

**Isolierung, Lokalisation und Charakterisierung Phosphorylcholin-
modifizierter Proteine des Trematoden
Schistosoma mansoni.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
im Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
aus

Oliver Meub
Lich

Gießen

2007

Aus dem Biochemischen Institut
Des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Gutachter: Prof. Dr. R. Geyer

Gutachter: Frau Prof. Dr. R. Füssle

Tag der Disputation: 05.05.2008

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Angaben 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.“

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1 Die Schistosomiasis (Bilharziose).....	- 1 -
1.1.1 Krankheitsbild	- 1 -
1.1.2 Historie	- 3 -
1.1.3 Geographische Verbreitung.....	- 4 -
1.2. Der Parasit <i>Schistosoma mansoni</i>	- 5 -
1.2.1 Stellung des Parasiten <i>S. mansoni</i> innerhalb der Helminthen.....	- 5 -
1.2.2 Lebens- und Entwicklungszyklus des Parasiten <i>S. mansoni</i>	- 6 -
1.2.3 Anatomie der Schistosomen.....	- 8 -
1.3 Diagnose der Schistosomiasis	- 9 -
1.4. Therapie der Schistosomiasis	- 10 -
1.5 Phosphorylcholin als immunmodulatorischer Substituent.....	- 11 -
1.6 Le ^x und M2D3H-positive Antigenstrukturen bei <i>S. mansoni</i>	- 13 -
1.7 Aufgabenstellung	- 14 -
2. Materialien und Methoden	- 15 -
2.1 Verwendete Materialien	- 15 -
2.2 Proteinisolation.....	- 15 -
2.2.1 Proteinextraktion	- 15 -
2.2.2 Proteinbestimmung.....	- 16 -
2.3 SDS-Gelelektrophorese.....	- 16 -
2.3.1 Eindimensionale Gelelektrophorese.....	- 16 -
2.3.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese	- 18 -
2.3.2.1 Rehydratisierung	- 18 -
2.3.2.2 Isoelektrische Fokussierung (Erste Dimension).....	- 19 -
2.3.2.3 Elektrophorese (Zweite Dimension)	- 19 -
2.3.2.4 Proteinfärbung mit Coomassie	- 21 -
2.3.2.5 Proteinfärbung mit Silber	- 21 -
2.3.2.6 Stains-All – Färbung	- 22 -
2.3.3 Westernblot	- 23 -
2.3.4 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel	- 25 -
2.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	- 26 -
2.5 Immunhistochemische und Immunfluoreszierende Nachweisverfahren	- 26 -

2.5.1 Immunhistologie bei adulten <i>S. mansoni</i>	- 26 -
2.5.2 Immunhistologie bei <i>S. mansoni</i> Eiern	- 27 -
3. Ergebnisse	- 28 -
3.1 Identifizierung eines PC-modifizierten Proteins im Gesamtextrakt von <i>S. mansoni</i> - Adultwürmern	- 28 -
3.2 Proteinextraktion aus adulten <i>S. mansoni</i>	- 29 -
3.3 Eindimensionale Gelelektrophorese.....	- 31 -
3.3.1 Vergleichende Analyse verschiedener Entwicklungsstadien von <i>S. mansoni</i>	- 31 -
3.3.2 Spezifitätskontrolle des mAk-TEPC-15	- 32 -
3.3.3 Ausschluss einer Bindung des PC-Substituenten über ein N-Glycan mittels Behandlung des Westernblot mit PNGase F und PNGase A	- 33 -
3.4 Zweidimensionale SDS Gelelektrophorese.....	- 34 -
3.5 Proteolytischer in Gel Verdau von Proteinen.....	- 36 -
3.6 Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF-MS.....	- 36 -
3.7 Immunhistologische Untersuchungen an <i>S. mansoni</i> Adultwürmern und Eiern ...	- 45 -
3.7.1 Nachweis von Antigenen mit PC-Substituenten beim adulten Wurm	- 45 -
3.7.2 Le ^x mAk-Untersuchungen am adulten Wurm und Eiern von <i>S. mansoni</i>	- 48 -
3.7.3 Detektion von PC-positiven Strukturen und definierten Kohlenhydratepitopen in Eipräparaten von <i>S. mansoni</i>	- 49 -
4. Diskussion	- 53 -
4.1. Verbreitung von Antigenen mit Phosphocholin-Epitopen bei Helminthen	- 53 -
4.2. Methodische Aspekte zum Nachweis PC-substituierter Epitope bei <i>S. mansoni</i> ..	- 54 -
4.3 Immunmodulatorische Eigenschaften und stadienspezifische Expression von Proteinen mit PC-Epitopen.....	- 55 -
4.4 Immunhistologische Lokalisation von Kohlenhydrat-Epitopen in <i>S. mansoni</i>	- 56 -
5. Zusammenfassung	- 58 -
6. Summary	- 60 -
7. Literatur	- 61 -

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
A-Le ^x -Ak	Anti-Le ^x -Antikörper
AEC	3-Amino-9-ethylcarbamazol
AP	alkalische Phosphatase
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	(3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-propansulfate)
C:M:W	Chloroform/Methanol/Wasser
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GαR	Goat anti-Rabbit
HCCA	α-cyano-4-hydroxycinnamic acid
HF	Fluorwasserstoff (Flusssäure)
HPLC	high-performance liquid chromatography
IFT	Immunfluoreszenztest
kDa	Kilodalton
Le ^x	Lewis-X (Lacto-N-fuco-pentaose III)
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight
MS	Massenspektrometrie
p. a.	pro analysi
PBS	phosphate-buffered saline
p. i.	post infectionem
PNGase A	N-Glycosidase A
PNGase F	N-Glycosidase F
RT	Raumtemperatur
S.	Schistosoma
TBS	TRIS-HCl buffered saline
TBS-B	TBS mit 0.5% BSA
TTBS	TRIS-HCl buffered saline mit 0.05% Tween 20
TFA	Trifluoressigsäure

1. Einleitung

1.1 Die Schistosomiasis (Bilharziose)

Bei der Schistosomiasis (auch Bilharziose genannt, nach ihrem Entdecker Th. M. Bilharz, 1825-1862) handelt es sich um eine parasitäre Erkrankung, die durch Pärchenegel (Schistosomen) hervorgerufen wird und die sowohl beim Menschen als auch bei Tieren (z.B. durch *Schistosoma matthei* beim Rind [1]) anzutreffen ist. Die Infektion, von der weltweit etwa 200 Millionen Menschen [2] betroffen sind und die somit neben der Malaria die wichtigste und schwerste parasitäre Infektionskrankheit in tropischen und subtropischen Gebieten darstellt, führt, je nach Gattung, zu den unterschiedlichsten pathologischen Erscheinungen (siehe 1.1.1).

1.1.1 Krankheitsbild

Während ihrer Entwicklung bis zum Adultwurm durchlaufen die Schistosomen verschiedene Stadien (siehe Abb.1.3), die das Krankheitsbild der Schistosomiasis prägen. Für den Menschen infektiös ist die im Süßwasser, dessen Temperatur mindestens 25°C betragen muss, umherschwärmende Gabelschwanzcercarie (ca. 0,375-0,590 mm). Diese penetriert die durch das Wasser aufgeweichte Haut des Endwirtes (Mensch), wirft die äußere Glycokalix, die das Tegument umgibt, ab und verliert gleichzeitig ihren Schwanz [3]. An den Penetrationsstellen, in denen sich nun die Schistosomula befinden, tritt nach ca. 5-7 Stunden ein starker Juckreiz auf, und es bilden sich mehrere Millimeter messende, von einem Erythem umgebene Papeln oder Quaddeln aus [4]. Hierbei handelt es sich um die sog. Cercariendermatitis, die sich bei den humanpathogenen Arten nach 2-3 Tagen wieder zurückbildet. Die Schistosomula gelangen über den Lymph- bzw. Blutweg in die Lunge und erreichen von dort aus über den großen Kreislauf das Pfortadersystem, in dem sie schließlich zum Adultwurm heranreifen. Der endgültige Ansitzort unterscheidet sich von Art zu Art (siehe Tab. 1.1): *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* in den Mesenterialvenen und *Schistosoma haematobium* in den Blasenvenen. Ca. 5 Wochen *post infectionem* treten die ersten Eier im Stuhl bzw. im Urin auf. Verantwortlich für die klinische Symptomatik, die von Patient zu Patient stark variieren

Einleitung

kann, sind in erster Linie die Adultwürmer und die von ihnen produzierten Eier, deren Anzahl zwischen 200 bis 3000/Wurmpaar/Tag über bis zu 30 Jahre beträgt [3]. Waren die Erkrankten im Wasser einer großen Anzahl von Cercarien ausgesetzt, kommt es mit Beginn der Eiablage zu einer akuten, schweren Krankheitssymptomatik mit Fieber, Kopfschmerzen, generalisierten Schmerzen, Schwindel und Erbrechen. Die Eier gelangen dann mit dem Blutstrom in verschiedene Gewebe, z.B. in die Blasenwand (*S. haematobium*), in die Darmwand (*S. mansoni*, *S. japonicum*), in seltenen Fällen auch in die Lunge oder in das Gehirn. Je nach Lokalisation der Eier kommt es zu unterschiedlichen Krankheitserscheinungen, wie z.B. zu einer Hämaturie, Blasenentleerungsstörungen, mit nachfolgenden Sekundärinfektionen und gehäuften Auftreten von Blasenkarzinomen (*S. haematobium*). Bei Infektion mit *S. mansoni* oder *S. japonicum* kommt es zur sog. Darmbilharziose mit Symptomen wie Fieber und Kopfschmerzen, Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie, Eosinophilie sowie schleimig, blutiger Diarrhöe, im Wechsel mit Obstipation. Sekundär kommt es durch in die Leber abgeschwemmten Eier, die granulomatös abgekapselt werden, zu periportal Fibrosen mit nachfolgender portaler Hypertension, Aszites und Splenomegalie. Neben den Eiern verursachen auch Adultwürmer, sofern sie durch die Vena porta in die Leber eingeschwemmt werden, Organschädigungen, besonders nach Chemotherapie, wenn eine große Zahl absterbender Würmer simultan in die Leber gelangt. Erreichen die Eier andere Organe, z.B. die Lunge, führt dies zu obstruktiven Gefäßveränderungen mit daraus resultierendem Cor pulmonale. Insbesondere Infektionen mit *S. japonicum* verursachen eine cerebrale Symptomatik [1].

Einleitung

Art	Endwirt (Reservoir)	Zwischenwirt (nur Gattung)	Geographische Verbreitung
mansoni-Gruppe <i>S. mansoni</i> <i>S. rodhaini</i> <i>S. edwardiense</i>	Mensch, Nagetiere (Primaten) Nage-, Raubtiere (Mensch) Flusspferd	<i>Biomphalaria</i> <i>Biomphalaria</i> <i>Biomphalaria</i>	Afrika, östl. Südamerika, Karibik Afrika (Nigeria bis Zaire) Afrika (Uganda, Südafrika)
haematobium-Gruppe <i>S. haematobium</i> <i>S. intercalatum</i> <i>S. mathei</i> <i>S. bovis</i> <i>S. leiperi</i>	Mensch (Primaten) Mensch (Nagetiere) Paarhufer (Mensch) Huftiere (Mensch) Paarhufer	<i>Bulinus, Planorbarius</i> <i>Bulinus</i> <i>Bulinus</i> <i>Bulinus, Planorbarius</i> <i>Bulinus</i>	Afrika, Madagaskar, vord. Orient Zentral- u- Westafrika Südl. u. südöstl. Afrika Afrika, Mittelmeerländer, vord. Orient Südostafrika
indicum-Gruppe <i>S. indicum</i> <i>S. spindale</i> <i>S. nasale</i>	Paarhufer Wiederkäuer Mensch Paarhufer	<i>Indoplanorbis</i> <i>Indoplanorbis</i> <i>Indoplanorbis</i>	Indien Indien, Vietnam Indien, Sri Lanka, Bangladesch, Burma
japonicum- Gruppe <i>S. japonicum</i> <i>S. mekongi</i> <i>S. malayensis</i>	Mensch, Wasserbüffel u. ä. Säugetiere Hund, Mensch Nagetiere (Mensch)	<i>Oncomelania</i> <i>Neotricula</i> <i>Robertiella</i>	China, Japan, Taiwan, Philippinen Laos, Thailand, Kampuchea Malaysische Halbinsel

Tabelle 1.1: End- und Zwischenwirte der Gattung Schistosoma und ihre geographische Verbreitung

1.1.2 Historie

Die Symptomatik der Schistosomiasis, wie z.B. chronische Hämaturie (in einem Papyrus von ca. 1900 v. Chr. erwähnt) und Blasenleiden wurde bereits zu Zeiten der früheren Hochkulturen am unteren Nil und in Mesopotamien beschrieben. Auch wurden in zwei ägyptischen Mumien der zwanzigsten Dynastie (1250-1000 v. Chr.) verkalkte Eier von Schistosomen nachgewiesen. Ferner zeigten napoleonische Truppen während der Invasion Ägyptens 1799-1801 Symptome, die auf eine Schistosomiasis schließen lassen [5]. Endgültige Klärung, der bis dahin sogenannten ägyptischen Hämaturie [Pschyrembel Klinisches Wörterbuch: 258. neubearbeitete Auflage, Berlin: de Gruyter, 1998], brachte eine im Jahre 1851 von Theodor Bilharz (1825-1862) an einem Kairoer Krankenhaus durchgeführte Autopsie, bei der er den Trematoden *Schistosoma haematobium* in den Mesenterialvenen des Verstorbenen nachweisen konnte [6]. Im Jahre 1902 postulierte Manson die Existenz einer zweiten Schistosomenart (*S. mansoni*), was Leiper 1915 bestätigte. Als Erreger des Katayama-Fiebers wurde *S. japonicum* 1904 erstmals isoliert, 1923 wurde *S. calatum* und 1978 *S. mekongi* erstmals beschrieben [5].

1.1.3 Geographische Verbreitung



Abb. 1.1: Geographische Verbreitung humaner Schistosomiasis (<http://www.schisto.org/distribution.htm>)

Die Schistosomiasis kommt endemisch in 76 Entwicklungsländern vor und stellt somit die zweithäufigste parasitäre Erkrankung nach der Malaria dar. Etwa 200 Millionen Menschen sind weltweit infiziert, wovon 20 Millionen schwer erkrankt sind. Weitere 120 Millionen Betroffene zeigen Krankheitssymptome [2]. Die jährliche Anzahl der Todesfälle durch schistosomale Infektionen beläuft sich auf ca. 200.000. Man beobachtet auch, dass in manchen Endemiegebieten eine große Zahl von Kindern unter 14 Jahren infiziert ist. Im Gesamten besteht weltweit für 500-600 Millionen Menschen Infektionsgefahr [Fact Sheet N° 115, 1996 www.who.int/inf-fs/en/fact abgerufen am 28.06.06].

Wie man schon aus Tab. 1.1 und Abb. 1.1 entnehmen kann, sind die einzelnen Gattungen weltweit unterschiedlich verteilt. *S. mansoni*, der Erreger der intestinalen Schistosomiasis, kommt vorwiegend in 53 Ländern Afrikas, in der Karibik und in Südamerika vor. *S. japonicum*, Erreger der orientalischen oder asiatischen intestinalen Schistosomiasis, ist in sieben Ländern Südostasiens und in der westpazifischen Region beheimatet. Das Vorkommen von *S. calatum* beschränkt sich auf 10 zentralafrikanische Staaten. Die Endemiegebiete von *S. haematobium*, dem Erreger der urogenitalen Bilharziose, erstrecken sich über 54 afrikanische Staaten und über den östlichen mediterranen Raum [Fact Sheet N° 115, 1996 www.who.int/inf-fs/en/fact abgerufen am 28.06.06].

Maßnahmen zur Bekämpfung der Erkrankung sind regional höchst unterschiedlich erfolgreich, was u.a. auch von Eingriffen des Menschen in die Umwelt abhängt. In der

Karibik ist die Kontrolle der Schistosomiasis relativ erfolgreich, wohingegen die Anzahl der Infektionen in Gebieten, in denen beispielsweise Staudämme angelegt wurden (Assuan-Staudamm; Diama-Damm im Senegal) drastisch anstieg.

1.2. Der Parasit *Schistosoma mansoni*

1.2.1 Stellung des Parasiten *S. mansoni* innerhalb der Helminthen

Innerhalb der Trematoden gehören Schistosomen zu den *Digenea* und sind getrenntgeschlechtliche Würmer, welche in Dauerkopulation (siehe Abb. 1.2) in unterschiedlichen Partien des Venensystems ihres Endwirtes überleben. Alle 12 Gattungen der *Schistosomatidae* kommen parasitär im venösen System von Vertebraten vor. Sieben haben Vögel als Hauptwirte, die fünf übrigen befallen Säuger. Insgesamt gibt es über 85 verschiedene Schistosomenarten. Alle humanpathogenen Schistosomen gehören der Gattung *Schistosoma* an, die 18 Arten umfasst [7]. Diese werden wiederum je nach Morphologie der Eier und nach der Verwandtschaft der Endwirte, in vier Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 1). Die bedeutendsten humanpathogenen Arten sind, neben den anderen in Tabelle 1 aufgeführten, ebenfalls den Menschen befallenden Schistosomen, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* und *S. intercalatum*. Außer den säugerpathogenen Arten sind auch die Cercarien diverser Vogelschistosomen der Gattung *Trichobilharzia*, *Gigantobilharzia* und *Ornithobilharzia* in der Lage, die menschliche Haut zu penetrieren und eine sogenannte Cercariendermatitis (oder auch "swimmers itch") hervorzurufen (siehe 1.1.1)

Einleitung



Abb. 1.2: Männliche u. weibliche Schistosomen in Dauerkopulation.
(<http://biology.unm.edu/biology/esloker/grants/schisto.html>)

1.2.2 Lebens- und Entwicklungszyklus des Parasiten *S. mansoni*

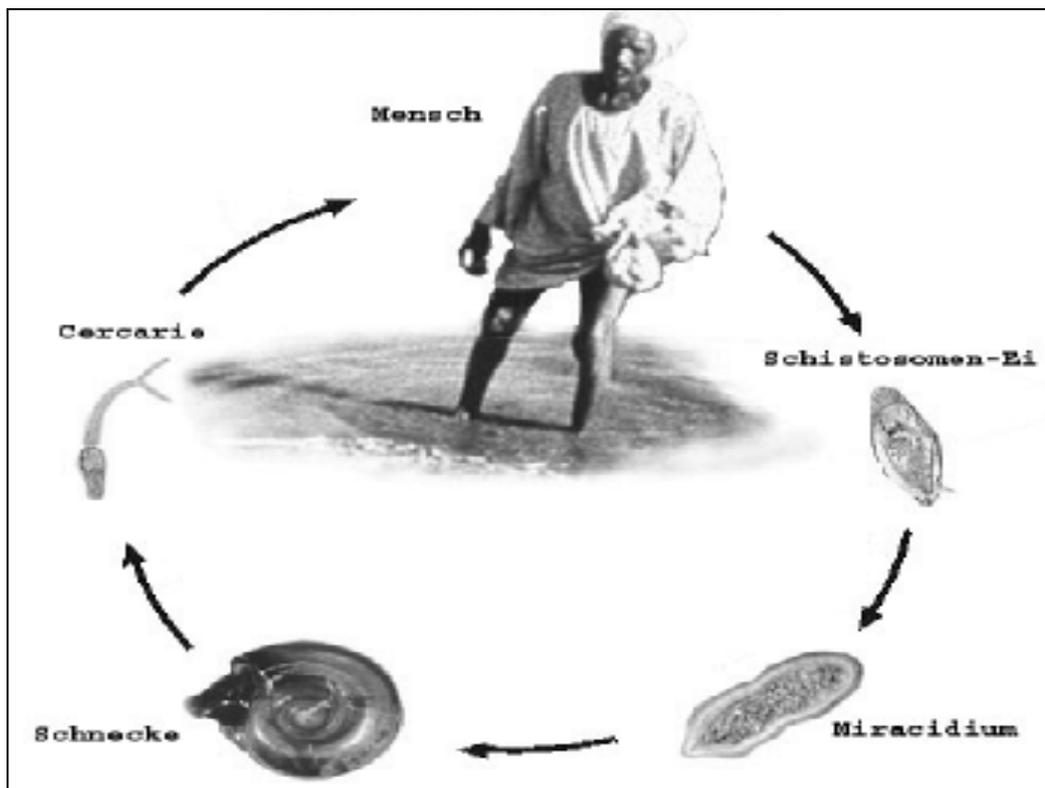


Abb. 1.3: Lebenszyklus von *S. mansoni* (<http://www.uni-erlangen.de/parasit/contents/research/schisto.html>)

Wie aus Abbildung 1.3 ersichtlich, durchlaufen Schistosomen einen komplexen Lebenszyklus. Der Endwirt infiziert sich im Süßwasser mit der frei umherschwimmenden

Einleitung

Cercarie. Sie bohrt sich an Haarfollikeln oder in Hautfalten in vom Wasser aufgeweichte Hautpartien, z.B. des Menschen, ein. Während dieses Vorganges wird der Schwanz und die äußere fibrilläre Glycocalix, die das Tegument umgibt, abgeworfen [1]. Das so entstandene sogenannte Schistosomulum durchwandert innerhalb von ca. drei Tagen die Haut, bis es das Lumen einer Vene oder eines Lymphgefäßes erreicht. Über diesen Weg gelangen die Schistosomula in die Lunge. Dort verweilen die Schistosomula eine gewisse Zeit und wachsen in die Länge. Schließlich werden die Parasiten über das linke Herz und den arteriellen Kreislauf bis in die Portalvene geschwemmt. Hier nehmen die bereits adulten Männchen die etwas später eintreffenden Weibchen in ihre Bauchfalte auf, in der diese wiederum zur Geschlechtsreife gelangen. Die Überlebenszeit der Würmer im Endwirt liegt zwischen 2-5 Jahren, vereinzelt wurden aber auch 20-30 Jahre beobachtet. Vier bis fünf Wochen nach der Infektion beginnen die Weibchen mit der Eiablage. Die von den Schistosomen produzierten Eier, je nach Art bis zu 3000 pro Wurm-paar und Tag, durchbohren mit ihrem Stachel die Blasen- bzw. die Darmwand und werden so über den Urin bzw. mit dem Stuhl ausgeschieden. Bei schweren *S. mansoni* Infektionen wurden bei den Infizierten mehrere tausend Wurm-pärchen gefunden und pro Gramm Stuhlprobe bis zu 1000 Eier diagnostiziert [8]. Kommen die Eier mit Süßwasser in Kontakt schlüpfen aus ihnen die begeißelten Miracidien, die dann ihren Zwischenwirt, eine Süßwasserschnecke, infizieren [9-11]. In der Schnecke, im Falle von *S. mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, eine Wasserlungenschnecke aus der Familie der Planorbidae, findet nun die Transformation der Miracidien zunächst in Sporozysten und dann zu Tochttersporozysten statt. In diesem Stadium kommt es zu einer ungeschlechtlichen Vermehrung der Tochttersporozysten im Wirtsorganismus. Bei entsprechendem Wärme- und Lichtreiz kommt es nach etwa drei bis sieben Wochen zum Austritt hunderter reifer Cercarien aus der Schnecke in das Süßwasser, und der Entwicklungszyklus kann von neuem beginnen.

1.2.3 Anatomie der Schistosomen

Die adulten *S. mansoni* Männchen sind 6-28 mm lang und ihr Durchmesser beträgt zwischen 0,25-1 mm. Während das Tegument der *S. mansoni* und *S. haematobium* mit Tuberkeln besetzt ist, ist die Oberfläche des *S. japonicum* Männchens und die aller weiblichen Schistosomen glatt. Adulte *S. mansoni* verfügen über einen oralen Saugnapf, der sich in das Verdauungssystem öffnet und über einen ventralen Saugnapf, mit welchem sich der Wurm an der Blutgefäßwand anheftet. Das Männchen verfügt an seiner Ventralseite über den gynäkophoren Kanal, in dem sich das Weibchen befindet. Das Verdauungssystem der Schistosomen besteht aus einem kurzen Ösophagus, an den sich der Darmtrakt anschließt. Der Darm teilt sich noch vor dem ventralen Saugnapf in zwei Anteile, welche sich hinter den Gonaden wieder zu einem unpaaren Rohr vereinigen. Im Darmlumen findet die Verdauung der aufgenommenen Stoffe hauptsächlich durch Proteasen statt. Das Exkretionssystem besteht aus sog. Flammzellen, aus Sammelkanälen, einer Blase und einer Öffnung nach außen [12]. Das Nervensystem folgt dem bei Trematoden üblichen Bausystem. Am Ösophagus liegt ein Ganglienpaar, welche durch eine dorsale Kommissur verbunden ist. Von jedem der Ganglien gehen je ein dorsaler und ein ventraler Hauptnerv in anteriorer und posteriorer Richtung ab. Beim Männchen liegen hinter dem Bauchsaugnapf 6-9 Testes, die aus einer Menge eng aneinander gedrängten Bläschen bestehen und über ein *vas deferens* in einen Samenbehälter münden. Im Ovar des Weibchens finden sich kleine Oogonien am anterioren Ende. Während ihrer Reifung zu Oozyten wandern sie über das posteriore Ende in den Eileiter, der sich zu einem Samenspeichergefäß erweitert. Der Eileiter umrundet das Ovar zur Hälfte bis zur Mehlisschen Drüse und vereinigt sich mit dem Dottergang. Nach der Vereinigung von Dottergang und Ovidukt lagern sich im Ootyp die Nährzellen zusammen mit Sekreten der Mehlisschen-Drüse an die befruchteten Eizellen. Die Embryonalzellen teilen sich und bilden die im Ei enthaltenen Miracidien. Die Eier gelangen schließlich über den Uterus nach außen. Anzahl und Gestalt der Eier variieren innerhalb der Schistosomenarten (*mansoni*-Gruppe mit Seitenstachel und 100 bis 800 Eier/Tag; *japonicum*-Gruppe mit verkümmertem Seitenstachel und 500 bis 3500 Eier/Tag) [5]. Näheres siehe Abbildung 1.4.

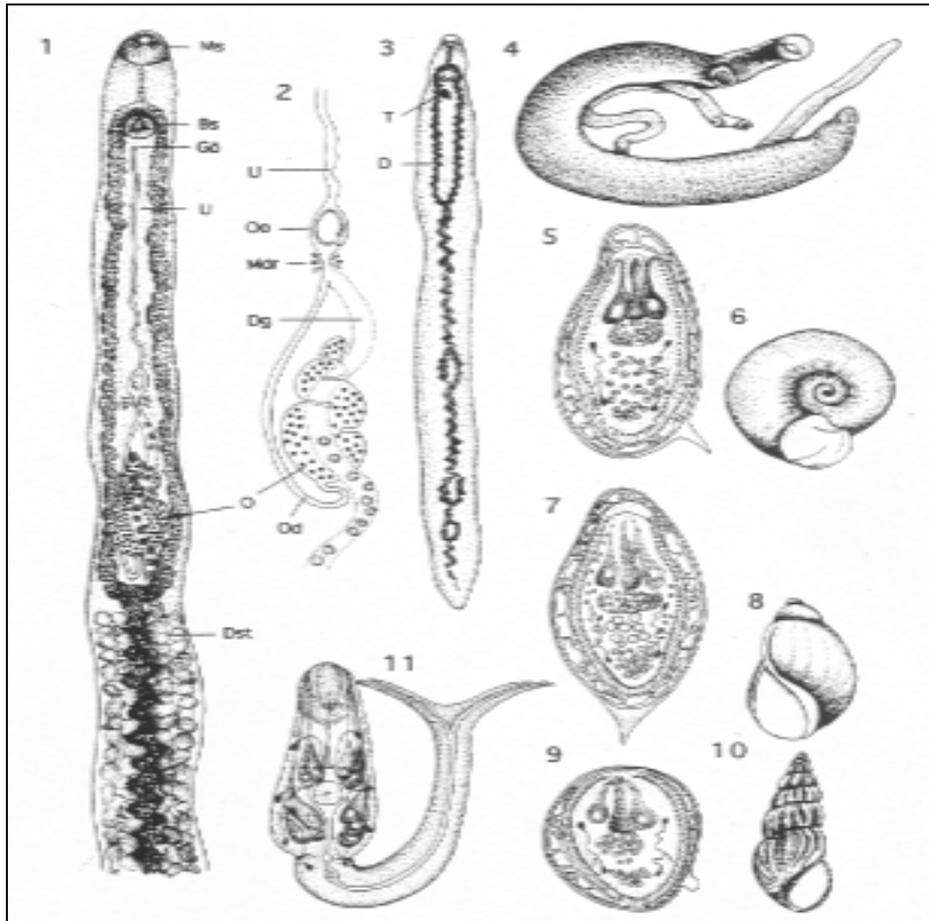


Abbildung 1.4: Anatomie der Schistosomen [1]

1-4: *S. mansoni*. 1, Vorderende des adulten Weibchens. 2, Geschlechtsorgane des Weibchens. 3, Adultes Männchen. 4, Pärchen in Dauerkopula. 5, 6, *S. mansoni* Ei mit Zwischenwirt *Biomphalaria glabrata*. 7,8 *S. haematobium*. mit Zwischenwirt *Bulinus truncatus*, 9, 10 *S. japonicum*. mit Zwischenwirt *Oncomelania hupensis*, 11 Cercarie von *S. mansoni*

1.3 Diagnose der Schistosomiasis

Aufgrund der verschiedenen Manifestationen der Schistosomiasis kommt es zu unterschiedlichsten unspezifischen Symptomatiken, was leicht zu einer Fehldiagnose führen kann, wodurch die Erkrankung lange unerkannt bleiben kann. Die Methode der Wahl ist der direkte Erregernachweis durch den mikroskopischen Nachweis von Wurmeiern im Stuhl, bzw. im Urin, möglichst nach einer Anreicherung. Um die Diagnose zu sichern, sollten die Stuhl- oder Urinuntersuchungen wiederholt werden, da die Eiproduktion der Schistosomen starken Schwankungen unterliegen kann. Bei schwachen Infektionen (z.B. nach kurzfristiger Exposition bei Tropenreisenden) oder während der Präpatenzzeit (ab zwei bis drei Wochen nach Infektion) kann eine Verdachtsdiagnose durch eine Serodiagnostik erhärtet werden. Für die Serologie wird neben ELISA Methoden (enzyme-linked immuno sorbent essay) mit

Einleitung

Adultwurm- oder Eiantigenen, der Immunfluoreszenztest (IFAT) mit Cercarien oder Gefrierschnitten adulter Würmer als Antigenen eingesetzt. Für Kontrollen nach Behandlung der Schistosomiasis eignen sich serologische Methoden nicht, da die gebildeten Antikörper über viele Jahre hinweg persistieren. Auch die bis heute entwickelten Antigen-Nachweismethoden haben eine nur ungenügende Sensitivität

[http://www.infektionsbiologie.ch/seiten/modellparasiten/schistosoma/steckbrief_schisto.html#parasit, abgerufen am 14.10.2006].

1.4. Therapie der Schistosomiasis

Neben unspezifischen Maßnahmen zur Reduktion des Zwischenwirtes *Biomphalaria glabrata* z.B. durch den Einsatz von Mollusciziden wie Niclosamid standen lange Zeit präventive Maßnahmen zur Infektionsverhütung im Vordergrund. Kommt es jedoch trotzdem zu einer Infektion mit Schistosomen, so steht die Anwendung eines Chemotherapeutikums im Vordergrund. Die weitaus größte Rolle spielt hierbei das Praziquantel, welches z.B. unter den Handelsnamen Cesol® oder Biltricide® erhältlich ist.

Praziquantel eignet sich zur Therapie aller Stadien der Schistosomiasis, sowie zur Massenbehandlung im Rahmen von Anti-Bilharzioseprogrammen. Ein weiterer Vorteil dieses Medikamentes liegt darin, dass es gegen verschiedene Schistosomengattungen wirksam ist, sofern die Dosierung der jeweiligen Gattung angepasst wird. Bei einer Infektion mit *S. mansoni* hat sich beispielsweise eine einmalige Gabe von 2 x 40mg/kg Körpergewicht als therapeutisch durchaus ausreichend dargestellt. Der Wirkmechanismus scheint auf einem erhöhten Calciumeinstrom durch das Tegument der Schistosomen zu beruhen [13, 14]. *In vitro* führt dies zu einer Muskelkontraktion der Schistosomen. Für die Abtötung der Parasiten ist weiterhin das Zusammenwirken des Chemotherapeutikums mit den humoralen Abwehrmechanismen des Immunsystems von entscheidender Bedeutung [15-18]. Aus diesem Grund könnte eine zusätzliche Immunisierung einen synergistischen Effekt herbeiführen. Durch diese Therapie wird möglicherweise ebenfalls die Oberflächenstruktur der Schistosomen dahingehend verändert, dass eine größere Anzahl parasitenspezifischer Antigene auf dem Tegument präsentiert werden. Aufgrund des seltenen Auftretens von Resistenzen gegen Praziquantel werden andere alternative Substanzen zur Behandlung einer Schistosomiasis kaum eingesetzt. Optional stehen hierfür Präparate wie Oxaminaiquin oder Metrifonat zur Verfügung.

Einleitung

Zu den häufigsten Nebenwirkungen der im Grund gut verträglichen anthelmintischen Therapie mit Praziquantel gehören Oberbauchschmerzen, Nausea und Diarrhöen, welche auf das Zugrundegehen der Würmer zurückgeführt werden.

Zwar weist die Therapie mit Anthelmintika wie Praziquantel gute Erfolge auf, sie ist jedoch nicht in der Lage, eine Reinfektion zu verhindern. Auch fehlt eine postinfektiöse Immunität gegenüber dem Parasiten nach einer durchlebten Schistosomiasis.

Die derzeit immer noch einzig wirksame Möglichkeit besteht in der Expositionsprophylaxe, d.h. dem Vermeiden jeglichen Kontaktes mit Cercarien kontaminierten Süßwassers, was mit der Bevölkerung in endemischen Gebieten jedoch kaum zu verwirklichen ist.

Auch verschiedene Versuche der Vakzinierung, z.B. mit attenuierten Cercarien [19], mit auf DNA basierenden Wirkstoffen [20] oder dem Hämocyanin des Zwischenwirtes [21, 22] brachten trotz Teilerfolgen noch keinen für den Menschen verwendungsfähigen Impfstoff hervor.

1.5 Phosphorylcholin als immunmodulatorischer Substituent

Phosphorylcholin (PC) wurde erstmals im Jahre 1967 im grampositiven Bakterium *Streptococcus pneumoniae* entdeckt [23]. Seither folgten weitere Arbeiten über das Vorhandensein von PC in gramnegativen Bakterien und bei einer grossen Zahl pathogener Parasiten wie Protozoen, Filarien, gastrointestinalen Nematoden [24-31] und, wie in dieser Arbeit beschrieben, im Trematoden *Schistosoma mansoni*. Man vermutet, dass dieses kleine Molekül, gebunden an Glykoproteine und Glykolipide, für eine grosse Zahl immunologischer/immunmodulatorischer Vorgänge im Verlauf einer Infektion und der zum Teil lang anhaltenden Persistenz der Parasiten im Wirtsorganismus verantwortlich ist.

Studien zu Lokalisation von PC-tragenden Antigenen in Lungenlarven von *A. suum* zeigten Vorkommen auf der Oberfläche der Kutikula, wohingegen in Kryoschnitten adulter *A. suum* Weibchen in allen drei Schichten der Kutikula PC nachgewiesen werden konnte [32]. Des Weiteren fand man PC durch Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern in den Ovarien, dem Uterus und den Eiern der *A. suum* Weibchen [32]. Nach Behandlung der Kryoschnitte mit organischen Lösungsmitteln beobachtete man kein vollständiges Verschwinden der Immunfluoreszenz in den diversen Organen. Erst nach einer Proteinkinase-K Behandlung der Präparate wurde ein vollständiger Verlust der Immunfluoreszenz erreicht. Diese Tatsache spricht dafür, dass PC in allen immunfluoreszierenden Organen sowohl an Glykolipid als

Einleitung

auch an (Glyko)-Protein gebunden vorkommt [31] . Bei *Trichinella spiralis* wurden PC-Antigene auf inneren Strukturen von Muskellarven und Adultwürmern detektiert, während fetale und neugeborene Larven kein PC trugen [33, 34] . Dieser Umstand könnte auf eine stadienspezifische Exprimierung PC-tragender Strukturen hindeuten, wofür auch Beobachtungen bei dem Trematoden *S. mansoni* sprechen. In dieser Arbeit konnte mittels Westernblot gezeigt werden, dass insbesondere in den Adultwürmern und in den Eiern PC-tragende Antigene vorhanden sind, während in Cercarien und Schistosomula keine PC-positiven Strukturen nachgewiesen werden konnten.

Auch zu diagnostischen Zwecken könnte PC-tragendes Antigen von Nutzen sein. So wurde beispielsweise bei *Wucheria bancrofti* Patienten ein PC-Antigen beschrieben, welches zur Quantifizierung der Wurmlast vor und während einer Therapie mit Anthelmintika herangezogen werden kann [35].

Neben weiteren Parasiten mit PC-Antigenen stellt die Filarie *Acantocheilonema viteae* ein besonders gutes Modell in Bezug auf die immunmodulatorische Wirkung von PC dar. Hier konnten PC-Epitope in Eiern, Uterus und Darm immunhistochemisch lokalisiert werden. PC kommt weiterhin im Fall des 62 kDa schweren exkretorisch-sekretorischen Proteins ES-62 über ein N-Glykan gebunden vor [36]. Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen wurde das Protein im Darmtrakt des Wurmes nachgewiesen. Ähnliche Strukturen stellten sich auch bei weitergehenden Untersuchungen des freilebenden Bodennematoden *Caenorhabditis elegans* dar [37]. Somit kann *C. elegans* als Modellorganismus zur Aufklärung der Biosynthese dieser biomedizinisch relevanten Komponenten herangezogen werden [38].

Es ergaben sich signifikante Homologien von ES-62 zu Aminopeptidasen aus einigen Bakterien und Pilzen, welche durch den Nachweis einer Aminopeptidaseaktivität nach Inkubation mit geeigneten Substraten bestätigt wurde [26]. Der Präsenz von PC auf ES-62 wird die Fähigkeit der Parasiten zugesprochen, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, da sie das Protein sezernieren [39, 40].

Einer der immunmodulatorischen Mechanismen von PC konnte *in vitro* veranschaulicht werden. PC regulierte die Proliferation von Lymphozyten herunter, indem es Signaltransduktionswege moduliert [41]. Auch die Proliferation von B-Zellen, welche durch anti-Immunglobuline und LPS induziert wird, war in Gegenwart von PC-substituierten Glykosphingolipiden aus *A. suum* signifikant vermindert. Im Verlauf dieser Untersuchungen wurde jedoch deutlich, dass dieser Effekt im Bezug auf die Senkung der LPS-Wirkung PC-abhängig war, während sich die Hemmung der Proliferationsstimulation durch Anti-B-Zell-Rezeptor-Immunglobuline als PC-unabhängig erwies. Dies könnte ein Hinweis darauf sein,

dass die durch Glykosphingolipide und anti-Ig verursachte Verminderung der B-Zellproliferation, zumindest teilweise, auf eine Induktion der Apoptose zurückzuführen ist [42]. Anscheinend handelt es sich bei PC nicht um die einzige immunmodulatorische Komponente der PC-substituierten Glykosphingolipide. Möglicherweise besitzen auch Kohlenhydrat- und/oder Ceramidstrukturen eine immunmodulatorische Aktivität [43].

Weitere immunmodulatorische Eigenschaften PC-haltiger Antigene liegen darin, dass sie eine Th2-Antwort begünstigen und zeitgleich eine Th1-Antwort supprimieren, was eine Bildung von IL-10 induziert [44-46]. Gleichzeitig wird die Synthese von IL-12 durch Makrophagen unterdrückt [29]. Dieser Sachverhalt wurde auch für ES-62 aus *A. viteae* dargestellt, und es konnte eine Induktion Th2-spezifischer Cytokine, Antikörperbildung vom Typ IgG1 [29] und ein Einfluss auf die Differenzierung und Reifung dendritischer Zellen [29] gezeigt werden. Des Weiteren zeigten Untersuchungen zur biologischen Aktivität zweier PC-substituierter Glykosphingolipid-Komponenten aus *A. suum*, dass es zu einer Stimulation der Synthese der inflammatorischen Cytokine TNF- α , IL-1 und IL-6 bei humanen Monozyten kommt [47].

Wie all diese Beispiele zeigen, spielen PC-substituierte Strukturen in Parasitenantigenen, die, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wird, auch bei dem Trematoden *S. mansoni* vorhanden sind, eine große Rolle während der Immunreaktion des Wirtsorganismus. Auf vielfältige Art und Weise greifen sie in die Wirts/Parasiteninteraktionen ein und könnten daher eine Erklärung für die lange Persistenz der Parasiten im Wirtsorganismus liefern.

1.6 Le^x und M2D3H-positive Antigenstrukturen bei *S. mansoni*

Auf diese Strukturen soll hier nur kurz eingegangen werden, da es sich nur um Nebenuntersuchen handelt, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Beim Le^x Epitop handelt es sich um eine Kohlenhydrateinheit, welche eine α 3-gebundene Fucose (Gal β 1-4[Fuca α 1-3]GlcNac β 1-R)[48] enthält und zu den Blutgruppenantigenen gehört. Dementsprechend kommt diese Struktur sowohl beim Menschen als auch bei *S. mansoni* vor. Solch eine Ähnlichkeit von Parasiten- und Wirtsantigenen wird auch als „molekulares Mimikry“ bezeichnet und könnte unter dem Aspekt der Immunevasion betrachtet werden [49-52]. Ein weiteres Beispiel hierfür ist das M2D3H-Epitop (Fuca α 1-3GalNAc β 1-4GlcNac β 1-R) [53], das *S. mansoni* mit seinem Zwischenwirt gemein hat.

1.7 Aufgabenstellung

Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass PC-Epitope bei der Interaktion des Immunsystems mit dem Parasiten eine wichtige Rolle spielen, bzw. dahingehend immunmodulatorisch wirken, so dass die Abwehrreaktion des Wirtsorganismus abgeschwächt wird.

Ausgangspunkt für diese Arbeit war der Nachweis eines, auf einem Protein vorhandenen PC-Epitopes bei dem Trematoden *S. mansoni*.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung einer Methode zur Extraktion dieses PC-substituierten Proteins. Des Weiteren galt es, Methoden zur Aufreinigung und zur anschließenden Identifikation des entsprechenden Proteins zu etablieren. Ein zweiter Schwerpunkt umfasste die Lokalisation des PC-Epitopes in *S. mansoni* Eiern und im Adultorganismus, den Vergleich der Besetzung von Antigenen mit PC-, M2D3H- und Le^x-Epitopen in *S. mansoni* sowie die Untersuchung verschiedener Anti-*S. mansoni*-Seren bezüglich ihrer PC-Reaktivität mittels Westernblot und ELISA.

2. Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Für die eindimensionale Gelelektrophorese wurden jeweils Elektrophoresekammern der Fa. Keutz (Reiskirchen) verwendet. Für den im Anschluss durchgeführten Westernblot wurde eine Semidry Blotkammer, ebenfalls der Fa. Keutz, genutzt. Für die zweidimensionale Gelelektrophorese standen folgende Geräte zur Verfügung:

Netzgerät: Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL (Amersham Pharmacia Biotech);
Elektrophoresekammer: Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech).

Als Lösungsmittel, Säuren und Basen wurden, falls nicht anders angemerkt, Produkte der Firma Merck, Darmstadt in p. a.-Qualität verwendet. Das Wasser wurde mit einer „Milli-Q Ultra-pure water system“ Filteranlage der Firma Millipore, Eschborn aufbereitet. Stickstoff und Argon wurden von Linde, Höllreuth mit dem Reinheitsgrad 4.6 geliefert.

2.2 Proteinisolation

2.2.1 Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion wurden jeweils 15mg lyophilisierte adulte männliche und weibliche Schistosomen in 1 ml PBS-, bzw. in Lysispuffer II (8M Harnstoff, 4% CHAPS) jeweils 3 mal für 3 Minuten bei 50% Leistung und auf Stufe 2 homogenisiert (Sonifier B15, Microspitze, Fa. Branson, Danbury, USA). Um das Homogenat vor Überhitzung zu schützen wurden die Gefäße während der gesamten Zeit im Eisbad gekühlt. Im Anschluss wurde die homogene Suspension für zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt (The Belly Dancer, Fa. Stovall life science, USA) und nachfolgend für 15 Minuten mit 5000 x g bei 4°C zentrifugiert (Universal 32 R, Fa. Hettich), um unlösliche Rückstände zu sedimentieren. Der klare Überstand wurde sorgfältig vom Sediment abgenommen. Anschließend folgte eine Bestimmung des Gesamtproteingehaltes des gewonnenen Extraktes.

2.2.2 Proteinbestimmung

Die Probe wurde in eine Küvette mit 200 μl H_2O gegeben. Anschließend wurde das Bio-Rad Protein Assay Reagenz (Bio-Rad, München) ein Teil zu vier Teilen mit H_2O verdünnt und 800 μl des Reagenzes in die Küvetten pipettiert. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen, danach wurden 1000 μl H_2O hinzugegeben und die Absorption bei 578 nm gemessen. Zusätzlich wurde zu jeder Probe eine Eichreihe mit einem Albumin-Standard (Pierce, Rockford) in den Konzentrationen 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erstellt.

2.3 SDS-Gelelektrophorese

2.3.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

Die Acrylamidkonzentrationen betragen 10 % im Trenngel und 4 % im Sammelgel.

Acrylamidstammlösung:	100 ml Acrylamidstammlösung (Roth)
Trenngelpuffer:	36,3 g Trishydroxymethylaminoethan (Tris) (ICN)/HCl (Merck) <i>ad</i> 100 ml H_2O , pH 8,8
Sammelgelpuffer:	6,0 g Tris/HCl <i>ad</i> 100 ml H_2O , pH 6,8 in H_2O
SDS-Lösung:	10 g SDS <i>ad</i> 100 ml H_2O
Ammoniumperoxiddisulfat-Lösung:	0,1 g Ammoniumperoxidsulfat (AMPS)/ml H_2O
Elektrodenstammpuffer, zehnfach:	15 g Tris, 72 g Glycin <i>ad</i> 500 ml H_2O
Elektrodenlaufpuffer:	100 ml Elektrodenstammpuffer, zehnfach 10 ml SDS-Lösung auf 1 Liter mit H_2O auffüllen

Für zwei Gele mit 0,75 mm Dicke wurden 4,02 ml H_2O , 3,33 ml Acrylamidstammlösung und 2,5 ml Trenngelpuffer gemischt, 5 Minuten im Ultraschallbad entgast und 2 Minuten auf 50°C erhitzt. Unter gründlichem Mischen wurden 100 μl SDS-Lösung, 50 μl AMPS (Serva) und 5 μl *N,N,N',N'*- Tetramethylethylendiamin (TEMED, Merck) hinzugefügt. 3,4 ml der

Materialien und Methoden

Lösung wurde zwischen zwei auf Gelplatten-Halter eingespannte Glasplatten gegeben. Um eine gleichmäßige Oberfläche zu erreichen, wurde das Trenngelgemisch mit H₂O-gesättigtem Butanol überschichtet und eine Stunde ruhen gelassen. Nach der Polymerisation wurde das n-Butanol abgegossen und die Trenngeloberfläche gründlich mit H₂O gespült.

Für das Sammelgel wurden 6,1 ml H₂O, 1,3 ml Acrylamidstammllösung und 2,5 ml Sammelgelpuffer gemischt und 5 Minuten im Ultraschallbad entgast. Anschließend wurden 100 µl SDS-Lösung, 5 µl AMPS und 10 µl TEMED hinzugegeben. Die Sammelgelmischung wurde auf das Trenngel pipettiert und der Kamm für die Proben tasche aufgesetzt. Der verwendete Kamm formte 10, bzw. 16 Auftrags taschen für ein Probenvolumen von je maximal 40 µl. Nach einer Polymerisationszeit von 45 Minuten wurden die Kä mme entfernt, die Taschen mit H₂O gespült und die Elektrophoresekammer zusammengesetzt. In die innere Kammer wurden 125 ml und in die äußere Kammer 200 ml Elektrodenlaufpuffer eingefüllt.

Vor dem Auftrag auf das Sammelgel wurden die Proteinproben 10 Minuten bei 100°C in 40 µl Probenpuffer gekocht.

Zusammensetzung des Probenpuffers (1 ml):	62,5 µl 1 M Tris/HCl, pH 6,8
	10,0 µl 100 mM Na ₂ EDTA (Roth)
	100 µl Glycerin (87%)
	200 µl SDS (10%)
	25,0 µl Bromphenolblau (0,25%)
	552,5 µl H ₂ O
	50 µl 2-Mercaptoethanol (Merck)

Mit einer Hamilton-Spritze wurden Aliquots der Proben und des Standards auf das Gel aufgetragen. Als Standard für das SDS-Gel wurde BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) genommen, für den Western-Blot wurden Precision Protein Standards (Bio Rad) verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 15 Minuten bei 100 V und dann für 65 Minuten bei 150 V. Danach wurden die Gele entnommen, mit Coomassie (s.Abb. 3.6) oder Silber gefärbt oder für einen Western-Blot weiterverarbeitet.

2.3.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

2.3.2.1 Rehydratisierung

Die Probe wurde in 500 µl Lysispuffer gelöst. Es wurden für 9 Strips 450 µl Probe benötigt. Für eine Gesamtpufferlösung von 1900 µl wurden 1420 µl Rehydratisierungspuffer, 450 µl Probe und 30 µl Immobilized pH gradient buffer (IPG-Puffer; Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt.

Lysispuffer:	19,2 g Harnstoff
	1,6 g CHAPS
	0,194 g Tris
	auf 40 ml mit H ₂ O auffüllen
Rehydratisierungspuffer:	12 g Harnstoff
	0,5 g CHAPS
	Bromphenolblau
	auf 25 ml mit H ₂ O auffüllen

Diese Lösung wurde mit 2,8 µg/ml Dithiothreitol (DTT) in ein Eppendorfgesäß gegeben. Die Lösung wurde für 10 min gerüttelt und anschließend 10 min bei 20160 x g zentrifugiert. Je 200 µl dieser Lösung wurden in insgesamt 9 Spuren des „Reswelling Trays“ mit einer Pipette perlenförmig eingefüllt, so dass möglichst keine Luftblasen entstanden. Auf dieses Lösungsbett wurde jeweils ein Immobiline DryStrip von 11 cm Länge mit der Acrylamidseite nach unten gelegt. Damit der Harnstoff aus der Lösung nicht auskristallisiert, wurde jede Spur mit 1,5 ml DryStrip Cover Fluid (Pharmacia Biotech) bedeckt. Die Strips wurden über Nacht bei RT rehydratisiert.

2.3.2.2 Isoelektrische Fokussierung (Erste Dimension)

Jeder gequollene Gelstreifen wurde aus dem „Reswelling Tray“ herausgenommen, anschließend wurde er kurz mit H₂O abgespült und mit der Gelseite nach oben und der pH-sauren Ecke (Stripspitze) Richtung Anode in den DryStrip Aligner mittig gelegt.

Der Anoden- und Kathodenstreifen wurde orthogonal auf die Strips gelegt, so dass das Gel gerade noch berührt wurde. Die Elektrodenklammern wurden aufgesteckt, so dass der Elektrodendraht in der Mitte des Elektrodenstrips auflag. Die Gelstreifen wurden mit ~80 ml Cover Fluid überdeckt. Der Deckel des Multiphor-Gerätes wurde aufgesetzt und die Kabel wurden mit dem Spannungsgerät verbunden.

Das Spannungsgerät wurde wie folgt programmiert:

0-100 V	1 mA	5 W	300 Vh
100-3500 V	1 mA	5 W	8,5 kVh
3500 V	1 mA	5 W	21 kVh

Der Gradient war linear. Nach Abschluss der isoelektrischen Fokussierung wurden die Gelstrips herausgenommen und mit H₂O abgespült. Die Strips wurden bei -80°C eingefroren.

2.3.2.3 Elektrophorese (Zweite Dimension)

Das Gel

Es wurden zwei 12,5%ige Acrylamidgele verwendet.

Zusammensetzung:	33,36 ml Monomer stock solution (monomere Acrylamidlösung mit 2,5% Bisacrylamid) (Rotiphorese Gel 30, Roth)
	20 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
	0,8 ml 10% SDS-Lösung
	25,44 ml H ₂ O

Die Einzelkomponenten wurden in einem Erlenmeyerkolben zusammenpipettiert und im Ultraschallbad für mindestens 10 min entgast. Anschließend wurden 400 µl 10% AMPS und 26,4 µl TEMED hinzugefügt.

Jeweils 40 ml Lösung wurden in eine Gelkammer gefüllt. Die Gelkammern wurden bis ca. 0,5 cm unter den oberen Glasplattenrand befüllt und anschließend mit wassergesättigtem n-

Materialien und Methoden

Butanol überschichtet. Zur Polymerisation wurden die Gele zunächst für 2 Stunden bei RT und dann über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

Vorbereitung der Gelstrips

Pro Gelstrip wurden 50 mg DTT in 5 ml SDS-Äquilibrierungspuffer gelöst, in das Plastikröhrchen mit dem Gelstrip gefüllt und dieses dann 15 min auf den Rüttler gelegt.

SDS-Äquilibrierungspuffer: 6,7 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
 72,07 g Urea
 69 ml 87%iges Glycerin
 8 g SDS
 auf 200 ml mit H₂O auffüllen

Anschließend wurden pro Gelstrip 125 mg Iodacetamid in 5 ml SDS-Äquilibrierungspuffer gelöst und in neue Plastikröhrchen gefüllt. Die Gelstrips wurden in diese Lösung umgebettet und erneut 15 min gerüttelt. Anschließend wurden die Strips mit Laufpuffer abgespült und mit zwei Pinzetten zwischen die Glasplatten bis zum direkten Kontakt mit dem Trenngel hineingeschoben. Die Stripspitze wies zur rechten Seiten, daneben wurde ein ~ 0,8 cm breiter Filterpapierstreifen eingeführt, auf den der mit Agarose-Gel gemischte Proteinmarker platziert wurde.

Um den Kontakt zwischen den beiden Gelen zu gewährleisten, wurde der übrige Hohlraum mit flüssiger 60°C warmer Agarose-Lösung bis an den Glasplattenrand überschichtet. Während die Agarose fest wurde, wurden ca. 2,5 l Laufpuffer zur Temperierung in die Elektrophoresekammer gefüllt. Nachdem die Agarose fest geworden war, wurde die Halterung auf die Platten gesetzt und in die Elektrophoresekammer hineingehängt. Der restliche Laufpuffer wurde bis zur Markierung eingefüllt. In die obere Wanne wurde ebenfalls Laufpuffer gegossen, bis beide Pegel auf gleicher Höhe waren. Die Elektrophoresekammer wurde an ein Spannungsgerät angeschlossen und die Elektrophorese wie folgt durchgeführt:

15 min	30 mA	600 V	50 W
~ 150 min	90 mA	600 V	50 W

Die Elektrophorese wurde gestoppt, als sich die Lauffront kurz vor dem Ende der Glasplatte befand. Danach wurden die Gele aus der Kammer genommen und die Gelstrips entfernt. Zur Weiterbehandlung wurden die Gele entweder gefärbt oder geblottet (s.u.).

Materialien und Methoden

Die Imprägnierlösung wurde zweimal für 30 Sekunden mit H₂O abgewaschen. Dieser Schritt erfolgte ebenfalls im Dunkeln. Ebenso wurde die Entwicklung für ungefähr drei Minuten im Dunkeln vollzogen.

Entwicklungslösung:

- 60 g Na₂CO₃
- 4 mg Na₂S₂O₃
- 0,5 ml Formol (37%)
- in 1000 ml H₂O aufnehmen

Die Entwicklungslösung wurde zweimal für 30 Sekunden mit H₂O im Dunkeln abgewaschen. Die Reaktion wurde mit einer Lösung, die 0,05 M EDTA und 18,61 g Na₂EDTA·2 H₂O enthielt, abgestoppt und anschließend mit H₂O 20 Minuten gewaschen. Das Gel wurde für ungefähr 50 Minuten in 5% Glycerin-Lösung inkubiert, um es zu konservieren. Anschließend wurde das Gel in einen Trocknungsrahmen zwischen zwei Cellophanfolien gespannt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.2.6 Stains-All – Färbung

Es wurde eine Stammlösung erstellt, die lichtgeschützt aufbewahrt wurde. Das Gel wurde in lichtgeschützten Gefäßen behandelt und 2 Stunden in Silberfixierer (50% Methanol, 10% Essigsäure) geschwenkt. Anschließend wurde das Gel zweimal mit H₂O gewaschen und über Nacht im Dunkeln in Stains-All-Färbelösung gelagert. Mittels H₂O wurde das Gel, ebenfalls im Dunkeln, kurz entfärbt. Das Gel wurde ungefähr 3 bis 5 Minuten in 5% Glycerin-Lösung inkubiert, um es zu konservieren. Anschließend wurde das Gel in einen Trocknungsrahmen zwischen zwei Cellophanfolien gespannt und über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet.

Materialien und Methoden

Stammlösung: 100 mg Stains-All (ICN, Eschwege)
100 ml Formamid

Färbelösung: 129 ml H₂O
1 ml 3,0 M Tris/HCl; pH 8,8
50 ml Isopropanol
10 ml Formamid
10 ml Stammlösung

2.3.3 Westernblot

Jeweils eines der Gele aus der 2D-Gelelektrophorese wurde im Westernblotverfahren weiterverarbeitet.

Zur immunhistochemischen Charakterisierung wurden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine von *S. mansoni* von einem Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert. Im direkten Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Acrylamidgel 5 Minuten im Transferpuffer äquilibriert.

Transferpuffer: 2,9 g Glycin
5,8 g Tris
1,85 ml SDS-Lösung (10%)
200 ml Methanol
auf 1000 ml mit H₂O auffüllen

Die PVDF-Membranen wurden auf die entsprechende Gelgröße zugeschnitten und für ungefähr 10 Sekunden in Methanol getaucht. Anschließend wurden die Transfermembran sowie die Filterpapiere in Transferpuffer äquilibriert. Auf der Anode wurden zwei Filterpapiere postiert. Zum Proteintransfer wurde das Gel auf die PVDF-Membran gelegt, zwei weitere Filterpapiere auf das Gel gegeben und die Kathode abschließend oben aufgelegt. Es wurde im Falle eines Mini-Gels 90 Minuten bei 50 mA und im Anschluss an die 2D-Gelelektrophorese für 60 Minuten bei 700 mA geblottet. Nach dem Blotvorgang wurde die PVDF-Membran in „tris buffered saline“ (TBS), das 1% BSA enthielt, zunächst bei Raumtemperatur, dann über Nacht im Kühlschrank bei 4°C blockiert.

TBS: 25 mM Tris/HCl, pH 7,5
100 mM NaCl

2.3.4 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel

Der *in situ*-Verdau erfolgte nach Zerkleinerung des Gels mittels einer Millipore „Ultrafree-DA Nebulizer“-Vorrichtung. Die Bande wurde dazu aus dem Gel ausgeschnitten, in den „Nebulizer“ gegeben, mit 100 µl H₂O versetzt und 3 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Nebulizer wurde entfernt. Das zerkleinerte Gel auf der Membran wurde anschließend viermal für je 5 Minuten bei RT gewaschen.

1. 100 µl 50 mM NH₄HCO₃, pH 8,5
2. 100 µl 50 mM NH₄HCO₃, pH 8,5 in 40% ACN
3. 100 µl 50 mM NH₄HCO₃, pH 8,5
4. 100 µl 50 mM NH₄HCO₃, pH 8,5 in 40% ACN

Bei allen Waschgängen wurden die Proben 5 min geschüttelt, 3 min zentrifugiert und das Reservoir entleert. Anschließend wurde das Gel durch Zugabe von 30 µl ACN und nachfolgende Zentrifugation getrocknet. Der Inhalt des Reservoirs wurde verworfen. Zur Trypsinbehandlung wurden 0,5 µg Trypsin in 250 µl 25 mM NH₄CO₃, pH 8,5 gelöst.

Das Gel wurde mit 50 µl der Trypsinlösung versetzt, mit Argon überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben 1 min bei 5000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Peptide mit 50 µl 25 mM NH₄CO₃, pH 8,5 gewaschen, indem die Gelpartikel 10 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert wurden. Die gleichen Arbeitsschritte erfolgten nochmals mit 50 µl H₂O. Die flüssigen Phasen wurden vereint und in der Speed Vac ohne Membraneinsatz zur Trockene einrotiert. Die Membranhülse mit den Gelstücken wurde wieder aufgesetzt und zunächst mit 20 µl 30% ACN/ 0,1% TFA, anschließend mit 20 µl 60% ACN und zum Schluss mit 20 µl 100% ACN gewaschen und zentrifugiert. Die Proben wurden ohne Membraneinsatz in der Speed Vac zur Trockene einrotiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt.

2.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

MALDI-TOF-MS Analysen wurden mittels eines Ultraflex TOF/TOF (Bruker) im „positive-ion reflectron mode“ und der Software FlexControl 2.0 (Bruker) durchgeführt. Die Messungen wurden unter einer Beschleunigungsspannung von 25 kV durchgeführt, was die Registrierung Ionen mit einem Molekulargewicht zwischen 800 und 6000 Da ermöglichte. Zur Kalibrierung diente ein Peptide Calibration Standard (~1000-4000 Da) (Bruker). Es wurden Summenspektren aufgenommen wobei annähernd 300 Einzelspektren summiert wurden. Als Matrix wurde eine gesättigte Lösung von HCCA in ACN: 0,1% TFA (2:1 v/v) verwendet). Die Analyse der so gewonnenen Daten erfolgte mittels FlexAnalysis 2.0 und BioTools 2.2 (Bruker). Zuordnungen zu den analysierten Peptidmassen wurden online, unter Verwendung der Mascot Suchmaschine (MatrixScience, London, UK), durchgeführt.

2.5 Immunhistochemische und Immunfluoreszierende Nachweisverfahren

2.5.1 Immunhistologie bei adulten *S. mansoni*

Mehrere *S. mansoni* Adultegelpaare wurden in einen ca. 1 cm³ großen Paraffinwürfel eingebettet, aus dem dann Dünnschnitte angefertigt wurden, welche im Anschluss auf Objektträger aufgebracht wurden. Jedes dieser Präparate enthielt diverse Körpersegmente männlicher und weiblicher Adultegel in einer Länge zwischen 0,1-1 cm. Um die Dünnschnitte zu entparaffinieren wurden sie zunächst für 5 min. in Toluol gebadet. Im Anschluss folgte eine Weiterbehandlung der Präparate durch Inkubation, jeweils 3 min, in einem Ethanolbad absteigender Konzentration (100%, 90%, 80%). Dem folgte ein kurzes, ca. 30 sec Abwaschen der Schnitte unter fließendem Wasser. Zum Teil wurde bei einigen Präparaten noch eine zusätzliche Extraktion der Glykolipide mittels Chloroform/Methanol 1:1 für 15 min durchgeführt, mit anschließendem 30 sec Abwaschen der Schnitte unter H₂O (Millipore).

Nun folgte das Blockieren der Präparate in 0,1M PBS mit 2% BSA für 30 Minuten. Daraufhin wurden die Schnitte für 2 Stunden bei RT mit dem PC-spezifischen monoklonalen Antikörper TEPC-15 oder einem *S. mansoni* spezifischen Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 in 0.1M PBS inkubiert. Bevor der Zweitantikörper aufgetragen wurde, wurden die Präparate

fünf mal mit 0,1M PBS gewaschen. Dem folgte eine erneut zweistündige Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper. Für die Fluoreszenzmethode handelte es sich hierbei um einen FITC-konjugierten Anti-Maus Antikörper vom Typ IgG (Sigma) in einer Konzentration von 1:10 in 0,1M PBS, versetzt mit 0,5% Evans blue. Der Ansatz des Zweitantikörpers wurde vor dem Auftragen auf die Schnitte noch für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, um unspezifische Fluoreszenzen durch Antikörperkonglomerate zu vermeiden.

Im Falle des immunhistochemischen Nachweises PC-positiver Strukturen wurde die Präparate wie bereit oben beschrieben vorbereitet und anschließend für eine Stunde bei RT mit TEPC-15 in einer Verdünnung von 1:100 in 0,1M PBS inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit 0,1M PBS wurde der Zweitantikörper, ein peroxidasekonjugierter α -Maus Ak (Dako 260) in der Verdünnung von 1:100 in 0,1M PBS für 30 min bei RT auf die Schnitte gegeben.

Nach fünfmaligem Waschen der Präparate mit H₂O (Millipore) folgte deren Färbung mittels der Peroxidasereaktion mit dem Substrat 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC Staining Kit, Sigma) für 5-10 min. Nach einmaligem Waschen der Schnitte mit Wasser folgte eine Gegenfärbung mit Mayer's Haematoxylin (Sigma), Inkubationszeit 1-5 min. Anschließend wurden die Präparate erneut mit Wasser gewaschen, danach mit Glycerolpuffer (pH 8-9, 73mg NaHCO₃, 16mg Na₂CO₃, gelöst in 10ml H₂O und auf 100ml mit Glycerin aufgefüllt) eingeschlossen, mit einem Deckplättchen abgedeckt und schließlich mit farblosem Nagellack versiegelt.

Die anschließende Mikroskopie mit Aufnahme digitaler Bilder erfolgte mittels eines Leica DM9 Mikroskops ausgestattet mit einer RT Slider Spot Kamera (Visitron Systems, Puchheim, Germany) und unter Verwendung der MetaMorph Software Version 4.6.

Zur Interpretation der anatomischen Strukturen der *S. mansoni* Adultegel- und Eipräparate wurden folgende Quellen verwendet: Anatomie weibl. und männl. Adultegel [54]; weibl. Reproduktionstrakt [55]; embryonale Eimembranen [56]. Um die diversen anatomischen Strukturen histologisch differenzieren zu können wurden ebenfalls Trichromfärbungen nach Goldner durchgeführt [57].

2.5.2 Immunhistologie bei *S. mansoni* Eiern

Bei diesen Präparaten handelte es sich ebenfalls um in Paraffin eingebettete Lebern *S. mansoni* infizierter Mäuse.

Die Vorgehensweise im Umgang mit den Präparaten mit Entparaffinierung, Blockierung, Inkubation mit den jeweiligen Erst- und Zweitantikörpern und der anschließenden Färbung entspricht der in Kapitel 2.5.1.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung eines PC-modifizierten Proteins im Gesamtextrakt von *S. mansoni*- Adultwürmern

Der Proteinextrakt aus dem Adultwurm *S. mansoni* zeigt eine positive Reaktion mit TEPC-15, einem PC-spezifischen Antikörper (siehe Abbildung 3.1 und 3.2). Im Verlauf von Untersuchungen an Lysis- bzw. PBS-Puffer Gesamtexttrakten wurde jedoch nur ein ca. 50-55 kDa großes PC-modifiziertes Protein entdeckt, welches im Organismus dieses Trematoden vorhanden ist. Der Extrakt wurde zunächst durch eine eindimensionale SDS-Gelelektrophorese getrennt (Abb.3.3a). Die weitere Trennung der Proteine erfolgte mittels der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Zur Detektion der PC-positiven Anteile wurde das Westernblot-Verfahren (Abb. 3.7) angewandt (s. 2.3.2). Das Gel wurde mit Coomassie (s. 2.3.2.4), der Westernblot mit TEPC-15/alkalischer Phosphatase gefärbt (s. 2.3.3). Der Westernblot zeigte TEPC-15-positive Spots im Bereich um ~ 50-55 kDa. Zur genaueren Analyse des Proteins wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Spots, die im Westernblot als PC-modifiziert zu erkennen waren, im Coomassie-Gel ausgeschnitten (Abb. 3.6) und proteolytisch verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden anschließend mit Hilfe von MALDI-TOF-MS analysiert. Die resultierenden Peptidmassen (Abb. 3.8 – 3.10) wurden mittels MASCOT zur Suche in einer Protein-Datenbank verwendet, um Proteine zu identifizieren. Des Weiteren wurden immunhistochemische und immunfluoreszierende Untersuchungen sowohl anhand von Adultwürmern als auch an Leberschnitten von mit *S. mansoni* infizierten Mäusen durchgeführt, um antigene Strukturen der Adultwürmer und der Eier von *S. mansoni* zu lokalisieren (s. 2.5.1, 2.5.2 und Abb. 3.1 – 3.23).

Ergebnisse

3.2 Proteinextraktion aus adulten *S. mansoni*

Die Proteinextraktion aus sowohl weiblichen als auch männlichen adulten *S. mansoni*, sowie den jeweiligen Entwicklungsstadien erfolgte wie unter den Punkten 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben mittels unterschiedlicher Pufferlösungen unter Verwendung verschiedener Detergentien. Es kamen reiner TBS-, reiner PBS-, TBS-2%CHAPS, PBS-1%Triton X100 und Lysispuffer zum Einsatz. Im Verlauf der Extraktionsversuche zeigte sich, dass die Proteine am besten unter Verwendung des Lysispuffers zu extrahieren waren (s. Abb.3.2). Die erhaltenen Extrakte wurden mittels eindimensionaler SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Westernblot mit Detektion PC-positiver Strukturen durch die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper TEPC-15 (2.3.1 und 2.3.3; Abbildungen 3.1 und 3.2) kontrolliert.

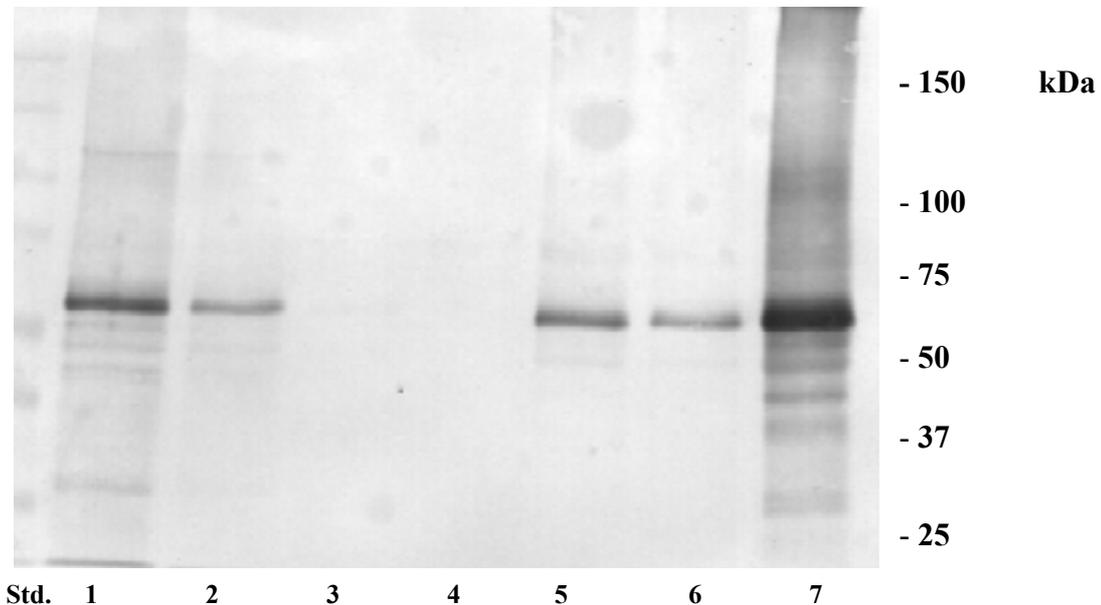


Abbildung 3.1: Proteinextraktion von *S. mansoni* Adultegeln mittels unterschiedlicher Pufferlösungen.

Proteintrennung mittels 10% Acrylamidgel, im Anschluss Westernblot. Färbung des Westernblot nach Behandlung mit TEPC-15 mAk (1:1000), Zweitantikörper Anti-Maus AP (Dako 0486), mittels alkalischer Phosphatase. Proteinstandard: Bio-Rad Prestained Precision Protein Standard

- 1: Extraktion mit PBS aus 20mg lyophilisierten Adultegeln/ml Pufferlsg. Auftrag 20µg Gesamtextrakt = 0,1%
- 2: Extraktion mit PBS aus 5mg lyophilisierten Adultegeln/ml Pufferlsg Auftrag 5µg Gesamtextrakt = 0,1%
- 3: Extraktion mit PBS-1%Triton X100 aus 20mg lyophilisierten Adultegeln/ml Pufferlsg. Auftrag 20µg Gesamtextrakt = 0,1%
- 4: Extraktion mit PBS-1%Triton X100 aus 5mg lyophilisierten Adultegeln/ml Pufferlsg. Auftrag 5µg Gesamtextrakt = 0,1%
- 5: Sediment nach Extraktion mit PBS-1%Triton X100 aus 20mg lyophilisierten Adultegeln/ml Pufferlsg. Auftrag 20µg Gesamtextrakt = 0,1%
- 6: Sediment nach Extraktion mit PBS-1%Triton X100 aus 5mg lyophilisierten Adultegeln/ml Pufferlsg. Auftrag 5µg Gesamtextrakt = 0,1%
- 7: Sediment nach Extraktion mit PBS aus 20µg lyophilisierten Adultegeln/ml Pufferlsg. Auftrag 20µg Gesamtextrakt = 0,1%

Ergebnisse

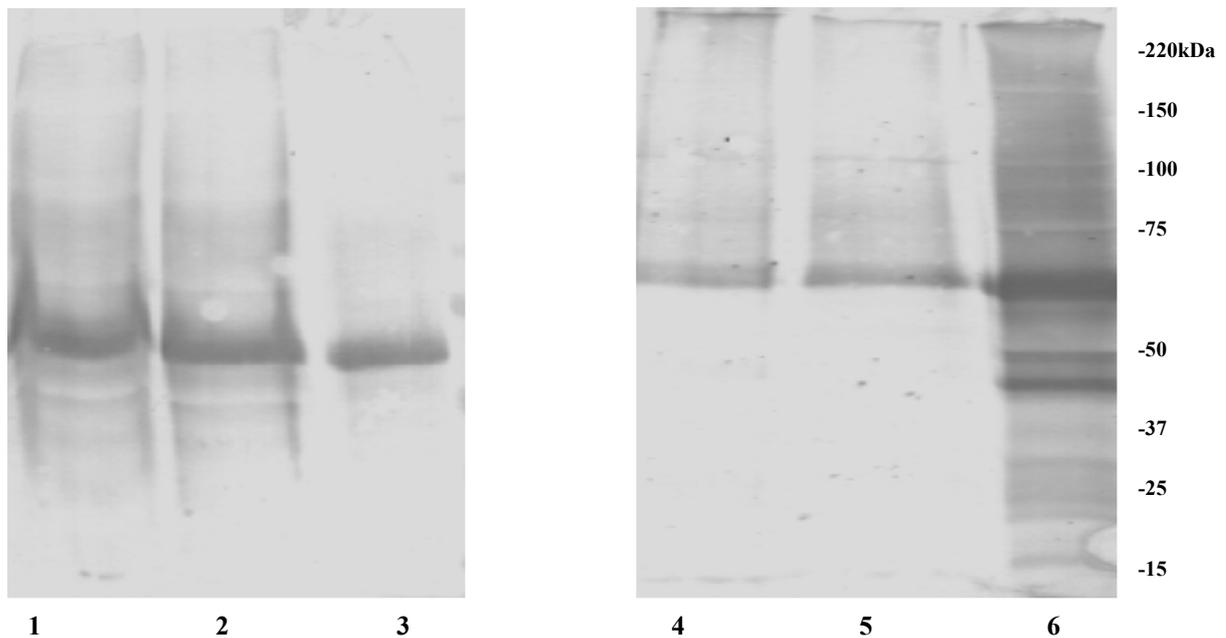


Abbildung 3.2: Proteinextraktion von *S. mansoni* Adultegeln mittels Lysispuffer, bzw. TBS-2%CHAPS.

Proteintrennung mittels 10% Acrylamidgel, im Anschluss Westernblot. Färbung des Westernblot nach Behandlung mit TEPC-15 mAk (1:1000), Zweitantikörper Anti-Maus AP (Dako 0486), mittels alkalischer Phosphatase. Proteinstandard: Bio-Rad Prestained Precision Protein Standard

Aufgetragen wurden jeweils 30 μ l des Gesamtextraktes/Spur, entspricht ca. 450 μ g Gesamtproteingehalt

- 1: Extraktion mit Lysispuffer aus 15mg lyophilisierten Adultegeln/ml Pufferlsg vor Ultrazentrifugation für 90min bei 100000 x g
- 2: Extraktion mit Lysispuffer aus 15mg lyophilisierten Adultegeln/ml Pufferlsg nach Ultrazentrifugation für 90min bei 100000 x g
- 3: Pellet nach Extraktion mit Lysispuffer aus 15mg lyophilisierten Adultegeln/ml Pufferlsg
- 4: Extraktion mit TBS-2%CHAPSaus 15mg lyophilisierten Adultegeln/ml Pufferlsg. vor Ultrazentrifugation für 90min bei 100000 x g
- 5: Extraktion mit TBS-2%CHAPSaus 15mg lyophilisierten Adultegeln auf 1ml Pufferlsg. nach Ultrazentrifugation für 90min bei 100000 x g
- 6: Pellet nach Extraktion mit TBS-2%CHAPSaus 15mg lyophilisierten Adultegeln auf 1ml Pufferlsg

Wie aus den Abbildungen 3.1 und 3.2 deutlich wird, war die Löslichkeit der Proteine in den Lysispufferextrakten am größten. Im Gegensatz dazu verbleibt bei den Extraktionsversuchen mittels reinem TBS-, reinem PBS-, TBS-2% CHAPS und PBS-1%Triton-X100 der mengenmäßig überwiegende Proteinanteil im Sediment (Pellet).

3.3 Eindimensionale Gelelektrophorese

3.3.1 Vergleichende Analyse verschiedener Entwicklungsstadien von *S. mansoni*

Die weitere Untersuchung und Aufreinigung der gewonnenen Extrakten aus adulten *S. mansoni* und der freundlicherweise von Dr. M. J. Doenhoff (School of Biological Sciences, University of North Wales, Bangor, UK) zur Verfügung gestellten Extrakte der verschiedenen Entwicklungsstadien (jeweils PBS Extrakte von Eiern, Cercarien und Schistosomula) erfolgte mittels eindimensionaler SDS-Gelelektrophorese. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Weiterverarbeitung und der weiteren Aufreinigung der Adultegelextrakte. Wie aus Abbildung 3.3 ersichtlich, zeigte der Gesamtextrakt aus *S. mansoni* Adultegeeln die stärkste PC-positive Bande nach Westernblot und Detektion mittels des monoklonalen TEPC-15 mAk. Auch diente die eindimensionale SDS-Gelelektrophorese dem Nachweis der Proteinlöslichkeit während der Extraktion mittels diverser Pufferlösungen (s. 3.1 und Abb.3.2)

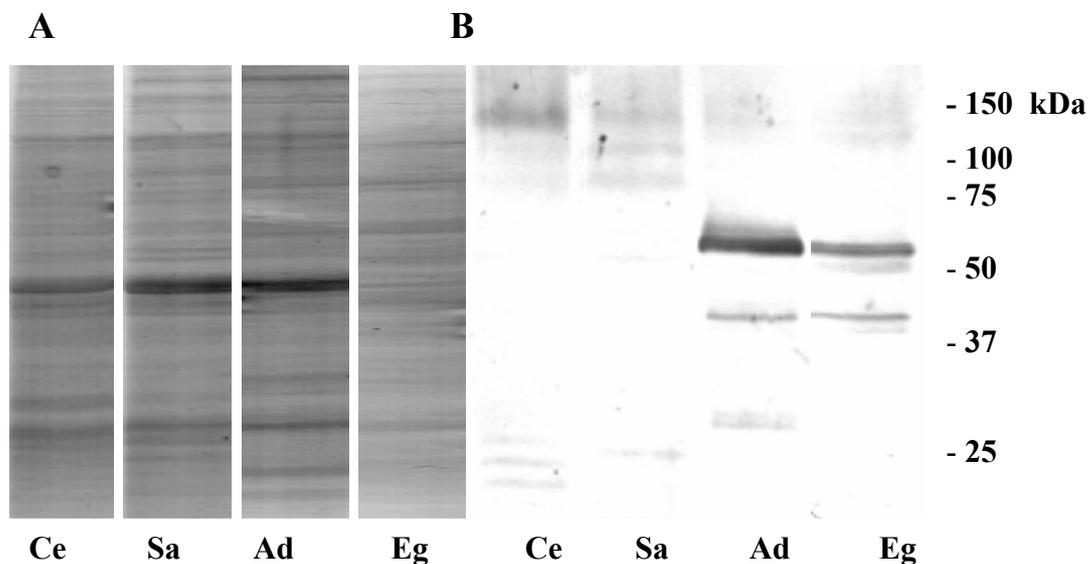


Abbildung 3.3: Stadienspezifische Expression phosphocholin-substituierter Antigene bei *S. mansoni*

A: Silberfärbung nach Trennung der Extrakte mittels SDS-PAGE 10%; 100µg lyophilisiertes Material/Spur aus jeweils Gesamtextrakten unterschiedlicher *S. mansoni* Entwicklungsstadien.

B: Färbung eines Westernblot nach Auftrennung der Extrakte verschiedener *S. mansoni* Entwicklungsstadien nach Behandlung mit TEPC-15 mAk (1:1000) und Zweitantikörper Anti-Maus AP (Dako 0486), mittels alkalischer Phosphatase. Proteinstandard: Bio-Rad Prestained Precision Protein Standard.

Ce: Cercarie; **Sa:** Schistosomula; **Ad:** Adultegel; **Eg:** Ei.

Ergebnisse

3.3.2 Spezifitätskontrolle des mAk-TEPC-15

Um eine spezifische Bindungen des TEPC-15 mAk an PC zu beweisen, wurde in der eindimensionalen Elektrophorese jeweils eine Kontrollspur des Adultwurm- bzw. des Eiextraktes im Westernblot-Verfahren mitbehandelt und der im Anschluss aufgetragene Erstantikörper durch Zugabe von jeweils 5 mM PC zur Antikörperlösung inhibiert. Wie diese Experimente zeigten, kam es zum vollständigen Ausbleiben der Antikörperbindung an die PC-spezifischen Strukturen auf der PVDF-Membran (s. Abb. 3.4)

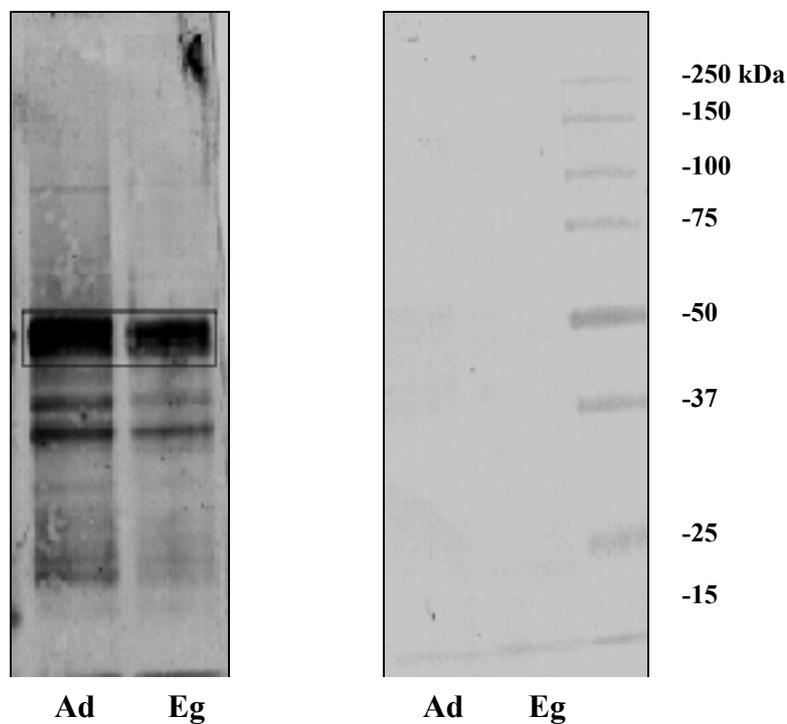


Abbildung 3.4 Färbung eines Westernblot nach Auftrennung der Adultegel- und Eiextrakte von *S. mansoni* mittels SDS-PAGE

10% Trenngel; 100µg lyophilisiertes Material/Spur. Behandlung mit TEPC-15 mAk (1:1000), Zweitantikörper Anti-Maus AP (Dako 0486), (1:1000), Färbung mittels alkalischer Phosphatase.

Proteinstandard: Bio-Rad Prestained Precision Protein Standard. Rechts dargestellt, die Inhibition des Erstantikörpers durch die Zugabe von 5mM PC (Sigma) zum mAk-Ansatz.

Ad: Adultegel; **Eg:** Ei.

Ergebnisse

3.3.3 Ausschluss einer Bindung des PC-Substituenten über ein N-Glycan mittels Behandlung des Westernblot mit PNGase F und PNGase A

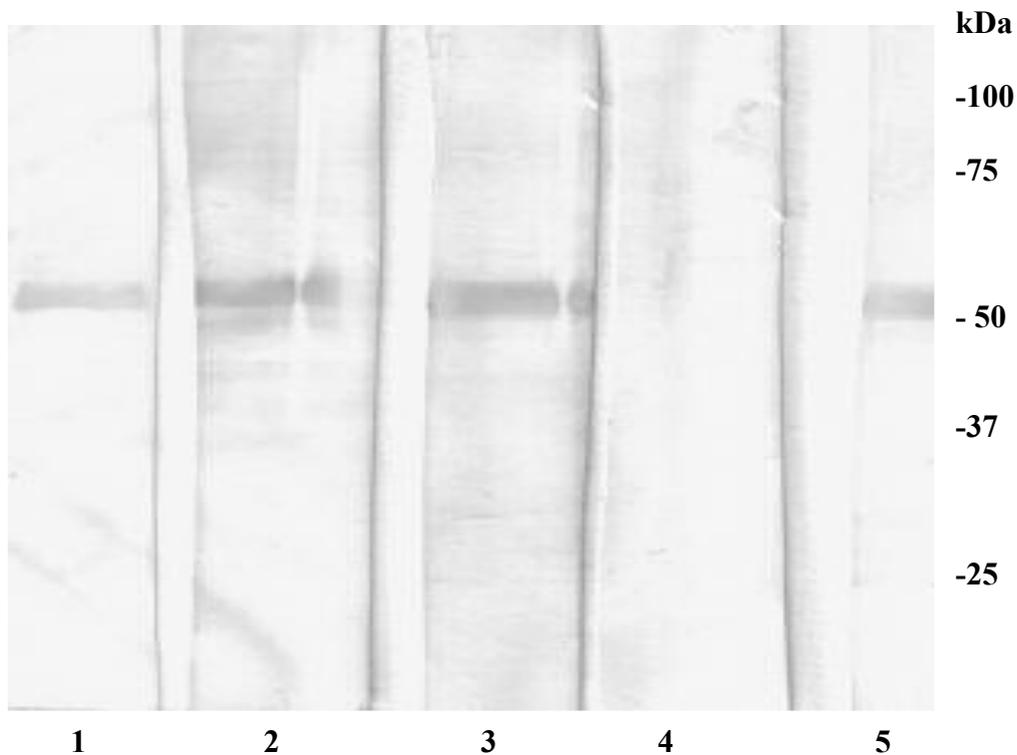


Abbildung 3.5 Behandlung eines Westernblot mit PNGase A, PNGase F und HF zum Ausschluss einer Bindung des PC-Substituenten über N-Glykane.

Eingesetzt wurden 25µl Adultegelgesamtextr./Spur, entspricht ca. 400µg Gesamtproteingehalt

1. unbehandelte Spur *S. mansoni* Adultegelextrakt

2. nach PNGaseA-Behandlung

3. nach PNGase F-Behandlung

4. nach HF-Behandlung

5. unbehandelte Spur

Extrakt und Blotbedingungen entsprechen denen der obigen Abbildungen.

Proteinstandard: Bio-Rad Prestained Precision Protein Standard

Wie in Abbildung 3.5 gezeigt hat eine Behandlung mit PNGase F und PNGase A keinen Einfluß auf die Reaktivität gegenüber TEPC-15. Dies lässt vermuten, dass der PC-Substituent nicht über ein N-Glykan gebunden ist

3.4 Zweidimensionale SDS Gelelektrophorese

Zur weiteren Reinigung und Trennung der in der eindimensionalen Gelelektrophorese nachweislich PC-positiven Proteine aus dem gewonnenen *S. mansoni* Adultegeleextrakt diente das Verfahren der 2D-Gelelektrophorese, mittels IPG-Strips zur Trennung in der 1. und 10% Acrylamidgelen zur Trennung in der 2. Dimension (s. 2.3.2, Abb. 3.6). Hierbei sollten die in der eindimensionalen Gelelektrophorese deutlich vorhandenen PC-positiven Proteinbanden weiter in einzelne Spots getrennt und im Anschluss mittels eines tryptischen Verdaus (s. 2.3.4) aus dem Gel extrahiert werden, um im Anschluss weiteren massenspektrometrischen Analysen unterzogen zu werden. Entsprechende PC-positive Proteine im Westernblot zeigt Abbildung 3.7.

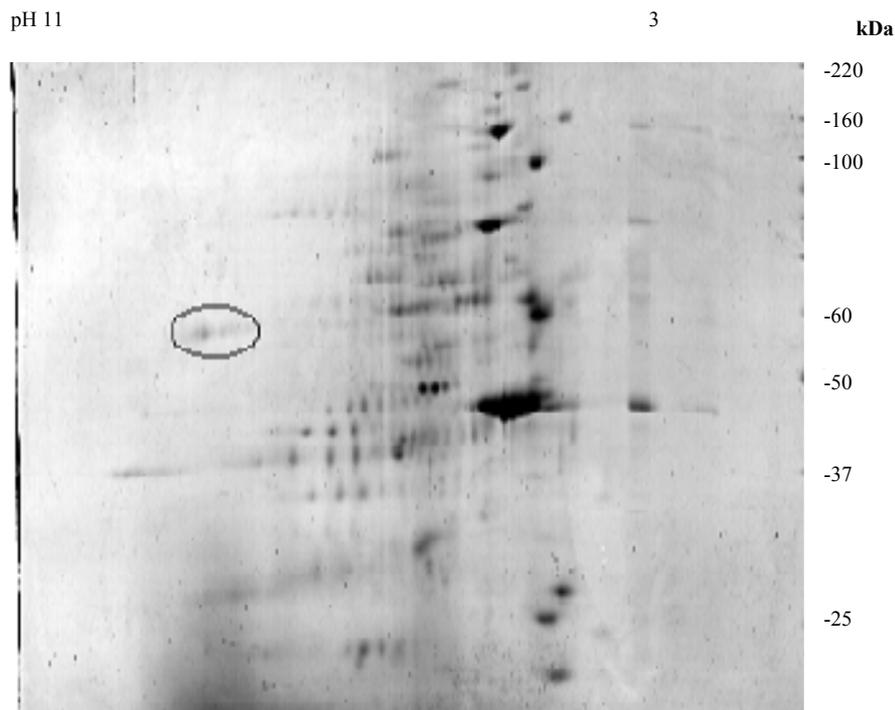


Abbildung 3.6 Zweidimensionale SDS Gelelektrophorese des *S. mansoni* Adultwurmextraktes.

Gesamtproteingehalt der aufgetragenen Probe 300µg bei 30µl Probevolumen, Coomassie-Färbung, markiert ist jener Spot, der nach Western-Blot und Inkubation mit TEPC-15 mAk (1:1000) PC-positive Strukturen trägt. Proteinstandard: BenchMark™ Protein Ladder, Bio-Rad.

Ergebnisse

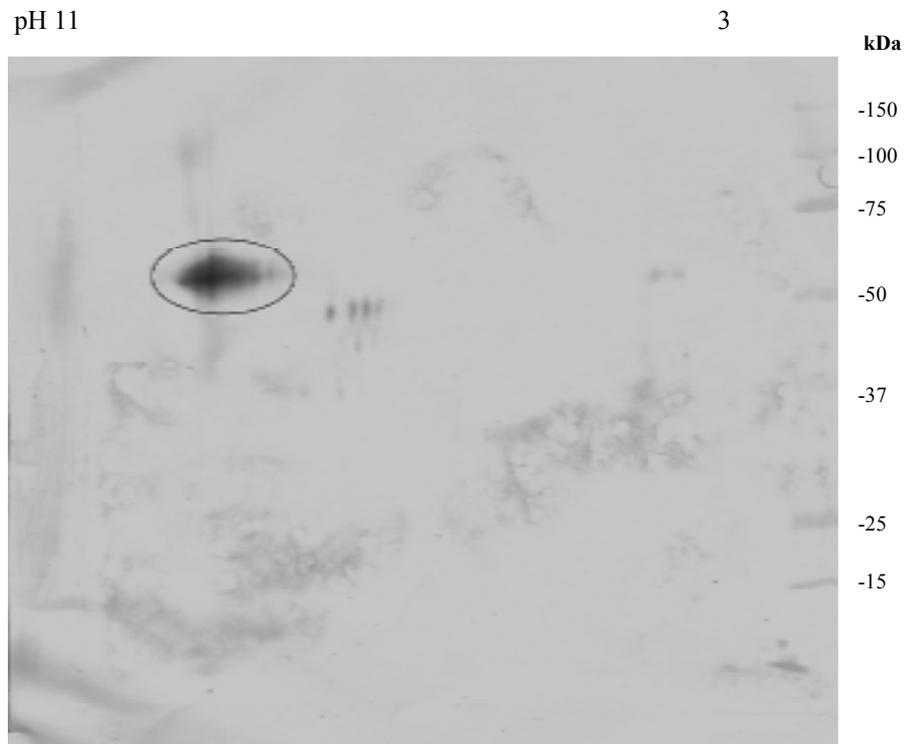


Abbildung 3.7: Färbung eines Westernblot nach Proteintrennung des *S. mansoni* Adultwurmgesamtextraktes.

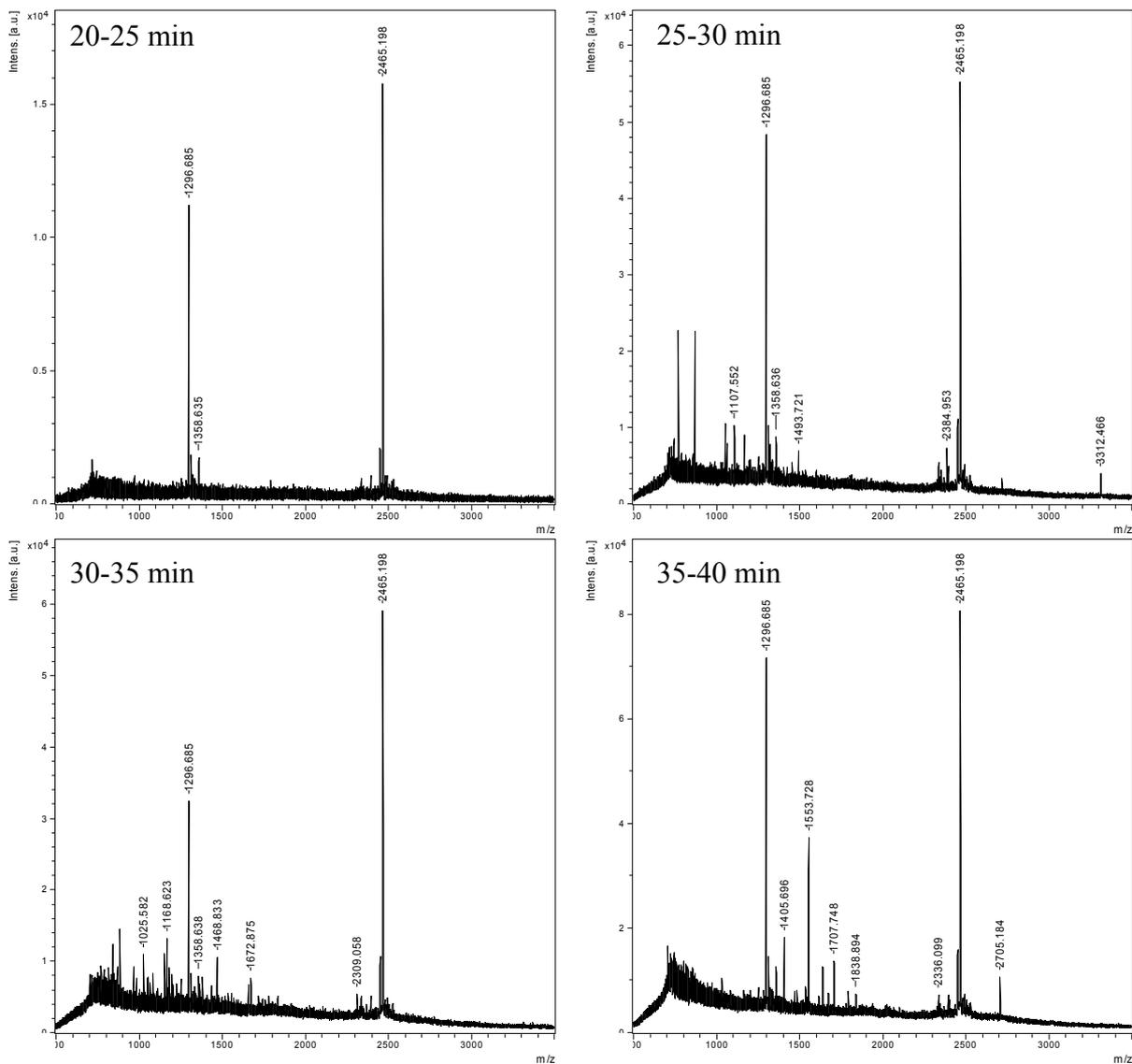
Gesamtproteingehalt der aufgetragenen Probe: 300µg bei 30µl Probevolumen, Trennung mittels 2-D-SDS-Gelelektrophorese (Trenngel 10%) und anschließender Behandlung mit TEPC-15 mAk (1:1000), Zweitantikörper Anti-Maus AP (Dako 0486), Färbung mittels alkalischer Phosphatase. Proteinstandard: Bio-Rad Prestained Precision Protein Standard.

3.5 Proteolytischer in Gel Verdau von Proteinen

Der tryptische Verdau der mittels der 2D-Gelelektrophorese detektierten PC-positiven Spots erfolgte wie unter 2.3.4 beschrieben. Im Anschluss wurden das so gewonnene Probenmaterial der Analyse mittels MALDI-TOF-MS wie unter 2.4.2. beschrieben zugeführt.

3.6 Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF-MS

Trypsin-Verdau



Ergebnisse

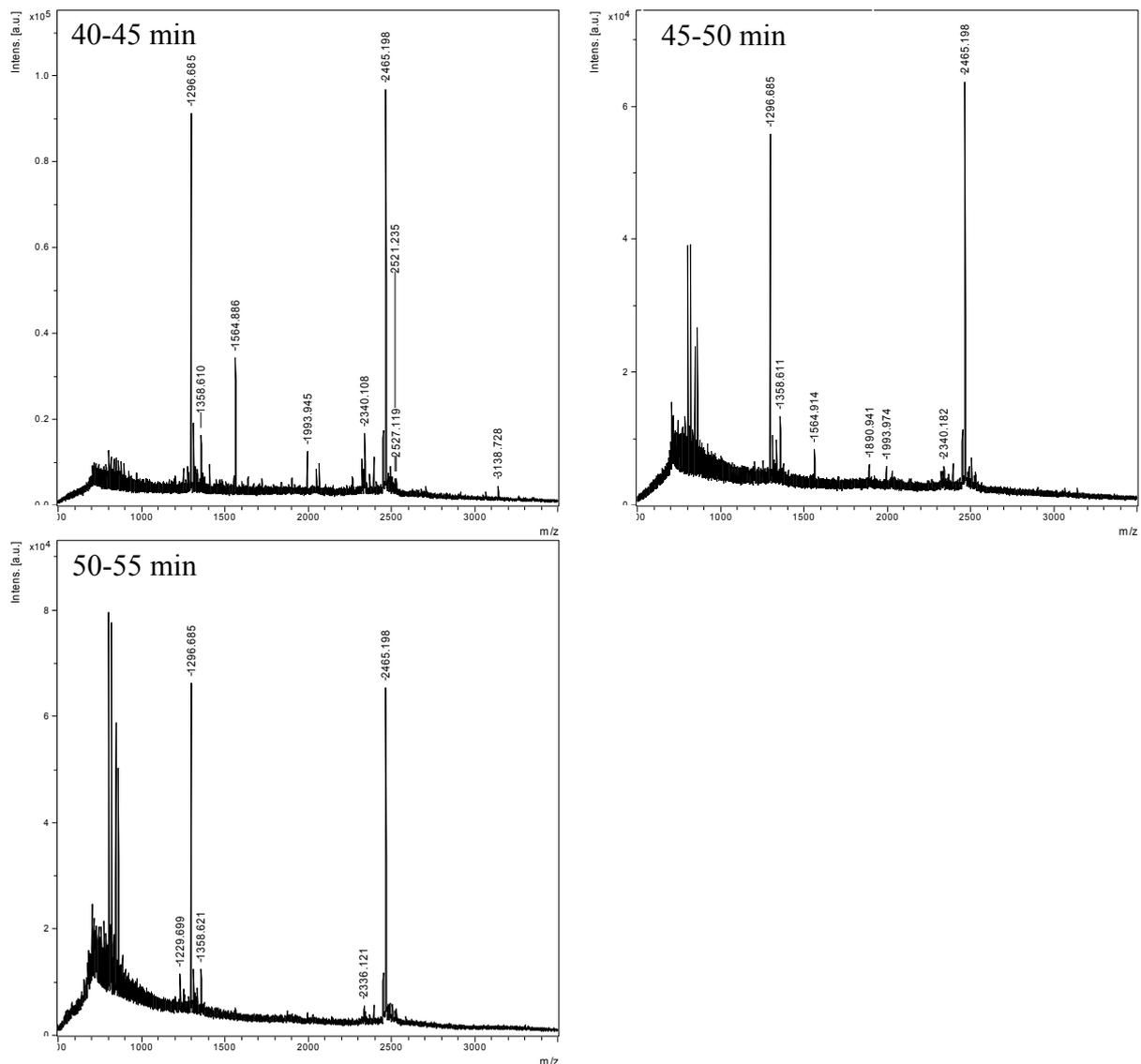


Abbildung 3.8: MALDI-TOF-MS Analyse der nano-LC Fraktionen des tryptischen Verdaus

Zur Identifizierung des PC-substituierten Proteins wurde dieses aus dem 2D-Gel ausgeschnitten und im-Gel proteolytisch mit Trypsin gespalten. Die eluierten Peptide wurden anschliessend auf einer nano-LC Säule aufgetrennt. Es wurden jeweils 5 min Fraktionen direkt über einen Fraktionskollektor auf MALDI-Targets gesammelt. Zur internen Kalibrierung wurden die Peptide Angiotensin I ($[M+H]^+$ 1296,685 Da) und ACTH ($[M+H]^+$ 2465,198 Da) zugesetzt. Die erhaltenen Massen aus den einzelnen Fraktionen wurden zu einer Massenliste zusammengeführt (s. Tab) und diese für die Datenbanksuche verwendet.

Ergebnisse

m/z [M+H] ⁺	Intensität	Zuordnung
1025.582	6273.680	
1051.658	3280.610	
1064.553	4075.620	
1082.590	3746.880	
1107.552	6868.310	
1151.641	7045.650	
1165.586	5256.860	Keratin
1168.623	9134.630	
1179.595	4891.180	Keratin
1198.675	3301.920	
1229.699	6205.580	
1251.655	5057.050	
1277.681	4564.500	
1310.678	5913.410	
1320.586	3458.730	
1324.696	4576.560	
1334.650	4643.170	
1358.610	12372.820	
1358.611	8629.530	
1358.620	7543.570	
1358.621	8299.350	
1360.622	5317.750	
1363.702	5130.130	
1379.715	3463.860	
1405.696	12367.930	
1407.695	5585.770	
1468.833	6680.070	
1493.721	3556.230	
1535.721	3591.710	
1553.728	32122.070	
1564.886	29809.400	
1638.837	8177.920	
1657.802	2792.450	
1672.875	3626.100	
1707.748	9648.930	
1790.855	3672.090	
1838.894	2542.140	
1890.941	2090.270	
1901.960	2241.590	
1993.945	8198.460	Keratin
2047.015	4093.830	
2064.092	5733.260	
2266.737	2238.140	
2309.058	2596.260	
2321.100	5592.540	
2336.086	4869.630	
2340.108	9520.750	
2384.953	2556.030	
2394.146	5300.320	
2450.297	2587.820	
2450.547	8050.430	
2481.188	1656.620	

Ergebnisse

2487.224	1392.890
2493.187	3718.980
2493.210	1886.900
2503.139	2671.290
2504.153	1867.970
2521.235	2575.250
2527.119	2331.540
2705.184	5129.630
3138.728	1471.620
3312.466	1563.580

Tabelle 2.1: Massenliste nach tryptischem Verdau, welche zur Datenbanksuche verwendet wurde

Für die Datenbanksuche wurde das MASCOT Suchprogramm verwendet. Für die Suche wurden die optionale Oxidation von Methionin sowie das Überspringen einer tryptischen Spaltstelle erlaubt. Die Massengenauigkeit wurde auf 100 ppm festgelegt. Es wurden die Datenbanken MSDB, NCBIR sowie die EST-Datenbanken durchsucht. Es wurde keinerlei Einschränkung hinsichtlich des Organismus vorgegeben. Keine der Suche ergab jedoch eine statistisch signifikante Proteinidentifikation.

Ergebnisse

Glu-C-Verdau

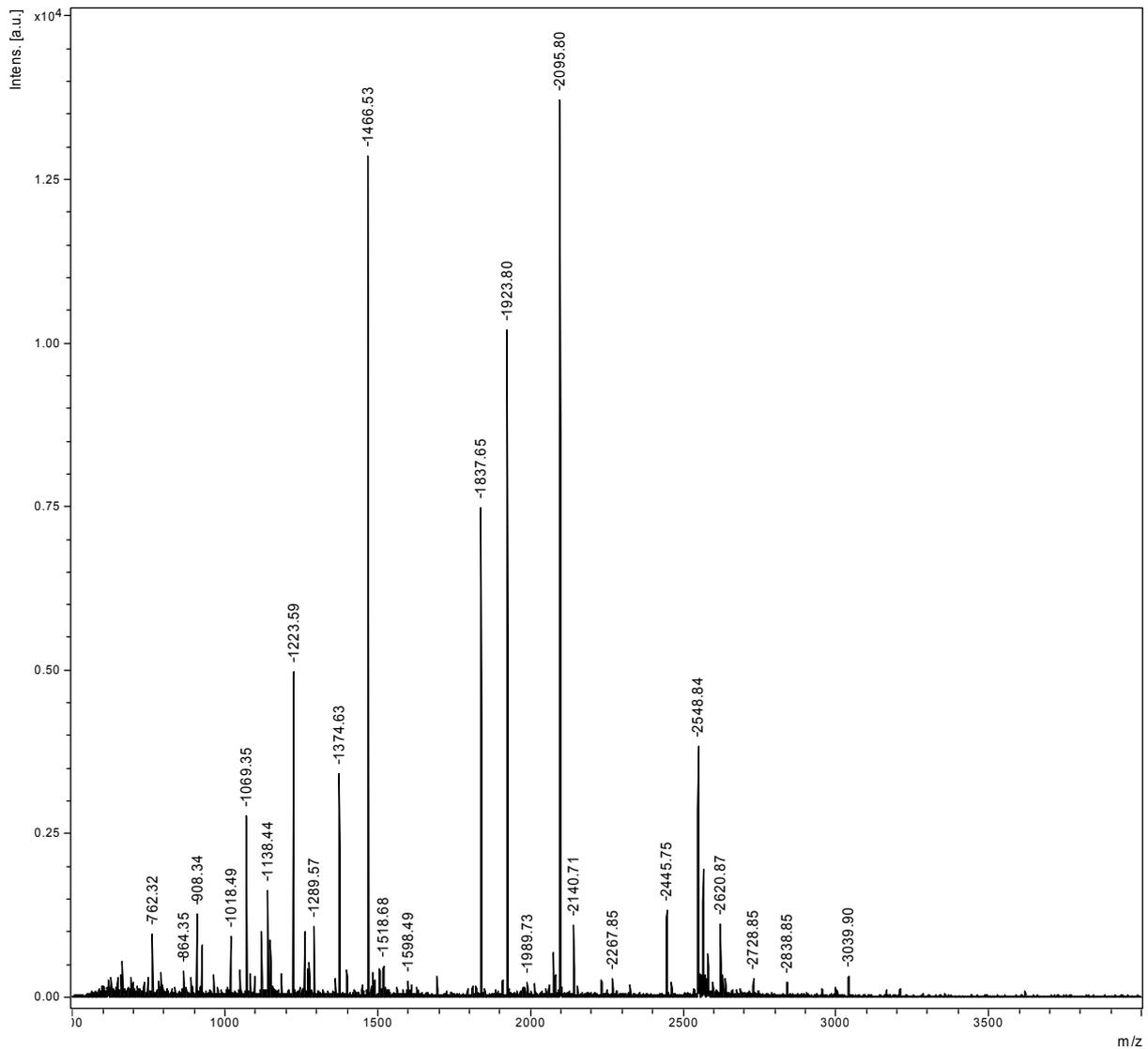


Abbildung 3.9: MALDI-TOF-MS Analyse des Glu-C Verdau

m/z	Intens.	Zuordnung
762.32	920.08	
864.35	309.69	
890.42	281.06	
908.34	1207.65	
925.36	773.47	
1018.49	944.18	
1069.35	2828.24	Autolyse
1080.40	340.02	
1097.42	257.46	Autolyse
1117.53	958.03	Autolyse
1121.41	226.39	
1138.44	1794.80	
1148.52	798.01	
1184.37	361.70	

Ergebnisse

1223.59	5018.00	Autolyse
1260.52	953.08	Autolyse
1272.42	406.65	
1276.55	297.52	
1289.57	963.57	Autolyse
1359.61	241.70	
1374.63	3242.26	Autolyse
1399.54	371.67	
1466.53	13173.82	Autolyse
1483.50	338.62	
1489.64	229.62	
1505.59	442.47	
1518.68	458.52	Autolyse
1598.49	195.95	
1837.65	7299.86	
1908.77	193.69	
1923.80	9155.92	
1989.73	159.93	
2060.79	139.00	
2074.64	538.57	
2080.79	244.18	
2095.80	11717.95	
2140.71	881.92	
2267.85	175.18	
2442.83	583.98	
2445.75	906.32	
2548.84	2747.94	
2564.83	1312.99	
2577.85	309.71	
2580.83	339.89	
2620.87	739.45	
2627.82	206.89	
2636.86	162.01	
2728.85	151.44	
2838.85	116.90	
3039.90	160.87	

Tabelle 2.2: Massenliste nach Glu-C Verdau, welche zur Datenbanksuche verwendet wurde

Ergebnisse

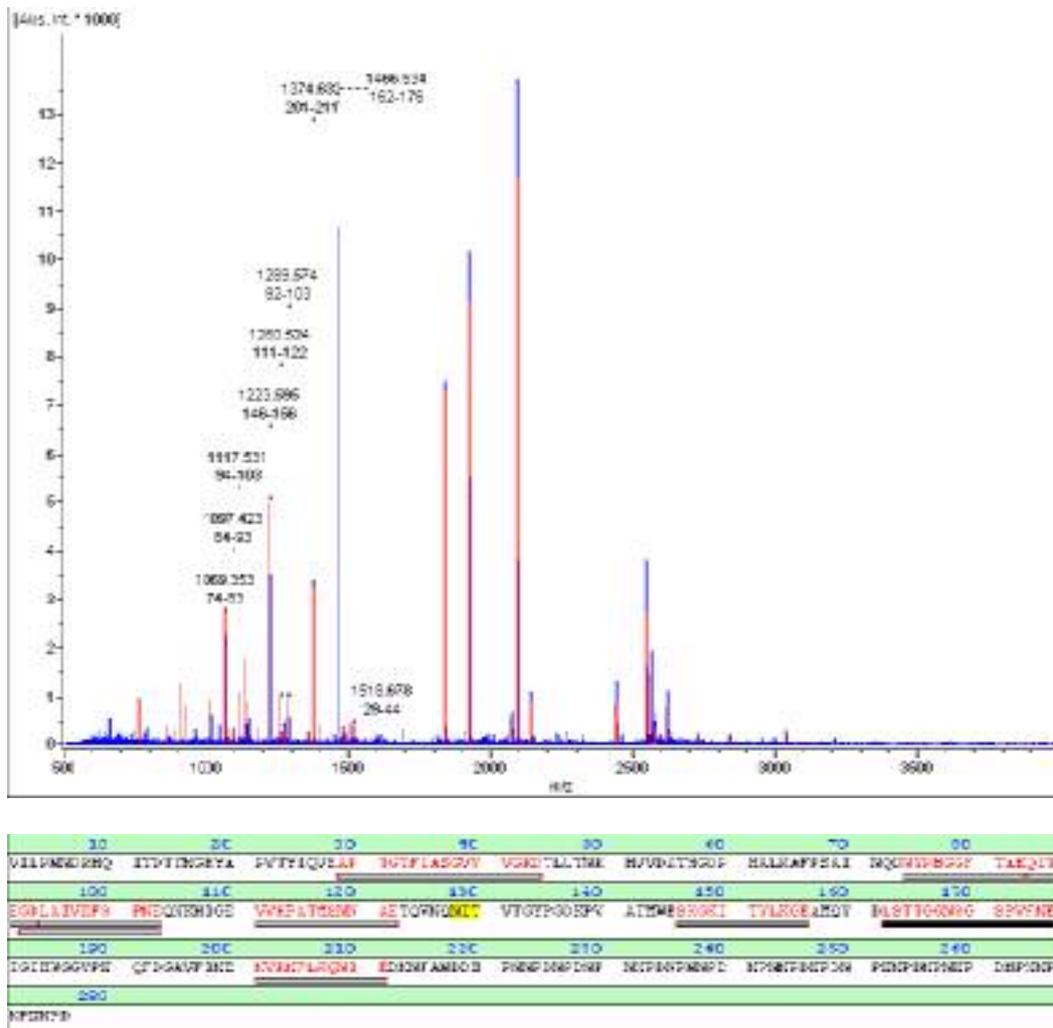


Abbildung 3.10: Zuordnung der Autolyse-Produkte nach Verdau mit Glu-C

Für die Datenbanksuche wurde wiederum das MASCOT Suchprogramm verwendet. Für die Suche wurden die optionale Oxidation von Methionin sowie das Überspringen einer proteolytischen Spaltstelle erlaubt. Die Massengenauigkeit wurde auf 100 ppm festgelegt. Es wurden die Datenbanken MSDB, NCBIR sowie die EST-Datenbanken durchsucht. Es wurde keinerlei Einschränkung hinsichtlich des Organismus vorgegeben. Keine Suche ergab jedoch eine statistisch signifikante Proteinidentifikation. Lediglich zahlreiche Autolyse-Produkte von Glu-C konnten identifiziert werden.

Chymotrypsin-Verdau

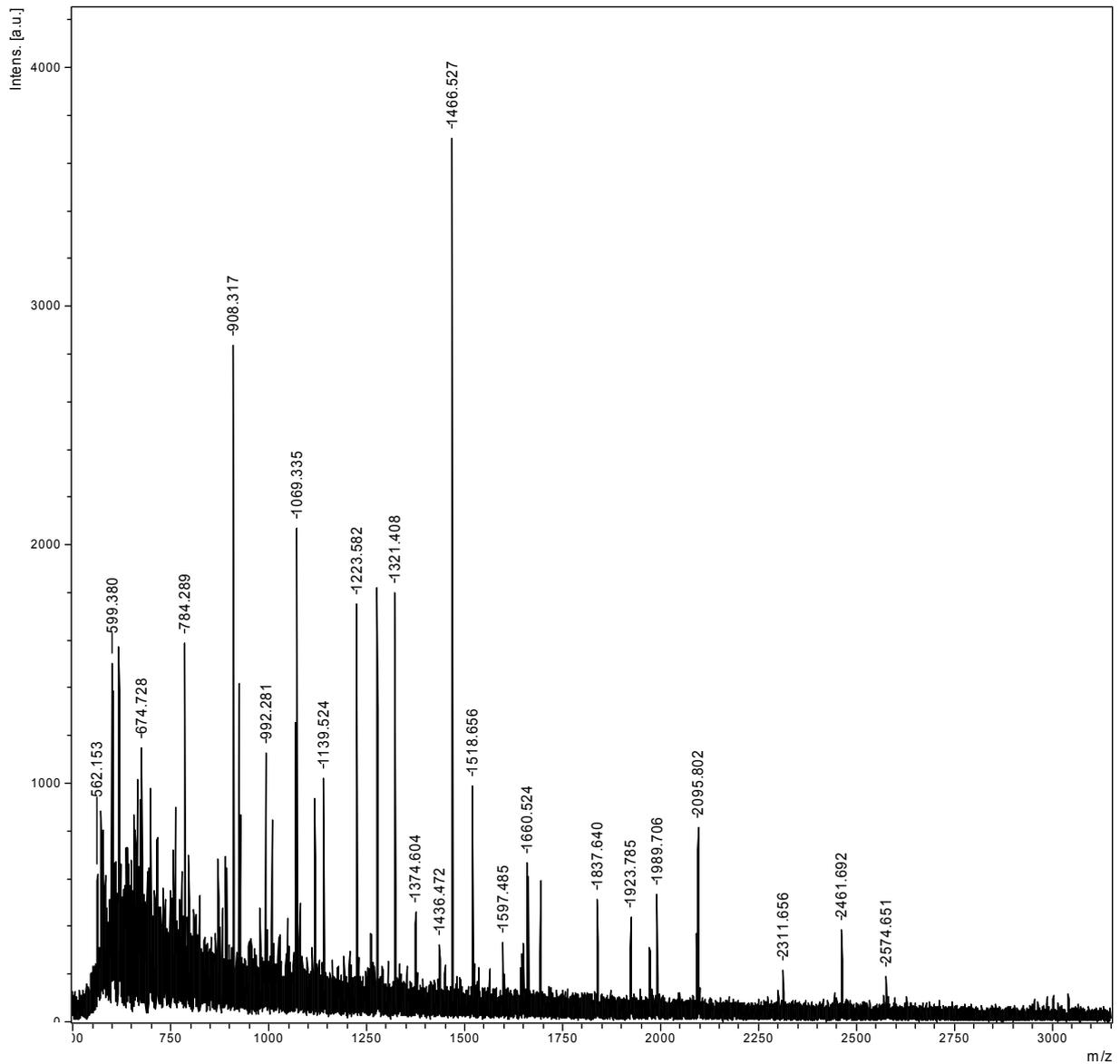


Abbildung 3.11: MALDI-TOF-MS Analyse des Chymotrypsin Verdau

m/z	Intens.	Zuordnung
890.40	516.07	
908.32	2414.33	
925.34	1163.93	
992.28	945.68	
1008.46	584.95	
1048.20	309.90	
1069.34	1199.35	
1070.35	1148.71	Autolyse
1080.41	318.02	
1117.51	819.05	
1139.52	838.42	
1223.58	1504.77	
1260.51	277.31	

Ergebnisse

1276.49	1597.24
1321.41	1729.98
1374.60	337.53
1436.47	201.99
1466.53	3830.35
1518.66	786.94
1522.44	197.10
1597.49	231.36
1647.49	233.83
1660.52	565.52
1693.61	443.88
1837.64	343.74
1923.79	230.62
1972.58	226.36
1989.71	407.69
2090.63	188.54
2095.80	614.16
2311.66	136.95
2461.69	208.83
2574.65	69.98

Tabelle 2.3: Massenliste nach Chymotrypsin-Verdau, welche zur Datenbanksuche verwendet wurde

Für die Datenbanksuche wurde wiederum das MASCOT Suchprogramm verwendet. Für die Suche wurden die optionale Oxidation von Methionin sowie das Überspringen zweier proteolytischen Spaltstellen erlaubt. Die Massengenauigkeit wurde auf 100 ppm festgelegt. Es wurden die Datenbanken MSDB, NCBIR sowie die EST-Datenbanken durchsucht. Es wurde keinerlei Einschränkung hinsichtlich des Organismus vorgegeben. Keine Suche ergab jedoch eine statistisch signifikante Proteinidentifikation.

3.7 Immunhistologische Untersuchungen an *S. mansoni* Adultwürmern und Eiern

3.7.1 Nachweis von Antigenen mit PC-Substituenten beim adulten Wurm

An Paraffinschnitten von *S. mansoni* Adultwürmern wurden immunhistochemische und immunfluoreszierende Untersuchungen auf PC-positive Strukturen durchgeführt (s. 2.5.1), wobei sich im IFT folgende Bilder zeigten:

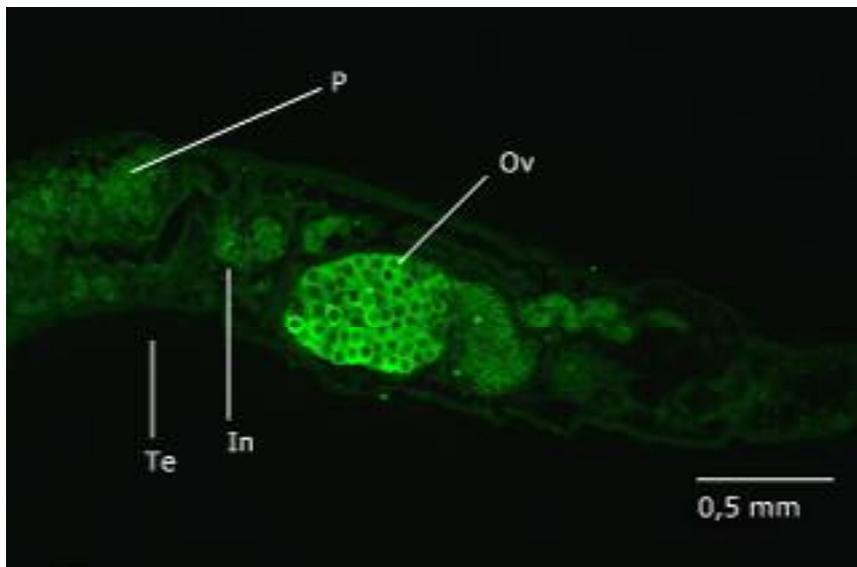


Abbildung 3.12: Lokalisation von PC-Proteinen in *S. mansoni* Adultwürmern (Längsschnitt).

1. Ak TEPC15 (1:10) 2h RT, 2. AK FITC konj. Goat α Mouse Polyvalent IgG (Sigma) (1:100) 2h RT, jew. in PBS 2%BSA. Vergrößerung 200f. PC-positiv: Ovarien bzw. Gonaden der Adultwürmer.

Te: Tegument, **In:** Intestinum, **P:** Parenchym, **Ov:** Ovarien.

Ergebnisse

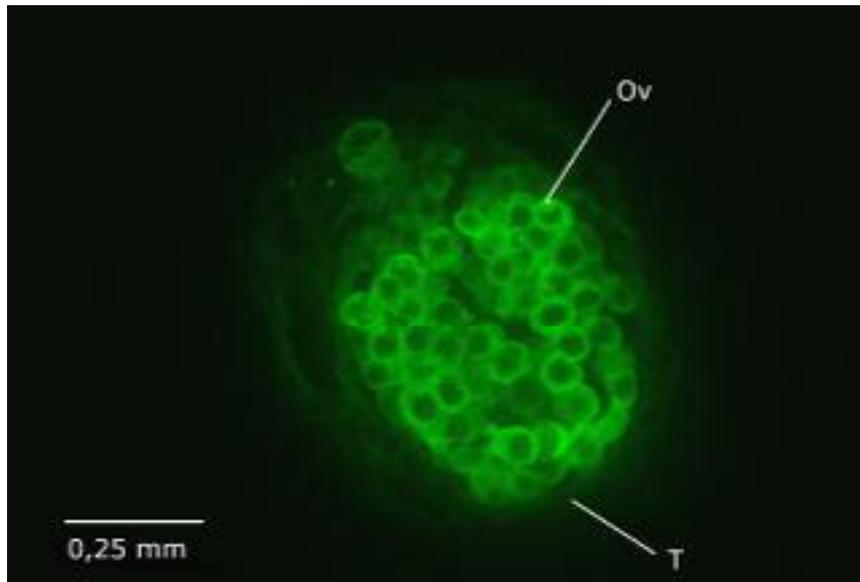


Abbildung 3.13: Lokalisation von PC-Proteinen in *S. mansoni* Adultwürmern (Querschnitt).

1. Ak TEPC15 (1:10) 2h RT, 2. AK FITC-Goatα Mouse Polyvalent IgG (Sigma) (1:100) 2h RT, jew. in PBS 2%BSA. Vergrößerung 400f. PC-positiv: Ovarien bzw. Gonaden der Adultwürmer. **T:** Tegument, **Ov:** Ovarien

Auf den Abbildungen 3.12 und 3.13 ist ein Längs- bzw. Querschnitt durch ein adultes *S. mansoni* Weibchen zu sehen. In beiden Abbildungen ist deutlich eine stark ausgeprägte PC-spezifische Fluoreszenz zu erkennen. Bei den entsprechenden Strukturen handelt es sich um den Reproduktionstrakt, genauer um die Ovarien der weiblichen Adultwürmern [1]. Weitere immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass die Fluoreszenz auch nach Extraktion der Glykolipide mittels Chloroform:Methanol 1:1 (s.2.5.1) weiterhin vorhanden war (s. Abb.3.14)

Ergebnisse

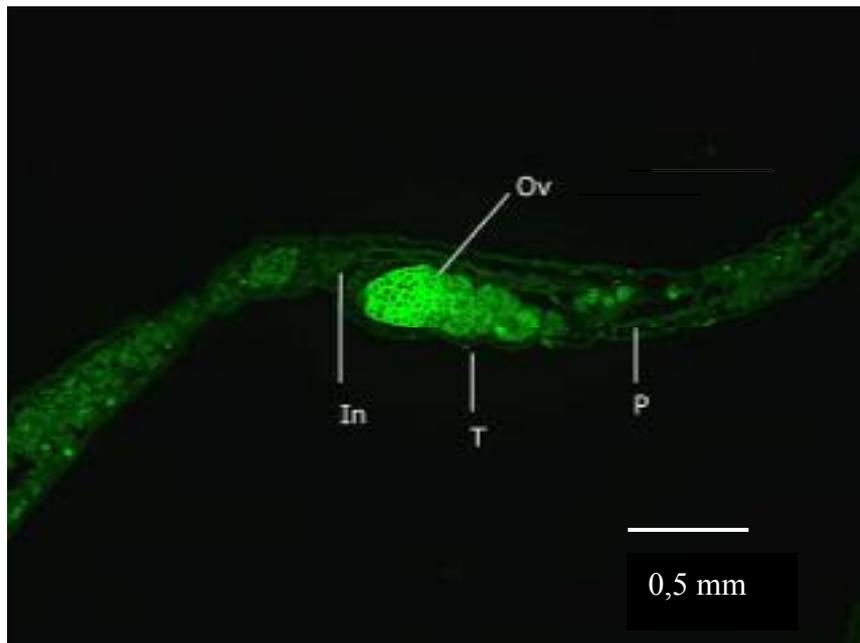


Abbildung 3.14: Lokalisation von PC-Proteinen in *S.mansoni* Adultwürmern

Längsschnitt, nach Glykolipidextraktion, 1.Ak TEPC15 (1:10) 2h RT, 2. AK FITC konj. GoataMouse Polyvalent IgG (Sigma) (1:100) 2h RT, jew. in PBS 2%BSA. Vergrößerung 100f. PC-positiv: Ovarien bzw. Gonaden der Adultwürmer (nach CM-Beh.)

T: Tegument, **Ov:** Ovarien, **In:** Intestinum, **P:** Parenchym

Die jeweils parallel dazu angefertigten Kontrollpräparate bestätigten zum einen die Spezifität des TEPC-15mAk, zum anderen konnte hierdurch ebenfalls eine Autofluoreszenz von Strukturen aus *S. mansoni* Adultwürmern ausgeschlossen werden (s. Abb.3.15).

Ergebnisse

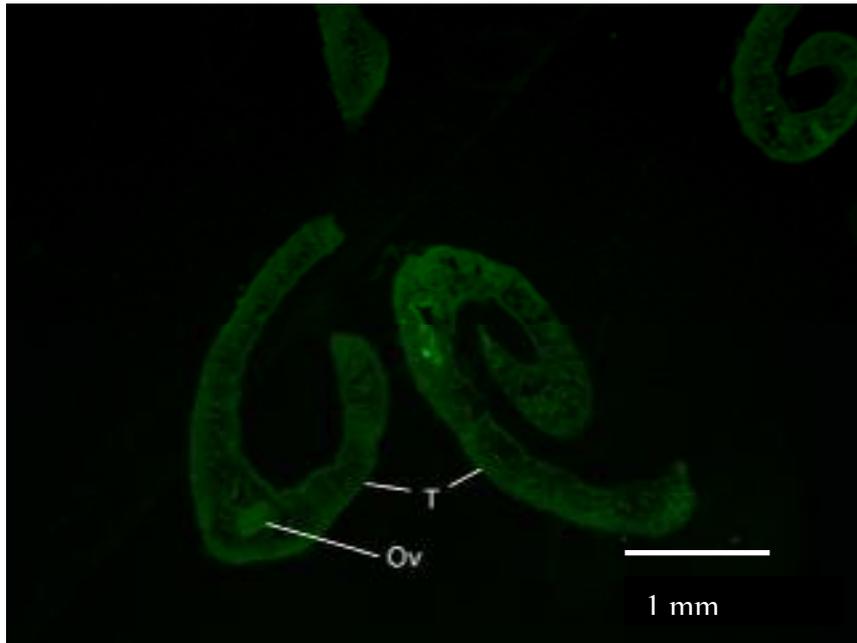


Abbildung 3.15: Kontrollfärbung von *S. mansoni* Adultwürmern (Längsschnitt).

Kein 1.Ak, 2. AK FITC konj. GoatαMouse Polyvalent IgG (Sigma) (1:100) 2h RT, jew. in PBS 2%BSA inkubiert. Vergrößerung 100f.. Keine unspezifische 2.-AK-Bindung, keine Autofluoreszenz

Te: Tegument, **Ov:** Ovarien.

3.7.2 Le^x mAk-Untersuchungen am adulten Wurm und Eiern von *S.*

mansoni

An Paraffinschnitten von *S. mansoni* Adultwürmern wurden des Weiteren Immunfluoreszenz-Untersuchungen auf Le^x-positive Strukturen durchgeführt (s. 2.5.1), wobei sich im IFT folgende Bilder zeigten:

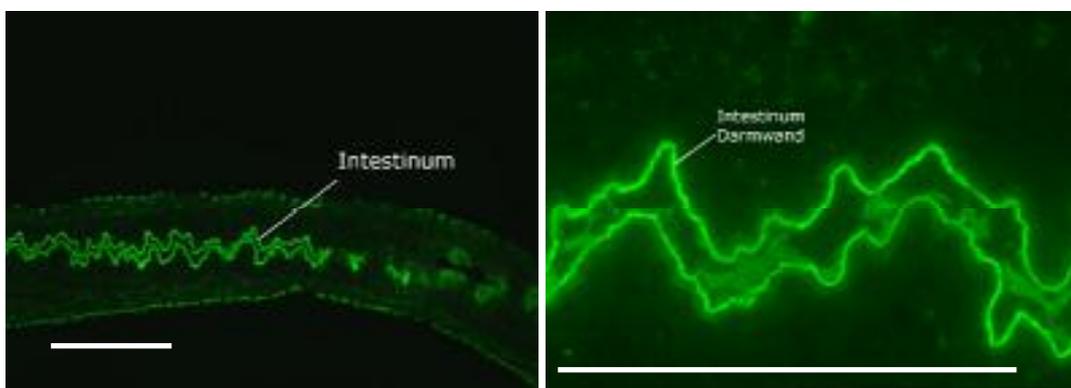


Abbildung 3.16: Lokalisation von Le^x-Proteinen in *S. mansoni* Adultwürmern (Längsschnitt).

1.Ak Le^x(1:10) 2h RT, 2. AK FITC konj. GoatαMouse Polyvalent IgG (Sigma) (1:100) 2h RT, jew. in PBS 2%BSA. Vergrößerung A: 100f. , B: 400f. Le^x-positiv: Anteile des Darmes der Adultwürmer. Der Maßstab entspricht jew. 0,5 mm

Ergebnisse

In Abbildung 3.16 handelt es sich um einen Längsschnitt eines adulten Wurmes nach Inkubation mit dem beschriebenen Le^x-Antikörper. Le^x-positive Signale zeigen sich hellgrün fluoreszierend. Die gut erkennbare spezifische Fluoreszenz lässt sich eindeutig dem Darm des Wurmes zuordnen, alle anderen Bereiche sind Le^x-negativ. Ähnliche Ergebnisse wie bei den Untersuchungen der Adultwürmer ließen sich auch bei den immunhistochemischen und immunfluoreszierenden Untersuchungen von *S. mansoni* Eiern in Lebergranulomen von infizierten Mäusen beobachten. Hierbei handelt es sich ebenfalls um in Paraffin eingebettete Präparate, die den Adultwürmern entsprechend behandelt wurden (s. 2.5.2). Als Erstantikörper kamen TEPC-15, Le^x und M2D3H zur Anwendung. Als Zweitantikörper fanden zum einen ein peroxidasekonjugierter AK (RabbitαMouse HRP (Dako 0260)) und zum anderen ein FITC-gekoppelter GoatαMouse-Antikörper (Sigma) Verwendung.

3.7.3 Detektion von PC-positiven Strukturen und definierten Kohlenhydratepitopen in Eipräparaten von *S. mansoni*

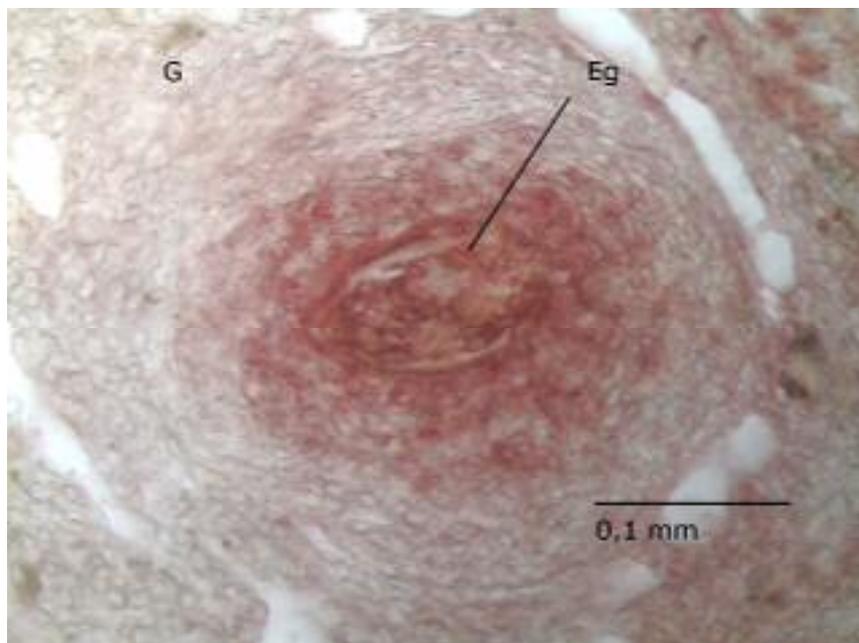


Abbildung 3.17: Lokalisation von PC-Proteinen in *S.mansoni* Eiern (Längsschnitt durch Eigranulome einer Mäuseleber).

1.Ak TEPC15 (1:100) 1h RT, 2. AK RabbitαMouse HRP (Dako 0260) (1:100) 1h RT, jew. in PBS 2%BSA. Vergrößerung 400f. PC-positiv: Ei und das Ei umgebende Granulomgewebe.

Eg: Ei, **G:** Granulom

Ergebnisse

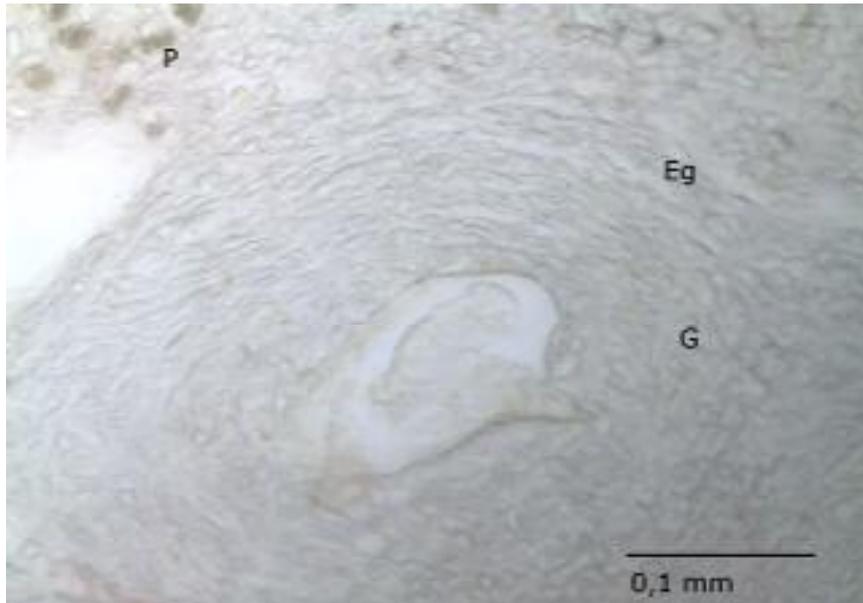


Abbildung 3.18: Kontrollfärbung von *S.mansoni* Eipräparaten (Längsschnitt).

Kein 1.Ak, 2. AK Rabbit+Mouse HRP (Dako 0260) (1:100), jew. In PBS 2%BSA für 1h bei RT inkubiert. Vergrößerung 400f.. Keine unspezifische 2.-AK-Bindung, keine unspez. Peroxidasereaktion.

Eg: Ei, **G:** Granulom, **P:** Leberparenchym

Wie aus der Abbildung 3.17 ersichtlich kommt es zu einer starken Peroxidasereaktion im Bereich des Eies und des umliegenden Granulomgewebes, deutlich erkennbar an der ausgeprägten Rotfärbung der entsprechenden Strukturen, welche dementsprechend PC-antigene Merkmale tragen. Besonders auffällig ist hierbei das umgebende Granulomgewebe, welches ebenfalls eine deutliche Farbreaktion zeigt. Dieser Befund war für die Detektion PC-tragender Antigenstrukturen sowohl in der Immunhistochemie als auch in der Immunfluoreszenz (Abb. 3.19) spezifisch und war in weiteren Untersuchungen auf Le^x- (s. Abb. 3.20) und M2D3H- (s. Abb. 3.21) positive Strukturen nicht zu beobachten. Hier kam es isoliert am Ei zur entsprechenden Antikörperbindung.

Ergebnisse

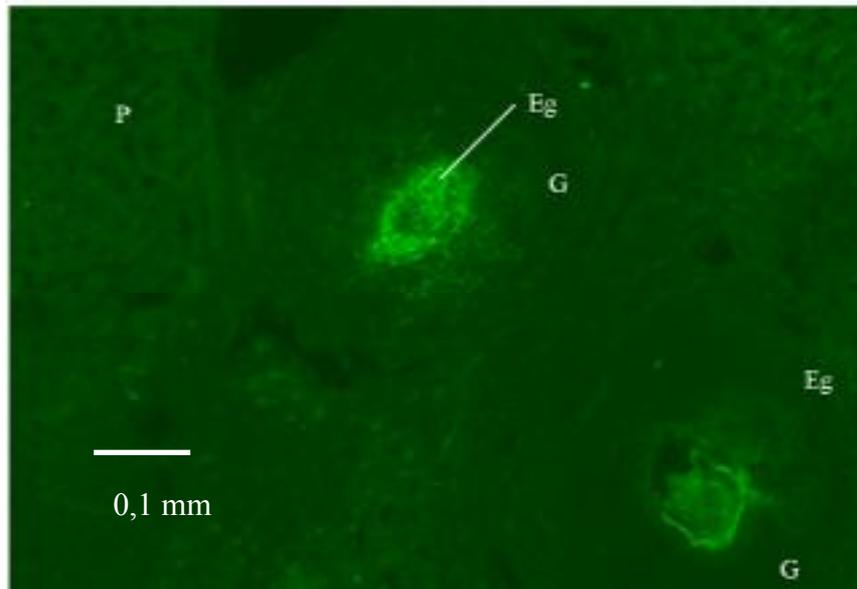


Abbildung 3.19: Lokalisation von PC-Proteinen in *S. mansoni* Eiern (Längsschnitt durch Eigranulome einer Mäuseleber).

1. Ak TEPC15 (1:100) 1h RT, 2. AK FITC conj. Goat α Mouse Polyvalent IgG (Sigma) (1:100) 1h RT, jew. in PBS 2%BSA. Vergrößerung 200f. PC-positiv: Ei und das das Ei umgebende Granulomgewebe.

Eg: Ei, **G:** Granulom, **P:** Leberparenchym

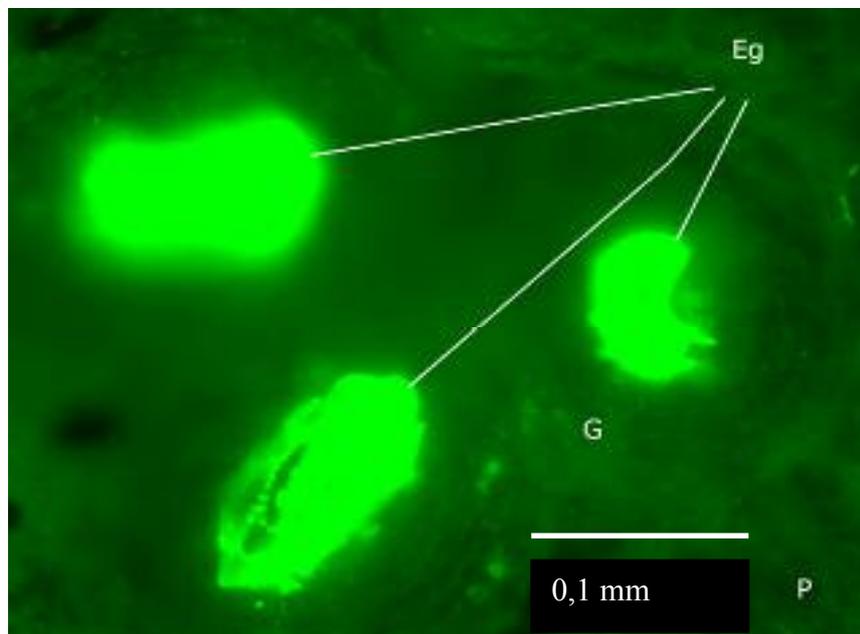


Abbildung 3.20: Lokalisation von Le^x-positiven Proteinen in *S. mansoni* Eiern (Längsschnitt durch Eigranulome einer Mäuseleber).

1. Ak Le^x(1:100) 1h RT, 2. AK FITC conj. Goat α Mouse Polyvalent IgG (Sigma) (1:100) 1h RT, jew. in PBS 2%BSA. Vergrößerung 400f. Le^x positiv: das Ei **ohne** das umgebende Granulom

Eg: Ei, **G:** Granulom, **P:** Leberparenchym

Ergebnisse

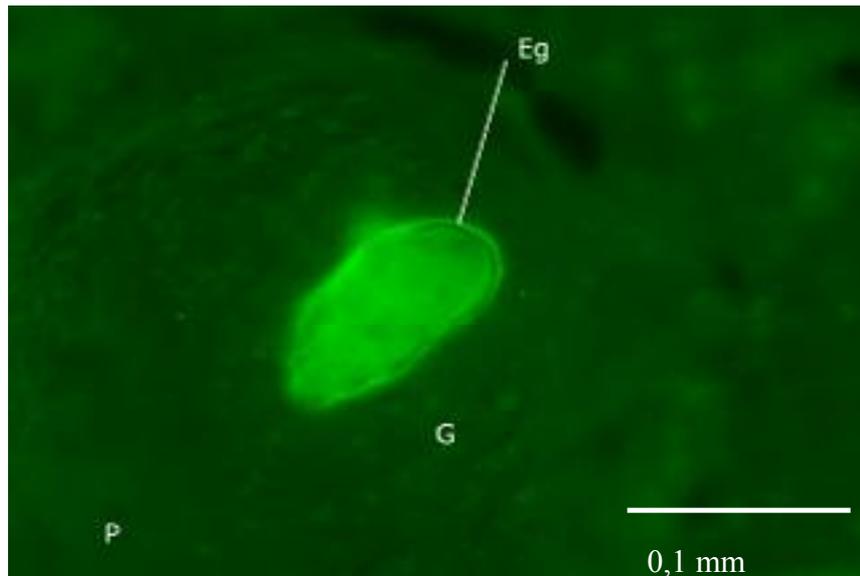


Abbildung 3.21: Lokalisation von M2D3H-positiven Proteinen in *S.mansoni* Eiern (Längsschnitt durch Eigranulome einer Mäuseleber).

1. Ak M2D3H (1:100) 1h RT, 2. AK FITC konj. Goat α Mouse Polyvalent IgG (Sigma) (1:100) 1h RT, jew. in PBS 2%BSA. Vergrößerung 400f. M2D3H-positiv: Ei ohne das umgebende Granulomgewebe.

Eg: Ei, **G:** Granulom, **P:** Leberparenchym

Die parallel dazu angefertigten Kontrollpräparate bestätigten zum einen die Spezifität der jeweiligen Erstantikörper (TEPC-15mAk, Le^x und M2D3H) und zum anderen konnte hierdurch ebenfalls eine Autofluoreszenz von Strukturen aus *S. mansoni* Eiern ausgeschlossen werden (s. Abb.3.22).

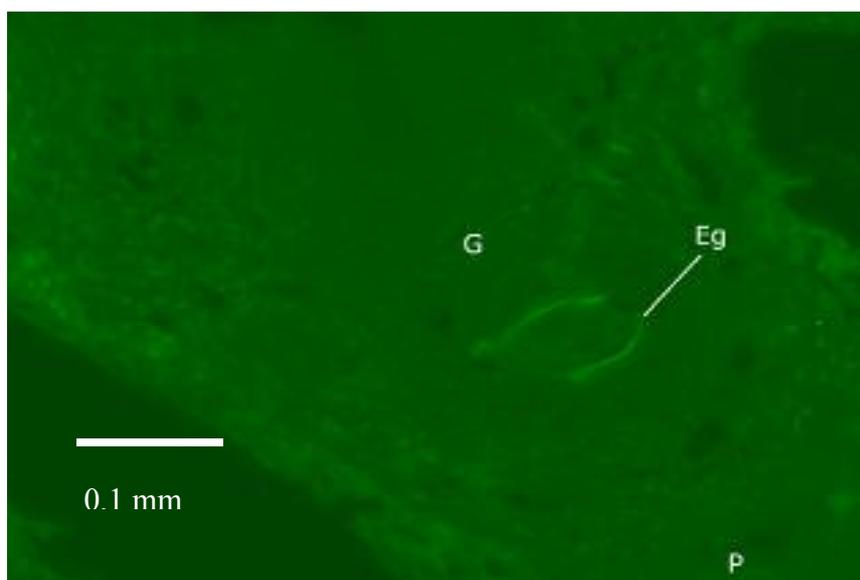


Abbildung 3.22: Kontrollfärbung von *S. mansoni* Eipräparaten (Längsschnitt).

Kein 1. Ak, 2. AK FITC α Mouse Polyvalent IgG (Sigma) (1:100) 2h RT, jew. In PBS- 2%BSA inkubiert. Vergrößerung 200f.. Keine unspezifische 2.-AK-Bindung, keine Autofluoreszenz.

Eg: Ei, **G:** Granulom, **P:** Leberparenchym

4. Diskussion

4.1. Verbreitung von Antigenen mit Phosphocholin-Epitopen bei Helminthen

Phosphocholin wurde als posttranslationale Modifikation von Proteinen oder als zwitterionischer Substituent auf Glykosphingolipiden in der Vergangenheit bereits in einer Vielzahl von Organismen beschrieben [31] [58]. In jüngerer Vergangenheit wurden auch immer mehr dieser PC-haltigen Epitope strukturell aufgeklärt [31, 47, 59-66], [67]. Bei den Helminthen zeigten diese Untersuchungen, dass PC-Epitope auf Glykosphingolipiden ausschließlich bei Nematoden vorkommen [58, 68]. Die umfangreichsten Kenntnisse über diese PC-Epitope liegen für *C. elegans* und *Ascaris suum* vor [47, 59, 63, 69-71]. Die Substitution von Proteinen mit PC ist jedoch bei den Helminthen weiter verbreitet. Bei Nematoden liegen entsprechende Strukturdaten für N-Glykane mit zusätzlichen PC-Substituenten für *C. elegans* [64, 65], *A. suum* [72], *T. spiralis* [60, 73, 74] und *A. viteae* [36] vor. Es handelt sich hierbei zumeist um trunkierte N-Glykanstrukturen, bei denen terminale *N*-Acetylglucosamin-Reste in der C-6 Position mit PC substituiert sind. Bislang wurden jedoch erst wenige Proteine aus diesen Organismen als PC-modifiziert identifiziert, da bei den meisten Untersuchungen zunächst die N-Glykane abgespalten wurden und nur diese strukturell aufgeklärt wurden. Bislang wurden bei den Nematoden erst zwei Proteine als PC-tragend identifiziert: das exkretorisch-sekretorische Protein ES-62 aus *A. viteae* [36] sowie die Aspartylprotease ASP-6 aus *C. elegans* [75]. In einer ersten proteom-weiten Untersuchung bei *C. elegans* konnte kürzlich eine größere Anzahl an PC-substituierten Proteinen identifiziert werden [76]. Diese Arbeit zeigte, dass bei Nematoden funktionell ganz unterschiedliche Proteine mit PC substituiert werden. Zudem ergaben diese Arbeiten erste Hinweise darauf, dass die PC-Substituenten auf Proteinen nicht notwendigerweise über N-Glykane gebunden sein müssen. Dies deutet auf eine höhere strukturelle Vielfalt dieser Epitope hin.

Während bei den Cestoden bislang weder auf Glykosphingolipid- noch auf Protein-Ebene PC-Modifikationen beschrieben wurden, datierten erste Berichte über PC-Modifikationen bei *S. mansoni* bereits aus den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts [77]. Dort wurde erstmals durch ELISA das Vorhandensein von PC-Epitopen gezeigt. Untersuchungen von M. Wuhrer

zeigten, dass auf Glykosphingolipid-Ebene keine PC-Substituenten bei *S. mansoni* vorliegen [78].

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals anhand von Westernblot Untersuchungen mit dem PC-spezifischen Antikörper TEPC-15 gezeigt werden, dass *S. mansoni* über ein ca. 52 kDa großes Protein verfügt, das mit diesem Antikörper spezifisch reagiert. Die Spezifität dieser Erkennung konnte durch die Blockierung des Antikörpers mit Phosphocholin gezeigt werden. Eine stadienspezifische Analyse zeigte weiterhin, dass diese Protein-Modifikation nur im Adult und Ei-Stadium zu detektieren war. Da für diese Untersuchungen jeweils gemischt-geschlechtliche Populationen untersucht wurden, konnte bislang noch nicht eindeutig festgestellt werden, ob die Expression des PC-Epitops geschlechtsspezifisch erfolgt.

4.2. Methodische Aspekte zum Nachweis PC-substituierter Epitope bei *S. mansoni*

Eine zweidimensionale Auftrennung der Proteine aus dem Adultstadium zeigte, dass es sich bei dem PC-modifizierten Protein um ein recht basisches Protein (pH ca. 9-10) handelt. Wie die massenspektrometrische Analyse des Proteins zeigte, lieferte der tryptische Verdau nur eine geringe Anzahl von Peptiden im Massenbereich von 1000-2000 Da. Diese Peptide wurden mittels nano-LC aufgetrennt und fraktionsweise auf MALDI-TOF Probenhalter gesammelt. Dieses Vorgehen sollte eventuelle Unterdrückungsphänomene bei der Ionisation im Massenspektrometer ausschliessen und so mehr Peptidsignale liefern. Die anschließende Suche mit diesen Peptidmassen in den Datenbanken ergab jedoch keine statistisch sichere Identifikation des Proteins. Hierzu dürfte die geringe Zahl an detektierten Peptiden beigetragen haben. Möglicherweise verfügt das Proteine über sehr viele basische Aminosäuren wie Lysin und Arginin, was beim Verdau mit Trypsin zu einer Vielzahl kleiner Fragmente führt, die sich nicht gut für eine Identifikation eignen.

Auch die Verwendung anderer Proteasen, die andere Spaltstellen verwenden und so vielleicht zu größeren Fragmenten führen, erbrachte nicht den gewünschten Erfolg. Ein anderer wichtiger Punkt für das Scheitern der Identifikation liegt aber in dem Fehlen ausreichender genetischer Sequenzdaten von *S. mansoni*. Trotz jahrelanger Anstrengungen ist noch immer keine komplette Gensequenz von *S. mansoni* verfügbar. Es liegt einzig eine EST-Datenbank öffentlich vor, die jedoch naturgemäß nur die N-Termini der exprimierten Proteine umfasst und ferner sehr reich an Fehlern ist [79-82]. Nach Abschluss des Genomprojektes von *S. mansoni* und seiner Veröffentlichung sollte es jedoch ohne weiteres möglich sein, das Protein

zu identifizieren und dann auch das PC-Epitop zu lokalisieren. Da auch bei diesem Protein eine Behandlung mit PNGase F und PNGase A keinen Einfluß auf die Reaktivität gegenüber TEPC-15 hatte, ist zu vermuten, dass auch hier, ähnlich wie bei *C. elegans* Enzym ASP-6, der PC-Substituent eventuell nicht über ein N-Glykan gebunden ist. Zur funktionellen Charakterisierung des PC-substituierten Proteins von *S. mansoni* wurden Paraffin-Dünnschnitte von adulten Würmern zur Lokalisation dieses Proteins verwendet. Diese zeigten, dass das PC-Epitop überwiegend in den Gonaden weiblicher Würmer zu finden war.

Dünnschnitte der Leber von *S. mansoni* infizierten Mäusen zeigten zudem eine starke positive Reaktion des TEPC-15 Antikörpers mit den in Granulomen verkapselten Eiern und dem umgebenden Bindegewebe. Dies könnte darauf hindeuten, dass das PC-substituierte Protein eventuell vom Ei sezerniert wird und eine Rolle bei der Immunmodulation durch den Parasiten spielt, die dann zu einer Herunterregulierung der zellulären Immunantwort und damit einer verminderten Granulombildung führt. Dies könnte der Versuch des Parasiten sein, möglichst wenige Eier in der Leber zu verlieren und den Aufbau einer protektiven Immunantwort zu erschweren und zu verlangsamen.

Es ist daher zu vermuten, dass in den Gonaden der weiblichen Würmer dieses PC-modifizierte Protein hergestellt, anschließend in die Eier verpackt wird und dann von den Eiern als exkretorisch-sekretorische Komponente abgegeben wird.

4.3 Immunmodulatorische Eigenschaften und stadienspezifische Expression von Proteinen mit PC-Epitopen

Die generelle immunmodulatorische Funktion PC-substituierter Proteine läßt sich gut anhand des Glycoproteins ES-62, einem sekretorischem Produkt von *A. vitae*, einem Filarienvertreter, veranschaulichen. ES-62 ist ein PC-substituiertes Glycoprotein, dem aufgrund der Anwesenheit des PC-Substituenten immunmodulatorische Eigenschaften zugesprochen werden. Zum einen handelt es sich hierbei um die Aktivierung der B1-Zellen mit entsprechenden Folgeeffekten, zum anderen wird eine Suppression der TNF- α -Produktion und der Th1-Antwort beschrieben. Zudem konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von ES-62 der proinflammatorische Effekt, vermittelt durch dendritische Zellen ebenfalls supprimiert wurde. Ferner wurde eine verstärkte Aktivierung der antiinflammatorischen T-Helfer (Th2) Immunantwort mit erniedrigtem IFN- γ , vermehrter IL 10 Produktion und deutlich erhöhtem IgG4 Antikörperlevel beschrieben [30, 42, 83-88]. Die geschlechts- und gewebsspezifische Expression des PC-Epitops deutet auf eine ebensolche der PC-Transferase hin. Bislang wurde

jedoch noch keine PC-Transferase bei den Helminthen identifiziert. Auch ist der Donor für die Phosphorylcholin-Gruppe noch gänzlich unbekannt. Bei *C. elegans* konnte kürzlich gezeigt werden, dass in Mikrosomenfraktionen eine PC-Transferase Aktivität vorhanden ist, die in der Lage ist, PC von Phosphatidylcholin auf N-Glykane zu übertragen ([38]).

Interessanterweise ähnelt die Situation mit nur einem einzigen PC-substituiertem Protein bei dem Trematoden *S. mansoni* der bei dem Nematoden *A. viteae*. Offenbar handelt es sich in beiden Fällen um exretorisch-sekretorische Proteine. Die Restriktion der Modifikation auf jeweils ein einzelnes Protein deutet auf eine genaue zeitliche und räumliche Regulation der Expression von PC-Transferase und Akzeptorprotein hin. Die Tatsache, dass sich die Akzeptorstrukturen der PC-Transferase(n) auf Glykosphingolipiden und Glykoproteinen bei Nematoden ähneln, könnte die Erklärung für das Fehlen der PC-Epitope auf Glykosphingolipidebene bei *S. mansoni* sein. Die Glykosphingolipide der Trematoden und Nematoden unterscheiden sich strukturell sehr stark. Während die Nematoden vorwiegend Glykosphingolipide der Artho-Serie aufweisen, basieren die Glykosphingolipide von *S. mansoni* auf der sogenannten Schisto-Serie.

4.4 Immunhistologische Lokalisation von Kohlenhydrat-Epitopen in *S. mansoni*

Untersuchungen zum Vorkommen von Le^x und M2D3H-antigenen Strukturen bei *S. mansoni* zeigten im Einklang mit Literaturdaten, dass das Intestinum, wie auch insbesondere die Eier von *S. mansoni* in hohem Maße Le^x-positive Strukturen exprimieren. Eine im Verhältnis zu PC und Le^x-positiven Strukturen relativ schwache Reaktion konnte bei der Verwendung des mAK-M2D3H nachgewiesen werden. Interessanterweise stellte sich im Laufe der Untersuchungen heraus, dass es sich im Falle der PC-positiven Strukturen, insbesondere beim Ei, um exkretorische Produkte handeln könnte, da hier, wie oben erwähnt, das umgebende Granulomgewebe in den Leberschnitten ebenfalls positiv mit dem monoklonalen Antikörper TEPC-15 reagierte. Dies war im Falle der Le^x- und M2D3H-positiven Strukturen jeweils nicht nachzuweisen. Dieser Sachverhalt könnte darauf hindeuten, dass PC-substituierten Proteinen von *S. mansoni* eine spezielle Aufgabe im Rahmen des Entwicklungszyklus zugeschrieben werden könnte.

Le^x wie auch Kohlenhydratstrukturen mit M2D3H-Epitopen werden als Kandidaten für eine molekulare Mimikry diskutiert, mit der sich die Parasiten der Abwehr des jeweiligen Wirtes entziehen, oder diese zumindest dämpfen. In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits

Diskussion

gezeigt werden, dass das Blutgruppenantigen Le^X (Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-R)[48] beim Menschen wie auch bei *S. mansoni* vorkommt. Es handelt sich hierbei um eines von mehreren Strukturelementen, welche eine α 3-gebundene Fucose enthalten und wie erwähnt im Wirtsorganismus und im Parasiten selbst nachzuweisen ist. Eine solch starke Ähnlichkeit von Wirts- und Parasitenantigenen wird mit dem Begriff „molecular mimicry“ umschrieben und kann einen Beitrag zur Immunevasion leisten [89, 90].

Gleiches gilt auch für den, wenn auch nur schwach positiven, Nachweis von M2D3H-Epitopen bei *S. mansoni*, insbesondere im Eistadium. Bei dem mAK-M2D3H handelt es sich um einen ursprünglich gegen Schistosomen Glykokonjugate entwickelten monoklonalen Antikörper, der unter anderem mit dem Haemocyanin der kalifornischen Schlüssellochschnecke, *Megathurna crenulata*, (KLH), kreuzreagiert [53, 91]. Eine Kreuzreaktivität von KLH mit Antiseren gegen Schistosomen-Glykolipide wurde bereits mehrfach beschrieben [92]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass diese Kreuzreaktivität auf das Vorhandensein eines Fuc α 1-3GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-R Motivs auf einem Teil der N-Glykane von KLH zurückzuführen ist [93]. Jüngste Untersuchungen zeigten weiterhin, dass dieses Kohlenhydratepitop auch auf Glykoproteinen des Zwischenwirtes von *S. mansoni*, der Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata*, vorkommt [94]. Dies ist in sofern äußerst interessant, als KLH bereits als Kandidat für die serologische Diagnose [95-97], zur Immunotherapie [98] und als möglicher Impfstoff gegen die Schistosomiasis diskutiert wurde.

Ähnliche Möglichkeiten könnten sich auch im Bezug auf die vorhandenen PC-positiven Strukturen ergeben, wobei man jedoch anmerken muss, dass hier im Vergleich zur immunologischen Färbung mit dem mAK-M2D3H eine weitaus stärkere Reaktion nachgewiesen werden konnte. Diese Tatsache lässt vermuten, dass hier eine weitaus höhere Zahl an PC-positiven, immunmodulatorischen Strukturen insbesondere im Bereich der *S. mansoni* Eier vorliegt.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein mit Phosphocholin (PC) modifiziertes Protein des Humanparasiten *S. mansoni* erstmalig identifiziert. Im Vorfeld galt es zunächst Methoden zur Isolierung und Aufreinigung dieses Proteins auszuarbeiten, wobei sich die Etablierung geeigneter Extraktionsbedingungen zur Proteingewinnung aus dem Adultegelhomogenat zu Anfang als besonders schwierig erwies. Es zeigte sich, dass die weitaus größte Proteinmenge mittels des Lysispuffers, welcher eigentlich zur Probenvorbereitung im Rahmen der 2D-Gelelektrophorese verwendet wird, zu extrahieren war. Zur weiteren Aufreinigung und Charakterisierung des so gewonnenen Proteingemisches wurden Proteintrennungen mittels der eindimensionalen (1D) SDS-Gelelektrophorese der 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Detektion der PC-positiven Proteinbande im 1D-Gel, bzw. des PC-positiven Spots nach 2D-Gelelektrophorese erfolgte mit dem PC-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAK) TEPC-15 in den jeweils im Anschluss an die gelelektrophoretischen Proteintrennungen durchgeführten Westernblots. Es zeigte sich, dass das PC-modifizierte Protein relativ basisch ist und ein apparentes Molekulargewicht von ca. 52 kD aufweist. Weitere Analysen der einzelnen Entwicklungsstadien von *S. mansoni* zeigten, dass es sich um ein stadienspezifisch exprimiertes Antigen handelt, da die stärksten PC-positiven Banden im Westernblot bei Proteinen von Adultegeln und Eiern nachzuweisen waren. Extrakte von Schistosomula, die ein Vorstadium bei der Entwicklung zum Adultegel darstellen, und Cercarien, die nur außerhalb des menschlichen Organismus vorkommen, wiesen allenfalls geringe Mengen an PC-modifizierten Proteinen auf. Eine Identifizierung und weitere Charakterisierung des isolierten 52 kDa-Proteins durch proteolytischen Verdau und weiterführende Analysen mittels MALDI-TOF-MS war aufgrund der aktuell unzureichenden Datenlage nicht möglich. Eine Bindung des PC-Substituenten über ein N-Glykan des Proteins scheint aufgrund der nach PNGase-A- und PNGase-F-Behandlung erhaltenen Resultate weitgehend ausgeschlossen zu sein.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildete jedoch die Lokalisation PC-substituierter Strukturen im Bereich des *S. mansoni*-Adultegels sowie des Eies. Hier konnte gezeigt werden, dass insbesondere im Bereich der Gonaden weiblicher Adultegel, der Eier und in dem das Ei umgebende Granulomgewebe PC-positive Strukturen vorhanden sind. Dies bestärkt zum einen die Hypothese, dass es sich um einen stadienspezifischen Prozess handelt und - im direkten Vergleich mit Analysen zum Vorkommen von Le^x- und M2D3H-Epitopen - zum

Zusammenfassung

anderen, dass es sich bei diesen Proteinen um PC-modifizierte exkretorische Produkte handelt, welche im Rahmen der Immunevasion eine übergeordnete Rolle spielen könnten.

6. Summary

In this thesis, a phosphocholine (PC)-modified protein has been identified for the first time in the human trematode parasite *S. mansoni*. The primary purpose of this study was to work out methods for the isolation and purification of this above-mentioned protein. In this context the establishment of appropriate extraction conditions for protein isolation from adult trematode homogenates proved to be particularly difficult. It turned out that the greatest amount of protein was extractable by means of so-called lysis-buffer which, strictly speaking, was utilised for sample preparation in the scope of 2D-gel electrophoresis. For further purification and characterisation of the obtained protein mixture, protein separation was carried out by means of one-dimensional (1D) SDS-gel electrophoresis and 2D-gel electrophoresis. The detection of PC-positive protein bands in 1D-gels, or rather, of PC-positive protein spots after 2D-gel electrophoresis, as determined by the PC-specific monoclonal antibody (MAb) TEPC-15 in both, was subsequent to gel electrophoresis-protein separation as carried out by Western blotting. This demonstrated that the PC-modified protein is relatively basic with an apparent molecular weight of approximately 52 kDa.

Further analysis of the various life-cycle, developmental stages of *S. mansoni* displayed a stage-specific expression of this antigen in that the strongest Westernblot, PC-positive bands were detectable in adult worm- and egg-proteins. Extracts from schistosomula (the parasitic, juvenile stadium of trematode worm development) and cercariae (free-living, infective stage of humans) demonstrated, at the most, lower amounts of PC-modified proteins. An identification and further characterisation of the isolated 52 kDa protein by proteolytic digestion and subsequent MALDI-TOF-MS analyses were not possible because of the, at present, insufficient data-situation. The possibility of a linkage of the PC-substituents via protein N-glycans would appear, from the obtained PNGase-A/PNGase-F-treatment results, to be largely discounted.

A further priority of this project constituted, however, the localisation of PC-substituted structures within the region of the *S. mansoni* adult worm/egg. Here it could be shown that PC-positive structures existed, especially, in the area of the adult worm gonads, eggs and of the immediate granuloma tissue of the egg itself. This supported, on the one hand, the hypothesis that it refers to a stadium-specific process in direct comparison with analyses on the occurrence of Le^x and M2D3H epitopes and, on the other hand, that it concerns PC-modified, secretory proteins which may have a major role in the framework of immunevasion.

7. Literatur

- 1 Lucius, R. (1997) Parasitologie: Grundlagen für Biologen, Mediziner, Veterinärmediziner. 171-177
- 2 Savioli, L., Renganathan, E., Montresor, A., Davis, A. and Behbehani, K. (1997) Control of schistosomiasis - a global picture. *Parasitology Today*. **13**, 444-448
- 3 Krauss, H. W., B./Enders, B./Schiefer, H.G./Slenczka, W./Zahner, H. Zoonosen, von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. Deutscher Ärzte-Verlag Köln, S. 267-272
- 4 Abath, F. G. C. and Werkhauser, R. C. (1996) The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. *Parasite Immunology*. **18**, 15-29
- 5 Davis, A. (1996) Schistosomiasis. In Manson's Tropical Diseases ed.)^eds.). pp. 1413-1456, WB Saunders, London
- 6 Bilharz, T. M. (1852) Fernere Beobachtungen über das die Pfortader des Menschen bewohnende *Distomum haematobium* und sein Verhältnis zu gewissen pathologischen Bildungen aus brieflichen Mitteilungen an Professor v. Siebold vom 29. März 1852. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie, Leipzig*. **4**, 72-76
- 7 Rollinson, D. and Simpson, A. J. G. (1987) The Biology of Schistosomes - from Genes to Latrines. Academic Press, London
- 8 Gryseels, B. and de Vlas, S. J. (1996) Worm burdens in schistosome infections. *Parasitology Today*. **12**, 115-117
- 9 Haas, W., Haberl, B., Kalbe, M. and Körner, M. (1995) Snail-host-finding by miracidia and cercariae: chemical host cues. *Parasitology Today*. **11**, 468-472
- 10 Kalbe, M., Haberl, B. and Haas, W. (1996) *Schistosoma mansoni* miracidial host-finding: species specificity of an Egyptian strain. *Parasitol Res*. **82**, 8-13
- 11 Wikel, S. K. and Bogitsh, B. J. (1974) *Schistosoma mansoni* penetration apparatus and epidermis of the miracidium. *Experimental Parasitology*. **36**, 342-354
- 12 MachadoSilva, J. R., PelajoMachado, M., Lenzi, H. L. and Gomes, D. C. (1998) Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **93**, Suppl. 1, 303-307
- 13 Cioli, D. (1998) Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitology Today*. **14**, 418-422
- 14 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. *Parasitology Today*. **12**, 14-20
- 15 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. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **34**, 99-108
- 16 Brindley, P. J. and Sher, A. (1987) The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *Journal of Immunology*. **139**, 215-220
- 17 Brindley, P. J. (1994) Relationships between chemotherapy and immunity in schistosomiasis. *Adv Parasitol*. **34**, 133-161
- 18 Brindley, P. J. (1994) Drug resistance to schistosomicides and other anthelmintics of medical significance. *Acta Trop*. **56**, 213-231
- 19 Abath, F. G. C., Montenegro, S. M. L. and Gomes, Y. M. (1998) Vaccines against human parasitic diseases: an overview. *Acta Tropica*. **71**, 237-254
- 20 Zang, X. and Maizels, R. M. (2001) Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *Trends Biochem Sci*. **26**, 191-197.

Literatur

- 21 Kantelhardt, S. R., Wuhrer, M., Dennis, R. D., Lochnit, G., Doenhoff, M. and Geyer, R. (2001) Characterization of small, antigenic glycosphingolipids from *Schistosoma mansoni* eggs. *Glycoconjugate Journal*. **18**, 58
- 22 Dissous, C., Grzych, J. M. and Capron, A. (1986) *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. *Nature*. **323**, 443-445
- 23 Tomasz, A. (1967) Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in pneumococcus. *Science*. **157**, 694-697
- 24 McWilliam, A. S., Stewart, G. A. and Allen, W. (1986) Phosphorylcholine bearing components of some helminthic parasites: localization to parasite lipoproteins. *Comp Biochem Physiol B*. **85**, 627-633
- 25 Heise, A., Peters, W. and Zahner, H. (1999) Phosphocholine epitopes in *Eimeria bovis*. *Exp Parasitol*. **92**, 279-282
- 26 Harnett, W., Deehan, M. R., Houston, K. M. and Harnett, M. M. (1999) Immunomodulatory properties of a phosphorylcholine-containing secreted filarial glycoprotein. *Parasite Immunol*. **21**, 601-608
- 27 Feng, G. J., Goodridge, H. S., Harnett, M. M., Wei, X. Q., Nikolaev, A. V., Higson, A. P. and Liew, F. Y. (1999) Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania* phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol*. **163**, 6403-6412
- 28 Harnett, W. and Harnett, M. M. (1999) Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system? *Immunol. Today*. **20**, 125-129
- 29 Harnett, W., Harnett, M. M. and Byron, O. (2003) Structural/Functional Aspects of ES-62 - A Secreted Immunomodulatory Phosphorylcholine-Containing Filarial Nematode Glycoprotein. *Curr Protein Pept Sci*. **4**, 59-71
- 30 Harnett, W., Harnett, M. M., Leung, B. P., Gracie, J. A. and McInnes, I. B. (2004) The anti-inflammatory potential of the filarial nematode secreted product, ES-62. *Curr Top Med Chem*. **4**, 553-559
- 31 Lochnit, G., Dennis, R. D. and Geyer, R. (2000) Phosphorylcholine substituents in nematodes: structures, occurrence and biological implications. *Biol. Chem*. **381**, 839-847
- 32 Lochnit, G., Dennis, R. D., Muntefehr, H., Nispel, S. and Geyer, R. (2001) Immunohistochemical localization and differentiation of phosphocholine-containing antigens of the porcine, parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Parasitology*. **122**, 359-370
- 33 Ubeira, F. M., Leiro, J., Santamarina, M. T. and Sanmartin-Duran, M. L. (1987) Modulation of the anti-phosphorylcholine immune response during *Trichinella spiralis* infections in mice. *Parasitology*. **95**, 583-592
- 34 Ubeira, F. M., Leiro, J., Santamarina, M. T., Villa, T. G. and Sanmartin-Duran, M. L. (1987) Immune response to *Trichinella* epitopes: the antiphosphorylcholine plaque-forming cell response during the biological cycle. *Parasitology*. **94**, 543-553
- 35 Lal, R. B., Lynch, T. J. and Nutman, T. B. (1987) *Brugia malayi* antigens associated with lymphocyte activation in filariasis. *J. Immunol*. **139**, 1652-1657
- 36 Haslam, S. M., Khoo, K. H., Houston, K. M., Harnett, W., Morris, H. R. and Dell, A. (1997) Characterisation of the phosphorylcholine-containing N-linked oligosaccharides in the excretory-secretory 62 kDa glycoprotein of *Acanthocheilonema viteae*. *Mol. Biochem. Parasitol*. **85**, 53-66
- 37 Cipollo, J. F., Awad, A., Costello, C. and Hirschberg, C. B. (2005) N-Glycans of *Caenorhabditis elegans* Are Specific to Developmental Stages. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**, 26063-26072

Literatur

- 38 Cipollo, J. F., Awad, A., Costello, C. E., Robbins, P. W. and Hirschberg, C. B. (2004) Biosynthesis in vitro of *Caenorhabditis elegans* phosphorylcholine oligosaccharides. Proc Natl Acad Sci U S A. **101**, 3404-3408
- 39 Deehan, M. R., Frame, M. J., Parkhouse, R. M., Seatter, S. D., Reid, S. D., Harnett, M. M. and Harnett, W. (1998) A phosphorylcholine-containing filarial nematode-secreted product disrupts B lymphocyte activation by targeting key proliferative signaling pathways. J Immunol. **160**, 2692-2699
- 40 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 Immunology. **24**, 463-469
- 41 Harnett, W. and Harnett, M. M. (2000) Phosphorylcholine: an immunomodulator present on glycoproteins secreted by filarial nematodes. Mod. Asp. Immunobiol. **1**, 40-42
- 42 Wilson, E. H., Deehan, M. R., Katz, E., Brown, K. S., Houston, K. M., O'Grady, J., Harnett, M. M. and Harnett, W. (2003) Hyporesponsiveness of murine B lymphocytes exposed to the filarial nematode secreted product ES-62 in vivo. Immunology. **109**, 238-245
- 43 Aoki, K., Uchiyama, R., Itonori, S., Sugita, M., Che, F. S., Isogai, A., Hada, N., Hada, J., Takeda, T., Kumagai, H. and Yamamoto, K. (2004) Structural elucidation of novel phosphocholine-containing glycosylinositol-phosphoceramide in filamentous fungi and their induction of cell death of cultured rice cells. Biochem J. **378**, 461-472
- 44 Maizels, R. M., Kurniawan, A., Selkirk, M. E. and Yazdanbakhsh, M. (1991) Immune responses to filarial parasites. Immunol Lett. **30**, 249-254
- 45 Maizels, R. M. and Lawrence, R. A. (1991) Immunological tolerance: the key feature in human filariasis. Parasitol. Today. **7**, 271-276
- 46 Hoffmann, K. F., Cheever, A. W. and Wynn, T. A. (2000) IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis [In Process Citation]. J Immunol. **164**, 6406-6416
- 47 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. **278**, 466-474
- 48 Ko, A. I., Dräger, 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **87**, 4159-4163
- 49 Damian, R. T. (1987) Immunological aspects of host-schistosome relationships. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **82**, 13-16
- 50 Damian, R. T. (1989) Molecular mimicry: parasite evasion and host defense. Curr. Topics Microbiol. Immunol. **145**, 101-115
- 51 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**, 155-161
- 52 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
- 53 Wuhrer, M., Dennis, R. D., Doenhoff, M. J., Bickle, Q., Lochnit, G. and Geyer, R. (1999) Immunochemical characterisation of *Schistosoma mansoni* glycolipid antigens. Mol Biochem Parasitol. **103**, 155-169

Literatur

- 54 Liebau, E., Eckelt, V. H. O., Wildenburg, G., Teesdale-Spittle, P., Brophy, P. M., Walter, R. D. and Henkle-Dührsen, K. (1997) Structural and functional analysis of glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. *Biochem. J.* **324**, 659-666
- 55 Ishii, K. and Yanagisawa, T. (1954) Structure of the female reproductive organ of pig ascaris. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **7**, 96-109
- 56 Foor, W. E. (1967) Ultrastructural aspects of oocyte development and shell formation in *Ascaris lumbricoides*. *J Parasitol.* **53**, 1245-1261
- 57 Böck, P. (1989) *Romeis: Mikroskopische Technik.* Urban & Schwarzenberg, München
- 58 Dennis, R. D., Geyer, H. and Geyer, R. (2006) Glycoconjugates of parasitic helminth infections. eingereicht
- 59 Friedl, C. H., Lochnit, G., Zähringer, U., Bahr, U. and Geyer, R. (2003) Structural elucidation of zwitterionic carbohydrates derived from glycosphingolipids of the porcine parasitic nematode *Ascaris suum*. *Biochem. J.* **369**, 89-102
- 60 Haslam, S. M., Houston, K. M., Harnett, W., Reason, A. J., Morris, H. R. and Dell, A. (1999) Structural studies of N-glycans of filarial parasites. Conservation of phosphorylcholine-substituted glycans among species and discovery of novel chito-oligomers. *J Biol Chem.* **274**, 20953-20960
- 61 Haslam, S. M., Morris, H. R. and Dell, A. (2001) Mass spectrometric strategies: providing structural clues for helminth glycoproteins. *Trends Parasitol.* **17**, 231-235
- 62 Haslam, S. M., Restrepo, B. I., Obregon-Henao, A., Teale, J. M., Morris, H. R. and Dell, A. (2003) Structural characterization of the N-linked glycans from *Taenia solium* metacestodes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **126**, 103-107
- 63 Griffiths, J. S., Haslam, S. M., Yang, T., Garczynski, S. F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P. S., Dell, A., Adang, M. J. and Aroian, R. V. (2005) Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science.* **307**, 922-925
- 64 Cipollo, J. F., Costello, C. E. and Hirschberg, C. B. (2002) The fine structure of *Caenorhabditis elegans* N-glycans. *J Biol Chem.* **277**, 49143-49157
- 65 Cipollo, J. F., Awad, A. M., Costello, C. E. and Hirschberg, C. B. (2005) N-glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages. *J Biol Chem.* **280**, 26063-26072
- 66 Haslam, S. M., Gems, D., Morris, H. R. and Dell, A. (2002) The glycomes of *Caenorhabditis elegans* and other model organisms. *Biochem. Soc. Symp.* **69**, 117-134
- 67 Gerald Pörtl, D. K., Katharina Paschinger and Iain B. H. Wilson (2007) N-Glycans of the porcine nematode parasite *Ascaris suum* are modified with phosphorylcholine and core fucose residues. *FEBS Journal* **274** (2007) 714-726
- 68 Lochnit, G., Geyer, R., Heinz, E., Holst, O., Rietschel, E. T., Zähringer, U. and Müthing, J. (2001) Glycolipids. Chemical biology and biomedicine. In *Glycoscience: Chemistry and Biological Chemistry* (Fraser-Reid, B., Tatsuta, K. and Thiem, J., eds.). pp. 2183-2252, Springer, Heidelberg
- 69 Lochnit, G., Dennis, R. D., Zähringer, U. and Geyer, R. (1997) Structural analysis of neutral glycosphingolipids from *Ascaris suum* adults (Nematoda: Ascaridida). *Glycoconj. J.* **14**, 389-399
- 70 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**, 265-275
- 71 Friedl, C. H., Lochnit, G., Geyer, R., Karas, M. and Bahr, U. (2000) Structural elucidation of zwitterionic sugar cores from glycosphingolipids by nanoelectrospray ionization-ion-trap mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **284**, 279-287

Literatur

- 72 Pörtl, G., Kerner, D., Paschinger, K. and Wilson, I. B. H. (2006) The N-glycans of the porcine nematode parasite *A. suum*. Eingereicht
- 73 Morelle, W., Haslam, S. M., Olivier, V., Appleton, J. A., Morris, H. R. and Dell, A. (2000) Phosphorylcholine-containing N-glycans of *Trichinella spiralis*: identification of multiantennary lacdiNAc structures. *Glycobiology*. **10**, 941-950
- 74 Morelle, W., Haslam, S. M., Morris, H. R. and Dell, A. (2000) Characterization of the N-linked glycans of adult *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **109**, 171-177
- 75 Lochnit, G., Grabitzki, J., Henkel, B., Tavernarakis, N. and Geyer, R. (2006) First identification of a phosphorylcholine-substituted protein from *Caenorhabditis elegans*. Isolation and characterization of the aspartyl protease ASP-6. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler*. **in press**
- 76 Grabitzki, J. (2006) Massenspektrometrische Identifizierung posttranslationale modifizierter Proteine aus verschiedene Entwicklungsstadien von *Caenorhabditis elegans*.
- 77 Crandall, C. A. and Crandall, R. B. (1971) *Ascaris suum*: immunoglobulin responses in mice. *Exp. Parasitol.* **30**, 426-437
- 78 Wuhrer, M. (1999) Charakterisierung stadienspezifisch exprimierter Glykolipide des Humanparasiten *Schistosoma mansoni*. In *Biochemisches Institut am Klinikum ed.)* eds.). p. 170, Justus-Liebig-Universität, Gießen
- 79 Ashton, P. D., Curwen, R. S. and Wilson, R. A. (2001) Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. *Trends Parasitol.* **17**, 198-202
- 80 Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E. A., Guimaraes, P. E., Ojopi, E. P., Paquola, A. C., Piazza, J. P., Nishiyama, M. Y., Kitajima, J. P., Adamson, R. E., Ashton, P. D., Bonaldo, M. F., Coulson, P. S., Dillon, G. P., Farias, L. P., Gregorio, S. P., Ho, P. L., Leite, R. A., Malaquias, L. C., Marques, R. C., Miyasato, P. A., Nascimento, A. L., Ohlweiler, F. P., Reis, E. M., Ribeiro, M. A., Sa, R. G., Stukart, G. C., Soares, M. B., Gargioni, C., Kawano, T., Rodrigues, V., Madeira, A. M., Wilson, R. A., Menck, C. F., Setubal, J. C., Leite, L. C. and Dias-Neto, E. (2003) Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat. Genet.*
- 81 Hu, W., Yan, Q., Shen, D. K., Liu, F., Zhu, Z. D., Song, H. D., Xu, X. R., Wang, Z. J., Rong, Y. P., Zeng, L. C., Wu, J., Zhang, X., Wang, J. J., Xu, X. N., Wang, S. Y., Fu, G., Zhang, X. L., Wang, Z. Q., Brindley, P. J., McManus, D. P., Xue, C. L., Feng, Z., Chen, Z. and Han, Z. G. (2003) Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. *Nat. Genet.* **35**, 139-147
- 82 Coppel, R. L. and Black, C. G. (2005) Parasite genomes. *Int. J. Parasitol.* **35**, 465-479
- 83 Wilson, E. H., Katz, E., Goodridge, H. S., Harnett, M. M. and Harnett, W. (2003) In vivo activation of murine peritoneal B1 cells by the filarial nematode phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. *Parasite Immunology*. **25**, 463-466
- 84 Kean, D. E., Ohtsuka, I., N.Hada, Takeda, T., Lochnit, G., Geyer, R., Harnett, M. M. and Harnett, W. (2006) Dissecting *Ascaris* glycosphingolipids for immunomodulatory moieties - the use of synthetic structural glycosphingolipid analogues. *Parasite Immunol.* **28**, 69-76
- 85 Marshall, F. A., Grierson, A. M., Garside, P., Harnett, W. and Harnett, M. M. (2005) ES-62, an immunomodulator secreted by filarial nematodes, suppresses clonal expansion and modifies effector function of heterologous antigen-specific T cells *in vivo*. *J Immunol.* **175**, 5817-5826
- 86 Goodridge, H. S., Stepek, G., Harnett, W. and Harnett, M. M. (2005) Signalling mechanisms underlying subversion of the immune response by the filarial nematode secreted product ES-62. *Immunology*. **115**, 296-304

Literatur

- 87 Goodridge, H. S., Marshall, F. A., Wilson, E. H., Houston, K. M., Liew, F. Y., Harnett, M. M. and Harnett, W. (2004) In vivo exposure of murine dendritic cell and macrophage bone marrow progenitors to the phosphorylcholine-containing filarial nematode glycoprotein ES-62 polarizes their differentiation to an anti-inflammatory phenotype. *Immunology*. **113**, 491-498
- 88 Wilson, E. H., Katz, E., Goodridge, H. S., Harnett, M. M. and Harnett, W. (2003) In vivo activation of murine peritoneal B1 cells by the filarial nematode phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. *Parasite Immunol.* **25**, 463-466
- 89 Wuhrer, M., Berkefeld, C., Dennis, R. D., Idris, M. A. and Geyer, R. (2001) The liver flukes *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica* express the leucocyte cluster of differentiation marker CD77 (globotriaosylceramide) in their tegument. *Biol Chem.* **382**, 195-207
- 90 Geyer, M. W. a. R. (2006) Glycokonjugate Structures. CAB International 2006. *Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, immunology and Physiology* (eds A.G. Maule and N.J. Marks), 408-422
- 91 Grzych, J. M., Dissous, C., Capron, M., Torres, S., Lambert, P. H. and Capron, A. (1987) *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin. *Journal of Experimental Medicine*. **165**, 865-878
- 92 Kantelhardt, S. R., Wuhrer, M., Dennis, R. D., Doenhoff, M. J., Bickle, Q. and Geyer, R. (2002) Fuc(alpha1->3)GalNAc-: major antigenic motif of *Schistosoma mansoni* glycolipids implicated in infection sera and keyhole limpet hemocyanin cross-reactivity. *Biochem J.* **Pt**
- 93 Geyer, H., Wuhrer, M., Kurokawa, T. and Geyer, R. (2004) Characterization of keyhole limpet hemocyanin (KLH) glycans sharing a carbohydrate epitope with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates. *Micron*. **35**, 105-106
- 94 Lehr, T., Geyer, H., Maass, K., Doenhoff, M. J., Geyer, R. (2007) Structural characterization of N-glycans from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* cross-reacting with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates. *Glycobiology*. **17**, 82-103
- 95 Alves-Brito, C. F., Simpson, A. J. G., Bahia-Oliveira, L. M. G., Rabello, A. L. T., Rocha, R. S., Lambertucci, J. R., Gazzinelli, G., Katz, N. and Correa-Oliveira, R. (1992) Analysis of anti-keyhole limpet haemocyanin antibody in Brazilians supports its use for the diagnosis of acute schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **86**, 53-56
- 96 Bendall, R. P., Laloo, K. and Chiodini, P. L. (1995) The serological response to keyhole limpet haemocyanin in imported *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections. *Serodiagn. Immunother. Infect. Disease.* **7**, 27-29
- 97 Thors, C. and Linder, E. (1998) Cross reacting antibodies against keyhole limpet haemocyanin may interfere with the diagnostics of acute schistosomiasis. *Parasite Immunol.* **20**, 489-496
- 98 Wishahi, M. M., Ismail, I. M., Ruebben, H. and Otto, T. (1995) Keyhole-limpet hemocyanin immunotherapy in the bilharzial bladder: a new treatment modality? Phase II trial: superficial bladder cancer. *J Urol.* **153**, 926-928

Lebenslauf

Persönliche Daten	Name:	Meub
	Vorname:	Oliver
	Geburtsdatum:	07.07.1975
	Geburtsort:	Lich
Schulbildung	1981-1985	Grundschule Ranstadt
	1985-1994	Gymnasium Nidda
	1994	Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst	09/94-11/94	Neurologische Klinik Bad Salzhausen
Aushilfstätigkeit	01/95-07/95	Fa. Reichardt, Gerüstbau/ Bauschreinerei, Florstadt
Krankenpflegepraktikum	08/95-09/95	Neurologische Klinik Bad Salzhausen
Berufsausbildung	10/95-10/98	Ausbildung zum Krankenpfleger, Kreiskrankenhaus Lich
Hochschulausbildung	1998- 2005	Studium der Humanmedizin Justus-Liebig-Universität, Gießen
	04/2001	Physikum
	04/2002	1. Staatsexamen
	04/2003	2. Staatsexamen
Famulaturen	09/2001	Fachbereich Anästhesie/operative Intensivstation, Universitätsklinikum Gießen
	08/2002	Fachbereich Chirurgie, evangelisches Krankenhaus Gießen
	03/2003	Praxisfamulatur Allgemeinmedizin, Ranstadt
	09/2003	Fachbereich Dermatologie, Universitätsklinikum Gießen

Praktisches Jahr	26.April 2004 bis 15.August 2004	Wahlfach Anästhesie, Justus- Liebig-Universität Gießen, davon zwei Monate in der Abteilung für Schmerztherapie
	16.August 2004 bis 05.Dezember2004	Chirurgie, Evangelisches Krankenhaus Gießen
	06. Dezember 2004 bis 27. März 2005	Innere Medizin, Evangelisches Krankenhaus Gießen
Doktorarbeit	seit März 2002	In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Geyer im Biochemischen Institut des Fachbereiches Humanmedizin der Universität Gießen
Ärztliche Tätigkeit	Seit August 2005	Assistenzarzt im Fachbereich Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Schotten (Gesundheitszentrum Wetterau)

Danksagung

Ich danke:

Prof. Dr. Rudolf Geyer für die interessante Themenstellung, die ausgezeichnete Betreuung, Diskussionsfreudigkeit und Hilfsbereitschaft sowie für die sehr guten Arbeitsbedingungen in seiner Arbeitsgruppe.

PD Dr. Günter Lochnit für seine äußerst engagierte Betreuung, seinen Ideenreichtum, die Durchführung diverser Messungen und die Einarbeitung in die Methodik und Technik der Laborgeräte und Analyseverfahren. Ferner danke ich für seine unendliche Geduld und seine fortwährende Motivation, insbesondere bis hin zur Fertigstellung dieser Arbeit

Dr. Manfred Wuhrer für die anfängliche Betreuung und Einarbeitung in Methodik und Technik der Laborarbeit

PD Dr. Roger Dennis für seine kompetenten Ratschläge, seine Gesprächs-, Diskussions- und Hilfsbereitschaft

Dr. Hildegard Geyer und Julia Grabitzki für die Diskussionsbereitschaft, Dr. Karin Hersemeyer, Daniela Zimmer und Michael Dreisbach für die Einarbeitung und Unterstützung, insbesondere im Bereich der Mikroskopie/ Gelelektrophorese sowie der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Geyer für die guten Arbeitsbedingungen, für das angenehme Arbeitsklima und die mir entgegengebrachte Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Werner Mink, Peter Käse und Siegfried Kühnhardt danke ich für nötige Zerstreuung zwischen diversen Experimenten durch ihre Gesprächsbereitschaft.

Herrn Dr. M. J. Doenhoff (University of North Wales) für die zuverlässige und großzügige Bereitstellung von Parasitenmaterial

Prof. Dr. R. Geyer, PD Dr. G. Lochnit für das Korrekturlesen dieser Arbeit

Meinen Eltern, Großeltern, meiner übrigen Familie und auch meinem Freundeskreis danke ich für die ausgezeichnete Unterstützung während meiner gesamten Ausbildungs- und Promotionszeit

und insbesondere danke ich meinem Sohn Silas und meiner Lebensgefährtin Katja für die Geduld, das mir entgegengebrachte Verständnis und die vielfältige Unterstützung während meiner Promotionszeit.