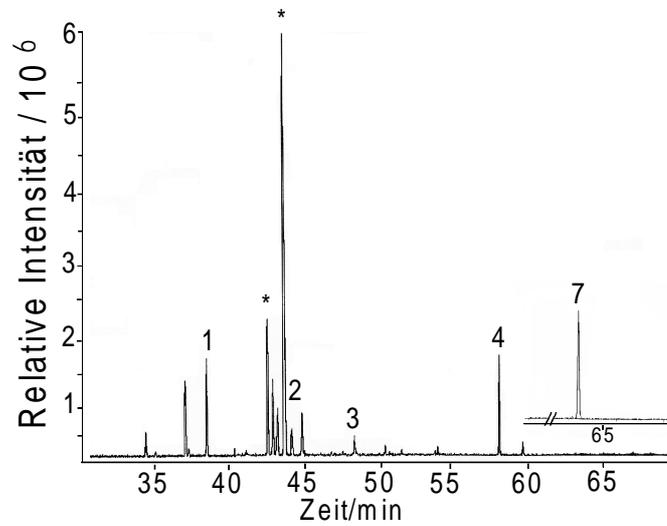
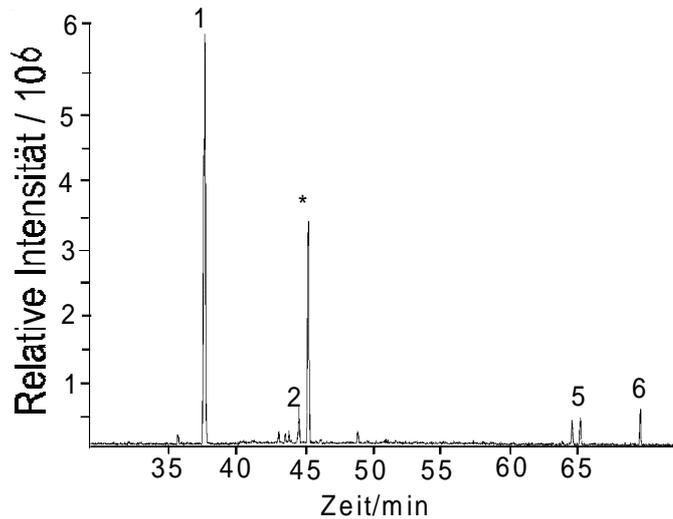
A**B**

Abb. 20: GC/MS-Analyse methylierter, partiell acetylierter Monosaccharide (Signale 1-6; s. auch Tab. 4) aus ca. 1mg *L. sigmodontis*-Scheidenmaterial zur Untersuchung ihrer Verknüpfung untereinander. A) Methylierung vor HF-Behandlung, B) nach HF-Behandlung. Signal 7 im kleinen überlagerten Spektrum von A) stellt eine separate Messung dar. Mit Stern markierte Signale: Verunreinigungen. Chromatographische Bedingungen siehe II.10.1, II.10.3 und II.8.1

III.5.2 PMP-Derivatisierung

Das Ergebnis der Auftrennung PMP-markierter Kohlenhydrate aus *L. sigmodontis* mit reverse-phase Chromatographie ließ sich mehrfach reproduzieren. Weiterhin konnten anhand der Elutionszeiten der eingesetzten, mit PMP derivatisierten Standards die Signale 1 und 2 in

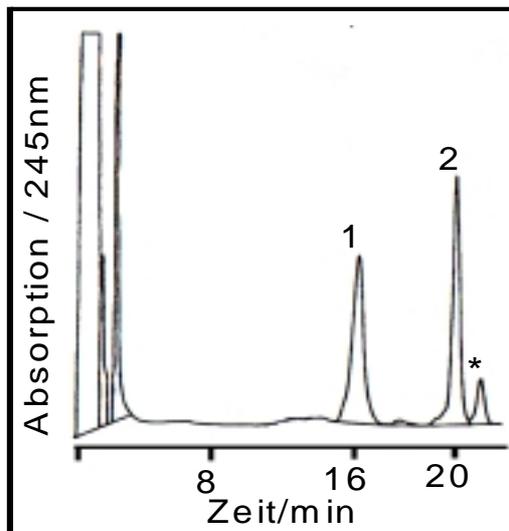


Abb.21: Reverse-Phase-Chromatogramm hydrazinolytisch freigesetzter, PMP-markierter Kohlenhydrate aus *L. sigmodontis*-Scheiden. Signal 1 und 2 komigrieren mit dem PMP-Derivat eines Disaccharids bzw. *N*-Acetylgalaktosamin. Mit Stern markiertes Signal: Nebenprodukt. Chromatographiebedingungen s. II.10.4.1

Abb.21 als PMP-Disaccharid bzw. PMP-Aminozucker vorcharakterisiert werden. Strukturelle Zuordnungen konnten schließlich mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie getroffen werden (s. Abb. 24). PMP-Uronsäuren konnten weder chromatographisch noch massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

III.5.3 Anthranilsäure-Derivatisierung

Das Verhältnis GalNAc:Gal nach Quantifizierung durch die Anthranilsäure-Methode ergab, in Übereinstimmung mit den gaschromatographischen Daten, einen Wert von 2:1. Zudem konnte das Signal einer Uronsäure detektiert und anhand eines Glucuronsäure-Standards zu ca. 0.2% bestimmt werden. Da verschiedene, mit Anthranilsäure derivatisierte Uronsäuren unter den angegebenen chromatographischen Bedingungen komigrieren, war eine Identifizierung des detektierten Signals nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

III.6 Massenspektrometrie

III.6.1 Kohlenhydrate

Anhand der mittels reduktiver Beta-Eliminierung freigesetzten, methylierten Glykane konnte im MALDI-TOF-Massenspektrometer ein Signal detektiert werden, das einem Trisaccharid entsprach, das aus zwei Hexosen und einem *N*-Acetylhexosamin bestand und sieben Phospho-DMAE-Reste trug. Nach vorheriger HF-Behandlung und anschließender Methylierung konnte der Massenverlust von sieben Phospho-DMAE-Inkrementen bestätigt werden. Dieses Ergebnis wurde zweimal reproduziert.

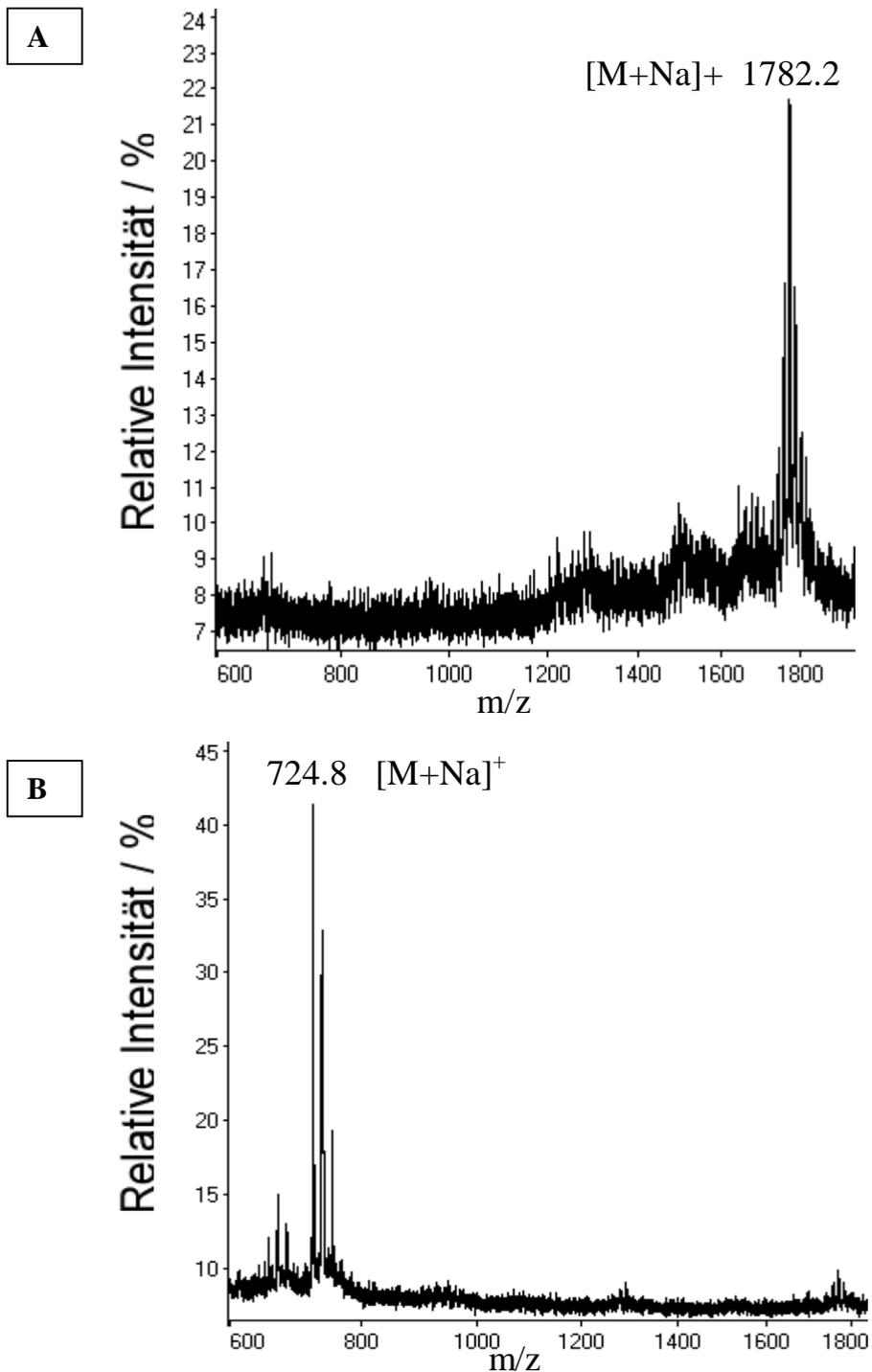


Abb. 22: MALDI-TOF-MS von methylierten Glykanen aus *L. sigmodontis*-Scheiden: A) vor, B) nach HF-Behandlung. Das Signal in A) entspricht einem Trisaccharid (Hex-Hex-HexNAc-OH), welches sieben methylierte Phospho-DMAE-Reste trägt. Die Massendifferenz der Signale in A) und B) entspricht exakt der Masse von sieben Phospho-DMAE-Inkrementen.