

Strukturelle Charakterisierung der Glykosphingolipide aus adulten Würmern  
von *Schistosoma mansoni*

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Sandra Frank

Aus dem Institut für Parasitologie  
am Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. C.G. Grevelding

**und**

dem Institut für Biochemie  
am Fachbereich Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. R. Geyer

**Strukturelle Charakterisierung der Glykosphingolipide aus adulten Würmern  
von *Schistosoma mansoni***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von  
**Sandra Frank**  
Tierärztin aus Lich

Gießen 2012

---

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. C.G. Greveling

Prof. Dr. R. Geyer

Tag der Disputation: 28. Juni 2012

---

Meiner Familie



## Publikationen, Kongress- und Seminarbeiträge

### Publikationen

Lehr, T.\*, Frank, S.\*, Natsuka, S., Geyer, H., Beuerlein, K., Doenhoff, M.J., Hase, S., Geyer, R. (2010). N-Glycosylation patterns of hemolymph glycoproteins from *Biomphalaria glabrata* strains expressing different susceptibility to *Schistosoma mansoni* infection. *Exp. Parasitol.* **126**: 592-602. (\*contributed equally)

Frank, S., Geyer, H., Geyer, R. (2011). Microscale Analysis of glycosphingolipids from *Schistosoma mansoni* cercariae. *J. Carb. Chem.* **30**: 233-248.

Frank, S., van Die, I., Geyer, R. (2012). Structural characterization of *Schistosoma mansoni* adult worm glycosphingolipids reveals pronounced differences with those of cercariae. *Glycobiology.* **22**: 676-695.

### Kongressbeiträge

Frank, S., van Stijn, C.M., Grevelding, C.G., van Die, I., Geyer, R. (POSTER)

*Structural characterization of carbohydrate moieties from adult Schistosoma mansoni glycosphingolipids.* 20<sup>th</sup> Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, the Groupe Lillois de Glycobiologie, and the Belgian Working Group for Glycosciences

08. - 10.11.2009 in Köln

Frank, S., van Stijn, C.M., Grevelding, C.G., van Die, I., Geyer, R. (VORTRAG)

*Structural Characterisation of Complex Glycosphingolipids from adult Schistosoma mansoni.* 21<sup>st</sup> Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, the Groupe Lillois de Glycobiologie, and the Belgian Working Group for Glycosciences

07. - 09.11.2010 in Ghent, Belgien

Frank, S., van Stijn, C.M., Grevelding, C.G., van Die, I., Geyer, R. (VORTRAG)

*Structural Characterisation of Complex Glycosphingolipids from adult Schistosoma mansoni.* Annual Spring Meeting of the British Society for Parasitology

11. - 14.04.2011 in Nottingham, UK

Frank, S., Geyer, H., Geyer, R. (POSTER)

*Microscale analysis of Glycosphingolipids from Schistosoma mansoni Cercariae*

International Symposium "Molecluar Life Sciences 2011"

25. - 28.09.2011 in Frankfurt/Main

---

Frank, S., van Stijn, C.M., van Die, I., Geyer, R. (POSTER)

*Structural Characterisation of Complex Glycosphingolipids from adult Schistosoma mansoni.*  
22<sup>nd</sup> Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, the Groupe Lillois de Glycobiologie, and the Belgian Working Group for Glycosciences  
27. - 29.11.2011 in Lille, Frankreich

### Seminarbeiträge

*Characterisation and localisation of stage- and gender-specific glycosylation patterns from Schistosoma mansoni.* Internes Seminar des Sonderforschungsbereiches 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“  
05.12.2008, Justus-Liebig-Universität, Gießen

*Gender- and stage-specific glycosylation patterns from Schistosoma mansoni*  
Japanese-Giessen-GlycoWorkshop  
07.11.2009, Justus-Liebig-Universität, Gießen

*Structural Characterisation of Complex Glycosphingolipids from adult Schistosoma mansoni.*  
Seminar of the International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences: Current topics in infection biology  
21.01.2011, Justus-Liebig-Universität, Gießen

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Die Schistosomiasis.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Erreger- und Wirtsspektrum .....	3
2.1.1.1	Erreger-Taxonomie .....	3
2.1.1.2	Humanmedizinisch relevante Schistosomen .....	4
2.1.1.3	Veterinärmedizinisch relevante Schistosomen .....	4
2.1.2	Geographische Verbreitung .....	5
<b>2.2</b>	<b><i>Schistosoma mansoni</i> .....</b>	<b>5</b>
2.2.1	Lebenszyklus und Entwicklung .....	5
2.2.2	Krankheitsbild.....	6
2.2.3	Diagnose .....	7
2.2.4	Therapie .....	8
2.2.5	Prävention .....	9
<b>2.3</b>	<b>Glykokonjugate von <i>S. mansoni</i>.....</b>	<b>10</b>
2.3.1	Glykosphingolipide (GSL) .....	11
2.3.2	Glykoproteine .....	14
<b>2.4</b>	<b>Immunmodulatorische Eigenschaften der Glykokonjugate von <i>S. mansoni</i>... </b>	<b>16</b>
2.4.1	Immunologie der Schistosomiasis .....	16
2.4.2	Dendritische Zellen .....	16
2.4.2.1	DC-SIGN .....	17
2.4.2.2	<i>Toll-like</i> Rezeptoren .....	18
2.4.3	Das Le <sup>X</sup> -Epitop .....	19
2.4.3.1	Vorkommen und Funktion .....	19
2.4.3.2	Immunmodulatorische Eigenschaften.....	20
2.4.4	Immunmodulatorische Eigenschaften von (Glykosphingo-) Lipiden.....	21
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikalien.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Neo-Glykokonjugate.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3</b>	<b>Biologische Materialien .....</b>	<b>24</b>
3.3.1	Glykokonjugate verschiedener Stadien von <i>S. mansoni</i> .....	24
3.3.2	Antikörper und Antikörperkonstrukte.....	24
3.3.3	Enzyme .....	25
<b>3.4</b>	<b>Reinigung und Aufarbeitung von GSL .....</b>	<b>25</b>
3.4.1	Verseifung des Rohextrakts .....	26
3.4.2	Umkehrphasenchromatographie.....	26
3.4.3	Hochleistungsdünnschichtchromatographie .....	26
3.4.4	Normalphasenchromatographie.....	27

---

3.5	<b>HPLC-basierte Monosaccharid-Analyse</b> .....	28
3.6	<b><i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i></b> .....	29
3.6.1	ELISA mit mAk gegen Kohlenhydratepitope .....	29
3.6.2	ELISA mit DC-SIGN-Fc Konstrukt .....	30
3.7	<b>Enzymatischer Verdau nativer GSL</b> .....	31
3.7.1	Verdau mit rEGC II .....	31
3.7.2	Verdau mit SCDase .....	32
3.8	<b>Chemische Derivatisierung von Oligosacchariden</b> .....	33
3.8.1	Reduktion .....	33
3.8.2	Permethylierung .....	34
3.9	<b>Chemische Derivatisierung von Fettsäuren</b> .....	34
3.9.1	Hydrolyse nach Gaver und Sweeley .....	34
3.9.2	Acetylierung .....	34
3.10	<b>Massenspektrometrische Analysen</b> .....	35
3.10.1	MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	35
3.10.2	ESI-Massenspektrometrie .....	36
3.10.3	GC-gekoppelte Massenspektrometrie .....	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
4.1	<b>Entwicklung einer Methode zum enzymatischen Verdau nativer GSL mit SCDase im Mikro-Maßstab</b> .....	<b>38</b>
4.1.1	Massenspektrometrische Untersuchung von GalCer .....	38
4.1.2	Enzymatischer Verdau von GalCer im Mikro-Maßstab .....	41
4.1.2.1	Massenspektrometrische Untersuchung von Lyso-GalCer .....	41
4.1.2.2	Fettsäureanalytik .....	45
4.1.2.3	Struktur von GalCer .....	47
4.2	<b>Strukturelle Charakterisierung des Ceramid-Komponenten von GSL aus Cercarien</b> .....	<b>48</b>
4.2.1	Massenspektrometrische Untersuchung nativer GSL .....	48
4.2.2	Enzymatischer Verdau nativer GSL mit SCDase .....	50
4.2.2.1	Massenspektrometrische Untersuchung der Lyso-GSL .....	50
4.2.2.2	Fettsäureanalytik .....	55
4.2.3	Struktur der Ceramid-Komponenten von GSL aus Cercarien .....	56
4.3	<b>Strukturelle Charakterisierung der GSL aus adulten Würmern</b> .....	<b>60</b>
4.3.1	Aufreinigung des Rohextraktes .....	60
4.3.2	Strukturelle Charakterisierung der Kohlenhydrat-Komponenten .....	63
4.3.2.1	Analyse der Kohlenhydratepitope nativer GSL mittels ELISA .....	63
4.3.2.2	Massenspektrometrische Untersuchung nativer GSL .....	64
4.3.2.3	Massenspektrometrische Untersuchung nativer Oligosaccharide .....	70
4.3.2.4	Massenspektrometrische Untersuchung derivatisierter Oligosaccharide .....	74
4.3.2.5	Strukturen der Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL .....	87

---

4.3.3	Strukturelle Charakterisierung der Ceramid-Komponenten.....	89
4.3.3.1	Massenspektrometrische Untersuchung der Lyso-GSL .....	89
4.3.3.2	Struktur der Ceramid-Komponenten komplexer GSL .....	98
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>99</b>
<b>5.1</b>	<b>Methodische Aspekte.....</b>	<b>99</b>
5.1.1	Reinigung und Aufarbeitung von GSL .....	99
5.1.1.1	Verseifung des Rohextraktes.....	99
5.1.1.2	HPLC-basierte Monosaccharid-Analyse.....	99
5.1.2	ELISA .....	100
5.1.3	Enzymatischer Verdau nativer GSL.....	100
5.1.3.1	Verdau mit rEGCase II.....	100
5.1.3.2	Verdau mit SCDase im Mikro-Maßstab .....	101
5.1.4	Chemische Derivatisierung von Oligosacchariden .....	103
5.1.5	Massenspektrometrie.....	104
<b>5.2</b>	<b>Strukturelle Charakterisierung der GSL aus adulten Würmern .....</b>	<b>105</b>
5.2.1	Strukturen der Kohlenhydrat-Komponenten .....	105
5.2.2	Ceramid-Zusammensetzungen.....	108
<b>5.3</b>	<b>Strukturelle Charakterisierung der Ceramid-Zusammensetzung von GSL aus Cercarien .....</b>	<b>109</b>
<b>5.4</b>	<b>Biosynthese von GSL in <i>S. mansoni</i> unter besonderer Beachtung der Strukturen adulter Würmern.....</b>	<b>110</b>
<b>5.5</b>	<b>Immunmodulatorische Wirkung komplexer GSL aus adulten Würmern .....</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>120</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>131</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>149</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>151</b>
<b>12</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>152</b>

---

# 1 Einleitung

Die Schistosomiasis, welche auch als Bilharziose bezeichnet wird, ist nach der Malaria die zweithäufigste parasitäre Erkrankung des Menschen weltweit. Die vorwiegend in den Tropen und Subtropen vorkommende Krankheit wird durch Infektionen mit Trematoden der Gattung *Schistosoma* verursacht, wobei die Spezies *Schistosoma mansoni* die höchste Prävalenz aufweist. Der genannte Erreger besitzt darüber hinaus zoonotische Bedeutung, da er neben dem Menschen auch Primaten und Nagetiere infizieren kann. Natürliche Infektionen von Rindern sind ebenso beschrieben [1-5].

Infektionen mit *S. mansoni* weisen einen überwiegend chronischen Verlauf auf. Während die in den Mesenterialvenen des Wirtes parasitierenden adulten Würmer kaum zur klinischen Symptomatik beitragen, führen schistosomale Eier, welche mit dem Blutstrom in verschiedene Organe abgeschwemmt werden, zu Granulombildungen und fibrotischen Veränderungen der betroffenen Gewebe. Trotz des permanenten und direkten Kontaktes zwischen parasitierenden Würmern und immunkompetenten Zellen sowie humoralen Abwehrmechanismen des Wirtes ist dessen Immunsystem nicht in der Lage, eine vollständige und dauerhafte Elimination der Wurmbürde zu erreichen. Infektionen mit Schistosomen können daher jahrzehntelang persistieren [6] - ein Phänomen, welches neben den immunpathologischen Gesichtspunkten dieser Erkrankung dazu beiträgt, dass dieser Parasit zentrales Forschungsobjekt vieler Immunbiologen ist.

Die molekulare Mimikry repräsentiert einen wesentlichen und weit verbreiteten Mechanismus zur Immunevasion von Pathogenen, welche durch Nachahmen wirtsähnlicher bzw. -identischer Strukturen versuchen, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen und somit den Status der Immuntoleranz zu erreichen [7]. In diesem Zusammenhang rückte die Erkenntnis, dass schistosomale Glykoproteine mit dem Lewis X-Trisaccharid ( $\text{Le}^X$ ;  $\text{Gal}(\beta 1-4)[\text{Fuc}(\alpha 1-3)]\text{GlcNAc}$ ; Gal, Galactose; Fuc, Fucose; GlcNAc, *N*-Acetylglucosamin) ein wirtsidentisches Kohlenhydrat-epitop exprimieren, Kohlenhydrate generell sowie  $\text{Le}^X$  im Speziellen in den Fokus immunbiologischer Forschungsansätze [8]. Mittlerweile belegen zahlreiche Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*, dass parasitäre Glykokonjugate das Immunsystem des Wirtes in vielfältiger Weise modulieren können, um somit optimale Bedingungen für eine chronische Persistenz des Parasiten zu schaffen [9, 10]. Diesbezüglich ermöglichten Studien der letzten Jahre die Identifikation beteiligter Rezeptoren sowie eine Ableitung definierter Struktur-Wirkungsbeziehungen immunmodulierender Moleküle.

Lipide rangierten lange Zeit abseits des allgemeinen Forschungsinteresses. Während beispielsweise Glykosphingolipide (GSL) primär als struktureller Bestandteil biologischer Membranen angesehen wurden, ist mittlerweile aus verschiedene Untersuchungen bekannt,

dass diese Substanzklasse neben zahlreichen physiologischen Funktionen [11] gleichermaßen immunmodulatorische Eigenschaften besitzt [12].

So ist beispielsweise aus *in vitro* Untersuchungen verschiedener Lebensstadien von *S. mansoni* bekannt, dass komplexe GSL aus adulten Würmern die Reifung dendritischer Zellen sowie eine gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine induzieren können. Eine Koinkubation der in dieser Weise aktivierten dendritischen Zellen mit naiven T-Zellen resultierte anschließend in der Ausprägung einer Th1-dominierten Immunantwort [13]. In entsprechenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Präsenz fucosylierter Kohlenhydratepitope strukturelle Voraussetzung für die Induktion der beschriebenen Vorgänge durch komplexe GSL war. Die Identifikation beteiligter Rezeptoren führte schließlich zu der Annahme, dass die Kohlenhydratepitope Le<sup>X</sup> und LDN-F (GalNAc(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc; GalNAc, *N*-Acetylgalactosamin) die biologische Aktivität dieser GSL vermittelten. Interessant war hierbei, dass komplexe GSL aus Cercarien, welche durch die vorherrschende Präsenz des Le<sup>X</sup>-Epitops charakterisiert sind [14], die genannten immunmodulatorischen Vorgänge in diesen Untersuchungen nicht induzieren konnten [13]. Diese Beobachtung führte daher zu der Annahme, dass stadienspezifische Unterschiede in der Ceramidstruktur entsprechender GSL entscheidend an der biologischen Aktivität bzw. Inaktivität von GSL beteiligt sind.

Während GSL aus Cercarien und Eiern bereits detailliert analysiert wurden [15], beschränken sich Informationen zu komplexen GSL aus adulten Würmern bislang überwiegend auf eine immunologisch-basierte Charakterisierung exprimierter Kohlenhydratepitope. Um jedoch definierte Struktur-Wirkungsbeziehungen entsprechender Komponenten ableiten zu können, sollten Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit einen möglichst detaillierten Einblick in die strukturelle Vielfalt von Kohlenhydrat-Komponenten sowie korrespondierenden Ceramidstrukturen von GSL aus adulten Würmern ermöglichen und darüber hinaus stadienspezifische Unterschiede zu Le<sup>X</sup>-tragenden GSL aus Cercarien aufdecken.

Nicht zuletzt ist eine detaillierte Strukturaufklärung der GSL aus adulten Würmern unverzichtbar für weitere funktionelle Untersuchungen hinsichtlich ihres Anwendungspotentials im therapeutischen Bereich sowie im Rahmen von Immunprophylaxe und Diagnostik der Schistosomiasis.

---

## 2 Literaturübersicht

Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die gegenwärtig aus der Literatur verfügbaren Informationen über biologische Eigenschaften von Erregern der Gattung *Schistosoma* sowie über Pathogenese, Diagnose und Therapie einer Infektion mit *S. mansoni*. Darüber hinaus sollen infektionsspezifische, immunologische Grundlagen erläutert und bislang beschriebene Glykokonjugate verschiedener Lebensstadien von *S. mansoni* aufgeführt werden, um anschließend deren immunmodulatorische Eigenschaften als Schnittpunkt beider Themenkomplexe darzustellen.

### 2.1 Die Schistosomiasis

Die klinische Manifestation einer Infektion mit Erregern der Gattung *Schistosoma* wird als Schistosomiasis bezeichnet. Im Gedenken an Theodor Bilharz, welcher 1851 erstmals die Präsenz dieser Gattung durch die Entdeckung von *S. haematobium* im Rahmen einer Sektion beweisen konnte, wird die Erkrankung heute auch noch weitverbreitet Bilharziose genannt [16]. Die Schistosomiasis ist durch eine ausgesprochen hohe Morbidität bei vergleichsweise geringer Mortalität gekennzeichnet: Mit über 200 Millionen infizierten Menschen repräsentiert die Erkrankung nach der Malaria die zweithäufigste parasitäre Erkrankung weltweit [16]. Nach Schätzungen aus dem Jahr 2006 leben näherungsweise 779 Millionen Menschen unter ständigem Infektionsrisiko [17]. Während die Schistosomiasis überwiegend durch einen chronischen Verlauf mit unspezifischer bzw. subklinischer Symptomatik gekennzeichnet ist, sterben jedes Jahr schätzungsweise 280000 Menschen allein in Afrika südlich der Sahara an einer Infektion mit Schistosomen [18].

#### 2.1.1 Erreger- und Wirtsspektrum

##### 2.1.1.1 Erreger-Taxonomie

Schistosomen sind im Blutgefäßsystem von Vertebraten parasitierende Würmer, welche im Tierreich taxonomisch dem Stamm der Plathelminthen (Plattwürmer) zugeordnet werden. Die Eingruppierung zur Unterklasse der Digenea in der Klasse der Trematoden (Saugwürmer) spiegelt bereits den im Rahmen ihrer Entwicklung vorkommenden Generationswechsel wider, welcher durch eine Abfolge von geschlechtlicher und ungeschlechtlicher Vermehrung bestimmt wird. Innerhalb der Digenea nehmen Schistosomen eine biologische Sonderstellung ein, da sie anders als die übrigen Mitglieder dieser Subklasse keine Zwitter, sondern getrenntgeschlechtlich sind. Hierbei konnte gezeigt werden, dass gepaarte Männchen und Weibchen oft jahrelang in stabiler Paarung bleiben - ein Phänomen, das zur Bezeichnung Pärchenegel geführt hat.

---

Die Familie der Schistosomatidae umfasst drei Subfamilien mit insgesamt 12 Gattungen. Insgesamt fünf dieser Gattungen sind als pathogen für Säugetiere beschrieben. Spezies, welche mit Infektionen des Menschen assoziiert sind, gehören ausschließlich zur Gattung *Schistosoma* [16, 19], die darüber hinaus gleichermaßen veterinärmedizinisch relevante Erreger umfasst.

#### 2.1.1.2 Humanmedizinisch relevante Schistosomen

Unter den verschiedenen Schistosomen-Spezies sind im Wesentlichen *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* und *S. mekongi* an Infektionen des Menschen beteiligt. Während *S. haematobium* Verursacher der urogenitalen Schistosomiasis ist, sind alle übrigen genannten Arten verantwortlich für die Manifestation einer intestinalen Schistosomiasis. Grundsätzlich kommen beim Menschen Infektionen mit veterinärmedizinisch relevanten Schistosomen-Spezies aufgrund ihrer geringen zoonotischen Bedeutung nur zu einem geringen Anteil vor [16]. Die in dieser Hinsicht besondere Stellung von *S. japonicum* wird unter 2.1.1.3 dargestellt.

#### 2.1.1.3 Veterinärmedizinisch relevante Schistosomen

Es sind mittlerweile 14 verschiedene Schistosomen-Arten beschrieben, welche Säugetiere infizieren können (für eine detaillierte Darstellung siehe [19]). Besondere Bedeutung kommt hierbei dem Erreger *S. japonicum* zu, der neben dem Menschen zahlreiche domestizierte und wilde Tiere infiziert, die somit ein wichtiges Reservoir für Neu- und Reinfektionen bilden [20]. Veterinärmedizinisch bedeutsame Schistosomen sind in erster Linie pathogen für Paarhufer und besitzen in endemischen Gebieten der Tropen- und Subtropen durch den Befall von Schafen, Ziegen und Rindern sozio-ökonomische Bedeutung. Hierbei sind im Wesentlichen die Spezies *S. bovis*, *S. matthei* und *S. curassoni* in Afrika sowie *S. spindale*, *S. indicum*, *S. nasale* und *S. japonicum* in Asien zu nennen, wobei Infektionen mit *S. bovis* bis in den Mittelmeerraum reichen [19, 21]. Mit Ausnahme von *S. nasale* verursachen Infektionen mit den genannten Erregern eine intestinale Schistosomiasis. Bereits 1995 spekulierten De Bont und Vercruysse basierend auf Untersuchungen zur Prävalenz der Schistosomiasis bei Schafen, dass sich die Anzahl infizierter Schafe weltweit auf mindestens 165 Millionen beziffert [21]. Ein Befall mit *S. margrebowiei* wird häufig bei Antilopen in Zentralafrika beobachtet [16].

Wasservögel infizierende Schistosomen sind je nach Art in Europa und Asien bzw. weltweit verbreitet. In den entsprechenden Regionen sind Cercarien der *Bilharziella*- oder *Trichobilharzia*-Arten besonders häufig an der Entstehung der sog. Badedermatits des Menschen beteiligt, welche eine entzündliche Reaktionen der Haut als Antwort auf die kutane

---

Penetration der infektiösen Larve darstellt [22].

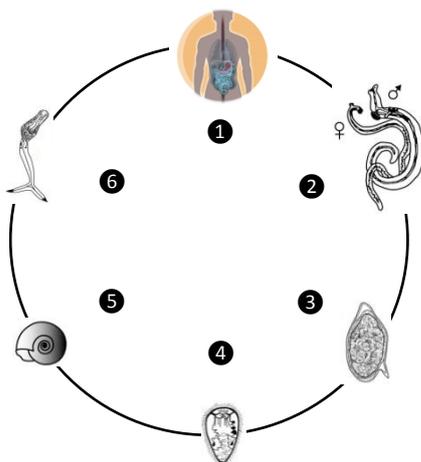
## 2.1.2 Geographische Verbreitung

Unter allen parasitierenden Schistosomen zeigen Erreger der Gattung *Schistosoma* die größte geographische Verbreitung. Sie kommen endemisch in insgesamt 77 Ländern vorwiegend in den Tropen und Subtropen vor, wobei nach von der WHO (*World Health Organization*) veröffentlichten Schätzungen 90% der schistosomen-infizierten Menschen in Afrika leben [1]. Unter den humanpathogenen Arten besitzt *S. mansoni* die höchste Prävalenz und kommt endemisch in 54 Ländern vor [2-4]. *S. haematobium* ist in Afrika und im mittleren Osten verbreitet, während *S. mansoni* darüber hinaus zusätzlich in den westlich gelegenen Gebieten Südamerikas weit verbreitet ist. Das Vorkommen von *S. intercalatum* ist auf die Regenwaldgebiete Zentralafrikas beschränkt. *S. japonicum* kommt endemisch in China, Indonesien und den Philippinen vor, während *S. mekongi* in Gebieten Kambodschas und Laos' verbreitet ist [1].

## 2.2 *Schistosoma mansoni*

### 2.2.1 Lebenszyklus und Entwicklung

Die Entwicklung des Parasiten erfolgt über mehrere Larvenstadien und schließt obligat einen mollusken Zwischenwirt der Gattung *Biomphalaria* sowie den Wechsel von geschlechtlicher und ungeschlechtlicher Vermehrung ein. Der komplexe Lebenszyklus ist in Abbildung 1 vereinfacht unter Angabe von Zwischen- und Endwirt sowie der wichtigsten Lebensstadien dargestellt.



**Abbildung 1** Lebenszyklus von *S. mansoni*

① Endwirt; ② gepaarte, adulte Würmer; ③ embryoniertes Ei; ④ Miracidium; ⑤ mollusker Zwischenwirt; ⑥ Cercarie. Die Abbildung berücksichtigt nicht die realen Größenverhältnisse (modifiziert nach einer Abbildung des *Center for Disease Control and Prevention* (CDC); ([http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/Schistosomiasis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/Schistosomiasis_il.htm))).

Die adulten Würmer parasitieren in den Mesenterialvenen ihres Wirtes, wo jedes gepaarte Weibchen pro Tag ca. 100-300 embryonierte Eier produziert. Die gelegten Eier gelangen

entweder nach Durchdringen der Darmwand in das Intestinallumen und werden anschließend mit den Fäzes freigesetzt, oder sie werden mit dem Blutstrom zur Pfortader transportiert und von dort im gesamten Körper verteilt. Die Entwicklungsdauer des ersten Larvenstadiums im Ei dauert ungefähr sechs bis 16 Tage. Exogene Reize veranlassen das vollständig entwickelte Miracidium (Wimpernlarve) zum Schlupf, sobald das mit den Fäzes freigesetzte Ei in Kontakt mit Süßwasser kommt. Das Miracidium lebt aphag, so dass die Lebensdauer dieser Larve auf zehn bis 24 Stunden beschränkt ist. Eine Süßwasserschnecke der Gattung *Biomphalaria* fungiert als mollusker Zwischenwirt, welcher durch kutane Penetration infiziert wird. Die weitere Entwicklung im Zwischenwirt schließt die ungeschlechtliche Vermehrung über Mutter- und Tochtorsporozysten ein. Nach einer Entwicklungszeit von vier bis fünf Wochen schlüpfen die für den Endwirt infektiösen Cercarien (Gabelschwanzlarven) perkutan, wobei Licht der wichtigste Stimulus zum Schlupf darstellt. Der Lebenszyklus des Parasiten wird durch die Infektion des Endwirtes beim Baden bzw. Trinken geschlossen. Hierbei durchdringen die Cercarien unter Verlust des Schwanzes die Haut, wobei sie ihre Glykokalix abstreifen und unter Umbildung des Teguments zu juvenilen Würmern, den Schistosomula, transformieren. Nach subkutaner Migration gelangen diese via venösem Kreislauf in Herz und Lunge und werden anschließend über den arteriellen Kreislauf in die intrahepatischen Verzweigungen der Pfortader transportiert. Nach Ausreifung zu adulten Würmern und erfolgter Paarung wandern die Würmer in die Mesenterialvenen, wo die Eiproduktion und -ablage beginnt [16, 22].

### 2.2.2 Krankheitsbild

Die Infektion des Menschen mit Cercarien führt in seltenen Fällen zur Ausprägung einer Dermatitis, welche mit Papel- und Erythembildung einhergehen kann. Häufiger wird die sog. Badedermatitis allerdings bei einer Infektion mit aviären Cercarien beobachtet (vgl. hierzu 2.1.1.3). Die vermehrt nach einer Erstinfektion auftretende akute Form der Schistosomiasis wird nach einer Inkubationszeit von drei bis sieben Wochen beobachtet. Der Patient zeigt hierbei unspezifische Symptome wie Fieber, Mattigkeit sowie Glieder- und Kopfschmerzen. Abdominale Beschwerden manifestieren sich häufig in Nausea und Anorexie sowie Vomitus und Diarrhoe. Die Beschwerden dauern im Mittel ungefähr acht Tage an, wobei vereinzelt bereits in dieser Periode schistosomale Eier in den Fäzes gefunden werden können. Die chronische Schistosomiasis geht nur bei schweren Infektionen mit einer ausgeprägten Symptomatik einher, während die Erkrankung in der überwiegenden Anzahl der Fälle nahezu symptomfrei verläuft. Während die in den Blutgefäßen parasitierenden adulten Würmer hierbei nicht ursächlich an der Ausprägung klinischer Symptome beteiligt sind, bestimmen überwiegend die in die verschiedenen Organe abgeschwemmten Eier das klinische Erscheinungsbild. Die im Gewebe lokalisierten Eier verursachen eine entzündliche Reaktion,

---

in deren Verlauf der Körper im Zuge einer Th2-dominierten Immunantwort Granulome bildet. Von diesen pathologischen Veränderungen ist die Leber besonders stark betroffen, wobei durch fibrotische Veränderungen des Leber- und Milzparenchyms eine Hepatosplenomegalie auftreten kann. Da sich Leberzellschädigungen überwiegend im kompensatorischen Bereich bewegen, verursachen die beschriebenen Leberveränderungen allerdings nur in seltenen Fällen eine klinische Symptomatik. Der entstehende portale Stau führt zu Ascites und begünstigt gleichzeitig die Ausbildung einer sekundären Splenomegalie. Darüber hinaus kann eine schwere Infektion mit *S. mansoni* in der chronischen Phase mit unspezifischen Dysenterie-Symptomen einer intestinalen Schistosomiasis einhergehen, welche sich in chronischem oder intermittierendem Durchfall, abdominalen Schmerzen sowie Anorexie und Gewichtsverlust äußern kann. Granulomatöse sowie fibrotische Veränderungen der Lunge, deren Entstehung durch wandernde Schistosomula sowie abgeschwemmte Eier verursacht wird, können mit pulmonalem Lungenhochdruck sowie der Entstehung eines Cor pulmonale und entsprechender klinischer Symptomatik einhergehen. Veränderungen der Nieren (schistosomale Nephropathie) sowie des Zentralnervensystems (neurologische Schistosomiasis) und damit assoziierte klinische Erscheinungen treten nur vereinzelt auf [16, 23].

### 2.2.3 Diagnose

Das einfachste und schnellste Verfahren zur Diagnose einer Infektion mit *S. mansoni* ist der direkte Nachweis schistosomaler Eier in den Fäzes, wobei die Eier von *S. mansoni* durch ihre charakteristische Form und den lateralen Stachel mikroskopisch leicht von Eiern der anderen humanpathogenen Spezies zu unterscheiden sind (vgl. hierzu Abbildung 1). Die Sensitivität dieser Methode korreliert direkt mit der Wurmbürde des infizierten Patienten und kann ggf. durch eine mehrmalige Probenentnahme an unterschiedlichen Tagen erhöht werden. Es muss jedoch damit gerechnet werden, dass dieses Verfahren bei geringer Wurmbürde falsch-negative Resultate liefert. In diesem Zusammenhang können Aufkonzentrierungsverfahren wie Sedimentation oder Filtration die Sensitivität des Diagnoseverfahrens erhöhen, sind jedoch nicht zum *high-throughput-screening* geeignet [24]. Im Gegensatz hierzu ermöglichen immunologische Diagnoseverfahren den Nachweis moderater Infektionen: ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-basierte Testverfahren, welche auf der Detektion der im Zuge der Serokonversion gebildeten Antikörper gegen Antigene der verschiedenen Lebensstadien basieren, besitzen eine hohe Sensitivität bei gleichzeitig guter Spezifität. Alternativ gelingt der Nachweis von Antikörpern gegen das zirkulierende, schistosomale Antigen CCA (*circulating cathodic antigen*) auch durch Immunfluoreszenz unter Verwendung von histologischen Schnitten adulter Würmer [25]. Da Antikörper gegen schistosomale Antigene allerdings noch lange nach einer kurativen Therapie im Serum nachweisbar sind, können die letztgenannten

---

Testverfahren nicht zwischen einer akuten und zurückliegenden Infektion unterscheiden und eignen sich somit nur bei Patienten, welche zuvor nicht gegen die Schistosomiasis behandelt worden sind. Im Gegensatz hierzu können ELISA-basierte Testverfahren, welche die schistosomalen, zirkulierenden Glykokonjugate CCA und CAA (*circulating anodic antigen*) (vgl. hierzu 2.3.2). im Serum und Urin infizierter Patienten detektieren, sowohl mit hoher Spezifität und Sensitivität eine akute Infektion nachweisen als auch den Erfolg einer kurativen Behandlung zeitlich verfolgen [26-28]. In diesem Zusammenhang haben van Dam und Mitarbeiter 2004 einen Schnelltest zum Nachweis von CCA im Urin in Form eines Teststreifens entwickelt, der die Diagnose einer Infektion mit Schistosomen unter Feldbedingungen ermöglicht [29]. Neben den hier geschilderten direkten Diagnoseverfahren erfordert eine Diagnosestellung *lege artis* darüber hinaus eine ausführliche Anamnese sowie die umfassende Berücksichtigung der klinischen Symptomatik (vgl. hierzu 2.2.2) und weiterer Befunde, auf die an dieser Stelle nicht detaillierter eingegangen werden soll.

#### 2.2.4 Therapie

Praziquantel ist gegenwärtig das Mittel der Wahl zur kurativen Behandlung einer Infektion mit Schistosomen. Der Wirkstoff ist beispielsweise in Form der Präparate Cestox<sup>®</sup> oder Cisticid<sup>®</sup> kommerziell erhältlich. In Brasilien kam lange Zeit zur Behandlung einer Infektion mit *S. mansoni* vorzugsweise Oxamniquin zum Einsatz. Daneben gibt es weitere schistosomizide Wirkstoffe, welche im Gegensatz zu den erstgenannten nicht in die Liste essentieller Medikamente der WHO aufgenommen wurden (für eine umfassende Beschreibung siehe [30]).

Praziquantel ist ein Isochinolin-Derivat, dessen primärer Wirkungsmechanismus noch weitgehend unbekannt ist. Aus Literaturangaben ist bekannt, dass der Wirkstoff Störungen der Kalzium-Permeabilität, metabolische Fehlregulationen sowie ausgeprägte Muskelkontraktionen verursacht und der Parasit schließlich aufgrund einer Schädigung seines Teguments abstirbt [31-33], wobei die Ablösung des Teguments durch Freilegen schistosomaler Antigene eine effiziente Immunantwort des Wirtes ermöglicht. In dieser Hinsicht konnte gezeigt werden, dass die humorale Immunantwort des Wirtes einen steigernden Effekt auf den Erfolg einer Behandlung mit Praziquantel ausübt [34, 35]. Eine einmalige perorale Behandlung, welche in der Regel die Gabe von zwei Dosen des Medikamentes über den Tag verteilt beinhaltet, erzielt bereits den gewünschten kurativen Effekt. Allerdings wird gerade bei moderaten Infektionen aufgrund des synergistischen Effekts von Immunsystem und Wirkstoff [36] empfohlen, die Behandlung nach zwei bis vier Wochen zu wiederholen [37].

Bislang besitzt Praziquantel eine ausreichend hohe Wirksamkeit gegen Helminthen der Gattung *Schistosoma*, allerdings mehren sich Literaturangaben, aus denen auf eine

---

beginnende Resistenzbildung geschlossen werden kann (für detailliertere Informationen siehe [38]). Daher wird gegenwärtig nach neuen schistosomiziden Wirkstoffen gesucht, welche sowohl Praziquantel-Analoga als auch andere Wirkstoffgruppen umfassen [39-43].

### 2.2.5 Prävention

Da eine Infektion mit *S. mansoni* nicht zur Ausbildung einer stabilen, sterilen Immunität führt, kommt der Prävention vor Infektion und Erkrankung bei der Kontrolle der Schistosomiasis eine zentrale Schlüsselrolle zu.

In diesem Zusammenhang werden die beschriebenen chemotherapeutischen Maßnahmen sowohl kurativ als auch präventiv eingesetzt. So verfolgt die WHO ein Konzept, nach welchem die Risikogruppen in endemischen Gebieten einer regelmäßigen Behandlung unterzogen werden [1]. Allerdings können präventive, chemotherapeutische Ansätze langfristig nur in Kombination mit verbesserten Hygienestandards sanitärer Einrichtungen sowie einer gezielten Information betroffener Bevölkerungsschichten über mögliche Infektionswege eine Reduktion des Infektionsrisikos gewährleisten [1, 44, 45]. Aufgrund der ausgeprägten Wirtsspezifität hinsichtlich des mollusken Zwischenwirtes gehört die Kontrolle dieser Schneckenarten ebenso zur Bekämpfungsstrategie der Schistosomiasis. Der Einsatz von Molluskiziden wurde in einigen Gebieten bereits erfolgreich durchgeführt [46].

Obwohl zahlreiche Studien sich bereits seit Jahrzehnten mit der Entwicklung einer Immunprophylaxe gegen die Schistosomiasis befassen, ist bislang keine Impfung verfügbar. Bereits in den 90er Jahren konnte in Feldversuchen eine Immunisierung von Rindern mit strahlungsattenuierten Cercarien von *S. bovis* einen partiellen Schutz vor der bovinen Schistosomiasis generieren. In gleicher Weise resultierte die Infektion von mit strahlungsattenuierten Schistosomula immunisierten Mäusen in einer signifikanten Reduktion der Wurmbürde [47]. Während gezeigt werden konnte, dass aufgereinigte bzw. rekombinante Proteine aus *S. mansoni* einen partiellen Schutz vor der Schistosomiasis im Tiermodell vermitteln [48], werden gleichfalls Glykane in Überlegungen zur Induktion einer protektiven Immunantwort einbezogen. Experimente mit Mäusen konnten zeigen, dass das Serum schistosomen-infizierter sowie teilweise immunisierter Tiere einen partiellen Schutz der passiv immunisierten Tiere vermitteln kann, und belegen somit die Bedeutung humoraler Abwehrmechanismen für die Ausbildung einer Resistenz [49, 50]. Obwohl bekannt ist, dass eine Infektion mit *S. mansoni* zur Bildung hoher Antikörpertiter gegen schistosomale Kohlenhydratepitope führt, wird deren protektiver Charakter in der Literatur sehr kontrovers diskutiert (vgl. hierzu 2.4.3.2). So konnte zwar gezeigt werden, dass ein monoklonaler Antikörper (mAk) gegen ein auf der Parasitenoberfläche lokalisiertes Kohlenhydratepitop *in vitro* zur komplementvermittelten Lyse von Schistosomula führt [51], allerdings sehen Eberl *et*

---

a/. die Funktion der hohen anti-Glykan-Antikörper vielmehr darin begründet, das Immunsystem des Wirtes von den noch immunogeneren Peptid-Epitopen des Parasiten abzulenken [52]. Gegenwärtig werden die verschiedensten Moleküle wie Rezeptoren, Ionenbindende Proteine und Enzyme in Versuchsansätzen zur Stimulierung einer effizienten, adaptiven Immunantwort erprobt. Während Schistosomula das empfindlichste Lebensstadium gegenüber den Effektorfunktionen des Immunsystems sind, bietet das widerstandsfähige Tegument adulter Würmer einen sehr effektiven Schutz vor den Angriffen des Wirtes. Daher werden mit den Tetraspaninen beispielsweise auch tegumentassoziierte Proteine in die Suche nach möglichen Vakzinekandidaten einbezogen [53]. Man darf zuversichtlich sein, dass die molekulare Erforschung des Parasiten auf den Gebieten der Transkriptomics, Genomics, Proteomics und Glycomics die Entwicklung einer wirkungsvollen Vakzine in greifbare Nähe rücken wird [54].

### 2.3 Glykokonjugate von *S. mansoni*

In zahlreichen Studien sind die Glykoproteine und Glykolipide der verschiedenen Lebensstadien von *S. mansoni* sowohl strukturell als auch immunologisch charakterisiert und lokalisiert worden. Die hierbei bislang beschriebenen Kohlenhydratepitope sind in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

Während LDN-basierte Kohlenhydratepitope vielfach Invertebraten-Strukturen repräsentieren, kommen LacNAc-basierte Epitope besonders häufig bei Glykokonjugaten aus Vertebraten vor. Aus der schematischen Übersicht in Tabelle 1 ist ersichtlich, dass fucosylierte sowie oligofucosylierte Epitope ein spezielles Merkmal schistosomaler Glykokonjugate darstellen. In diesem Zusammenhang konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass die Fucosylierung strukturelle Voraussetzung für immunogene sowie immunmodulatorische Eigenschaften der zugrundeliegenden Glykokonjugate ist [13, 55]. Bereits an dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die verschiedenen Lebensstadien von *S. mansoni* durch die Präsenz von Le<sup>X</sup>- und LDN-F-Epitopen wirtseigene Kohlenhydratepitope exprimieren (siehe auch 2.4.3), während pseudo-Le<sup>Y</sup>-tragende und oligofucosylierte Strukturen parasiten-spezifische Epitope repräsentieren.

Viele der in Tabelle 1 gezeigten Kohlenhydratepitope werden sowohl auf Glykoproteinen als auch Glykolipiden aus *S. mansoni* exprimiert [56]. Darüber hinaus zeigen sich deutliche Unterschiede in den stadienspezifischen Expressionmustern der einzelnen Strukturen, welche im Folgenden detailliert dargestellt werden sollen.

---

Kohlenhydratepitop	Struktur	Piktogramm
<i>N,N'</i> -Diacetyllactosediemin ( <u>LacDiNAc</u> , <u>LDN</u> )	GalNAc(β1-4)GlcNAc	
Fucosyliertes LDN ( <u>LDN-F</u> )	GalNAc(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc	
Terminal fucosyliertes LDN ( <u>F-LDN</u> )	Fuc(α1-3)GalNAc(β1-4)GlcNAc	
Fucosyliertes LDN-F ( <u>F-LDN-F</u> )	Fuc(α1-3)GalNAc(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc	
Difucosyliertes LDN ( <u>LDN-DF</u> )	GalNAc(β1-4)[Fuc(α1-2)Fuc(α1-3)]GlcNAc	
Terminal difucosyliertes LDN ( <u>DF-LDN</u> )	Fuc(α1-2)Fuc(α1-3)GalNAc(β1-4)GlcNAc	
Fucosyliertes LDN-DF ( <u>F-LDN-DF</u> )	Fuc(α1-3)GalNAc(β1-4) [Fuc(α1-2) Fuc(α1-3)]GlcNAc	
Fucosyliertes DF-LDN ( <u>DF-LDN-F</u> )	Fuc(α1-2)Fuc(α1-3)GalNAc(β1-4) [Fuc(α1-3)]GlcNAc	
Difucosyliertes LDN-DF ( <u>DF-LDN-DF</u> )	Fuc(α1-2)Fuc(α1-3)GalNAc(β1-4) [Fuc(α1-2)Fuc(α1-3)]GlcNAc	
<i>N</i> -Acetyllactosamin ( <u>LacNAc</u> , <u>LN</u> )	Gal(β1-4)GlcNAc	
Lewis X ( <u>Le<sup>X</sup></u> )	Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc	
Pseudo-Lewis Y ( <u>pseudo-Le<sup>Y</sup></u> )	Fuc(α1-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc	

**Tabelle 1** Wichtige Kohlenhydratepitope der Glykokonjugate von *S. mansoni*

Die im Rahmen dieser Arbeit benutzten Abkürzungen entsprechender Epitope sind unterstrichen. Die gezeigten Piktogramme wurden mittels GlycoWorkbench erstellt [57]. GlcNAc, *N*-Acetylglucosamin; Gal, Galactose; GalNAc, *N*-Acetylgalactosamin; Fuc, Fucose; Blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose.

### 2.3.1 Glykosphingolipide (GSL)

GSL sind Bestandteile von biologischen Membranen und kommen weit verbreitet im Tier- und Pflanzenreich vor. Sie sind vorzugsweise in den cholesterolreichen *lipid rafts* lokalisiert, wo sie vielfältige biologische Funktionen wie beispielsweise Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen

wahrnehmen. In der Literatur finden sich zahlreiche Beschreibungen für die Beteiligung membranständiger GSL an unterschiedlichsten zellulären Vorgängen, wie Signaltransduktionkaskaden, infektiösen Prozessen sowie der Tumorgenese [58-60].

GSL besitzen eine extrazellulär gerichtete, variable Kohlenhydrat-Komponente, welche über eine O-glykosidische Bindung an den lipophilen Ceramidanker gebunden ist. Der Ceramidanteil seinerseits besteht aus einer Sphingoidbase und einer über eine Säureamidgruppe gebundenen Fettsäure. Beide Ceramid-Bausteine repräsentieren aufgrund der unterschiedlichen Anzahl von Kohlenstoffatomen und Hydroxylgruppen sowie eines variierenden Sättigungsgrades hochvariable, lipophile Strukturen. Die sich hieraus in ihrer Gesamtheit ergebende große strukturelle Vielfalt von GSL liegt somit in der Heterogenität ihrer einzelnen Strukturbestandteile begründet und ist indikativ für die weitreichende Beeinflussung (patho-)physiologischer Prozesse durch diese Substanzklasse zu werten [11, 61].

Glucose (Glc)- und Galactose-basierte Ceramidmonohexoside (CMH) repräsentieren GSL, die in unterschiedlichen Mengenanteilen in Eiern, Cercarien und adulten Würmern von *S. mansoni* nachgewiesen wurden [62]. Hierbei handelt es sich um GSL-Spezies, welche ebenfalls von Säugetieren exprimiert werden [11]. Im Gegensatz zu den Säugetieren bildet der Parasit, wiederum in allen Lebensstadien, vorhandenes Ceramiddihexosid (CDH) ausschließlich durch Anhängen von *N*-Acetylgalactosamin an Glucosylceramid. Basierend auf dem Disaccharid GalNAc( $\beta$ 1-4)Glc werden alle weiteren komplexen GSL aufgebaut. Da die Präsenz einer solchen *core*-Struktur weder bei GSL aus Vertebraten noch Invertebraten bekannt ist, wird sie seit ihrer Erstbeschreibung durch Maaouf *et al.* als *schisto-core* bezeichnet [63]. Während komplexe GSL aus Cercarien durch die Epitope Le<sup>X</sup> und pseudo-Le<sup>Y</sup> dominiert werden [14], wird das Le<sup>X</sup>-Eptiop auf GSL aus Eiern von *S. mansoni* kaum exprimiert. Entsprechende Untersuchungen konnten zeigen, dass die Kohlenhydrat-Anteile dieser GSL vorwiegend aus einem oligofucosylierten *N*-Acetylhexosamin-Rückgrat bestehen, welches als charakteristisches Strukturmerkmal sich wiederholende Einheiten von -4[Fuc( $\alpha$ 1-2)Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc $\beta$ 1- aufzeigt [64]. Die strukturell charakterisierten Kohlenhydratepitope spiegeln im Wesentlichen variabel fucosylierte LDN-Motive wider, wobei gezeigt werden konnte, dass terminales, monofucosyliertes *N*-Acetylgalactosamin hierbei die vorherrschende antigene Determinante repräsentiert [65, 66]. Entsprechende, den Ei-GSL ähnliche Kohlenhydrat-Komponenten, wurden in GSL aus Cercarien nur in geringerem Anteil detektiert, und erlaubten somit keine detaillierte Analyse [14]. Die Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL aus adulten Würmern wurden bislang nicht strukturell charakterisiert. Entsprechende Literaturangaben lassen jedoch auf immunologischer Basis anhand der Bindung von mAb gegen verschiedene Kohlenhydratepitope auf die Präsenz von Le<sup>X</sup>, LDN, LDN-F, LDN-DF, F-LDN sowie F-LDN-F schließen [13, 67, 68]. Tabelle 2 gibt einen zusammenfassenden

---

Überblick über die zu Beginn dieser Dissertation beschriebenen Kohlenhydratstrukturen von GSL aus *S. mansoni*.

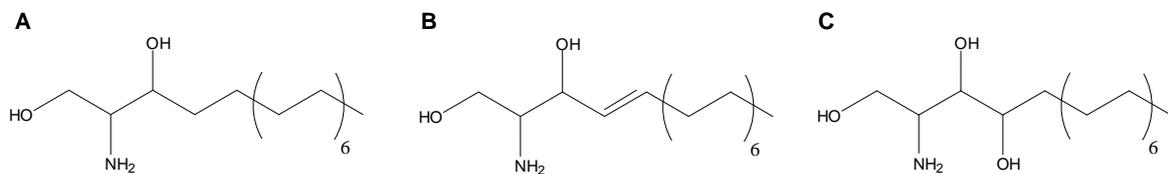
	Gal( $\beta$ 1-1)Cer	[a-c]
	Glc( $\beta$ 1-1)Cer	[a-c]
	GalNAc( $\beta$ 1-4)Glc( $\beta$ 1-1)Cer	[a-c]
	GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-4)Glc( $\beta$ 1-1)Cer	[a,b]
	Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-4)Glc( $\beta$ 1-1)Cer	[a]
	Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-4)Glc( $\beta$ 1-1)Cer   Fuc( $\alpha$ 1-3)	[a,b]
	Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-4)Glc( $\beta$ 1-1)Cer   Fuc( $\alpha$ 1-3)	[a]
	Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-4)Glc( $\beta$ 1-1)Cer         Fuc( $\alpha$ 1-3) Fuc( $\alpha$ 1-3)	[a]
	GalNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-4)Glc( $\beta$ 1-1)Cer         Fuc( $\alpha$ 1-3) Fuc( $\alpha$ 1-3)	[b]
	GalNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-4)Glc( $\beta$ 1-1)Cer         Fuc( $\alpha$ 1-3) Fuc( $\alpha$ 1-3)   Fuc( $\alpha$ 1-2)   Fuc( $\alpha$ 1-2)	[b]
	GalNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-4)Glc( $\beta$ 1-1)Cer               Fuc( $\alpha$ 1-3) Fuc( $\alpha$ 1-3) Fuc( $\alpha$ 1-3)               Fuc( $\alpha$ 1-2) Fuc( $\alpha$ 1-2) Fuc( $\alpha$ 1-2)	[b]

**Tabelle 2** Kohlenhydratstrukturen von GSL aus *S. mansoni*

Gezeigt sind die Glykanstrukturen von GSL aus Cercarien [a], Eiern [b] und adulten Würmern [c]. Das Le<sup>X</sup>-Epitop ist mit einem grauen, ovalen Kreis hinterlegt. Tabelle modifiziert nach [69]. Cer, Ceramid; Glc, Glucose; GlcNAc, *N*-Acetylglucosamin; Gal, Galactose; GalNAc, *N*-Acetylgalactosamin; Fuc, Fucose.

Neben der stadienspezifischen Expression von Kohlenhydratstrukturen weisen auch die Ceramid-Zusammensetzungen von CMH aus Eiern, Cercarien und adulten Würmern deutliche Unterschiede auf. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass CMH-Spezies aus Eiern von C18- und C20-Phytosphingosin dominiert werden, während entsprechende

Komponenten aus adulten Würmern zusätzlich C18-Sphingosin und C18-Sphinganin aufzeigen. Die CMH-Komponenten aus Cercarien werden vorwiegend durch C18-Sphinganin sowie C18- bis C20-Phytosphingosin repräsentiert. In allen drei Lebensstadien wurde hydroxylierte Palmitinsäure als Hauptfettsäure nachgewiesen [62]. Interessanterweise konnte in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass komplexe GSL aus Cercarien nicht mehr hydroxylierte Palmitinsäure als Hauptfettsäure enthalten, sondern vorwiegend von langkettigen Fettsäuren mit 24 bis 27 Kohlenstoffatomen dominiert werden. Die bislang bei GSL aus *S. mansoni* nachgewiesenen Klassen von Sphingoidbasen sind in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2** Klassen von Sphingoidbasen der GSL aus *S. mansoni*

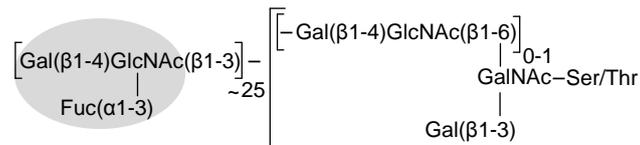
Schematische Darstellung der Strukturmerkmale von Sphinganinen (**A**), Sphingosinen (**B**) und Phytosphingosinen (**C**). Es ist exemplarisch jeweils nur die entsprechende Sphingoidbase mit 18 Kohlenstoffatomen dargestellt.

### 2.3.2 Glykoproteine

Die Glykosylierung ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikation von Proteinen, wobei je nach Lokalisation der Kohlenhydrat-Komponente N- und O-Glykane voneinander zu unterscheiden sind: Während bei N-Glykanen die Bindung des Oligosaccharids über die Amidgruppe eines Asparagins erfolgt, wird die O-Glykosylierung durch Bindung des Oligosaccharids an die Hydroxylgruppe eines Serin (Ser)- oder Threonin (Thr)-Restes bewerkstelligt. Bislang konnten bereits zahlreiche N- und O-Glykanstrukturen der verschiedenen Lebensstadien von *S. mansoni* aufgeklärt werden. Aus Gründen der Vollständigkeit soll im Rahmen dieser Dissertationsschrift auf besondere Merkmale schistosomaler Glykoproteine eingegangen werden, während im Hinblick auf stadienspezifische Details sowie Strukturbeispiele auf Referenz [69] verwiesen wird.

Grundsätzlich kommen bei Glykoproteinen aus *S. mansoni* mit LacNAc, Le<sup>x</sup>, LDN sowie variabel fucosylierten LDN-Motiven die gleichen Kohlenhydrat-epitope vor, wie sie bereits bei den GSL einzelner Lebensstadien gefunden wurden (vgl. 2.3.1). Darüber hinaus sind oligofucosylierte Seitenketten beispielsweise in Form der repetitiven Einheit +/-Fuc(α1-2)Fuc(α1[-3)GalNAc(β1-4)[+/-Fuc(α1-2)Fuc(α1-2)Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1-3)Gal(α1-)]<sub>n</sub> bei O-Glykanen aus Cercarien beschrieben [70]. Während schistosomale O-Glykane grundsätzlich auf *core 1* (Gal(β1-3)GalNAc-Ser/Thr) und *core 2* (Gal(β1-3)[GlcNAc(β1-6)]GalNAc-Ser/Thr) Strukturen

aufgebaut sind, konnte darüber hinaus bei Cercarien eine bislang bei Säugetieren nicht beschriebene *core*-Struktur mit O-glykosidisch gebundenem N-Acetylgalactosamin und (β1-3)- sowie (β1-6)-verknüpfter Galactose charakterisiert werden [71]. Die zirkulierenden Glykokonjugate CAA und CCA, welche von adulten Würmern in den Blutkreislauf des Wirtes sekretiert werden, besitzen ebenfalls O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide, wobei die Präsenz von polymerem Le<sup>X</sup> (polyLe<sup>X</sup>) als vorherrschende strukturelle Komponente von CCA beschrieben worden ist (Abbildung 3) [72].



**Abbildung 3** Kohlenhydratstruktur des zirkulierenden Glykokonjugates CCA

Struktur der O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydrat-Komponente von CCA (*circulating cathodic antigen*). Fucosylierungen an den N-Acetylglucosamin-Bausteinen der poly-LacNAc-Kette in Position 3 resultiert in der Bildung des Le<sup>X</sup>-Epitopes, welches mit einem grauen, ovalen Kreis hinterlegt ist. Abbildung modifiziert nach [69]. Ser, Serin; Thr, Threonin; GlcNAc, N-Acetylglucosamin; Gal, Galactose; GalNAc, N-Acetylgalactosamin; Fuc, Fucose.

Die verschiedenen Lebensstadien von *S. mansoni* exprimieren oligomannosidische und komplexe N-Glykane sowie N-Glykane vom Hybrid-Typ. Entgegen den Glykoproteinen aus Säugetieren kann die *core*-Struktur schistosomaler N-Glykane durch eine (α1-3) bzw. (α1-6) Fucosylierung [73] sowie eine (β1-2) Xylosylierung [74] modifiziert sein. Antennen können aus repetitiven LacNAc- bzw. LDN-basierten Einheiten bestehen bzw. die entsprechenden fucosylierten Epitope Le<sup>X</sup> und LDN-F aufweisen, wobei multimere Le<sup>X</sup>-Strukturen aus bis zu 10 monomeren Einheiten in N-Glykanen aus adulten Würmern beschrieben wurden [8, 75, 76]. Aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften sind die Kohlenhydratstrukturen der pufferlöslichen Ei-Antigene (*soluble egg antigen* - SEA) besonders detailliert strukturell analysiert worden, wobei Omega-1, IPSE (*interleukin-4-inducing principle from S. mansoni eggs*)/Alpha-1 und Kappa-5 zu den vorherrschenden immunogenen Ei-Antigenen zählen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Omega-1 zwei jeweils diantennäre N-Glykane besitzt, welche überwiegend eine Difucosylierung des innersten N-Acetylglucosamins aufzeigen und Le<sup>X</sup> als terminales Motiv exprimieren [77]. Während IPSE/Alpha-1 ein hierzu annähernd identisches Glykosylierungsmuster aufweist [78] konnten entsprechende Untersuchungen mit Kappa-5 zeigen, dass dieses über vier besetzte Glykosylierungsstellen verfügt, welche überwiegend triantennäre N-Glykanstrukturen mit difucosylierter und xylosylierter *core*-Struktur sowie terminalen LDN-Motiven aufweisen [79].

## 2.4 Immunmodulatorische Eigenschaften der Glykokonjugate von *S. mansoni*

Die Fähigkeit von *S. mansoni*, jahrzehntelang im Blutgefäßsystem seines Wirtes überleben zu können [6], macht diesen Parasiten zu einem der interessantesten Forschungsobjekte vieler Immunbiologen. In diesem Zusammenhang konnte in vielen Untersuchungen gezeigt werden, dass vor allem schistosomale Glykokonjugate sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunität in vielfältiger Weise beeinflussen können.

### 2.4.1 Immunologie der Schistosomiasis

Die frühe Phase einer Infektion mit *S. mansoni* wird von einer Th1-dominierten Immunantwort begleitet, die sechs bis acht Wochen *p.i.*, d.h. zum Zeitpunkt der Eiablage, in eine Th2-basierte Reaktion übergeht. Die Einleitung dieser zweiten Phase der Immunreaktion ist vornehmlich als Reaktion des Wirtes auf die Eiablage und sekretierte Eiprodukte zu werten und geht mit Granulombildung sowie fibrotischer Veränderung entsprechender Organe einher [80]. Durch die simultane Induktion regulatorischer T-Zellen sowie die verstärkte Sekretion von Interleukin (IL)-10 bildet sich eine modifizierte, regulatorische Th2-basierte Immunantwort aus, welche die chronische Persistenz des Parasiten ermöglicht [81]. An dieser Stelle sei jedoch darauf hingewiesen, dass der Wirtsorganismus gleichfalls von der sich einstellenden Immunitätslage profitiert, welche ihn vor massivem Gewebsschaden durch eine vorherrschende inflammatorische Antwort bewahrt.

Zahlreiche Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* haben sich mit den wechselseitigen Interaktionen der verschiedenen Lebensstadien von *S. mansoni* sowie den von ihnen exkretierten/sekretierten (ES-) Produkten mit dem wirtseigenen Immunsystem befasst. Bereits die infektiöse Larve kann die Migration von antigenpräsentierenden Zellen inhibieren und darüber hinaus die Immunantwort des Wirtes supprimieren [82]. Während hierbei gegenwärtig die Beteiligung schistosomaler Glykokonjugate diskutiert, aber noch nicht belegt wurde, konnten immunmodulierende Glykoproteine von Eiern bereits detailliert strukturell sowie funktionell charakterisiert werden (vgl. hierzu 2.4.3.2) [77-79, 83, 84].

Da dendritische Zellen maßgeblich an der Induktion einer adaptiven Immunantwort beteiligt sind, stehen sie und die von ihnen exprimierten Rezeptoren im Mittelpunkt vieler *in vitro* Experimente zur Charakterisierung der immunmodulatorischen Eigenschaften endogener und exogener Antigene und sollen daher im Folgenden ausführlicher dargestellt werden.

### 2.4.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (*dendritic cells* - DC) entwickeln sich aus Stammzellen des Knochenmarks. Mit dem Blut werden entsprechende Vorläuferzellen im ganzen Körper verteilt, so dass

---

sich unreife dendritische Zellen in nahezu allen Geweben finden lassen [85]. Die zentrale Aufgabe dendritischer Zellen besteht in der Antigenaufnahme und -prozessierung, um diese naiven T-Zellen via MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I und II Molekülen zu präsentieren und somit die Induktion einer adaptiven Immunantwort zu ermöglichen [86]. Nach heutigem Kenntnisstand zählt die erstmals 1973 von Steinman und Cohn beschriebene Zellpopulation [87] zu den potentesten antigenpräsentierenden Zellen und repräsentiert somit ein zentrales Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunität. Darüber hinaus sind DC maßgeblich für die Erhaltung der peripheren Selbsttoleranz verantwortlich, indem sie durch Aufnahme, Prozessierung und Präsentation endogener Antigene die Differenzierung und Proliferation von T-Zellen mit regulatorischen Funktionen induzieren [88]. Zur Erfüllung dieser vielfältigen Funktionen sind DC mit spezifischen pathogenerkennenden Rezeptoren (*pathogen recognition receptor* - PRR) ausgestattet, von denen im Folgenden *Toll-like* Rezeptoren (*toll-like receptor* - TLR) sowie DC-SIGN (*dendritic cell-specific, ICAM (intercellular adhesion molecule)-3-grabbing nonintegrin*) aus der Familie der C-Typ-Lektin Rezeptoren (*C-type lectin receptor* - CLR) detaillierter dargestellt werden sollen. Obwohl die molekularen Grundlagen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, konnte mittlerweile im Rahmen vieler Untersuchungen bestätigt werden, dass erst die Ausstattung verschiedener Subpopulationen dendritischer Zellen mit einem unterschiedlichen Repertoire an Rezeptoren deren antigenspezifische Reaktion ermöglicht, welche basierend auf einem *cross talk* der einzelnen rezeptorspezifischen Signaltransduktionskaskaden final über Erhaltung der peripheren Toleranz oder Induktion einer Immunantwort entscheidet [89, 90].

#### 2.4.2.1 DC-SIGN

DC-SIGN, welches gleichfalls als CD (*cluster of determination*) 209 bekannt ist, repräsentiert ein Typ II Transmembranprotein, dessen extrazellulär gelegene Kohlenhydrat-Bindedomäne Oligosaccharide in Gegenwart von Kalziumionen bindet. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass DC-SIGN eine Spezifität für mannosylierte Glykokonjugate sowie Fucose-tragende Lewis-Blutgruppenantigene besitzt [91, 92]. Unter physiologischen Bedingungen ist DC-SIGN durch Oligomerisierung zur Bildung tetramerer Strukturen befähigt, welche zur Spezifität und Affinität des Rezeptors für verschiedene Liganden beiträgt [93].

Aufgrund seiner Fähigkeiten sowohl endogene als auch pathogenassoziierte Glykokonjugate erkennen und binden zu können, besitzt DC-SIGN vielfältige physiologische Funktionen. Über Bindung der endogenen Liganden ICAM-2 auf Endothelzellen und ICAM-3 auf T-Zellen besitzt der Rezeptor Bedeutung als Adhäsionsmolekül bei der Migration dendritischer Zellen sowie ihrer Interaktion mit T-Zellen [94, 95]. Darüber hinaus ist DC-SIGN verantwortlich für die Bindung und Internalisierung von Antigenen, um diese durch deren Transport zu Lysosomen

---

sowie späten MHC II-positiven Endosomen einer MHC-vermittelten Präsentation gegenüber naiven T-Zellen zugänglich zu machen [96, 97]. Neben dieser Funktion als endozytotischer Rezeptor konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass DC-SIGN zudem eigenständig Signaltransduktionsprozesse in Gang setzen kann und durch *cross talk* mit TLR-induzierten Signalkaskaden somit entscheidend an der Ausprägung der induzierten Immunantwort beteiligt ist. In zahlreichen Untersuchungen wurde belegt, dass die Aktivierung von DC-SIGN überwiegend an der Induktion einer antiinflammatorischen sowie suppressiven Immunantwort beteiligt ist [98-100]. Die Tatsache, dass der Rezeptor nicht in der Lage ist, endogene von pathogenassoziierten Liganden unterscheiden zu können, verdeutlicht sowohl seine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz [101] als auch seine Bedeutung als potentieller Angriffspunkt von Pathogenen, um die wirtsinduzierte Immunantwort zielgerichtet modulieren zu können [102]. Bislang gibt es eine Reihe von unterschiedlichsten Pathogenen wie Viren, Bakterien, Hefen und Parasiten, für die eine Bindung an DC-SIGN beschrieben worden ist (vgl. hierzu [102]).

#### 2.4.2.2 Toll-like Rezeptoren

Das Immunsystem bedient sich bei der Erkennung von Pathogenen unter anderem der selektiven Erkennung sog. pathogenassoziiertes, molekularer Muster. Aufgrund ihrer Fähigkeit, diese hochkonservierten Strukturmerkmale selektiv erkennen und von endogenen Strukturen differenzieren zu können, repräsentiert die Familie der TLR das wichtigste Werkzeug des angeborenen Immunsystems der Säugetiere zur Erkennung eindringender Pathogene [103-105]. Die TLR sind Homo- sowie Heterodimer-bildende Typ I Transmembranproteine, welche unter anderem von dendritischen Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert werden. Nach heutigem Kenntnisstand umfasst die TLR-Familie im Menschen insgesamt 10 verschiedene Rezeptoren, die sich in ihrer Bindungsspezifität stark unterscheiden. Einer der am intensivsten erforschten und charakterisierten Rezeptoren ist TLR4, der auf die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS) aus gramnegativen Bakterien spezialisiert ist [106, 107]. Hierbei führt eine Bindung des Liganden zur Sekretion proinflammatorischer Cytokine, welche neben der Makrophagen- und Neutrophilenrekrutierung sowie -aktivierung die DC-vermittelte Induktion einer Th1-basierten Immunantwort einleiten.

Eine selektive Aktivierung von TLR führt im Wesentlichen über die MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene (88)*)-abhängige Signalkaskade vorzugsweise zur Ausbildung einer Th1-dominierten Immunantwort, so dass lange davon ausgegangen wurde, dass TLR vorzugsweise über eine MyD88-unabhängige Signalkaskade die Ausprägung einer Th2-basierten Immunantwort favorisieren [108]. In zahlreichen Studien der letzten Jahre

---

konnte jedoch gezeigt werden, dass vielmehr komplexe Wechselwirkungen zwischen den einzelnen PRR die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischer Immunantwort maßgeblich bestimmen. In dieser Hinsicht finden sich in der Literatur zahlreiche Studien, welche sich mit dem *cross talk* zwischen DC-SIGN und TLR beschäftigen. So konnte beispielsweise in Untersuchungen zur TLR-induzierten Immunantwort durch verschiedene *Helicobacter pylori* Varianten gezeigt werden, dass Varianten, welche Le<sup>X</sup> auf LPS exprimieren, über Interaktion des Kohlenhydratepitopes mit DC-SIGN eine Th2-dominierte Immunantwort induzieren. Im Gegensatz hierzu lösten Varianten, welche nicht DC-SIGN bindendes LPS ohne Le<sup>X</sup> exprimierten, eine dominante Th1-basierte Immunantwort aus [109]. Die Zellwand-Komponente ManLAM (*mannose-capped lipoarabinomannan*) von Mykobakterien interagiert neben dem Mannoserezeptor ebenfalls mit DC-SIGN und induziert so die Produktion von antiinflammatorischem IL-10 durch LPS-aktivierte DC [98]. Im Gegensatz hierzu konnte gezeigt werden, dass LPS von *Neisseria meningitidis* Varianten durch Bindung von DC-SIGN die Ausprägung einer Th1-dominierten Immunantwort einleiten [110].

### 2.4.3 Das Le<sup>X</sup>-Epitop

Das Le<sup>X</sup>-Epitop repräsentiert eine Kohlenhydratstruktur, die sowohl auf Glykokonjugaten des Wirtes als auch auf schistosomalen Glykoproteinen und Glykolipiden vorkommt. Seit geraumer Zeit befindet sich daher dieses Epitop aufgrund seiner Beteiligung an Immunevasions- und -modulationsvorgängen durch *S. mansoni* *in vitro* und *in vivo* im Fokus der glykobiologischen Forschung [9, 111, 112].

#### 2.4.3.1 Vorkommen und Funktion

Das Le<sup>X</sup>-Epitop (CD 15) der Säugetiere gehört zur Gruppe der stadienspezifischen, embryonalen Antigene (*stage-specific embryonic antigens* - SSEA) und wird daher auch als SSEA-1 bezeichnet. Es wird als Kohlenhydratepitop von Glykoproteinen und -lipiden exprimiert und spielt vor allem während der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums sowie in verschiedenen Reifungs- und Differenzierungsvorgängen [113]. In der postembryonalen Phase wird das Le<sup>X</sup>-Epitop auf vielen Epithelien, neuronalen Geweben sowie Granulozyten exprimiert. Neben der Funktion als Zelladhäsionsmolekül [114, 115] zählt Le<sup>X</sup> infolge einer gesteigerter Expression bei Tumoren epithelialen Ursprungs gleichfalls zu den tumorassoziierten Kohlenhydratepitopen [116].

Bereits vor mehr als zwanzig Jahren konnte das Le<sup>X</sup>-Epitop auf serologischer Basis in den verschiedenen Lebensstadien von *S. mansoni* lokalisiert und als struktureller Bestandteil schistosomaler Glykoproteine identifiziert werden [8, 117] und wird seither mit dem Begriff der molekularen Mimikry in Verbindung gebracht. Hierbei handelt es sich ganz allgemein um einen Mechanismus zur Immunevasion von Pathogenen, welcher auf der starken strukturellen

---

Ähnlichkeit zu bzw. Identität mit wirtseigenen Molekülen beruht und seit langer Zeit als eine der zentralen Überlebensstrategien von *S. mansoni* betrachtet wird [7]. Die biologische Bedeutung, welche diese Kohlenhydratstruktur für den Parasiten besitzt, wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass sie in Glykokonjugaten aller Lebensstadien exprimiert wird. Während monomeres Le<sup>X</sup> bei Cercarien immunhistochemisch nur im Bereich der Acetabular-Drüsen sowie an dem von diesen Drüsen sezernierten Material lokalisiert werden kann, wird es nach der Transformation zu den Schistosomula auf der gesamten Oberfläche exponiert [117-119]. Adulte Würmer exprimieren Le<sup>X</sup>-tragende Glykokonjugate ebenfalls auf der gesamten Oberfläche sowie im Darmepithel, während es bei schistosomalen Eiern im Bereich der Eischale nachweisbar ist [117, 118, 120].

Während die Expression schistosomaler Kohlenhydrat epitope wie LDN und LDN-F auch bei anderen Helminthen beschrieben wurde, ist bislang das Vorkommen des Le<sup>X</sup>-Epitops auf parasitären Glykokonjugaten nur bei *S. mansoni* und *Dictyocaulus viviparus* bekannt [121].

#### 2.4.3.2 Immunmodulatorische Eigenschaften

In der Literatur finden sich zahlreiche Untersuchungen zur immunmodulierenden Wirkung Le<sup>X</sup>-tragender Glykokonjugate. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Glykokonjugate, welche als Kohlenhydratanteil Lacto-*N*-Fucopentaose III (LNFP III) tragen, welche ihrerseits das Le<sup>X</sup>-Trisaccharid aufweist, die Ausbildung einer Th2-basierten Immunantwort in Mäusen induzieren [122, 123]. Darüber hinaus ist aus weiteren Untersuchungen mit LNFP III-konjugiertem, humanem Serumalbumin bekannt, dass dieses Glykokonjugat *in vitro* die Freisetzung von IL-10 aus B-Zellen der Milz schistosomen-infizierter Mäuse [124] sowie aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes schistosomen-infizierter Patienten induzieren kann [125].

Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Glykoproteinen aus schistosomalen Eiern zeigten, dass Omega-1 die Induktion eines Th2-Profiles *in vitro* und *in vivo* induziert [126, 127]. Die strukturelle Charakterisierung von Omega-1 belegte die vorherrschende Präsenz des Le<sup>X</sup>-Epitops, so dass auf eine wesentliche Beteiligung dieser Struktur an den beschriebenen immunmodulatorischen Vorgängen geschlossen werden konnte [77]. In dieser Hinsicht bleibt allerdings zu berücksichtigen, dass IPSE/Alpha-1, welches ebenfalls ein Glykoprotein aus Eiern von *S. mansoni* repräsentiert und ein dem Omega-1 nahezu identisches Glykosylierungsmuster aufweist [78], die genannten Th2-induzierenden Vorgänge nicht auslösen kann [126]. Hingegen konnte in *in vivo* Experimenten mit Mäusen gezeigt werden, dass IPSE/Alpha-1 durch Induktion einer verstärkten Makrophagenaktivität zur Ausbildung größerer Granulome in der Leber führt [128]. Diese Tatsache verdeutlicht, dass immunmodulierende Eigenschaften von Glykoproteinen nicht ausschließlich von der vorherr-

---

schenden Kohlenhydrat-Komponente bestimmt werden, sondern darüber hinaus auch unter dem Einfluss der zugrunde liegenden Proteinstruktur stehen.

Neben den immunmodulatorischen Eigenschaften Le<sup>X</sup>-tragender Glykokonjugate von *S. mansoni* stehen ähnliche Betrachtungen ebenfalls bei anderen Pathogenen im Blickfeld des Interesses. So zeitigt beispielsweise die Fähigkeit von *H. pylori* zur Dekoration seines LPS mit Lewis-Antigenen nicht nur immunmodulierende Funktionen im Hinblick auf eine T-Zell-Polarisierung (vgl. hierzu 2.4.2.2), sondern wird auch mit einer verbesserten Kolonialisierung und mit der Adhäsion an endogenes Galectin-3 in Verbindung gebracht [129].

Neben den genannten immunmodulatorischen Eigenschaften Le<sup>X</sup>-exprimierender Glykokonjugate soll an dieser Stelle gleichfalls auf die Bedeutung der gegen dieses Kohlenhydratepitop gebildeten Antikörper näher eingegangen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit *S. mansoni* zur Bildung von anti-Le<sup>X</sup> Antikörpern führt [130, 131] und diese darüber hinaus eine zytotoxische Wirkung auf Le<sup>X</sup>-exprimierende Wirtszellen *in vitro* ausüben [72, 130]. Unklar bleibt, welche Wirkung von infektionsspezifischen, autoreaktiven anti-Le<sup>X</sup> Antikörpern im Rahmen einer natürlichen Infektion vermittelt wird. In der Literatur ist zwar beschrieben, dass hohe anti-Le<sup>X</sup>-Antikörpertiter mit der Schwere der sich einstellenden Neutropenie korreliert sind [132], darüber hinaus scheinen allerdings weitere Komplikationen infolge der generell schlechten Erreichbarkeit endogener Le<sup>X</sup>-tragender Strukturen für autoreaktive Antikörper in Gehirn, Niere und Verdauungstrakt eher unwahrscheinlich zu sein [117]. Vielmehr gehen Ko *et al.* davon aus, dass die Präsenz dieser Autoantikörper durch Ausbildung einer infektionsgebundenen Immunität maßgeblich am Schutz vor Reinfektionen beteiligt ist. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Bindung von anti-Le<sup>X</sup>-Antikörpern durch juvenile Schistosomula eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität *in vitro* vermittelt [117]. Darüber hinaus repräsentieren Antikörper gegen das Le<sup>X</sup>-Epitop den größten Anteil der gebildeten anti-Glykan-Antikörper, wenn man Mäuse mit Cercarien immunisiert, die zuvor durch Bestrahlung attenuiert worden waren [131].

#### 2.4.4 Immunmodulatorische Eigenschaften von (Glykosphingo-) Lipiden

Bereits seit langer Zeit stehen die in SEA enthaltenen Glykoproteine aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften hinsichtlich einer starken Induktion einer Th2-basierten Immunantwort im Zentrum der Glykobiologie-Forschung. In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Experimenten sowohl in murinen als auch humanen Modellen sowie durch detaillierte strukturelle Analyse einzelner Komponenten konnten diesbezüglich definierte Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgezeigt werden [77-79, 83, 84, 128, 133] (vgl. hierzu 2.4.3). Daneben rücken zunehmend allerdings auch lipophile Bestandteile von Pathogenen bezüglich ihrer Interaktionen mit dem Immunsystem des Wirtes sowie ihrer immunmodulierenden

---

Eigenschaften in das Blickfeld des Interesses [12]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Strukturen humaner GSL von pathogenen *Neisseria* und *Haemophilus* spp. sowie *H. pylori* nachgeahmt werden, um die Immunantwort zu unterlaufen und eine Adhäsion sowie Invasion humaner Zellen zu ermöglichen [134, 135].

Im Hinblick auf parasitäre Strukturen wurde beschrieben, dass Phosphorylcholin (PC)-enthaltene GSL aus *Ascaris suum* die Sekretion von IL-1, IL-6 sowie Tumornekrose-Faktor (TNF)- $\alpha$  in Monozyten induzieren können [136]. Während diese Effekte die Präsenz von PC auf den GSL voraussetzten, konnte in weiteren Untersuchungen die signifikante Reduktion der durch anti-Maus-Ig-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment-induzierten Proliferation von B-Zellen aus der Milz von BALB/c Mäusen durch GSL aus *A. suum* als PC-unabhängiger Effekt beobachtet werden [137].

*In vitro* Experimente mit Lipiden aus *S. mansoni* zeigten, dass schistosomales Lyso-Phosphatidylserin eine TLR2-vermittelte Reifung dendritischer Zellen sowie die Differenzierung IL-10-produzierender T-Zellen induziert, während schistosomales Phosphatidylserin ursächlich an der TLR2-unabhängigen Ausbildung einer Th2-basierten Immunantwort beteiligt ist [138]. Darüber hinaus ist beschrieben, dass GSL aus Eiern die Zytokinsekretion von Monozyten *in vitro* stimulieren [139]. Hierbei konnte festgestellt werden, dass vor allem das Kohlenhydrat-epitop LDN-DF ursächlich an der Sekretion von IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  beteiligt ist, während GSL aus adulten Würmern die genannten Effekte nicht erzielten. Weitere Untersuchungen belegten, dass komplexe GSL aus Eiern vorwiegend über das F-LDN-F-Epitop von L-SIGN (*liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*) gebunden werden [140]. Da dieser Rezeptor auf Endothelzellen der Lebersinusoiden exprimiert wird, liegt eine Beteiligung der GSL aus Eiern an den infektionsbedingten, immunbiologischen sowie leberpathologischen Vorgängen nahe.

Versuchen mit GSL aus adulten Würmern zeigten, dass diese von DC-SIGN auf unreifen dendritischen Zellen gebunden werden und deren TLR4-vermittelte Reifung induzieren. Im Verlauf der Reifung wurde gleichzeitig eine gesteigerte Zytokinproduktion von IL-12 p40, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 sowie TNF- $\alpha$  gemessen, so dass die Kokultivierung entsprechend gereifter dendritischer Zellen mit naiven T-Zellen in der Entwicklung einer Th1-dominierten, proinflammatorischen Immunantwort resultierte [13]. Experimente auf immunologischer Basis erlaubten unter Berücksichtigung der identifizierten Rezeptoren den Rückschluss, dass die DC-SIGN-bindenden Kohlenhydrat-epitope Le<sup>x</sup> und LDN-F auf komplexen GSL aus adulten Würmern sehr wahrscheinlich die strukturelle Voraussetzung für deren immunmodulierende Eigenschaften lieferten. Bemerkenswert war hierbei, dass GSL aus Cercarien, welche ebenfalls aufgrund der vorherrschenden Präsenz von Le<sup>x</sup> von DC-SIGN gebunden werden, die genannten biologischen Effekte nicht erzielen konnten. Ob allerdings GSL aus adulten

---

Würmern *in vivo* im Rahmen einer natürlichen Infektion zur initialen Entwicklung einer Th1-basierten Immunantwort beitragen, muss unbeantwortet bleiben. Da die Th2-dominierte Immunantwort durch das Eistadium des Parasiten induziert wird und bei Infektionen mit strahlungsattenuierten oder eingeschlechtlichen Cercarien, in deren weiterer Verlauf keine Eiproduktion und -ablage stattfindet, der Wechsel zur Th2-basierten Immunantwort ausbleibt [84], scheint es möglich, dass Glykokonjugate adulter Würmer für die Ausprägung einer Th1-basierten, initialen Immunantwort *in vivo* zumindest mitverantwortlich sein können.

Die genannten Beispiele belegen, dass Glykolipide ebenso wie Glykoproteine in definierten Struktur-Wirkungsbeziehungen mit dem Immunsystem interagieren können. Deren weitere funktionelle Charakterisierung sowie die Etablierung von Interaktionsmodellen auf Basis definierter Wechselwirkungen erfordert daher die detaillierte Strukturanalyse der entsprechenden Komponenten.

---

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Chemikalien

Soweit es nicht anders angegeben ist, wurden die verwendeten Chemikalien von Chem-Lab (Zedelgem, Belgien), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Fluka (Buchs, Schweiz) und Promochem (Wesel) jeweils in *p.a.*-Qualität bezogen. Helium und Stickstoff (Reinheitsgrad jeweils 4.6) stammten von Linde (Höllriegelskreuth). Das verwendete Wasser wurde mittels einer Elix UV5 Anlage deionisiert und anschließend durch eine Milli-Q Synthesis A10 Anlage (beide Millipore, Eschborn) analytisch rein aufbereitet.

### 3.2 Neo-Glykokonjugate

Lewis<sup>X</sup>-Polyacrylamid (Le<sup>X</sup>-PAA) und Glucitol-Polyacrylamid (Glucitol-PAA) wurden als Positiv- bzw. Negativkontrolle für den DC-SIGN-Bindungsassay (3.6.2) jeweils in einer Konzentration von 1 mg/mL von Prof. Dr. Irma van Die (Universität Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurde Lacto-*N*-Fucopentaose III (LNFP III) gebunden an 1,2-*sn*-Dipalmitoylphosphatidylethanolamin als Le<sup>X</sup>-tragender Neo-Glykolipid-Standard (40 ng/μL in Chloroform:Methanol:Wasser (C:M:W) 10:10:1 (v/v/v)) in der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (3.4.3) verwendet [141].

### 3.3 Biologische Materialien

#### 3.3.1 Glykokonjugate verschiedener Stadien von *S. mansoni*

Ausgangsmaterial für die GSL-Charakterisierung adulter Schistosomen war ein Rohextrakt, welcher aus 73.5 mg lyophilisierten Adultwürmern hergestellt wurde. Es handelt sich hierbei um die vereinigten Überstände einer vierphasigen Extraktion homogenisierten Materials mit Lösungsmittelgemischen unterschiedlicher Polarität [13]. Der strukturellen Charakterisierung der Ceramid-Zusammensetzung von GSL aus Cercarien diente eine bereits aufgereinigte und über Normalphasenchromatographie fraktionierte Glykolipid-Aufarbeitung (vgl. hierzu 3.4.4). Der Rohextrakt adulter Würmer sowie die GSL-Fractionen aus Cercarien wurden von Dr. Sandra Meyer (Biochemisches Institut/AG Geyer, Universität Gießen) hergestellt. Cercarien als auch adulte Würmer waren von dem puertoricanischen Schistosomen-Stamm [118]. Ein Phosphatpuffer-Extrakt von *S. mansoni* Eiern (SEA) wurde von Dr. Michael J. Doenhoff (School of Biology, Nottingham, UK) zur Verfügung gestellt [142].

#### 3.3.2 Antikörper und Antikörperkonstrukte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper (mAk) wurden von Prof. Dr. André M. Deelder und Prof. Dr. Cornelis H. Hokke (Universität Leiden, Niederlande) zur

---

Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um sowohl einfach konzentrierte als auch zehnfach aufkonzentrierte Zellkulturüberstände verschiedener Hybridomazelllinien [27, 143, 144]. Dr. Quentin Bickle (School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK) stellte eine Hybridomazelllinie bereit, die den mAk M2D3H produziert [145]. Für die durchgeführten Experimente wurde der zehnfach aufkonzentrierte Zellkulturüberstand verwendet. Tabelle 3 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die verwendeten monoklonalen Antikörper und deren Spezifität. Des Weiteren stellte Prof. Dr. Irma van Die das DC-SIGN-Fc Konstrukt (0,8 mg/mL) bereit [146]. Zur Visualisierung von Antigen-Antikörper-Bindungen im ELISA wurden HRP-konjugierte Zweit-Antikörper (goat-anti-mouse und rabbit-anti-human IgG spezifisch für die Gamma-Kette) von Dako (Glostrup, Dänemark) verwendet.

mAk	Spezifität	Referenz
273-3E7-A ( $\alpha$ -Le <sup>X</sup> )	Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc	[118]
259-2A1 ( $\alpha$ -LDN)	GalNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc	[118]
291-3E9-A ( $\alpha$ -LDN-F)	GalNAc( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc	Persönliche Information von Prof. Dr. C. H. Hokke
114-5B1-A ( $\alpha$ -LDN-DF)	GalNAc( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-2)Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc	[118]
M2D3H ( $\alpha$ -F-LDN / $\alpha$ -F-LDN-F)	Fuc( $\alpha$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc / Fuc( $\alpha$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc	[66]

**Tabelle 3** Verwendete monoklonale Antikörper und deren Spezifität

Für eine Übersicht zu den Abkürzungen der einzelnen Kohlenhydratepitope vgl. Tabelle 1. GlcNAc, N-Acetylglucosamin; Gal, Galactose; GalNAc, N-Acetylgalactosamin; Fuc, Fucose.

### 3.3.3 Enzyme

Zur strukturellen Charakterisierung des Kohlenhydrat- und Ceramidanteils nativer GSL wurden diese mit folgenden Enzymen hydrolysiert: Rekombinante Endoglycoceramidase II (rEGC II) aus *Rhodococcus* sp. (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) und Sphingolipid-Ceramid-N-Deacylase (SCDase) aus *Pseudomonas* sp. (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

## 3.4 Reinigung und Aufarbeitung von GSL

Der Lipid-Rohextrakt adulter Würmer wurde zur weiteren Analytik aufgearbeitet, um enthaltene Phospholipide und Salze zu entfernen.

### 3.4.1 Verseifung des Rohextrakts

Der Rohextrakt wurde zu Beginn der Aufarbeitung einer Verseifung unterzogen, um die bei der Lipidextraktion ebenfalls extrahierten Phospholipide zu spalten. Zu diesem Zweck wurde der Rohextrakt im Rotationsverdampfer (Rotavapor® RE-111 von Büchi Labortechnik, Essen) getrocknet und in 13 mL Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von 1,44 mL 1 M Natriummethanolat (in Methanol) wurde der Ansatz kurz im Ultraschallbad (Sonorex von Bandelin, Berlin) behandelt und anschließend für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Messung des pH-Wertes sowohl eine Stunde nach Beginn als auch am Ende der Verseifung, der zu beiden Zeitpunkten im basischen Bereich liegen soll, erbrachte in beiden Fällen einen Wert von 12. Im Anschluss an die Wärmeinkubation wurde der Ansatz mit 96%iger Essigsäure auf pH 5-7 eingestellt und im Rotationsverdampfer getrocknet.

### 3.4.2 Umkehrphasenchromatographie

Zur Entsalzung wurden die Glykolipide im Anschluss an die Verseifung einer Umkehrphasenchromatographie (*reversed-phase* (RP) *chromatography*) auf einer C18-Kartusche unterzogen. Hierbei erfolgt die Adsorption der Glykolipide an das Kartuschenmaterial über deren hydrophoben Lipidteil, während Salze und weitere polare Verunreinigungen nicht binden können. Die getrockneten Lipide wurden zu diesem Zweck in 5,1 mL *theoretical upper phase* (TUP; C:M:W 3:98:74 (v/v/v), mit W = 0,1 M Kaliumchlorid (KCl)) aufgenommen und zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde der Ansatz weitere zehn Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert (Labofuge I von Heraeus, Hanau) und der Überstand auf eine 100 mg C18-Kartusche (Chromabond® von Macherey-Nagel, Düren) gegeben, welche vor Probenauftrag wie folgt gewaschen und äquilibriert wurde: 10 Säulenvolumina (SV) Methanol - 10 SV C:M 2:1 (v/v) - 10 SV Methanol - 10 SV C:M 2:1 (v/v) - 10 SV Methanol - 5 SV TUP. Der Probendurchlauf wurde erneut auf die Kartusche aufgegeben und die gebundenen Lipide anschließend mit 10 SV Wasser gewaschen. Die Elution der gebundenen Lipide erfolgte in zwei Schritten mit 5 SV Methanol (Eluat 1) und 10 SV C:M 1:1 (v/v) (Eluat 2). Jeweils 1% von Eluat 2, Waschwasser (WW) und zweitem Probendurchlauf sowie 0,5% von Eluat 1 wurden einer HPLC-basierten Monosaccharid-Analyse (3.5) unterzogen.

### 3.4.3 Hochleistungsdünnschichtchromatographie

Die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (*high-performance thin layer chromatography* (HPTLC)) diente nach Verseifung der Phospholipide (3.4.1) und anschließender Reinigung der GSL über RP-Chromatographie (3.4.2) der ersten Qualitätskontrolle der GSL-Aufarbeitung. Basierend auf der Adsorption des hydrophilen Kohlenhydratanteils von GSL an die mit

---

Silikagel beschichtete HPTLC-Platte können diese entsprechend der Größe ihrer Kohlenhydrat-Komponenten voneinander getrennt werden [147].

Hierzu wurden jeweils 1% des Probendurchlaufs, des WW und beider Eluate der RP-Chromatographie unter Stickstoffstrom getrocknet, in 20  $\mu\text{L}$  C:M:W 10:10:1 (v/v/v) aufgenommen und kurz im Ultraschallbad behandelt. Der Probenauftrag auf die HPTLC-Platte (Kieselgel 60 von Merck) mittels Mikroliterspritze (von Hamilton, Graubünden, Schweiz) erfolgte auf zuvor mit weichem Bleistift markierten, 3 mm breiten Spuren. Der Abstand der einzelnen Spuren zueinander betrug 5 mm, die Abstände von den seitlichen Rändern und dem unteren Rand jeweils 1,5 cm. Nach Trocknung der Proben unter einem warmen Luftstrom erfolgte die Entwicklung der Platte mit C:M:W 50:40:10 ((v/v/v), mit W = 33,5 mM KCl) in einem automatischen Entwicklungsgerät (DC-MAT-F von Laborgeräte Baron, Reichenau). Als Standards wurden jeweils 5  $\mu\text{L}$  Qualmix (Matreya Inc., Pleasant Gap, PA, USA) und Le<sup>X</sup>-tragendes Neo-Glykolipid eingesetzt. Im Anschluss an die Entwicklung wurde die Platte unter einem warmen Luftstrom getrocknet und die chromatographisch getrennten GSL chemisch detektiert [148].

Durch Inkubation der HPTLC-Platte in einer Iodkammer lassen sich Lipide aufgrund der reversiblen Anlagerung von Iod an Doppelbindungen nachweisen (Detektionsgrenze 1  $\mu\text{g}$ ). Die Inkubation erfolgte für 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Die sich einstellende Gelbfärbung konnte anschließend unter einem Luftstrom wieder entfernt werden und die Platte zum chemischen Nachweis von Kohlenhydraten weiterverwendet werden.

Hierzu wurde die Platte vollständig mit Derivatisierungsreagenz (0,2 g Orcinol in 100 mL 2 M Schwefelsäure) besprüht und bis zur sich einstellenden violetten Färbung im Ofen bei 110°C inkubiert (Detektionsgrenze 200 ng). Die Platte wurde anschließend zur photographischen Dokumentation gescannt und bei -20°C gelagert.

#### 3.4.4 Normalphasenchromatographie

Die entsalzten Glykolipide wurden mittels Normalphasenchromatographie (*normal-phase* (NP) *chromatography*) auf einer Silika-Kartusche (Sep-Pak<sup>®</sup> von Waters, Eschborn) fraktioniert, um die Heterogenität der in der Probe vorhandenen Glykolipid-Spezies für Folge-Analysen zu verringern. Die im Wesentlichen über ihre Kohlenhydrat-Komponente an die Kartusche adsorbierten GSL werden hierbei mit Gemischen organischer Lösungsmittel aufsteigender Polarität vom NP-Material eluiert, so dass die sich ergebende Trennung überwiegend auf der Größe der entsprechenden Kohlenhydrat-Komponenten beruht. Hierzu wurden die unter Stickstoff getrockneten GSL in 1 mL Chloroform aufgenommen, fünf Minuten im Ultraschallbad behandelt und anschließend auf eine zuvor mit 5 mL Chloroform äquilibrierte 500 mg Silika-Kartusche aufgetragen. Nachdem der Probendurchlauf erneut auf die Kartusche aufge-

---

tragen wurde, erfolgte die Elution der gebundenen GSL schrittweise mit jeweils 5 mL der folgenden Lösungsmittelgemische: C:M 90:10 (v/v) - C:M 80:20 (v/v) - C:M 70:30 (v/v) - C:M 60:40 (v/v) - C:M 40:60 (v/v) - C:M:W 60:35:8 (v/v/v) - C:M:W 30:60:8 (v/v/v) und C:M:W 10:70:20 (v/v/v). Jeweils 1% der entsprechenden Fraktionen und 5% des zweiten Proben-durchlaufs wurden einer HPLC-basierten Monosaccharid-Analyse (3.5) unterzogen.

Abweichend von der hier beschriebenen Fraktionierung der GSL aus adulten Würmern erfolgte die Elution von GSL aus Cercarien mit folgenden Lösungsmittelgemischen: C:M 90:10 (v/v) - C:M 80:20 (v/v) - C:M 70:30 (v/v) - C:M 65:35 (v/v) - C:M 60:40 (v/v) - C:M 55:45 (v/v) - C:M 50:50 (v/v) - C:M 40:60 (v/v) - C:M:W 65:25:4 (v/v/v) - C:M:W 60:35:8 (v/v/v) - C:M:W 30:60:8 (v/v/v) und C:M:W 10:70:20 (v/v/v).

### 3.5 HPLC-basierte Monosaccharid-Analyse

Die sowohl quantitative als auch qualitative Bestimmung der in einer Probe enthaltenen Monosaccharid-Bausteine basiert auf einer HPLC (*high-performance liquid chromatography*)-gestützten Trennung ihrer fluoreszierenden Anthranilsäure-Derivate [149]. Ein Aliquot der entsprechenden Probe wurde hierzu unter Stickstoffstrom getrocknet, mit 200  $\mu$ L 4 N Trifluor-essigsäure (TFA) versetzt, kurz im Ultraschallbad behandelt und zur vollständigen Hydrolyse der enthaltenen Kohlenhydrate für vier Stunden bei 100°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend im Vakuumkonzentrator (SpeedVac® Jouan RC 10.22 von Thermo Scientific, Bellefonte, PA, USA) getrocknet und in 10  $\mu$ L 0,6%iger Natriumacetat (NaAc)-Lösung (w/v) aufgenommen. Die reduktive Aminierung der freigesetzten Monosaccharide mit Anthranilsäure erfolgte durch Zugabe von 50  $\mu$ L Derivatisierungsreagenz (6 mg/mL Anthranilsäure und 20 mg/mL Natriumcyanoborhydrid in methanolischer Lösung mit 2,4% NaAc (w/v) und 2,0% Borsäure (w/v)) und anschließende Inkubation des Reaktionsansatzes für 45 Minuten bei 80°C. Nach beendeter Inkubation wurden die Ansätze mit Laufmittel A (vgl. hierzu Tabelle 4) auf 200  $\mu$ L aufgefüllt und gemischt. Die Trennung der Anthranilsäure-Derivate erfolgte mittels RP-HPLC (Säule: LiCroCart® 250-4, Superspher® 100 RP-18e, Merck, Darmstadt) bei einer Säulentemperatur von 40°C unter unten dargestelltem Stufen-Gradienten (Tabelle 4, Abbildung 4). Das Injektionsvolumen betrug 20  $\mu$ L und der Fluss 1 mL/min. Die anschließende fluoreszenzphotometrische Detektion erfolgte bei  $\lambda=425$  nm mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda=360$  nm.

Ein externer Standard (Stammlösung jeweils 1 mg/mL *N*-Acetylglucosamin, *N*-Acetylgalactosamin, Galactose, Mannose, Glucose, Xylose und Fucose) diente sowohl der qualitativen als auch quantitativen Bestimmung der analysierten Monosaccharid-Bausteine über Retentionszeiten-Vergleich bzw. über Erstellung einer Kalibriergeraden anhand der integrierten Peakflächen. Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgte auf Grundlage von drei

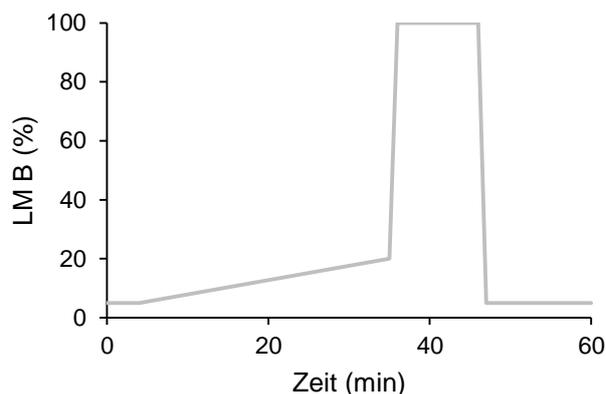
---

bis vier Verdünnungen der Stammlösung, deren Konzentrationen je nach erwartetem Kohlenhydratgehalt der analysierten Probe jeweils zwischen 2,5 und 30,0 ng Monosaccharid/Peak eingestellt wurden. Zur Kontrolle der vollständigen Hydrolyse der analysierten Kohlenhydrate zu Monosaccharid-Bausteinen wurde Blutgruppen A-Trisaccharid eingesetzt, welches aus *N*-Acetylgalactosamin, Galactose und Fucose in äquimolarem Verhältnis besteht.

Zeit [min]	LM A [%]	LM B [%]
0	95	5
4	95	5
35	80	20
36	0	100
46	0	100
47	95	5
60	95	5

**Tabelle 4** Gradient zur HPLC-basierten Monosaccharid-Analyse

LM A (Laufmittel A): 0,1% Butylamin,  
0,5% Phosphorsäure,  
1,0% Tetrahydrofuran in Wasser (v/v/v)  
LM B (Laufmittel B): LM A:Acetonitril (ACN) 1:1 (v/v)



**Abbildung 4** Gradient zur HPLC-basierten Monosaccharid-Analyse

### 3.6 *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

#### 3.6.1 ELISA mit mAk gegen Kohlenhydratepitope

Zur immunbasierten Charakterisierung der Kohlenhydratepitope von GSL adulter Würmer wurden die fraktionierten GSL im ELISA bezüglich ihrer Interaktion mit verschiedenen mAk (vgl. Tabelle 3) untersucht. Hierzu wurden 96 *well*-Platten (Polysorb<sup>®</sup> von Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit jeweils 30 ng GSL der einzelnen Fraktionen pro *well* beschichtet, indem die getrockneten GSL in 50 µL *n*-Propanol aufgenommen, kurz im Ultraschallbad behandelt und die Platten anschließend nach Befüllen der *wells* bei 37°C im Wärmeschrank bis zur vollständigen Verdampfung des Lösungsmittels inkubiert wurden. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit TBS (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM Natriumchlorid (NaCl), 2% bovines Serumalbumin (BSA) (w/v)) für 16 Stunden bei 4°C. Die Platten wurden zweimal mit TTBS-10 (TBS:Wasser 1:1 (v/v) + 0,05% Tween<sup>®</sup>20 (v/v)) gewaschen und mit den mAk für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Hierzu wurden die entsprechenden Zellkulturüberstände in TTBS-10B (TTBS-10 + 0,25% BSA (w/v)) 1:1000 (für M2D3H) bzw. 1:500 verdünnt. Nach beendeter Inkubation wurden die Platten fünfmal mit

TTBS-10 gewaschen und mit HRP-konjugiertem *goat-anti-mouse* Antikörper (Verdünnung 1:2000 in TTBS-10B) für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nachdem die Platten fünfmal mit TTBS-10 gewaschen wurden, erfolgte zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Bindungen eine Inkubation mit 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB) bei RT. Die HRP-vermittelte enzymatische Umsetzung von TMB zu einem blauen Farbstoff wurde je nach Intensität des Farbumschlags, spätestens jedoch nach 30 Minuten durch Zugabe von 0,5 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Messung der Extinktion an einem ELISA Reader (BioTek, Bad Friedrichshall) erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda=450$  nm.

Die ELISA Experimente der einzelnen Fraktionen erfolgten jeweils als Doppelbestimmung. Um unspezifische Bindungen des eingesetzten Zweit-Antikörpers auszuschließen, wurden die GSL anstelle von Erst-Antikörper parallel mit TTBS-10B inkubiert. Diese Negativkontrolle erfolgte ebenfalls als Doppelbestimmung. SEA (200 ng pro Well in 50 mM Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )) diente in allen ELISAs als Positivkontrolle.

### 3.6.2 ELISA mit DC-SIGN-Fc Konstrukt

Die fraktionierten GSL von adulten Würmern wurden im ELISA über die Bindung durch ein DC-SIGN-Fc Konstrukt hinsichtlich ihrer DC-SIGN-Bindungseigenschaften charakterisiert. Hierzu wurde eine 96 *well*-Platte (Polysorb<sup>®</sup>) mit jeweils 30 ng GSL der einzelnen Fraktionen pro *well* beschichtet, indem die getrockneten GSL in 50  $\mu\text{L}$  Ethanol aufgenommen, kurz im Ultraschallbad behandelt und die Platte nach Befüllen der *wells* für eine Stunde bei 37°C inkubiert wurde. Nachdem die Platte viermal mit TST (TSM + 0,1% Tween<sup>®</sup>20 (v/v); TSM: 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM Kalziumchlorid, 2 mM Magnesiumchlorid) gewaschen wurde, erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit TSB (TSM + 1% BSA (w/v)) für 30 Minuten bei 37°C. Die Platte wurde anschließend mit TST gewaschen und mit DC-SIGN-Fc Konstrukt (Verdünnung 1:100 in TSB) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurde die Platte viermal mit TST gewaschen und mit HRP-konjugiertem *rabbit-anti-human* IgG Antikörper (Verdünnung 1:6000 in TST) für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Nachdem die Platte viermal mit TST gewaschen wurde, erfolgte zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Bindungen eine Inkubation mit TMB bei RT. Die HRP-vermittelte enzymatische Umsetzung von TMB zu einem blauen Farbstoff wurde je nach Intensität des Farbumschlags, spätestens jedoch nach 30 Minuten durch Zugabe von 0,5 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda=450$  nm.

Der DC-SIGN-Bindungsassay wurde jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt. Um unspezifische Bindungen des eingesetzten Zwei-Antikörpers auszuschließen, wurden die GSL anstelle von DC-SIGN-Fc Konstrukt parallel mit TSB inkubiert. Diese Negativkontrolle erfolgte

---

ebenfalls als Doppelbestimmung. Le<sup>X</sup>-PAA und Glucitol-PAA (jeweils 200 ng pro Well in 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) dienen als Positiv- bzw. Negativkontrolle für eine Bindung durch das DC-SIGN-Fc Konstrukt.

## 3.7 Enzymatischer Verdau nativer GSL

### 3.7.1 Verdau mit rEGC II

Der enzymatische Verdau nativer GSL mit rEGC II führt über Spaltung der O-glykosidischen Bindung zwischen Kohlenhydrat- und Ceramidteil zur Freisetzung der nativen Oligosaccharide.

Zu diesem Zweck wurden 1,25 µg GSL unter Stickstoffstrom getrocknet, in 100 µL Verdau-puffer (50 mM NaAc, pH 5,5 + 0,1% Natriumtaurodeoxycholat (TDC) (w/v)) aufgenommen, kurz im Ultraschallbad behandelt und nach Zugabe von 20 mU rEGC II für insgesamt 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden dem Ansatz weitere 20 mU und nach 48 Stunden weitere 15 mU rEGC II zugegeben. Nach der anschließenden Zugabe von 400 µL Wasser erfolgte die Trennung der freigesetzten Oligosaccharide von nicht umgesetzten GSL und freigesetzten Ceramiden mittels RP-Chromatographie.

Hierzu wurde eine 100 mg C18-Kartusche mit jeweils 10 SV der folgenden Lösungsmittel (-gemische) gewaschen und äquilibriert: Methanol - Wasser - 0,1% TFA - 0,1% TFA:ACN 80:20 (v/v) - 0,1% TFA:ACN 60:40 (v/v) - 0,1% TFA:ACN 40:60 (v/v) und Wasser. Die Probe wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 mL aufgefüllt und auf die vorbereitete Kartusche gegeben. Der Probendurchlauf wurde erneut aufgetragen, die Kartusche anschließend mit 10 SV 0,1% TFA gewaschen und das WW mit dem zweiten Probendurchlauf vereinigt. Die in diesem Pool enthaltenen Oligosaccharide wurden in der SpeedVac<sup>®</sup> getrocknet. Die an der C18-Kartusche gebundenen lipophilen Komponenten wurden mit jeweils 5 SV an 0,1% TFA:ACN 80:20 (v/v) - 0,1% TFA:ACN 60:40 (v/v) und 0,1% TFA:ACN 40:60 (v/v) eluiert. Zur anschließenden Entsalzung der getrockneten Oligosaccharide mittels PGC (*porous graphitic carbon*)-Kartusche (Thermo Scientific) wurden diese in 500 µL Wasser aufgenommen und auf eine wie folgt gewaschene und äquilibrierte 1 mg Kartusche aufgegeben: 5 SV Wasser - 5 SV 0,1% TFA:ACN 80:20 (v/v) - 5 SV 0,1% TFA:ACN 20:80 (v/v) und 5 mL Wasser. Nach erneuter Aufgabe des Probendurchlaufs und Waschen der gebundene Oligosaccharide mit 1 mL Wasser erfolgte deren Elution in drei Schritten mit jeweils 500 µL der folgenden Lösungsmittelgemische: ACN:Wasser 25:75 (v/v) - ACN:0,1% TFA 25:75 (v/v) - ACN:Wasser 40:60 (v/v). Das Gesamteluat wurde in der SpeedVac<sup>®</sup> getrocknet und jeweils 5% des zweiten Probendurchlaufs und des WW einer HPLC-basierten Monosaccharid-Analyse (3.5) unterzogen.

### 3.7.2 Verdau mit SCDase

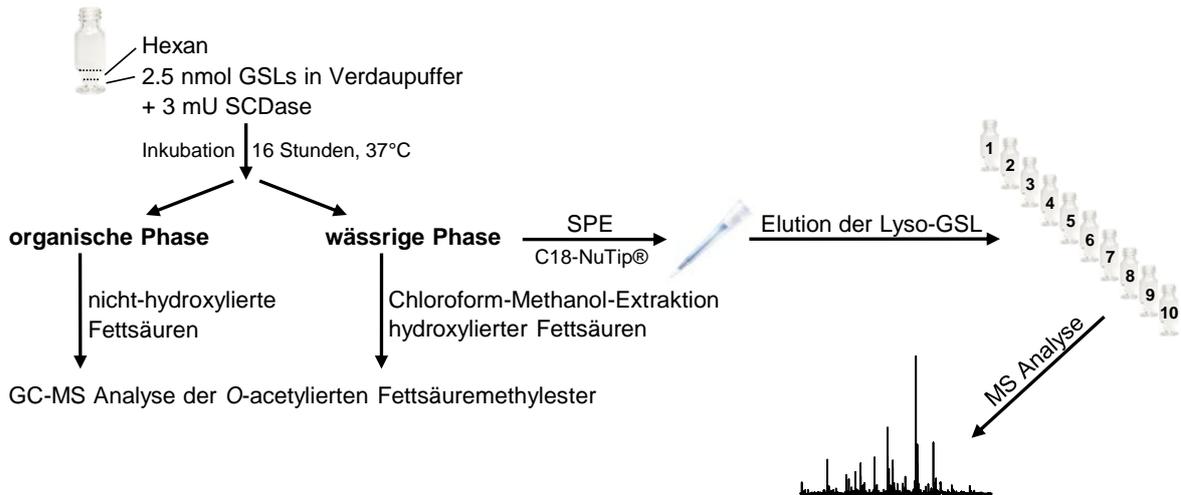
Der enzymatische Verdau nativer GSL mit SCDase führt über Spaltung der Säureamidbindung zwischen Fettsäure und Sphingoidbase zur Freisetzung der gebundenen Fettsäure und Bildung der entsprechenden Lyso-Glykosphingolipide (Lyso-GSL) [150, 151]. Hierzu wurde eine modifizierte Methode des enzymatischen Verdaus im biphasischen System von Kurita *et al.* [152] und Li *et al.* [153] eingesetzt, deren schematischer Ablauf in Abbildung 5 zusammenfassend dargestellt ist.

2,5 nmol GSL wurden unter Stickstoffstrom getrocknet, in 10  $\mu$ L Verdaupuffer (50 mM NaAc pH 6,0 + 0,8% TDC (w/v)) aufgenommen, kurz im Ultraschallbad behandelt und mit 3 mU SCDase versetzt. Nach Überschichten des Reaktionsansatzes mit 100  $\mu$ L n-Hexan wurde der Verdau für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die organische Phase vorsichtig abpipettiert und der Fettsäureanalytik (3.9 und 3.10.3) unterzogen. Nach Auffüllen der wässrigen Phase mit detergensfreiem Verdaupuffer auf ein Volumen von 20  $\mu$ L erfolgte die Isolierung und Reinigung der enthaltenen Lyso-GSL mittels RP-Chromatographie an C18-NuTips<sup>®</sup> (Sunchrom GmbH, Friedrichsdorf).

Hierzu wurden die NuTips<sup>®</sup> mit Lösungsmittel A (LM A; ACN:Wasser 1:9 (v/v)) und Lösungsmittel B (LM B; ACN:Methanol 1:9 (v/v)) im Mischungsverhältnis 8:2 (v/v) gewaschen und mit detergensfreiem Verdaupuffer äquilibriert. Die anschließende Adsorption der Lyso-GSL an das Festphasen-Extraktionsmaterial erfolgte durch 70faches Aspirieren der wässrigen Phase. Die adsorbierten Lyso-GSL wurden zweimal durch jeweils 70faches Aspirieren von detergensfreiem Verdaupuffer gewaschen und in entsprechender Weise mit jeweils 20  $\mu$ L der folgenden Lösungsmittel (-gemische) fraktioniert eluiert: LM A:LM B 8:2 (v/v) (3x) - LM A:LM B 6:4 (v/v) - LM A:LM B 4:6 (v/v) - LM A:LM B 2:8 (v/v) - LM B - Methanol - ACN (2x). Nach massenspektrometrischer Kontrolle (3.10.1) der einzelnen Fraktionen wurden die Lyso-GSL-enthaltenden Fraktionen zu gleichen Volumenanteilen gepoolt.

Anschließend wurden die noch in der wässrigen Phase des Verdauansatzes enthaltenen Fettsäuren mittels Chloroform-Methanol-Extraktion isoliert. Die wässrige Phase wurde zu diesem Zweck mit 80  $\mu$ L Wasser verdünnt, durch Zugabe von 2  $\mu$ L 6 N Salzsäure auf pH 2 eingestellt und mit 100  $\mu$ L C:M 1:1 (v/v) versetzt. Die Extraktion der Fettsäuren erfolgte durch kräftiges Schütteln (5 min) des Extraktionsansatzes mit anschließender Zentrifugation und vorsichtiger Isolierung der unteren organischen Phase mittels Mikroliterspritze. In beschriebener Weise wurde die Extraktion noch zweimal mit jeweils 100  $\mu$ L Chloroform wiederholt und die gewonnenen Extrakte einer Fettsäureanalytik (3.9 und 3.10.3) unterzogen.

---



**Abbildung 5** Enzymatischer Verdau nativer GSL mit SCDase

Schematische Darstellung des *workflows* zum Verdau nativer GSL mit SCDase im biphasischen System. SPE; *solid phase extraction* - Festphasen-Extraktion.

## 3.8 Chemische Derivatisierung von Oligosacchariden

Zur detaillierten massenspektrometrisch-gestützten Strukturanalyse wurden die enzymatisch freigesetzten Oligosaccharide verschiedenen Derivatisierungen unterzogen.

### 3.8.1 Reduktion

Die Reduktion nativer Oligosaccharide überführt die am reduzierenden Ende vorliegende Aldehydgruppe in einen primären Alkohol.

Die in der SpeedVac<sup>®</sup> getrockneten Oligosaccharide wurden hierzu mit 500 µL Reduktionsreagenz (10 mg/mL Natriumborhydrid in 0,01 M Natronlauge) versetzt und für 16 Stunden bei RT inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurde der Reaktionsansatz im Eisbad unter tropfenweiser Zugabe von 96%iger Essigsäure auf pH 5 eingestellt und in der SpeedVac<sup>®</sup> getrocknet. Die Reinigung der reduzierten Oligosaccharide von Borsäure erfolgte durch dreimalige Zugabe von jeweils 500 µL Methanol (+ 1% Eisessig (v/v)) mit anschließender Trocknung unter Stickstoffstrom.

Die darauffolgende Entsalzung der reduzierten und gereinigten Oligosaccharide erfolgte mittels PGC-Kartusche entsprechend der unter 3.7.1 beschriebenen Entsalzung enzymatisch freigesetzter Oligosaccharide. Abweichend hiervon wurden die an das Kartuschen-Material adsorbierten Oligosaccharide in drei Schritten mit jeweils 500 µL ACN:0,1% TFA 25:75 (v/v) - ACN:0,1% TFA 40:60 (v/v) und ACN:0,1% TFA 60:40 (v/v) fraktioniert eluiert [154]. Das Gesamteluat wurde in der SpeedVac<sup>®</sup> getrocknet und die reduzierten Oligosaccharide einer Permethylierung (3.8.2) unterzogen.

### 3.8.2 Permethylierung

Mittels Permethylierung werden die unsubstituierten Hydroxylgruppen von Oligosacchariden in Methylether überführt.

Zu diesem Zweck wurden die getrockneten Oligosaccharide mit 300 µL wasserfreiem Dimethylsulfoxid versetzt, nach Zugabe einer Spatelspitze fein gemörserten Natriumhydroxids fünf Minuten lang geschüttelt und anschließend eine Minute bei 2500 g zentrifugiert. Nach Zugabe von 50 µL Iodmethan, erneutem Schütteln und Zentrifugieren unter oben angegebenen Bedingungen erfolgte die Inkubation des Reaktionsansatzes unter Schütteln für 40 Minuten bei RT. Anschließend wurden im Eisbad jeweils 1 mL 10%ige Essigsäure und Dichlormethan zugegeben, die obere wässrige Phase nach Schütteln (5 min) und Zentrifugation (1 min) abpipettiert und zur unteren organischen Phase, welche die permethylierten Oligosaccharide enthielt, 1 mL 10%ige Essigsäure im Eisbad zugegeben. Die obere wässrige Phase wurde nach Schütteln (5 min) und Zentrifugieren (1 min) erneut abpipettiert und die organische Phase viermal jeweils durch Zugabe von 1 mL Wasser mit anschließendem Schütteln (3 min), Zentrifugieren (1 min) und Verwerfen der wässrigen Phase gewaschen. Die verbleibende organische Phase wurde für 30 Minuten bei -20°C gelagert und anschließend von gefrorenem Restwasser abgenommen. Die Trocknung der permethylierten Oligosaccharide erfolgte durch Abblasen des Chloroforms unter Stickstoffstrom.

## 3.9 Chemische Derivatisierung von Fettsäuren

Die nach enzymatischem Verdau nativer GSL mit SCDase sowohl in der Hexanphase enthaltenen als auch durch Chloroform-Methanol-Extraktion des wässrigen Verdauansatzes gewonnenen Fettsäuren (3.7.2) wurden durch Hydrolyse nach Gaver und Sweeley und anschließender Acetylierung einer massenspektrometrisch-gestützten Analyse zugänglich gemacht.

### 3.9.1 Hydrolyse nach Gaver und Sweeley

Die organischen Phasen wurden hierzu unter Stickstoffstrom getrocknet und nach Zugabe von 500 µL Hydrolyselösung (1,057 mL 30%ige Salzsäure (v/v), 0,95 mL Wasser, 7,993 mL Methanol) für 16 Stunden bei 100°C inkubiert. Die dabei in Methylester überführten Fettsäuren wurden anschließend aus dem Reaktionsansatz durch dreimalige Extraktion mit n-Hexan isoliert und unter Stickstoffstrom getrocknet [155].

### 3.9.2 Acetylierung

Die Acetylierung der getrockneten Fettsäuremethylester erfolgte nach Zugabe von 200 µL Essigsäureanhydrid und 50 µL Pyridin durch Inkubation des Reaktionsansatzes für

---

16 Stunden bei RT im Dunkeln. Die O-acetylierten Fettsäuremethylester wurden anschließend unter Stickstoffstrom getrocknet und über GC-gekoppelte Massenspektrometrie analysiert (3.10.3).

### 3.10 Massenspektrometrische Analysen

Basierend auf der Bestimmung von Molekül- bzw. Fragmentionenmassen ermöglicht die Massenspektrometrie die strukturelle Charakterisierung unterschiedlichster Verbindungen. Während die massenspektrometrische Untersuchung intakter Moleküle einen Überblick über die Heterogenität der Probe und die Zusammensetzung einzelner Moleküle gibt, liefern strukturspezifische Fragmentierungspfade in MS/MS bzw. MS<sup>n</sup> Experimenten detaillierte Informationen zur Struktur der einzelnen Komponenten.

Im Bereich der Glykosphingolipid-Analytik bieten die Massenspektrometrie und die mit ihr gekoppelten Methoden weitreichende Charakterisierungsmöglichkeiten [156, 157].

#### 3.10.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Diese Methode stellt eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Strukturanalyse von Kohlenhydraten und Glykokonjugaten dar [158]. Sie basiert auf einer matrixunterstützten Laserdesorption/ionisation (*matrix-assisted laser desorption/ionisation* (MALDI)) der Analytmoleküle mit nachgeschalteter Trennung der generierten Pseudomolekülonen ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ , etc.) im Flugzeit-Massenanalysator (*time-of-flight* (TOF)).

Die in dieser Arbeit beschriebenen MALDI-TOF-Experimente wurden an einem Ultraflex I Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) durchgeführt, welches mit einem Stickstoff-Laser (337 nm) ausgerüstet ist. Für alle durchgeführten Experimente wurde das Gerät im positiven Reflektron-Modus betrieben. Soweit nicht anders vermerkt, basierten Fragmentierungen in MS/MS-Experimenten auf laserinduzierten Dissoziationen (*laser induced dissociation* (LID)). Die Kalibrierung erfolgte mittels *peptide calibration standard* (Bruker). Die generierten Spektren sind Summenspektren aus jeweils 300-600 Einzelmessungen, die angegebenen Masse/Ladungs-Quotienten ( $m/z$ ) sind auf eine Nachkommastelle gerundet. Zur Kokristallisation wurden Analyt- und Matrixlösung in einem geeigneten Mischungsverhältnis auf den Probenhalter (Anchorchip 600, Bruker) gespottet und unter einem warmen Luftstrom getrocknet.

Die Untersuchung nativer GSL in MS- und MS/MS-Experimenten erfolgte mit gleichen Volumenanteilen von Probe (1-10 pmol in C:M:W 10:10:1 (v/v/v)) und 6-Aza-2-Thiothymin (ATT)-Matrix (35 mM ATT, 25 mM Natriumhydrogencarbonat). Native und permethylierte Oligosaccharide (10 ng/ $\mu$ L in Wasser bzw. M:W 1:1 (v/v)) wurden mit ATT-Matrix im Verhältnis 1:2 (v/v) gespottet. Als Matrix für die Analyse von Lyso-GSL diente ein Gemisch aus gleichen Volumenanteilen von 2,5-Dihydroxybenzoesäure (10 mg/mL) und Methylendiphosphonsäure

---

(10 mg/mL), welches im Volumenverhältnis 1:1 mit der Probe aufgetragen wurde.

Die Auswertung der generierten Spektren erfolgte mittel FlexAnalysis (Bruker), Glyco-Peakfinder [159] und GlycoWorkbench Software-Tools [57].

### 3.10.2 ESI-Massenspektrometrie

Dieser massenspektrometrischen Methode liegt eine Elektrospray-Ionisation (ESI) flüssiger Analytmoleküle unter Hochspannung zugrunde [160]. Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden an einem Esquire 3000 Massenspektrometer (Bruker) durchgeführt, welches zur massenabhängigen Trennung der Ionen mit einer Ionenfalle ausgestattet ist und Helium als Kollisionsgas für  $MS^n$ -Experimente verwendet.

Die getrocknete Probe wurde in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und ein Aliquot (3 bis 5  $\mu\text{L}$ ) in eine metallbeschichtete Borosilikat-Nadel (Proxeon, Odense, Dänemark) gefüllt. Der Ionisationsprozess erfolgte bei einer Spannung von 600 bis 900 V und gleichzeitiger Trocknung im Stickstoffstrom (150°C, 6 L/min). Die resultierende Stromstärke lag zwischen 30 und 40 nA. Permethylierte Oligosaccharide wurden zur Analyse in M:W 1:1 (v/v) (+ 0,1% Ameisensäure (v/v)) und Lyso-GSL in ACN:W 4:1 (v/v) (+ 0,1% Ameisensäure (v/v)) aufgenommen.

Die generierten Spektren sind Summenspektren aus 20 bis 100 Einzelspektren. Ihre Auswertung erfolgte mittels DataAnalysis (Bruker), Glyco-Peakfinder [159] und GlycoWorkbench Software-Tools [57].

### 3.10.3 GC-gekoppelte Massenspektrometrie

Mit Hilfe dieser Methode wurden die, zum Teil *O*-acetylierten, Fettsäuremethylester (3.9) gaschromatographisch (GC) getrennt und anschließend massenspektrometrisch detektiert [161]. Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden an einem Trace-GC durchgeführt, welcher mit einem Best-PTV Injektor ausgestattet und einem Polaris Q Massenspektrometer (alle Thermo Electron, Karlsruhe) gekoppelt ist. Die Fettsäuremethylester wurden in 50  $\mu\text{L}$  *n*-Hexan aufgenommen und ein 5  $\mu\text{L}$  Aliquot autosamplergesteuert (GC PAL von CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) injiziert, wobei der Injektor im Solvent-Split Mode unter dem in Tabelle 5 und Abbildung 6 dargestellten Temperaturprogramm betrieben wurde. Die chromatographische Trennung des Analyten erfolgte über eine VF-5ms Kapillarsäule (Länge 60 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,1  $\mu\text{m}$  von Varian Inc., Darmstadt) mit Helium als Trägergas (Reinheitsgrad 5.0; Fluss 1,2 mL/min). Der Säulenofen wurde hierzu in dem in Tabelle 5 und Abbildung 6 dargestellten Temperaturprogramm betrieben. Die anschließende Ionisierung der Analytmoleküle basierte auf Elektronenstoß-Ionisation. Die Identifizierung der, partiell *O*-acetylierten, Fettsäuremethylester erfolgte anhand der detektierten Retentionszeiten

---

und entsprechenden Massenspektren im Vergleich zu den eingesetzten Fettsäure-Standards. Als Standard für nicht hydroxylierte Fettsäuren diente Supelco® 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich). Die hydroxylierten Fettsäure-Standards der Palmitin- und Lignocerinsäure waren von Matreya Inc. (Pleasant Gap, PA, USA). Die Auswertung der generierten Chromatogramme und Spektren erfolgte mittels Xcalibur (Thermo Electron).

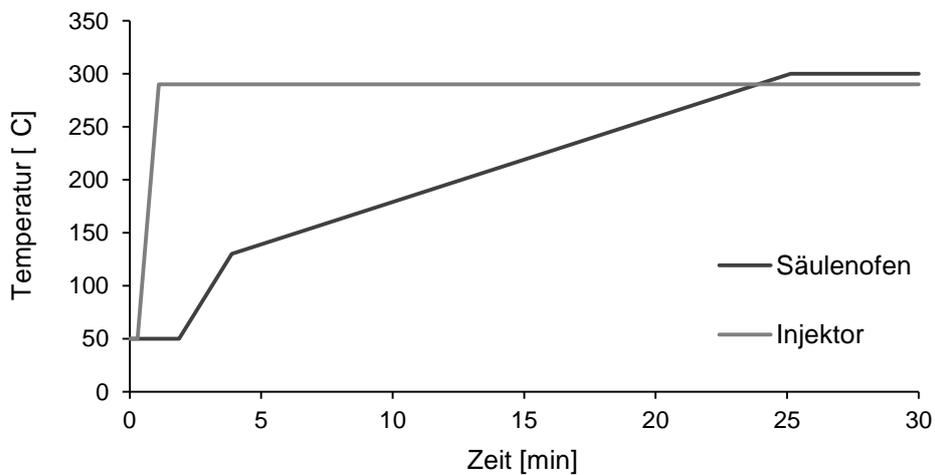
#### A. Injektor

Zeit	Temperatur [°C]
0	50
18"	50
1' 6"	290
30'	290

#### B. Säulenofen

Zeit	Temperatur [°C]
0	50
1' 52,8"	50
3' 52,8"	130
25' 7,8"	300
30'	300

**Tabelle 5** Temperaturprogramme der GC-MS-gestützten Analyse von Fettsäuren



**Abbildung 6** Temperaturprogramme der GC-MS-gestützten Analyse von Fettsäuren

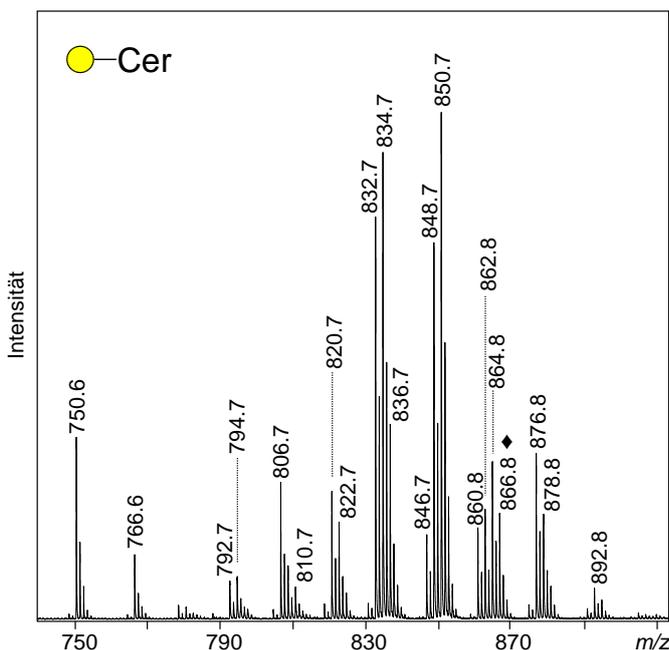
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Entwicklung einer Methode zum enzymatischen Verdau nativer GSL mit SCDase im Mikro-Maßstab

Zur detaillierten Charakterisierung des Ceramid-Anteils von GSL hinsichtlich distinkter Fettsäure- und Sphingoidbasen-Zusammensetzungen wurde eine Methode entwickelt, welche die simultane Analyse beider Komponenten bei kleinstmöglichem Probeneinsatz gewährleistet. Der Etablierung dieser Methode diene als Standard Galactosylcerebrosid aus bovinem Gehirn (Sigma-Aldrich). Im Folgenden wird Galactosylcerebrosid durch die allgemeinere Beschreibung Galactosylceramid (GalCer) abgekürzt.

#### 4.1.1 Massenspektrometrische Untersuchung von GalCer

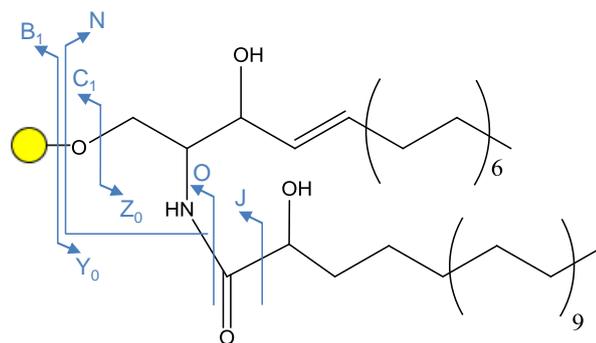
In der MALDI-MS Analyse von GalCer wurden 20 verschiedene Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  registriert, welche jeweils GalCer-Komponenten unterschiedlicher Ceramid-Zusammensetzungen repräsentierten ( $m/z$  750.6 - 892.8) (Abbildung 7). Das Signal  $m/z$  866.8 konnte nach Zugabe von 1  $\mu$ L 4 mM KCl zur Probe als Kaliumaddukt ( $[M+K]^+$ ) der Hauptkomponente  $m/z$  850.7 identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 7** MALDI-MS Analyse eines GalCer-Standards aus bovinem Gehirn. Es wurden überwiegend Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  registriert, das Kaliumaddukt ( $[M+K]^+$ ) ist mit einem Rhombus ( $\blacklozenge$ ) markiert. Gelber Kreis, Galactose; Cer, Ceramid.

In MALDI-MS/MS Analysen von Natriumaddukten ( $[M+Na]^+$ ) im LID-Mode sowie von Lithiumaddukten ( $[M+Li]^+$ ) im CID (*collision induced dissociation*)-Mode konnten detaillierte Informationen zur Ceramid-Zusammensetzung der Hauptkomponenten gewonnen werden (Abbildung 9). Fragmentierungspfade und Nomenklatur der hierbei relevanten Fragmentionen sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

Bereits die MALDI-MS/MS Spektren der Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) beider Hauptkomponenten lieferten das B- und C-Fragmentation der endständigen Hexose ( $m/z$  185.1 bzw. 185.4 und 203.1 bzw. 203.6) sowie die nach Abspaltung der Fettsäure generierte Lyso-GalCer-Struktur ( $m/z$  484.2 bzw. 484.9) (Abbildung 9A und C). Da Natriumaddukte von Lyso-CMH mit  $m/z$  484.3 der Sphingoidbase C18-Sphingosin (d18:1) zugeordnet werden können, konnte basierend auf diesen Experimenten für GalCer  $m/z$  834.7 die Ceramid-Zusammensetzung d18:1/Lignocerinsäure (C24:0) sowie für GalCer  $m/z$  850.7 die Zusammensetzung d18:1/hydroxylierte Lignocerinsäure (C24h:0) berechnet werden.

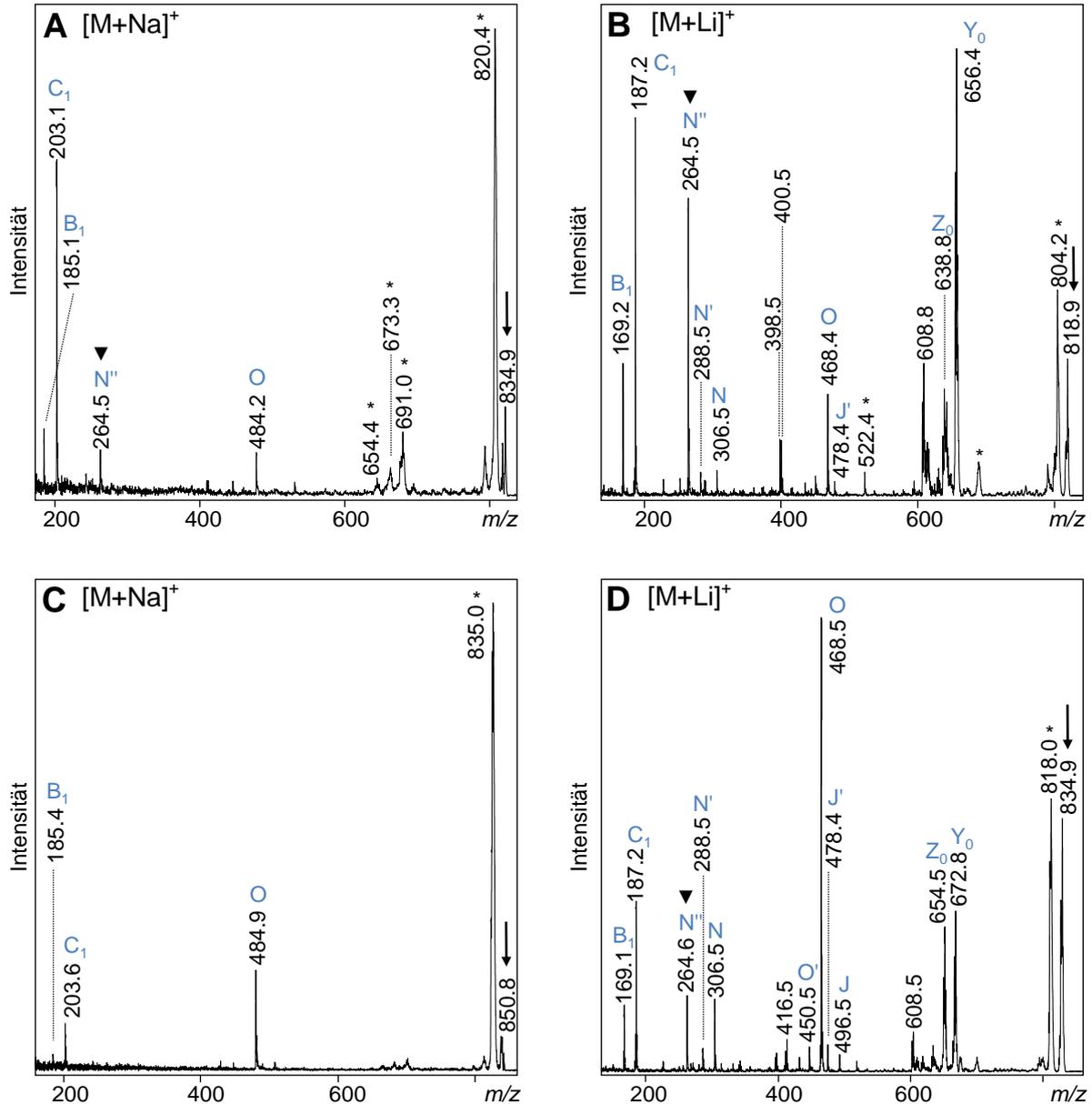


**Abbildung 8** Fragmentierungspfade von GalCer

Schematische Darstellung möglicher Fragmentierungspfade von GalCer am Beispiel der GalCer-Komponente bei  $m/z$  834.9 ( $[M+Li]^+$ ). Der Ceramid-Anteil besteht aus C18-Sphingosin (d18:1) und hydroxylierter Lignocerinsäure (C24h:0). Gebildete Fragmentationen sind entsprechend der Nomenklatur von Domon und Costello [162] sowie Adams und Ann [163] benannt. Durch einfache bzw. doppelte Wasserabspaltung gebildete Sekundärfragmente werden mit J', N', O' bzw. N'' gekennzeichnet. Gelber Kreis, Galactose.

Die Verifizierung der ermittelten Ceramid-Zusammensetzungen erfolgte durch Fragmentierung der Lithiumaddukte ( $[M+Li]^+$ ) im CID-Mode (Abbildung 9B und D).

Neben den B- und C-Fragmentationen der endständigen Hexose ( $m/z$  169.2 bzw. 169.1, 187.2) sowie dem Lyso-GalCer bei  $m/z$  468.4 bzw. 468.5 wurden in der MALDI-MS/MS Analyse der GalCer-Komponenten  $m/z$  818.9 und 834.9 (Abbildung 9B und D; Pfeile) Z und Y-Fragmentationen der freigesetzten Ceramid-Anteile detektiert ( $m/z$  638.8, 656.4 und 654.5, 672.8). Die Signalgruppe  $m/z$  306.5, 288.5 und 264.5 bzw. 264.6 konnte der freien Base C18-Sphingosin sowie den aus einer einfachen und doppelten Wasserabspaltung entstandenen Produkten zugeordnet werden. Darüber hinaus waren in der MALDI-MS/MS Analyse der GalCer-Komponente  $m/z$  834.9 die hohe Signalintensitäten des O-Fragmentations sowie von J- und J'-Fragmentationen als indikativ für die Präsenz einer  $\alpha$ -Hydroxyfettsäure zu werten (Abbildung 9D). Im Vergleich dazu wurden bei der Analyse der GalCer-Komponente  $m/z$  818.9, deren Fettsäure mit nicht-hydroxylierter Lignocerinsäure berechnet wurde, entsprechende Fragmentationen in nur sehr geringen Signalintensitäten registriert (Abbildung 9B).



**Abbildung 9** MALDI-MS/MS Analyse der Hauptkomponenten von GalCer

Massenspektrometrische Untersuchung der Hauptkomponenten von GalCer-Standard (vgl. Abbildung 7) im LID-Mode (**A** und **C**) bzw. CID-Mode (**B** und **D**). (**A**), MALDI-MS/MS Spektrum des Pseudomoleküions  $[M+Na]^+$  bei  $m/z$  834.7 (Pfeil). (**B**), MALDI-MS/MS Spektrum des entsprechenden Lithiumadduktes ( $[M+Li]^+$ ) bei  $m/z$  818.9 (Pfeil). (**C**), MALDI-MS/MS Spektrum des Pseudomoleküions  $[M+Na]^+$  bei  $m/z$  850.7 (Pfeil). (**D**), MALDI-MS/MS Spektrum des entsprechenden Lithiumadduktes ( $[M+Li]^+$ ) bei  $m/z$  834.9 (Pfeil). Die Annotation relevanter Fragmentationen ( $[M+Na]^+$ ) in (**A**) und (**C**) bzw. ( $[M+Li]^+$ ) in (**B**) und (**D**) erfolgte entsprechend der Nomenklatur nach Domon und Costello [162] sowie Adams und Ann [163] (vgl. hierzu Abbildung 8). Hierbei sind Wasserabspaltungen von einzelnen Fragmentationen durch hochgesetzte Striche an den jeweiligen Buchstaben ( $N \rightarrow N'$ , etc.) gekennzeichnet. Für weitere Strukturen nicht annotierter Fragmentationen ( $m/z$  400.5 und 608.8 in (**B**) sowie  $m/z$  416.5 in (**D**)) vgl. [164]. Protonierte Fragmentationen sind mit einem Dreieck ( $\blacktriangledown$ ) und undefinierte Signale mit einem Stern (\*) markiert.

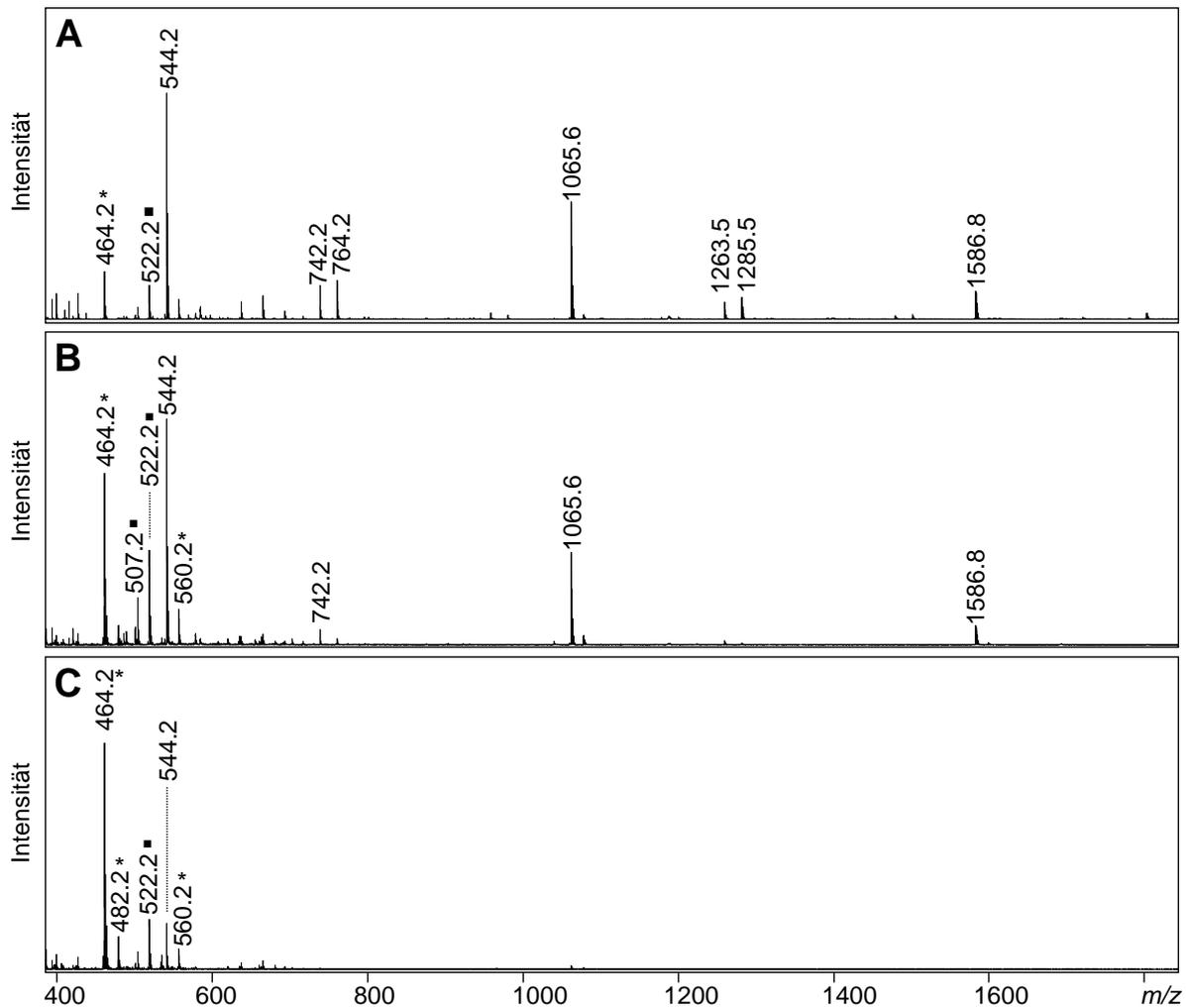
#### 4.1.2 Enzymatischer Verdau von GalCer im Mikro-Maßstab

Die massenspektrometrische Analyse von GalCer (4.1.1) ermöglichte zwar die Identifizierung der Ceramid-Zusammensetzungen der beiden Hauptkomponenten, eine detaillierte Charakterisierung von Nebenkomponenten erlaubte sie jedoch nicht (vgl. Abbildung 7).

Um strukturelle Informationen zur Ceramid-Zusammensetzung aller GalCer-Komponenten zu erhalten, erfolgte ein enzymatischer Verdau mit SCDase im biphasischen System (3.7.2). Die darauffolgende Analyse der gebildeten Lyso-GSL sowie freigesetzten Fettsäuren sollte einen möglichst umfassenden Überblick über die strukturelle Heterogenität von GalCer ermöglichen. Hierbei wurde ausgehend von 10 nmol GalCer der enzymatische Verdau mit SCDase im biphasischen System etabliert und die hierfür erforderlichen Probenmenge anschließend bis auf 2,5 nmol an eingesetztem GalCer nach unten skaliert.

##### 4.1.2.1 Massenspektrometrische Untersuchung von Lyso-GalCer

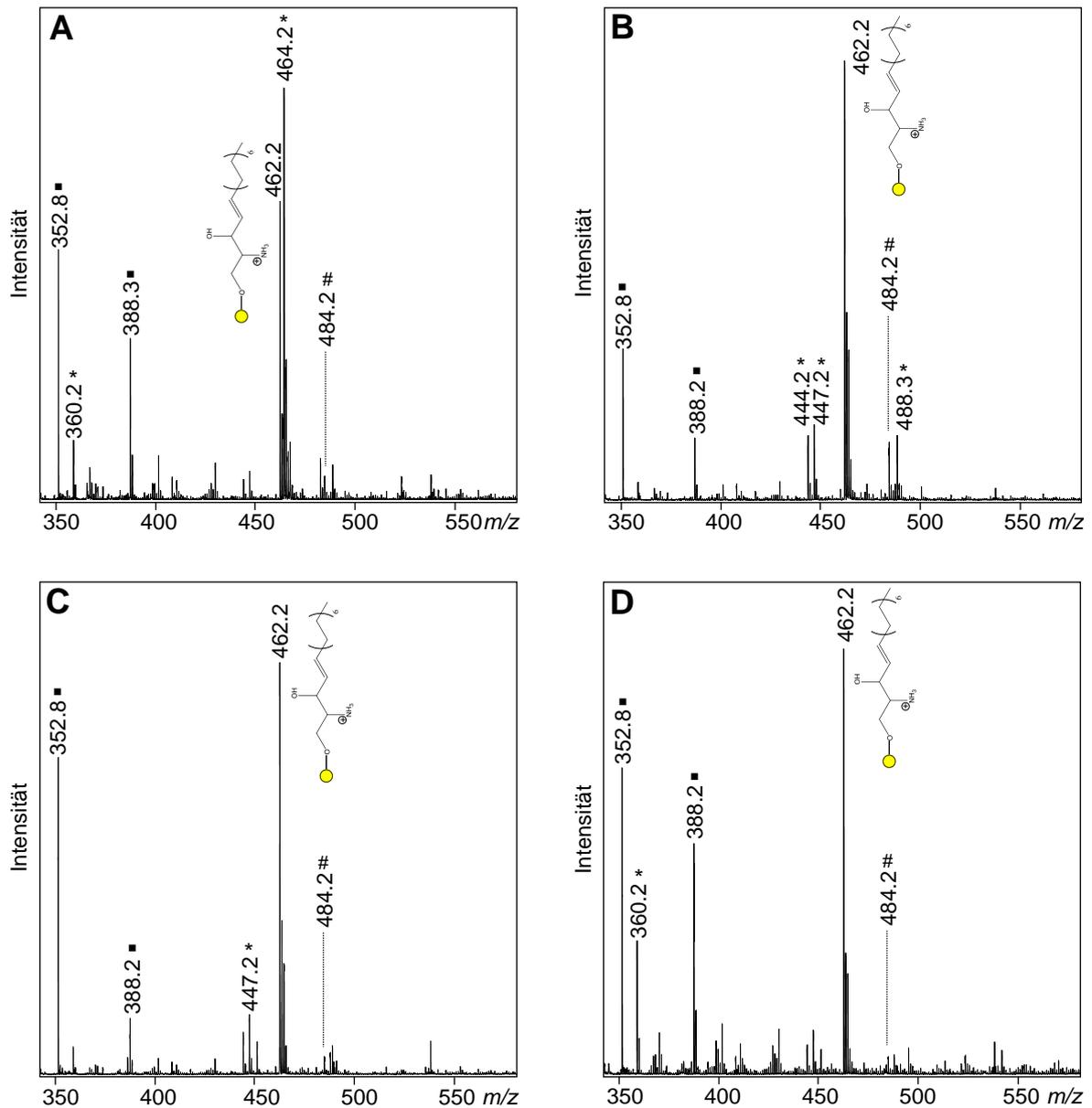
Die Isolierung der Lyso-GalCer Verdauprodukte aus dem wässrigen Verdaupuffer erfolgte mittels Adsorption an C18 NuTips<sup>®</sup> und anschließender fraktionierter Elution. Die ersten drei Eluate (E1-E3) dienten hierbei der selektiven Abtrennung des Detergens Natriumtaurodeoxycholat (TDC) sowie weiterer Verunreinigungen (Abbildung 10A-C). In der MALDI-MS Analyse der ersten beiden Fraktionen konnte bei  $m/z$  544.2 das Natriumaddukt ( $[M+Na]^+$ ) von TDC ( $M_w$  521,7 g/mol) detektiert werden, während die Signale  $m/z$  1065.6 und 1586.8 durch Aggregatbildung von zwei bzw. drei TDC-Molekülen erklärbar waren (Abbildung 10A und B). Darüber hinaus unterschieden sich die Signalpaare  $m/z$  1263.5/1285.5 und 742.2/764.2 in  $\Delta m/z$  521.3 und waren somit ebenfalls indikativ für an Pseudomolekülen aggregierte TDC-Moleküle zu werten. In der MALDI-MS Analyse der dritten Fraktion wurde nur noch das Natriumaddukt ( $[M+Na]^+$ ) von TDC bei  $m/z$  544.2 als detergensbasiertes Signal detektiert (Abbildung 10C). Das Signal  $m/z$  464.2, welches in allen drei Eluaten registriert werden konnte (Abbildung 10A-C), repräsentierte eine ebenfalls im Verdaupuffer nachweisbare Kontamination (Daten nicht gezeigt). Eine MALDI-MS/MS Analyse ermöglichte die Abgrenzung vom massengleichen Protonenaddukt ( $[M+H]^+$ ) des C18-Sphinginin (d18:0)-basierten Lyso-GalCer, wobei Gal-d18:0 verifizierende Fragmentionen ( $m/z$  302.3, 284.3, 266.3) nicht detektiert werden konnten. In Übereinstimmung mit entsprechenden MALDI-MS/MS Analysen des Pseudomoleküls aus dem Verdaupuffer hingegen wurden kontaminationsspezifische Signale bei  $m/z$  126.3, 208.5, 215.6, 243.4, 255.6 und 339.8 registriert (Daten nicht gezeigt). Matrixassoziierte Signale wurden bei  $m/z$  507.2 und 522.2 detektiert. In MALDI-MS Untersuchungen reiner Matrix konnte ausgeschlossen werden, dass diese den Lyso-Verbindungen von Galactosylcerebroside massenidentische Moleküle generierten, und somit deren Detektion im unteren Massenbereich beeinträchtigen könnte.



**Abbildung 10** MALDI-MS Kontrolle der Elutionsfraktionen E1 bis E3

Massenspektrometrische Kontrolle der Isolierung des enzymatisch freigesetzten Lyso-GalCer durch fraktionierte Elution (vgl. hierzu 3.7.2). **(A)**, MALDI-MS Spektrum des ersten Eluats (E1). **(B)**, MALDI-MS Spektrum des zweiten Eluats (E2). **(C)**, MALDI-MS Spektrum des dritten Eluats (E3). Matrixassoziierte Signale sind durch ein Quadrat (■) und undefinierte Signale durch einen Stern (\*) gekennzeichnet. Alle übrigen, nicht gesondert gekennzeichneten Signale repräsentieren detergensbasierte Pseudomolekülonen ( $[M+Na]^+$ ).

In den folgenden vier Eluaten (E4-E8) konnte als Hauptprodukt Lyso-GalCer als Pseudomolekülon  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  462.2 isoliert werden (Abbildung 11A-D). Das entsprechende Natriumaddukt ( $[M+Na]^+$ ) wurde in geringen Intensitäten detektiert ( $m/z$  484.2). Es konnte somit rechnerisch auf die vorherrschende Präsenz von C18-Sphingosin in Lyso-GalCer geschlossen werden. Die bereits bei den vorherigen Elutionsschritten detektierte und aus dem Verdaupuffer stammende Verunreinigung  $m/z$  464.2 war im Eluat E4 ebenfalls noch nachweisbar (Abbildung 11A). Eine Abgrenzung vom massengleichen C18-Sphinganin-basierten Lyso-GalCer erfolgte in ESI-MS<sup>2</sup> Analysen (Daten nicht gezeigt).

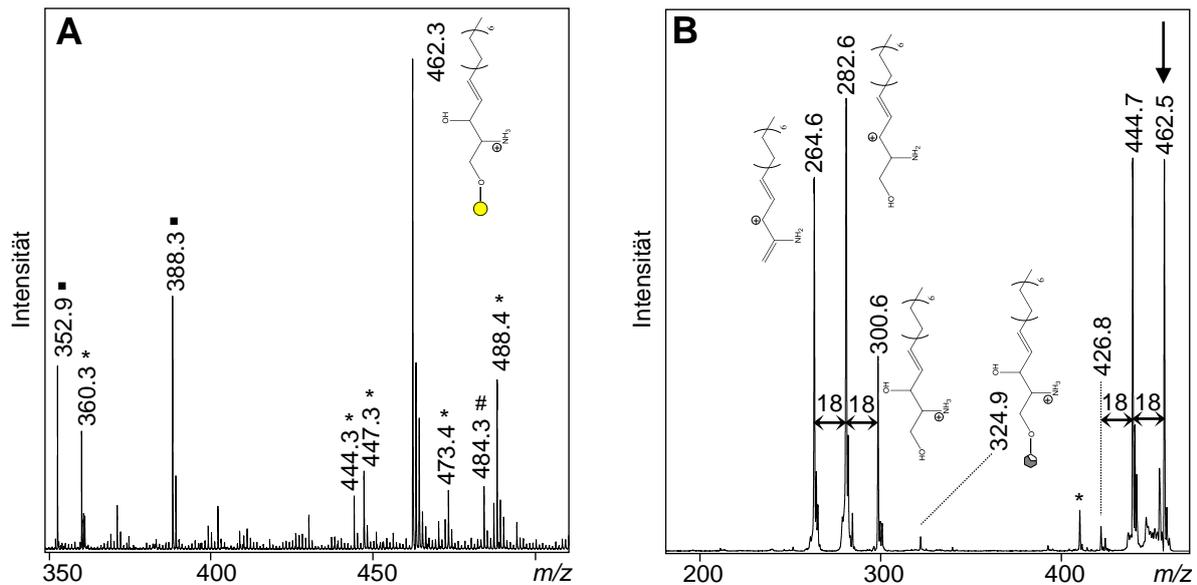


**Abbildung 11** MALDI-MS Kontrolle der Elutionsfraktionen E4 bis E7

Massenspektrometrische Kontrolle der Isolierung des enzymatisch freigesetzten Lyso-GalCer durch fraktionierte Elution (vgl. hierzu 3.7.2). (A), MALDI-MS Spektrum des vierten Eluats (E4). (B), MALDI-MS Spektrum des fünften Eluats (E5). (C), MALDI-MS Spektrum des sechsten Eluats (E6). (D), MALDI-MS Spektrum des siebten Eluats (E7). Das Lyso-GalCer wurde als Pseudomolekulation ( $[M+H]^+$ ) registriert. Das Natriumaddukt ( $[M+Na]^+$ ) ist durch eine Raute (#) und undefinierte Signale durch einen Stern (\*) markiert. Matrixassoziierte Signale sind durch ein Quadrat (■) kenntlich gemacht. Gelber Kreis, Galactose.

MALDI-MS Untersuchungen der nachfolgenden Eluate registrierten das Verdauprodukt nur noch in sehr geringen Intensitäten (Daten nicht gezeigt).

Eine Verifizierung der errechneten Zusammensetzung von Lyso-GalCer  $m/z$  462.2 erfolgte in MALDI-MS/MS Untersuchungen. Hierzu wurden die Fraktionen 5 bis 7 zu gleichen Volumenanteilen gepoolt (Abbildung 12A).



**Abbildung 12** Massenspektrometrische Untersuchung von Lyso-GalCer

(A), MALDI-MS Spektrum des repräsentativen Pools der Lyso-GalCer-enthaltenden Einzelaktionen E5 bis E7 (vgl. Abbildung 11B-D). Das Lyso-GalCer wurde als Pseudomolekülion ( $[M+H]^+$ ) registriert. Das entsprechende Natriumaddukt ist mit einer Raute (#) markiert. Matrixassoziierte Signale sind durch ein Quadrat (■) gekennzeichnet. (B), MALDI-MS/MS Spektrum von Lyso-GalCer bei  $m/z$  462.3 (Pfeil). Wasserabspaltungen sind durch einen schwarzen Doppelpfeil ( $\Delta m/z$  18) gekennzeichnet. Dargestellte Fragmentationen der freien Base sind exemplarisch für einen möglichen Fragmentierungspfad gewählt [165, 166]. undefinierte Signale sind mit einem Stern (\*) kenntlich gemacht. Gelber Kreis, Galactose. Ein partiell schattierter Sechsring markiert einen  $^{0,2}X_0$ -Ringbruch der Galactose.

In der MALDI-MS/MS Analyse des Lyso-GalCer  $m/z$  462.3 (Abbildung 12B; Pfeil) konnte die errechnete Zusammensetzung verifiziert werden. Die freie Base C18-Sphingosin wurde bei  $m/z$  300.6 nachgewiesen. Darüber hinaus konnten Fragmentationen detektiert werden, welche aus einer einfachen bzw. doppelten Wasserabspaltungen der freien Base hervorgegangen waren ( $m/z$  282.6, 264.6) [165, 166]. Das Signal  $m/z$  324.9 war durch einen  $^{0,2}X_0$ -Ringbruch der Galactose erklärbar. Wasserabspaltungen vom Vorläuferion (*precursor*) repräsentierten die Signale  $m/z$  444.7 und 426.8.

Interessanterweise lieferte das MALDI-MS Spektrum der gepoolten Einzelaktionen (Abbildung 12A) ein irreguläres Isotopenmuster des Lyso-GalCer ( $m/z$  462.3), welches sich in einer Übergewichtung von  $m/z$  464.3 darstellte. In ESI-MS<sup>2</sup> Untersuchungen konnte diesbezüglich die Präsenz von C18-Sphingamin-basiertem Lyso-GalCer durch Detektion der freien Base bei  $m/z$  302.3 sowie dem aus einer Wasserabspaltung hervorgegangenem Fragmention  $m/z$  284.3 bestätigt werden. Wasserabspaltungen vom *precursor* wurden bei  $m/z$  446.3, 428.3 und 410.3 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden aber auch charakteristische Fragmentationen der aus dem Verdauerpuffer stammenden Kontamination ( $m/z$  464.2; vgl. hierzu Abbildung 10 und Abbildung 11A) detektiert, so dass die Überge-

wichtung des Signals  $m/z$  464.2 als additiver Effekt dieser Verunreinigung und C18-Sphingarin-basiertem GalCer gewertet werden musste.

#### 4.1.2.2 Fettsäureanalytik

Die Identifizierung der beim enzymatischen Verdau von GalCer in der Hexan- und Chloroformphase isolierten Fettsäuren (3.7.2) erfolgte durch Retentionszeiten-Vergleich mit den eingesetzten Fettsäure-Standards sowie zusätzlich über den Nachweis des entsprechenden fettsäurespezifischen Massenspektrums (vgl. hierzu 3.10.3). Mit Ausnahme von *O*-acetylierten Fettsäuremethylestern konnte hierbei die Detektion des Molekülpeaks  $[M]^+$  stets als diagnostisch gewertet werden (Daten nicht gezeigt) [161, 167]. Gesättigte Fettsäuren zeigten darüber hinaus deutliche Signale, welche Fragmente der Carbomethoxy-Serie repräsentierten, sowie einen Basispeak bei  $m/z$  74, dessen zugrunde liegendes Fragment aus einem Bruch der 2,3-Bindung bei simultaner Wasserstoffumlagerung (Mc Lafferty-Umlagerung) entsteht. Im Gegensatz dazu zeigten einfach ungesättigte Fettsäuren deutliche Signale, welche Fragmente der Kohlenwasserstoff-Serie ( $C_nH_{2n-1}$ ) repräsentierten sowie das durch Methanolabspaltung gebildete Fragment bei  $m/z=M-32$ . Signale bei  $m/z=M-74$  und  $M-116$  waren ebenfalls als diagnostisch für die Präsenz ungesättigter Fettsäuren zu werten. In den Massenspektren *O*-acetylierter Fettsäuremethylester waren Molekülpeaks  $[M]^+$  kaum nachweisbar. Hierbei repräsentierte das durch Abspaltung von Keten ( $\Delta m/z$  42) gebildete Fragmentation das Signal der höchsten Intensität. Da die Hydroxyfettsäuren der GC-MS-basierten Analytik in ihrer *O*-acetylierten Form zugeführt wurden, war eine Lokalisierung der Hydroxygruppe nicht mit absoluter Sicherheit möglich. Charakteristische Fragmentationen, welche die Präsenz einer  $\alpha$ -Hydroxyfettsäure bestätigen können, werden in hohen Signalintensitäten überwiegend in der massenspektrometrischen Analyse nicht-acetylierter Fettsäuremethylester beobachtet. Allerdings ließ beispielsweise die Detektion von Signalen  $[M-59]^+$ , welche den Verlust des Carbomethoxy-Radikals ( $CH_3OC=O^\bullet$ ) repräsentierten, je nach Signalintensität die Präsenz von  $\alpha$ -Hydroxyfettsäuren vermuten.

Das Ergebnis der Fettsäureanalytik ist in Tabelle 6 zusammenfassend dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass gesättigte, nicht-hydroxylierte Fettsäuren vorwiegend in der Hexanphase nachweisbar waren (C22:0 - C26:0). Hieraus konnte die Schlussfolgerung getroffen werden, dass der überwiegende Nachweis von Palmitin- (C16:0) und Stearinsäure (C18:0) in der Chloroformphase zumindest teilweise kontaminationsbedingt zu bewerten war. Im Gegensatz hierzu waren gesättigte und ungesättigte, hydroxylierte Fettsäuren nahezu ausschließlich in der Chloroformphase enthalten (C18h:0 - C25h:0, C24h:1, C26h:1). Dies verdeutlichte, dass hydroxylierte Fettsäuren aufgrund ihres polaren Charakters nicht in die Hexanphase diffundierten und somit ihre Analyse erst nach Ansäuerung des Verdauansatzes

---

durch eine Chloroform-Methanol-Extraktion ermöglicht wurde. Ähnliche Tendenzen konnten bei ungesättigten, nicht hydroxylierten Fettsäuren (C22:1, C24:1) nicht beobachtet werden. Sie waren in beiden Phasen nachweisbar.

Die aufsummierten Werte der in der Hexan- und Chloroformphase analysierten Fettsäuren zeigten, dass Lignocerinsäure (C24:0) und ihre hydroxylierte Variante (C24h:0) als Hauptfettsäuren identifiziert werden konnten. Daneben wurden gesättigte und ungesättigte sowie partiell hydroxylierte Fettsäuren mit 16 bis 26 Kohlenstoffatomen zu verschiedenen Anteilen nachgewiesen.

Fettsäure	Hexanphase		Chloroformphase		Summe	
	Peakfläche x10 <sup>6</sup>	relative Häufigkeit (%)	Peakfläche x10 <sup>6</sup>	relative Häufigkeit (%)	Peakfläche x10 <sup>6</sup>	relative Häufigkeit (%)
C16:0	0,37	2	1,76	3	2,13	3
C18:0	2,17	9	7,06	12	9,23	11
C18h:0	n.d.	-	0,62	1	0,62	1
C22:0	2,66	11	0,94	2	3,60	4
C22h:0	Spuren	Spuren	2,15	4	2,15	4
C22:1	0,65	3	4,81	8	5,46	7
C23:0	2,84	12	0,66	1	3,50	4
C23h:0	n.d.	-	3,38	6	3,38	4
C24:0	10,67	46	3,00	5	13,67	17
C24h:0	n.d.	-	15,52	26	15,52	19
C24:1	1,01	4	2,44	4	3,45	4
C24h:1	n.d.	-	7,35	12	7,35	9
C25:0	2,00	9	0,80	1	2,80	3
C25h:0	n.d.	-	4,47	8	4,47	5
C26:0	0,79	3	0,83	1	1,62	2
C26h:0	n.d.	-	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
C26h:1	n.d.	-	3,27	6	3,27	4

**Tabelle 6** Fettsäureanalytik nach enzymatischem Verdau von GalCer

Die durch enzymatischen Verdau von GalCer mit SCDase (vgl. hierzu 4.1.2) in der Hexan- und Chloroformphase enthaltenen, freigesetzten Fettsäuren wurden als partiell acetylierte Fettsäuremethylester GC-MS-basiert analysiert (3.10.3). Die hierbei erhaltenen Ergebnisse wurden schließlich für eine repräsentative Aussage der in GalCer gebundenen Fettsäuren aufsummiert. C16:0, gesättigte, nicht-hydroxylierte Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen; C16h:0, gesättigte, hydroxylierte Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen; C22:1, einfach ungesättigte, nicht hydroxylierte Fettsäure mit 22 Kohlenstoffatomen; etc.

Während in den Massenspektren O-acetylierter Fettsäuremethylester mit 23 bis 25 Kohlenstoffatomen (C23h:0 - C25h:0) deutliche Signale  $[M-59]^+$  die Präsenz von  $\alpha$ -Hydroxyfettsäuren wahrscheinlich erscheinen lassen, konnten entsprechende Signale der *precursor* C18h:0 und C22h:0 nur mit sehr schwachen Intensitäten registriert werden. Besonders interessant war hierbei zu beobachten, dass in den Massenspektren der O-acetylierten Fettsäuremethylester ungesättigter Fettsäuren (C24h:1, C26h:1) das Signal bei  $m/z$   $[M-59]^+$  das Basissignal repräsentierte (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2.3 Struktur von GalCer

GalCer-Komponente $[M+Na]^+$ ( $m/z$ )	Ceramid-Zusammensetzung	
	Sphingoidbase	Fettsäure
750.6	d18:1	C18:0
766.6	d18:1	C18h:0
792.7	d18:1	n.d.
794.7	d18:1	n.d.
806.7	d18:1	C22:0
810.7	d18:1	n.d.
820.7	d18:1	C23:0
822.7	d18:1	C22h:0
832.7	d18:1	C24:1
834.7	d18:1	C24:0
836.7	d18:1	C23h:0
848.7	d18:1	C24h:1 (C25:0)
850.7	d18:1	C24h:0
862.7	d18:1	C26:0
864.7	d18:1	C25h:0
876.8	d18:1	C26h:1
878.8	d18:1	C26h:0
892.7	d18:1	n.d.

**Tabelle 7** Strukturvorschläge zur Ceramid-Zusammensetzung von GalCer

Errechnete Ceramid-Zusammensetzungen von GalCer (vgl. Abbildung 7) basieren auf der massenspektrometrischen Untersuchung enzymatisch freigesetzter Fettsäuren (4.1.2.2) und entsprechender Lyso-Verbindungen (4.1.2.1). Es sind jeweils die C18-Sphingosin (d18:1)-basierenden Hauptkomponenten gezeigt, entsprechende Nebenkomponten sind in Klammern gesetzt. C18:0, gesättigte, nicht-hydroxylierte Fettsäure mit 18 Kohlenstoffatomen; C18h:0, gesättigte, hydroxylierte Fettsäure mit 18 Kohlenstoffatomen; C24:1, einfach ungesättigte, nicht-hydroxylierte Fettsäure mit 24 Kohlenstoffatomen; etc.; n.d., nicht detektiert.

Basierend auf der massenspektrometrischen Untersuchung von Lyso-GalCer (4.1.2.1) sowie der GC-MS-basierten Analyse freigesetzter Fettsäuren (4.1.2.2) konnten die im Rahmen der MALDI-MS Analyse von GalCer detektierten Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  (vgl. Abbildung 7) distinkten Ceramid-Zusammensetzungen zugeordnet werden (Tabelle 7). Lediglich die korrespondierenden Fettsäuren von Komponenten, welche die Signale niedrigster Intensität repräsentierten ( $m/z$  792.7, 794.7, 810.7, 892.8; vgl. hierzu Abbildung 7), wurden in der GC-MS basierten Analyse nicht nachgewiesen. Die entsprechenden Fettsäuren konnten mit C20h:1, C20h:0, C21h:0 und C27h:0 berechnet werden. Es war hierbei davon auszugehen, dass ihre Mengenanteile unterhalb der Nachweisgrenze der Fettsäureanalytik lagen.

Da Palmitinsäure (C16:0) und Erucasäure (C22:1) keiner registrierten GalCer-Komponente zugeordnet werden konnten, wurde ihre Nachweis als in erster Linie kontaminationsbedingt bewertet. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die in Tabelle 7 aufgeführten Ceramid-Zusammensetzungen keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben können. Zusätzliche, die ebenfalls identifizierte Sphingoidbase C18-Sphingarin (d18:0) aufweisende Nebenkomponenten blieben in dieser Zusammenstellung unberücksichtigt. So könnte die Ceramid-Komponente des Galactosylcerebrosids bei  $m/z$  806.7 neben der vorherrschenden Zusammensetzung d18:1 und Behensäure (C22:0) ebenso eine Nebenkomponente aus d18:0 und C22:1 enthalten.

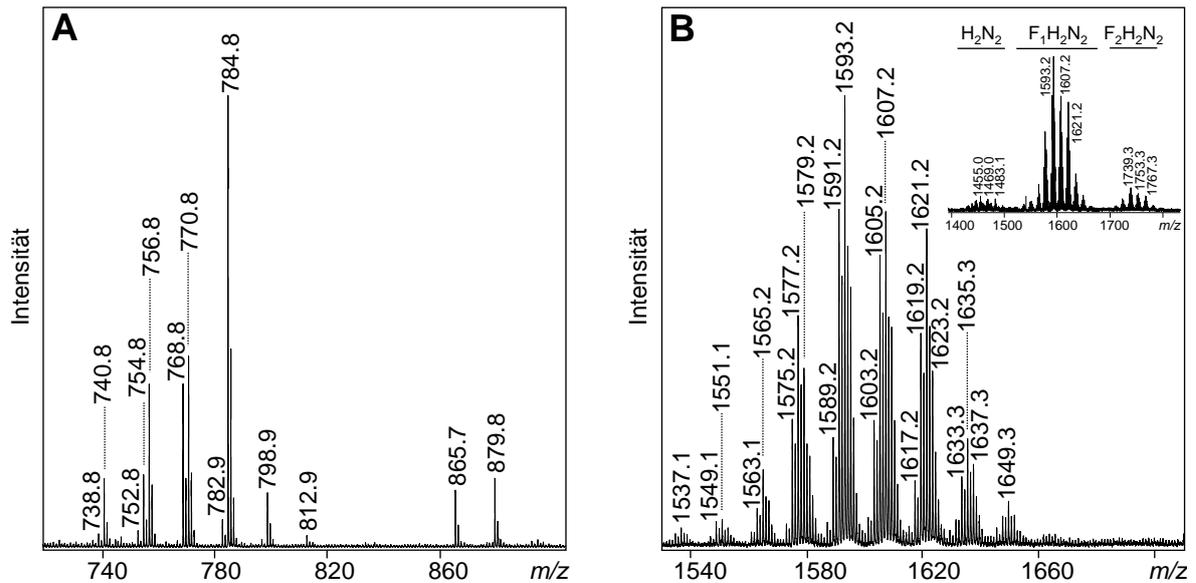
## 4.2 Strukturelle Charakterisierung des Ceramid-Komponenten von GSL aus Cercarien

Die Anwendbarkeit der etablierten Methode zur simultanen Charakterisierung der in GSL enthaltenen Sphingoidbasen und korrespondierenden Fettsäuren (4.1) auf biologische Proben wurde an CMH aus Cercarien überprüft, um sie anschließend auf die Analyse der Ceramid-Zusammensetzungen Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragender GSL aus Cercarien anzuwenden.

### 4.2.1 Massenspektrometrische Untersuchung nativer GSL

Die MALDI-MS Analysen der fraktionierten GSL aus Cercarien (vgl. hierzu 3.3.1) zeigten, dass CMH-Komponenten nahezu ausschließlich in Fraktion 2 detektierbar waren (Abbildung 13A), während entsprechende Signale in anderen Fraktionen kaum registriert werden konnten (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen zur Ceramid-Zusammensetzung von CMH aus Cercarien [62, 168] konnten Signale bei  $m/z$  738.8, 740.8, 752.8, 754.8, 756.8, 768.8, 770.8, 782.9, 784.8, 798.9, 812.9, 865.7 und 879.8 detektiert werden, welche CMH-Spezies unterschiedlicher Ceramid-Zusammensetzungen repräsentierten. CMH bei  $m/z$  784.8 wurde hierbei als Hauptkomponente registriert.

---



**Abbildung 13** MALDI-MS Analyse nativer GSL aus Cercarien

Massenspektrometrische Untersuchung nativer GSL der Fraktionen 2 (A) und 6 (B). Die GSL wurden als Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  registriert. Das MALDI-MS Spektrum der Fraktion 6 zeigt den Ausschnitt  $Le^X$ -Pentasaccharid-tragender GSL; das komplette Spektrum registrierter GSL ist im Inset gezeigt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in (B) nicht alle detektierten Signale annotiert. H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose;  $H_2N_2$ , Oligosaccharid, welches aus zwei Hexose- und zwei *N*-Acetylhexosamin-Bausteinen besteht, etc.

Komplexere GSL wurden in den Fraktionen 5 bis 9 detektiert, während in den Fraktionen 10 bis 12 keine GSL mehr nachweisbar waren. Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass komplexe GSL aus Cercarien von  $Le^X$ - und pseudo- $Le^Y$ -tragenden Strukturen dominiert werden [14]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurden  $Le^X$ -Pentasaccharid-tragende GSL vorwiegend in den Fraktionen 5 (Daten nicht gezeigt) und 6 nachgewiesen (Abbildung 13B). Das Inset in Abbildung 13B verdeutlicht die dominierende Präsenz  $Le^X$ -Pentasaccharid-tragender GSL (Monosaccharid-Zusammensetzung von  $Le^X$ -Pentasaccharid: Ein Fucose-, zwei Hexose- und zwei *N*-Acetylhexosamin-Bausteine; Abk.  $F_1H_2N_2$ ) im Vergleich zu pseudo- $Le^Y$ -exprimierenden Strukturen (Monosaccharid-Zusammensetzung  $F_2H_2N_2$ ). GSL, welche das nicht fucosylierte Tetrasaccharid tragen (Monosaccharid-Zusammensetzung  $H_2N_2$ ), wurden ebenfalls in niedrigen Signalintensitäten registriert. Der Nachweis von insgesamt 30 Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$   $Le^X$ -Pentasaccharid-tragender GSL spiegelte die große Heterogenität der Ceramid-Zusammensetzungen komplexer GSL aus Cercarien wider ( $m/z$  1537.1 - 1651.3; zu Gunsten der Übersichtlichkeit sind nicht alle detektierten Signale in Abbildung 13B annotiert). Da eine Zugabe von Natriumchlorid (NaCl) zum Proben spot nicht zu einer Veränderung der relativen Signalintensitäten führte, konnte das Vorliegen von Kaliumaddukten ( $[M+K]^+$ ) ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Während die registrierten Ceramid-Muster  $Le^X$ - und pseudo-

Le<sup>Y</sup>-tragender GSL identisch waren, unterschieden sich H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>-tragende GSL hinsichtlich der detektierten Signalverhältnisse hiervon deutlich (vgl. hierzu Inset Abbildung 13B; Daten nicht gesondert gezeigt). Das Ceramid-Muster nativer GSL aus Fraktion 5 war dem nativer GSL aus Fraktion 6 sehr ähnlich (Daten nicht gezeigt).

Während Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragende GSL in allen Folgefraktionen mit sehr niedrigen Signalintensitäten registriert wurden, konnten in Fraktion 8 weitere komplexe GSL detektiert werden, für deren Kohlenhydrat-Anteile in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen [14] die Monosaccharid-Zusammensetzungen F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, F<sub>2</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub> und F<sub>2</sub>H<sub>2</sub>N<sub>4</sub> berechnet wurden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.2 Enzymatischer Verdau nativer GSL mit SCDase

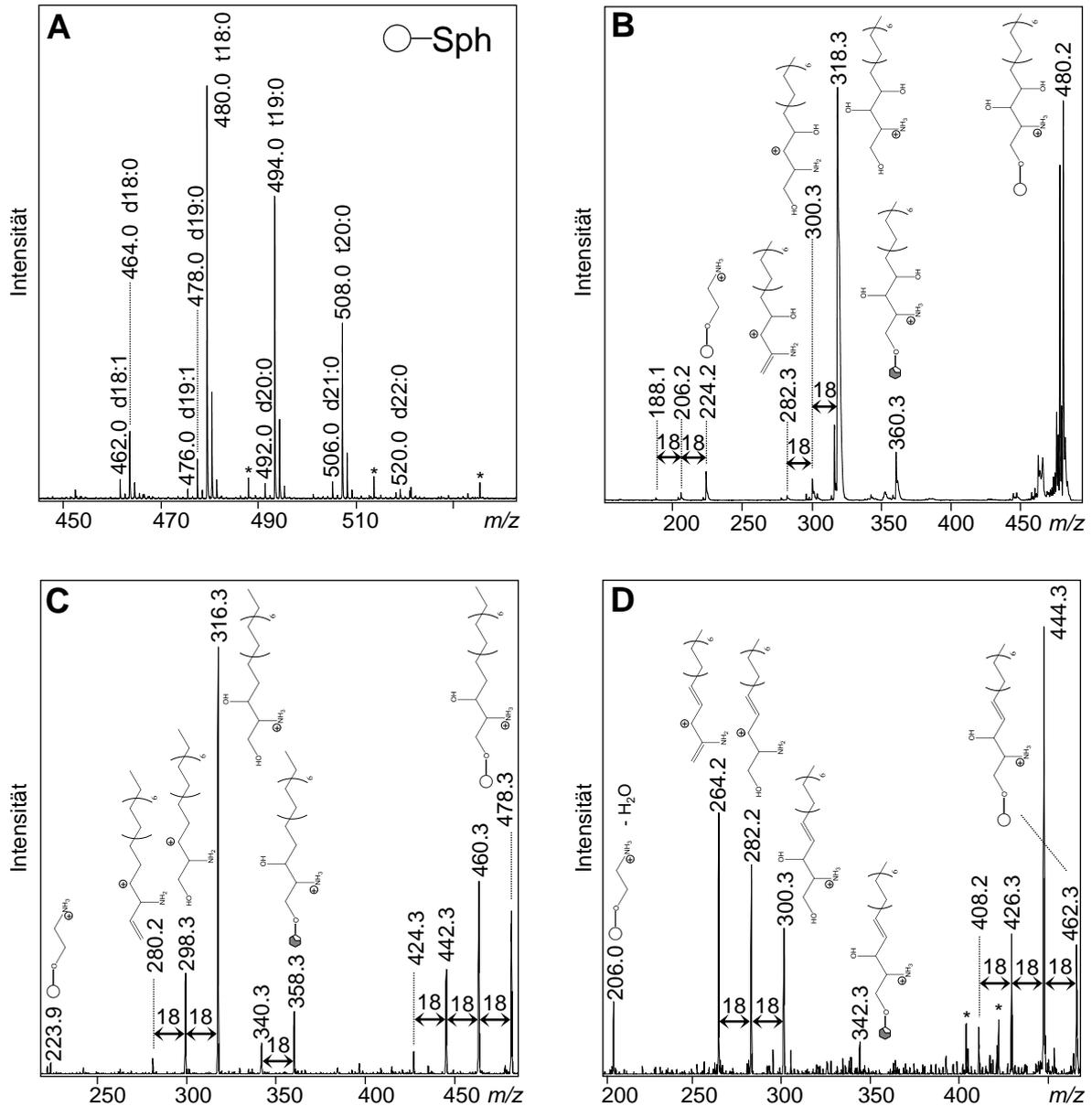
Zur strukturellen Charakterisierung der Ceramid-Komponenten wurden die nativen GSL der Fraktionen 2, 5 und 6 mit SCDase enzymatisch verdaut (3.7.2). Parallel dazu durchgeführte, HPLC-basierte Monosaccharid-Analysen der Fraktionen 5 und 6 ergaben einen Gesamtgehalt an Kohlenhydraten von 4.6 µg bzw. 2.6 µg. Entsprechend wurde für die Fraktion 2 einen Gehalt von 108 µg ermittelt (Daten nicht gezeigt).

##### 4.2.2.1 Massenspektrometrische Untersuchung der Lyso-GSL

###### *Lyso-GSL von CMH*

Die MALDI-MS Analyse der aus Fraktion 2 freigesetzten Lyso-GSL ließ auf das Vorhandensein von C18- und C19-Sphingosin (Hex-d18:1 (Lyso-GSL bestehend aus einer Hexose und C18-Sphingosin), *m/z* 462.0; Hex-d19:1, *m/z* 476.0), C18- bis C22-Sphingarin (Hex-d18:0 - Hex-d22:0, *m/z* 464.0, 478.0, 492.0, 506.0, 520.0) und C18- bis C20-Phytosphingosin (Hex-t18:0 - Hex-t20:0, *m/z* 480.0, 494.0, 508.0) in CMH schließen, wobei Hex-t18:0 (*m/z* 480.0), Hex-t19:0 (*m/z* 494.0) und Hex-t20:0 (*m/z* 508.0) als Hauptkomponenten detektiert wurden (Abbildung 14A).

Die Verifizierung der anhand von MALDI-MS Analysen errechneten Präsenz der einzelnen Sphingoidbasen in Lyso-CMH erfolgte in MALDI-MS/MS bzw. ESI-MS<sup>2</sup> Untersuchungen (Abbildung 14B-D). Hierbei resultierte die weitere Fragmentierung von Hex-t18:0 (*m/z* 480.0) in einer MALDI-MS/MS Analyse in der Detektion der freien Sphingoidbase C18-Phytosphingosin (*m/z* 318.3) (Abbildung 14B). Mit sehr viel geringeren Intensitäten waren Signale, welche eine einfache bzw. doppelte Wasserabspaltung der freien Base repräsentierten, detektierbar (*m/z* 300.3, 282.3). Die Signalgruppe *m/z* 224.2, 206.2 und 188.1 konnte aus der Fragmentierung der Sphingoidbase in Kombination mit Wasserabspaltungen der Hexose hervorgegangen sein. Darüber hinaus erklärte ein <sup>0,2</sup>X<sub>0</sub>-Ringbruch der Hexose das Signal *m/z* 360.3, so dass sich das registrierte Fragmentierungsmuster zusammenfassend als C18-Phytosphingosin-spezifisch darstellte.



**Abbildung 14** Massenspektrometrische Analyse kleiner Lyso-GSL aus Cercarien

(A), MALDI-MS Spektrum enzymatisch freigesetzter Lyso-GSL aus Fraktion 2, wobei die Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$  jeweils nur mit der entsprechenden Sphingoidbase annotiert sind. (B), MALDI-MS/MS Spektrum von Hex-t18:0 bei  $m/z$  480.0. (C), ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von Hex-d19:0 bei  $m/z$  478.0. (D), ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von Hex-d18:1 bei  $m/z$  462.0. Die Annotation der registrierten Fragmentationen  $[M+H]^+$  erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. Hierbei sind die gezeigten Strukturen einzelner Fragmente jeweils beispielhaft für einen möglichen Fragmentierungspfad gewählt. Wasserabspaltungen sind durch schwarze Doppelpfeile ( $\Delta m/z$  18) gekennzeichnet. undefinierte Signale sind mit einem Stern (\*) markiert. d18:1, C18-Sphingosin; d18:0 - d21:0, C18- bis C21-Sphingarin; t18 - t20:0, C18- bis C20-Phytosphingosin; weißer Kreis, Hexose; Sph, Sphingoidbase. Ein partiell schattierter Sechsering markiert einen  $^{0,2}X_0$ -Ringbruch der Hexose.

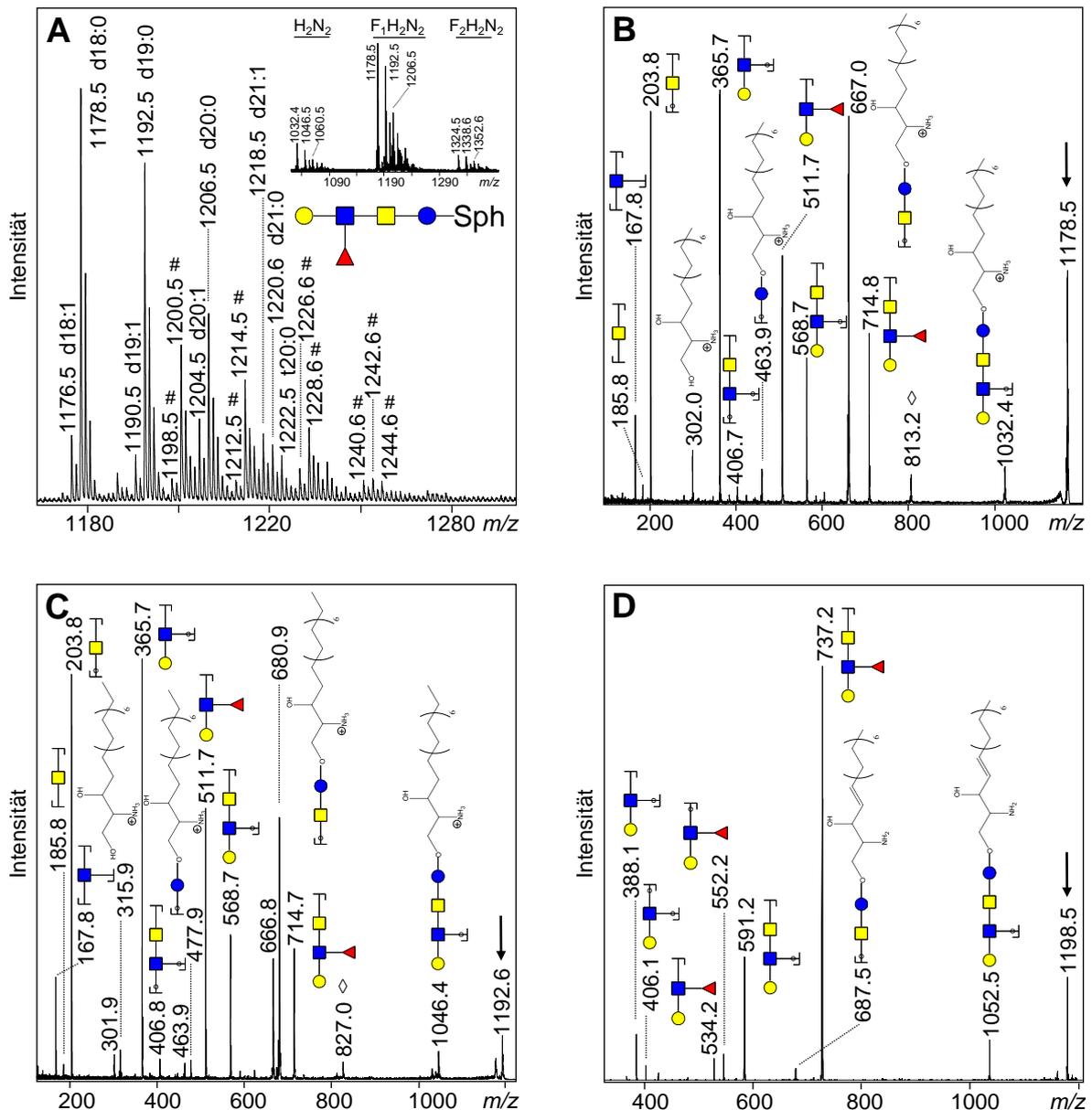
In gleicher Weise resultierte die ESI-MS<sup>2</sup> Analyse von Hex-d19:0 ( $m/z$  478.0) in der Detektion der freien Sphingoidbase C19-Sphingarin bei  $m/z$  316.3 (Abbildung 14C). Wasserabspaltungen von der freien Base resultierten in der Detektion der Signale  $m/z$  298.3 und 280.2. Ein <sup>0,2</sup>X<sub>0</sub> Ringbruch der Hexose in Kombination mit einer Wasserabspaltung der Sphingoidbase konnten die Signalgruppe  $m/z$  358.3 / 340.3 erklären. Eine Fragmentierung der Sphingoidbase resultierte in der Detektion des Signals  $m/z$  223.9, wie es bereits bei der Fragmentierung von Hex-t18:0 registriert worden war (vgl. Abbildung 14B). Darüber hinaus konnten Wasserabspaltungen vom *precursor* bei  $m/z$  460.3, 442.3 und 424.3 registriert werden.

Die ESI-MS<sup>2</sup> Analyse von Hex-d18:1 resultierte in der Detektion der gleichen sphingoidbasenspezifischen Signale, wie sie bereits bei der massenspektrometrischen Untersuchung von Hex-t18:0 sowie Hex-d19:0 registriert werden konnten, und verifizierte somit C18-Sphingosin als Komponente des Lyso-CMH bei  $m/z$  462.0 (Abbildung 14D). Besonders auffallend waren hierbei die hohen Signalintensitäten, in denen die Produkte der einfachen und doppelten Wasserabspaltung von der freien Sphingoidbase detektiert wurden ( $m/z$  282.2, 264.2). In Anlehnung an die gezeigten Strukturen möglicher Fragmentionen, war dies als Ausdruck des im Zuge der Wasserabspaltungen gebildeten mesomeriestabilisierten Carbeniumions zu erklären.

Die dargestellten Fragmentstrukturen in Abbildung 14B-D sind den entsprechenden Signalen rein rechnerisch basierend auf einem möglichen Fragmentierungspfad zugeordnet. Hierbei konnten die Feststellungen, dass Ringbrüche der Hexose ( $m/z$  360.3, 358.3, 342.3) in der Detektion sphingoidbasenspezifischer Signale resultierten und Fragmentierungen des hexosenahen Teils der Sphingoidbase zur Generierung massengleicher Fragmentionen führten ( $m/z$  224.2 bzw. 223.9, 206.2 bzw. 206.0), die erfolgten Annotationen bestätigen.

In analoger Weise wurde das Vorkommen aller in Abbildung 14A annotierten Sphingoidbasen in CMH aus Cercarien anhand des charakteristischen Fragmentierungsmusters der verschiedenen Lyso-GSL über MALDI-MS/MS bzw. ESI-MS<sup>2</sup> Untersuchungen verifiziert (Daten nicht gezeigt).

---

Lyso-GSL Le<sup>X</sup>-tragender GSL

**Abbildung 15** Massenspektrometrische Analyse Le<sup>X</sup>-tragender Lyso-GSL aus Cercarien

(A), MALDI-MS Spektrum enzymatisch freigesetzter Lyso-GSL aus Fraktion 6, wobei die Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$  jeweils nur mit der entsprechenden Sphingoidbase annotiert sind. Natriumaddukte  $[M+Na]^+$  sind mit einer Raute (#) markiert. Es ist nur der Ausschnitt Le<sup>X</sup>-Pentasaccharidtragender Lyso-GSL gezeigt; das vollständige Spektrum registrierter Lyso-GSL ist im Inset abgebildet. (B), MALDI-MS/MS Spektrum von F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>-d18:0 bei  $m/z$  1178.5 (Pfeil). (C), MALDI-MS/MS Spektrum von F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>-d19:0 bei  $m/z$  1192.5 (Pfeil). (D), ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>-d18:1 bei  $m/z$  1198.5 (Pfeil). Die Annotation registrierter Fragmentationen  $[M+H]^+$  in (B) und (C) bzw.  $[M+Na]^+$  in (D) erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. Die mit einem weißen Rhombus (◇) gekennzeichneten Signale werden durch eine Fucosewanderung erklärt. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; Sph, Sphingoidbase; d18:1 - d21:1, C18- bis C21-Sphingosin; d18:0 - d21:0, C18- bis C21-Sphingarin; t20:0, C20-Phytosphingosin; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose; H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, Glykan bestehend aus zwei Hexose- und zwei *N*-Acetylhexosamin-Bausteinen, etc.

Die MALDI-MS Analysen der durch enzymatischen Verdau nativer GSL aus den Fraktionen 5 und 6 freigesetzten Lyso-GSL resultierten in der Detektion eines identischen Lyso-GSL-Musters, so dass im Folgenden nur die Daten zur Fraktion 6 gezeigt werden sollen.

Hier konnten hinsichtlich  $\text{Le}^{\text{X}}$ -tragender Lyso-GSL Sphinganin-basierte Strukturen als Hauptkomponenten detektiert werden ( $\text{F}_1\text{H}_2\text{N}_2\text{-d18:0}$  -  $\text{F}_1\text{H}_2\text{N}_2\text{-d21:0}$ ,  $m/z$  1178.5, 1192.5, 1206.5, 1220.6) (Abbildung 15A). C18- bis C21-Sphingosin ( $\text{F}_1\text{H}_2\text{N}_2\text{-d18:1}$  -  $\text{F}_1\text{H}_2\text{N}_2\text{-d21:1}$ ,  $m/z$  1176.5, 11950.5, 1204.5, 1218.5) sowie C20-Phytosphingosin ( $\text{F}_1\text{H}_2\text{N}_2\text{-t20:0}$ ,  $m/z$  1222.5) wurden als Sphingoidbasen der Nebenkomponten registriert. Ein identisches Muster registrierter Lyso-Formen wurde ebenfalls hinsichtlich  $\text{H}_2\text{N}_2$ - sowie  $\text{F}_2\text{N}_2\text{N}_2$ -tragenden Lyso-GSL beobachtet: C18- bis C21-Sphinganin repräsentierten auch hier die vorherrschenden Sphingoidbasen, während Sphingosin-basierte Lyso-Formen in deutlich geringerer Intensität detektiert wurden (vgl. hierzu Inset Abbildung 15B; Daten nicht gesondert gezeigt).

Die Verifizierung der errechneten Zusammensetzungen detektierter Lyso-GSL erfolgte durch deren weitere Fragmentierung in MALDI-MS/MS und ESI-MS<sup>2</sup> Experimenten. Die MALDI-MS/MS Analyse von  $\text{F}_1\text{H}_2\text{N}_2\text{-d18:0}$  ( $m/z$  1178.5) bestätigte aufgrund der Detektion kohlenhydrat- und sphingoidbasenspezifischer Fragmentierungsmuster die Präsenz von  $\text{Le}^{\text{X}}$ -Pentasaccharid und C18-Sphinganin (Abbildung 15B). Neben den C18-Sphinganin-basierenden Y-Fragmentionen  $m/z$  463.9, 667.0 und 1032.4 konnte zusätzlich die freie Base bei  $m/z$  302.0 nachgewiesen werden. Die gleichzeitige Detektion  $\text{Le}^{\text{X}}$ -Pentasaccharid-typischer Fragmente wie beispielsweise von  $\text{B}_2$ - und  $\text{B}_3$ -Fragmentionen bei  $m/z$  511.7 und 714.8 erlaubte die endgültige Verifizierung von  $\text{Le}^{\text{X}}$ -Pentasaccharid-d18:0. Das Signal  $m/z$  813.2 war durch einen Bindungsbruch zwischen den beiden *N*-Acetylhexosaminen nach Fucosewanderung erklärbar [169, 170].

In analoger Weise konnte die MALDI-MS/MS Analyse von  $\text{F}_1\text{H}_2\text{N}_2\text{-d19:0}$  ( $m/z$  1192.5) die Präsenz von  $\text{Le}^{\text{X}}$ -Pentasaccharid-d19:0 bestätigen (Abbildung 15C). Kohlenhydratstruktur-spezifische Fragmentionen wurden bei  $m/z$  167.8, 185.8, 203.8, 365.7, 511.7, 568.7 und 714.7 detektiert und waren somit identisch zu den bereits bei der MALDI-MS/MS Analyse von  $\text{Le}^{\text{X}}$ -Pentasaccharid-d18:0 registrierten Signalen. Ein durch den Bindungsbruch zwischen den beiden *N*-Acetylhexosaminen nach Fucosewanderung erklärbares Signal ( $m/z$  827.0) konnte ebenfalls detektiert werden. Des Weiteren wurden sowohl die freie Base C19-Sphinganin ( $m/z$  315.9) als auch mehrere C19-Sphinganin-aufweisende Y-Fragmentionen ( $m/z$  477.9, 680.9, 1046.4) registriert. Auffallend war hierbei, dass neben den C19-Sphinganin-spezifischen Fragmentionen ebenfalls entsprechende Signale bei einem um 14 Masseneinheiten verringerten  $m/z$ -Quotienten detektiert werden konnten ( $m/z$  301.9/315.9, 463.9/477.9, 666.8/680.9). Da die Abspaltung einer verzweigten Methylgruppe in einer Verringerung des  $m/z$ -Quotienten von 14 resultiert, könnte diese Beobachtung als indikativ für

die Präsenz verzweigter Sphingoidbasen gewertet werden. Entsprechende Satellitensignale konnten ebenso bei der MALDI-MS/MS Analyse von  $F_1H_2N_2$ -d20:0 ( $m/z$  1206.5) registriert werden (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu der MALDI-MS/MS Analyse von Protonenaddukten  $[M+H]^+$  waren bei der ESI-MS<sup>2</sup> Analyse von Natriumaddukten ( $[M+Na]^+$ ) sphingoidbasenspezifische Fragmentationen in sehr viel geringerer Intensität detektierbar. Wie am Beispiel der ESI-MS<sup>2</sup> Analyse von  $F_1H_2N_2$ -d18:1 ( $m/z$  1198.5) gezeigt, erfolgte die Verifizierung von C18-Sphingosin anhand des nach Abspaltung von Fucose gebildeten Y-Fragmentions bei  $m/z$  1052.5. Ein durch Abspaltung des Lewis-Epitops generiertes Y-Fragmention (hier:  $m/z$  687.5) konnte nicht immer sicher detektiert werden. Unter Berücksichtigung der Detektion entsprechender kohlenhydratspezifischer Fragmentationen ( $m/z$  388.1 - 591.2 und 737.2) konnte die ESI-MS<sup>2</sup> Analyse die Präsenz von  $Le^X$ -Pentasaccharid-d18:1 jedoch bestätigen.

In analoger Weise erfolgte die Verifizierung von C19- bis C21-Sphingosin, C21-Sphinganin und C20-Phytosphingosin in  $Le^X$ -Pentasaccharid-tragenden Lyso-GSL (Daten nicht gezeigt). Lyso-GSL, deren Kohlenhydratstrukturen die Monosaccharid-Zusammensetzungen  $H_2N_2$  und  $F_2H_2N_2$  aufzeigten, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht detailliert charakterisiert (vgl. hierzu 4.2.3).

#### 4.2.2.2 Fettsäureanalytik

Das Ergebnis der Analytik der nach enzymatischem Verdau nativer GSL von Cercarien aus den Fraktionen 2 und 6 in den organischen Phasen enthaltenen Fettsäuren (3.10.3), welches weitgehend mit früheren Untersuchungen zur Ceramid-Zusammensetzung von CMH und komplexeren GSL aus Cercarien übereinstimmt [62], ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Es konnte gezeigt werden, dass beim enzymatischen Verdau nativer GSL der Fraktion 2, welche ausschließlich CMH-Komponenten repräsentierten (vgl. hierzu Abbildung 13A), hauptsächlich hydroxylierte Palmitinsäure (C16h:0) und zu einem geringeren Anteil nicht-hydroxylierte Palmitinsäure (C16:0) freigesetzt wurden. Darüber hinaus konnten längerkettige Fettsäuren mit bis zu 28 Kohlenstoffatomen in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führte der enzymatische Verdau nativer GSL der Fraktion 6, welche hauptsächlich  $Le^X$ -Pentasaccharid-tragende GSL darstellten (vgl. hierzu Abbildung 13B), zur überwiegenden Freisetzung langkettiger Fettsäuren mit 24 bis 28 Kohlenstoffatomen. Mit einem errechneten Anteil von 47% wurde hierbei C26:0 als Hauptkomponente nachgewiesen. C16h:0 konnte nicht detektiert werden. Anhand der jeweiligen Massenspektren O-acetylierter Fettsäuremethylester von C16h:0 und C18h:0 aus Fraktion 2 konnte durch den Nachweis deutlicher Signale bei  $m/z=M-59$  auf die Präsenz von  $\alpha$ -Hydroxyfettsäuren geschlossen werden. Ein entsprechendes Signal konnte im Massenspektrum der O-acetylierten Fettsäure

---

C25h:0 in sehr geringen Intensitäten nachgewiesen werden.

Fettsäure	relative Häufigkeit (%)	
	F2	F6
C16:0	27	+
C16h:0	48	n.d.
C18:0	+	+
C18h:0	3	+
C20:0	3	4
C22:0	2	5
C24:0	4	12
C25:0	3	13
C25h:0	2	n.d.
C26:0	5	47
C26:1	n.d.	3
C27:0	n.d.	9
C28:0	2	8

**Tabelle 8** Fettsäureanalytik nach enzymatischem Verdau der GSL aus Cercarien

Die durch enzymatischen Verdau von GSL aus den Fraktionen 2 (F2) und 6 (F6) freigesetzten Fettsäuren wurden als, zum Teil O-acetylierte, Fettsäuremethylester GC-MS-basiert analysiert (3.10.3). Die mit einem Plus (+) markierten Fettsäuren konnten keiner spezifischen Ceramid-Zusammensetzung zugeordnet werden und blieben daher bei der Berechnung der relativen Häufigkeit der einzelnen Fettsäuren unberücksichtigt. C16:0, gesättigte, nicht-hydroxylierte Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen; C16h:0, gesättigte, hydroxylierte Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen; C26:1, einfach ungesättigte, nicht-hydroxylierte Fettsäure mit 26 Kohlenstoffatomen, etc.; n.d., nicht detektiert.

#### 4.2.3 Struktur der Ceramid-Komponenten von GSL aus Cercarien

Unter Berücksichtigung der massenspektrometrischen Analyse der aus dem enzymatischen Verdau nativer GSL resultierenden Lyso-GSL (4.2.2.1) sowie der GC-MS-basierten Analyse freigesetzter Fettsäuren (4.2.2.2) konnten die Ceramid-Zusammensetzungen der in den Fraktionen 2 und 6 detektierten GSL ermittelt werden. Die für CMH-Komponenten der Fraktion 2 (vgl. hierzu Abbildung 13A) ermittelten Ceramid-Zusammensetzungen sind in Tabelle 9 zusammenfassend dargestellt. Entsprechend errechnete Ceramid-Zusammensetzungen Le<sup>X</sup>-tragender GSL aus Fraktion 6 (vgl. hierzu Abbildung 13B) sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die berechneten Ceramid-Zusammensetzungen von CMH (Tabelle 9) sowie Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragenden GSL (Tabelle 10) jeweils auf den dominierenden Sphingoidbasen detektierter Lyso-GSL sowie den analysierten Hauptfettsäuren beruhen. Darüber hinaus könnte eine Vielzahl isobarer Nebenkomponenten errechnet werden, welche aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht aufgeführt sind

Pseudomolekülion ( <i>m/z</i> )	Ceramid-Zusammensetzung	
	Sphingoidbase	Fettsäure
738.8	d18:1 (d19:0)	C16h:0 (C16:0)
740.8	t18:0 (d18:0)	C16:0 (C16h:0)
752.8	d19:1 (d20:0)	C16h:0 (C16:0)
754.8	t19:0 (d19:0)	C16:0 (C16h:0)
756.8	t18:0	C16h:0
768.8	t20:0 (d20:0)	C16:0 (C16h:0)
770.8	t19:0	C16h:0
782.9	d21:0	C16h:0
784.8	t20:0	C16h:0
798.9	t19:0	C18h:0
812.9	t20:0	C18h:0
865.7	d18:0	C26:0
879.8	d19:0	C26:0

**Tabelle 9** Strukturvorschläge zur Ceramid-Zusammensetzung von CMH aus Cercarien

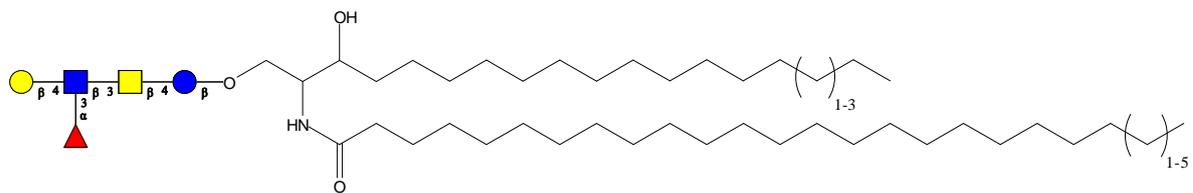
Errechnete Ceramid-Zusammensetzungen der Pseudomolekülionen  $[M+Na]^+$  von CMH aus Cercarien (vgl. hierzu Abbildung 13A) basierend auf der massenspektrometrischen Untersuchung enzymatisch freigesetzter Fettsäuren (4.2.2.2) und Lyso-Verbindungen (4.2.2.1). Es sind jeweils die Hauptkomponenten gezeigt, entsprechende Nebenkomponenten sind in Klammern gesetzt. d18:1, C18-Sphingosin; d18:0 - d21:0, C18- bis C21-Sphinganin; t18 - t20:0, C18- bis C20-Phytosphingosin; C16:0, gesättigte, nicht-hydroxylierte Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen; C16h:0, gesättigte, hydroxylierte Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen; etc.

Pseudomolekülion ( <i>m/z</i> )	Ceramid-Zusammensetzung	
	Sphingoidbase	Fettsäure
1563.1	d18:1 oder d19:1	C25:0 oder C24:0
1565.2	d18:0 oder d19:0	C25:0 oder C24:0
1575.2	d18:1	C26:1
1577.2	d18:1 oder d18:0	C26:0 oder C26:1
1579.2	d18:0 - d20:0	C26:0 - C24:0
1581.2	n.k.	n.k.
1589.2	d19:1	C26:1
1591.2	d19:1 oder d19:0	C26:0 oder C26:1
1593.2	d18:0 oder d19:0	C27:0 oder C26:0
1595.2	t20:0	C24:0
1603.2	d20:1	C26:1
1605.2	d20:1 oder d20:0	C26:0 oder C26:1
1607.2	d18:0 - d20:0	C28:0 - C26:0
1609.2	t20:0	C25:0
1617.2	d21:1	C26:1
1619.2	d21:1	C26:0
1621.2	d19:0 - d21:0	C28:0 - C26:0
1623.2	t20:0	C26:0
1633.3	d21:1	C27:0
1635.3	d20:0	C28:0
1637.3	t20:0	C27:0
1649.3	d21:0	C28:0

**Tabelle 10** Strukturvorschläge zur Ceramid-Zusammensetzung Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragender GSL aus Cercarien

Errechnete Ceramid-Zusammensetzungen von Pseudomolekülonen [M+Na]<sup>+</sup> Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragender Lyso-GSL aus Cercarien basierend auf der massenspektrometrischen Untersuchung enzymatisch freigesetzter Fettsäuren (4.2.2.2) und entsprechender Lyso-Verbindung (4.2.2.1). Es sind jeweils nur die vorherrschenden Kombinationen detektierter Hauptkomponenten (vgl. hierzu Abbildung 13B) gezeigt. d18:1 - d21:1, C18- bis C21-Sphingosin; d18:0 - d21:0, C18- bis C21-Sphinganin; t20:0, C20-Phytosphingosin; C24:0, gesättigte, nicht-hydroxylierte Fettsäure mit 24 Kohlenstoffatomen; C26:1 ungesättigte, nicht-hydroxylierte Fettsäure mit 26 Kohlenstoffatomen, etc.; n.k. nicht kalkulierbar.

Die Ergebnisse zeigten in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen [62], dass CMH-Komponenten aus Cercarien überwiegend aus C18- bis C20-Phytosphingosinen in Kombination mit Palmitinsäure (C16:0) sowie deren hydroxylierter Form (C16h:0) bestehen. Im Gegensatz hierzu dominierten bei Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragenden GSL Ceramid-Zusammensetzungen mit C18- bis C21-Sphinganinen sowie einem geringen Anteil an C18- bis C21-Sphingosinen und C20-Phytosphingosin in entsprechenden Kombinationen mit gesättigten und ungesättigten, langkettigen Fettsäuren (C24:0 – C28:0; C26:1). In Abbildung 16 ist die hieraus abgeleitete prototypische Struktur Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragender GSL aus Cercarien schematisch dargestellt.



**Abbildung 16** Strukturvorschlag für Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragende GSL aus Cercarien

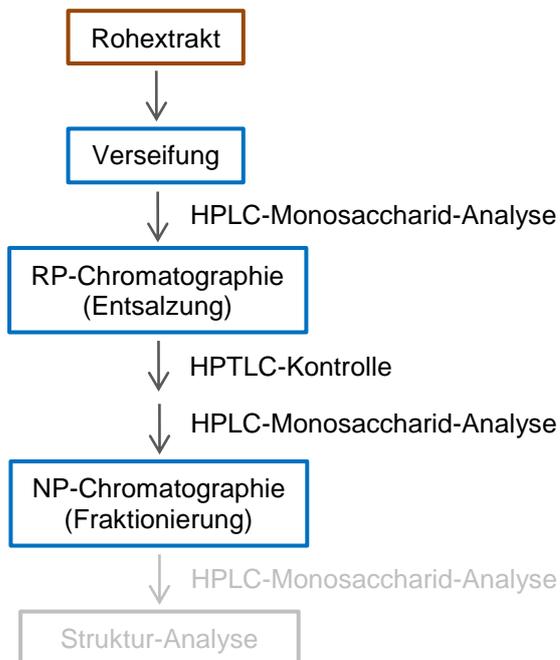
Prototyp Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragender GSL aus Cercarien mit C18- bis C21-Sphinganinen und langkettigen Fettsäuren mit 24 bis 28 Kohlenstoffatomen. Sphingosin-Derivate sowie ungesättigte Fettsäuren sind nicht illustriert. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose.

Darüber hinaus wurden Ceramid-Zusammensetzungen weiterer komplexer GSL von Cercarien nicht detailliert analysiert. Da jedoch die registrierten Ceramid-Muster sowie Lyso-GSL-Muster Le<sup>X</sup>- und pseudo-Le<sup>Y</sup>-tragender GSL nahezu identisch waren (vgl. hierzu Abbildung 13B und Abbildung 15A), kann zumindest basierend auf diesen Ergebnissen von identischen Ceramid-Zusammensetzungen ausgegangen werden.

## 4.3 Strukturelle Charakterisierung der GSL aus adulten Würmern

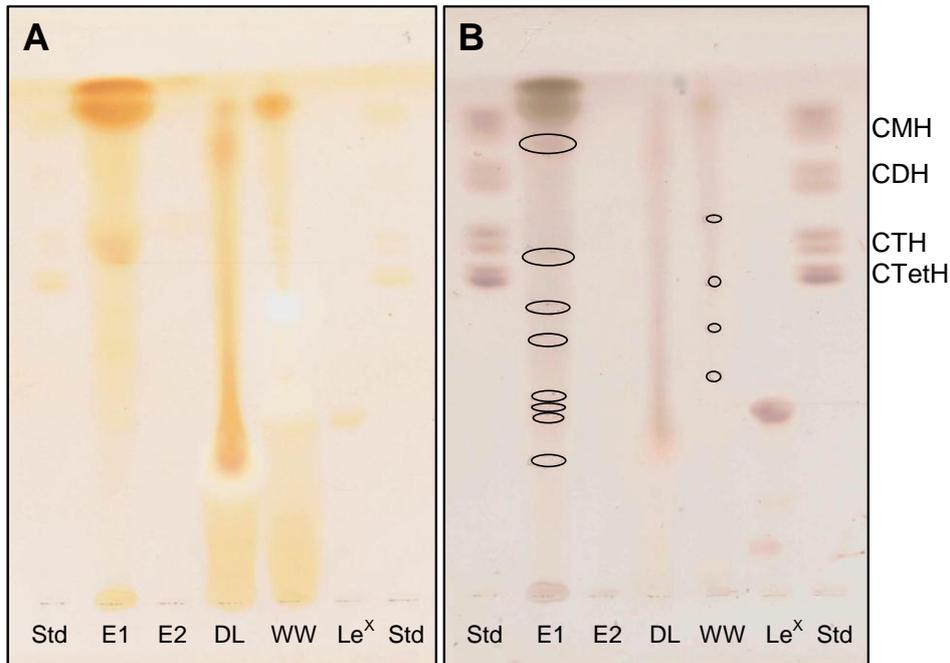
### 4.3.1 Aufreinigung des Rohextraktes

Die Aufreinigung des Rohextraktes aus adulten Würmern (3.3.1) erfolgte nach dem in Abbildung 17 dargestellten Schema.



**Abbildung 17** Schematische Darstellung der Aufarbeitung von Glykolipiden

Zu Beginn der Aufarbeitung ergab eine HPLC-basierte Monosaccharid-Analyse (3.5) im Anschluss an die Verseifung des Rohextraktes (3.4.1) einen Kohlenhydratgehalt von insgesamt 330 µg. Nach darauffolgender Entsalzung über RP-Chromatografie (3.4.2) erfolgte die erste Qualitätskontrolle der GSL-Aufarbeitung mittels HPTLC-basierter Trennung und chemischer Detektion (3.4.3) der sowohl in beiden Eluaten, als auch in WW und Durchlauf (DL) enthaltenen Glykolipide (Abbildung 18). Deutlich erkennbar waren hierbei im Eluat 1 auf Höhe der Lauffront detektierbare intakte Phospholipide, welche auf eine nicht vollständige Verseifung des Rohextraktes schließen ließen. Aufgrund der Polaritätsunterschiede von Phospholipiden und komplexen GSL konnte jedoch in der darauffolgenden NP-Chromatographie eine deutliche Trennung beider Lipidklassen erwartet werden, so dass mit einer Störung der strukturellen Charakterisierung komplexer GSL durch enthaltene Phospholipide nicht zu rechnen war. Aus diesem Grund wurde zur Vermeidung weiterer Probenverluste auf eine erneute Verseifung verzichtet.



**Abbildung 18** HPTLC von (Glyko)- Lipiden aus adulten Würmern

Qualitätskontrolle der aufgearbeiteten GSL aus adulten Würmern mittels HPTLC und chemischer Detektion der (Glyko)-Lipide. (A), chemische Detektion von Lipiden mit Iod. (B), chemische Detektion von Kohlenhydraten mit Orcinol-Reagenz. Die bei der Färbung mit Orcinol-Reagenz nur im Durchlicht erkennbaren, schwach gefärbten Banden sind entsprechend ihrer Laufhöhe mit einer Ellipse markiert. Std, Qualmix-Standard (CMH, Ceramidmonohexosid; CDH, Ceramiddihexosid; CTH, Ceramidtrihexosid; CTetH, Ceramidtetrahexosid); E1, Eluat 1; E2, Eluat 2; DL, Durchlauf; WW, Waschwasser; Le<sup>X</sup>, LNFP III-Neo-Glykolipid.

Die spezifische Färbung von Kohlenhydraten (Abbildung 18B) resultierte in der Spur des Eluats 1 (E1) in der Detektion einer deutlichen Bande unterhalb der Laufhöhe der CMH des Standards und mehrerer schwacher Banden unterhalb der Laufhöhen der Ceramidtri- (CTH) und -tetrahexoside (CTetH). Darüber hinaus waren schwache Banden auf und unterhalb der Laufhöhe des Le<sup>X</sup>-tragenden Neo-Glykolipids erkennbar. Obwohl jeweils entsprechende Banden in der spezifischen Färbung von Lipiden (Abbildung 18A) vermutlich aufgrund der geringeren Sensitivität dieser Nachweismethode nicht detektierbar waren, deutete dieser Befund auf das Vorhandensein von CMH, CTH, CTetH und komplexeren GSL in der Aufarbeitung des Rohextraktes aus adulten Würmern hin. Im Gegensatz zu E1 waren im zweiten Eluat (E2) keine Glykolipide detektierbar. Darüber hinaus wiesen die deutlich erkennbaren Färbungen von Lipiden und Kohlenhydraten in den Laufspuren des WW und DL auf noch größere Mengen enthaltener Glykolipide hin.

Die anschließende HPLC-basierte Monosaccharid-Analyse (3.5) der beiden Eluate ergab einen Gesamtgehalt an Kohlenhydraten von 64.6 µg (E1) bzw. 0.8 µg (E2). Die entsprechenden Analysen von DL und WW beliefen sich auf 23.6 µg bzw. 11.7 µg Kohlenhydrate, so dass

DL und WW vereinigt und erneut über RP-Chromatographie (3.4.2) aufgereinigt wurden. Das hierbei gewonnene Glykolipid-enthaltende Eluat zeigte jedoch in der HPLC-Monosaccharid-Analyse deutliche Qualitätsminderungen (vergleichsweise hohe Mengen an Mannose, nicht-definierbarer Peak zur Retentionszeit 25,14 min), so dass es bei der weiteren Glykolipid-Aufarbeitung unberücksichtigt blieb.

Die darauffolgende Fraktionierung der in E1 enthaltenen Glykolipide mittels NP-Chromatographie erfolgte in acht Schritten (3.4.4). Wie aus Tabelle 11 ersichtlich, lagen die ermittelten Kohlenhydratmengen der hierbei gewonnenen Einzelfraktionen in einem Bereich von 1,6 bis 13,7 µg, wobei die Fraktionen 2, 5, 6 und 7 den größten Gehalt an Kohlenhydraten aufzeigten.

Fraktion	Monosaccharide [µg]							Summe
	GlcNAc	GalNAc	Gal	Man	Glc	Xyl	Fuc	
1	0.09	0.02	<b>0.29</b>	n.d.	<b>2.11</b>	0.05	n.d.	2.5
2	0.09	<b>0.20</b>	<b>2.98</b>	n.d.	<b>10.43</b>	0.04	n.d.	13.7
3	0.08	<b>0.41</b>	<b>0.35</b>	n.d.	<b>0.85</b>	0.07	n.d.	1.7
4	<b>0.20</b>	<b>0.35</b>	<b>0.59</b>	n.d.	<b>0.75</b>	n.d.	n.d.	1.9
5	<b>2.86</b>	<b>3.31</b>	<b>2.04</b>	0.51	<b>2.46</b>	n.d.	<b>1.72</b>	12.4
6	<b>3.23</b>	<b>3.44</b>	<b>0.63</b>	0.39	<b>1.78</b>	n.d.	<b>3.09</b>	12.2
7	<b>2.40</b>	<b>1.95</b>	<b>0.26</b>	0.41	<b>0.96</b>	n.d.	<b>2.07</b>	7.6
8	<b>0.42</b>	<b>0.22</b>	<b>0.16</b>	0.30	<b>0.56</b>	0.18	<b>0.28</b>	1.6

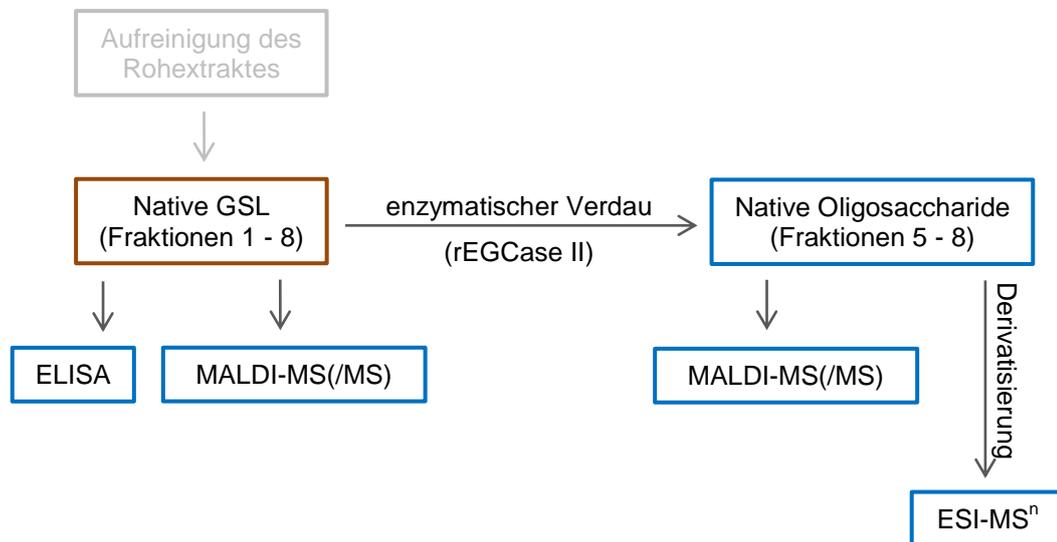
**Tabelle 11** HPLC-basierte Monosaccharid-Analyse der fraktionierten GSL aus adulten Würmern

Die fraktionierten GSL aus adulten Würmern wurden einer HPLC-basierten Monosaccharid-Analyse unterzogen. Monosaccharide, die als Bestandteile von GSL angesehen werden können, sind durch Fettdruck hervorgehoben. Werte für Glucose werden zum Teil durch vorhandene Verunreinigungen verfälscht. GlcNAc, *N*-Acetylglucosamin; GalNAc, *N*-Acetylgalactosamin; Gal, Galactose; Man, Mannose; Glc, Glucose; Xyl, Xylose; Fuc, Fucose; n.d., nicht detektierbar.

Nach bisherigen Erkenntnissen sind Mannose und Xylose keine Monosaccharid-Bausteine von GSL aus *S. mansoni*. Sie blieben deshalb in der Berechnung des Gesamt-Kohlenhydrat-gehaltes unberücksichtigt. Jede Fraktion wurde auf eine Endkonzentration von 15 ng/µL gebracht.

### 4.3.2 Strukturelle Charakterisierung der Kohlenhydrat-Komponenten

Die strukturelle Charakterisierung der Kohlenhydrat-Komponenten der GSL erfolgte nach dem in Abbildung 19 dargestellten Schema.



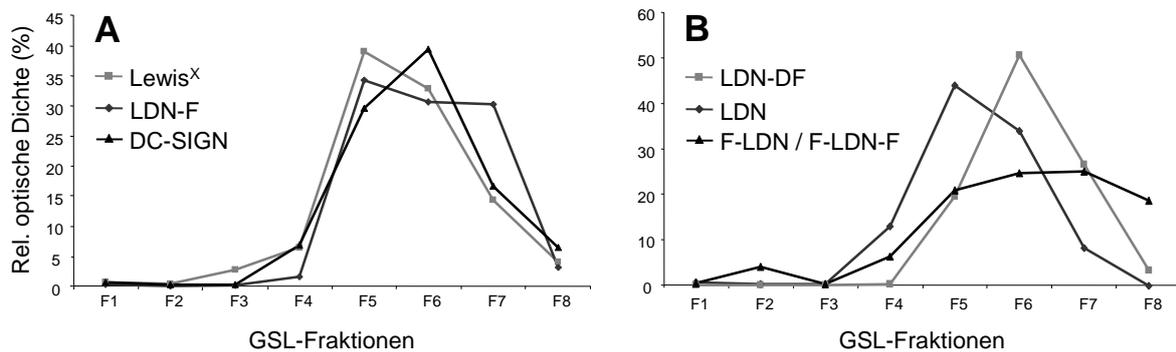
**Abbildung 19** Workflow zur Strukturanalyse der Kohlenhydrat-Komponenten von GSL

#### 4.3.2.1 Analyse der Kohlenhydrat-epitope nativer GSL mittels ELISA

Die fraktionierten, nativen GSL wurden in ELISA Experimenten bezüglich ihrer Erkennung durch mAK gegen verschiedene Kohlenhydrat-epitope (3.6.1) charakterisiert. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung der DC-SIGN-Bindungseigenschaften der entsprechenden GSL über deren Erkennung durch ein DC-SIGN-Fc Konstrukt (3.6.2). In Abbildung 20 sind die vom Leerwert der Negativkontrolle bereinigten relativen optischen Dichten der einzelnen Fraktionen in den jeweiligen Versuchen dargestellt.

Die Ergebnisse zeigten, dass überwiegend GSL der Fraktionen 5 und 6 und zu einem deutlich geringeren Anteil der Fraktion 7 von mAK gegen das Le<sup>X</sup>-Epitop gebunden wurden (Abbildung 20A), wodurch auf eine entsprechende Präsenz des Le<sup>X</sup>-Epitops vorwiegend auf GSL dieser Fraktionen geschlossen werden konnte. In ähnlicher Weise ergaben die Experimente mit  $\alpha$ -LDN-F die höchsten relativen optischen Dichten für GSL der Fraktionen 5 bis 7. Wie erwartet zeigten sich in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass die genannten Kohlenhydrat-epitope von DC-SIGN gebunden werden können, im ELISA mit DC-SIGN-Fc Konstrukt deutliche Bindungseigenschaften für GSL der Fraktionen 5 und 6 und in entsprechend vermindertem Maße für Fraktion 7. Darüber hinaus konnte bei den Experimenten mit  $\alpha$ -LDN der größte Bindungslevel für GSL der Fraktion 5 gemessen werden, welcher in den

nachfolgenden Fraktionen aufgrund der Zunahme von Komplexität und Fucosylierungsgrad der entsprechenden GSL kontinuierlich geringer wurde (Abbildung 20B). Einen entsprechenden tendenziellen Verlauf zeigte die Bindung von  $\alpha$ -LDN-DF mit der höchsten gemessenen optischen Dichte für GSL der Fraktion 6. ELISA Experimente mit  $\alpha$ -F-LDN /  $\alpha$ -F-LDN-F ergaben eine Zunahme der errechneten relativen optischen Dichten in den Fraktionen 4 und 5, welche in den Fraktionen 6 bis 8 weitestgehend konstant blieb. Eine hierbei für GSL der Fraktion 2 gemessene Extinktion basierte auf unspezifischen Reaktionen, da die entsprechende Fraktion ausschließlich CMH und CDH enthielt (vgl. hierzu 4.3.2.2).



**Abbildung 20** ELISA Experimente fraktionierter GSL aus adulten Würmern

(A), relative optische Dichte der Einzelfraktionen (F1, Fraktion 1; F2, Fraktion 2; etc.) basierend auf einer Erkennung der enthaltenen GSL durch mAk gegen Lewis<sup>x</sup> und LDN-F bzw. durch DC-SIGN-Fc Konstrukt. (B), relative optische Dichte der Einzelfraktionen basierend auf einer Erkennung der enthaltenen GSL durch mAk gegen LDN-DF, LDN und F-LDN / F-LDN-F.

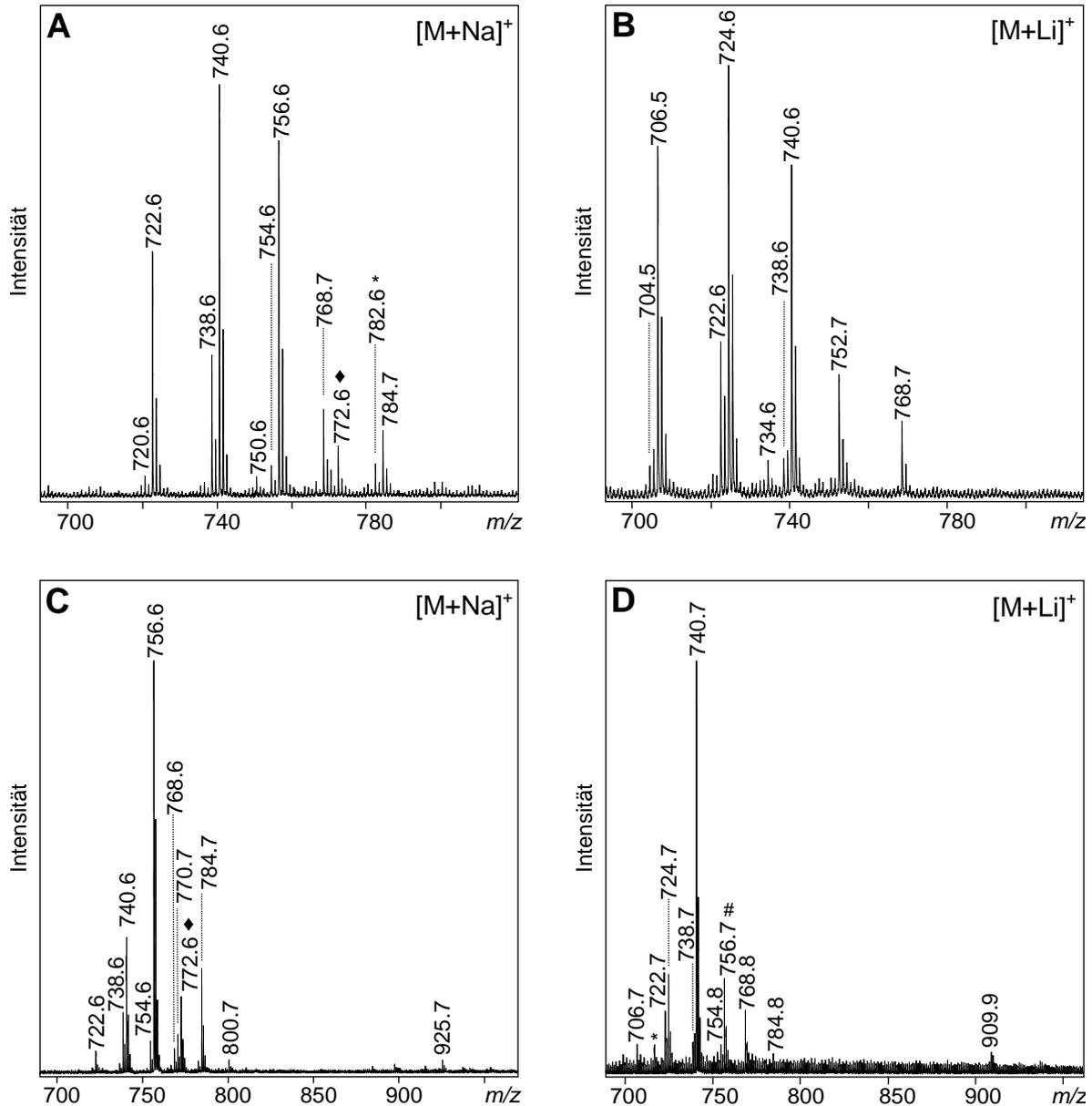
#### 4.3.2.2 Massenspektrometrische Untersuchung nativer GSL

Die fraktionierten GSL wurden in MALDI-MS Experimenten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Fraktionen 1 und 2 ausschließlich kleine GSL enthielten (Abbildung 21), während komplexere GSL in den Fraktionen 5 bis 8 detektiert werden konnten (Abbildung 22). Die Fraktionen 3 und 4 enthielten überwiegend kleinere GSL, deren Spektren im Anhang (Abbildung 36) abgebildet sind. Aufgrund der geringen Konzentration enthaltener GSL blieben sie für weitere Analysen zur strukturellen Charakterisierung der GSL aus adulten Würmern unberücksichtigt.

In Fraktion 1 wurden ausschließlich Signale von CMH-Strukturen detektiert (Abbildung 21A). Da CMH-Komponenten aus *S. mansoni* ausschließlich Glucose oder Galactose als Kohlenhydrat-Komponenten enthalten [62], basiert das registrierte CMH-Muster alleinig auf der Heterogenität des Ceramidanteils hinsichtlich seiner Fettsäure- und Sphingoidbasen-Zusammensetzung. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen von CMH aus adulten Würmern konnten Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  bei  $m/z$  720.6, 722.6, 738.6, 740.6, 750.6,

756.6, 768.7 und 784.7 detektiert werden, während CMH bei  $m/z$  754.6 bislang nur bei GSL aus Cercarien und Eiern beschrieben wurde [62, 168]. Signale bei  $m/z$  722.6, 740.6 und 756.6 wurden in dieser Fraktion als Hauptkomponenten registriert. Nach Zugabe von 1  $\mu$ L 4 mM Lithiumchlorid (LiCl) zum ProbenSpot konnten ausschließlich die in ihrer Masse um 16 Da verringerten Lithiumaddukte ( $[M+Li]^+$ ) der oben genannten Signale detektiert werden ( $m/z$  704.5, 706.5, 722.6, 724.6, 734.6, 738.6, 740.6, 752.7, 768.7; Abbildung 21B) und verifizierten somit deren vorherige Annotation als Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ). Im Gegensatz hierzu konnten von den Signalen bei  $m/z$  772.6 und 782.6 (Abbildung 21A) keine detektierbaren Pseudomolekülonen  $[M+Li]^+$  bei  $m/z$  756.6 und 766.6 generiert werden. Folglich wurde das Signal  $m/z$  772.6 als Kaliumaddukt ( $[M+K]^+$ ) der CMH-Komponente  $m/z$  756.6 annotiert. Eine entsprechende Zuordnung war für das Signal bei  $m/z$  782.6 nicht möglich, sodass es als „undefiniert“ gekennzeichnet wurde.

Zusätzlich zu den in Fraktion 1 registrierten GSL konnten in Fraktion 2 Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  bei  $m/z$  770.7, 800.7 und 925.7 detektiert werden (Abbildung 21C). Die CMH-Komponenten bei  $m/z$  770.7 und 800.7 wurden bislang nur bei Cercarien beschrieben, während das Signal  $m/z$  925.7 bereits eine CDH-Komponente repräsentierte [62]. Darüber hinaus zeigten sich im Vergleich zur Fraktion 1 deutliche Intensitätsunterschiede des detektierten Ceramid-Musters: Die CMH-Komponente bei  $m/z$  756.6 wurde als Hauptkomponente detektiert, während die Signale  $m/z$  722.6 und 740.6 CMH-Nebenkomponten darstellten. Die LiCl-Zugabe zum ProbenSpot resultierte in der Detektion der entsprechenden Pseudomolekülonen  $[M+Li]^+$  bei  $m/z$  706.7, 722.7, 724.7, 738.7, 740.7, 754.8, 768.8, 784.8 und 909.9 (Abbildung 21D). Ein dem Natriumaddukt ( $[M+Na]^+$ )  $m/z$  768.6 entsprechendes Lithiumaddukt ( $[M+Li]^+$ )  $m/z$  752.6 konnte aufgrund des ungünstigen Verhältnisses von Grundrauschen zu registrierter Signalintensität nicht sicher detektiert werden. Darüber hinaus konnte das Signal bei  $m/z$  756.7 als Natriumaddukt ( $[M+Na]^+$ ) der CMH-Hauptkomponente identifiziert werden. Hierbei erfolgte die Differenzierung vom massenidentischen Lithiumaddukt ( $[M+Li]^+$ ) der Komponente  $m/z$  772.6 (vgl. Abbildung 21C) durch Zugabe von KCl zum Probenfleck (Daten nicht gezeigt).



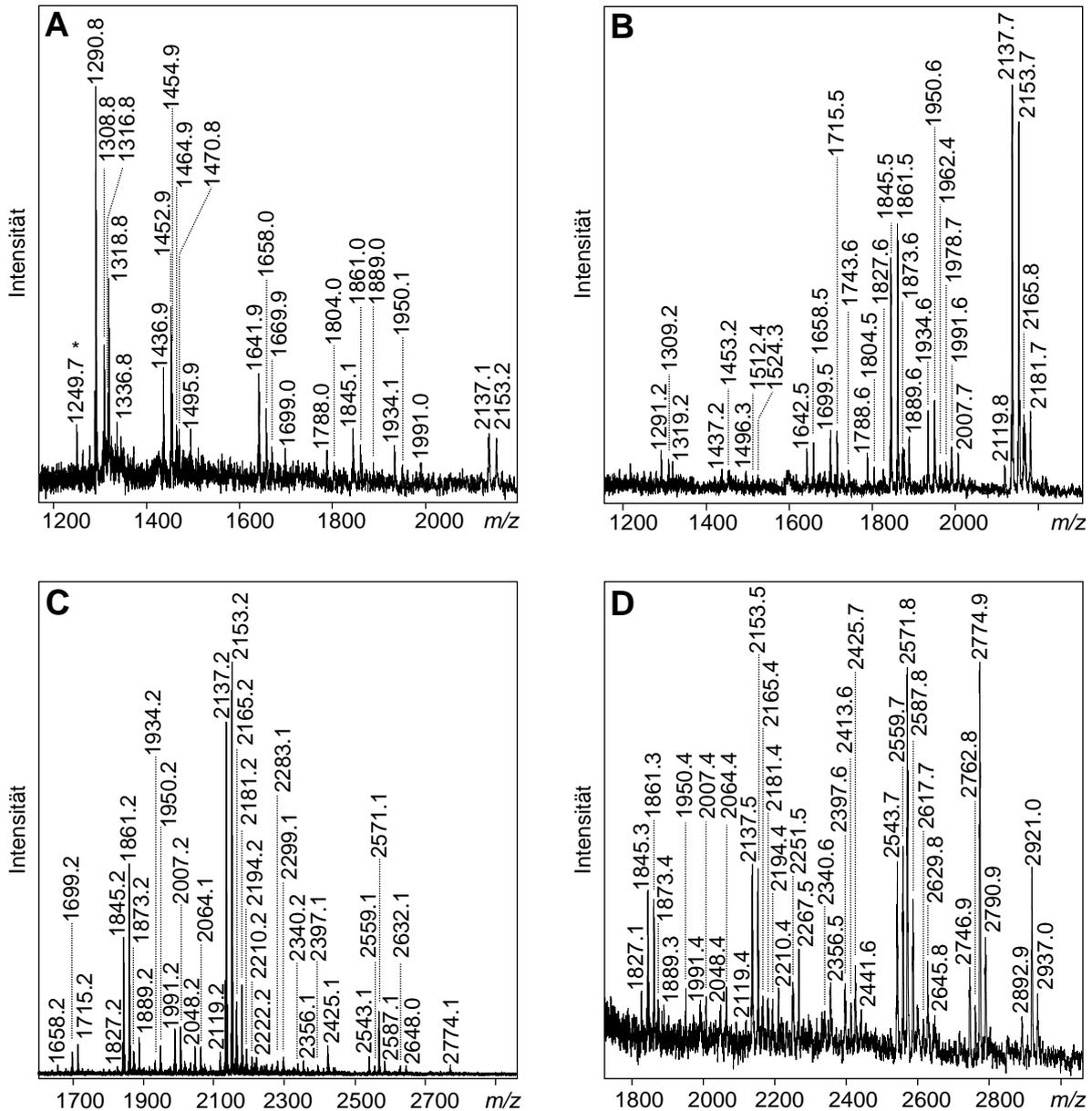
**Abbildung 21** MALDI-MS Analyse kleiner GSL aus adulten Würmern

Massenspektrometrische Untersuchung nativer GSL aus Fraktion 1 (**A** und **B**) und Fraktion 2 (**C** und **D**). Die nativen GSL wurden vorwiegend als Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  detektiert (**A**, **C**). Nach Zugabe von 1  $\mu$ L 4 mM LiCl-Lösung wurden überwiegend Lithiumaddukte ( $[M+Li]^+$ ) registriert (**B**, **D**). Kaliumaddukte ( $[M+K]^+$ ) sind mit einem Rhombus ( $\blacklozenge$ ) und undefinierte Signale mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Das Natriumaddukt ( $[M+Na]^+$ ) in (D) ist mit einer Raute (#) markiert.

Komplexere GSL wurden in MALDI-MS Experimenten der Fraktionen 5 bis 8 detektiert (Abbildung 22). Aufgrund der Ceramid-Heterogenität hinsichtlich unterschiedlicher Fettsäuren- und Sphingoidbasen-Zusammensetzungen zeigte sich auch bei den komplexen GSL ein ähnliches Ceramid-Muster, wie es bereits für die CMH-Komponenten beobachtet wurde.

Mit Hilfe von MALDI-MS/MS Experimenten einzelner Komponenten (Daten nicht gezeigt)

sowie GlycoWorkbench Software-Tools [57] konnten die detektierten Signale überwiegend rechnerisch in Ceramid-Cluster identischer Monosaccharid-Zusammensetzungen eingruppiert werden, welche in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt sind.



**Abbildung 22** MALDI-MS Analyse komplexer GSL aus adulten Würmern

Massenspektrometrische Untersuchung nativer GSL der Fraktion 5 (**A**), Fraktion 6 (**B**), Fraktion 7 (**C**) und Fraktion 8 (**D**). Die GSL wurden als Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  registriert. Das undefinierte Signal in (A) ist mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Zu Gunsten der Übersichtlichkeit sind nicht alle detektierten Signale annotiert (vgl. hierzu Tabelle 12).

Kohlenhydrat- Zusammensetzung	detektierte Ceramid-Cluster ( <i>m/z</i> )			
	F5	F6	F7	F8
H <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	1288.8, 1290.8, 1306.8, 1308.8, 1316.8, 1318.8, 1336.8	1291.2, 1309.2, 1319.2		
F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	1436.9, 1452.9, 1454.9, 1464.9, 1470.8	1437.2, 1453.3		
F <sub>1</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub>	1495.9	1496.3, 1512.4, 1524.3		
F <sub>2</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub>	1641.9, 1658.0, 1669.9	1642.5, 1656.8, 1658.5	1658.2	
F <sub>3</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub>	1788.0, 1804.0	1788.6, 1804.5,		
F <sub>4</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub>	1934.1, 1950.1,	1934.6, 1950.6, 1962.4, 1964.4, 1978.7	1934.2, 1950.2	1950.4
F <sub>1</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub>	1699.0	1699.5, 1715.5, 1743.6	1697.1, 1699.2, 1715.2, 1727.2, 1729.2	
F <sub>2</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub>	1845.1, 1861.0, 1889.0	1827.6, 1845.5, 1861.5, 1873.6, 1889.6	1827.2, 1843.1, 1845.2, 1859.2, 1861.2, 1873.2, 1875.2, 1889.2	1827.1, 1843.3, 1845.3, 1863.3, 1873.4, 1889.3
F <sub>3</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub>	1991.0	1991.6, 2007.7	1991.2, 2007.2, 2019.2, 2021.2, 2035.2	1991.4, 2007.4
F <sub>4</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub>	2137.1, 2153.2	2119.8, 2137.7, 2153.7, 2165.8, 2181.7	2119.2, 2135.2, 2137.2, 2151.2, 2153.2, 2165.2, 2167.2, 2181.2	2119.4, 2137.5, 2153.5, 2165.4, 2167.5, 2181.4
F <sub>5</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub>			2283.1, 2299.1	
F <sub>2</sub> H <sub>1</sub> N <sub>5</sub>			2046.1, 2048.2, 2064.1, 2076.2, 2092.2	2048.4, 2064.4
F <sub>3</sub> H <sub>1</sub> N <sub>5</sub>			2194.2, 2210.2, 2222.2, 2224.2	2194.4, 2210.4
F <sub>4</sub> H <sub>1</sub> N <sub>5</sub>			2340.2, 2356.1, 2368.1	2340.6, 2356.6
F <sub>6</sub> H <sub>1</sub> N <sub>5</sub>			2630.1, 2632.1, 2648.0,	

**Tabelle 12** Monosaccharid-Zusammensetzungen komplexer GSL aus adulten Würmern

$F_1H_1N_6$	2397.1, 2413.1, 2425.1, 2427.2, 2441.1	
$F_2H_1N_6$	2543.1, 2559.1, 2571.1, 2573.1, 2587.1	2251.5, 2267.5
$F_3H_1N_6$		2397.6, 2413.6, 2425.7, 2441.6
$F_4H_1N_6$		2543.7, 2559.7, 2571.8, 2587.8
$F_3H_1N_7$		2617.7, 2629.7, 2645.8
$F_4H_1N_7$	2774.1	2746.9, 2762.8, 2774.9, 2790.9
$F_5H_1N_7$		2892.9, 2921.0, 2937.0

**Tabelle 12** (Fortsetzung)

Anhand von MALDI-MS/MS Experimenten und GlycoWorkbench Software Tools [57] erfolgte eine Eingruppierung der in den Fraktionen 5 bis 8 (F5 - F8) als Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  registrierten komplexen GSL in Ceramid-Cluster identischer Monosaccharid-Zusammensetzungen (vgl. hierzu Abbildung 22). H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose;  $H_2N_2$ , Oligosaccharid, welches aus 2 Hexose- und 2 *N*-Acetylhexosamin-Bausteinen besteht, etc.

Hierbei zeigte sich, dass die in Fraktion 5 (F5) registrierten GSL-Hauptkomponenten Kohlenhydrat-Anteile bestehend aus zwei Hexosen und zwei *N*-Acetylhexosaminen ( $H_2N_2$ ,  $m/z$  1288.8 - 1336.8) bzw. deren monofucosylierten Variante  $F_1H_2N_2$  ( $m/z$  1436.9 - 1470.8) aufzeigten (Abbildung 22A, Tabelle 12). Unter Berücksichtigung der ELISA Experimente (4.3.2.1, Abbildung 20A), welche eine dominierende Präsenz  $Le^X$ -tragender GSL in Fraktion 5 indizierten, repräsentierte die Kohlenhydrat-Komponente der allgemeinen Zusammensetzung  $F_1H_2N_2$  sehr wahrscheinlich  $Le^X$ -Pentasaccharid. Darüber hinaus waren GSL, deren Kohlenhydrat-Komponenten eine Hexose und drei bzw. vier *N*-Acetylhexosamine aufzeigten ( $F_{1-4}H_1N_3$  und  $F_{1-4}H_1N_4$ ) und die somit indikativ für die Präsenz variabel fucosylierter LDN-Epitope waren, in deutlich geringerer Intensität detektierbar.

Die genannten GSL wurden in der Fraktion 6 (F6) in deutlich veränderten Signalintensitäten registriert (Abbildung 22B, Tabelle 12). GSL-Spezies, deren Kohlenhydrat-Komponenten zwei Hexose-Einheiten aufzeigten ( $H_2N_2$ ,  $m/z$  1291.2 - 1319.2;  $F_1H_2N_2$ ,  $m/z$  1437.2, 1453.3) wurden in niedrigeren Intensitäten detektiert, während entsprechende Spezies mit einer Hexose ( $F_{1-4}H_1N_{3-4}$ ) deutlichere Signale repräsentierten. Hierbei bildeten GSL, welche Kohlenhydratreste der allgemeinen Zusammensetzung  $F_2H_1N_4$  ( $m/z$  1827.6 - 1889.6) und  $F_4H_1N_4$  ( $m/z$  2119.8 - 2181.7) aufzeigten, die Hauptkomponenten.

GSL dieser Kohlenhydrat-Zusammensetzungen wurden ebenfalls in Fraktion 7 (F7) als

Hauptkomponenten registriert ( $F_2H_1N_4$ ,  $m/z$  1827.2 - 1889.2;  $F_4H_1N_4$ ,  $m/z$  2119.2 - 2181.2) (Abbildung 22C, Tabelle 12). Die entsprechenden Ceramid-Cluster dieser GSL-Spezies beinhalteten jeweils acht Signale und repräsentierten somit die größte detektierte Ceramid-Heterogenität innerhalb der komplexen GSL der Fraktionen 5 bis 8. Zusätzlich zu den bereits in den Fraktionen 5 und 6 beschriebenen Spezies wurden GSL mit mehrfach fucosylierten Kohlenhydrat-Komponenten, welche aus einer Hexose und bis zu sieben *N*-Acetylhexosamin-Einheiten aufgebaut waren, detektiert ( $F_5H_1N_4$ ,  $F_{2-6}H_1N_5$  exkl.  $F_5H_1N_5$ ,  $F_{1-2}H_1N_6$  und  $F_4H_1N_7$ ). Darüber hinaus konnte, basierend auf den MALDI-MS Experimenten, nicht auf die Präsenz  $H_2N_2^-$  bzw.  $F_1H_2N_2^-$ -tragender GSL geschlossen werden.

In Fraktion 8 (F8) wurden GSL-Spezies der komplexesten Kohlenhydrat-Zusammensetzungen registriert, welche eine Hexose, bis zu fünf Fucosen und bis zu sieben *N*-Acetylhexosamin-Einheiten ( $F_1H_1N_3$ ,  $F_{2-4}H_1N_{4-6}$ ,  $F_{3-5}H_1N_7$ ) aufzeigten (Abbildung 22D, Tabelle 12). Wie in Fraktion 7 konnte auch in dieser Fraktion nicht auf die Präsenz  $H_2N_2^-$  bzw.  $F_1H_2N_2^-$ -tragender GSL geschlossen werden.

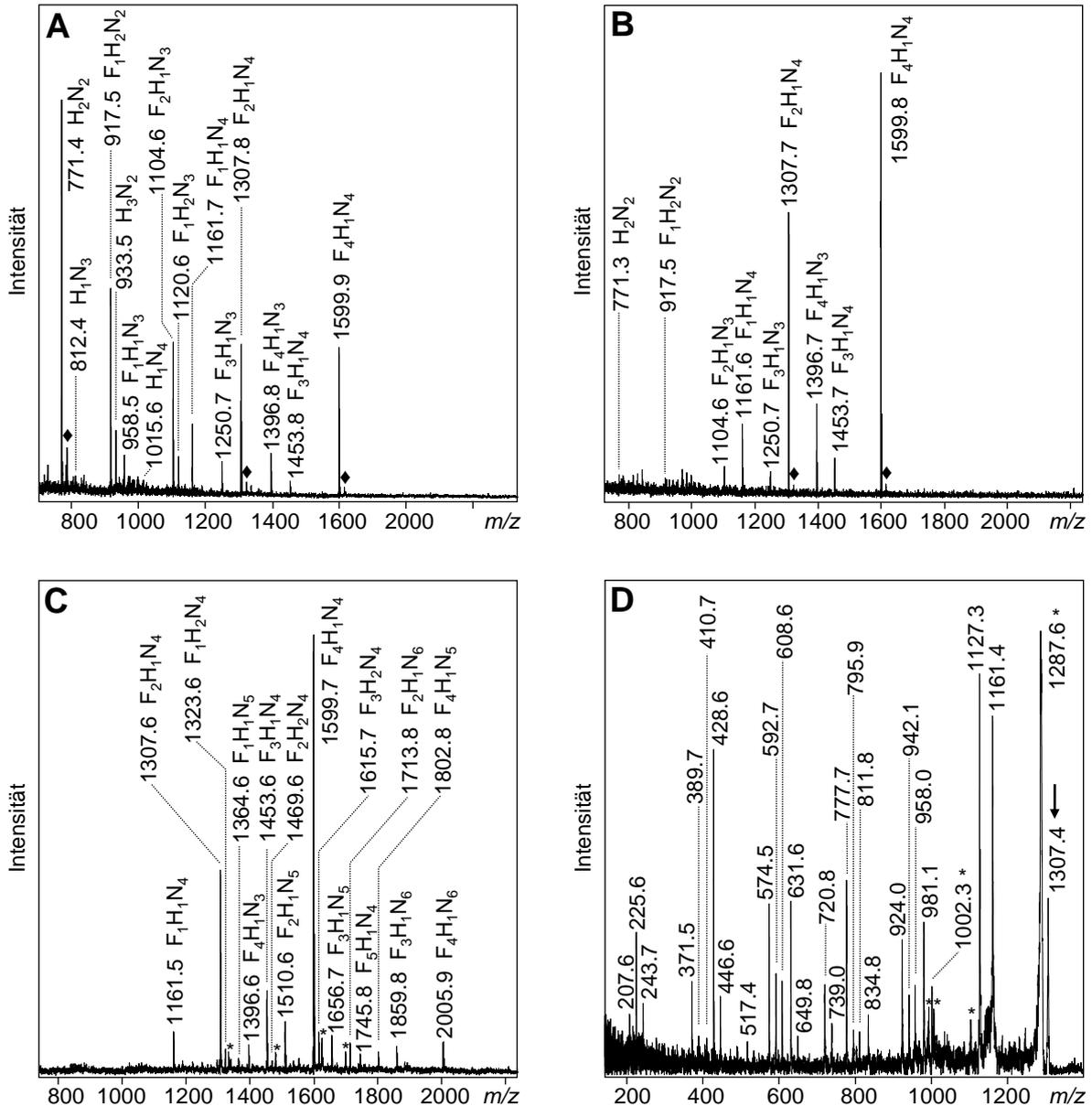
Es bleibt hierbei jedoch zu berücksichtigen, dass die vorgenommene Eingruppierung registrierter GSL zu Ceramid-Clustern identischer Monosaccharid-Zusammensetzungen in Tabelle 12 aufgrund des möglichen Vorkommens isobarer Strukturen keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben kann. So konnten beispielsweise bei der Fragmentierung des GSL bei  $m/z$  1658.5 aus Fraktion 6 diagnostische Signale für Kohlenhydrat-Komponenten der allgemeinen Zusammensetzung  $F_2H_1N_3$  und  $F_1H_2N_3$  detektiert werden, welche bei entsprechenden Ceramid-Zusammensetzungen GSL identischer Massen bilden (Abbildung 37; Anhang). Die Eingruppierung der registrierten GSL in Tabelle 12 erfolgte entsprechend ihrer Hauptisobare. Auf Mehrfach-Zuordnungen einzelner Signale wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

#### 4.3.2.3 Massenspektrometrische Untersuchung nativer Oligosaccharide

Zur detaillierten strukturellen Charakterisierung der Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL der Fraktionen 5 bis 7 wurden die nativen Oligosaccharide enzymatisch freigesetzt (3.7.1) und in MALDI-MS Experimenten untersucht (Abbildung 23). Fraktion 8 blieb hierbei wegen der geringen Menge enthaltener GSL (vgl. hierzu 4.3.1) unberücksichtigt.

Durch MALDI-MS/MS Experimente (Daten nur beispielhaft gezeigt; vgl. Abbildung 23D) sowie mit Hilfe von Glyco-Peakfinder [159] wurden den registrierten Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  nativer Oligosaccharide die entsprechenden Kohlenhydrat-Zusammensetzungen zugeordnet, welche die zuvor überwiegend rechnerisch ermittelten Kohlenhydratanteile der nativen GSL (4.3.2.2) weitestgehend bestätigten. Durch LiCl-Zugabe zum ProbenSpot erfolgte die Identifizierung von Kaliumaddukten ( $[M+K]^+$ ) (Daten nicht gezeigt).

---



**Abbildung 23** MALDI-MS (MS) Analyse nativer Oligosaccharide aus adulten Würmern

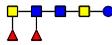
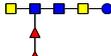
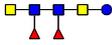
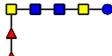
Massenspektrometrische Untersuchung enzymatisch freigesetzter Oligosaccharide. **(A)**, MALDI-MS Spektrum Fraktion 5. **(B)**, MALDI-MS Spektrum Fraktion 6. **(C)**, MALDI-MS Spektrum Fraktion 7. **(D)**, MALDI-MS/MS Spektrum von F<sub>2</sub>H<sub>1</sub>N<sub>4</sub> bei  $m/z$  1307.7 (Pfeil) aus Fraktion 6. Die Berechnung der Monosaccharid-Zusammensetzungen annotierter Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  in (A-C) erfolgte mittels Glyco-Peakfinder [159]. Kaliumaddukte ( $[M+K]^+$ ) sind mit einem Rhombus (♦) und undefinierte Signale mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose.

In Fraktion 5 wurden H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> ( $m/z$  771.4) und die entsprechende monofucosylierte Variante F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> ( $m/z$  917.5) als Hauptkomponenten detektiert (Abbildung 23A). Das um ein *N*-Acetylhexosamin verlängerte Oligosaccharid F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub> konnte bei  $m/z$  1120.6 registriert werden, wobei die Tatsache, dass entsprechende F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>-enthaltende GSL bei der massenspektro-

metrischen Analyse nativer GSL nicht berechnet wurden (Tabelle 12), unter anderem indikativ für das bereits unter 4.3.2.2 beschriebene Vorkommen isobarer Strukturen zu werten ist. Darüber hinaus konnten variabel fucosylierte Oligosaccharide bestehend aus einer Hexose und drei bzw. vier *N*-Acetylhexosamin-Einheiten detektiert werden ( $F_{0-4}H_1N_3$  bei  $m/z$  812.4, 958.5, 1104.6, 1250.7, 1396.8;  $F_{0-4}H_1N_4$  bei  $m/z$  1015.6, 1161.7, 1307.8, 1453.8, 1599.9). Wahrscheinlich aufgrund ihrer geringen Konzentration konnten native GSL, welche die nicht fucosylierten Kohlenhydrat-Komponenten  $H_1N_3$  und  $H_1N_4$  tragen, in den entsprechenden massenspektrometrischen Analysen nicht nachgewiesen werden (vgl. hierzu Abbildung 22A, Tabelle 12). Für das Pseudomolekülion  $[M+Na]^+$  bei  $m/z$  933.5 wurde die allgemeine Zusammensetzung  $H_3N_2$  errechnet. Durchgeführte ESI-MS<sup>n</sup> Experimente ergaben diesbezüglich die Monosaccharid-Sequenz HexNAc-HexNAc-Hex-Hex-Hex (HexNAc, *N*-Acetylhexosamin; Hex, Hexose) und deuten somit auf das Vorliegen des vom Wirtstier stammenden Forssman Antigens (GalNAc( $\alpha$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\alpha$ 1-4)Gal( $\beta$ 1-4)Glc) hin, wie es bereits in Untersuchungen zur Struktur von GSL aus *Fasciola hepatica* beschrieben wurde [171] (Daten nicht gezeigt).

Die aus GSL der Fraktion 6 freigesetzten Oligosaccharide zeigten überwiegend die allgemeine Zusammensetzung  $F_{2-4}H_1N_3$  ( $m/z$  1104.6, 1250.7, 1396.7) und  $F_{1-4}H_1N_4$  ( $m/z$  1161.6, 1307.7, 1453.7, 1599.8), wobei  $F_2H_1N_4$  und  $F_4H_1N_4$  als Hauptkomponenten registriert wurden (Abbildung 23B). Signale für Oligosaccharide mit zwei Hexose-Bausteinen ( $H_2N_2$ ,  $m/z$  771.3;  $F_1H_2N_2$ ,  $m/z$  917.5) konnten nur mit niedriger Intensität detektiert werden.

In Übereinstimmung mit den MALDI-MS Experimenten nativer GSL (4.3.2.2) wurden die komplexesten Oligosaccharide in Fraktion 7 detektiert (Abbildung 23C). Neben variabel fucosylierten Kohlenhydratstrukturen, welche eine Hexose und drei bis vier *N*-Acetylhexosamin-Einheiten aufzeigten ( $F_4H_1N_3$ ,  $m/z$  1396.6;  $F_{1-5}H_1N_4$ ,  $m/z$  1161.5, 1307.6, 1453.6, 1599.7, 1745.8), konnten entsprechend verlängerte Strukturen mit fünf bzw. sechs *N*-Acetylhexosamin-Bausteinen detektiert werden ( $F_{1-4}H_1N_5$ ,  $m/z$  1364.6, 1510.6, 1656.7, 1802.8;  $F_{2-4}H_1N_6$ ,  $m/z$  1713.8, 1859.8, 2005.9). Oligosaccharide der allgemeinen Zusammensetzung  $F_1H_2N_4$  ( $m/z$  1323.6),  $F_2H_2N_4$  ( $m/z$  1469.6) und  $F_3H_2N_4$  ( $m/z$  1615.7), welche wahrscheinlich verlängerte Strukturen der in den Fraktionen 5 und 6 registrierten Kohlenhydrat-Komponenten  $F_1H_2N_2$  und  $F_1H_2N_3$  repräsentierten, wurden in niedrigen Signlintensitäten registriert.  $F_2H_1N_4$  und  $F_4H_1N_4$  bildeten auch in dieser Fraktion die Hauptkomponenten.

detektierte Masse ( $m/z$ )	Fragmentationen möglicher Strukturkandidaten			
				
207.6				
225.6 (243.7)				
371.5 (389.7)				
410.7				
428.6 (446. 6)				
517.4				
574.5 (592.7)				
608.6				
631.6 (649.8)				
720.8 (739.0)				
777.7 (795.9)				
811.8				
834.8				
924.0 (942.1)				
958.0				
981.1				
1127.3				
1161.4				

**Tabelle 13** Fragmentationen von Strukturisomeren der Monosaccharid-Zusammensetzung  $F_2H_1N_4$ . Die Signale wurden als Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) registriert und mit GlycoWorkbench Software Tools [57] annotiert. Es sind nur die Piktogramme der B-Fragmente gezeigt, während die Massen entsprechender C-Fragmente in Klammern gesetzt sind [162]. Beispielhaft ist jeweils nur ein Fragment für einen möglichen Fragmentierungspfad dargestellt. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose.

Darüber hinaus zeigte sich, dass die im Rahmen der massenspektrometrischen Untersuchung nativer Oligosaccharide durchgeführten MALDI-MS/MS Experimente zwar die mittels

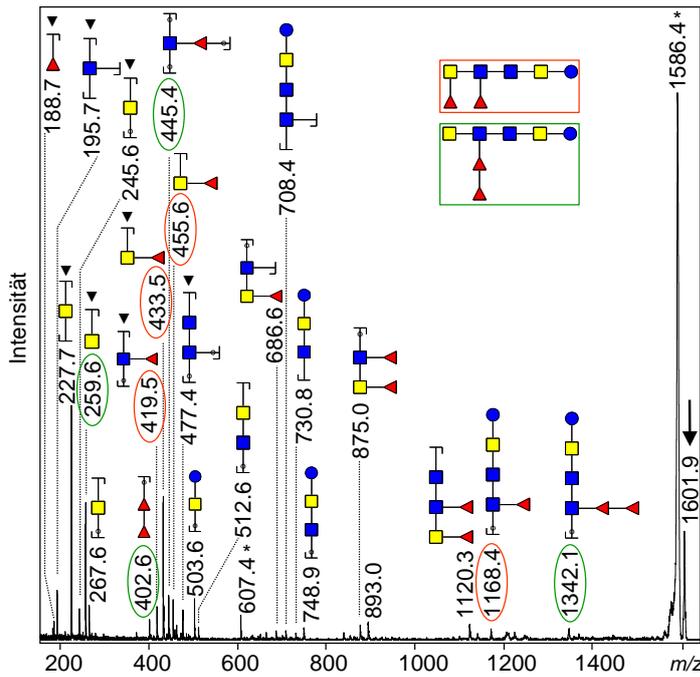
GlycoPeakfinder [159] errechneten Monosaccharid-Zusammensetzungen bestätigten, eine Differenzierung möglicher isomerer Strukturen jedoch nicht erlaubten. Exemplarisch soll dies am Beispiel der MALDI-MS/MS Analyse des Oligosaccharids der allgemeinen Zusammensetzung  $F_2H_1N_4$  ( $m/z$  1307.7) aus Fraktion 6 gezeigt werden (Abbildung 23D).

In Tabelle 13 sind den registrierten Masse-Ladungs-Quotienten ( $m/z$ ) die Piktogramme entsprechender Fragmentationen möglicher Strukturisomere von  $F_2H_1N_4$  zugeordnet. Hierbei sind die dargestellten Isomere in Anlehnung an bereits beschriebene Kohlenhydratstrukturen aus GSL verschiedener Lebensstadien von *S. mansoni* beispielhaft gewählt. Es sind jeweils nur Piktogramme der B-Fragmente gezeigt, während die Masse-Ladungs-Quotienten entsprechender C-Fragmente in Klammern gesetzt sind [162]. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die durchgeführten MALDI-MS/MS Experimente keine spezifischen Aussagen zur Monosaccharid-Sequenz der untersuchten Kohlenhydratstruktur erlaubten, da jedes registrierte Signal durch Fragmente von mindestens zwei Strukturisomeren erklärbar war.

#### 4.3.2.4 Massenspektrometrische Untersuchung derivatisierter Oligosaccharide

Da MALDI-MS/MS Experimente nativer Oligosaccharide keine Hinweise zur strukturellen Differenzierung isomerer Kohlenhydratstrukturen aufzeigten (vgl. 4.3.2.3), erfolgte deren massenspektrometrische Charakterisierung anhand permethylierter Glykane.

Abbildung 24 zeigt das MALDI-MS/MS Spektrum des permethylierten Oligosaccharids der allgemeinen Zusammensetzung  $F_2H_1N_4$  bei  $m/z$  1601.9 (Pfeil) aus Fraktion 6. Im Gegensatz zu der entsprechenden Analyse des nativen Oligosaccharids (vgl. hierzu Abbildung 23D, Tabelle 13) waren charakteristische Signale bei  $m/z$  259.6, 402.6, 445.4 und 1342.1 detektierbar, welche in ihrer Gesamtheit auf die Präsenz des grün markierten Strukturkandidaten (Inset) mit difucosyliertem, subterminalem *N*-Acetylhexosamin hindeuteten. Darüber hinaus war die Detektion von Fragmentationen eines monofucosylierten, terminalen *N*-Acetylhexosamins ( $m/z$  433.5 bzw. 455.6) in Kombination mit dem entsprechenden Signal bei  $m/z$  1168.4 sowie dem Signal  $m/z$  419.5 indikativ für die Präsenz des rot markierten Strukturkandidaten (Inset) zu werten. Allerdings war eine endgültige Verifizierung des Vorkommens beider Strukturisomere ohne weitere Fragmentierung charakteristischer Signale (z.B.  $m/z$  1168.4) nicht sicher möglich. Darüber hinaus konnten in der MALDI-MS/MS Analyse diagnostische Signale einer weiteren isomeren Nebenkomponente nicht detektiert werden, deren Präsenz in ESI-MS<sup>n</sup> Untersuchungen hingegen sicher bestätigt werden konnte (vgl. hierzu Tabelle 15).



**Abbildung 24** MALDI-MS/MS Analyse von permethyliertem  $F_2H_1N_4$

MALDI-MS/MS Spektrum des permethylierten Glykans  $F_2H_1N_4$  bei  $m/z$  1601.9 (Pfeil, aus Fraktion 6). Die Annotation der registrierten Fragmentationen ( $[M+Na]^+$ ) erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. Protonenaddukte ( $[M+H]^+$ ) sind mit einem Dreieck ( $\blacktriangledown$ ) und undefinierte Signale mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Charakteristische Signale der beiden Strukturisomere (Inset) sind in orange bzw. grün markiert. Nichtdiagnostische Signale sind exemplarisch mit dem Fragment für einen möglichen Fragmentierungspfad eines Strukturkandidaten illustriert. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose.

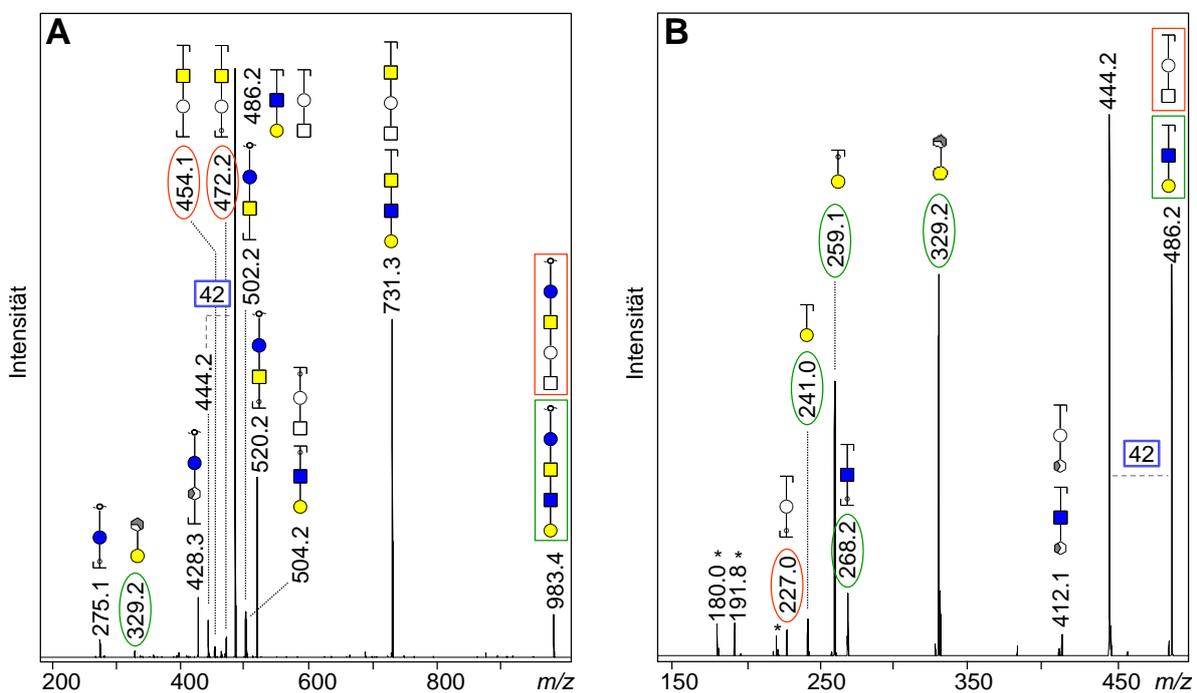
Aufgrund der beschriebenen Nachteile der MALDI-MS/MS-basierten Charakterisierung isomerer Kohlenhydratstrukturen erfolgte deren Analyse in ESI-MS<sup>n</sup> Untersuchungen permethylierter und zum Teil reduzierter Glykane (3.10.2) aus den Fraktionen 5 und 6. Eine Charakterisierung derivatisierter Oligosaccharide der Fraktion 7 sowie der Komponenten  $H_1N_3$  und  $H_1N_4$  aus Fraktion 5 war aufgrund der geringeren Menge entsprechender Kohlenhydrate nicht möglich.

Die hierbei angewandte Methodik soll im Folgenden an einigen ausgewählten Strukturen exemplarisch dargestellt werden. Soweit eine Charakterisierung von Strukturen identischer Kohlenhydrat-Zusammensetzungen aus den Fraktionen 5 und 6 möglich war, resultierte sie in der Detektion nahezu gleicher Fragmentierungsmuster, so dass die in diesen Fällen gezeigten Spektren jeweils beispielhaft aus einer der genannten Fraktionen gewählt sind.

Im Folgenden sind die registrierten Fragmentationen entsprechend der Nomenklatur von Domon und Costello [162] bezeichnet. In allen gezeigten Spektren erfolgte die Annotation detektierter Signale mittels GlycoWorkbench Software Tools [57] in Anlehnung an bereits beschriebene Kohlenhydratstrukturen von GSL aus *S. mansoni* und in Übereinstimmung mit den durchgeführten ELISA Experimenten (4.3.2.1). In Fällen, in denen ein Signal durch mehrere Fragmente verschiedener Fragmentierungspfade erklärt werden konnte, ist exemplarisch nur ein Fragment eines möglichen Fragmentierungspfades dargestellt.

### Strukturelle Charakterisierung von H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

Unter Berücksichtigung der bei GSL aus *S. mansoni* beschriebenen Kohlenhydrat epitope zeigten die generierten Spektren deutlich, dass das Hauptisomer des Tetrasaccharids H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> ein terminales LacNAc-Epitop trägt (Abbildung 25). Darüber hinaus konnten diagnostische Signale einer bisher bei GSL aus *S. mansoni* nicht beschriebenen isomeren Struktur mit terminalem *N*-Acetylhexosamin und subterminaler Hexose detektiert werden. In Abbildung 25 sind Struktur und diagnostische Signale des Hauptisomers grün, die der Nebenkompone entsprechend rot markiert. Nicht-diagnostische Signale sind mit Fragmenten beider Struktur-isomere annotiert.



**Abbildung 25** ESI-MS<sup>n</sup> Analyse von H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

Strukturelle Charakterisierung des reduzierten und permethylierten Oligosaccharids der Zusammensetzung H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> aus Fraktion 5. (A), ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum des precursors  $m/z$  983.4. (B), ESI-MS<sup>3</sup> Spektrum der B<sub>2</sub>-Fragmentationen bei  $m/z$  486.2 (983.4 → 486.2). Abspaltungen von Keten ( $\Delta m/z$  42) sind durch grau gestrichelte Linien illustriert. Die Annotation der registrierten Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. undefinierte Signale sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Diagnostische Signale der beiden Struktur-isomere sind in grün bzw. orange markiert. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; weißer Kreis, Hexose; weißes Quadrat, *N*-Acetylhexosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin.

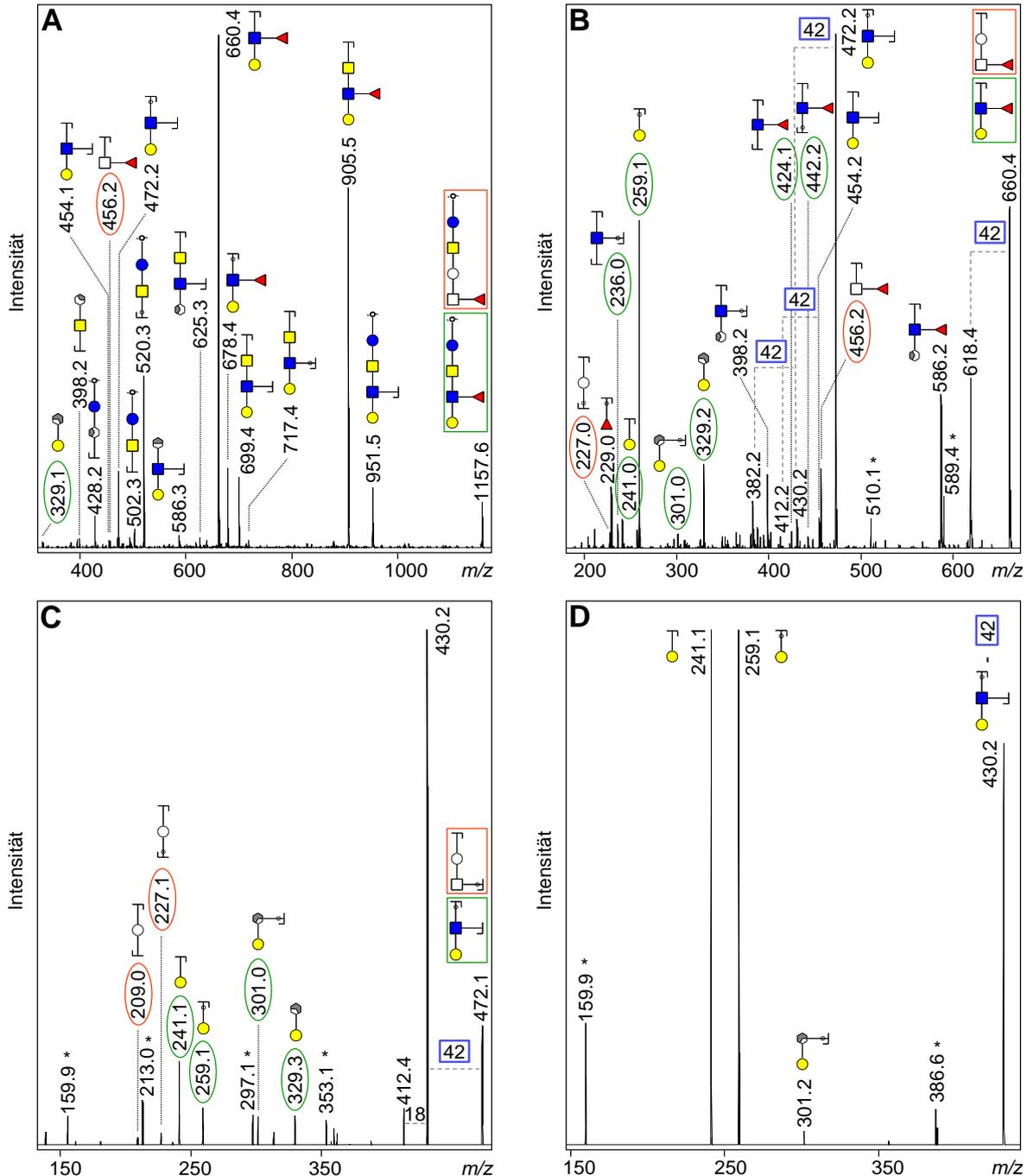
Im ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum des precursors  $m/z$  983.4 bildeten B<sub>2</sub>- und B<sub>3</sub>-Fragmentationen Signale der höchsten Intensität ( $m/z$  486.2, 731.3) (Abbildung 25A). Das Signal bei  $m/z$  444.2 konnte nicht durch ein Kohlenhydratfragment der beiden Strukturkandidaten erklärt werden, lieferte

jedoch durch eine Differenz von  $\Delta m/z=42$  vom Signal des  $B_2$ -Fragmentions Hinweise auf eine erfolgte Ketenabspaltung. Abspaltungen dieser Art wurden in ESI-MS<sup>n</sup> Analysen des Oligosaccharids  $F_1H_2N_2$  verifiziert (siehe unten). Das Signal  $m/z$  329.2 konnte durch ein  $^{3,5}A_{GlcNAc,2}$ -Fragmention des LacNAc-Epitops erklärt werden und ist somit als diagnostisch für dessen Präsenz zu werten. Signale, welche das Vorkommen der isomeren Nebenkomponente verifizierten, wurden als  $B_3Z_3^-$  und  $B_3Y_3^-$ -Fragmentionen bei  $m/z$  454.1 bzw. 472.2 detektiert. Entsprechende Fragmentionen des Hauptisomers konnten nicht detektiert werden, was als Hinweis auf eine besonders leichte Fragmentierung der glykosidischen Bindung zwischen den beiden *N*-Acetylhexosamin-Bausteinen gewertet werden muss.  $Y_2^-$  und  $Z_2^-$ -Fragmentionen bei  $m/z$  502.2 bzw. 520.2 bestätigten die Präsenz des *schisto-cores* am reduzierenden Ende des Tetrasaccharids.

Die weitere Fragmentierung des Kohlenhydratepitopes bei  $m/z$  486.2 ( $983.4 \rightarrow 486.2$ ) bestätigte die bisher beschriebene strukturelle Charakterisierung von  $H_2N_2$  (Abbildung 25B): Das durch Ketenabspaltung vom *precursor* generierte Fragment bildete bei  $m/z$  444.2 das Signal der höchsten Intensität.  $B_1^-$  und  $C_1^-$ -Fragmentionen einer endständigen Hexose ( $m/z$  241.0, 259.1), das  $B_2Y_3^-$ -Fragmention eines subterminalen *N*-Acetylhexosamins ( $m/z$  268.2) sowie das bereits in ESI-MS<sup>2</sup> Experimenten von  $H_2N_2$  beschriebene Signal bei  $m/z$  329.2 konnten nur durch Fragmentierung des LacNAc-Epitops generiert worden sein und verifizierten dieses anhand ihrer hohen Signalintensitäten als Kohlenhydratepitop des Hauptisomers. In deutlich geringerer Intensität wurde das  $B_2Y_3^-$ -Fragmention der subterminalen Hexose der Nebenkomponente detektiert ( $m/z$  227.0).

#### *Strukturelle Charakterisierung von $F_1H_2N_2$*

In Übereinstimmung mit den ELISA Experimenten konnten die ESI-MS<sup>n</sup> Analysen des Oligosaccharids der allgemeinen Zusammensetzung  $F_1H_2N_2$  Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid als Hauptisomer identifizieren (Abbildung 26). Entsprechend der massenspektrometrischen Untersuchung von  $H_2N_2$  (siehe oben) konnte auch hier auf das zusätzliche Vorkommen einer isomeren Nebenkomponente mit monofucosyliertem, terminalem *N*-Acetylhexosamin und subterminaler Hexose geschlossen werden. In Abbildung 26 sind Struktur und diagnostische Signale des Hauptisomers grün, die der Nebenkomponente orange markiert. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die nicht farblich markierten Signale, welche Fragmente beider Strukturkandidaten repräsentieren können, jeweils nur mit dem Fragment des Hauptisomers Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid annotiert.



**Abbildung 26** ESI-MS<sup>n</sup> Analyse von F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

Strukturelle Charakterisierung des reduzierten und permethylierten Oligosaccharids der Zusammensetzung F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> aus Fraktion 5. (A), ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum des *precursors*  $m/z$  1157.6. (B), ESI-MS<sup>3</sup> Spektrum des Kohlenhydratepitops bei  $m/z$  660.4 (1157.6→660.4). (C), ESI-MS<sup>4</sup> Spektrum der BY-Fragmentationen  $m/z$  472.2 (1157.6→660.4→472.2). (D), ESI-MS<sup>5</sup> Spektrum der BY-Fragmentationen nach Keten-Abspaltung bei  $m/z$  430.2 (1157.6→660.4→472.2→430.2). Abspaltungen von Keten ( $\Delta m/z$  42) sind durch grau gestrichelte Linien illustriert. Die Annotation registrierter Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. undefinierte Signale sind mit einem Stern (\*), diagnostische Signale der beiden Strukturisomere in grün bzw. orange markiert. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; weißer Kreis, Hexose; weißes Quadrat, *N*-Acetylhexosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose.

In Übereinstimmung mit früheren massenspektrometrischen Untersuchungen der Kohlenhydrat-Komponenten von GSL aus Cercarien und Eiern von *S. mansoni* zeigte das ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum des *precursors*  $m/z$  1157.6 das charakteristische Fragmentierungsmuster des Le<sup>X</sup>-Pentasaccharids, welches maßgeblich durch Detektion des Y-Fragments des *schisto-cores* ( $m/z$  520.3) und des B-Fragments des Kohlenhydratepitops ( $m/z$  660.4) bestimmt wird (Abbildung 26A) [65, 141]. Mit schwacher Intensität konnte bei  $m/z$  456.2 das für die Nebenkomponente diagnostische B<sub>1α</sub>-Fragmentation eines monofucosylierten, terminalen *N*-Acetylhexosamins detektiert werden.

Eine mögliche Fucosylierung des *schisto-cores* wurde über ESI-MS<sup>3</sup> Analysen des Signals bei  $m/z$  905.5 ausgeschlossen, welche keine Hinweise bezüglich dieser Modifikation aufzeigten (Daten nicht gezeigt).

Die weitere Untersuchung des Kohlenhydratepitops bei  $m/z$  660.4 in ESI-MS<sup>3</sup> Analysen (1157.6→660.4) bestätigte das Le<sup>X</sup>-Epitop als Hauptisomer durch Detektion diagnostischer Signale bei  $m/z$  241.0, 236.0, 259.1, 301.0, 329.2, 424.1 und 442.2 (Abbildung 26B). In analoger Weise konnten B<sub>3</sub>Y<sub>3</sub><sup>-</sup> und B<sub>2</sub>-Fragmentationen der Nebenkomponente in entsprechend geringeren Intensitäten bei  $m/z$  227.0 und 456.2 registriert werden. Besonders auffallend war bei dieser Untersuchung das Auftreten von Satelliten-Signalen bei einem um die Masse von Keten verringerten  $m/z$ -Wert ( $\Delta m/z$  42) der entsprechenden Hauptsignale ( $m/z$  382.2/424.1, 412.2/454.2, 430.2/472.2, 618.4/660.4).

Zur Verifizierung der Ketenabspaltung erfolgte eine ESI-MS<sup>4</sup> Analyse des Signals  $m/z$  472.2 (1157.6→660.4→472.2) (Abbildung 26C). Neben den diagnostischen Signalen der beiden Strukturkandidaten war das Signal der höchsten Intensität bei einem um 42 verringerten  $m/z$ -Wert von 430.2 detektierbar. Dessen weitere Fragmentierung (1157.6→660.4→472.2→430.2) resultierte in der Detektion charakteristischer B- bzw. C-Fragmentationen einer terminalen Hexose ( $m/z$  241.1, 259.1) und bestätigte somit indirekt die Abspaltung von Keten vom subterminalen *N*-Acetylhexosamin (Abbildung 26D). Da in diesem Spektrum ausschließlich diagnostische Signale des Hauptisomers detektiert werden konnten, wurde das entsprechende Fragment der Nebenkomponente bei  $m/z$  430.2 nicht illustriert.

Besonders interessant war hierbei, dass die beschriebene Abspaltung von Keten in ESI-MS<sup>n</sup> Analysen von Oligosacchariden mit variabel fucosylierten LDN-Motiven nicht beobachtet werden konnten (vgl. hierzu ESI-MS<sup>n</sup> Analysen von F<sub>1-4</sub>H<sub>1</sub>N<sub>3</sub>).

#### Strukturelle Charakterisierung von F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>

In der ESI-MS<sup>n</sup> Analyse des Oligosaccharids der allgemeinen Zusammensetzung F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub> konnte Le<sup>X</sup>-Hexasaccharid als Hauptisomer identifiziert werden (Abbildung 38, Anhang). Entsprechend den massenspektrometrischen Untersuchungen von H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> und F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (vgl.

hierzu Abbildung 25 und Abbildung 26) konnten auch bei diesem Oligosaccharid diagnostische Signale von Fragmentationen einer isomeren Nebenkomponente mit monofucosyliertem, terminalem *N*-Acetylhexosamin und subterminaler Hexose detektiert werden.

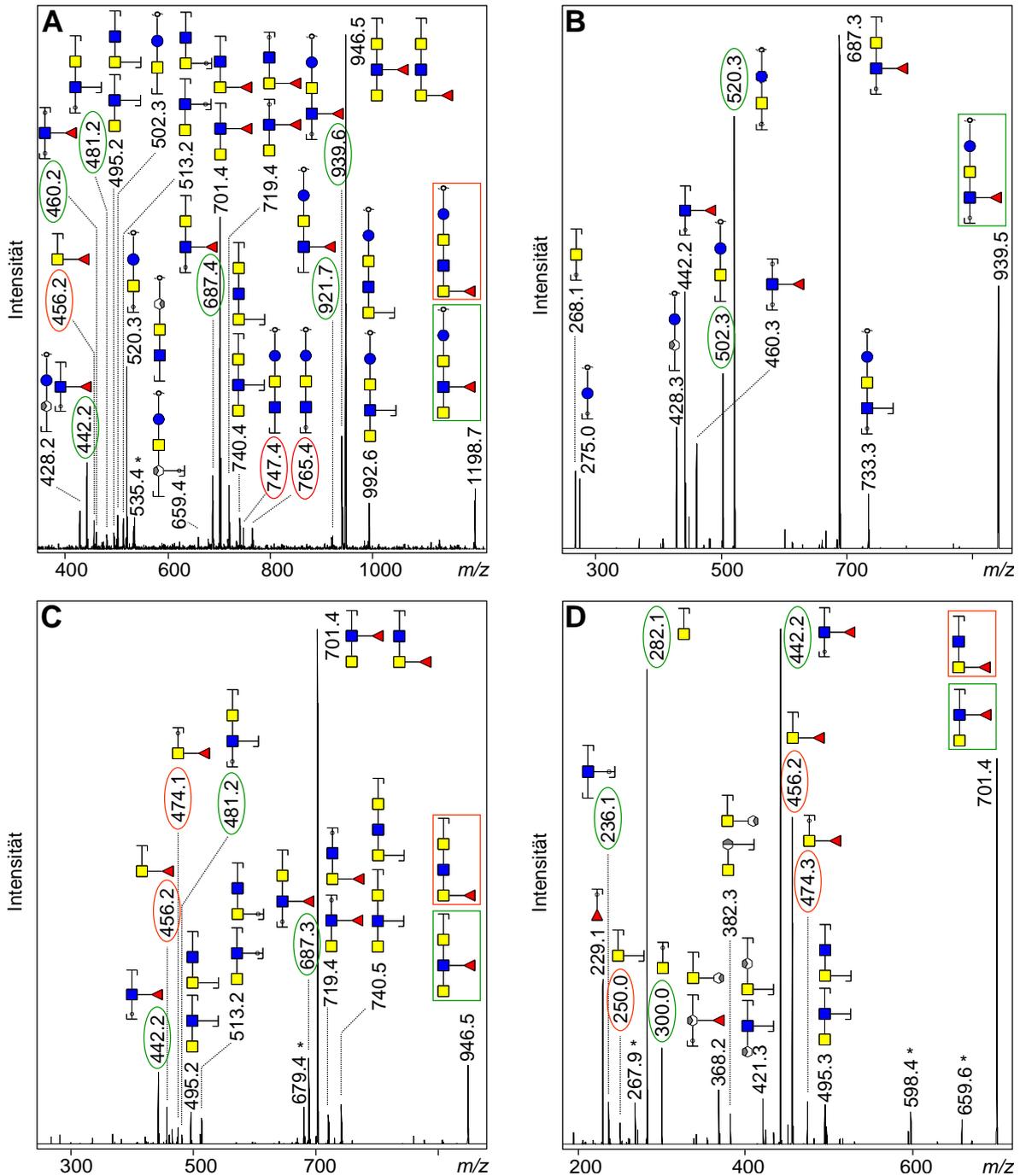
#### *Strukturelle Charakterisierung von F<sub>1</sub>H<sub>1</sub>N<sub>3</sub>*

Die ESI-MS<sup>n</sup> Analysen des reduzierten und permethylierten Oligosaccharids der Zusammensetzung F<sub>1</sub>H<sub>1</sub>N<sub>3</sub> verifizierten das LDN-F-tragende Pentasaccharid als dominantes Strukturisomer (Abbildung 27). F-LDN konnte hierbei als Kohlenhydratepitop der Nebenkomponente identifiziert werden. In Abbildung 27 sind diagnostische Signale, welche die Präsenz der isomeren Kohlenhydratepitope LDN-F und F-LDN verifizieren, grün bzw. orange markiert. Nicht-diagnostische Signale sind mit Fragmenten beider Strukturisomere annotiert.

Bereits das ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum des *precursors* *m/z* 1198.7 enthielt detaillierte strukturelle Informationen der vorliegende Strukturkandidaten (Abbildung 27A). Neben den nicht-diagnostischen Signalen höchster Intensität (Y-Fragmentation des *schisto-cores* (*m/z* 520.3) sowie B-Fragmentationen bei *m/z* 701.4 und 946.5) konnten zahlreiche charakteristische Signale, welche die Präsenz des LDN-F-Epitops verifizierten, detektiert werden (*m/z* 442.2, 460.2, 481.2, 687.4, 921.7, 939.6). Darüber hinaus belegte die Detektion des B-Fragmentations eines monofucosylierten, terminalen *N*-Acetylhexosamins (*m/z* 456.2) in Kombination mit entsprechenden Z<sub>3</sub>- und Y<sub>3</sub>-Fragmentationen bei *m/z* 747.4 und 765.4 das Vorkommen des F-LDN-Epitops. Die hierbei registrierten Signalintensitäten erlaubten bereits an dieser Stelle die Identifizierung des LDN-F-tragenden Oligosaccharids als vorliegende Hauptkomponente: Das B<sub>2</sub>Y<sub>3α</sub>-Fragmentation des monofucosylierten, subterminalen *N*-Acetylhexosamins (*m/z* 442.2) wird durch den gleichzeitigen Bruch von zwei glykosidischen Bindungen generiert. Dennoch wurde es mit einer deutlich höheren Signalintensität registriert als das entsprechende F-LDN-verifizierende Fragmentation eines monofucosylierten, terminalen *N*-Acetylhexosamins (*m/z* 456.2), dessen Bildung nur den Bruch einer glykosidischen Bindung erforderte. Unter der Berücksichtigung, dass der gleichzeitige Bruch von zwei glykosidischen Bindungen weniger wahrscheinlich ist als ein einfacher Bruch, musste die LDN-F-tragende Struktur einen deutlich größeren Anteil am isomeren Gemisch repräsentieren als das F-LDN-tragende Oligosaccharid.

Eine ESI-MS<sup>3</sup> Analyse des Y<sub>3</sub>-Fragmentations bei *m/z* 939.6 (1198.7→939.6) bestätigte die Lokalisierung der Fucose am subterminalen *N*-Acetylhexosamin (Abbildung 27B). Mit hoher Intensität konnten hierbei die Y- und Z-Fragmentationen des nicht-fucosylierten *schisto-cores* bei *m/z* 502.3 und 520.3 detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden Signale, welche auf eine Fucosylierung des *schisto-cores* schließen ließen, nicht registriert.

---



**Abbildung 27** ESI-MS<sup>n</sup> Analyse von  $F_1H_1N_3$

Strukturelle Charakterisierung des reduzierten und permethylierten Oligosaccharids der Zusammensetzung  $F_1H_1N_3$ . (A), ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum des *precursors*  $m/z$  1198.7. (B), ESI-MS<sup>3</sup> Spektrum des  $Y_{3a}$ -Fragmentations bei  $m/z$  939.6 (1198.7→939.6). (C), ESI-MS<sup>3</sup> Spektrum der B-Fragmentionen bei  $m/z$  946.5 (1198.7→946.5). (D), ESI-MS<sup>4</sup> Spektrum des Kohlenhydrat-epitops bei  $m/z$  701.4 (1198.7→946.5→701.4). Die Annotation der registrierten Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. undefinierte Signale sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Diagnostische Signale der beiden Strukturisomere sind in grün bzw. orange markiert. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose.

Die abschließende Bestätigung der erhobenen strukturellen Befunde erfolgte in ESI-MS<sup>3</sup> Analysen der B-Fragmentionen bei  $m/z$  946.5 (1198.7→946.5) (Abbildung 27C) sowie der darauffolgenden Fragmentierung des Kohlenhydratepitopes  $m/z$  701.4 (1198.7→946.5→701.4) (Abbildung 27D). Der direkte Vergleich registrierter Signalintensitäten bei  $m/z$  442.2 und 456.2 in Abbildung 27C erlaubte entsprechend den bereits beschriebenen Überlegungen bezüglich zugrunde liegender Fragmentierungspfade die Identifizierung des LDN-F-tragenden Pentasaccharids als vorherrschendes Isomer. Die für das LDN-F-Epitop bislang nicht registrierten diagnostischen Signale eines unsubstituierten, terminalen *N*-Acetylhexosamins konnten durch Fragmentierung des Kohlenhydratepitops als B- und C-Fragmentionen bei  $m/z$  282.1 und 300.1 registriert werden (Abbildung 27D).

#### *Strukturelle Charakterisierung von F<sub>2</sub>H<sub>1</sub>N<sub>3</sub>*

Die Ergebnisse der ESI-MS<sup>n</sup> Analyse des permethylierten Oligosaccharids der Zusammensetzung F<sub>2</sub>H<sub>1</sub>N<sub>3</sub> erlaubten Rückschlüsse auf das Vorkommen von drei isomeren Strukturen (Abbildung 28). Hierbei wurden die F-LDN-F- und LDN-DF-tragenden Hexasaccharide als Hauptkomponenten identifiziert, während das DF-LDN-tragende Glykan als Nebenkomponekte registriert werden konnte. In Abbildung 28 sind die jeweils für Fragmente von F-LDN-F-, LDN-DF- und DF-LDN-tragenden Kohlenhydratstrukturen diagnostischen Signale entsprechend grün, blau bzw. orange markiert. Nicht-diagnostische Signale sind mit Fragmenten aller Strukturkandidaten annotiert.

Im ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum des *precursors*  $m/z$  1356.7 repräsentiert das B-Fragmention eines monofucosylierten, terminalen *N*-Acetylhexosamins ( $m/z$  456.3) das Signal der höchsten Intensität und ist somit als diagnostisch für die Präsenz des F-LDN-F-Epitops zu werten (Abbildung 28A). Dass genanntes Signal in einer noch höheren Intensität als das des von allen drei Strukturkandidaten gebildeten B-Fragmentions des Kohlenhydratepitopes ( $m/z$  875.5) detektiert wurde, konnte indikativ für dessen vorherrschende Präsenz gewertet werden. Die entsprechenden Z<sub>3α</sub>- und Y<sub>3α</sub>-Fragmentionen des F-LDN-F-tragenden Strukturisomers wurden bei  $m/z$  905.3 und 923.5 registriert. Das hierzu analoge Y<sub>3α</sub>-Fragmention des LDN-DF-tragenden Isomers wurde bei  $m/z$  1097.6 in hoher Intensität detektiert. Unter weiterer Berücksichtigung der deutlichen Intensitäten der diagnostischen B<sub>3</sub>Y<sub>3β</sub>- und C<sub>3</sub>Y<sub>3β</sub>-Fragmentionen bei  $m/z$  616.4 und 634.4 konnte das LDN-DF-exprimierende Isomer zu den Hauptkomponenten gezählt werden. Im Vergleich hierzu waren entsprechende B<sub>3</sub>- und C<sub>3</sub>-Fragmentionen ( $m/z$  630.4, 648.4) sowie Y<sub>3</sub>- und Z<sub>3</sub>-Fragmentionen ( $m/z$  731.4, 749.5), welche die Präsenz des DF-LDN-tragenden Strukturkandidaten verifizierten, in deutlich geringerer Intensität detektierbar, so dass die genannte Struktur als Nebenkomponekte angesehen wurde.

Diese strukturellen Rückschlüsse konnten in einer ESI-MS<sup>3</sup> Analyse des Kohlenhydratepitops bei  $m/z$  875.6 weiter bestätigt werden (Abbildung 28B). Das B-Fragmention eines monofucosylierten, terminalen *N*-Acetylhexosamins ( $m/z$  456.3) repräsentierte auch hier das Signal der höchsten Intensität. Entsprechendes B<sub>3</sub>-Fragmention ( $m/z$  630.3) und B<sub>3</sub>Y<sub>38</sub>-Fragmention ( $m/z$  616.4) des DF-LDN- bzw. LDN-DF-tragenden Isomers wurden in deutlich geringeren Intensitäten registriert. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der unterschiedlichen Fragmentierungspfade konnte somit DF-LDN als Kohlenhydratepitop der Nebenkomponente und F-LDN-F sowie LDN-DF als Epitope der isomeren Hauptkomponenten verifiziert werden. Eine ESI-MS<sup>3</sup> Analyse des B<sub>3</sub>-Fragmentions bei  $m/z$  1120.7 (1356.7→1120.7) konnte die bisherigen strukturellen Rückschlüsse weiter bestätigen, sowie darüber hinaus eine mögliche Fucosylierung des *schisto-cores* ausschließen (Daten nicht gezeigt).

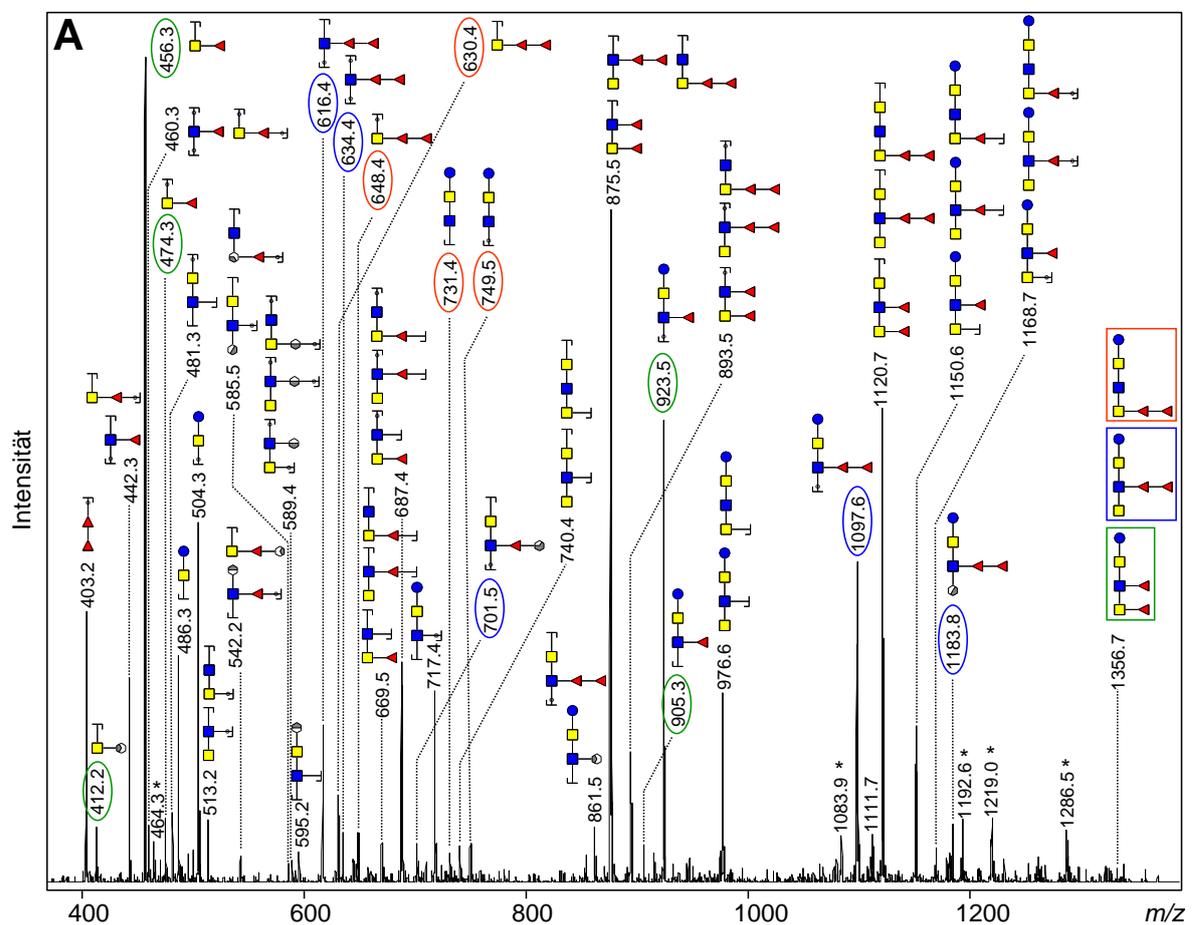
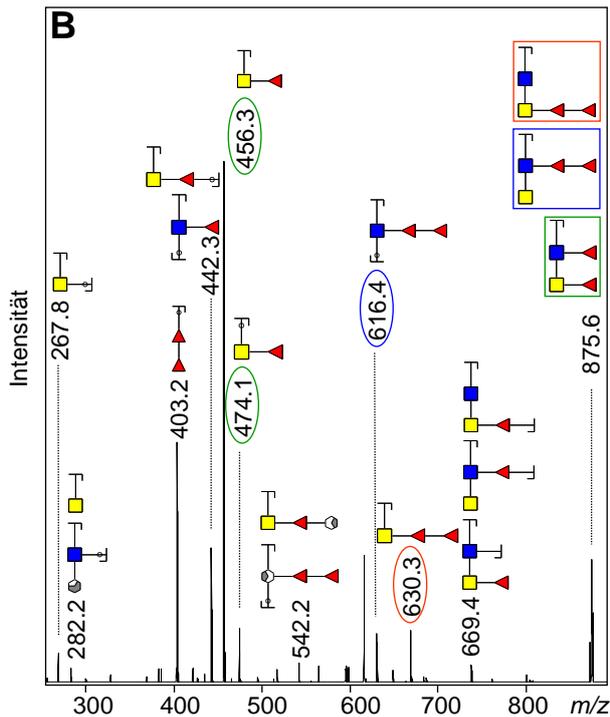


Abbildung 28 ESI-MS<sup>n</sup> Analyse von F<sub>2</sub>H<sub>1</sub>N<sub>3</sub>



**Abbildung 28** (Fortsetzung)

Massenspektrometrische Untersuchung des permethylierten Oligosaccharids der Zusammensetzung  $F_2H_1N_3$ . **(A)**, ESI- $MS^2$  Spektrum des *precursors* bei  $m/z$  1356.7. **(B)**, ESI- $MS^3$  Spektrum der B-Fragmentionen  $m/z$  875.6 ( $1356.7 \rightarrow 875.6$ ). Die Annotation der registrierten Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. undefinierte Signale sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Diagnostische Signale der identifizierten Strukturisomere sind in grün, blau und orange markiert. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose.

Die ESI- $MS^4$  Analyse des  $B_2$ -Fragmentions bei  $m/z$  456.3 bestätigte dessen Annotation als B-Fragmention eines monofucosylierten, terminalen *N*-Acetylhexosamins, konnte allerdings darüber hinaus keine Hinweise auf die Verknüpfungsposition der Fucose liefern (Daten nicht gezeigt).

#### Strukturelle Charakterisierung von $F_3H_1N_3$

In der ESI- $MS^n$  Analyse des permethylierten Oligosaccharids der Zusammensetzung  $F_3H_1N_3$  konnte das F-LDN-DF-tragende Strukturisomer als Hauptkomponente identifiziert werden, während die DF-LDN-F-tragende Struktur die Nebenkomponekte bildete (Abbildung 39, Anhang). Hierbei konnten zusätzlich Signale niedriger Intensität registriert werden, deren Detektion als charakteristisch für das Vorkommen einer Dreifachfucosylierung des subterminalen *N*-Acetylhexosamins zu werten war. GSL-Glykosylierungen dieser Art wurden bisher bei Eiern von *S. mansoni* beschrieben [64, 65]. Da die GSL-Extraktion aus adulten Würmern auch Weibchen einschloss, die Schistosomen-Eier enthielten, konnte unter Berücksichtigung der niedrigen Signalintensitäten hierbei die Detektion von Kohlenhydratstrukturen Ei-spezifischer GSL nicht sicher ausgeschlossen werden. Oligofucosylierte Strukturen blieben deshalb in der zusammenfassenden Übersicht der charakterisierten Strukturisomere aus adulten Würmern unberücksichtigt (vgl. Tabelle 15 sowie 5.2.1).

#### *Strukturelle Charakterisierung von $F_4H_1N_3$*

Das DF-LDN-DF-tragende Oktasaccharid konnte in der ESI-MS<sup>n</sup> Analyse des permethylierten Oligosaccharids der Zusammensetzung  $F_4H_1N_3$  identifiziert werden. Darüber hinaus ergaben sich keine Hinweise für die Präsenz weiterer Strukturisomere (Abbildung 40, Anhang).

#### *Strukturelle Charakterisierung von $F_{1-4}H_1N_4$*

ESI-MS<sup>n</sup> Analysen der permethylierten Oligosaccharide der allgemeinen Monosaccharid-Zusammensetzungen  $F_{1-4}H_1N_4$  ließen auf das Vorkommen derselben Kohlenhydratepitope schließen, wie sie bereits für die Strukturen  $F_{1-4}H_1N_3$  beschrieben wurden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnten diagnostische Signale registriert werden, welche zusätzlich die Präsenz einer isomeren Nebenkomponente mit einer Monofucosylierung des internen *N*-Acetylhexosamins in direkter Nachbarschaft zum terminalen Kohlenhydratepitop verifizierten (vgl. Tabelle 15).

Die durchgeführten ESI-MS<sup>n</sup> Analysen derivatisierter Oligosaccharide einschließlich der zur strukturellen Charakterisierung der einzelnen isomeren Komponenten herangezogenen diagnostischen Signale sind in Tabelle 15 zusammenfassend dargestellt. Fragmentationen von bisher bei Glykokonjugaten von *S. mansoni* nicht beschriebenen Kohlenhydratstrukturen, welche ein terminales (monofucosyliertes) *N*-Acetylhexosamin und eine subterminale Hexose aufweisen (vgl. strukturelle Charakterisierung von  $H_2N_2$ ,  $F_1H_2N_2$  und  $F_1H_2N_3$ ), sind in Tabelle 15 nicht aufgeführt. Die entsprechenden Piktogramme der aufgelisteten Fragmentationen sind in einer Übersicht im Anhang abgebildet (Tabelle 17).

---

Kohlenhydrat-Komponente (aus GSL-Fraktion)	charakteristische Fragmentionen ( <i>m/z</i> )		
	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>	MS <sup>4</sup>
H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> * (5)	<u>486.2/520.2</u> 731.3	<u>259.1/268.2/329.2</u> 259.0/486.2	
F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> * (5, 6)	<u>520.3/660.4</u>	<u>259.1/472.2</u>	241.1
F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> N <sub>3</sub> * (5, 6)	<u>520.3/660.4</u>	<u>259.1/472.2</u>	
F <sub>1</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub> * (5, 6)	442.2; (456.2)		
	687.4		
	<u>939.6</u> ; (765.4)	442.2; (456.2)	
	946.5	701.4	<u>282.1</u> ; (250.0) 442.2; (456.2)
F <sub>2</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub> (5, 6)	456.3; 616.4; (630.4)	403.2	
	875.5	<u>456.3</u> ; 616.4; (630.4)	<u>229.0/250.0/268.1</u>
	(749.5); 923.5; 1097.6		
F <sub>3</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub> (5, 6)	<u>456.3</u> ; (630.4)	403.1/442.1	
	1049.6	403.2	
	(923.5); <u>1097.6</u>	<u>456.3</u> ; 616.5; (630.2)	385.0/403.2
F <sub>4</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub> (5, 6)	630.4	403.2/504.3/616.4	
	1097.6	630.4/648.4	385.1/403.2/442.1
	1223.7	403.2/486.2/630.3	403.3/442.2
	1324.7		
F <sub>1</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub> (5, 6)	442.3; (456.2)	282.1; (268.1)	
	701.4	<u>442.2</u> ; (456.1)	
	(994.5); 1168.7		
F <sub>2</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub> (5, 6)	456.3; 616.3; (701.4)	403.2	
	875.5	<u>456.2</u> ; 616.4	<u>229.0/250.1/268.1</u>
	(905.7); <u>1168.6</u>	442.0/495.3/749.6	
	1342.7	403.1/634.0/749.1	
F <sub>3</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub> (6)	(630.4)	456.2; 630.4/648.7	
	1067.6	634.4	403.2
	(1168.7); <u>1342.9</u>	634.4; (442.2)	
		749.7; (905.4)	
F <sub>4</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub> (6)	630.3	385.2/403.2/442.0	
	1342.8	616.1/634.1/749.5	

**Tabelle 14** Charakteristische Fragmentionen der ESI-MS<sup>n</sup> Analyse permethylierter Oligosaccharide aus adulten Würmern

Alle Fragmente wurden als Natriumaddukte ([M+Na]<sup>+</sup>) registriert. Die entsprechenden *m/z*-Werte der Fragmentionen verschiedener Strukturisomere sind durch ein Semikolon getrennt, während jene von isomeren Nebenkomponenten zusätzlich in Klammern gesetzt sind. Oligosaccharide, die in reduzierter (sowie permethylierter) Form strukturell charakterisiert wurden, sind mit einem Stern (\*) markiert. Signale von Fragmenten, die einer weiteren Fragmentierung unterzogen wurden, sind unterstrichen. Für eine übersichtliche Darstellung der Piktogramme aufgelisteter Fragmentionen siehe Tabelle 17 im Anhang.

#### 4.3.2.5 Strukturen der Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL

Im Rahmen dieser Arbeit wurden elf Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL aus adulten Würmern in MALDI-MS(/MS) Experimenten nativer (4.3.2.3) und permethylierter Glykane sowie in ESI-MS<sup>n</sup> Experimenten derivatisierter Glykane (4.3.2.4) detailliert analysiert. Die hieraus resultierenden Strukturvorschläge sind in Tabelle 15 zusammenfassend dargestellt. Die bisher bei Glykokonjugaten von *S. mansoni* nicht beschriebenen Kohlenhydratstrukturen, welche ein terminales (monofucosyliertes) *N*-Acetylhexosamin und eine subterminale Hexose aufweisen (vgl. strukturelle Charakterisierung von H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> und F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), sind hierbei nicht aufgeführt. Die dargestellten Monosaccharid-Sequenzen sind bereits publizierten Strukturen der Kohlenhydrat-Komponenten von GSL aus Cercarien, Eiern und adulten Würmern entnommen [14, 62-65, 140, 141]. Unter Berücksichtigung der erhobenen Struktur-Daten aus den ELISA-Experimenten nativer GSL (siehe 3.6.1) und in Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Kohlenhydrat-Strukturen von GSL aus *S. mansoni* kann jedoch auf die Expression der folgenden Kohlenhydrat-epitope geschlossen werden: LacNAc, Le<sup>x</sup>, F-LDN, LDN-F, F-LDN-F, DF-LDN, LDN-DF, F-LDN-DF, DF-LDN-F und DF-LDN DF. In wenigen Fällen wurden durch den Nachweis entsprechender Fragmentionen in ESI-MS<sup>n</sup> Analysen präzise Verknüpfungspositionen identifiziert, welche die genannten Epitope bestätigen konnten (Daten nur teilweise gezeigt; vgl. hierzu Abbildung 40F im Anhang). Fragmentionen, welche die Präsenz hiervon abweichender Verknüpfungspositionen indiziert hätten, konnten nicht detektiert werden.

Zusätzlich zu den in Tabelle 15 in Klammern gezeigten Nebenkomponten lieferten die in den ESI-MS<sup>n</sup> Experimenten einiger Oligosaccharide erhobenen Daten zusätzliche Hinweise auf das Vorkommen weiterer Strukturisomere. So lassen Fragmentionen von F<sub>2</sub>H<sub>1</sub>N<sub>4</sub> beispielsweise auch auf die Präsenz des DF-LDN-Epitops schließen (Daten nicht gezeigt). Basierend auf den sehr geringen Intensitäten detektierter Signale sind jedoch in Tabelle 15 zu Gunsten der Übersichtlichkeit nur die jeweils vorherrschenden Nebenkomponten dargestellt.

---

Kohlenhydrat-Komponente	Strukturvorschläge charakterisierter Isomere		
$H_2N_2$			
$F_1H_2N_2$			
$F_1H_2N_3$			
$F_1H_1N_3$			
$F_2H_1N_3$			
$F_3H_1N_3$			
$F_4H_1N_3$			
$F_1H_1N_4$			
$F_2H_1N_4$			
$F_3H_1N_4$			
$F_4H_1N_4$			

**Tabelle 15** Strukturvorschläge von Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL aus adulten Würmern

Es sind jeweils die Hauptisomere gezeigt, während Nebenkomponenten in Klammern gesetzt sind. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose.

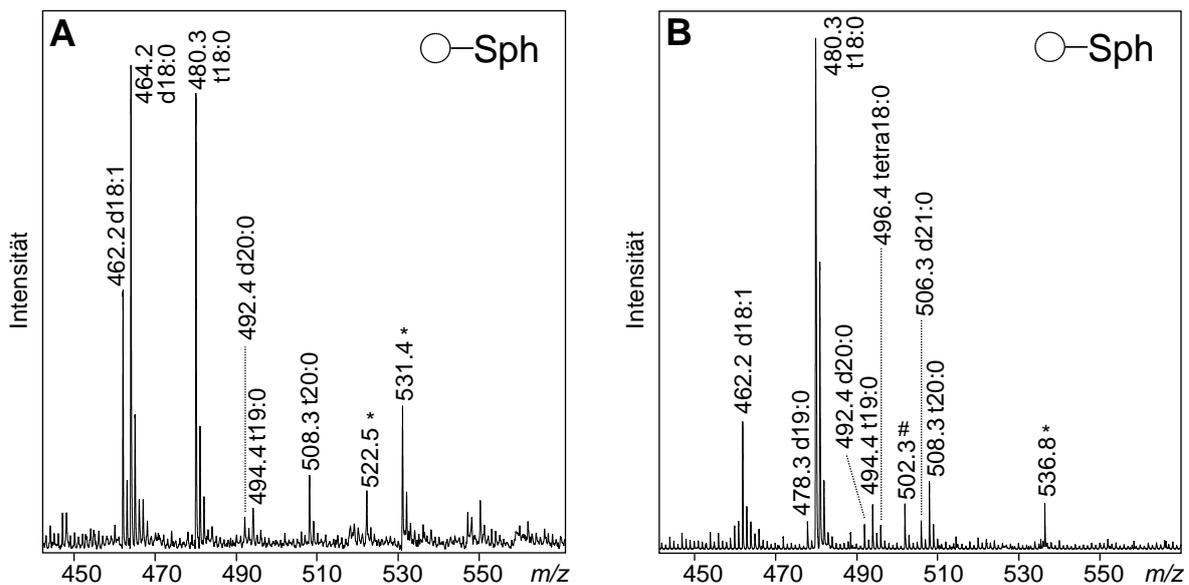
### 4.3.3 Strukturelle Charakterisierung der Ceramid-Komponenten

Die strukturelle Charakterisierung der Ceramid-Komponenten von GSL adulter Würmer erfolgte über massenspektrometrische Analyse der aus dem enzymatischen Verdau nativer GSL mit SCDase (3.7.2) gewonnenen Lyso-GSL. Fraktion 8 blieb hierbei wegen der geringen Menge an GSL unberücksichtigt.

#### 4.3.3.1 Massenspektrometrische Untersuchung der Lyso-GSL

##### *Lyso-GSL von CMH*

Die MALDI-MS Analyse der freigesetzten Lyso-GSL aus Fraktion 1 ließ auf das Vorkommen von C18-Sphingosin (d18:1,  $m/z$  462.2), C20-Sphinganin (d20:0,  $m/z$  492.4) und C18 - C20-Phytosphingosin (t18:0 - t20:0,  $m/z$  480.3, 494.4, 508.3) in CMH schließen, wobei Hex-d18:1, Hex-d18:0 und Hex-t18:0 als Hauptkomponenten registriert wurden (Abbildung 29A). In der MALDI-MS Analyse der Lyso-GSL aus Fraktion 2 konnte Hex-d18:0 nicht mehr detektiert werden, während Hex-t18:0 ( $m/z$  480.3) auch hier die Hauptkomponente bildete (Abbildung 29B).



**Abbildung 29** MALDI-MS Analyse kleiner Lyso-GSL aus adulten Würmern

Massenspektrometrische Analyse enzymatisch freigesetzter Lyso-GSL aus Fraktion 1 (**A**) und Fraktion 2 (**B**). Die Lyso-GSL wurden als Protonenaddukte ( $[M+H]^+$ ) detektiert und jeweils nur mit der entsprechenden Sphingoidbase annotiert. Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) und undefinierte Signale sind mit einer Raute (#) bzw. Stern (\*) markiert. d18:1, C18-Sphingosin; d18:0 - d21:0, C18- bis C21-Sphinganin; t18 - t20:0, C18- bis C20-Phytosphingosin; weißer Kreis, Hexose; Sph, Sphingoidbase.

Zusätzlich zu den in Fraktion 1 registrierten Signalen ließen Signale bei  $m/z$  478.3 und 506.3 auf das Vorkommen von C19- und C21-Sphinganin (d19:0, d21:0) in CMH schließen. In ESI-MS<sup>n</sup> Analysen (s. unten) wurde das Signal bei  $m/z$  502.3 als Natriumaddukt ( $[M+Na]^+$ ) von Hex-t18:0 identifiziert. Während Sphingosine, Sphinganine und Phytosphingosine bereits in früheren Untersuchungen von CMH aus adulten Würmern detektiert worden sind [62], gibt das Signal bei  $m/z$  496.4 Hinweise auf das Vorkommen einer bislang bei *S. mansoni* noch nicht beschriebene Sphingoidbasen-Spezies, welche vier Hydroxylgruppen aufweist (Abk. tetra18:0).

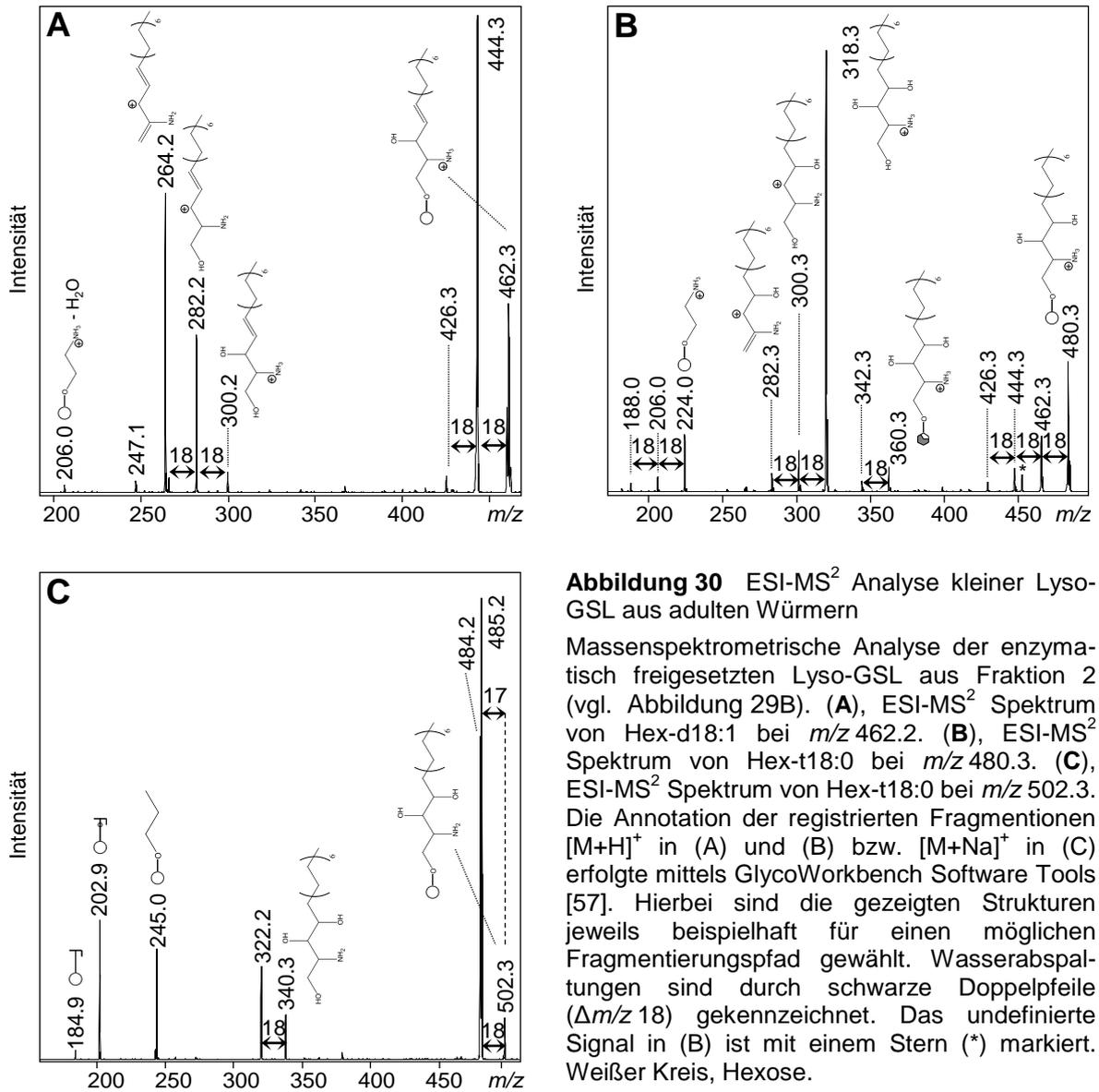
Die Verifizierung der massenbasierten Zuordnung registrierter Lyso-GSL erfolgte anschließend in ESI-MS<sup>n</sup> Analysen. Dies soll im Folgenden an einigen ausgewählten Strukturen der Fraktion 2 beispielhaft dargestellt werden.

Bei der ESI-MS<sup>2</sup> Untersuchung von Hex-d18:1 bei  $m/z$  462.2 repräsentierte das Signal der höchsten Intensität ( $m/z$  444.3) eine Wasserabspaltung vom *precursor* (Abbildung 30A). Daneben ließen sich die freie Sphingoidbase C18-Sphingosin ( $m/z$  300.2) sowie zwei weitere Produkte registrieren, welche aus einer einfachen bzw. doppelten Wasserabspaltung von der freien Base entstanden waren ( $m/z$  282.2, 264.2). Das Signal bei  $m/z$  206.0 konnte durch eine Fragmentierung der Sphingoidbase mit gleichzeitiger Wasserabspaltung erklärt werden.

In ähnlicher Weise ließen sich entsprechend diagnostische Signale bei der ESI-MS<sup>n</sup> Analyse von Hex-t18:0 bei  $m/z$  480.3 registrieren (Abbildung 30B). Als Signal der höchsten Intensität wurde die freie Sphingoidbase C18-Phytosphingosin bei  $m/z$  318.3 detektiert. Mit deutlich geringerer Intensität ließen sich eine einfache und doppelte Wasserabspaltung von der freien Base bei  $m/z$  300.3 und 282.3 nachweisen. Das Signal  $m/z$  360.3 konnte durch einen <sup>0,2</sup>X<sub>0</sub>-Ringbruch der Hexose erklärt werden, während das Signal bei  $m/z$  224.0 offensichtlich durch eine Fragmentierung der Sphingoidbase generiert wurde. Weitere Wasserabspaltungen ( $\Delta m/z$  18) waren sowohl vom *precursor* als auch von den generierten Fragmentationen nachweisbar.

In beschriebener Weise konnte anhand des charakteristischen Fragmentierungsmusters der verschiedenen Lyso-GSL in ESI-MS<sup>2</sup> Untersuchungen das Vorkommen aller annotierten Sphingoidbasen in CMH aus Fraktion 2 (vgl. hierzu Abbildung 29) bestätigt werden. Im Anhang (Abbildung 41) finden sich die entsprechenden ESI-MS<sup>2</sup> Spektren zur strukturellen Verifizierung von Hex-d19:0 ( $m/z$  478.3; ESI-MS<sup>2</sup> Analyse als Natriumaddukt ( $[M+Na]^+$ ) bei  $m/z$  500.5), Hex-d20:0 ( $m/z$  492.4), Hex-d21:0 ( $m/z$  506.3) und Hex-tetra18:0 ( $m/z$  496.4). ESI-MS<sup>2</sup> Analysen der Lyso-GSL aus Fraktion 1 bestätigten ebenfalls die MALDI-MS-basierte Annotation der einzelnen Signale (Daten nicht gezeigt).

---



**Abbildung 30** ESI-MS<sup>2</sup> Analyse kleiner Lyso-GSL aus adulten Würmern

Massenspektrometrische Analyse der enzymatisch freigesetzten Lyso-GSL aus Fraktion 2 (vgl. Abbildung 29B). **(A)**, ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von Hex-d18:1 bei  $m/z$  462.2. **(B)**, ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von Hex-t18:0 bei  $m/z$  480.3. **(C)**, ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von Hex-t18:0 bei  $m/z$  502.3. Die Annotation der registrierten Fragmentationen  $[M+H]^+$  in (A) und (B) bzw.  $[M+Na]^+$  in (C) erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. Hierbei sind die gezeigten Strukturen jeweils beispielhaft für einen möglichen Fragmentierungspfad gewählt. Wasserabspaltungen sind durch schwarze Doppelpfeile ( $\Delta m/z$  18) gekennzeichnet. Das undefinierte Signal in (B) ist mit einem Stern (\*) markiert. Weißer Kreis, Hexose.

Aufgrund der ausgeprägten Bildung von Protonenaddukten ( $[M+H]^+$ ) der Lyso-GSL in MALDI-MS Analysen (vgl. hierzu Abbildung 29) führte eine NaCl-Zugabe zum Proben spot nicht zur quantitativen Bildung der entsprechenden Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund erfolgte die Identifizierung des Pseudomoleküliens  $[M+Na]^+$  von Hex-t18:0 ( $m/z$  502.3) in ESI-MS<sup>n</sup> Untersuchungen. Interessanterweise unterschied sich das hierbei registrierte Fragmentierungsmuster (Abbildung 30C) deutlich von dem des Protonenadduktes ( $[M+H]^+$ ) (vgl. Abbildung 30B): Neben dem aus einer Wasserabspaltung vom *precursor* ( $m/z$  502.3) generierten Fragmentation ( $m/z$  484.2) repräsentierte ein in der Masse um 17 Da verringertes Fragment bei  $m/z$  485.2 das Signal der höchsten Intensität, welches aus einer NH<sub>3</sub>-Abspaltung generiert worden sein konnte. Das C-Fragment der endständigen Hexose war bei  $m/z$  202.9 mit hoher Intensität detektierbar; das entsprechende B-Fragmention ( $m/z$  184.9)

konnte ebenfalls registriert werden. Die freie Sphingoidbase ( $m/z$  340.3) und das entsprechende Produkt der einfachen Wasserabspaltung ( $m/z$  322.2) waren in deutlich geringeren Intensitäten nachweisbar. Die weitere Fragmentierung des Signals  $m/z$  245.0 in ESI-MS<sup>3</sup> Untersuchungen (502.3→245.0) resultierte in der Detektion des B-Fragmentions der Hexose ( $m/z$  184.9) (Daten nicht gezeigt), so dass genanntes Signal, wie in Abbildung 30C beispielhaft dargestellt, aus einer Fragmentierung der Sphingoidbase hervorgegangen sein muss.

#### *Lyso-GSL komplexer GSL*

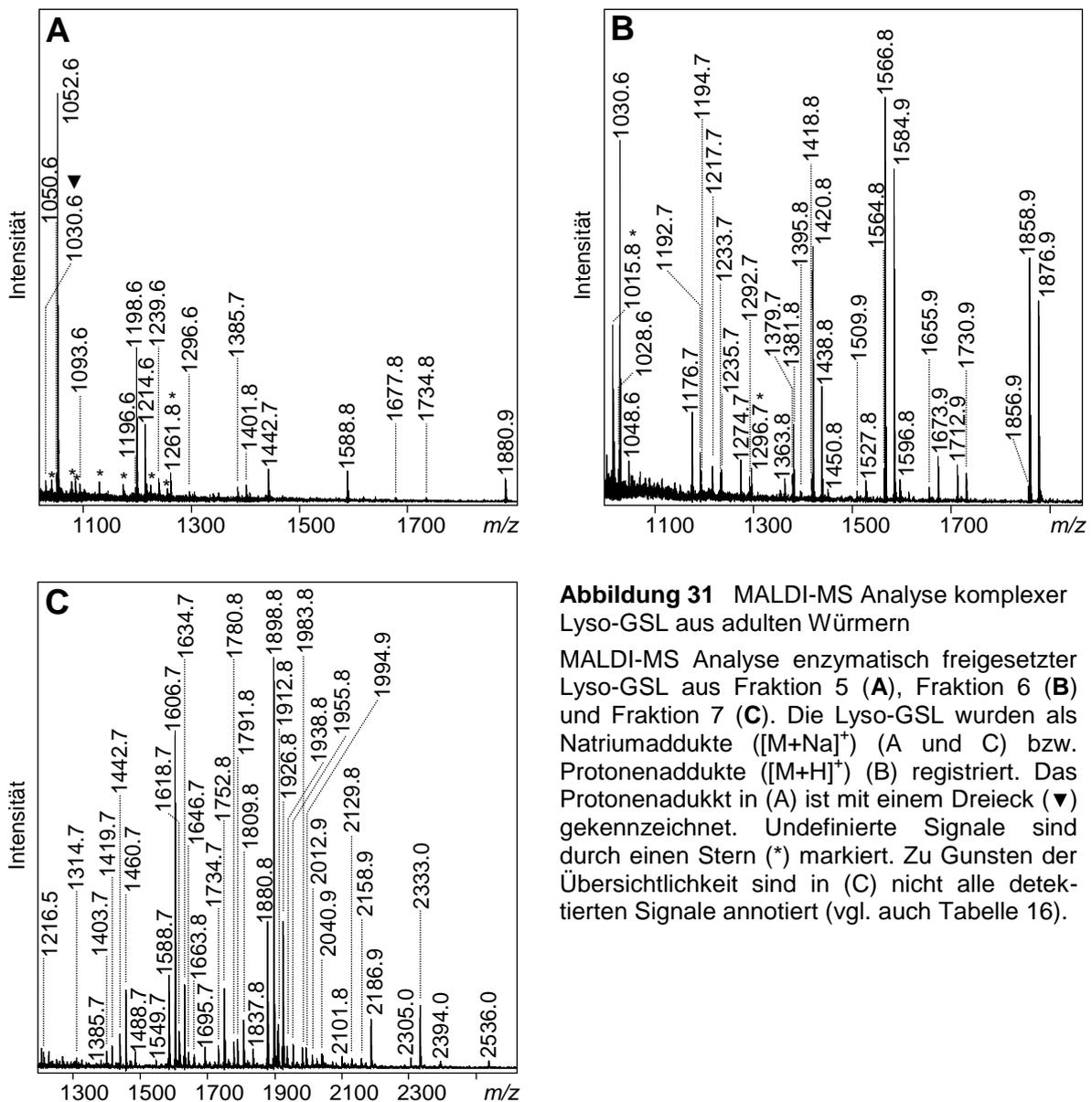
Basierend auf den bereits verifizierten Kohlenhydratstrukturen komplexer GSL (4.3.2) wurden die detektierten Signale der Lyso-GSL aus den Fraktionen 5 bis 7 (Abbildung 31) rechnerisch in Cluster identischer Kohlenhydrat-Zusammensetzungen eingruppiert (Tabelle 16). Es bleibt hierbei jedoch zu berücksichtigen, dass die vorgenommene Eingruppierung registrierter Lyso-GSL aufgrund des möglichen Vorkommens isobarer Strukturen keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben kann. Unter Berücksichtigung detektierter Ceramid-Muster und Abwägung registrierter Signalintensitäten erfolgte die Eingruppierung der entsprechenden Lyso-GSL jeweils zum Hauptisobar. Auf Mehrfach-Zuordnungen einzelner Signale wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Die Präsenz der bei der strukturellen Charakterisierung komplexer GSL verifizierten Kohlenhydratepitope (vgl. hierzu Tabelle 15) wird im Folgenden für die entsprechenden Kohlenhydrat-Komponenten vorausgesetzt.

Die Ergebnisse zeigten, dass die in Fraktion 5 detektierten Lyso-GSL überwiegend C18-Sphingosin aufwiesen (Abbildung 31A, Tabelle 16). Während Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  LacNAc-basierter Kohlenhydrat-Komponenten ( $H_2N_2$ ,  $m/z$  1052.6;  $F_1H_2N_2$ ,  $m/z$  1198.6) als Hauptkomponenten registriert wurden, konnten entsprechende Strukturen LDN-basierter Kohlenhydrat-Spezies in deutlich geringerer Intensität registriert werden ( $F_{0-4}H_1N_3$  (exkl.  $F_3H_1N_3$ ),  $m/z$  1093.6, 1239.6, 1385.7, 1677.8;  $F_{0-4}H_1N_4$ ,  $m/z$  1296.6, 1442.7, 1588.8, 1734.8, 1880.9). Mit geringer Intensität detektierte Signale bei  $m/z$  1050.6 und 1196.6 gaben darüber hinaus Hinweise auf das Vorkommen einer bislang bei *S. mansoni* nicht beschriebenen Sphingoidbase, deren Masse der von C18-Sphingosin mit einer zusätzlichen Doppelbindung zugeordnet werden konnte (C18-Sphingadien, Abk. d18:2). Das Signal  $m/z$  1214.6 wurde als Lyso-GSL der Zusammensetzung  $H_3N_2$ -d18:1 identifiziert. Diese Struktur repräsentierte in Übereinstimmung mit der strukturellen Charakterisierung der Kohlenhydrat-Komponenten (4.3.2.3) mit großer Wahrscheinlichkeit das Lyso-GSL des vom Wirt stammenden Forssman-Antigens und blieb deshalb bei der Eingruppierung schistosomaler Lyso-GSL in Tabelle 16 unberücksichtigt.

In den aus GSL der Fraktion 6 freigesetzten Lyso-GSL waren neben C18-Sphingosin auch

C18-Phytosphingosin und in geringeren Intensitäten C18-Sphingadien, C20-Sphinganin und C19-Phytosphingosin nachweisbar, wobei  $\text{H}_2\text{N}_2^-$  ( $m/z$  1028.6 - 1048.6),  $\text{F}_1\text{H}_1\text{N}_4^-$  ( $m/z$  1418.8 - 1450.8),  $\text{F}_2\text{H}_1\text{N}_4^-$  ( $m/z$  1564.8 - 1596.8) und  $\text{F}_4\text{H}_1\text{N}_4^-$  ( $m/z$  1856.8 - 1876.9) tragende Lyso-GSL als Hauptkomponenten registriert wurden (Abbildung 31B, Tabelle 16).

Die größte Heterogenität vorkommender Sphingoidbasen konnte in Lyso-GSL der Fraktion 7 detektiert werden (Abbildung 32C, Tabelle 16). Neben den dominierenden Signalen von C18-Sphingosin-, sowie C18- und C20-Phytosphingosin-aufweisender Lyso-GSL konnte zusätzlich auf das Vorkommen von C18-Sphingadien, C20- bis C22-Sphinganin und C19-Phytosphingosin geschlossen werden. Lyso-GSL der Kohlenhydrat-Komponenten  $\text{F}_2\text{H}_1\text{N}_4$  ( $m/z$  1588.7 - 1646.7) und  $\text{F}_4\text{H}_1\text{N}_4$  ( $m/z$  1880.8 - 1938.8) zählten auch hier zu den Hauptkomponenten.



Lyso-GSL		detektierte Pseudomolekülonen ( <i>m/z</i> )		
Kohlenhydrat-Komponente	Sphingoidbase	F5 ([M+Na] <sup>+</sup> )	F6 ([M+H] <sup>+</sup> )	F7 ([M+Na] <sup>+</sup> )
H <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	d18:2	1050.6	1028.6	
	d18:1	1052.6	1030.6	n.d.
	t18:0	-	1048.6	
F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	d18:2	1196.6	-	-
	d18:1	1198.6	1176.7	-
	t18:0	-	1194.7	1216.5
H <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	d18:1	n.d.	1233.7	n.d.
F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	d18:1	1401.8	1379.7	-
	t18:0	-	-	1419.7
H <sub>1</sub> N <sub>3</sub>	d18:1	1093.6	n.d.	n.d.
F <sub>1</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub>	d18:1	1239.6	1217.7	
	t18:0	-	1235.7	n.d.
F <sub>2</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub>	d18:1	1385.7	1363.8	1385.7
	t18:0	-	1381.8	1403.7
	t19:0	-	1395.8	-
F <sub>3</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub>	d18:1	n.d.	1509.9	-
	t18:0		1527.8	1549.7
F <sub>4</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub>	d18:1	1677.8	1655.9	1677.8
	t18:0	-	1673.9	1695.7
H <sub>1</sub> N <sub>4</sub>	d18:1	1296.6	1274.7	-
	t18:0	-	1292.7	1314.7
F <sub>1</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub>	d18:2	-	1418.8	-
	d18:1	1442.7	1420.8	1442.7
	t18:0	-	1438.8	1460.7
	d20:0	-	1450.8	1472.7
	t20:0	-	-	1488.7
F <sub>2</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub>	d18:2	-	1564.8	-
	d18:1	1588.8	1566.8	1588.7
	t18:0	-	1584.9	1606.7
	d20:0	-	1596.8	1618.7
	t19:0	-	-	1620.7
	d21:0	-	-	1632.7
	t20:0	-	-	1634.7
d22:0	-	-	1646.7	
F <sub>3</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub>	d18:1	1734.8	1712.9	1734.7
	t18:0	-	1730.9	1752.8
	d20:0	-	-	1764.8
	t19:0	-	-	1766.7
	t20:0	-	-	1780.8

**Tabelle 16** Strukturvorschläge zur Zusammensetzung komplexer Lyso-GSL aus adulten Würmern

	d18:2	-	1856.8	-
	d18:1	1880.9	1858.9	1880.8
	t18:0	-	1876.9	1898.8
F <sub>4</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub>	d20:0	-	-	1910.8
	t19:0	-	-	1912.8
	d21:0	-	-	1924.8
	t20:0	-	-	1926.8
	d22:0	-	-	1938.8
F <sub>5</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub>	t18:0	n.d.	n.d.	2044.8
	t20:0			2072.9
F <sub>1</sub> H <sub>1</sub> N <sub>5</sub>	t18:0	n.d.	n.d.	1663.8
F <sub>2</sub> H <sub>1</sub> N <sub>5</sub>	d18:1			1791.8
	t18:0	n.d.	n.d.	1809.8
	d20:0			1821.8
	t20:0			1837.8
F <sub>3</sub> H <sub>1</sub> N <sub>5</sub>	t18:0			1955.8
	d20:0	n.d.	n.d.	1967.8
	t20:0			1983.8
F <sub>4</sub> H <sub>1</sub> N <sub>5</sub>	d18:1			2083.9
	t18:0	n.d.	n.d.	2101.8
	t20:0			2129.8
F <sub>6</sub> H <sub>1</sub> N <sub>5</sub>	t18:0	n.d.	n.d.	2394.0
F <sub>2</sub> H <sub>1</sub> N <sub>6</sub>	d18:1			1994.9
	t18:0	n.d.	n.d.	2012.9
	t19:0			2026.9
	t20:0			2040.9
F <sub>3</sub> H <sub>1</sub> N <sub>6</sub>	t18:0			2158.9
	t19:0	n.d.	n.d.	2172.9
	t20:0			2186.9
F <sub>4</sub> H <sub>1</sub> N <sub>6</sub>	t18:0			2305.0
	t20:0	n.d.	n.d.	2333.0
F <sub>4</sub> H <sub>1</sub> N <sub>7</sub>	t20:0	n.d.	n.d.	2536.0

**Tabelle 16** (Fortsetzung)

Die detektierten Pseudomolekülonen komplexer Lyso-GSL der Fraktionen 5 bis 7 (F5 bis F7) (vgl. Abbildung 31) wurden in Cluster identischer Kohlenhydrat-Komponenten eingruppiert. Signale, welche nicht registriert werden konnten, sind mit einem Strich (-) gekennzeichnet. In den Fällen, in denen kein Signal einer Kohlenhydrat-Komponente registriert werden konnte, ist dies durch ein n.d. (nicht detektiert) kenntlich gemacht. H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose; d18:2, C18-Sphingadien; d18:1, C18-Sphingosin; d20:0 - d22:0, C20- bis C22-Sphinganin; t18:0 - t20:0, C18- bis C20-Phytosphingosin.

Eine Verifizierung der rechnerisch ermittelten Zusammensetzung registrierter Lyso-GSL erfolgte mittels MALDI-MS/MS (Daten nicht gezeigt) und ESI-MS<sup>2</sup> Experimenten ausgewählter Pseudomolekülonen der Fraktionen 5 und 7, was im Folgenden beispielhaft dargestellt werden soll.

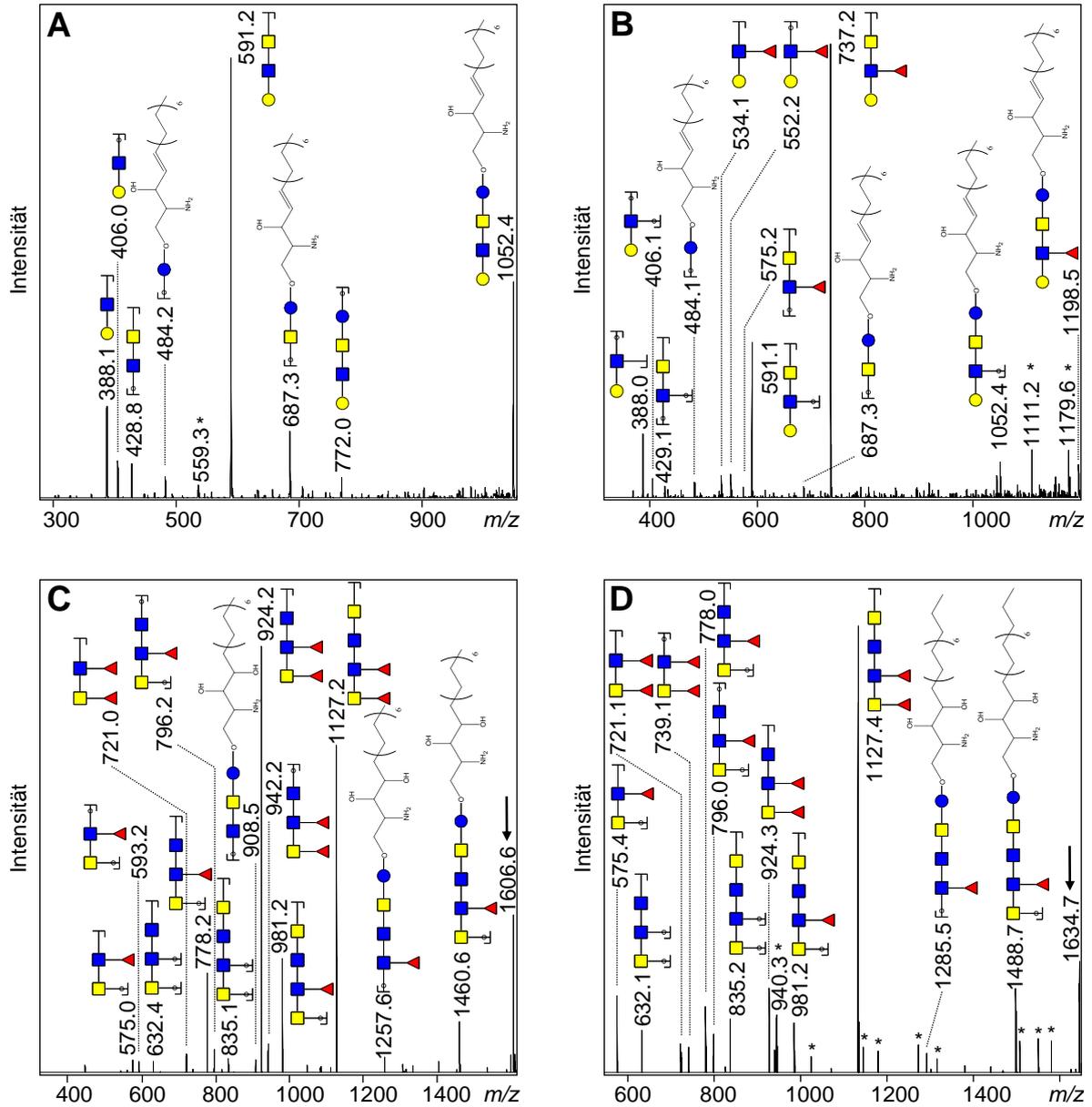
Die ESI-MS<sup>2</sup> Analyse des Lyso-GSL  $m/z$  1052.6 aus Fraktion 5 (vgl. hierzu Abbildung 31A) bestätigte den Strukturvorschlag H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>-d18:1 (Abbildung 32A). Signale bei  $m/z$  388.1, 406.0, 428.8, 591.2 und 772.0 repräsentierten Fragmentationen ([M+Na]<sup>+</sup>), welche durch Fragmentierung der Kohlenhydrat-Komponente H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> entstanden waren. Im Gegensatz hierzu basierten Signale bei  $m/z$  484.2 und 687.3 auf C18-Sphingosin-aufzeigenden Y-Fragmentationen. In gleicher Weise konnte die ESI-MS<sup>2</sup> Analyse des Lyso-GSL  $m/z$  1050.6 aus Fraktion 5 (vgl. hierzu Abbildung 31A) den Strukturvorschlag H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>-d18:2 bestätigen (Abbildung 42A; Anhang).

ESI-MS<sup>2</sup> Experimente des Lyso-GSL  $m/z$  1198.6 aus Fraktion 5 (vgl. hierzu Abbildung 31A) konnten den Strukturvorschlag F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-d18:1 verifizieren (Abbildung 32B). Zusätzlich zu den bereits bei der ESI-MS<sup>2</sup> Analyse von H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>-d18:1 registrierten C18-Sphingosin-enthaltenden Y-Fragmentationen bei  $m/z$  484.1 und 687.3, wurde das aus einer Fucoseabspaltung vom *precursor* generierte Y<sub>3β</sub>-Fragmentation  $m/z$  1052.4 detektiert. Darüber hinaus konnten zahlreiche Signale registriert werden, welche die rechnerisch ermittelte Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-basierte Kohlenhydrat-Komponente F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> bestätigten. Das B<sub>3</sub>-Fragmentation  $m/z$  737.2 und das aus einer Fucoseabspaltung entstandene Fragment bei  $m/z$  591.1 repräsentierten hierbei die Signale der höchsten Intensität. In analoger Weise konnte die ESI-MS<sup>2</sup> Analyse des Lyso-GSL bei  $m/z$  1196.6 aus Fraktion 5 (vgl. hierzu Abbildung 31A) den Strukturvorschlag F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>-d18:2 bestätigen (Daten nicht gezeigt).

Im Vergleich hierzu konnten in ESI-MS<sup>2</sup> Untersuchungen von Lyso-GSL mit komplexeren LDN-basierten Kohlenhydrat-Komponenten Fragmentationen mit intakter Sphingoidbase im niedermolekularen Bereich nicht mehr detektiert werden. Hierbei erfolgte die massenspektrometrische Verifizierung der zugrunde liegenden Sphingoidbase über Detektion von Y-Fragmentationen nach Abspaltungen von Fucose- und ein bis zwei *N*-Acetylhexosaminresten vom jeweiligen *precursor* (Abbildung 32C und D). Entsprechende Fragmentationen waren in der ESI-MS<sup>2</sup> Untersuchung des Lyso-GSL bei  $m/z$  1606.7 aus Fraktion 7 (vgl. hierzu Abbildung 31C) bei  $m/z$  1460.6, 1257.6 und 908.5 nachweisbar (Abbildung 32C). In Kombination mit dem strukturspezifischen Fragmentierungsmuster der Kohlenhydrat-Komponente ( $m/z$  575.0, 593.2, 632.4, 721.0, 778.2, 796.2, 835.1, 924.2, 942.2 und 981.2) konnte somit der errechnete Strukturkandidat F<sub>2</sub>H<sub>1</sub>N<sub>4</sub>-t18:0 bestätigt werden.

Die ESI-MS<sup>2</sup> Analyse des Lyso-GSL der errechneten Zusammensetzung F<sub>2</sub>H<sub>1</sub>N<sub>4</sub>-t20:0 ( $m/z$  1634.7) aus Fraktion 7 (vgl. hierzu Abbildung 31C) bestätigte durch Detektion der Signale  $m/z$  1285.5 und 1488.7 das Vorkommen von C20-Phytosphingosin (Abbildung 32D). Der Nachweis kohlenhydratspezifischer Fragmentationen ( $m/z$  575.0 - 1127.4) verifizierte auch hier die entsprechende Kohlenhydrat-Komponente.

---



**Abbildung 32** ESI-MS<sup>2</sup> Analyse komplexer Lyso-GSL aus adulten Würmern

Massenspektrometrische Analyse enzymatisch freigesetzter Lyso-GSL aus den Fraktionen 5 und 7 (vgl. Abbildung 31 A und C). **(A)**, ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>-d18:1 bei m/z 1052.6 (Fraktion 5). **(B)**, ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>-d18:1 bei m/z 1198.6 (Fraktion 5). **(C)**, ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von F<sub>2</sub>H<sub>1</sub>N<sub>4</sub>-t18:0 bei m/z 1606.7 (Pfeil, Fraktion 7). **(D)**, ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von F<sub>2</sub>H<sub>1</sub>N<sub>4</sub>-t20:0 bei m/z 1634.7 (Pfeil, Fraktion 7). Die Annotation der registrierten Fragmentationen [M+Na]<sup>+</sup> erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. Die gezeigten Strukturen sind beispielhaft für einen möglichen Fragmentierungspfad gewählt, wobei jeweils nur ein Hauptisomer berücksichtigt wurde. undefinierte Signale sind durch einen Stern (\*) gekennzeichnet. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, N-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, N-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, N-Acetylhexosamin; F, Fucose.

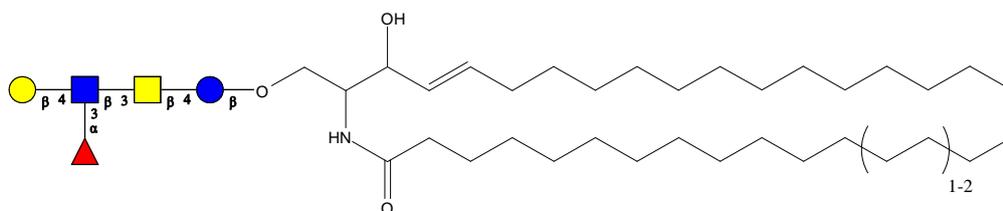
In analoger Weise konnten für Lyso-GSL aus Fraktion 7 die errechneten Strukturvorschläge  $F_2H_1N_4-d18:1$  ( $m/z$  1588.7) (Abbildung 42B; Anhang),  $F_2H_1N_4-d20:0$  ( $m/z$  1618.7),  $F_2H_1N_4-t19:0$  ( $m/z$  1620.7) und  $F_2H_1N_4-d22:0$  ( $m/z$  1646.7) verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus lieferten ESI-MS<sup>2</sup> Analysen der Molekülspezies bei  $m/z$  1586.7, 1604.7 und 1632.7 trotz der niedrigen Signalintensitäten detektierter Fragmentationen Hinweise auf das Vorkommen von C18-Sphingadien, sowie C19- und C21-Sphinganinen (Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.3.2 Struktur der Ceramid-Komponenten komplexer GSL

Basierend auf den charakterisierten Lyso-GSL (4.3.3.1) und unter Einbeziehung detektierter nativer GSL (4.3.2.2) konnte rechnerisch auf die in den Ceramid-Komponenten gebundenen Fettsäuren geschlossen werden.

Hieraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass der Ceramidanteil LacNAc- und Le<sup>X</sup>-tragender GSL vorwiegend aus C18-Sphingosin in Kombination mit hydroxylierter und nicht-hydroxylierter Palmitinsäure sowie nicht-hydroxylierter Stearinsäure aufgebaut ist. In Abbildung 33 ist die hieraus abgeleitete prototypische Struktur Le<sup>X</sup>-tragender GSL aus adulten Würmern schematisch dargestellt.

Im Gegensatz hierzu waren bei variabel fucosylierten LDN-basierten GSL-Spezies neben C18-Sphingosin zusätzlich C18- und C20-Phytosphingosin als Hauptkomponenten detektierbar. Die jeweilig gebundenen Fettsäuren wurden somit als hydroxylierte und nicht-hydroxylierte Palmitinsäure für GSL aus Fraktion 7, sowie einem zunehmenden Anteil an bis zu fünffach ungesättigter Stearinsäure und deren hydroxylierter Form für entsprechende GSL aus den Fraktionen 6 und 5 bestimmt.



**Abbildung 33** Strukturvorschlag für Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragende GSL aus adulten Würmern

Prototyp Le<sup>X</sup>-tragender GSL aus adulten Würmern mit C18-Sphingosin und Palmitin-bzw. Stearinsäure. Hydroxylierte Fettsäuren sind nicht gezeigt. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, N-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, N-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose.

## 5 Diskussion

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde werden im Folgenden im Kontext der zugehörigen Literatur diskutiert, wobei sowohl methodische als auch inhaltliche Aspekte angesprochen werden sollen.

### 5.1 Methodische Aspekte

#### 5.1.1 Reinigung und Aufarbeitung von GSL

##### 5.1.1.1 Verseifung des Rohextraktes

Im Laufe dieser Arbeit zeigte sich, dass die Verseifung des Lipid-Rohextraktes mit Natriummethanolat (1 mol/L in Methanol) die bei der Lipid-Aufarbeitung ebenfalls extrahierten Phospholipide nicht quantitativ spalten konnte (4.3.1). Aufgrund der physikalischen Eigenschaften von Phospholipiden konnte davon ausgegangen werden, dass diese bei der NP-Chromatografie (3.4.4) in den ersten Elutionsschritten von der Kartusche eluiert werden und sich somit vorwiegend in den CMH- und CDH-enthaltenden Fraktionen wiederfinden. Wie sich in der weiteren strukturellen Analytik der GSL aus adulten Würmern zeigte, resultierte hieraus jedoch keinerlei Beeinträchtigung der massenspektrometrischen Charakterisierung entsprechender Komponenten im LID-Mode (4.3.2.2). Die Frage, ob Kontaminationen dieser Art Messungen im CID-Mode beeinträchtigt haben, blieb ungeklärt (vgl. hierzu 5.1.3.2).

##### 5.1.1.2 HPLC-basierte Monosaccharid-Analyse

Die HPLC-basierte Monosaccharid-Analyse der fraktionierten GSL konnte Ergebnisse aus früheren Untersuchungen zur Reinigung und Aufarbeitung von GSL aus adulten Würmern sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht bestätigen (4.3.1).

In früheren Untersuchungen zur Kohlenhydrat-Komponente von CMH aus adulten Würmern konnte Glucose als vorherrschender Baustein identifiziert werden, während Galactose hierzu mit einem Äquivalent von 0,25 quantifiziert wurde [62]. In Übereinstimmung mit diesem Befund wurde das im Rahmen dieser Arbeit für CMH aus adulten Würmern in den Fraktionen 1 und 2 ermittelte Verhältnis von Galactose zu Glucose mit 0,26 berechnet.

Des Weiteren konnten auch in früheren Studien bereits Xylose und Mannose in den aufgearbeiteten GSL-Fraktionen aus adulten Würmern beobachtet werden [67]. Da beide Monosaccharide nach bisherigen Erkenntnissen keine Bausteine von GSL aus *S. mansoni* sind, ist ihre Detektion mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Extraktion hydrophober Glykoproteine bzw. derer Biosynthese-Vorstufen zurückzuführen.

Neben den hier genannten Übereinstimmungen zu früheren Aufarbeitungen von GSL aus adulten Würmern stehen gleichfalls die im Rahmen der Strukturanalytik von CMH-

Komponenten gewonnenen Resultate im Einklang mit Literaturangaben (vgl. hierzu 4.3.2.2 und 4.3.3.1 sowie [62]). Diese Aspekte bekräftigen in ihrer Gesamtheit die repräsentative Aussagekraft der strukturellen Charakterisierung komplexer GSL aus adulten Würmern.

### 5.1.2 ELISA

Die nativen GSL wurden in ELISA Experimenten hinsichtlich ihrer Bindung durch mAk, die gegen spezifische Kohlenhydratepitope gerichtet waren, untersucht (4.3.2.1). Die ELISA Technik erwies sich dabei als sehr einfache und gleichfalls sensitive Methode, mit Hilfe derer innerhalb kürzester Zeit zahlreiche Informationen zur Struktur der vorhandenen Kohlenhydrat-Komponenten gewonnen werden konnten. Darüber hinaus konnte anhand der Bindungseigenschaften eines DC-SIGN-Fc Konstrukts (4.3.2.1) in Übereinstimmung mit Literaturangaben die Präsenz definierter Kohlenhydratepitope bestätigt werden [13]. Bereits in früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass das bivalente DC-SIGN-Fc Konstrukt, welches rekombinant durch Fusion des extrazellulären Anteils von DC-SIGN (Aminosäurereste 64-404) mit dem Fc-Fragment von humanem IgG1 hergestellt worden war, eine sehr ähnliche Bindungsspezifität für Mannose- und Fucose-tragende Liganden besitzt wie das zelluläre DC-SIGN, welches seinerseits Tetramere bildet [91, 92, 172]. Basierend auf der Detektion einer Bindung komplexer GSL durch das DC-SIGN-Fc Konstrukt *in vitro* konnte daher eine zuverlässige Aussage über ein ähnliches Bindeverhalten durch zelluläres DC-SIGN getroffen werden und somit auf eine Beteiligung der in den entsprechenden Fraktionen enthaltenen GSL an den beschriebenen immunmodulatorischen Wirkungen *in vitro* geschlossen werden.

### 5.1.3 Enzymatischer Verdau nativer GSL

#### 5.1.3.1 Verdau mit rEGCase II

Der enzymatische Verdau nativer GSL mit rEGCase II führt durch Spaltung der O-glykosidischen Bindung zwischen Kohlenhydrat- und Ceramidteil zur Freisetzung der nativen Oligosaccharide. Da entsprechende Bindungen von CMH (Glucosyl- und Galactosylceramide), Sulfatiden, Sphingomyelinen, Glykoglycerolipiden und Glykoproteinen von rEGC II nicht hydrolysiert werden [173-175], erlaubt diese Methode die selektive Freisetzung von Oligosacchariden aus GSL mit einem Kohlenhydrat-Anteil von mehr als einem Monosaccharid-Baustein. Aufgrund der großen Heterogenität von GSL hinsichtlich isomerer Kohlenhydrat- und Ceramid-Komponenten, ist der enzymatische Verdau dieser Substanzklasse mit rEGCase II eine häufig eingesetzte Methode, um durch Freisetzung der Kohlenhydrat-Komponente deren detaillierte strukturelle Analyse zu erlauben [176-178]. Bereits in früheren Untersuchungen zur strukturellen Charakterisierung von GSL aus verschiedenen Stadien von *S. mansoni* wurde diese Methode häufig angewendet. In Studien

---

zur Analyse von GSL aus Cercarien und Eiern konnte für den Verdau nativer GSL mit rEGCase II nach dieser Methode eine durchschnittliche Hydrolyse-Effizienz von 81% bzw. 92% ermittelt werden [14, 65]. Im Rahmen dieser Arbeit errechnete sich aus den entsprechenden HPLC-basierten Monosaccharid-Analysen (3.5) der organischen Eluate im Vergleich zur eingesetzten Menge an GSL eine durchschnittliche Effizienz der Glykanfreisetzung von 93% (Verdau F5 = 92%, Verdau F6 = 94%, Verdau F7 = 93%), welche unter zusätzlicher Berücksichtigung von methodenbedingten Probenverlusten die früheren Ergebnissen widerspiegeln (Daten nicht gezeigt). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass bei der darauffolgenden Entsalzung enzymatisch freigesetzter Oligosaccharide über PGC-Kartuschen nahezu keine Probenverluste auftraten, da in der Monosaccharid-Analyse von DL und WW Kohlenhydrate nicht bzw. nur in nicht auswertbaren Spuren detektiert wurden (Daten nicht gezeigt).

#### 5.1.3.2 Verdau mit SCDase im Mikro-Maßstab

Die strukturelle Charakterisierung der Ceramid-Zusammensetzung von GSL bei möglichst geringem Probeneinsatz erforderte die Etablierung des enzymatischen Verdaus nativer GSL mit SCDase im Mikro-Maßstab.

Wie im Rahmen dieser Arbeit beschrieben, war in Einzelfällen die strukturelle Charakterisierung der Ceramid-Zusammensetzung ebenso über massenspektrometrische Untersuchung der nativen GSL möglich. So lieferten beispielweise MALDI-MS/MS Analysen der Hauptkomponenten von Galactosylcerebroside (4.1.1) sowie von CMH aus Cercarien (Daten nicht gezeigt) im LID-Mode über Detektion der generierten Fragmentationen Hinweise auf die zugrunde liegende Ceramid-Zusammensetzung einzelner Komponenten. Darüber hinaus ist aus Literaturangaben bekannt, dass die MALDI-MS/MS Analyse von Lithiumaddukten ( $[M+Li]^+$ ) im CID-Mode durch Detektion der freien Base sowie zusätzlicher fettsäurespezifischer Fragmentationen detaillierte strukturelle Informationen zur Ceramid-Zusammensetzung von GSL liefern kann [164, 166, 179, 180]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten MALDI-MS/MS Untersuchungen entsprechender Pseudomoleküle  $[M+Li]^+$  der Galactosylcerebroside-Hauptkomponenten im CID-Mode konnten den Erfolg dieser Strategie bestätigen (4.1.1). Eine Anwendung auf GSL aus *S. mansoni* war jedoch nicht möglich, da eine zufriedenstellende Kristallisation der für Messungen im CID-Mode erforderlichen Probenmengen nach Zugabe ausreichender Mengen an Lithiumchlorid zur quantitativen Bildung entsprechender Addukte auf dem Probenteller nicht zu erreichen war. Darüber hinaus erlaubte diese Strategie lediglich die Charakterisierung der Hauptkomponenten des Galactosylcerebroside-Standards; eine weitere Fragmentierung von Nebenkomponenten gelang nicht. Mittels der daraufhin etablierten Methode sollte daher

---

versucht werden, Sphingoidbasen und Fettsäuren getrennt voneinander zu analysieren, um - basierend auf diesen Ergebnissen - potentielle Ceramid-Zusammensetzungen anschließend rechnerisch ermitteln zu können. Zu diesem Zweck wurden die nativen GSL mit SCDase verdaut und die nach Freisetzung gebundener Fettsäuren gebildeten Lyso-GSL massenspektrometrisch analysiert. Eine im Rahmen der Strukturanalytik von Glykokonjugaten häufig angewendete Methode des enzymatischen Verdaus *on-target* [181] konnte für den Verdau nativer GSL mit SCDase nicht etabliert werden. Hierbei erwies sich in Übereinstimmung mit Literaturangaben [152] die im Protokoll vorgegebene Zugabe von Detergens für eine ausreichende Hydrolyse-Effizienz als unverzichtbar (Daten nicht gezeigt). Eine anschließende Entfernung des Detergens vom *on-target*-Verdauansatz mittels Festphasenextraktion gelang nicht, so dass die massenspektrometrische Untersuchung der gebildeten Lyso-GSL durch die Detektion dominanter detergensbasierter Signale nahezu unmöglich war.

Die anhand eines Galactosylcerebrosid-Standards etablierte Methode zum enzymatischen Verdau von GSL mit SCDase im Miko-Maßstab (3.7.2) lieferte distinkte Ceramid-Zusammensetzungen für nahezu alle detektierten GSL-Komponenten. Hierbei wurde in Übereinstimmung mit Literaturangaben [182] C18-Sphingosin als vorherrschende Sphingoidbase identifiziert, während C18-Sphinganin eine Nebenkomponente darstellte (4.1.2.1). Die Präsenz von C21-Sphingosin, welche in der Literatur mit einer relativen Häufigkeit von 2-3% in Galactosylcerebrosid aus bovinem Gehirn beschrieben ist, konnte mit dieser Methode allerdings nicht bestätigt werden.

Darüber hinaus zeigte sich bei der Methodenetablierung, dass eine schrittweise Elution der Lyso-GSL vom Festphasenextraktionsmaterial unabdingbar war: Erst eine massenspektrometrische Analyse der Einzelfractionen ermöglichte eine Differenzierung der Verdauprodukte von massengleichen Kontaminationen (4.1.2.1). Des Weiteren zeigten die Lyso-GSL je nach Polarität der enthaltenen Sphingoidbase teilweise Unterschiede in ihren Elutionseigenschaften, so dass die Identifizierung insbesondere von Nebenkomponenten oftmals nur durch eine massenspektrometrische Untersuchung der Einzelfractionen möglich war (Daten nicht gezeigt).

Die im Rahmen der Methodenetablierung in Galactosylcerebrosid aus bovinem Gehirn nachgewiesenen Fettsäuren (4.1.2.2) stimmten weitestgehend mit Literaturangaben überein [183]. Hiervon überwiegend quantitative Abweichungen beruhen vermutlich auf den generellen Unterschieden individueller Aufarbeitungs- und Reinigungsschritte der verschiedenen Cerebrosid-Standards. Darüber hinaus ist jedoch darauf hinzuweisen, dass sich die GC-MS-basierte Analytik der enzymatisch freigesetzten Fettsäuren an ihrer Nachweisgrenze bewegte. Daher wurde die Verlässlichkeit der Aussagekraft der etablierten Methode durch die Fettsäureanalytik von 25 nmol Galactosylcerebrosid-Standard überprüft, deren Ergebnis die

---

analysierten Ceramid-Zusammensetzungen der einzelnen GSL-Komponenten (vgl. hierzu 4.1.2.3) umfassend bestätigen konnte (Daten nicht gezeigt). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass bei Analyse von 1,25 nmol Galactosylcerebrosid die bei der Methoden-etablierung quantifizierten Fettsäuren immer noch sicher qualitativ nachweisbar waren. Es ist jedoch hervorzuheben, dass die Analyse der durch enzymatischen Verdau von 2,5 nmol GSL freigesetzten Fettsäuren grundsätzlich keinen Anspruch auf absolute Quantifizierung erheben kann, sondern sich durch Aussagen zu deren relativen Anteilen auf das Erkennen qualitativer Tendenzen begrenzt. Des Weiteren können insbesondere bei biologischen Proben lipophile, Fettsäure-enhaltende Kontaminationen die Analytik empfindlich stören (vgl. hierzu 5.2.2). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die etablierte Methode basierend auf dem enzymatischen Verdau von 2,5 nmol GSL detaillierte und zuverlässige Aussagen zur vorliegenden Ceramid-Zusammensetzung und somit GSL-Heterogenität liefert. Hierbei ist gesondert hervorzuheben, dass dieser analytische Ansatz lediglich den Einsatz konventioneller massenspektrometrischer Geräte (vgl. hierzu 5.1.5) erfordert und somit eine Alternative für nicht-spezialisierte bioanalytische Routine-Laboratorien darstellt. Massenspektrometrische Verfahren wie MALDI-FTICR (*fourier transform ion cyclotron resonance*)-MS [184] oder der Einsatz von Geräten, welche mit einem Er:YAG (*Erbium-doped Yttrium-Aluminium-Garnet*)-Infrarot-Laser ausgerüstet sind [156, 185], liefern ebenfalls sehr detaillierte strukturelle Informationen zur Ceramid-Zusammensetzung und Heterogenität nativer GSL, sind jedoch nur in wenigen spezialisierten Einrichtungen vorhanden.

#### 5.1.4 Chemische Derivatisierung von Oligosacchariden

Um eine möglichst detaillierte Charakterisierung der enzymatisch freigesetzten Oligosaccharide zu ermöglichen, wurden diese durch chemische Derivatisierung einer massenspektrometrischen Untersuchung zugänglich gemacht. Hierbei ermöglichte die Reduktion LacNAc-basierter Kohlenhydratstrukturen die in MS/MS bzw. MS<sup>n</sup> Untersuchungen erforderliche massenbasierte Differenzierung des reduzierenden und des nicht-reduzierenden Endes des Oligosaccharids, welche bei qualitativ gleichwertiger Monosaccharid-Zusammensetzung ohne vorherige Reduktion Fragmente identischer Massen generieren.

Darüber hinaus führte die Permethylierung freier Hydroxylgruppen von Oligosacchariden zur Bildung spezifischer, bindungsabhängiger Fragmentationen und erlaubte somit die Identifizierung isomerer Strukturen in MS<sup>n</sup> Untersuchungen (vgl. hierzu 4.3.2.4). Des Weiteren kann die Permethylierung Fucosewanderungen, die bei der Fragmentierung vorzugsweise von Protonenaddukten ( $[M+H]^+$ ) nativer Oligosaccharide vorkommen können, weitestgehend unterdrücken [169, 170, 186]. Der Nachweis entsprechender Fragmentationen in MALDI-MS/MS Analysen machte es wahrscheinlich, dass solche Umlagerungen im Rahmen dieser Arbeit bei

---

der Fragmentierung von Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$  Le<sup>X</sup>-tragender Lyso-GSL aus Cercarien (4.2.2.1) beobachtet wurden.

### 5.1.5 Massenspektrometrie

Experimente im Rahmen dieser Arbeit konnten zeigen, dass oftmals nur die gezielte Kombination verschiedener massenspektrometrischer Verfahren schlüssige Ergebnisse lieferte.

Für einen Einsatz in der GSL-Analytik erwies sich die MALDI-Massenspektrometrie als sehr sensitive Methode. Sowohl native GSL und Lyso-GSL als auch native und derivatisierte Oligosaccharide waren bei einem Probeneinsatz im unteren picomolaren Bereich in meist hoher Auflösung und guter Massengenauigkeit detektierbar. Hierbei bestätigte sich, dass durch die Verwendung von ATT-Matrix eine gute Kristallisation und Ionisation nativer GSL sowie nativer und derivatisierter Oligosaccharide erreicht werden konnte [15], welche in der massenspektrometrischen Untersuchung überwiegend als Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) registriert wurden. Kaliumaddukte ( $[M+K]^+$ ) wurden durch Zugabe von LiCl zum ProbenSpot als solche identifiziert. In seltenen Fällen erfolgte zu diesem Zweck auch die Zugabe von KCl (vgl. hierzu 4.1.1). Im Gegensatz hierzu konnten bei der massenspektrometrischen Untersuchung von Lyso-GSL die besten Resultate durch Verwendung der protonenreichen DHB-MDP-Matrix erzielt werden [187]. Darüber hinaus erlaubte diese Matrix gleichfalls die Untersuchung kleiner Lyso-GSL, da im unteren Massenbereich keine den Lyso-GSL massenidentische, matrixassoziierte Signale detektiert werden konnten. Kleine Lyso-GSL wurden aufgrund ihrer freien Aminogruppe überwiegend als Protonenaddukte ( $[M+H]^+$ ) registriert. Eine Zugabe von Alkalisalzen führte hierbei nicht zu einer quantitativen Bildung entsprechender Pseudomolekülonen, so dass ein Nachweis von Natriumaddukten ( $[M+Na]^+$ ) nur in ESI-MS<sup>n</sup> Analysen möglich war (4.3.3.1). Komplexere Lyso-GSL hingegen zeigten aufgrund des größeren Kohlenhydrat-Anteils eine vermehrte Tendenz zur Bildung von Natriumaddukten ( $[M+Na]^+$ ). In Anlehnung an Literaturangaben [166] konnte in MALDI-MS/MS- sowie ESI-MS<sup>2</sup>-basierten Analysen gezeigt werden, dass die Fragmentierung der verschiedenen Pseudomolekülonen  $[M+H]^+$ ,  $[M+Li]^+$  bzw.  $[M+Na]^+$  in sehr unterschiedlichen Fragmentierungsmustern resultierte (Daten nur teilweise gezeigt). Bei der ESI-MS<sup>n</sup>-gestützten Analyse von Lyso-CMH aus adulten Würmern ermöglichte diese Tatsache beispielsweise die Bestätigung der Präsenz von Nebenkompenten, deren alleinige Fragmentierung als Protonenaddukte ( $[M+H]^+$ ) nicht aussagekräftig genug war (vgl. hierzu Abbildung 41A; Anhang).

Grundsätzlich erwies sich die MALDI-MS Analyse als sehr sensitiv für die Aufnahme von Profilspektren. In MS/MS-Experimenten konnten darüber hinaus ohne Verwendung

---

zusätzlichen Probenmaterials erste strukturelle Informationen über den Analyten erhalten werden. Es zeigte sich jedoch, dass der Einsatz dieser Methode oftmals durch eine ungenügende Abtrennung des *precursors* von Nachbarsignalen limitiert war. Des Weiteren erforderte insbesondere die Strukturanalyse der Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL aus adulten Würmern zur Verifizierung der verschiedenen isomeren Strukturkandidaten eine über die MS/MS Untersuchung hinausgehende Fragmentierung in ESI-MS<sup>n</sup> Analysen. Im direkten Vergleich konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der strukturellen Charakterisierung derivatisierter Oligosaccharide in ESI-MS<sup>n</sup> Analysen zusätzliche isomere Nebenkomponenten sicher nachgewiesen werden konnten, während MALDI-MS/MS Untersuchungen für die Präsenz solcher Strukturen keinen Anhaltspunkt lieferten (vgl. Abbildung 24 und Tabelle 15). In gleicher Weise erforderte die Analyse der im Rahmen des enzymatischen Verdauens nativer GSL mit SCDase im Mikro-Maßstab freigesetzten Lyso-GSL eine gezielte Kombination beider Methoden. So konnten selbst Nebenkomponenten in direkter Nachbarschaft zu Hauptkomponenten in MALDI-MS-basierten Profilspektren in hoher Auflösung registriert und deren Präsenz anschließend in ESI-MS<sup>n</sup> Untersuchungen sicher verifiziert werden (vgl. Abbildung 14).

## 5.2 Strukturelle Charakterisierung der GSL aus adulten Würmern

### 5.2.1 Strukturen der Kohlenhydrat-Komponenten

Experimente im Rahmen dieser Arbeit erlaubten die strukturelle Charakterisierung von Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL aus adulten Würmern von *S. mansoni*, welche insgesamt 11 unterschiedliche Monosaccharid-Zusammensetzungen aufzeigten. In Anlehnung an und in Übereinstimmung mit den bereits strukturell charakterisierten Kohlenhydrat-Komponenten von GSL aus Cercarien, Eiern und adulten Würmern [14, 62-65, 140, 165] ermöglichten die Untersuchungen Strukturvorschläge zu insgesamt 20, zum Teil isomeren, Oligosacchariden (vgl. hierzu Tabelle 15). Hierbei wurde am reduzierenden Ende jeweils das Disaccharid des *schisto-cores* nachgewiesen, welches keine weiteren Modifikationen aufzeigte. Eine Verlängerung dieser *core*-Struktur durch *N*-Acetylhexosamin-Bausteine führte nach variabler Mono- bzw. Oligofucosylierung der Grundstruktur zum Aufbau der Kohlenhydratepitope LacNAc, Le<sup>x</sup>, LDN, LDN-F, F-LDN, F-LDN-F, LDN-DF, DF-LDN, F-LDN-DF, DF-LDN-F sowie DF-LDN-DF. Die im Rahmen dieser Arbeit massenspektrometrisch und immunologisch charakterisierten Kohlenhydratstrukturen komplexer GSL stehen damit in Einklang mit Literaturangaben, welche auf immunologischer Basis anhand der Bindung durch mAk gegen verschiedene Kohlenhydratepitope die Präsenz von Le<sup>x</sup>, LDN, LDN-F, LDN-DF, F-LDN sowie F-LDN-F in GSL aus adulten Würmern aufzeigten [13, 67, 68]. Darüber hinaus werden die erhobenen Daten durch Methylierungsanalysen früherer Untersuchungen bestätigt, in denen die Präsenz von terminaler und 2-substituierter Fucose, 4-substituierter

Glucose, terminaler sowie 3-substituierter Galactose, 3-substituiertem sowie 3,4-disubstituiertem *N*-Acetylglucosamin und 3-substituiertem *N*-Acetylgalactosamin nachgewiesen werden konnte [67]. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten darüber hinaus nach Chromtrioxid-Oxidation die *N*-Acetylhexosamin-Bausteine und Galactose als  $\beta$ -konfiguriert bestimmt werden, während Fucose  $\alpha$ -anomere Konfiguration aufzeigte. Terminales *N*-Acetylgalactosamin, welches struktureller Bestandteil LDN und LDN-F-tragender GSL ist, konnte in den damaligen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Da die Präsenz entsprechender GSL jedoch durch Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sowie in Übereinstimmung mit Literaturangaben [13, 68] bestätigt werden konnte, kann ein fehlender Nachweis von terminalem *N*-Acetylgalactosamin in früheren Untersuchungen als indikativ für ein Unterschreiten der Nachweisgrenze gewertet werden. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass genannte Unterschiede Ausdruck einer biologischen Variabilität exprimierter Kohlenhydratepitope von *S. mansoni* GSL sind.

Experimente im Rahmen dieser Arbeit lieferten darüber hinaus Hinweise für das Vorkommen einer bislang bei *S. mansoni* nicht beschriebenen Struktur, deren Kohlenhydratepitop ein terminales, monofucosyliertes *N*-Acetylhexosamin sowie eine subterminale Hexose aufweist und somit eine isomere Nebenkomponente zum  $\text{Le}^{\text{X}}$ -Epitop darstellt. Entsprechende diagnostische Signale wurden bei der massenspektrometrischen Untersuchung der Kohlenhydrat-Komponenten  $\text{F}_1\text{H}_2\text{N}_2$  und  $\text{F}_1\text{H}_2\text{N}_3$  detektiert (vgl. hierzu Abbildung 26 unter 4.3.2.4 sowie Abbildung 38 im Anhang). In der massenspektrometrischen Analyse der nicht-fucosylierten Vorläuferstruktur  $\text{H}_2\text{N}_2$  konnten Signale, welche aus der Fragmentierung einer Struktur mit terminalem *N*-Acetylhexosamin und subterminaler Hexose hervorgegangen sein mussten, ebenfalls mit geringen Intensitäten detektiert werden (Abbildung 25). Darüber hinaus kann der Nachweis von 3-substituierter Galactose in den früheren Untersuchungen zur immunochemischen Charakterisierung der GSL aus adulten Würmern [67] zumindest als indikativ für eine entsprechende Struktur der Monosaccharidsequenz  $\text{Fuc}(\alpha 1-3)\text{HexNAc}(\beta 1-3)\text{Hex}$  gewertet werden. Es soll jedoch bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Detektion von 3-substituierter Galactose gleichfalls bei der Präsenz des Kohlenhydratepitops pseudo- $\text{Le}^{\text{Y}}$  erwartet wird. Da eine endgültige Verifizierung der zu  $\text{Le}^{\text{X}}$  isomeren Struktur weitere Experimente erfordert, die den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten, sind die entsprechenden isomeren Nebenkomponenten der Monosaccharid-Zusammensetzungen  $\text{H}_2\text{N}_2$ ,  $\text{F}_1\text{H}_2\text{N}_2$  sowie  $\text{F}_1\text{H}_2\text{N}_3$  in Tabelle 15 nicht aufgeführt.

Die bei der strukturellen Charakterisierung der Kohlenhydrat-Komponenten  $\text{F}_3\text{H}_1\text{N}_{3-4}$  detektierten Signale geringer Intensität, welche als diagnostisch für die Präsenz von Trifucosyl-Seitenketten gewertet werden müssen, können nicht sicher den von adulten Würmern exprimierten Kohlenhydratstrukturen zugeordnet werden. Genannte Oligofuco-

---

sylierungen wurden bislang als ausgeprägtes Merkmal komplexer GSL aus Eiern beschrieben [64, 65], so dass deren Detektion ebenso durch Extraktion und Nachweis von Ei-GSL durch die Aufarbeitung von Schistosomen-Eiern enthaltenden Weibchen bedingt sein konnte. In gleicher Weise wurden die isomeren Nebenkomponenten der Kohlenhydrat-Zusammensetzungen  $F_{2-3}H_1N_4$ , welche eine Monofucosylierung des internen *N*-Acetylhexosamins in direkter Nachbarschaft zum terminalen Kohlenhydratepitop aufzeigen (vgl. hierzu Tabelle 15) bislang ebenso als Komponenten der Ei-GSL identifiziert [64, 140]. Aufgrund der deutlichen Intensitäten registrierter diagnostischer Signale wurden entsprechende Strukturen jedoch als Komponenten von GSL aus adulten Würmern gewertet.

Mit Ausnahme von DF-LDN-F wurden bereits alle zuvor genannten Epitope als Bestandteile der Kohlenhydratstrukturen komplexer GSL von Cercarien und/oder Eiern von *S. mansoni* beschrieben. Da das entsprechende Epitop allerdings stets eine isomere Nebenkomponente repräsentierte, scheint eine stadienspezifische Expression einhergehend mit gesonderter biologischer Funktion unwahrscheinlich zu sein. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine in allen Lebensstadien exprimierte Biosynthese-Zwischenstufe handelt (vgl. hierzu 5.4). Somit ist pseudo- $Le^Y$  die bislang einzig beschriebene Struktur, welche aufgrund des auf GSL aus Cercarien begrenzten Vorkommens als stadienspezifisch exprimiertes Kohlenhydratepitop angesehen werden muss [14]. Allerdings kann durch den Nachweis eines Signals relativ niedriger Intensität in der massenspektrometrischen Analyse der enzymatisch freigesetzten Oligosaccharide aus Fraktion 7 (vgl. Abbildung 23), welches rechnerisch der Kohlenhydrat-Zusammensetzung  $F_2H_2N_4$  zugeordnet werden konnte, die Präsenz pseudo- $Le^Y$ -tragender GSL in adulten Würmern als Nebenkomponenten nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Während die komplexen GSL von Cercarien von LacNAc-basierten Kohlenhydratepitopen dominiert werden [14, 141], welche die strukturelle Grundlage für die Präsenz  $Le^X$ - und pseudo- $Le^Y$ -exprimierender GSL bilden, repräsentieren variabel fucosylierte LDN-basierte Motive mit starker Tendenz zur Oligofucosylierung die vorherrschenden Strukturen der Ei-GSL [64, 65, 140]. Die Untersuchungen dieser Arbeit konnten zeigen, dass komplexe GSL aus adulten Würmern hierbei eine strukturelle Zwischenstellung einnehmen, da sowohl LacNAc- als auch LDN-basierte Epitope Hauptkomponenten komplexer GSL darstellen. Hinsichtlich der LDN-basierten Kohlenhydratepitope repräsentierten Strukturen der Monosaccharid-Zusammensetzung  $F_2H_1N_4$  sowie  $F_4H_1N_4$  die registrierten Hauptkomponenten, was auf eine entsprechende biologische Relevanz dieser Strukturen mit Bezug auf die entsprechenden vorherrschenden Epitope F-LDN-F, LDN-DF sowie DF-LDN-DF schließen lässt.

---

### 5.2.2 Ceramid-Zusammensetzungen

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten, vorherrschenden Sphingoidbasen von CMH-Komponenten stimmten mit den bereits veröffentlichten Ceramid-Zusammensetzungen entsprechender Adultwurm-Komponenten überein [62] und konnten somit die angewendete Methodik zur strukturellen Charakterisierung der Ceramid-Komponenten komplexer GSL aus adulten Würmern bestätigen. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen C18-Sphingosin-, C18-Sphingandin- sowie C18- und C20-Phytosphingosin-basierten Hauptkomponenten ließen massenspektrometrische Untersuchungen enzymatisch freigesetzter Lyso-GSL auf die Präsenz von C19- bis C21- Sphingandin und C19-Phytosphingosin schließen. Darüber hinaus lieferten die massenspektrometrischen Daten Hinweise auf das Vorkommen einer sehr ungewöhnlichen, bislang bei *S. mansoni* nicht beschriebenen Sphingoidbasen-Familie. Mitglieder dieser Familie, welche als gemeinsames Strukturmerkmal insgesamt vier Hydroxylgruppen aufzeigen, wurden bislang beispielsweise als Bestandteile freier Ceramide aus *Candida lipolytica* identifiziert [188, 189]. Die eindeutige Verifizierung dieser Struktur als schistosomenspezifische Sphingoidbase hätte jedoch über die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente hinausgehende Untersuchungen erforderlich gemacht. Darüber hinaus lieferten massenspektrometrische Untersuchungen komplexer Lyso-GSL Hinweise auf die Anwesenheit der bislang bei GSL aus *S. mansoni* nicht beschriebenen Sphingoidbase C18-Sphingadien (d18:2). In der Literatur ist C18-Sphingadien als Bestandteil von Ceramiden und Sphingomyelin bzw. von Glykolipiden aus humanem Plasma mit einer relativen Häufigkeit von 11-14% bzw. 2-3% beschrieben [190]. Obwohl die endgültige Präsenz von C18-Sphingadien in GSL aus *S. mansoni* noch durch weitere Untersuchungen zu verifizieren ist, könnte deren Vorhandensein als Indiz für die Aufnahme wirtseigener Strukturen zur weiteren Verwendung in der schistosomalen GSL-Biosynthese gewertet werden (vgl. hierzu 5.4). Darüber hinaus konnte die Analyse komplexer Lyso-GSL aus adulten Würmern zeigen, dass LacNAc-basierte GSL überwiegend C18-Sphingosin aufzeigten, während LDN-basierte Spezies zusätzlich von C18- und C20-Phytosphingosin dominiert wurden. Biologische Funktionen sowie mögliche Konsequenzen dieser kohlenhydratspezifischen Zusammensetzung der Ceramid-Komponente werden gesondert unter 5.4 und 5.5 diskutiert.

Basierend auf der Analyse der durch enzymatischen Verdau nativer GSL gebildeten Lyso-GSL mussten die in den entsprechenden nativen GSL gebundenen, korrespondierenden Fettsäuren rechnerisch ermittelt werden (vgl. hierzu 4.3.3.2), da ihr Nachweis in den entsprechenden organischen Phasen des Verdauansatzes mittels GC-MS-basierter Analytik keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte: In den CMH-enthaltenden Fraktionen 1 und 2 wurden vorherrschend die Fettsäuren C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:1, C20:2 sowie C20:4 nachgewiesen, während hydroxylierte Palmitinsäure (C16h:0), welche in Übereinstimmung mit

---

Literaturangaben [62] rechnerisch als eine der Hauptkomponenten ermittelt wurde, nur in vergleichsweise geringen Mengenanteilen detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Da aus früheren Untersuchungen bekannt ist, dass schistosomale Phospholipide, Triacylglycerine sowie freie Fettsäuren von C16:0, C18:0 sowie C18:1 dominiert werden und darüber hinaus signifikante Mengen an C18:2, C20:1, C20:4 und C22:4 enthalten [191], liegt es nahe, dass die Gründe für die Beeinträchtigung der GC-MS-basierten Fettsäureanalytik in der Verunreinigung der GSL der Fraktionen 1 und 2 mit den genannten schistosomalen Lipiden zu suchen sind (vgl. hierzu 5.1.1.1 sowie 5.1.3.2). Beim enzymatischen Verdau komplexer GSL konnten die für GSL-Spezies der Fraktion 7 und für LacNAc-basierte GSL der Fraktionen 5 und 6 errechneten Hauptfettsäuren C16:0 und C16h:0 sowie zusätzlich C18:0 für LacNAc-basierte GSL der Fraktionen 5 und 6 in den organischen Phasen des jeweiligen Verdauansatzes detektiert werden. Allerdings zeigte sich auch hier ein vermutlich kontaminationsbedingter Nachweis weiterer Fettsäuren, von denen C22:1 vorherrschend detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden die für LDN-basierte komplexe GSL der Fraktionen 5 und 6 errechneten Fettsäuren C18:5 sowie C18h:5 nicht detektiert. Die Ursachen für die beobachtete Diskrepanz zwischen theoretisch berechneten und experimentell nachgewiesenen Fettsäuren blieben letztlich ungeklärt. Es kann jedoch angenommen werden, dass es sich hierbei um das Resultat eines minimalen Probeneinsatzes und schistosomaler sowie schistosomen-unabhängiger Kontaminationen handelte. Darüber hinaus können ebensowenig methodenbedingte Schwierigkeiten bei der Analyse mehrfach ungesättigter Fettsäuren, welche sich aus der thermischen Labilität genannter Strukturen ergeben können, ausgeschlossen werden.

### 5.3 Strukturelle Charakterisierung der Ceramid-Zusammensetzung von GSL aus Cercarien

Die Strukturanalyse der Ceramid-Zusammensetzung von GSL aus Cercarien konnte entsprechende Ergebnisse früherer Untersuchungen in vollem Umfang bestätigen und darüber hinaus erweitern [62]. Gründe für die hiervon überwiegend quantitativen Abweichungen sind in den verschiedenen biologischen Proben und GSL-Aufarbeitungen sowie unterschiedlichen Analysemethoden zu suchen.

Hinsichtlich der CMH-Komponenten konnten im Rahmen dieser Arbeit neben den bereits beschriebenen, dominierenden Sphingoidbasen weitere Nebenkomponenten der Sphinganinfamilie (C20- und C21-Sphinganin) sowie C18- und C19-Sphingosin nachgewiesen werden. Gleichfalls spiegelt die Identifizierung von hydroxylierter Palmitinsäure als vorherrschende Fettsäure die Ergebnisse der früheren Untersuchungen wider, so dass zusammenfassend die bislang beschriebenen Strukturen der CMH-Komponenten aus

---

Cercarien bestätigt und darüber hinaus erweitert werden konnten (vgl. hierzu Tabelle 9). In gleicher Weise wurde hinsichtlich der Ceramid-Zusammensetzungen komplexer GSL die vorherrschende Präsenz langkettiger Fettsäuren mit C26:0 als dominierende Struktur bestätigt. Während korrespondierende Sphingoidbasen in früheren Untersuchungen nicht charakterisiert wurden, konnten Experimente im Rahmen dieser Arbeit erstmals zeigen, dass komplexe, LacNAc-basierte GSL aus Cercarien im Gegensatz zu den CMH-Komponenten von Sphingoidbasen der Sphinganinfamilie (C18- bis C21-Sphinganin) dominiert wurden. Basierend auf diesen Ergebnissen konnten Strukturvorschläge zur Ceramid-Zusammensetzung Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragender GSL gemacht werden (vgl. hierzu Tabelle 10). Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zur Ceramid-Zusammensetzung Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragender GSL aus adulten Würmern, welche gesondert unter 5.5 diskutiert werden. In diesem Zusammenhang bleibt ungeklärt, ob die bei der massenspektrometrischen Analyse von C19- und C20-Sphinganin-basierten Lyso-GSL auftretenden Satellitensignale ( $\Delta m/z$  14) als indikativ für die Präsenz verzweigter Sphingoidbasen gewertet werden kann. Während *iso*- bzw. *anteiso*-verzweigte Sphingoidbasen beispielsweise als Komponenten der GSL aus adulten Würmern von *Caenorhabditis elegans* und *Ascaris suum* beschrieben worden sind [192, 193], konnten entsprechende Strukturen in GSL von *S. mansoni* bislang nicht beobachtet werden.

#### 5.4 Biosynthese von GSL in *S. mansoni* unter besonderer Beachtung der Strukturen adulter Würmern

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigten in Anlehnung an und in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, dass die Ceramid-Zusammensetzungen der verschiedenen GSL-Spezies eines Lebensstadiums sich zum Teil sehr deutlich unterscheiden können. Wie am Beispiel der GSL aus Cercarien gezeigt werden konnte, repräsentierten vorherrschend Sphinganin-basierte CMH-Komponenten mit langkettigen Fettsäuren die Vorläuferstrukturen zum Aufbau der komplexen LacNAc-basierten GSL-Spezies (vgl. hierzu Abbildung 13 und Tabelle 9), während Phytosphingosin-basierte CMH-Komponenten kaum am Aufbau der genannten Strukturen beteiligt waren. In ähnlicher Weise unterschied sich das Ceramid-Muster LacNAc-basierter GSL ( $H_2N_2$ ,  $F_1H_2N_{2-3}$ ) aus adulten Würmern deutlich von dem registrierter CMH-Komponenten, wobei die am Aufbau der Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragenden GSL beteiligten CMH-Vorläuferstrukturen teilweise nur schwer detektiert werden konnten. Darüber hinaus zeigten LacNAc-basierte GSL eine deutlich andere Ceramid-Zusammensetzung als variabel fucosylierte, LDN-basierte Spezies (vgl. hierzu 5.2.2). Insgesamt spiegeln diese Ergebnisse somit Untersuchungen zu GSL aus schistosomalen Eiern wider, nach denen entsprechende CMH-Komponenten zu gleichen Teilen C18- und

---

C20-Phytosphingosin aufzeigen [62], komplexere GSL hingegen von C20-Phytosphingosin dominiert werden [64, 65, 140, 194]. In analoger Weise konnten frühere Untersuchungen zur strukturellen Charakterisierung neutraler GSL aus *A. suum* zeigen, dass CMH-Komponenten C17-Sphingosin, -Sphinganin und -Phytosphingosin enthielten, während C17-Sphingosin in komplexeren Spezies nicht mehr detektiert werden konnte [193].

Die Bedeutung und biologische Funktion der hier beschriebenen unterschiedlichen Ceramid-Zusammensetzungen von GSL eines Lebensstadiums ist bislang nicht bekannt. Die bereits 1982 von Kannagi, Nudelman und Hakomori postulierte Hypothese, nach welcher die strukturellen Unterschiede von Ceramid-Komponenten einen Einfluss auf die Biosynthese der Kohlenhydrat-Anteile haben soll, scheint in diesem Zusammenhang jedoch sehr wahrscheinlich [195]. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass GSL humaner Erythrozyten eine sehr ähnliche Korrelation zwischen Ceramid-Zusammensetzung und exprimierter Kohlenhydratstruktur zeigen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit bei LacNAc- und LDN-basierten GSL aus adulten Würmern gefunden wurde: Während Le<sup>X</sup>-tragende GSL nahezu ausschließlich durch Palmitinsäure dominiert wurden, konnten bei GSL, welche die hierzu isomere H-Determinante exprimierten, vorwiegend Fettsäuren mit 20 bis 24 Kohlenstoffatomen als Hauptkomponenten identifiziert werden. Es erscheint somit sehr wahrscheinlich, dass die Struktur des Ceramid-Anteils die GSL-Biosynthese maßgeblich beeinflussen und somit modifizieren kann, indem er die Zugänglichkeit der synthetisierten Kohlenhydratkette für die verschiedenen, membranständigen Glykosyltransferasen im Golgi-Apparat reguliert. Neben einer potentiellen Bedeutung für die GSL-Biosynthese gewinnt jedoch zunehmend die Erkenntnis an Bedeutung, dass die Struktur der Ceramid-Komponente eine zentrale Rolle im Hinblick auf biologische Funktionen der GSL spielen kann (vgl. hierzu 5.5). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Insulinsekretion von beta-Zellen *in vitro* durch die Präsenz von Palmitinsäure-basierten Sulfatiden gehemmt wird. Im Gegensatz hierzu zeigten Lignocerinsäure-basierte Sulfatide keinen Einfluss auf die Insulinsekretion [196]. Darüber hinaus sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass in Untersuchungen zur Ceramidstruktur von Gangliosiden ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Ceramid-Zusammensetzung und der Lokalisierung der GSL festgestellt wurde [197, 198].

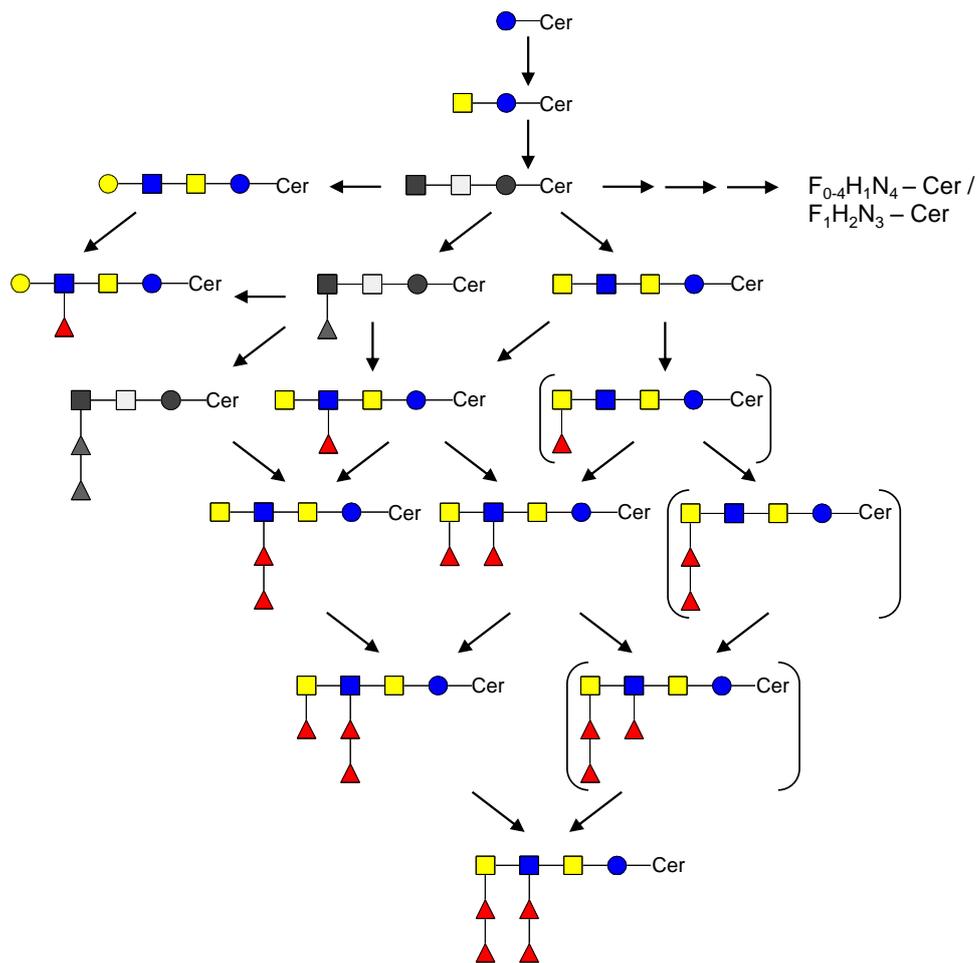
Die große Ähnlichkeit Le<sup>X</sup>-tragender GSL aus adulten Würmern zu den entsprechenden Strukturen aus Säugetieren lässt darüber hinaus vermuten, dass der Parasit nicht nur wie bislang angenommen molekulares Mimikry auf Ebene exprimierter Kohlenhydratstrukturen betreibt, sondern darüber hinaus gleichfalls wirtsähnliche Ceramid-Anteile präsentiert. Während C18-Sphingosin und Palmitinsäure dominierende Komponenten der GSL von Säugetieren repräsentieren [11, 199], konnte diese im Rahmen dieser Arbeit gleichfalls als vorherrschende Komponenten Le<sup>X</sup>-tragender GSL aus adulten Würmern identifiziert werden.

---

Da bereits frühere Untersuchungen die Akquisition von GSL-basierten Blutgruppenantigenen durch Schistosomula belegen [200, 201], kann in diesem Zusammenhang spekuliert werden, dass der Parasit wirtseigene GSL aufnimmt, um entsprechende Ceramid-Komponenten als Vorläuferstrukturen für seine eigene GSL-Biosynthese zu nutzen. Untersuchungen, nach welchen C18-Sphingosin die vorherrschende Sphingoidbase in GSL aus humanem Blut darstellt [190, 202, 203], bekräftigen diese Hypothese. Besonders interessant ist hierbei, dass eine zu der bei adulten Würmern beschriebenen CMH-Komponente  $m/z$  722.6 (Ceramid-Zusammensetzung d18:1/C16:0) massenidentische Glucosylceramid-Komponente als Bestandteil Lipoprotein-assoziiierter GSL aus humanem Blut identifiziert werden konnte [203]. Weder in CMH-Komponenten aus Cercarien noch aus Eiern konnte diese Struktur bislang detektiert werden. Des Weiteren kommt die im Rahmen dieser Arbeit besonders bei LacNAc-basierten GSL aus adulten Würmern charakterisierte Sphingoidbase C18-Sphingadien (d18:2) ebenfalls prominent bei Sphingolipiden aus humanem Blut vor [204]. Dieser Befund ist sowohl indikativ für deren Präsenz als auch für die Hypothese der Verwendung wirtseigener Ceramid-Komponenten durch *S. mansoni* zu werten.

Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass Schistosomen nicht zur *de novo* Fettsäure-Biosynthese befähigt sind, sondern an Stelle dessen wirtseigene Fettsäuren aufnehmen, um diese in vielfältiger Weise zu modifizieren [191, 205]. Hierbei ist der Parasit durch Verlängern der wirtseigenen Strukturen sowie durch Einfügen einer oder mehrerer Doppelbindungen zur Synthese sehr ungewöhnlicher Fettsäure-Spezies befähigt. In diesem Zusammenhang sind die von Schistosomen synthetisierten Fettsäuren C18:1 $\Delta$ 5, C20:1 und C22:4 zu nennen, deren Präsenz bei Säugetieren bislang nicht beschrieben ist [206-208]. Es kann daher festgestellt werden, dass sich das Fettsäure-Profil von *S. mansoni* zum Teil wesentlich von dem des Wirtes unterscheidet [209]; eine Tatsache, welche die Präsenz von fünffach ungesättigter Stearinsäure bei den Invertebraten-typischen LDN-basierten GSL aus adulten Würmern (vgl. hierzu 5.2.2) bestätigt. Abweichend hiervon kann jedoch postuliert werden, dass zur Synthese der Vertebraten-typischen LacNAc-basierten GSL die vom Parasiten aufgenommene Fettsäuren kaum verändert werden, um wirtseigene Strukturen möglichst strukturidentisch imitieren zu können. Basierend auf der Annahme, dass die langkettigen Fettsäuren komplexer GSL aus Cercarien für eine Erkennung durch das angeborene Immunsystem besonders geeignet sind [12], kann weiterhin spekuliert werden, dass die Umstellung der GSL-Biosynthese von *S. mansoni* auf die ausschließliche Präsenz kurzkettiger Fettsäuren in komplexen GSL der adulten Würmer das Ergebnis einer Anpassung an die sich im Folge des Wirtswechsels veränderte immunologische Umgebung darstellt.

---



**Abbildung 34** Postulierter Biosyntheseweg für GSL aus adulten Würmern

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Kohlenhydratstrukturen sind in farbigen Piktogrammen abgebildet, während die Piktogramme nicht nachgewiesener Strukturen in Graustufen dargestellt sind. Isomere Nebenkomponenten sind in Klammern gesetzt. Auf die Angabe einzelner Bindungspositionen wurde verzichtet (vgl. hierzu 5.2.1). Aus Gründen der Übersichtlichkeit beschränkt sich diese schematische Darstellung auf die Biosynthese von GSL der Monosaccharid-Zusammensetzungen  $F_{0-4}H_1N_3$  sowie  $F_{0-1}H_2N_2$ . Dargestellte Synthesewege können analog auf  $F_{0-4}H_1N_4$ - sowie  $F_1H_2N_3$ -tragende GSL übertragen werden. Blauer bzw. dunkler Kreis, Glucose; blaues bzw. dunkles Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber bzw. heller Kreis, Galactose; gelbes bzw. helles Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose; Cer, Ceramid.

Hinsichtlich der Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL aus adulten Würmern (vgl. hierzu Tabelle 15) konnte basierend auf den strukturell charakterisierten isomeren Haupt- und Nebenkomponenten sowie in Anlehnung an bereits postulierte Biosynthesewege der GSL aus Cercarien [168] der in Abbildung 34 dargestellte Biosyntheseweg komplexer GSL aus adulten Würmern abgeleitet werden. Mit Ausnahme der in Graustufen dargestellten GSL  $H_1N_2$ -Cer,  $F_1H_1N_2$ -Cer und  $F_2H_1N_2$ -Cer konnten im Rahmen dieser Arbeit alle in Abbildung 34

abgebildeten, farbigen Strukturen als native GSL bzw. Lyso-GSL und/oder native bzw. derivatisierte Oligosaccharide nachgewiesen werden, wobei die Piktogramme isomerer Nebenkomponenten in Klammern gesetzt sind.

Ähnlich wie die Biosynthese oligosialylierter GSL in Vertebraten [210], scheint die Bildung oligofucosylierter Kohlenhydrat-Komponenten schistosomaler GSL ein streng geordneter Prozess zu sein. Wie am Beispiel der Struktursiomere der allgemeinen Monosaccharid-Zusammensetzung  $F_{1-3}H_1N_3$  dargestellt, basiert die Bildung oligofucosylierter Haupt- und Nebenkomponenten stets auf der Präsenz entsprechender isomerer Vorläuferstrukturen. So entstehen im Zuge einer weiteren Fucosylierung von  $F_1H_1N_3$ , welches durch das LDN-F-tragende Isomer dominiert wird, vorwiegend F-LDN-F- und LDN-DF-exprimierende GSL-Spezies. DF-LDN, welches ausschließlich aus der F-LDN-tragenden Vorläuferstruktur synthetisiert werden kann, repräsentiert hierbei das Kohlenhydratepitop der isomeren Nebenkomponente. In gleicher Weise führen weitere Fucosylierungsreaktionen schrittweise zur vorwiegenden Bildung F-LDN-DF- und schließlich DF-LDN-DF-tragender GSL-Spezies. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass die Bildung isomerer Haupt- und Nebenkomponenten bereits auf der ersten Fucosylierungsstufe maßgeblich reguliert wird. Obwohl die GSL-Komponente  $F_1H_1N_2$ -Cer im Gegensatz zu  $H_1N_3$ -Cer nicht nachgewiesen werden konnte, kann eine vorgeschaltete Fucosylierung des subterminalen *N*-Acetylglucosamins vor der Fertigstellung des *N*-Acetylhexosamin-Grundgerüsts durch Übertragung eines terminalen *N*-Acetylgalactosamin-Restes nicht ausgeschlossen werden. Vielmehr könnte dieser Syntheseweg die vorherrschende Präsenz LDN-F-tragender Strukturisomere erklären. Aus dem postulierten Biosyntheseweg ist ersichtlich, dass aus genannter Zwischenstufe auch die Biosynthese  $Le^X$ -Pentasaccharid-tragender GSL erfolgen könnte.

Die zuvor geschilderten Überlegungen können analog auf die Biosynthese  $F_{1-4}H_1N_4$ - sowie  $F_1H_2N_3$ -exprimierender GSL übertragen werden, wobei gezeigt werden konnte, dass das um ein *N*-Acetylglucosamin verlängerte Grundgerüst LDN-basierter GSL die Biosynthese weiterer isomerer Nebenkomponenten mit einer Fucosylierung am Aminozucker in direkter Nachbarschaft zum jeweiligen Kohlenhydratepitop erlaubt (vgl. hierzu Tabelle 15). Entsprechende, zum  $Le^X$ -Hexasaccharid isomere Nebenkomponenten konnten basierend auf den erhobenen Strukturdaten von  $F_1H_2N_3$ -tragenden GSL nicht sicher identifiziert werden.

## 5.5 Immunmodulatorische Wirkung komplexer GSL aus adulten Würmern

Auf strukturanalytischer Basis konnten die Ergebnisse dieser Arbeit Erklärungsansätze für die Beobachtung liefern, dass GSL aus adulten Würmern die Reifung und Zytokinproduktion dendritischer Zellen *in vitro* initiierten, während GSL aus Cercarien hierzu nicht in der Lage

waren [13]. Da hierbei gezeigt werden konnte, dass die Entfaltung der biologischen Wirkung eine Bindung der Adultwurm-GSL durch DC-SIGN erforderte, war es umso bemerkenswerter, dass die GSL aus Cercarien, welche durch die DC-SIGN bindenden Epitope Le<sup>X</sup> und pseudo-Le<sup>Y</sup> dominiert werden, diese immunmodulatorische Wirkung nicht erzielen konnten.

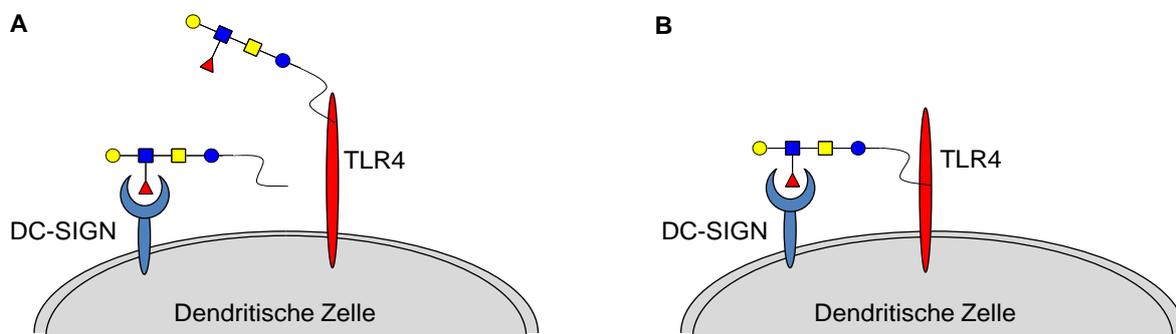
In früheren Untersuchungen mit mAk gegen distinkte Kohlenhydratepitope wurde bereits auf immunologischer Basis auf die Präsenz der DC-SIGN bindenden Epitope Le<sup>X</sup> und LDN-F in GSL aus adulten Würmern geschlossen (vgl. hierzu 5.2.1). Ergänzend hierzu konnten im Rahmen dieser Arbeit massenspektrometrische Untersuchungen von nativen GSL sowie nativen und derivatisierten Oligosacchariden das Vorkommen der entsprechenden Epitope auch auf struktureller Basis verifizieren und somit die Annahme bekräftigen, dass die zur Entfaltung der biologischen Wirkung von GSL notwendige Bindung von DC-SIGN über Le<sup>X</sup>- und LDN-F-Epitope erfolgt.

Da beide Lebensstadien von *S. mansoni* DC-SIGN-bindende GSL exprimieren und darüber hinaus die Entfaltung der biologischen Aktivität der GSL aus adulten Würmern neben einer Bindung durch DC-SIGN zusätzlich die Präsenz des lipidbindenden TLR4 erforderte [13], lag die Vermutung nahe, dass die Gründe für die beschriebenen Unterschiede bezüglich der Induktion immunmodulatorischer Vorgänge in strukturellen Unterschieden der jeweiligen Ceramid-Komponenten zu suchen waren. Da sich adulte Würmer und Cercarien abgesehen von den Le<sup>X</sup>-tragenden GSL in ihren Kohlenhydratstrukturen stark unterscheiden (vgl. hierzu 5.2.1), könnten die divergierenden biologischen Effekte auch als Resultat einer unterschiedlichen Bindung dieser Epitope durch andere CLR gewertet werden; ein Effekt, der beispielsweise bei der immunmodulatorischen Wirkung von SEA aus *S. mansoni* beobachtet werden konnte [133]. Insgesamt erscheint es aber wahrscheinlich, dass die immunmodulatorische Wirkung DC-SIGN-bindender GSL verschiedener Lebensstadien von *S. mansoni* durch die strukturellen Eigenschaften der entsprechenden Ceramid-Komponenten insofern beeinflusst werden, als diese eine TLR4-vermittelte Interaktion ermöglichen oder verhindern können. In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Ceramid-Komponenten Le<sup>X</sup>-tragender GSL aus adulten Würmern vorwiegend C18-Sphingosin in Kombination mit kurzkettigen Fettsäuren (C16:0, C16h:0, C18:0) aufzeigten, während entsprechende GSL aus Cercarien von Sphingoidbasen der Sphinganinfamilie und länger-kettigen Fettsäuren (C24:0 bis C28:0) dominiert wurden (vgl. hierzu Abbildung 16 und Abbildung 33). Diese Erkenntnis bestätigte die Hypothese, nach welcher die Interaktion von Adultwurm-GSL mit TLR4 erst durch deren kurzen Ceramid-Anteil ermöglicht wird, während entsprechende Wechselwirkungen durch die langkettigen Fettsäuren der Ceramid-Komponenten von Cercarien unterbunden werden.

Auf molekularer Ebene kann eine Interaktion von GSL mit DC-SIGN bei gleichzeitiger

---

Kooperation mit TLR4 theoretisch auf verschiedene Weise realisiert werden. So ist denkbar, dass ein GSL-Molekül via Kohlenhydratepitop von DC-SIGN gebunden wird, während ein zweites GSL-Molekül über die lipophile Ceramid-Komponente mit TLR4 interagiert, so dass beide Rezeptoren in getrennten Ligand-Rezeptor-Interaktionen aktiviert werden (Abbildung 35A). Es gibt bereits eine Reihe von Untersuchungen, welche sich mit der Struktur-Wirkungsbeziehung von TLR4-Agonisten beschäftigen. So konnte beispielsweise in Versuchen mit synthetischen Serin-basierten Glykolipiden sowie Lipid A-ähnlichen Strukturen bestätigt werden, dass die Effektivität einer Aktivierung von TLR4 maßgeblich von der Länge der lipophilen Komponente bestimmt wird [211, 212]. In ähnlicher Weise konnten Untersuchungen zur biologischen Aktivität von (Lyso-) Phosphatidylserin aus *S. mansoni* zeigen, dass eine TLR2-vermittelte, immunmodulatorische Wirkung von der Art und Anzahl der im lipophilen Molekül vorhandenen Fettsäuren abhängig war. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit postulierten Wechselwirkungen konnten diese Untersuchungen zeigen, dass schistosomenspezifisches Lyso-Phosphatidylserin mit überwiegend langkettigen Fettsäuren mit 20 bis 26 Kohlenstoffatomen eine TLR2-vermittelte Reifung regulatorischer T-Zellen induzieren konnte, während kommerziell erhältliches, Palmitinsäure-enthaltendes Lyso-Phosphatidylserin hierzu nicht in der Lage war [138].



**Abbildung 35** Schematische Darstellung möglicher Interaktionswege schistosomaler GSL mit DC-SIGN und TLR4

(A), Aktivierung der Rezeptoren mittels getrennter Ligand-Rezeptor-Interaktionen. (B), Aktivierung beider Rezeptoren durch Ausbildung eines ternären Komplexes. Schistosomale GSL, welche die Reifung dendritischer Zellen und somit die Ausprägung einer Th1-basierten Immunantwort induzieren können, werden exemplarisch von Le<sup>x</sup>-Pentasaccharid-tragenden GSL repräsentiert. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, N-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, N-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; geschwungene, schwarze Linie (—), Ceramid-Komponente. Die Abbildung berücksichtigt nicht die realen Größenverhältnisse (modifiziert nach [213]).

Alternativ ist es ebenso denkbar, dass schistosomale GSL mit DC-SIGN und TLR4 in Form eines ternären Komplexes miteinander in Wechselwirkung treten, in welchem die GSL eine

Brücke zwischen den beiden Rezeptoren bilden und somit deren simultane Aktivierung gewährleisten (Abbildung 35B). In diesem Zusammenhang konnten bereits frühere Untersuchungen zeigen, dass DC-SIGN und TLR4 innerhalb der *lipid rafts* lokalisiert sind [214, 215], so dass die beschriebene Interaktion zumindest rein räumlich möglich ist. Besonders interessant ist hierbei, dass eine sehr ähnliche Interaktion bei der Erkennung von GSL durch natürliche Killerzellen beschrieben wurde. Hierbei werden GSL nach Aufnahme und Prozessierung durch antigenpräsentierende Zellen über Bindung der Ceramid-Komponente via CD1d den natürlichen Killerzellen präsentiert, welche die entsprechende Kohlenhydrat-Komponente über ihren T-Zell-Rezeptor erkennen können. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktionen in diesem trimolekularen Komplex ganz wesentlich von den strukturellen Eigenschaften beider Molekülbereiche, des Kohlenhydrat-Anteils sowie der lipophilen Komponente, bestimmt werden [216, 217].

Zusammenfassend bleibt zu berücksichtigen, dass die durchgeführten Untersuchungen und erzielten Ergebnisse zwar strukturbasierte Erklärungsansätze für die beobachtete Divergenz der biologischen Aktivität von GSL aus adulten Würmern und Cercarien *in vitro* liefern konnten, darüber hinaus aber weitere Untersuchungen zur Verifizierung der postulierten Struktur-Wirkungsbeziehungen erforderlich sind. Ein experimenteller Ansatz könnte hier sein, synthetische, Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragende GSL mit definierter Ceramid-Zusammensetzung auf ihre biologische Aktivität *in vitro* hin zu untersuchen. Die entsprechenden Strukturen könnten zu diesem Zweck aus einer GSL-Aufarbeitung aus Cercarien isoliert werden, um anschließend die langkettigen Fettsäuren durch kurzkettigere zu ersetzen. Diese Vorgehensweise setzt jedoch voraus, dass strukturelle Unterschiede in den jeweiligen Sphingoidbasen der GSL aus adulten Würmern und Cercarien keinen Einfluss auf deren biologische Aktivität zeigen. Zum Ausschluss solcher Effekte könnten ergänzende *in vitro* Experimente mit vollsynthetischen Komponenten erfolgen, wobei an dieser Stelle darauf hinzuweisen ist, dass die *de novo* Synthese schistosomaler Le<sup>X</sup>-Pentasaccharid-tragender GSL bereits erfolgreich von Kanaya *et al.* etabliert wurde [218].

---

## 6 Zusammenfassung

Durch eine gezielte Kombination verschiedener strukturanalytischer Ansätze sowie unter Einbeziehung immunologischer Methoden wurde im Rahmen dieser Arbeit ein sehr detaillierter Einblick in die strukturelle Vielfalt von Glykosphingolipiden (GSL) aus adulten Würmern von *Schistosoma mansoni* gewonnen.

Basierend auf der massenspektrometrischen Analyse enzymatisch freigesetzter sowie derivatisierter Oligosaccharide konnten Vorschläge zur Struktur von insgesamt 11 verschiedenen Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL-Spezies erarbeitet werden. Unter Berücksichtigung strukturspezifischer Fragmentierungspfade ermöglichte hierbei eine Abwägung registrierter Signalintensitäten neben der Identifizierung der vorherrschenden Strukturisomere gleichfalls Aussagen zur Präsenz isomerer Nebenkomponenten. In Übereinstimmung mit Literaturangaben und unter Einbeziehung des Bindungsverhaltens der Adultwurm-GSL gegenüber verschiedenen monoklonalen Antikörpern wurde so auf die Expression der Kohlenhydratepitope LacNAc, Le<sup>X</sup>, F-LDN, LDN-F, F-LDN-F, DF-LDN, LDN-DF, F-LDN-DF, DF-LDN-F und DF-LDN-DF geschlossen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnten präzise Vorschläge zu möglichen Biosynthesewegen von GSL aus adulten Würmern abgeleitet werden.

Darüber hinaus erlaubte die Etablierung einer Methode zum enzymatischen Verdau nativer GSL mit Sphingolipid-Ceramid-*N*-Deacylase im Mikro-Maßstab anhand der nachfolgenden Analyse hierbei gebildeter Lyso-GSL und freigesetzter Fettsäuren detaillierte Aussagen zur Zusammensetzung der Ceramid-Komponenten dieser GSL. Mit dieser Strategie wurde unter ausschließlicher Verwendung massenspektrometrischer Routineverfahren erstmals gezeigt, dass in den Ceramid-Komponenten Le<sup>X</sup>-tragender GSL aus Cercarien überwiegend Kombinationen aus C18- bis C20-Sphinganinen und langkettigen Fettsäuren mit 24 bis 28 Kohlenstoffatomen vorherrschen. Im Gegensatz hierzu wiesen komplexe GSL aus adulten Würmern C18-Sphingosin als Hauptkomponente Le<sup>X</sup>-tragender GSL auf, so dass parallel auf die Präsenz kurzkettiger Fettsäuren mit 16 bzw. 18 Kohlenstoffatomen in den entsprechenden Ceramid-Anteilen geschlossen werden konnte. Diese stadienspezifischen Unterschiede lieferten strukturbasierte Erklärungsansätze für die in früheren Untersuchungen beobachteten divergierenden immunmodulatorischen Eigenschaften komplexer GSL aus Cercarien und adulten Würmern.

Neben detaillierten Einblicken in die strukturelle Diversität der Kohlenhydrat- und Ceramid-Komponenten von GSL aus *S. mansoni* liefern die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Resultate somit den Ausgangspunkt für nachfolgende Untersuchungen zu funktionellen Eigenschaften dieser Substanzklasse.

---

## 7 Summary

Within this doctoral thesis a detailed insight into the structural heterogeneity of glycosphingolipids (GSLs) from adult *Schistosoma mansoni* could be obtained by systematic combination of different analytical approaches including mass spectrometry as well as immunological methods.

Mass spectrometric analyses of enzymatically released and, in part, derivatized oligosaccharides allowed an in-depth structural characterisation of in total 11 different carbohydrate moieties of complex GSLs. Next to the detection of preponderant isomers, identification of minor ones was performed on the basis of the relative peak intensities of detected signals in overall consideration of the registered fragmentation pattern. In parallel, binding of complex GSLs by various monoclonal antibodies directed against distinct carbohydrate epitopes has been investigated. Based on this analytical strategy and in agreement with literature data available, expression of the following carbohydrate epitopes on complex GSLs of adult worms could be deduced: LacNAc, Le<sup>X</sup>, F-LDN, LDN-F, F-LDN-F, DF-LDN, LDN-DF, F-LDN-DF, DF-LDN-F and DF-LDN-DF. Moreover, detailed biosynthetic pathways of the carbohydrate moieties of complex GSLs from adult *S. mansoni* could be predicted.

Furthermore, a microscale approach for enzymatic digestion of native GSLs with sphingolipid ceramide *N*-deacylase was developed. Application of this method allowed a precise characterisation of respective ceramide compositions by mass spectrometric analysis of resulting lyso-GSLs as well as released fatty acids. To this end, solely routine mass spectrometric techniques are required. Obtained results revealed that the ceramide units of cercarial Le<sup>X</sup> exhibiting GSLs are dominated by C18- to C20-sphinganines in combination with long-chained fatty acids of 24 to 28 carbon atoms. In contrast, respective GSLs of adult worms were based mainly on C18-sphingosine and short-chained fatty acids with 16 or 18 carbon atoms. Observed stage-specific differences of the ceramide moieties of Le<sup>X</sup> exhibiting GSLs may explain the published observation that only adult worm, but not cercarial GSLs are able to induce dendritic cell activation, skewing the T cell response towards a Th 1 profile.

In addition to the gained insight into the structural diversity of both carbohydrate as well as ceramide moieties of GSLs from *S. mansoni*, the results of this doctoral thesis provide a structural basis for further studies on functional aspects of schistosomal GSLs.

---

## 8 Literatur

- [1] WHO (2012). Schistosomiasis - Fact sheet N°115. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>.
- [2] Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A. and Savioli, L. (2000). The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop*, **77**: 41-51.
- [3] Meurs, L., Mbow, M., Vereecken, K., Menten, J., Mboup, S. and Polman, K. (2012). Epidemiology of mixed *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections in northern Senegal. *Int J Parasitol*, **42**: 305-11.
- [4] Tchuem Tchuenté, L.A., Kamwa Ngassam, R.I., Sumo, L., Ngassam, P., Dongmo Noumedem, C., Nzu, D.D., Dankoni, E., Kenfack, C.M., Gipwe, N.F., Akame, J., Tarini, A., Zhang, Y. and Angwafo, F.F.r. (2012). Mapping of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in the regions of centre, East and west cameroon. *PLoS Negl Trop Dis*, **6**: e1553.
- [5] Modena, C.M., dos Santos Lima, W. and Coelho, P.M. (2008). Wild and domesticated animals as reservoirs of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil. *Acta Trop*, **108**: 242-4.
- [6] Chabasse, D., Bertrand, G., Leroux, J.P., Gauthey, N. and Hocquet, P. (1985). Developmental bilharziasis caused by *Schistosoma mansoni* discovered 37 years after infestation. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, **78**: 643-7.
- [7] Leid, R.W., Suquet, C.M. and Tanigoshi, L. (1987). Parasite defense mechanisms for evasion of host attack; a review. *Vet Parasitol*, **25**: 147-62.
- [8] 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**: 20196-203.
- [9] van Die, I. and Cummings, R.D. (2010). Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response? *Glycobiology*, **20**: 2-12.
- [10] Harn, D.A., McDonald, J., Atochina, O. and Da'dara, A.A. (2009). Modulation of host immune responses by helminth glycans. *Immunol Rev*, **230**: 247-57.
- [11] Wennekes, T., van den Berg, R.J., Boot, R.G., van der Marel, G.A., Overkleeft, H.S. and Aerts, J.M. (2009). Glycosphingolipids-nature, function, and pharmacological modulation. *Angew Chem Int Ed Engl*, **48**: 8848-69.
- [12] van der Kleij, D. and Yazdanbakhsh, M. (2003). Control of inflammatory diseases by pathogens: lipids and the immune system. *Eur J Immunol*, **33**: 2953-63.
- [13] van Stijn, C.M., Meyer, S., van den Broek, M., Bruijns, S.C., van Kooyk, Y., Geyer, R. and van Die, I. (2010). *Schistosoma mansoni* worm glycolipids induce an inflammatory phenotype in human dendritic cells by cooperation of TLR4 and DC-SIGN. *Mol Immunol*, **47**: 1544-52.
- [14] 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.
- [15] van Die, I., van Stijn, C.M., Geyer, H. and Geyer, R. (2010). Structural and functional analysis of glycosphingolipids of *Schistosoma mansoni*. *Methods Enzymol*, **480**: 117-40.
- [16] Davis, A. (1996). Schistosomiasis. In *Manson's tropical diseases* (Cook, G.C., ed) W.B. Saunders Company Ltd., London, **20<sup>th</sup> Ed**:1413-56.
- [17] Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M. and Utzinger, J. (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis*, **6**: 411-25.
- [18] van der Werf, M.J., de Vlas, S.J., Brooker, S., Looman, C.W., Nagelkerke, N.J., Habbema, J.D. and Engels, D. (2003). Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop*, **86**: 125-39.
- [19] Quack, T., Beckmann, S. and Grevelding, C.G. (2006). Schistosomiasis and the molecular biology of the male-female interaction of *S. mansoni*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **119**: 365-72.
- [20] Ross, A.G., Sleigh, A.C., Li, Y., Davis, G.M., Williams, G.M., Jiang, Z., Feng, Z. and McManus, D.P. (2001). Schistosomiasis in the People's Republic of China: prospects and challenges for the 21st century. *Clin Microbiol Rev*, **14**: 270-95.
- [21] De Bont, J. and Vercruyssen, J. (1997). The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. *Parasitol Today*, **13**: 255-62.
- [22] Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H. and Deplazes, P. (2005). Parasiten und Parasitosen - Helminthen; Familie der Schistosomatidae. In *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin* Enke Verlag, Stuttgart: 161-5.

- [23] Wenk, P. and Renz, A. (2003). Parasitologie - Biologie der Humanparasiten. Thieme, Stuttgart.
- [24] Polderman, A.M., Panday, U.G., Ramkisoen, S., van Lieshout, L. and Oostburg, B.F. (1994). A sedimentation-selective filtration method for the diagnosis of light infections with *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop*, **58**: 221-7.
- [25] van Lieshout, L., Polderman, A.M. and Deelder, A.M. (2000). Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. *Acta Trop*, **77**: 69-80.
- [26] Deelder, A.M., De Jonge, N., Boerman, O.C., Fillie, Y.E., Hilberath, G.W., Rotmans, J.P., Gerritse, M.J. and Schut, D.W. (1989). Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg*, **40**: 268-72.
- [27] Deelder, A.M., van Dam, G.J., Cornelis, D., Fillie, Y.E. and van Zeyl, R.J. (1996). *Schistosoma*: Analysis of monoclonal antibodies reactive with the circulating antigens CAA and CCA. *Parasitology*, **112**: 21-35.
- [28] de Jonge, N., Kremsner, P.G., Krijger, F.W., Schommer, G., Fillie, Y.E., Cornelis, 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**: 815-8.
- [29] van Dam, G.J., Wichers, J.H., Ferreira, T.M., Ghati, D., van Amerongen, A. and Deelder, A.M. (2004). Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. *J Clin Microbiol*, **42**: 5458-61.
- [30] Abdul-Ghani, R., Loutfy, N., el-Sahn, A. and Hassan, A. (2009). Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges. *Parasitol Res*, **104**: 955-65.
- [31] Cioli, D. (1998). Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol Today*, **14**: 418-22.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] Brindley, P.J. and Sher, A. (1987). The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J Immunol*, **139**: 215-20.
- [35] 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.
- [36] Ribeiro, F., Mello, R.T., Tavares, C.A., Kusel, J.R. and Coelho, P.M. (2004). Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **46**: 231-3.
- [37] Centers for Disease Control and Prevention (2012). Parasites - Schistosomiasis. Available from: [http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/health\\_professionals/index.html#dx](http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/health_professionals/index.html#dx).
- [38] Doenhoff, M.J., Cioli, D. and Utzinger, J. (2008). Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis*, **21**: 659-67.
- [39] Manneck, T., Braissant, O., Ellis, W. and Keiser, J. (2011). *Schistosoma mansoni*: antischistosomal activity of the four optical isomers and the two racemates of mefloquine on schistosomula and adult worms *in vitro* and *in vivo*. *Exp Parasitol*, **127**: 260-9.
- [40] Neves, J.K., Botelho, S.P., de Melo, C.M., Pereira, V.R., de Lima Mdo, C., Pitta Ida, R., Albuquerque, M.C. and Galdino, S.L. (2010). Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*, **107**: 531-8.
- [41] Beckmann, S. and Grevelding, C.G. (2010). Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Int J Parasitol*, **40**: 521-6.
- [42] Dong, Y., Chollet, J., Vargas, M., Mansour, N.R., Bickle, Q., Alnouti, Y., Huang, J., Keiser, J. and Vennerstrom, J.L. (2010). Praziquantel analogs with activity against juvenile *Schistosoma mansoni*. *Bioorg Med Chem Lett*, **20**: 2481-4.
- [43] Dissous, C. and Grevelding, C.G. (2011). Piggy-backing the concept of cancer drugs for schistosomiasis treatment: a tangible perspective? *Trends Parasitol*, **27**: 59-66.
- [44] Knopp, S., Stothard, J.R., Rollinson, D., Mohammed, K.A., Khamis, I.S., Marti, H. and Utzinger, J. (2011). From morbidity control to transmission control: time to change tactics against helminths on Unguja Island, Zanzibar. *Acta Trop*, doi: 10.1016/j.actatropica.2011.04.010.
- [45] Coura, J.R. and Conceicao, M.J. (2010). Specific schistosomiasis treatment as a strategy for disease control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **105**: 598-603.
- [46] Perrett, S. and Whitfield, P.J. (1996). Currently available molluscicides. *Parasitol Today*, **12**: 156-9.

- [47] Taylor, M.G. and Bickle, Q.D. (1986). Irradiated schistosome vaccines. *Parasitol Today*, **2**: 132-4.
- [48] Colley, D.G. and Colley, M.D. (1989). Protective immunity and vaccines to schistosomiasis. *Parasitol Today*, **5**: 350-5.
- [49] Dunne, D.W., Jones, F.M., Cook, L. and Moloney, N.A. (1994). Passively transferable protection against *Schistosoma japonicum* induced in the mouse by multiple vaccination with attenuated larvae: the development of immunity, antibody isotype responses and antigen recognition. *Parasite Immunol*, **16**: 655-68.
- [50] Fallon, P.G., Fookes, R.E. and Doenhoff, M.J. (1996). Protection of mice against *Schistosoma mansoni* infection by passive transfer of sera from infected rabbits. *Parasite Immunol*, **18**: 7-14.
- [51] Nyame, A.K., Lewis, F.A., Doughty, B.L., Correa-Oliveira, R. and Cummings, R.D. (2003). Immunity to schistosomiasis: glycans are potential antigenic targets for immune intervention. *Exp Parasitol*, **104**: 1-13.
- [52] Eberl, M., Langermans, J.A., Vervenne, R.A., Nyame, A.K., Cummings, R.D., Thomas, A.W., Coulson, P.S. and Wilson, R.A. (2001). Antibodies to glycans dominate the host response to schistosome larvae and eggs: is their role protective or subversive? *J Infect Dis*, **183**: 1238-47.
- [53] Han, Z.G., Brindley, P.J., Wang, S.Y. and Chen, Z. (2009). *Schistosoma* genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **10**: 211-40.
- [54] Loukas, A., Gaze, S., Mulvenna, J.P., Gasser, R.B., Brindley, P.J., Doolan, D.L., Bethony, J.M., Jones, M.K., Gobert, G.N., Driguez, P., McManus, D.P. and Hotez, P.J. (2011). Vaccinomics for the major blood feeding helminths of humans. *OMICs*, **15**: 567-77.
- [55] Okano, M., Satoskar, A.R., Nishizaki, K., Abe, M. and Harn, D.A., Jr. (1999). Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol*, **163**: 6712-7.
- [56] 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**: 4275-82.
- [57] Ceroni, A., Maass, K., Geyer, H., Geyer, R., Dell, A. and Haslam, S.M. (2008). GlycoWorkbench: A tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res*, **7**: 1650-9.
- [58] Regina Todeschini, A. and Hakomori, S.I. (2008). Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochim Biophys Acta*, **1780**: 421-33.
- [59] Hakomori, S.I. (2008). Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochim Biophys Acta*, **1780**: 325-46.
- [60] Schnaar, R.L. (2004). Glycolipid-mediated cell-cell recognition in inflammation and nerve regeneration. *Arch Biochem Biophys*, **426**: 163-72.
- [61] Makita, A. and Taniguchi, N. (1985). Glycosphingolipids. In *New Comprehensive Biochemistry*, Vol 10: *Glycolipids* (Wiegandt, H., ed) Elsevier Ltd., Amsterdam: 1-99.
- [62] Wuhrer, M., Dennis, R.D., Doenhoff, M.J. and Geyer, R. (2000). Stage-associated expression of ceramide structures in glycosphingolipids from the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochim Biophys Acta*, **1524**: 155-61.
- [63] Makaaru, 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**: 2251-7.
- [64] 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**: 653-61.
- [65] 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( $\alpha$ 1-3)GalNAc-, GalNAc( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc- and Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc- (Lewis X) terminal structures. *Eur J Biochem*, **269**: 481-93.
- [66] Kantelhardt, S.R., Wuhrer, M., Dennis, R.D., Doenhoff, M.J., Bickle, Q. and Geyer, R. (2002). Fuc( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)GalNAc-: the major antigenic motif of *Schistosoma mansoni* glycolipids implicated in infection sera and keyhole-limpet haemocyanin cross-reactivity. *Biochem J*, **366**: 217-23.
- [67] 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**: 155-69.
-

- [68] 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.
- [69] Dennis, R.D., Geyer, H. and Geyer, R. (2007). Glycoconjugates of Parasitic Helminth Infections. In *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology*, Vol. 4: *Cell Glycobiology and Development, Health and Disease in Glycomedicine* (Kamerling, J.P., Boons, G.-J., Lee, Y.C., Suzuki, A., Taniguchi, N. and Vorhagen, A.G.J., eds) Elsevier Ltd., Oxford (UK): 473-94.
- [70] 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 $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal  $\alpha$ 1- motif constitutes the repeating unit of the complex O-glycans derived from the cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem*, **270**: 17114-23.
- [71] 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.
- [72] van Dam, G.J., Claas, F.H., Yazdanbakhsh, M., Kruize, Y.C., van Keulen, A.C., Ferreira, S.T., Rotmans, J.P. and Deelder, A.M. (1996). *Schistosoma mansoni* excretory circulating cathodic antigen shares Lewis-x epitopes with a human granulocyte surface antigen and evokes host antibodies mediating complement-dependent lysis of granulocytes. *Blood*, **88**: 4246-51.
- [73] 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**: 663-77.
- [74] 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**: 149-63.
- [75] 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**: 347-61.
- [76] Srivatsan, J., Smith, D.F. and Cummings, R.D. (1992). *Schistosoma mansoni* synthesizes novel biantennary Asn-linked oligosaccharides containing terminal  $\beta$ -linked *N*-acetylgalactosamine. *Glycobiology*, **2**: 445-52.
- [77] Meevissen, M.H., Wuhrer, M., Doenhoff, M.J., Schramm, G., Haas, H., Deelder, A.M. and Hokke, C.H. (2010). Structural characterization of glycans on omega-1, a major *Schistosoma mansoni* egg glycoprotein that drives Th2 responses. *J Proteome Res*, **9**: 2630-42.
- [78] 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**: 2276-92.
- [79] Meevissen, M.H., Balog, C.I., Koeleman, C.A., Doenhoff, M.J., Schramm, G., Haas, H., Deelder, A.M., Wuhrer, M. and Hokke, C.H. (2011). Targeted glycoproteomic analysis reveals that kappa-5 is a major, uniquely glycosylated component of *Schistosoma mansoni* egg antigens. *Mol Cell Proteomics*, **10**: M110.005710.
- [80] Pearce, E.J. (2005). Priming of the immune response by schistosome eggs. *Parasite Immunol*, **27**: 265-70.
- [81] MacDonald, A.S., Araujo, M.I. and Pearce, E.J. (2002). Immunology of parasitic helminth infections. *Infect Immun*, **70**: 427-33.
- [82] Jenkins, S.J., Hewitson, J.P., Jenkins, G.R. and Mountford, A.P. (2005). Modulation of the host's immune response by schistosome larvae. *Parasite Immunol*, **27**: 385-93.
- [83] Meevissen, M.H., Yazdanbakhsh, M. and Hokke, C.H. (2011). *Schistosoma mansoni* egg glycoproteins and C-type lectins of host immune cells: Molecular partners that shape immune responses. *Exp Parasitol*, doi: 10.1016/j.exppara.2011.05.005.
- [84] Schramm, G. and Haas, H. (2010). Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. *Microbes Infect*, **12**: 881-8.
- [85] Liu, K. and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev*, **234**: 45-54.
- [86] Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392**: 245-52.
- [87] Steinman, R.M. and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, **137**: 1142-62.

- [88] Steinman, R.M. and Nussenzweig, M.C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 351-8.
- [89] Pearce, E.J., Kane, C.M. and Sun, J. (2006). Regulation of dendritic cell function by pathogen-derived molecules plays a key role in dictating the outcome of the adaptive immune response. *Chem Immunol Allergy*, **90**: 82-90.
- [90] Coquerelle, C. and Moser, M. (2010). DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev*, **234**: 317-34.
- [91] Appelmelk, B.J., van Die, I., van Vliet, S.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Geijtenbeek, T.B. and van Kooyk, Y. (2003). Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol*, **170**: 1635-9.
- [92] van Liempt, E., Bank, C.M., Mehta, P., Garcia-Vallejo, J.J., Kwar, Z.S., Geyer, R., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., Kooyk, Y. and van Die, I. (2006). Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Lett*, **580**: 6123-31.
- [93] Serrano-Gomez, D., Sierra-Filardi, E., Martinez-Nunez, R.T., Caparros, E., Delgado, R., Munoz-Fernandez, M.A., Abad, M.A., Jimenez-Barbero, J., Leal, M. and Corbi, A.L. (2008). Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. *J Biol Chem*, **283**: 3889-903.
- [94] Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y. and Figdor, C.G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, **100**: 575-85.
- [95] van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T.B. (2002). A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions. *Immunol Rev*, **186**: 47-56.
- [96] Figdor, C.G., van Kooyk, Y. and Adema, G.J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*, **2**: 77-84.
- [97] Engering, A., Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Wijers, M., van Liempt, E., Demaurex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C.G., Piguët, V. and van Kooyk, Y. (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*, **168**: 2118-26.
- [98] Geijtenbeek, T.B., Van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B. and Van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*, **197**: 7-17.
- [99] den Dunnen, J., Gringhuis, S.I. and Geijtenbeek, T.B. (2009). Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol Immunother*, **58**: 1149-57.
- [100] van Kooyk, Y. (2008). C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans*, **36**: 1478-81.
- [101] Garcia-Vallejo, J.J. and van Kooyk, Y. (2009). Endogenous ligands for C-type lectin receptors: the true regulators of immune homeostasis. *Immunol Rev*, **230**: 22-37.
- [102] van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T.B. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*, **3**: 697-709.
- [103] Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, **296**: 298-300.
- [104] Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**: 783-801.
- [105] Moresco, E.M., LaVine, D. and Beutler, B. (2011). Toll-like receptors. *Curr Biol*, **21**: R488-93.
- [106] Kang, J.Y. and Lee, J.O. (2011). Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu Rev Biochem*, **80**: 917-41.
- [107] Lu, Y.C., Yeh, W.C. and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, **42**: 145-51.
- [108] Xu, D., Liu, H. and Komai-Koma, M. (2004). Direct and indirect role of Toll-like receptors in T cell mediated immunity. *Cell Mol Immunol*, **1**: 239-46.
- [109] Bergman, M.P., Engering, A., Smits, H.H., van Vliet, S.J., van Bodegraven, A.A., Wirth, H.P., Kapsenberg, M.L., Vandenbroucke-Grauls, C.M., van Kooyk, Y. and Appelmelk, B.J. (2004). *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J Exp Med*, **200**: 979-90.
- [110] Steeghs, L., van Vliet, S.J., Uronen-Hansson, H., van Mourik, A., Engering, A., Sanchez-Hernandez, M., Klein, N., Callard, R., van Putten, J.P., van der Ley, P., van Kooyk, Y. and van de Winkel, J.G. (2006). *Neisseria meningitidis* expressing IgtB lipopolysaccharide targets DC-SIGN and modulates dendritic cell function. *Cell Microbiol*, **8**: 316-25.
-

- [111] Cummings, R.D. and Nyame, A.K. (1996). Glycobiology of schistosomiasis. *FASEB J*, **10**: 838-48.
- [112] Hokke, C.H. and Deelder, A.M. (2001). Schistosome glycoconjugates in host-parasite interplay. *Glycoconj J*, **18**: 573-87.
- [113] Fenderson, B.A., Eddy, E.M. and Hakomori, S. (1990). Glycoconjugate expression during embryogenesis and its biological significance. *Bioessays*, **12**: 173-9.
- [114] Hakomori, S. (1992). Le(X) and related structures as adhesion molecules. *Histochem J*, **24**: 771-6.
- [115] Kerr, M.A. and Stocks, S.C. (1992). The role of CD15-(Le(X))-related carbohydrates in neutrophil adhesion. *Histochem J*, **24**: 811-26.
- [116] Singhal, A. and Hakomori, S. (1990). Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *Bioessays*, **12**: 223-30.
- [117] 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**: 4159-63.
- [118] 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<sup>x</sup>, LacdiNAc, GalNAc $\beta$ 1-4 (Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc and GalNAc $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-2Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc carbohydrate epitopes: Detection with monoclonal antibodies that are characterized by enzymatically synthesized neoglycoproteins. *Glycobiology*, **10**: 601-9.
- [119] Koster, B. and Strand, M. (1994). *Schistosoma mansoni*: immunolocalization of two different fucose-containing carbohydrate epitopes. *Parasitology*, **108**: 433-46.
- [120] 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**: 115-9.
- [121] 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**: 223-9.
- [122] Okano, M., Satoskar, A.R., Nishizaki, K. and Harn, D.A., Jr. (2001). Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J Immunol*, **167**: 442-50.
- [123] Thomas, P.G. and Harn, D.A., Jr. (2004). Immune biasing by helminth glycans. *Cell Microbiol*, **6**: 13-22.
- [124] Velupillai, P. and Harn, D.A. (1994). Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**: 18-22.
- [125] Velupillai, P., dos Reis, E.A., dos Reis, M.G. and Harn, D.A. (2000). Lewis(x)-containing oligosaccharide attenuates schistosome egg antigen-induced immune depression in human schistosomiasis. *Hum Immunol*, **61**: 225-32.
- [126] Everts, B., Perona-Wright, G., Smits, H.H., Hokke, C.H., van der Ham, A.J., Fitzsimmons, C.M., Doenhoff, M.J., van der Bosch, J., Mohrs, K., Haas, H., Mohrs, M., Yazdanbakhsh, M. and Schramm, G. (2009). Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *J Exp Med*, **206**: 1673-80.
- [127] Steinfeldt, S., Andersen, J.F., Cannons, J.L., Feng, C.G., Joshi, M., Dwyer, D., Caspar, P., Schwartzberg, P.L., Sher, A. and Jankovic, D. (2009). The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *J Exp Med*, **206**: 1681-90.
- [128] Fahel, J.S., Macedo, G.C., Pinheiro, C.S., Caliari, M.V. and Oliveira, S.C. (2010). IPSE/alpha-1 of *Schistosoma mansoni* egg induces enlargement of granuloma but does not alter Th2 balance after infection. *Parasite Immunol*, **32**: 345-53.
- [129] Moran, A.P. (2008). Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. *Carbohydr Res*, **343**: 1952-65.
- [130] Nyame, A.K., Pilcher, J.B., Tsang, V.C. and Cummings, R.D. (1996). *Schistosoma mansoni* infection in humans and primates induces cytolytic antibodies to surface Le(x) determinants on myeloid cells. *Exp Parasitol*, **82**: 191-200.
- [131] 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**: 1826-31.
- [132] Borojevic, R., Santos-da-Silva, C. and Carvalho, E.A. (1983). Chronic schistosomiasis mansoni: splenic myelopoiesis and inhibition of neutrophil granulocytopenia mediated by the sera of patients. *J Infect Dis*, **148**: 422-6.

- [133] van Liempt, E., van Vliet, S.J., Engering, A., Garcia Vallejo, J.J., Bank, C.M., Sanchez-Hernandez, M., van Kooyk, Y. and van Die, I. (2007). *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol*, **44**: 2605-15.
- [134] Moran, A.P., Prendergast, M.M. and Appelmek, B.J. (1996). Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **16**: 105-15.
- [135] Harvey, H.A., Swords, W.E. and Apicella, M.A. (2001). The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *J Autoimmun*, **16**: 257-62.
- [136] Lochnit, G., Dennis, R.D., Ulmer, A.J. and Geyer, R. (1998). Structural elucidation and monokine-inducing activity of two biologically active zwitterionic glycosphingolipids derived from the porcine parasitic nematode *Ascaris suum*. *J Biol Chem*, **273**: 466-74.
- [137] Deehan, M.R., Goodridge, H.S., Blair, D., Lochnit, G., Dennis, R.D., Geyer, R., Harnett, M.M. and Harnett, W. (2002). Immunomodulatory properties of *Ascaris suum* glycosphingolipids - phosphorylcholine and non-phosphorylcholine-dependent effects. *Parasite Immunol*, **24**: 463-9.
- [138] van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J.F., Kruize, Y.C., Schmitz, M., Kurt-Jones, E.A., Espevik, T., de Jong, E.C., Kapsenberg, M.L., Golenbock, D.T., Tielens, A.G. and Yazdanbakhsh, M. (2002). A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem*, **277**: 48122-9.
- [139] Van der Kleij, D., Van Remoortere, A., Schuitemaker, J.H., Kapsenberg, M.L., Deelder, A.M., Tielens, A.G., Hokke, C.H. and Yazdanbakhsh, M. (2002). Triggering of innate immune responses by schistosome egg glycolipids and their carbohydrate epitope GalNAc $\beta$ 1-4(Fuca1-2Fuca1-3)GlcNAc. *J Infect Dis*, **185**: 531-9.
- [140] Meyer, S., Tefsen, B., Imberty, A., Geyer, R. and van Die, I. (2007). The C-type lectin L-SIGN differentially recognizes glycan antigens on egg glycosphingolipids and soluble egg glycoproteins from *Schistosoma mansoni*. *Glycobiology*, **17**: 1104-19.
- [141] 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<sup>Y</sup> glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, the first parasite-specific ligand of DC-SIGN. *J Biol Chem*, **280**: 37349-59.
- [142] 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.
- [143] van Dam, G.J., Kornelis, D., Van Zeyl, R.J., Rotmans, J.P. and Deelder, A.M. (1993). *Schistosoma mansoni*: Analysis of monoclonal antibodies reactive with gut-associated antigens. *Parasitol Res*, **79**: 55-62.
- [144] Nibbeling, H.A., Kahama, A.I., Van Zeyl, R.J. and Deelder, A.M. (1998). Use of monoclonal antibodies prepared against *Schistosoma mansoni* hatching fluid antigens for demonstration of *Schistosoma haematobium* circulating egg antigens in urine. *Am J Trop Med Hyg*, **58**: 543-50.
- [145] Bickle, Q.D. and Andrews, B.J. (1988). Characterization of *Schistosoma mansoni* monoclonal antibodies which block in-vitro killing: failure to demonstrate blockage of immunity *in vivo*. *Parasite Immunol*, **10**: 151-68.
- [146] Geijtenbeek, T.B., van Duijnhoven, G.C., van Vliet, S.J., Krieger, E., Vriend, G., Figdor, C.G. and van Kooyk, Y. (2002). Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem*, **277**: 11314-20.
- [147] Schnaar, R.L. and Needham, L.K. (1994). Thin-layer chromatography of glycosphingolipids. *Methods Enzymol*, **230**: 371-89.
- [148] Fuchs, B., Suss, R., Teuber, K., Eibisch, M. and Schiller, J. (2011). Lipid analysis by thin-layer chromatography - a review of the current state. *J Chromatogr A*, **1218**: 2754-74.
- [149] Anumula, K.R. (1994). Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection. *Anal Biochem*, **220**: 275-83.
- [150] Ito, M., Kurita, T. and Kita, K. (1995). A novel enzyme that cleaves the *N*-acyl linkage of ceramides in various glycosphingolipids as well as sphingomyelin to produce their lyso forms. *J Biol Chem*, **270**: 24370-4.
-

- [151] Kita, K., Kurita, T. and Ito, M. (2001). Characterization of the reversible nature of the reaction catalyzed by sphingolipid ceramide *N*-deacylase. A novel form of reverse hydrolysis reaction. *Eur J Biochem*, **268**: 592-602.
- [152] Kurita, T., Izu, H., Sano, M., Ito, M. and Kato, I. (2000). Enhancement of hydrolytic activity of sphingolipid ceramide *N*-deacylase in the aqueous-organic biphasic system. *J Lipid Res*, **41**: 846-51.
- [153] Li, Y., Arigi, E., Eichert, H. and Levery, S.B. (2010). Mass spectrometry of fluorocarbon-labeled glycosphingolipids. *J Mass Spectrom*, **45**: 504-19.
- [154] Bleckmann, C., Geyer, H., Reinhold, V., Lieberoth, A., Schachner, M., Kleene, R. and Geyer, R. (2009). Glycomic analysis of N-linked carbohydrate epitopes from CD24 of mouse brain. *J Proteome Res*, **8**: 567-82.
- [155] Gaver, R.C. and Sweeley, C.C. (1965). Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long-chain bases by gas chromatography. *J Am Oil Chem Soc*, **42**: 294-8.
- [156] Meisen, I., Mormann, M. and Muthing, J. (2011). Thin-layer chromatography, overlay technique and mass spectrometry: A versatile triad advancing glycosphingolipidomics. *Biochim Biophys Acta*, **1811**: 875-96.
- [157] Haynes, C.A., Allegood, J.C., Park, H. and Sullards, M.C. (2009). Sphingolipidomics: methods for the comprehensive analysis of sphingolipids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **877**: 2696-708.
- [158] Harvey, D.J. (1999). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom Rev*, **18**: 349-450.
- [159] Maass, K., Ranzinger, R., Geyer, H., von der Lieth, C.W. and Geyer, R. (2007). "Glycopeakfinder" - *de novo* composition analysis of glycoconjugates. *Proteomics*, **7**: 4435-44.
- [160] Meng, C.K. and Fenn, J.B. (1990). Analyzing organic molecules with electrospray mass spectrometry. *Am Biotechnol Lab*, **8**: 54-60.
- [161] Ryhage, R. and Stenhagen, E. (1960). Mass spectrometry in lipid research. *J Lipid Res*, **1**: 361-90.
- [162] Domon, B. and Costello, C.E. (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj J*, **5**: 397-409.
- [163] Adams, J. and Ann, Q. (1993). Determination of sphingolipids by mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, **12**: 51-85.
- [164] Hsu, F.F. and Turk, J. (2001). Structural determination of glycosphingolipids as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisional-activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument. *J Am Soc Mass Spectrom*, **12**: 61-79.
- [165] Merrill Jr., A.H., Sullards, M.C., Allegood, J.C., Kelly, S. and Wang, E. (2005). Sphingolipidomics: High-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods*, **36**: 207-24.
- [166] Olling, A., Breimer, M.E., Peltomaa, E., Samuelsson, B.E. and Ghardashkhani, S. (1998). Electrospray ionization and collision-induced dissociation time-of-flight mass spectrometry of neutral glycosphingolipids. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **12**: 637-45.
- [167] Rhyage, R. and Stenhagen, E. (1963). Mass spectrometry of long-chain esters. In *Mass Spectrometry of Organic Ions* (McLafferty, F.W., ed) Academic Press, New York: 399-452.
- [168] Wuhrer, M. (1999). Charakterisierung stadienspezifisch exprimierter Glykolipide des Humanparasiten *Schistosoma mansoni*. Dissertation, Fachbereich Biologie und Chemie, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- [169] Harvey, D.J., Mattu, T.S., Wormald, M.R., Royle, L., Dwek, R.A. and Rudd, P.M. (2002). "Internal residue loss": rearrangements occurring during the fragmentation of carbohydrates derivatized at the reducing terminus. *Anal Chem*, **74**: 734-40.
- [170] Wuhrer, M., Deelder, A.M. and van der Burgt, Y.E. (2011). Mass spectrometric glycan rearrangements. *Mass Spectrom Rev*, **30**: 664-80.
- [171] Wuhrer, M., Grimm, C., Dennis, R.D., Idris, M.A. and Geyer, R. (2004). The parasitic trematode *Fasciola hepatica* exhibits mammalian-type glycolipids as well as Gal(β1-6)Gal-terminating glycolipids that account for cestode serological cross-reactivity. *Glycobiology*, **14**: 115-26.
- [172] Guo, Y., Feinberg, H., Conroy, E., Mitchell, D.A., Alvarez, R., Blixt, O., Taylor, M.E., Weis, W.I. and Drickamer, K. (2004). Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol*, **11**: 591-8.
- [173] Ito, M. and Yamagata, T. (1989). Endoglycoceramidase from *Rhodococcus* species G-74-2. *Methods Enzymol*, **179**: 488-96.
-

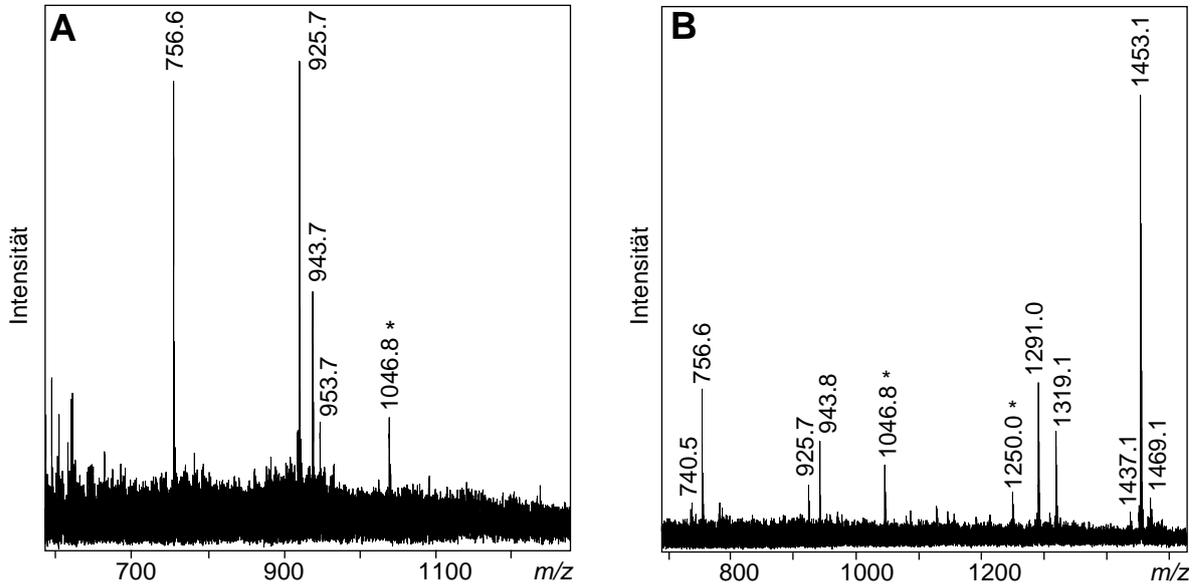
- [174] Ito, M. and Yamagata, T. (1986). A novel glycosphingolipid-degrading enzyme cleaves the linkage between the oligosaccharide and ceramide of neutral and acidic glycosphingolipids. *J Biol Chem*, **261**: 14278-82.
- [175] Ito, M. and Yamagata, T. (1989). Purification and characterization of glycosphingolipid-specific endoglycosidases (endoglycoceramidases) from a mutant strain of *Rhodococcus* sp. Evidence for three molecular species of endoglycoceramidase with different specificities. *J Biol Chem*, **264**: 9510-9.
- [176] Li, Y.T., Chou, C.W., Li, S.C., Kobayashi, U., Ishibashi, Y.H. and Ito, M. (2009). Preparation of homogenous oligosaccharide chains from glycosphingolipids. *Glycoconj J*, **26**: 929-33.
- [177] Karlsson, H., Halim, A. and Teneberg, S. (2010). Differentiation of glycosphingolipid-derived glycan structural isomers by liquid chromatography/mass spectrometry. *Glycobiology*, **20**: 1103-16.
- [178] Geyer, H. and Geyer, R. (1998). Strategies for glycoconjugate analysis. *Acta Anat*, **161**: 18-35.
- [179] Adams, J. (1990). Charge-remote fragmentations: Analytical applications and fundamental studies. *Mass Spectrom Rev*, **9**: 141-186.
- [180] Hsu, F.F. and Turk, J. (2000). Structural determination of sphingomyelin by tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom*, **11**: 437-49.
- [181] Geyer, H., Schmitt, S., Wuhrer, M. and Geyer, R. (1999). Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS. *Anal Chem*, **71**: 476-82.
- [182] Jungalwala, F.B., Evans, J.E., Bremer, E. and McCluer, R.H. (1983). Analysis of sphingoid bases by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Lipid Res*, **24**: 1380-8.
- [183] Curatolo, W. and Jungalwala, F.B. (1985). Phase behavior of galactocerebrosides from bovine brain. *Biochemistry*, **24**: 6608-13.
- [184] Levery, S.B. (2005). Glycosphingolipid structural analysis and glycosphingolipidomics. *Methods Enzymol*, **405**: 300-69.
- [185] Muthing, J. and Distler, U. (2010). Advances on the compositional analysis of glycosphingolipids combining thin-layer chromatography with mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, **29**: 425-79.
- [186] Wuhrer, M., Koeleman, C.A., Hokke, C.H. and Deelder, A.M. (2006). Mass spectrometry of proton adducts of fucosylated N-glycans: fucose transfer between antennae gives rise to misleading fragments. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **20**: 1747-54.
- [187] Kuyama, H., Sonomura, K. and Nishimura, O. (2008). Sensitive detection of phosphopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: use of alkylphosphonic acids as matrix additives. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **22**: 1109-16.
- [188] Rupcic, J. and Maric, V. (1998). Isolation and chemical composition of the ceramide of the *Candida lipolytica* yeast. *Chem Phys Lipids*, **91**: 153-61.
- [189] Rupcic, J., Mesaric, M. and Maric, V. (1998). The influence of carbon source on the level and composition of ceramides of the *Candida lipolytica* yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, **50**: 583-8.
- [190] Karlsson, K.A. (1970). On the chemistry and occurrence of sphingolipid long-chain bases. *Chem Phys Lipids*, **5**: 6-43.
- [191] Brouwers, J.F., Smeenk, I.M., van Golde, L.M. and Tielens, A.G. (1997). The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, **88**: 175-85.
- [192] Gerdt, S., Lochnit, G., Dennis, R.D. and Geyer, R. (1997). Isolation and structural analysis of three neutral glycosphingolipids from a mixed population of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda:Rhabditida). *Glycobiology*, **7**: 265-75.
- [193] Lochnit, G., Dennis, R.D., Zahringer, U. and Geyer, R. (1997). Structural analysis of neutral glycosphingolipids from *Ascaris suum* adults (Nematoda:Ascaridida). *Glycoconj J*, **14**: 389-99.
- [194] Levery, S.B., Weiss, J.B., Salyan, M.E., Roberts, C.E., Hakomori, S., Magnani, J.L. and Strand, M. (1992). Characterization of a series of novel fucose-containing glycosphingolipid immunogens from eggs of *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem*, **267**: 5542-51.
- [195] Kannagi, R., Nudelman, E. and Hakomori, S. (1982). Possible role of ceramide in defining structure and function of membrane glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**: 3470-4.
- [196] Buschard, K., Blomqvist, M., Mansson, J.E., Fredman, P., Juhl, K. and Gromada, J. (2006). C16:0 sulfatide inhibits insulin secretion in rat  $\beta$ -cells by reducing the sensitivity of  $K_{ATP}$  channels to ATP inhibition. *Diabetes*, **55**: 2826-34.
- [197] Panasiewicz, M., Domek, H., Hoser, G., Fedoryszak, N., Kawalec, M. and Pacuszka, T. (2009). The ceramide structure of GM1 ganglioside differently affects its recovery in low-density membrane fractions prepared from HL-60 cells with or without triton-X100. *Cell Mol Biol Lett*, **14**: 175-89.
-

- [198] Panasiewicz, M., Domek, H., Hoser, G., Kawalec, M. and Pacuszka, T. (2003). Structure of the ceramide moiety of GM1 ganglioside determines its occurrence in different detergent-resistant membrane domains in HL-60 cells. *Biochemistry*, **42**: 6608-19.
- [199] Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J.C., Liu, Y., Peng, Q., Ramaraju, H., Sullards, M.C., Cabot, M. and Merrill, A.H., Jr. (2006). Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, **1758**: 1864-84.
- [200] Clegg, J.A., Smithers, S.R. and Terry, R.J. (1971). Acquisition of human antigens by *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *Nature*, **232**: 653-4.
- [201] Goldring, O.L., Clegg, J.A., Smithers, S.R. and Terry, R.J. (1976). Acquisition of human blood group antigens by *Schistosoma mansoni*. *Clin Exp Immunol*, **26**: 181-7.
- [202] Samuelsson, K. (1969). On the occurrence and nature of free ceramides in human plasma. *Biochim Biophys Acta*, **176**: 211-3.
- [203] Schweppe, C.H., Hoffmann, P., Nofer, J.R., Pohlentz, G., Mormann, M., Karch, H., Friedrich, A.W. and Muthing, J. (2010). Neutral glycosphingolipids in human blood: a precise mass spectrometry analysis with special reference to lipoprotein-associated Shiga toxin receptors. *J Lipid Res*, **51**: 2282-94.
- [204] Quehenberger, O., Armando, A.M., Brown, A.H., Milne, S.B., Myers, D.S., Merrill, A.H., Bandyopadhyay, S., Jones, K.N., Kelly, S., Shaner, R.L., Sullards, C.M., Wang, E., Murphy, R.C., Barkley, R.M., Leiker, T.J., Raetz, C.R., Guan, Z., Laird, G.M., Six, D.A., Russell, D.W., McDonald, J.G., Subramaniam, S., Fahy, E. and Dennis, E.A. (2010). Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res*, **51**: 3299-305.
- [205] Meyer, F., Meyer, H. and Bueding, E. (1970). Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. *Biochim Biophys Acta*, **210**: 257-66.
- [206] Brouwers, J.F., Gadella, B.M., van Golde, L.M. and Tielens, A.G. (1998). Quantitative analysis of phosphatidylcholine molecular species using HPLC and light scattering detection. *J Lipid Res*, **39**: 344-53.
- [207] Brouwers, J.F., Van Hellemond, J.J., van Golde, L.M. and Tielens, A.G. (1998). Ether lipids and their possible physiological function in adult *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, **96**: 49-58.
- [208] Brouwers, J.F., Versluis, C., van Golde, L.M. and Tielens, A.G. (1998). 5-Octadecenoic acid: evidence for a novel type of fatty acid modification in schistosomes. *Biochem J*, **334**: 315-9.
- [209] Allan, D., Payares, G. and Evans, W.H. (1987). The phospholipid and fatty acid composition of *Schistosoma mansoni* and of its purified tegumental membranes. *Mol Biochem Parasitol*, **23**: 123-8.
- [210] Maccioni, H.J., Quiroga, R. and Spessott, W. (2011). Organization of the synthesis of glycolipid oligosaccharides in the Golgi complex. *FEBS Lett*, **585**: 1691-8.
- [211] Stöver, A.G., da Silva Correia, J., Evans, J.T., Cluff, C.W., Elliott, M.W., Jeffery, E.W., Johnson, D.A., Lacy, M.J., Baldrige, J.R., Probst, P., Ulevitch, R.J., Persing, D.H. and Hershberg, R.M. (2004). Structure-activity relationship of synthetic toll-like receptor 4 agonists. *J Biol Chem*, **279**: 4440-9.
- [212] Huang, L.D., Lin, H.J., Huang, P.H., Hsiao, W.C., Reddy, L.V., Fu, S.L. and Lin, C.C. (2011). Synthesis of serine-based glycolipids as potential TLR4 activators. *Org Biomol Chem*, **9**: 2492-504.
- [213] van Stijn, C.M.W. (2009). Helminth glycans and their interaction with the immune system. Dissertation, Department of Molecular Cell Biology and Immunology, VU University Medical Center Amsterdam.
- [214] Caparros, E., Munoz, P., Sierra-Filardi, E., Serrano-Gomez, D., Puig-Kroger, A., Rodriguez-Fernandez, J.L., Mellado, M., Sancho, J., Zubiaur, M. and Corbi, A.L. (2006). DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood*, **107**: 3950-8.
- [215] Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D.T. and Triantafilou, K. (2002). Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci*, **115**: 2603-11.
- [216] Zajonc, D.M. and Kronenberg, M. (2009). Carbohydrate specificity of the recognition of diverse glycolipids by natural killer T cells. *Immunol Rev*, **230**: 188-200.

- [217] Wang, J., Li, Y., Kinjo, Y., Mac, T.T., Gibson, D., Painter, G.F., Kronenberg, M. and Zajonc, D.M. (2010). Lipid binding orientation within CD1d affects recognition of *Borrelia burgorferi* antigens by NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**: 1535-40.
- [218] Kanaya, T., Yagi, S., Schweizer, F., Takeda, T., Kiuchi, F. and Hada, N. (2010). Synthetic studies on glycosphingolipids from protostomia phyla: synthesis of glycosphingolipids from the parasite *Schistosoma mansoni*. *Chem Pharm Bull*, **58**: 811-7.
-

## 9 Anhang

### MS Analyse nativer GSL aus adulten Würmern I

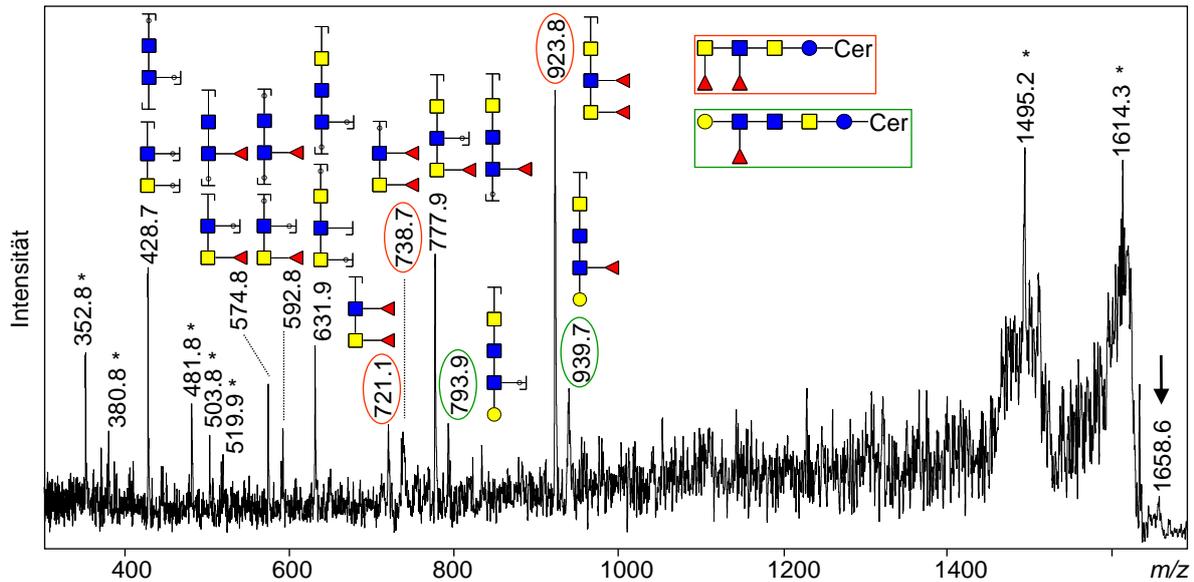


**Abbildung 36** MALDI-MS Analyse fraktionierter GSL aus adulten Würmern

Massenspektrometrische Untersuchung nativer GSL der Fraktionen 3 (**A**) und 4 (**B**). Die nativen GSL wurden als Pseudomolekülonen  $[M+Na]^+$  registriert. undefinierte Signale sind mit einem Stern gekennzeichnet (\*).

In Übereinstimmung mit beschriebenen Strukturen von GSL aus adulten Würmern, konnten CMH-Komponenten bei  $m/z$  740.5 und 756.6 detektiert werden, während Signale bei  $m/z$  925.7, 943.7 (bzw. 943.8) und 953.7 CDH-Spezies repräsentierten (Abbildung 36A und B) [62]. Aus massenspektrometrischen Untersuchungen von nativen GSL der folgenden Fraktionen (vgl. hierzu 4.3.2.2) konnte der Rückschluss gezogen werden, dass die in der Fraktion 4 detektierten Signale  $m/z$  1291.0 und 1319.1  $H_2N_2$ -tragende GSL repräsentierten, während entsprechende monofucosylierte Varianten, welche die Kohlenhydrat-Komponente  $F_1H_2N_2$  aufzeigten, bei  $m/z$  1437.1, 1453.1 sowie 1469.1 registriert wurden (Abbildung 36B).

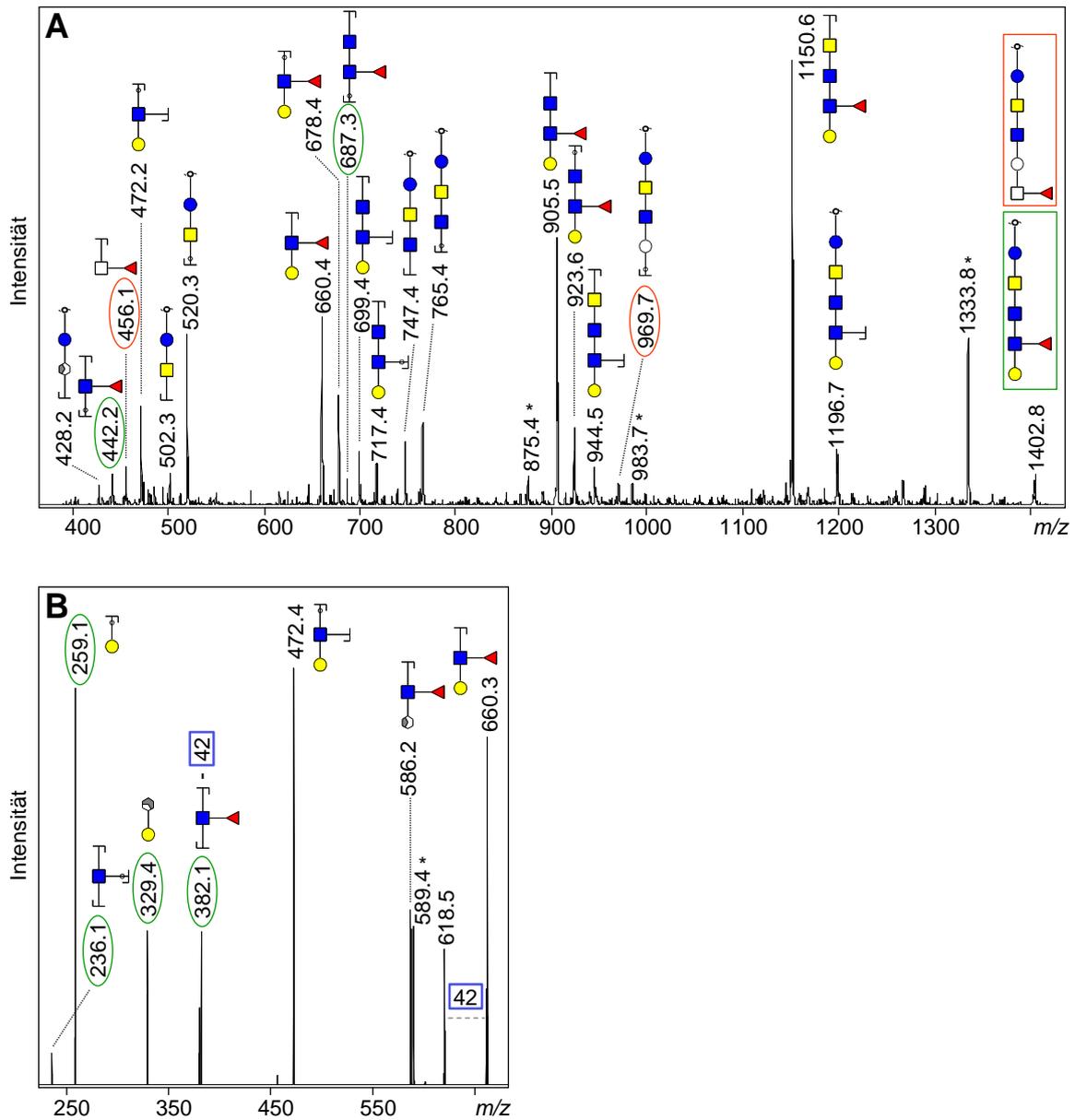
## MS Analyse nativer GSL aus adulten Würmern II



**Abbildung 37** MALDI-MS/MS Analyse der GSL-Komponente bei  $m/z$  1658.5

MALDI-MS/MS Spektrum der GSL-Komponente bei  $m/z$  1658.5 aus Fraktion 6 (Pfeil), welches dem Ceramid-Cluster der Kohlenhydrat-Zusammensetzung  $F_2H_1N_3$  zugeordnet wurde (vgl. hierzu Tabelle 12). Die registrierten Fragmentationen ( $[M+Na]^+$ ) wurden mittels GlycoWorkbench Software Tools [57] annotiert. Die für die GSL-Komponente mit einem Kohlenhydratanteil der Monosaccharid-Zusammensetzung  $F_2H_1N_3$  diagnostischen Signale sind rot markiert, wobei jeweils nur Fragmentationen des F-LDN-F tragenden Hauptisomers dargestellt sind. Grün markierte Signale sind als diagnostisch für die Präsenz einer hierzu isobaren GSL-Komponente zu werten, deren Kohlenhydratanteil die Monosaccharid-Zusammensetzung  $F_1H_2N_3$  ( $Le^X$ -Hexasaccharid) aufweist. Nicht-diagnostische Signale sind mit Fragmentationen beider Kohlenhydratstrukturen annotiert. Die dargestellten Strukturen sind jeweils beispielhaft für einen möglichen Fragmentierungspfad gewählt. undefinierte Signale sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose; Cer, Ceramid.

## MS Analyse derivatisierter Oligosaccharide aus adulten Würmern I



**Abbildung 38** ESI-MS<sup>n</sup> Analyse von F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>

Strukturelle Charakterisierung des reduzierten und permethylierten Oligosaccharids der Mono-saccharid-Zusammensetzung F<sub>1</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub> aus Fraktion 5. **(A)**, ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum des *precursors*  $m/z$  1402.8. **(B)**, ESI-MS<sup>3</sup> Spektrum des Kohlenhydratepitops bei  $m/z$  660.4 (1402.8→660.4). Die Abspaltung von Keten ( $\Delta m/z$  42) ist durch eine grau gestrichelte Linie illustriert. Die Annotation registrierter Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. Struktur und diagnostische Signale des Hauptisomers sind grün, die der Nebenkomponente orange markiert. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nicht-diagnostische Signale exemplarisch jeweils nur mit dem Fragment eines möglichen Fragmentierungspfades des Hauptisomers Le<sup>x</sup>-Hexasaccharid annotiert. undefinierte Signale sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Ein partiell schattierter Sechsering markiert einen Ringbruch entsprechender Monosaccharide. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; weißer Kreis, Hexose; weißes Quadrat, *N*-Acetylhexosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose.

MS Analyse derivatisierter Oligosaccharide aus adulten Würmern II

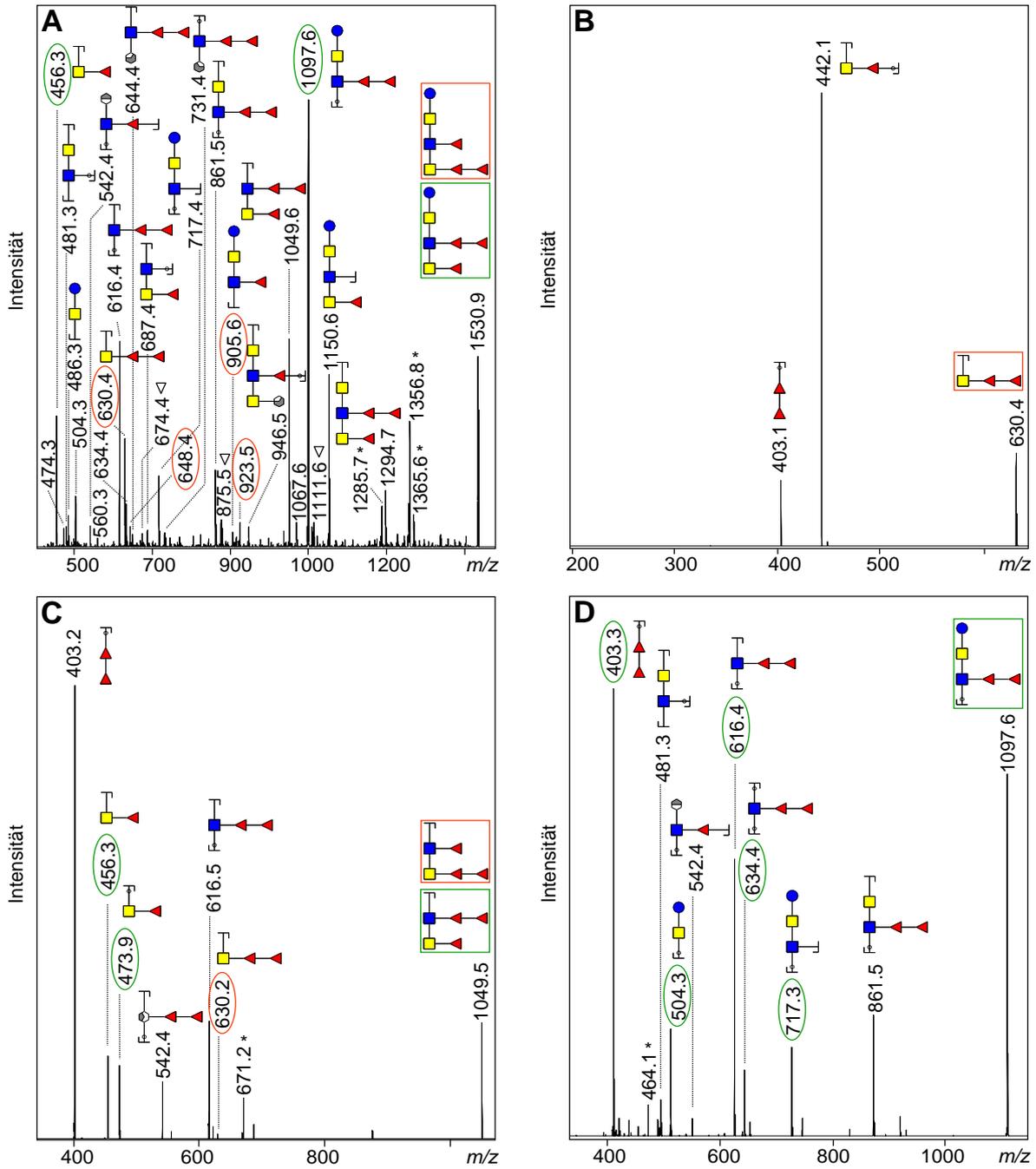
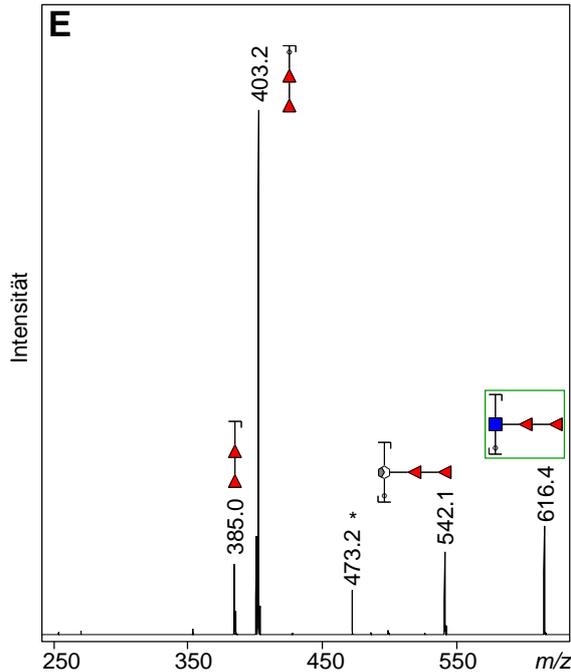


Abbildung 39 ESI-MS<sup>n</sup> Analyse von F<sub>3</sub>H<sub>1</sub>N<sub>3</sub>



**Abbildung 39** (Fortsetzung)

Strukturelle Charakterisierung des permethylierten Oligosaccharids der Monosaccharid-Zusammensetzung  $F_3H_1N_3$  aus Fraktion 6. **(A)**, ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum des *precursors*  $m/z$  1530.9. **(B)**, ESI-MS<sup>3</sup> Spektrum des  $B_3$ -Fragmentions bei  $m/z$  630.4 (1530.9→630.4). **(C)**, ESI-MS<sup>3</sup> Spektrum der B-Fragmentionen bei  $m/z$  1049.6 (1530.9→1049.6). **(D)**, ESI-MS<sup>3</sup> Spektrum des  $Y_{3\alpha}$ -Fragmentions bei  $m/z$  1097.6 (1530.9→1097.6). **(E)**, ESI-MS<sup>4</sup> Spektrum des  $B_3Y_{3\alpha}$ -Fragmentions bei  $m/z$  616.4 (1530.9→1097.6→616.4). Die Annotation der registrierten Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. Struktur und diagnostische Signale des Hauptisomers sind grün, die der Nebenkompente orange markiert. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nicht-diagnostische Signale exemplarisch mit dem entsprechenden Fragment des F-LDN-DF-tragenden Hauptisomers annotiert. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde in (A) auf die Darstellung der Piktogramme von C (bzw. auch Y)-Fragmentionen verzichtet, wenn bereits das zugehörige B (bzw. Z)-Fragmention abgebildet wurde (vgl. beispielsweise  $m/z$  630.4 / 648.4). Die dargestellten Strukturen sind jeweils beispielhaft für einen möglichen Fragmentierungspfad gewählt. Signale, welche als diagnostisch für eine Trifucosylierung des terminalen bzw. subterminalen *N*-Acetylhexosamins gewertet werden können, sind durch ein weißes Dreieck ( $\nabla$ ) markiert. Aufgrund der geringen Signalintensitäten können entsprechende Strukturen nicht sicher von Eizspezifischen GSL-Spezies abgegrenzt werden, so dass an dieser Stelle aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung entsprechender Piktogramme verzichtet wurde. undefinierte Signale sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Partiiell schattierte Sechsringe markieren Ringbrüche entsprechender Monosaccharide. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose.

MS Analyse derivatisierter Oligosaccharide aus adulten Würmern III

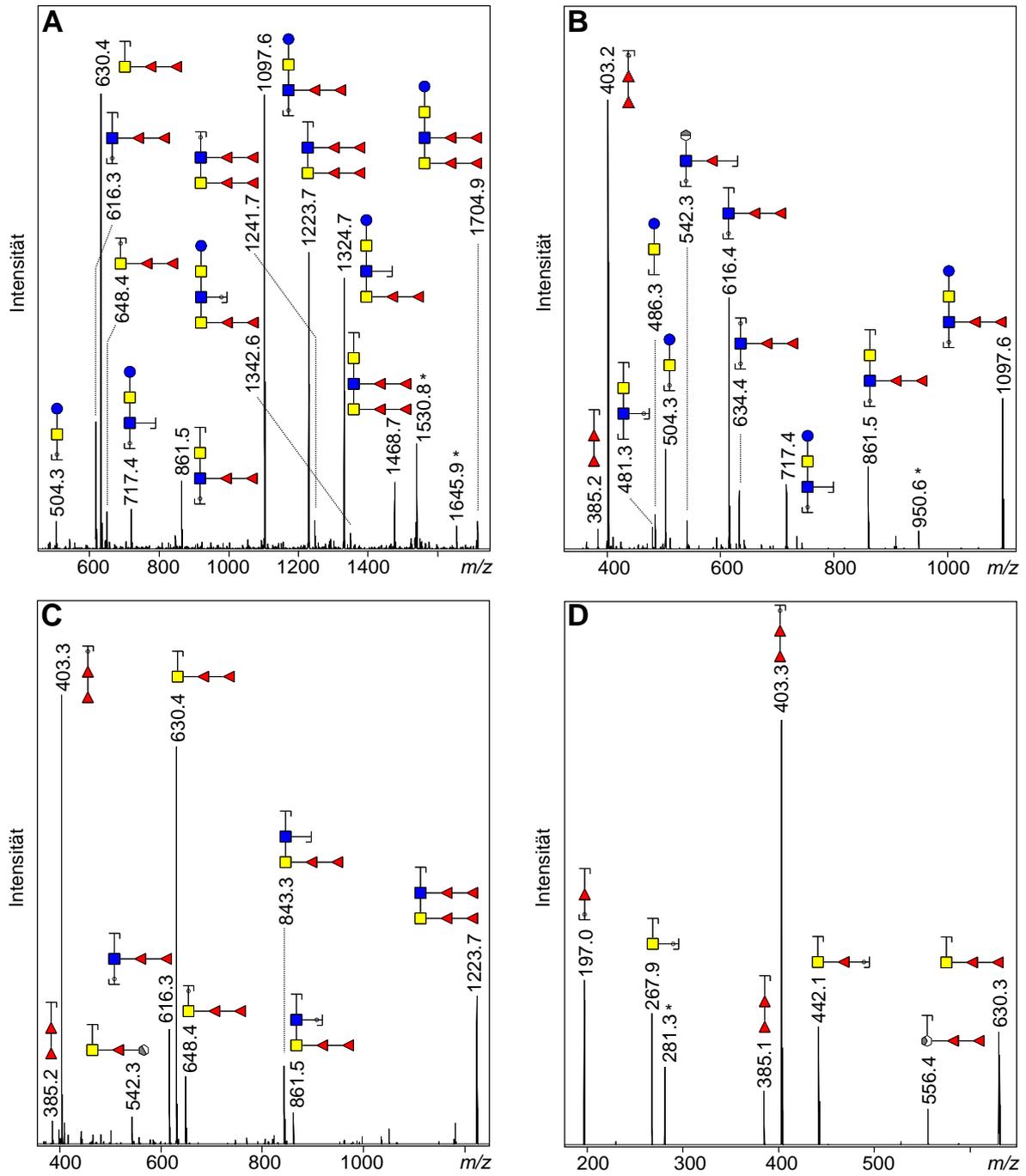
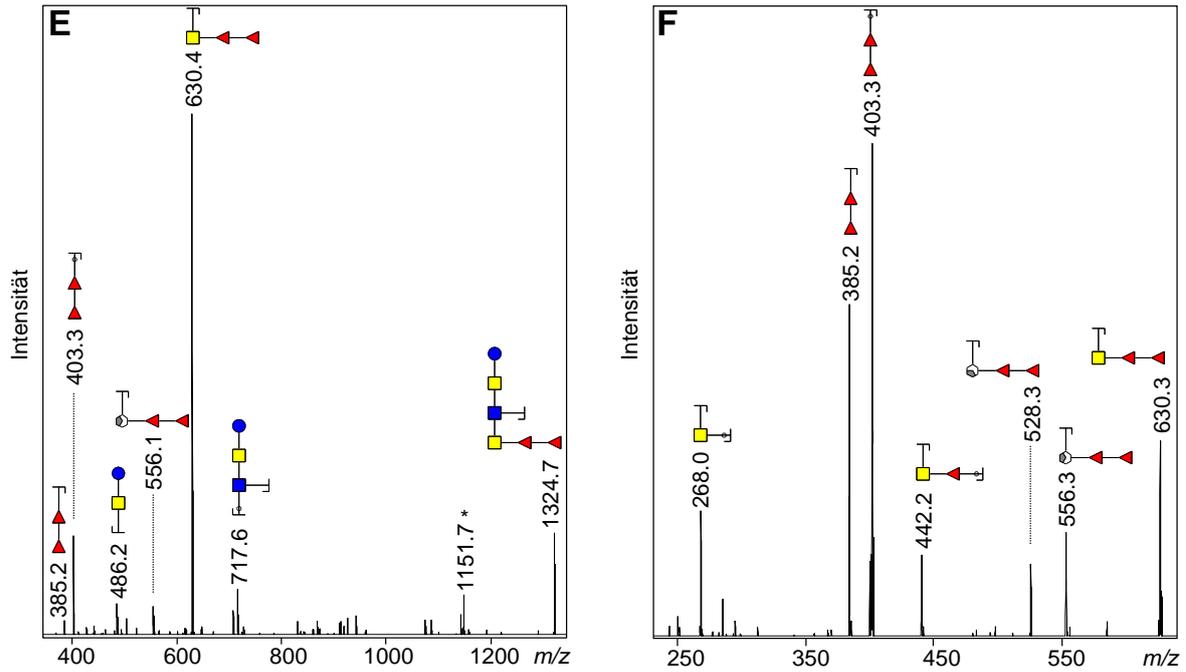


Abbildung 40 ESI-MS<sup>n</sup> Analyse von F<sub>4</sub>H<sub>1</sub>N<sub>3</sub>

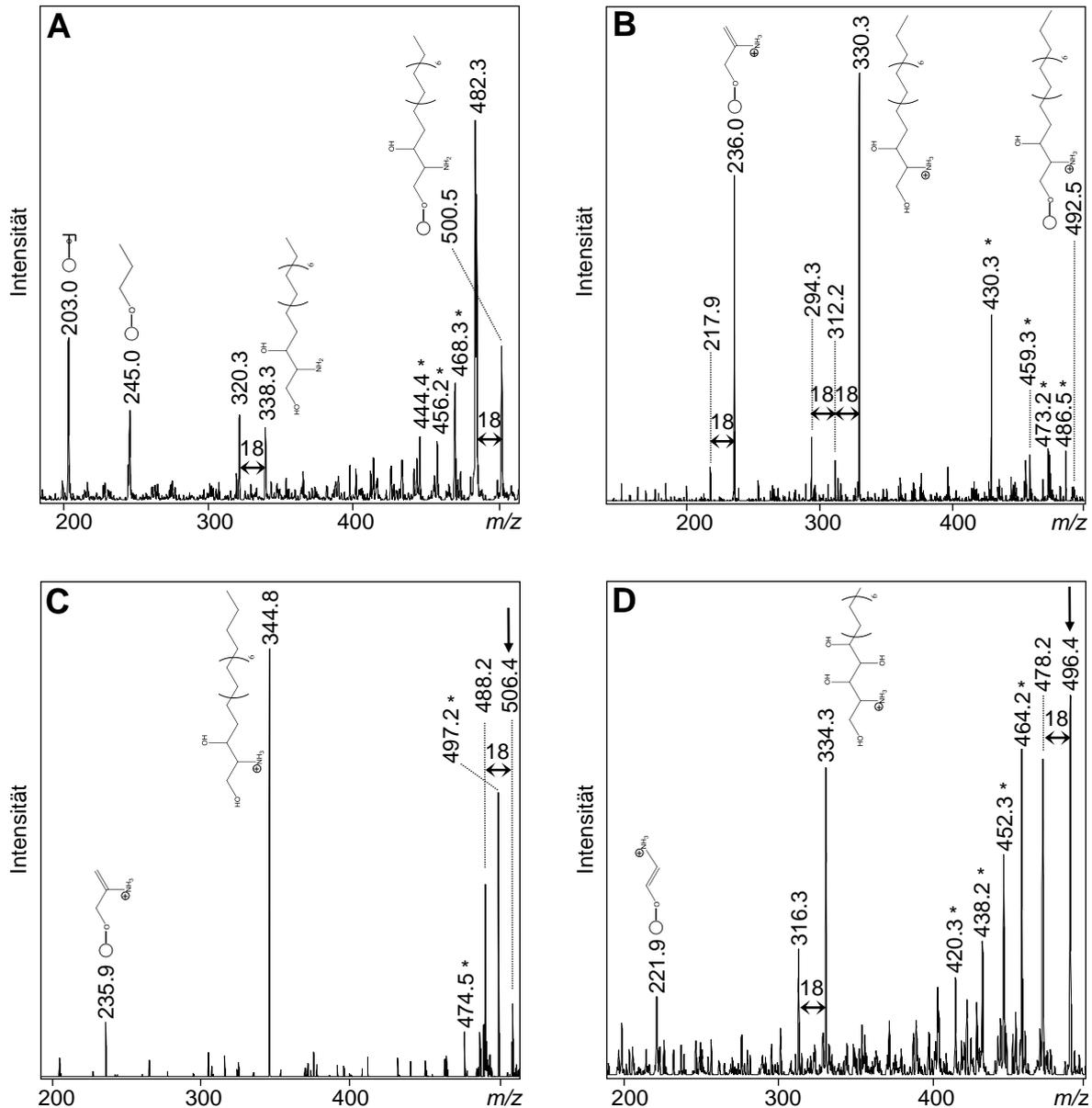


**Abbildung 40** (Fortsetzung)

Strukturelle Charakterisierung des permethylierten Oligosaccharids der Monosaccharid-Zusammensetzung  $F_4H_1N_3$  aus Fraktion 6. (A), ESI- $MS^2$  Spektrum des *precursors*  $m/z$  1704.9. (B), ESI- $MS^3$  Spektrum des  $Y_{3\alpha}$ -Fragmentions bei  $m/z$  1097.6 (1704.9 $\rightarrow$ 1097.6). (C), ESI- $MS^3$  Spektrum des  $B_4$ -Fragmentions bei  $m/z$  1223.7 (1704.9 $\rightarrow$ 1223.7). (D), ESI- $MS^4$  Spektrum des  $B_3$ -Fragmentions bei  $m/z$  630.4 (1704.9 $\rightarrow$ **1223.7** $\rightarrow$ **630.4**). (E), ESI- $MS^3$  Spektrum des  $Y_{3\beta}$ -Fragmentions bei  $m/z$  1324.7 (1704.9 $\rightarrow$ 1324.7). (F), ESI- $MS^4$  Spektrum des  $B_3$ -Fragmentions bei  $m/z$  630.4 (1704.9 $\rightarrow$ **1324.7** $\rightarrow$ **630.4**). Die Annotation der registrierten Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. undefinierte Signale sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Die dargestellten Strukturen sind jeweils beispielhaft für einen möglichen Fragmentierungspfad gewählt. Ein partiell schattierter Sechsring markiert einen Ringbruch entsprechender Monosaccharide. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose.

Es ist hierbei zu berücksichtigen, dass die weitere Fragmentierung des  $B_3$ -Fragmentions bei  $m/z$  630.4 in Abbildung 40D und F aus jeweils verschiedenen Vorläufer-Fragmentionen erfolgte. Hierbei zeigte der Vergleich beider Spektren deutlich, dass auch unterschiedliche Fragmentierungspfade schließlich in der Detektion eines sehr ähnlichen Fragmentierungsmusters resultieren. Dem Signal  $m/z$  528.3 (Abbildung 40F) kommt bei der Strukturanalyse von  $F_4H_1N_3$  besondere Bedeutung zu, da der zugrunde liegende Ringbruch, welcher zur Bildung des  $^{3,5}X_{GalNAc,3}$ -Fragmentions führte, die Fucosylierung des *N*-Acetylhexosamins in Position 3 bestätigte.

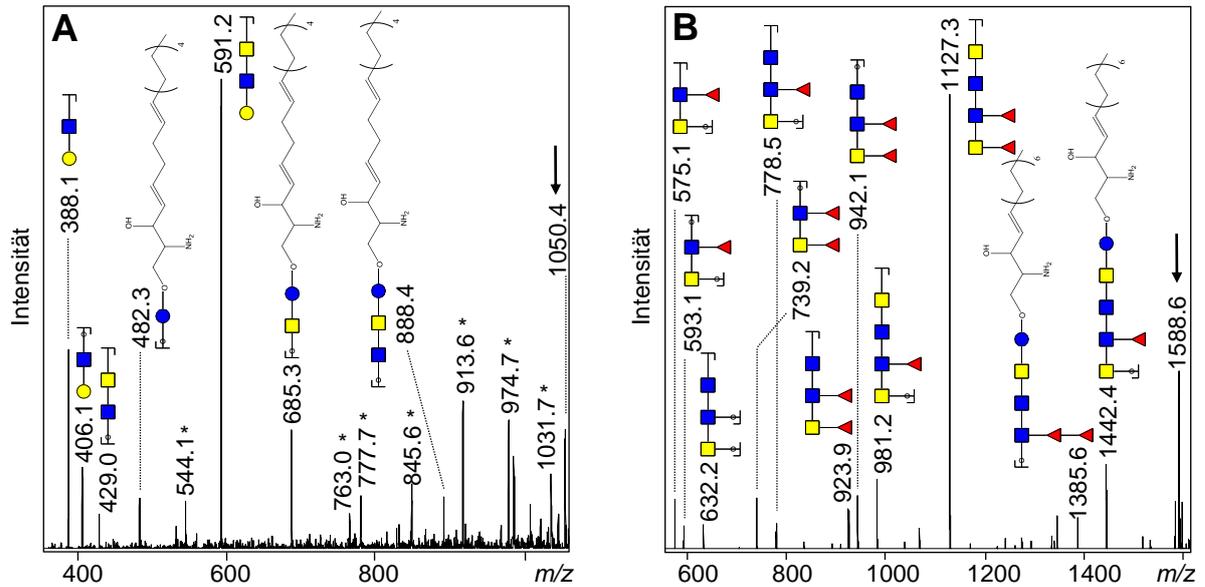
## MS Analyse der Lyso-Formen von CMH-Komponenten aus adulten Würmern



**Abbildung 41** ESI-MS<sup>2</sup> Analyse kleiner Lyso-GSL aus adulten Würmern

Massenspektrometrische Analyse der enzymatisch freigesetzten Lyso-GSL aus Fraktion 2 (vgl. Abbildung 29B). (A), ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von Hex-d19:0 bei m/z 500.5. (B), ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von Hex-d20:0 bei m/z 492.4. (C), ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von Hex-d21:0 bei m/z 506.3 (Pfeil). (D), ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von Hex-tetra18:0 bei m/z 496.4 (Pfeil). Da der analytische Ansatz die Lokalisierung von Hydroxylgruppen nicht erlaubte, ist die dargestellte Struktur tetra18:0 gemäß entsprechender Literaturangaben [188] exemplarisch gewählt. Die Annotation der registrierten Fragmentationen  $[M+Na]^+$  in (A) bzw.  $[M+H]^+$  in (B bis D) erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57], wobei die gezeigten Strukturen jeweils beispielhaft für einen möglichen Fragmentierungspfad gewählt sind. Wasserabspaltungen sind durch schwarze Doppelpfeile ( $\Delta m/z$  18) gekennzeichnet. undefinierte Signale sind mit einem Stern (\*) markiert. Weißer Kreis, Hexose.

## MS Analyse der Lyso-Formen komplexer GSL aus adulten Würmern



**Abbildung 42** ESI-MS<sup>2</sup> Analyse komplexer Lyso-GSL aus adulten Würmern

Massenspektrometrische Analyse enzymatisch freigesetzter Lyso-GSL aus den Fraktionen 5 und 7 (vgl. Abbildung 31 A und C). **(A)**, ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>-d18:2 bei  $m/z$  1050.6 (Pfeil; Fraktion 5). Da der analytische Ansatz die Lokalisierung von Doppelbindungen nicht erlaubte, ist die dargestellte Struktur d18:2<sup>4 trans,8 trans</sup> gemäß entsprechender Literaturangaben [190] exemplarisch gewählt. **(B)**, ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von F<sub>2</sub>H<sub>1</sub>N<sub>4</sub>-d18:1 bei  $m/z$  1588.7 (Pfeil; Fraktion 7). Die Annotation der registrierten Fragmentationen [M+Na]<sup>+</sup> erfolgte mittels GlycoWorkbench Software Tools [57]. Die gezeigten Strukturen sind beispielhaft für einen möglichen Fragmentierungspfad gewählt, wobei jeweils nur ein vorherrschendes Kohlenhydratisomer berücksichtigt wurde. undefinierte Signale sind durch einen Stern (\*) gekennzeichnet. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, N-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, N-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, N-Acetylhexosamin; F, Fucose.

Im Gegensatz zu den weiteren massenspektrometrischen Untersuchungen von Lyso-GSL aus Fraktion 7 (vgl. hierzu Abbildung 32 C und D), erlaubte die ESI-MS<sup>2</sup> Analyse von F<sub>2</sub>H<sub>1</sub>N<sub>4</sub>-d18:1 bei  $m/z$  1588.7 mit dem Signal  $m/z$  1385.6 die Detektion eines Fragmentations, welches nicht durch das F-LDN-F-tragende Strukturisomer, sondern überwiegend vom LDN-DF-exprimierenden Isomer generiert wurde (Abbildung 42B).

ESI-MS<sup>n</sup> Analyse der Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL aus adulten Würmern

Kohlenhydrat-Zusammensetzung	detektierte Masse (m/z)			berechnete Masse (m/z)	zugeordnetes Fragmentation
	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>	MS <sup>4</sup>		
H <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	486.2	486.2		486.2	
	520.2			520.3	
	731.3			731.4	
	259.1	259.0		259.1	
	268.2			268.1	
	329.2			329.2	
F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> / F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	520.3			520.3	
	660.4			660.3	
	259.1			259.1	
	472.2			472.2	
		241.1		241.1	
F <sub>1</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub>	442.2	442.2	442.2	442.2	
	456.2	456.2	456.2	456.2	
	687.4			687.3	

**Tabelle 17** Schematische Darstellung charakteristischer Fragmentationen der ESI-MS<sup>n</sup> Analyse von Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL aus adulten Würmern

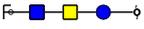
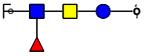
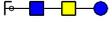
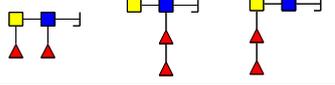
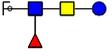
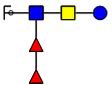
	765.4	765.4	
	939.6	939.5	
	946.5	946.5	
	701.4	701.3	
	250.0	250.1	
	282.1	282.1	
$F_2H_1N_3$	456.3 456.3	456.2	
	616.4 616.4	616.3	
	630.4 630.4	630.3	
	749.5	749.4	
	875.5	875.4	
	923.5	923.5	
	1097.6	1097.5	
	403.2	403.2	
	229.0	229.1	
	250.0	250.1	
	268.1	268.1	

Tabelle 17 (Fortsetzung)

$F_3H_1N_3$	442.1	442.2	
	456.3 456.3	456.2	
	630.4 630.2	630.3	
	923.5	923.5	
	1049.6	1049.5	
	1097.6	1097.5	
	403.1 403.2 403.2 403.3	403.2	
	616.5 616.4	616.3	
	504.3	504.2	
	385.0	385.2	
$F_4H_1N_3$	630.4 630.4 630.3	630.3	
	1097.6	1097.5	
	1223.7	1223.6	
	1324.7	1324.7	
	403.2 403.2 403.3	403.2	
	486.2	486.2	
	504.3	504.2	

Tabelle 17 (Fortsetzung)

	616.4	616.3	
	648.4	648.3	
	385.1	385.2	
	442.1 442.2	442.2	
$F_1H_1N_4$	442.3 442.2	442.2	
	456.2 456.1	456.2	
	701.4	701.3	
	994.5	994.5	
	1168.7	1168.6	
	268.1	268.1	
	282.1	282.1	
$F_2H_1N_4$	456.3 456.2	456.2	
	616.3 616.4	616.3	
	701.4	701.3	
	875.5	875.4	
	905.7	905.4	
	1168.6	1168.6	

Tabelle 17 (Fortsetzung)

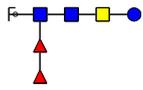
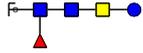
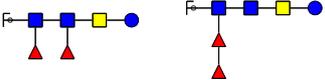
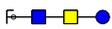
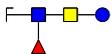
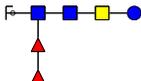
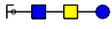
	1342.7	1342.7	
	403.1 403.2	403.2	
	442.0	442.2	
	495.3	495.2	
	634.0	634.3	
	749.1 749.6	749.4	
	229.0	229.1	
	250.1	250.1	
	268.1	268.1	
$F_3H_1N_4$	630.4 630.4	630.3	
	1067.6	1067.5	
	1168.7	1168.6	
	1342.9	1342.7	
	442.2	442.2	
	456.2	456.2	
	634.4	634.3	
	648.7	648.3	

Tabelle 17 (Fortsetzung)

	749.7	749.4	
	905.4	905.4	
	403.2	403.2	
F <sub>4</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub>	630.3	630.3	
	1342.8	1342.7	
	385.2	385.2	
	403.2	403.2	
	442.0	442.2	
	616.1	616.3	
	634.1	634.3	
	749.5	749.4	

**Tabelle 17** (Fortsetzung)

Die Fragmente wurden als Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) registriert und mittels GlycoWorkbench Software Tools [57] annotiert. Blauer Kreis, Glucose; blaues Quadrat, *N*-Acetylglucosamin; gelber Kreis, Galactose; gelbes Quadrat, *N*-Acetylgalactosamin; Dreieck, Fucose; H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose.

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei all jenen bedanken, die mich in der Zeit meines Promotionsvorhabens begleitet und unablässig unterstützt haben.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Rudolf Geyer, der mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante Forschungsprojekt zu bearbeiten, sowie meine Ergebnisse auf zahlreichen Kongressen präsentieren und schließlich veröffentlichen zu können. Ich möchte Dir meinen Dank aussprechen, dass Du an mich geglaubt hast, und in zahlreichen Gesprächen durch fortwährende Anregungen und Hilfestellungen stets kompetent und verlässlich ganz grundlegend zum Erfolg meiner Dissertation beigetragen hast. Die ausgeprägt gute Arbeitsatmosphäre in Deiner Arbeitsgruppe wird mir stets unvergesslich sein.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinem Vertreter am Fachbereich Veterinärmedizin, Prof. Dr. Christoph Grevelding, der mich bereits während meines Studiums für die Parasitologie begeistern konnte und somit meine berufliche Entwicklung maßgeblich geprägt hat. Du hast dein Vertrauen in mich gesetzt und mich offen in deine Arbeitsgruppe aufgenommen. Danke für die vielen anregenden Gespräche und die spannenden Kooperationsprojekte.

Prof. Dr. Irma van Die und Dr. Caroline M. van Stijn danke ich für die sehr angenehme und fruchtbare Kooperation; Dr. Michael J. Doenhoff, Dr. Quentin Bickle, Prof. Dr. André M. Deelder und Prof. Dr. Cornelis H. Hokke für die Bereitstellung von Probenmaterialien sowie Dr. Sandra Meyer für verschiedene GSL-Vorarbeiten und Dr. Tobias Lehr für die verlässliche und effiziente Zusammenarbeit im Bereich der Hämolymphe-Glykoproteine. Dr. Svenja Beckmann und Dr. Thomas Quack waren nicht zuletzt durch ihre freudige Diskussionsbereitschaft in vielen Kooperationsprojekten zuverlässige und gleichfalls kompetente Unterstützung.

Prof. Dr. Günter Lochnit sei Dank für die zahlreichen praktischen Tipps und inspirierenden Ideen rund um Glykolipide und MALDI-MS. Hille war nicht zuletzt wegen unserer gemeinsamen Bürozeiten jederzeit ansprechbar und konnte mir in fachlichen Belangen durch kompetente Ratschläge stets weiterhelfen. Darüber hinaus warst Du mir gleichfalls auf zwischenmenschlicher Ebene beigestanden - vielen Dank für die vertrauensvolle Zusammenarbeit mit Dir. Ebenfalls möchte ich Sebastian danken, der stets ein offenes Ohr nicht nur für analytische Schwierigkeiten hatte - Du warst mir immer ein wertvoller Ansprechpartner.

Meinen lieben Wegbegleitern in der alltäglichen Labor-Routine, Tina und Dennis, möchte ich für die stets unvergessene und schöne Zeit danken, die ich mit euch verbringen durfte. Nachdem wir jeden Tag aufs Neue berufliche und private Höhen und Tiefen miteinander erlebt und geteilt haben, macht es mich sehr glücklich, dass ich mich Euch in wahrer Freundschaft verbunden fühle.

---

Peter möchte ich für seine ausdauernde Hilfestellung bei der Fettsäureanalytik danken. Sigggi hat entscheidend dazu beigetragen, dass das ESI zu gewünschten Zeiten zuverlässig in Topform war und Werner hatte für jedes Laborproblemchen eine sofortige, maßgeschneiderte Lösung parat. Vielen Dank dafür, Ihr Lieben.

Christina, Jule, Kai, Sören, Peter, Olli, Nils, Ben, Moritz, Jan und Manka sei Dank für das gute Teamgefühl in unserer Arbeitsgruppe sowie hilfreiche Unterstützung in zahlreichen Gesprächen.

Christin, Silke, Steffen, Denis und Gabriele haben durch ihre offenherzige Art dazu beigetragen, dass ich mich immer auch als Teil ihrer Arbeitsgruppe gefühlt habe. Es war sehr schön, diese Zeit mit Euch teilen zu dürfen.

Caro, Denise und Nina haben mich aus mancher Frustration herausgeholt und die schönen Stunden noch schöner gemacht. Ihr habt mich unablässig motiviert und immer an mich geglaubt. Mit Euch habe ich viele unvergessliche Augenblicke geteilt. Danke, dass Ihr meine Freunde seid - Ihr seid die Besten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne deren beharrliche Unterstützung die Fertigstellung dieser Arbeit niemals möglich gewesen wäre. Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen, um Euch meinen tiefsten Dank dafür auszusprechen, dass Ihr mir unentwegt verlässlich zur Seite gestanden habt. Meinem Sohn Benedikt Paul möchte ich dafür danken, dass er meist verständnisvoll auf gemeinsame Stunden verzichtet hat, die ich im Labor oder am Schreibtisch verbracht habe. Deine Liebe hat mir die Kraft gegeben, diesen Weg beschreiten und schließlich meistern zu können. Du hast mein Leben um so vieles bereichert und warst mir unablässig mein größter Halt. Vielen Dank dafür, mein lieber Schatz.

---

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 oder unveröffentlichten 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.“



---

Sandra Frank

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Lebenzyklus von <i>S. mansoni</i> .....	5
Abbildung 2	Klassen von Sphingoidbasen der GSL aus <i>S. mansoni</i> .....	14
Abbildung 3	Kohlenhydratstruktur des zirkulierenden Glykokonjugates CCA .....	15
Abbildung 4	Gradient zur HPLC-basierten Monosaccharid-Analyse .....	29
Abbildung 5	Enzymatischer Verdau nativer GSL mit SCDase .....	33
Abbildung 6	Temperaturprogramme der GC-MS-gestützten Analyse von Fettsäuren .....	37
Abbildung 7	MALDI-MS Analyse eines GalCer-Standards aus bovinem Gehirn.....	38
Abbildung 8	Fragmentierungspfade von GalCer .....	39
Abbildung 9	MALDI-MS/MS Analyse der Hauptkomponenten von GalCer .....	40
Abbildung 10	MALDI-MS Kontrolle der Elutionsfraktionen E1 bis E3.....	42
Abbildung 11	MALDI-MS Kontrolle der Elutionsfraktionen E4 bis E7.....	43
Abbildung 12	Massenspektrometrische Untersuchung von Lyso-GalCer .....	44
Abbildung 13	MALDI-MS Analyse nativer GSL aus Cercarien .....	49
Abbildung 14	Massenspektrometrische Analyse kleiner Lyso-GSL aus Cercarien.....	51
Abbildung 15	Massenspektrometrische Analyse Le <sup>X</sup> -tragender Lyso-GSL aus Cercarien .....	53
Abbildung 16	Strukturvorschlag für Le <sup>X</sup> -Pentasaccharid-tragende GSL aus Cercarien.....	59
Abbildung 17	Schematische Darstellung der Aufarbeitung von Glykolipiden.....	60
Abbildung 18	HPTLC von (Glyko)- Lipiden aus adulten Würmern .....	61
Abbildung 19	<i>Workflow</i> zur Strukturanalyse der Kohlenhydrat-Komponenten von GSL.....	63
Abbildung 20	ELISA Experimente fraktionierter GSL aus adulten Würmern.....	64
Abbildung 21	MALDI-MS Analyse kleiner GSL aus adulten Würmern .....	66
Abbildung 22	MALDI-MS Analyse komplexer GSL aus adulten Würmern .....	67
Abbildung 23	MALDI-MS (/MS) Analyse nativer Oligosaccharide aus adulten Würmern ...	71
Abbildung 24	MALDI-MS/MS Analyse von permethyliertem F <sub>2</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub> .....	75
Abbildung 25	ESI-MS <sup>n</sup> Analyse von H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> .....	76
Abbildung 26	ESI-MS <sup>n</sup> Analyse von F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> .....	78
Abbildung 27	ESI-MS <sup>n</sup> Analyse von F <sub>1</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub> .....	81
Abbildung 28	ESI-MS <sup>n</sup> Analyse von F <sub>2</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub> .....	83
Abbildung 29	MALDI-MS Analyse kleiner Lyso-GSL aus adulten Würmern .....	89
Abbildung 30	ESI-MS <sup>2</sup> Analyse kleiner Lyso-GSL aus adulten Würmern .....	91
Abbildung 31	MALDI-MS Analyse komplexer Lyso-GSL aus adulten Würmern .....	93
Abbildung 32	ESI-MS <sup>2</sup> Analyse komplexer Lyso-GSL aus adulten Würmern .....	97

---

Abbildung 33	Strukturvorschlag für Le <sup>X</sup> -Pentasaccharid-tragende GSL aus adulten Würmern.....	98
Abbildung 34	Postulierter Biosyntheseweg für GSL aus adulten Würmern .....	113
Abbildung 35	Schematische Darstellung möglicher Interaktionswege schistosomaler GSL mit DC-SIGN und TLR4 .....	116
Abbildung 36	MALDI-MS Analyse fraktionierter GSL aus adulten Würmern.....	131
Abbildung 37	MALDI-MS/MS Analyse der GSL-Komponente bei <i>m/z</i> 1658.5 .....	132
Abbildung 38	ESI-MS <sup>n</sup> Analyse von F <sub>1</sub> H <sub>2</sub> N <sub>3</sub> .....	133
Abbildung 39	ESI-MS <sup>n</sup> Analyse von F <sub>3</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub> .....	134
Abbildung 40	ESI-MS <sup>n</sup> Analyse von F <sub>4</sub> H <sub>1</sub> N <sub>3</sub> .....	136
Abbildung 41	ESI-MS <sup>2</sup> Analyse kleiner Lyso-GSL aus adulten Würmern .....	138
Abbildung 42	ESI-MS <sup>2</sup> Analyse komplexer Lyso-GSL aus adulten Würmern.....	139

---

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Wichtige Kohlenhydratepitope der Glykokonjugate von <i>S. mansoni</i> .....	11
Tabelle 2	Kohlenhydratstrukturen von GSL aus <i>S. mansoni</i> .....	13
Tabelle 3	Verwendete monoklonale Antikörper und deren Spezifität.....	25
Tabelle 4	Gradient zur HPLC-basierten Monosaccharid-Analyse .....	29
Tabelle 5	Temperaturprogramme der GC-MS-gestützten Analyse von Fettsäuren.....	37
Tabelle 6	Fettsäureanalytik nach enzymatischem Verdau von GalCer.....	46
Tabelle 7	Strukturvorschläge zur Ceramid-Zusammensetzung von GalCer .....	47
Tabelle 8	Fettsäureanalytik nach enzymatischem Verdau der GSL aus Cercarien .....	56
Tabelle 9	Strukturvorschläge zur Ceramid-Zusammensetzung von CMH aus Cercarien .....	57
Tabelle 10	Strukturvorschläge zur Ceramid-Zusammensetzung Le <sup>X</sup> -Pentasaccharid- tragender GSL aus Cercarien .....	58
Tabelle 11	HPLC-basierte Monosaccharid-Analyse der fraktionierten GSL aus adulten Würmern .....	62
Tabelle 12	Monosaccharid-Zusammensetzungen komplexer GSL aus adulten Würmern .....	68
Tabelle 13	Fragmentionen von Strukturisomeren der Monosaccharid-Zusammen- setzung F <sub>2</sub> H <sub>1</sub> N <sub>4</sub> .....	73
Tabelle 14	Charakteristische Fragmentionen der ESI-MS <sup>n</sup> Analyse permethylierter Oligosaccharide aus adulten Würmern .....	86
Tabelle 15	Strukturvorschläge von Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL aus adulten Würmern .....	88
Tabelle 16	Strukturvorschläge zur Zusammensetzung komplexer Lyso-GSL aus adulten Würmern .....	94
Tabelle 17	Schematische Darstellung charakteristischer Fragmentionen in der ESI-MS <sup>n</sup> Analyse von Kohlenhydrat-Komponenten komplexer GSL aus adulten Würmern .....	145

---

## 12 Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Ascaris</i>
ACN	Acetonitril
ATT	6-Aza-2-Thiothymidin
BSA	bovines Serumalbumin
CAA	<i>circulating anodic antigen</i>
CCA	<i>circulating cathodic antigen</i>
CD	<i>cluster of determination</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CDH	Ceramiddihexosid
Cer	Ceramid
CID	<i>collision induced dissociation</i>
CLR	<i>C-type lectin receptor</i>
CMH	Ceramidmonohexosid
C:M(:W)	Chloroform:Methanol:Wasser
CTH	Ceramidtrihexosid
CTetH	Ceramidtetrahexosid
DC	<i>dendritic cell</i> - dendritische Zelle
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific, ICAM-3-grabbing nonintegrin</i>
DF-LDN	terminal difucosyliertes LDN
DF-LDN-DF	difucosyliertes LDN-DF
DF-LDN-F	fucosyliertes DF-LDN
DL	Durchlauf
E	Eluat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
ES Produkte	exkretierte/sekretierte Produkte
F	Fucose
F-LDN	terminal fucosyliertes LDN
F-LDN-DF	fucosyliertes LDN-DF
F-LDN-F	fucosyliertes LDN-F
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalCer	Galactosylceramid
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
Glucitol-PAA	Glucitol-Polyacrylamid
GSL	Glykosphingolipide
GSLs	<i>glycosphingolipids</i>
H.	<i>Helicobacter</i>
H	Hexose
Hex	Hexose
HexNAc	<i>N</i> -Acetylhexosamin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HPTLC	<i>high-performance thin layer chromatography</i>

---

ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IL	Interleukin
IPSE	<i>interleukin-4-inducing principle from S. mansoni eggs</i>
KCl	Kaliumchlorid
LDN	LacDiNAc; <i>N,N'</i> – Diacetyllactosediamin
LDN-DF	difucosyliertes LDN
LDN-F	fucosyliertes LDN
Le <sup>X</sup>	Lewis X
Le <sup>X</sup> -PAA	Le <sup>X</sup> -Polyacrylamid
LiCl	Lithiumchlorid
LID	<i>laser induced dissociation</i>
LM	Lösungsmittel
LN	LacNAc; <i>N</i> -Acetyllactosamin
LNFP III	Lacto- <i>N</i> -Fucopentaose III
LPS	Lipopolysaccharid
Lyso-CMH	Lyso-Ceramidmonohexosid
Lyso-GalCer	Lyso-Galactosylceramid
Lyso-GSL	Lyso-Glykosphingolipide
M	Molekülmasse
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
<i>m/z</i>	Masse/Ladung
N	<i>N</i> -Acetylhexosamin
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
n.d.	nicht detektiert
NP	<i>normal-phase</i>
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PC	Phosphorylcholin
PGC	<i>porous graphitic carbon</i>
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
polyLe <sup>X</sup>	polymeres Le <sup>X</sup>
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
pseudo-Le <sup>Y</sup>	pseudo-Lewis <sup>Y</sup>
rEGC II	rekombinante Endoglycoceramidase II
RP	<i>reversed-phase</i>
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Schistosoma</i>
SCDase	Sphingolipid-Ceramid- <i>N</i> -Deacylase
SEA	<i>soluble egg antigen</i>
Ser	Serin
SPE	<i>solid phase extraction</i> - Festphasen-Extraktion
Sph	Sphingoidbase
SSEA	<i>stage-specific embryonic antigens</i>
SV	Säulenvolumina
TBS	<i>tris-buffered saline</i>

---

TDC	Natriumtaurodeoxycholat
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMB	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrose-Faktor
TOF	<i>time-of-flight</i>
TUP	<i>theoretical upper phase</i>
v/v(v)	<i>volume/volume(/volume)</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
WW	Waschwasser

---