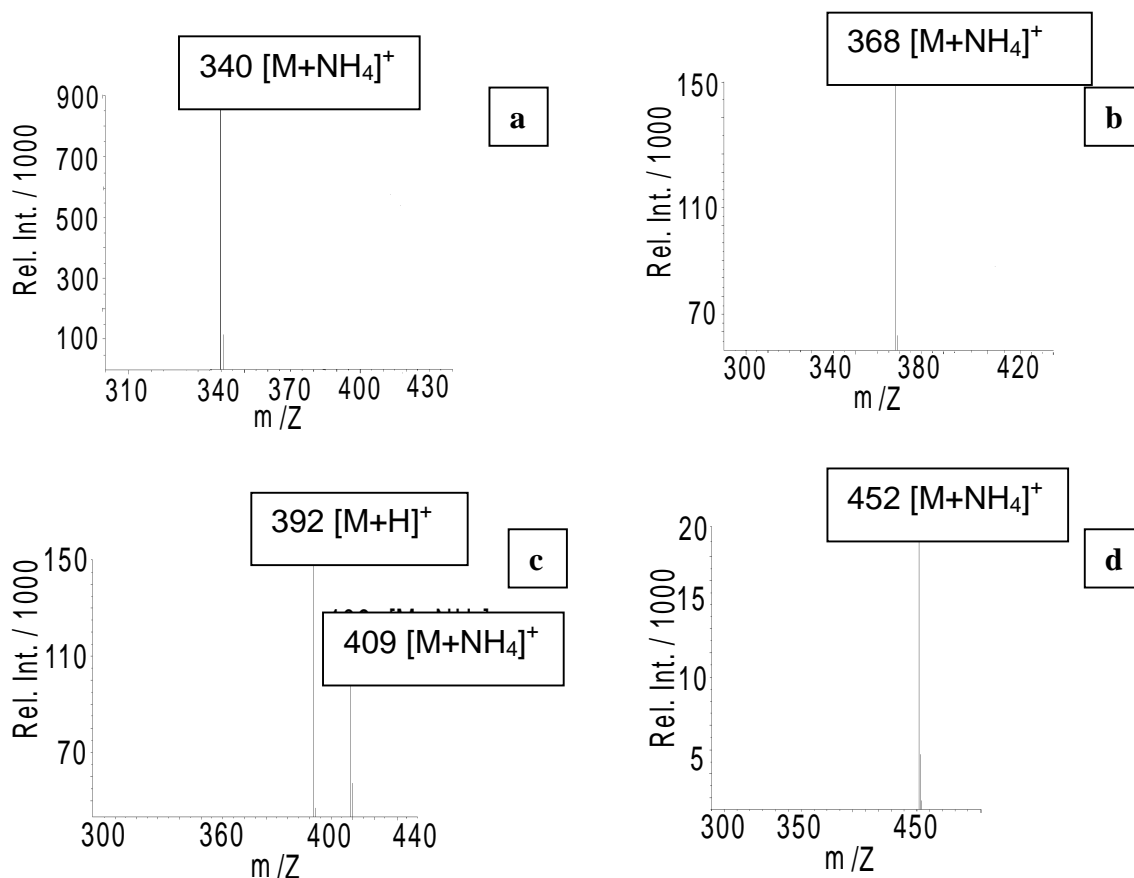


Mit Hilfe der PMP-Derivatisierung (s. II.10.4.1) konnte zudem neben freiem, monomeren GalNAc ein Disaccharid isoliert werden, bestehend aus Gal-GalNAc (s. Abb.21, Signale 2 bzw. 1). Beide Substanzen konnten sowohl mit käuflichen Standards kochromatographisch identifiziert als auch per MALDI-TOF-MS bestätigt werden (Abb.24). Eine Isolierung des entsprechend derivatisierten Phospho-DMAE-tragenden Trisaccharids gelang nicht. Generell zeigte sich bei massenspektrometrischen Untersuchungen negativ geladener Standard-Disaccharide, daß die Nachweissensitivität per MALDI-TOF-MS mit steigender Ladung des



**Abb. 23:** Single Ion Monitoring-Spektren einiger (partiell methylierter) Alditolacetate nach Aufbereitung von *L. sigmodontis*-Scheiden (s. Abb. 20): a) 2,3,4,6-Gal, b) 2,4,6-Gal, c) 4,6-GalNAc und d) peracetylierte Galaktose (Bezeichnungen s. Legende Tab.4)

Glykans abnahm – sowohl im positiven als auch im negativen Ionen-Modus.

Die Methylierungsanalyse zeigte ausschließlich eine über Position C3 verknüpfte Struktur des Trisaccharids Gal-Gal-GalNAc. Durch vergleichende Analyse zweier Parallelansätze vor und nach HF-Behandlung konnten die Positionen der *O*-Phosphorylierungen zum Teil bestimmt werden. Abb. 22 zeigt das MALDI-TOF-Massenspektrum des isolierten, methylierten Trisac-

charids vor und nach der Dephosphorylierung mit HF (A bzw. B).

Während bei der terminalen Galaktose dieses Trisaccharids alle vier OH-Gruppen modifiziert vorlagen, ließen sich die restlichen drei substituierten Positionen nicht eindeutig der internen Galaktose bzw. dem *N*-Acetylgalaktosamin zuordnen. Die Masse 340 in Abb. 23a (Tab.4 Signal1) zeigt die permethylierte, bzw. die Masse 452 (Abb.23d) die peracetylierte, vierfach substituierte, terminale Galaktose des Trisaccharids; ferner stellt die Masse 340 die terminale Galaktose des unsubstituierten Disaccharids Gal-GalNAc dar. Die Massen 368 und 396 in Tab.4 (Signal 2 u. 3 in Abb.20 A bzw. B) ließen sich als 3-substituierte bzw. 2,3-disubstituierte Galaktose identifizieren und weisen damit auf eine interne Galaktose hin, die zum Teil an Position C2 substituiert ist. Die beiden noch verbleibenden Substitutionen sollten folglich auf dem GalNAc an den Positionen C4 und C6 zu finden sein. Das Signal für ein dementsprechend dreifach acetyliertes GalNAc konnte jedoch nicht detektiert werden. Stattdessen wurde nach HF-Behandlung lediglich ein an Position C3 verknüpftes GalNAc mit der Masse 392/409 identifiziert (vgl. Abb.20 Signal 6, Abb.23c u. Tab.4 Signal 6), welches das Trisaccharid-Modell sowie das bereits identifizierte Disaccharid Gal-GalNAc vervollständigt; des weiteren ein terminales, unsubstituiertes GalNAc mit der Masse 364/381, welches bereits mit der PMP-Derivatisierungsmethode als Monosaccharid bestätigt werden konnte.

-HF / Signal-Nr.*	Masse	Substanz	Strukturelement
1	340	2,3,4,6-Gal	terminale Galaktose
2	368	2,4,6-Gal	3-subst. Galaktose
3	396	4,6-Gal (?)	evtl. 2,3-disubst. Gal.
4	364/381	3,4,6-GalNAc	terminales GalNAc
7	452	peracetyl. Gal	terminale, unsubst. Galaktose

+HF / Signal-Nr.**	Masse	Substanz	Strukturelement
1	340	2,3,4,6-Gal	terminale Galaktose
2	368	2,4,6-Gal	3-subst. Galaktose
5	381	n.b. <sup>a</sup>	HexNAc(?)
6	392/409	4,6-GalNAc	3-subst. GalNAc

\* vgl. Abb. 20 A)      \*\* vgl. Abb. 20 B)

<sup>a</sup> nicht eindeutig zuordenbar bzw. nicht identifizierbar

**Tab. 4:** Auflistung der in Abb.20 gaschromatographisch aufgetrennten, partiell methylierten Alditolacetate und ihre massenspektrometrische Identifikation (GC/MS). Obere Tabelle, Methylierung vor HF-Behandlung; untere Tabelle, Methylierung nach HF-Behandlung

## Ergebnisse

Legende zu Tab.4:

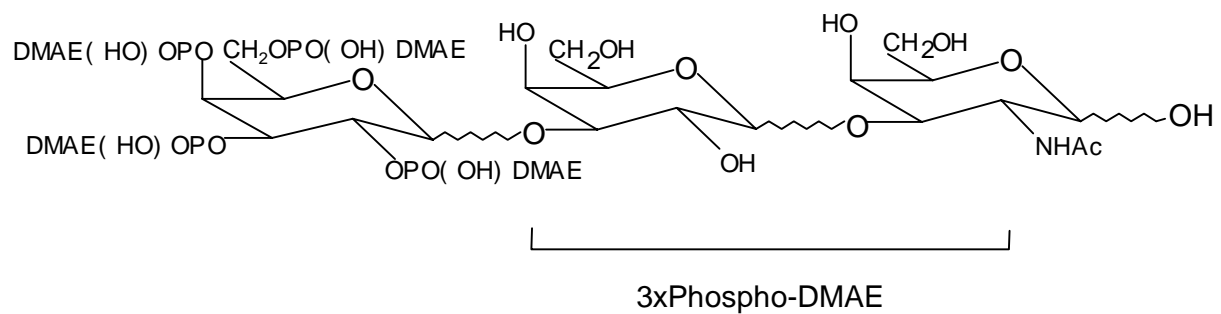
Die in der Substanzspalte aufgeführten Kürzel sind wie folgt zu lesen:

2,3,4,6-Gal : 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-1,5-di-*O*-acetylgalactitol

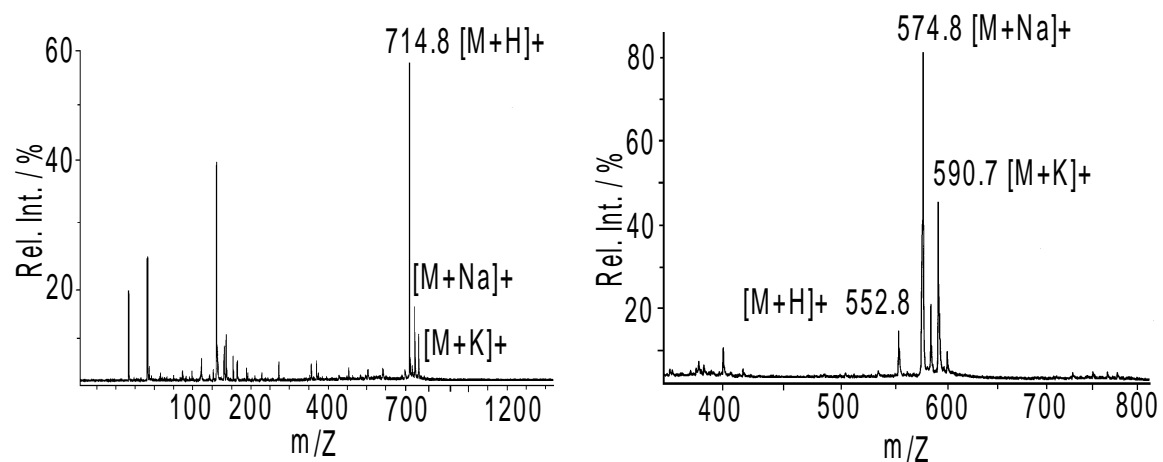
2,4,6-Gal : 2,4,6-Tri-*O*-methyl-1,3,5-tri-*O*-acetylgalactitol etc.

3,4,6-GalNAc : 3,4,6-Tri-*O*-methyl-1,5-di-*O*-acetyl-2-(*N*-methyl)-acetamidogalactitol

In Kombination der GC/MS-Daten mit denen aus MALDI-TOF-Massenspektrometrie kann folgende Struktur des Trisaccharids postuliert werden:

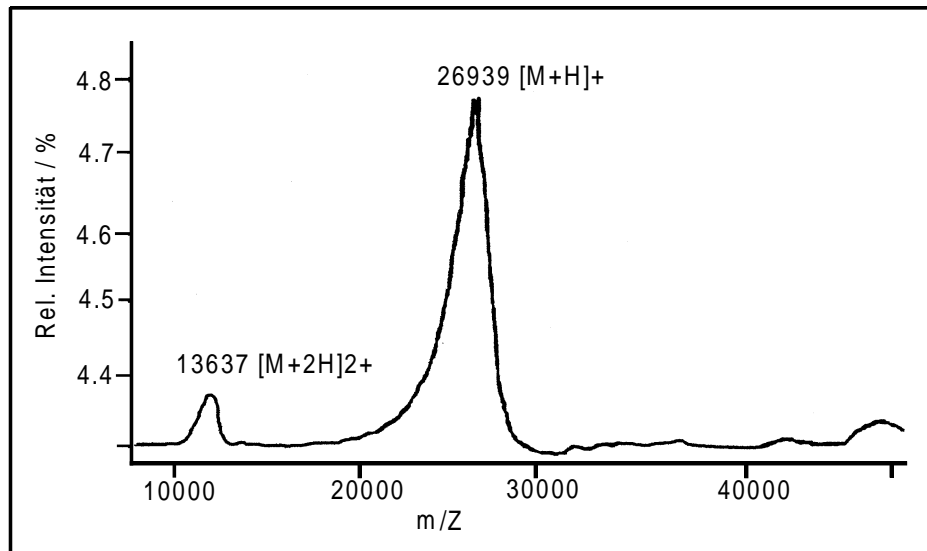


Bei Vergleich der Kohlenhydratanalysen der Scheiden von *Litomosoides sigmodontis* mit denen verwandter Nematodenspezies, wie *Brugia malayi* und *Toxocara canis*, zeigte sich übereinstimmend keine Sialylierung der *O*-Glykane [45,49](s. Diskussion).



**Abb. 24:** MALDI-TOF-Massenspektren der beiden isolierten, PMP-markierten Glykane, isoliert aus *L. sigmodontis*-Scheiden. Links: PMP-GalNAc-Gal (s. Abb. 21 Signal 1), rechts: PMP-GalNAc (s. Abb. 21 Signal 2).

## III.6.2 Shp3a



**Abb. 25:** MALDI-TOF-Massenspektrum von shp3a nach HF-Behandlung und Mikrodi-alyse (ca. 7nmol; Reflektor-Modus). Der Massenverlust von ca. 18 kDa steht in guter Übereinstimmung mit der Gesamtzahl von ca. 110 DMAE-Resten - als Phosphodiester am Protein gebunden (s. Tab.1). Die mittlere Breite des Hauptsignals ist auf Grund der nach Dephosphorylierung verbleibenden Glykosylierungen mit ca. 2kDa beträchtlich.

MALDI-TOF-MS-Analysen von „nativem“, carboxymethylierten shp3a lieferten für dieses Protein eine mittlere Molekülmasse von 45.5kDa (pers. Mitteilung Dr. Hintz). HF-Behandlung führte zu einem Massenverlust von ca. 18kDa (Abb.25), was die Anwesenheit von etwa 110 Phospho-DMAE-Resten indiziert.

Vielfache Aminosäure- bzw. -zuckeranalysen in Verbindung mit gaschromatographischen Quantifizierungen von Galaktose zeigten weiterhin konvergierend, daß der größte Anteil der posttranslationalen Modifikationen von shp3a aus GalNAc, Gal sowie DMAE und Phosphat besteht. Damit wurden über 90% der Gesamtmasse von shp3a belegt (s. Tab.5 u. Diskussion).

	Mol/Mol shp3a	Masse/kDa
cDNA		11.3
DMAE	~110	9.7
Phosphat	n.b. <sup>a</sup>	8.7
GalN(Ac)	~22*	4.5
Gal	~44	7.3
Ser/Thr	54 /45 <sup>c</sup>	
		$\Sigma = 41.5$ kDa

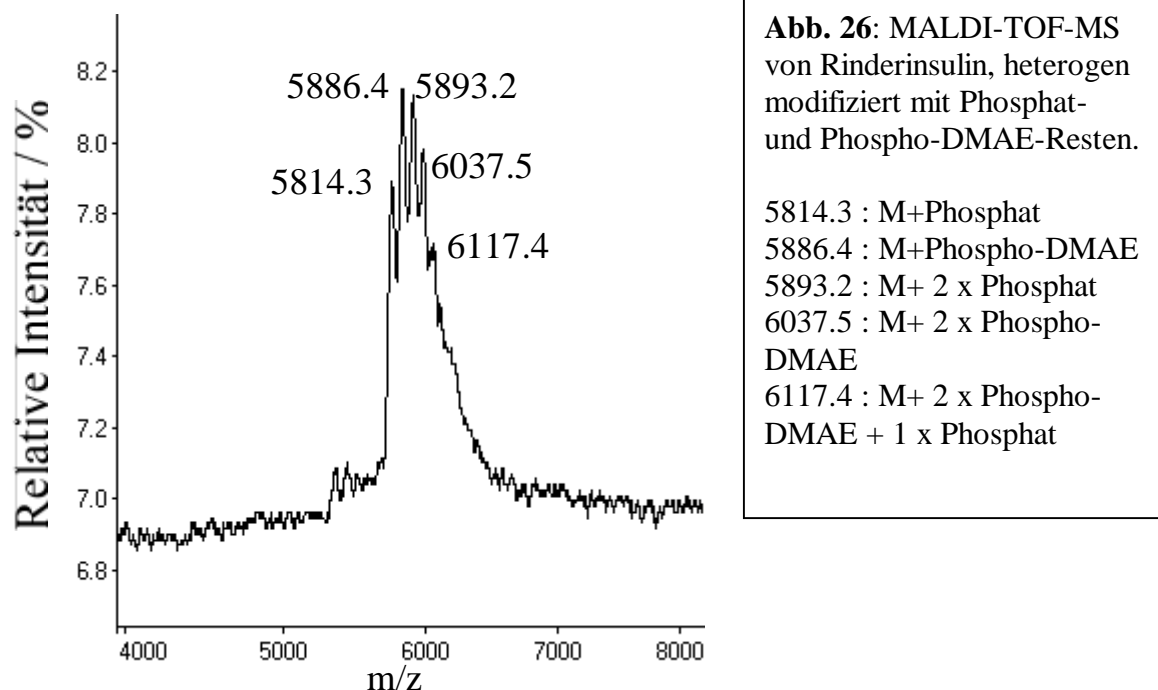
\*korrigierter Wert auf Grund von Detektionsverlusten durch Phosphorylierung

<sup>a</sup> rechnerisch aus Massenverlust im MS nach HF-Behandlung bestimmt

<sup>c</sup> Gesamtzahl der Serine/Threonine, die nicht durch Edman-Sequenzierung erfaßbar, aber nicht zwingend modifiziert

**Tab. 5:** Tabellarische Übersicht aller bzgl. shp3a analytisch zugänglicher Daten und deren Gesamtmasse. Berücksichtigt man bei dem gaschromatographisch bzw. aminosäureanalytisch bestimmten Anteil der Kohlenhydrate und DMAE-Reste einen Fehlerbereich von ca. 10%, so lassen sich über 90% der Bestandteile an Modifikationen belegen.

### III.7 Chemische Synthesen



Die direkte Kopplung von Phospho-DMAE-Resten an freie OH-Seitengruppen von Polypeptiden konnte an Rinderinsulin und -serumalbumin (BSA) erfolgreich durchgeführt und demonstriert werden.

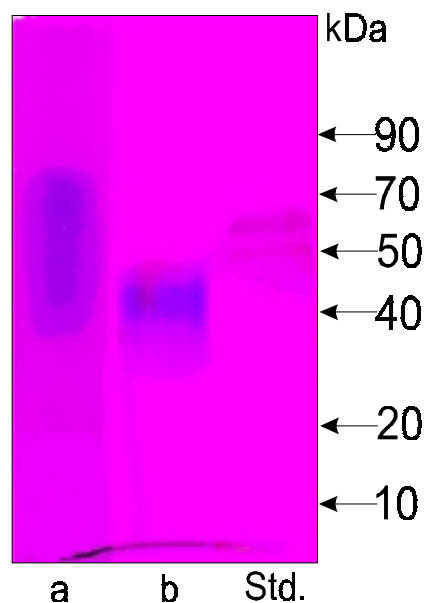
Auf Grund seiner geringen Masse (<10kDa) war Rinderinsulin als einziges Polypeptid nach der direkten Kopplung massenspektrometrisch genau charakterisierbar, so daß eine exakte Anzahl veresterter OH-Gruppen gemessen werden konnte. Wie Abb. 26 zeigt, ist das Kopplungsprodukt von Rinderinsulin heterogen mit Phosphat und Phospho-DMAE modifiziert. Aus der Masse 6117.7 Da läßt sich errechnen, daß maximal zwei Phospho-DMAE-Reste zusammen mit einem Phosphat an die Peptidkette gekoppelt werden konnten.

Dies zeigt, daß alle drei im Rinderinsulin vorhandenen OH-Gruppen selektiv verestert wurden. Parallel wurden anhand von Aminosäureanalysen zwei Phospho-DMAE-Reste quantifiziert, was das massenspektrometrische Ergebnis in Abb. 26 bestätigte.

Jedoch erzielten die aminosäureanalytisch durchgeführten Quantifizierungen dieser Synthese bzgl. der eingesetzten Peptidmenge lediglich eine Ausbeute von 0.3%, nach HPLC-Reinigung des Produkts (ca. 100µg).

Die direkte Kopplung von Phospho-DMAE an Rinderserumalbumin erzielte eine Kopplungsausbeute von über 90% (d.h. 55 von 59 vorhandenen OH-Gruppen) bzw. eine Gesamtausbeute des HPLC-gereinigten Produkts von ca. 30% (Daten nicht gezeigt). Auf Grund der zu erwartenden, hohen Heterogenität des Kopplungsprodukts war eine massenspektrometrische Charakterisierung nicht möglich gewesen. Die Stains-All-Färbung jedoch zeigte ein blau gefärbtes, über den gesamten Trennbereich des Gels verschmiertes Produkt (nicht gezeigt).

Die Kopplungsversuche von Phospho-DMAE an BSA und Ovalbumin mit p-Aminophenol über Isothiocyanat waren mit ca. 50% Kopplungsausbeute ebenso erfolgreich verlaufen. Die Produktausbeute war mit jeweils 30% vergleichbar mit dem Ergebnis der direkten Kopplung an BSA. Auch bei diesen Experimenten war auf Grund der großen Heterogenität der Produkte keine Detektion im Massenspektrometer zu beobachten gewesen. Demgegenüber ließen sich beide Kopplungsprodukte in der SDS-PAGE als blau-gefärbte, diffuse Banden darstellen, wie Abb. 27 zeigt. Es ist klar zu erkennen, daß Ovalbumin gegenüber Rinderserumalbumin



**Abb.27:** SDS-PAGE und Stains-All-Färbung von Rinderserumalbumin (BSA) (a) und Ovalbumin (b), chemisch gekoppelt mit p-Aminophenyl-Phospho-DMAE über Isothiocyanat.

offenbar eine schärfere Bande aufweist. Der Hauptanteil der heterogenen Kopplungsprodukte von BSA erstreckt sich mit ca. 40-70kDa über einen breiten Massenbereich, während sich die Hauptbande von Ovalbumin vorwiegend bei ca. 41kDa befindet und deutlich oberhalb der Molekülmasse des unmodifizierten Proteins liegt (ca. 38kDa).

Neben der Kopplung über p-Aminophenol als Isothiocyanat wurden verschiedene andere Vernetzungsmethoden und -moleküle experimentell untersucht, wie z.B. die Verwendung von Ethyl-dicyclohexyl-carbodiimid (EDC), die Succinylierung von Lysinen im Protein und ihre Reaktion mit Aminopropyl-Phospho-DMAE oder die reduktive Aminierung von mit Periodat oxidiertem Glycerol-3-Phospho-DMAE. Jedoch waren die Produktausbeuten extrem niedrig und standen hinsichtlich des geplanten Einsatzes für immunologische Tests in keinem nutzbringenden Verhältnis zu den Mengen der eingesetzten Reagenzien.

#### IV. Diskussion

##### Stains-All-Färbung

Untersuchungen an SDS-Polyacrylamidgelen mit Phosvitin und Chondroitinsulfat als Standards zeigten im Gegensatz zu vergleichbaren Mengen an shp3 und 3a nur eine schwache, wenig sensitive Blaufärbung. Relativ zu Chondroitinsulfat wies Phosvitin noch eine stärkere Färbung auf. Wie spektroskopische Messungen an Protein-Farbstoff-Komplexen des Phosvitins zeigten, steigt die Intensität der Färbung mit dem abnehmenden mittleren Abstand der im Protein vorhandenen negativen Ladungen, was mit der „batterieähnlichen“ Anhäufung von Phosphoestergruppen erklärt wird [102]. Die sensitive Stains-All-Färbung von shp3 und 3a sollte daher auf eine dem Phosvitin ähnliche, dichte räumliche Anordnung von Phosphoestergruppen auf den *O*-Glykanen zurückzuführen sein. Die Frage, in wieweit DMAE diese intensive Färbung beeinflusst, bleibt noch ungeklärt. Demgegenüber läßt sich die schwache Färbung des Sulfat- und Carboxylgruppen tragenden Chondroitinsulfats durch deren zum Teil breitere Verteilung entlang der Glykankette, und damit der größeren Distanz untereinander, erklären. Es kommt daher zu wenig Protein-Farbstoff-Komplexen.

Mit Hilfe von Stains-All konnten inzwischen mehrere phosphat-tragende Proteine in den Scheiden der verwandten, humanpathogenen Spezies *Brugia malayi* identifiziert, sowie das exkretorisch-sekretorische Protein juveniler Filarien von *L. sigmodontis* – Juv-p120 – als phosphat- und DMAE-haltig charakterisiert werden (pers. Mitteilung Dr. Hintz).

Generell lassen sich mit der Stains-All-Färbung unter geringem Verbrauch an Probenmaterial phosphorylierte Proteine von nicht phosphorylierten unterscheiden und ggf. auf DMAE untersuchen.

##### Biosynthese von DMAE

DMAE konnte als Fmoc-Derivat einwandfrei identifiziert und als ein bisher einzigartiger Substituent *O*-glykosidisch modifizierter Proteine beschrieben werden. Die Tatsache, daß in den Mikrofilarienscheiden von *L. sigmodontis* dieses biogene Amin neben Spuren von Cholin und MMAE zu finden ist, läßt auf eine gezielte Biosynthese schließen. Die Herkunft dieses Substituenten bleibt allerdings noch völlig ungeklärt. Bisher sind nur zwei Synthesewege dokumentiert. Zum einen wird DMAE als Bestandteil des isolierbaren Lipids Phosphatidyl-DMAE gebildet, welches im Säugerorganismus durch sukzessive Methylierung von Phospha-



tidyl-Ethanolamin mittels Methyltransferasen zum Endprodukt Phosphatidyl-Cholin (Lecithin) entsteht (Kennedy-Zyklus). Jedoch ist dieses Lipid lediglich ein Zwischenprodukt dieser Synthese und existiert dementsprechend nur in geringen Mengen.

Zum anderen sind Pflanzen in der Lage, Phosphatidyl-DMAE im Bedarfsfall direkt zu synthetisieren [123]. Allerdings gibt es bisher keine deutlichen Hinweise über das enzymatische Spektrum dieser Synthesen. Die biologische Bereitstellung von Phosphatidyl-DMAE läßt die Annahme zu, daß evtl. nukleotidaktiviertes DMAE direkt auf das Lipidgerüst transferiert wird. Hinweise dazu sind Ergebnisse in Bezug auf CDP-Cholin, welches als Donormolekül einer CDP-Cholin-Transferase fungiert [124-126]. Entsprechende Hinweise bzgl. der Anheftung von DMAE gibt es bislang nicht; auch ist noch kein analoges CDP-DMAE biochemisch isoliert worden.

Aminosäureanalytisch untersuchte Überstände, die aus PBS-Extrakten adulter und juveniler Filarien stammten, weisen schon in der Präpatenz deutlich nachweisbare Mengen freien DMAEs auf (pers. Mitteilung Dr. Hintz). Zudem liefert die Analyse des exkretorisch-sekretorischen Proteins Juv-p120 eine enorm hohe DMAE-Modifikation [127]. Dieses schon in der Präpatenz adulter Filarien nachweisbare Protein beweist die intrauterine, selektive DMAE-Modifizierung sowohl sezernierter Proteine als auch von Strukturproteinen der Mikrofilarienscheide. Diese Befunde unterstützen die Annahme, daß DMAE schon in einer vollständig synthetisierten Form vorliegen muß, um anschließend als Donormolekül einer Transferase eingesetzt zu werden. Im Rahmen des Projekts wäre eine Untersuchung des DMAE-Syntheseweges und der dafür nötigen Transferasen von größtem Interesse, da Filarizide entwickelt werden könnten.

Die Untersuchung der Extraktionsüberstände bei *B. malayi* und *Setaria*-Arten hatten ebenfalls beträchtliche Mengen an DMAE ergeben. Andere verwandte, humanpathogene Arten wie *B. pahangi* und *W. bancrofti* waren, wenn überhaupt, in zu geringen Mengen verfügbar, um analog untersucht zu werden. Aus allen bisherigen Ergebnissen zeichnet sich jedoch ab, daß DMAE offenbar eine charakteristische Modifikation der lymphatischen Filarien ist, deren Mikrofilarien bescheidet sind. Alle anderen verfügbaren, nicht lymphatischen und nicht bescheidete Mikrofilarien produzierenden Filarienarten (*Ascaris* sp., *Acanthocheilonema* sp.) sind eindeutig DMAE-negativ (pers. Mitteilung Dr. Hintz). Hiermit könnte sich eine regelrecht neue Nematodenfamilie mit DMAE als strukturellem Marker herauskristallisieren.

### **Kohlenhydrate**

#### Methodische Aspekte

Die Interpretation der Methylierungsanalysen der *O*-Glykane aus *L. sigmodontis* war trotz der GC/MS-Daten nur durch die MALDI-TOF-Massenspektrometrie möglich gewesen; zum einen durch die Spektren ihrer PMP-markierten Derivate, zum anderen durch die der methylierten und reaktiv beta-eliminierten Glykane. Wie aus beiden Derivatisierungsmethoden hervorging, wurden drei Glykanstrukturen, GalNAc, Gal-GalNAc und mit Phospho-DMAE substituiertes Gal-Gal-GalNAc identifiziert. Bei letzterer Verbindung konnte nur durch vergleichende Massenspektrometrie des HF-behandelten und nicht behandelten Glykans auf das Vorhandensein von sieben Phospho-DMAE geschlossen werden. Die massenspektrometrisch in Form ihrer PMP-Derivate identifizierten Strukturen GalNAc und Gal-GalNAc ließen sich in den Methylierungsanalysen als terminales GalNAc bzw. als terminale Galaktose und 3-verknüpftes GalNAc bestätigen. Für eine individuelle chromatographische Auftrennung der Glykane mit nachfolgender Analyse war das Material trotz großen Mengeneinsatzes nicht ausreichend.

Im Falle des Modells eines siebenfach mit Phospho-DMAE substituierten Trisaccharids deuteten die Daten der Methylierungsanalyse **nach** HF-Behandlung auf terminale Galaktose, 3-verknüpfte Galaktose sowie 3-verknüpftes GalNAc, welche das Modell eines aus MALDI-TOF-Spektren abgeleiteten Trisaccharids unterstützten. Methylierungsanalyse **vor** HF-Behandlung lieferte dagegen Hinweise auf eine vierfach mit Phospho-DMAE substituierten Gal-Rest. Durch HF-Behandlung **vor** Methylierung bzw. Acetylierung wurde weiterhin eine an Position C3 acetylierte Galaktose detektiert. Erfolgte HF-Behandlung **nach** der Methylierung, wurde eine an Position C2 und C3 acetylierte Galaktose bestimmt. Der Vergleich beider Analysenansätze – Methylierung **vor** bzw. **nach** HF-Behandlung – ließ bzgl. der internen Galaktose des postulierten Trisaccharids nur eine Verknüpfung über Position C3 und eine Substitution an Position C2 zu. Somit mußten sich die verbleibenden zwei Phospho-DMAE-Substituenten auf dem GalNAc befinden. Hier ergab die Analyse **nach** vorheriger HF-Behandlung eine 3-Verknüpfung des GalNAc; und die Methylierung **vor** HF-Behandlung nur terminales, also unsubstituiertes GalNAc, welches als Monomer anzusehen war. Nach dem postulierten Modell hätte ein dreifach substituiertes GalNAc detektiert werden müssen. Es konnten jedoch weder Signale einer dreifach substituierten Galaktose noch für ein zwei-

zweifach oder evtl. dreifach substituiertes GalNAc gefunden werden, um ein siebenfach mit Phospho-DMAE modifiziertes Trisaccharid zu konstruieren. Andererseits beweisen die MALDI-TOF-Analysen eindeutig ein solches Trisaccharid. Zudem wurde dieses Ergebnis zweimal reproduziert. Eine Erklärung für die fehlenden Signale bei der GC/MS-Analyse könnten Verluste während der Aufreinigung der Glykane oder ein zu geringer Response-Faktor im Massenspektrometer gewesen sein. Weiterhin gestaltete das Fehlen geeigneter Standardverbindungen die Interpretation der Signale partiell methylierter Alditolacetate schwierig.

Bei der MALDI-TOF-Analyse des methylierten, substituierten Trisaccharids ist das Na-Addukt des Molekül-Ions ungewöhnlich homogen, da keinerlei Signale geringerer oder höherer Substitution zu beobachten sind (Abb.22A). Aus biologischer Sicht ist es bemerkenswert, daß selektiv sieben Phospho-DMAE-Reste einheitlich übertragen werden, obwohl insgesamt neun OH-Gruppen zur Verfügung stünden. Postuliert man jedoch eine  $\beta$ -anomere Verknüpfung der Kohlenhydrate untereinander, so ergäbe sich eine rigide, geradlinige Struktur, in der tatsächlich nur noch sieben OH-Gruppen einer Transferase zugänglich wären; die Positionen C4 der internen Galaktose und des GalNAc wären in dieser Anordnung eventuell sterisch verdeckt.

Das Ergebnis der Kohlenhydratanalysen ist in einiger Hinsicht bemerkenswert. Neben den ausschließlich *O*-glykosidisch gebundenen Monosaccharid-Bausteinen *N*-Acetylgalaktosamin und Galaktose wurden keine *N*-Glykane gefunden. Auch das von Bardehle [61] bestimmte, äquimolare Verhältnis von *N*-Acetylgalaktosamin zu Uronsäure konnte nicht bestätigt werden; vielmehr kommen Uronsäuren nur in Spuren vor. Vermutlich ist das damalige Ergebnis darauf zurückzuführen, daß auf Grund der hohen Substitution der Kohlenhydrate durch Phospho-DMAE der analytisch zugängliche Anteil des *N*-Acetylgalaktosamins in mit Uronsäuren vergleichbaren Mengen vorlag. Das postulierte Strukturmodell eines polymeren Glykosaminoglykans ist also eindeutig widerlegt.

### Immunologische Aspekte

Analog zu Beobachtungen bei verwandten Nematoden-Spezies weist auch *L. sigmodontis* keine sialylierten Glykane auf. Untersuchungen an exkretorisch-sekretorischen Produkten von *Toxocara canis* zeigten lediglich durch Fucose terminierte *O*-Glykane [45]. Ebenso weisen andere Glykokonjugate wie Glykolipide in *Caenorhabditis elegans* und *Ascaris suum* keine Sialylierung auf. Die in *L. sigmodontis* nachgewiesenen Kohlenhydratstrukturen besitzen keine der biologisch häufig beobachteten Terminationen wie Sialylierung, Sulfatierung und Fucosylierung.

Obwohl bislang keine Untersuchung der anomeren Verknüpfung erfolgt ist, läßt sich zumindest eine große Ähnlichkeit des *N*-Acetylgalaktosamins mit dem sog. Tn-Antigen (normales Thomsen-Antigen) und des Gal-GalNAc mit dem T-Antigen feststellen (Thomsen-Friedenreich-Antigen). Immunologisch ist dieser Befund von einigem Interesse, da solche „ungeschützten“ Strukturen ggf. eine Aktivierung des Immunsystems (Makrophagen) hervorrufen können. Das Tn- und das T-Antigen werden als „nackte *O*-Glykane“ bevorzugt und in hohem Maße auf Zelloberflächen bestimmter Tumorgewebe gefunden [128]. Zudem ist bekannt, daß Sialinsäuren auf Zelloberflächen einen Angriff durch das Complementsystem verhindern.

Allgemein wird die Exposition solcher nicht vollständig prozessierten Glykane auf die beschleunigte Expression der Zelloberflächenproteine zurückgeführt, so daß während des Durchschleusens der zu glykosylierenden Proteine durch die Golgi-Kompartimente keine Anheftung terminierender Substituenten erfolgt. Ein beim Parasiten ähnlich gelagerter Mechanismus scheint wenig wahrscheinlich. Vielmehr liegt generell keine aktive Sialyltransferase vor. Die Synthese dieser dem Immunsystem fremden Glykanstrukturen seitens des Parasiten würden sein Überleben im Wirt jedoch gefährden. Daher müssen andere Schutzmechanismen vorherrschen. *N*-Acetylgalaktosamin und Gal-GalNAc wurden vornehmlich den im tieferen Bereich der Mikrofilarienscheide befindlichen Polypeptide shp1 und shp1a zugeordnet, da sie nichtphosphorylierte und nicht DMAE tragende Proteine sind. Daher sind sie nicht auf der Scheidenoberfläche exponiert und für das Immunsystem des Wirts unzugänglich. Im Vergleich dazu scheint die Maskierung des Trisaccharids Gal-Gal-GalNAc durch über Phosphodiestergruppen verknüpftes DMAE offensichtlich. Dieses Glykan ist Hauptbestandteil der Modifikationen in den beiden Oberflächenproteinen shp3 und shp3a und durch den hohen Grad seiner Substitution als solches vom Immunsystem in bislang ungeklär-

ungeklärter Weise nicht identifizierbar. Zudem weist der Substituent DMAE physiologisch bedeutsame Eigenschaften auf, denn DMAE bzw. Phospho-DMAE besitzen *per se* antidepressive bzw. psychotonische Eigenschaften. Seit geraumer Zeit wird dies auch für kommerziell erhältliche Präparate genutzt.

### **PMP- und Anthranilsäure-Derivatisierung**

Welche der beiden Derivatisierungsmethoden zu wählen ist, richtet sich nach der individuellen Fragestellung. Die Anthranilsäuremethode hat den großen Vorteil, mit sehr geringen Materialmengen auszukommen (unterer Picomol-Bereich pro Monosaccharid), und ist auf Grund der fluorimetrischen Detektion sehr sensitiv, welche nur wenig durch Verunreinigungen gestört wird. Mittlerweile konnte die analytische Voruntersuchung von Probenmaterial auf Kohlenhydrate mittels dieser Methode erfolgreich etabliert und standardisiert werden. Über Nacht lassen sich somit im Auto-Sampler-System Proben quantitativ und qualitativ untersuchen. Erstmals ist es auch gelungen, die mit anderen Reagentien nur schwer derivatisierbaren Uronsäuren zu detektieren.

Demgegenüber ist die chromatographische Auftrennung PMP-markierter Glykane auf Grund ihrer Detektion im UV zuweilen durch stark absorbierende Verunreinigungen gestört. Auch ist eine etwas höhere Ausgangsmenge von mindestens 30pmol pro Monosaccharid zur Derivatisierung nötig, was unter anderem eine Untersuchung der in Spuren vorkommenden Uronsäuren von *L. sigmodontis* nicht möglich machte. Jedoch liegen die Vorteile der PMP-Markierung in der Derivatisierung größerer Glykane, z. B. Dextran, und deren mühelosen chromatographischen Auftrennung mit reverse-phase Chromatographie, vor allem aber in der massenspektrometrischen Detektion, da sich das Pyrazolon-Molekül im PMP leicht protonieren läßt. Monosaccharide können durch den Einbau zweier PMP-Moleküle in den von Matrix-Signalen ungestörten Meßbereich verschoben werden.

### **shp3a**

Wie in Tab.5 aufgeführt, beläuft sich die Gesamtmasse aller Phospho-DMAE-Reste von shp3a auf ca. 18kDa, was einem relativen Anteil von ca. 40% entspricht. Ca. 26% der Molekülmasse bestehen aus *O*-Glykanen, sowie 25% aus Polypeptid. Durch die HF-Behandlung von shp3a konnte eine deutliche Zunahme des GalNAc-Anteils beobachtet werden. Des Weiteren wurde Galaktose als Bestandteil der Modifikation entdeckt. Dieser Be-

fund ist auf die im Labor gängige Freisetzungsmethode von Kohlenhydraten zurückzuführen. Sie geht von einer schonenden Hydrolyse der glykosidischen Bindungen aus, kann aber Phosphoester- und -diesterbindungen, wie sie in diesem Fall vorlagen, nicht spalten. Dementsprechend konnten bislang nur die unsubstituierten, „flüchtigen“ Monosaccharide gaschromatographisch detektiert werden.

Nach Entfernung der Phosphoestergruppen mit HF sind nunmehr alle Glykane zugänglich. Das gaschromatographisch ermittelte, ungewöhnlich hohe Verhältnis von 5:1 bzgl. Gal:GalNAc wurde angesichts der Identifizierung des substituierten Trisaccharids Gal-Gal-GalNAc für die Berechnung der Gesamtmasse der Kohlenhydrate auf ca. 2:1 geschätzt.

Zieht man die Meßfehler bei der Bestimmung der Kohlenhydrate und des DMAE von ca. 10-20% in Betracht, so lassen sich bei der Gesamtmassenbestimmung von shp3a mindestens 90% belegen (41.5kDa). Somit kann die Existenz weiterer unbekannter Modifikationen ausgeschlossen werden.

Versuche, einen näheren Einlick in die Struktur der Modifikationen von shp3a und shp3 mittels Isolierung individueller proteolytischer Fragmente zu bekommen, waren auf Grund der außerordentlichen Resistenz der modifizierten Proteinregion gegenüber unspezifischen Enzymen nicht möglich gewesen. Andererseits erfüllen damit diese Oberflächenproteine ihre biologische Schutzfunktion vor Angriffen des Immunsystems.

### **Synthesen/Immunsereen**

Im Rahmen der immunologischen Charakterisierung der Oberflächenmodifikationen in den Scheiden von *L. sigmodontis* wurden zur Gewinnung von Antiseren sowohl synthetisch gewonnene als auch „native“ Antigene herangezogen. Bzgl. der synthetischen Antigene ist es gelungen, DMAE über Phosphodiesterbindungen an freie OH-Gruppen von Rinderinsulin, serumalbumin und Ovalbumin zu koppeln. Die Kopplungssynthesen mit Polypeptiden wurden ausschließlich auf die direkte Kopplung von Phospho-DMAE und die Isothiocyanat-Methode beschränkt, da sich die exakte Nachbildung des aus den Scheiden isolierten, substituierten Trisaccharids als außerordentlich schwierig und zeitaufwendig darstellte.

Die Ausbeuten an modifiziertem Rinderinsulin mit der direkten Kopplungsmethode waren gegenüber denen bei BSA sehr niedrig gewesen, was z. T. auf Verluste während der relativ sauren Reaktionsbedingungen, und damit auf einen hydrolytischen Abbau, zurückzuführen war. Des weiteren könnte Material während der chromatographischen Aufreinigung verloren

gegangen sein. Demgegenüber schienen die Verluste bei BSA unter denselben Bedingungen angesichts der hohen eingesetzten Mengen kompensiert worden zu sein. Ein weiterer Grund waren vermutlich die nicht-wäßrigen Reaktionsmedien, welche die Löslichkeit der Polypeptide herabsetzten. Generell war die relative Kopplungsausbeute gegenüber der Isothiocyanat-Methode, bei der gepufferte, wäßrige Medien verwendet wurden, jedoch erhöht. Im Vergleich mit dem sterisch anspruchsvollen p-Aminophenol-Molekül ist der Zugang des kleinen Phospho-DMAE-Moleküls zu den OH-Seitengruppen vermutlich erleichtert.

Auf Grund seiner geringen Masse ließ sich Insulin als einziges Polypeptid nach der Kopplung massenspektrometrisch genau charakterisieren, so daß eine exakte Anzahl veresterter OH-Seitengruppen bestimmt werden konnte.

Um zunächst ein möglichst strukturnahes Antigen zur Immunisierung einzusetzen, wurde auf Grund der geringen Mengen von shp3 und shp3a auf das exkretorisch-sekretorische Produkt Juv-p120 zurückgegriffen, welches ebenfalls an *O*-Glykane gebundenes Phospho-DMAE trägt, deren Strukturen aber noch nicht bestimmt wurden.

Mittlerweile konnten die gewonnenen Antiseren charakterisiert werden. Wie die ersten Ergebnisse zeigten, gab es positive Reaktionen gegen Juv-p120 sowie gegen Phosphatidyl-DMAE und -MMAE, welches auf PVDF-Folien präsentiert wurde (pers. Mitt. Dr. Hintz). Der Vergleich der Ergebnisse bzgl. dieser beiden DMAE tragenden Strukturen legt den Schluß nahe, daß das Serum sowohl DMAE selbst als auch teilweise seine „strukturelle Umgebung“ zu erkennen scheint. Zusammen mit den nunmehr in größeren Mengen verfügbaren synthetischen DMAE-Kopplungsprodukten ist der Weg zur Gewinnung DMAE-spezifischer Antikörper geebnet. Somit besteht auch die Möglichkeit, diese für Inhibierungs- oder auch Agglutinationsexperimente von Mikrofilarien einzusetzen.

## V. Zusammenfassung und Ausblick

Mit Hilfe der Stains-All-Färbetechnik ist es möglich, die beiden Oberflächenproteine der Scheiden von *Litomosoides sigmodontois*, shp3 und shp3a, sensitiv und selektiv als phosphorylierte Proteine nachzuweisen. Auf diese Weise lassen sich auch andere, verwandte Nematodenspezies bzgl. phosphat-tragender Proteine im Gel voruntersuchen, die ggf. auch biogene Amine tragen.

Die Flüssigphasenhydrolyse von Scheidenmaterial sowie isolierter Glykoproteine mit 6M HCl und anschließender Fmoc-Analyse hat sich gegenüber der Gasphasenhydrolyse als geeignetere Methode erwiesen, um neben der Charakterisierung und quantitativen Freisetzung von Aminosäuren auch Aminozucker detektierbar zu machen.

Zur präparativen Isolierung größerer Mengen des Bausteins DMAE hat sich ein umgekehrtes Derivatisierungsverhältnis des Fmoc-Reagenzes gegenüber Aminosäuren bewährt. Zudem läßt sich DMAE selektiv aus Scheiden und Scheidenpolypeptiden wie shp3a durch schonende Behandlung mit Flußsäure herauslösen und als Fmoc-Derivat mit Hilfe der NMR-Spektroskopie strukturell belegen.

Da weder Glycerol noch signifikante Mengen des DMAE-Homologen Cholin in den Scheiden detektiert wurden, kann die Vermutung hinsichtlich vorhandener Teichonsäure nicht bestätigt werden. Des weiteren konnte das von Bardehle [129] postulierte Vorhandensein polymerer Glykosaminoglykane auf Grund des Spurenanteils von Uronsäuren widerlegt werden.

Die Untersuchungen am Scheidenpolypeptid shp3a haben ergeben, daß das hohe Ausmaß seiner Modifikationen fast ausschließlich auf die Anwesenheit der Kohlenhydrat-Bausteine *N*-Acetylgalaktosamin und Galaktose sowie auf DMAE-Reste zurückzuführen ist, die über Phosphodiesterbrücken mit dem Kohlenhydratanteil des Proteins verknüpft sind. Neben monomerem *N*-Acetylgalactosamin und dem Disaccharid Galaktose-*N*-Acetylgalactosamin konnte aus den Scheiden ein bisher unbekanntes Trisaccharid isoliert werden. Durch Methylierungsanalyse und MALDI-TOF-Massenspektrometrie ließ sich zeigen, daß das Trisaccharid aus den C3-verknüpften Monosacchariden Gal-Gal-GalNAc besteht und sieben Phospho-DMAE-Reste trägt, deren Positionen zum Teil im Molekül lokalisiert werden konnten.

Die Markierung kleinerer, reduzierender und neutraler Glykane mit dem Reagenz PMP, die Isolierung ihrer Derivate mittels HPLC und ihre Charakterisierung mit der MALDI-TOF-



Massenspektrometrie haben sich als leicht handhabbar, sensitiv, wenig aufwendig und schnell durchführbar herausgestellt. Der entscheidende Vorteil liegt in der Erhöhung der Molekülmasse um die des Reagenzes, was die Detektion im unteren Massenbereich erleichtert.

Die Verwendung von Anthranilsäure zur Derivatisierung ist durch die effektive HPLC-Automatisierung im Hause zu einer bequemen Methode quantitativer Bestimmung von Monosacchariden geworden, die eine für die gaschromatographische Analyse zeitaufwendige Aufarbeitung erspart.

Anhand von Rinderinsulin und -serumalbumin konnten die direkte Kopplung von Phospho-DMAE und die Kopplung mittels der Isothiocyanat-Methode erfolgreich etabliert und durchgeführt werden. Mit Hilfe der so gewonnenen Neokonjugate ist es möglich geworden, Antisera gegen den Baustein DMAE zu gewinnen und somit die Grundlage u.a. in Richtung Immunodiagnostik und Immunisierung gegen lymphatische Mikrofilarien gegeben.