

**Strukturelle Charakterisierung
hämolympmphroteingebundener N-Glykane und
immunhistochemische Lokalisierung
antigener Strukturen von *Biomphalaria glabrata*,
die mit Glykokonjugaten des Humanparasiten
Schistosoma mansoni kreuzreagieren**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie und Chemie
an der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Tobias Lehr
Diplom-Biologe aus Gießen

Gießen, im Februar 2007

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Januar 2003 bis Oktober 2006 am Biochemischen Institut des Universitätsklinikums Gießen-Marburg am Standort Gießen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rudolf Geyer durchgeführt. Finanziert wurde die Arbeit aus Drittmitteln zu den Teilprojekten A 15 „Molekulare Mimikry bei Trematoden“ und Z 1 „Zentrale Analytik“ im Rahmen der dritten und vierten Antragsperiode des DFG-Sonderforschungsbereiches 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“. Ein Teil der Experimente wurde von Oktober bis Dezember 2005 im Labor von Prof. Dr. Sumihiro Hase an der Universität Osaka (Japan) durchgeführt und dieser Aufenthalt durch ein Stipendium des „21st Center of Excellence Programs“ finanziert.

D 26

Dekan: Prof. Dr. Peter R. Schreiner

1. Gutachter: Prof. Dr. Alfred M. Pingoud

2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Geyer

Tag der mündlichen Prüfung: 26. März 2007

**„Sein und Wissen ist ein uferloses Meer: Je weiter wir vordringen,
umso unermesslicher dehnt sich aus, was noch vor uns liegt; jeder Triumph des
Wissens schließt hundert Bekenntnisse des Nichtwissens in sich.“**

Isaac Newton (1643 – 1727)

Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Kongressbeiträge

T. Lehr, H. Geyer, S. Natsuka, S. Hase and R. Geyer (2006). Carbohydrates in the focus of susceptibility and resistance of *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. 17th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“, the „Groupe Lillois de Glycobiologie“ and the “Belgian Working Group for Glycosciences”, 5.-7. November 2006, Bruges, Belgium.

T. Lehr, S. Meyer, H. Geyer, M. Wuhrer, I. van Die, M. J. Doenhoff and R. Geyer (2005). Developmental expression of carbohydrate epitopes contributes to molecular mimicry during the life-cycle of *Schistosoma mansoni*. Gordon Research Conference “Glycobiology”, 6.-11. März 2005, Ventura, USA.

T. Lehr, H. Geyer, M. J. Doenhoff and R. Geyer (2004). Carbohydrate-based cross-reactivity of haemolymph glycoproteins from *Biomphalaria glabrata* with *Schistosoma mansoni*. 15th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“ and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“, 28.-30. November 2004, Wageningen, The Netherlands, Glycoconjugate J: 21, 395.

T. Lehr. Carbohydrate-based cross-reactivity of haemolymph glycoproteins from *Biomphalaria glabrata* with *Schistosoma mansoni*. Oral presentation at the 15th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, the „Netherlands Society for Glycobiology“ and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“, 28.- 30. November 2004, Wageningen, Niederlande.

T. Lehr, H. Geyer, M. Wuhrer, G. Lochnit, M. J. Doenhoff and R. Geyer (2003). Preliminary characterization of glycoprotein-glycans from *Biomphalaria glabrata*: a major molluscan host of *Schistosoma mansoni*. 14th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“ and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“, 20.- 22. November 2003, Lille, France.

Veröffentlichungen

T. Lehr, S. Frank, S. Natsuka, H. Geyer, K. Beuerlein, M.J. Doenhoff, S. Hase and R. Geyer (2010). N-Glycosylation patterns of hemolymph glycoproteins from *Biomphalaria glabrata* strains expressing different susceptibility to *Schistosoma mansoni* infection. *Experimental Parasitology*, 126, 4, pp. 592-602.

T. Lehr, K. Beuerlein, M. D. Doenhoff, C. Grevelding and R. Geyer (2008). Localisation of carbohydrate determinants common to *Biomphalaria glabrata* as well as sporocysts and miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 135, 8, pp. 931-42.

T. Lehr, H. Geyer, K. Maaß, M. J. Doenhoff and R. Geyer (2007). Structural analysis of N-glycans from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* cross-reacting with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates. *Glycobiology*, 17, 1, pp. 82-103.

Abkürzungen

| | |
|-----------------|---|
| 2-AB | 2-Aminobenzidin |
| 3-O-MeMan | 3-O-Methylmannose |
| 3-O-MeGal | 3-O-Methylgalaktose |
| ACN | Acetonitril |
| AMPS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| ATT | 6-Aza-2-thiothymine |
| Bg | <i>Biomphalaria glabrata</i> (aus gemischter Hälterung) |
| Bge | <i>Biomphalaria glabrata</i> embryonic cell line |
| Bg PR | <i>Biomphalaria glabrata</i> Puerto Rico Stamm |
| Bg SAL | <i>Biomphalaria glabrata</i> Salvador Stamm |
| BSA | bovine serum albumine (Rinderserumalbumin) |
| (he)CID | (high-energy-) collision-induced-dissociation |
| CTF | Cercariales Transformations Fluid |
| Da | Dalton |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat |
| DHB | 2,5-Dihydroxybenzoesäure |
| dHex | Deoxyhexose |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EI | electron-impact |
| E/S | exkretorisch/sekretorisch |
| ECL | enhanced chemoluminescence |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| EtOH | Ethanol |
| F, Fuc | L-Fucose |
| F-LDN | terminal fucosyliertes LDN (Fuc(α 1-3)GalNAc(β 1-4)GlcNAc) |
| FAB | Fast Atom Bombardment |
| Gal | D-Galaktose |
| GalNAc | 2-Acetamido-2-deoxy-D-galaktose (N-Acetylgalaktosamin) |
| GC | Gaschromatographie |
| GC/MS | Gaschromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie |
| Glc | Glukose |
| GlcA | Glukuronsäure |
| GlcNAc | 2-Acetamido-2-deoxy-D-glukose (N-Acetylglukosamin) |
| H, Hex | Hexose |
| HexNAc | N-Acetylhexosamin |
| HPLC | high-performance liquid chromatography |
| HRP | horseradish peroxidase; Meerrettich-Peroxidase |
| IgG | Immunglobulin G |
| kDa | Kilodalton |
| KLH | keyhole limpet haemocyanin; Hämocyanin der Schnecke <i>Megathura crenulata</i> |
| LDN | LacDiNAc (GalNAc(β 1-4)GlcNAc) |
| LDN-F | subterminal fucosyliertes LDN (GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc) |
| LDN-DF | subterminal difucosyliertes LDN (GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-2)Fuc(α 1-3)]GlcNAc) |
| Le ^x | Lewis ^x (Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-2)]GlcNAc) |
| LID | Laser-Induzierte-Dissoziation |
| LM | Laufmittel |
| mAk | monoklonaler Antikörper |

| | |
|-------------------------------|---|
| Man | D-Mannose |
| MeH, MeHex | monomethylierte Hexose |
| MeOH | Methanol |
| MS | Massenspektrometrie |
| N | <i>N</i> -Acetylhexosamin |
| NF | HexNAc-Fuc-Fragment |
| N ₂ F | HexNAc ₂ -Fuc-Fragment |
| N ₂ F ₂ | HexNAc ₂ -Fuc ₂ -Fragment |
| NMS | normales Mausserum (normal mouse serum) |
| NRS | normales Kaninchenserum (normal rabbit serum) |
| PA | 2-Aminopyridin; Pyridylamin |
| p. a. | pro analysis |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | phosphate-buffered saline |
| PCR | polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PGC | Porous graphitic chromatography |
| <i>p. i.</i> | <i>post infectionem</i> |
| pLe ^Y | pseudo Lewis ^Y (Fuc(α1-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-2)]GlcNAc) |
| PMAA | partiell methylierte Alditolacetate |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| RP | Reversed-phase |
| RT | Raumtemperatur |
| <i>Sm</i> | <i>Schistosoma mansoni</i> |
| SDS | sodium dodecylsulfate; Natriumdodecylsulfat |
| TBS | Tris-buffered saline |
| TEA | Triethylamin |
| TEMED | <i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethylendiamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| ü. N. | über Nacht |
| US | Ultraschall |
| v/v | volume/volume |
| v/v/v | volume/volume/volume |
| w/v | weight/volume |
| X, Xyl | Xylose |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Die Schistosomiasis | 1 |
| 1.2 | Die Geschichte der Schistosomiasis | 1 |
| 1.3 | Geografische Verbreitung | 2 |
| 1.4 | Krankheitsbild | 3 |
| 1.5 | Der Humanparasit <i>S. mansoni</i> | 5 |
| 1.5.1 | Zoologische Stellung von <i>S. mansoni</i> | 5 |
| 1.5.2 | Der Lebenszyklus von <i>S. mansoni</i> | 6 |
| 1.6 | Diagnose und Behandlung der Schistosomiasis | 8 |
| 1.7 | Bekämpfung der Schistosomiasis | 10 |
| 1.8 | Untersuchungen am Zwischenwirt <i>B. glabrata</i> | 11 |
| 1.8.1 | Zoologische Stellung von <i>B. glabrata</i> | 11 |
| 1.8.2 | Die Hämolymphe von <i>B. glabrata</i> | 11 |
| 1.8.3 | Histologische Untersuchungen an <i>B. glabrata</i> | 12 |
| 1.9 | Interaktion zwischen <i>S. mansoni</i> und <i>B. glabrata</i> | 13 |
| 1.9.1 | Zur Invasion von <i>S. mansoni</i> in <i>B. glabrata</i> | 13 |
| 1.9.2 | Lektine und Peptide in der humoralen Abwehr von <i>B. glabrata</i> | 13 |
| 1.9.3 | Zur Rolle der Hämozyten | 15 |
| 1.9.4 | Molekulare Mimikry als Invasionsstrategie | 17 |
| 1.10 | Glykokonjugate von <i>S. mansoni</i> | 18 |
| 1.10.1 | Proteingebundene Glykane von <i>S. mansoni</i> | 19 |
| 1.10.2 | Lipidgebundene Glykane von <i>S. mansoni</i> | 23 |
| 1.11 | Glykanstrukturen von Mollusken | 25 |
| 1.12 | Aufgabenstellung | 28 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 29 |
| 2.1 | Chemikalien | 29 |
| 2.2 | Biologische Materialien | 29 |
| 2.2.1 | Hämolympfproben | 29 |
| 2.2.2 | Antiseren und Antikörper | 29 |
| 2.2.3 | Gewebeproben | 30 |
| 2.3 | Aufarbeitung der Hämolympfproben | 31 |
| 2.4 | Proteinbiochemische Methoden | 31 |
| 2.4.1 | Proteinbestimmung | 31 |
| 2.4.2 | 1D-Gelelektrophorese | 32 |
| 2.4.3 | Färbung von Gelen | 33 |
| 2.4.4 | Western Blot | 34 |
| 2.4.5 | Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) | 36 |
| 2.5 | Freisetzung N-glykosidisch gebundener Glykane | 37 |
| 2.5.1 | Enzymatische Freisetzung von N-Glykanen | 37 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.5.1.1 | Freisetzung von N-Glykanen mit PNGase F | 38 |
| 2.5.1.2 | Abtrennung der enzymatisch freigesetzten N-Glykane | 38 |
| 2.5.1.3 | Freisetzung von N-Glykanen mit PNGase A | 38 |
| 2.5.1.4 | Aufreinigung der enzymatisch freigesetzten N-Glykane | 39 |
| 2.5.1.5 | Monosaccharidbestimmung mittels Anthranilsäurederivaten | 39 |
| 2.5.1.6 | Chemische Freisetzung von N-Glykanen | 39 |
| 2.6 | Analyse von PA-markierten N-Glykanen..... | 40 |
| 2.6.1 | Herstellung PA-markierter Oligosaccharide | 40 |
| 2.6.2 | Bestimmung der Monosaccharide mittels GC/MS | 41 |
| 2.6.3 | Methylierungsanalysen | 42 |
| 2.6.4 | Affinitätschromatographien mit PA-markierten N-Glykanen | 43 |
| 2.6.4.1 | Herstellung und Verwendung einer Immunaффinitätssäule | 43 |
| 2.6.4.2 | Lektinaффinitätsläufe mit fucosespezifischem Lektin | 44 |
| 2.6.5 | HPLC-Trennungen der PA-markierten N-Glykane | 45 |
| 2.6.5.1 | Größenfraktionierung mittels Normalphasen-HPLC | 45 |
| 2.6.5.2 | 2D-HPLC-Mapping von PA-markierten N-Glykanen | 45 |
| 2.6.6 | Verwendung von Exoglykosidasen und HF-Behandlung | 47 |
| 2.7 | Massenspektrometrische Analyse der N-Glykane..... | 47 |
| 2.7.1 | Matrix assisted Laser desorption ionisation – time of flight – Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) | 48 |
| 2.7.2 | nano-HPLC mit online-Kopplung an Electrospray-Ionisation-Ion Trap-Massenspektrometrie (ESI-IT-MS) | 49 |
| 2.7.3 | Auswertung der massenspektrometrischen Daten | 49 |
| 2.8 | Immunhistologische Untersuchungen..... | 50 |
| 2.8.1 | Fixierung und Einbettung von Schnecken | 50 |
| 2.8.2 | Immunhistochemische Markierung an Schneckenschnitten | 50 |
| 2.8.3 | Immunhistochemie an Miracidien | 52 |
| 2.8.4 | Dokumentation der immunhistochemischen Markierungen | 52 |
| 3 | ERGEBNISSE | 53 |
| 3.1 | Aufreinigung des Hämolympheproteins | 53 |
| 3.2 | Isolierung, Aufreinigung und Untersuchungen kreuzreagierender N-Glykane | 53 |
| 3.3 | Biochemische Untersuchungen..... | 55 |
| 3.3.1 | Proteinbestimmung | 55 |
| 3.3.2 | 1D-SDS-PAGE und Western Blot | 55 |
| 3.3.3 | Ergebnisse der Bindungsstudien mittels ELISA | 56 |
| 3.4 | Gesamtpool an Hämolymphe-N-Glykanen | 58 |
| 3.4.1 | Monosaccharidbestimmung mittels GC/MS | 58 |
| 3.4.2 | Massenspektrometrische Untersuchung der freigesetzten und PA-markierten N-Glykane | 60 |
| 3.5 | Isolierung und Charakterisierung kreuzreagierender Glykane durch Immunaффinitätschromatographie..... | 62 |
| 3.5.1 | Isolierung der IgG-Fraktion und deren Kopplung | 62 |
| 3.5.2 | Monosaccharidbestimmung vom Immunaффinitätsdurchlauf und Immunaффinitätseluat | 62 |
| 3.5.3 | Ergebnisse aus den Methylierungsanalysen | 65 |
| 3.5.4 | Massenspektrometrische Untersuchung der Immunaффinitätsfraktionen | 68 |
| 3.5.4.1 | MS-Analyse des Immundurchlaufes (anti-SEA ungebundene Fraktion) | 68 |
| 3.5.4.2 | MS-Analyse des Immuneeluates (anti-SEA gebundene Fraktion) | 69 |
| 3.6 | Affinitätschromatographie mit dem fucosespezifischen immobilisierten <i>Aleuria aurantia</i> Lektin (AAL)..... | 72 |
| 3.6.1 | MS-Analyse der AAL-ungebundenen kreuzreagierenden N-Glykane | 72 |
| 3.6.2 | MS-Analyse der AAL-gebundenen kreuzreagierenden N-Glykane | 74 |
| 3.6.3 | HPLC-Trennung der AAL-Fraktionen | 75 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 3.7 | Massenspektrometrische Analyse kreuzreagierender N-Glykane..... | 77 |
| 3.7.1 | MALDI-TOF-MS der AAL-ungebundenen N-Glykane | 77 |
| 3.7.2 | Strukturelle Charakterisierung von AAL-ungebundenen N-Glykanen | 82 |
| 3.7.2.1 | Kleine AAL-ungebundene N-Glykane | 82 |
| 3.7.2.2 | Größere AAL-ungebundene N-Glykane..... | 87 |
| 3.7.2.3 | MALDI-TOF-MS/MS Analyse von AAL-ungebundenen N-Glykanen mittels heCID 90 | |
| 3.7.2.4 | Behandlung mit Exoglykosidasen und HF-Lösung | 94 |
| 3.7.3 | MALDI-TOF-MS Analyse AAL-gebundener N-Glykane..... | 97 |
| 3.7.4 | Strukturelle Charakterisierung AAL-gebundener kreuzreagierender N-Glykane | 104 |
| 3.7.4.1 | MALDI-TOF-MS/MS Analyse kleiner AAL-gebundener N-Glykane..... | 104 |
| 3.7.4.2 | Charakterisierung komplexer AAL-gebundener N-Glykane..... | 112 |
| 3.7.4.3 | Untersuchungen AAL-gebundener N-Glykane mittels MALDI-TOF-MS/MS (heCID) und Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie..... | 119 |
| 3.7.4.4 | Behandlung komplexer AAL-gebundener N-Glykane mit Exoglykosidasen und HF. | 126 |
| 3.8 | Immunhistochemische Untersuchungen an Schneckengewebe..... | 130 |
| 3.8.1 | Analyse nicht-infizierter <i>B. glabrata</i> | 130 |
| 3.8.2 | Immunhistochemische Analyse infizierter <i>B. glabrata</i> | 138 |
| 3.9 | Immunhistochemische Markierung von Miracidien | 142 |
| 3.10 | Vergleich zweier <i>B. glabrata</i> Stämme mit unterschiedlicher Empfänglichkeit gegenüber einer <i>S. mansoni</i> Infektion..... | 149 |
| 3.10.1 | Biochemische Untersuchungen | 149 |
| 3.10.1.1 | 1D-SDS-PAGE und Western Blot Analysen..... | 149 |
| 3.10.1.2 | Bindungsstudien mittels ELISA | 150 |
| 3.10.2 | Monosaccharidbestimmung mittels GC/MS | 152 |
| 3.10.3 | Methylierungsanalysen..... | 153 |
| 3.10.4 | MALDI-TOF-MS Analyse der Ausgangsfractionen und der Immunaффinitätseluat..... | 154 |
| 3.10.5 | Größenfraktionierung der Immuneffluatfraktionen..... | 157 |
| 3.10.6 | MALDI-TOF-MS Analyse nach Größenfraktionierung der Immuneffluat..... | 157 |
| 3.10.7 | Reversed-phase HPLC-Trennung der Fraktionen nach Größentrennung..... | 162 |
| 3.10.8 | Massenspektrometrische Analyse ausgewählter Peaks nach RP-HPLC..... | 165 |
| 3.10.9 | Vergleich der Mengen an kreuzreagierenden Glykanen beider Stämme..... | 171 |
| 3.10.10 | Immunhistochemische Untersuchungen..... | 173 |
| 4 | DISKUSSION | 177 |
| 4.1 | Allgemeine Aspekte..... | 177 |
| 4.2 | Methodische Aspekte..... | 177 |
| 4.2.1 | Aufreinigung des Hämolympheproteins und Freisetzung der N-Glykane | 177 |
| 4.2.2 | Befunde biochemischer Untersuchungen..... | 178 |
| 4.2.3 | Isolierung und erste Charakterisierung der kreuzreagierenden Spezies | 178 |
| 4.2.4 | MALDI-TOF-MS basierende Untersuchungen..... | 180 |
| 4.2.5 | Behandlung mit Exoglykosidasen und Defucosylierung | 180 |
| 4.3 | Strukturelle Aspekte..... | 181 |
| 4.3.1 | Kleinere kreuzreagierende N-Glykane | 181 |
| 4.3.2 | Verlängerte kreuzreagierende N-Glykane..... | 183 |
| 4.3.3 | Komplexere kreuzreagierende N-Glykane..... | 185 |
| 4.3.4 | Weitere strukturelle Eigenschaften | 188 |
| 4.4 | Immunhistochemische Befunde an Geweben von <i>B. glabrata</i>..... | 189 |
| 4.5 | Immunhistochemische Markierung von Miracidien | 191 |
| 4.6 | Vergleich der kreuzreagierenden N-Glykanprofile zweier <i>B. glabrata</i> Stämme | 192 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 195 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 6 | SUMMARY | 196 |
| 7 | LITERATUR | 197 |
| 8 | ANHANG..... | 213 |
| | Tabelle mit Monosaccharidzusammensetzungen aller detektierter PA-markierter N-Glykane | 213 |
| | Danksagungen | 219 |
| | Lebenslauf | 221 |
| | Erklärung | 223 |

1 Einleitung

1.1 Die Schistosomiasis

Die Schistosomiasis, die nach ihrem Entdecker Theodor Bilharz (1825-1862) auch Bilharziose genannt wird, ist eine chronische Erkrankung des Menschen, die durch humanpathogene Trematoden (Saugwürmer) der Gattung *Schistosoma* verursacht wird. Die Bilharziose gilt neben der Malaria als die bedeutendste und schwerste parasitäre Erkrankung in den Tropen und Subtropen. Die Zahl der weltweit infizierten Menschen wird auf circa 200 Millionen geschätzt [41,190,196,262]. Da ein Impfstoff gegen die Bilharziose bisher noch nicht entwickelt werden konnte, stellt lediglich die Chemotherapie mit Praziquantel eine Behandlungsform dar. Da die Behandlung mit diesem Medikament aber die Gefahr der Reinfektion nicht mindert, infizieren sich viele Menschen nach erfolgreicher Behandlung neu. Auf Grund dessen stellt die Bilharziose besonders in Entwicklungsländern eine ernstzunehmende, gesundheitliche Dauergefährdung für die Menschen dar. Daher wurden in den letzten Jahren vermehrt Untersuchungen an *Schistosoma mansoni* durchgeführt, um Invasionsmechanismen und die Überlebensstrategie besser zu verstehen sowie antigene Determinanten zu charakterisieren, um dem Endziel, eine effektive Vakzinierung gegen Schistosomiasis zu entwickeln, näher zu kommen.

1.2 Die Geschichte der Schistosomiasis

Erste Symptome, die auf Schistosomiasis hinweisen, sind schon aus der Zeit um 1900 v. Chr. aus den Hochkulturen am Nil und in Mesopotamien bekannt und wurden, als chronische Hämaturien und Blasenleiden beschrieben und in den Papyri als „Blutharnen“ bezeichnet. In Untersuchungen an Mumien der prädynastischen Periode Ägyptens (um 3100 v. Chr.) konnten schistosomale Antigene mittels ELISA detektiert werden [16]. In zwei weiteren Mumien aus der Zeit der 20. Dynastie (ca. 1250-1000 v. Chr.) wurden verkalkte Schistosomeneier gefunden [254]. Von den Napoleonischen Truppen, die in der Zeit von 1799 bis 1801 eine Invasion in Ägypten durchführten, wurden die typischen Symptome beschrieben, die auf eine Infektion mit Schistosomen schließen ließen [57]. Erst im Jahre 1851 entdeckte der deutsche Arzt Theodor Bilharz nach einer Sektion in Mesenterialvenen *Schistosoma haematobium* und nannte diesen

Wurm *Distamom haematobium*, den er 1852 in einer wissenschaftlichen Publikation als „doppelten Saugwurm“ beschrieb. Mit *Schistosoma mansoni* wurde 1902 die zweite Schistosomenart von Manson postuliert, 1915 von Leiper bestätigt und von Sambon *Schistosoma mansoni* benannt [259]. Mit *Schistosoma japonicum* (1904), *Schistosoma intercalatum* (1923) und *Schistosoma mekongi* (1978) wurden weitere Arten beschrieben [57].

1.3 Geografische Verbreitung

Die Schistosomiasis kommt endemisch in über 70 Entwicklungsländern vor, in denen 20 Millionen Menschen schwer erkrankt sind und 120 Millionen Symptome zeigen. Abb. 1 zeigt die globale Verbreitung der fünf, für den Menschen wichtigste Arten der Schistosomen. Die auf drei Kontinenten vorkommende Krankheit birgt für 500 bis 600 Millionen Menschen alleine durch deren Lebensweise eine permanente Infektionsgefahr [41].

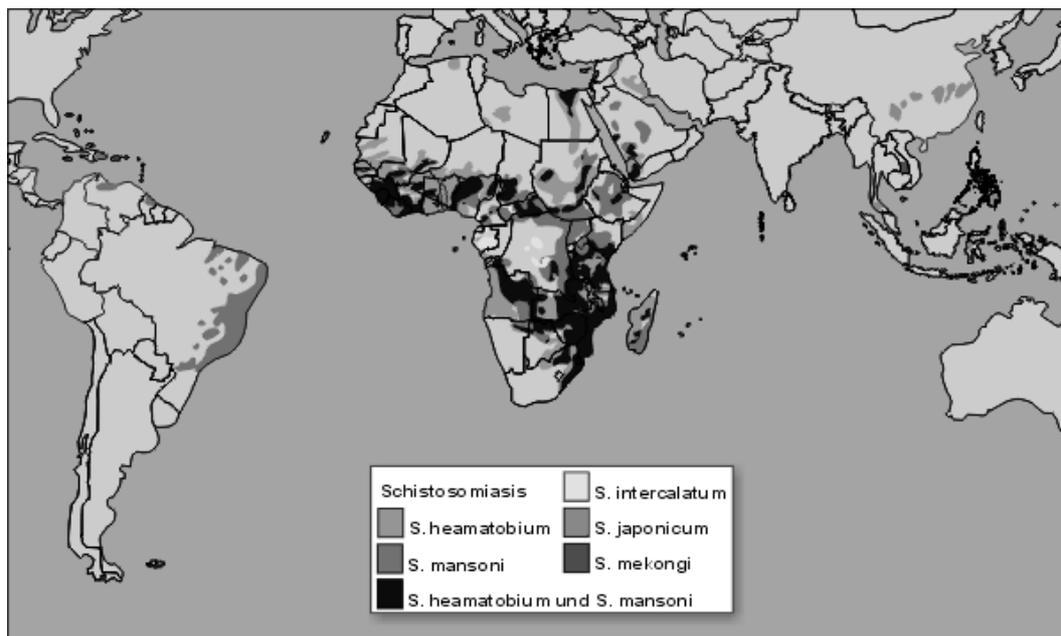


Abb. 1: Geografische Verbreitung humanpathogener Schistosomenarten.

<http://www.bueger.de/prima/maps/schistosomiasis.gif>

Jährlich fordert die Krankheit ca. 200.000 Todesopfer. Bisherige Maßnahmen, die Schistosomiasis unter Kontrolle zu bringen, sind sehr unterschiedlich ausgefallen. Da menschliches Leben permanent vom Wasser abhängig ist, stellt dies vor allem in Entwicklungsländern mit geringem hygienischem Standard eine ständige Infektionsge-

fahr für die Menschen dar. Dennoch konnte in Lateinamerika und in der Karibik die Rate an Schistosomiasis-Patienten hauptsächlich auf Brasilien und Puerto Rico reduziert werden. Afrika ist hingegen das am stärksten betroffene Gebiet weltweit. Vor allem haben die Eingriffe des Menschen auf natürliche Wasservorkommen (Assuan-Staudamm in Ägypten, Diama-Staudamm im Senegal) haben dazu geführt, dass die Rate an *S. haematobium* Infektionen zurückging, hingegen aber mehr Fälle von *S. mansoni* Infektionen auftraten [262]. Im asiatischen Raum stellt die Infektion mit *S. japonicum* ein Problem dar, welches dadurch noch verstärkt wird, dass *S. japonicum* eine Zoonose eingeht und auch Rinder und Wasserbüffel befällt, was ein ständiges Reservoir an Parasiten darstellt [61].

1.4 Krankheitsbild

Zum Krankheitsbild der Schistosomiasis tragen verschiedene Stadien des Lebenszyklus des Wurmes bei (Abb. 3Abb. 4). Nach Penetration der Haut durch die eingedrungene Cercarie ist als Folge eine leichte Hautrötung feststellbar, die bei humanpathogenen Arten je nach Empfindlichkeit des Menschen innerhalb von 2-3 Tagen anschwellen kann und auch als cercariale Dermatitis bezeichnet wird [87]. Erst nach vier bis fünf Wochen haben sich die adulten Würmer in den Mesenterialvenen gefunden, verpaart und beginnen mit der Eiproduktion. Die meisten Symptome und klinisch relevanten Komplikationen werden im Verlauf der Schistosomiasis durch die Eier verursacht. Der Krankheitsverlauf mit den auftretenden Symptomen ist sehr unterschiedlich und wird durch den Grad der Infektion, die physische Konstitution, die Immunität und auch die Sensitivität des Infizierten entscheidend beeinflusst [42,87,281]. Durch die Infektion mit einer sehr hohen Zahl an Cercarien kann es einige Wochen nach der Infektion zu einer akuten fiebrigen Schistosomiasis kommen, was auch als Katayama-Syndrom bezeichnet wird. Grund dafür ist ein plötzliches massives Heranreifen adulter Würmer, welches in der Eiproduktion mündet und mit einer Leukozytose mit ausgeprägter Eosinophilie einhergeht [144]. Als Folge der hohen Eiproduktion bei hoher Wurmlast gelangen Eier auch in andere Organe wie die Darmwand (*S. japonicum*, *S. mansoni*), und in die Blasenwand (*S. haematobium*). Große Mengen werden durch den Blutstrom auch in die Leber und seltener in das Gehirn transportiert. Um die im Lebergewebe befindlichen Eier kommt es zur Granulombildung. Eosinophile Granulozyten können die Eier umgeben, wobei es zu einer eosinophilen Hepatitis kommen kann und peripher am Granulom gemischte eosinophile und neutrophile Entzündungsreaktionen auftreten.

Die Eier können auch von einer epithelartigen Schicht umgeben sein, an die sich Lymphozyten anlagern, was eine Fibrose zur Folge haben kann. Die Eier verkalken, wenn die in ihnen befindliche Larve abgestorben ist und die entzündliche Reaktion abgeklungen ist. Bekannt ist auch, dass die Eier durch Poren in der Schale lösliches Eiantigen (u. a. Glykoproteine) abgeben, die für die Stimulation von T-Lymphozyten (Th) verantwortlich sind und über Cytokine (u. a. Interleukin-4) die typische Eigranulomreaktion auslösen [256,305]. Bei beginnender Eiablage kommt es in infizierten Mäusen zur Synthese von Th2 Cytokinen [269]. Lösliches Eiantigen führt bei basophilen Zellen von gesunden Spendern zur Bildung von Histamin und Interleukin 4, worin eine Verschiebung der Immunantwort von Th1 zu Th2 gesehen wird [81]. Dieses Prinzip ist als „IL-4 inducing principle of schistosome eggs“ (IPSE) beschrieben und inzwischen als ein Glykoprotein identifiziert, auf dessen Glykananteilen Lewis^X-Epitope (Le^X) nachgewiesen wurden [266,267,310]. Damit der Parasit überleben kann, darf er befallene Organe nicht so stark schädigen, dass der Endwirt zu Grunde geht. Ein Bestandteil des löslichen Eiantigens induziert die Proliferation von Endothelzellen und steht im Zusammenhang mit einer Neovaskularisierung in der Leber [86]. Zudem wurde ein pro-angiogener Faktor aus Eiern beschrieben, der ein kapillarähnliches Auswachsen von Endothelzellen induziert und als hitzestabil und proteasestabil näher charakterisiert wurde [156]. Die Granulombildung kann in der Leber zu einer Hypertension der Pfortader führen. Leberschädigungen können aber auch auftreten, wenn die Adultwürmer durch die Pfortader geschwemmt werden, was bei hoher Infektionsrate und nach Chemotherapie der Fall sein kann [12]. Bei Infektion mit *S. haematobium* kann das Auftreten von Blasenkrebs eine Folge sein [208]. Neben den Komplikationen bei hoher Infektionsrate, die auch zum Tod durch massive Organschädigung führen können, äußert sich die Schistosomiasis bei geringerer Infektionsrate oftmals nur durch Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen sowie Vergrößerung von Leber, Lymphknoten und Milz und wird häufig erst bei Routineuntersuchungen diagnostiziert.

1.5 Der Humanparasit *S. mansoni*

1.5.1 Zoologische Stellung von *S. mansoni*

Unter den Helminthen, welche parasitische Metazoen aus den Tierstämmen der Plathelminthen, Nematoden und Acanthocephala sind, gehören Schistosomen zum Stamm der Plathelminthen und darunter zur Klasse der Trematoden. Schistosomen gehören zu den Digenea und sind getrenntgeschlechtlich. Sie sind zur Familie der Schistosomatidae zusammengefasst, welche insgesamt 12 Gattungen beinhaltet, die alle parasitär in Blutgefäßen von Vertebraten vorkommen. Alle humanpathogenen Arten gehören der Gattung *Schistosoma* an, die sich nach der Morphologie der Eier (Abb. 2) und der Verwandtschaft der Zwischenwirte in vier Gruppen einteilen lässt, die jeweils nach ihrem Hauptvertreter benannt sind [264]. *S. mansoni* gehört als Hauptvertreter der zweiten Gruppe neben weiteren tierpathogenen Arten an. Beim Auftreten möglicher neuer Arten erleichtern der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus der mitochondrialen DNA und die „Polymerase-Chain-Reaction“ (PCR) eine Identifizierung und Klassifizierung [66,67,217,232,235]

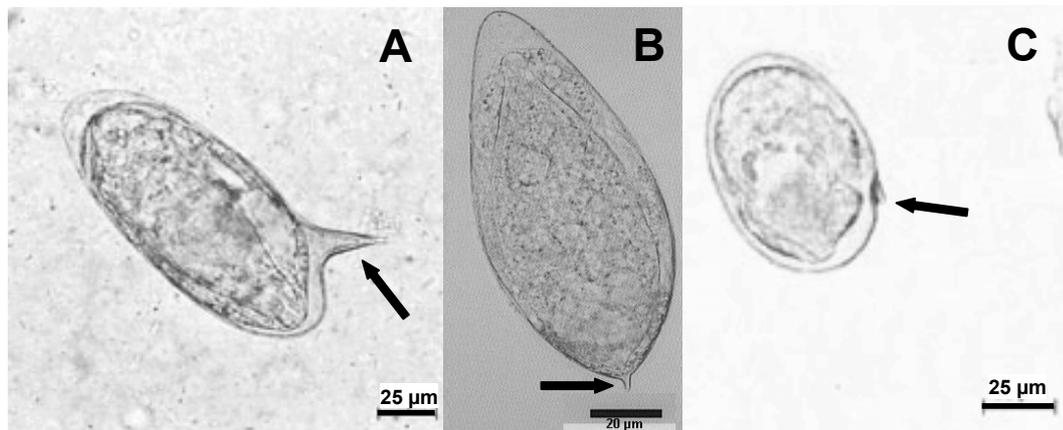


Abb. 2: Eier von *S. mansoni* (A), *S. haematobium* (B) und *S. japonicum* (C). Der Pfeil kennzeichnet den Stachel, der sich artspezifisch unterscheidet und auch zur Diagnose verwendet wird.

<http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/SchistoLife/S.mansoni.egg.html> (A),

http://www.mt.mahidol.ac.th/elearning/Parasite/blood_flukes.html (B und C).

1.5.2 Der Lebenszyklus von *S. mansoni*

Im Lebenszyklus von *S. mansoni* wird der Mensch immer als Endwirt befallen (Abb. 3). Zur Infektion kommt es bei Kontakt von menschlicher Haut mit Wasser, welches die larvalen, humanpathogenen Cercarien enthält. Cercarien, die auch Hakenschwanzlarven genannt werden, bestehen aus einem Kopf, in dem alle wichtigen Bestandteile lokalisiert sind, welche für die Entwicklung zum adulten Wurm im Menschen wichtig sind, und einem Schwanz, welcher der Fortbewegung dient. Cercarien verhalten sich schwimmend negativ geotaktisch [308] und können 1-2 Tage überleben. Den Hautkontakt mit einem potentiellen Endwirt registrieren Cercarien u. a. über die Wärmeänderung und heften sich an der Haut fest, wobei L-Arginin als Stimulus eine Rolle zu spielen scheint. Polare Oberflächenlipide sind dafür verantwortlich, dass die Cercarie an der Haut haften bleibt. Über eine Kriechphase, bei welcher der Schwanz als reine Fortbewegungshilfe abgeworfen wird, dringen sie aktiv durch die Haut ein, wobei dieser Vorgang durch bestimmte Fettsäuren stimuliert wird. Glykosylceramide und Phospholipide stimulieren die Abgabe von proteolytischen Enzymen am Vorderpol der Cercarie, die das Eindringen erleichtern [117,119,168]. Dabei streifen die Cercarien ihr äußeres Tegument (Glykokalyx) ab, ersetzen es durch ein neues Tegument und wandeln sich zu Schistosomula um. Die Schistosomula verweilen 2 bis 3 Tage im Unterhautgewebe und wandern dann in Blutgefäße ein, wobei sie zur Lunge weitertransportiert werden. Dort bleiben sie einige Tage und wandern dann über den Blutstrom und das Herz zu den Mesenterialgefäßen und gelangen zur Leber. Dort reifen sie weiter zum adulten Wurm heran und heften sich mit ihrem Saugnapf an die Blutgefäßwand an. Männliche und weibliche Würmer verpaaren sich dort und wandern gegen den Blutstrom in die Darmblutgefäße, wo sie sich festhaften (Abb. 3). Etwa 4 bis 5 Wochen nach der Infektion kommt es zur Eiproduktion, wobei 300 bis 3000 Eier pro Wurmpaar und Tag abhängig von der Art beschrieben wurden [57]. Für ein erfolgreiches Wurmpaar spielt das männliche Tier eine besondere Rolle, da ungepaarte Weibchen nicht zur Geschlechtsreife kommen, es hingegen bei einer durchaus vorkommenden artverschiedenen Verpaarung zur Geschlechtsreife beim Weibchen kommt und damit Parthenogenese vorliegt [153,287]. Bei experimenteller Trennung der Wurmpärchen teilen sich die Stammzellen im Ovar nicht mehr, was eine reversible Reaktion darstellt, wobei nach erneuter Verpaarung eine Tyrosinkinase in Ovar und Vitellarium aktiv wird, welche die Eiproduktion anregt [158]. Um die hohe Eiproduktion zu gewährleisten, frisst das Weibchen pro Tag etwa die zehnfache Menge an Erythrozyten im Vergleich zum Männchen [170].

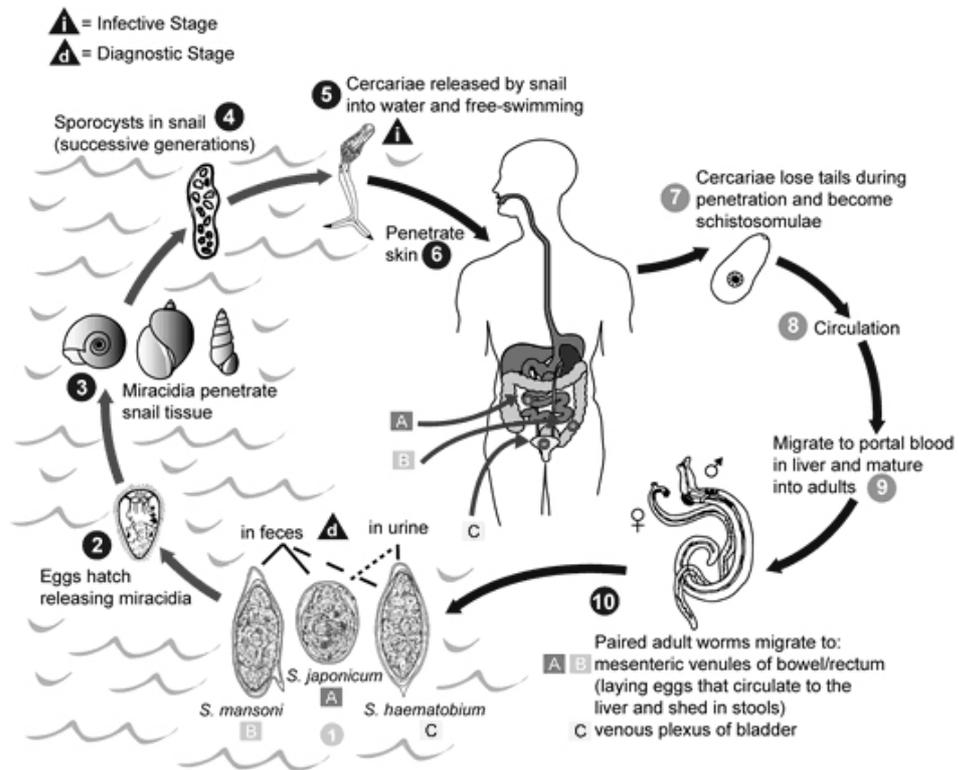


Abb. 3: Lebenszyklus der drei wichtigsten humanpathogenen Schistosomenarten *S. mansoni*, *S. japonicum* und *S. haematobium*.

Der Lebenszyklus gliedert sich in eine Süßwasser-Phase und eine Phase, die im Endwirt Mensch abläuft, auf. Punkt 3 der Abbildung zeigt symbolisch die drei Gehäuse der Zwischenwirtschnecken *Biomphalaria spec.*, *Bulinus spec.* und *Oncomelania spec.* (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

Ohne Behandlung können die Wurm-pärchen im Endwirt 5 bis 10 Jahre überleben, aber es ist auch schon von über 30 Jahren berichtet worden [90]. Je nach Grad der Infektion können über 1000 Eier pro Gramm Stuhl ausgeschieden werden [112]. Durch ungeklärte Abwässer gelangen die ausgeschiedenen Eier sukzessive in größere Süßwasseransammlungen, wo daraus kleine begeißelte Larven, die Miracidien ausschlüpfen. Die Miracidien, die bereits geschlechtsdeterminiert sind, müssen zur Fortsetzung des Lebenszyklus eine Süßwasserschnecke der Gattung *Biomphalaria* infizieren, wobei den Miracidien dafür fünf bis sechs Stunden bleiben, bevor sie absterben [118,154,308,309]. Mittels Chemokinese, wobei der Gradient des Lockstoffes erst während der Fortbewegung wahrgenommen wird, findet das Miracidium seinen Zwischenwirt. Makromolekulare Glykokonjugate, deren Spezifität möglicherweise durch den Kohlenhydratanteil bestimmt wird und bei denen es sich um Glykoproteine handeln kann, dienen als Schlüsselreize [242,308]. Es wurde nachgewiesen, dass *S. mansoni* seinen Zwischenwirt artspezifisch findet [118]. In die Schnecke eingedrungen,

werfen die Miracidien einige ihrer Epithelzellen ab und wachsen im Fuß zu einer Vorläufersporozyste heran. Durch vegetative Vermehrung entstehen Tochtorsporozysten, die über das offene Blutgefäßsystem in die Mitteldarmdrüse einwandern und dort geschlechtlich einheitlich determinierte Cercarien produzieren. Nach vier bis sechs Wochen und durch Lichtreize induziert, werden die Cercarien freigesetzt und treten nahezu über den ganzen Schneckenkörper aus, gelangen wieder ins Süßwasser und können eine neue Infektion auslösen. Eine Übersicht über die verschiedenen Stadien im Lebenszyklus von *S. mansoni* gibt Abb. 4.

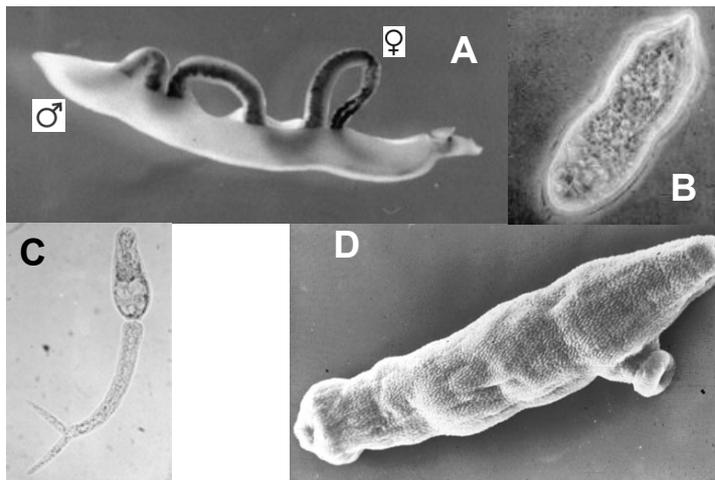


Abb. 4: Lebenszyklusabhängige Stadien von *S. mansoni*:

Adultes Wurmpärchen (A), Miracidium (B), Cercarie (C) und Schistosomulum (D). Die Größenverhältnisse sind nicht korrekt wiedergegeben.

<http://www.weichtiere.at/Schnecken/parasitismus.html> (B+C),

<http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/SchistoLife/Adult.worm.html> (A)

<http://www.path.cam.ac.uk/~schisto/SchistoLife/Schistosomule.html> (D)

1.6 Diagnose und Behandlung der Schistosomiasis

Auf Grund der nach einer Infektion mit Schistosomen auftretenden unspezifischen Symptome sind vielfältige direkte und indirekte Methoden zur eindeutigen Diagnose der Schistosomiasis unabdingbar. In vielen Fällen wird die Schistosomiasis durch den Nachweis von Eiern im Stuhl und anderen Exkreten diagnostiziert, was eine zuverlässige Methode ist, da sich die schistosomalen Eier artspezifisch unterscheiden (Abb. 2). Zur Unterscheidung der Schistosomenarten sind aber auch molekularbiologische Methoden geeignet [22]. Einen weiteren direkten Nachweis stellt die Detektion von zirkulierenden Antigenen im Serum oder Urin dar. Dabei handelt es sich um die

glykosylierten Antigene CCA (circulating cathodic antigen) und CAA (circulating anodic antigen) [1,19,58,62,63,113,216,219,292]. Unter einem indirekten Diagnoseverfahren versteht man zum Beispiel den Nachweis von Hämoglobin im Urin von mit *S. haematobium* Infizierten [57]. Weitere Diagnoseverfahren basieren auf dem Nachweis von schistosomenspezifischen Antikörpern im Serum [325]. Diese Antikörper können einmal durch Bindung an Schnitten von Adultwürmern nachgewiesen werden, aber auch durch Präzipitationstechnik, die Cercarienhüllenreaktion, durch indirekte Hämagglutination, durch ELISA [10,19,57,64,72,80,166,193,200,241,257,302,322,331] und Tüpfeltest erfolgen. Chemisch synthetisierte schistosomale Kohlenhydratantigene sollen auf ihre Eignung für diagnostische Zwecke geprüft werden [124,125]. Für die Behandlung der Schistosomiasis wird, wie bereits erwähnt, im Allgemeinen der Wirkstoff Praziquantel in oraler Medikation verabreicht [57]. Die ein- oder mehrmalige Einnahme führt zur Abtötung der Würmer, wobei zum genauen Wirkmechanismus mehrere Ansätze diskutiert werden. So führt die Applikation von Praziquantel zu einem Calciumionen-Einstrom durch das Tegument der Würmer, was auch *in vitro* Untersuchungen gezeigt haben [29,43,244]. Magnesium erwies sich dabei als Antagonist des Calciums, da die Muskelkontraktionen damit inhibiert werden konnten [29]. Erwiesen ist auch, dass ein Zusammenspiel von Praziquantel mit dem humoralen Immunsystem des Endwirts ein Abtöten der Würmer begünstigt [32-34] und dass die Praziquantelgabe und Immunisierung synergistisch wirken [82,83]. Die Ursache für diesen Zusammenhang wird mit einer Veränderung der Schistosomen-Oberfläche durch Praziquantel diskutiert, wodurch es zu einer vermehrte Expression parasitärer Antigene auf der Oberfläche des Wurmes kommt [133,179]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Malariamedikament Artemether juvenile Schistosomen zerstört und zusammen mit Praziquantel verschiedene Stadien von Schistosomen angreift, was eine neue Therapie möglich machen könnte [271,272,320]. Die im Vergleich zur Vakzinierung möglicherweise schnellere Entwicklung von neuen Medikamenten und Therapien scheint im Hinblick auf Praziquantelresistenzen bei Schistosomen dringend notwendig zu sein [9,246].

1.7 Bekämpfung der Schistosomiasis

Auf Grund fehlender Vakzinierungsmöglichkeiten stellt diese Krankheit besonders in Entwicklungsländern ein erhebliches Problem für die Bevölkerung dar. Daher wird mit der Behandlung von Infizierten und der lebenszyklusabhängigen Bekämpfung auf zweierlei Wegen gegen den Parasiten vorgegangen. Für eine effektive Vakzinierung wurden Peptid- und Kohlenhydratantigene bereits auf ihr Potential geprüft, eine protektive Immunantwort zu erzeugen und somit als mögliche Impfstoffe in Frage zu kommen. Dabei wird das Schistosomula-Stadium, besonders im Lungenstadium, effektiv durch das Immunsystem bekämpft [7,35]. Auch der Adultwurm wird teilweise erfolgreich durch das Immunsystem attackiert [44]. Für mehrere Kohlenhydratantigene von Schistosomen wurde gezeigt, dass sie sehr immunogen sind und dass die gegen sie gerichtete Immunantwort zu einer protektiven Immunität führen kann [114,164,165,229]. Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern (mAKs) gegen *S. mansoni* Eier haben gezeigt, dass die Schutzfunktion eines Antigens durch den passiven Transfer des Serums oder des Antikörpers einen protektiven Einfluss gegen cercariale Infektion ausüben kann [54,132,218,228,229]. Erfolgsversprechend im Hinblick auf mögliche Vakzinkandidaten sieht auch die Behandlung im Mausmodell mit strahlungsbehandelten Cercarien aus [60,247-250,270]. Auch aus anderen Stadien von *S. mansoni*, bei schistosomalen Enzymen, rekombinanten Proteinen und dem Hämocyanin der Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* (Keyhole limpet haemocyanine, KLH) sind protektive Antigene beschrieben worden [23,56,84,111,115,149,245,275,286,304]. Da sich aber bisher noch keine Vakzinierung für die klinische Anwendung daraus entwickeln ließ, wird nach alternativen Vakzinkandidaten gesucht [71]. Auf der Basis des Zwischenwirtes wird auch nach Möglichkeiten zur Intervention gesucht. Inzwischen lassen sich infizierte Schnecken mittels ELISA und PCR detektieren [127-130]. Strategien zur Bekämpfung des Zwischenwirtes werden prinzipiell auf biologischer sowie chemischer Basis erprobt. Die Wirkung von Substanzen pflanzlichen Ursprungs wird auf ihren Einsatz gegen *B. glabrata* als molluskizides Mittel geprüft. Chemikalien wurden ebenfalls auf ihre molluskiziden Eigenschaften getestet. Auch der Einsatz so genannter Kompetitor-Schnecken wurde erwogen, ebenso wie die Wirkung anderer schneckenpathogenen Trematoden, die *B. glabrata* nach Infektion steril werden lassen [2,13,178,181,194,202,227,237-239,255,263,273].

1.8 Untersuchungen am Zwischenwirt *B. glabrata*

1.8.1 Zoologische Stellung von *B. glabrata*

Innerhalb der Gastropoden gehört *B. glabrata* zur Unterklasse der Euthyneura, in der fast alle Vertreter zwittrig sind. Zur gleichen Gruppe gehören auch Schnecken anderer Gattungen, die als Zwischenwirte anderer Parasiten dienen, wie *Bulinus spec.* (*S. haematobium*), und *Lymnaea spec.* (*Trichobilharzia ocellata*). Abb. 5 zeigt ein lebendes Exemplar von *B. glabrata* (5 A), ein Exemplar ohne Gehäuse nach Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) (5 B).

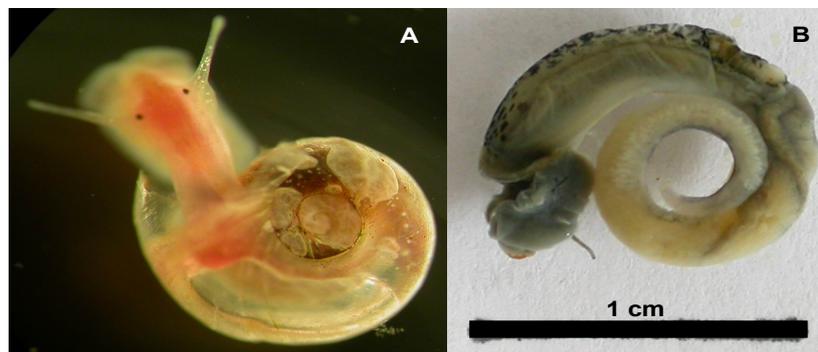


Abb. 5: *Biomphalaria glabrata* in zwei Ansichten mit Gehäuse (A) und paraformaldehydfixiert nach Entfernung der Schale (B). Durch den respiratorischen Farbstoff Hämoglobin erscheint die Schnecke rot-braun (A). Der dunklere Teil in der Mitte des Gehäuses kennzeichnet den Sitz der Mitteldarmdrüse. Adulte Exemplare haben einen Schalendurchmesser von 1-2 cm. A und B: eigene Aufnahmen.

1.8.2 Die Hämolymphe von *B. glabrata*

Die biochemische Charakterisierung des Hämoglobins von *B. glabrata* stellt eine der ersten Untersuchungen der Hämolymphe von *B. glabrata* dar [8]. Das Hämoglobin macht mit über 90 % der gesamten Proteinmenge die Hauptkomponente des Hämolympheproteins aus und liefert nach Reduktion eine 180 kDa Bande in der 5-15 %igen Gradienten-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) [11,17,18,107,177]. Das Hämoglobin ist als Glykoprotein beschrieben, das 3 % Kohlenhydratanteil enthält, wobei neben Mannose, Galaktose und Fucose im molaren Verhältnis von 2:1:1 auch Glukosamin, aber weder Sialinsäuren noch Uronsäuren detektiert wurden [5]. Nach Immunisierung von Kaninchen mit zellfreier Hämolymphe des PR-albino Stammes von *B. glabrata* konnte gezeigt werden, dass das polyklonale Kaninchenserum an PBS-gewaschene Hämozyten von *B. glabrata* bindet. Damit konnte der Nachweis erbracht

werden, dass auf der Oberfläche der Hämozyten gleiche Antigene wie in der zellfreien Hämolymphe vorliegen [328]. Eine weitere Untersuchung an *B. glabrata* Stämmen, die sich in ihrer Empfänglichkeit gegenüber einer *S. mansoni* Infektion unterscheiden, ergab Unterschiede im Proteingehalt der Hämolymphe sowie im Bindevermögen von polyklonalem Antiserum gegen Hämolymphe [276]. Darüber hinaus wurden fünf Polypeptide mit unterschiedlichem Molekulargewicht aus dem Serum von empfänglichen und resistenteren *B. glabrata* beschrieben, die sich in ihrem Muster nach Verdau mit α -Chymotrypsin und Pepsin leicht unterscheiden und eine strukturelle Ähnlichkeit zum Hämoglobin zeigten [277]. In der Hämolymphe wurde zudem die hydrolytische Aktivität von Enzymen untersucht, die sich als Glykosidasen identifizieren ließen. Darin wurde ein humoraler Abwehrmechanismus vermutet, den die Schnecke nutzt, um insbesondere die Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche von eindringenden Pathogenen zu modifizieren [335]. Während besonders in N-Glykanen der Monosaccharidbaustein L-Fucose vorwiegend α -glykosidisch gebunden vorliegt, kann als besondere Entdeckung die Detektion einer β -D-Fucosidase gesehen werden [335]. Die Hypothese des Abwehrmechanismus wurde durch den Befund gestützt, dass die Aktivität der Glykosidasen bei gleich bleibendem Proteingehalt in der Hämolymphe besonders in den ersten beiden Tagen *post infectionem* (*p. i.*) gesteigert ist. Empfindlichere Schnecken zeigten eine geringere Proteinkonzentration im Plasma sowie eine signifikant niedrigere Glykosidaseaktivität als resistenterere Exemplare [333].

1.8.3 Histologische Untersuchungen an *B. glabrata*

Bisherige histologische Untersuchungen an *B. glabrata* beschreiben hauptsächlich die Vorgänge nach Infektion der Schnecke mit *S. mansoni*. Mit Arbeiten über das Mantelgewebe, den Gewebsbereichen um den Vorderpol, der Mitteldarmdrüse und dem Amöbozyten-produzierenden Organ wurden histologische Untersuchungen auch an uninfizierten Exemplaren durchgeführt [150,174]. Nach Infektion kommt es durch Sporozystenbildung zu Veränderungen im betroffenen Gewebe, wobei ein Einkapselungsprozess eingeleitet werden kann, der als Abwehr gegen den Parasiten dient und je nach Art unterschiedlich stark ausfallen kann [59,175,274]. Auf Vorläufer-Sporozysten in *B. glabrata* wurde in immunhistochemischen Untersuchungen die Epitope LacDiNAc (GalNAc(β 1-4)GlcNAc, LDN) und subterminal monofucosylierte LacDiNAc (GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc, LDN-F) Epitope nachgewiesen, die im Gewebe von uninfizierten *B. glabrata* bisher noch nicht detektiert werden konnten [221].

1.9 Interaktion zwischen *S. mansoni* und *B. glabrata*

1.9.1 Zur Invasion von *S. mansoni* in *B. glabrata*

Das *B. glabrata* – *S. mansoni* Infektionssystem wurde hinsichtlich seiner zellulären und molekularen Basis der Schneckenempfänglichkeit bzw. Resistenz sowie der Trematodeninfektiösität in der Vergangenheit besonders intensiv untersucht [186]. Dennoch wird das Immunsystem von Invertebraten noch immer als nicht gut verstanden angesehen [185]. Entsprechend sind die molekulare Basis des Invasionsmechanismus von *S. mansoni* und die Faktoren, die zu Resistenzerscheinungen bei *B. glabrata* führen, bisher unbekannt [186]. Verschiedene Parameter werden diskutiert, die zur erfolgreichen Infektion von *B. glabrata* führen und die andererseits bei einigen Schnecken Resistenzen begünstigen [78,79,186,288]. Dazu zählen die genetische Disposition, das Vorhandensein von (bislang noch undefinierten) Faktoren in der Hämolymphe, die Mobilisierung von Hämozyten, die molekulare Mimikry durch Expression wirtsspezifischer Determinanten, das Phenoloxidasystem und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die Hämozyten [36,101,327]. Miracidien werden durch ein Makromolekül chemotaktisch angezogen, das von der Schnecke abgegeben wird und als Glykokonjugat identifiziert wurde [118,120,121,242]. Die Verwendung von Schnecken-konditioniertem-Wasser zeigte dabei, dass die Miracidien von *S. mansoni* spezifisch und auch gegen konkurrierende Einflüsse ihren Zwischenwirt finden können [154]. Vergleichende Untersuchungen hatten gezeigt, dass *B. glabrata* durch die Infektion beeinflusst wird und infizierte Exemplare einen geringeren Gehalt an Hämolympheprotein aufweisen als uninfizierte Kontrollgruppen, was mit einem Abbau von Hämoglobin und Serumproteinen im Verlauf der Infektion erklärt wurde, da infizierte Schnecken zudem auch eine erhöhte Herzfrequenz sowie einen geringeren Glukosespiegel in der Hämolymphe zeigen [40,99,100,171-173]. Es konnte weiter gezeigt werden, dass der Proteingehalt der Hämolymphe nur innerhalb von 12 Wochen nach Infektion der Schnecke Schwankungen ausgesetzt ist und sich später nicht mehr von uninfizierten Exemplaren unterscheidet [258,334].

1.9.2 Lektine und Peptide in der humoralen Abwehr von *B. glabrata*

Zu den Hämolympheproteinen, die im Verlauf der Invasion für die Abwehr von Parasiten eine Rolle spielen, zählen kohlenhydratbindende Proteine (Lektine) und weitere Peptide. Ein Hämagglutinin konnte identifiziert werden, das mit einer Masse von 100 kDa

als Glykoprotein in der Hämolymphe vorliegt und eine Affinität zu terminalen Galaktoseresten aufweist [30]. Die Hämagglutinine können lebende Sporozysten von *S. mansoni* agglutinieren und stellen damit eine der ersten Barrieren für den Parasiten nach der Invasion dar. Möglicherweise wird dieser Mechanismus vom Parasiten auch dafür ausgenutzt, selektiv wirtseigene Antigene aufzunehmen, da gezeigt werden konnte, dass Sporozysten in der Lage sind, an Plasmaproteine zu binden und antigene Determinanten sogar aufzunehmen [24,25,278]. Interessant war dabei auch der Befund, dass diese aufgenommenen Antigene anscheinend prozessiert werden, weil Antiseren gegen antigene Determinanten aus dem Plasma nicht mehr gut binden konnten [25]. In diesem Mechanismus wird eine erste Selektion vermutet, die darüber entscheiden könnte, ob eine Schnecke infiziert wird oder nicht [278]. Dazu trägt der Befund bei, dass tegumentale Proteine von *S. mansoni* Sporozysten hoch glykosyliert sind und das Bindevermögen von Plasmaproteinen kohlenhydratabhängig ist [151]. In infizierten *B. glabrata* ist zudem eine gesteigerte Prävalenz eines Hämagglutinins nachweisbar, das sich durch L-Fucose sowie EDTA und EGTA hemmen lässt. In dieser Untersuchung wurde nach Affinitätsanreicherung ein fucosebindendes Lektin isoliert, das agglutinierende Eigenschaften hat [49].

Lektine scheinen im Infektionsgeschehen bei *B. glabrata* eine besondere Rolle zu spielen, da die Konzentration von kohlenhydratbindenden Polypeptiden im Massenbereich von 75-130 und 150-220 kDa im Zuge einer Infektion ansteigt [205,206]. Diese Studie lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass möglicherweise Fucose ein Schlüsselmonosaccharid im Hinblick auf das Bindeverhalten von Plasmaproteinen an Sporozysten ist [151]. Zwar wurde Fucose in einer Lektinbindungsstudie an Plasmaproteinen von infizierten (72 h *p. i.*) und nicht-infizierten *B. glabrata* nicht nachgewiesen, der Einsatz von Neoglykoproteinen belegte jedoch das Vorliegen eines fucosespezifischen Lektins [334]. In der Hämolymphe vorkommende Lektine werden als Bindeglieder diskutiert, die es Hämozyten ermöglichen, besser an eingedrungene Pathogene zu binden, was im Laborversuch bereits gezeigt werden konnte [188,204]. Eine besondere Bedeutung von fucosylierten Glykokonjugaten (insbesondere Glykopeptiden) im Infektionsgeschehen haben auch andere Untersuchungen erkennen lassen. Eine Studie an Sporozysten, Cercarien und auch Miracidien ergab, dass die beiden mAbs KCS und E2 nicht nur an deren Oberfläche binden, sondern auch an Peptide aus der Hämolymphe infizierter *B. glabrata*. Untersuchungen zur Epitopspezifität dieser mAbs mittels Immunaффinitätsaufreinigung und Methylierungsanalyse ergaben, dass Glykokonjugate mit hohem Gehalt an Fucose erkannt werden und zweitens für die Bin-

dung terminale Fucose (KCS) und interne Fucose-Reste (E2) verantwortlich sind [265]. Mittels Western Blot Analyse und mAbs wurden in der Hämolymphe infizierter *B. glabrata* zudem das GalNAc(β 1-4)GlcNAc (LDN) sowie GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc (LDN-F) Epitop nachgewiesen, die in uninfizierten Exemplaren nicht detektiert werden konnten und daher als parasitär sekretierte Glykopeptide interpretiert wurden [221]. Beide Experimente verdeutlichen, dass möglicherweise die Sekretion fucosylierter Antigene durch den Parasiten in *B. glabrata* stattfindet. Andere Peptide wurden beschrieben, die in einem Zusammenhang mit dem humoralen Abwehrverhalten bei *B. glabrata* gesehen werden. In einer Untersuchung, in der *B. glabrata* mit dem Trematoden *Echinostoma paraensei* infiziert wurde, konnten in der Hämolymphe Lektine nachgewiesen werden, welche vom Parasiten sekretierte Polypeptide präzipitierten. Drei cDNAs mit Sequenzhomologie zu diesen Lektinen codieren Fibrinogen-verwandte Proteine (FREPs), die Sequenzhomologien zur Immunglobulin G (IgG) Superfamilie aufweisen [4] und als Basis weiterer Untersuchungen an Proteinen der IgG Superfamilie bei *B. glabrata* als Modellobjekt dienen [143,336]. Die Injektion von rekombinantem humanen Interleukin-1 in empfängliche und resistere *B. glabrata* mit und ohne Infektion führte zur deutlichen Steigerung der phagozytotischen Hämozytenaktivität und der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) in beiden Stämmen. Interleukin-1 β steigerte die Abtötung von primären Sporozysten in *B. glabrata*, vor allem in resistenteren Spezies [45,46,106]. Der Transfer von Plasma resistenteren *B. glabrata* auf sensible Exemplare hat dazu geführt, die Empfänglichkeit der Akzeptor-Schnecken deutlich herabzusetzen, was auf das Vorhandensein mindestens eines Plasmafaktors für die Resistenz schließen ließ [109]. Dabei scheinen Plasmakomponenten, möglicherweise auf Proteinbasis, mit einem Molekulargewicht von 10 und 30 kDa für die Übertragung von Resistenz auf empfindliche Schnecken verantwortlich zu sein [300].

1.9.3 Zur Rolle der Hämozyten

Die Hämozyten, die bei Gastropoden als frei zirkulierende und auf Abwehrreaktionen spezialisierte Zellen in der Hämolymphe vorkommen [101,186], sind für *B. glabrata* histologisch detailliert beschrieben worden [197-199]. Bereits zuvor wurde immunhistochemisch gezeigt, dass sich die Hämozyten auch im Hinblick auf ihre Oberflächenantigene unterscheiden [329,330], was eine mögliche Spezialisierung dieser Zellen wahrscheinlich macht. Der Befund, dass lysosomale Enzyme in den Hämozyten von zwei verschiedenen *B. glabrata* Stämmen unterschiedlich verteilt sind, stützt diese

Annahme [108]. Die Hämozyten sind fähig, Sporozysten, aber auch Miracidien von *S. mansoni* zu attackieren und letztendlich abzutöten [15,187]. Untersuchungen an Hämozyten von sensiblen und resistenteren *B. glabrata* haben gezeigt, dass die kurzzeitige Exposition mit *S. mansoni* Miracidien das Phagozytoseverhalten der Hämozyten der sensiblen Schnecken reduziert, das der resistenteren Schnecken hingegen steigert, was den parasitären Einfluss auf den Zwischenwirt verdeutlicht [89]. In neueren Untersuchungen im Hinblick auf die Stimulation der Hämozyten von *B. glabrata* wurde *in vitro* demonstriert, dass die Stimulation, die zur Bildung von ROS führt, durch Monosaccharide ausgelöst werden kann, wobei sich die Verbindungen BSA-Galaktose, BSA-Mannose und BSA-Fucose als besonders wirksam erwiesen haben [122]. Dieser Befund kann als Hinweis interpretiert werden, dass Monosaccharide und möglicherweise Lektine eine Rolle im Abwehrverhalten von *B. glabrata* spielen. Die Superoxid-Dismutase spielt als Schlüsselenzym eine Rolle in der Generation von Sauerstoffradikalen in Hämozyten [102,103,123]. Hämozyten von resistenteren Schnecken bilden vergleichsweise mehr Sauerstoffradikale, als sensible Schneckenstämme [47]. Hier hatte sich gezeigt, dass *S. mansoni* in diesen Abwehrmechanismus eingreift, da exkretorische/sekretorische (E/S) Produkte nach der Transformation zu Sporozysten die Radikalfreisetzung inhibieren konnten und die synthetisierende/sekretierende Aktivität der Hämozyten beeinflusst wurde [47,183]. Antikörper, die gegen Hämozyten und Plasmakomponenten verschiedener *B. glabrata* Stämmen gerichtet sind, zeigten eine Bindung an Sporozysten von *S. mansoni* und konnten sogar die Bindung von Hämozyten daran hemmen [6]. Eine solche Antikörperkreuzreaktivität wurde auch in einer anderen Studie beschrieben und als Möglichkeit interpretiert, wie es zur hämozyteninduzierten Abtötung des Parasiten kommen kann [105]. Eine Schlüsselrolle der Hämozyten bei der Bekämpfung eindringender Miracidien wurde durch erfolgreichen Transfer des Hämozytenbildungsgewebe resistenter *B. glabrata* Stämme in sensible *B. glabrata* demonstriert, wobei ein Anstieg der Resistenz in den Empfängerspezies beobachtet wurde, der allerdings nicht dauerhaft blieb [283,299]. Der schistosomale Einfluss in der Schnecke scheint direkt auf dieses Organ zu wirken, da eine mitotische Aktivität in diesem Gewebe nach Injektion von Miracidien und Cercarien-Extrakten in *B. glabrata* beobachtet wurde [282]. *In vitro* wurde nachgewiesen, dass zwei Proteine mit dem Molekulargewicht von 19 kDa und 46 kDa von Hämozyten synthetisiert werden, die an Sporozysten binden können, worin eine Mediatorfunktion in der Erkennung von Fremdstoffen in der Schnecke gesehen wird [184]. Der direkte Einfluss auf

Oberflächenpeptide bei Hämozyten durch *S. mansoni* Infektion deutete darauf hin, dass mehrere Signale für die Modulation von Hämozyten notwendig sein könnten [50].

1.9.4 Molekulare Mimikry als Invasionsstrategie

Voruntersuchungen deuteten darauf hin, dass antigene Determinanten von *B. glabrata* auch in bestimmten *S. mansoni* Stadien vorliegen und insofern im Invasionsprozess eine Rolle spielen könnten. Damit wird eine parasitäre Invasionsstrategie des Parasiten beschrieben, die molekulare Mimikry genannt wurde und die Präsentation von wirtseigenen Antigenen durch den Parasiten darstellt, die ihn gegen die Angriffe des Wirtes unempfindlicher macht [55]. Es konnte gezeigt werden, dass Antikörper, die gegen hämoglobinfreie Hämolymphe von resistenteren und sensiblen *B. glabrata* gerichtet sind, an der Oberfläche von Miracidien und primären Sporozysten binden, die zuvor *in vitro* generiert wurden, ohne dabei Kontakt zu Wirtsantigenen gehabt zu haben [326]. Ebenso wurde nachgewiesen, dass Antikörper, die gegen Sporozysten gerichtet sind, auch an Hämozyten binden [26]. Ein 38 kDa protektives Epitop wurde beschrieben, das in allen Stadien des Lebenszyklus von *S. mansoni* präsent ist und auch bei *B. glabrata* vorkommt, wo es als Oligosaccharid charakterisiert wurde. Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieses protektive Epitop auch bei nicht-schistosomalen Zwischenwirten vorliegt, wie zum Beispiel beim Hämocyanin der Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* (KLH) [70]. Ein weiteres Antigen aus adulten *S. mansoni*, das mit *B. glabrata* und auch mit dem großen Leberegel *Fasciola hepatica* kreuzreagiert, wurde auf sein serodiagnostisches Potential geprüft [243]. Das Vorliegen von protektiven Antigenen wurde auch für Mitteldarmdrüsenhomogenate von *B. alexandrina* beschrieben, welche die Infektion von Mäusen nach subkutaner Injektion von *S. mansoni* Cercarien um 50 % reduzierte, wobei sich hingegen eine Infektion nach perkutaner Invasion von Cercarien und intravenös injizierter Schistosomula bei den Mäusen manifestierte [68]. Das Vorkommen wirtseigener Antigene beim Parasiten wurde für den Zwischenwirt auch bei *S. mansoni* postuliert, hingegen fehlten lange Zeit Beweise, dass dies in den entsprechenden larvalen Stadien tatsächlich der Fall ist [327]. Weiterhin ist offen, wie und woher der Parasit die wirtsidentischen Antigene erhält, ob durch eigene Synthese (wirtsähnlich) oder aber durch Akquirierung (wirtseigen) unmittelbar nach der Invasion. Bekannt ist, dass *S. mansoni* mit *B. glabrata* mindestens ein 39 kDa saures Protein gemeinsam hat, welches mittels Antiseren im Western Blot detektiert werden konnte [69]. Eine Untersuchung an Hämolympheglykoproteinen von sensiblen

und resistenteren *B. glabrata* hat gezeigt, dass resistente Schnecken sich im Proteinmuster von sensiblen Exemplaren unterscheiden und dass Sporozysten von *S. mansoni* fähig sind, Glykoproteine aus dem Plasma zu adsorbieren. Dies ergab einen ersten Hinweis darauf, dass die Interaktion des invadierenden Miracidiums mit Glykoproteinen der Hämolymphe mit der Resistenz oder Empfänglichkeit von *B. glabrata* korreliert ist [303]. Im Zuge einer Infektion sind parasitäre Antigene im Zytoplasma von Amöbozyten und im Zentrum von Amöbozytenaggregaten detektiert worden [3]. Die Bindung von E/S-Glykokonjugaten von larvalen *S. mansoni* Stadien an Hämozyten verläuft scheinbar über einen kohlenhydratbindenden Rezeptor, da die Bindung dieser E/S-Glykokonjugaten an Hämozyten durch Glykokonjugate wie Mucine, Heparin und auch Fucoidan partiell inhibiert werden konnte, was ein Indiz für den Einfluss von komplexeren, polymeren Kohlenhydraten bei diesem Interaktionsschritt darstellt [152]. Die Zelllinie von *B. glabrata* Embryonen (*Bge*) wurde schon in zahlreichen Experimenten angewendet, um die Interaktion von *B. glabrata* Zellen mit *S. mansoni* zu untersuchen [37,48,77,147]. Diese Zellen binden an die Oberfläche von Sporozysten, was *in vitro* gezeigt werden konnte, und diese Bindung wurde am effektivsten von Fucoidan, aber auch von Mannose-6-phosphat, Heparin und Dextransulfat inhibiert [37]. Fucoidan selbst bindet an diesen Zelltyp von *B. glabrata* und weist auf deren Assoziationsfähigkeit mit Kohlenhydratmotiven hin. Die Bindung der *Bge* an Sporozysten erfolgt primär durch Oberflächen-N-Glykane, da die PNGase F Behandlung von geblotteten tegumentalen Glykoproteinen die Bindung aufhob [37]. Wie beschrieben, deuten zahlreiche Arbeiten auf eine Beteiligung von Kohlenhydraten am molekularen Mimikry hin.

1.10 Glykokonjugate von *S. mansoni*

In allen Stadien des Lebenszyklus von *S. mansoni* werden ganz verschiedene Glykokonjugate synthetisiert, die durch ihre strukturelle Einzigartigkeit und Antigenität gekennzeichnet sind und im Infektionsgeschehen auf Zwischen- sowie Endwirtbasis eine wichtige Rolle spielen [53,145,159,220,293,315]. Von besonderer Bedeutung ist deren Vorkommen auf N- und O-Glykanen und Glykolipiden sowie auch auf E/S-Produkten. Neben den gängigen Monosaccharidbausteinen wurden bei *S. mansoni* bisher keine modifizierten Zucker gefunden, ebenso keine Sialinsäuren. Während Fucose in Glykokonjugaten zumeist kein dominanter Baustein ist, kommt dieses Monosaccha-

rid in den Glykokonjugaten von *S. mansoni* besonders gehäuft vor [160,191,222-225,252,279,280,306,310,312-318].

1.10.1 Proteingebundene Glykane von *S. mansoni*

Die aus den verschiedenen Stadien von *S. mansoni* charakterisierten Glykane liegen sowohl N- als auch O-glykosidisch gebunden vor und zeichnen sich durch eine hohe strukturelle Variation aus [65,315]. Die N-Glykane aus den Eiern von *S. mansoni* bauen sich aus einem Pentasaccharidkern auf, der bis zu zweifach kernfucosyliert sein kann und mit einer (β 1-2)-gebundenen Xylose an der zentralen β -gebundenen Mannose substituiert sein kann. Die diantennären N-Glykane können an ihren terminalen Enden Le^{X} und LDN-F Epitope tragen [161,310], wie Abb. 6 zeigt.

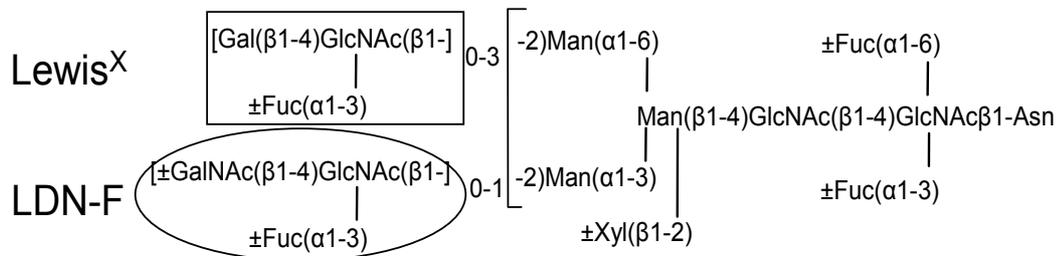


Abb. 6: Struktur von N-glykosidisch gebundenen Glykoprotein-Glykanen aus *S. mansoni* Eiern. Auf einem Pentasaccharidkern, der durch bis zu zweifache Kernfucosylierung und durch (β 1-2)-gebundene Xylose modifiziert vorliegen kann, sind auf den Glykanantennen in terminaler Position gebunden bis drei Le^{X} und bis ein LDN-F Epitope nachgewiesen worden (Abbildung modifiziert nach [65]).

In einer neueren Untersuchung an einer Glykoprotein-Fraktion von löslichem Eiantigen von *S. mansoni*, die im Serum oder Urin von Infizierten nachgewiesen wurde, wurden hoch fucosylierte O-Glykane, auf denen mittels Bindung an spezifische Antikörper das $Fuc(\alpha 1-2)Fuc(\alpha 1-3)GalNAc(\beta 1-4)[Fuc(\alpha 1-2)Fuc(\alpha 1-3)]GlcNAc$ (DF-LDN-DF) Epitop nachgewiesen wurde, detektiert (Abb. 7) [251].

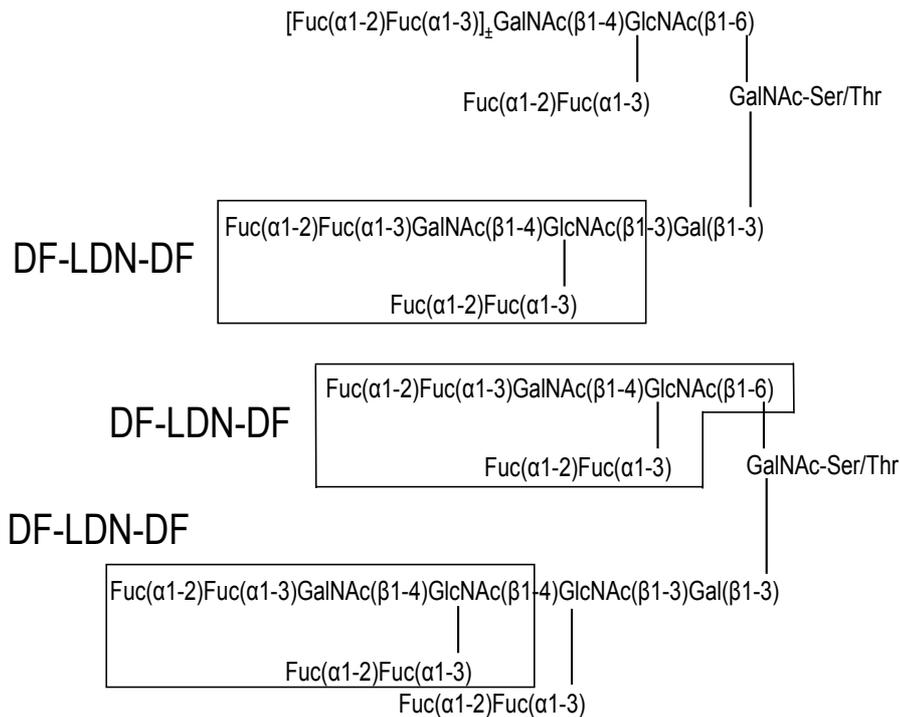


Abb. 7: O-Glykane aus einer Glykoprotein-Fraktion der löslichen Eiantigene von *S. mansoni*. Die bis zu 10 Fucose-Reste tragenden O-Glykane weisen auf den Antennen DF-LDN-DF-Motive in terminaler Position auf, die umrandet dargestellt sind.

Bei Cercarien wurden sowohl N- als auch O-Glykane strukturell charakterisiert [146,162,163]. Die cercarialen N-Glykane weisen eine Pentasaccharid-Kernstruktur mit einer (α1-6)-gebundene Kernfucose auf, die am C2 Atom der innersten Mannose einen Xylose-Rest tragen kann. Auf den Glykanantennen wurde in terminaler Position das Le^X Epitop nachgewiesen, wobei das subterminale Fuc(α1-3)GlcNAc-Element doppelt auftreten kann (Abb. 8).

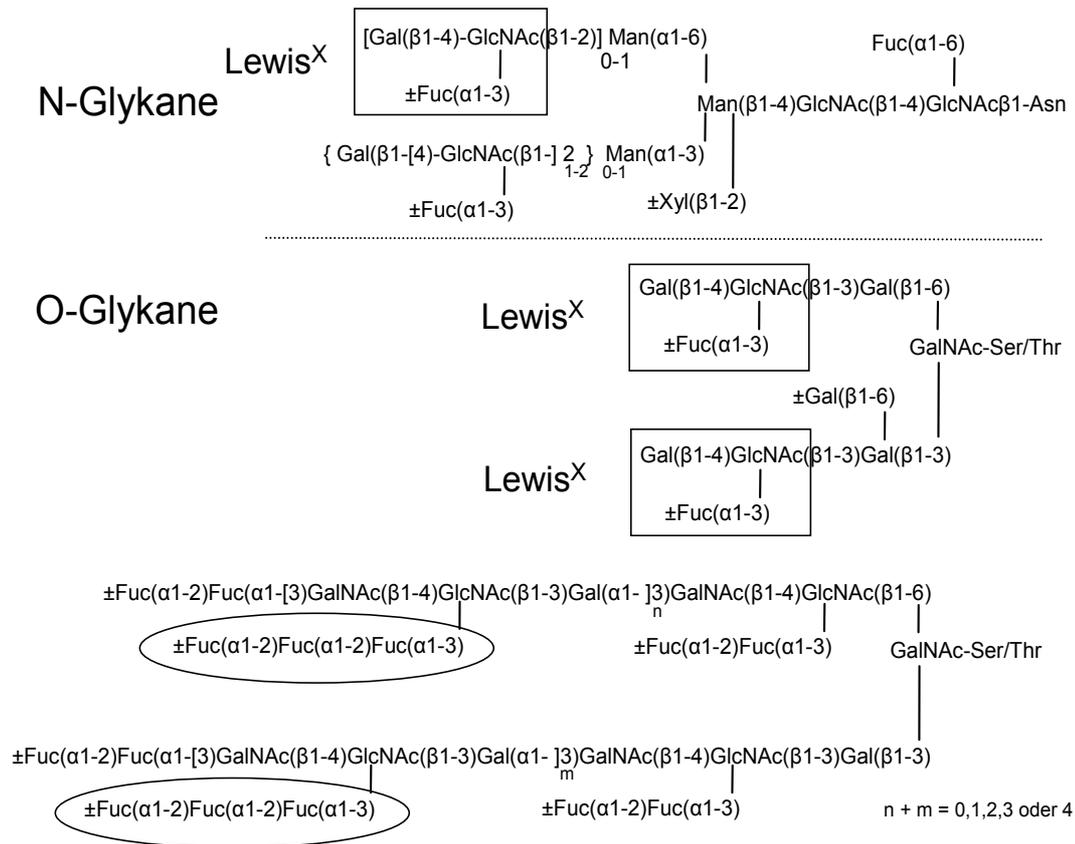


Abb. 8: Strukturelle Variationen der N- und O-Glykane von *S. mansoni* Cercarien. Die Rechtecke kennzeichnen die Le^X-Epitope, die auf beiden Glykantypen nachgewiesen wurden. Die Ovale kennzeichnen die Oligofucosylketten der komplexeren O-Glykane (Abbildung modifiziert nach [65]).

Während die cercarialen N-Glykane recht einfach gebaut sind, ist die strukturelle Variation bei den O-Glykanen dieses Larvenstadiums deutlich größer. Ein besonders hoher Gehalt an Fucose kennzeichnet die cercarialen Glykane [38,39,210,260,321]. Die cercariale Glykokalyx ist reich an verschiedenen Glykanen, wobei 60 und mehr Bausteine bei diesen Glykokonjugaten vorliegen können. Die O-Glykane enthalten als Rückgrat Wiederholungseinheiten des ungewöhnlichen Trisaccharids [-3GalNAc(β1-4)GlcNAc(β1-3)Galα-], wobei am GlcNAc-Rest zwei bis drei Fucosen gebunden sein können [159,163]. Abb. 8 gibt einen Überblick über die strukturellen Variationen der cercarialen O-Glykane.

Die N-Glykane adulter *S. mansoni* liegen di- bis tetraantennär vor. Der Pentasaccharidkern kann durch eine (α1-6)-gebundene Fucose am innersten GlcNAc-Rest modifiziert vorliegen, wobei bisher keine Xylose an der Kernstruktur nachgewiesen wurde [279,280,317]. Interessant daran ist das Auftreten dimerer LDN-Elemente, wobei der GlcNAc-Baustein mit einer (α1-3)-gebundenen Fucose substituiert sein kann und das subterminal fucosylierte LDN-F Epitop ausbildet (Abb. 9). Auf komplexeren N-Glyka-

nen adulter Schistosomen, die bis zu tetraantennär sind, wurden poly-Le^X Motive in den Antennen nachgewiesen (Abb. 9). Poly-Le^X Strukturen sind auch auf O-Glykanen des „Circulating cathodic antigens“ (CCA) nachgewiesen worden [291]. Auf den O-Glykanen des „Circulating anodic antigen“ (CAA), die sich strukturell stark von denen des CCAs unterscheiden, wurden poly-[GlcA(β1-3)]GalNAc(β1-6)-Motive identifiziert. Abb. 9 vermittelt einen Überblick über die strukturelle Vielfalt der N- und O-Glykane von adulten *S. mansoni*.

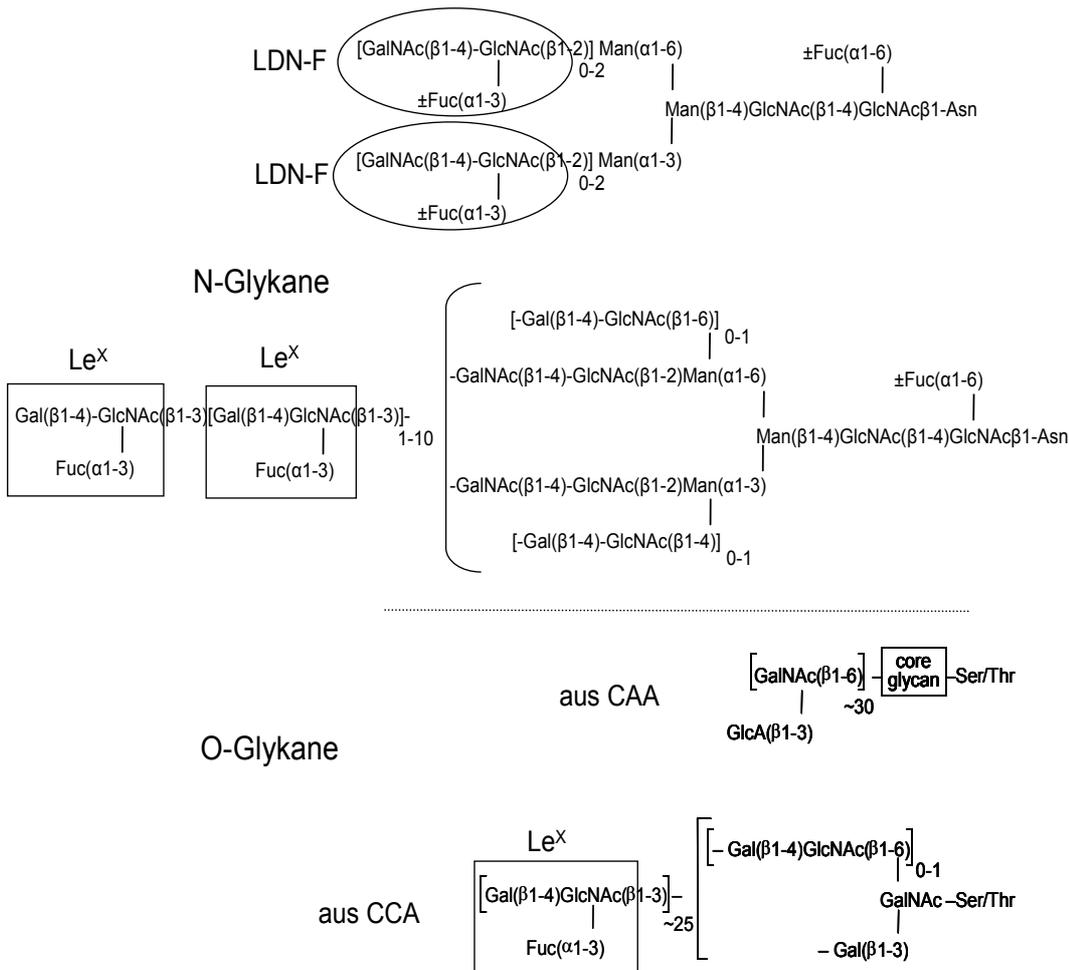


Abb. 9: Übersicht über die strukturelle Vielfalt an N- und O-Glykanen adulter *S. mansoni*. Auf den N-Glykanen liegen in terminaler Position sowohl das Le^X (Rechteck) als auch das LDN-F Epitop (Oval) vor. Die O-Glykane aus dem CCA weisen poly-Le^X Elemente auf. Die O-Glykane aus dem CAA enthalten (β1-3)-gebundene Glukuronsäure (GlcA) (Abbildung modifiziert nach [65]).

Eine geschlechtsspezifische Untersuchung an zunächst verpaarten, dann aber separierten *S. mansoni* zeigte, dass die Expression der N-Glykane geschlechtsabhängig ist und weibliche Würmer hauptsächlich Gal(β1-4)GlcNAc (LacNAc) und Le^X in den Glykanantennen tragen. Bei den männlichen Würmern liegt hingegen das

GalNAc(β 1-4)GlcNAc (LDN) und GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc (LDN-F) vor [318]. Das LDN-F Motiv wurde zudem als Wiederholungseinheit auf den Antennen von diantennären, (α 1-6)-kernfucosylierten N-Glykanen nachgewiesen, wobei der GlcNAc-Teil eine (α 1-3)-gebundene Fucose tragen kann [317]. Das aus immunologischer Sicht interessante Glykoprotein IPSE/ α 1 (Interleukin-4 inducing principle from *S. mansoni* eggs) [266], das von Eiern abgegeben, wird trägt das Le^X Epitop auf N-Glykanen, die zudem ein difucosyliertes, innerstes GlcNAc in der Kernstruktur aufweisen [310].

1.10.2 Lipidgebundene Glykane von *S. mansoni*

Der Glykananteil zahlreicher Glykolipide einzelner Stadien von *S. mansoni* ist inzwischen strukturell aufgeklärt worden [65,315]. Glykolipide von *S. mansoni* unterscheiden sich insofern von denen anderer Spezies, als für das Ceramid-Dihexosid die Struktur GalNAc(β 1-4)Glc1-Cer („Schisto-Core“) gefunden wurde [192] (Abb. 10). Neben dem Ceramid-Monohexosid und dem Ceramid-Dihexosid wurde in allen Stadien von *S. mansoni* eine Vielzahl von sehr komplexen Glykolipiden gefunden, die antigene Eigenschaften haben [157,160,306,312-314,316]. Untersuchungen an den drei Stadien haben gezeigt, dass ein dominantes Epitop vorliegt, welches mit Eiglykoproteinen verschiedener Schistosomenarten kreuzreagiert [306,307]. Strukturanalysen des Glykananteils von Eiglykolipiden ergaben, dass ein repetitiver Aufbau mit einem Motiv, bestehend aus zwei Fucose-Resten an GlcNAc gebunden, vorliegt, das die Struktur -4[\pm Fuc(α 1-2)Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1- aufweist [160]. Eiglykolipide von *S. mansoni* weisen Oligofucosyl-Strukturen auf, welche für die Antigenität mit verantwortlich sind [312]. Auf cercarialen Glykolipiden ist erstmalig das Fuc(α 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc-Epitop (pseudo- Lewis^Y, pLe^Y) nachgewiesen worden, das als erstes parasiteneigenes Glykolipid als Ligand des humanen C-Typ Lektin DC-SIGN beschrieben wurde [203]. Eine Übersicht über strukturell aufgeklärte Glykolipide von *S. mansoni* gibt Abb. 10.

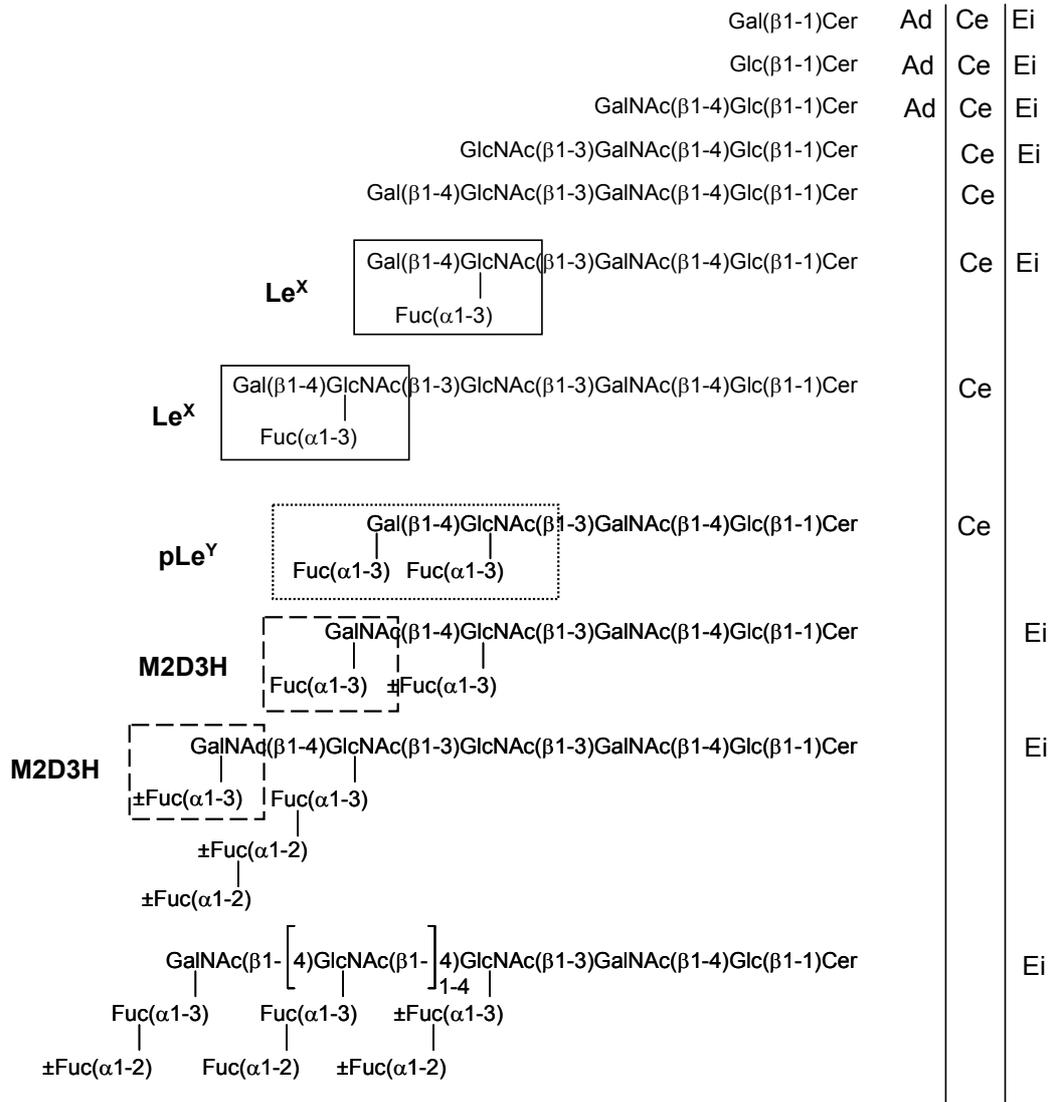
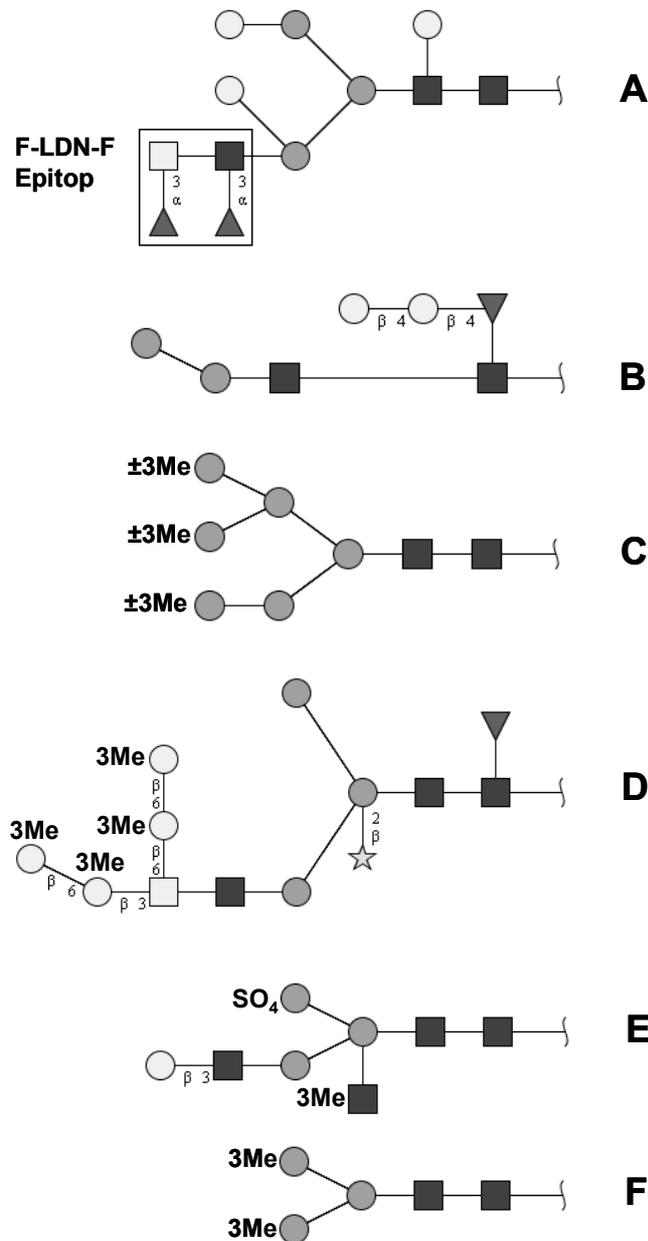


Abb. 10: Übersicht über strukturell aufgeklärte Glykolipide von *S. mansoni* und deren Stadienverteilung. Das Monosaccharid Fucose ist in großer Menge in Eiglykolipiden enthalten und für die Ausbildung von Epitopen wie Le^x (Rechteck), pLe^y (gepunktetes Rechteck) und M2D3H (gestricheltes Rechteck) verantwortlich (Abbildung modifiziert nach [65]). Ad = Adultwurm, Ce = Cercarie.

1.11 Glykanstrukturen von Mollusken

Glykokonjugate aus Mollusken sind bereits vielfach untersucht worden. Bemerkenswert ist, dass bei Gastropoden zahlreiche Modifikationen der Kernstruktur von N-Glykanen sowie der Glykanantennen vorliegen, was zur Ausbildung von teilweise einzigartigen Kohlenhydratepitopen führt (Abb. 11). Auf Grund der großen strukturellen Vielfalt sollen nachfolgend einige Beispiele vorgestellt werden. So weist das Hämocyanin der Schlüssellochschncke *Megathura crenulata* (KLH) N-Glykane mit zahlreichen Modifikation an den Antennen und am Kern auf, die zur Bildung außergewöhnlicher Epitope führen. Galaktose in (β 1-6)-Stellung gebunden und als Disaccharid Gal(β 1-4)Gal(β 1- zeichnet sich als epitopbildendes Monosaccharid aus, das als Gal(β 1-6)Man-Motiv auf N-Glykanen und als Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Fuc(α 1-6)- gebunden am innersten GlcNAc als modifizierte Kernstruktur auf KLH N-Glykanen nachgewiesen wurde (Abb. 11 B) [167,319]. Die substituierte Kernfucose ist auch im Rhodopsin bei *Octopus spec.* gefunden worden [337]. Auch das zweite GlcNAc in der Kernstruktur kann auf N-Glykanen von KLH modifiziert sein, was für Spezies gezeigt wurde, die mit dem Fuc(α 1-3)GalNAc[Fuc(α 1-3)]GlcNAc-Motiv (F-LDN-F) zudem ein terminales Epitop aufweisen, das für die Kreuzreaktivität mit *S. mansoni* Glykokonjugaten verantwortlich ist (Abb. 11 A) [93,94]. Die N-Glykane der Hämocyanine von *Lymnaea stagnalis*, dem Zwischenwirt von *Trichobilharzia spec.*, und *Helix pomatia* (Weinbergschncke) weisen neben Mannose, Galaktose, GalNAc und GlcNAc auch Fucose und Xylose, sowie 3-O-Methylmannose und 3-O-Methylgalaktose auf, die für tierische Glykoproteine ungewöhnlich sind [155]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass an der 3er Antenne der Kernstruktur eine (α 1-3)-gebundene 3-O-Methylmannose vorliegen kann, die nicht verlängert wird. Auf den Glykanantennen terminal gebundene 3-O-Methylgalaktose erwies sich ebenso als Stoppsignal [155,294,295]. N-Glykane vom *Helix pomatia* Hämocyanin zeichneten sich durch eine wesentlich höhere Komplexität aus (Abb. 11 D). Auf hauptsächlich diantennären N-Glykanen, von denen viele eine (α 1-6)-gebundene Kernfucose und (β 1-2)-gebundene Kernxylose tragen, kommt es zur Modifikation des terminalen LDN-Motivs durch 3-O-Methylgalaktosen, die an C6 verlängert 3-O-MeGal(β 1-6)3-O-MeGal(β 1-6)3-O-MeGal(β 1-3)GalNAc(β 1- Elemente ausbilden. Der GalNAc-Rest kann dabei durch weitere 3-O-MeGal-Reste an C6 disubstituiert vorliegen. Durch Kombination dieses Strukturmotivs auf beiden Antennen, auf denen mit 4-O-Methylgalaktose ein weiterer Methylzucker nachgewiesen wurde, kommt es zur Bildung teilweise isomerer N-Glykane [155,189,296]. Methylierte

Hexosen scheinen für Glykokonjugate von Mollusken nicht selten zu sein. Mannose, monomethyliert an C6 sowie dimethyliert, wurde auf kleineren N-gebundenen Glykanen des Lektins aus der Hämolymphe von *Hippopus hippopus* (Pferdehufmuschel) nachgewiesen [240]. 3-monomethylierte Galaktose wurde auch auf einem sauren N-Glykan des Hämocyanins der Schnecke *Rapana venosa* gefunden [74]. Ähnlich wie bei den N-Glykanen von *H. pomatia* wurde bei *Arion lusitanicus* 3-O-MeMan in terminaler Position auf mannosereichen N-Glykanen, die teilweise (α 1-6)-kernfucosyliert sind und eine (β 1-2)- kerngebundene Xylose tragen, gefunden (Abb. 11 C) [116]. Auch für *B. glabrata* wurde ein N-Glykan auf einem Dermatopontin der organischen Schalenmatrix nachgewiesen, bei dem zwei 3-O-Methylmannosen ((α 1-3) und (α 1-6)) an die zentrale Mannose der Kernstruktur gebunden sind, welches bisher das einzig beschriebene N-Glykan dieser Spezies ist (Abb. 11 F) [195]. Das Auftreten methylierter Zucker (3-O-MeMan, 3-O-MeGal) wurde bisher auf die Hämocyanine von Lungenschnecken (Pulmonata) beschränkt angesehen [126]. Inzwischen wurde aber auch bei *Haliotis tuberculata* (Seeohr), einer marinen Schnecke, 3-O-monomethylierte Mannose und Galaktose detektiert [148]. Auch bei Mollusken wurde eine (α 1-3)-gebundene Kernfucose auf Rhodopsin von *Todarodes pacificus* nachgewiesen, wobei dieser Typ von N-Glykanen eine difucosylierte Kernstruktur aufwies [214,284]. Während von vielen N-Glykanen die Strukturen detailliert aufgeklärt wurden, sind sie bei anderen Spezies eher rar und beziehen sich zumeist auf das Bindevormögen von Glykokonjugaten an Lektine bekannter Spezifität [76]. Befunde zu O-Glykanstrukturen bei Mollusken sind bisher selten. Mittels „Fast Atom Bombardment“ (FAB) Massenspektrometrie wurden O-GalNAc-Bindungsstellen im Rhodopsin von *Octopus dofleini* identifiziert. Die aus medizinisch-pharmazeutischer Sicht interessanten Conotoxine der Schneckengattung *Conus* enthalten Peptide, die O-glykosyliert sind [51,52]. Die strukturellen Variationen der Glykane von Mollusken scheinen sehr vielseitig. So wurde erst kürzlich von einer zweifach substituierten Fucose auf einer Hämocyaninuntereinheit bei *R. thomasi* berichtet, die terminal auf dem 3er Arm eines N-Glykans sitzt und mit 3-O-MeGal und GalNAc substituiert ist. Ein solches Motiv wurde bisher noch nicht beschrieben und gilt als immunogen [98,261].



● = Mannose, ○ = Galaktose, ■ = N-Acetylglucosamin, □ = N-Acetylgalaktosamin,
 ▲ = Fucose, ☆ = Xylose, 3Me = 3-O-Methyl, SO₄ = sulfatiert

Abb. 11: Beispiele strukturell charakterisierter N-Glykane von Gastropoden. (A) und (B) sind N-Glykane vom KLH, wobei (A) als kreuzreagierend mit *S. mansoni* Glykokonjugaten identifiziert wurde [93,94,319], (C) zeigt eine Struktur aus *Arion lusitanicus* mit 3-O-MeMan [116], (D) ist ein N-Glykan aus *Helix pomatia* Hämocyanin mit terminalen und substituierten 3-O-MeGal-Resten [155], (E) stellt ein saures N-Glykan mit 3-O-MeGlcNAc aus *Rapana venosa* Hämocyanin dar [74] und (F) ist das bisher einzig bekannte N-Glykan aus einem Schalenmatrixprotein von *Biomphalaria glabrata* [195].

1.12 Aufgabenstellung

Trotz der epidemiologischen Bedeutung von *B. glabrata* als Zwischenwirt des humanpathogenen Trematoden *S. mansoni*, sowie zahlreicher Untersuchungen in diesem Zusammenhang an dieser Spezies, ist über die Kohlenhydratstrukturen dieser Spezies bisher wenig bekannt. Zahlreiche Untersuchungen zum Infektionsgeschehen von *S. mansoni* in *B. glabrata* haben gezeigt, dass auch Kohlenhydratverbindungen eine Rolle im Invasionsmechanismus spielen. Darüber hinaus wird diskutiert, ob *S. mansoni* kohlenhydratbasierende molekulare Mimikry als Invasionsstrategie anwendet, um in seinem jeweiligen Wirt durch die molekulare Tarnkappe nicht aufzufallen und immunmodulatorisch zu wirken. Grundlage dafür ist, dass *S. mansoni* mit seinem Endwirt Mensch das Le^X-Kohlenhydratepitop gemeinsam hat, das auch auf humanen Blutzellen vorliegt. Die Invasionsstrategie der molekularen Mimikry wurde im Rahmen dieser Arbeit auf der Basis des Zwischenwirtes zum Schwerpunkt gemacht, zumal über die Kohlenhydratstrukturen bei *B. glabrata* bis auf eine Ausnahme nichts bekannt ist. Um eine Aussage über die generelle Invasionsstrategie von *S. mansoni* auf der Basis von Kohlenhydraten machen zu können, sollen ausgehend von einem Pool an Hämolymphe empfänglicher Schnecken die N-Glykane strukturell charakterisiert werden, die mit schistosomalen Glykokonjugaten kreuzreagieren. In Ergänzung dazu sollen kreuzreagierende Determinanten auch im Gewebe von nicht-infizierten und infizierten Schnecken sowie an der Oberfläche von Miracidien immunhistochemisch detektiert werden. In einer weiteren Untersuchung sollen die N-Glykanprofile zweier *B. glabrata* Stämme, die sich in ihrer Empfänglichkeit gegenüber einer Infektion mit *S. mansoni* unterscheiden, vergleichend untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in p.a. Qualität von Fluka (Seelze), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Die Laborgase [Linde, Höllriegelskreuth] Argon, Helium und Stickstoff hatten einen Reinheitsgrad von 4,6. Das im Labor verwendete Wasser wurde durch eine Elix UV5 Anlage vorgereinigt und durch die Milli-Q Synthesis A10 Anlage [Millipore, Eschborn] analytisch rein aufgearbeitet.

2.2 Biologische Materialien

2.2.1 Hämolympheproben

120 ml *Biomphalaria glabrata* Hämolymphe aus gemischter Hälterung (*Bg*)

20 ml *Biomphalaria glabrata* Hämolymphe, Puerto Rico Stamm (*Bg* PR)

6 ml *Biomphalaria glabrata* Hämolymphe, Salvador Stamm (*Bg* SAL)

2.2.2 Antiseren und Antikörper

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden Hyperimmenserum aus Kaninchen, sowie monoklonale Antikörper gegen definierte Kohlenhydratepitope verwendet. Die Kaninchenserum gegen schistosomale Antigene und die unter 2.2.1 angeführten Hämolympheproben wurden von Prof. M. J. Doenhoff (University of Bangor, Wales) bezogen, das gegen *B. glabrata* Hämoglobin gerichtete Serum von der Arbeitsgruppe Prof. J. Markl (Universität Mainz). Vom mAk M2D3H, der das Fuc(α 1-3)GalNAc-Epitop erkennt, wurde um Faktor 10 ankonzentrierter Kulturüberstand verwendet, der nach Kultur der Hybridomazelllinie in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Die mAks gegen definierte Kohlenhydratepitope wurden in Form von einfachem und auch 10 x ankonzentrierten Kulturüberständen von der Arbeitsgruppe Prof. Deelder (Universität Leiden, Niederlande) freundlicherweise zur Verfügung gestellt (für Details, siehe [252,298]). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verwendeten Seren und Antikörper.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Antisera und Antikörper

| Antikörper/ Antiserum | aus | gerichtet gegen | Referenz |
|--------------------------------|-----------|--|----------|
| BR 84 | Kaninchen | Lösliches Eiantigen von <i>S. mansoni</i> | [73] |
| BR 11 | Kaninchen | Lösliches Eiantigen von <i>S. mansoni</i> | [73] |
| CTF | Kaninchen | Cercariales Transformationsfluid | |
| α -Hb | Kaninchen | Natives Hämoglobin von <i>B. glabrata</i> | [11] |
| BR 95 | Kaninchen | Hämolymph von <i>B. glabrata</i> | |
| M2D3H | Maus | Fuc(α 1-3)GalNAc- | [27] |
| G8G12 | Maus | Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc (Le ^x) | [27] |
| LDN (259-2A1) | Maus | GalNAc(β 1-4)GlcNAc | [298] |
| LDN-F (290-2E6) | Maus | GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc | [298] |
| LDN-DF, 10x (290-4A8) | Maus | GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-2)Fuc(α 1-3)]GlcNAc | [298] |
| F-LDN (291-5D5) | Maus | Fuc(α 1-3)GalNAc(β 1-4)GlcNAc- | [252] |
| Le ^x (128-4F9-A) | Maus | Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc | [298] |

Folgende Zweiantikörper und Normalseren wurden verwendet:

Goat-anti-Rabbit (G-a-R), AP-konjugiert, Sigma, Taufkirchen
 Goat-anti-Mouse (G-a-M), AP-konjugiert, DakoCytomation, Hamburg
 Swine-anti-Rabbit (S-a-R), HRP-konjugiert, DakoCytomation, Hamburg
 Rabbit-anti-Mouse (R-a-M), HRP-konjugiert, DakoCytomation, Hamburg
 Goat-anti-Rabbit (G-a-R), FITC-konjugiert, DakoCytomation, Hamburg
 Goat-anti-Mouse (G-a-M), FITC-konjugiert, DakoCytomation, Hamburg
 Normales Mausserum (NMS), Sigma, Taufkirchen
 Normales Kaninchenserum (NRS), Sigma, Taufkirchen

2.2.3 Gewebeproben

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden paraformaldehydfixierte Schnecken aus gemischter Hälterung sowie vom Puerto Rico und Salvador Stamm verwendet, die von Prof. M. J. Doenhoff zur Verfügung gestellt wurden. Für die Oberflächenmarkierung von Miracidien wurde dieses Larvenstadium in Paraformaldehyd fixiert von der Arbeitsgruppe Prof. Grevelding (Institut für Parasitologie, Universität Gießen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.3 Aufarbeitung der Hämolympfproben

Die Hämolympfproben waren durch Herzpunktion der Schnecken gesammelt und bis zur Verwendung als rohe Hämolymphe bei -20 °C gelagert worden. Die Proben wurden im Laufe der Arbeit mit der nachfolgend beschriebenen Prozedur in kleineren Ansätzen zu verschiedenen Zeitpunkten aufgearbeitet. Nach dem Auftauen wurde die Hämolymphe mit 1 µl/ml Proteinaseinhibitor [Sigma] versetzt und 30 Min. mit 1780x g und 4 °C in der Kühlzentrifuge [Hettich] zentrifugiert, um Zelltrümmer und feinere Gewebefetzen zu entfernen. Zur weiteren Aufreinigung wurde die Hämolymphe zur Umpufferung gegen 25 mM NH₄HCO₃-Puffer dialysiert. Dazu wurde ein Dialyseschlauch [Roth] mit einer Ausschlussmasse von 10-15 kDa verwendet, der zuvor 15 Min. in Wasser ausgekocht worden war. Dialysiert wurde bei 4 °C, mit mindestens 30-40-fachem Volumenüberschuss an Dialysepuffer, der alle 6-8 h gewechselt wurde. Nach der Dialyse wurde der Hämolymphe nochmals Proteinaseinhibitor zugegeben und ein Aliquot für die Proteinbestimmung, Zuckerbausteinanalyse und proteinbiochemische Untersuchungen abgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde das BioRad-Protein-Assay Kit [BioRad, München] verwendet und nach Herstelleranweisung vorgegangen. Eine käufliche BSA-Lösung der Konzentration 2 mg/ml [Pierce] wurde als Standard benutzt. Da laut Herstellerangaben der BSA Konzentrationsbereich von 0 bis 10 µg linear ist, wurde eine BSA Eichreihe mit den Proteinmengen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 und 10 µg BSA in Kunststoffküvetten [Sarstedt] hergestellt. Die Proben wurden in Küvetten mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl BioRad-Protein-Assay Reagenz [BioRad] gemischt. Nach 10 Min. Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) wurde die Absorption bei 595 nm gegen einen Leerwert aus 800 µl Wasser und 200 µl Reagenz am Spektrophotometer (Beckman DU 640) gemessen.

2.4.2 1D-Gelelektrophorese

Die 1D-Gelelektrophorese wurde in Anlehnung an die Methode von Laemmli (1970) durchgeführt [169]. Verwendet wurde das Mini-PROTEAN 3 Gelelektrophoresesystem von BioRad, mit dem Gele der Größe 9 x 6 x 0,75 cm (B x H x T) vorbereitet wurden. Für die Gelelektrophorese wurden folgende Lösungen und Puffer verwendet:

| | |
|--|---|
| Acrylamidstammlösung: | gebrauchsfertige Acrylamidstammlösung Rotiphorese Gel 30 [Roth] |
| Trenngelpuffer: | 36,3 g Tris-HCl [Roth]/100 ml Lösung, pH=8,8 |
| Sammelgelpuffer: | 6,0 g Tris-HCl 100 ml Lösung, pH=6,8 |
| SDS-Lösung (10 %ig): | 10 g SDS [Bio-Rad]/100 g Lösung |
| Ammoniumperoxodisulfat-Lösung: (AMPS) | 0,01 g Ammoniumperoxodisulfat [Serva] pro 100 µl H ₂ O, stets frisch ansetzen |
| Laufpuffer für Elektrophorese (10x): | 15 g Tris-HCl und 72 g Glycin/500 ml Wasser |
| Elektrophorese-Laufpuffer: | 100 ml des 10 x Laufpuffer und 10 ml der 10%igen SDS-Lösung/1 Liter |

Für vier Gele mit 8,5 %igem Acrylamidgehalt wurden 3,35 ml Acrylamidstammlösung, 4,0 ml H₂O und 2,5 ml Trenngelpuffer gemischt und 5 Min. im Ultraschallbad [Sonorex] entgast. Anschließend wurden 100 µl SDS-Lösung, 50 µl AMPS und 5 µl TEMED [Merck] hinzugefügt, gemischt und die Lösung bis 1,5 cm zum oberen Rand eingefüllt. Um eine gleichmäßige Oberfläche zu erreichen, wurde das Trenngelgemisch mit 1 ml 2-Methylbutanol [Fluka] überschichtet und 1 h bei RT auspolymerisieren lassen. Danach wurde der 2-Methylbutanol mit Filterpapier vorsichtig abgesaugt und die Trenngeloberfläche mit 1 ml Sammelgelpuffer gespült. Für das Sammelgel mit 4 %igem Acrylamidgehalt wurden 6,1 ml H₂O, 1,3 ml Acrylamidstammlösung und 2,5 ml Sammelgelpuffer gemischt und 5 Minuten im Ultraschallbad entgast. Anschließend wurden 100 µl SDS-Lösung, 5 µl AMPS und 10 µl TEMED hinzugegeben. Die Sammelgelmischung wurde auf das Trenngel gegossen und der Kamm für 10 Probenaschen eingesetzt. Nach der Polymerisationszeit von 45 Min. wurden die Kämmen entfernt, die Taschen mit Wasser gespült und die Elektrophoresekammer zusammengesetzt. In die innere Kammer wurden ca. 200 ml Laufpuffer gefüllt, dass die Probenaschen deutlich geflutet waren, in die äußere Kammer ca. 300 ml. Der Probenpuffer für die Proteinproben setzte sich wie folgt zusammen.

Zusammensetzung des Probenpuffers (1 ml):

62,5 µl 1 M Tris-HCl [Roth] pH = 6,8
10,0 µl 100 mM Na₂EDTA [Roth]
100,0 µl Glycerin (87%) [Merck]
200,0 µl SDS-Lösung (10%ig)
25,0 µl Bromphenolblau-Lösung (0,25%ig) [Riedel de Haën]
552,5 µl H₂O

Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden 50 µl 2-Mercaptoethanol [Merck] zugesetzt. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt, darin gelöst und anschließend zur vollständigen Denaturierung 10 Min. gekocht. Der Probenauftrag erfolgte mit einer 10 µl-Hamiltonspritze, und pro Gelspur wurden 10 µg Protein aufgetragen. Als Standard für das SDS-Gel wurde BenchMark Protein Ladder [Invitrogen] verwendet, für den Western Blot wurde der Precision Protein Standard [BioRad] verwendet. Die Elektrophorese wurde mit dem Spannungsgerät EPS 600 [Pharmacia] durchgeführt und erfolgte zunächst für 15 Min. bei 100 Volt, 400 Milliampere und 100 Watt, dann für weitere 60 Min. bei gleichen Milliampere- und Watt-Werten und 150 Volt. Danach wurden die Gele geblottet oder mit Coomassie und/oder Silber gefärbt.

2.4.3 Färbung von Gelen

Für die Coomassie-Färbung wurde eine Stammlösung von Coomassie-Brilliant-Blue R 250 [Serva] verwendet, für die 1 g Coomassie-Brilliant-Blue in 1 l Methanol gelöst, im Ultraschallbad 30 Min. beschallt und anschließend gefiltert wurde. Zur Färbung wurde die Stammlösung 1:1 mit 20 %iger Essigsäurelösung gemischt und das Gel darin 5 Min. bei RT gefärbt und zur Verstärkung nochmals 30 Min. bei 60 °C im Färbebad inkubiert. Entfärbt wurde mit einer Lösung aus 40 % Ethanol, 10 % Essigsäure und 50 % Wasser (v/v/v). Der Entfärbeprozess wurde durch Einlage eines fussel-freien Papiertuches [Kimberly&Clark] ins Entfärbebad verstärkt. Nach 3-maligem Wechsel der Entfärbelösung wurde das Gel unter 2- bis 3-maligem Wechsel mit Wasser gewaschen und konnte für die sensitivere Silberfärbung direkt weiterverwendet werden. Durch Zugabe von Glycerin bis zu einer Menge von 50 % zum Waschwasser sowie nachfolgender Inkubation von 15 Min. wurde das Gel konserviert. Zur Trocknung wurde es in gewässerte Zellophanfolien [Roth] eingespannt und ü. N. getrocknet.

Um sehr geringe Proteinmengen im Gel besser sichtbar zu machen wurden die Gele mit Silber nachgefärbt, wobei die vorangegangene Coomassie-Färbung nicht stört. Für die Silberfärbung wurden folgende Lösungen verwendet:

| | |
|---|--|
| Fixierer: | 500 ml EtOH 100 ml Essigsäure 400 ml Wasser + 0,5 ml 37 %ige Formaldehydlösung |
| Waschlösung: | 500 ml EtOH + 500 ml Wasser |
| Sensitivierlösung: (immer frisch ansetzen) | 0,1 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ [Merck] mit Wasser zu 500 ml Lösung auffüllen |
| Färbelösung: (immer frisch ansetzen) | 0,4 g AgNO_3 [Sigma-Aldrich] mit Wasser zu 200 ml Lösung auffüllen + 150 μl 37 %ige Formaldehyd-Lösung |
| Entwicklerlösung: | 15 g Na_2CO_3 + 1mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ mit Wasser zu 250 ml Lösung auffüllen + 125 μl 37 %ige Formaldehydlösung |
| Stopplösung: | 60 ml Essigsäure + 220 ml EtOH + 220 ml Wasser |

Sofern die Gele nicht schon durch die Coomassie-Färbung fixiert waren, wurden sie 1 h bis ü. N. in Fixierlösung inkubiert, dann 2 x 25 Min. in Waschlösung gewaschen und anschließend 1 Min. mit der Sensitivierlösung behandelt. Nach 3 x 20 Sekunden Waschen mit Wasser wurden die Gele 20 Min. mit Färbelösung behandelt. Danach erfolgte die Entwicklung der Gele unter optischer Kontrolle bis die Banden gut sichtbar waren. Nach 20-sekündiger Waschphase mit Wasser wurden die Gele für 10 Min. ins Stopppad gegeben und nachfolgend in Wasser gewaschen. Die Gele wurden mittels Durchlichtscanners [Amersham] digitalisiert. Die Trocknung erfolgte danach wie bei den coomassiegefärbten Gelen.

2.4.4 Western Blot

Für die Western Blots wurde die Semidry Graphit-Blotapparatur [Keutz] verwendet. Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Folie [Millipore] wurde als Blotfolie verwendet. Insgesamt wurden 3 verschiedene Blotpuffer verwendet.

| | |
|--------------------------------|---|
| Blotpuffer 1 (Anodenlösung): | 800 ml 0,3 M Tris-HCl Lösung, pH = 10,4 + 200 ml 20 %iges MeOH, Lösung 5 Min. im US-Bad entgasen |
| Blotpuffer 2 (Anodenlösung): | 800 ml 0,025 M Tris-HCl Lösung, pH = 10,4 + 200 ml 20 %iges MeOH, Lösung 5 Min. im US-Bad entgasen |
| Blotpuffer 3 (Kathodenlösung): | 800 ml 1 M Tris-HCl Lösung, pH = 9,4 + 5,2 g 6-Aminohexansäure + 1 g SDS + 200 ml 20 %iges MeOH, Lösung 5 Min. im US-Bad entgasen |

Zur Vorbereitung wurden Blotpapierstücke [10 x 9 cm, Roth] verwendet und pro Blot drei in Blotpuffer 1, zwei in Blotpuffer 2 und fünf in Blotpuffer 3 für jeweils 45 Min. eingelegt. Die Blotmembran wurde 10 Sekunden in Methanol [Merck] gewaschen und dann in Blotpuffer 2 inkubiert. Für den Blotprozess wurden die 3 Papierstücke übereinander auf die Anodenseite gelegt und mit den 2 Papierstücken aus Blotpuffer 2 abgedeckt. Darauf wurde dann zuerst die Blotmembran gelegt, nachfolgend das Gel, das zuvor 1 Min. mit Blotpuffer 3 gewaschen wurde. Das aufgelagerte Gel wurde noch mit den restlichen 5 Papierstücken abgedeckt und mit einer kleinen Rolle Luftblasen entfernt. Nach Aufsetzen des Kathodendeckels wurde die Apparatur beschwert und der Western Blot gestartet. Geblottet wurde 1,5 h mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ unter Verwendung des Spannungsgerätes EPS 600. Nach dem Blotten wurde die Membran 1 Min. in Wasser und nachfolgend 5 Min. in 0,2 M NaOH gewaschen. Blockiert wurde 2 h oder ü. N. mit Roti-Block-Lösung [1:10 mit Wasser, Roth] blockiert. Danach konnte die Blotmembran für eine Indian Ink Färbung und für Antikörpermarkierungen verwendet werden.

Die Indian Ink Färbung erlaubt ein Anfärben der geblotteten Proteine auf der Membran ohne die nachfolgende Antikörpermarkierung zu stören. Die Blotmembran wurde dazu 3 x 15 Min. in PBS-T (9,68 g NaCl, 2,9 g Na_2HPO_4 , 0,234 g NaH_2PO_4 , 0,1 g NaN_3 , 0,5 ml Tween-20 auf 1 Liter) gewaschen. Zur Färbung wurden 99 ml PBS, 1 ml Essigsäure und 100 μl Fount India [Pelikan] gemischt und zur Blotmembran gegeben. Gefärbt wurde solange, bis Banden sichtbar waren. Danach wurde die Membran in Roti-Block gewaschen. Die Verdünnungen der Antikörper, Antiseren und der zweiten Antikörper sowie die Waschschrte wurden jeweils mit Roti-Block durchgeführt. Die Inkubationszeiten von 1. und 2. Antikörpern betragen jeweils 1,5 h bei RT. Inkubiert wurden jeweils ein Blotstreifen mit 1:4 verdünntem 10 x Kulturüberstand vom mAk M2D3H sowie 1:100000 verdünntem anti-SEA Serum, die zuvor für 10 Min. mit 1000x g zentrifugiert wurden, sowie NMS und NRS (je 1:100000) zur Negativkontrolle. Gewaschen wurde nach dem 1. Ak 3 x 10 Min., nach dem 2. Ak 4 x 10 Min. und nochmals 1 x 10 Min. mit PBS-T. Das Bindevermögen der Zweitantikörper wurde mit Chemilumineszenz detektiert (ECL). Dazu wurde der Blotstreifen auf eine Seite einer aufgeklappten Polypropylenfolie [Roth] gelegt, die in eine Filmentwicklerkassette [18 x 24 cm, Siemens] eingelegt wurde. Pro Membranstreifen der Größe 1 x 9 cm wurden 200 μl ECL-Reagenz eingesetzt, das zuvor aus gleichen Volumina der Lösungen A und B des West Dura Substrate Kit [Pierce] hergestellt wurde. Nach 5 minütiger Inkubationszeit wurde in der Dunkelkammer ein passender Filmstreifen eines Kodak X-Omat AR Film XAR-5 [Sigma] in der Kassette eingelegt und je nach Signalintensität 0,5 bis 3

Min. belichtet. Nach der Exposition wurde der Streifen im Filmentwickler CURIX 60 [AGFA] entwickelt und mit einem Durchlichtscanner [Amersham] eingescannt.

2.4.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die ELISA-Untersuchungen wurden mit tryptischen (Glyko-)Peptiden durchgeführt. Dazu wurde ein Aliquot der dialysierten Hämolymphe mit Trypsin verdaut und das Trypsin durch 10-minütiges Kochen deaktiviert. Ein Teil der tryptischen Peptide wurde mit 48 %iger wässriger HF-Lösung bei 4 °C im Dunklen ü. N. behandelt, um terminal-gebundene Fucose-Reste an Glykanen spezifisch zu entfernen und so deren Bedeutung für das Bindevormögen von Antikörpern zu untersuchen [141]. Überschüssige HF wurde im N₂-Strom durch 2-maliges Abblasen von 100 µl Methanol entfernt. Für die ELISA-Experimente wurden folgende Lösungen verwendet:

| | |
|-----------------|---|
| Bindungspuffer: | 0,1 M Na ₂ CO ₃ , pH = 9,6 (HCl) |
| TBS: | 25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH = 7,5 |
| TBS-B: | TBS + 0,5 % (w/v) BSA [PAA] |
| TTBS-10: | TBS, 1:10 mit Wasser verdünnt + 0,05 % Tween-20 |
| TTBS-10B: | TTBS-10 + 0,25 % BSA |
| Färbepuffer: | 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , pH = 9,5 |
| Stopplösung: | 10 mM EDTA [Roth] |

Für den ELISA wurden Maxi-Sorb 96-well Platten [Nunc] verwendet. Da Vorversuche gezeigt hatten, dass die mAks gegen Kohlenhydratepitope nur schwach reagierten, wurden die Menge an Antigen im Well bei dieser Inkubation verzehnfacht. Ansonsten wurden pro Well 200 ng Peptid in 100 µl Bindungspuffer vorgelegt und 2 h bei 37 °C absorbiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgenommen und jedes Well mit 4 x 250 µl TBS gewaschen. Blockiert wurde mit je 300 µl TBS-B für 1 h bei 37 °C. Nachfolgend wurde dann mit 2 x je 250 µl TTBS-10 gewaschen. Die Antikörper und/oder Antiseren wurden in TTBS-10B verdünnt, 100 µl pro Well zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Negativkontrollen wurden einmal mit PBS und zusätzlich mit Normalseren von Kaninchen und Maus durchgeführt. Seren gegen *Bg*-Hämoglobin und *Bg*-Hämolymphe wurden als Positivkontrollen verwendet. Nach Abnahme der 1. Antikörper wurde 5 x mit 250 µl TTBS-10 gewaschen. Die Zweitantikörper, die mit Alkalischer Phosphatase konjugiert waren (G-a-M, G-a-R), wurden nach gleichem Schema 1:200 verdünnt, inkubiert und nachfolgend gewaschen. Zur Färbung wurde pro Well 100 µl einer 0,1 %ige Lösung von p-Nitrophenylphosphat [Biomol] in Färbepuffer pipettiert. Da die Färbung langsam erfolgt, wurde der Ansatz 30 Min. inkubiert und

anschließend mit 100 µl 50 mM EDTA-Lösung abgestoppt. Die Extinktion wurde bei 405 nm mit einem ELISA-Reader ELx800 [BioTek] gemessen und mit der geräteigenen Gen5 Software aufgezeichnet.

Tabelle 2: Übersicht der eingesetzten Verdünnungen an Antiseren, Antikörpern und Zweitantikörpern für die ELISA-Experimente

| Antikörper/Antiserum | Verdünnung | Zweitantikörper | Verdünnung |
|------------------------|------------|----------------------|------------|
| BR 84 (α -SEA) | 1:50000 | G-a-R, AP-konjugiert | 1:200 |
| M2D3H (10x) | 1:100 | G-a-M, AP-konjugiert | 1:200 |
| F-LDN | 1:10 | G-a-M, AP-konjugiert | 1:200 |
| LDN | 1:10 | G-a-M, AP-konjugiert | 1:200 |
| LDN-F | 1:10 | G-a-M, AP-konjugiert | 1:200 |
| LDN-DF (10x) | 1:100 | G-a-M, AP-konjugiert | 1:200 |

2.5 Freisetzung N-glykosidisch gebundener Glykane

Die Freisetzung von N-Glykanen unter Erhalt des reduzierenden Endes kann sowohl enzymatisch als auch auf chemischem Wege erfolgen. Für die enzymatische Abspaltung werden die beiden N-Glykosidasen PNGase F und A verwendet, die als rekombinante Enzyme kommerziell erhältlich sind und sich in ihrer Substratspezifität lediglich in der vorliegenden Kernfucosylierung der N-Glykane unterscheiden [290]. Zur chemischen Freisetzung von N-Glykanen wird die Hydrazinolyse angewendet [213,215].

2.5.1 Enzymatische Freisetzung von N-Glykanen

Für Untersuchungen der kreuzreagierenden Hämolymp-Glykane wurden insgesamt 1200 mg Hämolympprotein mit PNGase F und auch PNGase A [Roche] behandelt. Um dem Enzym eine bessere Angriffsmöglichkeit am Substrat zu bieten, wurde das Hämolympprotein zuvor tryptisch verdaut. Die gereinigte Hämolympprobe wurde dazu unter kontrollierten Bedingungen zur Volumenreduktion bis fast zur Trockne lyophilisiert. Für den tryptischen Verdau wurde CPK-vorbehandeltes Trypsin [Sigma] im 40-fachen Unterschuss verwendet. Das Trypsin wurde zunächst durch Lösen in 25-100 µl 1 mM HCl aktiviert und der Probe zugefügt. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln ü. N. bei 37 °C. Nach dem Verdau wurde das Trypsin durch 5-minütiges Kochen deaktiviert und die Probe vollständig lyophilisiert.

2.5.1.1 Freisetzung von N-Glykanen mit PNGase F

Für den Glykanabau mit PNGase F wurde die lyophilisierte Proteinprobe in 5-10 ml 20 mM NaH₂PO₄ Puffer (pH=7,2) gelöst, kurz mit Ultraschall behandelt und der pH-Wert überprüft. Für die Glykanfreisetzung wurden inklusive einer Wiederholung 750 Units PNGase F Enzym (1,6 U pro mg Peptid) zugegeben und der Ansatz danach bei 37 °C ü. N. unter Schütteln inkubiert.

2.5.1.2 Abtrennung der enzymatisch freigesetzten N-Glykane

Die freigesetzten N-Glykane wurden vom Versuchsgemisch abgetrennt, in dem der komplette Ansatz über eine selbstgepackte C18ec Kartusche [Macherey & Nagel] gegeben wurde, welche Peptide und ungespaltene Glykopeptide bindet. Unter Beachtung der Herstellerangabe, dass das Gelmaterial ca. 3-5 % der eigenen Masse bindet, wurde eine ausreichende Menge an Säulenmaterial eingesetzt. Das C18ec Material wurde dann mit dem 10-fachen Volumen an MeOH [Merck], Wasser, 0,1%iger Trifluoressigsäure (TFA) [Merck], 20% Acetonitril (ACN) in 0,1%iger TFA, 40% ACN in 0,1%iger TFA, 60% ACN in 0,1%iger TFA und Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf das Säulenmaterial gegeben und einsickern lassen. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit 10 Volumina an 0,1%iger TFA Lösung gewaschen und der Durchlauf, welcher die freigesetzten Glykane enthielt, sowie die Waschfraktion vereinigt und lyophilisiert. Die gebundenen Peptide wurden mit dem jeweils 5-fachen Volumen an 20, 40 und 60 %igen ACN Lösungen in 0,1 %iger TFA eluiert und nach Abrotieren des ACNs in der Vakuumzentrifuge [Jouan] ebenfalls lyophilisiert. Die so zurück gewonnenen (Glyko-)Peptide wurden erneut für einen Glykanabau verwendet.

2.5.1.3 Freisetzung von N-Glykanen mit PNGase A

Die nach dem PNGase F Verdau zurück gewonnen Peptide konnten einer erneuten Behandlung mit einer weiteren N-Glykosidase unterzogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Glykopeptide nach PNGase F auch mit PNGase A behandelt. Die lyophilisierten (Glyko-)Peptide wurden dazu in 5 ml eines 50 mM NH₄Ac Puffers (pH = 5) gelöst und mit 10 mU PNGase A [Roche] versetzt und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Die Abtrennung freigesetzter N-Glykane erfolgte wie unter 2.5.1.2 beschrieben.

2.5.1.4 **Aufreinigung der enzymatisch freigesetzten N-Glykane**

Die durch PNGase F und/oder A freigesetzten Glykane, welche sich im Pool von Durchlauf und TFA-Waschfraktion befanden, wurden zur weiteren Verwendung über PGC-Kartuschen [250 mg Material, Supelco] entsalzt. Die PGC-Kartusche wurde zunächst mit je 10 ml folgender Lösungen gewaschen: 50 % ACN in 50 mM NH₃-Lösung, 80 %iges ACN in Wasser und nachfolgend nochmals 15 ml Wasser. Danach wurden die N-Glykane in 500 µl Wasser gelöst, auf die Säule gegeben und die Lösung langsam einsickern gelassen. Die gebundenen Glykane wurden mit 10 ml Wasser gewaschen und mit jeweils 5 ml 25 %iger wässriger ACN-Lösung, 80 %iger wässriger ACN-Lösung sowie 50 %iger ACN-Lösung in 50mM NH₃-Lösung eluiert. Das ACN wurde 30 Min. in der Vakuumzentrifuge abrotiert und die Fraktionen anschließend lyophilisiert.

2.5.1.5 **Monosaccharidbestimmung mittels Anthranilsäurederivaten**

Um zu überprüfen, ob eine ausreichende Menge an freigesetzten N-Glykanen für die strukturellen Analysen vorliegt, wurde eine Monosaccharidbestimmung mittels Anthranilsäurederivatisierung durchgeführt. Dazu wurde ein Aliquot der entsalzten N-Glykane nach Säurehydrolyse mit 200 µl 4 N TFA der Anthranilsäurederivatisierung und anschließender HPLC-Analyse unterzogen. Die derivatisierten Monosaccharide der Glykanprobe lassen sich während der HPLC-Trennung mittels Fluoreszenz detektieren und mit einem Kohlenhydratstandard vergleichen [14]. Ausgehend von wässrigen Stammlösungen (1 mg/ml) der Monosaccharide GlcNAc, GalNAc, Mannose, Glukose, Galaktose, Xylose und Fucose wurde ein Standardmix hergestellt, der ebenfalls derivatisiert wurde und später im Mengenverhältnis 100:100:200:200:200:300:300 ng pro Lauf aufgegeben wurde.

2.5.1.6 **Chemische Freisetzung von N-Glykanen**

Für den Vergleich der kreuzreagierenden Hämolymp-N-Glykanprofile wurden die N-Glykane von jeweils 20 mg gereinigtem Hämolympprotein der sensiblen und resistenten *B. glabrata* Stämme Puerto Rico und Salvador chemisch mit Hydrazin abgespalten [213]. Für einen typischen Ansatz wurden 2 mg lyophilisiertes Hämolympprotein verwendet und in ein verschraubbares Glasröhrchen [Pyrex] abgewogen. Anschließend wurden 200 µl 98 %iges wasserfreies Hydrazin [Nacalai Tesque] hinzugegeben, das Glasröhrchen mit einem Teflonseptum fest verschlossen. Die

Inkubation erfolgte bei 100 °C für 10 h. Danach wurden das Hydrazin unter Vakuum entfernt und nachfolgend noch 2 x 200 µl Toluol [Nacalai Tesque] unter Vakuum verdampft. Die nachfolgende Reacetylierung der Aminosucker erfolgte bei 0° C auf Eis. Zur Reacetylierung wurden 200 µl einer eisgekühlten, gesättigten NaHCO₃-Lösung [Sigma] mit 8 µl Acetanhydrid gemischt und sofort der getrockneten Probe zugegeben und kurz gevortext. Nach 5 Min. Inkubationszeit auf Eis wurde dieser Schritt mit nachfolgend 30 minütiger Inkubationszeit wiederholt. Nach der Reacetylierung wurden störende Na⁺-Ionen entfernt, indem zum Ansatz soviel H⁺/Na⁺ Kationenaustauscher-Harz [Dowex] hinzugegeben wurde, dass sich der pH-Wert des Ansatzes auf 3 einstellte. Unmittelbar danach wurde der komplette Ansatz über eine Glasfritte gegeben, dabei das Harz abgetrennt und nochmals mit 2 ml Wasser gespült. Der Durchlauf enthielt die freigesetzten Glykane und wurde lyophilisiert. Alternativ konnten die reacetylierten N-Glykane auch über eine PGC-Kartusche (2.5.1.4) entsalzt werden.

2.6 Analyse von PA-markierten N-Glykanen

Die freigesetzten N-Glykane können zur weiteren strukturellen Analyse an ihrem reduzierenden Ende mit einem fluoreszierenden Marker durch reduktiver Aminierung gekoppelt werden, der die spätere Detektion während der HPLC-Trennung erlaubt. Zur Fluoreszenzmarkierung haben sich besonders 2-Aminopyridin (PA) und 2-Aminobenzamid (2-AB) bewährt [91,94,139,140,211,213,310,311,317].

2.6.1 Herstellung PA-markierter Oligosaccharide

Für die Markierung von Oligosacchariden an ihrem reduzierenden Ende wurde 2-Aminopyridin [Merck] verwendet, das entweder durch Sublimation oder durch 2-malige Umkristallisation aus n-Hexan [Merck] zuvor gereinigt wurde und bis zur Verwendung bei -20 °C monatelang haltbar ist. Für einen Reaktionsansatz, bei der eine Oligosaccharidmenge von 0,05-100 nmol markiert werden soll, wurden 200 mg 2-Aminopyridin gelöst in 53 µl Eisessig [Merck] verwendet [213]. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7 wurde die Lösung den Oligosacchariden komplett zugegeben und im geschlossenen Analysenröhrchen 1 h auf 90 °C erhitzt. Nach 5 Min. abkühlen wurde das Reduktionsreagenz, bestehend aus 200 mg Boran-Dimethylkomplex [Merck], 50 µl Wasser und 80 µl Eisessig [Merck], frisch angesetzt und dem Reaktionsansatz zugefügt.

Die Inkubation erfolgte für 35 Min. bei 80 °C. Danach wurde der Ansatz 5 Min. abkühlen lassen und mit 200 µl Wasser versetzt. Mit 2,5 %igem Ammoniak wurde die Lösung auf pH=10 gebracht und die größte Menge an überschüssigem PA durch 6-maliges Ausschütteln mit 2 Volumina Chloroform entfernt. Die Chloroformphasen wurden gesammelt, das Chloroform unter N₂-Strom abgeblasen und die verbliebene wässrige Phase auf Zucker überprüft. Alternativ kann überschüssiges PA auch mit einer Chloroform/Phenol-Mischung extrahiert werden. Dazu wurden gleiche Volumina von geschmolzenem Phenol mit Chloroform gemischt und diese Lösung mit Wasser gesättigt. Nach der Markierung wurden 150 µl Wasser zum Ansatz gegeben und 2 x 200 µl der Chloroform-Phenol-Mischung hinzugegeben und gevortext. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, die untere verworfen. Im dritten Schritt wurde nochmals mit 200 µl Chloroform extrahiert und die wässrige Phase anschließend lyophilisiert. Zur weiteren Reinigung der nun PA-markierten N-Glykane wurden diese über eine TSK-HW-40 Gelfiltrationssäule gegeben. Als Laufmittel wurde ein 20 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH=6) verwendet. Der Fluss wurde mit einer Peristaltikpumpe [Minipuls, Gilson] auf 12 ml/h eingestellt und der Lauf durch Fluoreszenzmessung (Anregung: 320 nm, Detektion: 400 nm) beobachtet. Fraktionen von jeweils 30 Min. wurden gesammelt und glykanhaltige Fraktionen gepoolt und lyophilisiert.

2.6.2 Bestimmung der Monosaccharide mittels GC/MS

Zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung von Glykanen hat sich die Gaschromatographie (GC) in Kombination mit der massenspektrometrischen Detektion (GC/MS) der Monosaccharide bewährt [96]. Dazu wurde die Glykanprobe (≈ 1 µg) in ein Glasröhrchen überführt und ü. N. lyophilisiert. Nachfolgend wurde die Probe mit 500 µl 4 N TFA-Lösung [Merck] über 4 h bei 100 °C vollständig hydrolysiert. Nach Entfernung überschüssiger TFA im N₂-Strom wurden die Monosaccharide mit einer 1 %igen wässrigen Lösung von NaBH₄ ü. N. bei RT zu Alditolen reduziert. Nach der Reaktion wurde mit 2 %iger Essigsäure neutralisiert. Durch Vakuumzentrifugation wurde der Ansatz getrocknet und die entstandene Borsäure durch 4-maliges Abblasen von 2,5 ml 1 %iger Essigsäure in MeOH im N₂-Strom entfernt und mit einer Mischung aus 100 µl Pyridin und 400 µl Acetanhydrid ü. N. dunkel bei RT acetyliert. Danach wurde 3 x mit je 4 ml Dichlormethan und 2 ml Wasser extrahiert, die wässrigen Phasen verworfen und die Dichlormethanphasen vereinigt. Die so erhaltenen Alditolacetate

wurden nachfolgend im Trace Gaschromatograph [Thermo Finnigan] mit einer unpolaren VF5 MS-Säule [60m, 0,25 mm Innendurchmesser, Varian] aufgetrennt und mit dem PolarisQ Massenspektrometer [Thermo Finnigan] nach „Electron-Impact-Ionisation“ (EI-Ionisation) detektiert. Identifiziert wurden die einzelnen Alditolacetate einmal durch Cochromatographie eines Standards, der mit Rhamnose, Fucose, Xylose, Mannose, Glukose, Galaktose, GlcNAc und GalNAc sowie Inositol als internen Standard als Alditolacetate enthielt und durch deren Fragmentierungsmuster nach Electron-Impact-(EI)-Ionisierung.

2.6.3 Methylierungsanalysen

Methylierungsanalysen liefern Informationen über die Verknüpfungspositionen der einzelnen Monosaccharidbausteine im Glykan [28,85,91,95-97,180,231]. Bei der Aufarbeitung einer Glykanprobe für die Methylierungsanalyse wurden zunächst die freien OH-Gruppen methylverethert, die Probe anschließend hydrolysiert und die daraus entstehenden freien OH-Gruppen peracetyliert. Daraus resultierende partiell methylierte Alditolacetate werden gaschromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch detektiert. Die Glykanprobe ($\approx 5 \mu\text{g}$) wurde in ein Methylierungsgläschen [Zinnser] überführt, mit einem Teflonseptum samt Schraubverschluss leicht, aber nicht luftdicht verschlossen und *ü. N.* lyophilisiert. Unmittelbar vor der Methylierung wurde die Probe im Exsikkator über P_2O_5 [Merck] im Vakuum (1-5 mbar Druck) *ü. N.* weiter getrocknet. Für die Probenentnahme wurde der Exsikkator mit trockenem Argon geflutet und die Probengläschen sofort fest verschlossen. Durch das Septum wurden nachfolgend $50 \mu\text{l}$ trockenes DMSO [Restwasser $\leq 0,01 \%$, Fluka] zugegeben und die Probe 1,5 h lang im gekühlten US-Bad [Sonorex] gelöst. Anschließend wurden $50 \mu\text{l}$ Lithium-Dimethylsulfinylat-Lösung (2 M Butyllithium in DMSO) zur Aktivierung der OH-Gruppen zugegeben und weitere 1,5 h im US-Bad inkubiert. Die OH-Gruppen wurden durch Zugabe von $50 \mu\text{l}$ frisch destilliertem Iodmethan methylverethert. Alternativ wurde deuteriertes Iodmethan zur Methylierung verwendet, das pro Methylgruppe eine weitere Massenzunahme um drei Einheiten bewirkt und ermöglicht, die Position von bereits vorhandener Methylgruppen an monomethylierten Monosacchariden zu detektieren. Die permethylierten N-Glykane wurden über eine RP-Kartusche mit 100 mg C18ec Material aufgereinigt. Die Kartusche wurde zuvor mit je 5 ml Wasser, ACN, Methanol und nochmals 10 ml Wasser gewaschen, dann die Probe aufgegeben, $150 \mu\text{l}$ Wasser zugegeben und nochmals mit $300 \mu\text{l}$ Wasser nachgespült.

Anschließend wurde die Säule mit 5 ml Wasser und 2 ml 10 %igem ACN gewaschen. Die Probe wurde mit 4 ml ACN, 2 ml MeOH sowie 2 ml Chloroform eluiert. Nach der Trocknung der permethylierten Alditolacetaten konnten diese direkt massenspektrometrisch untersucht werden oder aber gemäß der Aufarbeitung für die Monosaccharidbestimmung mittels GC/MS (2.6.2) weiterverarbeitet werden.

2.6.4 Affinitätschromatographien mit PA-markierten N-Glykanen

2.6.4.1 Herstellung und Verwendung einer Immunaffinitätssäule

Zur Untersuchung der N-Glykane, die mit Glykokonjugaten von *S. mansoni* kreuzreagieren, sollten diese Glykanspezies durch Immunaffinitätschromatographie aus dem Pool freigesetzter N-Glykane angereichert werden. Dazu standen mit BR 11 und BR 84 zwei Hyperimmunseren aus Kaninchen zur Verfügung, die gegen lösliche Eiantigene von *S. mansoni* gerichtet sind. Da aus den Vollseren nur die IgG-Fraktion benötigt wurde, war diese zuvor durch Affinitätschromatographie an DEAE Affi-Gel Blue [BioRad], einem bifunktionalen Affinitätsgel aus Agaroseperlen, an welches kovalent der reaktive Farbstoff „Blue 2“ und als Ionenaustauscher Diethylaminoethan gebunden ist, abgetrennt worden. Eine fertig präparierte Trennsäule war bereits vorhanden und wurde neu aktiviert [230]. Ein Gemisch aus 60 % einer wässrigen Lösung aus 0,1 M Eisessig und 1,4 M NaCl (pH = 3) und 40 % Isopropanol wurde als Vorwaschpuffer verwendet, eine wässrige Lösung aus 0,02 M Tris-HCl, 0,028 M NaCl und 0,02 % NaN₃ (pH = 8) als Laufpuffer. Zunächst wurde die Säule (30 x 3 cm) durch Waschen des Säulenmaterials mit 2 - 3 Gelvolumina einer Lösung von 2 M Guanidin-HCl [Fluka] in Laufpuffer komplett gereinigt. Mit einer Peristaltikpumpe wurde dazu ein Säulendurchfluss von 12 ml/h eingestellt. Nach der Reinigung wurde das Säulenmaterial mit 3-4 Volumina an Laufpuffer äquilibriert. Beide Seren wurden vor dem Säulenauftrag 10 Min. mit 440x g kühl zentrifugiert und dann 48 h lang bei dreimaligem Pufferwechsel gegen Laufpuffer bei 4 °C dialysiert. Der komplette Chromatographie-Vorgang fand bei 4 °C im Kühlraum statt. Nach der Dialyse wurde das Serengemisch komplett auf die Säule gegeben und die Säule mit drei Volumina Laufpuffer gespült, wobei nur die IgG-Fraktion unter den gegebenen Bedingungen nicht bindet. Der Chromatographieverlauf wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm mit einem Durchflussphotometer [Uvicord II, LKB, München] detektiert, mit einem Schreiber [LKB] aufgezeichnet und mit einem Fraktionskollektor [LKB] Fraktionen zu

je 6 ml gesammelt. Von Aliquots in Frage kommender Fraktionen wurde die Reinheit der IgGs unter reduzierenden Bedingungen mit einer SDS-PAGE geprüft, saubere IgG-Fraktionen gepoolt und mittels Vakuumdialyse bei 4 °C schonend ankonzentriert [230]. Für die Immobilisierung der IgGs wurde NHS-aktivierte Sepharose [Amersham] verwendet und der Kopplungsvorgang nach Herstellerangaben durchgeführt. Zuvor wurde die IgG-Lösung gegen PBS umgepuffert. Die Kopplung erfolgte bei 4 °C an 7 ml Sepharose-Gel, das in eine kleine Glassäule überführt wurde. Die gebrauchsfertige Säule wurde bei 4 °C in PBS + 0,02 % Azid [Sigma] aufbewahrt. Vor der Chromatographie wurde die Säule mit 5 Gelvolumina TBS gespült. Die PA-markierten N-Glykane wurden zuvor lyophilisiert, in 500 µl TBS gelöst und auf die Säule aufgetragen. Nach der Probe wurden weitere 2 ml TBS auf die Säule gegeben und einsickern gelassen. Nach 1 h Inkubationszeit wurde die Säule mit 50 ml TBS gewaschen, die Waschfraktion gesammelt und lyophilisiert. Eluiert wurde die Säule dann mit 50 ml einer 50 mM Triethylamin (TEA, Merck) und 100 mM NaCl (pH = 11,5), das Eluat aufgefangen und lyophilisiert. Um eine möglichst effektive Anreicherung der kreuzreagierenden N-Glykane zu erzielen, wurde der gesamte N-Glykanpool zweimal über die Affinitätschromatographiesäule gegeben. Die gesammelten Fraktionen von Durchlauf und Eluat wurden mit PGC-Kartuschen entsalzt, anschließend lyophilisiert und für die weiteren Analysen (GC/MS-Monosaccharidbestimmung, Methylierungsanalysen und Massenspektrometrie (2.6) verwendet.

2.6.4.2 Lektinaffinitätsläufe mit fucosespezifischem Lektin

Um aus dem Pool an kreuzreagierenden N-Glykanen diejenigen zu isolieren, die fucosyliert sind, wurde mit dem Gesamtpool an kreuzreagierenden Glykanspezies ein Lektinaffinitätslauf durchgeführt. Dazu wurde das Lektin des Pilzes *Aleuria aurantia* (AAL) verwendet, das besonders gut (α 1-6)-gebundene, aber auch (α 1-3)-gebundene Fucose bindet [94,323]. Die Lektinsäule, die mit 4 ml AAL-Sepharose (2 mg Lektin pro ml Sepharose) gefüllt war, wurde mit 50 ml PBS (6,5 mM KH₂PO₄, 0,15 M NaCl, pH= 7,4) gewaschen. Die Glykanprobe wurde in 500 µl Puffer gelöst, auf die Säule gegeben und 1 ml PBS nachgelegt. Nach Einsickern der Probe wurde der Ansatz 1 h lang inkubiert. Ungebundene Glykane wurden mit 30 ml Puffer ausgewaschen und die gebundenen Glykane in zwei Fraktionen eluiert. Die erste Fraktion wurde mit 30 ml einer 1 mM Fucose-Lösung in PBS, mögliche höher fucosylierte Spezies mit 30 ml einer 50 mM Fucose-Lösung in PBS eluiert. Anschließend wurde die Säule mit 50 ml

PBS fucosefrei gewaschen und die Affinitätschromatographie einmal wiederholt. Nachfolgend wurden alle drei Fraktionen lyophilisiert, mit PGC-Kartuschen entsalzt und massenspektrometrisch analysiert.

2.6.5 HPLC-Trennungen der PA-markierten N-Glykane

2.6.5.1 Größenfraktionierung mittels Normalphasen-HPLC

Im ersten Teil dieser Studie, zur Untersuchung der kreuzreagierenden Glykane, wurden die Fraktionen aus der Lektinaffinitätschromatographie vor der Massenspektrometrie mittels Normalphasen-HPLC nach Größe aufgetrennt. Dazu wurde eine TSKgel Amide-80 Säule [25 cm x 4,6 mm, Tosoh] mit der Vorsäule TSKgel Amide-80 Guardcolumn [1 cm x 4,6 mm, Tosoh] verwendet. Als Laufpuffer wurde eine 3 %ige wässrige Essigsäurelösung verwendet, die mit TEA auf pH = 7,3 eingestellt worden war. Ein Gemisch aus 35 % Essigsäure-Puffer und 65 % ACN wurde als Laufmittel (LM) A verwendet, ein Gemisch aus 50 % Essigsäure-Puffer und 50 % ACN als LM B. Äquibriert wurde die Säule mit LM A bei einem Fluss von 1 ml/Min. Ein Gradient von 0 bis 100 % LM B in 50 Minuten wurde gefahren. Die Probe wurde in 50 µl LM A gelöst und aufgegeben. Um Temperatureffekte auszuschließen, wurde die Säule auf 40 °C gewärmt. Von der AAL-Waschfraktion wurden HPLC-Fraktionen von 1 Min. Laufzeit und von der AAL-Eluat-Fraktion HPLC-Fraktionen von 30 Sekunden Laufzeit gesammelt. Die Fraktionen wurden für alle nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchungen verwendet.

2.6.5.2 2D-HPLC-Mapping von PA-markierten N-Glykanen

Die N-Glykane, die für den Profilvergleich der kreuzreagierenden Spezies chemisch abgespalten worden waren, wurden mit der Methode des 2D-HPLC-Mappings aufgetrennt. Bei dieser Methode werden Glykangemische einer systematischen und vergleichenden HPLC-Trennung unter konstanten Bedingungen unterzogen [209,212,214,285,324]. Dabei lassen sich Intensitätsunterschiede in der Fluoreszenz detektieren und mittels eines Mengenstandards quantitative Aussagen über die Proben machen. Im Verlauf dieser Methode wurden die Glykane zuerst einer Größenfraktionierung unterzogen. Die Fraktionen wurden dabei nach Zeitfenstern gesammelt, die durch das Elutionsprofil von PA-markierten Isomaltosyloligosacchariden (IMO) gegeben wurden, welche sich nur um eine Glukose-Einheit unterscheiden. Gesammelt wurde immer

im zeitlichen Mittel zweier PA-IMO-Elutionspeaks. Die Größenfraktionierung erfolgte mit nachfolgenden Bedingungen:

Säule: NH2P-50 4D Säule [0,46 mm x 15 cm, Shodex Asahipak]
 Laufmittel A: ACN
 Laufmittel B: 0,3 %ige wässrige Ammoniumacetatlösung (pH = 7)
 Fluss: 0,5 ml/Min.
 Säulentemperatur: 38 °C
 Fluoreszenzmessung: 310/380 nm
 Probenauftrag: gelöst in 80 % LM A und 20 % LM B

Tabelle 3: HPLC-Bedingungen für die NH2P-Säule zur Größenfraktionierung

| Zeit [min] | % Laufmittel A | % Laufmittel B |
|------------|----------------|----------------|
| 0 | 80 | 20 |
| 50 | 30 | 70 |
| 55 | 80 | 20 |
| 100 | 80 | 20 |

Nachfolgend wurden die einzelnen Fraktionen nach MS-Analyse und Trocknung der RP-HPLC unterzogen und damit in der zweiten Dimension aufgetrennt. Als Standard diente dabei M5A (Man₅GlcNAc₂-PA), als PA-markiertes Standard-Glykan bekannter Masse und Menge, das zuvor vom Enzym TAKA-Amylase A freigesetzt wurde [209,214,215,285]. Die zweite Dimension erfolgte mit nachfolgenden Bedingungen:

Säule: Cosmosil 5C18-P [2 mm x 250 mm, Waters]
 Laufmittel A: 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung (pH = 4)
 Laufmittel B: Laufmittel A + 0,5 % (v/v) 1-Butanol
 Fluss: 0,2 ml/Min.
 Säulentemperatur: 38 °C
 Fluoreszenzmessung: 315/400 nm
 Probenauftrag: gelöst in 5 µl eines Gemisch aus 85 % LM A und 15 % LM B

Tabelle 4: RP-HPLC-Bedingungen für die Cosmosil-Säule

| Zeit [min] | % Laufmittel A | % Laufmittel B |
|------------|----------------|----------------|
| 0 | 85 | 15 |
| 105 | 20 | 80 |
| 106 | 85 | 15 |
| 120 | 85 | 15 |

Die Intensitäten der Peaks oder Peakgruppen aus den resultierenden RP-HPLC-Chromatogrammen lassen sich nachfolgend vergleichen, quantifizieren und die Fraktionen massenspektrometrisch untersuchen.

2.6.6 Verwendung von Exoglykosidasen und HF-Behandlung

Um die anomere Konfiguration von Monosaccharidbausteinen im Glykan zu untersuchen, wurden Exoglykosidasen eingesetzt, die das PA-markierte N-Glykan vom nicht-reduzierenden Ende sequentiell abbauen. Prinzipiell lassen sich dabei α/β -Hexosidasen, β -*N*-Acetylhexosaminidase, α -Fucosidase und β -Xylosidase verwenden. Ein Aliquot der Glykanprobe wurde in ein Glasvial [VWR] überführt und getrocknet. Anschließend wurde die Probe in 2-3 μ l 25 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 5) gelöst, 0,1 Units Enzym hinzugegeben und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe direkt massenspektrometrisch untersucht. Eine elegante Methode stellt der Exoglykosidaseverdau auf dem MALDI-TOF-MS-Target dar, wobei eine bereits gemessene Glykanprobe direkt auf dem Target enzymatisch behandelt und anschließend erneut massenspektrometrisch untersucht werden kann, was insbesondere eine Substanzeinsparung bedeutet. Eine entsprechende Probe wurde dafür nach der bereits veröffentlichten Methode vorbereitet [92]. Folgende Enzyme wurden verwendet: α -Mannosidase [EC 3.2.1.24, Sigma], β -*N*-Acetylhexosaminidase [Jackbohne, EC 3.2.1.52, Sigma], α -Fucosidase [Rinderniere, EC 3.2.1.51, Sigma], β -Galactosidase [Jackbohne, EC 3.2.1.23, Glyco] und β -Xylosidase aus *Solanum tuberosum* (für Details siehe: [233]).

2.7 Massenspektrometrische Analyse der N-Glykane

Für die strukturelle Analyse von Glykokonjugaten und Glykanen haben mit der „Matrix assisted Laser desorption ionisation-time of flight“ (MALDI-TOF) und der „Electrospray-Ionisation“ (ESI) Massenspektrometrie (MS) zwei Verfahren in den letzten Jahren besondere Bedeutung erlangt. Sanfte Ionisierungen erlauben dabei die Messung intakter Moleküle, und spezielle geräteabhängige Messmethoden ermöglichen die gezielte Fragmentierung der Probenmoleküle und liefern damit verschiedene strukturelle Informationen [91,136,138,201,207,332].

2.7.1 Matrix assisted Laser desorption ionisation – time of flight – Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden an einem Ultraflex-TOF/TOF (U-TOF) Massenspektrometer [Bruker], der mit einem Stickstofflaser und einer LIFT-MS/MS-Einheit ausgerüstet war, durchgeführt. Das Gerät wurde im positiven Reflektormodus betrieben. Fragmentionenanalyse mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) wurde nach Laser-induzierter Ionisation (LID) durchgeführt [94,319]. Zur Probenvorbereitung wurden auf einem Target mit 600er Anchor [Bruker] zunächst 0,25 µl Matrixlösung (5 mg/ml Azathiothymin (ATT) in Wasser) vorgelegt, mit 0,25 µl Probe gemischt und im Kaltluftstrom getrocknet. Mit 25 kV und 30 Hz Laserschussfrequenz wurde die Probe gemessen und intensitätsabhängig 90 bis 1000 einzelne Schüsse aufaddiert. Für die Fragmentionenanalyse im Tandem time-of-flight (TOF-TOF) Modus, wurden Vorläuferionen einer definierten Masse mit 6 kV forciert und in einem zeitlich begrenzten Ionenfenster selektiert. Fragmentionen wurden mittels LID mit 19 kV in der LIFT-Zelle generiert und deren Massen als H⁺-Addukte nach Passage des Ionenreflektors analysiert. Für die Fragmentionenanalyse im TOF-TOF-Modus durch kollisionsinduzierte Dissoziation (heCID) wurde die Ionenquelle mit 0,5 x 10⁻⁵ bar Argon als Kollisionsgas geflutet. Während bei der LID von H⁺-Addukten vornehmlich glykosidische Brüche gebildet werden, treten bei der Fragmentierung in der heCID Messmethode mit Na⁺-Addukten zusätzliche Ringfragmentierungen auf, die wichtige Informationen über das Glykangerüst und die Belegung besonders des C6-Atoms (6er Antenne) der zentralen, β-gebundenen Mannose der N-Glykanen liefern. Die Verlängerung der 6er Antenne eines N-Glykans kann dabei durch das Auftreten eines charakteristischen Doppelbruchs des Glykangerüsts identifiziert werden, bei dem ein so genanntes „D-Ion“ gebildet wird [134]. Zusätzlich zu dem „D-Ion“ werden zwei relevante A-Ringfragmente gebildet, die durch ^{0,4}A und ^{3,5}A Ringfragmentierungen aus der zentralen Mannose hervorgehen und Informationen zur Belegung der C6-Antenne liefern. Entscheidend für die Bildung von Na⁺-Addukten und Ringfragmenten ist neben der Probenmenge auch der Probenauftrag. Für die zu verwendende Matrix sind in der Literatur verschiedene Rezepte in Abhängigkeit von der Glykanprobe beschrieben worden [94,136,176,207]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Matrix aus 5 mg DHB gelöst in 1 ml eines Gemisches aus 30 % ACN und 0,1 % TFA verwendet. Dabei wurde auf einem 800er Anchor Chip Target [Bruker] 0,5 µl Matrix vorgelegt und 1 bis 2 µl Probe hinzu pipettiert und anschliessend im Kaltluftstrom getrocknet.

2.7.2 nano-HPLC mit online-Kopplung an Electrospray-Ionisation-Ion Trap-Massenspektrometrie (ESI-IT-MS)

Die ESI-IT-Massenspektrometrie wurde an einem Esquire 3000 Gerät von Bruker durchgeführt. Mittels einer nano-HPLC-Anlage [Ultimate, LC-Packings] war es möglich, die N-Glykanprobe aufzutrennen, um sie anschließend nach der Elution online mittels einer feinen Glasnadel im Massenspektrometer durch Elektrospray zu ionisieren und detektieren zu können. Als Laufpuffer wurde eine wässrige 50 mM Ameisensäurelösung (pH = 4,4) verwendet. Die Probe wurde in 10 µl eines Gemisches aus 20 % Puffer und 80 % ACN gelöst und 1 µl auf die TSKgel Amide-80 Kapillarsäule [150 mm x 75 µm, Grohm] aufgegeben. Als LM A diente das Gemisch aus 20 % Puffer und 80 % ACN, als LM B der Laufpuffer. Nach der Injektion wurde nach weiteren 5 Minuten LM A in 35 Min. auf 60 % LM B erhöht und 10 Min. gehalten. In weiteren 10 Min. wurde bis auf 100 % LM A zurückgeführt und für weitere 25 Min. gehalten. Die Nano-HPLC wurde mit einem Vorfluss von 130 µl/Min. betrieben und der effektive Fluss über die Säule betrug ca. 300 nl/Min. Die Online-Nadel [PicoTip, EMITTER, New Objective] war zuvor in den Nanospray-Quellenkopf eingespannt und mittels einer verschiebbaren Mechanik in x,y und z-Richtung zum Sprayschild hin ausgerichtet worden. Mit Hilfe der Steuerungssoftware HyStar [Bruker] wurde eine Spannung von 1400 Volt angelegt und das Trocknungsgas N₂ auf 200 °C und einem Fluss von 6 l/Min. eingestellt. Es wurden Ionen im Bereich von *m/z* 50 bis *m/z* 2500 aufgezeichnet. Ionen von Interesse wurden in der Ionenfalle isoliert und fragmentiert.

2.7.3 Auswertung der massenspektrometrischen Daten

Zur Auswertung der massenspektrometrischen Daten wurde das Softwarepaket Compass 1.1 von Bruker verwendet, das neben der Steuerungssoftware FlexControl 2.4 für das U-TOF Massenspektrometer auch das Programm FlexAnalysis 2.4 für die Annotierungen der detektierten Signale enthält. Die Daten aus den ESI-IT-Messungen wurden mit der Bruker Software DataAnalysis ausgewertet. Für die Zuordnung von Fragmenten zu den detektierten Massenpeaks wurde das Programm „Glyco-Peakfinder“ verwendet (<http://www.eurocarbdb.org/applications/ms-tools>). Zur Benennung der Fragmente wurde die Nomenklatur von Domon und Costello (1988) angewendet [75]. Mit dem Programm „GlycoWorkbench“ wurden zum einen die Strukturen gezeichnet, und zum anderen rein rechnerisch überprüft, ob sich die detektierten Fragmentpeaks aus

strukturellen Vorschlägen herleiten lassen (<http://www.eurocarbdb.org/applications/ms-tools>). Für die einzelnen Monosaccharide wurden folgende Symbole verwendet (Abb. 12).

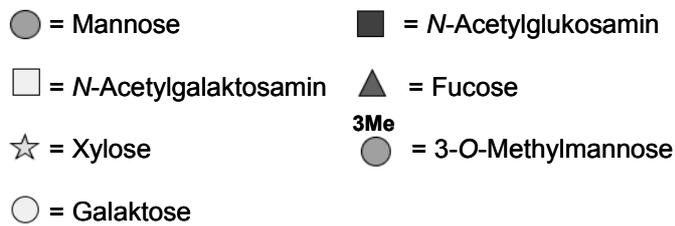


Abb. 12: Übersicht über die verwendeten Symbole aus dem GlycoWorkbench-Programm zur Darstellung der N-Glykanstrukturen. Die Symbole befinden sich nochmals auf der ausklappbaren Seite 213 des Anhangs.

2.8 Immunhistologische Untersuchungen

2.8.1 Fixierung und Einbettung von Schnecken

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden adulte Exemplare uninfizierter und infizierter *B. glabrata* verwendet. Die Schnecken wurden vor der Fixierung in 3 %igem ethanolischem Aquarienwasser narkotisiert und samt Gehäuse isoosmotisch in 4 % PFA isoosmotisch für 12 h fixiert. Danach wurde das Gehäuse vorsichtig von den Schnecken präpariert und für weitere 12 h fixiert. Nach der Fixierung wurden die Exemplare in PBS gewaschen und konnten in 0,02 % Azid in PBS bei 4 °C gelagert werden. Um einzelne Gewebereiche der Schnecken gezielt untersuchen zu können, wurden die fixierten Präparate als kleinere Stückchen in Agar (2 %ig in PBS) [Serva] arretiert. Die Einbettung in Paraffin, das Anfertigen von 1 µm dicken Serienschnitten (Superfrost Objektträger) und standardisierten Gewebefärbungen wurde freundlicherweise vom Labor Prof. Dr. Bohle (Institut für Pathologie, Universität Gießen) übernommen.

2.8.2 Immunhistochemische Markierung an Schneckenschnitten

Für die Markierungen wurde folgendes standardisierte Protokoll, modifiziert nach van Leeuwen (1986) verwendet [297].

Tabelle 5: Arbeitsschritte zur immunhistochemischen Anfärbung von Schneckenschnitten

| | Arbeitsschritt | Zeit |
|----|---|-----------|
| 1. | Entparaffinieren in Roti-Histol [Roth] | 2x 5 Min. |
| 2. | Wässern der Schnitte in absteigender EtOH-Reihe (100, 96, 90, 80 und 70 % in TBS) | Je 5 Min. |

| | | |
|-----|--|-----------------------|
| 3. | Einstellen in TBS | 2x 15 Min. |
| 4. | Einstellen in heißen Citratpuffer (0,01 M, pH = 6, 80-90 °C) | 15 Min. |
| 5. | Einstellen in 3 %iges H ₂ O ₂ (in TBS) | 5 Min. (dunkel) |
| 6. | Glycinpassage (0,1 M) | 10 Min. |
| 7. | Blockieren der Schnitte in 3 % BSA/0,1 % Triton-X-100 in TBS | 2 h (RT) |
| 8. | Inkubation mit 1. Antikörper (verdünnt in 0,1 % BSA/0,1 % Triton-X-100 in TBS) | 2 h RT oder ü. N. 4°C |
| 9. | Waschen der Schnitte in TBS | 3 x 10 Min. |
| 10. | Inkubation mit 2. Antikörper (verdünnt in 0,1 % BSA/0,1 % Triton-X-100 in TBS) | 1 - 2 h |
| 11. | Waschen der Schnitte in TBS | 4x 10 Min. |
| 12. | Färben mit DAB (6 mg DAB in 10 ml TBS + 20 µl 30 %iges H ₂ O ₂) | 1 - 5 Min. |
| 13. | Abstoppen der Färbung durch Einstellen in Wasser | 1 Min. |
| 14. | Kernfärbung mit Hämalaun | 0,5 - 2 Min. |
| 15. | Waschen in Wasser | 4x 1 Min. |
| 16. | Entwässern in kurzer EtOH-Passage (70, 90 und 100 %) | Je 2 Min. |
| 17. | Roti-Histol Passage | 2 Min. |
| 18. | Eindeckeln in Roti-Histokitt | |

Als Negativkontrollen wurden Schnitte mit PBS anstelle des 1. Antikörpers inkubiert oder Normalseren von Kaninchen und Maus verwendet. Die Citratpuffer-Passage (4. Schritt) dient der Verstärkung durch Freisetzung der antigenen Oberflächenstrukturen [21]. Die Kernfärbung kann auch entfallen und nach Schritt 13 zu Schritt 16 übergegangen werden. Die so markierten Schnitte sind lichtgeschützt jahrelang haltbar.

Tabelle 6: Übersicht der eingesetzten Verdünnungen an Antiseren, Antikörpern und Zweitantikörpern für die immunhistochemischen Anfärbungen.

| Inkubation | Verdünnung | Zweitantikörper | Verdünnung |
|---------------|------------|-----------------------|------------|
| BR 84 (α-SEA) | 1:5000 | S-a-R, HRP-konjugiert | 1 :100 |
| CTF | 1:5000 | S-a-R, HRP-konjugiert | 1 :100 |
| M2D3H (10x) | 1:100 | R-a-M, HRP-konjugiert | 1 :100 |
| F-LDN | 1:10 | R-a-M, HRP-konjugiert | 1 :100 |
| LDN | 1:10 | R-a-M, HRP-konjugiert | 1 :100 |
| LDN-F | 1:10 | R-a-M, HRP-konjugiert | 1 :100 |
| LDN-DF (10x) | 1:100 | R-a-M, HRP-konjugiert | 1 :100 |
| G8G12 | 1:200 | R-a-M, HRP-konjugiert | 1 :100 |

2.8.3 Immunhistochemie an Miracidien

Die immunhistochemische Markierung von Miracidien wurde in Anlehnung an die Methode von Pinheiro *et al.* (2004) durchgeführt [236]. Chamber-Slides [Nunc] mit 8 Kammern wurden ü. N. bei 4 °C mit Poly-L-Lysin-Lösung [Sigma] beschichtet, anschließend für 6 h bei 37 °C getrocknet und 1 x mit PBS gewaschen. Schlupffrische Miracidien eines liberianischen Stammes wurden durch Perfusion nach Präparation von syrischen Hamstern gewonnen [110,268], in PEM Puffer fixiert [226] und danach 1 x in PBS gewaschen. In jede Kammer wurden ca. 20-50 Miracidien pipettiert und ü. N. bei 4 °C adhären lassen. Anschließend wurden die Miracidien vorsichtig mit PBS gewaschen und in mikrotubulistabilisierendem Puffer + 0,5 % Triton X-100 1 h permeabilisiert [104]. Danach wurde 30 Min. bei RT mit 3 % BSA in PBS blockiert. Der erste Antikörper wurde mit einer Lösung von 0,1 % BSA in PBS plus 0,1 % Triton-X-100 verdünnt, auf die Miracidien pipettiert und ü. N. bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung vorsichtig abgesaugt und 4 x 10 Min. mit PBS gewaschen. Der zweite Antikörper war FITC-konjugiert, wurde 1:20 mit der gleichen Lösung verdünnt und 1 h dunkel bei RT inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Inkubationen mit PBS und mit 1:5000 verdünnten NMS und NRS angesetzt. Danach wurde die Lösung abgenommen und erneut 4 x 10 Min. mit PBS gewaschen. Nach Abnahme des Chamberaufsatz wurden die Miracidien mit einen Tropfen Vectashield [Vectorlaboratories, Burlingame, USA] versetzt, eingedeckelt und kühl und dunkel gelagert.

Tabelle 7: Übersicht der eingesetzten Verdünnungen an Antiseren, Antikörpern und Zweitantikörpern für die Oberflächenmarkierung von Miracidien

| Inkubation | Verdünnung | Zweitantikörper | Verdünnung |
|------------------------|------------|-----------------------|------------|
| BR 84 (α -SEA) | 1:5000 | G-a-R FITC-konjugiert | 1:20 |
| M2D3H (10x) | 1:100 | G-a-M FITC-konjugiert | 1:20 |
| F-LDN | 1:10 | G-a-M FITC-konjugiert | 1:20 |
| LDN | 1:10 | G-a-M FITC-konjugiert | 1:20 |
| LDN-F | 1:10 | G-a-M FITC-konjugiert | 1:20 |
| LDN-DF (10x) | 1:100 | G-a-M FITC-konjugiert | 1:20 |
| Le ^X (10x) | 1 :100 | G-a-M FITC-konjugiert | 1 :20 |
| | | | |

2.8.4 Dokumentation der immunhistochemischen Markierungen

Die Objektträger und Chamberslides wurden am Mikroskop Leica DM 6000 B im Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie fotografisch dokumentiert. Zur Auswertung der Aufnahmen wurde die Mikroskopsoftware Leica FW 4000 verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Aufreinigung des Hämolympfproteins

Für die strukturelle Charakterisierung der N-gebundenen Glykane des Hämolympfgesamtproteins von *B. glabrata* waren insgesamt 1200 mg Hämolympfprotein aufgearbeitet worden (2.3). Die aufgereinigte Hämolymphe diente als Ausgangsmaterial für alle weiteren Untersuchungen. Der größte Teil des Hämolympfproteins wurde dazu verwendet, die N-Glykane für die strukturelle Untersuchung abzuspalten (2.5.1). Dies wurde ausnahmslos an tryptisch verdauten Glykopeptiden mit PNGase F durchgeführt, da ein Vorversuch ergeben hatte, dass die Abspaltung von N-Glykanen am intakten Glykoprotein durch das Enzym nicht sehr effizient war.

3.2 Isolierung, Aufreinigung und Untersuchungen kreuzreagierender N-Glykane

Die aus Hämolympfprotein mit PNGase F freigesetzten N-Glykane wurden über eine PGC-Kartusche entsalzt und mit 2-Aminopyridin fluoreszenzmarkiert. Zur Isolierung der mit schistosomalen Glykokonjugaten kreuzreagierenden N-Glykane wurde aus polyklonalen Kaninchenseren, die gegen lösliches Eiantigen (SEA) von *S. mansoni* gerichtet waren, die IgG-Fraktion isoliert und an NHS-aktivierte Sepharose gekoppelt. Kreuzreagierende Spezies wurden mittels Immunaффinitätschromatographie angereichert. Der daraus resultierende Pool an kreuzreagierenden N-Glykanen diente als weiteres Ausgangsmaterial für alle strukturellen Untersuchungen. Zur weiteren Auftrennung der N-Glykane in fucosylierte und unfucosylierte Spezies wurde der gesamte Pool einer Lektinaффinitätschromatographie unter Verwendung des immobilisierten, fucosespezifischen Lektins von *Aleuria aurantia* (AAL) unterzogen. Die strukturelle Charakterisierung einzelner Spezies wurde nach Normalphasen-HPLC der beiden resultierenden Fraktionen (Lektinsäulen-Durchlauf und -Eluat) aus einzelnen HPLC Fraktionen durchgeführt. Eine Übersicht über den experimentellen Verlauf der Aufarbeitung und Charakterisierung gibt Abb. 13.

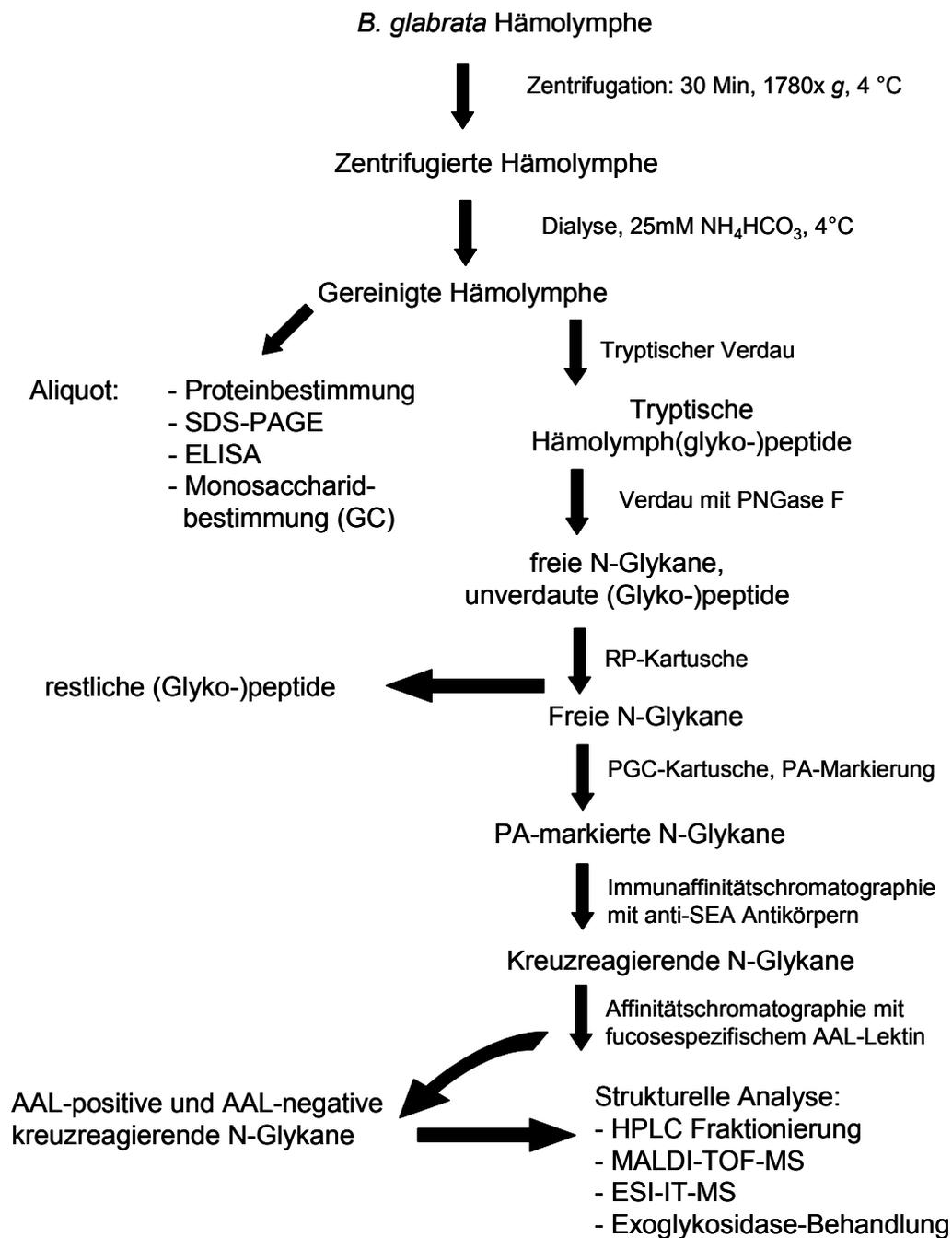


Abb. 13: Übersicht über die erfolgte Aufarbeitung der Hämolympheprobe, die Abspaltung und Aufreinigung der N-Glykane sowie den weiteren Weg der strukturellen Charakterisierung der kreuzreagierenden Glykanspezies.

3.3 Biochemische Untersuchungen

3.3.1 Proteinbestimmung

Zunächst wurde der Proteingehalt der aufgereinigten Hämolymphe ermittelt. Dazu war die Proteinbestimmung mit dem Protein-Assay Kit von BioRad durchgeführt worden (2.4.1). Die Hämolympheprobe wurde zuvor 1:1 mit Wasser verdünnt und 1 µl Probe als dreifachen Ansatz eingesetzt worden. Mittels der erstellten Eichgerade wurde die Proteinbestimmung an den Hämolympheproben durchgeführt. Sie ergab einen mittleren Gehalt von ca. 10,1 µg/µl Protein für *B. glabrata* aus gemischter Hälterung sowie 8,5 µg/µl und 9,5 µg/µl für *B. glabrata* des Puerto Rico und Salvador Stammes.

3.3.2 1D-SDS-PAGE und Western Blot

Die Auftrennung eines Aliquots der dialysierten Hämolymphe mit der 1D-SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen bot einen Überblick über die Größenverteilung der Hämolympheproteine. Dabei erzielte das 8,5 %ige Trenngel das beste Trennungsergebnis. Das Auftreten von einigen Proteinpräzipitaten im Massenbereich von über 250 kDa konnte in silbergefärbten Gelen nur schwach nachgewiesen werden. Um eine erste Aussage über das Bindevormögen von anti-SEA Serum und die Präsenz des Fuc(α1-3)GalNAc-Epitops zu bekommen, wurde an 1D-Gel Western Blot Streifen Bindungsstudien mit dem anti-SEA Serum und dem mAk M2D3H durchgeführt (2.4.4). Als ideale Proteinmenge pro Gelspur wurde in Vorversuchen 10 µg Hämolympheprotein ermittelt. Zur Positivkontrolle wurde im Western Blot eine Spur mit anti-*Bg*-Hämoglobin Serum inkubiert. Die Negativkontrollen im Western Blot, bestehend aus jeweils einer Spur verdünntem NMS und NRS zeigten nach Belichtung keine Signale und werden daher nicht gezeigt. Das anti-SEA Serum zeigte eine starke Bindung an zahlreiche distinkte Banden im Massenbereich von etwas mehr als 10 kDa bis hin zu 250 kDa (Abb. 14). Die Signale darüber sind als Bindungen an höhermolekulare Präzipitate zu betrachten. Das Bindevormögen des M2D3H mAks schien sich im Bandenmuster nicht wesentlich zu unterscheiden, hingegen aber in der Intensität der Bindung. Sowohl das polyklonale anti-SEA Serum als auch der mAk M2D3H zeigten eine deutliche serologische Kreuzreaktivität mit den Hämolympheproteinen.

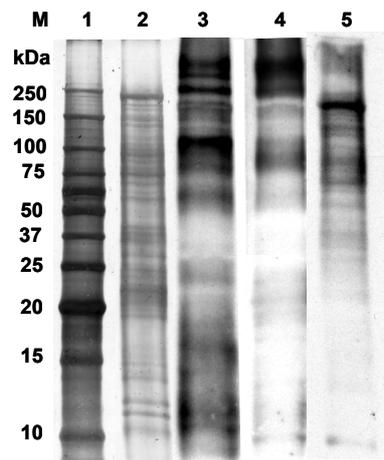


Abb. 14: 1D-SDS-PAGE und Western Blots von *B. glabrata* Hämolympheproteinen (10µg pro Spur). Spur 1: Marker, Spur 2: Silberfärbung, Spur 3: anti-SEA Serum (1:100.000), Spur 4: mAk M2D3H (1:4) und Spur 5: anti-*Bg*-Hämoglobin Serum.

3.3.3 Ergebnisse der Bindungsstudien mittels ELISA

Im ELISA wurden tryptische Hämolymphe(Glyko-)Peptide verwendet, um das Bindevormögen von Antiseren und monoklonalen Antikörpern zu testen und Hinweise auf das Vorliegen von Glykanepitopen zu erhalten (2.4.5). Um besonders die Bedeutung von terminalen Fucose-Resten für die Antikörperbindung zu untersuchen, wurde ein Teil der (Glyko-)Peptide mit 48 %iger HF-Lösung behandelt, was eine spezifische Abspaltung von (α 1-3)-gebundenen terminalen Fucose-Resten zur Folge hat, während das restliche Glykangerüst weitgehend intakt bleibt. Antiseren gegen *Bg*-Hämoglobin und gegen *Bg*-Hämolymphe wurden als positive Kontrollen eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten NMS und NRS, deren Extinktionswerte durch Abzug von allen detektierten Werten mit in die Diagramme eingeflossen sind. Die ELISA Experimente wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Lauf der Studie durchgeführt, da zu Beginn die monoklonalen Antikörper gegen LDN und die verschiedenen fucosylierten LDN Epitope noch nicht vorhanden waren. Zunächst wurde das Bindevormögen von anti-SEA und dem mAk M2D3H an 200 ng Antigen geprüft. Der Ansatz mit dem anti-SEA Serum zeigte eine starke Bindeaktivität bei den unbehandelten (Glyko-)Peptiden (Abb. 15 A). Durch HF-Behandlung der Glykopeptide wurde die Bindeaktivität hingegen um ca. 40 % gesenkt. Das Bindevormögen des M2D3H Antikörpers war bei unbehandelten (Glyko-)Peptiden deutlich schwächer und erreichte ca. 8 % des Bindevormögens von anti-SEA Serum. Nach HF-Behandlung sank das M2D3H Bindevormögen, verglichen mit dem Wert für unbehandelte Glykopeptide, auf 75 % des Ausgangswertes ab (Abb. 15 A). Die an unbehandelten sowie HF-

behandelten Glykopeptiden getesteten mAks gegen spezifische Kohlenhydratepitope zeigten unterschiedlich starkes Bindevormögen. Ihr Bindevormögen war unter Einsatz von 2000 ng Antigen geprüft worden (Abb. 15 B). Um einen Vergleich zu dem vorangegangenen ELISA zu haben, waren das anti-SEA Serum und der mAk M2D3H in ihren Inkubationen nochmals um Faktor 10 verdünnt eingesetzt worden. Der mAk F-LDN zeigte vor und nach HF-Behandlung ein zum M2D3H ähnliches Bindevormögen, wobei eine höhere Absorption bei der Inkubation mit F-LDN zu beobachten war. Die mAks gegen LDN-F und LDN-DF zeigten beide ein ähnlich starkes Bindevormögen wie der mAk M2D3H, das ebenfalls bei HF-behandelten Peptiden um 75 % abnahm. Der mAk gegen LDN zeigte ein stärkeres Bindevormögen als die übrigen mAks und als einziger mAk ein erhöhtes Bindevormögen gegenüber HF-behandelten Glykopeptiden (Abb. 15 B).

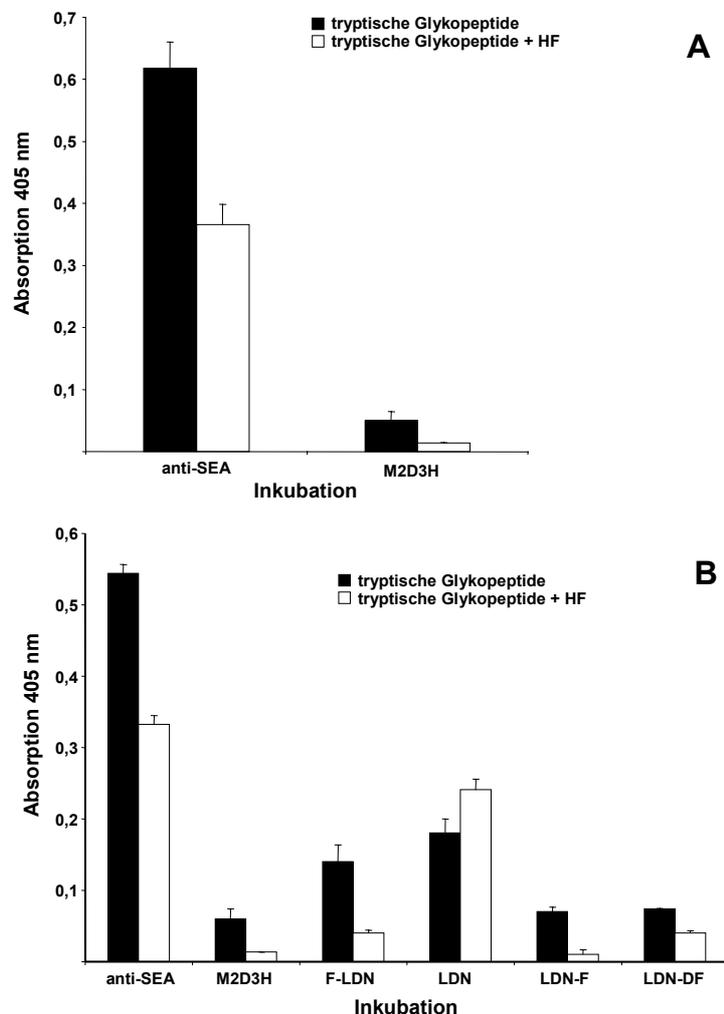


Abb. 15: ELISA-Experimente an tryptischen Hämolymp-(Glyko-)Peptiden vor und nach HF-Behandlung. In (A) wurde das Bindevormögen von anti-SEA Serum (1:50000) und M2D3H (1:100) an jeweils 200 ng (Glyko-)Peptid getestet. (B) zeigt die Ergebnisse aus Bindungsstudien von anti-SEA Serum (1:500000), M2D3H (1:1000) und den mAks gegen die F-LDN, LDN, LDN-F und LDN-DF Kohlenhydratepitope (je 1:10) unter Verwendung von je 2000 ng (Glyko-)Peptid.

3.4 Gesamtpool an Hämolymp-N-Glykanen

Die N-Glykane waren von 1200 mg Hämolympprotein mit insgesamt 750 Einheiten PNGase F enzymatisch abgespalten worden (2.5 und Unterpunkte). An dieser Stelle sei bereits erwähnt, dass eine Freisetzung von N-Glykanen mit PNGase A ebenfalls durchgeführt wurde. Jedoch ergaben die Monosaccharidbestimmung mittels GC/MS sowie die massenspektrometrische Analyse exakt die gleichen Ergebnisse wie für die N-Glykane nach PNGase F Freisetzung, wobei lediglich eine wesentlich geringere Menge detektiert wurde. Daher wurden für die strukturelle Charakterisierung ausschließlich N-Glykane nach Freisetzung mit PNGase F verwendet.

3.4.1 Monosaccharidbestimmung mittels GC/MS

Eine genaue, mit Massenfingerprint unterstützte Bestimmung des Monosaccharidgehaltes der PA-markierten N-Glykane, die auch eine genaue Abschätzung der Mengenverhältnisse erlaubt, wurde mit einer GC/MS-Analyse durchgeführt (2.6.2). Die Monosaccharide wurden als Alditolacetate gaschromatographisch getrennt und mit einem Standardmix, welcher Rhamnose, Fucose, Xylose, Mannose, Glukose, Galaktose, *N*-Acetylglukosamin und *N*-Acetylgalaktosamin als Alditolacetate enthielt und zusätzlich Inositol als internen Standard enthielt, mittels Kapillar-GC oder GC/MS unter Verwendung von Flammenionisation oder Electron-Impact-Ionisierung vergleichend analysiert. In den freigesetzten N-Glykanen des Hämolympproteins von *B. glabrata* wurden Man, Gal, GlcNAc, GalNAc, Fuc, Xyl, 3-*O*-MeMan und 3-*O*-MeGal im molaren Verhältnis von 2,5 : 1,1 : 0,3 : 0,1 : 0,3 : 0,1 : 0,5 : 0,1 detektiert. Neben Fucose und Xylose wurden kein weiterer Desoxyzucker bzw. keine weitere Pentose sowie auch keine Sialinsäuren gefunden. Abb. 16 zeigt GC/MS Läufe einzelner Monosaccharidbestimmungen. Zum Vergleich der Verhältnisse an detektierten Bausteinen ist der höchste Peak auf jeweils 100 gesetzt.

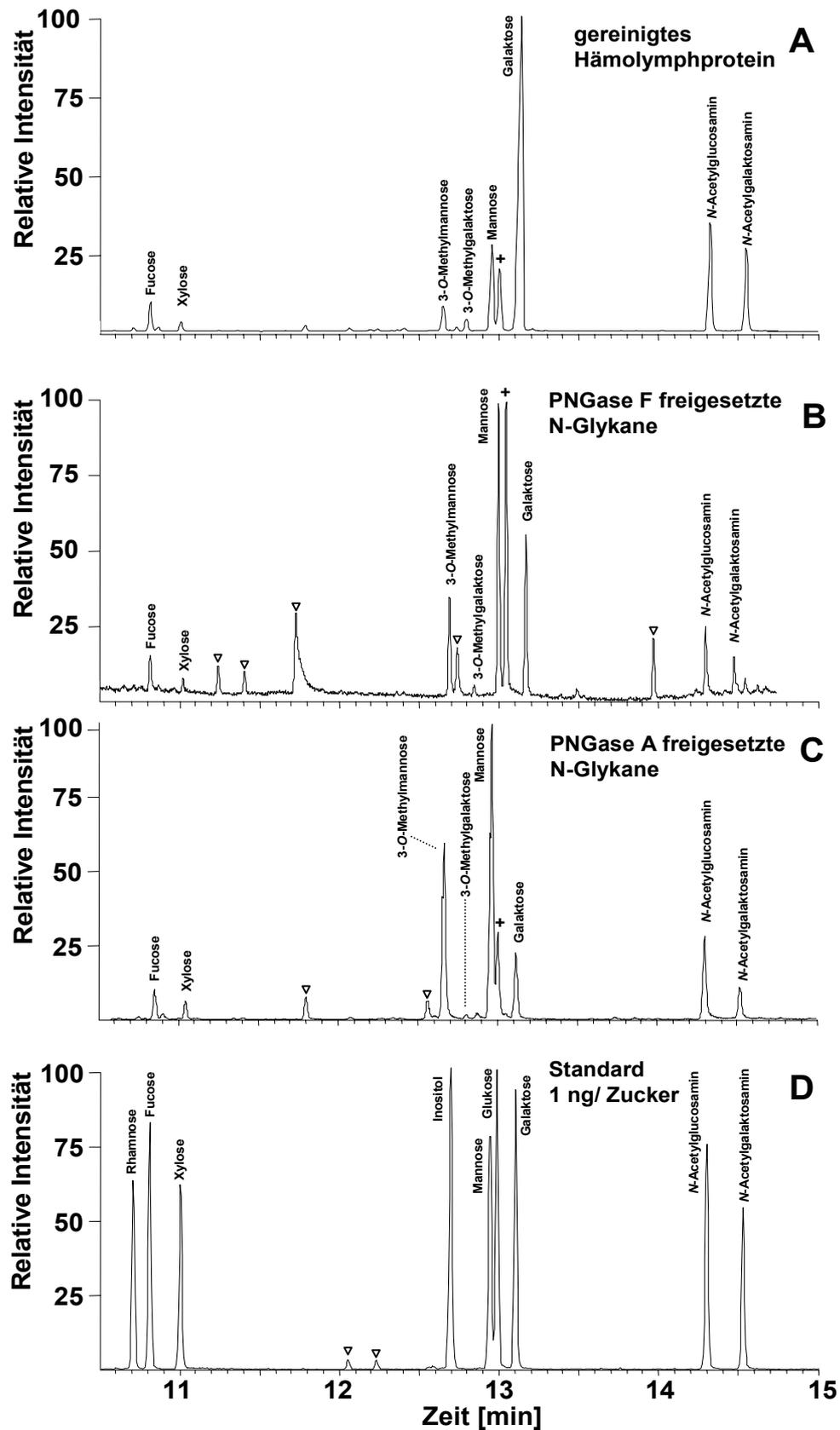


Abb. 16: Vergleichende GC/MS Läufe zur Monosaccharidbestimmung. Im Hämolympprotein (A) ist Galaktose das dominierende Monosaccharid, hingegen Mannose bei den freigesetzten N-Glykanen (B+C). In den molaren Verhältnissen unterscheiden sich die PNGase F oder A freigesetzten N-Glykane nicht. (C) zeigt den Standard. + = Glukosekontamination, ▽ = sonstige Verunreinigungen.

3.4.2 Massenspektrometrische Untersuchung der freigesetzten und PA-markierten N-Glykane

Das Massenspektrum der PNGase F freigesetzten N-Glykane zeigte Signale im Massenbereich von m/z 1000 bis 2300, wobei starke Intensitäten im vorderen Bereich zu beobachten waren (Abb. 17 A). Sinnvolle Monosaccharidzusammensetzungen, wie in Abb. 17 A gezeigt, ergaben für die Hauptpeaks, gemessen als $[M+Na]^+$, MeH_2HN_2 -PA (m/z 1039,7), MeH_2HN_2X -PA (m/z 1171,4), MeH_2HN_2XF -PA (m/z 1317,4), $MeH_3H_2N_2$ -PA (m/z 1377,5), $MeH_2H_4N_2$ -PA (m/z 1526,0) und $MeH_3H_3N_2$ -PA (m/z 1540,0). Die Hauptkomponenten des N-Glykanpools waren Spezies, in deren Komposition mindestens zwei 3-*O*-Methylhexosen, aber auch Xylose- und Fucose-Reste vorkamen. Im höheren Massenbereich wurden weitere Glykane mit Monosaccharidzusammensetzungen von $MeHH_4N_4XF_2$ -PA (m/z 2179,4) und $MeHH_3N_5XF_2$ -PA (m/z 2220,6) detektiert, die hingegen nur eine 3-*O*-Methylhexose, aber zwei Fucose aufweisen.

In den nachfolgenden Massenspektren wurden die detektierten Glykanmassen, sofern nicht anders angegeben, als Na^+ -Addukte annotiert. Beim Auftreten von zwei oder drei verschiedenen Addukten einer Glykanspezies in einem Spektrum wurden folgende Symbole für die Zuordnung verwendet: * = H^+ -Addukte, Δ = Na^+ -Addukte und # = K^+ -Addukte. Eine Übersicht über alle detektierten Glykane gibt die ausklappbare Tabelle 12 im Anhang, die zum vereinfachten Verständnis der MS-Daten des Lesenden empfohlen wird.

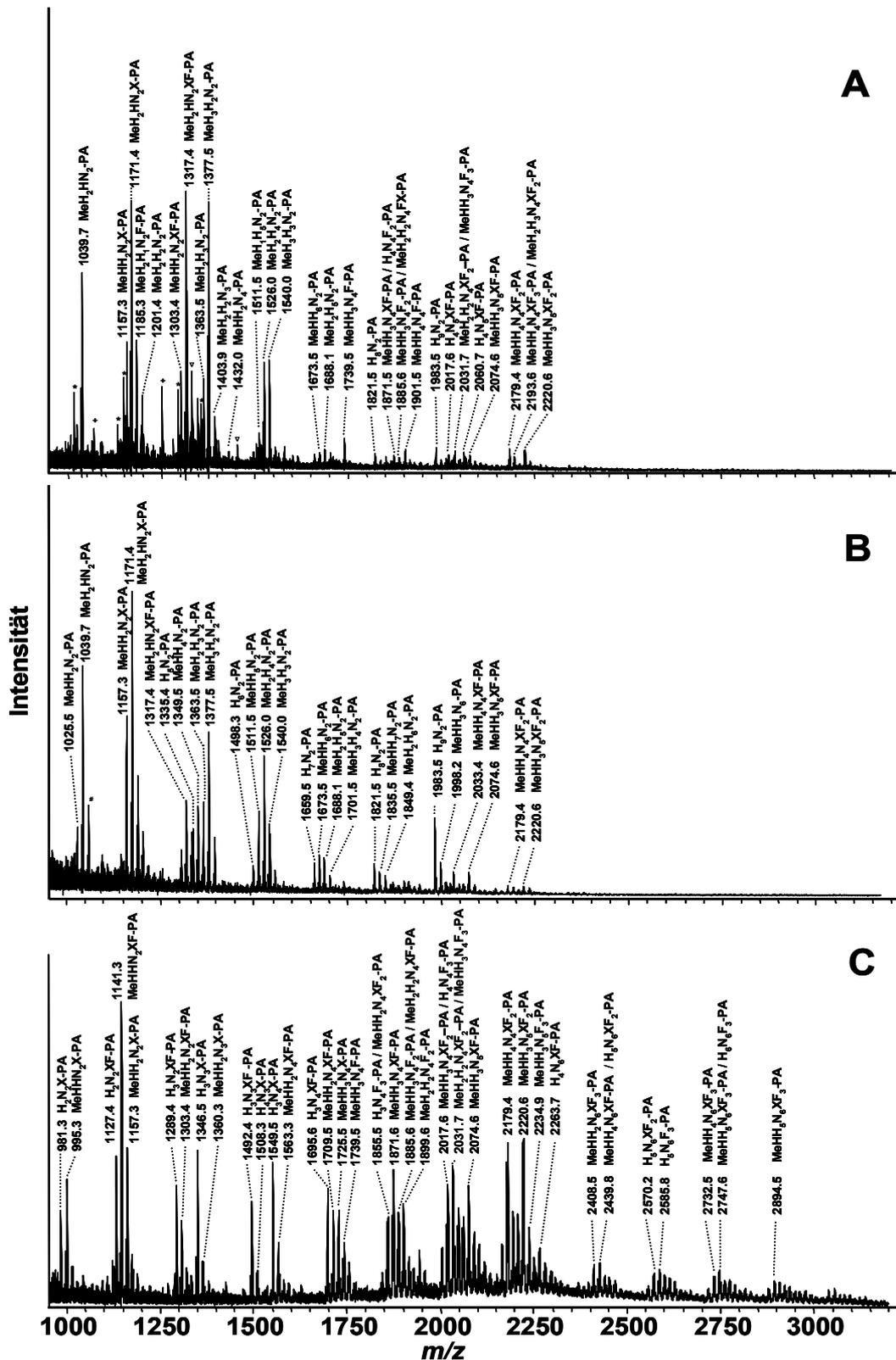


Abb. 17: Vergleichende MALDI-TOF-Massenspektren aller freigesetzten, PA-markierten N-Glykane (A), der anti-SEA ungebundenen Fraktion (B) und der anti-SEA gebundenen Fraktion (C). Die detektierten Massen stellen Na⁺-Addukte dar. * = H⁺-Addukte, # = K⁺-Addukte, + = Glukose-Oligomere, ∇ = Verunreinigung (kein Kohlenhydrat), MeH = Monomethylierte Hexose, H = Hexose, N = N-Acetylhexosamin, X = Xylose, F = Fucose und PA = 2-Aminopyridin. Eine Tabelle mit allen detektierten Glykanen und deren Monosaccharidzusammensetzungen befindet sich im Anhang (Tabelle 12).

3.5 Isolierung und Charakterisierung kreuzreagierender Glykane durch Immunaффinitätschromatographie

3.5.1 Isolierung der IgG-Fraktion und deren Kopplung

Die Kaninchen-IgGs gegen SEA waren mittels DEAE Affi-Gel Blue von den anderen Serumbestandteilen abgetrennt worden (2.6.4.1). Zur Überprüfung der Reinheit der IgGs in den Fraktionen wurde mit einem Aliquot einiger Fraktionen eine SDS-PAGE durchgeführt und saubere Fraktionen, wie in Abb. 18 gezeigt, vereinigt. Die nachfolgende Proteinbestimmung der gepoolten IgG-Fraktionen ergab 66 mg, die anschließend an 7 ml Sepharose-Trägermaterial gekoppelt wurden. Die nach der Kopplung der Antikörper an die Sepharose restliche wässrige Phase enthielt kein Protein mehr.

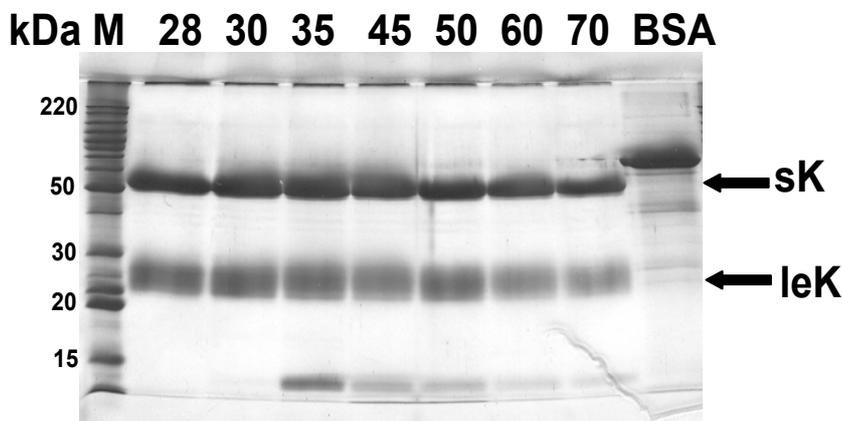


Abb. 18: Überprüfung der Reinheit der abgetrennten anti-SEA Antikörper mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. Das Gel zeigte einige Fraktionen des Hauptpeaks. BSA wurde zu Kontrollzwecken aufgetragen. sK = schwere IgG Kette, leK = leichte IgG Kette, M = Molekularer Marker

3.5.2 Monosaccharidbestimmung vom Immunaффinitätsdurchlauf und Immunaффinitätseluat

Die gesamte N-Glykanfraktion war zweimal über die Immunaффinitätssäule gegeben worden und der Durchlauf sowie das Eluat gesammelt, lyophilisiert und entsalzt worden. Jeweils ein Aliquot von beiden Fraktionen war der Monosaccharidbestimmung mittels GC/MS zugeführt worden. Die Analysen zeigten deutliche Unterschiede zwischen Immundurchlauf und Immuneluat. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die detektierten Monosaccharide und deren Mengen- sowie Molverhältnisse. Die Angaben entstammen aus drei GC/MS Läufen und sind gemittelt. Mannose stellte in beiden Fraktionen das dominante Monosaccharid dar, das zur Berechnung der molaren Verhältnisse zusammen mit 3-O-Methylmannose gleich drei gesetzt wurde. Fucose und Xylose wurden in beiden Fraktionen detektiert, hingegen war beim Immuneluat ein deutlicher

Anstieg im molaren Verhältnis dieser Monosaccharide bezogen auf die Gesamtfraction zu verzeichnen. Ein vergleichbarer Anstieg des molaren Verhältnisses wurde im Immuneluat auch bei den Aminozuckern beobachtet. Da es sich bei den Fraktionen um PA-markierte N-Glykane handelte, entspricht die Menge an detektiertem GlcNAc nicht der tatsächlich vorliegenden Menge an GlcNAc, da durch den Fluoreszenzmarker das innerste GlcNAc nicht erfasst wurde. Bezogen auf die Gesamtmenge an freigesetzten PA-markierten N-Glykanen entfielen 95 % auf den Immundurchlauf und 5 % der freigesetzten Menge auf das Immuneluat. Abb. 19 zeigt vergleichend die GC/MS Läufe der Monosaccharidanalysen des Immuneluates und des Immundurchlaufes. Die Identifizierung der monomethylierten Hexosen als 3-*O*-Methylmannose (Abb. 20 A) und 3-*O*-Methylgalaktose gelang massenspektrometrisch nach Verwendung von Natriumbordeuterid im Reduktionsschritt sowie durch Cochromatographie mit einem Methylzuckerstandard.

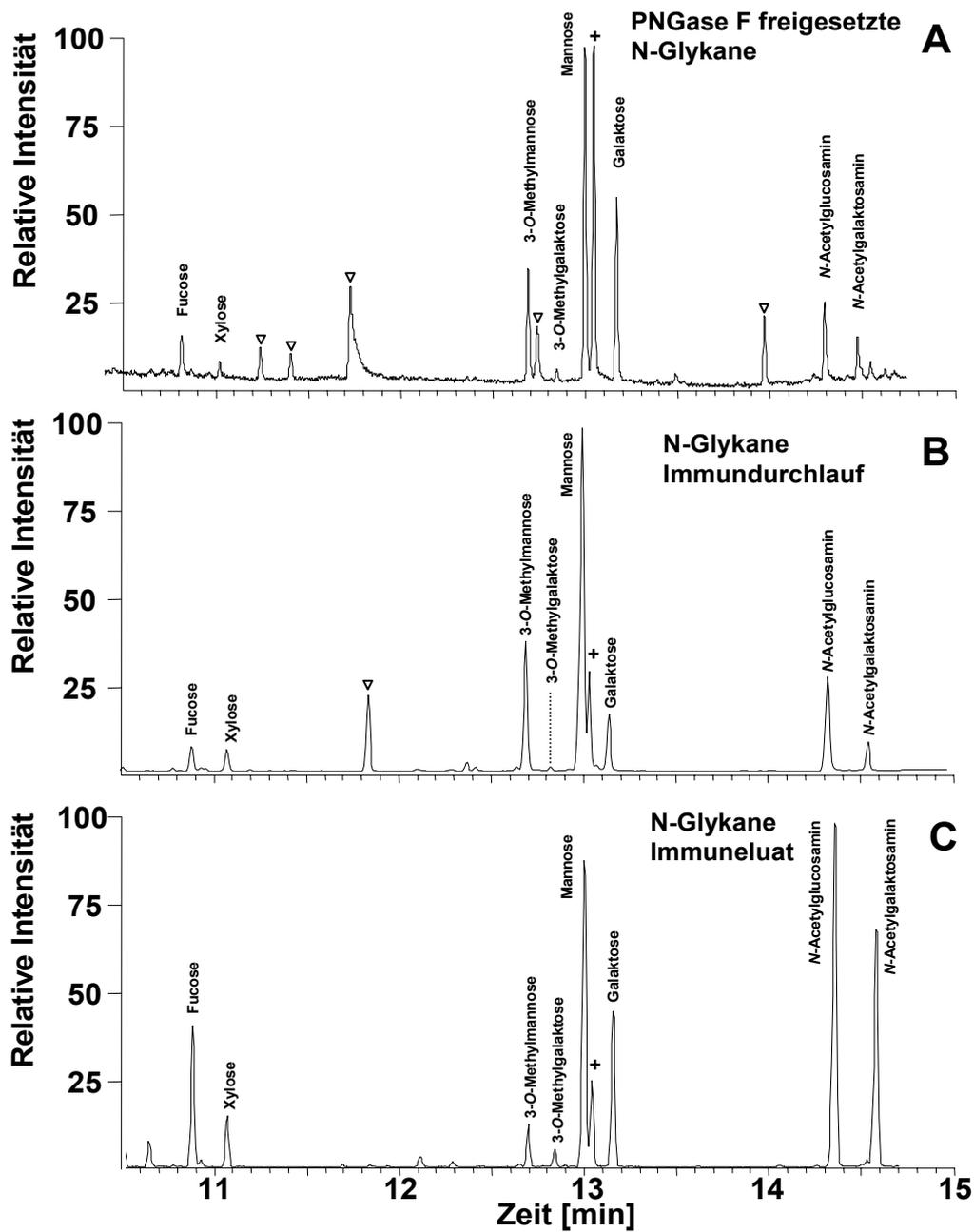


Abb. 19: Vergleichende GC/MS Läufe zur Monosaccharidbestimmung der N-Glykane im Immundurchlauf und Immuneluat. Ausgangsmaterial war der Gesamtpool an N-Glykanen (A). Das Immuneluat (C) verzeichnet eine Anreicherung der Bausteine Fucose, Galaktose und der Aminozucker, während der Immundurchlauf (B) von den Verhältnissen dem Gesamtpool ähnlich ist. + = Glukosekontamination, ∇ = sonstige Verunreinigungen.

Tabelle 8: Monosaccharidbestimmung der Hämolympheglykoproteine, des Immundurchlaufes und des Immuneluates.

| | Hämolymp- Protein ¹ | | Immundurchlauf | | Immuneluat | |
|--|-----------------------------------|-----------------------|----------------|-----------------------|---------------|-----------------------|
| | Menge [µg] | Molares Verhältnis | Menge [µg] | Molares Verhältnis | Menge [µg] | Molares Verhältnis |
| Fucose | 4930 | 0,7 | 446 | 0,13 | 83 | 1,09 |
| Xylose | 2270 | 0,2 | 335 | 0,11 | 73 | 0,42 |
| 3-O-CH₃- mannose* | 35390 | 0,7 | 1897 | 0,74 | 42 | 0,03 |
| Mannose* | 11230 | 2,3 | 5357 | 2,26 | 190 | 2,97 |
| 3-O-CH₃- Galaktose | 1600 | 0,3 | 112 | 0,11 | 3 | 0,1 |
| Galaktose | 54720 | 10,8 | 893 | 0,32 | 85 | 1,46 |
| GlcNAc | 28460 | 2,9 | 1562 | 0,6 | 60 | 3,46 |
| GalNAc | 34770 | 2,1 | 558 | 0,18 | 55 | 2,32 |
| Σ [µg] | 141560 | | 11160 | | 591 | |

* Das molare Verhältnis von 3-O-Methylmannose und Mannose wurde auf drei gesetzt.

¹ Die Menge an detektierten Monosacchariden wurde auf die insgesamt eingesetzte Menge an Hämolymphe(glyko-)proteinen (1200 mg) umgerechnet.

3.5.3 Ergebnisse aus den Methylierungsanalysen

An je einem Aliquot des Gesamtpools an freigesetzten N-Glykanen sowie der durch die Immunaффinitätssäule nicht gebundenen und gebundenen Fraktion waren Methylierungsanalysen unter Verwendung von Methyljodid (CH₃I) oder Trideuteromethyljodid (C²H₃I) durchgeführt worden. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Verknüfungspositionen der als partiell methylierte Alditolacetate detektierten Monosaccharide, die nach Reduktion mit Natriumborhydrid oder Natriumbordeuterid und Peracetylierung erhalten wurden. Sie waren mittels Kapillar-GC/MS durch chemische Ionisation sowie EI-Ionisation analysiert worden (Abb. 20 B als Beispiel).

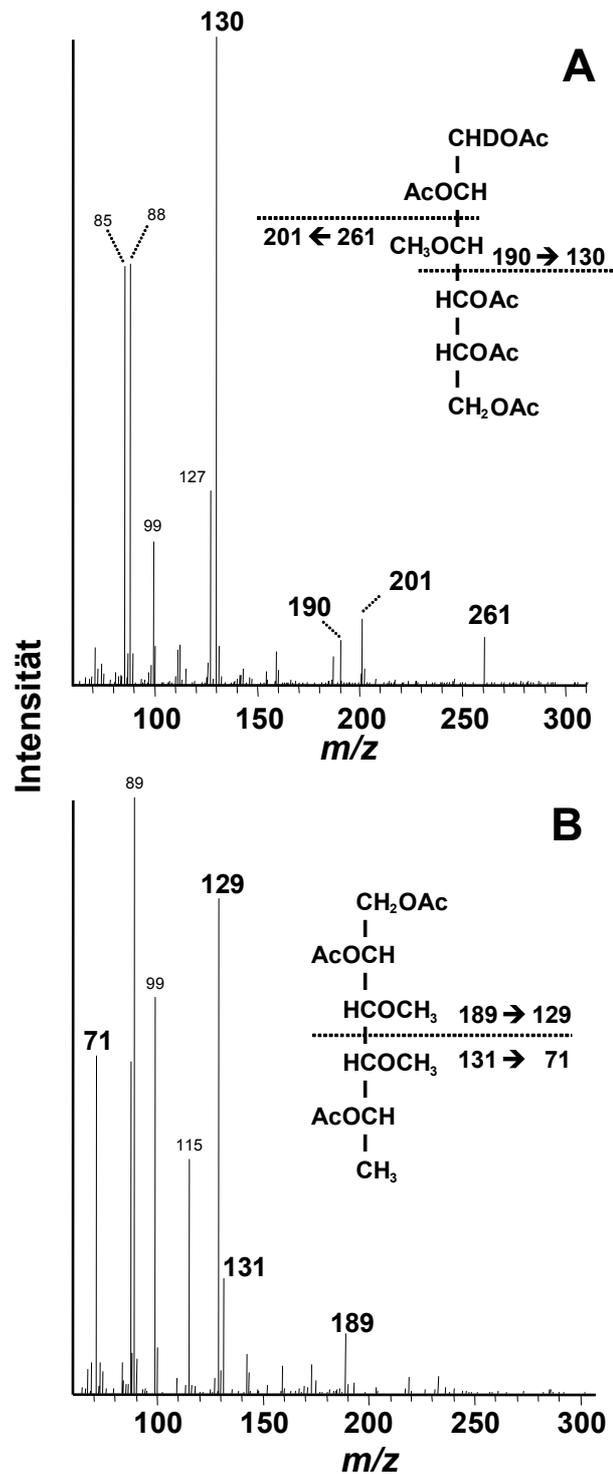


Abb. 20: Electron-Impact (EI) Massenspektren partiell methylierter Alditolacetate. (A) Spektrum von 1,2,4,5,6-Penta-*O*-acetyl-3-*O*-methyl-mannitol, das nach saurer Hydrolyse nativer N-Glykane, Reduktion mit Natriumbordeuterid und Peracetylierung erhalten wurde. (B) Spektrum von 1,2,5-Tri-*O*-Acetyl-3,4-di-*O*-methyl-fucitol, das nach Permethylierung der N-Glykane des Gesamtpools, saurer Hydrolyse, Reduktion mit Natriumborhydrid und anschließender Peracetylierung erhalten wurde. Die Alditole wurden mittels GC/MS im EI-Modus analysiert. Charakteristische Fragmentationen sind eingezeichnet.

Tabelle 9: Übersicht über die detektierten Monosaccharide und deren Verknüfungspositionen im Glykanverbund.¹

| Verknüpfung | N-Glykan-Gesamtpool | N-Glykane Immun-durchlauf | N-Glykane Immun-eluat |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|
| Xyl(1- | + | (+) | + |
| Fuc(1- | + | (+) | + |
| -2)Fuc(1- | + | (+) | + |
| Man(1- | ++ | ++ | ++ |
| 3- <i>O</i> -MeMan(1- ² | + | + | + |
| -2)Man(1- | ++ | ++ | ++ |
| -2)3- <i>O</i> -MeMan(1- ² | + | + | (+) |
| -6)Man(1- | (+) | n. d. | n. d. |
| -6)3- <i>O</i> -MeMan(1- ² | (+) | (+) | (+) |
| -2,4)Man(1- | + | n. d. | (+) |
| -2,6)Man(1- | (+) | n. d. | (+) |
| -3,6)Man(1- | ++ | ++ | ++ |
| -2,3,6)Man(1- ³ | ++ | + | ++ |
| Gal(1- | + | + | ++ |
| 3- <i>O</i> -MeGal(1- ² | + | + | + |
| -3,6)Gal(1- | (+) | n. d. | (+) |
| GalNAc(1- | n. d. | n. d. | (+) |
| -3)GalNAc(1- | + | (+) | + |
| GlcNAc(1- | (+) | n. d. | (+) |
| -3)GlcNAc(1- | (+) | n. d. | n. d. |
| -4)GlcNAc(1- | ++ | ++ | ++ |
| -3,4)GlcNAc(1- | + | + | + |

¹ Aliquots der Gesamtfraction an PA-markierten N-Glykanen sowie der Fraktionen nach Immunaффinitätsanreicherung mit immobilisierten anti-SEA Antikörpern wurden permethyliert und hydrolysiert. Partiiell methylierte Alditolacetate wurden nach Reduktion und Peracetylierung erhalten und mittels Kapillar-GC/MS analysiert. Relative Mengen wurden wie folgt angegeben: ++ Hauptkomponente, + Nebenkomponekte, (+) Spur, n. d. nicht detektiert

² Der Nachweis von 3-*O*-methylierten Hexosen wurde durch Cochromatographie entsprechender permethylierter Alditolacetate unter Verwendung von Natriumbor-deuterid bei der Reduktion durchgeführt. Die Verknüfungspositionen wurden unter Verwendung von Trideuteromethyliodid ermittelt.

³ Das Substitutionsmuster wurde nach Permethylierung und Natriumbor-deuterid-Reduktion verifiziert.

Unter den Hauptkomponenten der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs) wurden in allen drei Fraktionen terminale Mannose, 2-substituierte Mannose, 3,6-disubstituierte Mannose, 2,3,6-trisubstituierte Mannose sowie auch 4-substituiertes GlcNAc identifiziert. Eine Nebenkomponekte, die in allen drei Fraktionen gefunden wurden, ist terminale 3-*O*-MeMan (Abb. 20 A). Xylose, Fucose, 2-substituierte Fucose (Abb. 20 B) sowie 3-substituiertes GalNAc wurden im Gesamtpool sowie im Immuneluat detektiert. Terminale Galaktose wurde angereichert im Immuneluat nachgewiesen. Zahlreiche

weitere PMAAs wurden entweder nur als Nebenkomponente oder nur in Spuren detektiert.

3.5.4 Massenspektrometrische Untersuchung der Immunaффinitätsfraktionen

Die massenspektrometrische Analyse des Immuneluates und des Immundurchlaufes sollten einen ersten Überblick darüber geben, ob eine Anreicherung der kreuzreagierenden N-Glykane erfolgt war. Dazu war je ein Aliquot der beiden Fraktionen der MALDI-TOF-MS Analyse unterzogen worden. Um einen vergleichenden Überblick zu geben und auch den Erfolg der Immunaффinitätsanreicherung zu dokumentieren, sind die Spektren des N-Glykan-Gesamtpools, des Immundurchlaufes und des Immuneluates in Abb. 17 A bis C zusammengefasst.

3.5.4.1 MS-Analyse des Immundurchlaufes (anti-SEA ungebundene Fraktion)

Zunächst sollte geklärt werden, welche N-Glykane nicht an die immobilisierten anti-SEA Antikörper gebunden hatten und welche Hauptkomponenten sich im Durchlauf befanden. Die Fraktion der ungebundenen N-Glykane zeigte im Massenspektrum ein vergleichbares Aussehen, wie das bereits besprochene Spektrum des Gesamtpools an N-Glykanen (Abb. 17 B). Besonders im niedrigeren Massenbereich bis m/z 1800 wurden zahlreiche Signale dominanter Spezies registriert, die sich zu höheren m/z Werten hin stetig abschwächten. Sinnvolle Monosaccharidzusammensetzungen der Hauptpeaks, gemessen als $[M+Na]^+$ Addukte, ergaben für m/z 1039,7 MeH₂HN₂-PA, für m/z 1171,7 MeH₂HN₂X-PA, für m/z 1317,5 MeH₂HN₂XF-PA, für m/z 1377,5 MeH₃H₂N₂-PA, für m/z 1526,0 MeH₂H₄N₂-PA und MeH₃H₃N₂-PA für m/z 1540,0. Sie unterschieden sich damit nicht von den anscheinend identischen Spezies, die auch im Gesamtpool detektiert wurden. Einige der N-Glykane des Immundurchlaufes, welche nicht an anti-SEA Antikörper gebunden hatten, fielen durch ihren Gehalt einer Xylose und auch Fucose auf. Dabei handelte es sich um Spezies, die mindestens zwei Methylhexosen enthielten (im Falle der Xylose) bzw. deren Fucose-Rest am innersten GlcNAc gebunden war, was mittels MS/MS-Analyse im LID-Modus ermittelt wurde (Daten nicht gezeigt). Die im Massenbereich von $m/z > 2000$ detektierten Spezies handelte es sich offensichtlich um Komponenten, die bei der

Immunaффinitätschromatographie nicht quantitativ erfasst wurden, aber im Immuneeluat angereichert detektiert wurden (Abb. 17 C).

3.5.4.2 MS-Analyse des Immuneeluates (anti-SEA gebundene Fraktion)

Für die Fragestellung dieser Studie (1.12) stellte die Fraktion der durch die anti-SEA Antikörper gebundenen N-Glykane von *B. glabrata* den Ausgangspool für alle weiteren Untersuchungen dar und soll daher in diesem Abschnitt detaillierter besprochen werden. Das Eluat der Immunaффinitätschromatographie war nach Entsalzung mittels MALDI-TOF-MS analysiert worden, um einen ersten Überblick über die angereicherten N-Glykane zu erhalten (Abb. 17 C). Der Bereich von m/z 1500 bis 2500 wurde auf Grund der hohen Heterogenität nochmals gespreizt dargestellt (Abb. 21). Zu annotierten Peaks waren sinnvolle Monosaccharidzusammensetzungen mit dem Programm „Glyco-Peakfinder“ zugeordnet worden. Als Grundlage für die Monosaccharidzusammensetzungen wurden dazu die bereits ermittelten Daten verwendet. Es wurden nur die Bausteine in die Berechnung mit einbezogen, die in der GC/MS Analyse bereits detektiert wurden (Abb. 19 C). Da von schistosomalen Glykanstrukturen bereits bekannt ist, dass (β 1-2)-gebundene Kernxylose vorliegt und die Glykolipide aus Eiern das Fuc(α 1-3)GalNAc-Epitop (M2D3H) tragen, wurde in den Berechnungen die Xylose auf Grund der geringen Menge in der Monosaccharidbestimmung auf maximal eins gesetzt, Fucose hingegen auf maximal drei. Ferner wurden durch die Annahme der Pentasaccharid-Kernstruktur mindestens zwei HexNAc-Reste und drei Hexosen gesetzt. Methylhexosen schienen nach der Bausteinanalyse nur in geringem Maße vorzuliegen und wurden auf eins gesetzt. Varianten davon wurden aber auch in Betracht gezogen. Das Massenspektrum aller anti-SEA-serologisch kreuzreagierenden N-Glykane zeigte innerhalb des Massenbereiches von m/z 950 bis über 3000 eine große Menge an Signalen. Dabei fiel besonders eine Vielzahl an Signalen im Massenbereich von m/z 1700 bis 2300 auf, welche für die Bildung der Peakcluster verantwortlich ist. Um eine bessere Übersicht über die einzelnen Spezies im mittleren Massenbereich zu erlangen, wurde das Massenspektrum nochmals in einzelne Massenbereiche aufgespreizt (Abb. 21). Die detektierten Massen waren nachfolgend auf potentielle Monosaccharidzusammensetzungen untersucht worden, von denen sinnvolle Zusammensetzungen an die Peaks notiert wurden.

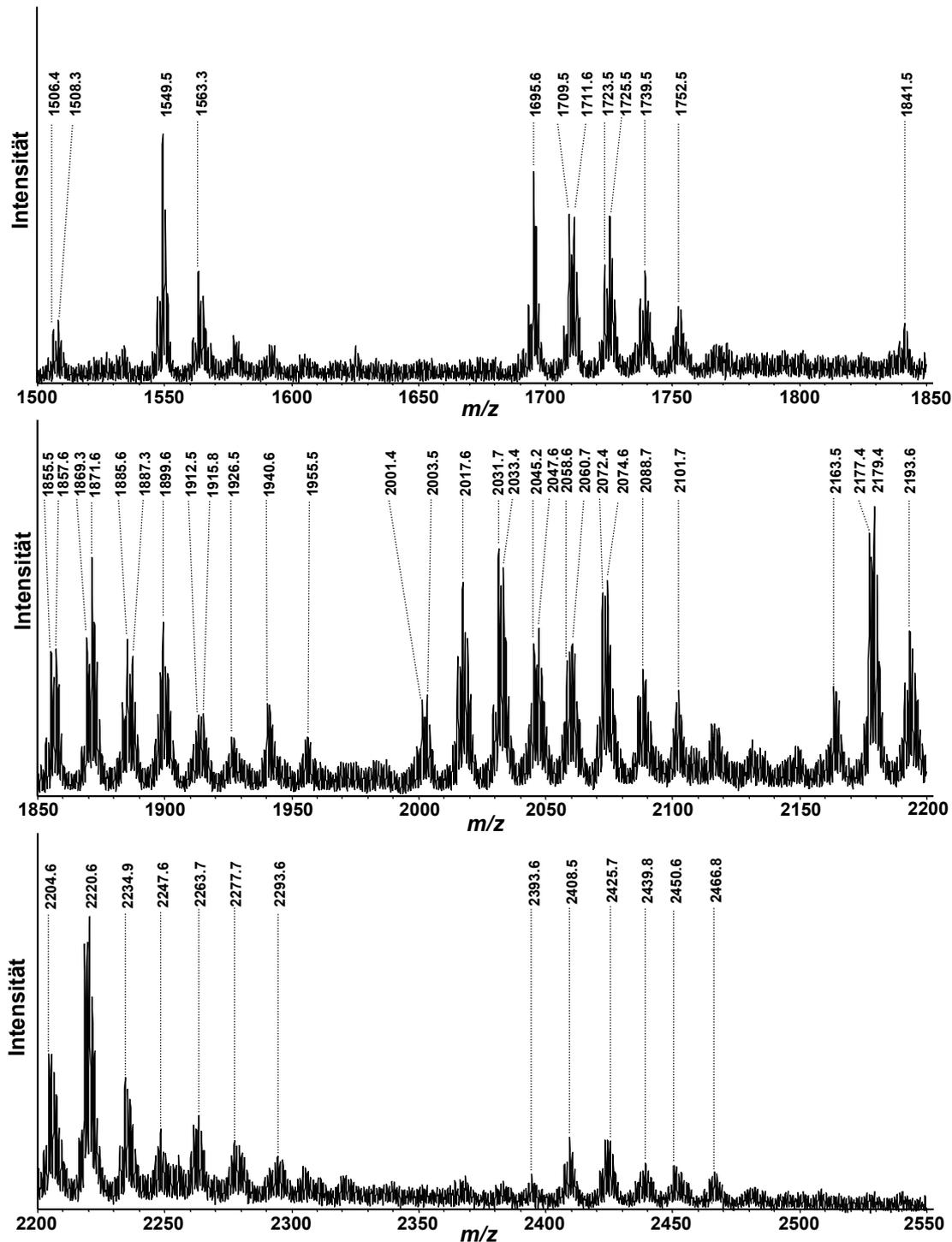


Abb. 21: Ausschnitt aus dem MALDI-TOF-MS der gesamten N-Glykane, die durch Immunanreicherung erhalten wurden. Der Massenbereich von m/z 1600 bis 2660 wurde besonders gespreizt, um die Heterogenität der Fraktion zu demonstrieren. Bei den annotierten Glykanmassen handelt es sich um Na^+ -Addukte. Zur Monosaccharidzusammensetzung der einzelnen Spezies siehe die ausklappbare Tabelle 12 im Anhang.

Das Massenspektrum erlaubte bereits eine Einteilung der kreuzreagierenden N-Glykanspezies in vier Gruppen:

- 1) Kleinere, xylosylierte Glykane der allgemeinen Monosaccharidzusammensetzung $\text{MeH}_{0-2}\text{H}_{1-3}\text{N}_2\text{XF}_{0-1}\text{-PA}$.
- 2) Xylosylierte verlängerte, in Teilen monofucosylierte Glykane mit mehr als zwei HexNAc-Resten ($\text{MeH}_{0-2}\text{H}_{2-5}\text{N}_{3-7}\text{XF}_{0-1}\text{-PA}$).
- 3) Xylosylierte, verlängerte Strukturen mit mehr als zwei HexNAc-Resten und mehr als einem Fucose-Rest ($\text{MeH}_{0-2}\text{H}_{2-5}\text{N}_{4-7}\text{XF}_{2-3}\text{-PA}$).
- 4) Glykane, die keine Xylose enthalten, wie $\text{MeH}_{0-2}\text{H}_1\text{N}_{4-7}\text{F}_{2-3}\text{-PA}$.

Als kleinste kreuzreagierende Glykane wurden daher Spezies mit einer Monosaccharidzusammensetzung von $\text{MeH}_{0-1}\text{H}_{1-2}\text{N}_2\text{X-PA}$ betrachtet. Von diesen Vertretern gab es auch Spezies mit Kernfucosylierung, die mit m/z 1127,4 und 1141,3 (Na^+ -Addukte) gemessen wurden. Zum großen Teil werden diese Glykane durch Hexose- oder Methylhexose-Reste verlängert, woraus Spezies der Zusammensetzung $\text{MeHH}_2\text{N}_2\text{X-PA}$ (m/z 1157,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$), $\text{H}_3\text{N}_2\text{XF-PA}$ (m/z 1289,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) und $\text{MeHH}_2\text{N}_2\text{XF-PA}$ (m/z 1303,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) resultieren. Durch Addition zweier HexNAc-Reste können diese Glykane verlängert werden, was durch die Spezies bei m/z 1563,3, 1695,6 und 1709,5 (Na^+ -Addukte) nachgewiesen wurde. Dies stellen Vertreter der Gruppe von xylosylierten, verlängerten und in Teilen monofucosylierten Glykane dar, die mehr als zwei HexNAc-Reste tragen. Das Glykan mit m/z 1695,6 kann durch Addition eines Fucose-Restes aus $\text{H}_3\text{N}_4\text{X-PA}$ entstehen, aber durch Verknüpfung eines HexNAc-Restes an $\text{H}_3\text{N}_3\text{XF-PA}$. Die Lokalisation des Fucose-Restes sollte daher im Hinblick auf die Kreuzreaktivität genauer untersucht werden. Im mittleren Massenbereich des Spektrums wurden mit m/z 1855,5 und 1885,6 (Na^+ -Addukte) erstmals Glykane detektiert, die nach Berechnungen zur Monosaccharidzusammensetzung der Gruppe von xylosefreier N-Glykane mit Zusammensetzungen von $\text{H}_3\text{N}_4\text{F}_3\text{-PA}$ und $\text{MeHH}_3\text{N}_4\text{F}_2\text{-PA}$ zugeordnet werden konnten. Die im Massenbereich über $m/z > 2000$ detektierten kreuzreagierenden N-Glykane stellen komplexere Strukturen dar, die als Hauptkomponenten vorliegen. Sie gehören zur Gruppe der xylosylierten, verlängerten Glykane, die mehr als zwei HexNAc-Reste und mehr als eine Fucose tragen. Die Spezies mit m/z 2179,4 ($\text{MeHH}_4\text{N}_4\text{XF}_2\text{-PA}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$) und m/z 2220,6 ($\text{MeHH}_3\text{N}_5\text{XF}_2\text{-PA}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$) können als typische Vertreter dieser Gruppe betrachtet werden. Die vierte Gruppe stellt die Glykane dar, die keine Xylose enthalten. Prominenten Vertreter dieser Gruppe sind die Spezies mit m/z 1855,5 ($\text{H}_3\text{N}_4\text{F}_3\text{-PA}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 1899,6 ($\text{MeH}_2\text{H}_2\text{N}_4\text{F}_2\text{-PA}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$) und 2017,6 ($\text{H}_4\text{N}_4\text{F}_3\text{-PA}$), die zumindest eine

Monosaccharidzusammensetzung ohne Xylose aufweisen. Die massenspektrometrische Analyse der Gesamtfraktion an kreuzreagierenden Glykanen zeigte, dass die Präsenz der kerngebundenen Xylose für die Kreuzreaktivität mit den anti-SEA Antikörpern ausreicht. Die komplexeren Glykane, die keine Xylose enthalten, besitzen hingegen mindestens zwei Fucosen und mindestens vier HexNAc-Reste. Die Abundanz der Glykane nahm im Massenspektrum über m/z 2300 stark ab, weshalb den Glykanen zwar eine Monosaccharidzusammensetzung zugeordnet werden konnte, sie aber für eine detaillierte strukturelle Charakterisierung nicht zugänglich waren. Sie leiten sich durch die Addition weiterer Monosaccharidreste (Fucose, Hexose, HexNAc) aus den Vertretern der einzelnen Gruppen ab. Aufgrund dessen, dass sich die kreuzreagierenden Glykanspezies in ihrem Gehalt an Fucosen unterschieden, wurde mit dem Gesamtpool an immunaffinitätsangereicherten Glykanen eine Lektinaffinitätsanreicherung unter Verwendung des immobilisierten, fucosespezifischen Lektins von *Aleuria aurantia* durchgeführt (2.6.4.2).

3.6 Affinitätschromatographie mit dem fucosespezifischen immobilisierten *Aleuria aurantia* Lektin (AAL)

Um den Pool der durch Immunaffinitätschromatographie angereicherten N-Glykanen in unfucosylierte und fucosylierte N-Glykane weiter aufzutrennen, war eine Affinitätschromatographie mit immobilisiertem *Aleuria aurantia* Lektin durchgeführt worden. Die daraus resultierenden Unterfraktionen wurden zunächst massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF-MS untersucht. In der MS-Analyse der AAL-Fraktionen sollte besonders auf Glykanspezies geachtet werden, die vorher nicht oder nur in geringem Maße detektiert worden waren.

3.6.1 MS-Analyse der AAL-ungebundenen kreuzreagierenden N-Glykane

Der Pool der AAL-ungebundenen kreuzreagierenden N-Glykane erwies sich in der MS-Analyse als heterogenes Gemisch (Abb. 22). Die Hauptkomponenten hatten eine Zusammensetzung von $\text{MeH}_{0-1}\text{H}_{1-4}\text{N}_{2-6}\text{X-PA}$, die durchweg einen Xyloserest trugen. Darüber hinaus wurden einige Spezies eluiert, die nicht xylosyliert, aber bis zu zwei Fucose-Reste aufwiesen. Es handelte sich dabei um Spezies der Zusammensetzung

MeH₀₋₁H₃₋₄N₄₋₆X₀₋₁F₁₋₂-PA, die anscheinend nur eine leichte Bindung zum Lektin aufwiesen. Im Vergleich zum Spektrum der gesamten kreuzreagierenden Glykane (Abb. 17 C) wurden einige Spezies im MS der AAL-ungebundenen Fraktion erstmalig beziehungsweise deutlicher detektiert. So wurde das Vorliegen der Spezies *m/z* 1143,4 klar gezeigt, auf die eine Zusammensetzung von H₃N₂X-PA passte. Zwei weitere Glykane, die sich aus diesem durch die Addition von Hexose-Resten herleiten, wurden mit *m/z* 1711,6 (H₄N₄X-PA) und *m/z* 1955,5 (H₃N₆X-PA) detektiert. Unter den Hauptkomponenten wurde mit der Spezies MeHH₄N₄XF-PA bei *m/z* 2034,3 ein weiteres Glykan detektiert, das eine Methylhexose trägt und durch schwache Bindung an das Lektin ausgewaschen wurde. Auf einige der im höheren Massenbereich erstmalig detektierten Glykane (*m/z* 2263,7 / 2277,7 / 2425,7 / 2585,8) passten durchweg Zusammensetzungen mit Fucose (MeH₀₋₁H₄₋₅N₆XF₁₋₂-PA), was ebenso für die bereits detektierte Spezies bei *m/z* 1695,6 (H₃N₄XF-PA) zutrifft.

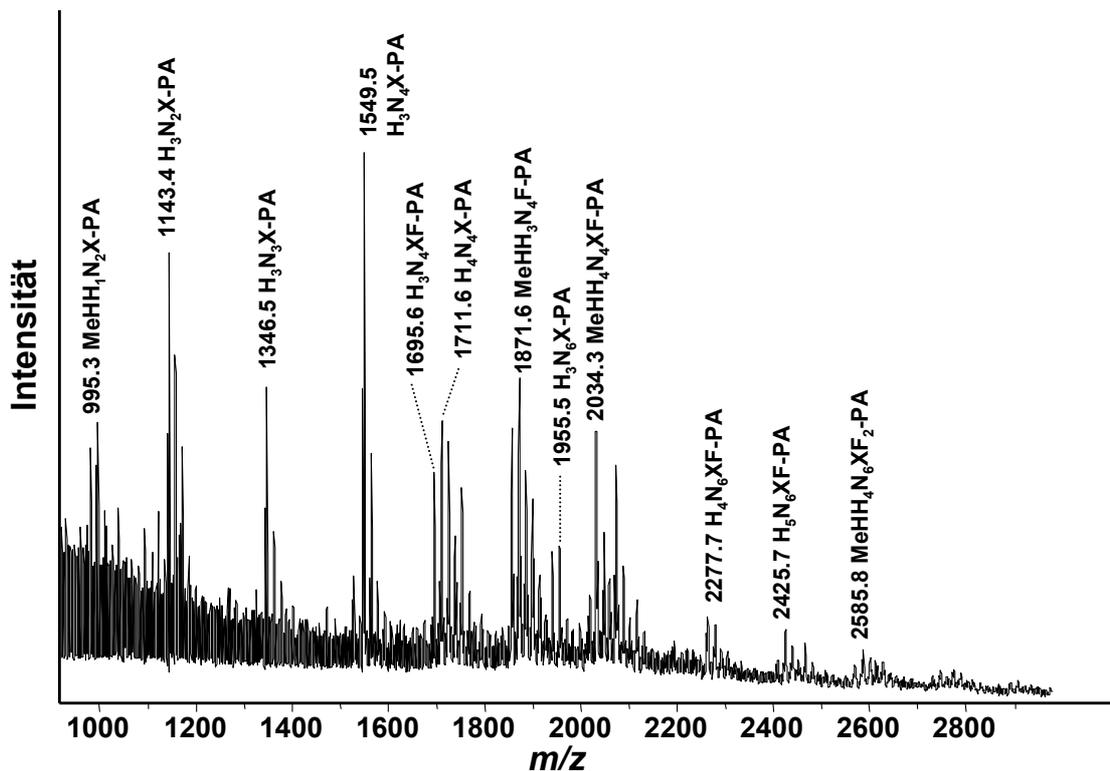


Abb. 22: MALDI-TOF-MS der AAL-ungebundenen Fraktion. Die Massen wurden als Na⁺-Addukte detektiert. Zur Kurzschreibweise der Monosaccharidbausteine siehe Bildunterschrift Abb. 17.

3.6.2 MS-Analyse der AAL-gebundenen kreuzreagierenden N-Glykane

Die Fraktion der durch das Lektin gebundenen kreuzreagierenden N-Glykane erwies sich im direkten Vergleich mit der AAL-ungebundenen Fraktion in der MS-Analyse als noch heterogeneres Gemisch (Abb. 23). Besonders im Bereich von m/z 1800 bis 2400 wurden viele Signale detektiert, die auch schon im Massenspektrum des Immuneluates (Abb. 17 C) zu sehen waren. Die Monosaccharidzusammensetzungen der einzelnen annotierten Hauptkomponenten bestätigte zum einen, dass in allen Spezies zumindest eine Fucose vorkommt, aber auch, dass hingegen das Vorliegen einer Xylose nicht immer der Fall sein muss (m/z 1855,5 $H_3N_4F_3$ -PA). Eine allgemeine Monosaccharidzusammensetzung von $MeH_{0-1}H_{2-5}N_{2-7}X_{0-1}F_{0-3}$ -PA beschreibt die Zusammensetzung dieser Glykanspezies, die nach ersten Untersuchungen maximal eine Methylhexose tragen und bis zu sieben HexNAc-Reste aufweisen können. Im Vergleich zu den Hauptkomponenten der Immuneluat-Gesamtfraktion erlaubte die Fraktionierung durch die Lektinsäule eine klarere Detektion von AAL-gebundenen N-Glykanen. So wurde im Massenbereich um m/z 1800 eine Spezies mit der Komposition $MeHH_2N_4F_2$ -PA (m/z 1723,5) präziser detektiert. Die daraus um einen HexNAc-Rest verlängerte Spezies, die im Gesamtspektrum des Immuneluates nur schwach detektiert worden war, wurde bei m/z 1926,5 eindeutig nachgewiesen. Mit den Massen von m/z 2017,6 ($MeHH_3N_4XF_2$ -PA oder $H_4N_4F_3$ -PA) und m/z 2058,6 ($MeHH_2N_5XF_2$ -PA) wurden Spezies detektiert, die aus $MeHH_2N_2XF$ -PA (m/z 1303,4) biosynthetisch hervorgehen könnten. Unter den prominenten N-Glykanen des Immuneluates fanden sich im AAL-gebundenen Glykanpool auch die Spezies $MeH_2H_2N_4XF_3$ -PA (m/z 2177,4) und $MeHH_3N_5XF_2$ -PA (m/z 2220,6), die als Hauptkomponenten detektiert wurden. Im höheren Massenbereich von $m/z > 2300$ lagen nach Berechnungen auch kreuzreagierende Spezies mit mehr als zwei Fucosen vor. Ein repräsentatives Beispiel dafür ist das Glykan mit m/z 2759,5 ($H_4N_7XF_3$ -PA, $[M+Na]^+$).

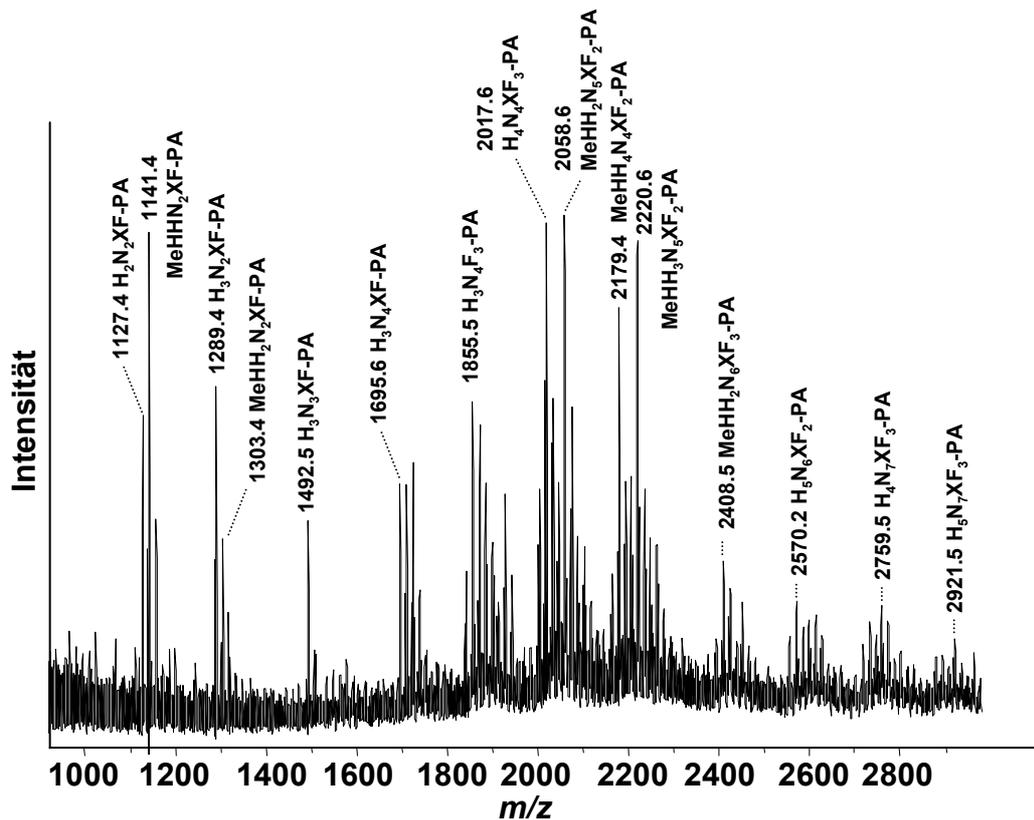


Abb. 23: MALDI-TOF-MS Analyse der AAL-gebundenen kreuzreagierenden N-Glykane. Das Spektrum zeigt besonders im mittleren Massenbereich zahlreiche Signale, welche die hohe Heterogenität der Fraktion verdeutlichen. Die Massen wurden als Na⁺-Addukte detektiert. Zur Kurzschreibweise der Monosaccharidbausteine siehe Bildunterschrift Abb. 17.

3.6.3 HPLC-Trennung der AAL-Fraktionen

Die beiden aus der Lektinaffinitätschromatographie gewonnenen Fraktionen wurden für weitere Analysen durch HPLC subfraktioniert. Um Material zu sparen, wurde auf eine weitere Monosaccharidbestimmung und Methylierungsanalyse verzichtet, zumal die in den Massenspektren nachgewiesene Heterogenität besonders in der Methylierung zu einem ebenso heterogenen Gemisch an Methylzuckerderivaten geführt hätte und vom Immuneluat (Ausgangsgemisch) bereits eine Methylierungsanalyse durchgeführt worden war. Die durch HPLC-Trennung gewonnenen Fraktionen (Abb. 24) wurden weiter analysiert. Durch die starke Heterogenität bedingt, stand dabei die strukturelle Charakterisierung auf Hauptkomponenten im Vordergrund. Nach massenspektrometrischer Überprüfung wurden Fraktionen identischen Gehalts gepoolt. Die so gewonnenen HPLC-Fraktionen wurden nachfolgend für alle weiteren Untersuchungen mittels MALDI-TOF-MS, MS/MS (LID und CID) sowie ESI-IT-MS eingesetzt.

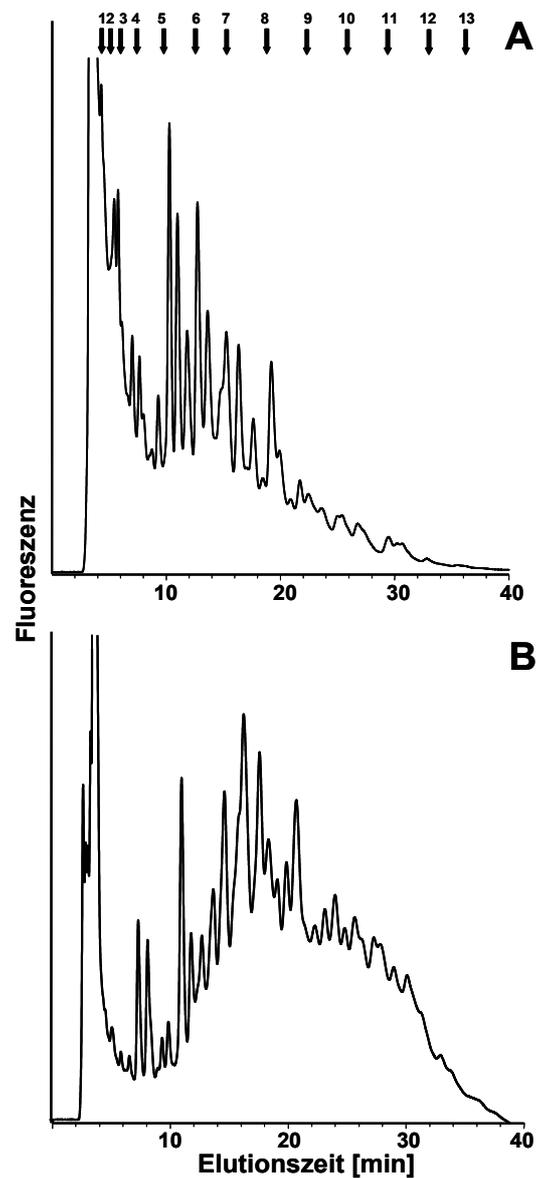


Abb. 24: Chromatogramme nach HPLC-Größenfraktionierung der ungebundenen (A) und gebundenen (B) AAL-Fraktion über eine TSK-Amid 80 Gelsäule. Die Pfeile (1-13) kennzeichnen die Elutionszeiten von PA-Isomaltosyloligosacchariden, die als Standard verwendet wurden. In (A) wurden Minutenfraktionen und in (B) Halbminutenfraktionen gesammelt.

Die Chromatogramme, die nach der HPLC-Größenfraktionierung über die TSK-Amid-80 Gel Säule erhalten wurden, wiesen für die ungebundene sowie gebundene Fraktion zahlreiche Peaks auf (Abb. 24 A und B) und unterschieden sich deutlich voneinander. Die Glykane der ungebundenen Fraktion eluierten nach Aufzeichnung in der Elutionszeit 10 bis 20 Minuten, die der gebundenen Fraktion nach 6 bis 30 Minuten. Der Verlauf der beiden Chromatogramme bestätigte die starke Heterogenität, da es nicht zur Basislinientrennung kam. Diese Fraktionen wurden im weiteren Verlauf dazu verwendet, die einzelnen kreuzreagierenden N-Glykane strukturell zu charakterisieren.

3.7 Massenspektrometrische Analyse kreuzreagierender N-Glykane

3.7.1 MALDI-TOF-MS der AAL-ungebundenen N-Glykane

Von den einzelnen Fraktionen, die nach der Größenfraktionierung der AAL-ungebundenen Glykane erhalten wurden, waren zunächst Massenspektren angefertigt worden. Dies sollte einen Überblick über die einzelnen Spezies und deren Verteilung erbringen. Alle Fraktionen bis einschliesslich Elutionsminute 9 enthielten keine Glykane und wurden verworfen. Die Abbildungen 25 bis 28 zeigen die teilweise heterogenen Fraktionen nach Größentrennung der AAL-ungebundenen N-Glykane. In den Fraktionen 10 bis 15 wurden hauptsächlich kleinere N-Glykane detektiert (Abb. 25). Ab Fraktion 16 bis einschliesslich 21 eluierten bereits verlängerte N-Glykane (Abb. 26). Besonders auffällig war dabei, dass die Heterogenität der Fraktionen trotz HPLC Trennung und den beiden Affinitätschromatographien nach wie vor stark ausgeprägt war und über den ganzen Lauf hinweg anhielt. Ab Fraktion 22 (Abb. 27) eluierten hauptsächlich größere Spezies mit einer Masse von $m/z > 2000$. In den Fraktionen 10 bis 21 wurden die bereits angesprochenen Hauptkomponenten identifiziert. Abtrennung dieser Hauptkomponenten in den nachfolgenden Fraktionen führte dazu, dass Spezies mit geringerer Abundanz überhaupt erst detektierbar waren. In Fraktion 22 und 23 wurde mit $m/z 2019,6$ ein Glykan nachgewiesen, das bis dahin noch in keiner anderen Fraktion gefunden worden war. In den Fraktionen 22 bis 28 eluierten hauptsächlich weitere größere N-Glykane, die sich durch zusätzliche Verknüpfung von Monosaccharidresten mit den bisherigen Grundstrukturen herleiteten. Als Beispiel dazu kann in Fraktion 25 die Spezies mit $m/z 2277,7$ genannt werden, die sich um 14 Masseneinheiten von der Komponente $m/z 2263,7$ aus Fraktion 22 und 23 unterscheidet. Dies kann zum einen durch den Tausch einer Hexose gegen eine Methylhexose erreicht werden oder aber durch die Präsenz einer Fucose anstelle der Xylose, wobei erstere Möglichkeit für diese Fraktion als wahrscheinlicher angesehen wurde. In Fraktion 26 und 27 wurde als Hauptkomponente H_5N_6XF-PA nachgewiesen, wobei in 26 das Na^+ -Addukt ($m/z 2425,7$) und in 27 das H^+ -Addukt ($m/z 2403,6$) gemessen wurden. Diese Spezies entsteht durch weitere Übertragung eines Hexose-Restes (Massendifferenz 162) aus dem Glykan mit $m/z 2263,7$. Die Spezies mit $m/z 2425,7$ aus den Fraktionen 26 und 27 erfährt ebenfalls eine Verlängerung durch weitere Hexosen oder HexNAc-Reste, die als Spezies mit m/z -Werten von 2587,4 (H_5N_6XF-PA) und 2628,4 (H_5N_7XF-PA) in Fraktion 29 nachgewiesen wurden. In den Fraktionen nach 30 Minuten HPLC-Elutionszeit wurde nur noch in Fraktion 32 Glykane detektiert (Abb. 28). Nach der MS-

Übersichtsanalyse wurden einige der als Hauptkomponenten in den Fraktionen vorliegenden N-Glykane weiteren massenspektrometrischen Analysen unterzogen.

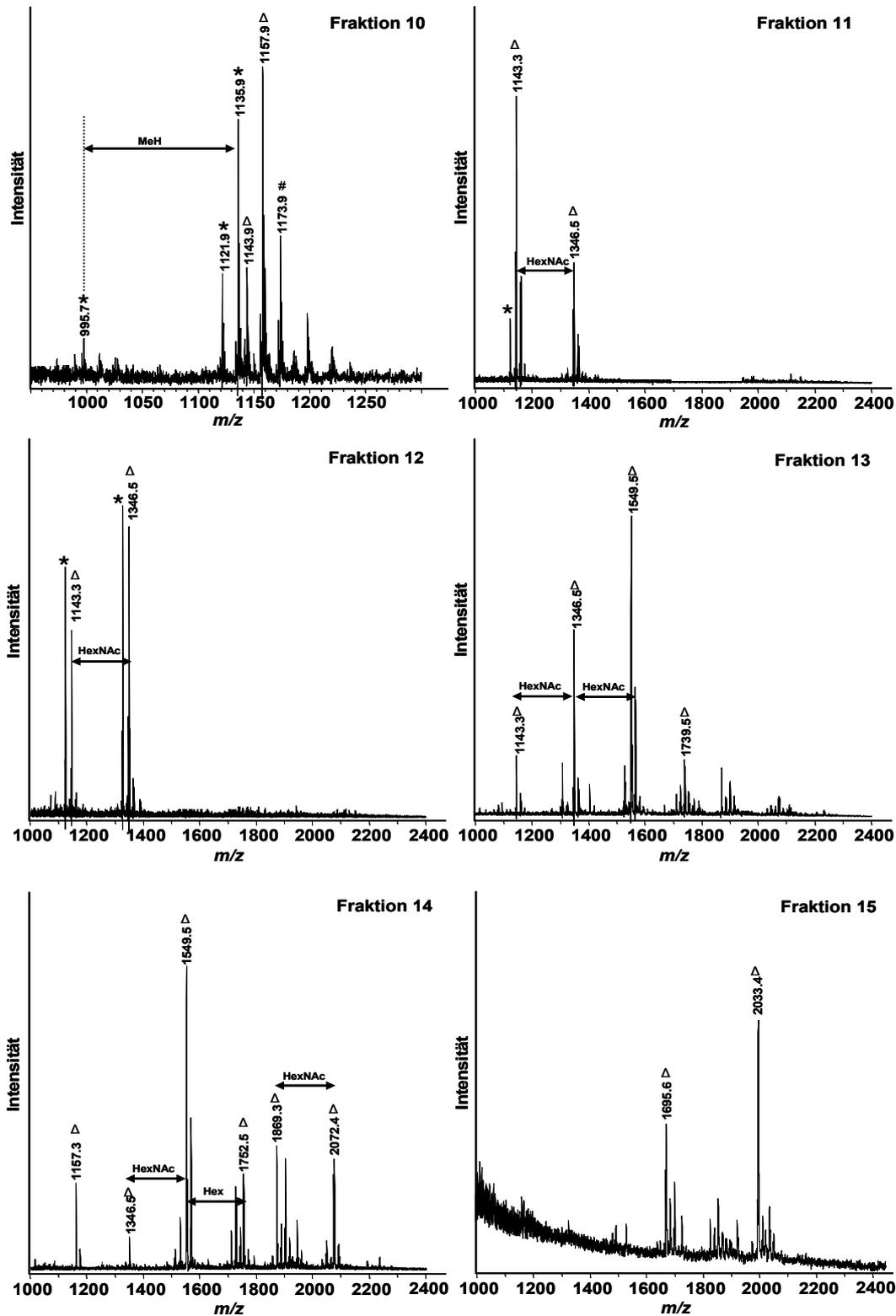


Abb. 25: MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktionen 10 bis 15 nach HPLC-Größenfraktionierung der AAL-ungebundenen N-Glykane. Δ = Na⁺-Addukte, \star = H⁺-Addukte. In ausgewählten Fällen wurden die Masseninkrementabstände, die für Monosaccharide zutreffend sind, mittels Doppelpfeil eingezeichnet.

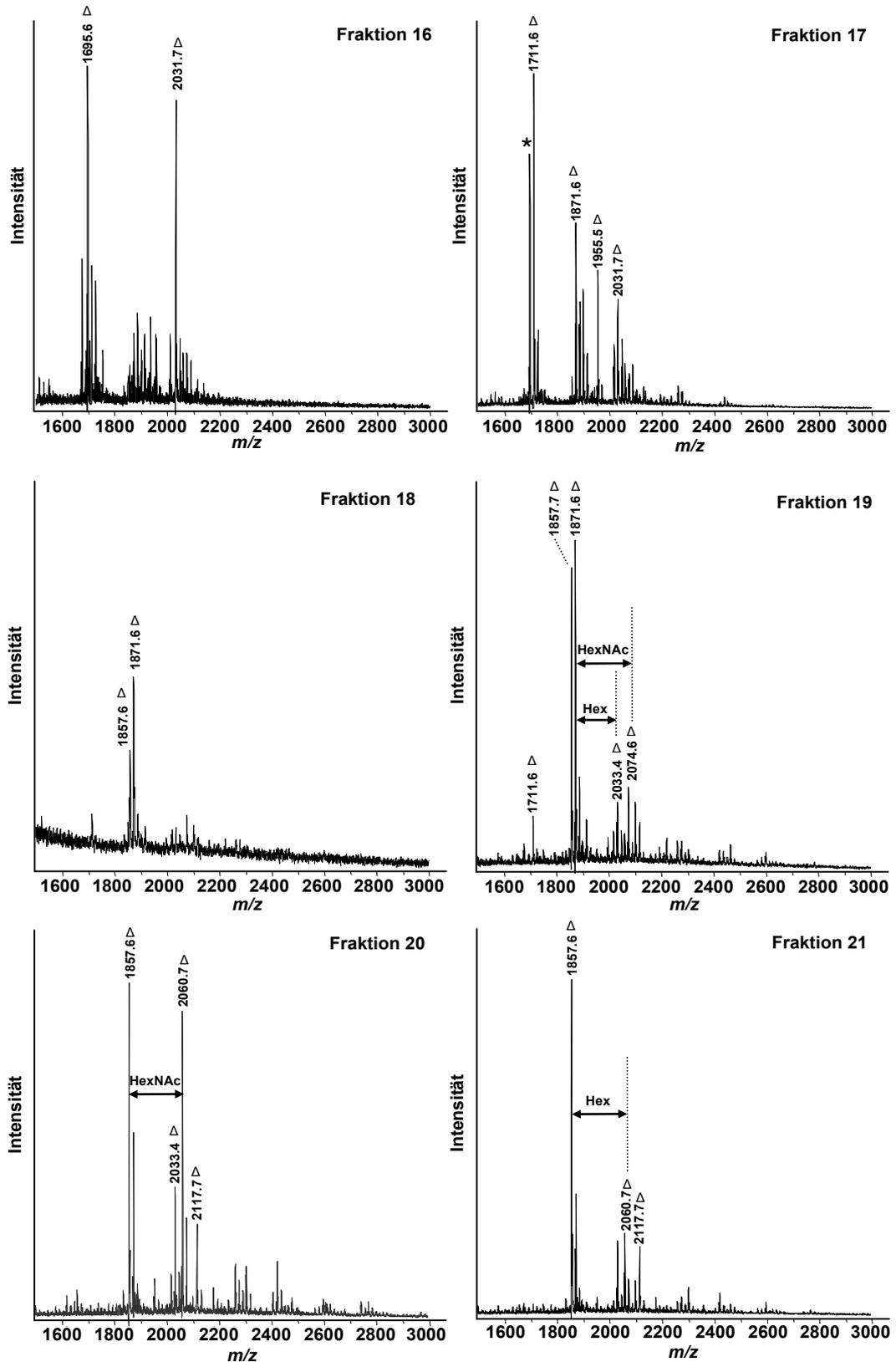


Abb. 26: MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktionen 16 bis 21 nach HPLC-Größenfraktionierung der AAL-ungebundenen N-Glykane. Δ = Na^+ -Addukte, \star = H^+ -Addukte. In ausgewählten Fällen wurden die Masseninkrementabstände, die für Monosaccharide zutreffend sind, mittels Doppelpfeil eingezeichnet.

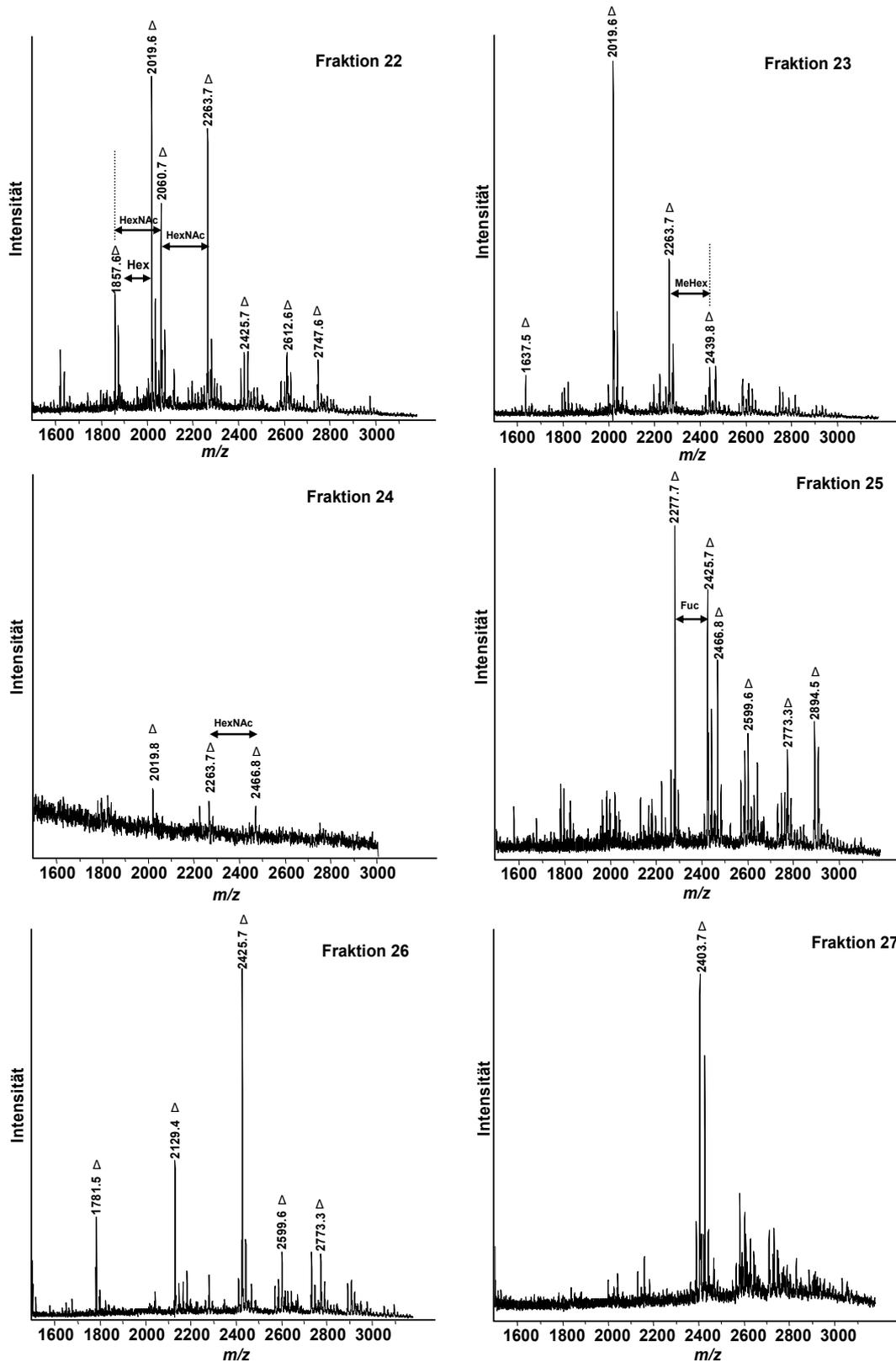


Abb. 27: MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktionen 22 bis 27 nach HPLC-Größenfraktionierung der AAL-ungebundenen N-Glykane. Δ = Na^+ -Addukte, \star = H^+ -Addukte. In ausgewählten Fällen wurden die Masseninkrementabstände, die für Monosaccharide zutreffend sind, mittels Doppelpfeil eingezeichnet.

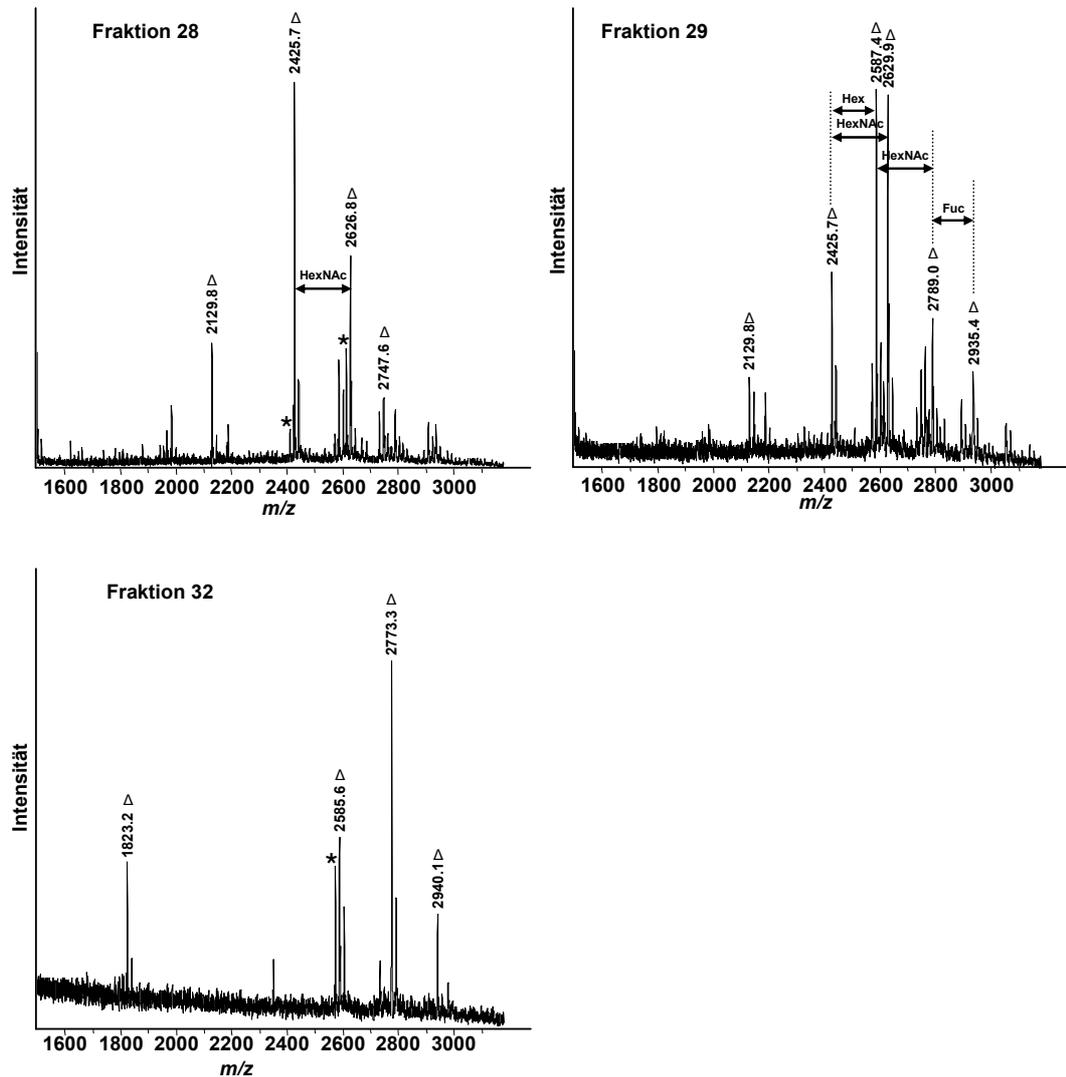


Abb. 28: MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktionen 28, 29 und 32 nach HPLC-Größenfraktionierung der AAL-ungebundenen N-Glykane. Δ = Na⁺-Addukte, \star = H⁺-Addukte. In ausgewählten Fällen wurden die Masseninkrementabstände, die für Monosaccharide zutreffend sind, mittels Doppelpfeil eingezeichnet. Nach Fraktion 32 waren keine Glykane mehr nachweisbar.

3.7.2 Strukturelle Charakterisierung von AAL-ungebundenen N-Glykanen

3.7.2.1 Kleine AAL-ungebundene N-Glykane

In Fraktion 10 der aufgetrennten AAL-ungebundenen N-Glykane wurde mit m/z 995,7 ($[M+Na]^+$) eine sehr kleine Spezies detektiert und mittels MS/MS untersucht. Die Fragmentierung des H^+ -Adduktes m/z 973,6 zeigte, dass vom Vorläuferion ein Methylhexosenrest sowie ein Xyloserest abgespalten wurden (Abb. 29). Das Signal bei m/z 299,9 (Y_1) bestätigt die Präsenz eines HexNAc-PA Fragmentes.

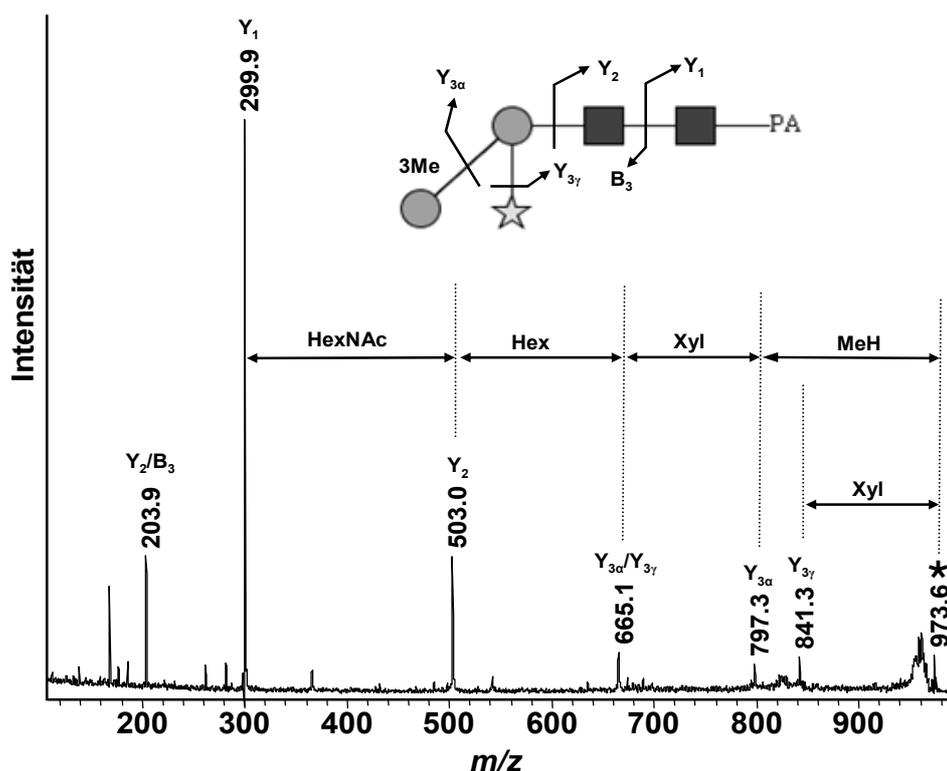


Abb. 29: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum des kleinen N-Glykans MeHhN₂X-PA, gemessen als H^+ -Addukt mit der pseudomolekularen Masse m/z 973,6. Charakteristische Fragmentationen wurden annotiert und Masseninkremente mit Doppelpfeilen eingezeichnet. Zur Erklärung der Symbole, siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

In Fraktion 11 wurde mit m/z 1135,9 MeHhN₂N₂X-PA eine Spezies gemessen, die sich um eine Hexose von dem vorangegangenen Glykan (MeHhN₂X-PA) unterscheidet. Im LIFT-Spektrum (Abb. 30) erhöht sich durch den Hexose-Rest die Menge an detektierten Signalen deutlich. Mit den Fragmenten bei m/z 133,2 ($B_{1\gamma}$), 163,2 ($B_{1\beta}$) und 177,2 ($B_{1\alpha}$) wurden terminal gebundene Xylose, Hexose und 3-*O*-Methylhexose detektiert, die durch Bruch als B-Fragmente gemessen wurden. Die korrespondierenden Y-Fragmente wurden ebenso detektiert.

(Abb. 31 B). Darüber hinaus deutete das $Y_{3\alpha}$ -Fragment (m/z 959,1) im gleichen Spektrum darauf hin, dass ein HexNAc-Hex-Disaccharid (Massendifferenz 365) abgespalten wurde; passend dazu wurde ebenfalls das korrespondierende $B_{2\alpha}$ -Fragment (m/z 365,7) detektiert. Die Spezies mit der Pseudomolekülmasse m/z 1527,1 $[M+H]^+$ erbrachte strukturbedingt einige neue Signale. Mit m/z 406,7 wurde ein Fragment gemessen, das zu einem HexNAc-HexNAc-Disaccharid passt, das in terminaler Stellung am nicht-reduzierenden Ende gebunden ist und damit als LDN-Strukturelement in Frage kommt.

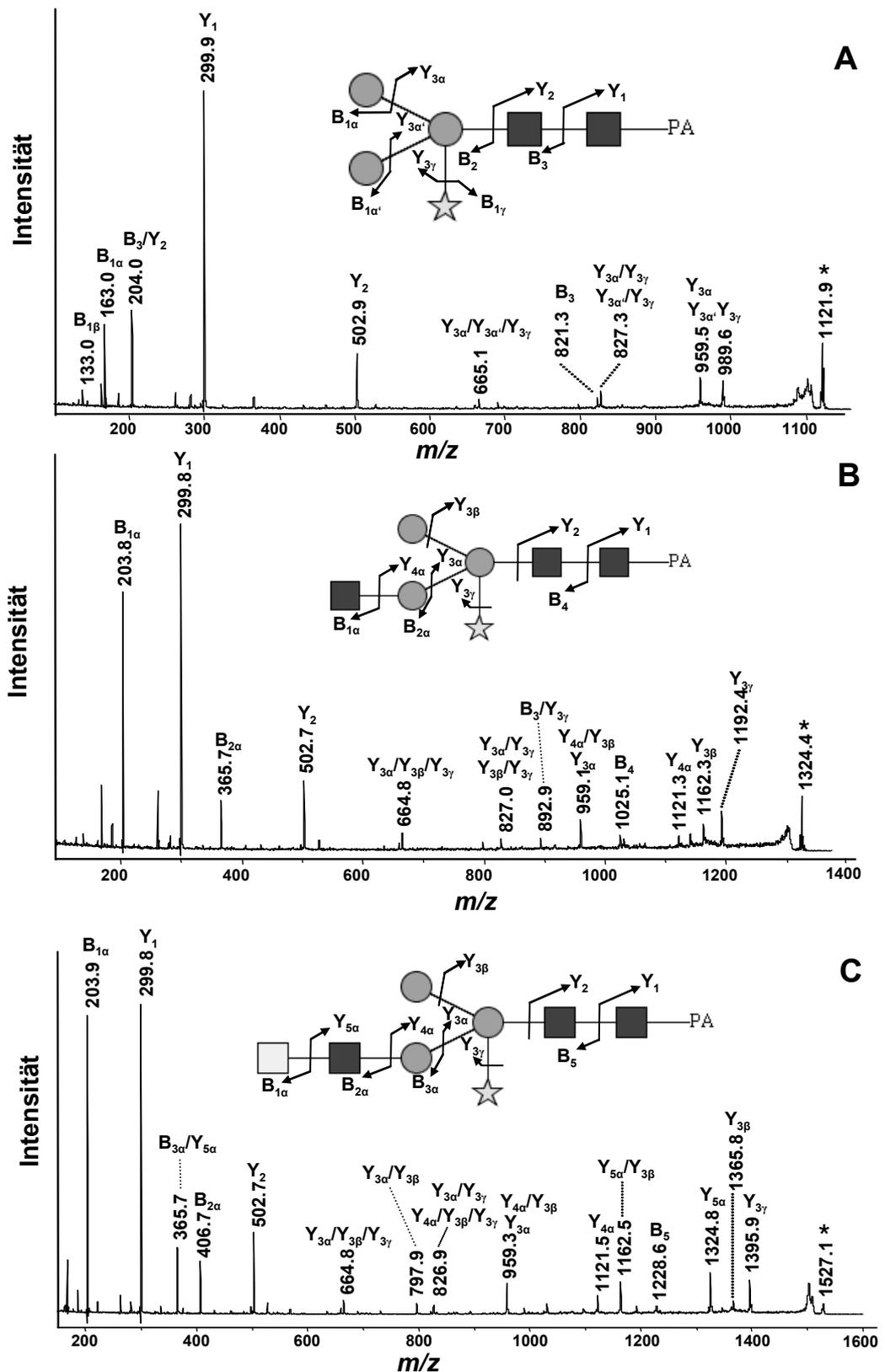


Abb. 31: MALDI-MS/MS (LID) Spektren der N-Glykane H_3N_2X -PA (A), H_3N_3X -PA (B) und H_3N_4X -PA (C), gemessen als H^+ -Addukte mit den pseudomolekularen Massen m/z 1121,9 / 1324,4 und 1527,1. Charakteristische Fragmentationen wurden annotiert. Das Auftreten der Fragmentationen identischer Massen deutet auf die strukturelle Ähnlichkeit der Glykane hin. Zur Erklärung der Symbole siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

Wie bereits beschrieben, wurde im Pool der AAL-ungebundenen Oligosaccharide ein Glykan mit m/z 1695,6 detektiert (Fraktionen 15 und 16, Abb. 25Abb. 26), dessen Monosaccharidzusammensetzung (H_3N_4XF -PA) eine Fucose aufweist. Im MS/MS-Spektrum dieser Spezies war ein dominantes Signal bei m/z 300,1 zu beobachten, das einen eindeutigen Hinweis auf ein N-PA Fragment (Y_1) lieferte, welches somit keine Fucose enthält. Der Fucose-Rest müsste somit außerhalb der Kernstruktur gebunden sein. Besonderes Interesse erweckten dabei die Fragmente $B_{2\alpha}$ (m/z 350,1) und $B_{3\alpha}$ (m/z 553,1), die im Spektrum durch die Abspaltung eines terminalen monofucosylierten HexNAc-Restes (NF) und eines terminalen monofucosylierten HexNAc₂-Restes (N₂F) generiert werden. Diese Fragmente belegen, dass der Fucose-Rest in terminaler Position lokalisiert ist, was das Vorliegen eines potentiellen Fuc(α 1-3)GalNAc(β 1-4)GlcNAc β 1-Elements (F-LDN) indiziert, das dem M2D3H-Epitop entsprechen würde. Die Detektion des $Y_{3\gamma}$ -Fragmentes (m/z 1542,0) belegte zudem die Abspaltung einer terminalen Xylose. Des Weiteren wurden mit den Signalen bei m/z 1528,0 (Y_6) und m/z 1512,0 ($Y_{3\beta}$) die Abspaltung einer terminalen Fucose und Hexose bestätigt.

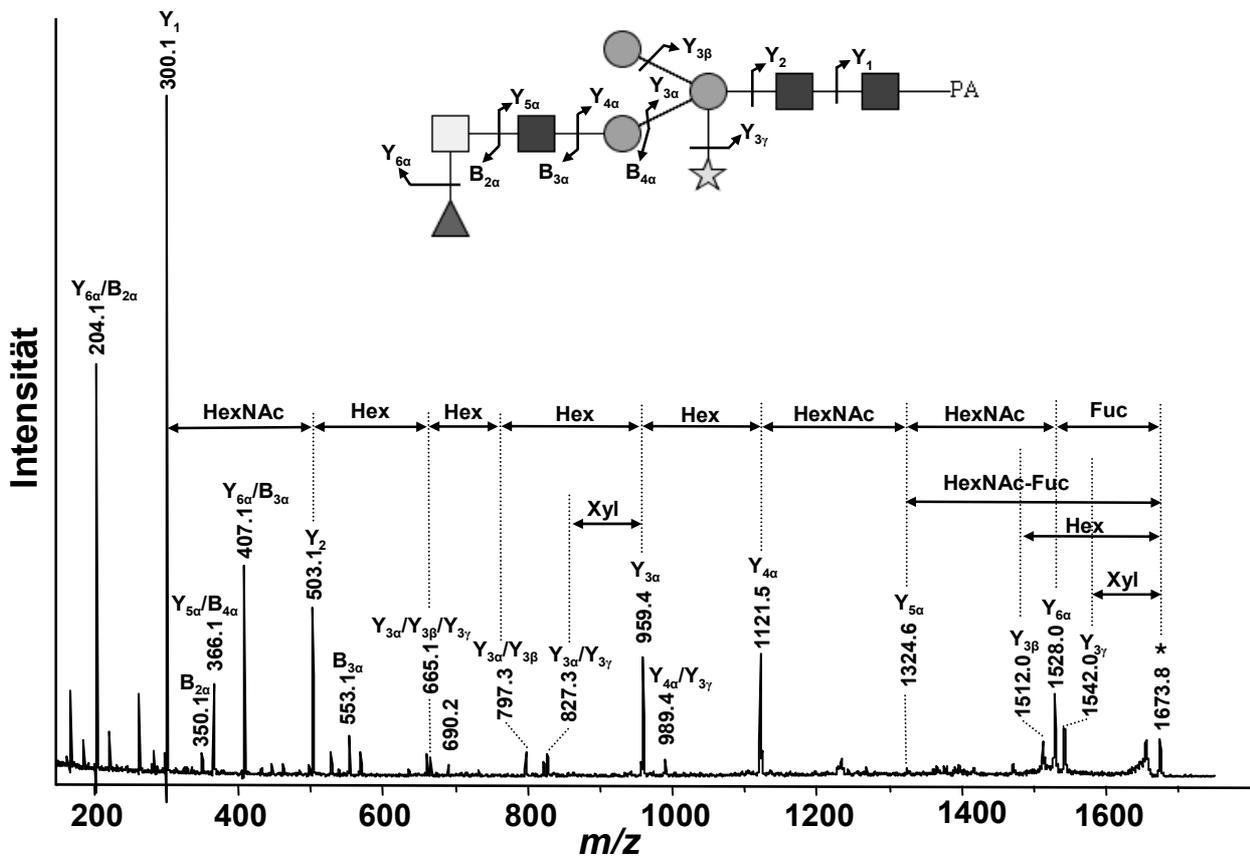


Abb. 32: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum der Spezies H_3N_4XF -PA, gemessen als H^+ -Addukt mit der pseudomolekularen Masse m/z 1673,8. Charakteristische Fragmentationen wurden annotiert und Masseninkrementabstände eingezeichnet. Zur Erklärung der Symbole siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

3.7.2.2 Größere AAL-ungebundene N-Glykane

In den Fraktionen 17 bis 22 wurden mit m/z von 1857,7 und 1871,6 zwei Glykane als Na^+ -Addukte gemessen, die sich in ihren Massen nur um 14 Einheiten unterschieden. Die Berechnungen zur Monosaccharidzusammensetzung ergaben $\text{H}_4\text{N}_4\text{XF-PA}$ und $\text{MeHH}_3\text{N}_4\text{XF-PA}$. Im LIFT-Spektrum, in dem beiden Spezies als Na^+ -Addukt gemessen wurden, waren viele identische Signale zu beobachten, was auf eine ähnliche Struktur hindeutete. Die Fragmentierung der Na^+ -Addukte im LID-Modus führte zu einer veränderten Intensitätsverteilung der auftretenden Signal (Abb. 33 A und B). Während in den LID-Spektren von H^+ -Addukten vor allem im kleineren Massenbereich die stärkste Signalintensität auftrat, waren bei den Na^+ -Addukten dort nur sehr geringe Fragmentintensitäten nachweisbar. Als besonders dominantes Signal wurde ein Z-Fragment registriert, das jeweils vom Vorläuferion durch Abspaltung eines terminalen Hexose bzw. Methylhexose-Restes einschliesslich des Sauerstoffatoms der glykosidischen Bindung hervorgeht. Die korrespondierenden Y-Ionen wurden in beiden Spektren ebenfalls gefunden. Weitere, im LIFT-Spektrum von H^+ -Addukten dominante Fragmente wie Y_1 und Y_2 wurden ebenso, aber schwächer detektiert. Vom Vorläuferion waren in beiden Spektren mit den $\text{Y}_{4\beta}$ (Hex bzw. MeH) und $\text{Y}_{5\alpha'}$ (Fuc) Fragmentationen die Abspaltung dieser terminal lokalisierten Monosaccharidreste zu beobachten. Das $\text{Y}_{3\gamma}$ -Fragmentation (Xyl) war hingegen nur in Spektrum A vom Vorläuferion zu beobachten. Die Detektion von Spuren eines $\text{B}_{1\alpha}$ -Fragmentes (m/z 225,9) könnte auf die Anwesenheit eines terminalen HexNAc-Restes hindeuten. Das $\text{Y}_{3\alpha}/\text{B}_5$ Fragment, das ebenfalls in beiden Spektren detektiert wurde, lieferte die Information, dass es sich um das Fragment $(\pm\text{Me})\text{H}_3\text{NX}$ handelte, das durch einen Doppelbruch generiert wird.

In Fraktion 19 wurde mit m/z 2074,6 $[M+Na]^+$ ein N-Glykan mit der Zusammensetzung MeHH₃N₅XF-PA detektiert. Im LIFT-Spektrum nach Laser-induzierter Dissoziation des $[M+H]^+$ Vorläuferions mit m/z 2052,8 waren besonders intensive Signale im Massenbereich von m/z 200 bis 1200 zu beobachten (Abb. 34). Die Detektion des Fragmentions bei m/z 1135,7 ($Y_{4\alpha}/Y_{4\beta}$ -Fragment) erinnerte an eine bereits besprochene Spezies, die eine Methylhexose trägt und ebenfalls mittels MS/MS untersucht wurde (Abb. 30). Interessanterweise wurde die Abspaltung einer Methylhexose erst auf der Stufe des $Y_{4\alpha}/Y_{4\beta}$ -Fragments beobachtet und als Signal bei m/z 959,6 ($Y_{4\alpha}/Y_{3\beta}$ -Fragment) detektiert. Vom $Y_{4\alpha}/Y_{4\beta}$ -Fragment konnte zudem die Abspaltung eines Xylose-Restes ($Y_{4\alpha}/Y_{3\beta}/Y_{3\gamma}$ -Fragment) und eines Hex-Restes ($Y_{3\alpha}/Y_{4\beta}$ -Fragment) beobachtet werden. Im Massenbereich bis m/z 600 wurde eine Reihe weiterer diagnostischer Fragmente detektiert. Die Fragmente $B_{1\alpha}$, Y_1 und $B_{2\beta}$ (m/z 204,2 / 300,2 / 366,2) belegen so die Freisetzung eines terminalen HexNAc-Restes, des HexNAc-PA Kernfragments und eines terminalen Hex-HexNAc-Disaccharids. Von Interesse waren auch die Fragmente $Y_{5\alpha}/B_{2\alpha}$ und $B_{2\alpha}$ (m/z 350,2 und 552,2), die Bruchstücke mit der Zusammensetzung HexNAcFuc bzw. HexNAc₂Fuc widerspiegeln, welche offenbar in terminaler Position am Glykan gebunden vorliegen. Weiterhin war die Detektion der Fragmente bei m/z 715,5 (B_3) und 836,4 ($Y_{3\alpha}/B_4$) interessant, die Bruchstücken der Zusammensetzung HexHexNAc₂Fuc und MeHHex₂HexNAcXyl zuordnen ließen.

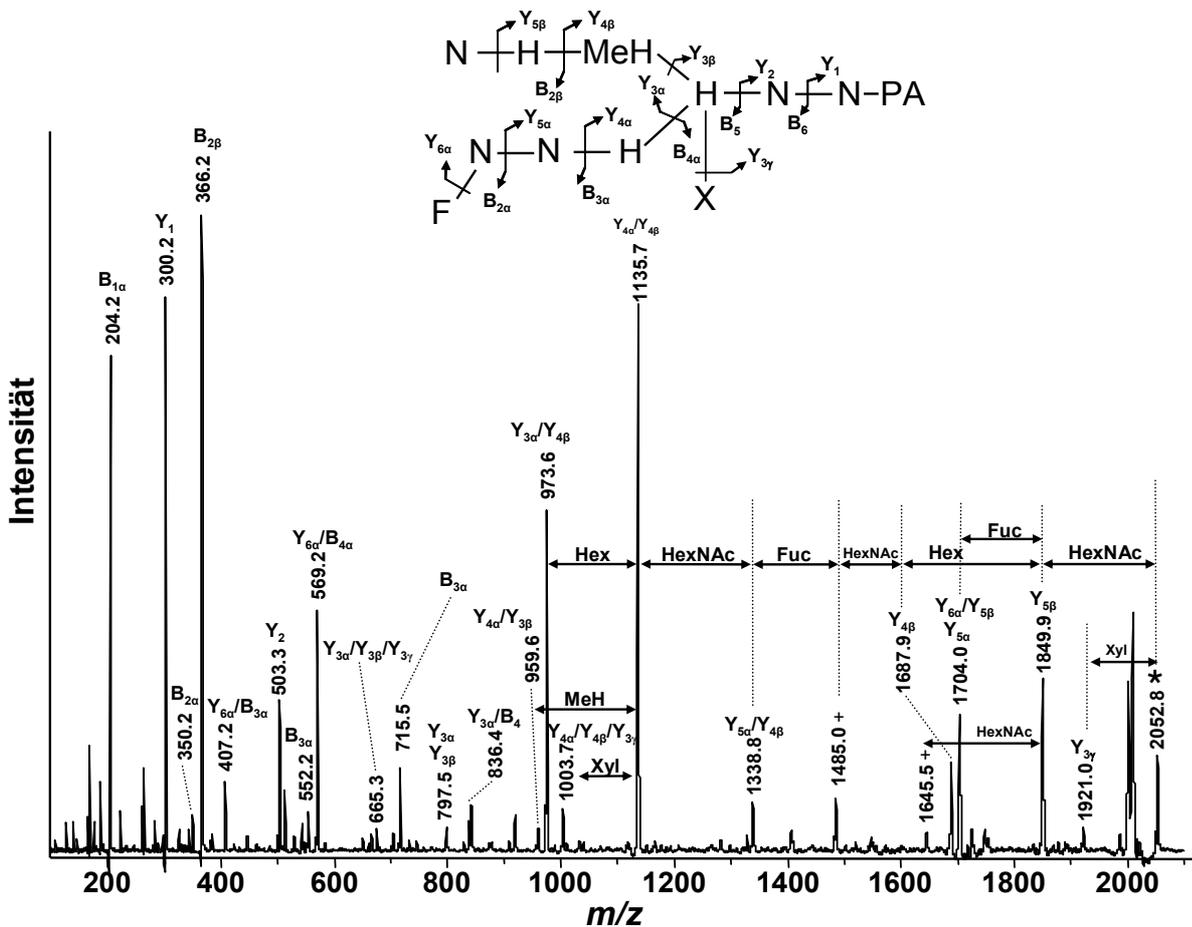


Abb. 34: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum der Spezies MeHH₃N₅XF-PA gemessen als H⁺-Addukt mit der pseudomolekularen Masse m/z 2052,8. Charakteristische Fragmentationen wurden annotiert und Masseninkrementabstände eingezeichnet. Die Fragmentierung eines MeH-Restes wurde nur vom Y_{4 α} /Y_{4 β} -Fragment (m/z 1135,7) beobachtet. Aus Platzgründen wurde die Glykanstruktur zur Einzeichnung der Fragmentierungen in Textform abgebildet. Zur Kurzschreibweise der Monosaccharide siehe Bildunterschrift Abb. 17. += Fragmente aus einer Nebenkomponente.

3.7.2.3 MALDI-TOF-MS/MS Analyse von AAL-ungebundenen N-Glykanen mittels heCID

Von den beiden N-Glykanen der Zusammensetzung H₃N₂X-PA (m/z 1143,3) und MeHH₂N₂X-PA (m/z 1157,3) wurden zusätzlich MALDI-TOF-MS/MS Messungen nach kollisioninduzierter Dissoziation unter Verwendung von Argon als Kollisionsgas in der Ionenquelle durchgeführt. Bei der Fragmentierung von Na⁺-Addukten als Vorläuferionen wurden neben glykosidischen Bindungsbrüchen in beiden Spektren (Abb. 35 und Abb. 36) auch zahlreiche Ringfragmentierungen (A- und X-Fragmente) beobachtet. Im niedrigeren Massenbereich (m/z 200 bis 500) wurden die Signale um Faktor 3 vergrößert dargestellt. Bei der Spezies 1143,3 stellte das B₃-Fragment (m/z 844,5) das intensivste Signal dar, das durch Abspaltung des HexNAc-PA Restes

gebildet wird (Abb. 35). Das dazu passende C_3 -Ion (m/z 862,5) ließ sich ebenfalls detektieren, wenn auch deutlich schwächer. Im oberen Massenbereich waren zudem neben einer Wasserabspaltung weitere Y- und Z-Fragmente zu beobachten, die durch den Verlust terminaler Monosaccharidreste generiert wurden. Im mittleren Massenbereich wurden neben weiteren, durch glykosidische Bindungsbrüche gebildeten Fragmenten, ein A-Ringfragment (m/z 715,4) detektiert, das durch einen $^{3,5}A_3$ -Ringbruch des vorletzten GlcNAc-Restes entsteht. Der untere Massenbereich (m/z 200 - 500) des im CID-Modus gemessenen Spektrums enthielt zahlreiche Fragmente, die Informationen über den mit Kohlenstoffatom 6 (C6) der zentralen Hexose verknüpften Arm des N-Glykans beinhalten und somit von besonderer Bedeutung sind. Die Detektion des Signals bei m/z 479,2, das durch den Doppelbruch $Y_{3\alpha}/B_2$ generiert wird, stellt das so genannte D-Ion dar, welches die zentrale β -gebundene Mannose der Kernstruktur enthält, sowie, wenn vorhanden, die am C2 und C6 gebundenen Monosaccharidreste. In diesem Fall konnte das Ion dem Trisaccharid Hex₂Xyl zugeordnet werden. Der innerste Mannose-Rest des D-Ions bildete im CID-Modus zudem zwei charakteristische Ringfragmente, die mit $^{0,4}A_2$ (m/z 245,1) und $^{3,5}A_2$ (m/z 259,1) ebenfalls registriert wurden und den Xylose-Rest nicht enthalten. Die am C2 der zentralen Mannose β -gebundene Xylose wurde auch direkt vom D-Ion abgespalten, was durch das um 132 Masseneinheiten kleinere Fragment bei m/z 347,1 ($Y_{3\alpha}/Y_{3\gamma}/B_2$) nachgewiesen wurde (Abb. 35 Inset).

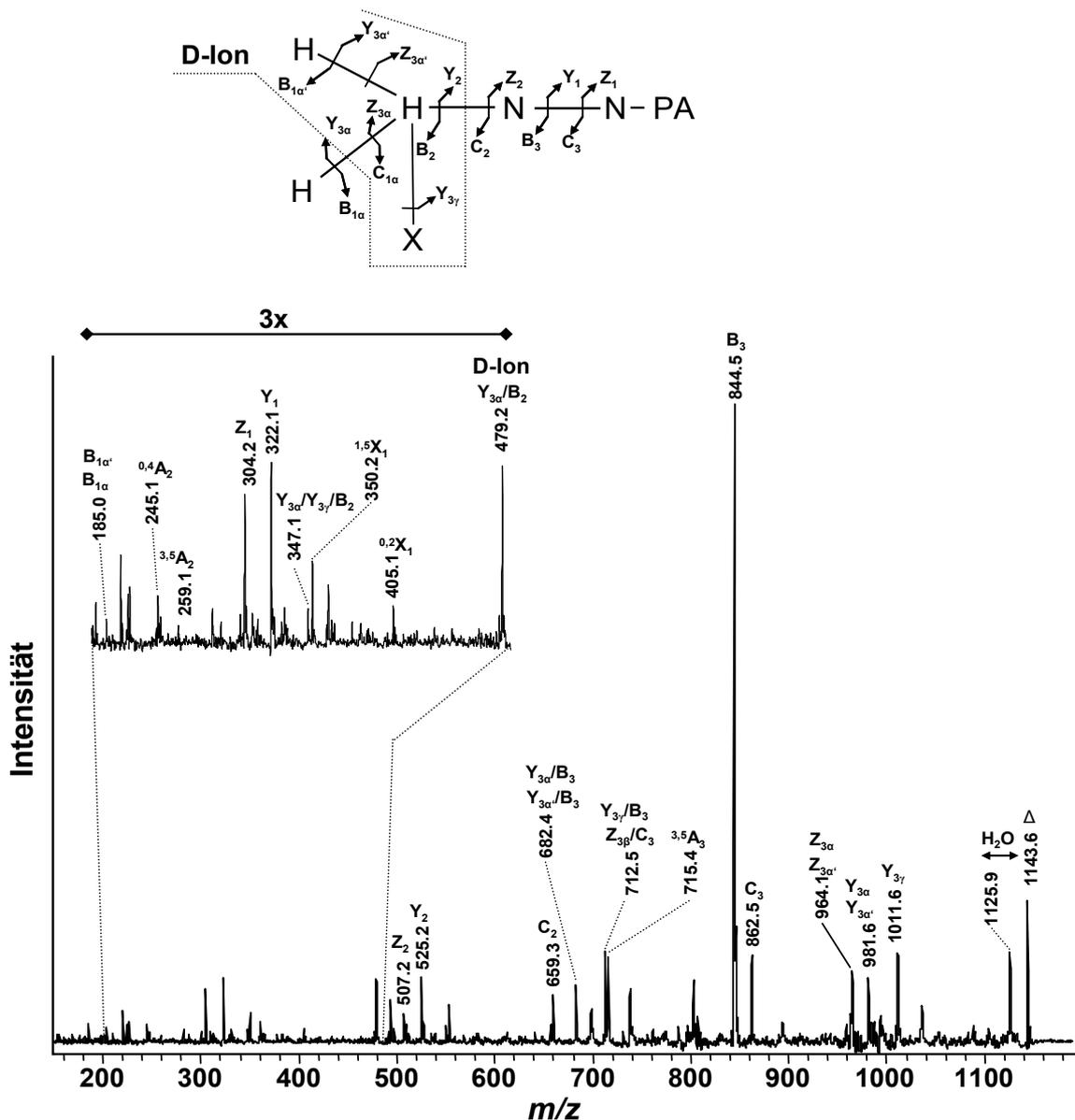


Abb. 35: MALDI-MS/MS (CID) Spektrum der Spezies H_3N_2X -PA gemessen als Pseudomolekülion $[M+Na]^+$ der Masse m/z 1143,6. Charakteristische Fragmentationen wurden annotiert und der Bereich des D-Ions und der korrespondierenden A-Ringfragmente um Faktor drei in der Intensität verstärkt, dargestellt. Aus Platzgründen wurde die Glykanstruktur zur Einzeichnung der Fragmentierungen in Textform abgebildet. Zur Kurzschreibweise der Monosaccharide siehe Bildunterschrift Abb. 17.

Die zweite Spezies wurde ebenfalls als Pseudomolekülion $[M+Na]^+$ mit der Masse m/z 1157,6 im CID-Modus untersucht. Das Spektrum in Abb. 32 zeigt ein vergleichbares Aussehen zum vorhergehenden CID-Spektrum. So wurden ebenfalls B_3 - und C_3 -Fragmente in entsprechender Intensität detektiert, die durch Abspaltung des HexNAc-PA Restes entstehen, wobei beide um 14 Masseneinheiten größer sind. Ebenso kommt es auch zur Abspaltung von Wasser sowie zur Generation weiterer Y- und Z-Fragmentierungen durch Abspaltungen terminaler Monosaccharidreste, wobei das

Fragment bei m/z 981,4 ($Y_{3\alpha}$) um das Masseninkrement einer Methylhexose kleiner ist als das Vorläuferion. Der mittlere Massenbereich wird ebenfalls durch glykosidische Fragmentbrüche dominiert, wobei mit dem $^{3,5}A_3$ -Ringfragment (m/z 729,2) des mittleren HexNAc-Restes das um 14 Masseneinheiten größere Pendant zum ersten Spektrum ebenfalls detektiert wurde. Durch die Peaks im Massenbereich von m/z 200 bis 500 konnte nachgewiesen werden, dass sich das entstehende D-Ion ebenfalls aus dem Trisaccharid Hex₂Xyl zusammensetzt, da mit m/z 479,0 ($Y_{3\beta}/B_2$) ein massengleiches Ion detektiert wurde. Auch die daraus resultierenden Ringfragmente hatten die gleiche Masse (m/z 244,9 für $^{0,4}A_2$ und 259,0 für $^{3,5}A_2$). Das um das Masseninkrement 132 kleinere Fragment (D-Ion minus Xylose) wurde wiederum bei m/z 347,0 beobachtet. Die massengleichen Signale für das D-Ion und die charakteristischen A-Ringfragmente weisen damit eindeutig das C3-Atom der zentralen Mannose als Bindungsstelle des Methylhexose-Restes aus.

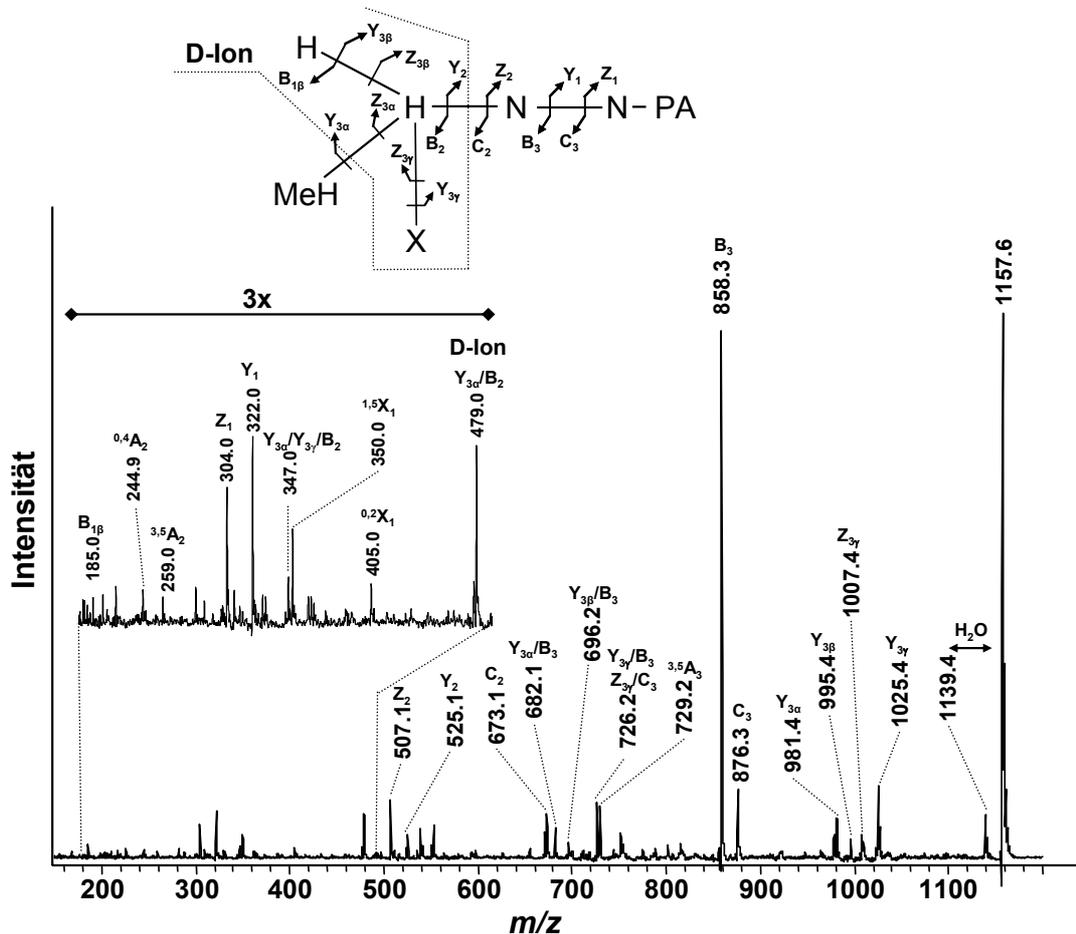


Abb. 36: MALDI-MS/MS (CID) Spektrum der Spezies MeHH₂N₂X-PA, gemessen als Pseudomolekülion $[M+Na]^+$ der Masse m/z 1157,6. Charakteristische Fragmentationen wurden annotiert und der Bereich des D-Ions und der korrespondierenden A-Ringfragmente um Faktor drei in der Intensität verstärkt dargestellt. Aus Platzgründen wurde die Glykanstruktur zur Einzeichnung der Fragmentierungen in Textform abgebildet. Zur Kurzschreibweise der Monosaccharide siehe Bildunterschrift Abb. 17.

3.7.2.4 Behandlung mit Exoglykosidasen und HF-Lösung

Zwei Fraktionen aus der HPLC-Trennung der AAL-ungebundenen Glykane wurden mit Exoglykosidasen behandelt und nachfolgend durch MALDI-TOF-MS analysiert. In Fraktion 13 (Abb. 37 A) wurden drei Hauptspezies nachgewiesen, die sich um jeweils einen HexNAc-Rest (Masseninkrement 203) unterschieden. Diese Fraktion wurde einmal mit β -N-Acetylhexosaminidase und auch α -Mannosidase behandelt (Abb. 37).

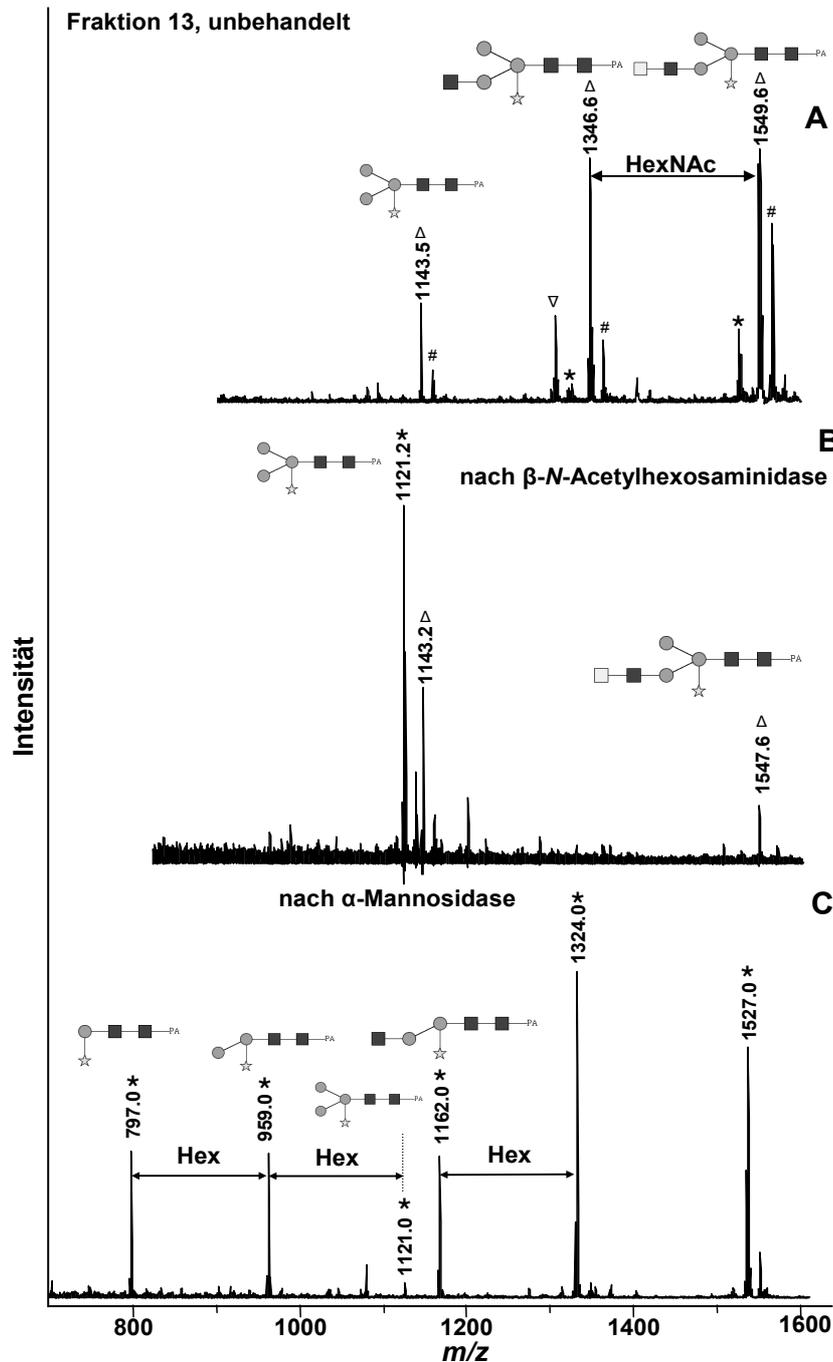


Abb. 37: MALDI-TOF-MS der Glykane von Fraktion 13 nach HPLC der AAL-ungebundenen Glykane vor (A) und nach Behandlung mit Exoglykosidasen. Während die β -N-Acetylhexosaminidase die Glykane fast quantitativ zur Spezies mit m/z 1121,2 $[M+H]^+$ (H_3N_2X -PA) umsetzt (B), setzt die α -Mannosidase die Glykane nur teilweise um (C). * = H^+ -Addukte, Δ = Na^+ -Addukte, # = K^+ -Addukte.

Abb. 37 A bis C zeigen die Massenspektren vor und nach Behandlung der Fraktion mit den Exoglykosidasen. Die Behandlung mit der β -N-Acetylhexosaminidase führt zur vollständigen Umsetzung der Spezies 1346,6 und 1549,6 zum kleineren N-Glykan mit m/z 1121,2 $[M+H]^+$ (Abb. 37 B), so dass es zur Abspaltung von zwei HexNAc-Resten kommt. Die Behandlung mit α -Mannosidase (Abb. 37 C) führte teilweise zu einem nahezu kompletten Verdau der Spezies 1121,2 bis hin zum Xyl(β 1-2)Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc-PA, das mit m/z 797,0 als H^+ -Addukt registriert wurde und sich um einen Hexose-Rest vom Signal bei m/z 959,0 unterscheidet. Während die große Spezies H_3N_4X -PA enzymatisch nicht angegriffen wird, wird von der Spezies H_3N_3X -PA zum Teil ein Mannose-Rest abgespalten, was mit dem Signal bei m/z 1162,0 korreliert. Die in Fraktion 20 vorliegenden Spezies wurden mit α -Fucosidase, β -Galaktosidase, 48 %iger HF-Lösung und β -N-Acetylhexosaminidase getrennt voneinander behandelt (Abb. 38 A-D). Dabei führte α -Fucosidase nur in geringem Maße zu einer Freisetzung von Fucose bei der Spezies H_4N_4XF -PA (Abb. 38 B). Die großen Glykane dieser Fraktionen wurden von beiden Enzymen nicht umgesetzt, da entsprechende Signale im MS nicht zu sehen waren. Beobachtet wurde hingegen eine erniedrigte Signalintensität. Die Kombination aus dem β -N-Acetylhexosaminidase Verdau nach HF-Behandlung führte hingegen zur Abspaltung von HexNAc-Resten und/oder Fucose, so dass Signale bei m/z 1689,9 $[M+H]^+$ und m/z 1702,4 $[M+H]^+$ gemessen wurden (Abb. 38 D).

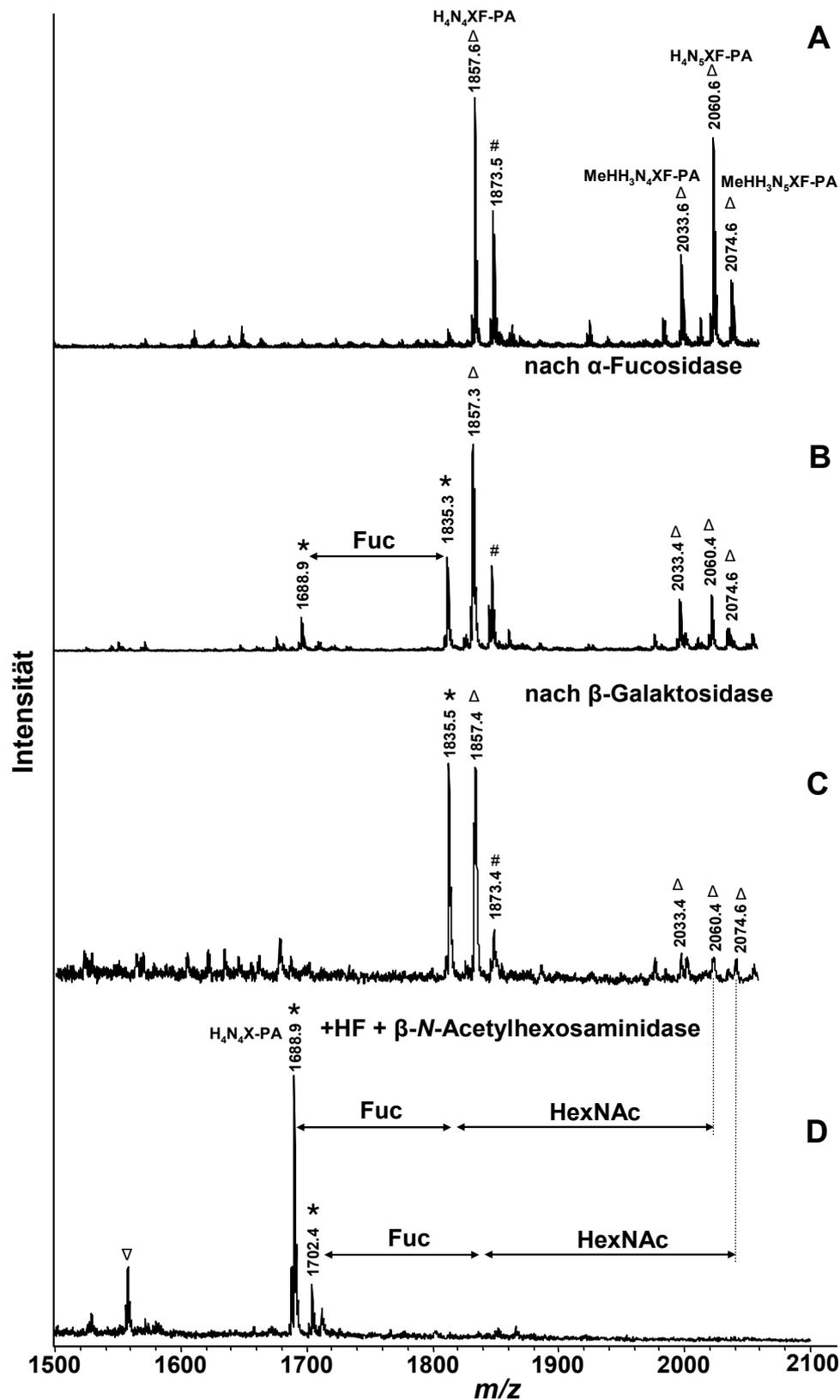


Abb. 38: MALDI-TOF-MS der Glykane von Fraktion 20 nach HPLC der AAL-ungebundenen Glykane vor (A) und nach sequentieller Behandlung mit Exoglykosidasen (B+C), sowie HF-Behandlung mit anschließender β -N-Acetylhexosaminidase-Behandlung (D). α -Fucosidase (B) und β -Galaktosidase (C) hatten nur einen schwachen Einfluss auf die Glykane. Lediglich die HF-Behandlung und der anschließender Verdau mit β -N-Acetylhexosaminidase-Behandlung (D) zeigten einen Effekt. In (A) wurden an die detektierten Massen noch Monosaccharidzusammensetzungen notiert.

3.7.3 MALDI-TOF-MS Analyse AAL-gebundener N-Glykane

Die MALDI-TOF-MS Analyse der Fraktionen nach Auftrennung der AAL-gebundenen N-Glykane bestätigte die große Heterogenität dieses Glykangemisches. Es zeigte sich, dass alle Glykane dieses Pooles innerhalb 25 Minuten (Fraktion 50) nach Laufbeginn eluiert waren. Nach Fraktion 50 waren keine N-Glykane mehr nachweisbar. Die Fraktionen 1 bis 15 (entsprechend 7,5 Minuten HPLC-Laufzeit) enthielten keine Kohlenhydrate. Die Größentrennung hatte bis Fraktion 30 (15 Minuten) vielfach zu vergleichsweise homogenen Fraktionen geführt (Abb. 39 bis Abb. 44). Hingegen verdeutlichten die MS-Analysen der Fraktionen 31 bis 50 wieder die enorme Heterogenität des Ausgangsgemisches (Abb. 42 bis Abb. 44). Einige N-Glykanspezies wurden bei der MS-Analyse als $[M+H]^+$ und/oder $[M+Na]^+$ Addukte gemessen, woraus teilweise Doppelpeaks mit dem Massenabstand 22 resultierten. In Fraktion 15 bis 26 eluierten hauptsächlich kleinere N-Glykane (Abb. 39 bis Abb. 41) und enthielten Spezies, die auch schon im Massenspektrum des Immuneluat-Gesamtpools detektiert worden waren. Die Fraktionierung erlaubte die Einteilung weiterer Glykane in die beschriebenen Gruppen. In Fraktion 15 wurde mit m/z 965,5 eine Spezies erstmalig und auch nur schwach detektiert, die eine Zusammensetzung von HN_2XF -PA aufweist. Sie kann als Vorläufer für die verlängerten Glykane mit m/z 1127,4 (H_2N_2XF -PA) und 1141,3 ($MeHHN_2XF$ -PA) betrachtet werden. Eine weitere Serie AAL-gebundener kreuzreagierender Glykane wird durch die Grundstruktur gegeben, welche sich biosynthetisch von der Spezies $MeHH_2N_2XF$ -PA (m/z 1303,4 Fraktion 20) herleitet. Größere Spezies in Fraktion 29 lassen sich von diesem Typ ableiten und scheinen durch Verlängerung zu entstehen. Zwar wurde das um einen HexNAc Rest verlängerte Glykan der Masse m/z 1506,4 ($MeHH_2N_3XF$ -PA) nur schwach in Fraktion 27 bis 29 detektiert, das um zwei HexNAc-Reste erweiterte Glykan $MeHH_2N_4XF$ -PA (m/z 1688,1) in Fraktion 33 war hingegen deutlich als $[M+H]^+$ Addukt nachweisbar. Die Spezies der Massen m/z 1855,5 $[M+Na]^+$, m/z 2017,6 $[M+Na]^+$, m/z 2179,4 $[M+Na]^+$ und m/z 2220,6 $[M+Na]^+$ waren als Hauptkomponenten im Gesamtmassenspektrum des Pools an AAL-gebundenen Glykanen detektiert worden (Abb. 23).

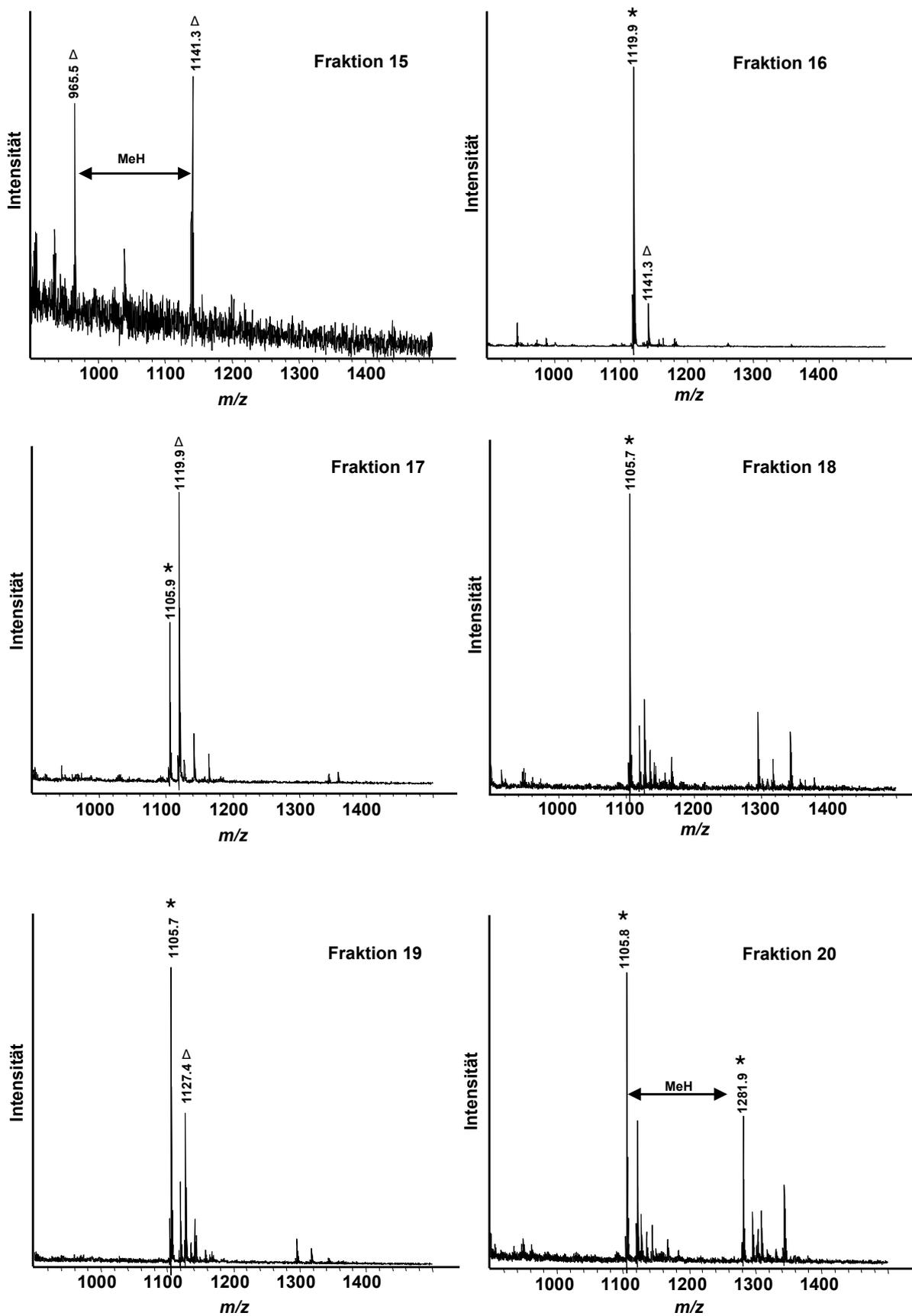


Abb. 39: MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktionen 15 bis 20 nach HPLC-Größenfraktionierung der AAL-gebundenen N-Glykane. In ausgewählten Fällen wurden Masseninkrementabstände, die für Monosaccharide zutreffend sind, mittels Doppelpfeil eingezeichnet. Δ = Na⁺-Addukte, * = H⁺-Addukte

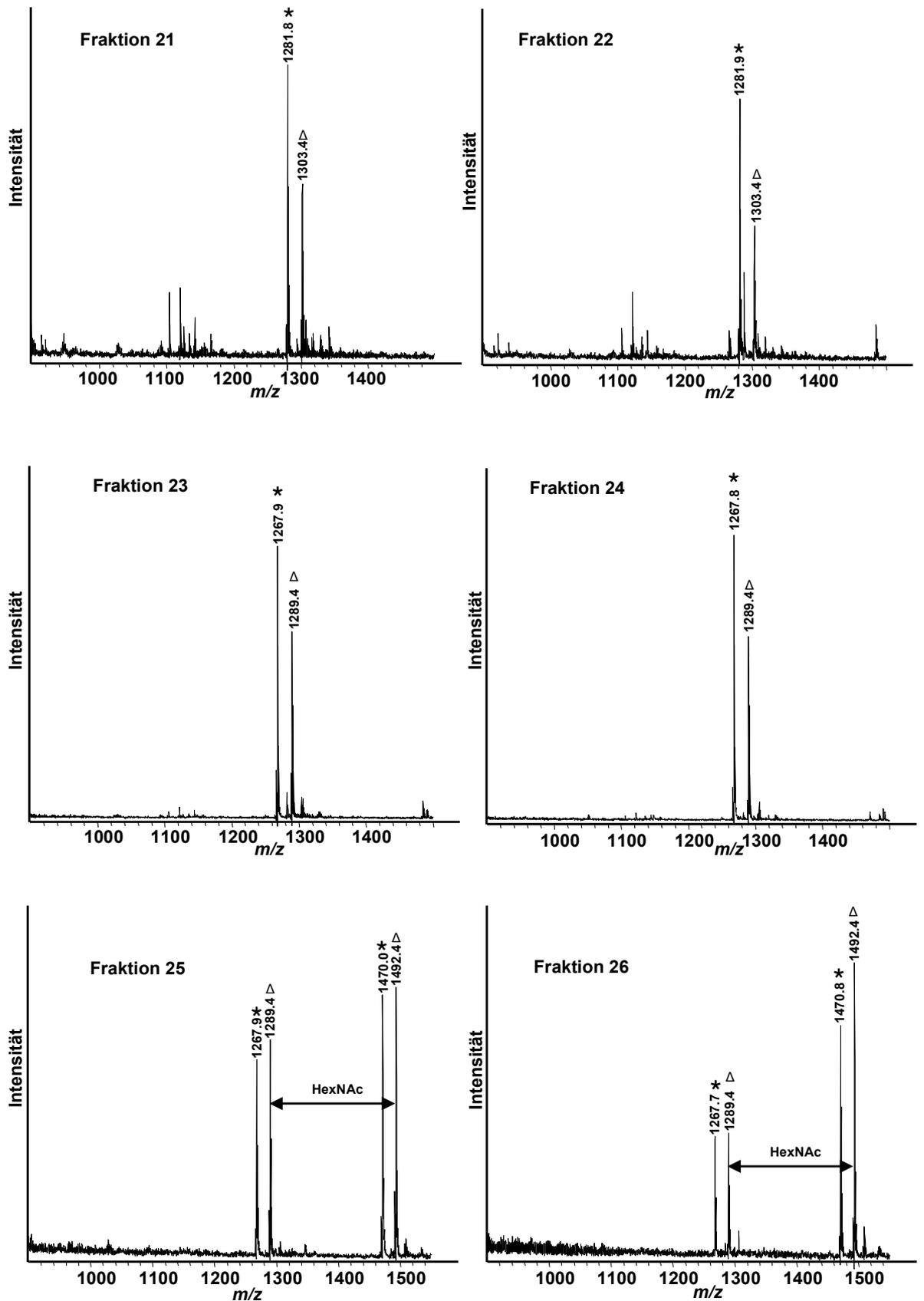


Abb. 40: MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktionen 21 bis 26 nach HPLC-Größenfraktionierung der AAL-gebundenen N-Glykane. In ausgewählten Fällen wurden Masseninkrementabstände, die für Monosaccharide zutreffend sind, mittels Doppelpfeil eingezeichnet. Δ = Na^+ -Addukte, \star = H^+ -Addukte

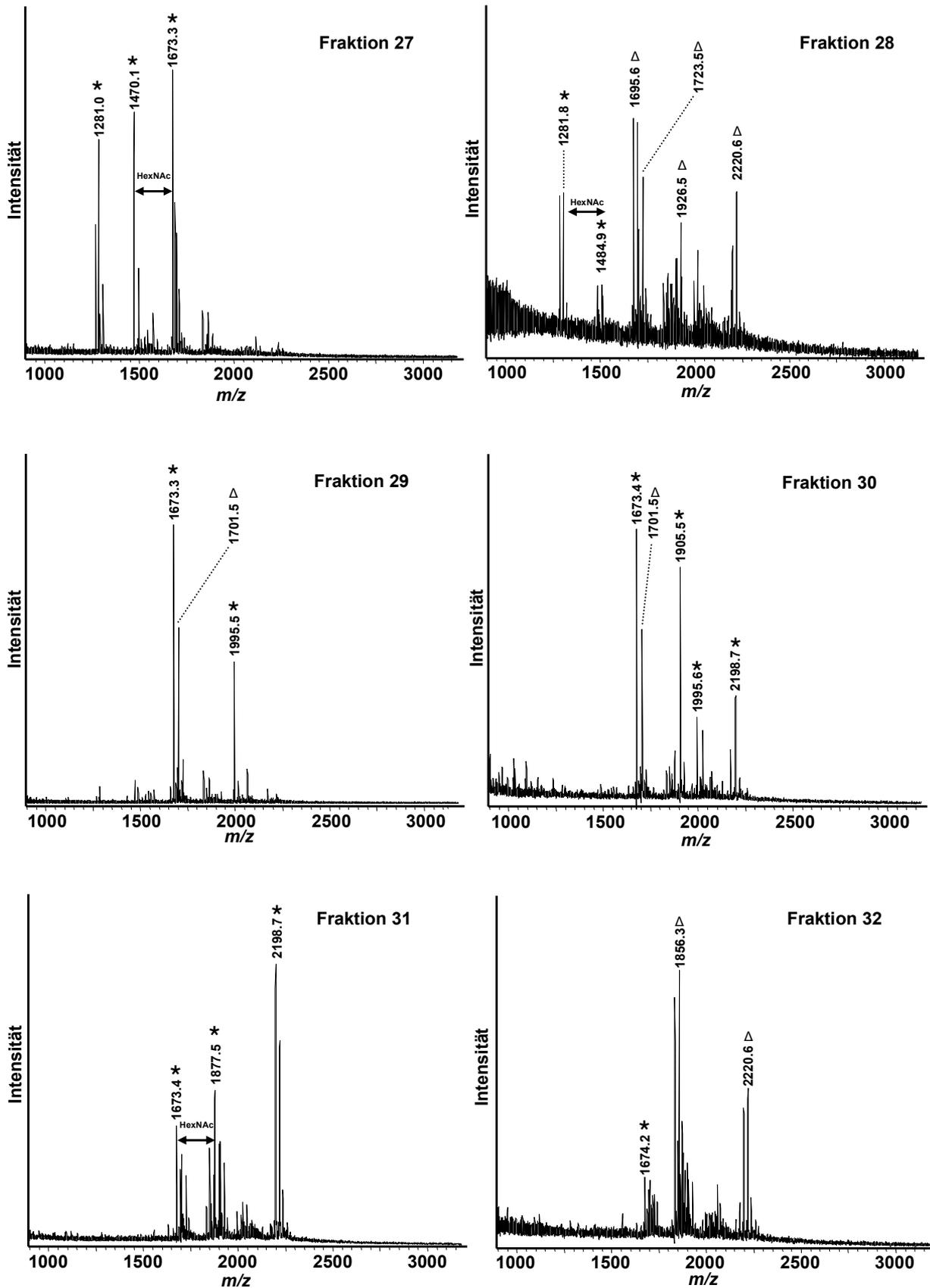


Abb. 41: MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktionen 27 bis 32 nach HPLC-Größenfraktionierung der AAL-gebundenen N-Glykane. In ausgewählten Fällen wurden Masseninkrementabstände, die für Monosaccharide zutreffend sind, mittels Doppelpfeil eingezeichnet. Δ = Na^+ -Addukte, \star = H^+ -Addukte

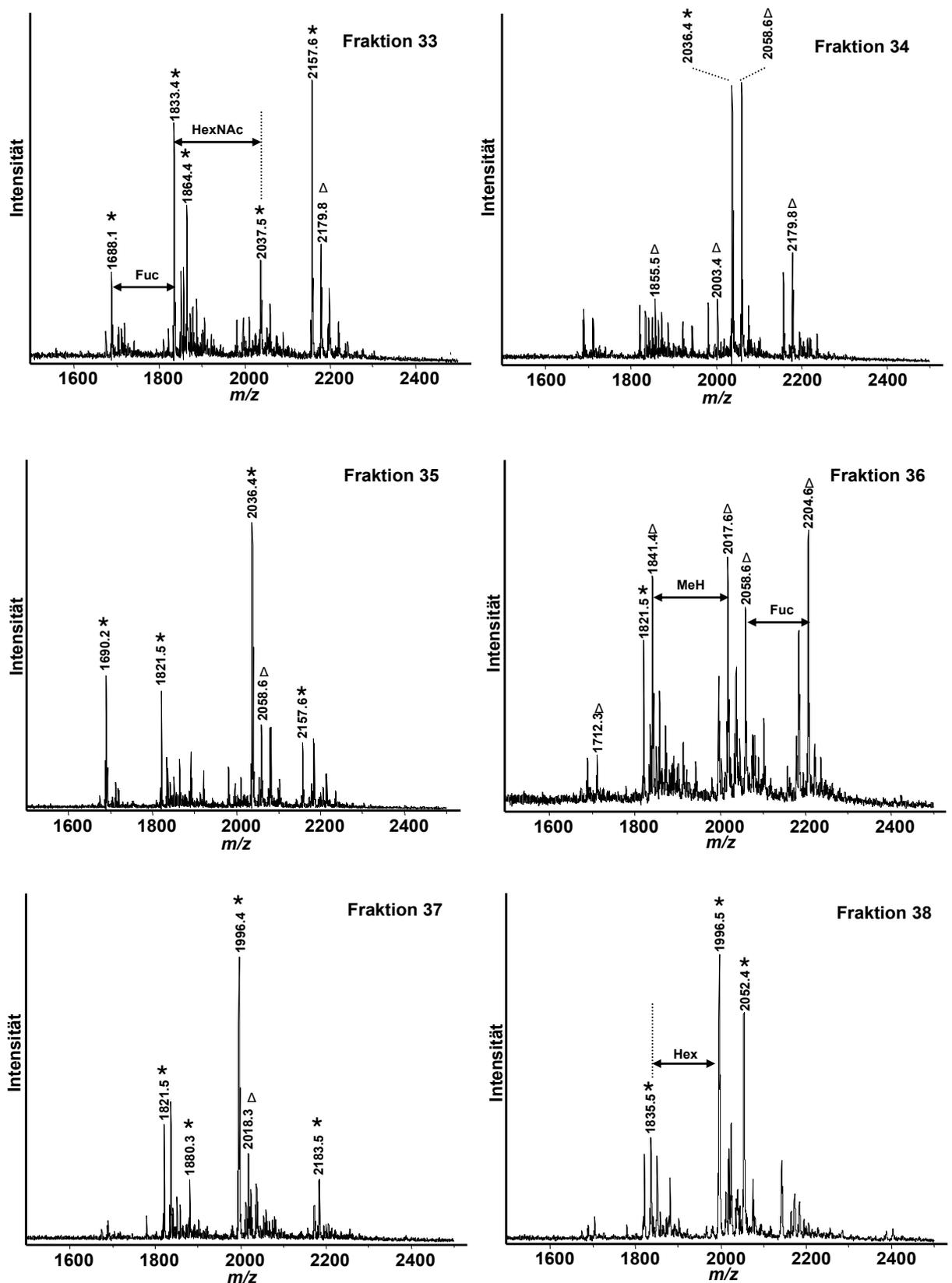


Abb. 42: MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktionen 33 bis 38 nach HPLC-Größenfraktionierung der AAL-gebundenen N-Glykane. In ausgewählten Fällen wurden Masseninkrementabstände, die für Monosaccharide zutreffend sind, mittels Doppelpfeil eingezeichnet. Δ = Na^+ -Addukte, $*$ = H^+ -Addukte

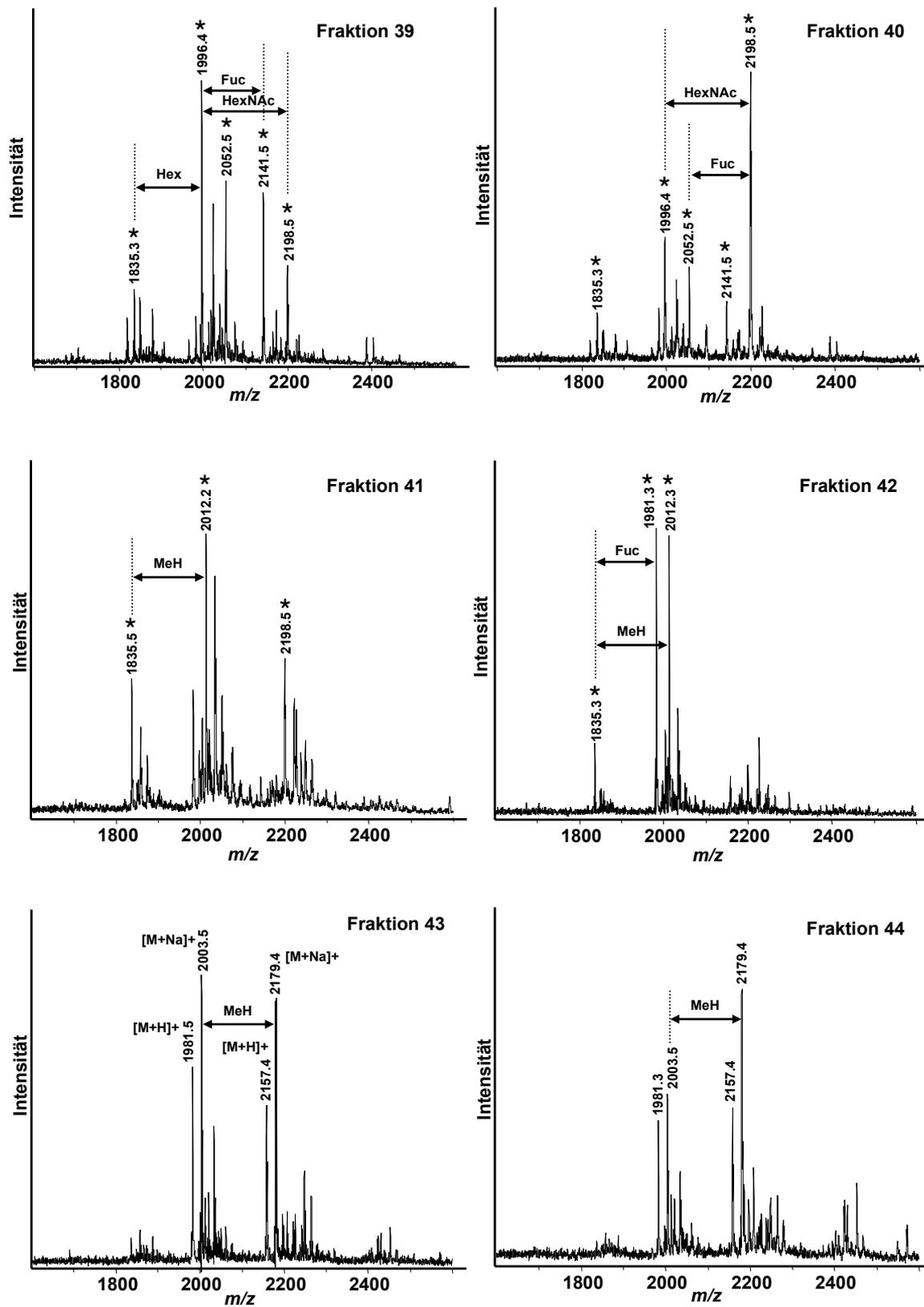


Abb. 43: MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktionen 39 bis 44 nach HPLC-Größenfraktionierung der AAL-gebundenen N-Glykane. In ausgewählten Fällen wurden Masseninkrementabstände, die für Monosaccharide zutreffend sind, mittels Doppelpfeil eingezeichnet. Δ = Na^+ -Addukte, \star = H^+ -Addukte

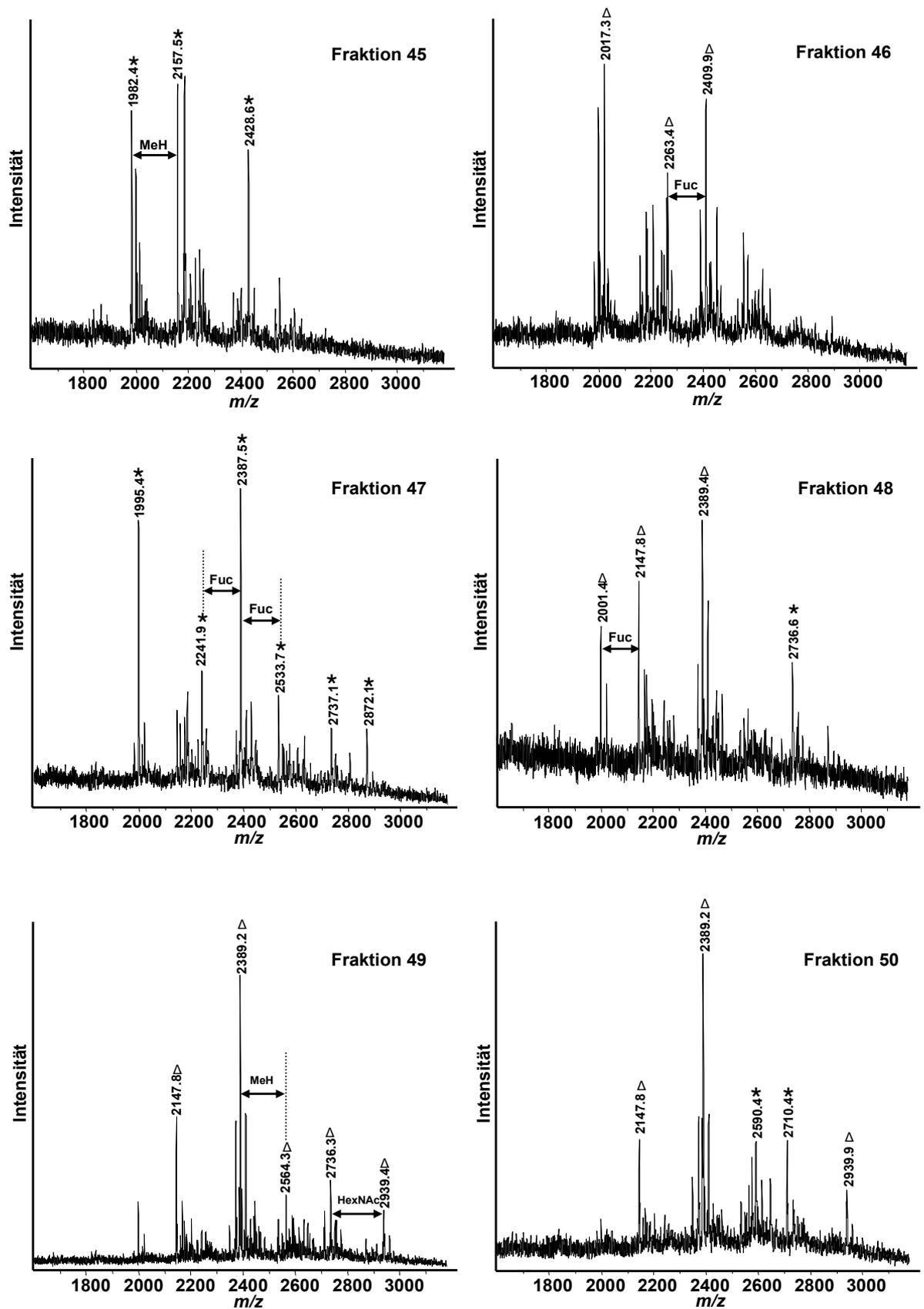


Abb. 44: MALDI-TOF-Massenspektren der Fraktionen 45 bis 50 nach HPLC-Größenfraktionierung der AAL-gebundenen N-Glykane. In ausgewählten Fällen wurden Masseninkrementabstände, die für Monosaccharide zutreffend sind, mittels Doppelpfeil eingezeichnet. Δ = Na^+ -Addukte, \star = H^+ -Addukte

Die Fraktionen ab 30 zeichneten sich durch starke Heterogenität aus und enthielten viele erstmalig detektierte Spezies, die auf Grund ihrer geringen Abundanz in vorangegangenen Fraktionen nicht nachgewiesen werden konnten. Dies spiegelte die Vielfalt des Ausgangsgemisches wider und führte zur gleichzeitigen Detektion von bis zu mehr als 10 verschiedenen Komponenten in einer Fraktion (Abb. 42, Fraktion 36 und Abb. 44, Fraktion 46). Da die meisten davon für eine detaillierte Analyse in viel zu geringer Menge vorlagen, konzentrierte sich die weitere strukturelle Charakterisierung auf schon beschriebene Hauptkomponenten.

3.7.4 Strukturelle Charakterisierung AAL-gebundener kreuzreagierender N-Glykane

3.7.4.1 MALDI-TOF-MS/MS Analyse kleiner AAL-gebundener N-Glykane

Die strukturelle Charakterisierung der kleineren AAL-gebundenen kreuzreagierenden N-Glykane mittels MALDI-TOF-MS/MS wurde an Vertretern der weitgehend homogenen Fraktionen 15 bis 26 durchgeführt. Die entsprechenden LIFT-Massenspektren sollten Informationen über den sequentiellen Aufbau der kleinen Strukturen liefern, die auch als mögliche Grundbausteine für die Biosynthese größerer Glykanspezies in Frage kommen. In Fraktion 15 wurde mit m/z 965,5 ($[M+Na]^+$) die kleinste Spezies der AAL-gebundenen kreuzreagierenden N-Glykane detektiert. Das dazugehörige LIFT-Spektrum lieferte ein dominantes Signal bei m/z 446,3 (Y_1), das durch das Fuc(α -6)HexNAc-PA Fragment generiert wird (Abb. 45). Vom Vorläuferion 943,5 ($[M+H]^+$) war zudem die Abspaltung der terminalen Monosaccharidreste Fucose (m/z 797,5 Y_{1a}) und Xylose (m/z 811,4 $Y_{3\gamma}$) zu beobachten.

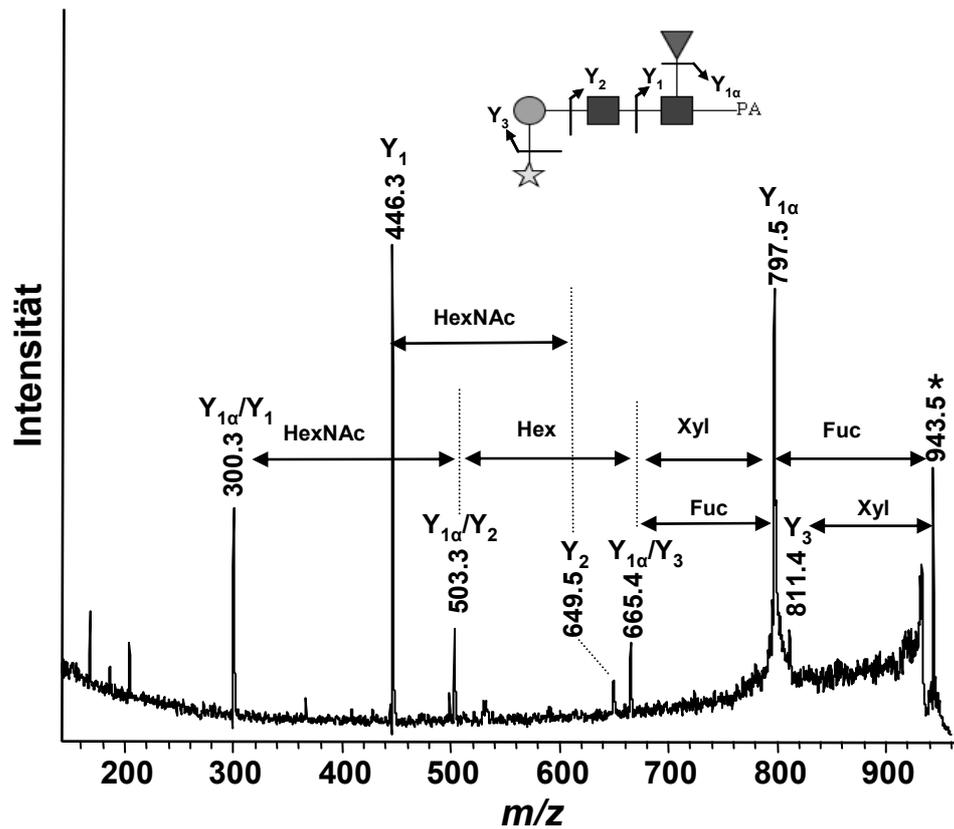


Abb. 45: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum der Spezies HN₂XF-PA, gemessen als H⁺-Addukt mit der pseudomolekularen Molekülmasse m/z 943,5. Charakteristische Fragmentationen wurden annotiert und Masseninkrementabstände eingezeichnet. Zur Erklärung der Symbole siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

Durch Addition eines Hexose-Restes oder einer Methylhexose entstehen Glykane der Masse m/z 1105,7 und 1119,9 ($[M+H]^+$), die ebenso in den Fraktionen detektiert wurden. Die LIFT-Spektren der beiden Spezies zeigten zahlreiche Peaks mit jeweils identischer Masse, was die strukturelle Ähnlichkeit beider Spezies verdeutlicht (Abb. 46). Das Fuc(α 1-6)HexNAc-PA Bruchstück ist als dominantestes Signal mit m/z 446 (Y_1) in beiden Spektren vertreten. Durch Verlust einer Hexose (Abb. 46 A) bzw. einer Methylhexose (Abb. 46 B) werden massengleiche $Y_{3\alpha}$ Fragmente generiert.

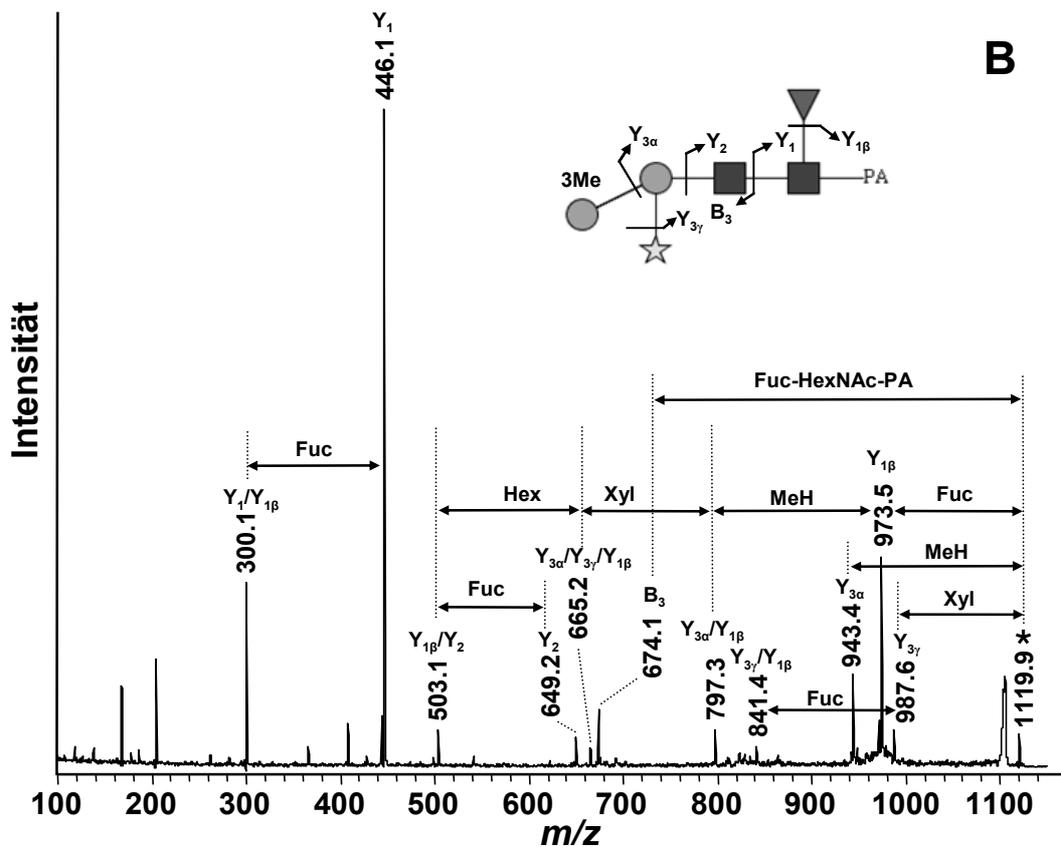
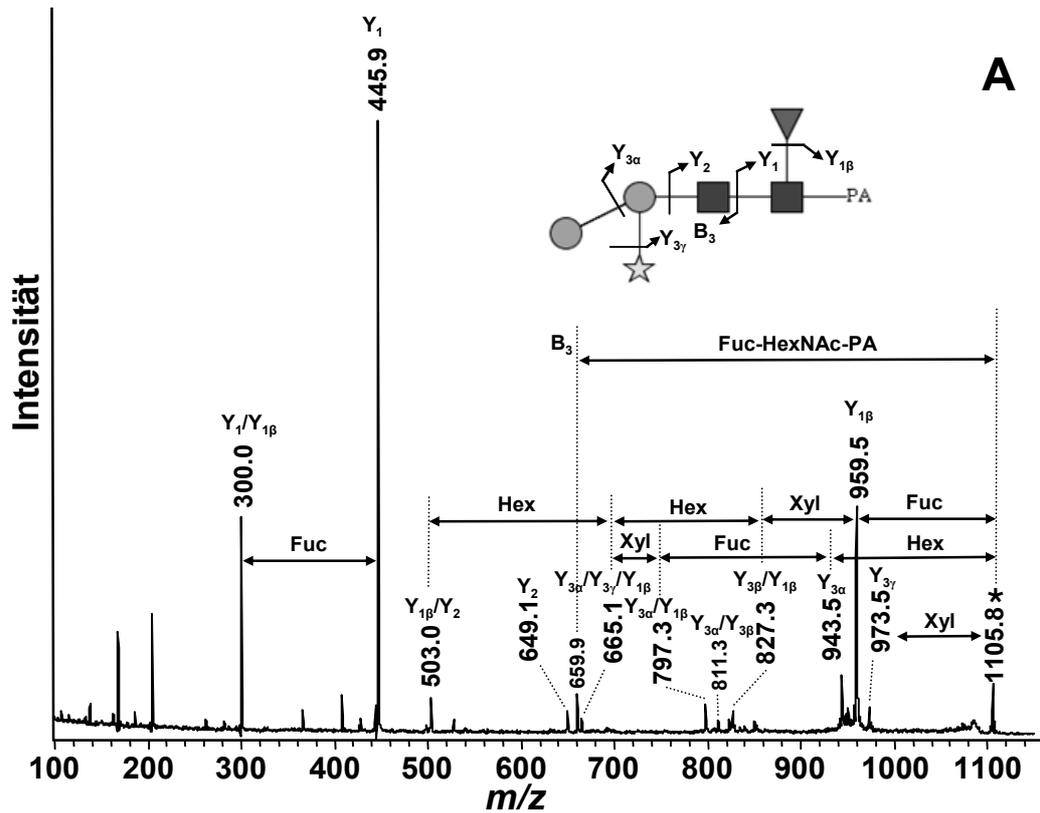


Abb. 46: MALDI-MS/MS (LID) Spektren der Spezies H₂N₂XF-PA (A) und MeHHN₂XF-PA (B), gemessen als H⁺-Addukte mit den Massen m/z 1105,8 und 1119,9. Die charakteristischen Fragmentationen stellen das Y₁-Fragment und das Y_{3α}-Fragment dar, welche die Kernfucosylierung und terminale Hexose bzw. Methylhexose zeigen. Zur Erklärung der Symbole siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

Eine weitere Hexose führt bei beiden Spezies zu Strukturen mit den Massen m/z 1267,8 und 1281,8. Bei beiden N-Glykanen ließ sich im MS/MS mit dem Y_1 -Fragment bei m/z 446 die vorliegende Kernfucosylierung nachweisen. Vom Pseudomolekülion m/z 1267,9 $[M+H]^+$ wurde die Abspaltung der terminalen Zuckerreste beobachtet, welche die drei Fragmente $Y_{1\gamma}$ (m/z 1121,8), $Y_{3\alpha}$ oder $Y_{3\alpha'}$ (m/z 1105,8) und $Y_{3\beta}$ (m/z 1135,9) generierte (Abb. 47). Im MS/MS Spektrum der Spezies 1281,8 wurde deutlich, dass vier massenverschiedene, terminale Zuckerreste vom Vorläuferion abgespalten werden (Abb. 48). In beiden MS/MS Spektren wurde auch ein B_3 -Fragment detektiert, das durch Abspaltung des Fuc(α 1-6)HexNAc-PA Fragmentes gebildet wird und sich um 14 Masseneinheiten unterschied.

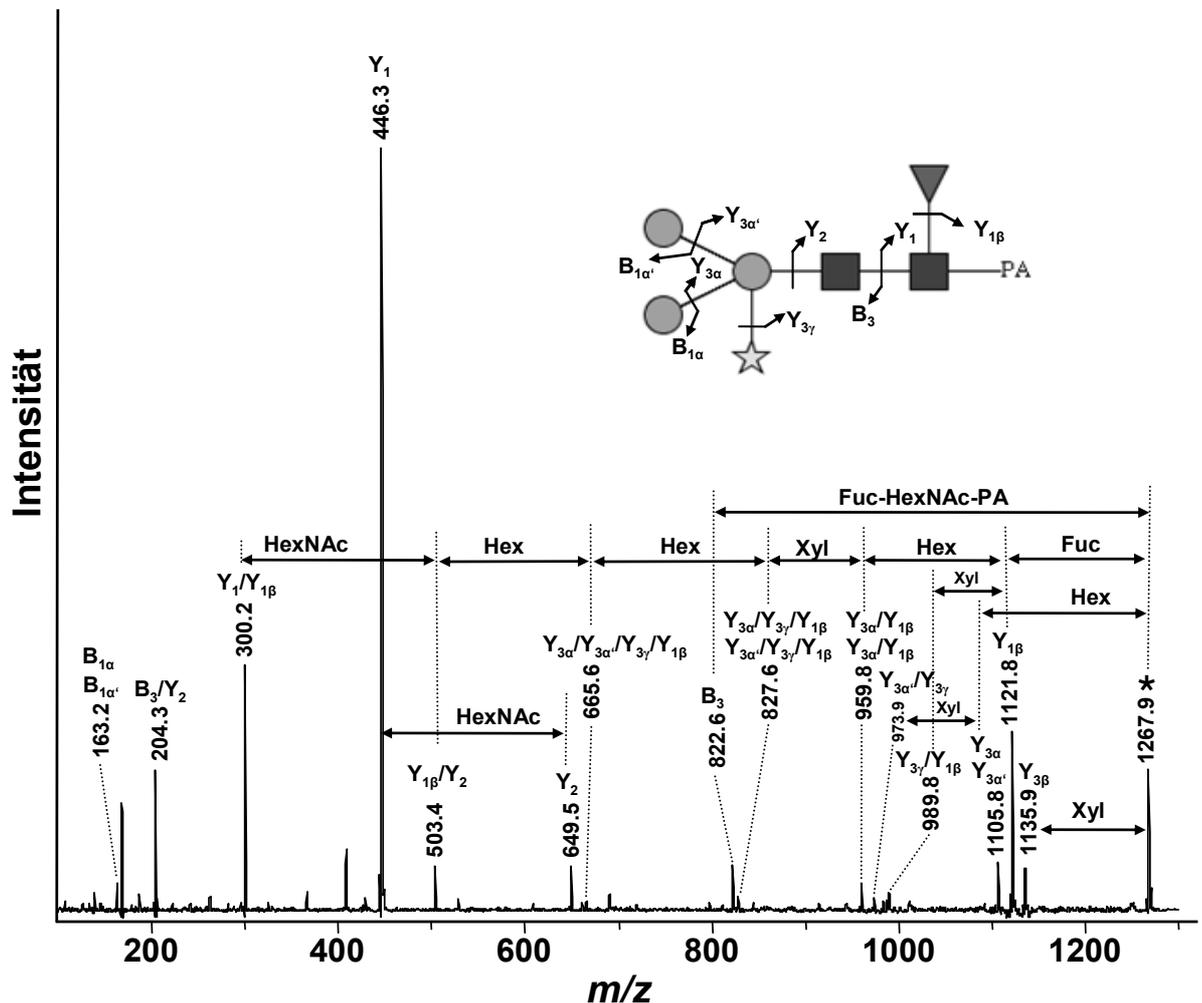


Abb. 47: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum der Spezies H_3N_2XF -PA gemessen als H^+ -Addukt der pseudomolekularen Masse m/z 1267,9. Das Y_1 -Fragment wurde als diagnostisches Fragment detektiert. Vom Vorläuferion ist in Richtung niedrigerer Masse eine 3er Fragmentengruppe zu sehen, die von terminalen Monosaccharidresten generiert wird. Zur Erklärung der Symbole siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

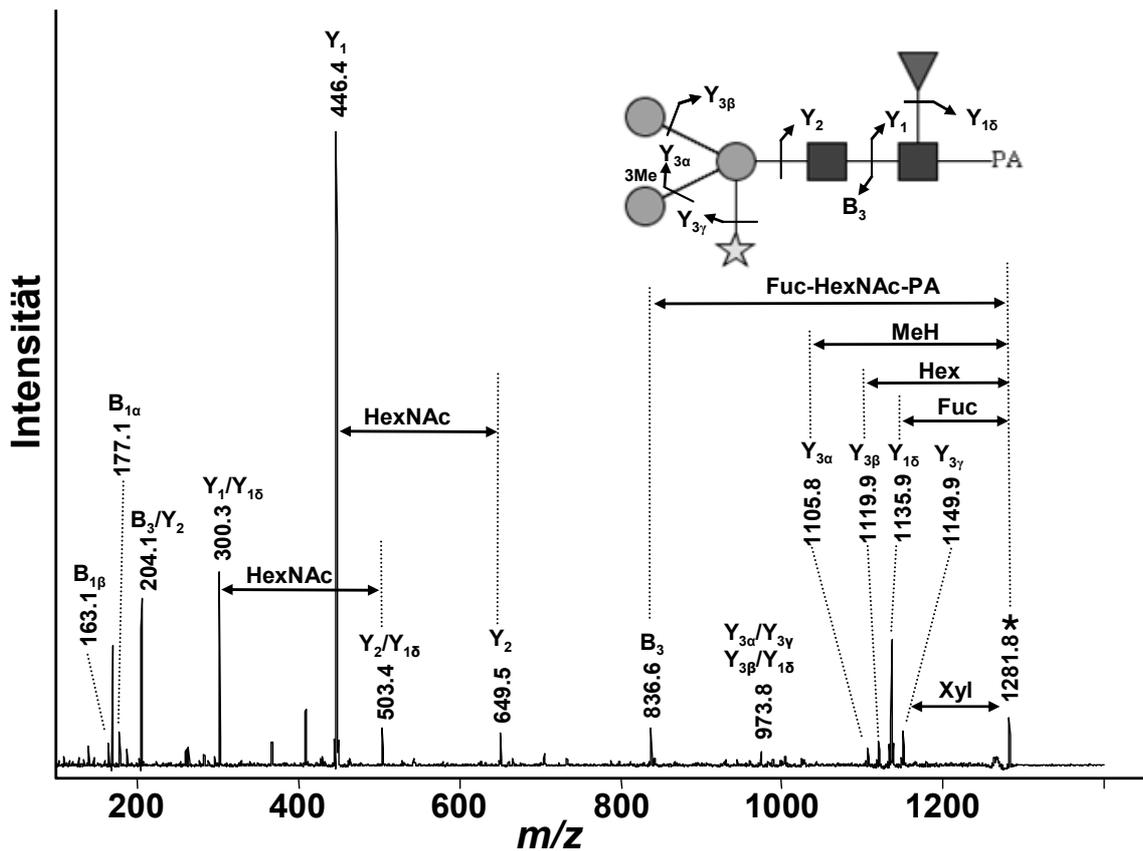


Abb. 48: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum der Spezies MeHH₂N₂XF-PA, gemessen als H⁺-Addukt der pseudomolekularen Masse m/z 1281,8. Das Y₁-Fragment wurde als diagnostisches Fragment detektiert. Vom Vorläuferion sind in Richtung niedrigerer Masse vier verschiedene Fragmentationen zu sehen, die durch Abspaltung terminaler Monosaccharidreste generiert werden. Zur Erklärung der Symbole siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

Die beiden beschriebenen N-Glykane H₃N₂XF-PA und MeHH₂N₂XF-PA (m/z 1289,4 und 1303,4 [M+Na]⁺) scheinen als Kernstrukturen in der biosynthetischen Reihe in Frage zu kommen, da Glykanspezies gefunden wurden, die mit zwei HexNAc-Resten verlängert werden und sich um das Masseninkrement von 406 Einheiten von diesen unterscheiden. Dafür sprach auch, dass von beiden Spezies das jeweils um einen HexNAc-Rest verlängerte Glykan detektiert wurde. Die LIFT-Spektren der um einen HexNAc-Rest verlängerten Spezies zeigten einen komplexeren Aufbau. Von besonderer Bedeutung war die Fragmentierung ausgehend vom Vorläuferion, das Indizien für terminale Monosaccharidreste geben sollte. Bei der Spezies m/z 1470,0 mit der Zusammensetzung H₃N₃XF-PA, wurden erwartungsgemäß die Signale beobachtet, welche aus der Abspaltung von einem terminalen HexNAc-Rest, einer Hexose, einer Xylose und einer Fucose resultieren (Abb. 49). Mit dem B_{2α}-Fragment bei m/z 366,7 wurde zudem das abgespaltene HexNAc-Hex-Disaccharid detektiert. Das Peakmuster im

LIFT-Spektrum dieser Spezies zeigte eine sequentielle Fragmentierung, die strukturelle Aussagen über das Glykan erlaubte.

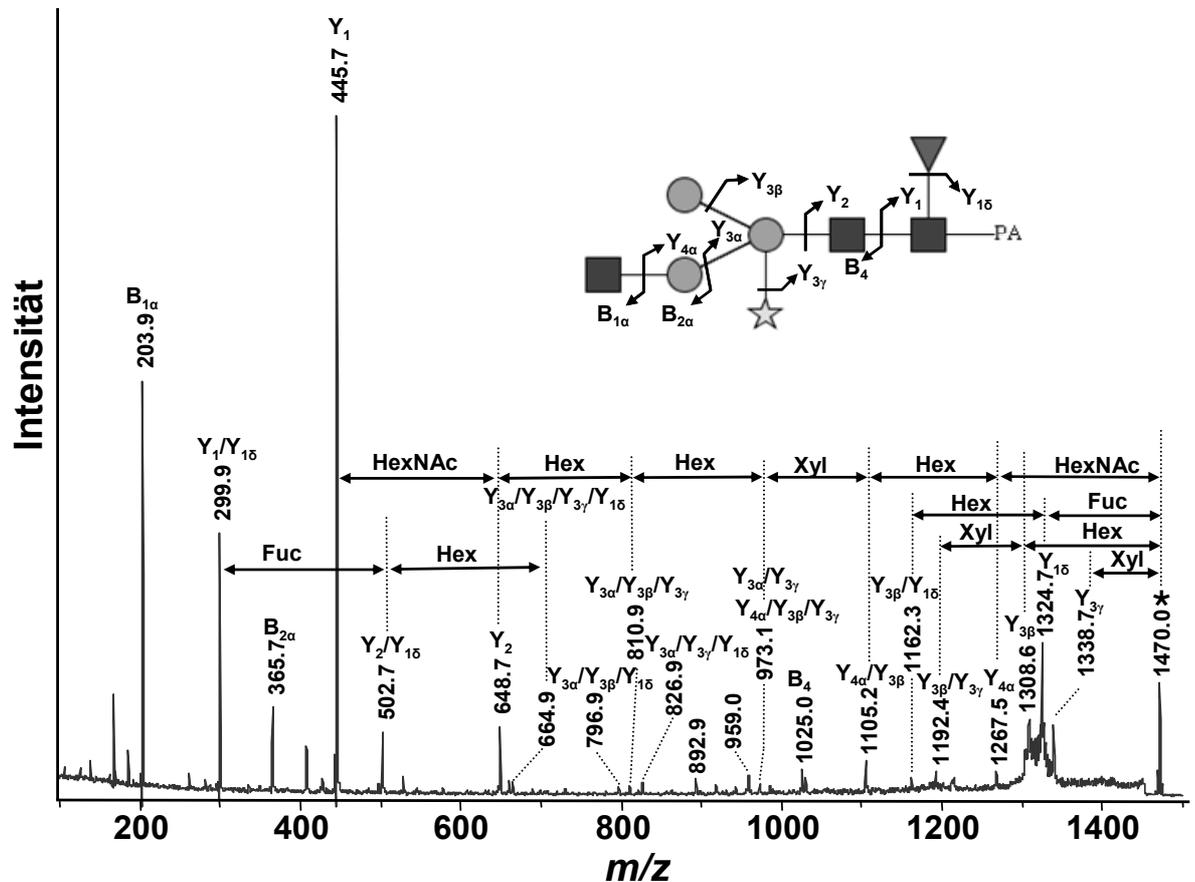


Abb. 49: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum der Spezies H₃N₃XF-PA, gemessen als H⁺-Addukt der pseudomolekularen Masse *m/z* 1470,0. Das Y₁-Fragment stellt das dominanteste Signal dar. Vom Vorläuferion ist in Richtung niedrigerer Masse eine ganze Reihe von Fragmentationen zu sehen, die durch Abspaltung terminaler Monosaccharidreste und durch sequentielle Fragmentierung generiert werden. Zur Erklärung der Symbole siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

Im LIFT-Spektrum der zweiten, um einen HexNAc-Rest verlängerten Spezies mit der pseudomolekularen Masse von *m/z* 1484,5 [M+H]⁺ war vom Vorläuferion nur die Abspaltung des HexNAc-Restes und der kerngebundenen Fucose in hohen Signalintensitäten zu beobachten (Abb. 50). Das Inset des relevanten Massenbereiches zeigt, dass auch die Methylhexose und der Xyloserest freigesetzt werden, wenn auch in deutlich geringerer Intensität. Korrespondierende B-Fragmente waren nur für den Methylhexose-Rest (B_{1β}) und den HexNAc-Rest (B_{1α}) detektierbar. Das B_{2α}-Fragment, detektiert bei *m/z* 366,1, deutete wiederum darauf hin, dass auch bei dieser Struktur die Verlängerung unter Ausbildung eines HexNAc-Hex-Disaccharid erfolgt war.

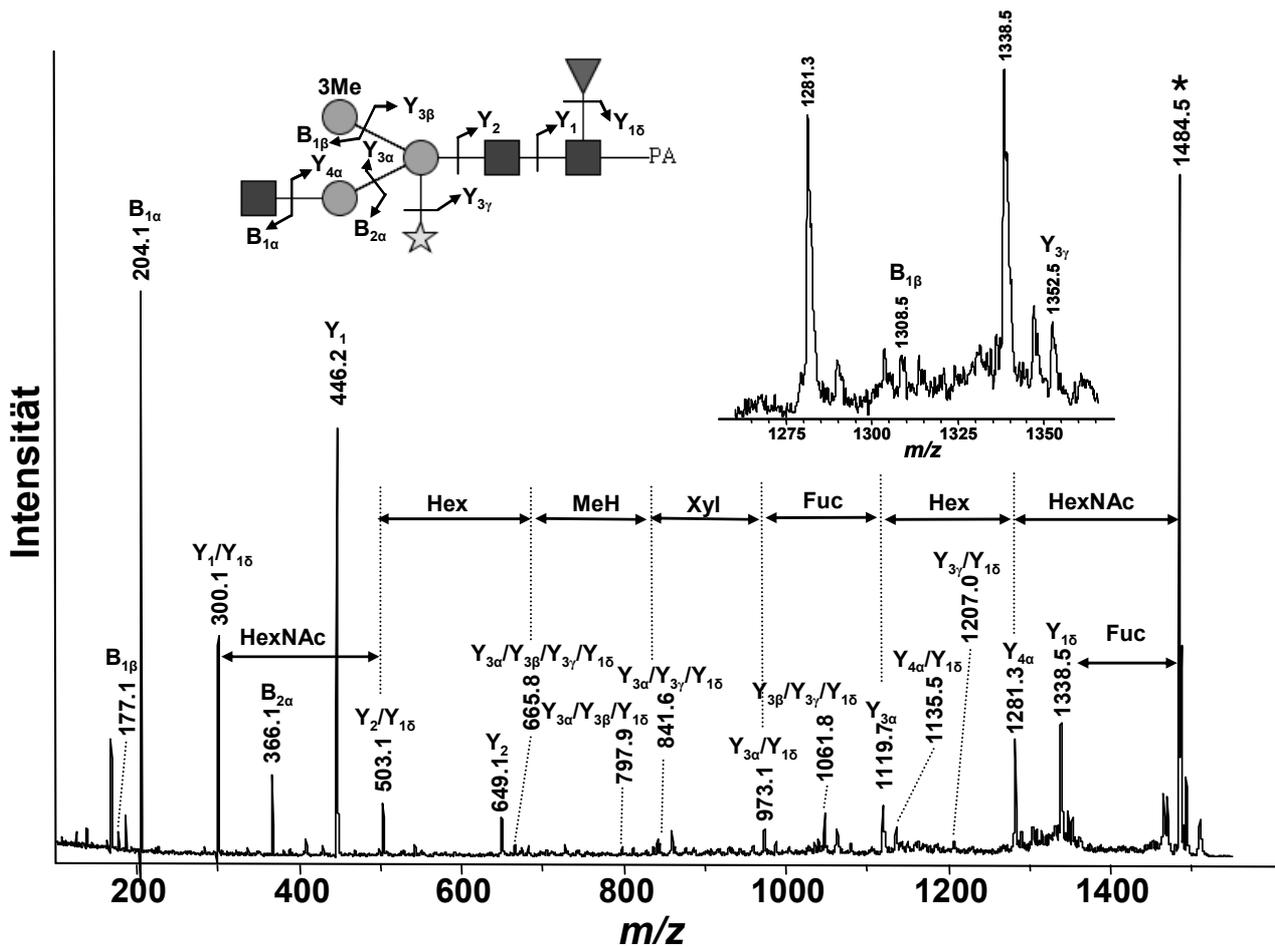


Abb. 50: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum der Spezies MeHH₂N₃XF-PA, gemessen als H⁺-Addukt der pseudomolekularen Masse m/z 1484,5. Das B_{1α}-Fragment (m/z 204,1) zeigt eine höhere Intensität als das Y₁-Fragment (m/z 446,2). Vom Vorläuferion ist in Richtung niedrigerer Masse vor allem die Abspaltung eines Fucose-Restes sowie eines HexNAc-Restes zu sehen. Zur Erklärung der Symbole siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

Die um zwei HexNAc-Reste verlängerten Spezies, die mit der Masse m/z 1674,0 ($[M+H]^+$) in den Fraktionen 27 bis 32 (Abb. 41) nachgewiesen wurde, war in sofern von Interesse, da eine massengleiche Komponente bereits im Pool der AAL-ungebundenen Glykane detektiert wurde. Das LIFT-Spektrum dieser Spezies zeigte ein dominantes Signal bei 446,0 (Y₁), das eindeutig eine Kernfucosylierung belegte (Abb. 51). Unter den diagnostisch relevanten Ionen wurde hier auch das B_{2α}-Fragment (m/z 407,0) detektiert, das die Präsenz eines terminalen HexNAc₂-Disaccharids zeigt und bisher noch bei keiner anderen Spezies aus dieser Gruppe von Glykanen gefunden wurde. Das B_{3α}-Fragment bei m/z 568,9 belegte, dass das HexNAc₂-Element an einen Hexose-Rest gebunden ist. Die um ein HexNAc₂-Element verlängerte Spezies mit der Masse m/z 1687,5 ($[M+H]^+$) wurde ebenfalls im MS/MS untersucht (Abb. 52). Vom Vorläuferion wurde die Abspaltung eines HexNAc-Restes (Y_{5α}), einer Methylhexose

($Y_{3\beta}$) und einer Fucose ($Y_{1\delta}$) beobachtet, was für deren terminales Vorliegen sprach. Unter den diagnostischen Ionen wurden das $B_{1\alpha}$ -Fragment mit m/z 204,1 als Signal der höchsten Intensität beobachtet, parallel dazu wurden auch das $B_{1\beta}$ -Fragment bei m/z 177,0, das $B_{2\alpha}$ -Fragment bei m/z 407,1 (HexNac₂-Rest) und das $Y_{5\alpha}/B_{3\alpha}$ -Fragment (HexNac-Hex) mit m/z 366,0 detektiert.

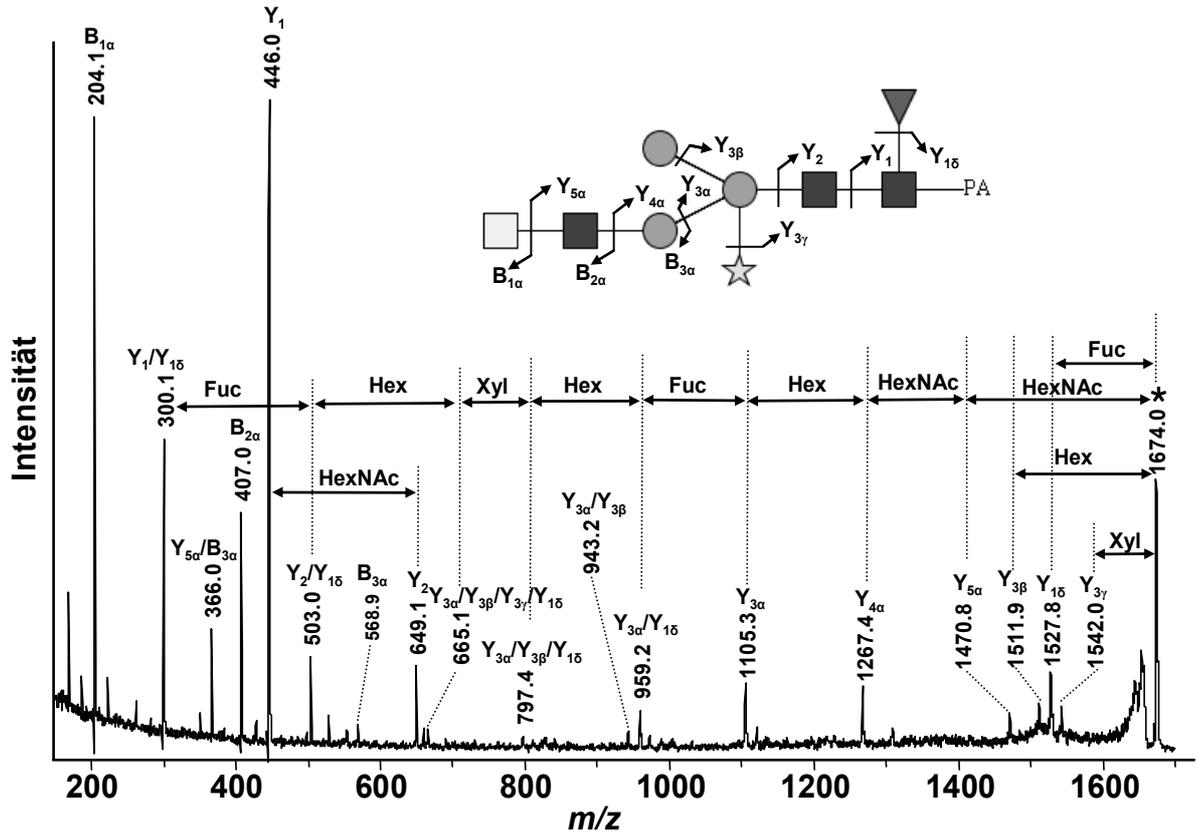


Abb. 51: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum der Spezies H_3N_4XF-PA , gemessen als H^+ -Addukt der pseudomolekularen Masse m/z 1674,0. Das $B_{2\alpha}$ -Fragment (m/z 407,0) zeigt die Abspaltung eines HexNac-Disaccharids an. Das Y_1 -Fragment (m/z 446,0) und das $B_{1\alpha}$ -Fragment (m/z 204,1) weisen nahezu gleiche Intensität auf. Vom Vorläuferion ist in Richtung niedrigerer Masse die Abspaltung der vier terminalen Monosaccharidresten verschiedener Massen zu sehen. Zur Erklärung der Symbole siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

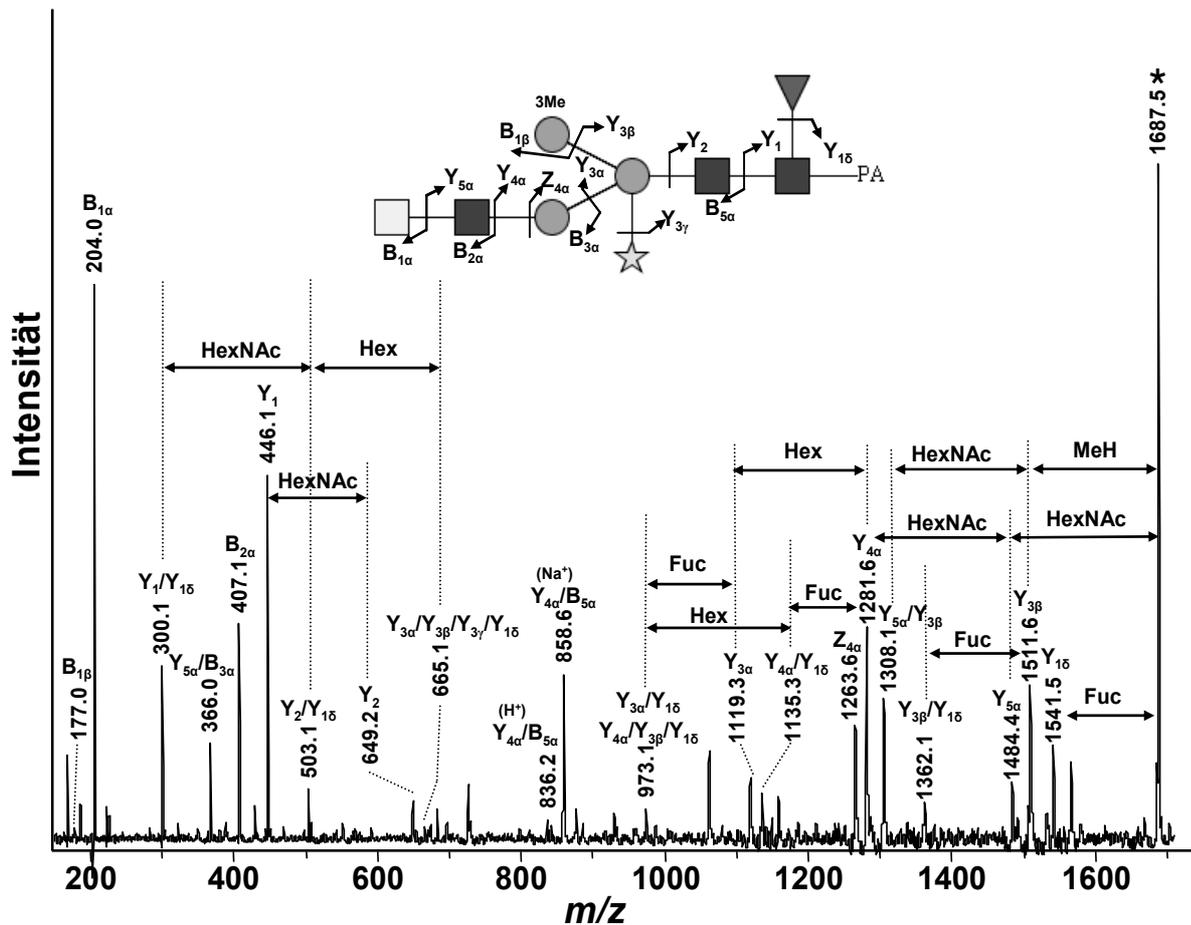


Abb. 52: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum der Spezies MeHH₂N₄XF-PA, gemessen als H⁺-Addukt der pseudomolekularen Masse m/z 1687,5. Unter den diagnostischen Fragmenten sind das B_{2α}-Fragment (m/z 407,1) und auch das Y₁-Fragment (m/z 446,1) relevant. Das B_{1α}-Fragment (m/z 204,1) zeigt zudem eine höhere Intensität als das Y₁-Fragment. Das Y_{3β}-Fragment bei m/z 1511,6 zeigt die Abspaltung einer terminalen Methylhexose vom Vorläuferion an. Zur Erklärung der Symbole siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

3.7.4.2 Charakterisierung komplexer AAL-gebundener N-Glykane

Unter diesem Punkt sollen einige Beispiele von AAL-gebundenen N-Glykanen folgen, die in ihrer Struktur als komplexer zu betrachten waren. Im Zuge einer biosynthetischen Reihe der kreuzreagierenden N-Glykane wurden in den HPLC-Fraktionen 30 bis 50 eine große Menge an N-Glykanen detektiert, die sich aus den bereits besprochenen Spezies durch Addition weiterer Monosaccharidreste herleiten lassen und damit in einem Zusammenhang stehen. Aus der Spezies H₃N₄XF-PA (m/z 1695,6 [M+Na]⁺), entstehen durch Addition eines HexNAc-Restes, einer Hexose oder einer Fucose Spezies mit den Massen m/z 1898,6 , 1857,6 und 1841,5. Diese drei Strukturen wurden zwar massenspektrometrisch detektiert, lagen aber für eine detaillierte Analyse in zu geringen Mengen vor. In Fraktion 33 wurde hingegen mit der Masse m/z 1833,5 ([M+H]⁺) ein

Glykan detektiert, das rechnerisch durch Verlängerung mit einer Fucose aus MeHH₂N₄XF-PA (m/z 1687,5) hervorgehen kann. Das MS/MS-Spektrum in Abb. 53 zeigt ein Mischspektrum, das auf die gleichzeitige Anwesenheit zweier isobarer N-Glykane zurückzuführen war, die an Hand charakteristischer Signale identifiziert werden konnten. Im Massenbereich vom Signal bei m/z 1135,2 bis zum Vorläuferion bei m/z 1834,0 generiert die Abspaltung von HexNAc-Resten und fucosylierten HexNAc-Resten charakteristische Y-Fragmente. Die dazu korrespondierenden B-Fragmente (m/z 349,9 / 552,8 / 698,8) wurden im unteren Massenbereich ebenfalls detektiert, wobei das Signal bei m/z 698,8 eindeutig das Vorhandensein einer Fuc₂HexNAc₂-Einheit indiziert. Das dominante Signal bei m/z 1135,2 passt dabei zu zwei Zusammensetzungen von H₃N₂F-PA und MeHH₂N₂X-PA, wobei die unfucosylierte Spezies mit dem entsprechenden fucosylierten Signal (m/z 1281,3) korrespondiert bzw. durch den Verlust der Methylhexose oder Xylose Signale bei m/z 959,0 oder 1003,2 generiert. Für die Anwesenheit einer Methylhexose spricht weiterhin das Auftreten eines B*_{1β}-Fragmentes mit m/z 176,9. In beiden Fällen kann durch Verlust eines weiteren Hexose-Restes ein Fragment mit m/z 973,0 (Y*_{3α}/Y_{1δ} oder Y_{3α}) entstehen. Ein Signal bei m/z 1631 ([M+H-HexNAc]⁺) war nicht nachweisbar, was die Existenz eines terminalen, unsubstituierten HexNAc-Restes ausschließt. Mit diesem LIFT-Spektrum wurde eindeutig gezeigt, dass kreuzreagierende N-Glykane nicht notwendigerweise einen Xylose-Rest tragen müssen.

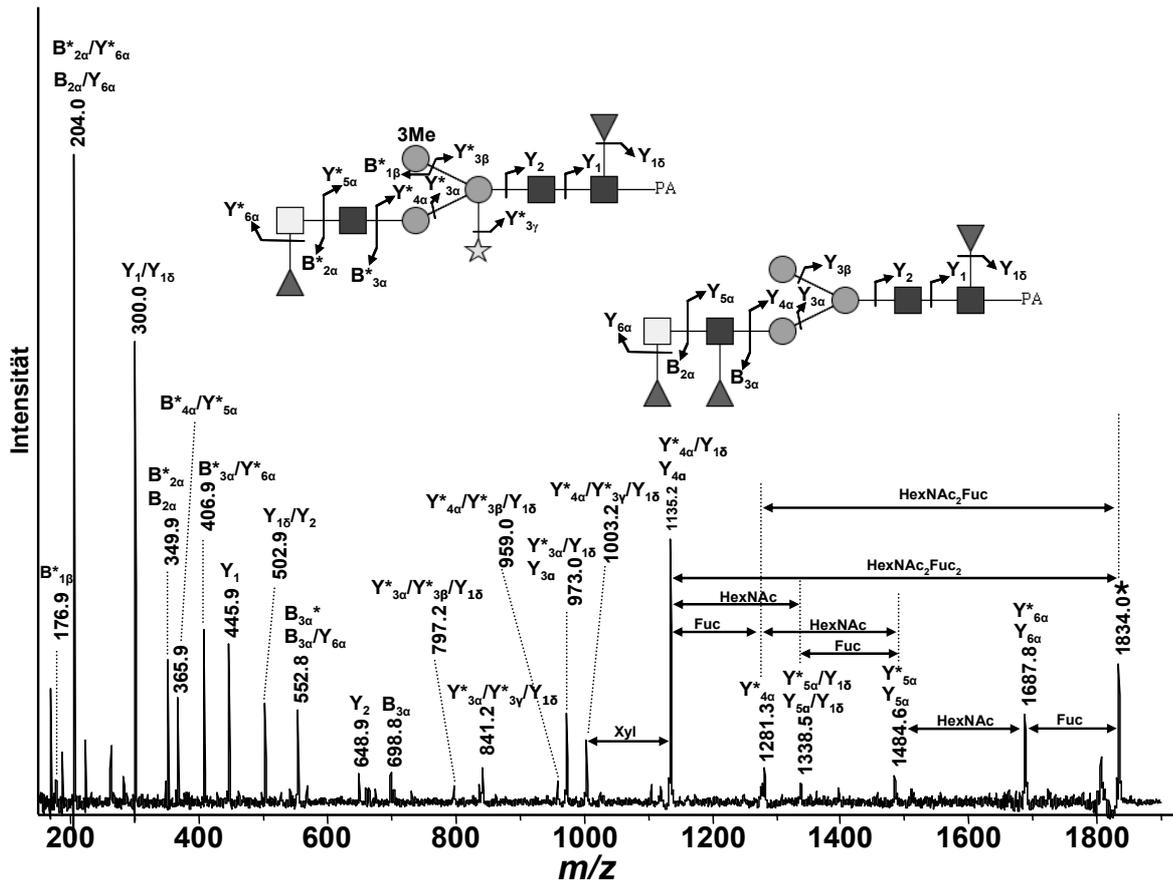


Abb. 53: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum der Spezies $H_3N_4F_3$ -PA und $MeHH_2N_4XF_2$ -PA, gemessen als Pseudomoleküle $[M+H]^+$ mit m/z 1834,0. Das Spektrum zeigt ein Gemisch an Signalen, die zum Teil auf beide isobare Spezies zutreffen. Zur Unterscheidung der Fragmente wurden die für Komponente $MeHH_2N_4XF$ -PA charakteristischen Signale mit einem Stern annotiert. Unter den diagnostisch relevanten Fragmenten sind besonders das $B^*_{2\alpha}$ -Fragment (m/z 349,9), das $B^*_{3\alpha}$ bzw. $B_{3\alpha}/Y_{6\alpha}$ -Fragment (m/z 552,8) und das $B_{3\alpha}$ -Fragment (m/z 698,8), welche allesamt monofucosylierte und difucosylierte HexNAc und HexNAc₂-Elemente anzeigen, von Interesse. Zur Erklärung der Symbole siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

Die Spezies mit den Massen m/z 1834,0 ($[M+H]^+$) können möglicherweise als Kandidaten für die Synthese von weiteren N-Glykanen höherer Masse angesehen werden. Dies schien für das kreuzreagierende N-Glykan mit der pseudomolekularen Masse $[M+H]^+$ m/z 1996,4 zutreffend, da sich diese Spezies durch die Addition einer Hexose aus der vorangegangenen Spezies rechnerisch ableiten lässt und daher als Glykan innerhalb einer biosynthetischen Reihe in Frage kommt. Das MS/MS-Spektrum dieses Oligosaccharids, fragmentiert als H^+ -Addukt bei m/z 1996,4, stellte wieder ein Mischspektrum dar. Dabei ergaben die beobachteten Signale strukturelle Informationen für zwei isobare Spezies der Zusammensetzungen $H_4N_4F_3$ -PA und $MeHH_3N_4XF_2$ -PA. Dementsprechend sah das LIFT-Spektrum vor allem im vorderen Massenbereich von m/z 200 bis 1200 recht komplex aus (Abb. 54). Zur besseren Zuordnung charakteristi-

scher Fragmente wurden diagnostisch relevante Signale von $H_4N_4F_3$ -PA mit einem Stern gekennzeichnet. Ausgehend vom Vorläuferion wurde einmal die Abspaltung von mono- und difucosylierten HexNAc₁₋₂-Elementen detektiert, wobei die korrespondierenden diagnostischen Fragmente bei m/z 350,6 ($B_{2\alpha}$ bzw. $B^*_{2\alpha}$), 553,4 ($B_{3\alpha}$ und $Y^*_{6\alpha}/B^*_{3\alpha}$ und $Y^*_{5\alpha'}/B^*_{3\alpha}$) und 698,3 ($B^*_{3\alpha}$) ebenfalls beobachtet wurden. Ferner wurde die Abspaltung einer terminalen Hexose mit dem $Y_{4\beta}$ bzw. $Y^*_{4\beta}$ -Fragment nachgewiesen. Das $B^*_{3\alpha}$ -Fragment (m/z 698,3) zeigt das Vorliegen eines N_2F_2 -Elementes auf einem Glykan an. Bei der anderen Spezies spricht die beobachtete Fragmentierung dafür, dass die Fucose am N_2 -Element in terminaler Position am GalNAc-Rest gebunden ist. Dafür spricht, dass vom Vorläuferion keine Abspaltung eines HexNAc-Restes gefunden wurde. Die Abspaltung eines Xylose-Restes vom dem Fragment mit m/z 1135,0 wird durch das Signal bei m/z 1003,8 belegt, während der Verlust des Methylhexose-Restes das Signal bei m/z 959,3 vom gleichen Vorläuferion generiert. Das Spektrum belegt weiterhin, dass die vorhandene Methylhexose subterminal vorliegt.

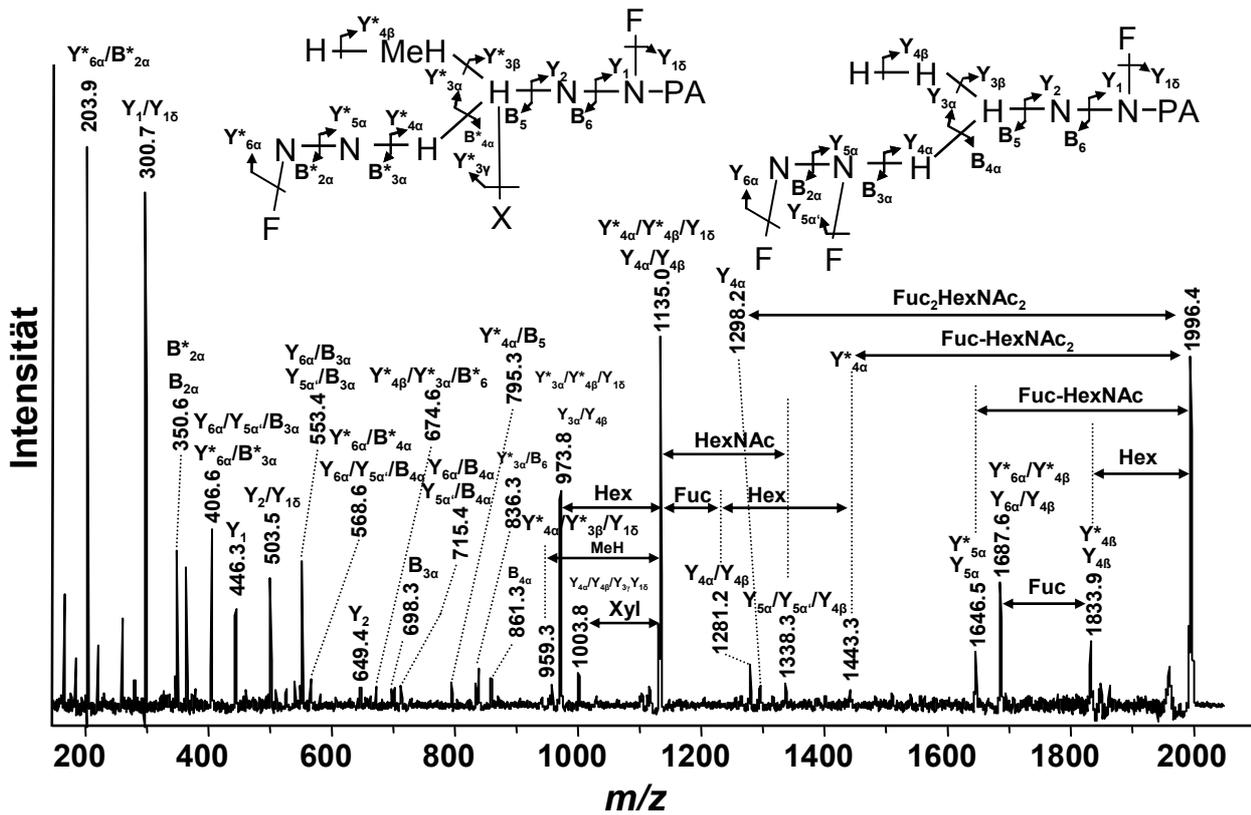


Abb. 54: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum der Spezies $H_4N_4F_3$ -PA und $MeHH_3N_4XF_2$ -PA, gemessen als Pseudomoleküle $[M+H]^+$ mit m/z 1996,4. Das Spektrum zeigt ein Gemisch an Signalen, die zum Teil auf beide isobare Spezies zutreffen. Zur Unterscheidung der Fragmente wurden die $MeHH_3N_4XF_2$ -PA betreffende Fragmente mit einem Stern annotiert. Zu den interessanten, diagnostischen Fragmenten gehören insbesondere das B_{2a} -Fragment (m/z 350,6) und das B^*_{3a} -Fragment (m/z 698,3), welche monofucosylierte und difucosylierte HexNac und HexNac₂-Elemente anzeigen. Aus Platzgründen wurde die Glykanstruktur zur Einzeichnung der Fragmentierungen in Textform abgebildet. Zur Erklärung der Kurzschreibweise siehe Bildunterschrift zur Abb. 17.

Unter den AAL-gebundenen kreuzreagierenden N-Glykanen zeigte sich schon im Massenspektrum des Gesamtpools Abb. 17 C, dass zwei Spezies mit den pseudomolekularen Massen $[M+Na]^+$ m/z 2179,4 und 2220,6 als Hauptkomponenten vorliegen, die mittels MS/MS weiter analysiert wurden und als repräsentative Strukturen höhermolekularer kreuzreagierender N-Glykane besprochen werden sollen. Die Berechnung der Monosaccharidzusammensetzung ergab $MeHH_4N_4XF_2$ -PA bzw. $MeHH_3N_5XF_2$ -PA, wobei die Massendifferenz auf einen Hex-HexNac-Austausch zurückzuführen war.

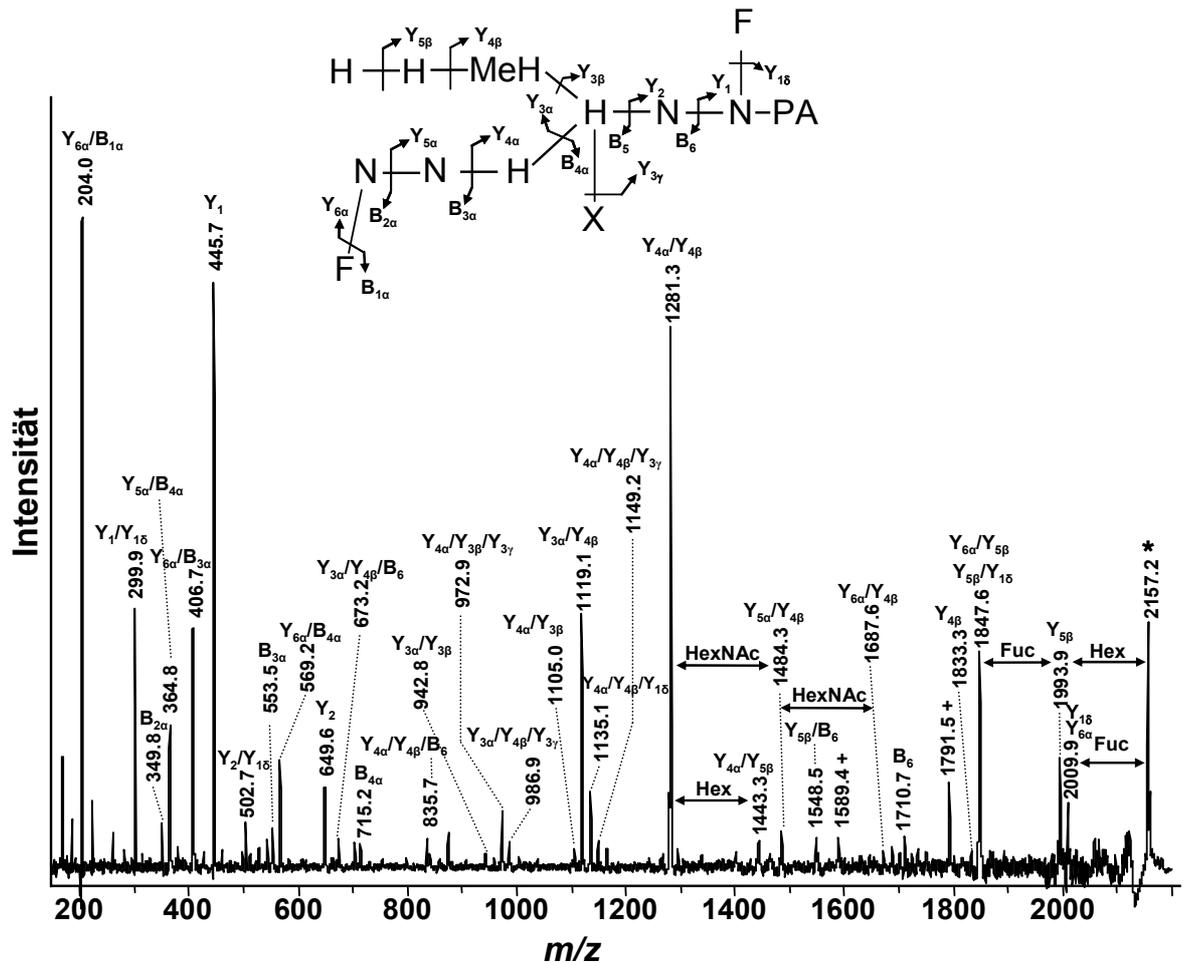


Abb. 55: MALDI-MS/MS (LID-Modus) Spektrum der Spezies MeHH₄N₄XF₂-PA gemessen als H⁺-Addukt der pseudomolekularen Masse m/z 2156,2. Das Spektrum zeigt besonders intensive Signale bei m/z 1281,3 (Y_{4 α} /Y_{4 β}), 445,7 (Y₁) und 204,0 (B_{1 α}). Als diagnostische Fragmente sind das B_{2 α} -Fragment (m/z 349,8) und auch das B_{3 α} -Fragment (m/z 553,5) zu nennen. Die mit einem „+“ markierten Fragmente lassen sich aus der vorgeschlagenen Struktur nicht ableiten und sind möglicherweise auf eine Nebenkomponenten zurückzuführen. Aus Platzgründen wurde die Glykanstruktur zur Einzeichnung der Fragmentierungen in Textform abgebildet. Zur Erklärung der Kurzschreibweise siehe Bildunterschrift zur Abb. 17.

Das MS/MS-Spektrum der Spezies MeHH₄N₄XF₂-PA (H⁺-Addukt mit m/z 2157,2) zeigte ein komplexes Bild an Y- und B-Fragmenten (Abb. 55). Vom Vorläuferion ergab die Abspaltung eines terminalen Hexose-Restes und einer Fucose zwei Signale bei m/z 1993,9 (Y_{5 β}) und 2009,9 (Y₁₆ oder Y_{6 α}). Das dominante Signal bei m/z 1281,3 (Y_{4 α} /Y_{4 β}) kann durch einen Doppelbruch entstehen und entspricht der Zusammensetzung MeHH₂N₂XF-PA. Es repräsentiert so die Kernstruktur, die bereits bei den kleineren AAL-gebundenen Glykanen detektiert wurde. Ausgehend von diesem Fragment wurden auch Signale gefunden, die der Kernstruktur plus Hexose (m/z 1443,3 Y_{4 α} /Y₅) bzw. HexNac-Rest (1484,3 Y_{5 α} /Y_{5 β}) entsprechen. Ausgehend von Fragment m/z 1281,3 war neben der Abspaltung einer Fucose (m/z 1135,1), einer Hexose (m/z

1119,1) weiterhin ein Verlust des Xylose-Restes bei m/z 1149,2 ($Y_{4\alpha}/Y_{4\beta}/Y_{3\gamma}$) und des Methylhexose-Restes (m/z 1105,0 $Y_{4\alpha}/Y_{3\beta}$) zu beobachten, wobei die Abspaltung beider Monosaccharidreste vom Molekülion nicht feststellbar war. Das Fehlen eines Signals bei m/z 699 deutete darauf hin, dass es kein N_2F_2 -Fragment in terminaler Position gibt, während die Signale bei m/z 349,8 ($B_{2\alpha}$) und 553,5 ($B_{3\alpha}$) NF- und N_2F -Elemente in terminaler Position belegen. Die Detektion der charakteristischen, diagnostischen Ionen für fucosylierte HexNAc₂-Element erlaubte aus dem MS/MS-Spektrum nicht die exakte Zuordnung des Fucose-Restes zum terminalen oder subterminalen HexNAc-Rest. Das Fehlen eines $[M+H-HexNAc]^+$ -Ion macht jedoch sehr wahrscheinlich, dass der Fucose-Rest mit dem terminalen HexNAc-Rest verknüpft war.

Das MS/MS-Spektrum der Spezies MeHH₃N₅XF₂-PA, gemessen als Pseudomolekül $[M+H]^+$ bei m/z 2198,8, zeigte in vielen Bereichen ein ähnliches Fragmentierungsmuster wie das um 41 Masseneinheiten kleinere N-Glykan (Abb. 56). Unterschiede waren insbesondere hinsichtlich der Abspaltung terminaler Monosaccharidreste vom Vorläuferion zu beobachten. Die Fragmentionen bei m/z 1995,8 ($Y_{5\alpha}$) werden durch einen Verlust von HexNAc (m/z 2052,8 $Y_{5\alpha}'$ oder $Y_{1\delta}$) oder Fucose generiert. Abspaltung eines terminalen Hexose-Restes wurde nicht detektiert. Erst das Signal bei m/z 1833,0 ($Y_{4\beta}$) kennzeichnet mit einer Massendifferenz von 162 den Verlust eines Hexose-Restes. Bis zum Signal bei m/z 1687,9 kennzeichnen die Masseninkremente zwischen den einzelnen Peaks die Abspaltung von HexNAc-, Hexose- und Fucose-Resten. Die Massendifferenz zwischen den Signalen bei m/z 1687,9 und m/z 1281,6 entspricht mit 406 einem HexNAc₂-Disaccharid, dessen Präsenz durch das dazwischenliegende Signal bei m/z 1484,7 ($Y_{4\alpha}/Y_{5\beta}$) belegt wird. Wie bei der zuvor beschriebenen Spezies wurde die Abspaltung der Methylhexose auf der Stufe von Fragment m/z 1281,6 beobachtet, was zu einem Signal bei m/z 1105,4 ($Y_{4\alpha}/Y_{3\beta}$) führte. Ergänzend sei erwähnt, dass im vorderen Massenbereich wiederum die diagnostisch relevanten Fragmentionen bei m/z 350,2 ($Y_{5\alpha}/B_{2\alpha}$), 553,3 ($B_{2\alpha}$) detektiert wurden, die ein fucosyliertes HexNAc₂-Element anzeigen. Es ist jedoch anzumerken, dass das erhaltene MS/MS-Spektrum auch mit einer isomeren Struktur kompatibel wäre, bei der die äußere Fucose mit dem terminalen HexNAc-Rest verknüpft ist und HexNAc in der oberen Antenne in terminaler Position vorliegt. Entsprechende Fragmentionen wurden mit einem

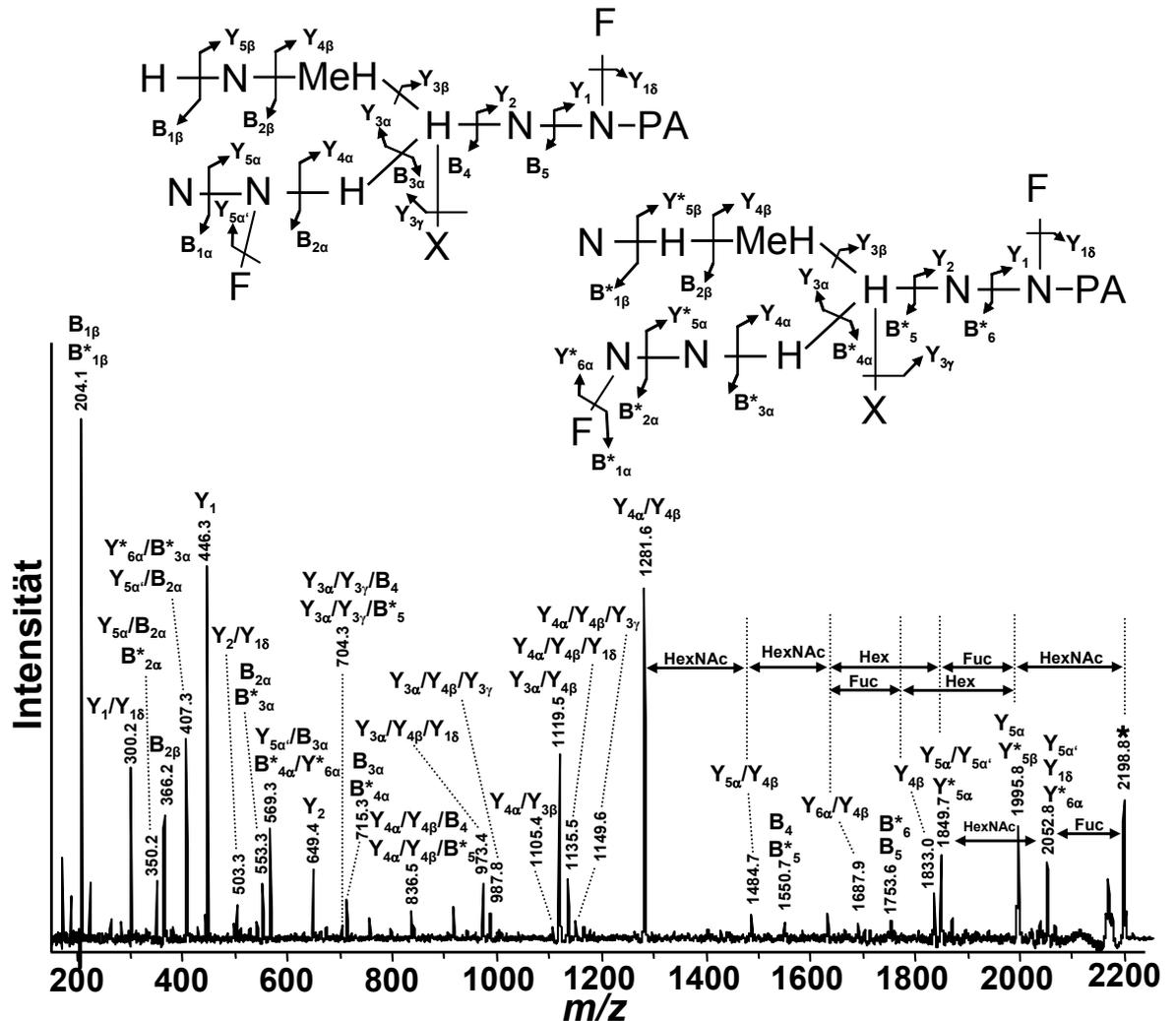


Abb. 56: MALDI-MS/MS (LID) Spektrum der Spezies MeHH₃N₅XF₂-PA, gemessen als H⁺-Addukt der pseudomolekularen Masse m/z 2198,8. Die Signale passen zum Teil auf beide Strukturvorschläge. Im Spektrum sind besonders intensive Signale bei m/z 1281,6 (Y_{4α}/Y_{4β}), 446,3 (Y₁) und 204,1 (B_{1α} oder B^{*}_{1β}) zu beobachten. Als diagnostische Fragmente sind die Fragmentationen m/z 350,2 (NF) und m/z 553,3 (N₂F) von Interesse. Die Fragmente, welche auf die alternative (untere) Struktur zutreffen, wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Aus Platzgründen wurden die Glykanstrukturen zur Einzeichnung der Fragmentierungen in Textform abgebildet. Zur Erklärung der Kurzschreibweise siehe Bildunterschrift zur Abb. 17.

3.7.4.3 Untersuchungen AAL-gebundener N-Glykane mittels MALDI-TOF-MS/MS (heCID) und Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie

Von den AAL-gebundenen kreuzreagierenden N-Glykanen wurden drei Vertreter, die alle eine Methylhexose aufweisen, mittels MALDI-TOF-MS/MS im CID-Modus untersucht. Dabei sollte die Frage geklärt werden, welche Antenne das HexNAc-HexNAc-Element trägt. Untersucht wurden mit MeHH₂N₂XF-PA ([M+Na]⁺ m/z 1303,4),

MeHH₂N₃XF-PA ($[M+Na]^+$ m/z 1506,4) und MeHH₃N₅XF₂-PA ($[M+Na]^+$ m/z 2220,6), die sich im Sinne einer biosynthetischen Reihe auseinander herleiten lassen.

Das CID-Spektrum der Spezies mit $[M+Na]^+$ von m/z 1303,4 zeigte ein besonders intensives Signal bei m/z 858,3, das durch Abbruch eines Fuc-HexNAc-PA Fragments entstand (Abb. 57). Verlust des Fucose-Restes erzeugte als Y₁₆-Fragment bei m/z 1157,5 ebenfalls ein dominantes Signal. Neben diesen beiden Y-Bruchstücken wurden weitere Y- und B-Fragmente beobachtet. Im unteren Massenbereich wurde bei m/z 478,9 das B₂/Y_{3α}-Fragment detektiert, das als D-Ion in Frage kommt. Die korrespondierenden A-Ringfragmente wurden bei 245,0 (^{0,4}A₂) und 258,9 (^{3,5}A₂) detektiert und belegten, dass am C6-Atom der zentralen β-gebundenen Mannose ein Hexose-Rest lokalisiert ist. Gleichzeitig wurde damit auch bewiesen, dass die Methylhexose mit dem C3-Atom der zentralen Mannose verknüpft ist.

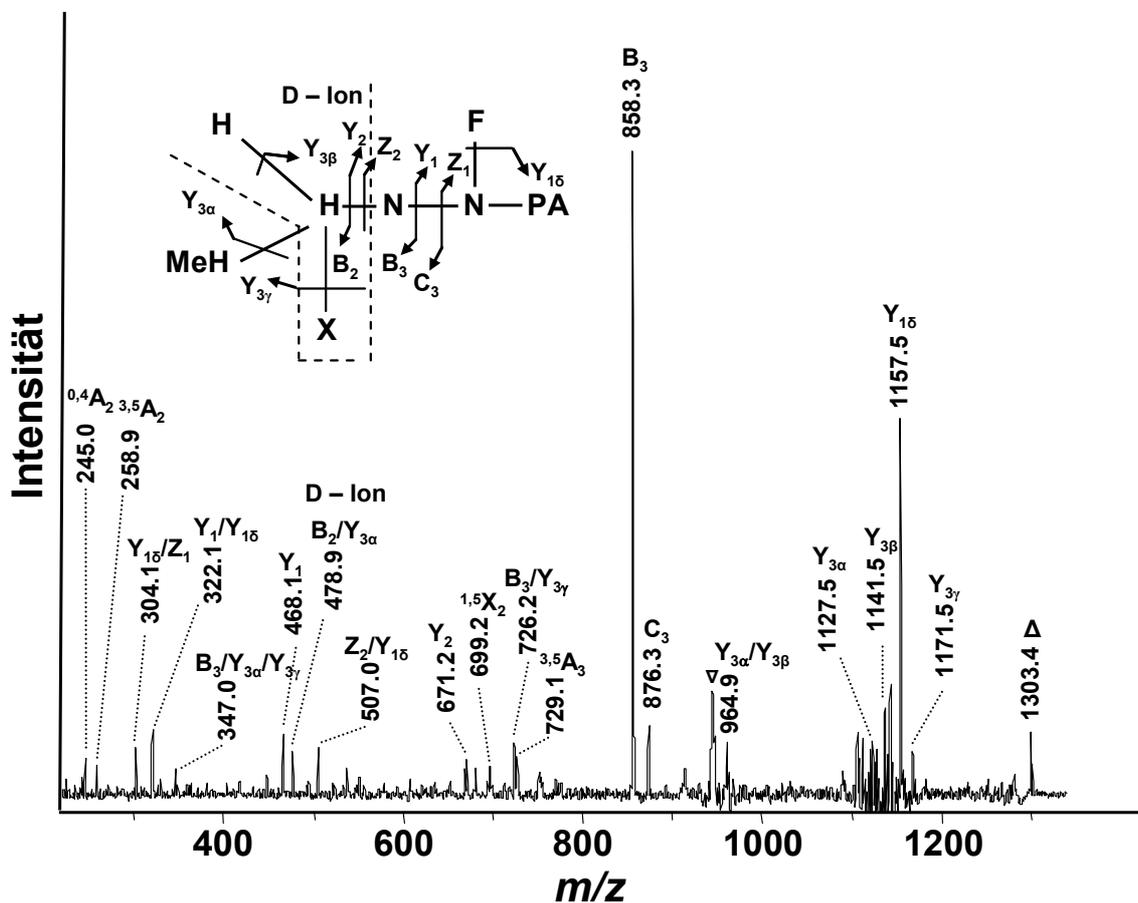


Abb. 57: MALDI-MS/MS (CID) Spektrum der Spezies MeHH₂N₂XF-PA, gemessen als Na⁺-Addukt der pseudomolekularen Masse m/z 1303,4. Im Spektrum ist ein besonders intensives Signal bei m/z 858,3 (B₃) zu beobachten. Als diagnostische Fragmente sind das „D-Ion“ (B₂/Y_{3α}) bei m/z 478,9 und die dazugehörigen A-Ringfragmente ^{0,4}A₂ bei m/z 245,0 und ^{3,5}A₂ bei m/z 258,9 von Relevanz. ∇ = aus angegebener Struktur ließ sich dieser Peak nicht zuordnen. Aus Platzgründen wurde die Glykanstruktur zur Einzeichnung der Fragmentierungen in Textform abgebildet. Zur Erklärung der Kurzschreibweise siehe Bildunterschrift zur Abb. 17.

Da von dieser Glykanspezies eine ausreichende Menge zur Verfügung stand, konnte zur Ergänzung noch eine Untersuchung mittels ESI-IT-MS durchgeführt werden, welche die mittels MALDI-TOF-MS generierten Ionen bestätigte. Im ESI-Spektrum (Abb. 58 C), welches das MS³ des B₃-Ions (*m/z* 858,2) zeigt (Abb. 58 A), wurden neben dem D-Ion bei *m/z* 479,3 auch die passenden A-Ringfragmente bei *m/z* 245,0 (^{0,4}A₂) und 259,2 (^{3,5}A₂) detektiert, wobei die Ringbruchstellen in Abb. 58 B strukturell beschrieben sind und in Abb. 58 C in ihrer Intensität 2-fach verstärkt abgebildet wurden. Weiterhin waren im ESI-IT-MS³-Spektrum des B₃-Ions A- und auch X-Fragmentierungen zu beobachten, die im CID-Spektrum ebenfalls detektiert wurden.

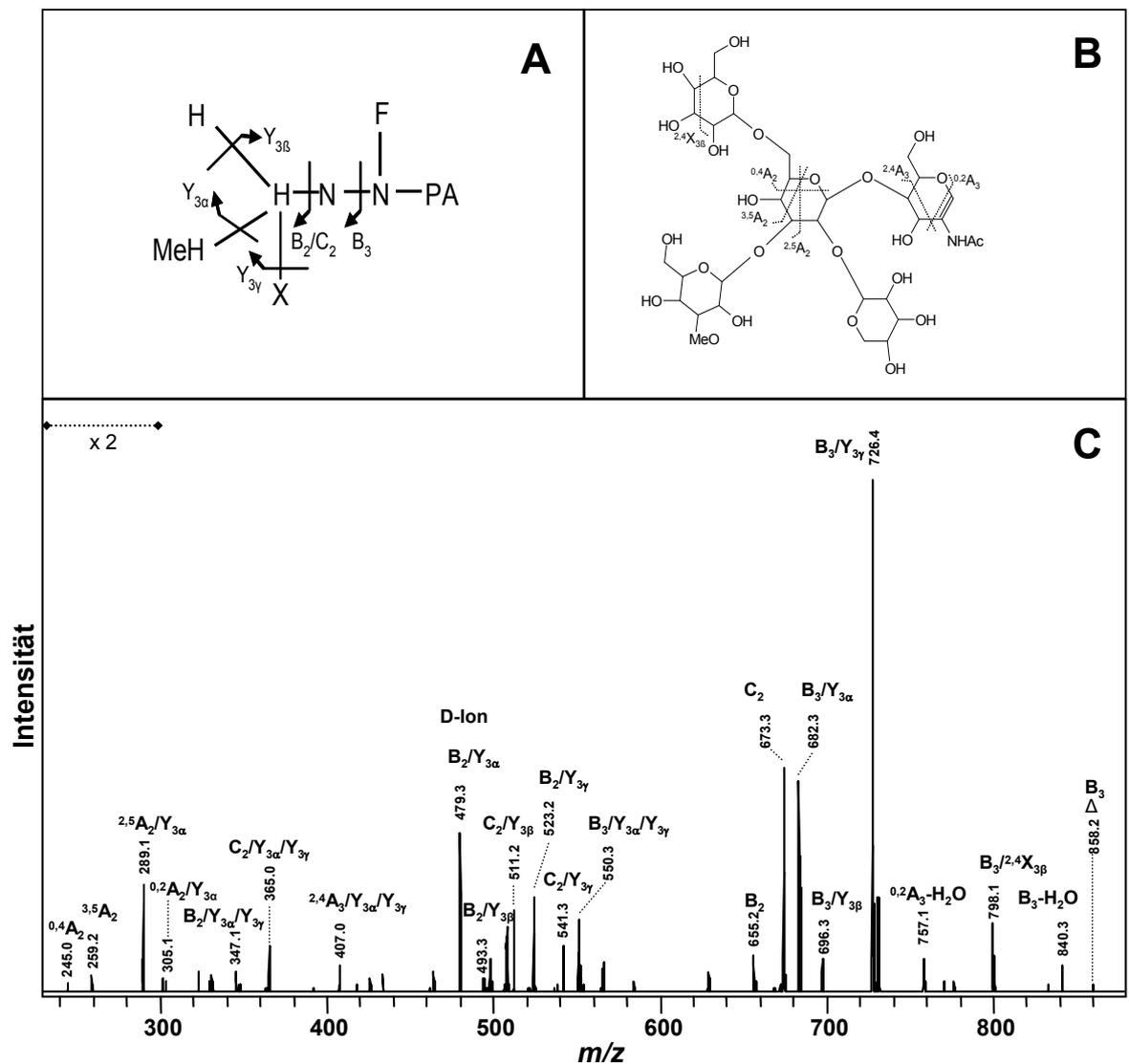


Abb. 58: ESI-IT-MS³ Spektrum vom B₃-Fragmentation der Spezies MeHH₂N₂XF-PA (A) gemessen als Na⁺-Addukt mit *m/z* 858,2 (C). Im Spektrum sind neben dem D-Ion bei *m/z* 479,3 (B₂/Y_{3α}) auch die korrespondierenden A-Ringfragmente bei *m/z* 245,0 (^{0,4}A₂) und *m/z* 259,2 (^{3,5}A₂) zu sehen. Die Bruchstellen, die zur Entstehung der relevanten A-Ringfragmente beitragen, sind in (B) dargestellt.

Wie bereits gezeigt wurde (Abb. 48), kommt neben der Spezies MeHH₂N₂XF-PA (m/z 1303,4 [M+Na]⁺) auch ein um einen HexNAc-Rest verlängertes N-Glykan vor. Mittels MALDI-TOF-MS/MS im CID-Modus sollte geklärt werden, an welcher Antenne die Verlängerung erfolgt. Vorliegende MS/MS-Daten hatten bereits gezeigt, dass die Methylhexose hier nicht substituiert ist, da die Spezies MeHH₂N₃XF-PA mit der Masse ([M+H]⁺) von m/z 1484,5 im LIFT-Spektrum (Abb. 48) ein Signal bei m/z 177,1 (B_{1β}) erzeugte sowie vom Molekülion direkt ein Methylhexose-Rest abgespalten wurde. Diese Spezies wurde nun als Pseudomolekülion [M+Na]⁺ mit m/z 1506,9 im CID-Modus gemessen. Das MS/MS-Spektrum zeigte ein besonders intensives Signal durch das B₄-Fragmentation bei m/z 1061,2 (Abb. 59). Während das Spektrum zahlreiche Signale enthielt, die durch Doppelbrüche generiert wurden, galt das Augenmerk besonders dem möglichen D-Ion und den dazugehörigen Ringfragmenten. Bei dem im Vergleich zu Spezies 1303,4 einen HexNAc-Rest längerem N-Glykan wurde ein D-Ion (Y_{3α}/B₃-Fragment) der Masse bei m/z 493,0 detektiert, was dafür spricht, dass der Methylhexose-Rest mit C6 der zentralen Mannose verknüpft ist (Abb. 59 Inset). Zwar wurde das D-Ion nur schwach detektiert, dennoch aber auch die korrespondierenden A-Ringfragmente bei m/z 258,9 (^{0,4}A₃) und 273,0 (^{3,5}A₃) sowie das um einen Xylose-Rest kleinere Fragment (B₃/Y_{3β}/Y_{3γ}) bei m/z 361,4 nachweisbar. Darüber hinaus wurden mit dem B₄/Y_{4α}/Y_{3β}-Fragment bei m/z 681,9 und dem B₄/Y_{3α}-Fragment bei m/z 696,0 weitere strukturell relevante Signale detektiert. Insgesamt zeigen die Ergebnisse sehr deutlich, dass der HexNAc-Rest mit der unteren, an C3 der zentralen Mannose gebundenen Hexose verknüpft ist.

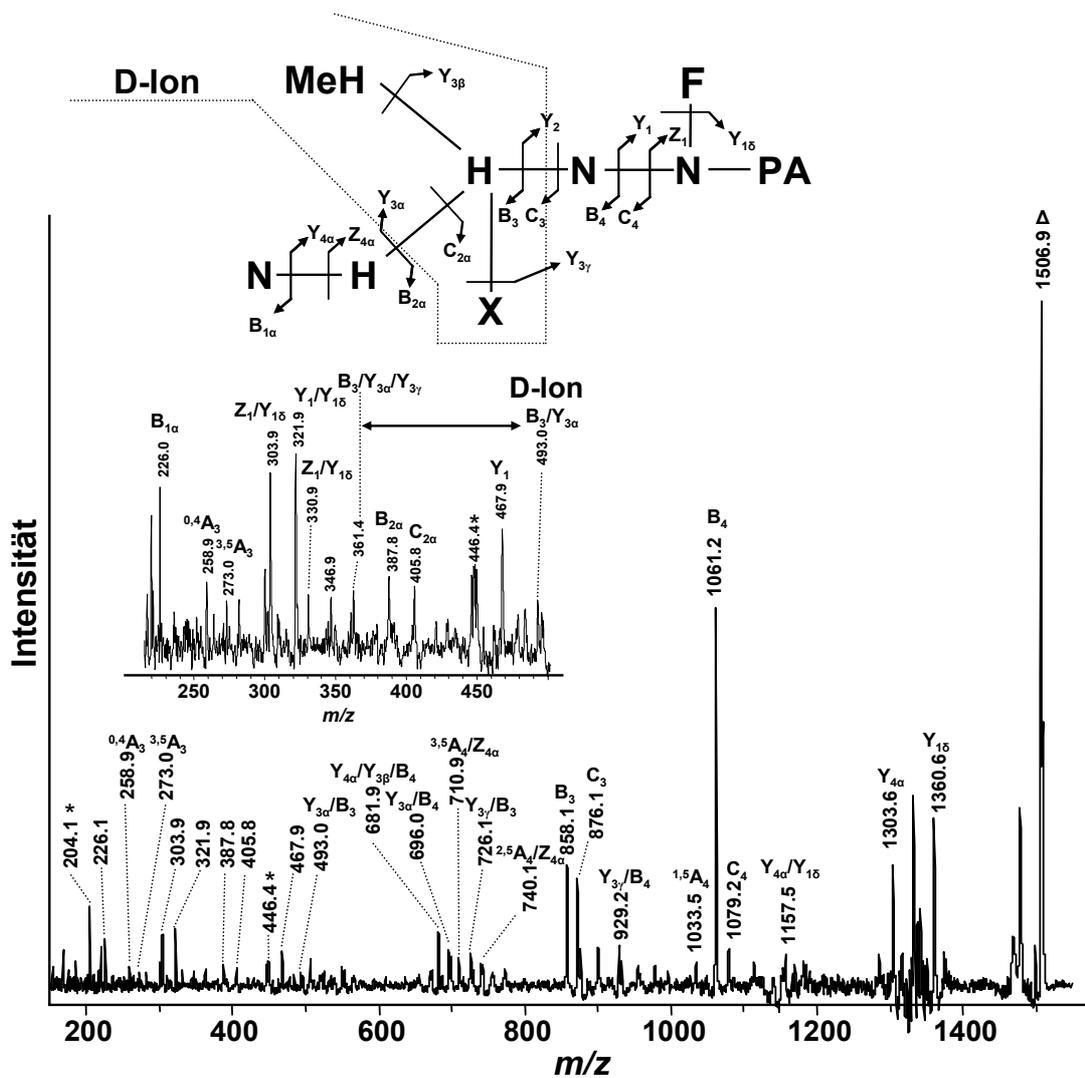


Abb. 59: MALDI-MS/MS (CID-Modus) Spektrum der Spezies MeHH₃N₃XF-PA gemessen als Na⁺-Addukt der pseudomolekularen Masse m/z 1506,9. Im Spektrum ist das B₄-Fragmentation bei m/z 1061,2 zu sehen. Als diagnostische Fragmente sind das „D-Ion“ (B_{2α}/Y_{3α}) bei m/z 493,0 und die dazugehörigen A-Ringfragmentierungen ^{0,4}A₃ bei m/z 258,9 und ^{3,5}A₃ bei m/z 273,0 von Relevanz (siehe Inset).

Im Fall des N-Glykans MeHH₃N₅XF₂-PA lieferte bereits das MS/MS-Spektrum nach Laser-induzierter Dissoziation Hinweise darauf, dass der Methylhexose-Rest nicht terminal vorliegt, sondern erst von bereits generierten Ionen freigesetzt wird. Die vorhandene Menge an diesem Glykan erlaubte es, eine MS-Analyse im CID-Modus durchzuführen (Abb. 60). Beim MS/MS-Spektrum dieser Spezies als Na⁺-Addukt gemessen, handelt es sich um ein Mischspektrum, in dem auch H⁺-Addukte detektiert wurden. Der relevante Bereich wird, weil die Signale dort im Vergleich zum Vorläuferion in bedeutend geringerer Intensität detektiert wurden, im Spektrum und Inset 3-fach verstärkt gezeigt (Abb. 60 Inset). Nachfolgend sollen nur die relevanten Ionen besprochen werden, die für die Position des HexNAc-HexNAc-Epitops relevant sind. Unter

den dominanten Fragmenten führte die Abspaltung eines Hex-HexNAc-Fragments ($Y_{4\beta}$) zu einem Signal bei m/z 1855,5, wobei das korrespondierende $B_{2\beta}$ -Fragment bei m/z 387,7 ebenfalls detektiert wurde. Ferner wurde mit dem $B_{1\alpha}$ -Fragment bei m/z 225,7 ein terminaler HexNAc-Rest nachgewiesen. Weitere Fragmente wurden durch Y-Fragmentierung sowie A- und X-Ringfragmentierungen generiert. Die beobachteten Signale erlaubten die Zuordnung der „HexNAc-HexNAc-tragenden“ Antenne. Mit einer Masse von m/z 857,8 wurde das „D-Ion“ detektiert, dessen relevante A-Ringfragmentierungen bei m/z 624,0 ($^{0,4}A_4$) und 637,9 ($^{3,5}A_4$) erfasst wurden (Abb. 60 Inset). Zudem wurde die Abspaltung eines Xylose-Restes vom D-Ion bei m/z 725,9 ($B_4/Y_{3\alpha}/Y_{3\gamma}$) detektiert. Weitere relevante Fragmentationen wurden mit dem $B_{2\beta}$ -Fragment bei m/z 387,7 und auch bei m/z 1303,3 ($Y_{4\alpha}/Y_{4\beta}$), als Pseudomolekül $[M+Na]^+$, gemessen. Die erhaltenen Resultate wären aber auch mit einem Strukturisomer kompatibel, bei dem der HexNAc-Rest der oberen Antenne in terminaler Position vorliegt und der äußere Fucose-Rest mit dem terminalen HexNAc-Rest der unteren Antenne verknüpft ist.

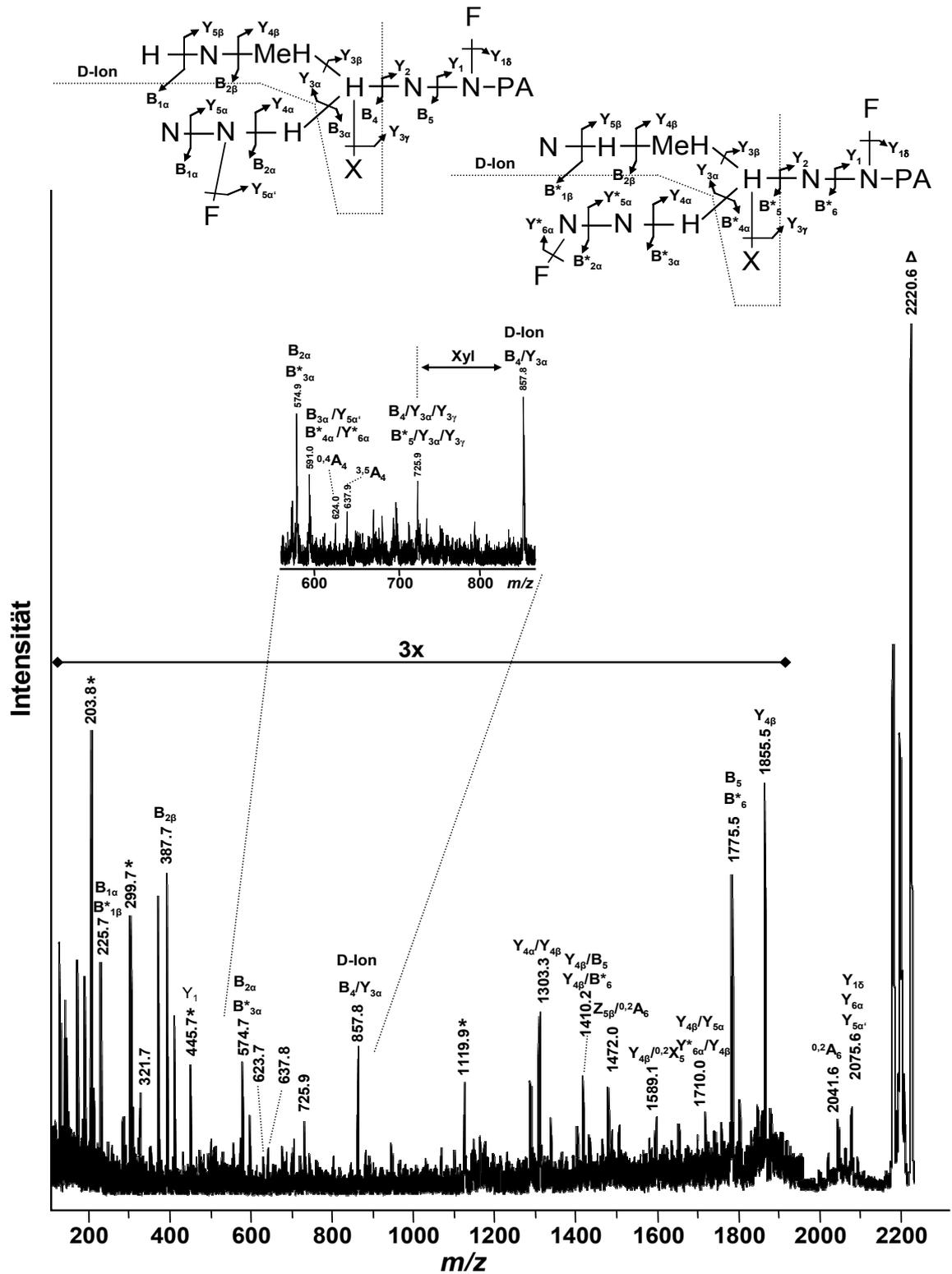


Abb. 60: MALDI-MS/MS (CID-Modus) Spektrum der Spezies MeHH₃N₅XF₂-PA gemessen als Na⁺-Addukt der pseudomolekularen Masse m/z 2220,6. Das Inset zeigt das zur strukturellen Charakterisierung relevante „D-Ion“ (B₄/Y_{3α}) bei m/z 857,8, bestehend aus MeHH₂NX und die dazugehörigen A-Ringfragmentierungen ^{0,4}A₄ bei m/z 624,0 und ^{3,5}A₃ bei m/z 637,9.

3.7.4.4 Behandlung komplexer AAL-gebundener N-Glykane mit Exoglykosidasen und HF

Die Ergebnisse der Behandlung einiger ausgewählter N-Glykane mit Exoglykosidasen und wässriger HF-Lösung sind in Abb. 61 und Abb. 63 dargestellt. Ausgangspunkt war ein Glykangemisch, das mit bekannten Vertretern aus den HPLC-Fractionen zusammengestellt worden war, was eine gleichzeitige Analyse mehrerer Glykane möglich machen sollte. Die Behandlung des Glykangemisches mit β -N-Acetylhexosaminidase führte zu einer charakteristischen Massenverschiebung von 203 Masseneinheiten, was die Abspaltung von HexNAc-Resten anzeigt, die in terminaler Position gebunden sind. Die beiden Spezies MeHH₄N₄XF₂-PA ($[M+H]^+$ m/z 2156,5) und MeHH₃N₅XF₂-PA ($[M+H]^+$ m/z 2198,7) wurden hingegen nicht umgesetzt, was entweder daran lag, dass sie kein Substrat darstellen oder aber eine sterische Hinderung vorlag. Die Behandlung mit α -Fucosidase, die besonders gut (α 1-6)-gebundene Fucose-Reste abspaltet, zeigte hingegen einen deutlichen Effekt und die Abspaltung von zahlreichen Fucose-Resten, was in Spektrum C durch die Massenverschiebungen von 146 Einheiten zu beobachten ist. Zur Überprüfung, ob die Massendifferenz zwischen m/z 2198 und 2052 auf der Abspaltung der Kernfucose basierte, wurde das Produkt im MALDI-MS/MS (LID) untersucht. Im MS/MS-Spektrum, in welchem nur die relevanten Signale annotiert sind, kennzeichnete das Signal bei m/z 300,1, dass keine Kernfucosylierung mehr vorlag, hingegen kennzeichneten die diagnostisch relevanten Peaks bei m/z 349,8 und 553,0 ein noch immer vorhandenes monofucosyliertes HexNAc_{1,2}-Element (Abb. 62). Deswegen war davon auszugehen, dass die α -Fucosidase Behandlung zur einer Abspaltung von Kernfucose führt. Die Behandlung der Fraktion mit HF-Lösung führte bei den Spezies MeHH₄N₄XF₂-PA (m/z 2156,5 $[M+H]^+$) und MeHH₃N₅XF₂-PA (m/z 2198,7 $[M+H]^+$) zur Massenverschiebungen um 308 und 350 Einheiten zum dominanten Signal bei m/z 1871,6 (Abb. 63 B), was rechnerisch nur durch die gleichzeitige Freisetzung von Fucose plus einem Hexose-Rest (308) bzw. Fucose plus einem HexNAc-Rest (350) ermöglicht werden kann. Im Spektrum war nach HF-Verdau auch bei anderen Spezies eine Fucose-Abspaltung zu beobachten, während ein Teil der Glykane unverändert blieb. Die Behandlung des Glykangemisches mit α - und β -Galaktosidase sowie α -Mannosidase blieb ohne Wirkung.

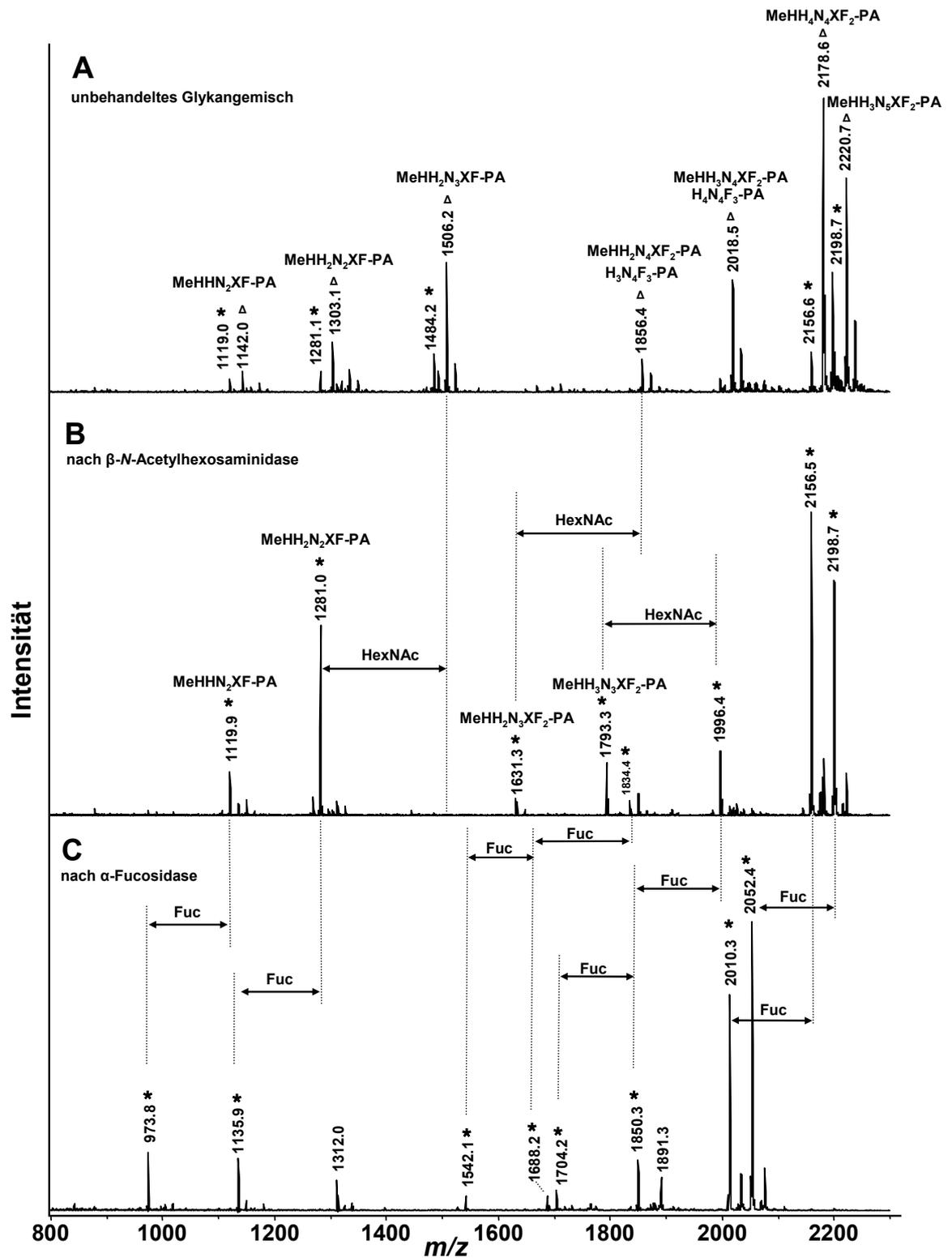


Abb. 61: MALDI-TOF-MS Analyse repräsentativer AAL-gebundener N-Glykane (A) nach separater Behandlung mit β -N-Acetylhexosaminidase (B) und α -Fucosidase (C). β -N-Acetylhexosaminidase hatte nur einen Einfluss auf drei Spezies (B), wobei die Glykane MeHH₄N₄XF₂-PA und MeHH₃N₅XF₂-PA nicht umgesetzt wurden. α -Fucosidase konnte hingegen bei allen Glykanen einen Fucose-Rest abspalten (C).

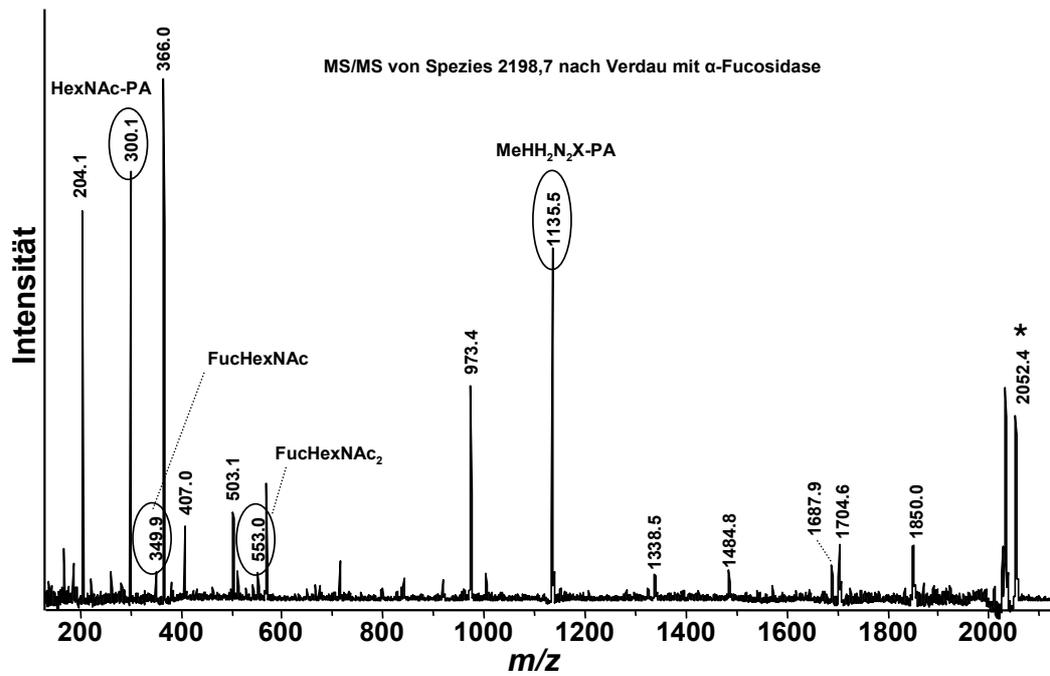


Abb. 62: Nachweis der Abspaltung eines Fucose-Restes mit α -Fucosidase vom innersten GlcNAc-Rest der Spezies MeHH₃N₅XF₂-PA (m/z 2198,8, $[M+H]^+$). Das MS/MS-Spektrum wurde mit der entstanden Spezies MeHH₃N₅XF-PA nach dem Verdau erstellt. Statt eines Signals bei m/z 446 (FucHexNAc-PA) war nun ein Fragment mit m/z 300,1 (HexNAc-PA) nachweisbar. Die Fragmente bei m/z 349,9 (NF) und m/z 553,0 (N₂F) (in Ovalen) bestätigen die Präsenz eines verbliebenen Fucose-Restes am Glykan.

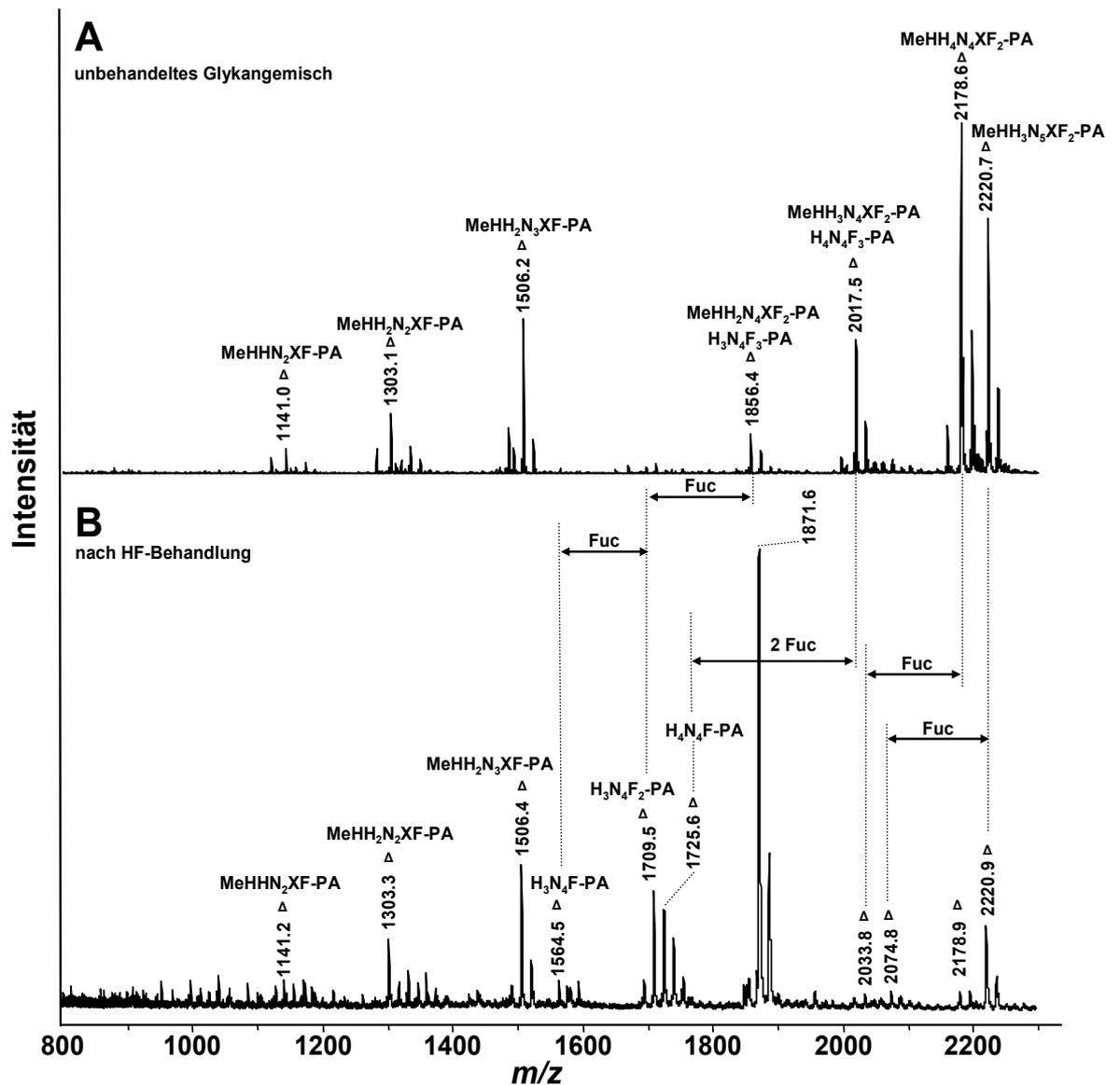


Abb. 63: MALDI-TOF-MS Analyse repräsentativer AAL-gebundener N-Glykane (A, vergleiche Abb. 61 A) nach Behandlung mit 48 %iger HF-Lösung (B). Das Signal bei m/z 1871,6 wurde besonders dominant nach der Behandlung detektiert und unterschied sich um 350 Masseneinheiten vom Signal bei m/z 2220,9 und um 308 Masseneinheiten vom Signal bei m/z 2178,9. Die beiden Pseudomolekülonen der Spezies, die einer Fucose-Abspaltung entsprechen, wurden hingegen nur schwach detektiert. Glykane mit m/z 2017,5 und 1856,4 wurden ebenfalls abgebaut, während kleinere Spezies nicht umgesetzt wurden. Zur Kurzschreibweise der Monosaccharide siehe Bildunterschrift Abb. 17.

3.8 Immunhistochemische Untersuchungen an Schneckengewebe

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden immunhistochemische Untersuchungen an Geweben von nicht-infizierten und infizierten *B. glabrata* durchgeführt, um Hinweise auf das Vorliegen und die Verteilung antigener Kohlenhydrat-Determinanten zu erhalten. Dazu waren von den Gewebeproben nach PFA-Fixierung Paraffin-Serienschnitte angefertigt und diese mit Antiseren und kohlenhydratspezifischen mAks markiert worden.

3.8.1 Analyse nicht-infizierter *B. glabrata*

Immunhistochemische Anfärbungen nicht-infizierter *B. glabrata* wurden am Fußgewebe (Abb. 64) dem Vorderpol (Abb. 66) und an Mitteldarmdrüsengewebe (Abb. 65), durchgeführt. Ein Teil der Schnitte wurde nach der Markierung noch mit Hämalaun-Färbelösung gegengefärbt, um Zellkerne besser sichtbar zu machen. Um den Erfolg einer Anfärbung besser beurteilen zu können, werden in den Abbildungen auch die Negativkontrollen gezeigt. Zur Dokumentation der Schnittebene wurde in den nachfolgenden Abbildungen ein Modell eingefügt, das den entsprechenden Bereich darstellt (Abb. 64-72). Beim Fußgewebe nicht-infizierter *B. glabrata* zeigten die Kontrollinkubationen mit NMS, NRS und PBS nur eine schwache Anfärbung, die als Hintergrundfärbung betrachtet wurde (Abb. 64 B-D). Im Schnitt in Abb. 64 F waren nach Markierung mit anti-SEA Antiserum einige Gewebsbereiche angefärbt, die das Vorliegen von Antigenen demonstrieren, welche von den anti-SEA Antikörpern erkannt wurden. Übereinstimmend wurden im Schnitt nach mAk M2D3H-Inkubation die gleichen Bereiche angefärbt, die schon vom anti-SEA Serum erkannt worden waren, wobei beim M2D3H die Färbung deutlich geringer ausfiel (Abb. 64 E).

Die Markierungen mit anti-SEA Serum und mit dem mAk M2D3H am Gewebe des Vorderpols von *B. glabrata* bestätigten die Befunde, die zuvor am Fußgewebe erhoben worden waren (Abb. 65 E+F). Die Kontrollinkubationen mit NMS und NRS ergaben keine Anfärbung in diesem Gewebsbereich, wobei die Kernfärbung hauptsächlich periphere Bereiche anfärbte (Abb. 65 B+C). Abb. 65 D zeigt eine Goldner-Trichromfärbung, die Gewebsdifferenzierungen in diesem Bereich erkennbar macht. Die weißen Pfeile kennzeichnen Bereiche, in denen viel Muskelgewebe zu sehen ist, was besonders als Ring um den Kauapparat bzw. den Schlundbereich zu finden ist. Der weiße Pfeilkopf kennzeichnet Teile der Reibzunge (Radula). Die Inkubation mit anti-SEA Serum und dem mAk M2D3H (Abb. 65 E+F) zeigten eine gewebsabhängige Expression

kreuzreagierender Antigene. Besonders im peripheren Bereich des Schneckenkörpers findet man eine starke Anfärbung, wohingegen der mittlere Ring aus Muskulatur deutlich weniger stark gefärbt ist. Die Inkubation mit dem mAk M2D3H führte zur Anfärbung gleicher Bereiche, jedoch mit geringerer Intensität (Abb. 65 F).

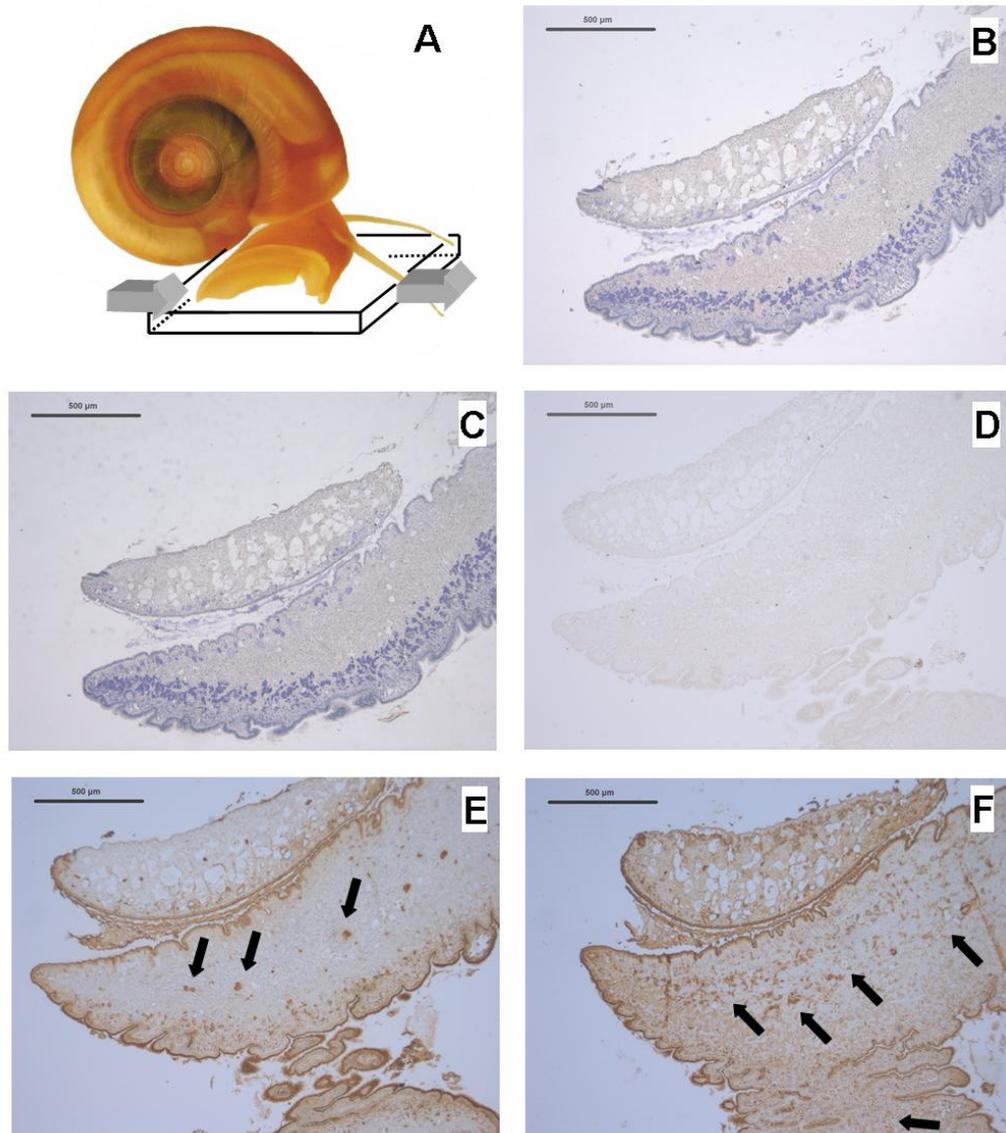


Abb. 64: Immunhistochemische Markierung von Fußgewebe von *B. glabrata*. (A) zeigt die Schnittebene, (B) die Kontrollinkubation mit NMS, (C) die Kontrollinkubation mit NRS und (D) mit PBS. Die Kontrollinkubation mit NMS (B) und NRS (C) wurden jeweils noch mit Hämalaun gefärbt, um Zellkerne sichtbar zu machen. Die Bindung vom mAk M2D3H zeigt (E) und vom anti-SEA Serum (F). Bereiche der Antikörperbindung wurden mit Pfeilen markiert. Die Balken entsprechen 500 µm.

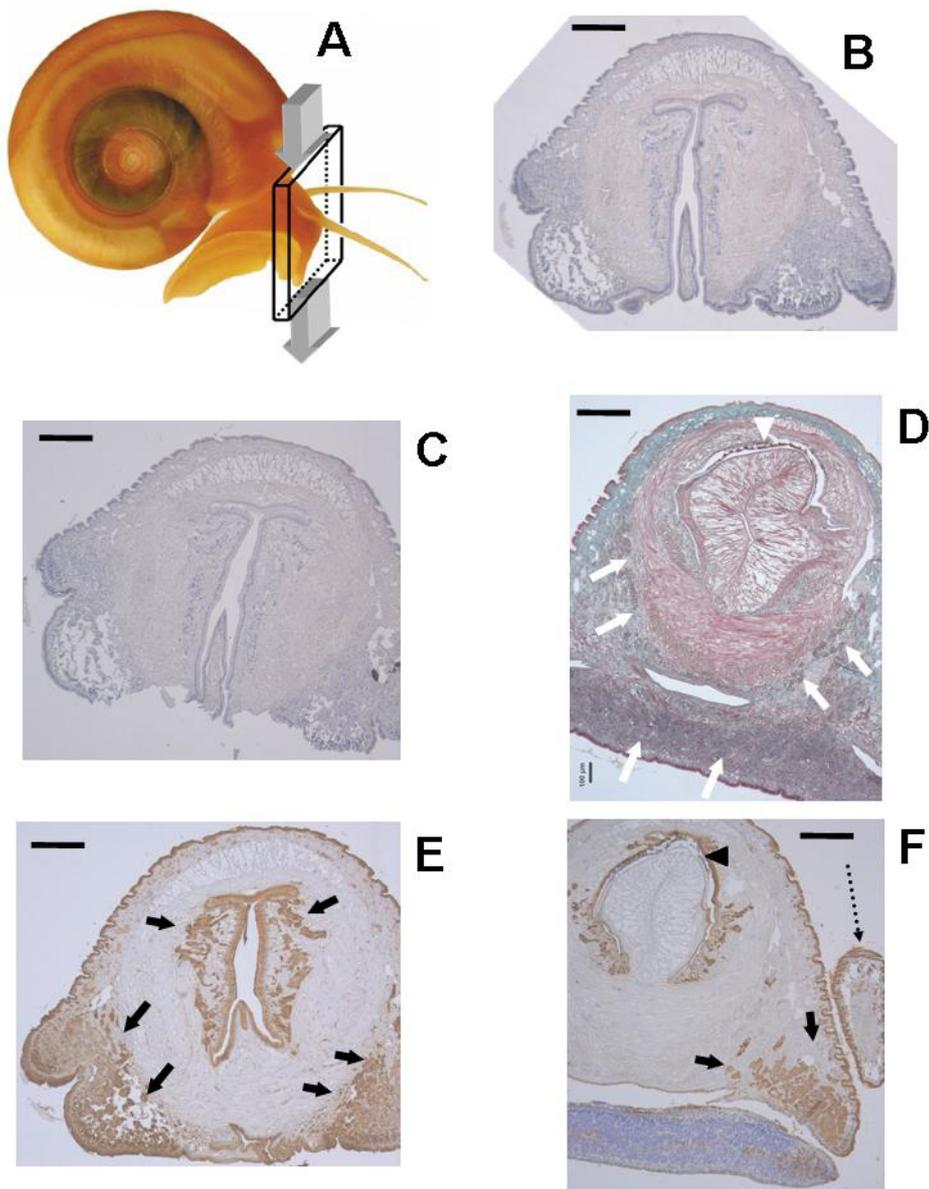


Abb. 65: Immunhistochemische Markierung an Vorderpolgewebe von *B. glabrata*. (A) zeigt die Schnittebene. Die Kontrollinkubationen mit NMS (B) und NRS (C) wurden noch Hämalaun gefärbt, um Zellkerne sichtbar zu machen. (D) zeigt einen Schnitt nach Trichromfärbung. Die weißen Pfeile in (D) zeigen Bereiche mit Muskelgewebe, der Pfeilkopf einen Teil des Kauapparates. Die Bindeeigenschaften vom anti-SEA Serum zeigt (E) und dem mAk M2D3H (F). Die Antikörperbindung besonders in peripheren Gewebereichen und um den Schlundbereich wurde mit schwarzen Pfeilen markiert (E+F). Der gestrichelte Pfeil in (F) zeigt einen Querschnitt durch den Fühler, der schwarze Pfeilkopf einen Teil des Kauapparates. Balken = 200 μ m.

Die Inkubation mit den mAKs gegen das LDN-Epitop und das LDN-DF-Epitop zeigten an den Schnitten des Vorderpols nur ein schwaches Bindevormögen (Abb. 66 C+D), verglichen mit den Bereichen, in denen die anti-SEA Antikörper und der mAk M2D3H gut banden. Der mAk gegen F-LDN zeigte ein sehr ähnliches Bindemuster wie der mAk M2D3H (Abb. 66 E).

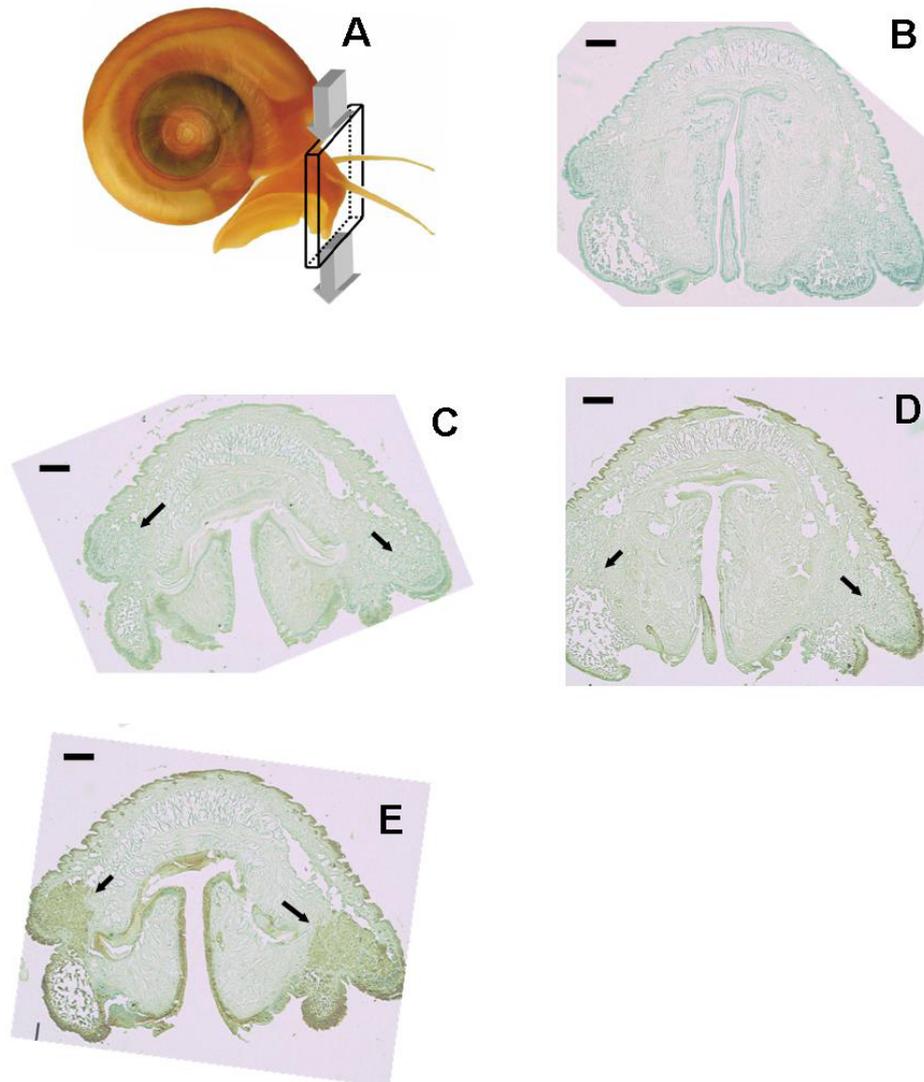


Abb. 66: Immunhistochemische Markierung an Vorderpolgewebe von *B. glabrata*. (A) zeigt die Schnittebene und (B) die Kontrollinkubation mit NMS. (C) zeigt die Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern gegen die Kohlenhydratepitope LDN, (D) gegen LDN-DF und (E) gegen F-LDN gegen die Kohlenhydratepitope LDN (C), LDN-DF (D) und F-LDN (E). Die Pfeile zeigen auf einen peripheren Gewebsbereich, in dem nur mit dem mAk gegen F-LDN (E) eine Braunfärbung zu sehen ist. Balken = 200 μ m.

Die Markierung von Mitteldarmdrüsen-Querschnitten zeigte bei Inkubation mit anti-SEA Serum ein starkes Bindevermögen der Antikörper über den gesamten Bereich des Schnittes (Abb. 67 E). Die Präsenz von fucosylierten Kohlenhydratepitopen wurde zum einen mit dem mAk M2D3H überprüft (Abb. 67 C) und des weiteren mit dem Le^X-spezifischen mAk G8G12 (Abb. 67 F). Dabei zeigte sich, dass das Bindevermögen des M2D3H Antikörpers deutlich besser war, als das des G8G12. Das Bindemuster des M2D3H deckte sich mit den markierten Stellen nach Inkubation mit dem anti-SEA Serum und gab einen Hinweis auf das Vorliegen terminal fucosylierter Epitope im Mitteldarmdrüsengewebe.

An Längsschnitten der Mitteldarmdrüse wurde das Bindevermögen von anti-SEA Serum, mAk M2D3H und monoklonalen Antikörpern definierter Kohlenhydratepitope LDN, LDN-F und LDN-DF getestet. Das anti-SEA Serum und der mAk M2D3H zeigten beide ein positives Bindevermögen am Längsschnitt der Mitteldarmdrüse (Abb. 68 D+E). Dabei zeigten Ausschnittsvergrößerungen, dass die Markierung teilweise Zellen direkt zugeordnet werden kann (Abb. 68 F+G). Verglichen mit der Kontrollinkubation in Abb. 69 B zeigten lediglich die mAks gegen LDN-F und LDN-DF ein schwaches Bindevermögen (Abb. 69 C+D). Beim mAk gegen das LDN-Epitop konnte keine Bindung nachgewiesen werden (Abb. 69 E).

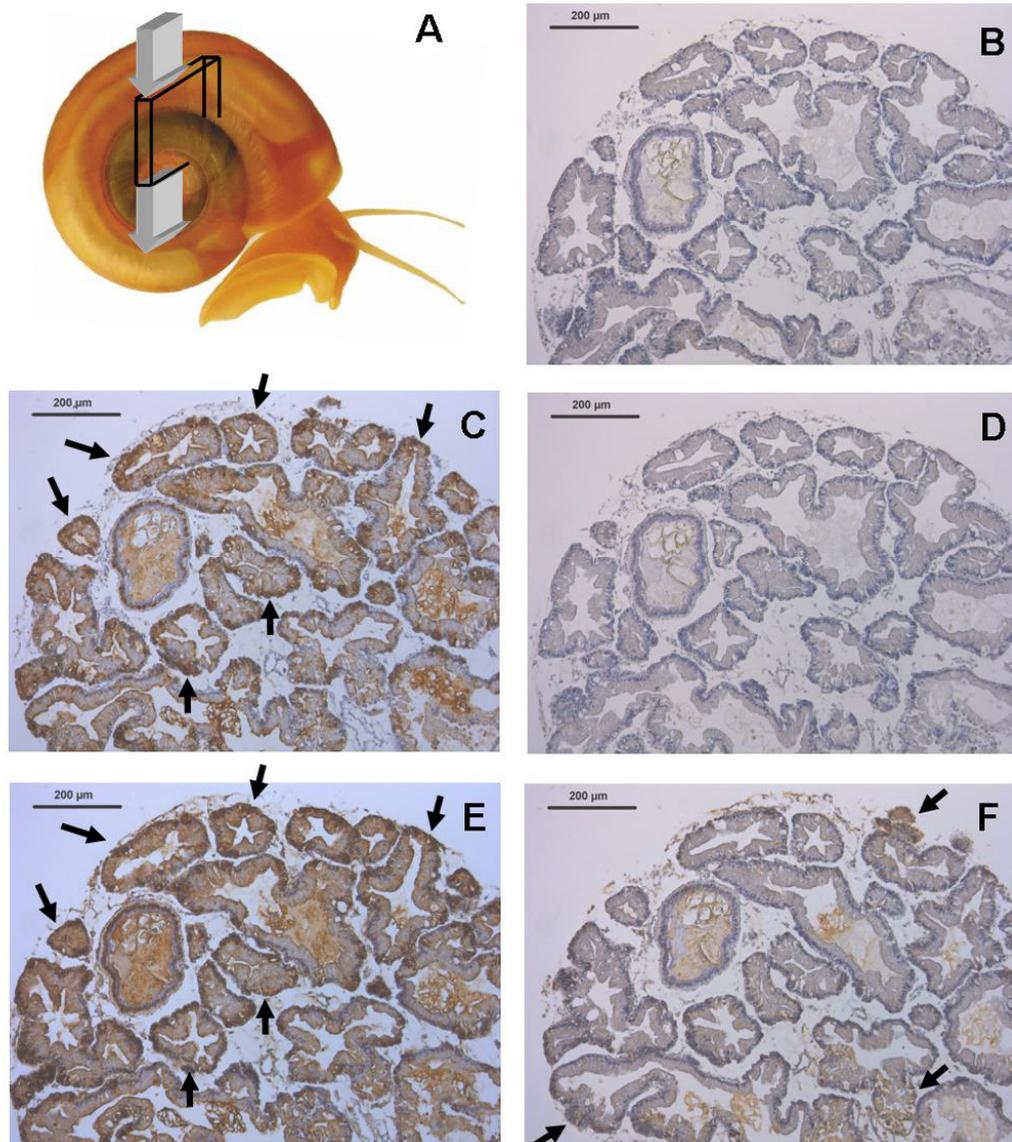


Abb. 67: Immunhistochemische Markierung an Mitteldarmdrüsengewebe (Querschnitt) von *B. glabrata*. (A) zeigt die Querschnittebene. In (B) und (D) sind die Kontrollen mit NMS und NRS abgebildet, in denen keine braunen Präzipitate zu sehen sind. Das anti-SEA Serum zeigte eine Bindung an allen Gewebsbereichen (E). Der Bereich der Bindung des mAk M2D3H (C) deckte sich mit denen in (E). Die Pfeile in C, E und F zeigen Orte starker Antikörperbindung an. Die Inkubation mit dem Le^X-spezifischen mAk G8G12 zeigte die schwächste Bindung. Balken = 200μm.

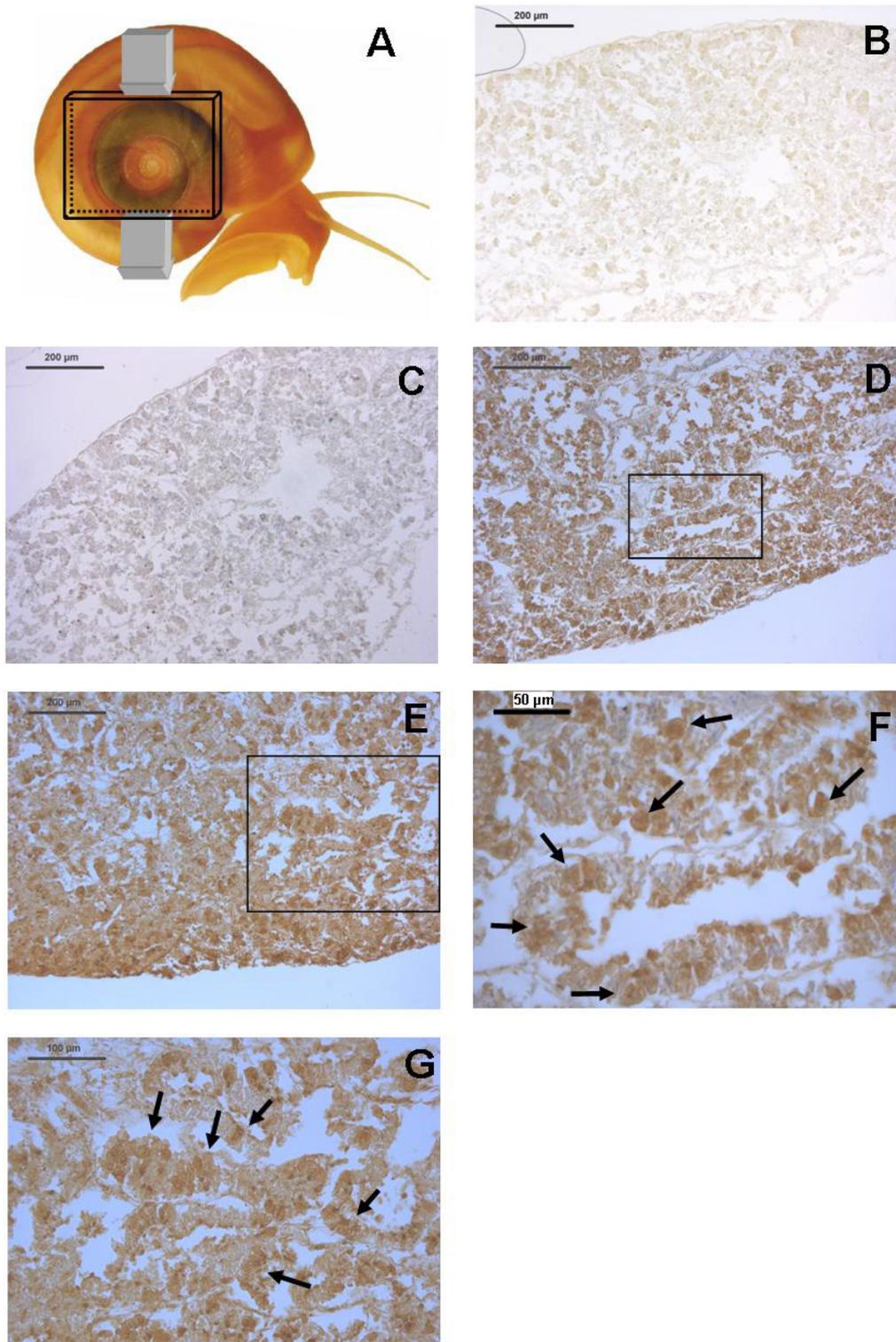


Abb. 68: Immunhistochemische Markierung an Mitteldarmdrüsengewebe (Längsschnitt) von *B. glabrata*. In (A) ist die Schnittebene zu sehen. (B) und (C) zeigen die Kontrollinkubationen. Sowohl das anti-SEA Serum (E) als auch der mAk M2D3H (D) zeigen eine starke Bindung in allen Gewebsbereichen des Schnittes. Die Ausschnittsvergrößerungen von M2D3H (F) und anti-SEA Serum (G) zeigen eine teilweise zellassoziierte Antikörperbindung. Balken = 200 µm (B-E), 50 µm (F) und 100 µm (G).

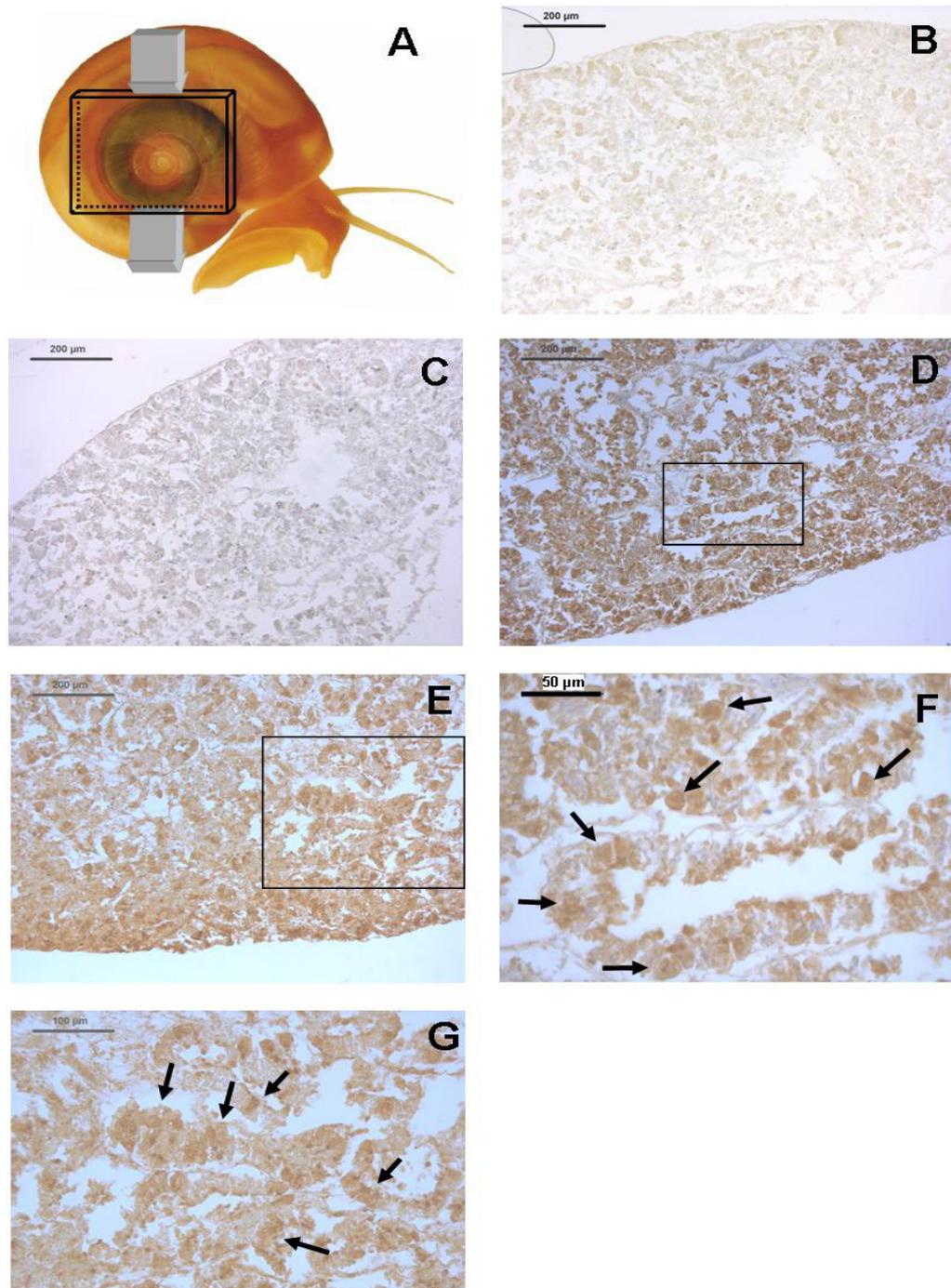


Abb. 69: Immunhistochemische Markierung an Mitteldarmdrüsengewebe (Längsschnitt) von *B. glabrata* mit mAbs gegen LDN-F (C), LDN-DF (D) und LDN (E). Lediglich die mAbs gegen LDN-F und LDN-DF zeigten eine schwache Bindung, welche durch die leichte Braunfärbung im Vergleich zur Kontrolle in (B) erkennbar ist. (A) zeigt die Schnittebene. Der mAb gegen LDN zeigte keine Bindung im Gewebe (E), wobei die dunklere Färbung im Vergleich zur Kontrolle auf die Hämalaun-Färbung zurück zu führen ist. Balken = 200 µm (B), 500 µm (C-E).

3.8.2 Immunhistochemische Analyse infizierter *B. glabrata*

Die immunhistochemische Anfärbung infizierter Exemplare von *B. glabrata* zeigte im Bereich des Mitteldarmdrüsengewebes deutliche Veränderungen im Vergleich zur uninfizierten Schnecke. Die Mitteldarmdrüse war, als Ort der asexuellen Reproduktion, zudem besonders interessant.

Das Mitteldarmdrüsengewebe zeigte bereits in den Hämalaun gefärbten Kontrollen, dass mit der Tochttersporozystenbildung erhebliche histologische Veränderungen einhergegangen waren (Abb. 70 B). Die Bindung des mAk M2D3H ergab, dass vor allem die Tochttersporozysten sehr intensiv markiert wurden, während das restliche unbeschadete Gewebe ein ähnlich gutes Bindevermögen aufwies, wie bei Inkubation nicht-infizierter Schnitte dieses Gewebetyps (Abb. 70 C). Die Inkubation mit cercarialem Transformationsfluid (CTF) (Abb. 70 D) ergab ein sporozystenspezifisches Bindungsmuster, wobei das restliche Gewebe praktisch nicht markiert wurde. Von den Le^X-spezifischen mAks zeigten beide Antikörper besonders an den Sporozysten eine Bindung, wobei die Inkubation mit mAk G8G12 (Abb. 70 E) deutlich stärker ausfiel als mit dem anderen Le^X-Antikörper (Abb. 70 G).

Das anti-SEA Serum zeigte, ähnlich wie der mAk M2D3H, eine starke Bindung bei den Schnitten der infizierten Mitteldarmdrüse (Abb. 71 C). Parallel wurde wieder das Bindevermögen der mAks gegen mono- oder difucosyliertes LDN geprüft. Dabei konnte beobachtet werden, dass eine starke Bindung an die Tochttersporozysten erfolgte. Besonders auffällig war dies bei Inkubation mit dem mAk F-LDN (Abb. 71 D). Die Antikörper gegen LDN, LDN-F und LDN-DF zeigten eine besonders starke Bindung an den Sporozysten (Abb. 71 E-G). Dabei wurde deutlich, dass die mAks gegen LDN-F und LDN-DF um die Sporozysten herum eine ringförmige Struktur anfärbten, der mAk LDN hingegen eher die Sporozysten selbst markierte.

Eine starke Bindung der vorgenannten Antikörper konnte an Mitteldarmdrüsen-Querschnitten bestätigt werden. Abb. 72 zeigt eine Kollage von Antikörpermarkierungen von Mitteldarmdrüsen verschiedener Schnecken. Dabei handelte es sich bei Abb. 72 A, E und H um Kontrollen. Mit Serum gegen CTF konnten insbesondere die Sporozysten sichtbar gemacht werden (B). Die starke Bindung von anti-SEA Serum (Abb. 72 C und I) und dem mAk M2D3H (Abb. 72 D und J) an Sporozysten wurde so bestätigt, wobei die Antikörper in sporozystenfreien Gewebsbereichen ebenfalls zu einer positiven Reaktion führten. Die Inkubation mit den mAks gegen LDN-F und LDN-DF, als

Doppelinkubation, sowie G8G12 (anti-Le^X) führte ebenfalls zu einer starken Anfärbung der Sporozysten (Abb. 72 F und G).

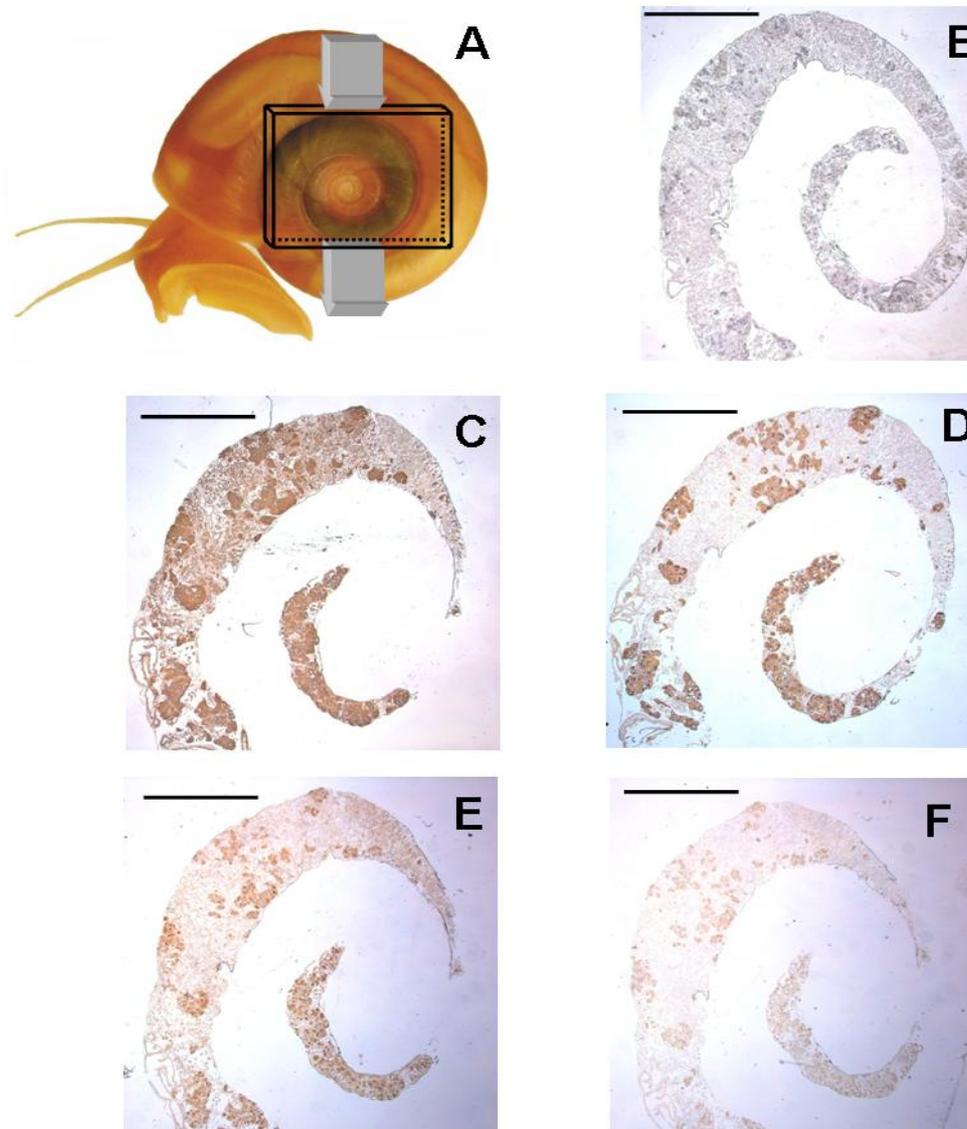


Abb. 70: Immunhistochemische Anfärbung des Mitteldarmdrüsengewebes (Längsschnitt) von infizierten *B. glabrata*. (A) Schnittebene, (B) Kontrolle NRS, (C) mAk M2D3H, (D) CTF, (E) G8G12, (F) Le^X. Balken = 2000 µm.

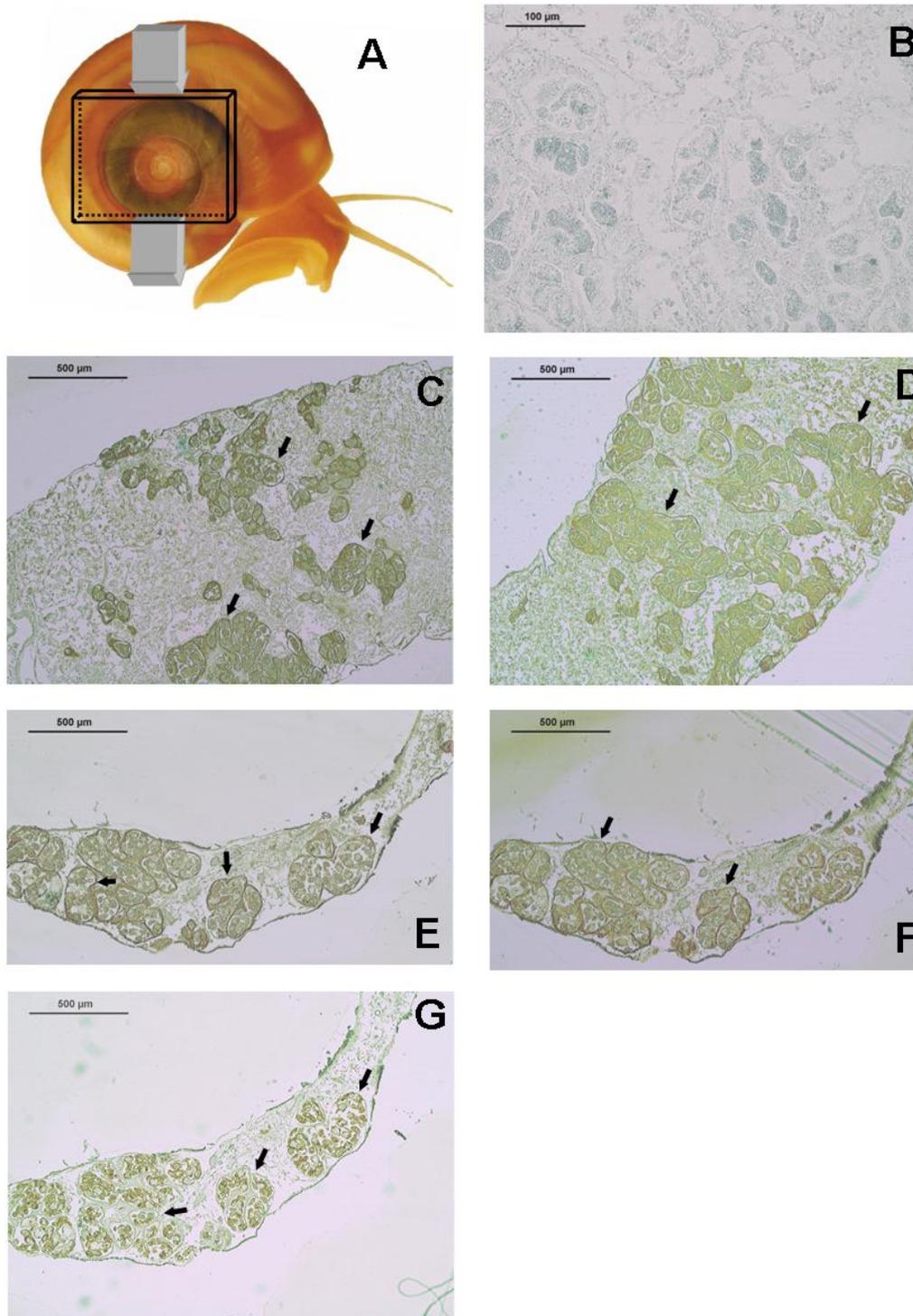


Abb. 71: Immunhistochemische Anfärbung des Mitteldarmdrüsengewebes (Längsschnitt) von infizierten *B. glabrata*. (A) Schnittebene, (B) Kontrolle NMS. Das anti-SEA Serum (C) und der mAk F-LDN (D) zeigten eine verstärkte Bindung an den Sporozysten. Die mAks gegen LDN-F (E) und LDN-DF (F) färbten eine ringförmige Struktur um die Sporozysten herum an. Der mAk gegen das LDN-Epitop (G) färbte hingegen vornehmlich an den Sporozysten. Die Pfeile kennzeichnen die Antikörperbindungen im Bereich der Sporozysten im Mitteldarmdrüsengewebe. Balken = 100 µm (B), 500 µm (C-G).

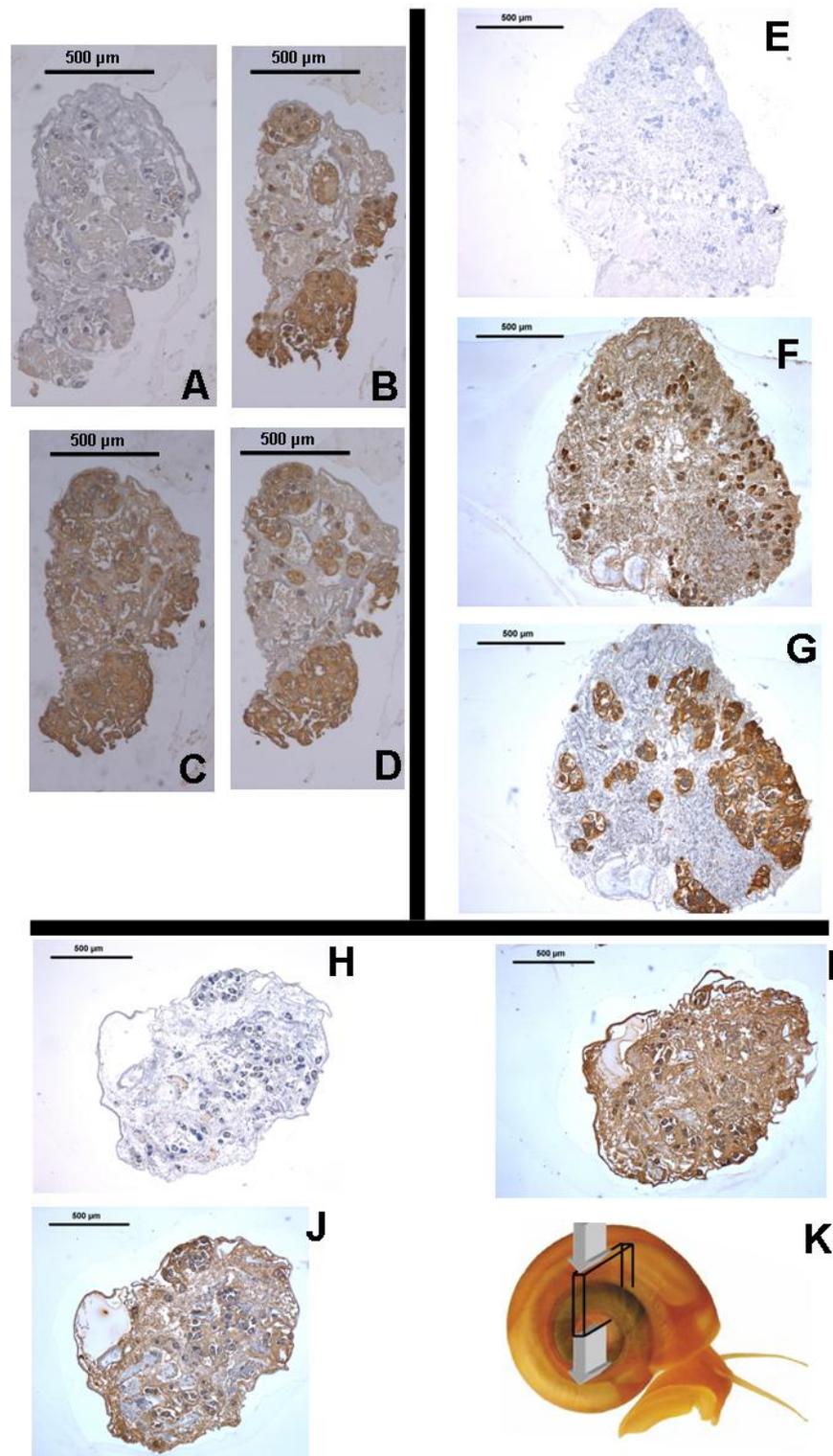


Abb. 72: Immunhistochemische Anfärbung des Mitteldarmdrüsengewebes (Querschnitt) von verschiedenen infizierten *B. glabrata*. (A, E und H) Kontrollen NMS, (C und I) anti-SEA Serum, (B und J) mAk M2D3H, (D) = CTF, (F) = mAk G8G12 und (G) = LDN-F/DF und (K) = Schnittebene. Balken = 500 µm.

3.9 Immunhistochemische Markierung von Miracidien

Die Miracidien wurden nach Fixierung als Ganzpräparate immunhistochemisch angefärbt. Dabei sollte überprüft werden, in welchen Bereichen besonders in besonderem Maße kreuzreagierenden Antigene auftreten. Dazu wurde die Antikörperbindung mittels indirekter Fluoreszenz detektiert. Da die Kontrollen nur eine unspezifische Fluoreszenz aufwiesen, wurden von diesen Fusionsbilder aus Fluoreszenz und Phasenkontrast angefertigt.

Die Inkubation von Miracidien mit anti-SEA Serum zeigte, dass viele der kreuzreagierende Epitope oberflächenexprimiert sind. Dabei zeigte der Bereich des Terebratoriums (Bohrorgan) eine deutliche Antikörperbindung (weiße Pfeile Abb. 73 B und D), die lediglich in Abb. 73 C etwas schwächer ausfiel. Die Methode erlaubte nur bedingt Aussagen zur Antikörperbindung an innere Strukturen des Miracidiums, während offenbar an der Oberfläche zum Teil plattenartige Strukturen markiert wurden. (Abb. 73 C). Der mAk M2D3H zeigte ebenfalls über das gesamte Miracidium verteilt eine Bindung, die jedoch nicht so intensiv ausfiel wie bei Inkubation mit anti-SEA Serum und im posterioren Teil des Miracidiums stärker ausgeprägt war (Abb. 74 B-D). Die Abb. 74 C zeigt ein Fusionsbild aus Fluoreszenz und Phasenkontrast, in dem die kleinen Pfeilspitzen zeigen, dass die Fluoreszenz auf der Miracidienoberfläche lokalisiert ist und der Wimpernkranz davon nicht betroffen ist. Der Pfeil kennzeichnet das Terebratorium, das ebenfalls markiert wurde.

Die Inkubation mit dem mAk F-LDN führte zu einem vergleichbaren Muster (Abb. 75 A und B). Besonders in (A) wird durch die Antikörperbindung der plattenartige Aufbau des Miracidiums sichtbar (Pfeilköpfe), wobei es anscheinend Bereiche gibt, an denen der mAk besser bindet. Abb. 75 B demonstriert, dass der hintere Bereich des Miracidiums stärker markiert wird und möglicherweise auch innere Strukturen vom Antikörper erkannt werden. Die mAks gegen LDN-F und LDN-DF (Abb. 76 A-D) zeigten ein vergleichbares Bindungsmuster, das über den ganzen Körper des Miracidiums verteilt war. Verglichen mit den anderen Ansätzen war hier eine besonders intensive Fluoreszenz zu beobachten war. Dabei zeigte sich, dass der LDN-DF Antikörper gleichmäßiger über die gesamte Oberfläche des Larvenstadiums bindet (Abb. 76 A+B). Wieder war eine Bindung des mAk auch an inneren Strukturen sowie am Terebratorium erkennbar. Der mAk gegen LDN-F führte gleichermaßen zur Anfärbung aller Bereiche der miracidialen Oberfläche, ließ jedoch eine Präferenz für den vorderen Bereich des Miracidiums erkennen, was mit weißen Pfeilköpfen in (D) gekennzeichnet ist. Das

Terebratorium wurde vom LDN-F Antikörper offenbar schlechter markiert (Abb. 76 C). Die mAk gegen Le^X und gegen LDN zeigten nur eine sehr schwache Bindung an die Miracidien. Deshalb wurden in Abb. 76 sowohl die Fluoreszenzen, als auch die Fusionsbilder mit Phasenkontrast abgebildet (Abb. 76 A-D). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass das Miracidium als invasives Agens auf seiner Oberfläche, zumindest zum Teil, Kohlenhydratepitope exprimiert, die auch in der nicht-infizierten Schnecke nachweisbar sind. Andere Kohlenhydrat-Determinanten, wie zum Beispiel das Le^X- oder das LDN-Epitop, werden in größerem Umfang erst im Sporozystenstadium synthetisiert.

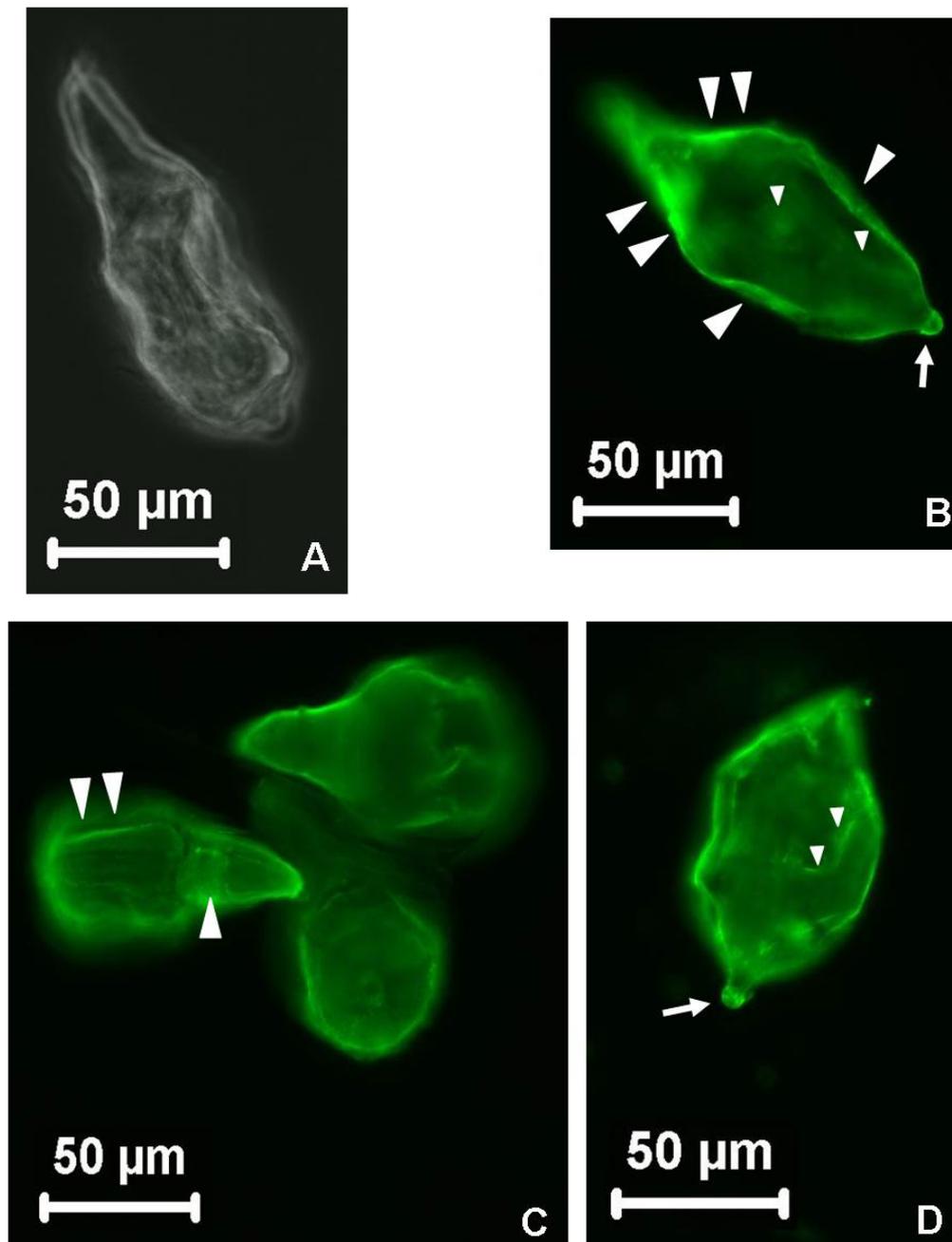


Abb. 73: Immunhistochemische Anfärbung von Miracidien nach PFA-Fixierung mit anti-SEA Serum. (A) zeigt die Kontrollinkubation mit NRS als Fusionsbild aus Fluoreszenz und Phasenkontrast. (B) bis (D) zeigen das Ergebnis nach Inkubation mit dem Antiserum, wobei Miracidien aus unterschiedlichen Blickwinkeln betrachtet wurden. In (B) und (D) erkennt man die Antikörperbindung am Terebratorium (weiße Pfeile), sowie an der Oberfläche (große Pfeilköpfe in (B) und (C)) sowie an möglicherweise inneren Strukturen (kleine Pfeilköpfe in (D)).

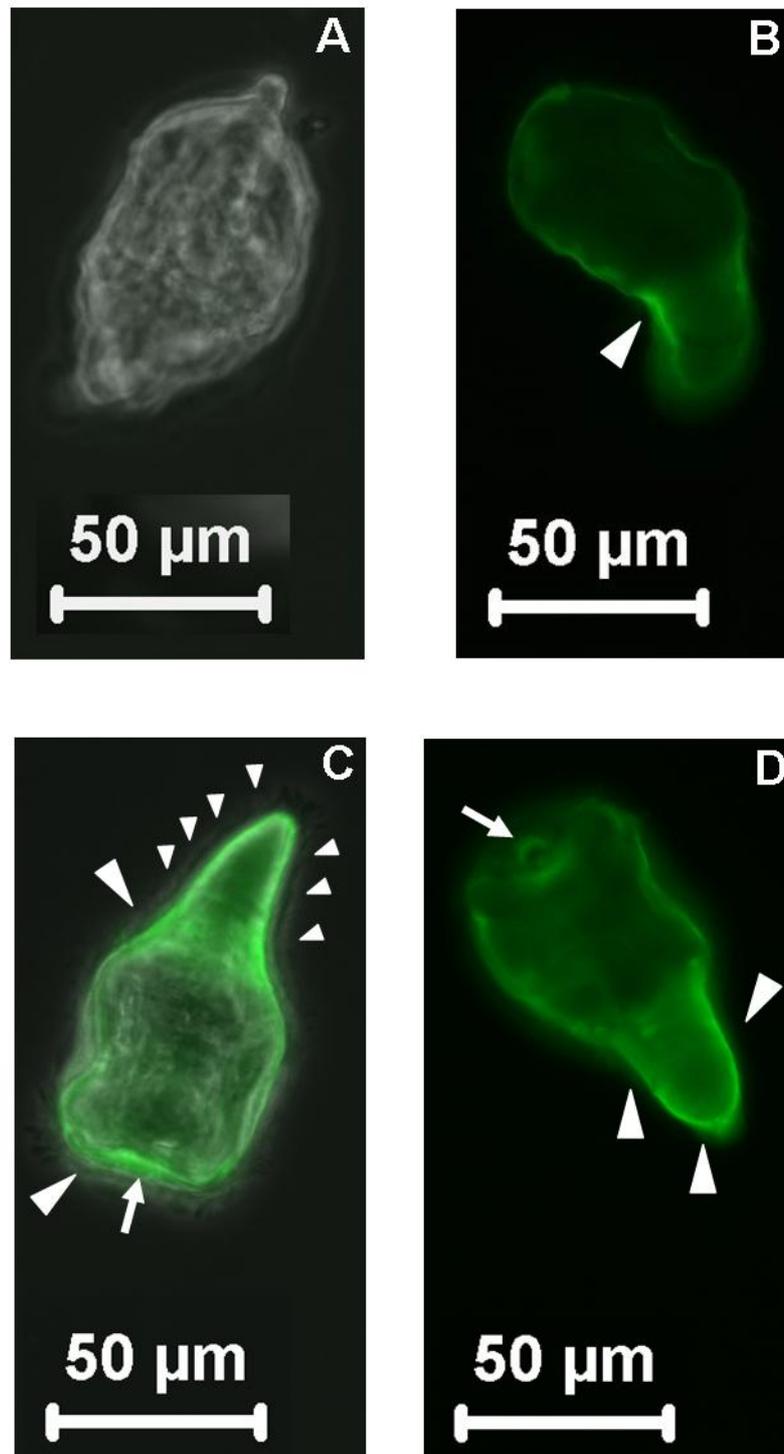


Abb. 74: Immunhistochemische Anfärbung von Miracidien nach PFA-Fixierung mit dem mAk M2D3H. (A) zeigt die Kontrollinkubation mit NMS als Fusionsbild mit Fluoreszenz und Phasenkontrast. In (B) ist die Markierung der Oberfläche demonstriert, die im hinteren Bereich des Miracidiums intensiver ist (Pfeilkopf). (C) zeigt ein Fusionsbild aus Fluoreszenz und Phasenkontrast, das neben der Oberflächenmarkierung (große Pfeilköpfe) auch die gesteigerte Intensität im hinteren Teil (kleine Pfeilköpfe) und dem Vorderpol (Pfeil) zeigt. In (D) sind nochmals die Oberflächenfärbung (Pfeilköpfe) sowie die Fluoreszenz am Terebratorium (Pfeil) demonstriert.

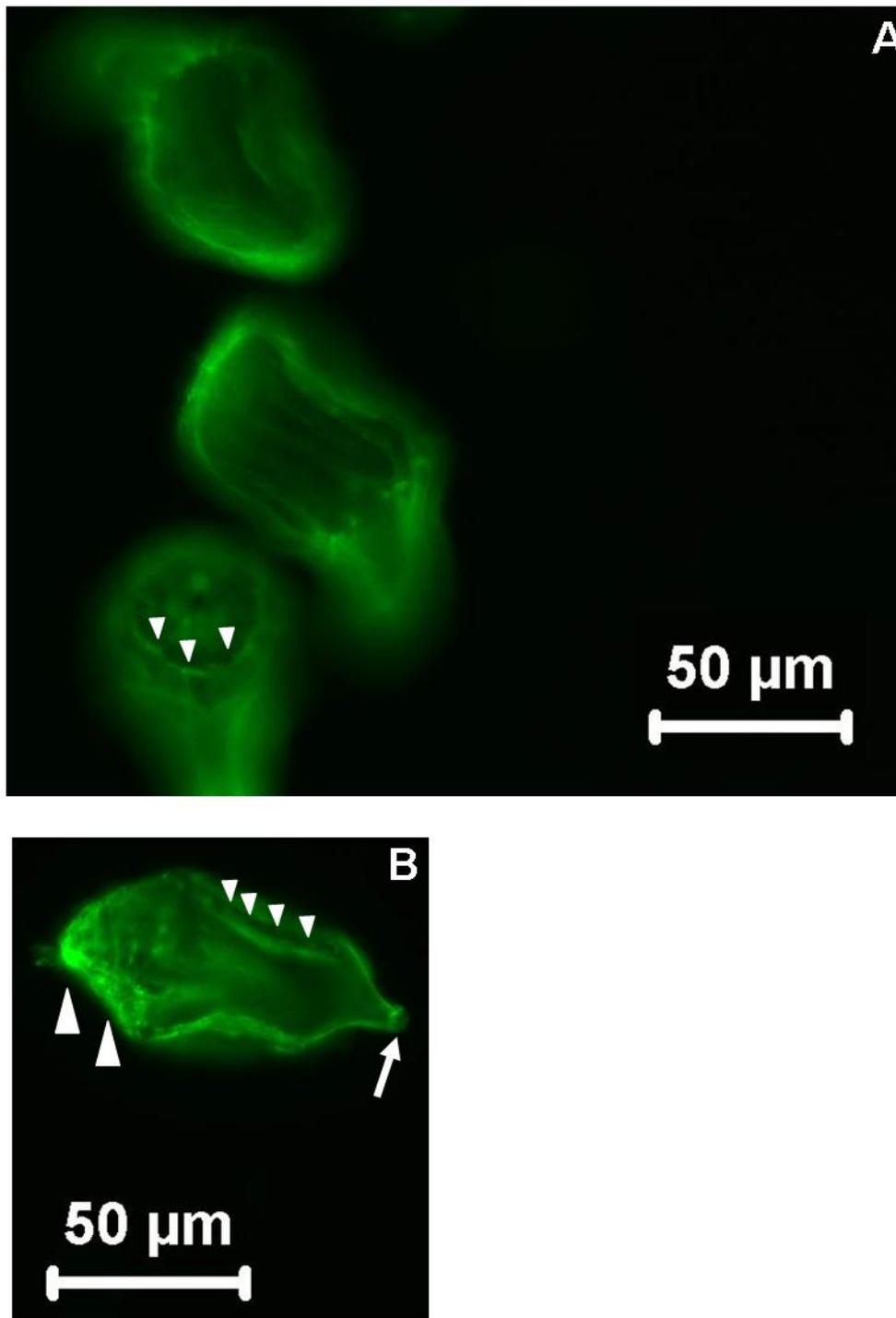


Abb. 75: Immunhistochemische Anfärbung von Miracidien nach PFA-Fixierung mit dem mAk gegen F-LDN. In (A) ist zu sehen, dass die Bindung des mAk zu einem plattenartigen Muster führt (Pfeilköpfe). (B) zeigt eine Längsübersicht, an welcher der intensiver angefärbte Hinterbereich zu sehen ist (große Pfeilköpfe) sowie neben dem Terebratorium (Pfeil) auch längliche Strukturen (kleine Pfeilköpfe) markiert wurden.

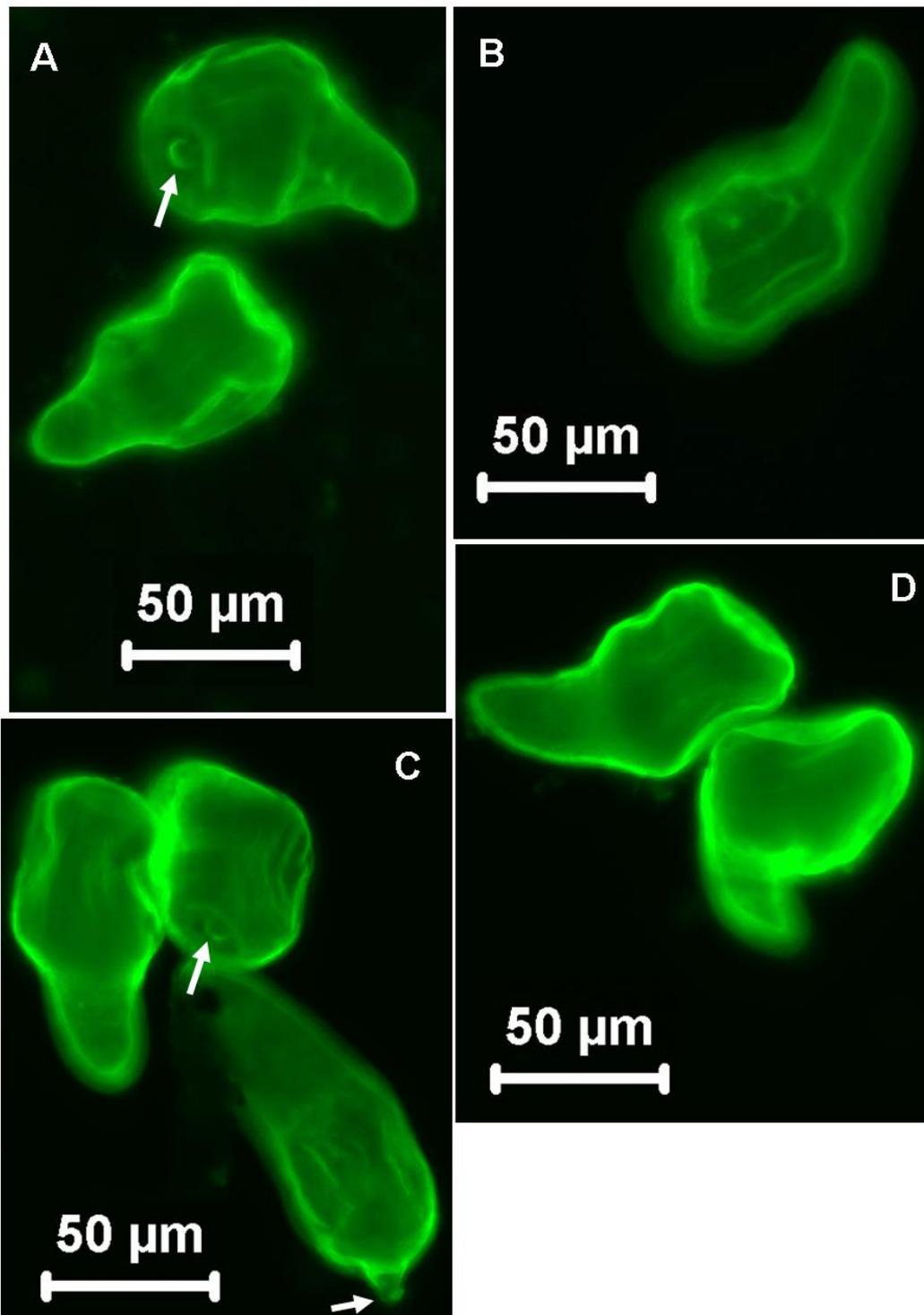


Abb. 76: Immunhistochemische Anfärbung von Miracidien nach PFA-Fixierung mit mAKs gegen LDN-DF (A und B) und LDN-F (C und D). (A) zeigt die Markierung der miracidialen Oberfläche und des Terebratoriums (Pfeil). In (B) ist die Bindung des mAKs demonstriert, wobei länglichen Strukturen erkannt werden können. (C) zeigt die Bindung des mAK LDN-F, der am Saugnapf (Pfeile) eine etwas schwächere Bindung zeigt. Zudem ist die Bindung des mAK gegen LDN-F scheinbar am Vorderpol des Larvenstadiums stärker ausgeprägt (D).

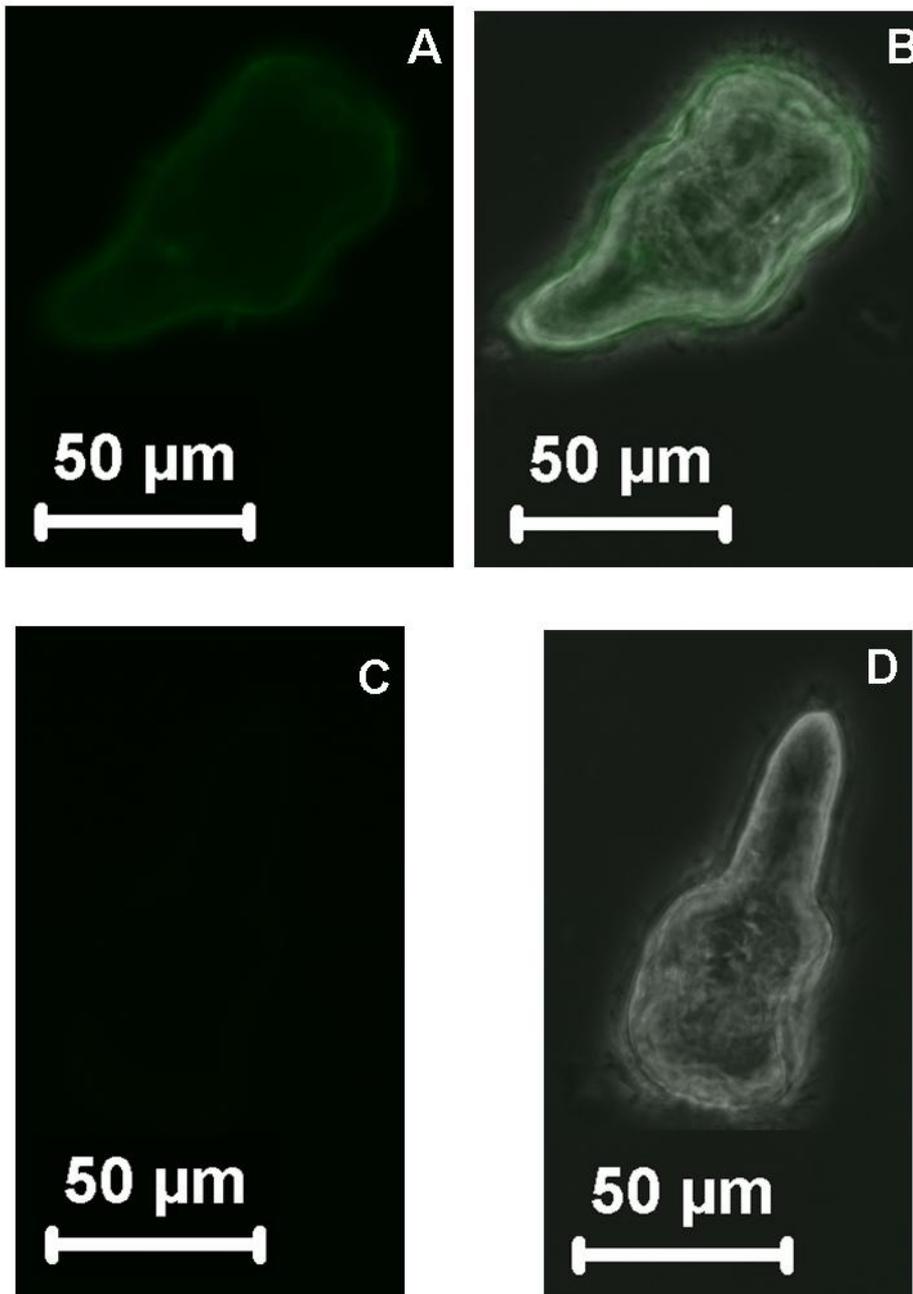


Abb. 77: Immunhistochemische Anfärbung von Miracidien nach PFA-Fixierung mit den mAbs gegen Le^X (A und B) und LDN (C und D). Beide Antikörper zeigten allenfalls nur eine sehr schwache Bindung an die Miracidien. (A) und (C) zeigen jeweils die Fluoreszenzen, (B) und (D) die Fusionsbilder aus Fluoreszenz und Phasenkontrast.

3.10 Vergleich zweier *B. glabrata* Stämme mit unterschiedlicher Empfänglichkeit gegenüber einer *S. mansoni* Infektion

Ausgehend von Hämolympfproben des empfänglichen *B. glabrata* Stammes Puerto Rico (*Bg* PR) und des eher resistenten Stammes Salvador (*Bg* SAL) sollte in dieser Studie weiterhin untersucht werden, inwieweit sich die Stämme im Hinblick auf kreuzreagierende N-Glykane unterscheiden. Dazu wurde die bereits beschriebene Methodik angewendet, wobei die N-Glykane hier mittels Hydrazinolyse freigesetzt wurden. Nach Markierung mit 2-Aminopyridin wurden kreuzreagierende N-Glykane wieder durch Immunaffinitätschromatographie angereichert und mittels 2D-HPLC-Mapping sowie MALDI-TOF-MS untersucht.

3.10.1 Biochemische Untersuchungen

3.10.1.1 1D-SDS-PAGE und Western Blot Analysen

Mittels 1D-SDS-PAGE wurden pro Spur jeweils 10 µg Hämolympfprotein aufgetrennt. Die Gele wurden entweder silbergefärbt oder auf PVDF-Membran geblottet. Die Blotstreifen wurden für die Western Blot Experimente zum einen mit anti-SEA Serum und zum anderen mit dem mAk M2D3H inkubiert. Die Antikörpermarkierung zeigte in beiden Ansätzen für *Bg* PR Hämolympfprotein eine stärkere Anfärbung (Abb. 78 A und B).

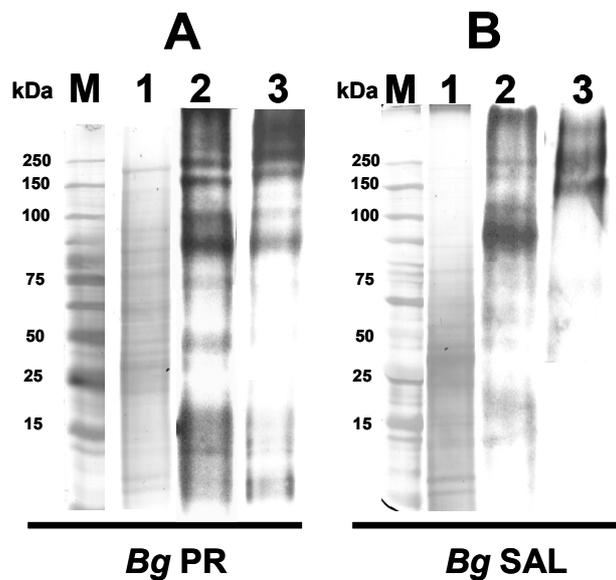


Abb. 78: 1D-SDS-PAGE und Western Blots von jeweils 10 μg Hämolympheprotein der beiden Stämme *Bg* PR (A) und *Bg* SAL (B). (M) Marker, Spur (1) Gesamtprotein nach Silberfärbung, Spur (2), nach Inkubation mit anti-SEA, Spur (3), nach Markierung mit mAk M2D3H.

3.10.1.2 Bindungsstudien mittels ELISA

Tryptische (Glyko-)Peptide (jeweils 2 μg) wurden in Bindungsstudien eingesetzt, um einen ersten Anhaltspunkt über die Präsenz von kreuzreagierenden Antigenen und definierten Kohlenhydratepitopen zu bekommen. Dabei wurden die in 2.2.2 aufgeführten Antikörper verwendet.

Es zeigte sich an (Glyko-)Peptide des *Bg* PR-Stammes von anti-SEA Serum und den mAks durchweg in höherem Ausmaß erkannt wurden als die des *Bg* SAL-Stammes (Abb. 78 A und B). Die HF-Behandlung führte mit Ausnahme des mAks gegen LDN bei allen Ansätzen zu einer deutlichen Reduktion des Bindungsvermögens und wirkte sich im Fall von anti-SEA Serum beim *Bg* PR Ansatz stärker aus als beim *Bg* SAL Ansatz.

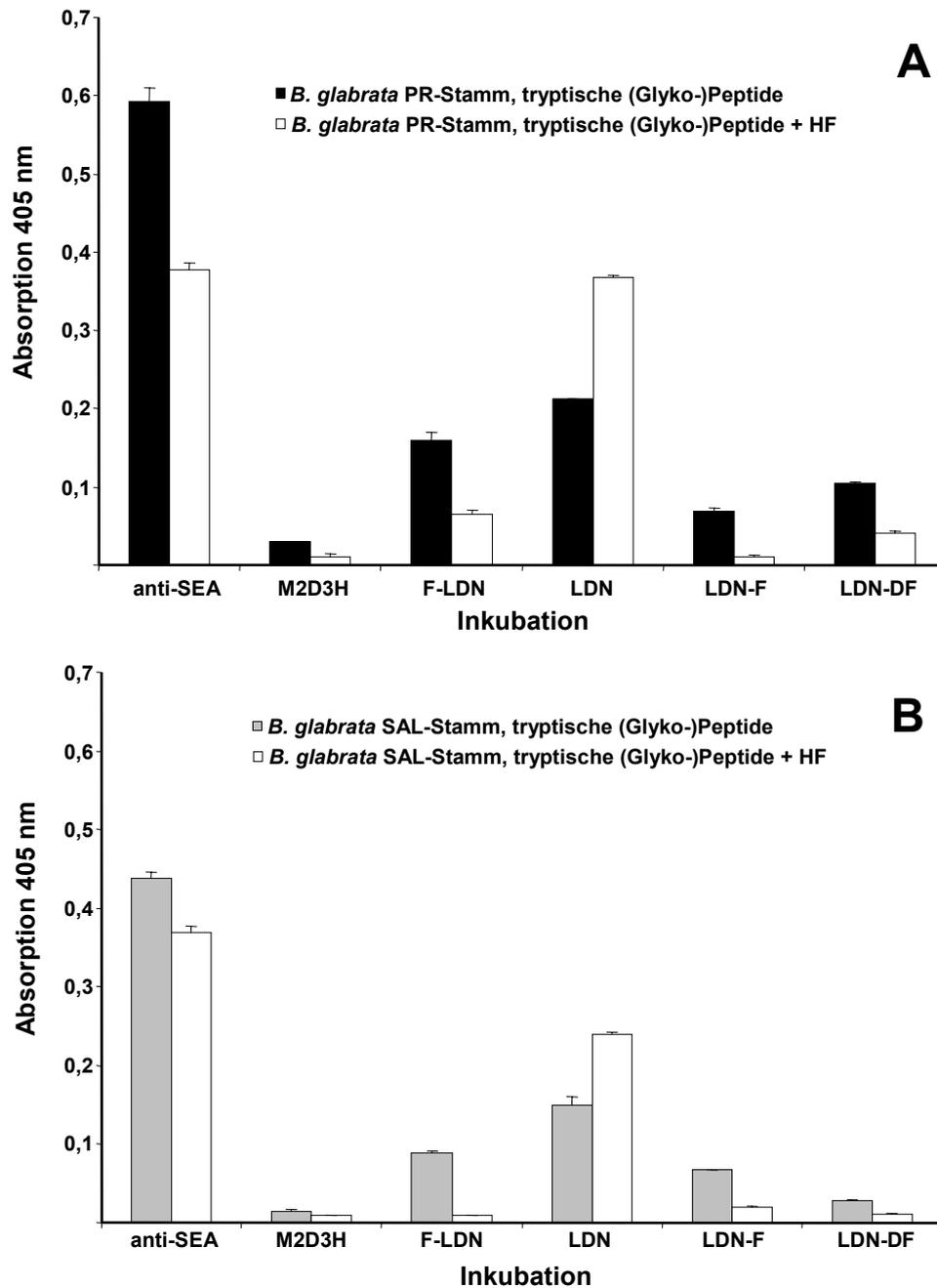


Abb. 79: Analyse tryptischer (Glyko-)Peptide der beiden Stämme *Bg* PR (A) und *Bg* SAL (B) mittels ELISA vor und nach HF-Behandlung. Als Antikörper wurden anti-SEA Serum und die mAks M2D3H, anti-F-LDN, anti-LDN, anti-LDN-F sowie anti-LDN-DF und als Antigen jeweils 2 μ g (Glyko-)Peptid getestet. Die eingefärbten Balken kennzeichnen die Bindung vor, die weißen Balken nach HF-Behandlung der (Glyko-)Peptide.

3.10.2 Monosaccharidbestimmung mittels GC/MS

Vom gesamten Hämolympfprotein, den freigesetzten nativen N-Glykanen und dem Immuneluat nach Immunaффinitätsanreicherung wurden Monosaccharidanalysen durchgeführt, um den Gehalt an Monosacchariden in den Proben beider Stämme zu vergleichen. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die detektierten Alditolacetate. Die Bestimmung zeigte, dass der *Bg* PR-Stamm einen durchweg höheren Gehalt an Fucose und Xylose aufwies. Unterschiede gab es auch bei GlcNAc und GalNAc, sowie dem Gehalt an Galaktose, der im SAL-Stamm deutlich erhöht war.

Tabelle 10: Übersicht über die Monosaccharidbestimmung von Hämolympfprotein, den mittels Hydrazinolyse freigesetzten nativen N-Glykanen und den Pools an angereicherten kreuzreagierenden Spezies

| | <i>Bg</i> PR | | | <i>Bg</i> SAL | | |
|------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|---------------|--------------------|-----------------------------------|---------------|
| | HL-Protein [µg] | Freigesetzte N-Glykane [µg] | IM EL [µg] | HL-Protein [µg] | Freigesetzte N-Glykane [µg] | IM EL [µg] |
| Fucose | 178,4 | 68,9 | 0,52 | 151,6 | 26,3 | 0,38 |
| Xylose | 96,4 | 11,4 | 0,2 | 88 | 10,4 | 0,19 |
| 3-O-CH ₃ - Mannose | 100 | 130 | 0,18 | 101,2 | 130,86 | 0,09 |
| Mannose | 262 | 195 | 0,55 | 256 | 196,3 | 0,57 |
| 3-O-CH ₃ - Galaktose | 63,2 | 513,15 | 0,04 | 56 | 51,65 | 0,06 |
| Galaktose | 780 | 351 | 0,32 | 1188 | 312 | 0,35 |
| GlcNAc | 461,2 | 351 | 0,5 | 496,8 | 162,24 | 0,13 |
| GalNAc | 452 | 247 | 0,71 | 470,4 | 79,04 | 0,13 |
| Σ | 2393,2 | 1404,62 | 3 | 2808 | 1062,4 | 1,9 |

HL-Protein = Hämolympfprotein, 20 mg Ausgangsmaterial pro Stamm

IM EL = Pool an N-Glykanen nach der Immunaффinitätsanreicherung

3.10.3 Methylierungsanalysen

Von den bei der Immunaффinitätschromatographie ungebundenen sowie gebundenen N-Glykanen beider Stämme wurden Methylierungsanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst und ähneln den Methylierungsdaten in Tabelle 9.

Tabelle 11: Übersicht über die detektierten Monosaccharide und deren Verknüpfungspositionen im Glykanverbund.¹

| Verknüpfung | <i>Bg PR</i> | | <i>Bg SAL</i> | |
|---------------------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| | Ungebundene N-Glykane | Gebundene N-Glykane | Ungebundene N-Glykane | Gebundene N-Glykane |
| Xyl(1- | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Fuc(1- | + | (+) | + | (+) |
| -2)Fuc(1- | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Man(1- | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 3- <i>O</i> -MeMan(1- ² | + | + | + | (+) |
| -2)Man(1- | ++ | ++ | ++ | ++ |
| -2)3- <i>O</i> -MeMan(1- ² | + | (+) | + | (+) |
| -6)3- <i>O</i> -MeMan(1- ² | (+) | (+) | (+) | (+) |
| -2,4)Man(1- | n. d. | (+) | (+) | (+) |
| -2,6)Man(1- | (+) | (+) | n. d. | (+) |
| -3,6)Man(1- | ++ | + | ++ | + |
| -2,3,6)Man(1- ³ | + | ++ | + | ++ |
| Gal(1- | + | ++ | + | ++ |
| 3- <i>O</i> -MeGal(1- ² | (+) | n. d. | (+) | n. d. |
| -3,6)Gal(1- | n. d. | (+) | n. d. | (+) |
| GalNAc(1- | n. d. | (+) | n. d. | (+) |
| -3)GalNAc(1- | (+) | + | (+) | + |
| GlcNAc(1- | n. d. | (+) | n. d. | (+) |
| -3)GlcNAc(1- | (+) | n. d. | (+) | n. d. |
| -4)GlcNAc(1- | ++ | ++ | ++ | ++ |
| -3,4)GlcNAc(1- | + | + | + | + |

¹ Aliquots der Gesamtfraction an PA-markierten N-Glykanen sowie der Fraktionen nach Immunaффinitätsanreicherung mit immobilisierten anti-SEA Antikörpern wurden permethyliert und hydrolysiert. Partiiell methylierte Alditolacetate wurden nach Reduktion und Peracetylierung erhalten und mittels Kapillar-GC/MS analysiert. Relative Mengen wurden wie folgt angegeben: ++ Hauptkomponente, + Nebenkomponekte, (+) Spur, n. d. nicht detektiert

² Der Nachweis von 3-*O*-methylierten Hexosen wurde durch Cochromatographie entsprechender permethylierter Alditolacetate unter Verwendung von Natriumborodeuterid bei der Reduktion durchgeführt. Die Verknüpfungspositionen wurden unter Verwendung von Trideuteromethyliodid ermittelt.

³ Das Substitutionsmuster wurde nach Permethylierung und Natriumborodeuterid-Reduktion verifiziert.

3.10.4 MALDI-TOF-MS Analyse der Ausgangsfractionen und der Immunaффinitätseluate

Die freigesetzten und PA-markierten Oligosaccharide beider Schnecken-Stämme waren zunächst mittels MALDI-TOF-MS untersucht worden. Zur Isolierung kreuzreagierender Spezies wurden die Glykane jeweils zweimal über die Immunaффinitätsäule gegeben und der Erfolg der Anreicherung mittels MALDI-TOF-MS überprüft.

Im N-Glykan-Gesamtpool des PR-Stammes stellten Komponenten mit mindestens einem Methylhexose-Rest die Hauptkomponenten dar (Abb. 80 A). Spezies mit dieser Zusammensetzung waren auch schon in der vergleichbaren Fraktion im ersten Teil der Studie detektiert (3.4.3). Daneben wurden im Massenspektrum im Massenbereich von über m/z 2000 auch Spezies in geringer Abundanz detektiert, welche für eine Kreuzreaktivität in Frage kommen könnten, da sie Xylose und mehr als eine Fucose beinhalten. Die Immunaффinitätsanreicherung zeigte eine deutliche Signalverstärkung in diesem Massenbereich (Abb. 80 B). Im niedrigeren Massenbereich wurden etliche Spezies detektiert, die im Gesamtpool nicht in Erscheinung getreten waren. Die detektierten Spezies stimmten in ihrer Masse mit denen überein, die auch schon im ersten Teil der Studie detailliert beschrieben wurden. Es kann deshalb davon ausgegangen werden konnte, dass keine neuen Spezies hinzukamen. Das Massenspektrum des N-Glykan-Gesamtpools vom SAL-Stamm (Abb. 81 A) war mit dem des PR-Stammes weitgehend vergleichbar. Lediglich im niedrigeren Massenbereich schien die Signaldichte höher zu sein, wobei es bei den Hauptpeaks keine Unterschiede gab. Im Massenbereich oberhalb von m/z 2000 wurden keine Signale mehr registriert. Das Spektrum nach Immunaффinitätsanreicherung zeigte wieder eine erhöhte Signalintensität im Massenbereich oberhalb von m/z 2000 (Abb. 81 B). Die Signalintensität fiel jedoch deutlich geringer aus. Ebenso wurden auch im niedrigeren Massenbereich weniger Glykanspezies detektiert.

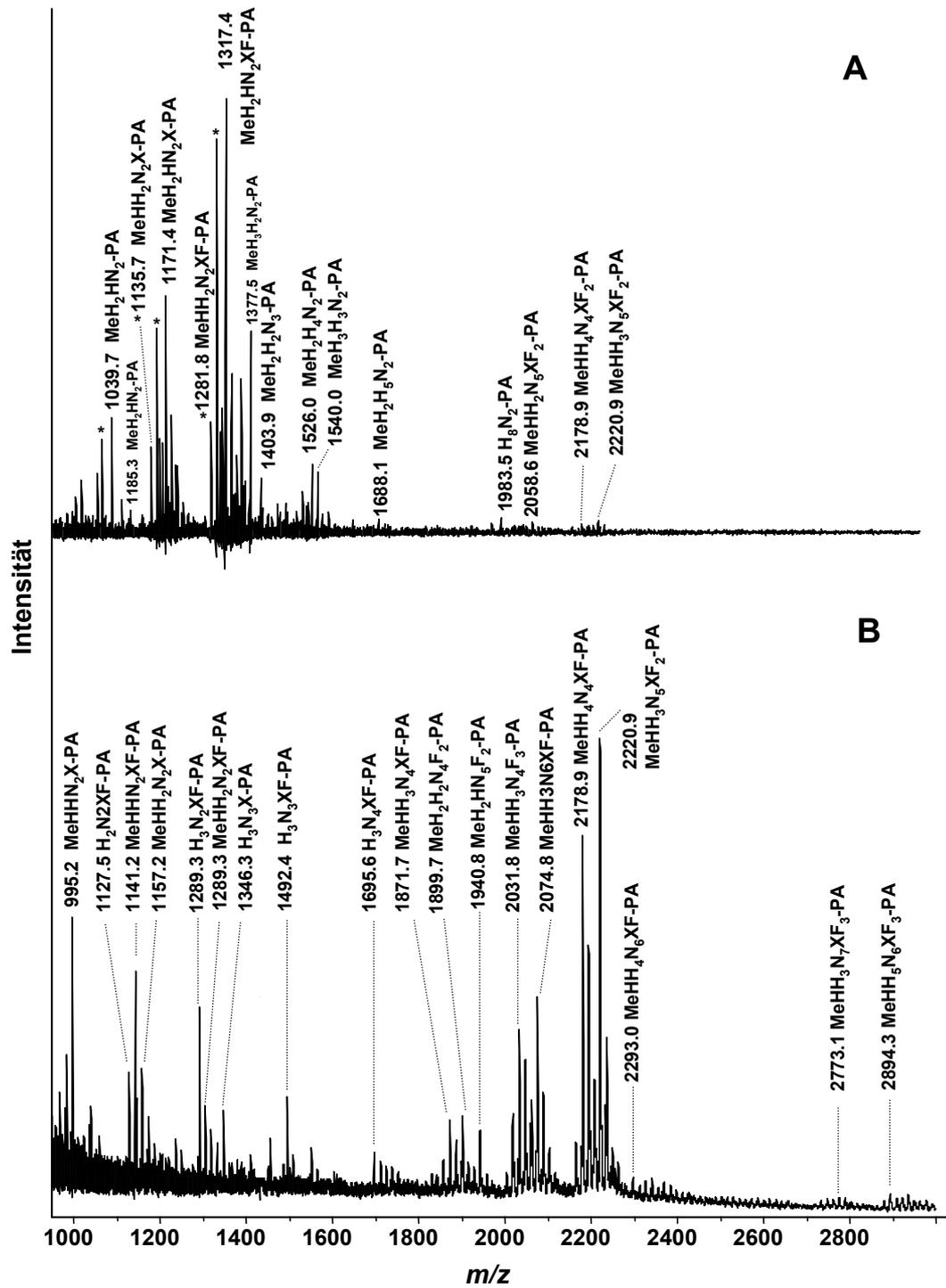


Abb. 80: MALDI-TOF-MS des Gesamtpools an PA-markierten N-Glykanen aus 20 mg Hämolympheprotein des *Bg* PR-Stammes (A) und der daraus mittels Immunaффinitätschromatographie angereicherten N-Glykane (B). Deutliche Signalunterschiede sind nach Anreicherung im Massenbereich oberhalb von m/z 1800 festzustellen.

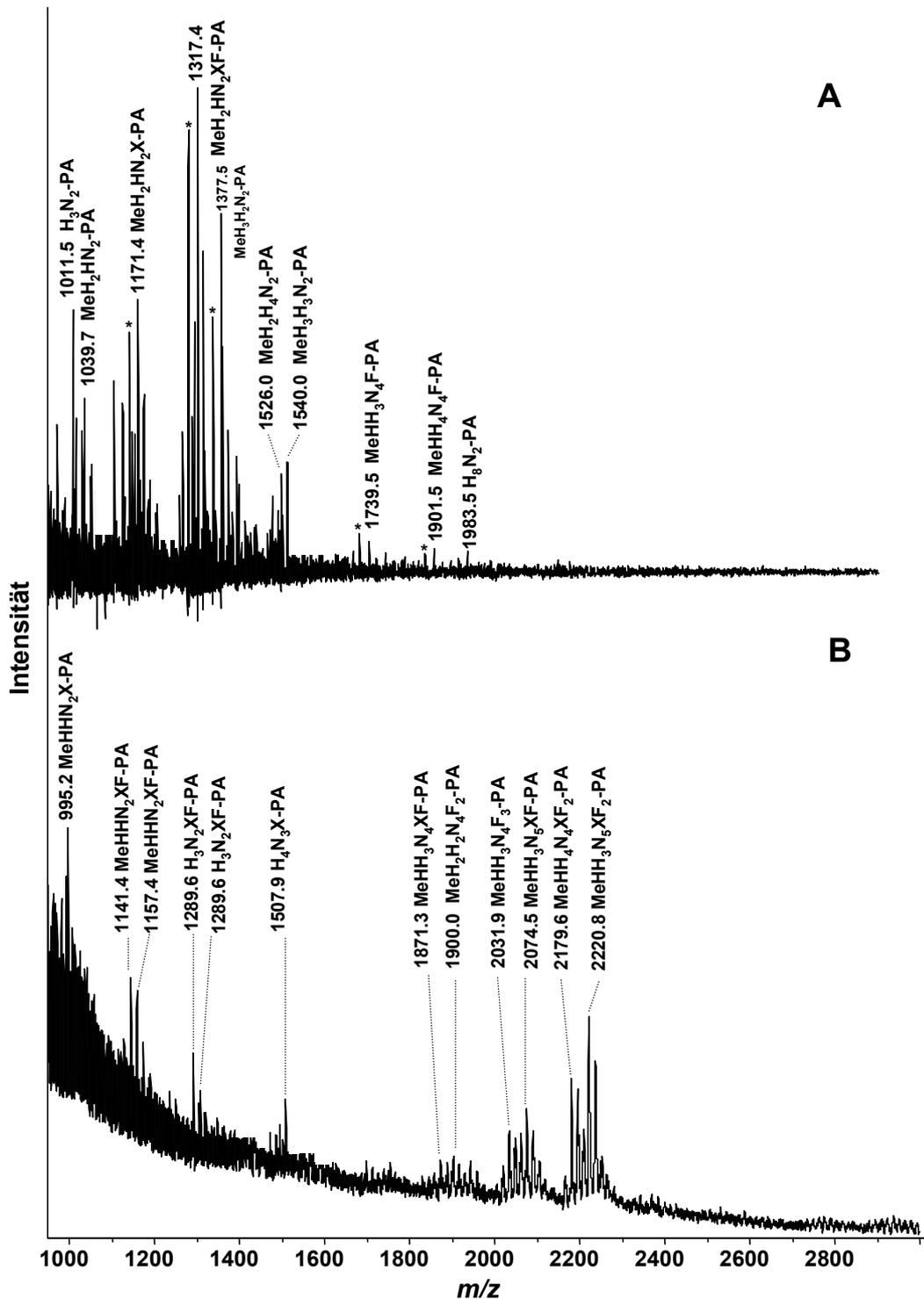


Abb. 81: MALDI-TOF-MS des Gesamtpools an PA-markierten N-Glykanen aus 20 mg Hämolympheprotein des *Bg* SAL-Stammes (A) und der daraus mittels Immunaффinitätschromatographie angereicherten N-Glykane (B). Die Immunaффinitätsanreicherung zeigt eine deutliche Zunahme an Spezies im Massenbereich oberhalb von m/z 1800, jedoch mit geringerer Intensität als beim *Bg* PR-Stamm.

3.10.5 Größenfraktionierung der Immneluatfraktionen

Die Glykane der Immneluatfraktionen wurden einem 2D-HPLC Mapping unterzogen (2.6.5.2). Die Größenfraktionierung ergab die höchsten Fluoreszenzintensitäten für beide Immneluate im Zeitfenster von 24 bis 34 Minuten, was dem Elutionsprofil von Isomaltosyloligosaccharide mit fünf bis elf Glc-Einheiten entsprach (Abb. 82). Die so gewonnenen Fraktionen wurden nachfolgend massenspektrometrisch untersucht.

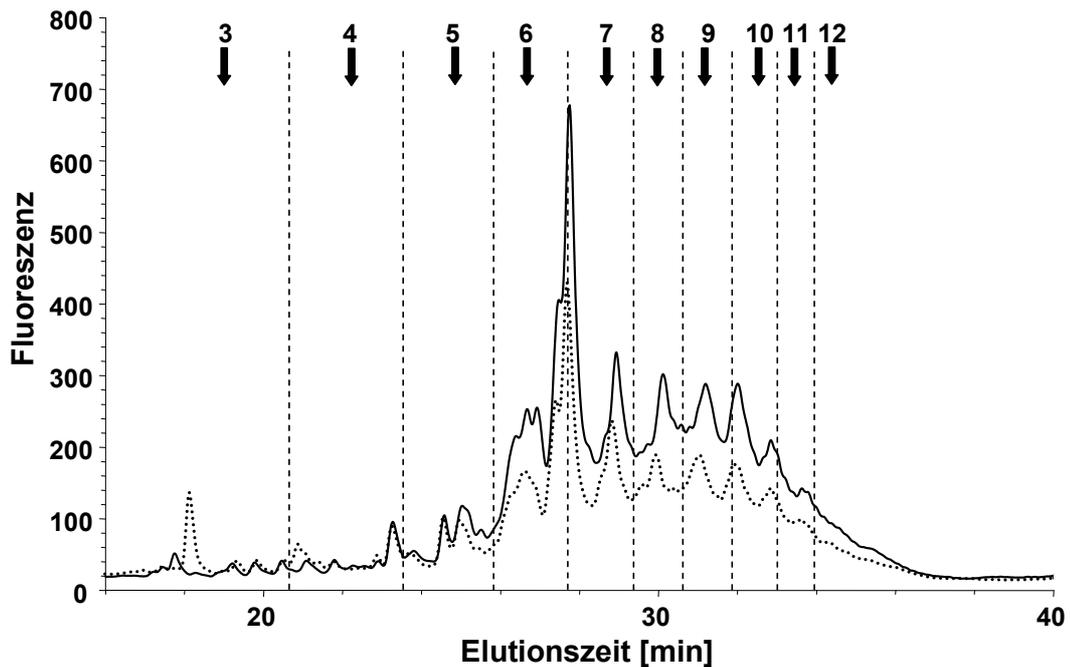


Abb. 82: Größenfraktionierung der anti-SEA gebundenen N-Glykane des *Bg* PR-Stammes (durchgezogene Linie) und des SAL-Stammes (gepunktete Linie) mittels einer NH₂P-Säule. Das Säuleneluat wurde wie angegeben (gestrichelte Linien) fraktioniert. Das Elutionsprofil der Isomaltosyloligosaccharide (IMO) mit 3-12 Glc-Einheiten ist durch die Pfeile gekennzeichnet.

3.10.6 MALDI-TOF-MS Analyse nach Größenfraktionierung der Immneluate

Die MS-Analyse gleicher Aliquots ergab einen ersten Überblick über die nach Größenfraktionierung der Immneluate erhaltenen Glykanfraktionen. In den Fraktionen, die entsprechend IMO 1 bis 2 und IMO 10 bis 12 gesammelt wurden, wurden massenspektrometrisch keine Glykane nachgewiesen. In den Fraktionen IMO 3 - 9 waren PA-Oligosaccharide nachweisbar, wobei insbesondere die Fraktionen IMO 6 - 8 Kohlenhydrate enthielten. Zwischen beiden Stämmen war kein wesentlicher Unter-

schied hinsichtlich der detektierten Glykanmassen festzustellen. Lediglich im Falle von Fraktion IMO 9 des *Bg* PR-Stammes schienen die jeweiligen Glykane in höherer Abundanz vorzuliegen (Abb. 83 und Abb. 84).

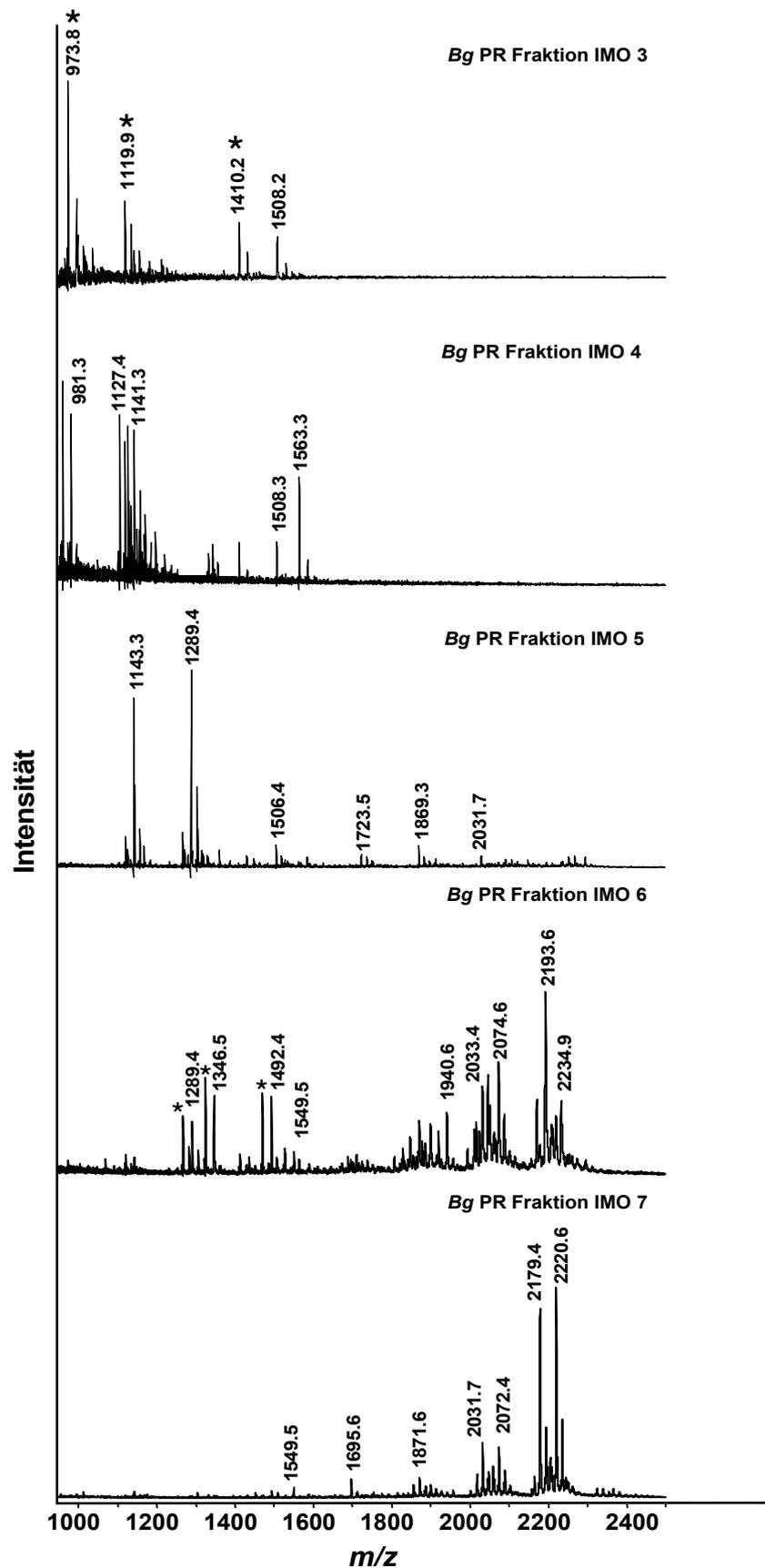


Abb. 83: MALDI-TOF-Massenspektren der IMO-Fractionen 3 bis 9 des *Bg* PR-Stammes nach HPLC-Größentrennung des Immuneluates. Die Glykane wurden jeweils als Na^+ -Addukte detektiert. Zur Monosaccharidzusammensetzung der einzelnen Spezies siehe ausklappbare Tabelle 12 im Anhang.

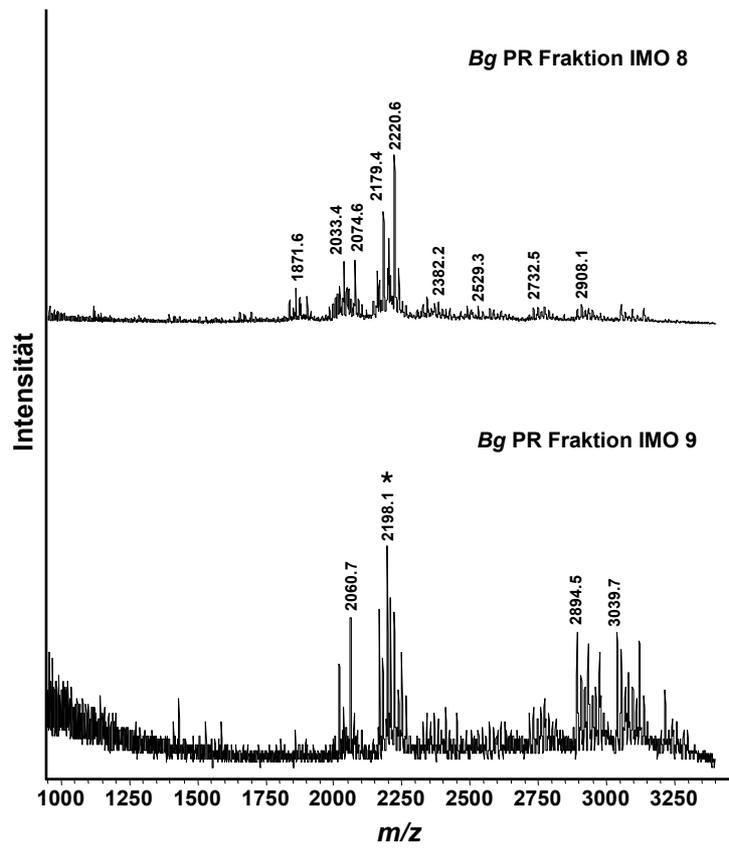


Abb. 83 (Fortsetzung)

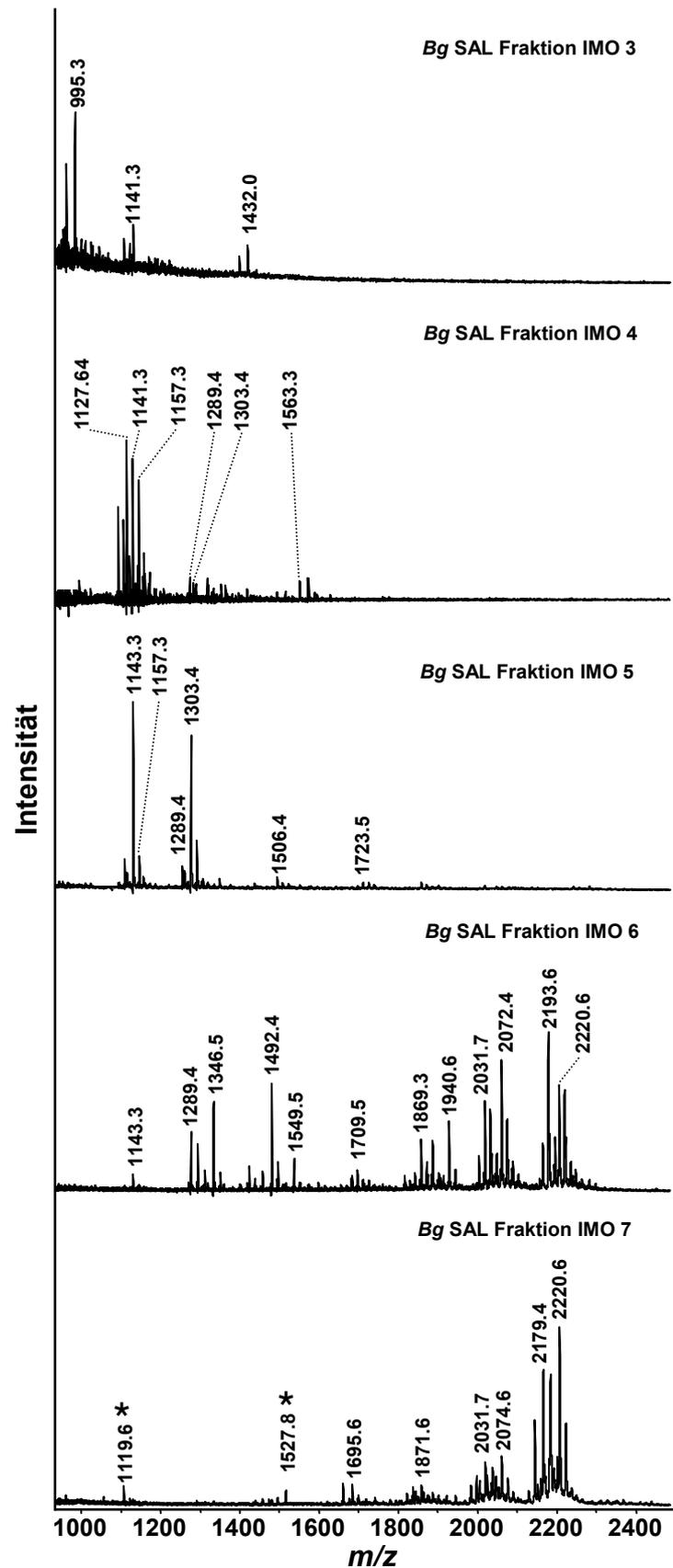


Abb. 84: MALDI-TOF-Massenspektren der IMO-Fractionen 3 bis 9 des *Bg* SAL-Stammes nach HPLC-Größenfraktionierung. Die Glykane wurden jeweils als Na^+ -Addukte detektiert. Zur Monosaccharidzusammensetzung der jeweiligen Spezies siehe die ausklappbare Tabelle 12 im Anhang.

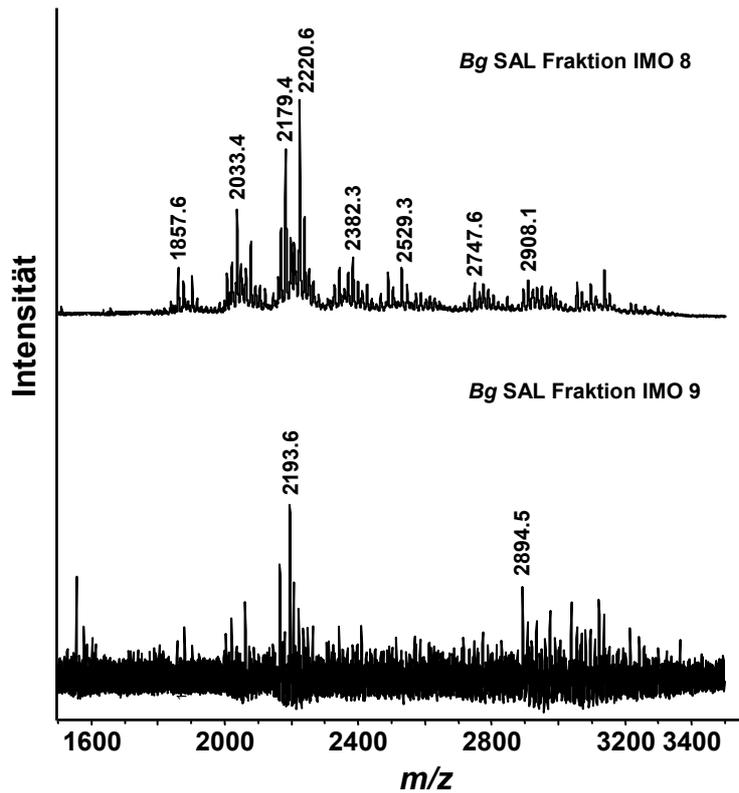


Abb. 84 (Fortsetzung)

3.10.7 Reversed-phase HPLC-Trennung der Fraktionen nach Größentrennung

Die Fraktionen IMO 3 - 9 wurden nachfolgend der RP-HPLC unterzogen. Dabei wurden die Fraktionen nach Trocknung zunächst in einer jeweils gleichen Menge an Wasser gelöst und jeweils eine identische Menge (Volumen) eingesetzt und als Standard PA-markiertes M5A verwendet ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$). In den dargestellten Chromatogrammen der einzelnen Fraktionen stellt die durchgezogene Linie jeweils die Elution der PA-Glykane des PR-Stammes, die gepunktete Linie die der PA-Oligosaccharide des SAL-Stammes dar. Die RP-HPLC-Trennungen der einzelnen Fraktionen zeigten, dass sich alle Chromatogramme sehr ähnlich waren, was die Anzahl an Peaks und den Kurvenverlauf anging. Insbesondere bei den Fraktionen IMO 6 und 7 waren jedoch deutliche Intensitätsunterschiede zu beobachten (Abb. 85 D und E). Einzelne Peakfraktionen oder auch zusammenhängende Peakgruppen wurden gesammelt und massenspektrometrisch analysiert. Innerhalb einer jeden Fraktion wurden die Peakflächen getrennt integriert und mit dem PA-markierten M5A-Standard (25 pmol) in Beziehung gesetzt.

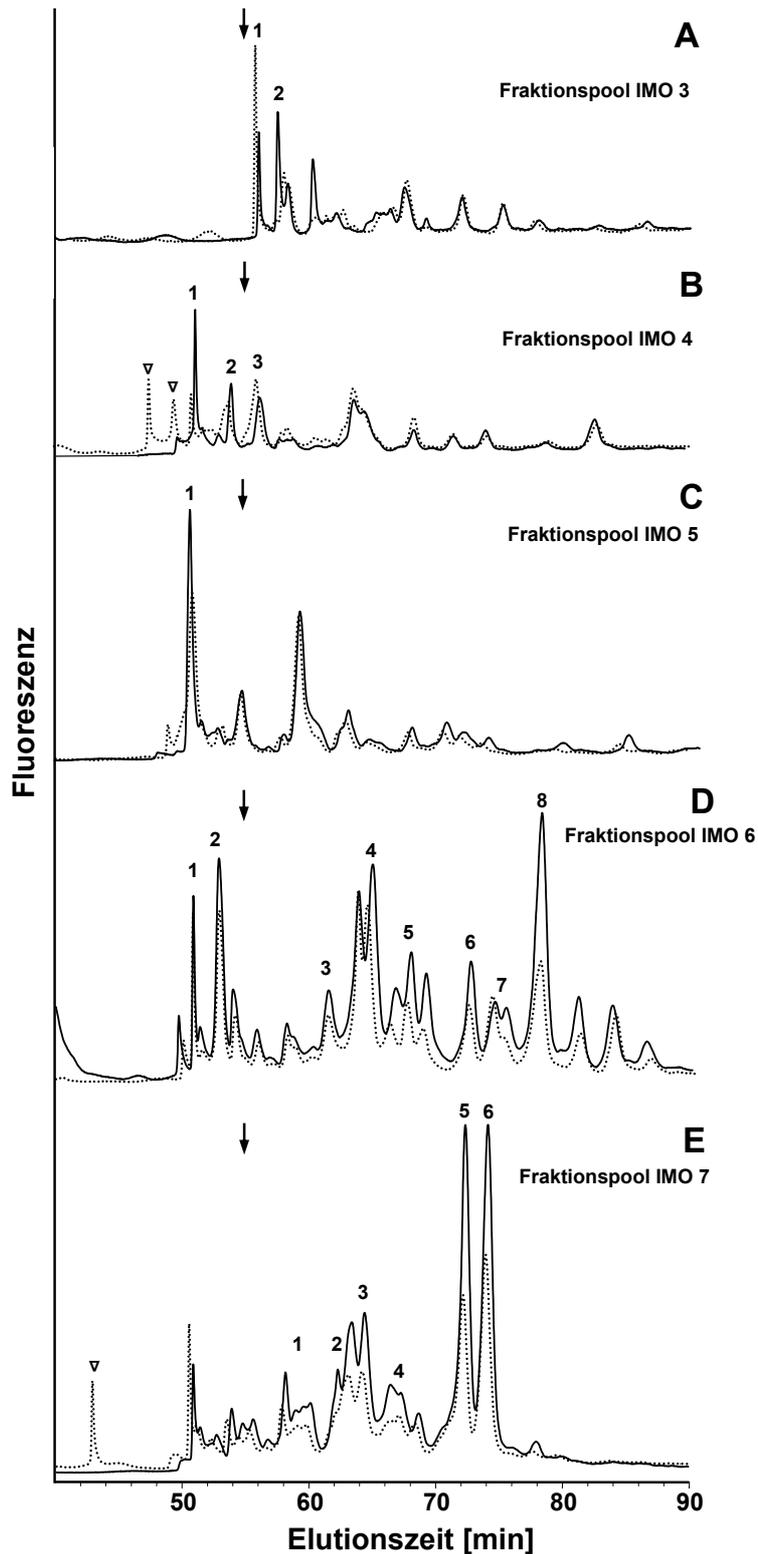


Abb. 85: Chromatogramme nach Auftrennung der einzelnen IMO-Fractionen mittels RP-HPLC (A)-(G), Fractionen IMO 3-9 (vgl. Abb. 82); (H), Oligosaccharid-Standard (M5A), + = Nebenkomponekte $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ (M6A). Durchgezogene Linie = *Bg* PR-Stamm, gestrichelte Linie: *Bg* SAL-Stamm. Die Elutionsposition des Standards ist in (A)-(G) durch eine Pfeil markiert. Die mit arabischen Zahlen gekennzeichneten Subfraktionen wurden weiter untersucht. ∇ = Kontamination (kein Kohlenhydrat). Zur Erklarung der Monosaccharidsymbole siehe Abb. 12 im Abschnitt Material und Methoden.

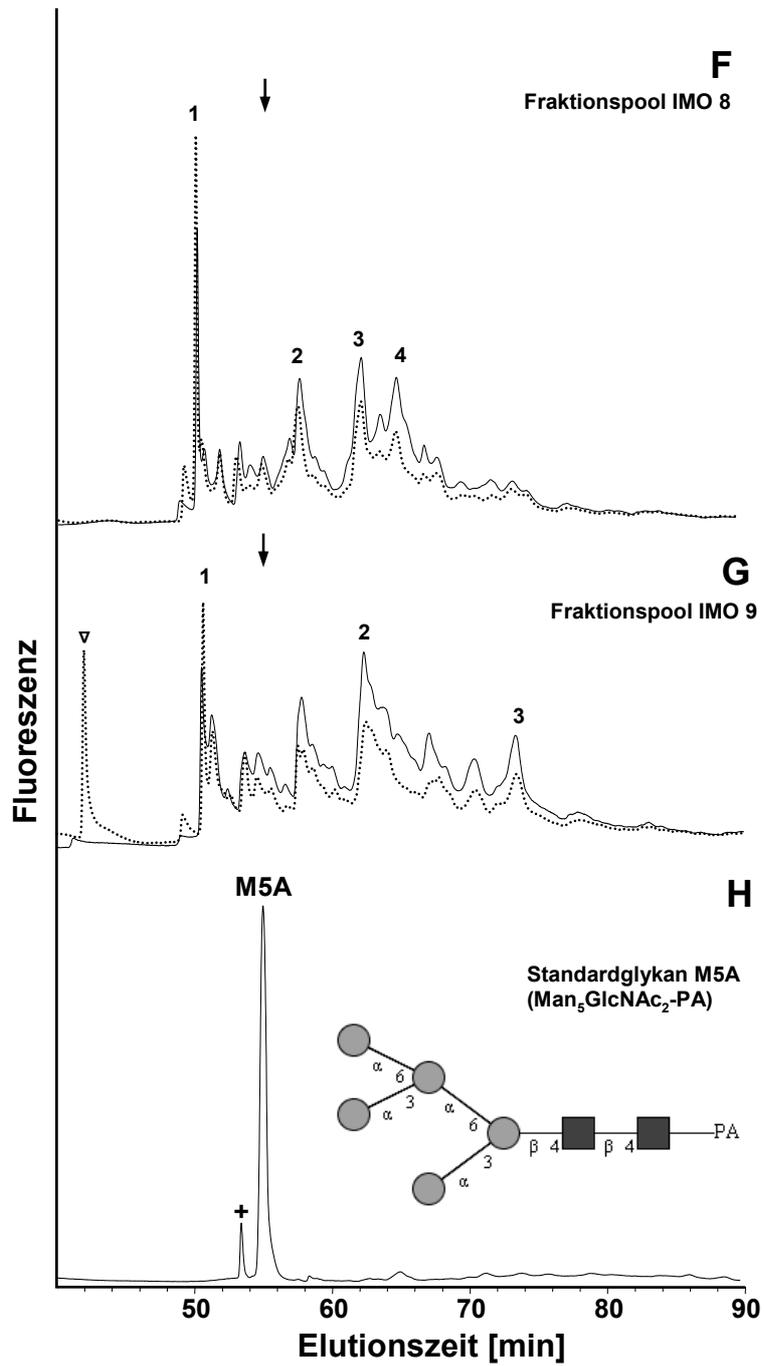


Abb. 85 (Fortsetzung)

3.10.8 Massenspektrometrische Analyse ausgewählter Peaks nach RP-HPLC

Im besonderen Fokus der vergleichenden Untersuchung sollten die Glykane stehen, bei denen nach der RP-HPLC offensichtliche Intensitätsunterschieden aufgetreten waren. Entsprechende Peaks wurden in den Abbildungen mit arabischen Zahlen versehen. Mittels MALDI-TOF-MS wurden diese Fraktionen auf ihren Gehalt an N-Glykanen untersucht. Bei der Trennung der Fraktionspools IMO 3 wurden zwei Peaks isoliert, deren MS-Analyse das Vorliegen von zwei kleineren N-Glykanen der Zusammensetzung MeHH₂N₂X-PA (m/z 1157,3) und MeHHN₂X-PA (m/z 995,3) indizierte, wobei ersteres im SAL-Stamm intensiver detektiert wurde (Abb. 86 A und B). Die ersten Peaks der SAL-IMO 4 Fraktion nach RP-HPLC enthielten keine Glykane. Die drei darauf folgenden Peaks (Abb. 85 B) enthielten alle das N-Glykan H₂N₂X-PA (m/z 981,3), wobei es im zweiten Peak als Hauptkomponente vertreten war (Abb. 86 C-E). Daneben wurde mit dem Glykan H₂N₂XF-PA (m/z 1127,3) in Peak 1 und Peak 2 die korrespondierende, fucosylierte Spezies nachgewiesen. Peak 3 hingegen enthielt mit MeHH₂N₂X-PA (m/z 1157,3) einen schon bekannten Vertreter als Hauptkomponente, deren Retentionszeit mit dem korrespondierenden Peak der Fraktion IMO 3 deckungsgleich war. Die RP-HPLC-Trennung von Fraktionspool IMO 5 erwies sich als Fraktion mit dem höchsten Deckungsgrad der beiden Chromatogramme (Abb. 85 C). Lediglich der erste Peak zeigte beim PR-Stamm eine höhere Intensität. Die MS-Analyse dieses Peaks ergab ein klares Signal für das Pseudomolekül [M+Na]⁺ m/z 1143,3 mit einer Monosaccharidzusammensetzung von H₃N₂X-PA (Abb. 86 F). Die Fraktionen IMO 6 fielen schon während der Größenfraktionierung durch einen Anstieg der Fluoreszenzintensität auf (Abb. 82), was für einen hohen Gehalt an N-Glykanen sprach. Die Chromatogramme nach RP-HPLC zeigten dementsprechend eine große Anzahl an Peaks, wobei insgesamt acht Bereiche auf Grund der Unterschiede in ihrer Fluoreszenzintensität interessant waren. In Peak 1 wurde mit dem Signal bei m/z 1324,9 ([M+H]⁺) ein N-Glykan der Zusammensetzung H₃N₃X-PA als Hauptkomponente detektiert, das als erstes verlängertes N-Glykan gefunden wurde und auch noch in Peak 2 nachgewiesen wurde (Abb. 86 G und H).

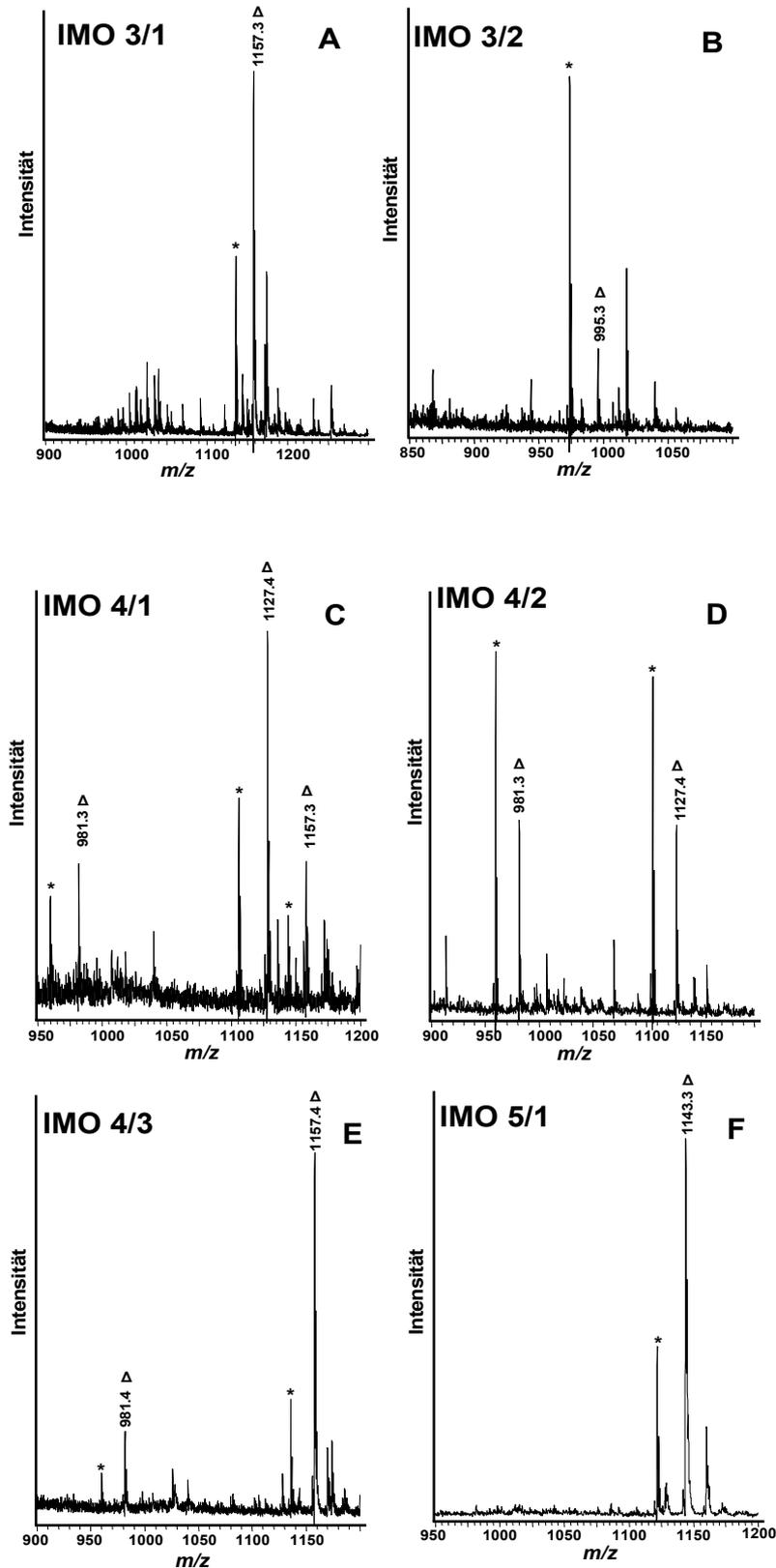


Abb. 86: MALDI-TOF-MS Analyse der ausgewählten Peaks aus den RP-HPLC-Läufen von IMO 3 - 9. * = H^+ -Addukte, Δ = Na^+ -Addukte. Charakteristische Oligosaccharid-Hauptkomponenten wurden annotiert. Zur Monosaccharidzusammensetzung der jeweiligen Glykane siehe in der ausklappbaren Tabelle 12 im Anhang die fettgedruckten Massen.

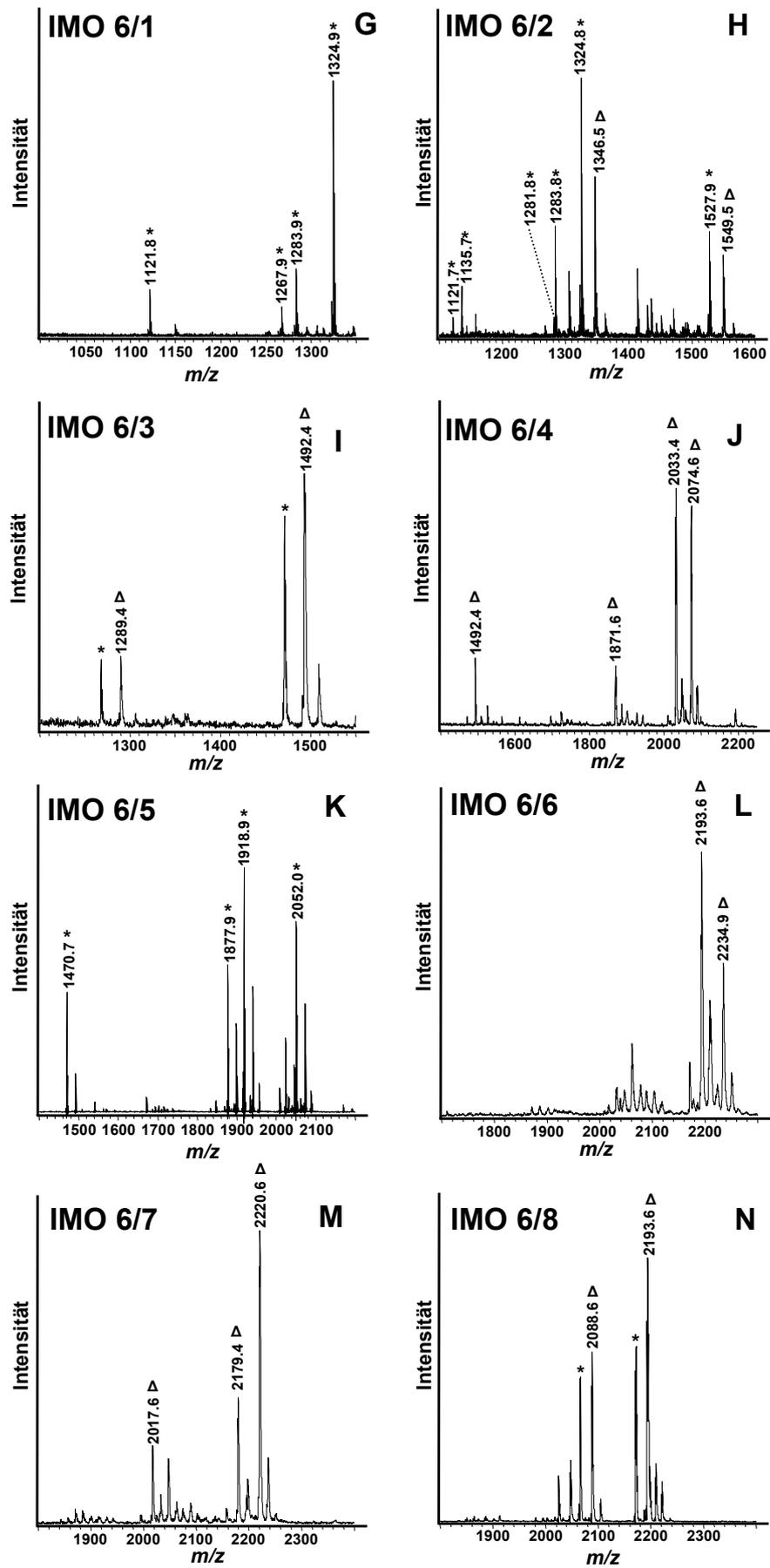


Abb. 86 (Fortsetzung)

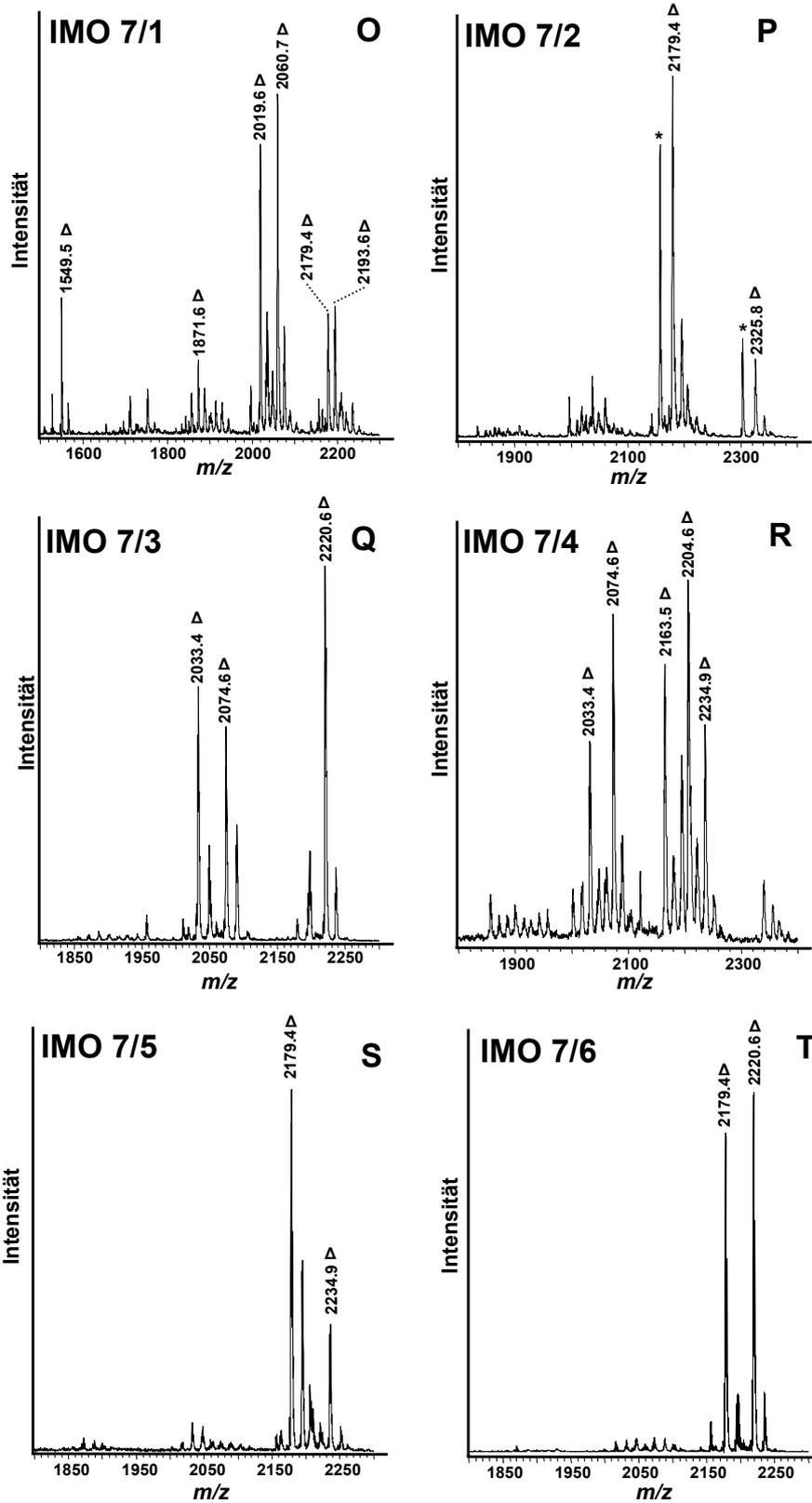


Abb. 86 (Fortsetzung)

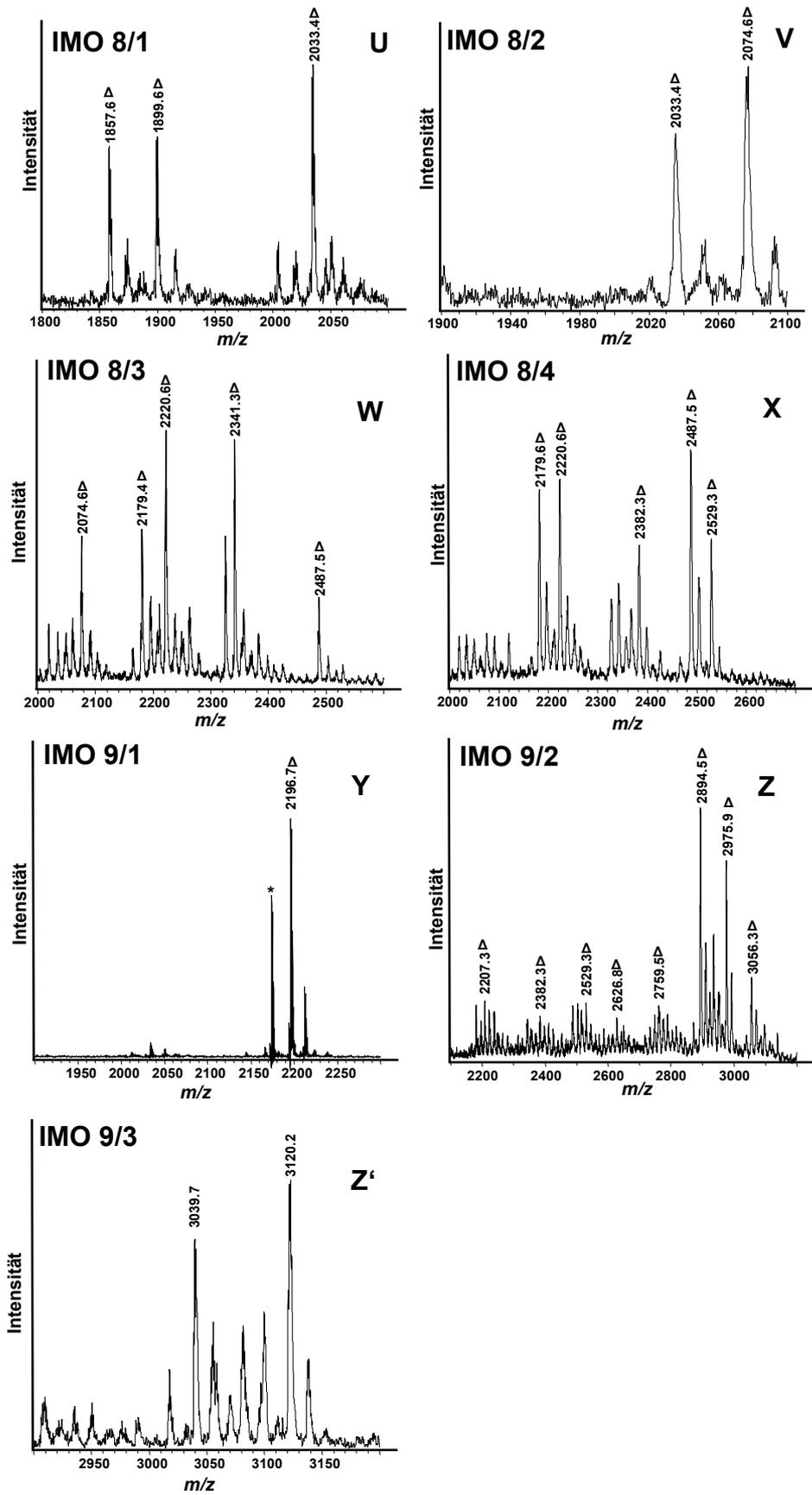


Abb. 86 (Fortsetzung)

In Peak 2 wurden bei m/z 1283,8 (H_4N_2X -PA) und m/z 1527,9 (H_3N_4X -PA) zwei weitere N-Glykane detektiert (Abb. 86 H), wobei das erstere davon erstmalig nachgewiesen wurde und als verlängerte Spezies von H_3N_2X -PA (m/z 1121,3) betrachtet werden kann. Peak 3 erschien im Chromatogramm recht isoliert, enthielt aber mit H_3N_2XF -PA (m/z 1289,4) und H_3N_3XF -PA (m/z 1492,4) zwei Komponenten, die sich um einen HexNAc-Rest unterschieden (Abb. 86 I). Die nächste interessante Fraktion (4) enthielt einen Doppelpeak, was die MS-Analyse bestätigte, da zwei Hauptkomponenten mit m/z 2033,4 ($MeHH_4N_4NF$ -PA) und m/z 2074,6 ($MeHH_3N_5XF$ -PA) nachgewiesen wurden (Abb. 86 J). Ab Peak 5 wurden komplexere N-Glykan-Gemische eluiert, wie m/z 1877,7 ($MeH_2H_2N_4F_2$ -PA), m/z 1918,9 ($MeH_2H_1N_5F_2$ -PA) und m/z 2052,0 ($MeHH_3N_5XF$ -PA) belegen (Abb. 86 K), hingegen war bei m/z 1470,7 noch der Rest eines bereits zuvor detektierten Glykans nachweisbar. In den Peaks 6 - 8, die zur Vollständigkeit ebenfalls analysiert wurden, konnten weitere komplexe N-Glykane detektiert werden, die alle im Massenbereich von über m/z 2000 lagen und eine allgemeine Monosaccharidzusammensetzung von $MeH_{0-2}H_{2-4}N_{4-5}X_{0-1}F_{1-4}$ -PA aufwiesen (Abb. 86 L-N). Die Chromatogramme nach Auftrennung der IMO 7 Fraktionen wurden durch zwei dominante Peaks zwischen 70 und 80 Minuten geprägt, wobei im Bereich von 55 bis 70 Minuten ebenfalls Intensitätsunterschiede registriert wurden. Die MS-Analyse der 6 interessanten Peaks und Peakgruppen ergab durchweg Komponenten komplexeren Typs mit einer Masse von über m/z 2000, die Monosaccharidzusammensetzungen von $MeH_{1-2}H_{2-4}N_{4-5}XF_{1-3}$ aufwiesen (Abb. 86 O-T). Trotz der dominanten Peaks, die isolierte, einzelne Glykane vermuten ließen, konnten in beiden Peaks (Abb. 86 S+T) zwar einige Spezies als Hauptkomponenten detektiert werden, dennoch waren weitere Nebenkomponten enthalten. Die RP-HPLC-Trennung der Poole IMO 8 lieferte neben dem dominanten Peak bei 50 Minuten weitere Peakgruppen, von denen vier auf Grund ihrer Intensitätsunterschiede analysiert wurden (Abb. 86 U-X). Während in den ersten beiden Peaks N-Glykane im Massenbereich von circa m/z 2000 detektiert wurden, wurde in Peak 4 erstmal eine Spezies mit einer Masse von über m/z 2500 (m/z 2529,3) registriert, die eine Monosaccharidzusammensetzung von $MeHH_4N_5XF_3$ -PA indiziert (Abb. 86 X). Die Peaks zeichneten sich durch eine aufsteigende Heterogenität aus, bei parallel sinkender Abundanz der einzelnen Spezies (Abb. 86 U-X). Die Fraktionen IMO 9 wurden ebenfalls mittels RP-HPLC aufgetrennt, da durch Massenspektrometrie in diesem Bereich noch N-Glykane detektiert werden konnten. Aus den Chromatogrammen wurden drei Bereiche ausgewählt, in denen besonders starke Fluoreszenzintensitätsunterschiede auftraten. In Peak 1 wurde nochmals eine sehr

homogene Fraktion mit einem Signal bei m/z 2196,7 beobachtet, welches die Zusammensetzung $\text{MeHH}_5\text{N}_4\text{XF-PA}$ oder $\text{H}_6\text{N}_4\text{F}_2\text{-PA}$ aufweisen konnte (Abb. 86 Y-Z). Die Peakgruppen **2** enthielt bereits wieder zahlreiche Glykane im Massenbereich bis über m/z 3000, zum Teil in sehr niedriger Abundanz (Abb. 86 Z). Peak **3** deckte den letzten Bereich des Chromatogramms ab, in dem weitere N-Glykane des komplexen Typs detektiert wurden, zu denen unter anderem das Signal bei m/z 3120,2 mit einer möglichen Monosaccharidzusammensetzung von $\text{MeH}_2\text{HN}_8\text{F}_5\text{-PA}$ gehört (Abb. 86 Z').

3.10.9 Vergleich der Mengen an kreuzreagierenden Glykanen beider Stämme

Von allen Peaks, die in den Chromatogrammen nach RP-HPLC der IMO-Fractionen 3 bis 9 detektiert worden waren, wurden die Flächen durch Integration bestimmt. Für jedes Chromatogramm wurden danach die einzelnen Flächeninhalte addiert und für jeden Stamm die Gesamtfläche errechnet. Um einen Überblick über die absolute Menge an kreuzreagierenden N-Glykanen der gesammelten IMO-Fractionen zu bekommen, wurden deren Gesamtflächen nach RP-HPLC gegen die aufgetrennten IMO-Fractionen aufgetragen. Um eine Aussage über die prozentuale Verteilung innerhalb eines Stammes machen zu können, wurde für die einzelnen Flächeninhalte die Höhe des Prozentsatzes mit Hilfe der detektierten Gesamtfläche errechnet und graphisch dargestellt.

Der Vergleich der Flächen der einzelnen Fractionen nach RP-HPLC-Trennung ergab ein deutliches Mengenprofil zugunsten der Fraction IMO 7 (Abb. 87 A). Während die Fractionen IMO 3 und 4 bei beiden Stämmen weitgehend identische Mengen an N-Glykanen enthielten, zeigte sich für die Fractionen von IMO 5 bis 9, dass im Fall des PR-Stammes von *B. glabrata* zum Teil deutlich mehr N-Glykane in diesen Fractionen detektiert wurden. Bei einem Blick auf die prozentuale Verteilung innerhalb der Stämme fiel auf, dass Fraction IMO 7 ungefähr 30 % der kreuzreagierenden Glykane in beiden Stämmen stellte. Danach kam es zu einem deutlichen Abfall der Glykanmengen, wobei die Fractionen IMO 6, 8 und 9 einen vergleichbaren Prozentsatz zur Gesamtmenge beitrugen. Die Fractionen IMO 3 bis 5 trugen jeweils den geringsten Teil zur Gesamtmenge bei, wobei die Glykane dieser Fractionen beim SAL-Stamm prozentual höhere Werte erreichten als beim PR-Stamm.

Bezogen auf die eingesetzte Menge (25 pmol) an M5A-Standardglykan wurden im Fall des PR-Stammes insgesamt 467 pmol an kreuzreagierenden N-Glykanen aufgetrennt,

gegenüber 338 pmol beim SAL-Stamm. Demzufolge werden beim empfindlicheren PR-Stamm offenbar die 1,4 fache Menge an kreuzreagierenden N-Glykanen exprimiert im Vergleich zum SAL -Stamm.

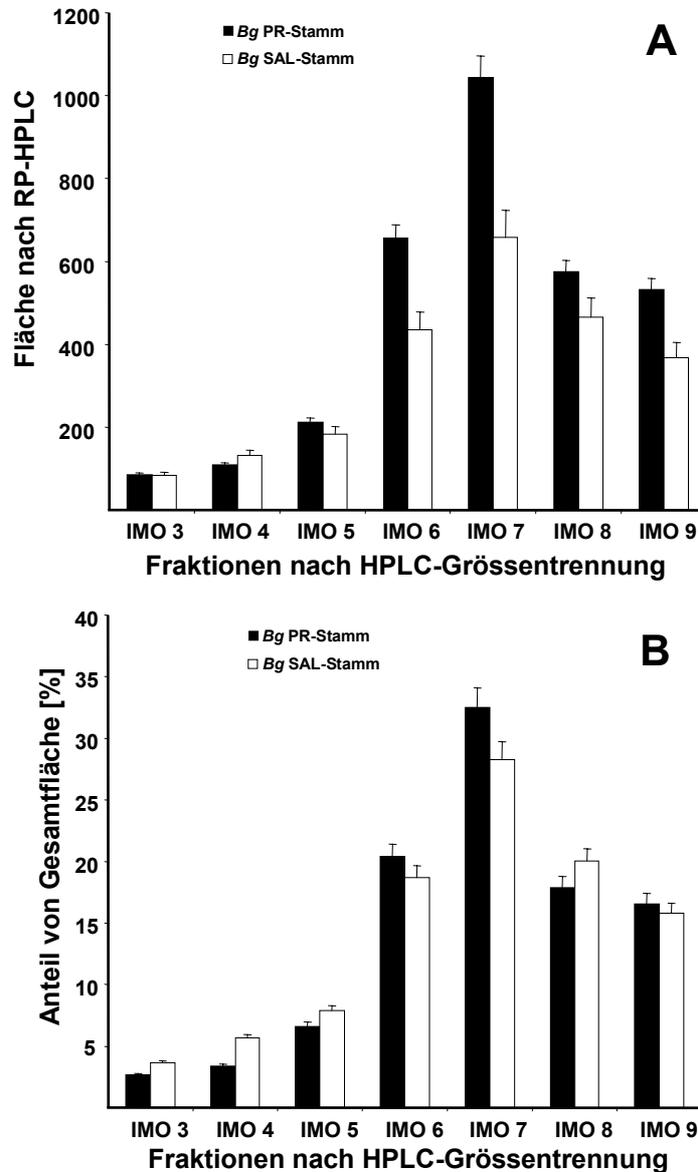


Abb. 87: Gegenüberstellung der nach Immunaffinitätschromatographie und HPLC-Größenfraktionierung erhaltenen kreuzreagierenden N-Glykane der *B. glabrata* Stämme Puerto Rico (PR) und Salvador (SAL). (A), Vergleich der Absolutmengen, ermittelt anhand der jeweiligen Peakflächen; (B) prozentuale Anteile der jeweiligen Glykanfraktionen am Gesamtgemisch der jeweiligen kreuzreagierender Glykane beider Stämme.

3.10.10 Immunhistochemische Untersuchungen

An PFA-fixiertem Mitteldarmdrüsengewebe wurden immunhistochemische Markierungen durchgeführt. Die Ergebnisse daraus werden für die beiden Stämme in Abb. 88 und Abb. 89 dokumentiert. Die Kontrollen mit PBS (ohne 1. Antikörper), NMS und NRS zeigten keine Gewebefärbung. Generell fiel auf, dass das Gewebe des PR-Stammes dichter zu sein schien, als das des SAL-Stammes, das einen aufgelockerten Eindruck machte, und dementsprechend größere Lakunen zeigte. Die Markierung mit anti-SEA Serum führte am Gewebe des PR-Stammes zu einer deutlichen Markierung aller Bereiche des Mitteldarmdrüsengewebes, wobei die Färbung besonders stark im Bereich zu den Lakunen hin ausfiel und Zwischenräume nicht markiert wurden (Abb. 88 D). An Gewebe des SAL-Stammes wurde ebenfalls eine Bindung der anti-SEA Antikörper über den gesamten Schnittbereich beobachtet, die aber weniger homogen war und es besonders in den Gewebsbereichen nahe den Lakunen unterschiedliche Präzipitatsdichten zu beobachten waren (Abb. 89 D). Die Markierung mit dem mAk M2D3H ergab bei beiden Stämmen eine zur anti-SEA Markierung vergleichbare Anfärbung (Abb. 88 F und Abb. 89 F). In beiden Fällen war zu erkennen, dass die Intensität der Anfärbungen geringer war, als bei der anti-SEA Inkubation. Um die Präsenz von unfucosylierten sowie fucosylierten Kohlenhydratepitopen weiter zu dokumentieren, wurden Schnitte beider Stämme mit den mAks gegen LDN und F-LDN inkubiert. Die Schnitte nach Markierung mit dem mAk gegen LDN zeigten keine Präzipitatsbildung (Abb. 88 G und Abb. 89 G), während die Markierung mit dem mAk gegen F-LDN die Präsenz terminal fucosylierter Epitope belegte, da die Anfärbung bei beiden Schnitten deutlich ausfiel und sich auch mit dem Markierungsprofil des mAks M2D3H deckte (Abb. 88 H und Abb. 89 H). Die Markierungen mit Antikörpern gegen subterminal fucosylierte Epitope LDN-F und LDN-DF lieferte nur eine schwache Anfärbung (ohne Abbildung).

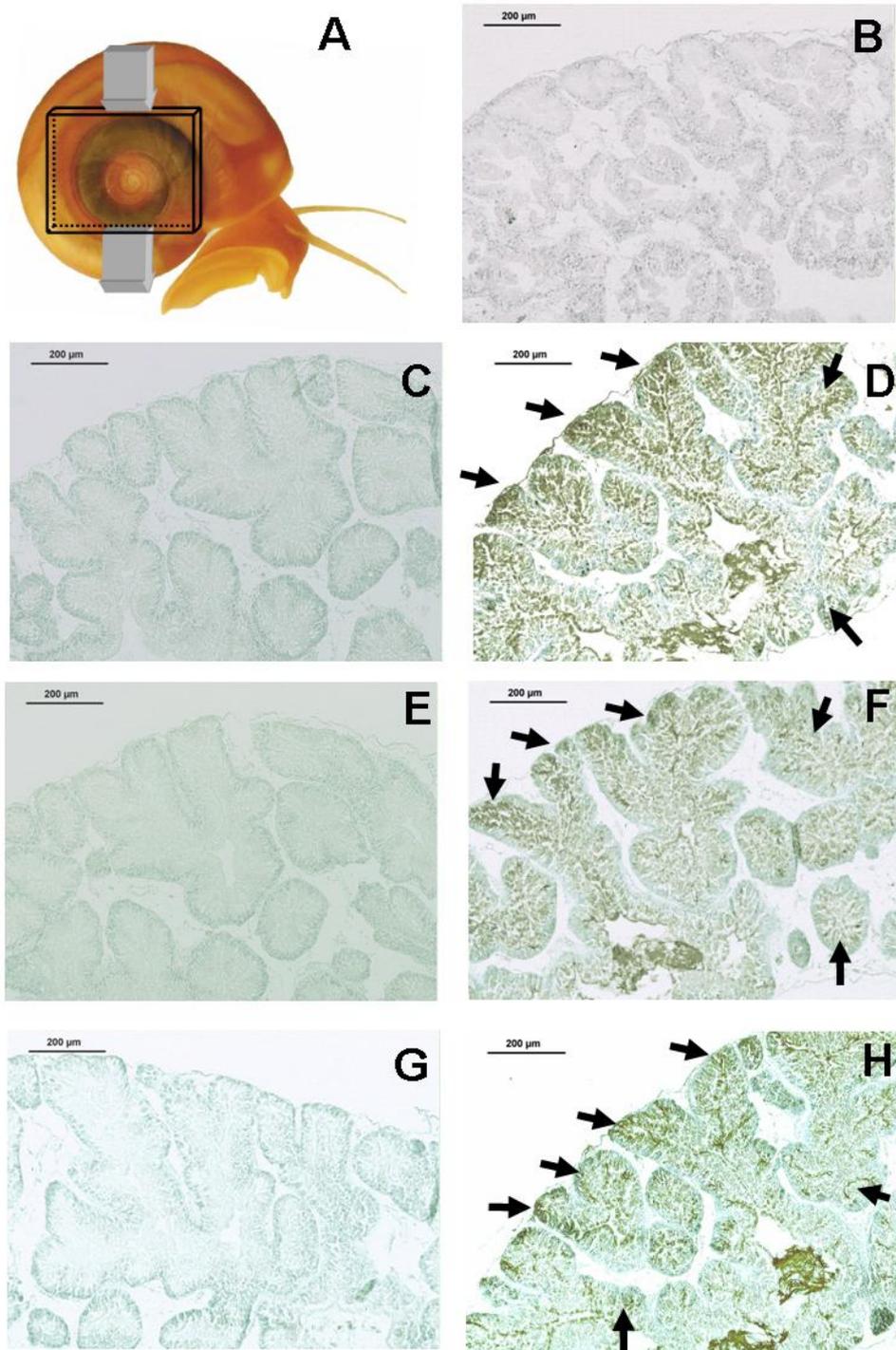


Abb. 88: Immunhistochemische Anfärbung von Mitteldarmdrüsen­gewebe des *Bg* PR-Stammes. (A) Schnittebene, (B) Kontrolle PBS, (C) Kontrolle NRS, (D) anti-SEA Serum, (E) Kontrolle NMS, (F) mAk M2D3H, (G) mAk LDN und (H) mAk F-LDN. Die Pfeile kennzeichnen Bereiche der Antikörperbindung. Balken = 200 µm.

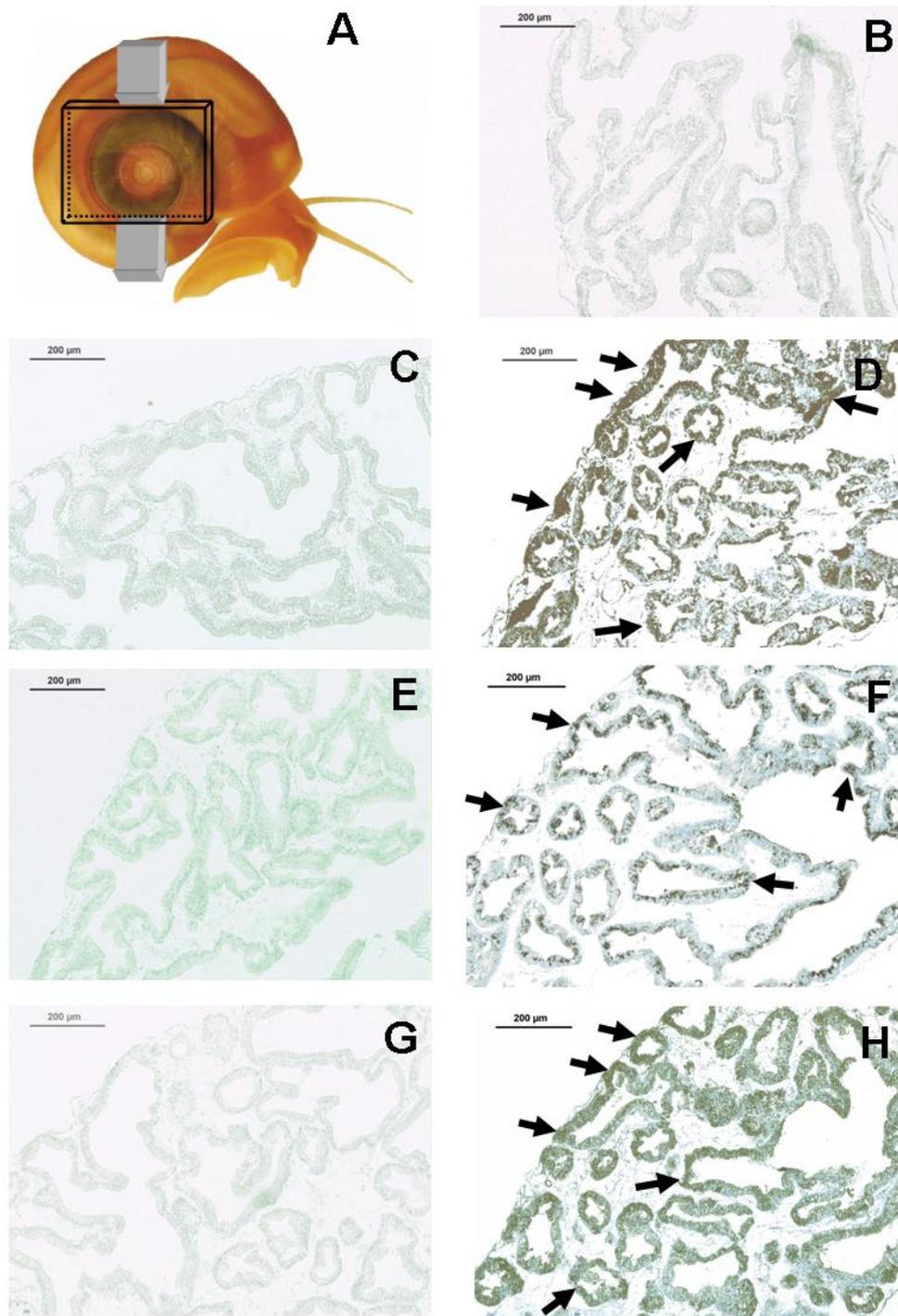


Abb. 89: Immunhistochemische Anfärbung von Mitteldarmdrüsengewebe des *Bg* SAL-Stammes. (A) Schnittebene, (B) Kontrolle PBS, (C) Kontrolle NRS, (D) Inkubation mit anti-SEA Serum, (E) Kontrolle NMS, (F) mAk M2D3H, (G) mAk LDN und (H) mAk F-LDN. Die Pfeile kennzeichnen Bereiche der Antikörperbindung. Balken = 200 µm.

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Aspekte

In ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden von einem Pool an Hämolymphe-Gesamtprotein der Süßwasserschnecke *B. glabrata* diejenigen N-Glykane strukturell charakterisiert, die eine Kreuzreaktivität zu Glykokonjugaten des Humanparasiten *S. mansoni* aufwiesen. Auf der Basis des früheren Befundes, dass *S. mansoni* mit seinem Zwischenwirt *B. glabrata* mindestens ein Epitop gemeinsam hat [70], sollte geklärt werden, ob molekulare Mimikry auf der Basis von kreuzreagierenden Kohlenhydratstrukturen als Invasionsstrategie von *S. mansoni* neben dem Endwirt auch für den Zwischenwirt postuliert werden kann.

4.2 Methodische Aspekte

4.2.1 Aufreinigung des Hämolympheproteins und Freisetzung der N-Glykane

Die Dialyse der Hämolymphe erlaubte, das Hämolympheprotein neben einer effektiven Aufreinigung auch von einer hohen Menge an freier Glukose zu befreien, was eine vergleichende Monosaccharidbestimmung des Rohmaterials und der aufgereinigten Hämolymphe belegte (Daten nicht gezeigt). Dabei hatte sich weiterhin gezeigt, dass das Hämolympheprotein einen Glykosylierungsgrad von 10 % bezogen auf die Gesamtproteinmenge aufweist. Berechnungen nach Monosaccharidbestimmung vom N-Glykan-Gesamtpool, des Immunaффinitätsdurchlaufes und -eluates zeigten, dass nur ca. 10 % der Glykane von der PNGase F freigesetzt wurden. Da der Gehalt an Galaktose im Gesamthämolympheprotein am höchsten war, während in den freigesetzten N-Glykanen der Gehalt an Mannose überwog, liegt es nahe anzunehmen, dass ein hoher Grad an O-Glykosylierung vorlag. Dennoch erwies sich die eingesetzte Menge an Hämolympheprotein für die Charakterisierung der kreuzreagierenden N-Glykane als ausreichend, um eine genügend große Menge an Kohlenhydrat-Ketten als Ausgangsmaterial mit PNGase F freizusetzen. Die chemische Freisetzung mit Hydrazin im zweiten Teil der Studie resultierte bei beiden Stämmen in einem prozentual höheren Anteil an freien N-Glykanen von gemittelten 48 %, was auf eine effektivere chemische Abspaltung hindeutet.

4.2.2 Befunde biochemischer Untersuchungen

Für die biochemische Charakterisierung des Hämolympheproteins wurden Western Blot Analysen und ELISA-Bindungsstudien durchgeführt, die einen ersten Überblick über vorliegende kreuzreagierende Epitope geben sollten. Die mittels reduktiver SDS-PAGE aufgetrennten Hämolympheproteine stellten sich als Gemisch heraus, in dem von kleineren Proteinen mit Massen zwischen 10 und 20 kDa bis hin zu dem großen Hämoglobin, detektiert als 180 kDa Untereinheit, viele Proteinbanden zu erkennen waren. Die anti-SEA Antikörper interagierten mit vielen Proteinbanden. Die Markierung mit dem mAk M2D3H, der spezifisch das Fuc(α 1-3)GalNAc-Motiv erkennt, zeigte ein vergleichbares Bindevormögen, wenn auch in geringerer Intensität. Die ELISA-Bindungsstudien bestätigten im Fall von anti-SEA Serum die Befunde aus den Western Blot Experimenten und zeigten, dass die Bindung defucosylierter (Glyko-)Peptide zwar weniger stark ausfällt, aber doch noch vorhanden ist. Dies deutete bereits darauf hin, dass für die Bindung der anti-SEA Antikörper nicht nur Fucose-Reste in Betracht zu ziehen sind. Die mAks gegen fucosylierte Kohlenhydratepitope zeigten bei defucosylierten (Glyko-)Peptiden stets einen starken Abfall der Antikörper-Bindung. An Hand des gesteigerten Bindevormögens des mAk gegen das LDN-Motiv konnte gezeigt werden, dass viele Fucose-Reste an LDN-Elementen gebunden vorliegen, die nach Defucosylierung für die Antikörperbindung als freie LDN-Epitope zur Verfügung stehen.

4.2.3 Isolierung und erste Charakterisierung der kreuzreagierenden Spezies

Ohne Anreicherung der kreuzreagierenden N-Glykane mittels Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung von immobilisierten Kaninchen-IgGs gegen lösliche Eiantigene von *S. mansoni* wäre es nur erschwert möglich gewesen, die für die Fragestellung interessanten Glykanspezies detailliert untersuchen zu können, da sie auf Grund ihrer geringen Abundanz im Gesamtspektrum aller N-Glykane fast nicht sichtbar waren. Während seines gesamten Lebenszyklus synthetisiert *S. mansoni* eine breite Palette an fucosylierten Kohlenhydratepitopen, von denen Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc (Le^X), Fuc(α 1-3)GalNAc(β 1-4)GlcNAc (F-LDN), GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc (LDN-F), Fuc(α 1-3)GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc (F-LDN-F) und GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-2)Fuc(α 1-3)]GlcNAc (LDN-DF) besonders von Bedeutung sind [145,220,293]. Durch den Einsatz von mAks gegen definierte Epitope konnte gezeigt werden, dass diese Epitope besonders auf Glykoproteinen im Eistadium [252] und auch

auf löslichen Eiantigen (SEA) im Serum von infizierten Wirten vorliegen [219]. Demzufolge schien es sinnvoll, IgGs aus Kaninchen-Hyperimmunseren gegen SEA von *S. mansoni* zu verwenden, da erwartet werden konnte, dass die Antikörper auch gegen solche Kohlenhydratepitope gerichtet sind. Die mittels der Immunaффinitätschromatographie isolierte Menge an kreuzreagierenden N-Glykanen betrug circa 5% der insgesamt freigesetzten Gesamtmenge an N-Glykanen. Die Monosaccharidbestimmung ergab, dass neben Fucose und Xylose auch Galaktose in dieser Fraktion angereichert wurde. Darüber hinaus wurden auch 3-O-Methylmannose und 3-O-Methylgalaktose in Spuren nachgewiesen. Die Methylierungsanalyse unter Verwendung von deuteriertem Methyljodid ergab, dass ein geringer Teil der 3-O-Methylmannose an C2 oder C6 verlängert wird. Dies war insofern von Interesse, als dieser Baustein auch auf N-Glykanen des Hämocyanins von *Lymnaea stagnalis* gefunden wurde, dort aber (α 1-3)-gebunden war und, nicht verlängert, als Stoppsignal betrachtet wurde [294,295]. Interessant war auch der Befund, dass in der Gesamtfraktion kreuzreagierender N-Glykane von *B. glabrata* 2-substituierte (internen) Fucose nachweisbar war, was für die Präsenz des LDN-DF-Motivs sprach.

Die Fraktion der von anti-SEA Antikörpern gebundenen N-Glykane erwies sich in der MS-Analyse als ausgesprochen heterogenes Glykangemisch. Trotzdem war daraus bereits eine Einteilung der Glykane in verschiedene Gruppen möglich, wobei diese Glykanfraktion in kleine xylosylierte Glykane (\pm Kernfucose), verlängerte xylosylierte Spezies (\pm Kernfucose), verlängerte xylosylierte Glykane mit mehreren Fucosen und verlängerte unxylosylierte Spezies, die mehrere Fucose-Reste tragen, aufgeteilt werden konnte. Daher wurden zur weiteren Charakterisierung und Auftrennung die anti-SEA gebundenen N-Glykane einer Lektinaффinitätschromatographie unterzogen, bei der das immobilisierte, fucosespezifische Lektin des Pilzes *Aleuria aurantia* eingesetzt wurde, dessen Spezifität für die Bindung der Fucose bekannt ist [323]. Die Trennung erschien auf den ersten Blick sehr effektiv, da zwei Fraktionen an gebundenen und ungebundenen N-Glykanen erhalten wurden, deren MS-Analyse die Anwesenheit von Spezies unterschiedlicher Massen belegte. Besonders der Pool an AAL-gebundenen Glykanen unterschied sich in vielen Massen nicht vom Gesamtpool der anti-SEA gebundenen N-Glykane, was dafür sprach, dass ein Grossteil der Glykane, auch die Hauptkomponenten, eine starke Affinität zum Lektin zeigten. Hingegen schien die Trennung nicht quantitativ zu sein, da zum Teil auch fucosylierte Spezies in der AAL-ungebundenen Fraktion gefunden wurden. Zur weiteren HPLC-Trennung wurden beide Fraktionen mit einer TSK-Amidgel Säule nach Größe subfraktioniert. Die MS-Analyse

der einzelnen HPLC-Fractionen ergab, dass auf Grund der großen Heterogenität der Ausgangsfractionen durch HPLC nur eine Antrennung der Spezies möglich war, was sich in einer noch immer vorhandenen Heterogenität der HPLC-Fractionen widerspiegelte. Aus diesem Grunde wurde die strukturelle Charakterisierung nur an Hauptkomponenten durchgeführt, um prototypische Strukturen zu identifizieren.

4.2.4 MALDI-TOF-MS basierende Untersuchungen

Die MALDI-TOF-MS hat sich in den letzten Jahren als massenspektrometrische Methode zur Analyse neutraler Oligosaccharide neben weiteren Methoden sehr bewährt, zumal sie sich auch durch eine hohe Sensitivität auszeichnet [91,135,207,332]. Als Matrixsubstanz wird für neutrale Oligosaccharide häufig ATT und auch DHB eingesetzt [94,137,138,234,310,317,318]. Im Rahmen dieser Studie wurde ATT als Matrix bei den MS-Analysen im LID-Modus verwandt. Die Detektion der N-Glykane in den massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgte oftmals parallel als Pseudomoleküle $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$, was sich durch Doppelpeaks mit dem Abstand von 22 Da bemerkbar machte. Zur vermehrten Generation von H^+ -Addukten oder Na^+ -Addukten wurde die Matrixsubstanz zum Teil auch in 25 mM NH_4HCO_3 oder 25 mM NaCl Lösungen aufgenommen, was jedoch nicht immer von Erfolg gekrönt war. Die DHB Matrix wurde nur bei MS-Messungen im CID-Modus nach publiziertem Rezept eingesetzt [94]. Dabei zeigte sich, dass die Matrix besonders im Massenbereich von m/z 1000 bis 1500 zu störenden Signalclustern führte, die Oligosaccharidmassen unterdrückten und sich auch durch Aufreinigung nicht nennenswert umgehen ließen. Die Clusterbildung durch DHB ist massenspektrometrisch auch in einem anderen Zusammenhang beobachtet worden [31]. Dies zu umgehen, machte einen deutlich höheren Substanzverbrauch für die CID-Messungen erforderlich.

4.2.5 Behandlung mit Exoglykosidasen und Defucosylierung

Der sequenzielle Abbau von N-Glykanen vom nicht-reduzierenden Ende her mit Exoglykosidasen und HF-Lösung sollte Informationen über den Aufbau und die anomere Konfigurationen einzelner Monosaccharidbausteine des Glykans liefern [91]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden α -Fucosidase, α -Mannosidase, α -Galaktosidase, β -Galaktosidase, β -N-Acetylhexosaminidase und β -Xylosidase für eine enzymatische Behandlung eingesetzt. Die α -Fucosidase Behand-

lung führte besonders bei den AAL-gebundenen N-Glykanen zur Abspaltung eines Fucose-Restes, der in einem Beispiel mittels LIFT-Massenspektrum nach dem Verdau als Kernfucose identifiziert werden konnte. Der Verdau mit β -N-Acetylhexosaminidase und führte besonders bei den xylosylierten verlängerten Spezies zum Erfolg und bestätigte die Verlängerung diesen Glykants mit HexNAc-Resten. Der Einsatz von α -Mannosidase bestätigte, dass die Antennen der Kernstrukturen ohne Methylzucker offenbar nur α -gebundene Mannosen aufwiesen. Die Behandlung von N-Glykanen mit α - und β -Galaktosidase und β -Xylosidase zeigte keinen Effekt. Möglicherweise wurden die Enzyme durch umgebende Monosaccharidbausteine sterisch gehindert, was für die Behandlung mit Exoglykosidasen beschrieben wurde [338]. Bei größeren xylosylierten Glykanen mit zwei bis drei Fucose-Resten hatte die HF-Behandlung bei einem Teil der Spezies zur Freisetzung von mindestens einer, teilweise sogar zwei Fucose-Resten geführt. Interessanterweise zeigten die zwei komplexeren N-Glykane mit Pseudomolekülmasse $[M+Na]^+$ m/z 2179,4 und 2220,6 nach HF-Behandlung auch eine Massenverschiebung von 350 bzw. 309 Da, was für die gleichzeitige Abspaltung von einem Fucose-Rest in Kombination mit einem weiteren HexNAc-Rest oder einem Hexose-Rest spricht. Da es keine vergleichbaren Befunde in der Literatur gibt, kann spekuliert werden, dass die HF-Behandlung bei diesen Spezies schon zu einer partiellen Hydrolyse führt, da wiederum andere N-Glykane durch die HF-Behandlung unverändert blieben.

4.3 Strukturelle Aspekte

4.3.1 Kleinere kreuzreagierende N-Glykane

In den Glykanpools, die nach Lektinaffinitätschromatographie aus dem Gesamtpool kreuzreagierender Spezies gewonnen wurden, waren stets kleinere Spezies bis zu einer pseudomolekularen Masse $[M+Na]^+$ von m/z 1506,4 detektiert worden, die alle eine Xylose aufwiesen, was auch anhand der Fragmentierungsmuster in den LIFT-Spektren bewiesen wurde. Demnach war der (β 1-2)-gebundene Xylose-Rest an der zentralen β -gebundenen Mannose als Epitop kleinerer N-Glykane zu betrachten, das die Kreuzreaktivität dieser Glykanspezies vermittelt, zumal dieses Epitop auch auf N-Glykanen schistosomaler Ei-Glykoproteine gefunden wurde [159,161,162]. Dabei schien für die Bindung dieser Spezies an die anti-SEA Antikörper allein der (β 1-2)-gebundene Xylose-Rest auszureichen. So konnte mit der Spezies der pseudomolekularen Masse $[M+Na]^+$ 965,5 das kleinste kreuzreagierende N-Glykane in dieser Studie

detektiert werden, dessen LIFT-Spektrum deutlich die Fragmentierung einer Kernfucose und einer Xylose vom Vorläuferion zeigte. Die Bindung dieses Glykantyps wird auch durch die Präsenz weiterer Monosaccharidreste nicht beeinträchtigt, da die Spezies der pseudomolekularen Masse $[M+Na]^+$ 981,3 (H_2N_2X-PA) und 1127,4 (H_2N_2XF-PA), 1141,3 ($MeHHN_2XF-PA$) und 1289,4 (H_3N_2XF-PA) ebenfalls durch die anti-SEA Antikörper gebunden wurden. Ein zusätzliches Experiment mit dem N-Glykan $MUXF^3$ ($Man(\alpha 1-6)[(\beta 1-2)Xyl]Man(\beta 1-4)GlcNAc(\beta 1-4)[(\alpha 1-3)Fuc]GlcNAc$) vor und nach Entfernung der Kernfucose zeigte, dass auch N-Glykane pflanzlichen Ursprungs von den anti-SEA Antikörpern gebunden werden (Abb. 92 im Anhang). Eine mit der Kernstruktur ($\beta 1-2$)-verknüpfte Xylose wurde auch bei anderen Glykoproteinen von Mollusken, wie den Hämocyaninen von *Helix pomatia* [189,296] und *L. stagnalis* [294,295] nachgewiesen, wo entsprechende Glykane als Hauptkomponenten vorliegen, die 3-O-Methylhexosen sowie auch in Teilen LDN-Motive aufweisen. In den N-Glykanen des Hämocyanins der Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* (KLH), die mit schistosomalen Glykokonjugaten kreuzreagieren, wurde dieses Epitop dagegen nur vereinzelt nachgewiesen [94]. Die Addition der Hexose zum H_2N_2XF-PA Glykan und der Methylhexose zum $MeHHN_2XF-PA$ Glykan schien präferenziell an dem C3-Atom der zentralen Mannose zu erfolgen. Zum einen wurden in den MS-Messungen im CID-Modus keine passenden D-Ionen detektiert, zum anderen blieb der Verdau mit β -Xylosidase ohne Effekt, während das Enzym im Fall des N-Glykans $MUXF^3$ aktiv war, was den Literaturbefund bestätigte [233]. Die Hexose-Reste der Kernstrukturen konnten als Mannosen angesehen werden, auch wenn die Bausteinanalyse insgesamt einen gesteigerten Gehalt an Galaktose ergab. Grund zur Annahme war, dass die Behandlung mit α -Mannosidase an AAL-ungebundenen N-Glykanen zu einer Abspaltung von Mannosen führte. Dies muss nicht zwangsläufig bei N-Glykanen der Fall sein, da auf KLH auch N-Glykane des Typs $Gal(\beta 1-6)[Man(\alpha 1-3)]Man(\beta 1-4)GlcNAc_2$ nachgewiesen wurden, die jedoch nicht kreuzreagierend sind [94,167]. Die monomethylierten Hexose-Reste der Kernstruktur wurden als 3-O-Methylmannosen betrachtet, da die Monosaccharidbestimmung einen wesentlich höheren Anteil an 3-O-Methylmannose gegenüber 3-O-Methylgalaktose ergeben hatte. Sie schienen einen Einfluss auf das Bindevormögen dieser Glykanspezies zu haben, da Spezies der Zusammensetzung $MeManMan_2GlcNAc_2XylFuc_{0-1}PA$ sowohl in der gebundenen als auch ungebundenen Fraktion nach Immunaффinitätschromatographie gefunden wurden. Die Antikörperbindung xylosylierter Spezies schien durch die Präsenz von zwei 3-O-MeMan-Resten total blockiert zu sein, was die beiden Strukturen mit den Massen

$[M+Na]^+$ m/z 1171,4 (MeMan₂ManGlcNAc₂Xyl-PA) und m/z 1317,4 (MeMan₂ManGlcNAc₂XylFuc-PA) belegten, die als Hauptkomponenten im Gesamtpool und nachfolgend nur in der anti-SEA ungebundenen Fraktion gefunden wurden. Dieser Befund zeigte weiterhin, dass terminal lokalisierte monomethylierte Mannose-Reste von den Antikörpern nicht erkannt werden. Erstere Spezies scheint zudem bei Mollusken generell als Hauptkomponente vorzuliegen, da eine gleiche Struktur auch auf dem Hämocyanin von *L. stagnalis* gefunden wurde [295]. Die unxylosylierte Variante davon war bisher als einzig bekanntes N-Glykan des Dermatopontins von *B. glabrata* beschrieben worden [195]. Der Sitz der monomethylierten Mannose am Kern konnte bei den kleinen Strukturen auf das C3-Atom der zentralen β -gebundenen Mannose mittels MALDI-TOF-MS im CID-Modus und ESI-IT-MS³ eingegrenzt werden, was bedeutete, dass die Antikörperbindung dieser N-Glykane auch erfolgen konnte, wenn die sich die Methylmannose in nahe liegender Position (C3-Atom) zur Kern-Xylose befand.

4.3.2 Verlängerte kreuzreagierende N-Glykane

Ausgehend von den kleineren N-Glykanen wurden weiterhin Oligosaccharidspezies untersucht, deren Strukturen sich durch Addition eines oder zweier Monosaccharidreste zur Grundstruktur biosynthetisch ableiten ließen. Wie schon in Punkt 4.3.1 besprochen, kamen dafür die Spezies mit den pseudomolekularen Massen $[M+Na]^+$ m/z 1143,3 (Man₃GlcNAc₂Xyl-PA), m/z 1157,3 (MeManMan₂GlcNAc₂Xyl-PA), m/z 1289,4 (Man₃GlcNAc₂XylFuc-PA) und auch m/z 1303,4 (MeManMan₂GlcNAc₂XylFuc-PA) in Frage. Von allen vier Spezies wurden nicht nur um einen HexNAc-Rest verlängerte Glykane, sondern auch die um zwei HexNAc-Reste verlängerten Spezies detektiert. Eine Verlängerung mit anderen Monosaccharidresten konnte zumindest bei den Hauptkomponenten nicht nachgewiesen werden. Ob es sich bei Verlängerung um ein HexNAc₂-Disaccharid um ein LDN-Element oder um eine Chitobiose-Einheit (GlcNAc(β 1-4)GlcNAc) handelte, konnte aus den LIFT-Spektren nicht erschlossen werden. Die Methylierungsanalyse der anti-SEA gebundenen Glykanfraktion ergab, dass sowohl GlcNAc, als auch GalNAc terminal vorlagen. Durch ELISA-Bindungsstudien mit den mAks gegen LDN, F-LDN und dem mAk M2D3H konnte hingegen klar gezeigt werden, dass das LDN-Motiv und auch am C3-Atom des terminalen GalNAc fucosyliertes LDN vorliegt, da sonst die beiden anderen mAks nicht gebunden hätten. In den LIFT-Spektren der durch ein oder zwei HexNAc-Reste

verlängerten Strukturen konnten entsprechend intensive Signale mit m/z 204 registriert werden, die in einigen Spektren sogar die Intensität der Signale bei m/z 446 vom Fuc(α 1-6)GlcNAc-PA Element sowie m/z 300 vom GlcNAc-PA Element übertrafen. Als weiteres Indiz für einen terminalen HexNAc-Rest konnte das Auftreten von Fragmenten der Zusammensetzung $[M+H-HexNAc]^+$ interpretiert werden. Die Präsenz des LDN-Motivs wurde auch durch die Detektion des Signals m/z 407 demonstriert, wobei das Fragment nur in LIFT-Spektren von Glykanen zu finden war, die sich um 406 Masseneinheiten von ihren jeweiligen Grundstrukturen unterschieden. Damit widersprachen die Ergebnisse den Befunden von Nyame *et al.* (2002), die neben dem LDN-Epitop auch das LDN-F-Motiv nur in der Hämolymphe von infizierten *B. glabrata* nachweisen konnten und die Präsenz dieser Epitope als sekretierte Kohlenhydratmotive parasitären Ursprungs interpretierten, was auch Schmitt *et al.* (2002) postuliert hatten, die zwei Kohlenhydratepitope durch Bindung der mAKs KCS und E2 nur in infizierten Zwischenwirtsschnecken nachwies [265]. Aus den LIFT-Spektren der Spezies, die sich von der Grundstruktur MeManMan₂GlcNAc₂XylFuc-PA ableiteten, war ersichtlich, dass die Verlängerung nicht an der methylierten Mannose erfolgte. Zum einen war in dem LIFT-Spektrum der um einen HexNAc-Rest verlängerten Spezies mit dem Fragmentation m/z 177,1 ($B_{1\beta}$) ein terminaler Methylhexosen-Rest nachweisbar; zum anderen wurde im gleichen Spektrum auch das $B_{2\alpha}$ -Fragment (m/z 366,1) detektiert, das einem HexNAc-Hex-Element entspricht. Bei der um das LDN-Motiv verlängerten Spezies wurde das Signal bei m/z 177,0 nur schwach detektiert, hingegen das korrespondierende Y-Fragment mit m/z 1511,6 deutlicher. Ferner zeigten die Fragmente bei m/z 1119,3 ($Y_{3\alpha}$) und 1362,1 ($Y_{3\beta}/Y_{1\delta}$), dass das LDN-Element an den Mannose-Rest gebunden war. In den LIFT-Spektren der Strukturen, bei denen zwei (α 1-6)- und (α 1-3)-gebundene Mannosen vorlagen, wurden die entsprechende Fragmentsignale, die auf eine terminale Mannose zurückzuführen waren, ebenfalls detektiert. So konnte im Fall von der Spezies mit $[M+Na]^+$ m/z 1346,5 (Man₃GlcNAc₃Xyl-PA) im LIFT-Spektrum durch die Detektion des $Y_{3\beta}$ -Fragmentes bei m/z 1162,3 gezeigt, werden, dass ein Mannose-Rest abgespalten wurde. Dieses Signal wurde auch nach Behandlung des N-Glykans mit α -Mannosidase beobachtet. Bei der um das LDN-Epitop verlängerten Spezies (m/z 1527,1) war dieses $Y_{3\beta}$ -Fragment ebenfalls zu beobachten. Die Behandlung dieser Spezies mit α -Mannosidase blieb jedoch, auf Grund möglicher sterischer Hinderung, ohne Erfolg. Die für diesen Strukturtyp korrespondierenden Fragmente wurden auch in den LIFT-Spektren derjenigen Spezies

detektiert, die sich nur durch eine Kernfucosylierung von den vorgenannten Spezies unterscheiden und deswegen hier nicht extra erläutert werden sollen.

Zur Lokalisierung der um einen bzw. zwei HexNAc-Resten verlängerten Antennen wurde von der Spezies mit $[M+Na]^+$ m/z 1506,9 ein MALDI-TOF-MS/MS Spektrum im CID-Modus aufgenommen. Im CID-Spektrum wurde mit dem Signal bei m/z 493,0 ein Fragmentation ($B_3/Y_{3\alpha}$) beobachtet, welches zum Trisaccharid MeMan-Man-Xyl passt und als D-Ion identifiziert werden konnte. Dieser Befund zeigte, dass die Methylmannose sich bei diesen Spezies am C6 der zentralen Mannose des Kernes befindet und nicht verlängert wird.

4.3.3 Komplexere kreuzreagierende N-Glykane

Das Massenspektrum der anti-SEA gebundenen N-Glykane hatte gezeigt, dass eine besondere Dichte an komplexeren Spezies mit einer Masse von m/z 1600 bis 2300 vorlag. In der AAL-ungebundenen Glykanfraktion waren bereits fucosylierte Spezies identifiziert worden, was darauf schließen ließ, dass Fucose-Reste je nach Lokalisation und/oder Bindungsposition vom Lektin unterschiedlich stark gebunden wurden. Als Beispiel kann hierfür die Spezies mit der pseudomolekularen Masse $[M+Na]^+$ m/z 1695,6 gelten, welche sowohl in der AAL-ungebundenen als auch in der AAL-gebundenen Fraktion gefunden wurde. Ohne über die Verknüpfungsposition des Fucose-Restes genauer informiert zu sein, war annehmbar, dass diese Spezies für die Präsenz des Fuc(α 1-3)GalNAc(β 1-4)GlcNAc-Epitops (M2D3H-Epitop) potentiell in Frage kam, die aus der um einen Fucose-Rest kleineren Spezies m/z 1549,5 (H_3N_4X -PA, $[M+Na]^+$) hervorgeht. Die LIFT-Spektren der massengleichen Spezies bestätigten ein Isomerenpaar der Monosaccharidzusammensetzung H_3N_4XF -PA, wobei die AAL-ungebundene Spezies im LIFT-Spektrum ein starkes Signal bei m/z 300,1 (Y_1) zeigte, was die Abwesenheit einer Kernfucosylierung belegte. Passend dazu wurden mit den Pseudomolekülen $[M+H]^+$ bei m/z 350,1 und m/z 553,1 zwei Fragmente nachgewiesen, die für ein monofucosyliertes LDN sprachen. Die vergleichsweise niedrige Intensität des $B_1/Y_{6\alpha}$ -Fragmentes bei m/z 204,1 im Vergleich zum Y_1 -Fragment bei m/z 300,1 indizierte, dass der Fucose-Rest am terminalen GalNAc vorlag und dieses Glykan somit der einfachste Repräsentant von Spezies mit einem Fuc(α 1-3)GalNAc-Epitop ist. Dieses Motiv wurde auch auf Eiglykolipiden von *S. mansoni* als dominantes Epitop nachgewiesen und zeigt Kreuzreaktivität zu KLH [157,312,316]. Durch die sehr leichte Abspaltung von Fucose-Resten im LID-Modus, was sich auch einem intensiven Signal

(Y_{3α}) äußerte und auch in anderen massenspektrometrischen Messungen beobachtet wurde [88,94,319], ist es nicht leicht, den Fucose-Rest einem HexNAc-Rest exakt zuzuordnen. Die Abwesenheit eines [M+H-HexNAc]⁺-Fragmentes deutete jedoch darauf hin, dass der Fucose-Rest in der Tat mit dem terminalen HexNAc-Rest verknüpft war. Die isomere Spezies aus dem Pool AAL-gebundener Glykane zeigte andere Fragmentierungscharakteristika im LIFT-Spektrum. Hier zeigte sich, dass die Fucose am inneren GlcNAc gebunden vorlag. Weiterhin wies das detektierte B_{1α}-Fragment bei *m/z* 204,1 nahezu gleiche Intensität wie das Y_{1α}-Fragment auf, was durch das LDN-Element und die fehlende Fucosylierung dieses Motivs erklärt werden kann. Dieses Glykanpaar kann als ein Beispiel dafür betrachtet werden, dass es mit der Lektinsäule möglich war, fucosylierte Strukturisomere voneinander zu trennen.

Wie bereits angesprochen, konnte die HPLC-Trennung der AAL-gebundenen N-Glykane allenfalls als Antrennung betrachtet werden, bei der zumindest einige Glykanspezies gar nicht separiert wurden. Dies war bei vier Spezies (H₃N₄F₃-PA und MeHH₂N₄XF₂-PA sowie H₄N₄F₃-PA und MeHH₃N₄XF₂-PA) der Fall, die in den Fraktionen jeweils mit den Massen *m/z* 1855,5 und 2017,6 ([M+Na]⁺) detektiert wurden. Das anschließende LIFT-Spektrum machte hingegen deutlich, dass es sich um Mischspektren isobarer Strukturen handelte und erlaubte weiterhin eine Zuordnung der detektierten Signale zu jeweils zwei verschiedenen Strukturvorschlägen. Dabei zeigte sich, dass die unxylosylierten, kreuzreagierenden N-Glykane keine Methylhexose tragen und ein F-LDN-F-Motiv aufweisen, welches für das Signal bei *m/z* 699 verantwortlich ist und in den anderen LIFT-Spektren nicht nachgewiesen wurde. Solche Struktur motive wurden auch für N-Glykane von KLH nachgewiesen, die ebenfalls mit schistosomalen Glykokonjugaten kreuzreagieren [94]. In beiden Spektren war im mittleren Massenbereich ein dominantes Signal mit *m/z* 1135 zu beobachten, welches von seiner Masse her als Kernstruktur Man₃GlcNAc₂Fuc-PA oder MeManMan₂GlcNAc₂Xyl-PA in Frage kommt und auf zwei unterschiedliche biosynthetische Wege der Glykane hinweist.

Die strukturelle Charakterisierung von N-Glykanen aus dem höheren Massenbereich wurde repräsentativ an drei Glykanen vorgenommen. Dabei handelte es sich um Spezies der pseudomolekularen Masse [M+Na]⁺ *m/z* 2074,6 (MeHH₃N₅XF-PA) aus dem Pool der AAL-ungebundenen Spezies sowie um die beiden Glykane der pseudomolekularen Massen [M+Na]⁺ *m/z* 2179,4 (MeHH₄N₄XF₂-PA) und 2220,6 (MeHH₃N₅XF₂-PA). Diese schienen aus unterschiedlichen Biosynthesewegen hervorgegangen zu sein, da beim ersten N-Glykan das Signal mit *m/z* 1135,7 (Y_{4α}/Y_{4β}) und bei den beiden anderen

Spezies Signale mit m/z 1281 ($Y_{4\alpha}/Y_{4\beta}$) sehr dominant detektiert wurden, was auf das Vorliegen der Kernstrukturen $\text{MeHH}_2\text{N}_2\text{X-PA}$ und $\text{MeHH}_2\text{N}_2\text{XF-PA}$ schließen ließ. Eine weitere strukturelle Ähnlichkeit zu den schon angesprochenen kreuzreagierenden N-Glykanen des KLHs war auch in der Position der LDN-Antenne zu sehen, die am unteren C3-Arm der zentralen β -gebundenen Mannose lokalisiert werden konnte. Auf Grund der insgesamt gewonnenen Daten konnte somit gezeigt werden, dass die prototypischen hämolymphproteingebundenen N-Glykane von *B. glabrata* mit $(\beta 1-2)$ -gebundener Kernxylose und $\text{Fuc}(\alpha 1-3)\text{GalNAc}$ -Motiven (M2D3H) mindestens zwei Kohlenhydratepitope mit *S. mansoni* gemeinsam haben. Dabei scheint es, dass kreuzreagierende N-Glykane, die eine Methylhexose am C3-Atom der zentralen, β -gebundenen Mannose tragen, nicht verlängert werden, da bei verlängerten N-Glykanen mit Methylhexose diese stets am C6-Atom der inneren Kern-Mannose gefunden wurde. Eine zusammenfassende Übersicht über prototypische N-Glykane von *B. glabrata*, die mit *S. mansoni* Glykokonjugaten kreuzreagieren, gibt Abb. 90.

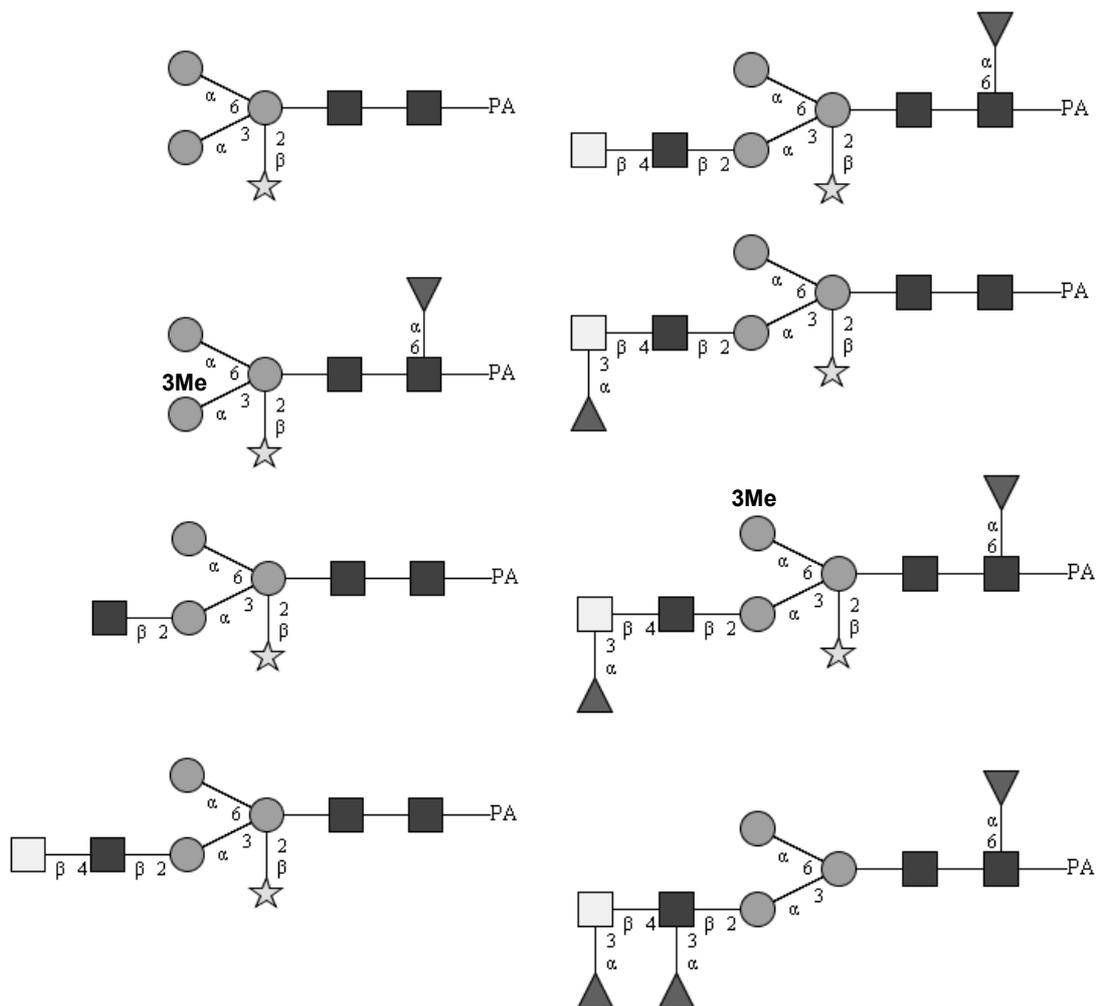


Abb. 90: Prototypen von *B. glabrata* N-Glykanen, die mit Glykokonjugaten von *S. mansoni* kreuzreagieren. Die Symbole für die einzelnen Monosaccharidbausteine sind in Abb. 12 aufgelistet.

4.3.4 Weitere strukturelle Eigenschaften

Ein Teil der AAL-gebundenen N-Glykane konnte auf Grund der geringen Abundanz nicht näher untersucht werden. Es handelte sich dabei um die Spezies mit pseudomolekularen Massen $[M+Na]^+$ $m/z > 2300$. Die detektierten Massen erlaubten aber Rückschlüsse auf Monosaccharidzusammensetzungen von $MeH_{0-2}H_{3-6}N_{4-8}XF_{0-3}$ -PA. Demnach stellen die N-Glykane im höheren Massenbereich möglicherweise Derivate der Hauptkomponenten dar, die durch Addition weiterer Monosaccharidreste synthetisiert wurden. Dafür spricht, dass zum Beispiel mit der pseudomolekularen Masse $[M+Na]^+$ m/z 2570,2 ein Glykan detektiert wurde, das sich um das Masseninkrement 350 Da vom der Spezies mit der pseudomolekularen Masse $[M+Na]^+$ m/z 2220,6 ($MeHH_3N_5XF_2$ -PA) unterscheidet, die strukturell näher charakterisiert wurde und um einen HexNAc-Rest sowie eine weitere Fucose verlängert vorliegt. Dabei wäre denkbar, dass einer der beiden bereits vorhandenen terminalen Fucose-Reste durch eine zweite Fucose substituiert wird und es somit zur Bildung des LDN-DF-Motivs kommen könnte. Für diese Annahme spricht, dass in den Methylierungsanalysen eine 2-substituierte Fucose detektiert wurde und das LDN-DF-Epitop auch in nicht-infizierten Schnecken immunhistochemisch und mittels ELISA nachweisbar war. Der Befund, dass die kreuzreagierenden N-Glykane höherer Masse bis zu acht HexNAc-Reste tragen können, gibt Grund zur Annahme, dass hier möglicherweise auch Chitobiose-Oligomere in den Antennen vorliegen. Dies hat man bereits auf dem Glykoprotein Batroxobin (aus Schlangengift von *Bothrops moojeni*) [182], den N-Glykanen von Filarien [142] und in fucosylierter Form in Glykosphingolipiden von *S. mansoni* Eiern nachgewiesen [160,161,316]. Alternativ könnten solche HexNAc-Reste auch LDN-Motive in repetitiver Form darstellen, die ebenfalls auf Glykoprotein-Glykanen adulter *S. mansoni* gefunden wurden [317]. Die geringe Menge dieser Glykantypen erlaubte keine genauere strukturelle Charakterisierung. Dennoch liegen mit der nachgewiesenen 2-substituierten Fucose sowie der möglichen repetitiven LDN-Motive zwei weitere Kohlenhydratstrukturen bei *B. glabrata* vor, die auch für *S. mansoni* bereits strukturell bewiesen sind.

4.4 Immunhistochemische Befunde an Geweben von *B. glabrata*

Bislang wurden in der Literatur hauptsächlich histologische Arbeiten an infizierten *B. glabrata* beschrieben, welche die histologischen Veränderungen im Zwischenwirt nach Infektion untersucht haben. Dabei wurde insbesondere über das Bindevermögen von mAks gegen LDN und LDN-F für Mutter- und Tochttersporozysten von *S. mansoni* berichtet [221]. Im Rahmen dieser Studie wurden sowohl uninfizierte Schnecken als auch infizierte Exemplare immunhistochemisch markiert. Es ging dabei vor allem um die Frage, in welchen Bereichen kreuzreagierende Strukturen zu finden sind. Bei uninfizierten Exemplaren zeigten besonders das anti-SEA Serum und die mAks gegen terminal fucosyliertes LDN eine ausgeprägte Bindung im Gewebebereich des Fußes, in peripheren Regionen des Vorderpols und der Mitteldarmdrüse. Die Befunde bestätigten, dass in den Bereichen, die für den parasitären Infektionsweg von Bedeutung sind, auch kreuzreagierende Kohlenhydratpitope exprimiert werden, die möglicherweise eine Invasion des eindringenden Miracidiums erleichtern. Das wird durch den Befund, dass insbesondere das Mitteldarmdrüsengewebe im Längs- und Querschnitt einen Ort starker Bindung der anti-SEA Antikörper und der mAks M2D3H und F-LDN darstellt, unterstützt. Das identische Markierungsmuster der mAks M2D3H und F-LDN ergab die gleiche Epitoperkennung und sicherte ab, dass dort in der Tat terminal fucosylierte LDN-Elemente vorlagen. Die Detektion von Le^X-Epitopen an dieser Stelle gelang mit dem mAk G8G12 nur schwach und gab Grund zur Annahme, dass dort das für den Parasiten stadienspezifisch bedeutendere F-LDN-Epitop vermehrt anstelle des für die Invasion in den Endwirt wichtigere Le^X-Epitop vorzuliegen scheint. Die LDN-F/DF-Motive konnten im Mitteldarmdrüsengewebe der uninfizierten Schnecke nur schwach detektiert werden. Trotzdem fiel diese Markierung stärker aus als die mit dem mAk gegen LDN. Möglicherweise spielt für die mAks gegen LDN-F/DF die Präsentation der Epitope eine wichtige Rolle, was auch in anderen Studien gezeigt wurde [253], zumal die gleichen mAks im ELISA gut funktioniert hatten. Das könnte auch für das LDN-Epitop zutreffend sein, das im Mitteldarmdrüsengewebe nicht detektierbar schien. Möglicherweise gibt es bei *B. glabrata* auch eine spezifische Expression dieses Epitops, da es auf den kreuzreagierenden N-Glykanen nicht-infizierter *B. glabrata* durch ELISA und MS nachgewiesen wurde, in einer vorangegangenen Studie mit einem anderen mAk gegen LDN jedoch nicht detektiert werden konnte [221]. Die Mitteldarmdrüse ist nach den Befunden dieser Studie als ideales Gewebe anzusehen, das genügend

kreuzreagierende Kohlenhydratstrukturen aufweist, die zum molekularen Mimikry beitragen und daher dem Parasiten einen gewissen Schutz bieten könnten. Möglicherweise handelt es sich dabei um proteingebundene Glykostrukturen, da Glykolipide durch die protokollbedingte Ethanolpassage weitgehend extrahiert wurden. Entsprechende Untersuchungen zum speziellen Glykom dieses Gewebes wären daher interessant.

Bereits die hämalaungefärbten Kontrollinkubation von infizierten Schnecken belegten besonders im Bereich der Mitteldarmdrüse erhebliche histologische Veränderungen durch die Sporozysten. Der mAk M2D3H zeigte dabei sowohl im Längsschnitt als auch im Querschnitt an den Sporozysten eine besonders intensive Bindung, was darauf hindeutet, dass an diesen Stellen eine gehäufte Menge an Fuc(α 1-3)GalNAc-Epitopen vorliegt. Dabei kann spekuliert werden, ob der Parasit diese möglicherweise selbst synthetisiert und präsentiert, oder ob er diese aus dem umliegenden Gewebe requiriert. Die Inkubation mit CTF zeigte dabei, dass es auch sporozystenspezifische Motive gibt, die von diesem Serum erkannt werden und im restlichen Gewebe nicht vorzuliegen schienen. Das legt nahe, dass vom CTF ganz andere Epitope erkannt werden, die im restlichen Gewebe nicht vorzukommen schienen und möglicherweise beim Invasionsprozess keine besondere Rolle spielen. Interessant war auch, dass die beiden mAk gegen Le^X ein unterschiedlich starkes Bindevormögen zeigten. So war die Markierung mit dem mAk G8G12 deutlich stärker und auch in sporozystenfreien Arealen besonders am Querschnitt zu beobachten. Dies kann zum Teil auf einem Unterschied in der Epitop-Präsentation und Erkennung durch die mAks beruhen, zum Teil aber auch daran, dass Le^X-tragende Glykoproteine vom Parasiten ins Schneckengewebe abgegeben werden. Der mAk gegen das LDN-Motiv zeigte an den Sporozysten eine leichte Bindung, wobei die nicht befallenen Bereiche nicht markiert wurden. Dieser Befund deckt sich mit Literaturdaten [221], nach denen LDN als ein Epitop gesehen werden kann, dass in diesem Zwischenwirtsstadium des Parasiten exprimiert wird, aber im Infektionsgeschehen keinen weitergehenden Einfluss hat. Das LDN-Epitop konnte zudem innerhalb der Sporozysten als besonders angereichert nachgewiesen werden, was verdeutlicht, dass es parasitär gehäuft vorliegt, aber möglicherweise nicht außerhalb der Sporozysten durch Exkretion oder Sekretion funktionell in Erscheinung tritt. Demgegenüber zeigten Markierungen mit den mAks gegen LDN-F und LDN-DF an Längsschnitten auffällig gefärbte Umrandungen, die darauf schließen ließen, dass dort Glykoproteine mit diesen Epitopen vermehrt zu finden waren. Diese Markierung konnte auch in einer Doppelinkubation mit beiden mAks an einem Querschnitt bestätigt

werden. Es ist denkbar, dass diese vom Parasiten vermehrt exkretiert oder sekretiert werden, zumal die Markierung mit diesen mAks in den gleichen Bereichen uninfizierter Exemplare viel schwächer ausfiel. Möglich ist auch, dass diese Glykoproteine in die Hämolymphe ausgeschwemmt werden und damit das Hämolympheprotein in seiner Zusammensetzung verändern. In diesem Zusammenhang wäre interessant, das N-Glykanprofil der Hämolympheproteine infizierter Schnecken vergleichend zu betrachten.

4.5 Immunhistochemische Markierung von Miracidien

Fixierte Miracidien wurden mit verschiedenen Antikörpern als Ganzpräparate oberflächenmarkiert. Die Inkubation mit anti-SEA Serum konnte dabei nahezu als Positivkontrolle gewertet werden, da davon auszugehen war, dass lösliche Eiantigene vielfach miracidiale Antigene darstellen. Die anti-SEA Antikörper wurden an der gesamten Oberfläche des Miracidiums gebunden. Dabei schien es, dass gehäuft Antigene im Bereich des Terebratoriums lokalisiert waren. Dies würde sich mit immunhistochemischen Beobachtungen hinsichtlich der LDN-DF und Le^X -Epitope bei Cercarien decken, da diese dort einmal auf der gesamten Oberfläche (LDN-DF) bzw. oberflächlich nur am Saugnapf (Le^X) nachgewiesen wurden [298]. Das Bindevormögen von anti-SEA schien neben der gesamten Oberfläche aber auch innere Strukturen zu betreffen. Dabei ließ die maximal mögliche Vergrößerung keine genaueren Aussagen über die Art des Gewebes zu. Dennoch ist anzunehmen, dass Aktinfilamente markiert worden sind, denn ähnliche Strukturen wurden bereits beim Miracidium von *S. mansoni* im Rahmen einer Studie über Motorproteine genauer untersucht [20]. Es kann als wahrscheinlich angesehen werden, dass die anti-SEA Antikörper hauptsächlich an Kohlenhydratstrukturen binden, da in einer anderen Studie die anti-SEA Bindung nach Periodatbehandlung, die bekanntermaßen zur Zerstörung von Kohlenhydratstrukturen führt, unterblieb [131,289].

Die Bindung des mAk M2D3H an der Oberfläche von Miracidien war mit der des anti-SEA Serums vergleichbar, fiel jedoch wesentlich weniger intensiv aus, was für eine geringere Epitop-Dichte auf der Oberfläche spricht. Die Phasenkontrastaufnahme in Kombination mit der Fluoreszenz zeigte, dass die Bindung des mAks M2D3H an der Oberfläche des Miracidiums erfolgt. Möglicherweise spielt dieses Epitop in der Tat für den Invasionsprozess eine besondere Rolle. Weiterhin wurde eine unterschiedliche Verteilung des Epitops deutlich, da im posterioren Bereich des Miracidiums eine leicht

verstärkte Intensität beobachtet wurde. Diese konnte auch mit dem mAk gegen F-LDN bestätigt und damit als spezifisch angesehen werden. In einer immunhistochemischen Untersuchung an Eiern von *S. mansoni* wurde die Bindung des mAks gegen F-LDN-F an eisekretierten Proteinen und an der Eischale nachgewiesen [252]. Dies spricht, wie auch die Detektion des F-LDN-Motivs, für die Oberflächenexpression terminal fucosylierter Epitope auf Miracidien. Ergänzend dazu war die Expression von den LDN-F und LDN-DF-Motiven auf der Oberfläche von Miracidien nachweisbar, wobei allenfalls kleine Unterschiede detektiert wurden. So schien das LDN-DF-Epitop auf der Oberfläche der Miracidien gleichmäßiger verteilt zu sein und auch am Terebratorium stärker exprimiert zu werden, während das LDN-F-Epitop im anterioren Bereich stärker als im posterioren Teil des Miracidiums oberflächenexprimiert zu sein schien. Die Befunde weisen wiederum darauf hin, dass fucosylierte terminale LDN-Motive eine Rolle im Invasionsprozess spielen könnten. Der mAk gegen Le^X zeigte hingegen nur eine schwache Bindung an der Oberfläche, was die stadienspezifische Expression fucosylierter Kohlenhydratepitope bei *S. mansoni* bestätigt. Ebenso wurde kein LDN-Epitop auf der Oberfläche nachgewiesen, was mit den Befunden aus den Markierungen nicht-infizierten Schneckengewebes konform ist.

4.6 Vergleich der kreuzreagierenden N-Glykanprofile zweier *B. glabrata* Stämme

Im letzten Teil dieser Studie wurden zwei Hämolympheglykoprotein-Isolate des empfänglichen *B. glabrata* Stammes Puerto Rico (PR) und des resistenteren Salvador (SAL) Stammes mittels biochemischer Methoden, HPLC und MALDI-TOF-MS vergleichend untersucht. *B. glabrata* Exemplare des Salvador Stammes wurden in zahlreichen Experimenten als resistenter Stamm eingesetzt [282,283,300,301]. Bereits im Western Blot wurde deutlich, dass sowohl das anti-SEA Serum als auch der mAk M2D3H an Glykoproteine des PR-Stammes stärker binden. Die Bindungsstudien mittels ELISA bestätigten dies und zeigten zudem, dass durch HF-Behandlung der tryptischen Glykopeptide die Intensität der anti-SEA Bindung im Fall von (Glyko-)Peptiden des SAL-Stammes weniger stark abnahm als beim PR-Stamm. Dies könnte mit einer geringeren Menge an fucosylierten kreuzreagierenden Epitopen erklärt werden. Der Einsatz von mAks gegen fucosylierte Epitope wie F-LDN und LDN-F/DF bestätigte dies, da beim PR-Stamm durchweg höhere Bindungsintensitäten gemessen wurden. Die ELISA Experimente zeigten aber auch, dass alle Epitope bei beiden Stämmen vorliegen.

Die Monosaccharidanalyse mittels GC/MS machte deutlich, dass der Gehalt an kreuzreagierenden Kohlenhydraten beim PR-Stamm höher war als beim SAL-Stamm und dass vor allem Fucose vermehrt nachweisbar war. Die MS-Analyse der durch die Immunaффinitätschromatographie angereicherten Spezies ergab beim PR-Stamm in der Regel höhere Signalintensitäten, wobei im Vergleich zum Gesamtgemisch an kreuzreagierenden Glykanen aus dem ersten Teil der Studie keine Unterschiede festzustellen waren. Auch bei der Größenfraktionierung der kreuzreagierenden N-Glykane waren Intensitätsunterschiede in der Fluoreszenz zu beobachten, wobei bis auf wenige Ausnahmen der PR-Stamm jeweils höhere Signale lieferte. Mittels RP-HPLC konnte gezeigt werden, dass fast jeder Peak nach Größenfraktionierung noch zahlreiche Glykane enthielt, die sich in der zweiten Dimension weiter auftrennen ließen. Zur weiteren Bewertung waren die Peaks massenspektrometrisch untersucht worden, bei denen ein Unterschied in der Fluoreszenz beobachtet worden war. Dabei wurde deutlich, dass typischerweise kreuzreagierende N-Glykane, die als kreuzreagierendes Epitop (β 1-2)-kerngebundene Xylose, F-LDN-Motive oder beide Epitope aufweisen, im empfänglicheren *B. glabrata* Stamm vermehrt vorlagen. Die immunhistochemischen Untersuchungen an beiden Stämmen zeigten zudem, dass beim empfänglicheren Stamm eine erhöhte Expression von kreuzreagierenden Kohlenhydrat-Determinanten im Gewebe nachweisbar ist. Zusammen genommen zeigten die Ergebnisse, dass die Quantität und Lokalisation kreuzreagierender, proteingebundener Kohlenhydratstrukturen möglicherweise einen Beitrag zur Empfänglichkeit von *B. glabrata* gegenüber *S. mansoni* leisten.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden N-Glykane der Zwischenwirtsschnecke *Biomphalaria glabrata*, die mit Glykokonjugaten des Humanparasiten *Schistosoma mansoni* serologisch kreuzreagieren, strukturell charakterisiert. Dazu waren die N-Glykane aus Hämolympheproteinen nicht-infizierter Schnecken nach proteolytischem Verdau enzymatisch freigesetzt, durch Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung von immobilisierten Antikörpern gegen lösliche Eiantigene von *S. mansoni* (anti-SEA) angereichert, entsprechend ihrem Bindevermögen an das fucosespezifische *Aleuria aurantia* Lektin subfraktioniert und mit HPLC aufgetrennt worden. Insgesamt wurden über 100 verschiedene N-Glykane detektiert. Die strukturelle Charakterisierung durch MALDI-TOF-MS(/MS) und ESI-IT-MS(/MS) ergab, dass mit (β 1-2)-kerngebundener Xylose und Fuc(α 1-3)GalNAc(β 1-4)GlcNAc (F-LDN)-Resten mindestens zwei serologisch kreuzreagierende Kohlenhydratepitope auf den N-Glykanen vorliegen. Die jeweiligen Glykane wiesen eine allgemeine Monosaccharidzusammensetzung von MeH₀₋₂H₂₋₆N₂₋₈X₀₋₁F₀₋₃-PA auf. Der Nachweis von 2-substituierten Fucose-Resten im Gesamtgemisch ist als Indiz für das Vorkommen von GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-2)Fuc(α 1-3)]GlcNAc (LDN-DF) als weiterem kreuzreagierendem Epitop zu werten. Darüber hinaus wurden zum Teil 3-O-Methylmannose-Reste nachgewiesen, die jedoch nicht zur Kreuzreaktivität beitragen. Immunhistochemische Untersuchungen bestätigten die Präsenz von kreuzreagierenden Kohlenhydrat-Determinanten im Fuß- und Mitteldarmdrüsengewebe uninfizierter *B. glabrata*. Während die Epitope GalNAc(β 1-4)GlcNAc (LDN), GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)GlcNAc (LDN-F) und LDN-DF im Mitteldarmdrüsengewebe von uninfizierten *B. glabrata* serologisch kaum nachweisbar waren, wurden sie in infizierten Schnecken besonders im Bereich der Sporozysten detektiert, wo auch polyklonale Antikörper gegen Eiantigene von *S. mansoni* (anti-SEA) und monoklonale Antikörper gegen das F-LDN Epitop eine starke Bindung zeigten. Parallel durchgeführte Untersuchungen von Hämolympheproben des empfänglichen *B. glabrata* Puerto Rico (PR) Stammes und des resistenteren Salvador (SAL) Stammes zeigten, dass zwar bei beiden Stämmen die gleichen kreuzreagierenden N-Glykane vorkommen, dass deren Expression im PR-Stamm jedoch mengenmäßig deutlich stärker ausgeprägt ist. Zusammengefasst trug diese Studie dazu bei, neue N-Glykanstrukturen von *B. glabrata* strukturell zu charakterisieren. Die erhobenen Befunde stehen in Einklang mit der Hypothese, dass molekulare Mimikry auf der Basis von Kohlenhydratstrukturen dazu beitragen könnte, Parasiten die Invasion und das Überleben im Wirt zu ermöglichen.

6 Summary

In the present study N-glycans of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, which share a serological cross-reactivity with glycoconjugates derived from human parasitic trematode *Schistosoma mansoni*, were structurally characterised. To this end, N-glycans were enzymatically released by PNGase F treatment from tryptic haemolymph (glyco-) peptides of non-infected *B. glabrata* and fluorescently labelled with 2-aminopyridine. This fraction had been enriched by immunoaffinity chromatography using immobilised antibodies raised against soluble egg antigens (anti-SEA) derived from *S. mansoni*, further subfractionated due to their binding affinity to the fucose-specific lectin from *Aleuria aurantia* and subsequently separated by size-fractionation HPLC. Taken together, more than 100 different compositional types of N-glycan were detected. Structural characterisation by MALDI-TOF-MS(/MS) and ESI-IT-MS(/MS) resolved in (β 1-2)-core-bound xylose and Fuc(α 1-3)GalNAc(β 1-4)GlcNAc (F-LDN) as at least two serologically cross-reacting carbohydrate moieties present on the N-glycans. The glycans obtained exhibited a general monosaccharide composition of MeH₀₋₂H₂₋₆N₂₋₈X₀₋₁F₀₋₃-PA. The detection of 2-substituted fucose in the total glycan pool underlined the presence of GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-2)Fuc(α 1-3)]GlcNAc- (LDN-DF) as a further cross-reacting carbohydrate epitope. Furthermore, 3-O-methylated mannose residues have been identified, but have been found not to contribute to the serological cross-reactivity. Immunohistochemical staining confirmed the presence of cross-reacting carbohydrate motifs in the foot and mid-gut gland tissues of uninfected *B. glabrata*. The epitopes GalNAc(β 1-4)GlcNAc- (LDN), GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc- (LDN-F) and LDN-DF were only weakly detectable in the mid-gut gland tissue of uninfected *B. glabrata*. In the same tissue of infected *B. glabrata*, however, these epitopes were strongly expressed, especially in the area of the sporocysts, whilst polyclonal antibodies raised against the soluble egg antigens of *S. mansoni* and monoclonal antibodies specific for the F-LDN motif also showed strong binding to infected tissue. In parallel, investigation of the cross-reacting N-glycans from the susceptible *B. glabrata* Puerto Rico (PR) strain in comparison with the more resistant Salvador (SAL) strain showed that the same cross-reacting glycans occur in both strains, but that their amount is increased in the PR strain. In summary, this study has contributed to a structural characterisation of novel N-glycans from *B. glabrata*. The results are in accordance with the hypothesis of “molecular mimicry”, in that, host-type carbohydrate structures expressed by the parasite may facilitate its invasion and survival within the host.

7 Literatur

- [1] Abdeen, H.H., Attallah, A.-F.M., El-Mohamady, H.I., Harrison, R.A. and Mansour, M.M. 1998. *Schistosoma mansoni*: the circulating cathodic antigen forms an abundant product of 41/42 kDa in the urine of infected patients. *Exp. Parasitol.* 90, 286-289.
- [2] Abdel-Gawad, M.M., El-Amin, S.M., Ohigashi, H., Watanabe, Y., Takeda, N., Sugiyama, H. and Kawanaka, M. 2000. Molluscicidal saponins from *Anagallis arvensis* against schistosome intermediate hosts. *Jpn J Infect Dis* 53, 17-19.
- [3] Abdul-Salam, J.M. and Michelson, E.H. 1983. *Schistosoma mansoni*: immunofluorescent detection of its antigen reacting with *Biomphalaria glabrata* amoebocytes. *Exp. Parasitol.* 55, 132-137.
- [4] Adema, C.M., Hertel, L.A., Miller, R.D. and Loker, E.S. 1997. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8691-8696.
- [5] Afonso, A.M., Arrieta, M.R. and Neves, A.G. 1976. Characterization of the hemoglobin of *Biomphalaria glabrata* as a glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 439, 77-81.
- [6] Agner, A.E. and Granath, W.O., Jr. 1995. Hemocytes of schistosome-resistant and -susceptible *Biomphalaria glabrata* recognize different antigens on the surface of *Schistosoma mansoni* sporocysts. *J. Parasitol.* 81, 179-186.
- [7] Ahmed, S.F., Oswald, I.P., Caspar, P., Hieny, S., Keefer, L., Sher, A. and James, S.L. 1997. Developmental differences determine larval susceptibility to nitric oxide-mediated killing in a murine model of vaccination against *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* 65, 219-226.
- [8] Almeida, A.P. and Neves, A.G. 1974. The hemoglobin of *Biomphalaria glabrata*: chemical composition and some physicochemical properties. *Biochim. Biophys. Acta* 371, 140-146.
- [9] Alonso, D., Munoz, J., Gascon, J., Valls, M.E. and Corachan, M. 2006. Failure of standard treatment with praziquantel in two returned travelers with *Schistosoma haematobium* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74, 342-344.
- [10] Alves-Brito, C.F., Simpson, A.J.G., Bahia-Oliveira, L.M.G., Rabello, A.L.T., Rocha, R.S., Lambertucci, J.R., Gazzinelli, G., Katz, N. and Correa-Oliveira, R. 1992. Analysis of anti-keyhole limpet haemocyanin antibody in Brazilians supports its use for the diagnosis of acute schistosomiasis mansoni. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 53-56.
- [11] Amann, A. 2004. Molekulare Untersuchungen am Hämoglobin der Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata*. Diploma thesis, University of Mainz, Germany.
- [12] Andrade, Z.A. and Brito, P.A. 1981. Evolution of schistosomal hepatic vascular lesions after specific chemotherapy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 1223-1227.
- [13] Anto, F., Bosompem, K., Kpikpi, J., Adjuik, M. and Edoh, D. 2005. Experimental control of *Biomphalaria pfeifferi*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*, by the ampullariid snail *Lanistes varicus*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 99, 203-209.
- [14] Anumula, K.R. 1994. Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection. *Anal. Biochem.* 220, 275-283.
- [15] Araque, W., Barrios, E.E., Rodriguez, P., Delgado, V.S. and Finol, H.J. 2003. Ultrastructural study of the in vitro interaction between *Biomphalaria glabrata* hemocytes and *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 905-908.
- [16] Armelagos, G.J., Leatherman, T., Ryan, M. and Sibley, L. 1992. Biocultural synthesis in medical anthropology. *Med. Anthropol.* 14, 35-52.
- [17] Arndt, M.H., Oliveira, C.L., Regis, W.C., Torriani, I.L. and Santoro, M.M. 2003. Small angle x-ray scattering of the hemoglobin from *Biomphalaria glabrata*. *Biopolymers* 69, 470-479.
- [18] Arndt, M.H.L. and Santoro, M.M. 1998. Structure of the extracellular hemoglobin of *Biomphalaria glabrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 119, 667-675.
- [19] Attallah, A.M., Ismail, H., El Masry, S.A., Rizk, H., Handousa, A., El Bendary, M., Tabll, A. and Ezzat, F. 1999. Rapid detection of a *Schistosoma mansoni* circulating antigen excreted in urine of infected individuals by using a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* 37, 354-357.
- [20] Bahia, D., Avelar, L.G., Vigorosi, F., Cioli, D., Oliveira, G.C. and Mortara, R.A. 2006. The distribution of motor proteins in the muscles and flame cells of the *Schistosoma mansoni* miracidium and primary sporocyst. *Parasitology* 133 (Pt 3), 321-329.
- [21] Bankfalvi, A., Navabi, H., Bier, B., Bocker, W., Jasani, B. and Schmid, K.W. 1994. Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *J. Pathol.* 174, 223-228.

- [22] Barral, V., This, P., Imbert-Establet, D., Combes, C. and Delseny, M. 1993. Genetic variability and evolution of the *Schistosoma* genome by using random amplified polymorphic DNA markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 211-222.
- [23] Bashir, M., Bickle, Q., Bushara, H., Cook, L., Shi, F., He, D., Huggins, M., Lin, J., Malik, K., Moloney, A. and et al. 1994. Evaluation of defined antigen vaccines against *Schistosoma bovis* and *Schistosoma japonicum* in bovines. *Trop. Geogr. Med.* 46, 255-258.
- [24] Bayne, C.J., Boswell, C.A., Loker, E.S. and Yui, M.A. 1985. Plasma components which mediate cellular defences in the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* 9, 523-530.
- [25] Bayne, C.J., Loker, E.S. and Yui, M.A. 1986. Interactions between the plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) and the sporocyst tegument of *Schistosoma mansoni* (Trematoda). *Parasitology* 92, 653-664.
- [26] Bayne, C.J. and Stephens, J.A. 1983. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata* share epitopes: antibodies to sporocysts bind host snail hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 42, 221-223.
- [27] Bickle, Q.D. and Andrews, B.J. 1988. Characterisation of *Schistosoma mansoni* monoclonal antibodies which block *in-vitro* killing: failure to demonstrate blockage of immunity *in vivo*. *Parasite Immunol.* 10, 151-168.
- [28] Björndal, H., Hellerqvist, C.G., Lindberg, B. and Svensson, S. 1970. Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie bei der Methylierungsanalyse von Polysacchariden. *Angew. Chem.* 82, 643-674.
- [29] Blair, K.L., Bennett, J.L. and Pax, R.A. 1992. Praziquantel: physiological evidence for its site(s) of action in magnesium-paralysed *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 104, 59-66.
- [30] Boswell, C.A. and Bayne, C.J. 1984. Isolation, characterization and functional assessment of a hemagglutinin from the plasma of *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Dev. Comp. Immunol.* 8, 559-568.
- [31] Bouschen, W.S. 2004. Ortsaufgelöste MALDI-Massenspektrometrie an biologischen und synthetischen Oberflächen. PhD thesis, Gießen.
- [32] Brindley, P.J. 1994. Relationships between chemotherapy and immunity in schistosomiasis. *Adv. Parasitol.* 34, 133-161.
- [33] Brindley, P.J. and Sher, A. 1987. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J. Immunol.* 139, 215-220.
- [34] Brindley, P.J., Strand, M., Norden, A.P. and Sher, A. 1989. Role of host antibody in the chemotherapeutic action of praziquantel against *Schistosoma mansoni*: identification of target antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 99-108.
- [35] Butterworth, A.E. 1993. Immunology of schistosomiasis. In: Jordan, P., Webbe, G. and Sturrock, R.F. *Human Schistosomiasis*, CAB International, Wallingford.
- [36] Carton, Y., Nappi, A.J. and Poirie, M. 2005. Genetics of anti-parasite resistance in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 9-32.
- [37] Castillo, M.G. and Yoshino, T.P. 2002. Carbohydrate inhibition of *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell adhesion to primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 125, 513-525.
- [38] Caulfield, J.P., Cianci, C.M., McDiarmid, S.S., Suyemitsu, T. and Schmid, K. 1987. Ultrastructure, carbohydrate, and amino acid analysis of two preparations of the cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 73, 514-522.
- [39] Caulfield, J.P., Yuan, H.C., Cianci, C.M. and Hein, A. 1988. *Schistosoma mansoni*: development of the cercarial glycocalyx. *Exp. Parasitol.* 65, 10-19.
- [40] Cheng, T.C. and Lee, F.O. 1971. Glucose levels in the mollusc *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Invertebr. Pathol.* 18, 395-399.
- [41] Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A. and Savioli, L. 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* 77, 41-51.
- [42] Chunge, R.N., Karumba, N., Ouma, J.H., Thiongo, F.W., Sturrock, R.F. and Butterworth, A.E. 1995. Polyparasitism in two rural communities with endemic *Schistosoma mansoni* infection in Machakos district, Kenya. *J. Trop. Med. Hyg.* 98, 440-444.
- [43] Cioli, D. 1998. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol. Today* 14, 418-422.
- [44] Cioli, D., Liberti, P. and Festucci, A. 1987. Stage-specific schistosome antigens. *Acta Trop Suppl* 12, 70-74.
- [45] Connors, V.A., de Buron, I. and Granath, W.O., Jr. 1995. *Schistosoma mansoni*: interleukin-1 increases phagocytosis and superoxide production by hemocytes and decreases output of cercariae in schistosome-susceptible *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.* 80, 139-148.
- [46] Connors, V.A., de Buron, I., Jourdan, J., Theron, A., Agner, A. and Granath, W.O., Jr. 1998. Recombinant human interleukin-1-mediated killing of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts in *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 84, 920-926.

- [47] Connors, V.A. and Yoshino, T.P. 1990. In vitro effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 76, 895-902.
- [48] Coppin, J.F., Lefebvre, C., Caby, S., Cocquerelle, C., Vicogne, J., Coustau, C. and Dissous, C. 2003. Gene expression changes in *Schistosoma mansoni* sporocysts induced by *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. Parasitol. Res. 89, 113-119.
- [49] Couch, L., Hertel, L.A. and Loker, E.S. 1990. Humoral response of the snail *Biomphalaria glabrata* to trematode infection: observations on a circulating hemagglutinin. J. Exp. Zool. 255, 340-349.
- [50] Coustau, C. and Yoshino, T.P. 1994. *Schistosoma mansoni*: modulation of hemocyte surface polypeptides detected in individual snails, *Biomphalaria glabrata*, following larval exposure. Exp. Parasitol. 79, 1-10.
- [51] Craig, A.G., Norberg, T., Griffin, D., Hoeger, C., Akhtar, M., Schmidt, K., Low, W., Dykert, J., Richelson, E., Navarro, V., Mazella, J., Watkins, M., Hillyard, D., Imperial, J., Cruz, L.J. and Olivera, B.M. 1999. Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. J. Biol. Chem. 274, 13752-13759.
- [52] Craig, A.G., Zafaralla, G., Cruz, L.J., Santos, A.D., Hillyard, D.R., Dykert, J., Rivier, J.E., Gray, W.R., Imperial, J., DelaCruz, R.G., Sporning, A., Terlau, H., West, P.J., Yoshikami, D. and Olivera, B.M. 1998. An O-glycosylated neuroexcitatory conus peptide. Biochemistry 37, 16019-16025.
- [53] Cummings, R.D. and Nyame, A.K. 1999. Schistosome glycoconjugates. Biochim. Biophys. Acta 1455, 363-374.
- [54] Dalton, J.P., Lewis, S.A., Aronstein, W.S. and Strand, M. 1987. *Schistosoma mansoni*: immunogenic glycoproteins of the cercarial glycocalyx. Exp. Parasitol. 63, 215-226.
- [55] Damian, R.T. 1989. Molecular mimicry: parasite evasion and host defense. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 145, 101-115.
- [56] Darani, H.Y., Curtis, R.H., McNeice, C., Price, H.P., Sayers, J.R. and Doenhoff, M.J. 1997. *Schistosoma mansoni*: anomalous immunogenic properties of a 27 kDa larval serine protease associated with protective immunity. Parasitology 115 (Pt 3), 237-247.
- [57] Davis, A. 1996. Schistosomiasis. In: Manson's Tropical Diseases, WB Saunders, London.
- [58] de Jonge, N., Kremsner, P.G., Krijger, F.W., Schommer, G., Fillié, Y.E., Kornelis, D., van Zeyl, R.J., van Dam, G.J., Feldmeier, H. and Deelder, A.M. 1990. Detection of the schistosome circulating cathodic antigen by enzyme immunoassay using biotinylated monoclonal antibodies. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84, 815-818.
- [59] de Souza, C.P., Cunha Rde, C. and Andrade, Z.A. 1995. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 37, 201-206.
- [60] Dean, D.A., Mangold, B.L., Harrison, R.A. and Ricciardone, M.D. 1996. Homologous and heterologous protective immunity to Egyptian strains of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* induced by ultraviolet-irradiated cercariae. Parasite Immunol. 18, 403-410.
- [61] DeBont, J. and Vercruyse, J. 1997. The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. Parasitol. Today 13, 255-262.
- [62] Deelder, A.M. and Kornelis, D. 1980. *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster, and human infections. Exp. Parasitol. 50, 16-32.
- [63] Deelder, A.M., van Dam, G.J., Kornelis, D. and Fillié, Y.E. 1996. *Schistosoma*: analysis of monoclonal antibodies reactive with the circulating antigens CAA and CCA. Parasitology 112, 21-35.
- [64] Dennis, R.D., Baumeister, S., Lauer, G., Richter, R. and Geyer, E. 1996. Neutral glycolipids of *Schistosoma mansoni* as feasible antigens in the detection of schistosomiasis. Parasitology 112, 295-307.
- [65] Dennis, R.D., Geyer, H. and Geyer, R. 2006. Glycoconjugates of Parasitic Helminth Infections. In: Kamerling, J.P., Boons, G.-J., Lee, Y.C., Suzuki, A., Taniguchi, N. and Voragen, A.G.J. Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to System Biology, Elsevier, accepted.
- [66] Despres, L., Imbert-Establet, D., Combes, C., Bonhomme, F. and Monnerot, M. 1991. Isolation and polymorphism in mitochondrial DNA from *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 47, 139-141.
- [67] Despres, L., Imbert-Establet, D. and Monnerot, M. 1993. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. Mol. Biochem. Parasitol. 60, 221-229.
- [68] Diehl, H., Zahner, H., Schweinsberg, H. and Enders, B. 1987. Intermediate host (*Biomphalaria alexandrina*) antigens partly protect against subcutaneous infections with cercariae of

- Schistosoma mansoni* but are ineffective in infections by percutaneous invasion. Parasitol. Res. 73, 538-540.
- [69] Dissous, C. and Capron, A. 1989. *Schistosoma mansoni* and its intermediate host *Biomphalaria glabrata* express a common 39 kilodalton acidic protein. Mol. Biochem. Parasitol. 32, 49-56.
- [70] Dissous, C., Grzych, J.M. and Capron, A. 1986. *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. Nature 323, 443-445.
- [71] Doenhoff, M.J. 1998. A vaccine for schistosomiasis: alternative approaches. Parasitol. Today 14, 105-109.
- [72] Doenhoff, M.J., Butterworth, A.E., Hayes, R.J., Sturrock, R.F., Ouma, J.H., Koech, D. and Prentice, M. 1993. Seroepidemiology and serodiagnosis of schistosomiasis in Kenya using crude and purified egg antigens of *Schistosoma mansoni* in ELISA. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87, 42-48.
- [73] Doenhoff, M.J., Pearson, S., Dunne, D.W., Bickle, Q., Lucas, S., Bain, J., Musallam, R. and Hassounah, O. 1981. Immunological control of hepatotoxicity and parasite egg excretion in *Schistosoma mansoni* infections: stage specificity of the reactivity of immune serum in T-cell deprived mice. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75, 41-53.
- [74] Dolashka-Angelova, P., Beck, A., Dolashki, A., Beltramini, M., Stevanovic, S., Salvato, B. and Voelter, W. 2003. Characterization of the carbohydrate moieties of the functional unit RvH1-a of *Rapana venosa* haemocyanin using HPLC/electrospray ionization MS and glycosidase digestion. Biochem. J. 374, 185-192.
- [75] Domon, B. and Costello, C. 1988. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. Glycoconj. J. 5, 253-257.
- [76] Dreon, M.S., Heras, H. and Pollero, R.J. 2004. Characterization of the major egg glycolipoproteins from the perivitellin fluid of the apple snail *Pomacea canaliculata*. Mol. Reprod. Dev. 68, 359-364.
- [77] Duclermortier, P., Lardans, V., Serra, E., Trottein, F. and Dissous, C. 1999. *Biomphalaria glabrata* embryonic cells express a protein with a domain homologous to the lectin domain of mammalian selectins. Parasitol. Res. 85, 481-486.
- [78] El-Ansary, A. 2003. Biochemical and immunological adaptation in schistosome parasitism. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 136, 227-243.
- [79] El-Ansary, A. and Al-Daihan, S. 2006. Important aspects of *Biomphalaria* snail-schistosome interactions as targets for antischistosome drug. Med Sci Monit 12, RA282-292.
- [80] ElSayed, L.H., Ghoneim, H., Demian, S.R., ElSayed, M.H., Tawfik, N.M., Sakr, I., AbouBasha, L.M., Renganathan, E., Klinkert, M.-Q. and AbouRawash, N. 1998. Diagnostic significance of *Schistosoma mansoni* proteins Sm31 and Sm32 in human schistosomiasis in an endemic area in Egypt. Trop. Med. Int. Health 3, 721-727.
- [81] Falcone, F.H., Dahinden, C.A., Gibbs, B.F., Noll, T., Amon, U., Hebestreit, H., Abrahamsen, O., Klaucke, J., Schlaak, M. and Haas, H. 1996. Human basophils release interleukin-4 after stimulation with *Schistosoma mansoni* egg antigen. Eur. J. Immunol. 26, 1147-1155.
- [82] Fallon, P.G., Cooper, R.O., Probert, A.J. and Doenhoff, M.J. 1992. Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. Parasitology 105, S41-S48.
- [83] Fallon, P.G. and Doenhoff, M.J. 1995. Active immunization of mice with *Schistosoma mansoni* worm membrane antigens enhances efficacy of praziquantel. Parasite Immunol. 17, 261-268.
- [84] Ferreira, C.C., Santoro, M.M. and Goes, A.M. 1998. Protective immunity induced in mice by F8.1 and F8.2 antigens purified from *Schistosoma mansoni* eggs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 93 Suppl 1, 185-189.
- [85] Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. and Montreuil, J. 1981. Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans. Anal. Biochem. 116, 489-502.
- [86] Freedman, D.O. and Ottesen, E.A. 1988. Eggs of *Schistosoma mansoni* stimulate endothelial cell proliferation *in vitro*. J. Infect. Dis. 158, 556-562.
- [87] Frenkel, J.K., Taraschewski, H. and Voigt, W.P. 1998. Important pathologic effects of parasitic infections of man. In: Mehlhorn, H. Parasitology in Focus: Facts and Trends, Springer Verlag, Berlin.
- [88] Friedl, C.H., Lochnit, G., Zahringer, U., Bahr, U. and Geyer, R. 2003. Structural elucidation of zwitterionic carbohydrates derived from glycosphingolipids of the porcine parasitic nematode *Ascaris suum*. Biochem. J. 369, 89-102.
- [89] Fryer, S.E. and Bayne, C.J. 1990. *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 76, 45-52.
- [90] Fulford, A.J., Butterworth, A.E., Ouma, J.H. and Sturrock, R.F. 1995. A statistical approach to schistosome population dynamics and estimation of the life-span of *Schistosoma mansoni* in man. Parasitology 110 (Pt 3), 307-316.

- [91] Geyer, H. and Geyer, R. 2006. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics* 1764, 1853-1869.
- [92] Geyer, H., Schmitt, S., Wuhler, M. and Geyer, R. 1999. Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS. *Anal. Chem.* 71, 476-482.
- [93] Geyer, H., Wuhler, M., Kurokawa, T. and Geyer, R. 2004. Characterization of keyhole limpet hemocyanin (KLH) glycans sharing a carbohydrate epitope with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates. *Micron* 35, 105-106.
- [94] Geyer, H., Wuhler, M., Resemann, A. and Geyer, R. 2005. Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 280, 40731-40748.
- [95] Geyer, R. and Geyer, H. 1994. Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques. *Methods Enzymol.* 230, 86-107.
- [96] Geyer, R., Geyer, H., Kühnhardt, S., Mink, W. and Stirn, S. 1982. Capillary gas chromatography of methylhexitol acetates obtained upon methylation of N-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 121, 263-274.
- [97] Geyer, R., Geyer, H., Kühnhardt, S., Mink, W. and Stirn, S. 1983. Methylation analysis of complex carbohydrates in small amounts: Capillary gas chromatography - mass fragmentography of methylalditol acetates obtained from N-glycosidically linked glycoprotein oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 133, 197-207.
- [98] Gielens, C., Idakieva, K., Van den Bergh, V., Siddiqui, N.I., Parvanova, K. and Compennolle, F. 2005. Mass spectral evidence for N-glycans with branching on fucose in a molluscan hemocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 562-570.
- [99] Gilbertson, D.E. and Etges, F.J. 1967. Haemagglutinins in the haemolymph of planorbid snails. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 61, 144-147.
- [100] Gilbertson, D.E., Etges, F.J. and Ogle, J.D. 1967. Free amino acids of *Australorbis glabratus* hemolymph: comparison of four geographic strains and effect of infection by *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 53, 565-568.
- [101] Glinski, Z. and Jarosz, J. 1997. Molluscan immune defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 45, 149-155.
- [102] Goodall, C.P., Bender, R.C., Broderick, E.J. and Bayne, C.J. 2004. Constitutive differences in Cu/Zn superoxide dismutase mRNA levels and activity in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) that are either susceptible or resistant to *Schistosoma mansoni* (Trematoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 137, 321-328.
- [103] Goodall, C.P., Bender, R.C., Brooks, J.K. and Bayne, C.J. 2006. *Biomphalaria glabrata* cytosolic copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) gene: Association of SOD1 alleles with resistance/susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 147, 207-210.
- [104] Gordon, M.B., Howard, L. and Compton, D.A. 2001. Chromosome movement in mitosis requires microtubule anchorage at spindle poles. *J. Cell Biol.* 152, 425-434.
- [105] Granath, W.O., Jr. and Aspevig, J.E. 1993. Comparison of hemocyte components from *Schistosoma mansoni* (Trematoda)- susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) that cross-react with larval schistosome surface proteins. *Comp Biochem Physiol [B]* 104, 675-680.
- [106] Granath, W.O., Jr., Connors, V.A. and Raines, A.E. 2001. Effects of exogenous interleukin-1 β on primary sporocysts of *Schistosoma mansoni* (Trematoda) incubated with plasma and hemocytes from schistosome-susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). *Invertebrate Biology* 120, 365-371.
- [107] Granath, W.O., Jr., Spray, F.J. and Judd, R.C. 1987. Analysis of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemolymph by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, high-performance liquid chromatography, and immunoblotting. *J. Invertebr. Pathol.* 49, 198-208.
- [108] Granath, W.O., Jr. and Yoshino, T.P. 1984. Intracellular distribution of lysosomal enzymes within the hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. *Transactions of the American Microscopical Society* 103, 38-43.
- [109] Granath, W.O., Jr. and Yoshino, T.P. 1984. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.* 58, 188-193.
- [110] Grevelding, C.G., Sommer, G. and Kunz, W. 1997. Female-specific gene expression in *Schistosoma mansoni* is regulated by pairing. *Parasitology* 115 (Pt 6), 635-640.
- [111] Grezel, D., Capron, M., Grzych, J.M., Fontaine, J., Lecocq, J.P. and Capron, A. 1993. Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur. J. Immunol.* 23, 454-460.
- [112] Gryseels, B. and de Vlas, S.J. 1996. Worm burdens in schistosome infections. *Parasitol. Today* 12, 115-117.

- [113] Gryseels, B., Stelma, F., Talla, I., Polman, K., van Dam, G., Sow, S., Diaw, M., Sturrock, R.F., Decam, C., Niang, M. and Deelder, A.M. 1995. Immuno-epidemiology of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in Senegal. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 90, 271-276.
- [114] Grzych, J.M., Capron, M., Lambert, P.H., Dissous, C., Torres, S. and Capron, A. 1985. An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. Nature 316, 74-76.
- [115] Gustavson, S., Oliveira, S.C., Alves, J.B. and Goes, A.M. 1998. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection by antigens purified from PIII, a fraction of adult worm, associated to the downregulation of granuloma formation. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 93 Suppl 1, 191-196.
- [116] Gutternigg, M., Ahrer, K., Grabher-Meier, H., Burgmayr, S. and Staudacher, E. 2004. Neutral N-glycans of the gastropod *Arion lusitanicus*. Eur. J. Biochem. 271, 1348-1356.
- [117] Haas, W. 1998. Host finding - a physiological effect. In: Mehlhorn, H. Parasitology in Focus: Facts and Trends, Springer Verlag, Berlin.
- [118] Haas, W., Haberl, B., Kalbe, M. and Körner, M. 1995. Snail-host-finding by miracidia and cercariae: chemical host cues. Parasitol. Today 11, 468-472.
- [119] Haas, W. and van de Roemer, A. 1998. Invasion of the vertebrate skin by cercariae of *Trichobilharzia ocellata*: penetration processes and stimulating host signals. Parasitol. Res. 84, 787-795.
- [120] Haberl, B. and Haas, W. 1992. Miracidium of *Schistosoma mansoni*: a macromolecular glycoconjugate as signal for the behaviour after contact with the snail host. Comp Biochem Physiol Comp Physiol 101, 329-333.
- [121] Haberl, B., Kalbe, M., Fuchs, H., Strobel, M., Schmalzfuss, G. and Haas, W. 1995. *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*: miracidial host-finding behaviour is stimulated by macromolecules. Int. J. Parasitol. 25, 551-560.
- [122] Hahn, U.K., Bender, R.C. and Bayne, C.J. 2000. Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. Dev. Comp. Immunol. 24, 531-541.
- [123] Hahn, U.K., Bender, R.C. and Bayne, C.J. 2001. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. J. Parasitol. 87, 292-299.
- [124] Halkes, K.M., Lefeber, D.J., Fransen, C.T.M., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. 1998. Synthesis of the spacer-containing beta-D-GalpNAc-(1->4)-beta-D-GlcpNAc-(1->3)-alpha-D-Galp moiety, representing the non-fucosylated backbone trisaccharide of the glycocalyx glycan of the parasite *Schistosoma mansoni*. Carbohydr. Res. 308, 329-338.
- [125] Halkes, K.M., Vermeer, H.J., Slaghek, T.M., van Hoof, P.A., Loof, A., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F. 1998. Preparation of spacer-containing di-, tri-, and tetrasaccharide fragments of the circulating anodic antigen of *Schistosoma mansoni* for diagnostic purposes. Carbohydr. Res. 309, 175-188.
- [126] Hall, R.L., Wood, E.J., Kamberling, J.P., Gerwig, G.J. and Vliegthart, F.G. 1977. 3-O-methyl sugars as constituents of glycoproteins. Identification of 3-O-methylgalactose and 3-O-methylmannose in pulmonate gastropod haemocyanins. Biochem. J. 165, 173-176.
- [127] Hamburger, J., He, N., Xin, X.Y., Ramzy, R.M., Jourdane, J. and Ruppel, A. 1998. A polymerase chain reaction assay for detecting snails infected with bilharzia parasites (*Schistosoma mansoni*) from very early prepatency. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 872-876.
- [128] Hamburger, J., Turetski, T., Kapeller, I. and Deresiewicz, R. 1991. Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe. Mol. Biochem. Parasitol. 44, 73-80.
- [129] Hamburger, J., Weil, M., Turetzky, T., Ouma, J.H., Koech, D.K., Klumpp, R., Siongok, T.K. and Sturrock, R.F. 1989. Identification of snails infected with schistosomes by ELISA employing monoclonal antibodies: *Schistosoma mansoni* in laboratory snails (*Biomphalaria glabrata*) and in field snails (*Biomphalaria pfeifferi*) from Kenya. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40, 613-619.
- [130] Hamburger, J., Xu, Y.X., Ramzy, R.M., Jourdane, J. and Ruppel, A. 1998. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 468-473.
- [131] Hamilton, J.V., Chiodini, P.L., Fallon, P.G. and Doenhoff, M.J. 1999. Periodate-sensitive immunological cross-reactivity between keyhole limpet haemocyanin (KLH) and serodiagnostic *Schistosoma mansoni* egg antigens. Parasitology 118, 83-90.
- [132] Harn, D.A., Mitsuyama, M. and David, J.R. 1984. *Schistosoma mansoni*. Anti-egg monoclonal antibodies protect against cercarial challenge in vivo. J. Exp. Med. 159, 1371-1387.
- [133] Harnett, W. and Kusel, J.R. 1986. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel *in vitro*. Parasitology 93, 401-405.
- [134] Harvey, D.J. 1999. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. Mass Spectrom Rev 18, 349-450.

- [135] Harvey, D.J. 2000. Collision-induced fragmentation of underivatized N-linked carbohydrates ionized by electrospray. *J. Mass Spectrom.* 35, 1178-1190.
- [136] Harvey, D.J., Bateman, R.H. and Green, M.R. 1997. High-energy collision-induced fragmentation of complex oligosaccharides ionized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 32, 167-187.
- [137] Harvey, D.J., Küster, B. and Naven, T.J.P. 1998. Perspectives in the glycosciences - matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry of carbohydrates. *Glycoconj. J.* 15, 333-338.
- [138] Harvey, D.J., Naven, T.J.P. and Küster, B. 1996. Identification of oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization and electrospray MS. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 905-912.
- [139] Hase, S. 1993. Analysis of sugar chains by pyridylamination. *Meth. Mol. Biol.* 14, 69-80.
- [140] Hase, S., Hara, S. and Matsushima, Y. 1979. Tagging of sugars with a fluorescent compound, 2-aminopyridine. *J Biochem (Tokyo)* 85, 217-220.
- [141] Haslam, S.M., Coles, G.C., Morris, H.R. and Dell, A. 2000. Structural characterization of the N-glycans of *Dictyocaulus viviparus*: discovery of the Lewis^X structure in a nematode. *Glycobiology* 10, 223-229.
- [142] Haslam, S.M., Houston, K.M., Harnett, W., Reason, A.J., Morris, H.R. and Dell, A. 1999. Structural studies of N-glycans of filarial parasites. Conservation of phosphorylcholine-substituted glycans among species and discovery of novel chito-oligomers. *J. Biol. Chem.* 274, 20953-20960.
- [143] Hertel, L.A., Adema, C.M. and Loker, E.S. 2005. Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 295-303.
- [144] Hiatt, R.A., Sotomayor, Z.R., Sanchez, G., Zambrana, M. and Knight, W.B. 1979. Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *J. Infect. Dis.* 139, 659-666.
- [145] Hokke, C.H. and Deelder, A.M. 2001. Schistosome glycoconjugates in host-parasite interplay. *Glycoconj. J.* 18, 573-587.
- [146] Huang, H.H., Tsai, P.L. and Khoo, K.H. 2001. Selective expression of different fucosylated epitopes on two distinct sets of *Schistosoma mansoni* cercarial O-glycans: identification of a novel core type and Lewis X structure. *Glycobiology* 11, 395-406.
- [147] Humphries, J.E. and Yoshino, T.P. 2006. *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products stimulate a p38 signalling pathway in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Int. J. Parasitol.* 36, 37-46.
- [148] Idakieva, K., Stoeva, S., Voelter, W. and Gielens, C. 2004. Glycosylation of *Rapana thomasiana* hemocyanin. Comparison with other prosobranch (gastropod) hemocyanins. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 138, 221-228.
- [149] Inal, J. and Bickle, Q. 1995. Sequence and immunogenicity of the 23-kDa transmembrane antigen of *Schistosoma haematobium*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 74, 217-221.
- [150] Jeong, K.H., Lie, K.J. and Heyneman, D. 1983. The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 217-228.
- [151] Johnston, L.A. and Yoshino, T.P. 1996. Analysis of lectin- and snail plasma-binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 112, 469-479.
- [152] Johnston, L.A. and Yoshino, T.P. 2001. Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors. *J. Parasitol.* 87, 786-793.
- [153] Jourdan, J., Imbert-Establet, D. and Tchuente, L.A.T. 1995. Parthenogenesis in Schistosomatidae. *Parasitol. Today* 11, 427-430.
- [154] Kalbe, M., Haberl, B. and Haas, W. 1996. *Schistosoma mansoni* miracidial host-finding: species specificity of an Egyptian strain. *Parasitol. Res.* 82, 8-13.
- [155] Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. 1997. Hemocyanins. In: Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G. and Schachter, H. *Glycoproteins*, Elsevier Science,
- [156] Kanse, S.M., Liang, O., Schubert, U., Haas, H., Preissner, K.T., Doenhoff, M.J. and Dennis, R.D. 2005. Characterisation and partial purification of *Schistosoma mansoni* egg-derived pro-angiogenic factor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 144, 76-85.
- [157] Kantelhardt, S.R., Wuhler, M., Dennis, R.D., Doenhoff, M.J., Bickle, Q. and Geyer, R. 2002. Fuc(alpha1-->3)GalNAc-: the major antigenic motif of *Schistosoma mansoni* glycolipids implicated in infection sera and keyhole-limpet haemocyanin cross-reactivity. *Biochem. J.* 366, 217-223.
- [158] Kapp, K., Knobloch, J., Schussler, P., Sroka, S., Lammers, R., Kunz, W. and Grevelding, C.G. 2004. The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 171-182.

- [159] Khoo, K.H. 2001. Structural variations in schistosomal glycans. *Trends Glycoscience Glycotechnol.* 31, 493-506.
- [160] Khoo, K.H., Chatterjee, D., Caulfield, J.P., Morris, H.R. and Dell, A. 1997. Structural characterization of glycosphingolipids from the eggs of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Glycobiology* 7, 653-661.
- [161] Khoo, K.H., Chatterjee, D., Caulfield, J.P., Morris, H.R. and Dell, A. 1997. Structural mapping of the glycans from the egg glycoproteins of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*: identification of novel core structures and terminal sequences. *Glycobiology* 7, 663-677.
- [162] Khoo, K.H., Huang, H.H. and Lee, K.M. 2001. Characteristic structural features of schistosome cercarial N-glycans: expression of Lewis X and core xylosylation. *Glycobiology* 11, 149-163.
- [163] Khoo, K.H., Sarda, S., Xu, X., Caulfield, J.P., McNeil, M.R., Homans, S.W., Morris, H.R. and Dell, A. 1995. A unique multifucosylated -3GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3Gal α 1- motif constitutes the repeating unit of the complex O-glycans derived from the cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 270, 17114-17123.
- [164] Ko, A.I., Drager, U.C. and Harn, D.A. 1990. A *Schistosoma mansoni* epitope recognized by a protective monoclonal antibody is identical to the stage-specific embryonic antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4159-4163.
- [165] Ko, A.I. and Harn, D.A. 1987. Characterization of protective and non-protective surface membrane carbohydrate epitopes of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, Suppl. 4, 115-119.
- [166] Köster, B., Hall, M.R.T. and Strand, M. 1993. *Schistosoma mansoni*: immunoreactivity of human sera with the surface antigen Sm23. *Exp. Parasitol.* 77, 282-294.
- [167] Kurokawa, T., Wuhler, M., Lochnit, G., Geyer, H., Markl, J. and Geyer, R. 2002. Hemocyanin from the keyhole limpet *Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal(β 1-6)Man-motifs. *Eur. J. Biochem.* 269, 5459-5473.
- [168] Kusel, J.R. 1970. Studies on the structure and hatching of the eggs of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 60, 79-88.
- [169] Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-688.
- [170] Lawrence, J.D. 1973. The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 59, 60-63.
- [171] Lee, F.O. and Cheng, T.C. 1970. Increased heart rate in *Biomphalaria glabrata* parasitized by *Schistosoma mansoni*. *J. Invertebr. Pathol.* 16, 148-149.
- [172] Lee, F.O. and Cheng, T.C. 1971. *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata*: alterations in heart rate and thermal tolerance in the host. *J. Invertebr. Pathol.* 18, 412-418.
- [173] Lee, F.O. and Cheng, T.C. 1972. *Schistosoma mansoni*: Alterations in Total Protein and Hemoglobin in the Hemolymph of Infected *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.* 31, 203-216.
- [174] Lemos, Q.T. 1999. Contribution to the histology of *Biomphalaria glabrata*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32, 343-347.
- [175] Lemos, Q.T. and Andrade, Z.A. 2001. Sequential histological changes in *Biomphalaria glabrata* during the course of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 719-721.
- [176] Lewandrowski, U., Resemann, A. and Sickmann, A. 2005. Laser-induced dissociation/high-energy collision-induced dissociation fragmentation using MALDI-TOF/TOF-MS instrumentation for the analysis of neutral and acidic oligosaccharides. *Anal. Chem.* 77, 3274-3283.
- [177] Lieb, B., Dimitrova, K., Kang, H.S., Braun, S., Gebauer, W., Martin, A., Hanelt, B., Saenz, S.A., Adema, C.M. and Markl, J. 2006. Red blood with blue-blood ancestry: Intriguing structure of a snail hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- [178] Lima, N.M., dos Santos, A.F., Porfirio, Z., Goulart, M.O. and Sant'Ana, A.E. 2002. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. *Acta Trop.* 83, 43-47.
- [179] Lima, S.F., Viera, L.Q., Harder, A. and Kusel, J.R. 1994. Altered behaviour of carbohydrate-bound molecules and lipids in areas of the tegument of adult *Schistosoma mansoni* worms damaged by praziquantel. *Parasitology* 109, 469-477.
- [180] Lindberg, B. and Lonngren, J. 1978. Methylation analysis of complex carbohydrates: general procedure and application for sequence analysis. *Methods Enzymol.* 50, 3-33.
- [181] Liu, S.Y., Sporer, F., Wink, M., Jourdane, J., Henning, R., Li, Y.L. and Ruppel, A. 1997. Anthraquinones in *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* (Polygonaceae), and phorbol esters in *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) with molluscicidal activity against the schistosome vector snails *Oncomelania*, *Biomphalaria* and *Bulinus*. *Trop. Med. Int. Health* 2, 179-188.
- [182] Lochnit, G. and Geyer, R. 1995. Carbohydrate structure analysis of batroxobin, a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* venom. *Eur. J. Biochem.* 228, 805-816.

- [183] Lodes, M.J., Connors, V.A. and Yoshino, T.P. 1991. Isolation and functional characterization of snail hemocyte-modulating polypeptide from primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 49, 1-10.
- [184] Lodes, M.J. and Yoshino, T.P. 1993. Polypeptides synthesized in vitro by *Biomphalaria glabrata* hemocytes bind to *Schistosoma mansoni* primary sporocysts. J. Invertebr. Pathol. 61, 117-122.
- [185] Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M. and Kepler, T.B. 2004. Invertebrate immune systems--not homogeneous, not simple, not well understood. Immunol. Rev. 198, 10-24.
- [186] Loker, E.S. and Bayne, C.J. 1986. Immunity to trematode larvae in the snail *Biomphalaria*. Symp. zool. Soc. London 56, 199-220.
- [187] Loker, E.S., Bayne, C.J., Buckley, P.M. and Kruse, K.T. 1982. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 68, 84-94.
- [188] Loker, E.S., Boston, M.E. and Bayne, C.J. 1989. Differential adherence of M line *Biomphalaria glabrata* hemocytes to *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* larvae, and experimental manipulation of hemocyte binding. J. Invertebr. Pathol. 54, 260-268.
- [189] Lommerse, J.P., Thomas-Oates, J.E., Gielens, C., Preaux, G., Kamerling, J.P. and Vliegenthart, J.F.G. 1997. Primary structure of 21 novel monoantennary and diantennary N-linked carbohydrate chains from alpha D-hemocyanin of *Helix pomatia*. Eur. J. Biochem. 249, 195-222.
- [190] Löscher, T. 2000. Schistosomiasis. In: Löscher, T.u.L., W. Tropenmedizin in Klinik und Praxis, Thieme Verlag, Stuttgart.
- [191] Ma, B., Simala-Grant, J.L. and Taylor, D.E. 2006. Fucosylation in Prokaryotes and Eukaryotes. Glycobiology 16, 158R-184R.
- [192] Makaanu, C.K., Damian, R.T., Smith, D.F. and Cummings, R.D. 1992. The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes a novel type of glycosphingolipid. J. Biol. Chem. 267, 2251-2257.
- [193] Mansour, M.A., Ali, P.O., Farid, Z., Simpson, A.J.G. and Woody, J.W. 1989. Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis mansoni by antibody responses to keyhole limpet hemocyanin. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41, 338-344.
- [194] Mantawy, M.M., Hamed, M.A., Sasmour, E.M. and Sanad, M. 2004. Influence of *Capparis spinosa* and *Acacia arabica* on certain biochemical haemolymph parameters of *Biomphalaria alexandrina*. J. Egypt. Soc. Parasitol. 34, 659-677.
- [195] Marxen, J.C., Nimtz, M., Becker, W. and Mann, K. 2003. The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin. Biochim. Biophys. Acta 1650, 92-98.
- [196] Mascie-Taylor, C.G. and Karim, E. 2003. The burden of chronic disease. Science 302, 1921-1922.
- [197] Matricon-Gondran, M. and Letocart, M. 1999. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata* I. Characterization of Hemocytes and Fixed Phagocytes. J. Invertebr. Pathol. 74, 224-234.
- [198] Matricon-Gondran, M. and Letocart, M. 1999. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata* II. Defense Cells Have Different Phagocytic Responses to Various Injected Foreign Materials. J. Invertebr. Pathol. 74, 235-247.
- [199] Matricon-Gondran, M. and Letocart, M. 1999. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata* III. Observations on Tubular Helical Filaments Induced in the Hemolymph by Foreign Material. J. Invertebr. Pathol. 74, 248-254.
- [200] McLaren, M.L., Lillywhite, J.E., Dunne, D.W. and Doenhoff, M.J. 1981. Serodiagnosis of human *Schistosoma mansoni* infections: enhanced sensitivity and specificity in ELISA using a fraction containing *S. mansoni* egg antigens omega 1 and alpha 1. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75, 72-79.
- [201] Mechref, Y., Novotny, M.V. and Krishnan, C. 2003. Structural characterization of oligosaccharides using MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. Anal. Chem. 75, 4895-4903.
- [202] Melendez, P.A. and Capriles, V.A. 2002. Molluscicidal activity of plants from Puerto Rico. Ann. Trop. Med. Parasitol. 96, 209-218.
- [203] Meyer, S., Van Liempt, E., Imberty, A., Van Kooyk, Y., Geyer, H., Geyer, R. and Van Die, I. 2005. DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-Lewis glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae - the first parasite-specific ligand of DC-SIGN. J. Biol. Chem. 280, 37349-37359.
- [204] Michelson, E.H. 1986. Preliminary observations on a hemolymph factor influencing the infectivity of *Schistosoma mansoni* miracidia. Acta Trop. 43, 63-68.

- [205] Monroy, F., Hertel, L.A. and Loker, E.S. 1992. Carbohydrate-binding plasma proteins from the gastropod *Biomphalaria glabrata*: strain specificity and the effects of trematode infection. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 355-366.
- [206] Monroy, F.P. and Loker, E.S. 1993. Production of heterogeneous carbohydrate-binding proteins by the host snail *Biomphalaria glabrata* following exposure to *Echinostoma paraensei* and *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 79, 416-423.
- [207] Morelle, W. and Michalski, J.C. 2005. The Mass Spectrometric Analysis of Glycoproteins and their Glycan Structures. *Current Analytical Chemistry* 1, 29-57.
- [208] Mostafa, M.H., Sheweita, S.A. and O. Connor, P.J. 1999. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 97-111.
- [209] Nakakita, S., Natsuka, S., Okamoto, J., Ikenaka, K. and Hase, S. 2005. Alteration of brain type N-glycans in neurological mutant mouse brain. *J Biochem (Tokyo)* 138, 277-283.
- [210] Nanduri, J., Dennis, J.E., Rosenberry, T.L., Mahmoud, A.A. and Tartakoff, A.M. 1991. Glycocalyx of bodies versus tails of *Schistosoma mansoni* cercariae. Lectin-binding, size, charge, and electron microscopic characterization. *J. Biol. Chem.* 266, 1341-1347.
- [211] Natsuka, S., Adachi, J., Kawaguchi, M., Ichikawa, A. and Ikura, K. 2002. Method for purification of fluorescence-labeled oligosaccharides by pyridylamination. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 1174-1175.
- [212] Natsuka, S., Adachi, J., Kawaguchi, M., Nakakita, S., Hase, S., Ichikawa, A. and Ikura, K. 2002. Structural analysis of N-linked glycans in *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem (Tokyo)* 131, 807-813.
- [213] Natsuka, S. and Hase, S. 1998. Analysis of N- and O-glycans by pyridylamination. In: Hounsell, E.F. *Glycoanalysis Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ.
- [214] Natsuka, S., Ishida, M., Ichikawa, A., Ikura, K. and Hase, S. 2006. Comparative Biochemical Study of N-Linked Glycans from Skin of a Squid, *Todarodes pacificus*. *J Biochem (Tokyo)* 140, 87-93.
- [215] Natsuka, S., Kawaguchi, M., Wada, Y., Ichikawa, A., Ikura, K. and Hase, S. 2005. Characterization of wheat germ agglutinin ligand on soluble glycoproteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Biochem (Tokyo)* 138, 209-213.
- [216] Ndhlovu, P., Cadman, H., Gundersen, S.G., Vennervald, B., Friis, H., Christensen, N., Mutasa, G., Haagensen, I., Chandiwana, S.K. and Deelder, A.M. 1995. Optimization of the magnetic bead antigen capture enzyme immuno assay for the detection of circulating anodic antigens in mixed *Schistosoma* infections. *Acta Trop.* 59, 223-235.
- [217] Neto, E.D., de Souza, C.P., Rollinson, D., Katz, M., Pena, S.D.J. and Simpson, A.J.G. 1992. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52, 83-88.
- [218] Norden, A.P. and Strand, M. 1984. *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum*: identification of genus- and species-specific antigenic egg glycoproteins. *Exp. Parasitol.* 58, 333-344.
- [219] Nourel Din, M.S.A., Kornelis, D., van Zeyl, R.J.M. and Deelder, A.M. 1994. Immunologic characterization of two monoclonal antibodies reactive with repetitive carbohydrate epitopes of circulating *Schistosoma mansoni* egg antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 487-498.
- [220] Nyame, A.K., Kawar, Z.S. and Cummings, R.D. 2004. Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics. *Arch. Biochem. Biophys.* 426, 182-200.
- [221] Nyame, A.K., Yoshino, T.P. and Cummings, R.D. 2002. Differential expression of LacdiNAc, fucosylated LacdiNAc, and Lewis x glycan antigens in intramolluscan stages of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 88, 890-897.
- [222] Nyame, K., Cummings, R.D. and Damian, R.T. 1987. *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing terminal O-linked N-acetylglucosamine residues. *J. Biol. Chem.* 262, 7990-7995.
- [223] Nyame, K., Cummings, R.D. and Damian, R.T. 1988. Characterization of the high mannose asparagine-linked oligosaccharides synthesized by *Schistosoma mansoni* adult male worms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 28, 265-274.
- [224] Nyame, K., Cummings, R.D. and Damian, R.T. 1988. Characterization of the N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins synthesized by *Schistosoma mansoni* schistosomula. *J. Parasitol.* 74, 562-572.
- [225] Nyame, K., Smith, D.F., Damian, R.T. and Cummings, R.D. 1989. Complex-type asparagine-linked oligosaccharides in glycoproteins synthesized by *Schistosoma mansoni* adult males contain terminal β -linked N-acetylgalactosamine. *J. Biol. Chem.* 264, 3235-3243.
- [226] Ogbadoyi, E., Ersfeld, K., Robinson, D., Sherwin, T. and Gull, K. 2000. Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma* 108, 501-513.
- [227] Oliveira-Filho, E.C. and Paumgarten, F.J. 2000. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 342-350.

- [228] Omer-Ali, P., Magee, A.I., Kelly, C. and Simpson, A.J.G. 1986. A major role for carbohydrate epitopes preferentially recognized by chronically infected mice in the determination of *Schistosoma mansoni* schistosomulum surface antigenicity. *J. Immunol.* 137, 3601-3607.
- [229] Omer-Ali, P., Smithers, S.R., Bickle, Q., Phillips, S.M., Harn, D. and Simpson, A.J.G. 1988. Analysis of the anti-*Schistosoma mansoni* surface antibody response during murine infection and its potential contribution to protective immunity. *J. Immunol.* 140, 3273-3279.
- [230] Pahmeier, A. 1996. Intrazelluläre Lokalisation der env Genprodukte des Friend Spleen Focus-Forming Virus. PhD thesis, Gießen.
- [231] Paz-Parente, J., Cardon, P., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B. and Ricard, G. 1985. A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methyl-sulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* 141, 41-47.
- [232] Pena, H.B., de Souza, C.P., Simpson, A.J. and Pena, S.D. 1995. Intracellular promiscuity in *Schistosoma mansoni*: nuclear transcribed DNA sequences are part of a mitochondrial minisatellite region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 915-919.
- [233] Peyer, C., Bonay, P. and Staudacher, E. 2004. Purification and characterization of a beta-xylosidase from potatoes (*Solanum tuberosum*). *Biochim. Biophys. Acta* 1672, 27-35.
- [234] Pfenninger, A., Karas, M., Finke, B., Stahl, B. and Sawatzki, G. 1999. Matrix optimization for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligosaccharides from human milk. *J. Mass Spectrom.* 34, 98-104.
- [235] Pillay, D. and Pillay, B. 1994. *Schistosoma mansoni*: PCR amplification shows intraspecific variation among geographical isolates. *Exp. Parasitol.* 79, 57-58.
- [236] Pinheiro, J., Maldonado, A. and Lanfredi, R.M. 2004. Light and scanning electron microscopy of the miracidium of *Echinostoma paraensei* (Trematoda, Echinostomatidae). *Vet. Parasitol.* 121, 265-275.
- [237] Pointier, J.P., Guyard, A. and Mosser, A. 1989. Biological control of *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea* by the competitor snail *Thiara tuberculata* in a transmission site of schistosomiasis in Martinique, French West Indies. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83, 263-269.
- [238] Pointier, J.P. and Jourdane, J. 2000. Biological control of the snail hosts of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area. *Acta Trop.* 77, 53-60.
- [239] Pointier, J.P. and McCullough, F. 1989. Biological control of the snail hosts of *Schistosoma mansoni* in the Caribbean area using *Thiara spp.* *Acta Trop.* 46, 147-155.
- [240] Puanglarp, N., Oxley, D., Currie, G.J., Bacic, A., Craik, D.J. and Yellowlees, D. 1995. Structure of the N-linked oligosaccharides from tridacnin, a lectin found in the haemolymph of the giant clam *Hippopus hippopus*. *Eur. J. Biochem.* 232, 873-880.
- [241] Rabello, A.L.T., Garcia, M.M.A., Neto, E.D., Roche, R.S. and Katz, N. 1993. Dot-dye-immunoassay and dot-ELISA for the serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis mansoni using keyhole limpet haemocyanin as antigen. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 279-281.
- [242] Rabl, E. 2002. Experimentelle Untersuchung zur Charakterisierung eines lockwirksamen Signalmoleküls der Zwischenwirtsschnecke *Biomphalaria glabrata* für *Schistosoma mansoni*, Erreger Intestinaler Bilharziose. PhD thesis, München.
- [243] Rasmussen, K.R., Hillyer, G.V. and Kemp, W.M. 1985. Isolation and partial characterization of an antigen shared between *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, and *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 71, 792-798.
- [244] Redman, C.A., Robertson, A., Fallon, P.G., Modha, J., Kusel, J.R., Doenhoff, M.J. and Martin, R.J. 1996. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol. Today* 12, 14-20.
- [245] Reynolds, S.R., Dahl, C.E. and Harn, D.A. 1994. T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase. *J. Immunol.* 152, 193-200.
- [246] Ribeiro-Dos-Santos, G., Verjovski-Almeida, S. and Leite, L.C. 2006. Schistosomiasis-a century searching for chemotherapeutic drugs. *Parasitol. Res.* 99, 505-521.
- [247] Richter, D., Harn, D.A. and Matuschka, F.R. 1995. The irradiated cercariae vaccine model: looking on the bright side of radiation. *Parasitol Today* 11, 288-293.
- [248] Richter, D., Incani, R.N. and Harn, D.A. 1993. Isotype responses to candidate vaccine antigens in protective sera obtained from mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* 61, 3003-3011.
- [249] Richter, D., Incani, R.N. and Harn, D.A. 1996. Lacto-N-fucopentaose III (Lewis x), a target of the antibody response in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* 64, 1826-1831.
- [250] Richter, D., Reynolds, S.R. and Harn, D.A. 1993. Candidate vaccine antigens that stimulate the cellular immune response of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 151, 256-265.

- [251] Robijn, M.L., Koeleman, C.A., Wuhrer, M., Royle, L., Geyer, R., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Deelder, A.M. and Hokke, C.H. 2006. Targeted identification of a unique glycan epitope of *Schistosoma mansoni* egg antigens using a diagnostic antibody. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006.
- [252] Robijn, M.L., Wuhrer, M., Kornelis, D., Deelder, A.M., Geyer, R. and Hokke, C.H. 2005. Mapping fucosylated epitopes on glycoproteins and glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, adult worms and eggs. *Parasitology* 130, 67-77.
- [253] Roon, M.v. 2005. *Schistosoma mansoni*: Structural and Biophysical Aspects of Lewis X-antibody Interactions. PhD thesis, Leiden.
- [254] Ruffer, M.A. 1910. Note on the presence of *Bilharzia haematobium* in Egyptian mummies of the twentieth dynasty. *Br. Med. J.* 1, 16.
- [255] Rug, M. and Ruppel, A. 2000. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes. *Trop. Med. Int. Health* 5, 423-430.
- [256] Rumbley, C.A., Zekavat, S.A., Sugaya, H., Perrin, P.J., Ramadan, M.A. and Phillips, S.M. 1998. The schistosome granuloma: characterization of lymphocyte migration, activation, and cytokine production. *J. Immunol.* 161, 4129-4137.
- [257] Ruppel, A., Breternitz, U. and Burger, R. 1987. Diagnostic Mr 31,000 *Schistosoma mansoni* proteins: requirement of infection, but not immunization, and use of the "miniblot" technique for the production of monoclonal antibodies. *J. Helminthol.* 61, 95-101.
- [258] Rupprecht, H., Becker, W. and Schwanbek, A. 1989. Alterations in hemolymph components in *Biomphalaria glabrata* during long-term infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 75, 233-237.
- [259] Sambon, L.W. 1907. Now or little known African entozoa. *J. Trop. Med. Hyg.* 10, 117.
- [260] Samuelson, J.C. and Caulfield, J.P. 1985. The cercarial glycoalyx of *Schistosoma mansoni*. *J. Cell Biol.* 100, 1423-1434.
- [261] Sandra, K., Dolashka-Angelova, P., Devreese, B. and Van Beeumen, J. 2007. New insights in *Rapana venosa* hemocyanin N-glycosylation resulting from on-line mass spectrometric analyses. *Glycobiology* 17, 141-156.
- [262] Savioli, L., Renganathan, E., Montresor, A., Davis, A. and Behbehani, K. 1997. Control of schistosomiasis - a global picture. *Parasitol. Today* 13, 444-448.
- [263] Schall, V.T., Vasconcellos, M.C., Rocha, R.S., Souza, C.P. and Mendes, N.M. 2001. The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant Molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (syn *milli* Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. *Acta Trop.* 79, 165-170.
- [264] Schmidt, G.S. and Roberts, L.S. 2000. *Foundations of Parasitology*. McGraw-Hill Education.
- [265] Schmitt, J., Wuhrer, M., Hamburger, J., Jourdane, J., Ramzy, R.M., Geyer, R. and Ruppel, A. 2002. *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*: identification and characterization of glycoconjugate antigens in the hemolymph of infected vector snails. *J. Parasitol.* 88, 505-513.
- [266] Schramm, G., Falcone, F.H., Gronow, A., Haisch, K., Mamat, U., Doenhoff, M.J., Oliveira, G., Galle, J., Dahinden, C.A. and Haas, H. 2003. Molecular characterization of an interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Biol. Chem.* 278, 18384-18392.
- [267] Schramm, G., Gronow, A., Knobloch, J., Wippersteg, V., Grevelding, C.G., Galle, J., Fuller, H., Stanley, R.G., Chiodini, P.L., Haas, H. and Doenhoff, M.J. 2006. IPSE/alpha-1: a major immunogenic component secreted from *Schistosoma mansoni* eggs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 147, 9-19.
- [268] Schussler, P., Grevelding, C.G. and Kunz, W. 1997. Identification of Ras, MAP kinases, and a GAP protein in *Schistosoma mansoni* by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction. *Parasitology* 115 (Pt 6), 629-634.
- [269] Sher, A., Fiorentino, D., Caspar, P., Pearce, E. and Mosmann, T. 1991. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J. Immunol.* 147, 2713-2716.
- [270] Sher, A., Hieny, S., James, S.L. and Asofsky, R. 1982. Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. II. Analysis of immunity in hosts deficient in T lymphocytes, B lymphocytes, or complement. *J. Immunol.* 128, 1880-1884.
- [271] Shuhua, X., Hotez, P.J. and Tanner, M. 2000. Artemether, an effective new agent for chemoprophylaxis against schistosomiasis in China: its in vivo effect on the biochemical metabolism of the Asian schistosome. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 31, 724-732.
- [272] Shuhua, X., Jiqing, Y., Jinying, M., Huifang, G., Peiying, J. and Tanner, M. 2000. Effect of praziquantel together with artemether on *Schistosoma japonicum* parasites of different ages in rabbits. *Parasitol Int* 49, 25-30.
- [273] Silva, T.M., Batista, M.M., Camara, C.A. and Agra, M.F. 2005. Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum spp.* (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 99, 419-425.

- [274] Sire, C., Rognon, A. and Theron, A. 1998. Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitology* 117 (Pt 2), 117-122.
- [275] Soisson, L.M., Masterson, C.P., Tom, T.D., McNally, M.T., Lowell, G.H. and Strand, M. 1992. Induction of protective immunity in mice using a 62-kDa recombinant fragment of a *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J. Immunol.* 149, 3612-3620.
- [276] Spray, F.J. and Granath, W.O., Jr. 1988. Comparison of haemolymph proteins from *Schistosoma mansoni* (Trematoda)-susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). *Comp Biochem Physiol B* 91, 619-624.
- [277] Spray, F.J. and Granath, W.O., Jr. 1989. Structural analysis of hemolymph proteins from *Schistosoma mansoni* (Trematoda)-susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). *Comp Biochem Physiol B* 94, 543-553.
- [278] Spray, F.J. and Granath, W.O., Jr. 1990. Differential binding of hemolymph proteins from schistosome-resistant and -susceptible *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* sporocysts. *J. Parasitol.* 76, 225-229.
- [279] Srivatsan, J., Smith, D.F. and Cummings, R.D. 1992. The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes glycoproteins containing the Lewis X antigen. *J. Biol. Chem.* 267, 20196-20203.
- [280] Srivatsan, J., Smith, D.F. and Cummings, R.D. 1992. *Schistosoma mansoni* synthesizes novel biantennary Asn-linked oligosaccharides containing terminal β -linked *N*-acetylgalactosamine. *Glycobiology* 2, 445-452.
- [281] Stephenson, L.S., Latham, M.C., Kurz, K.M., Kinoti, S.N., Oduori, M.L. and Crompton, D.W. 1985. Relationships of *Schistosoma haematobium*, hookworm and malarial infections and metrifonate treatment to growth of Kenyan school children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 1109-1118.
- [282] Sullivan, J.T., Pikios, S.S. and Alonzo, A.Q. 2004. Mitotic responses to extracts of miracidia and cercariae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte-producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 90, 92-96.
- [283] Sullivan, J.T. and Spence, J.V. 1999. Factors affecting adoptive transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 85, 1065-1071.
- [284] Takahashi, N., Masuda, K., Hiraki, K., Yoshihara, K., Huang, H.H., Khoo, K.H. and Kato, K. 2003. N-Glycan structures of squid rhodopsin. *Eur. J. Biochem.* 270, 2627-2632.
- [285] Takemoto, T., Natsuka, S., Nakakita, S. and Hase, S. 2005. Expression of complex-type N-glycans in developmental periods of zebrafish embryo. *Glycoconj. J.* 22, 21-26.
- [286] Tarrab-Hazdai, R., Schechtman, D. and Arnon, R. 1998. Synthesis and characterization of a protective peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* 66, 4526-4530.
- [287] Tchuem Tchuente, L.-A. 1996. Mating behaviour in schistosomes: are paired worms always faithful? *Parasitol. Today* 12, 231-236.
- [288] Theron, A. and Coustau, C. 2005. Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? *J. Helminthol.* 79, 187-191.
- [289] Thors, C. and Linder, E. 2003. Localization and Identification of *Schistosoma mansoni*/KLH-crossreactive Components in Infected Mice. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1367-1373.
- [290] Tretter, V., Altmann, F. and Marz, L. 1991. Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1----3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *Eur. J. Biochem.* 199, 647-652.
- [291] van Dam, G.J., Bergwerff, A.A., Thomas-Oates, J.E., Rotmans, J.P., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F. and Deelder, A.M. 1994. The immunologically reactive O-linked polysaccharide chains derived from circulating cathodic antigen isolated from the human blood fluke *Schistosoma mansoni* have Lewis x as repeating unit. *Eur. J. Biochem.* 225, 467-482.
- [292] van Dam, G.J., Bogitsh, B.J., van Zeyl, R.J., Rotmans, J.P. and Deelder, A.M. 1996. *Schistosoma mansoni*: *in vitro* and *in vivo* excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. *J. Parasitol.* 82, 557-564.
- [293] van Die, I. and Cummings, R.D. 2006. Glycans modulate immune responses in helminth infections and allergy. *Chem Immunol Allergy* 90, 91-112.
- [294] van Kuik, J.A., Sijbesma, R.P., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G. and Wood, E.J. 1986. Primary structure of a low-molecular-mass N-linked oligosaccharide from hemocyanin of *Lymnaea stagnalis*. 3-O-methyl-D-mannose as a constituent of the xylose-containing core structure in an animal glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* 160, 621-625.
- [295] van Kuik, J.A., Sijbesma, R.P., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G. and Wood, E.J. 1987. Primary structure determination of seven novel N-linked carbohydrate chains derived from hemocyanin of *Lymnaea stagnalis*. 3-O-methyl-D-galactose and N-acetyl-D-galactosamine as

- constituents of xylose-containing *N*-linked oligosaccharides in an animal glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* 169, 399-411.
- [296] van Kuik, J.A., van Halbeek, H., Kamerling, J.P. and Vliegenthart, J.F.G. 1985. Primary structure of the low-molecular-weight carbohydrate chains of *Helix pomatia* α -hemocyanin. *J. Biol. Chem.* 260, 13984-13988.
- [297] van Leeuwen, F. 1986. Pitfalls in immunocytochemistry with special reference to the specificity problems in the localization of neuropeptides. *Am J Anat* 175, 363-377.
- [298] van Remoortere, A., Hokke, C.H., van Dam, G.J., van Die, I., Deelder, A.M. and van den Eijnden, D.H. 2000. Various stages of *Schistosoma* express Lewis^X, LacdiNAc, GalNAc β 1-4 (Fuc α 1-3)GlcNAc and GalNAc β 1-4(Fuc α 1-2Fuc α 1-3)GlcNAc carbohydrate epitopes: detection with monoclonal antibodies that are characterized by enzymatically synthesized neoglycoproteins. *Glycobiology* 10, 601-609.
- [299] Vasquez, R.E. and Sullivan, J.T. 2001. Effect of miracidial dose on adoptively transferred resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 87, 460-462.
- [300] Vasquez, R.E. and Sullivan, J.T. 2001. Further characterization of passively transferred resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 87, 1360-1365.
- [301] Vasquez, R.E. and Sullivan, J.T. 2001. Hematopoietic tissue allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni*. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 561-564.
- [302] Verweij, J.J., Polderman, A.M., Vissert, L.G. and Deelder, A.M. 1995. Measurement of antibody response to keyhole limpet haemocyanin was not adequate for early diagnosis of schistosomiasis in a group of Dutch visitors to Mali. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89, 48-50.
- [303] Vietri, N.J. and Granath, W.O., Jr. 1992. Identification, comparison and partial characterization of glycoproteins in the hemolymph of *Schistosoma mansoni* (Trematoda)-susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). *Comp Biochem Physiol B* 102, 315-323.
- [304] Webster, M., Fulford, A.J., Braun, G., Ouma, J.H., Kariuki, H.C., Havercroft, J.C., Gachuhi, K., Sturrock, R.F., Butterworth, A.E. and Dunne, D.W. 1996. Human immunoglobulin E responses to a recombinant 22.6-kilodalton antigen from *Schistosoma mansoni* adult worms are associated with low intensities of reinfection after treatment. *Infect. Immun.* 64, 4042-4046.
- [305] Weiss, J.B., Aronstein, W.S. and Strand, M. 1987. *Schistosoma mansoni*: stimulation of artificial granuloma formation in vivo by carbohydrate determinants. *Exp. Parasitol.* 64, 228-236.
- [306] Weiss, J.B., Magnani, J.L. and Strand, M. 1986. Identification of *Schistosoma mansoni* glycolipids that share immunogenic carbohydrate epitopes with glycoproteins. *J. Immunol.* 136, 4275-4282.
- [307] Weiss, J.B. and Strand, M. 1985. Characterization of developmentally regulated epitopes of *Schistosoma mansoni* egg glycoprotein antigens. *J. Immunol.* 135, 1421-1429.
- [308] Wenk, P. and Renz, A. 2003. Parasitologie - Biologie der Humanparasiten. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- [309] Wikel, S.K. and Bogitsh, B.J. 1974. *Schistosoma mansoni* penetration apparatus and epidermis of the miracidium. *Exp. Parasitol.* 36, 342-354.
- [310] Wuhrer, M., Balog, C.I., Catalina, M.I., Jones, F.M., Schramm, G., Haas, H., Doenhoff, M.J., Dunne, D.W., Deelder, A.M. and Hokke, C.H. 2006. IPSE/alpha-1, a major secretory glycoprotein antigen from schistosome eggs, expresses the Lewis X motif on core-difucosylated N-glycans. *Febs J* 273, 2276-2292.
- [311] Wuhrer, M. and Deelder, A.M. 2005. Negative-mode MALDI-TOF/TOF-MS of oligosaccharides labeled with 2-aminobenzamide. *Anal. Chem.* 77, 6954-6959.
- [312] Wuhrer, M., Dennis, R.D., Doenhoff, M.J., Bickle, Q., Lochnit, G. and Geyer, R. 1999. Immunochemical characterisation of *Schistosoma mansoni* glycolipid antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 103, 155-169.
- [313] Wuhrer, M., Dennis, R.D., Doenhoff, M.J. and Geyer, R. 2000. A fucose-containing epitope is shared by keyhole limpet haemocyanin and *Schistosoma mansoni* glycosphingolipids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 237-246.
- [314] Wuhrer, M., Dennis, R.D., Doenhoff, M.J., Lochnit, G. and Geyer, R. 2000. *Schistosoma mansoni* cercarial glycolipids are dominated by Lewis X and pseudo-Lewis Y structures. *Glycobiology* 10, 89-101.
- [315] Wuhrer, M. and Geyer, R. 2006. Glycoconjugate Structures. In: Maule, A.G. and Marks, N.J. Parasitic Flatworms - Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Parasitology, CAB International, Wallingford.
- [316] Wuhrer, M., Kantelhardt, S.R., Dennis, R.D., Doenhoff, M.J., Lochnit, G. and Geyer, R. 2002. Characterization of glycosphingolipids from *Schistosoma mansoni* eggs carrying Fuc(α 1-

- 3)GalNAc-, GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc- and Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc- (Lewis X) terminal structures. Eur. J. Biochem. 269, 481-493.
- [317] Wuhrer, M., Koeleman, C.A., Deelder, A.M. and Hokke, C.H. 2006. Repeats of LacdiNAc and fucosylated LacdiNAc on N-glycans of the human parasite *Schistosoma mansoni*. Febs J 273, 347-361.
- [318] Wuhrer, M., Koeleman, C.A., Fitzpatrick, J.M., Hoffmann, K.F., Deelder, A.M. and Hokke, C.H. 2006. Gender-specific expression of complex-type N-glycans in schistosomes. Glycobiology 16, 991-1006.
- [319] Wuhrer, M., Robijn, M.L., Koeleman, C.A., Balog, C.I., Geyer, R., Deelder, A.M. and Hokke, C.H. 2004. A novel Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Fuc(α 1-6)-core modification attached to the proximal N-acetylglucosamine of keyhole limpet haemocyanin (KLH) N-glycans. Biochem. J. 378, 625-632.
- [320] Xiao, S.H., You, J.Q., Mei, J.Y. and Jiao, P.Y. 1994. Early treatment of schistosomal infection with artemether and praziquantel in rabbits. Zhongguo Yao Li Xue Bao 15, 447-452.
- [321] Xu, X., Stack, R.J., Rao, N. and Caulfield, J.P. 1994. *Schistosoma mansoni*: fractionation and characterization of the glycocalyx and glycogen-like material from cercariae. Exp. Parasitol. 79, 399-409.
- [322] Xue, C.G., Taylor, M.G., Bickle, Q.D., Sacioli and Renagathan, E.A. 1993. Diagnosis of *Schistosoma haematobium* infection: evaluation of ELISA using keyhole limpet haemocyanin or soluble egg antigen in comparison with detection of eggs or haematuria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87, 654-658.
- [323] Yamashita, K., Kochibe, N., Ohkura, T., Ueda, I. and Kobata, A. 1985. Fractionation of L-fucose-containing oligosaccharides on immobilized *Aleuria aurantia* lectin. J. Biol. Chem. 260, 4688-4693.
- [324] Yanagida, K., Natsuka, S. and Hase, S. 2006. Structural diversity of cytosolic free oligosaccharides in the human hepatoma cell line, HepG2. Glycobiology 16, 294-304.
- [325] Yazdanbakhsh, M. and Deelder, A.M. 1998. Advances in schistosomiasis research. Curr. Opin. Infect. Dis. 11, 541-546.
- [326] Yoshino, T.P. and Bayne, C.J. 1983. Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol. 5, 317-328.
- [327] Yoshino, T.P. and Boswell, C.A. 1986. Antigen sharing between larval trematodes and their snail hosts: how real a phenomenon in immune evasion. Symp. zool. Soc. London 56, 221-238.
- [328] Yoshino, T.P. and Davis, C.D. 1983. Surface antigens of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemocytes: evidence for linkage-independence of some hemolymph-like surface antigens and Con A receptor-bearing macromolecules. J. Invertebr. Pathol. 42, 8-16.
- [329] Yoshino, T.P. and Granath, W.O., Jr. 1983. Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers. Cell Tissue Res. 232, 553-564.
- [330] Yoshino, T.P. and Granath, W.O., Jr. 1985. Surface antigens of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemocytes: functional heterogeneity in cell subpopulations recognized by a monoclonal antibody. J. Invertebr. Pathol. 45, 174-186.
- [331] Yuesheng, L., Rabello, A.L.T., Simpson, A.J.G. and Katz, N. 1994. The serological differentiation of acute and chronic *Schistosoma japonicum* infection by ELISA using keyhole limpet haemocyanin as antigen. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, 249-251.
- [332] Zaia, J. 2004. Mass spectrometry of oligosaccharides. Mass Spectrom Rev 23, 161-227.
- [333] Zelck, U.E. 1999. Glycosidase activities in plasma of naive and schistosome-infected *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). Parasitology 119, 563-568.
- [334] Zelck, U.E., Becker, W. and Bayne, C.J. 1995. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. Dev. Comp. Immunol. 19, 181-194.
- [335] Zelck, U.E., Trippensee, G. and Becker, W. 1996. Detection and partial characterization of glycosidases in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (gastropoda). Comp Biochem Physiol 114B, 281-286.
- [336] Zhang, S.M., Adema, C.M., Kepler, T.B. and Loker, E.S. 2004. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. Science 305, 251-254.
- [337] Zhang, Y., Iwasa, T., Tsuda, M., Kobata, A. and Takasaki, S. 1997. A novel monoantennary complex-type sugar chain found in octopus rhodopsin: occurrence of the Gal β 1 \rightarrow 4Fuc group linked to the proximal N-acetylglucosamine residue of the trimannosyl core. Glycobiology 7, 1153-1158.
- [338] Zhou, B., Li, S.-C., Laine, R.A., Huang, R.T.C. and Li, Y.-T. 1989. Isolation and characterization of ceramide glycanase from leech, *Macrobdella decora*. J. Biol. Chem. 264, 12272-12277.

8 Anhang

| | |
|--------------------------|--------------------------------------|
| ● = Mannose | ■ = N-Acetylglukosamin |
| □ = N-Acetylgalaktosamin | ▲ = Fucose |
| ☆ = Xylose | ● ^{3Me} = 3-O-Methylmannose |
| ○ = Galaktose | |

Abb. 91: Symbole der Monosaccharide in den massenspektrometrischen Abbildungen.

Tabelle mit Monosaccharidzusammensetzungen aller detektierter PA-markierter N-Glykane

Tabelle 12: Monosaccharidzusammensetzungen aller detektierten PA-markierten N-Glykane von *B. glabrata* Hämolympheglykoproteinen. Die in Fettdruck gesetzten Glykanmassen gehören zu Spezies, die in der Vergleichsstudie detektiert wurden. Erläuterungen zu den drei letzten Spalten finden sich am Tabellenende. MeH = Methylhexose, H = Hexose, N = Aminosucker, X = Xylose und F = Fucose

| Gemessen [M+Na] ⁺ | Theo- retisch [M+Na] ⁺ | Vorgeschlagene Monosaccharid- zusammensetzung | | | | | Vor- kommen ^a | Erken- nung durch anti-SEA | Diagnostische Fragmentationen ^d |
|---------------------------------|---|---|----------|----------|----------|----------|-----------------------------|-------------------------------------|---|
| | | MeH | H | N | X | F | | | |
| 965.5 | 965.4 | | 1 | 2 | 1 | 1 | - ^b | + | 6 |
| 981.3 | 981.4 | | 2 | 2 | 1 | | - ^b | + | n. d. |
| 995.3 | 995.4 | 1 | 1 | 2 | 1 | | - ^b | + | 1, 3 |
| 1011.5 | 1011.4 | | 3 | 2 | | | - ^b | - | 2, 9 |
| 1025.5 | 1025.4 | 1 | 2 | 2 | | | - ^b | - | 2, 3 |
| 1039.7 | 1039.7 | 2 | 1 | 2 | | | ++++ | - | 3 |
| 1127.4 | 1127.4 | | 2 | 2 | 1 | 1 | - ^b | + | 1, 2, 6 |
| 1141.3 | 1141.4 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | - ^b | + | 1, 3, 6 (317, 97) |
| 1143.3 | 1143.4 | | 3 | 2 | 1 | | - ^b | + | 1, 2, 9 |
| 1157.3 | 1157.4 | 1 | 2 | 2 | 1 | | ++++ | +/- ^c | 1, 2, 3, 10, 16 (479, 245, 259) |
| 1171.4 | 1171.5 | 2 1 | 1 2 | 2 2 | 1 | 1 | +++++ | - | 1, 2, 3, 6, 13 |
| 1173.8 | 1173.4 | | 4 | 2 | | | - ^b | - | n. d. |
| 1185.3 | 1185.5 | 2 | 1 | 2 | | 1 | ++++ | - | 3, 6 |
| 1187.4 | 1187.5 | 1 | 3 | 2 | | | - ^b | - | n. d. |
| 1201.4 | 1201.5 | 2 | 2 | 2 | | | +++ | - | 3, 10 |
| 1289.4 | 1289.5 | | 3 | 2 | 1 | 1 | - ^b | + | 1, 2, 6 |
| 1303.4 | 1303.5 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | ++++ | +/- ^c | 1, 2, 3, 6, 16 (479, 245, 259) |
| 1305.5 | 1305.5 | | 4 | 2 | 1 | | - ^b | + | n. d. |
| 1317.4 | 1317.5 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | +++++ | - | 1, 3, 6 |
| 1335.4 | 1335.5 | | 5 | 2 | | | - ^b | - | 2, 9 |
| 1346.5 | 1346.5 | | 3 | 3 | 1 | | - ^b | + | 2, 9, 11 |
| 1349.5 | 1349.5 | 1 | 4 | 2 | | | +++ | - | 2, 3, 9, 10 |
| 1360.3 | 1360.5 | 1 | 2 | 3 | 1 | | - ^b | +/- ^c | n. d. |

| | | | | | | | | | |
|---------------|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------------|------------------------|-------------------------------|
| | | | 3 | 3 | | 1 | | | |
| 1363.5 | 1363.5 | 2 | 3 | 2 | | | ++++ | - | 2, 3, 10 |
| 1377.5 | 1377.5 | 3 | 2 | 2 | | | +++++ | - | 3, 10 |
| 1403.9 | 1404.6 | 2 | 2 | 3 | | | ++ | - | n. d. |
| 1432.0 | 1431.6 | 1 | 2 | 4 | | | + | - | n. d. |
| 1492.4 | 1492.6 | | 3 | 3 | 1 | 1 | -^b | + | 2, 6, 14 |
| 1498.3 | 1497.5 | | 6 | 2 | | | ++ | - | n. d. |
| 1506.4 | 1506.6 | 1 | 2 | 3 | 1 | 1 | - ^b | + | 3, 6, 15 |
| 1508.3 | 1508.6 | | 4 | 3 | 1 | | - ^b | + | n. d. |
| 1511.5 | 1511.6 | 1 | 5 | 2 | | | ++ | - | n. d. |
| 1526.0 | 1525.6 | 2 | 4 | 2 | | | ++++ | - | 2, 3, 10 |
| 1540.0 | 1539.6 | 3 | 3 | 2 | | | ++++ | - | 2, 3, 10 |
| 1549.5 | 1549.6 | | 3 | 4 | 1 | | -^b | + | 2, 5, 11 |
| 1563.3 | 1563.6 | 1 | 2 | 4 | 1 | | + | + | 2, 3, 5, 10, |
| 1659.5 | 1659.6 | | 7 | 2 | | | + | - | 2, 9 |
| 1673.5 | 1673.6 | 1 | 6 | 2 | | | + | - | 2, 3, 9 |
| 1688.1 | 1687.6 | 2 | 5 | 2 | | | ++ | - | 2, 3, 9, 10 |
| 1695.6 | 1695.6 | | 3 | 4 | 1 | 1 | - ^b | + | 4, 5, 6, 7, 11 |
| 1701.5 | 1701.6 | 3 | 4 | 2 | | | ++ | - | n. d. |
| 1709.5 | 1709.7 | 1 | 2 | 4 | 1 | 1 | - ^b | + | n. d. |
| 1711.6 | 1711.6 | | 4 | 4 | 1 | | - ^b | + | 5, 11 |
| 1723.5 | 1723.7 | 1 | 2 | 4 | | 2 | - ^b | + | n. d. |
| 1725.5 | 1725.7 | 1 | 3 | 4 | 1 | | + | + | n. d. |
| 1739.5 | 1739.7 | 1 | 3 | 4 | | 1 | ++ | + | n. d. |
| 1752.5 | 1752.6 | | 3 | 5 | 1 | | - ^b | + | n. d. |
| 1781.3 | 1780.7 | 1 | 2 | 5 | | 1 | - ^b | - | n. d. |
| 1821.5 | 1821.6 | | 8 | 2 | | | + | - | 9 |
| 1835.5 | 1835.6 | 1 | 7 | 2 | | | (+) | - | n. d. |
| 1841.5 | 1841.7 | | 3 | 4 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |
| 1849.4 | 1849.6 | 2 | 6 | 2 | | | (+) | - | n. d. |
| 1855.5 | 1855.7 | | 3 | 4 | | 3 | - ^b | + | 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, |
| | | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | | | 15 |
| 1857.6 | 1857.7 | | 4 | 4 | 1 | 1 | -^b | + | 6, 7, 11, 14 |
| 1869.3 | 1869.7 | 1 | 2 | 4 | | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 1871.6 | 1871.7 | 1 | 3 | 4 | 1 | 1 | -^b | + | n. d. |
| | | | 4 | 4 | | 2 | | | |
| 1885.6 | 1885.7 | 1 | 3 | 4 | | 2 | + | + | n. d. |
| | | 2 | 2 | 4 | 1 | 1 | | | |
| 1887.3 | 1887.7 | 1 | 4 | 4 | 1 | | - ^b | + | n. d. |
| 1899.6 | 1899.7 | 2 | 2 | 4 | | 2 | -^b | + | n. d. |
| 1901.5 | 1901.7 | 1 | 4 | 4 | | 1 | ++ | - | n. d. |
| 1912.5 | 1912.7 | 1 | 2 | 5 | 1 | 1 | - ^b | + | n. d. |
| | | | 3 | 5 | | 2 | | | |
| 1915.8 | 1915.7 | 2 | 3 | 4 | | 1 | - ^b | + | n. d. |
| 1926.5 | 1926.6 | 1 | 2 | 5 | | 2 | - ^b | + | n. d. |
| 1940.6 | 1940.7 | 2 | 1 | 5 | | 2 | -^b | + | n. d. |
| 1955.5 | 1955.8 | | 3 | 6 | 1 | | - ^b | + | n. d. |
| 1983.5 | 1983.7 | | 9 | 2 | | | ++ | - | 2, 9 |
| 1985.4 | 1985.8 | | 4 | 6 | | | - ^b | - | n. d. |
| 1998.2 | 1997.7 | 1 | 8 | 2 | | | + | - | 2, 3 |
| 2001.4 | 2001.7 | 1 | 2 | 4 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2003.5 | 2003.8 | | 4 | 4 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |
| 2012.2 | 2011.7 | 2 | 7 | 2 | | | + | - | n. d. |
| 2017.6 | 2017.8 | 1 | 3 | 4 | 1 | 2 | + | + | 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, |
| | | | 4 | 4 | | 3 | | | 15 |
| 2019.6 | 2019.8 | | 5 | 4 | 1 | 1 | + | + | n. d. |
| 2026.2 | 2026.7 | | 3 | 7 | | | + | - | n. d. |
| 2031.7 | 2031.8 | 2 | 2 | 4 | 1 | 2 | ++ | + | n. d. |
| | | 1 | 3 | 4 | | 3 | | | |
| 2033.4 | 2033.8 | 1 | 4 | 4 | 1 | 1 | + | +/-^c | 5, 10, 12 |
| 2045.2 | 2044.8 | | 3 | 5 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |

| | | | | | | | | | |
|---------------|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------|------------------|---|
| | 2045.8 | 2 | 2 | 4 | | 3 | | | |
| 2047.6 | 2047.8 | 2 | 3 | 4 | 1 | 1 | + | + | n. d. |
| | | 1 | 4 | 4 | | 2 | | | |
| 2058.6 | 2058.8 | 1 | 2 | 5 | 1 | 2 | - ^b | + | 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 15 |
| | | | 3 | 5 | | 3 | | | |
| 2060.7 | 2060.8 | | 4 | 5 | 1 | 1 | + | + | 2, 6, 9 |
| 2072.4 | 2072.8 | 1 | 2 | 5 | | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2074.6 | 2074.7 | 1 | 3 | 5 | 1 | 1 | + | +/- ^c | 4, 5, 10, 12, 16 (858) |
| 2088.7 | 2088.8 | 1 | 3 | 5 | | 2 | (+) | + | n. d. |
| | | 2 | 2 | 5 | 1 | 1 | | | |
| 2101.7 | 2101.8 | | 3 | 6 | 1 | 1 | (+) | + | n. d. |
| 2117.7 | 2117.8 | | 4 | 6 | 1 | | (+) | + | n. d. |
| 2163.5 | 2163.8 | 1 | 3 | 4 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2177.4 | 2177.8 | 2 | 2 | 4 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2179.4 | 2179.8 | 1 | 4 | 4 | 1 | 2 | ++ | +/- ^c | 4, 5, 6, 7, 12, 13, 15 |
| 2193.6 | 2193.8 | 1 | 4 | 4 | | 3 | + | + | n. d. |
| | | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | | | |
| 2196.7 | 2195.8 | 1 | 5 | 4 | 1 | 1 | - ^b | + | n. d. |
| | | | 6 | 6 | | 2 | | | |
| 2204.6 | 2204.9 | 1 | 2 | 5 | 1 | 3 | (+) | + | 4, 5, 6, 7, 15 |
| 2207.3 | 2206.8 | | 4 | 5 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |
| 2220.6 | 2220.9 | 1 | 3 | 5 | 1 | 2 | ++ | +/- ^c | 4, 5, 6, 7, 15, 16 (858, 624, 638) |
| 2234.9 | 2234.9 | 1 | 3 | 5 | | 3 | (+) | + | n. d. |
| | | 2 | 2 | 5 | 1 | 2 | | | |
| 2238.9 | 2238.8 | | 6 | 5 | 1 | | - ^b | - | n. d. |
| 2247.6 | 2247.6 | | 3 | 6 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |
| 2263.7 | 2263.9 | | 4 | 6 | 1 | 1 | (+) | + | n. d. |
| 2277.7 | 2277.9 | 1 | 3 | 6 | 1 | 1 | (+) | + | n. d. |
| | | | 4 | 6 | | 2 | | | |
| 2293.6 | 2293.8 | 1 | 4 | 6 | 1 | | - ^b | + | n. d. |
| | | | 5 | 6 | | 1 | | | |
| 2325.5 | 2325.8 | 1 | 4 | 4 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2341.3 | 2341.9 | 1 | 5 | 4 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |
| | | | 6 | 4 | | 3 | | | |
| 2382.3 | 2382.9 | 1 | 4 | 5 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |
| 2393.6 | 2393.9 | | 3 | 6 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2408.5 | 2407.9 | 1 | 2 | 6 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2425.7 | 2425.9 | | 5 | 6 | 1 | 1 | (+) | + | n. d. |
| 2439.8 | 2439.9 | 1 | 4 | 6 | 1 | 1 | - ^b | + | n. d. |
| | | | 5 | 6 | | 2 | | | |
| 2450.6 | 2450.9 | | 3 | 7 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |
| | | 2 | 2 | 6 | | 3 | | | |
| 2466.8 | 2466.9 | | 4 | 7 | 1 | 1 | - ^b | + | n. d. |
| 2487.5 | 2487.9 | 1 | 5 | 4 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2529.3 | 2528.9 | 1 | 4 | 5 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2555.6 | 2556.0 | | 4 | 6 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2570.2 | 2570.0 | | 5 | 6 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |
| 2585.8 | 2586.0 | | 5 | 6 | | 3 | - ^b | + | n. d. |
| | | 1 | 4 | 6 | 1 | 2 | | | |
| 2587.4 | 2587.9 | | 6 | 6 | 1 | 1 | - ^b | + | n. d. |
| 2599.6 | 2600.0 | 2 | 3 | 6 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |
| | | 1 | 4 | 6 | | 3 | | | |
| 2612.6 | 2613.0 | | 4 | 7 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |
| 2626.8 | 2627.0 | 1 | 3 | 7 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |
| | | | 4 | 7 | | 3 | | | |
| 2732.5 | 2732.0 | 1 | 4 | 6 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2747.6 | 2748.0 | 1 | 5 | 6 | 1 | 2 | - ^b | + | n. d. |
| | | | 6 | 6 | | 3 | | | |

| | | | | | | | | | |
|---------------|---------------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------------|---|--------------|
| 2759.5 | 2759.1 | | 4 | 7 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2773.3 | 2773.1 | 1 | 3 | 7 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2787.5 | 2787.1 | 2 | 2 | 7 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2877.5 | 2876.1 | 1 | 5 | 8 | | 1 | - ^b | + | n. d. |
| 2894.5 | 2894.1 | 1 | 5 | 6 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2908.1 | 2908.5 | 2 | 4 | 6 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2921.5 | 2921.1 | | 5 | 7 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2935.5 | 2935.1 | 1 | 4 | 7 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 2975.9 | 2974.1 | 1 | 8 | 4 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 3039.7 | 3038.1 | 1 | 6 | 8 | | 1 | - ^b | + | n. d. |
| 3056.3 | 3056.1 | 1 | 6 | 6 | 1 | 3 | - ^b | + | n. d. |
| 3120.2 | 3120.2 | 1 | 4 | 10 | | 1 | - ^b | + | n. d. |

^a (+) bis +++++; 0-1000; 1001-1500; 1501-2500; 2501-5000; 5001-10000; 10001-15000 Peakflächen. Die Werte entstammen aus drei verschiedenen massenspektrometrischen Messungen und sind gemittelt.

^b Spezies nur detektierbar nach Immunaффinitätschromatographie, Lektinaффinitätsanreicherung und/oder HPLC-Fraktionierung.

^c +/- = Spezies detektiert in der anti-SEA ungebundenen sowie gebundenen Fraktion

^d Nummern-Schlüssel für die diagnostischen Fragmentationen (gemessen als $[M+H]^+$ im LID-Modus):

1 = Xyl (m/z 133);

2 = Hex (m/z 163);

3 = MeHex (m/z 177);

4 = FucHexNAc (m/z 350);

5 = HexNAc₂ (m/z 407);

6 = HexNAcFuc-PA (m/z 446);

7 = HexNAc₂Fuc (m/z 553);

8 = HexNAc₂Fuc₂ (m/z 699);

9 = Hex₃HexNAc₂-PA (m/z 989);

10 = MeHexHex₂HexNAc₂-PA (m/z 1003);

11 = Hex₃HexNAc₂X-PA (m/z 1121);

12 = MeHexHex₂HexNAc₂X-PA (m/z 1135);

13 = MeHexHex₂HexNAc₂F-PA (m/z 1149);

14 = Hex₃HexNAc₂XF-PA (m/z 1267);

15 = MeHexHex₂HexNAc₂XF-PA (m/z 1281);

16 = D-Ion und Ringfragmenten, gemessen als $[M+Na]^+$ (m/z D-Ion, ^{0,4}A, ^{3,5}A) im CID-Modus

n. d. = nicht durchgeführt

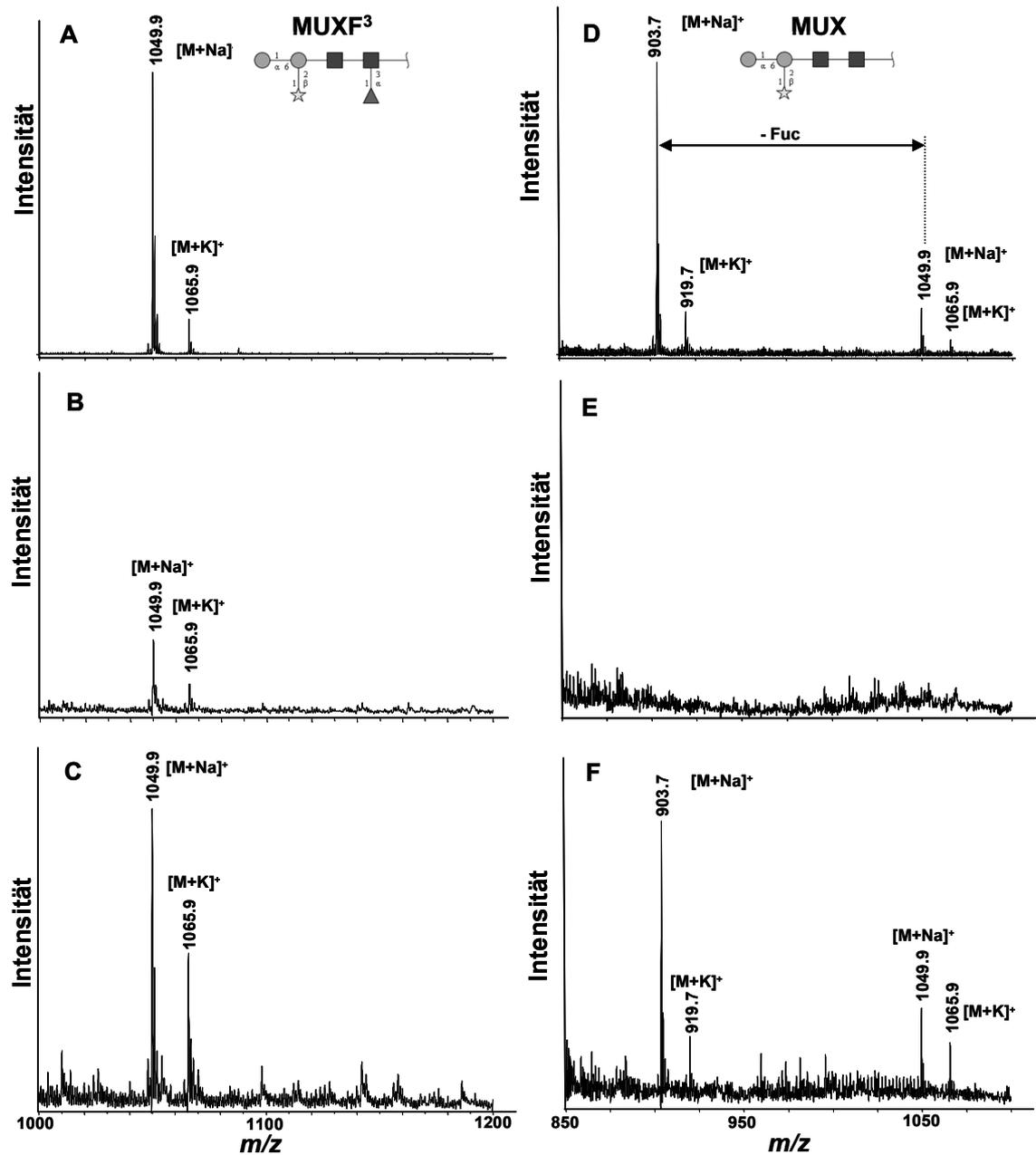


Abb. 92: MALDI-TOF-MS Analyse nach Bindungsstudien an immobilisierten anti-SEA Antikörper mit dem pflanzlichen N-Glykan MUXF³ (Man₂GlcNAc₂XylFuc) vor (A-C) und nach HF-Behandlung (D-F). (A) und (B) zeigen das Ausgangsglykan vor und nach Defucosylierung. Im Durchlauf war massenspektrometrisch vom MUXF³ nur wenig nachweisbar (B), vom MUX (Man₂GlcNAc₂Xyl) nichts (E). Im Eluat wurden beide Glykane detektiert (C+F).

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Rudolf Geyer, danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Glykogruppe und die interessante Themenstellung. Sein permanentes Interesse, seine zahlreichen Ideen zum Fortgang dieser Arbeit, verbunden mit dem exzellenten Klima in seiner Gruppe sowie der Fähigkeit, für die Glykobiologie zu begeistern, haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Alfred M. Pingoud danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit seitens des Fachbereiches 08 zu vertreten.

Frau Dr. Hildegard Geyer danke ich für ihre große Hilfe besonders in der Vermittlung der Methoden zur Kohlenhydratanalytik sowie ihre große Unterstützung bei der Auswertung von unzähligen Signalen in den vielen massenspektrometrischen Messungen und den Veröffentlichungen dieser Arbeit.

Prof. em. Dr. Michael J. Doenhoff danke ich für seine zuverlässige Lieferung von biologischen Materialien.

Prof. Dr. Sumihiro Hase danke ich für die freundliche Aufnahme in sein „Hase-sensei-Labor“ an der Universität in Osaka und der Möglichkeit, dort für drei Monate arbeiten zu können sowie viele Methoden und auch Japan kennen lernen zu dürfen.

Den Herrn PDs Dr. Roger D. Dennis und Dr. Günter Lochnit danke ich, obwohl nicht direkt im Projekt eingebunden, für ihre Diskussionsbereitschaft und so manche hilfreiche Idee. PD Dr. Roger D. Dennis danke ich zudem für die hilfreichen Korrekturen in Wort und Schrift der englischen Sprache.

Dr. Manfred Wuhrer danke ich für die zahlreichen Tipps zu Beginn dieser Arbeit.

Allen meinen Laborkollegen aus dem Rundlabor 37, mit denen ich die Zeit teilweise oder ganz zusammenarbeiten durfte: Christina Bleckmann, Christoph Burkl, Sebastian Galuska, Dr. Julia Grabitzki, Dr. Kai Maaß, Oliver Meub, Sandra Meyer und Martin Schmitt danke ich für das unkomplizierte Miteinander, die gegenseitige Hilfsbereitschaft und viel Spaß innerhalb und außerhalb des Labors.

Den „Kellerkindern“ Peter Kaese, Siegfried Kühnhardt und Werner Mink danke ich für die Durchführung zahlreicher Analysen und ihre Kooperation nicht nur bei deren Auswertung.

Ein Dank geht auch an unsere langjährige Laborantin Daniela Stock und alle Laboranten-Azubis, die mir so manche Gefälligkeit im Labor geleistet haben.

Prof. Dr. Rainer M. Bohle und Frau Petra Hahn-Kohlberger (Institut für Pathologie, Gießen) danke ich für die Möglichkeit, Einbettungen, Schnitte und Färbungen anfertigen lassen zu können.

Dr. Knut Beuerlein danke ich für die Möglichkeit, am Mikroskop im Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie die Auswertung und Dokumentation der immunhistochemischen Anfärbungen durchführen zu können.

Allen, die diese Arbeit zur Korrektur gelesen haben, danke ich ebenfalls.

Mein besonderer Dank gilt meiner Lebensgefährtin und Kollegin Sandra Meyer, die mich in vielen Dingen unterstützt. Danke für das schöne Leben.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Eltern für die große Unterstützung schon während des Studiums danken.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen,

(Tobias Lehr)