# N-Glykananalyse in Gastropoden

# DIPLOMARBEIT

durchgeführt am Department für Chemie an der Universität für Bodenkultur Wien

> von Judith Rudolf März 2007

Mein besonderer Dank gilt Frau Ao. Univ. Prof. DI Dr. Erika Staudacher für die großartige Betreuung meiner Diplomarbeit sowie die Motivation und Begeisterung dafür, die sie mir vermitteln konnte.

Weiters möchte ich mich auch bei Herrn DI Martin Gutternigg für seine Hilfsbereitschaft und geduldige Unterstützung bedanken.

Mein Dank geht außerdem an die gesamte Arbeitsgruppe der Gylkobiologie für alle praktischen und theoretischen Hilfestellungen sowie viele interessante Gespräche.

# **Inhaltsverzeichnis**

	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Glykane	3
2.1.1. O-Glykane	3
2.1.2. N-Glykane	5
2.1.3. Erkennung von Glykanstrukturen	7
2.1.4. Glykosylierung verschiedener Organismen	8
2.1.4.1. Sialinsäuren	10
2.1.5. Wissenschaftliche Bedeutung von Glykanen	11
2.2. Aktuelle Forschungsgebiete im Zusammenhang mit Glykosylierung	12
2.2.1. Schistosoma	12
2.2.1.1. Biologie der Schistosoma	12
2.2.1.2. Glykosylierung	13
2.2.1.3. Interaktion: Schnecke-Parasit	17
2.2.2. Schnecken	18
3. Problemstellung	21
4. Material und Methoden	23
4.1. Präparative Methoden	. 23
4.1.1. Glykanpräparation aus Schnecken und Schneckeneiern	23
4.1.1.1. Vorbereitung und Homogenisierung	. 23
4.1.1.2. Fraktionierte Ammonsulfatfällung	. 24
4.1.1.3. Dialyse	24
4.1.1.4. Proteolytischer Abbau	. 24
4.1.1.5. Kationenaustauscherchromatographie	25
4.1.1.6. Gelfiltration G 25	26
4.1.1.7. Peptid-N-Glykanase A Abbau	26
4.1.1.8. Gelfiltration G 15	27
4.1.2. Glykanpräparation aus Biomphalaria glabrata-Zellen	. 27
4.1.2.1. Vorbereitung und Homogenisierung	27
4.1.2.2. Proteolytischer Abbau und Zentrifugation	28
4.1.2.3. 1. Kationenaustauscherchromatographie	28
4.1.2.4. Gelfiltration G 25	28

4.1.2.5. Peptid-N-Glykanase A Abbau	29
4.1.2.6. 2. Kationenaustauscherchromatographie	. 29
4.1.2.7. Reversed Phase - C18	. 30
4.1.3. Pyridylaminierung von Oligosacchariden	. 30
4.1.4. Glykanhydrolyse mit Trifluoressigsäure	. 31
4.1.5. Anthranilsäure-Markierung von Monosacchariden	31
4.1.6. Probenvorbereitung für SDS-PAGE und Blot	. 32
4.1.7. SDS-PAGE	. 34
4.1.8. Glykanpräparation nach der SDS-PAGE	. 36
4.1.8.1. Abtrennung der Glykane	. 38
4.2. Analytische Methoden	39
4.2.1. Kohlenhydratbestimmung mit Orcinol	. 39
4.2.2. Enzymatische Abbau-Versuche	39
4.2.3. Chemische Desialylierung	. 41
4.2.4. Western Blot	. 41
4.2.5. Massenspektrometrische Analyse mit MALDI-TOF	. 44
4.2.6. LC-MS/ESI-Q-TOF	44
4.3. HPLC-Methoden	45
4.3.1. Fraktionierung der Glykane mittels AIEX-HPLC	. 45
4.3.2. RP-HPLC PA-markierter Oligosaccharide	. 46
4.3.3. RP-HPLC AA-markierter Monosaccharide – Methodenoptimierung	. 47
4.4. Kultivierung von Biomphalaria glabrata Zellen	. 48
5. Ergebnisse	. 49
5.1. N-Glykanpräparationen	49
5.1.1. N-Glykanpräparation aus Schnecken und Schneckeneiern	50
5.1.2. N-Glykanpräparation aus <i>Bg</i> -Zellen	. 51
5.2. HPLC – Methodenoptimierung	. 52
5.2.1. Monosaccharidanalyse-Methodenoptimierung	. 52
5.2.2. Versuch einer Methodenetablierung: analytische AIEX-HPLC	56
5.3. N-Glykan-Präparation für SDS-PAGE und Western Blot	. 58
5.4. N-Glykan-Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot	. 59
5.4.1. Ergebnisse der enzymatischen Abbauten	. 68
5.5. HPLC - Analyse der N-Glykane	. 72
5.5.1. AIEX-HPLC zur Auftrennung geladener und ungeladener Glykane	
der Achatschnecke	. 72
5.5.2. RP-HPLC der PA-markierten Glykane	. 73

5.5.3. Monosaccharidanalyse		75
5.6. MALDI-TOF-MS- Analyse der N-GI	ykane7	79
5.6.1. MALDI-TOF-MS von Fibrin	٤	80
5.6.2. MALDI-TOF-MS von N-Glyka	nen aus Biomphalaria glabrata	83
5.6.3. MALDI-TOF-MS von N-Glyka	nen aus Achatina fulica 8	85
5.6.4. Ergebnisse der enzymatische	n Abbauten in <i>Bg</i> -Zellen	89
5.6.5. Ergebnisse der enzymatische	en Abbauten in Achat-Eiern	92
6. Diskussion		95
7. Abkürzungen und Strukturverzeichnis	5 10	05
8. Literatur		09

.

# 1. Zusammenfassung

Während Schnecken lange Zeit vor allem als landwirtschaftliche Schädlinge und Zwischenwirte humanpathogener Parasiten bekannt waren, entwickeln sie sich immer mehr zu interessanten Forschungsobjekten auf dem Sektor der Glykobiologie. Sie besitzen ein weit reichendes Spektrum an Glykosylierungsmöglichkeiten, welches es ihnen ermöglicht unterschiedlichste Varianten komplexer N-Glykanstrukturen zu synthetisieren. Gastropoden scheinen Glykanmuster verschiedener Organismen zu vereinen. So konnten bislang neben hoch- und paucimannosidischen N-Glykanen Fukose, säugerspezifische Glykanstrukturen, wie endständige Sialylierungen und a1,6gebundene Fukose, sowie Methylierungen, wie sie in Nematoden gängig sind, nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich Untersuchungen des Hämocyanin Sauerstofftransportproteins Arbeiten einiger Schnecken, weitere beschäftigen sich mit dem Glykanspektrum der Nacktschnecke Arion lusitanicus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 7 Schneckenarten untersucht, darunter Nackt-, Gehäuse-, Land- und Wasserschnecken, sowie – wo verfügbar - auch Zellkulturen und Eier.

Es wurden Rohextrakte der verschiedenen Schneckengewebe hergestellt, im Fall der ausgewachsenen Schnecken wurden Haut und Viscera (Eingeweide ohne Darm) getrennt analysiert. Nach proteolytischem Abbau mit Thermolysin oder Pepsin, wurden die N-Glykane durch Behandlung mit PNGase A (Peptid-N-Glykanase A) abgespalten und für nachfolgende Präparationen mittels HPLC mit 2-Aminopyridin fluoreszenzmarkiert. Für Monosaccharidanalysen wurde ein Teil der aufgereinigten N-Glykane mit Trifluoressigsäure hydrolysiert und mit Anthranilsäure markiert. Dabei konnten in allen analysierten Proben methylierte Galaktose, Xylose und Fukose nachgewiesen werden.

Analysen der Glykoproteine wurden elektophoretisch via SDS-PAGE und anschließenden Western-Blots durchgeführt. Durch spezifische Detektion mit Lektinen und enzymatischem Abbau mit Sialidase und PNGase F (N-Glykosidase F) konnten endständig sialylierte N-Glykane in *Planobarius corneus* (Posthornschnecke) nachgewiesen werden. Mehrfach konnten auch endständige Sialinsäuren detektiert werden, die nicht N-glykosidisch gebunden waren.

1

Weitere Analysen der aufgereinigten N-Glykane wurden massenspektrometrisch durchgeführt. Dabei wurden in Zellen von *Biomphalaria glabrata* (tropische Wasserschnecke) und Eiern von *Achatina fulica* (Achatschnecke) neben hochmannosidischen methylierten und nichtmethylierten Strukturen auch komplexe endständig sialylierte, zum Teil fukosylierte N-Glykane detektiert. Hinweise auf sulfatierte Glykane konnten ebenfalls ermittelt werden. Einige der Strukturen konnten durch enzymatische Abbauvorgänge bestätigt werden.

Im Zuge dieser Arbeit konnten die Untersuchungen der Glykosylierungsmuster in Gastropoden neben Arion lusitanicus auch auf andere Schneckenarten ausgeweitet werden. Endständige Sialinsäuren, Fukose, Xylose, terminale Methylgruppen und eventuell Sulfatreste konnten als gängige Bausteine komplexer N-Glykane vieler Schneckenarten bestätigt werden.

Aufgrund ihrer Vielfältigkeit könnten Schnecken in der Zukunft als glykobiologische Modellorganismen fungieren, weiters besteht die Hoffnung neue Zellkulturen für die Produktion rekombinater Glykoproteine entwickeln zu können.

# 2. Einleitung

#### 2.1. Glykane

Als Glykokonjugate bezeichnet man an Proteine oder Lipide gebundene Mono-, Oligooder Polysaccharide. Man unterscheidet Glykoproteine, Glykolipide und Glykosylphosphatidylinositolanker [1].

Die Zuckeranteile der jeweiligen Struktur werden als Glykane bezeichnet. Die Bausteine der Glykane – die Monosaccharide – unterscheiden sich nicht von jenen, aus denen energie – und speichertechnisch relevante Kohlenhydrate, wie Stärke, Glykogen, Saccharose und Laktose, aufgebaut sind. Jedoch ist das Spektrum der in Glykanen vorkommenden Monosaccharide wesentlich breiter. Neben den "Klassikern" wie Glukose und Galaktose sind auch Mannose, Fukose und Xylose, Aminozucker wie N-Acetylglukosamin, aber auch geladene Monosaccharide wie Zuckersäuren und Sialinsäuren keine Seltenheit.

Die biologischen Funktionen der protein- und lipidgebundenen Glykane sind sehr unterschiedlich und noch nicht vollständig erforscht. Glykosylierte Strukturen findet man an der Oberfläche von Zellmembranen, im Blutplasma und in der extrazellulären Matrix. Glykane haben einen wesentlichen Einfluss auf strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Proteine und Lipide an die sie gebunden sind. Sie bewirken zielgerichteten Transport, Erkennungsreaktionen, Differenzierung, Signalvermittlung, Proteinfaltung, Stabilität und Löslichkeit [2].

Glykosylierung von Proteinen ist eine komplizierte co- und posttranslatorische Modifikation, die die Vielfältigkeit des Proteoms noch verstärkt [3].

Glykoproteine werden in O- und N-Glykane unterteilt, abhängig von der Bindung zwischen Protein und Oligosaccharid. N-Glykane löslicher Plasmaproteine sind die am besten untersuchte und verstandene Gruppe von Glykokonjugaten, was historisch mit der einfachen Verfügbarkeit von Serum und den darin enthaltenen Glykoproteinen zu erklären ist [2].

#### 2.1.1. O-Glykane

O-Glykane können  $\alpha$ - oder  $\beta$ -glykosidisch mit dem Sauerstoffmolekül eines Aminosäurerestes eines Proteins verbunden sein. Für O-Glykosylierung von Proteinen ist, im Gegensatz zur N-Glykosylierung keine einheitliche Konsensussequenz notwendig, meistens sind O-Glykane jedoch an Serin oder Threonin gebunden, N-Acetylgalaktosamin ist häufig das erste Zuckermolekül. Diese O-Glykanstruktur wird als Mucin-Typ bezeichnet und kommt in höheren eukaryotischen Zellen, nicht jedoch in niedrigen Eukaryoten und Prokaryoten vor [1].



Abb. 1: Bindungsmöglichkeiten von O-Glykanen [4]

Die Synthese der O-Glykane erfolgt posttranslatorisch im Golgi-Apparat. Die Monosaccharide werden einzeln von Glykosyltransferasen an die wachsende Oligosaccharidkette angefügt [5]. Als Donor-Moleküle dienen, wie auch bei der finalen Modifikation der N-Glykane im Golgi-Apparat Nukleotid-Zucker. Die Variationsmöglichkeiten der O-Glykane sind noch wesentlich größer, als die der N-Glykane. Allein in Säugetieren wurden bislang 8 verschiedene Core-Strukturen nachgewiesen, wobei die Core-Typen 1 und 2 bei humanen Proteinen bei weitem überwiegen.



Abb. 2a: Core 1 Typ von O-Glykanen

Abb. 2b: Core 2 Typ von O-Glykanen

Die Core-Strukturen können zu linearen oder verzweigten Oligosaccharidketten verlängert werden, die häufig aus repetitiven Disaccharideinheiten bestehen. Als endständige Zucker findet man Fukosen, Sialinsäuren und Sulphat-Reste [6].

O-Glykane des Mucin-Typs findet man in Schleimhäuten, wo sie wasserspeichernde und antibakterielle Schutzfunktion haben [1,2]. Weiters sind O-Glykane an

Adhäsionsvorgängen beteiligt und tragen zur Invasion und dem Überleben von Pathogenen und malignen Zellen im Körper bei [6].

Gut bekannte Strukturen findet man im ABO-Blutgruppen-System wieder. Die Struktur der Blutgruppen-Antigene entspricht jener der O-Glykane, allerdings können sie auch als N-Glykane oder Glykolipide gebunden vorkommen [1].



Abb. 3: ABO-Blutgruppen-Antigene

#### 2.1.2. N-Glykane

N-Glykane sind über den reduzierenden Zucker N-Acetylglukosamin der einheitlichen Core-Struktur (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) kovalent mit dem Amidstickstoff von Asparagin in der Aminosäurekette eines Proteins verbunden, wobei dafür die Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr erforderlich ist (X steht für jede beliebige Aminosäure außer Prolin). Allerdings bedeutet das Vorhandensein einer Konsensussequenz nicht zwangsläufig, dass eine Glykosylierung vorliegt. Nur ca. ein Drittel der möglichen Glykosylierungsstellen sekretierter Glykoproteine ist auch tatsächlich glykosyliert. Die Proteinglykosylierung findet co-translatorisch im Endoplasmatischen Reticulum (ER) und im Golgi-Apparat von eukaryotischen Zellen statt [6, 7].

Über die Glykan-Synthese in Bakterien gibt es noch kaum Informationen, da lange Zeit nicht bekannt war, dass Bakterien überhaupt Fähigkeiten zur Glykosylierung besitzen. Erste Beobachtungen über N-Glykane an Proteinen in *Camylobacter jejuni*, einem gramnegativen Bakterium, wurden 1999 von Symanski et.al publiziert [8].

Manal <sup>6</sup>Manpl-4GlcNAcpl-4GlcNAcpl-Asn Manal

Abb. 4: Core-Struktur von N-Glykanen

Die Synthese der N-Glykane kann grob in 3 Schritte eingeteilt werden:

- 1.) Synthese eines Dolichol-gebundenen Oligosaccharid-Precursor
- 2.) En bloc Transfer des Oligosaccharids auf die wachsende Polypeptidkette
- 3.) Prozessieren des Glykans

Zunächst wird an der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran die Oligosaccharid-Struktur (Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) an Dolicholphosphat gebunden, wobei die Monosaccharide einzeln via UDP-GlcNAc bzw. GDP-Man übertragen werden. Sodann klappt die gesamte Struktur auf die Lumenseite des ER. Dieser Vorgang wird vermutlich von einem membrangebundenen Enzym katalysiert, der genaue Mechanismus dieser "Flippase" ist noch weitgehend unbekannt.

Auf der Lumenseite werden weitere 4 Mannosen und 3 Glukosen an das Oligosaccharid angefügt, die aber nun als Dolichol-P-Man bzw. Dolichol-P-Glc angeliefert werden, da die Nukleotid-Diphosphate die ER-Membran nicht passieren können [1, 2].



Abb. 5: Synthese eines N-Glykan-Precursors [1]

Das fertige Precursor-Oligosaccharid (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) wird im Lumen des ER von einer Oligosaccharyltransferase auf die wachsende Polypeptidkette, die vom Ribosom ebenfalls ins Lumen des ER entlassen wird, übertragen. Nachdem die β-glykosidische Bindung hergestellt und die Translation abgeschlossen ist, werden die drei Glukosereste abgespalten, die entsprechenden Enzyme werden als Glukosidasen bezeichnet.

Im Anschluss daran erfolgt die Faltung des neu synthetisierten Proteins. Ist diese korrekt, wird eine Mannose entfernt und das Glykoprotein mit der Glykanstruktur Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> in den Golgi-Apparat transportiert. Dort erfolgt nun die weitere Modifikation des Glykoproteins, es entstehen die drei Grundtypen von N-Glykanen: der hochmannosidische, der komplexe und der hybride Typ [2, 7].

Abb 6: Hochmannosidischer N-Glykan Typ

Abb 7: Komplexer, diantennärer N-Glykan Typ

Abb 8: Hybrider N-Glykan Typ

#### 2.1.3. Erkennung von Glykanstrukturen

Eine der wichtigsten Funktionen der Glykokonjugate ist die Vermittlung von Interaktionen zwischen Zellen. Sowohl zwischen zwei Körperzellen eines Organismus, als auch zwischen Wirt und Eindringling.

Die Glykane auf Membranproteinen und -lipiden bilden gemeinsam den sogenannten Glykocalyx, der in der Zell-Zellerkennung sozusagen an vorderster Front agiert [2].

Einleitung

Die Erkennung von Glykanstrukturen erfolgt durch Lektine, kohlenhydratbindende Proteine, die weder zu den Antikörpern noch zu den Enzymen gezählt werden. Die Bindung von Glykan-Epitopen durch Antikörper findet nur bei der Unterscheidung zwischen "körpereigen" und "körperfremd" statt.

Die ersten Lektine wurden in Pflanzen gefunden, heute geht man davon aus, dass alle Organismen Lektine produzieren. Lektine binden mit hoher Spezifität und Selektivität an bestimmte Kohlenhydratreste, jedoch ist ihre Funktionsweise nicht vollständig aufgeklärt. Sie können - müssen jedoch nicht - zu "Cross-linkages" und Zellagglutination führen. Um eine Saccharidstruktur binden zu können, ist meist nicht nur der endständige Zuckerrest ausschlaggebend, das "Kohlenhydrat-Epitop" muss eine bestimmte Struktur aufweisen, die aus zwei oder mehr Monosacchariden in bestimmter Bindung bestehen kann.

Pflanzenlektine binden meistens an Zuckerstrukturen, die nicht von der Pflanze selbst gebildet werden. Beispiele sind *Sambucus nigra* und *Maackia amurensis*, die spezifisch endständige Sialinsäuren binden, wie sie in erster Linie in Säugern vorkommen. Diese Eigenschaft lässt die Vermutung zu, dass Pflanzenlektine als Schutz gegen Schädlinge und Infektionen dienen und somit die Funktion eines "primitiven Immunsystems" erfüllen. Aus demselben Grund eignen sie sich auch zur Reinigung und Detektion von Glykoproteinen [5].

#### 2.1.4. Glykosylierung verschiedener Organismen

Der hochmannosidische N-Glykan Typ kommt vor allem in Hefen vor. Glykane mit bis zu 150 Mannosen können gebildet werden. Pauci- und oligomannosidische Strukturen bis Man9 kommen in nahezu allen Organismen vor. Der komplexe Typ ist weit verbreitet, Vorkommen und Bindung der verschiedenen Monosaccharide variieren je nach Organismus.

Merkmale der in Pflanzen vorkommenden komplexen N-Glykane sind α1,3-gebundene Fukose und β1,2-gebundene Xylose. Die endständigen Monosaccharide sind häufig Mannosen oder Galaktosen [9].

8



Abb. 9: Typische N-Glykan Strukturen in Pflanzen [1, 4]

In Insekten wurde sowohl α1,3 als auch α1,6-gebundene Fukose nachgewiesen, jedoch keine Xylose. In sehr frühen Entwicklungsstadien konnten auch sialylierte Glykane in *Drosophila malanogaster* detektiert werden, dabei handelt es sich jedoch um äußerst seltene Modifikationen. In ausgewachsenen Insektenzellen wurden keine Sialinsäuren gefunden [10, 11].



Abb. 10: N-Glykan Struktur in Insekten [4]

Während  $\alpha$ 1,6-gebundene Fukose auch in humanen Glykokonjugaten vorkommt, sind Xylose und  $\alpha$ 1,3-gebundene Fukose pflanzentypische Modifikationen und oft Auslöser allergischer Reaktionen, wie sie bei Nahrungsmittel- und Bienengiftallergien auftreten. Das Trisaccharid Gal $\beta$ 1,3[Fuc $\alpha$ 1,4]GlcNAc (Lewis A Antigen) stellt eine mögliche Ursache von allergischen Kreuzreaktionen, z.B. zwischen Nahrungsmittel- und Pollenallergien, dar [12].

Fukose in α1,6 Bindung sowie endständig gebundene Sialinsäuren wurden in Säugetieren nachgewiesen, wobei in erster Linie N-Acetyl-Neuraminsäure für Menschen spezifisch ist.

Fucal Siaa2-3/6GalB1-4GlcNAcB1-2Manaly <sup>6</sup> Manβl-4GleNAcβl-4GleNAcβl-Asn Siaa2-3/6GalB1-4GlcNAcB1-2Manal

Abb. 11: Typische N-Glykan Struktur von Säugern

#### 2.1.4.1. Sialinsäuren

Sialinsäuren sind alle natürlichen und synthetischen N- und O-Derivate der Neuraminsäure. Aufgrund unterschiedlicher Substitutionen an C4, C5, C7, C8 und C9 wurden bisher über 40 verschiedene Derivate gefunden [10, 13]. In Menschen kommt hauptsächlich N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac) vor, nur in Embryos und Tumorgewebe wurde die an der Acetylgruppe hydroxylierte N-Acetyl-Glykolylsäure (Neu5Gc) gefunden. Sialinsäuren werden im Golgi-Apparat von Sialyltransferasen endständig in  $\alpha$ 2,3,  $\alpha$ 2,6 oder  $\alpha$ 2,8 Stellung an Glykane gebunden. Als Donor dient im Gegensatz zu anderen Monosacchariden CMP-Sia [14].



Abb. 12: N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac)

Die Bedeutung von endständig sialylierten Glykoproteinen im menschlichen Organismus liegt vor allem in der Erkennung von körpereigenen Molekülen [15]. Die Sialylierung hat einen wesentlichen Einfluss auf die Verweilzeit eines Glykoproteins im Stoffwechsel [16]. Diese Schutzfunktion des Körpers ermöglicht die schnelle Detektion fremder nichtsialylierter Zellen und die Elimination via Komplementsystem. Auf der anderen Seite sind viele Pathogene auf die Erkennung und Bindung von endständigen Sialinsäuren konditioniert, um in den Wirt eindringen zu können. Andere Mikroben sind darauf spezialisiert Sialinsäuren an ihrer Oberfläche zu präsentieren um die Glykosylierung des Wirts zu imitieren und das Immunsystem und andere Abwehrmechanismen zu unterlaufen [15].

Im Fall von Influenzaviren werden Sialinsäuren an der Zelloberfläche des Wirts von dem Hüllenprotein Hämaglutinin erkannt. Nach Aufnahme in die Zelle wird der Sialinsäurerest von einer Neuraminidase abgespalten und das Virus damit freigesetzt. Die verschiedenen Subtypen der ausschlaggebenden Enzyme führen zu den charakterisierenden Bezeichnungen unterschiedlicher Influenzavirus-Typen (z.B. H5N1, Erreger der Vogelgrippe) [17, 18].

Ein weiteres Beispiel für die Beeinflussung des Immunsystems durch Glykane, allerdings unter Verwendung eines anderen Mechanismus, ist das an der Kapseloberfläche des Hepatitis C Virus vorkommende Glykoprotein E2, welches die Erkennung des Virus durch die T-Zellen herabsetzt. Die Entfernung der N-Glykane dieses Proteins führt zu einer verstärkten Immunantwort bei Infektion mit Hepatitis C [19]. Über die Glykanstruktur selbst gibt es noch keine Informationen. Reaktionen mit den C-Typ Lektinen DC-SIGN und L-SIGN lassen die Vermutung zu, dass die Glykanstruktur Mannosen enthält. Die positive Reaktion mit Calnexin, einem lektin-ähnlichen Chaperon des ER deutet auf Glukosereste hin [20].

#### 2.1.5. Wissenschaftliche Bedeutung von Glykanen

Durch immer weiter entwickelten Detektionsmöglichkeiten und das damit zunehmende Wissen über Funktion und Vorkommen von Glykoproteinen gewinnt ihre Bedeutung auch in der medizinischen und pharmazeutischen Forschung und Diagnostik immer mehr an Gewicht. Die Bereiche in denen Glykosylierungen eine Rolle spielen, sind genauso weitreichend wie die Funktionen der Glykokonjugate selbst. Allergien, Krebs, Xenotransplantationen, Infektionen durch Viren, Bakterien und Parasiten, aber auch der immer größer werdende Markt an rekombinant hergestellten Glykoproteinen stellen einige der relevanten Bereiche dar mit denen die Forschung heutzutage konfrontiert ist. Um rekombinante Glykoproteine herstellen zu können, die für den therapeutischen Einsatz in Frage kommen, muss sicher gestellt sein, dass die Glykosylierung mit der des Zielorganismus übereinstimmt. Im Fall von humanen Therapeutika spielt vor allem die endständige Sialylierung und die Vermeidung von allergenen Strukturen eine Rolle. Bei der Entwicklung von Expressionssystemen für rekombinante Glykoproteine stellt sich die Frage der genetischen Fähigkeit von Organismen zur (humanen) Glykosylierung und Sialylierung. Aktuelle Forschungen beschäftigen sich mit der Eignung von *Arabidopsis thaliana* als Expressionssystem für sialylierte Glykokonjugate [21, 22, 23].

#### 2.2. Aktuelle Forschungsgebiete im Zusammenhang mit Glykosylierung

#### 2.2.1. Schistosoma

Unter Schistosomiasis (früher Bilharziose) werden die Krankheitssymptome zusammengefasst, die durch Infektion mit verschiedenen Stämmen des Parasiten *Schistosoma* hervorgerufen werden. Diese Trematoden benutzen als Zwischenwirt Süßwasserschnecken, wie sie in warmen stehenden Gewässern der Tropen und Subtropen vorkommen. Ein typischer Zwischenwirt von *Schistosoma mansoni* ist die tropische Wasserschnecke *Biomphalaria glabrata*, Endwirt dieses Stammes ist der Mensch.

#### 2.2.1.1. Biologie der Schistosoma

Schistosomen sind getrenntgeschlechtliche Trematoden deren Lebenszyklus zwischen dem Endwirt Wirbeltier und dem Zwischenwirt Schnecke alterniert. Drei humanpathogene Vertreter sind Schistosoma mansoni, Schistosoma japonicum und Schistosoma haematobium. Die Parasiten werden auch Pärchenegel genannt, da Männchen und Weibchen als Paar leben. Die von den Weibchen gelegten Eier werden ins Blut abgegeben, von wo aus sie in die Blase, in den Darm und in andere Organe des Körpers gelangen. Über menschliche Ausscheidungen gelangt ein Teil der Eier ins Wasser, wo die Miracidien schlüpfen. Diese dringen in den Zwischenwirt ein und entwickeln sich in der Mitteldarmdrüse zu sogenannten Gabelschwanzcercarien. Letztere werden mit den Ausscheidungen der Schnecke wieder ins Wasser abgegeben. Sobald ein passender Endwirt gefunden ist, dringt die Cercarie durch die Haut in die Blutbahn ein und verliert dabei ihren Gabelschwanz. Es erfolgt die weitere Entwicklung zu noch unreifen Schistosomula, die in der Lunge leben. Erst zur Paarung wandern die ausgewachsenen und Weibchen erfolgt. [24, 25].



Abb. 13: Lebenszyklus von Schistosoma mansoni [1]

Die Symptome im Zusammenhang mit einer Infektion durch *Schistosoma* hängen von den jeweils befallenen Organen ab. Sie reichen von Fieber, Müdigkeit, allergischen Reaktionen, Eosinophilie und Anämie bis zu Blasenkrebs, Veränderungen der Darmwand, chronischen Leber- und Milzschäden [25]. Die Reaktionen des Immunsystems des Endwirts sowie die Interaktion zwischen Parasit und Zwischenwirt scheinen in hohem Maße von Glykokonjugaten beeinflusst und gesteuert zu werden.

#### 2.2.1.2. Glykosylierung

#### O-Glykane

Einige der Oberflächen-Glykokonjugate der ausgewachsenen Schistosomen zeigen dieselbe Struktur wie humane O-Glykane des Mucin-Typs. Diese Strukturen werden im humanen Organismus mit Autoimmunreaktionen und in weiterer Folge mit der Entstehung von Krebs in Zusammenhang gebracht [1, 24].

GalNAcal-Ser/Thr GalNAcal-Ser/Thr Galß

**Tn-Antigen** 

T-Antigen

Abb. 14: O-Glykane des Mucin Typs

Zwei der ersten, als immunogen identifizierten Glykoproteine aus dem Verdauungstrakt von ausgewachsenen *Schistosoma* sind das zirkulierende anodische Antigen (CAA) und das zirkulierende kathodische Antigen (CCA). CCA lässt sich durch einen hohen Anteil endständiger Galaktosen, sowie Fukosylierungen in α1,3-Bindung charakterisieren. Poly-Lewis X Strukturen führen zur Bildung von Glykoproteinen mit bis zu 80% Kohlenhydratanteil. CAA ist aus N-Acetylgalaktosaminen und Glukuronsäuren aufgebaut ist, wobei die Core Struktur noch nicht ermittelt werden konnte.



Abb. 15: Typische Struktur des CCA aus adulten Schistosoma [24]

$$\begin{pmatrix} GlcA\beta \\ 3\\ -GalNAc\beta \\ 1-6- \end{pmatrix} GalNAc\beta \\ 1-6- Core-Ser/Thr$$

$$n \ge 4$$

Abb 16: Typische Struktur des CAA [24]

Die O-Glykane des cercariellen Glykocalyx bestehen aus mindestens 60 Monosaccharidresten, neben N-Acetylglukosamin und N-Acetylgalaktosamin ist Fukose der dominierende Zucker. Eine Glykanstruktur dieses Aufbaus wurde in noch keinem anderen Organismus gefunden und löst im infizierten Individuum starke Immunreaktionen aus [26]. Dieser komplexe, hoch fukosylierte Glykocalyx löst sich ab und wird durch eine anders glykosylierte Oberfläche ersetzt, sobald die Cercarien in den Endwirt eingedrungen sind [27].

$$\begin{array}{c} \begin{array}{c} \pm \operatorname{Fuc\alpha 1-2Fuc\alpha 1-3} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \pm \operatorname{Fuc\alpha 1-2Fuc\alpha 1-3} \\ \left( -\operatorname{GalNAc\beta 1-4\operatorname{GlcNAc\beta 1-3}\operatorname{Gal\alpha 1-3}} \right) \\ \operatorname{GalNAc\beta 1-4\operatorname{GlcNAc\beta 1-4}\operatorname{GlcNAc\beta 1-3} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} - \pm \operatorname{Fuc\alpha 1-2Fuc\alpha 1-3} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \pm \operatorname{Fuc\alpha 1-2Fuc\alpha 1-3} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} - \operatorname{GalNAc\alpha 1-Ser/Thr} \\ - \operatorname{GalNAc\beta 1-4\operatorname{GlcNAc\beta 1-3}\operatorname{Gal\alpha 1-3} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} - \operatorname{GalNAc\beta 1-4\operatorname{GlcNAc\beta 1-3}\operatorname{Gal\beta 1-3} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} - \operatorname{GalNAc\beta 1-4\operatorname{GlcNAc\beta 1-3}\operatorname{Gal\beta 1-3} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} - \operatorname{GalNAc\beta 1-4\operatorname{GlcNAc\beta 1-3}\operatorname{Gal\beta 1-3} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} - \operatorname{GalNAc\beta 1-4\operatorname{GlcNAc\beta 1-3}\operatorname{Gal\beta 1-3} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array}$$

#### N-Glykane

In *Schistosoma* wurden sowohl hochmannosidische als auch komplexe N-Glykane gefunden. Die Glykane des komplexen Typs reichen von di- bis tetraantennär und werden aus den Bausteinen LacdiNAc (LDN), LacdiNAc-F (LDN-F) sowie LacNAc (LN) und Lewis X (Le<sup>x</sup>, LN-F) gebildet [26]. Auch Core-α1,6-gebundene Fukose wurde nachgewiesen. Es konnten weder Sialinsäuren noch Sulfatgruppen in Glykoproteinen von *Schistosoma* nachgewiesen werden. Bislang gibt es keine Publikationen über endständig methylierte Glykane in *Schistosoma*.





Abb. 18: Komplexe N-Glykan Strukturen aus Schistosoma [24]

Die Lewis X Struktur kommt damit sowohl auf O- als auch auf N-Glykanen vor, flächendeckend allerdings nur in Schistosomula und ausgewachsenen *Schistosoma*, in den Miracidien fehlt sie völlig, in den Cercarien ist sie nur in Spuren zu finden. In allen mit *Schistosoma* infizierten Individuen konnten Antikörper (IgM und IgG) gegen das Lewis X Antigen nachgewiesen werden [24, 27]. In N-Glykanen aus Schistosomen Eiern konnte neben  $\alpha$ 1,3- und  $\alpha$ 1,6-gebundener Fukose auch  $\beta$ 1,2-gebundene Xylose nachgewiesen werden [26]. Während die Xylosylierung sich im Fall von *S. japonicum* auf die Eier beschränkt, finden sich bei *S. mansoni* auch in den Cercarien xylosylierte Strukturen.  $\alpha$ 1,3-Fukose und  $\beta$ 1,2-Xylose stellen bekanntermaßen die typischen Epitope in Pflanzenallergenen dar, die von IgE erkannt werden [28]. Diese Glykanstrukturen könnten auch für die starke Immunantwort des infizierten Individuums zum Zeitpunkt der Eiablage verantwortlich sein. Medizinisch gesehen beginnt zu diesem Zeitpunkt die chronische Phase der Infektion. Nur etwa 50 % der Eier werden vom Wirt ausgeschieden, der Rest verbleibt im Körper und wird über den Blutkreislauf verteilt. In kleineren Gefäßen bleiben die Eier stecken, es kann zu dauerhaften Entzündungsreaktionen und damit Schädigung der Blutgefäße, sowie Thrombosen kommen [25].

Die in *Schistosoma* synthetisierten Glykokonjugate bieten gute Angriffspunkte für das menschliche Immunsystem. Dennoch können die ausgewachsenen Parasiten in ihrem Endwirt überleben. Smithers und Terry [29] beschreiben die Theorie, dass jene Trematoden, die die Immunreaktion des Wirts auslösen selbst gegen einen Angriff des Immunsystems beständig sind, während neu eingedrungene Schistosomula dadurch eliminiert werden. Dies würde bedeuten, dass sich bereits eingenistete Würmer der neu hinzukommenden Konkurrenz entledigen können, indem sie das Immunsystem des Wirtes zu ihrem eigenen Schutz verwenden [24]. Diese Möglichkeit wird auch von Horák und Kolářová [30] beschrieben, wobei hier davon ausgegangen wird, dass der abgeworfene Glykocalyx der Cercarien für die Stimulation des Immunsystems verantwortlich ist. Durch Synthese neuer Oberflächenglykane können die Trematoden nach der schnellen Metamorphose von Cercarie in Schistosomula den folgenden Immunreaktionen entgehen.

Es hat sich herausgestellt, dass Schistosomen die Fähigkeit besitzen Proteine und Lipide des Wirtes aufzunehmen und diese in ihren eigenen Metabolismus einzubauen.

Konkret konnte dies für Antikörper, Blutgruppenantigene, MHC-Produkte und Moleküle des Komplementsystems nachgewiesen werden [31]. Der genaue Mechanismus der Aufnahme wurde allerdings noch nicht aufgeklärt. Es scheint jedenfalls zwei mögliche Varianten dafür zu geben, zum einen die Aufnahme über den Verdauungsapparat der Parasiten und zum anderen durch die Körperoberfläche [32]. Erste Beobachtungen bezüglich der Bindung von Antikörpern an die Oberfläche von *Schistosoma* wurden von Smithers und Terry in den 1960er Jahren [33] gemacht. Die Bindung scheint von Strukturen an der Schistosomen Oberfläche abzuhängen, die mit der F<sub>c</sub> Region des Antikörpers IgG Verbindung eingehen. Das verantwortliche Molekül ist eine lösliche Form von Paramyosin, einem Strukturprotein in der Oberflächenmuskulatur der Parasiten [32]. Nach der Aufnahme wird der Antikörper in Einheiten von 10 bis 15 Aminosäuren zerlegt, welche zur Oberfläche des Parasiten transportiert und schließlich präsentiert werden. Diese Vorgehensweise dürfte dazu dienen die eigene "Fremdartigkeit" zu maskieren und somit dem Immunsystem des jeweiligen Wirtsorganismus zu entkommen [31].

#### 2.2.1.3. Interaktion: Schnecke-Parasit

Interaktionen von Schistosomen mit dem internen Abwehrmechanismus von Schnecken wurden von Horák und Kolářová [30] am Beispiel *Trichobilharzia ocellata – Lymnaea stagnalis* untersucht. Endwirte von *T. ocellata* sind Vögel, allerdings ist die Erkennung des Endwirtes nicht besonders spezifisch, Infektionen von Säugetieren mit *T. ocellata* und anderen Vertretern von Vogel-*Schistosoma* sind durchaus möglich. Obwohl die Überlebensfähigkeit im "falschen" Wirt nicht lange ist, kann es dennoch zu Erkrankungen des Wirts kommen. Die Schistosomula von *Trichobilharzia regenti* zeigen zwar Fehlbildungen, können aber bis ins Rückenmark wandern, wodurch es zu Lähmungserscheinungen in Säugetieren kommen kann.

Auf der anderen Seite zeigen Vogel-Schistosomen interessanterweise eine hohe Spezifität gegenüber dem Zwischenwirt. Sie sind in der Lage zwischen kompatiblen und inkompatiblen Schnecken zu differenzieren. Diese Unterscheidung erfolgt offensichtlich mittels von der Schnecke freigesetzten Glykoproteinen.

Schnecken verfügen über kein adaptives, sondern lediglich über das angeborene Immunsystem. Die Infektion von *L. stagnalis* mit *T. ocellata* führt zunächst zur Aktivierung der humoralen und zellulären Komponenten des Immunsystems und anschließend zur Unterdrückung. Ähnlich wie bei der Penetration des Endwirtes durch die Cercarien kommt es auch beim Eindringen der Miracidien in die Schecke zur Ablösung des Flimmerepithels und zur Entwicklung einer neuen Oberfläche (Neodermis). Das Flimmerepithel wird von den Abwehrmechanismen der Schnecke angegriffen.

Die Suppression des Immunsystems scheint mit der Synthese von vorwiegend Fukose und Galaktose an Oberfläche der Neodermis der *Schistosoma* Larven erklärbar zu sein. Die weitere Entwicklung zu Cercarien geht einher mit der Freisetzung eines bisher noch unbekannten Faktors, der die Schnecke zur Produktion des Peptids Schistosomin anregt. Schistosomin unterdrückt die Bildung der weiblichen Fortpflanzungshormone und verhindert die Eiablage und damit die Vermehrung der Schnecken. Außerdem scheint es Regulatoren des Größenwachstums zu beeinflussen – Schistosomen Infektion führt häufig zu übermäßigem Wachstum der Schnecke. Weiteres kommt es durch die Infektion zur verstärkten Synthese von Neuropeptiden und anderen biologisch aktiven Substanzen im zentralen Nervensystem von *L. stagnalis*. Ein Beispiel dafür sind die sogenannten FMRF-Amid-ähnlichen Peptide, die eine immunsuppressive Wirkung haben.

Infizierte Schnecken haben zwar keine kürzere Lebenserwartung als nicht-infizierte Exemplare, insofern hat die Infektion mit *T. ocellata* keine direkte pathogene Wirkung auf *L. stagnalis*, jedoch ergibt sich durch Unterdrückung der Fortpflanzungsfähigkeit das Problem des Fortbestandes der Schnecke [30].

#### 2.2.2. Schnecken

Abgesehen von jenen Schneckarten, wie zum Beispiel *Biomphalaria glabrata*, die als Zwischenwirte humanpathogener Parasiten (*Schistosoma*) fungieren, sind Gastropoden als Forschungsobjekte im Bereich der Glykobiologie noch nicht sehr weit verbreitet.

Viele Schnecken, in europäischen Breiten vor allem die Nacktschnecke Arion lusitanicus, in Afrika und südlichen Teilen der USA die große Gehäuseschnecke Achatina fulica, verursachen als Pflanzenfresser bedeutende landwirtschaftliche Schäden. Sie werden daher oft mit chemischen Mitteln bekämpft, die sich nicht nur gegen die Schnecken selbst, sondern auch gegen Bodenorganismen und "schnecken-fressende" Tiere wie Igel oder Kröten richten. Schnecken dienen aber auch kulinarische Delikatesse oder schlicht als proteinreiche Nahrung in ärmeren Regionen der Erde.

Die Forschungsergebnisse im Bereich der Glykokonjugate von Schnecken sind noch relativ jung. Es wurden N-Glykan Strukturen von Hämocyanin, einem Sauerstofftransportprotein, aus Helix pomatia (Weinbergschnecke) [34], Lymnaea stagnalis (Schwimmende Spitzschlammschnecke) [35, 36], Rapana venosa (Marine Raubschnecke) [37] und Megathura crenulata (Marine Schlüssellochschnecke) [38], sowie von einem Gehäuseprotein aus Biomphalaria glabrata publiziert [39]. Weitere Arbeiten beschäftigen sich mit den O- und N-Glykanen von Arion lusitanicus [4, 7, 40]. sowie der Fähigkeit von Gastropoden zur Sialylierung von Glykokonjugaten [10, 13].

Die in Schnecken gefundenen Glykane weisen Strukturmerkmale verschiedener Organismen auf. Neben hochmannosidischen und paucimannosidischen N-Glykanen, wurden unterschiedlichst modifizierte N-Glykane des komplexen Typs gefunden.

In Arion lusitanicus findet sich ein hoher Prozentsatz endständig methylierter Glykane, wobei die Methylreste in erster Linie an Mannose und zum Teil an Galaktose gebunden auftreten. Diese Modifikation wurde zunächst in Prokaryoten und niederen Eukaryoten, sowie in Nematoden (*C. elegans*) entdeckt, und später auch im Hämocyanin einiger Schnecken nachgewiesen. Außerdem sind Schnecken in Lage pflanzentypische N-Glykanmuster mit  $\beta$ 1,2-gebundener Xylose und  $\alpha$ 1,3-gebundener Fukose zu

synthetisieren. Häufig findet man auch die für Säugetiere typische α1,6-gebundene Fukose [4, 7, 40] und endständige Sialinsäuren [10, 13]. Auch Sulfatreste sowie endständige Fukosen konnten in *Lymnaea stagnalis* und im Hämocyanin von *Rapana venosa* detektiert werden. In den Eiern von *Arion lusitanicus* konnten 75 % der N-Glykane dem hochmannosidischen Typ zugeordnet werden, der Rest waren xylosylierte oder α1,6-fukosylierte Core-Strukturen (MMX oder MMF<sup>6</sup>). Interessanterweise konnten in den Eiern keine methylierten Strukturen nachgewiesen werden [10].



Abb. 19: Methylierter hochmannosidischer Typ aus Arion lusitanicus [4]



Abb. 20: Einige Modifikationsmöglichkeiten in Schneckenglykanen [40]



Abb. 21: Glykanstruktur von Hämocyanin (KHL) aus Megathura crenulata [38]

Abb. 22: Glykanstruktur der funktionellen Einheit von RvH1-a aus Rapana venosa [37]

Abb 23: N-Glykan Struktur aus Lymnaea stagnalis [35, 36]



Abb. 24: Glykanstruktur des Hämocyanins aus Helix pomatia [34]

Die strukturelle Vielfältigkeit von Schneckenglykanen scheint bisher von keinem anderen Organismus übertroffen zu werden. Weitere Erforschung und Verständnis der Glykosylierungsvorgänge würden dazu beitragen die Regulation der N-Glykan-Synthese noch näher zu beleuchten und die Produktion rekombinanter Glykoproteine zu optimieren. Außerdem könnten sich eventuell Schnecken oder Schneckenzellkulturen selbst als geeignete Systeme dafür herausstellen. Da der Methylierung vermutlich wesentliche regulatorische Funktionen im Organismus der Schnecke zukommen, und diese Variation der Glykanmodifikation in höheren Tieren bisher nicht nachgewiesen wurde, besteht die Möglichkeit über Beeinflussung der involvierten Enzyme weniger umweltbelastende Pestizide zu entwickeln [40].

# 3. Problemstellung

Bereits in früheren Arbeiten wurden Gastropoden (in erster Linie Arion Iusitanicus) hinsichtlich ihres Glykanspektrums untersucht. Dabei wurden nebst neutralen auch negativ geladene und methylierte Strukturen gefunden. Weiters konnte die Fähigkeit von Schnecken zur pflanzen- und säugetiertypischen N-Glykan Modifikation nachgewiesen werden.

Ausgehend von diesen Arbeiten, sollte ein möglichst breites Spektrum an Methoden angewendet werden, um Effektivität und Effizienz im Bezug auf die N-Glykananalyse in Schnecken zu ermitteln. Gängige Methoden sollten optimiert, sowie nach Möglichkeit neue Analysenmethoden, vor allem für geladene Oligosaccharide, entwickelt werden. Weiters sollten die Untersuchungen auf verschiedene Schneckarten ausgeweitet werden. Zur Verfügung standen:

- > Arion lusitanicus (Spanische Wegschnecke, Nackt- und Landschnecke) + Eier
- > Limax maximus (Großer Tigerschnegel, Nackt- und Landschnecke)
- > Achatina fulica (Afrikanische Achatschnecke, Gehäuse- und Landschnecke)
- > Cepea hortensis (Garten-Bänderschnecke, Gehäuse- und Landschnecke)
- > Arianta arbustorum (Gefleckte Schnirkelsschnecke, Gehäuse- und Landschnecke)
- Planobarius corneus (Einheimische Posthornschnecke, Gehäuse- und Wasserschnecke)
- Biomphalaria glabrata (Tropische Posthornschnecke, Gehäuse- und Wasserschnecke) + Zellkultur

Folgende Arbeitsschritte sollten erfolgen:

- Präparationen der N-Glykane aus Haut, Viscera und so vorhanden Eiern und Zellen:
  - Aufreinigung der Glykoproteine, Optimierung der Puffer- und Homogensierungsvarianten
  - Proteolytischer Verdau
  - Freisetzung der N-Glykane
  - Aufreinigung der N-Glykane
  - Markierung der Glykane mit 2-Aminopyridin

- > Elektophoretische Analyse der Glykoproteine:
  - Auftrennung mittels SDS-PAGE und anschließender Western Blot mit Lektin und Antikörper Detektion
    - o Ermittlung eines Überblicks bezüglich der Spezifität verschiedener Lektine
    - o Verifizierung der Strukturen durch spezifische enzymatische Abbauten

# > Analyse der N-Glykane:

- Chromatographisch:
  - o Trennung in neutrale und geladene Glykanstrukturen
  - o Auftrennung der Strukturen nach Hydrophobizität
  - Etablierung einer HPLC-Methode zur Trennung ein- und mehrfach geladener Strukturen
  - Optimierung einer HPLC-Methode zur Unterscheidung der Monosaccharide und damit Differenzierung der Glykane anhand ihres Monosaccharidspektrums
- Monosaccharidanalyse:
  - Hydrolyse der Oligosaccharide mit Trifluoressigsäure
  - o Markierung der Monosaccharide mit Anthranilsäure
- Massenspektrometrisch:
  - Identifizierung der Glykane mittels MALDI-TOF-MS mit besonderem Augenmerk auf geladene Strukturen
  - o Verifizierung der Strukturen durch spezifische enzymatische Abbauten

# 4. Material und Methoden

# 4.1. Präparative Methoden

### **4.1.1.** Glykanpräparation aus Schnecken und Schneckeneiern [7]

Da nicht bei jeder Präparation von der gleichen Menge an Rohmaterial ausgegangen werden kann, müssen einige Präparationsschritte an die jeweilige Probenmenge angepasst werden. Im Folgenden sind jene Schritte, die sich auf die Präparation in kleinerem Maßstab beziehen mit \* gekennzeichnet.

#### 4.1.1.1. Vorbereitung und Homogenisierung

Geräte: Ultra Turrax T 25 (8000 bis 24 000 U/min) Kühlzentrifuge Sorvall mit Rotor SS 34

Reagenzien: Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5

#### Durchführung:

Die eingefrorenen Schnecken wurden im lauwarmen Wasser aufgetaut und gereinigt. Gehäuseschnecken wurden vorsichtig aus ihrem Haus gelöst. Die Tiere wurden seziert, wobei vor allem die Entfernung des Darms wesentlich war, da Glykoproteine im Darminhalt zu verfälschten Ergebnissen führen könnten.

Für die weitere Präparation wurden die inneren Organe (Viscera) vom Muskelfleisch (Haut) getrennt, in kleine Stücke geschnitten und nochmals in Wasser gewaschen.

Schneckeneier wurden mit einem Glasstab zerdrückt, die Schalen mit 1000 U/min kurz abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde weiter verarbeitet.

Je nach Ausgangsmenge wurde Puffer zugegeben und mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Die Suspension wurde mit 20 000 U/min bei 20°C 20 Minuten zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Ammonsulfatfällung durchgeführt.

# 4.1.1.2. Fraktionierte Ammonsulfatfällung

Geräte: Kühlzentrifuge Sorvall mit Rotor SS 34

Reagenzien: Ammonsulfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

# Durchführung:

Die Überstände wurden unter Rühren zunächst auf eine Ammonsulfatkonzentration von 40 % (w/v) gebracht, 20 Minuten stehen gelassen und anschließend mit 20 000 U/min bei 4°C 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach derselben Vorgehensweise auf 80 % Sättigung gebracht. Die beiden Pellets wurden vereinigt und in destilliertem Wasser aufgeschlämmt.

Die Fällung wurde in zwei Schritten durchgeführt, weil Schnecken aufgrund ihrer Schleimproduktion schwierig zu verarbeiten sind, und so eine bessere Abtrennung des Schleims erreicht werden sollte.

# 4.1.1.3. Dialyse

Dialyseschlauch: Servapor, d = 16 mm, Ausschlussgrenze: 10 000 Da

# Durchführung:

Die Suspensionen der Proben wurden in einen Dialyseschlauch gefüllt und zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur gegen H<sub>2</sub>O dest. dialysiert. Anschließend wurde das Wasser gewechselt und die Dialyse über Nacht bei 4°C fortgesetzt.

# 4.1.1.4. Proteolytischer Abbau

Reagenzien:Thermolysin aus Bacillus thermoproteolyticus rokko (SIGMA)Puffer: 150 mM Tris/HCl + 1 mM CaCl2 pH 7,8

# Durchführung:

Die lyophilisierten Proben wurden in möglichst wenig Puffer so gut wie möglich gelöst und je Milliliter Puffer mit ca. 1 g Thermolysin versetzt. Der Abbau erfolgte über Nacht bei 50°C.

## 4.1.1.5. Kationenaustauscherchromatographie

Geräte:	Säule: 3 x 25 cm (oder 1 x 20 cm *)		
	Fraktionsgröße: 80 Tropfen/Fraktion		
Reagenzien:	Waschpuffer: 1 M NH₄Acetat pH 9,0		
	Startpuffer: 2 % Essigsäure		
	Elutionspuffer: 0,4 M NH₄Acetat pH 6,0		
	Gel: Biorad AG 50 W x 2		

# Durchführung:

Das Gel wurde in einer Nutsche mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit Essigsäure equilibriert. Die proteolytisch abgebaute Probe wurde in einem Becherglas mit ca. 150 (bzw. 15 ml \*) Gel vermischt und bei Raumtemperatur 30 Minuten stehen gelassen.

Anschließend wurde damit die Säule befüllt und mit etwa 100 (bzw. 20 ml \*) HAc gewaschen. Mit 200 (bzw. 40 ml \*) Elutionspuffer wurden die Glykopeptide eluiert und mit Orcinol auf Kohlenhydrate überprüft. Die entsprechenden Fraktionen wurden gepoolt und am Rotationsverdampfer auf 2-3 ml eingeengt.

Dieser Reinigungsschritt kann auch ohne Fraktionskollektor durchgeführt werden. Dabei wird das gesamte Eluat nach dem Laufmittelwechsel auf NH<sub>4</sub>Acetat gesammelt und ebenfalls eingeengt.

4.1.1.6. Gelfiltration G 25

Geräte:	Säule: 1,5 x 100 cm
	Fraktionsgröße: 120 Tropfen/Fraktion
Reagenzien:	Laufmittel: 1 % Essigsäure
	Gel: Sephadex G 25 fine (Amersham)

Durchführung:

Die einrotierte Probe wurde auf die Säule aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur aufgetrennt. Wieder wurde mit Orcinol auf Kohlenhydrate überprüft, entsprechend gepoolt und anschließend lyophilisiert.

(Bei den Präparationen im kleinen Maßstab wurde an dieser Stelle mit einer G 15 – Säule gearbeitet - siehe Pkt. 4.1.1.8).

4.1.1.7. Peptid-N-Glykanase A Abbau

Reagenzien:	Puffer: 0,1 M Citrat/Phosphat pH 5,0		
	Enzym: PNGase A aus Mandeln: 0,15 mU/µl (Präparation von Ing.		
	Thomas Dalik)		

Durchführung:

Die lyophilisierten Proben wurden in möglichst wenig Puffer gelöst und 10 µl Enzym je Milliliter Puffer zugegeben. Die Ansätze wurde bei 37°C über Nacht inkubiert.

# 4.1.1.8. Gelfiltration G 15

Geräte:	Säule: 1 x 50 cm		
	Fraktionsgröße: 35 Tropfen/Fraktion		
Reagenzien:	Laufmittel: 1 % Essigsäure		
	Gel: Sephadex G 15 (Amersham)		

Durchführung:

Die mit PNGase A behandelten Proben wurden auf die Säule aufgetragen und auf ca. 20 bis 25 Fraktionen aufgetrennt. Mittels Orcinol-Reaktion wurden vorhandene Glykane nachgewiesen, dann gepoolt und lyophilisiert.

# 4.1.2. Glykanpräparation aus Biomphalaria glabrata-Zellen [41]

### 4.1.2.1. Vorbereitung und Homogenisierung

Geräte:	Ultra Turrax	T 25	(8000 bis	s 24 (	000 U/i	min)
---------	--------------	------	-----------	--------	---------	------

Reagenzien: 80 mM HCl

## Durchführung:

Zellkulturen von *Biomphalaria glabrata* wurden durch zentrifugieren mit 5 000 U/min abgeerntet, die Zellen zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, wieder abzentrifugiert und gewogen. Ungefähr 0,7 g Zellen wurden in 5 ml HCl suspendiert und einige Minuten mit dem Ultra Turrax (maximale Geschwindigkeit) homogenisiert.

#### 4.1.2.2. Proteolytischer Abbau und Zentrifugation

Geräte: Kühlzentrifuge Sorvall mit Rotor SS 34

Reagenzien: Pepsin (Porcine Stomach Mucosa) 4,15 U/mg solid (SIGMA)

Durchführung:

Das Zellhomogenisat in HCl wurde mit ca. 1 mg Pepsin versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Nach 20 Minuten Zentrifugation mit 10 000 U/min bei 15 °C wurde das Pellet verworfen und mit dem Überstand weitergearbeitet.

4.1.2.3. 1. Kationenaustauscherchromatographie

Geräte: Säule: 1,7 x 30 cm

Reagenzien: siehe Pkt. 4.1.1.5

#### Durchführung:

Der Ionenaustausch wurde genauso wie unter Pkt. 4.1.1.5 beschrieben durchgeführt. Der Überstand der proteolytisch abgebauten Probe wurde in einem Becherglas mit ca. 50 ml -Gel vermischt. Es wurden von Startpuffer und Elutionspuffer je ca. 50 ml verwendet.

4.1.2.4. Gelfiltration G 25

Geräte:	Säule: 1 x 50 cm
	Fraktionsgröße: 30 Tropfen/Fraktion

Reagenzien:Laufmittel: 1 % EssigsäureGel: Sephadex G 25 coarse (Amersham)

Durchführung:

Die einrotierte Probe wurde auf die Säule aufgetragen mit 1 % HAc eluiert. Die Fraktionen wurden mit Orcinol auf Kohlenhydrate überprüft, entsprechend gepoolt und anschließend lyophilisiert.

4.1.2.5. Peptid-N-Glykanase A Abbau

Reagenzien: Puffer: 50 mM NH₄Acetat pH 5,0 Enzym: PNGase A aus Mandeln: 0,15 mU/µl (Präparation von Ing. Thomas Dalik)

Durchführung:

Die lyophilisierte Probe wurde in 400 µl Puffer gelöst und für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt, um Proteasen zu inaktivieren. Nach dem Abkühlen wurden 5 µl Enzym zugegeben und 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

4.1.2.6. 2. Kationenaustauscherchromatographie

- Geräte: Säule: 0,8 x 20 cm
- Reagenzien: 10 % Essigsäure Elutionsmittel: 2 % Essigsäure Gel: Biorad AG 50 W x 2

#### Durchführung:

Die mit PNGase verdaute Probe wurde mit 200  $\mu$ l 10 % HAc versetzt. Die Säule wurde mit 10 ml gereinigtem Gel befüllt, die Probe aufgetragen und die freigesetzten N-Glykane mit ca. 20 ml 2 % HAc eluiert. Anschließend wurde das Probenvolumen am Rotationsverdampfer auf < 500  $\mu$ l (!) eingeengt.

#### 4.1.2.7. Reversed Phase - C18

Material:	Minisäulchen: Strata C18-E (Phenomenex), ohne Originalge	١,
	stattdessen: Lichroprep RP C18 (Merck)	
	stattdessen: Lichroprep RP C18 (Merck)	

Reagenzien:	Isopropanol
	2 % Essigsäure

Durchführung:

Die Säulchen wurden mit 150 µl in Isopropanol gequollenem Gel befüllt und schrittweise auf 2 % HAc umgestellt.

100 µl Probe wurden aufgetragen, die Glykane mit ca. 300 µl HAc eluiert und anschließend lyophilisiert.

# 4.1.3. Pyridylaminierung von Oligosacchariden

Reagenzien: PA-Stammlösung:1 g 2-Aminopyridin in 0,76 ml HCl konz.
 PA-Lösung-frisch: 1 Teil Stammlösung + 2 Teile H<sub>2</sub>O (pH 6,2)
 NaCNBH<sub>3</sub>-Lösung: 10 mg NaCNBH<sub>3</sub> in 20 µl PA-Lösung-frisch + 30 µl H<sub>2</sub>O dest.

### Durchführung:

Den lyophilisierten Oligosacchariden wurde soviel PA-Lösung-frisch zugegeben bis sie nahezu vollständig gelöst waren, anschließend wurden sie 13 Minuten auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden zu dem Ansatz 5 µl NaCNBH<sub>3</sub>-Lösung auf 100 µl zugegeben und die Proben über Nacht bei 90 °C inkubiert.

Der Überschuss an 2-Aminopyridin wurde durch Gelfiltration (G 15) entfernt und die Probe wieder lyophilisiert.

Die Markierung mit Aminopyridin ermöglicht eine fluorimetrische Detektion der Oligosaccharide bei Ex/Em = 320/400 nm.

Die Gelfiltrationssäule muss danach einige Stunden gespült werden, um sie vom Reagens zu reinigen.

## 4.1.4. Glykanhydrolyse mit Trifluoressigsäure

Reagenzien:4 M Trifluoressigsäure (TFA)30 % Methanol

## Durchführung:

Die lyophilisierten Glykanproben wurden in möglichst wenig Wasser gelöst. Von den Lösungen wurden Aliquote entnommen, in 1,5 ml Eppis überführt und in der Speed Vac vollständig getrocknet. Anschließend wurden 250 µl TFA zugegeben und die Ansätze 4 Stunden bei 100°C hydrolysiert. Danach wurde die TFA durch Trocknen in der Speed Vac entfernt und die Proben zweimal mit je 200 µl MeOH gewaschen und wieder getrocknet. Die Pellets wurden anschließend für die Monosaccharid-Analyse mittels Anthranilsäure-Markierung herangezogen.

### 4.1.5. Anthranilsäure-Markierung von Monosacchariden

Reagenzien: Anthranilsäurereagens:

- 24 mg Natriumacetat, 20 mg Borsäure und 6 mg Anthranilsäure / ml Methanol = Lösung1
- 20 mg NaCNBH<sub>3</sub> / ml Lösung1 (! Muss täglich frisch zubereitet werden!)
- 0,6 % Natriumacetat

Standards: Monosaccharidlösungen 1% oder 0,1 %

Durchführung:

Von den Monosaccharidstandards wurde jeweils 1µl - unabhängig von der Ausgangskonzentration der Lösungen - in ein 1,5 ml Eppendorf Hütchen pipettiert und ca. 20 Minuten in der Speed Vac getrocknet. Dann wurden 10 µl NaAc (0,6%) und 6 µl Anthranilsäurereagens hinzugefügt. Anschließend wurden die Ansätze 1 Stunde bei 80°C im Heizblock inkubiert. Nach Abkühlen wurde kurz abzentrifugiert und die Proben mit Laufmittel A (siehe RP-HPLC AA-markierter Monosaccharide) auf 100 µl aufgefüllt. Anthranilsäure markierte Monosaccharide sind fluorimetrisch bei Ex/Em = 360nm/425 nm detektierbar.

Die Glykanproben wurden vor der Anthranilsäure-Markierung mit TFA (Trifluoressigsäure) hydrolysiert.
### 4.1.6. Probenvorbereitung für SDS-PAGE und Blot

Geräte:	Ultra Turrax T 25 (8000 bis 24 000 U/min) Ultraschallbad
Reagenzien:	RIPA-Puffer:
	<ul> <li>&gt; 50 mM Tris/HCl pH 8,0</li> <li>&gt; 150 mM NaCl</li> <li>&gt; 0,1 % SDS</li> <li>&gt; 0,5 % Deoxycholate</li> <li>&gt; 1 % NP 40</li> <li>&gt; 10 % Glycerol</li> </ul>
	<ul> <li>&gt; 0,4 mM EDTA</li> <li>&gt; 1 % Protease Inhibitor Cocktail (SIGMA)</li> </ul>

Der Puffer wird ohne Zugabe des Proteaseinhibitors hergestellt, der Inhibitor wird erst zu den fertigen Ansätzen zugegeben.

Durchführung:

Die Schnecken wurden, wie unter Pkt. 4.1.1.1 beschrieben gereinigt, seziert und in Haut und Viscera getrennt.

In 2 ml Eppis wurden ca. 25 mg Gewebe eingewogen, mit 100 µl Puffer je 10 mg versetzt, sowie 1 % des Proteaseinhibitors zugegeben. Die Ansätze wurden zunächst 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Weiters wurden die Proben 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt.

Nach weiteren 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde der ungelöste Anteil des Gewebes 15 Minuten mit 14 000 U/min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand wurde ein frisches Eppi überführt und bei – 20°C eingefroren. Davor wurde ein Aliquot für die SDS-PAGE entnommen. Anmerkung:

Die Probenvorbereitungen für SDS-PAGE und Blot wurden anstelle von RIPA-Puffer zunächst mit Tris/HCI pH 7,5 bzw. Tris/HCI mit 1% SDS durchgeführt.

Die Probenbehandlung war weitgehend gleich, wobei sofort nach Zugabe des Puffers homogenisiert wurde.

Die Homogenisierung wurde außerdem auch mit einem Glashomogenisator und einem Bohrer mit Stössel versucht, diese Methoden konnten sich aber neben dem Ultra Turrax nicht bewähren.

Weiters wurde eine Methanol-Fällung durchgeführt, wobei die Probenmenge mit der 5fachen Menge an kaltem Methanol versetzt und zur vollständigen Fällung 30 Minuten bei -20 °C stehen gelassen wurde.

Anschließend wurde 20 Minuten mit 14 000 U/min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgehoben und die Pellets in der Speed Vac getrocknet.

Anschließend wurde je nach Bedarf H<sub>2</sub>O zugesetzt um die Pellets zu lösen und mit einem Aliquot die SDS-PAGE vorbereitet.

#### 4.1.7. SDS-PAGE

Geräte:	MiniProtean II (BIORAD)
---------	-------------------------

Reagenzien: Acrylamid 30 % (w/v) Bisacrylamid 1 % (w/v) Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 SDS 10 % (w/v) TEMED Ammoniumpersulfat (APS) 10 % (w/v)

> Elektrodenpuffer (5x): 18 g/l Tris 72 g/l Glycin 5 g/l SDS

Loading buffer (2x):

- > 400 mg SDS
- > 10 ml Sammelgelpuffer
- > 5,6 ml Glycerin
- > 5,4 ml H₂O
- Bromphenolblau
- > 3 mg/ml DTT (sollte ca. wöchentlich frisch dazu gegeben werden!)

Standard: Page Ruler – Prestained Protein Ladder (Fermentas)

Fixierlösung: 50 % (v/v) MeOH + 7 % (v/v) Eisessig in H<sub>2</sub>O

Färbelösung: 0,04 % (w/v) Coomassie Brillant Blue G (gelöst in einigen Millilitern Methanol) + 3,5 % (v/v) Perchlorsäure in H<sub>2</sub>O

Entfärbelösung: 5 % Essigsäure

Tabelle 1: Gelherstellung (für 1 Gel)

	Analytische PAGE		Präparative PAGE	
	Trenngel	Sammelgel	Trenngel	Sammelgel
AA	2,5 ml	0,57 ml	3,39 ml	0,19 ml
Bis	0,78 ml	0,39 ml	1,04 ml	0,26 ml
TGP	1,5 ml	1	1,5 m	1
SGP	1	0,75 ml	1	0,5 ml
H₂O	1,14 ml	1,28 ml	1	1,05 ml
SDS	60 µl	30 µl	60 µI	20 µl_
APS	36 µl	24 µl	36 µI	16 µl
TEMED	3,6 µl	2,4 µl	3,6 µl	1,6 µl

Die Lösungen wurden in der gegebenen Reihenfolge zusammengemischt, zwischen die Glasplatten pipettiert und jeweils ca. 30 Minuten polymerisieren gelassen. Für die präparative SDS-PAGE soll das Sammelgel 2-3 cm lang sein!

### Probenvorbereitung:

Zwischen 7 und 12 µl Probe (je nach Taschengröße) wurden mit der gleichen Menge an Loading buffer vermischt, 6 Minuten bei 95 °C derivatisiert und danach kurz abzentrifugiert.

Mit einer Hamilton-Spritze wurden die Proben in die Geltaschen geladen. Vom Standard wurden 3 µl eingesetzt.

Bei der präparativen SDS-PAGE ist es sinnvoll zwischen den Proben jeweils eine Tasche freizulassen.

Trennbedingungen:	Analytische SDS-PAGE: 200 V
	Präparative SDS-PAGE: 100 V

Trenndauer:

Bei der analytischen Gelelekrophorese wurden die Proteinbanden in 45 bis 55 Minuten über die gesamte Gellänge aufgetrennt.

Bei der präparativen SDS-PAGE sollen alle in der Probe enthaltenen Proteine von Salzen oder anderen Verunreinigungen getrennt werden. Der Standard dient in diesem Fall nicht als Größenstandard, sondern als Indikator für den Verlauf der Elektrophorese. Sobald die Banden des Standards beginnen sich zu trennen, wird der Lauf abgestoppt.

Färbung:

Nach Ende des Laufs wurde das Gel ca. 30 Minuten fixiert und anschließend ca. 30 Minuten gefärbt. Danach wurde mit HAc entfärbt bis der Hintergrund hellblau bis farblos war.

In 5 % Essigsäure oder in Wasser sind die Gele zugedeckt einige Zeit lagerbar.

# 4.1.8. Glykanpräparation nach der SDS-PAGE

- Reagenzien:50 % Acetonitril100 % Acetonitril25 mM NH₄HCO₃0,1 M NH₄HCO₃10 mM DTT55 mM Jodacetamid5 % Ameisensäure25 mM NH₄Ac pH 5,0
- Enzyme: Trypsin (5 µg/100 µl 1mM HCl) PNGase A aus Mandeln: 0,15 mU/µl (Präparation von Ing. Thomas Dalik)

Durchführung:

Nach vollständiger Entfärbung des Gels nach der Elektrophorese werden die jeweiligen Banden ausgeschnitten, in ca. 1 x 4 mm große Stücke geschnitten und in 1,5 ml Eppis überführt.

Entfärbung:

- 1. + 50 µl 50% AcCN  $\rightarrow$  15 Minuten  $\rightarrow$  abheben
- 2. + 50 µl 50% AcCN  $\rightarrow$  15 Minuten  $\rightarrow$  abheben
- 3. + 50 µl 100 % AcCN → kurz einwirken lassen, bis das Gel weißlich wird → abheben
- 4. + 30 µl 0,1 M NH₄HCO<sub>3</sub> → 5 Minuten quellen lassen
- 5. + 30  $\mu$ l 100 % AcCN  $\rightarrow$  15 Minuten  $\rightarrow$  abheben
- 6. Gelstückchen ca. 15 Minuten in der Speed Vac trocknen

Carboxymethylierung/Carbamidomethylierung:

- 7. + 50 µl 10 mM DTT → 5 Minuten quellen lassen → 45 Minuten bei 56 °C inkubieren
   → abheben
- 8. + 50 µl 55 mM Jodacetamid  $\rightarrow$  30 Minuten in Dunkelheit (!) inkubieren
  - → abheben

Wiederholung der ersten 6 Schritte; das Gel sollte nun vor dem Trocknen farblos sein.

Proteolytischer Abbau:

Trypsin in HCl wird im Verhältnis 1:3 mit 25 mM NH₄HCO₃ gemischt. Je nach Gelmenge werden 10 – 15 µl der Lösung auf die getrockneten Gelstücke pipettiert und ca. 5 Minuten quellen gelassen. Dann werden weitere 20 – 30 µl 25 mM NH₄HCO₃ zugegeben (die Gelstücke sollen nun vollständig bedeckt sein). Die Ansätze werden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Extraktion der Peptide:

- 9. + 30 µl 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>  $\rightarrow$  15 Minuten schütteln
- 10. + 30 µl 100 % AcCN  $\rightarrow$  15 Minuten schütteln  $\rightarrow$  Überstand sammeln
- 11. + 30 µl 5 % HCOOH  $\rightarrow$  15 Minuten schütteln  $\rightarrow$  Überstand sammeln
- 12. + 30 µl 5 % HCOOH  $\rightarrow$  15 Minuten schütteln  $\rightarrow$  Überstand sammeln
- 13. Die gesammelten Proteinextrakte werden in der Speed Vac vollständig getrocknet, die Gelreste werden verworfen.

PNGase A Abbau:

Die getrockneten Glykoproteine werden in 10 µl 25 mM NH₄Ac aufgenommen und 0,25 µl PNGase A zugegeben. Die Ansätze werden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### 4.1.8.1. Abtrennung der Glykane

Material:	SPEC PLUS PT C18 Säulchen	
	Gele:	CIEX: AG 50 W x 8 100-200
		AIEX: AG 3 x 4A 200-400

Reagenzien:	2% Essigsäure
	65 % Acetonitri

Durchführung:

Die RP-Säule wird mit 65 % AcCN gewaschen und mit 2 % HAc equilibriert. Anschließend werden je 15 – 20 µl CIEX-Gel und AIEX-Gel in die Säule pipettiert und ebenfalls mit 2 % HAc equilibriert. Es muss sehr vorsichtig gearbeitet werden, um die Gele nicht zu verwirbeln.

Von den, mit PNGase A verdauten Proben werden 10 – 15  $\mu$ l aufgetragen und die Glykane mit ca. 150  $\mu$ l 2 % HAc eluiert. Das Eluat wird in der Speed Vac getrocknet und anschließend in 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Wenn negativ geladene Glykane analysiert werden sollen, muss das Anionenaustauscher-Gel weggelassen werden!!!

Die gereinigten Proben können für MALDI-TOF-Analysen gespottet werden bzw. sofern die Notwendigkeit besteht, mittels Carbonspitze entsalzt werden.

# 4.2. Analytische Methoden

# 4.2.1. Kohlenhydratbestimmung mit Orcinol

Material:	DC-Kieselgel Folien: Alugram-Sil-G (Machery-Nagel)
Reagenzien:	Orcin-Sprühreagens: 200 mg Orcinol in 100 ml 20 % $H_2SO_4$

Durchführung:

1 µl Probe wurde auf die DC-Platte gespottet und gut getrocknet. Die Platte wurde mit Orcin-Sprühreagens behandelt und im Trockenschrank bei 100°C ca. 10 Minuten inkubiert. Kohlenhydrat-positive Proben weisen eine blau-violette Färbung auf.

# 4.2.2. Enzymatische Abbau-Versuche

Reagenzien:	Neuraminidase-Puffer: 0,1 M NaAcetat pH 5,0
	PNGase F-Puffer: 50 mM NH₄Ac pH 8,4
	PNGase A-Puffer: 0,1 M Citrat/Phosphat pH 5,0
	Endo H-Puffer: 0,15 M Citrat/Phosphat + 0,1 M NaCl + 0,02 % NaN₃
	pH 5,0
	ß-Gal-Puffer: 50 mM NH₄Ac pH 4,0 bis 4,8
	α1,2-Fuc-Puffer: 5 x Reaction buffer pH 5,0 (SIGMA)
	α1,6-Fuc-Puffer: 25 mM NH₄Ac pH 5,0
	GlcNAc-Puffer: 25 mM NaCitrat pH 4,6

Enzyme:

- > Neuraminidase aus *Clostridium perifringens* [10 mU/µl] (SIGMA)
- > N-Glykosidase F aus *E.coli* [1 U/µl] (Roche)
- > PNGase A aus Mandeln [0,15 mU/µl] (Präparation von Ing. Thomas Dalik)
- > Endoglykosidase H aus rekombinantem *E.coli* [1 U/200 µl] (Boehringer Mannheim)
- > ß1,4-Galaktosidase aus A.oryzae [276,5 U/ml] (Präparation von Ing. Thomas Dalik)
- > α1,2-Fukosidase [0,004 U/vial] (SIGMA)
- > α-L-Fukosidase aus Bovine Kidney [10 U/mg Protein] (SIGMA)
- > N-Acetylglukosaminidase aus *Jack Beans* [53 U/mg Protein] (SIGMA)

Standard: Fetuin aus Fetal Calf Serum [50 µg/ml] (SIGMA)

#### Durchführung:

Abbau für SDS-PAGE und Blot:

Von den Glykoprotein Proben wurden jeweils ca. 10 µl in ein Eppendorf Hütchen pipettiert. Sofern vorher bereits eine SDS-PAGE durchgeführt wurde, wurden die Ergebnisse zur Ermittlung der richtigen Probemenge herangezogen.

Die Proben wurden in der Speed Vac vollständig getrocknet und in 20 µl des jeweiligen Puffers wieder gelöst. Den Ansätzen wurden 2 µl Neuraminidase (Verdünnungen: 1:10, 1:100 und 1.1000) bzw. 0,5 µl PNGase F zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Im Fall der PNGase A, die für nicht proteolytisch abgebaute Proben eine sehr geringe Aktivität besitzt, wurden zunächst 0,4 µl Enzym zugegeben und nach ca. 7 Stunden weitere 0,4 µl. Die gesamte Inkubationszeit betrug hier 24 Stunden.

Nach dem Abbau wurden die Ansätze wieder in der Speed Vac getrocknet, in 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und für SDS-PAGE und Western Blot (siehe Pkt. 4.1.7.) vorbereitet. Als Positivkontrolle wurde Fetuin herangezogen.

Abbau für MALDI-TOF-Analysen:

Von den Glykanproben wurde je 1 µl in ein Eppi pipettiert und in der Speed Vac getrocknet.

Je nach Enzymaktivität wurden 0,1 bis 2 µl Enzym in 10 µl des jeweiligen Puffers aufgenommen. Von diesen Enzymansätzen wurden 2 µl zu der getrockneten Probe pipettiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Nach dem Abbau wurden die Proben wieder in der Speed Vac getrocknet, in 1 bis 2 µl H₂O aufgenommen und für die MALDI-TOF-Analysen (siehe Pkt. 4.2.5.) vorbereitet.

#### 4.2.3. Chemische Desialylierung

Reagenzien:	2 M Essigsäure		
	1 M NaOH oder NH <sub>3</sub>		

#### Durchführung:

Wie bei den enzymatischen Abbauten werden 10 µl Probe (für anschließende SDS-PAGE) bzw. 1µl Probe (für MALDI-TOF Analysen) in der Speed Vac getrocknet.

Es werden 20 bzw. 2 µl HAc zugegeben und die Ansätze 15 Minuten bei 100 °C inkubiert. Anschließend wird mit dem gleichen Volumen an Lauge tendenziell neutralisiert, die Probe in der Speed Vac vollständig getrocknet und in dem Ausgangsvolumen Wasser wieder gelöst.

### 4.2.4. Western Blot

Geräte:	Trans-Blot SD
	Semi-Dry-Transfer Cell
Matarial <sup>.</sup>	BioTrace NT - Blotting membrane: pure nitrocellulose (Pall)
Material.	Extra Thick Blot Paper (Biorad)
Reagenzien:	Blotting-buffer (10x): 250 mM Tris + 1,92 M Glycin
Ū	Blotting-buffer (1x): 1 Teil Blotting-buffer (10x) + 2 Teile Methanol
	+ 7 Teile H <sub>2</sub> O
	TBS (10x): 1 M Tris + 1 M NaCl pH 7,5
	TTBS (1x): 1 Teil TBS (10x) + 9 Teile H <sub>2</sub> O + 0,01 % Tween 20
	Blockierungsreagens: TTBS (1x) + 0,5 % BSA
Substrat:	FAST BCIP/NBT-Tabletten (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl
	phosphate/Nitro blue tetrazolium) (SIGMA)

Durchführung:

Die Membran und zwei Stück Filterpapier werden auf die Größe des Gels zugeschnitten und in Blotting buffer (1x) equilibriert. Nach der Elektrophorese wird das Gel ebenfalls für einige Minuten in Blotting buffer (1x) gelegt.

Der Aufbau des Blots erfolgt wie abgebildet (Abb. 25). Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten sollten vermieden werden.



Abb. 25: Aufbau Western Blot

Blotbedingungen:	15 V
Blotdauer :	30 Minuten

Nachdem der Blot vorsichtig auseinander genommen wurde kann das "leere" Gel zur Kontrolle einer Coomassie-Färbung unterzogen werden.

Der Hintergrund der Membran wird mit Blockierungsreagens entweder über Nacht bei 4 °C oder 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt.

Die Membran wird anschließend mit TTBS (1x) gewaschen und dann zuerst 1 Stunde mit dem 1. Antikörper/Lektin und danach mit dem 2. Antikörper inkubiert.

Für die Inkubation wird die Membran mit 2 ml der jeweiligen Antikörper-Lösung in eine Plastikfolie eingeschweißt.

Nach jedem Inkubationsschritt wird sie 3 x 5 Minuten mit TTBS (1x) gewaschen.

Durch Schwenken der Membran in Substrat-Lösung (1 Tablette in 10 ml Wasser gelöst) werden die Banden durch Detektion der Alkalischen Phosphatase Aktivität sichtbar gemacht.

Verwendete Antikörper/Lektine:

- 1. Antikörper/Lektine:
- SNA Sambucus Nigra Lectin, Biotinylated Elderberry Bark Lectin (Vector Laboratories), Verdünnung: 1:1000
- MAA I Biotinylated Maackia Amurensis Lectin (Vector Laboratories), Verdünnung: 1:1000
- MAA II Biotinylated Maackia Amurensis Lectin (Vector Laboratories), Verdünnung: 1:1000
- WGA Biotinylated Wheat Germ Agglutinin (Vector Laboratories),
   Verdünnung: 1:1000
- RCA I Biotinylated Ricinus Communis Agglutinin (Vector Laboratories), Verdünnung: 1:1000
- Anti-HRP (rabbit) Anti-Horseradish Peroxidase (10 mg/ml) (SIGMA),
   Verdünnung: 1:10 000

2. Antikörper:

- > Streptavidin-Alkaline Phosphatase conjugate (Boehringer Mannheim),
   Verdünnung: 1:1000 → für SNA, MAA I + II, WGA
- > Anti-Biotin-Alkaline Phosphatase conjugate (goat) (SIGMA),
   Verdünnung: 1:20 000 → für RCA I
- > Anti-rabbit Ig (goat)-Alkaline Phosphatase conjugate (Vector Laboratories), Verdünnung: 1:2000 → für Anti-HRP

### 4.2.5. Massenspektrometrische Analyse mit MALDI-TOF

Geräte:	MALDI-TOF Massenspektrometer: Voyager DE-STR
Reagenzien:	Matrix: DHB (positive mode): 2,5-dihydroxybenzoic acid,
	1 % in TFA : AcCN = 70:30
	THAP (negative mode): Trihydroacetophenol,
	1 % in AcCN : 20 mM NH₄Citrat = 50:50

Durchführung:

Für Messungen im positive mode - zur Identifizierung neutraler Glykane - wurden 0,8 µl Probe auf das Target gespottet, im Vakuumexsikkator getrocknet, mit der gleichen Menge Matrix überschichtet und ein weiteres Mal bei Unterdruck getrocknet. Für Messungen im negative mode – zur Analyse negativ geladener Glykane – wurden jeweils nur 0,4 µl Probe und Matrix aufgetragen. Die Analysen erfolgten im Reflector mode.

# 4.2.6. LC-MS/ESI-Q-TOF

Geräte:	Micromass Q-TOF Spektrometer: Waters Ultima Global Luna C18 50*0,3 mm, ODS 2, 5 µm (Phenomex)
Reagenzien:	Laufmittel A: 0,1 % Ameisensäure Laufmittel B: 100% Acetonitril

Gradient:

time [min]	B [%]
0	5
5	20

Durchführung:

Einige Mikroliter der unmarkierten Glykanprobe werden zunächst über eine Kapillarsäule nach Hydrophobizität aufgetrennt, die Peaks unmittelbar nach der Elution über das ESI-Interface in das MS-Gerät eingespritzt und nach Masse/Ladungs-Verhältnis analysiert. Vorteile dieses Geräts im Vergleich mit dem MALDI-TOF sind Genauigkeit und Sensitivität der Messungen und natürlich die vorangehende chromatographische Auftrennung.

# 4.3. HPLC-Methoden

### 4.3.1. Fraktionierung der Glykane mittels AIEX-HPLC

Geräte:	Liquid Chromatograph LC-10 AD (Shimadzu)	
	Ventil FCV-10 AL (Shimadzu)	
	Fluoreszenz-Detektor RF-551 (Shimadzu)	
	Integrator C-R5A	
Säule:	MonoQ HR5/5, 1 ml	
Reagenzien:	Laufmittel A: 50 mM Tris/HCI pH 5,0	
	Laufmittel B: Laufmittel A + 1 M NaCl	

### Gradient:

time	В
[min]	[%]
0	0
7	0
17	50
22	100
23	100
24	0
26	0

Flussrate: 1 ml/min

Ex/Em: 320/400 nm

Durchführung:

Die PA-markierten Oligosaccharide wurden in möglichst wenig Wasser gelöst.

Zunächst wurde mit einem kleinen Probenvolumen von ca. 1 µl ein analytischer Testlauf durchgeführt, um die zu fraktionierenden Peaks festzulegen.

Anschließend wurde das gesamte Probenvolumen portionsweise fraktioniert. Dabei darf die Säulenkapazität nicht überschritten werden. Die injizierten Volumina müssen so gewählt werden, dass Trennleistung erhalten bleibt.

Die Probe wurde in geladene und ungeladene Fraktionen getrennt, die Peaks gesammelt, gepoolt und am Rotavapor eingedampft.

### 4.3.2. RP-HPLC PA-markierter Oligosaccharide

Geräte:	Liquid Chromatograph LC-10 AD (Shimadzu)
	Ventil FCV-10 AL (Shimadzu)
	Fluoreszenz-Detektor RF-551 (Shimadzu)
	Integrator C-R5A
Säule:	RP C18, Hypersil 4*250 mm, ODS 5µ
Reagenzien:	Laufmittel A: 0,1 M NH₄Ac pH 5,5
	Laufmittel B: 100 % Methanol
	Standard: Isomaltose: 3 – 11 Glucoseeinheiten

time	В
[min]	[%]
0	0
40	12
40,1	0
45	0

Flussrate: 1,5 ml/min

Ex/Em: 320/400 nm

Durchführung:

Vom Isomaltose-Standard (IM3 – IM11) wurden 6 µl aufgetragen. Die Probenkonzentrationen waren nicht bekannt, die Injektionsvolumina mussten abgeschätzt bzw. bei Bedarf entsprechend verdünnt werden.

Bei ausreichender Probenmenge besteht die Möglichkeit die Peaks zu sammein und anschließend separat zu analysieren.

# 4.3.3. RP-HPLC AA-markierter Monosaccharide - Methodenoptimierung

Geräte:	Liquid Chromatograph LC-10 AD (Shimadzu)
	Ventil FCV-10 AL (Shimadzu)
	Fluoreszenz-Detektor RF-551 (Shimadzu)
	Integrator C-R5A
Säule:	RP C18, Hypersil 4*250 mm, ODS 5µ
Reagenzien:	Laufmittel A: 0,2 % 1-Butylamin + 0,5 % Phosphorsäure + 1 % Tetrahydrofuran in $H_2O(v/v/v)$

Laufmittel B: 50 % Acetonitril in A (v/v)

# Gradient:

Gradient 1	
time	В
[min]	[%]
0	5
17	25
23	100
29	100
30	5
35	5

Gradient 2	
time	В
[min]	[%]
0	5
25	20
35	40
39	100
43	100
44	5
48	5

Gradient 3	
time	В
[min]	[%]
0	8
20	20
30	40
33	100
34	100
38	8
41	8

Flussrate: 1 ml/min

Ex/Em: 360/425 nm

Durchführung:

Von den 100 µl Anthranilsäure markierten Monosaccharid-Standards wurden Verdünnungen hergestellt, so dass als Richtwert 10 ng des jeweiligen Monosaccharids in sinnvollem Volumen injiziert werden konnten.

Da bei den eigentlichen Proben die Glykan-Konzentration nicht bekannt war, mussten die Verdünnungen abgeschätzt werden.

Im Zuge dieser Analysen wurde der Originalgradient (Gradient 1) schrittweise abgeändert, um die Trennung der einzelnen Monosaccharide zu verbessern.

Bei dieser Analysenmethode muss der Temperatur besondere Beachtung geschenkt werden. Temperaturschwankungen – der Laufmittel oder der Umgebung – führen zu Shifts in der Elution der Monosaccharide; die Analyse ist dadurch nicht mehr reproduzierbar.

Die Laufmittel sollten Raumtemperatur haben. Die Herstellung sollte deshalb nicht direkt vor der Analyse stattfinden, da das Mischen zu einer Abkühlung von Laufmittel B führt.

# 4.4. Kultivierung von Biomphalaria glabrata Zellen

Medien: Drosophila Medium, Serum frei (GIBCO) + 9 % Glutamin Snail Medium: 22 % Drosophila Schneider's Medium 20 % Fetal Calf Serum 4,5 g/l Lactalbumin 1,3 g/l p-Galaktose 10 mg/l Phenolrot pH 7,5 mit 0,5 M NaOH sterilfiltriert

Kultivierung:

Die Zellen wurden in 20 ml Roux-Flaschen bei 26 °C gezüchtet und jeweils nach einer Woche aliquot in neues Medium überführt. Dazu wurden 0,6 ml einer alten Kultur mit je 2,2 ml der beiden Medien in ein neues Fläschchen überführt. Die Arbeiten wurden unter einer Laminar Flow Workbench durchgeführt, um Kontaminationen zu verhindern.

Das Wachstum der Zellen konnte mikroskopisch verfolgt werden.

Versuche den Anteil an Snail Medium schrittweise zu reduzieren wurden durchgeführt.

# 5. Ergebnisse

# 5.1. N-Glykanpräparationen

Als Ausgangsmaterial für die N-Glykanpräparationen wurden afrikanische Landschnecken und (Achatina fulica) einheimische Wasserschnecken (Posthornschnecken - Planobarius corneus), sowie die Eier der Achat-Schnecke und Zellen aus einer Biomphalaria glabrata (tropische Wasserschnecken)-Zellkultur herangezogen.

Die unterschiedlichen Materialien sowie verfügbaren Mengen machten es notwendig das Präparationsschema vor allem in Bezug auf benötigte Mengen an Reagenzien der jeweiligen Probe anzupassen. Für die Präparation der *Bg*-Zellen wurde ein abgeändertes Präparationsschema angewendet.





#### 5.1.1. N-Glykanpräparation aus Schnecken und Schneckeneiern

Die, durch Einfrieren bei -80 °C getöteten Schnecken wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend seziert. Wesentlich war vor allem die Entfernung des Darms, da in der Nahrung enthaltene Glykane die Analysenergebnisse verfälschen könnten. Die Tiere wurden in "Haut", bestehend aus dem Fußmuskel und der tatsächlichen Haut und "Viscera", den inneren Organen aufgeteilt.

Die klein geschnittenen Gewebestücke wurden in Tris/HCI-Puffer homogenisiert und nicht lösliche Bestandteile abzentrifugiert.

Die Schneckeneier wurden mit einem Glasstab zerdrückt und die Schalen abzentrifugiert. Der Überstand (ca. 1,5 ml) wurde mit dem 10-fachen Volumen an Puffer homogenisiert und abzentrifugiert.

Bei der Präparation der Achat Haut traten erhebliche Probleme schon beim Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile nach der Homogenisierung auf. Die Viskosität des Schneckenschleims verhinderte ein Absetzen und erforderte eine relativ grobe Abtrennung durch Abschöpfen, das sicher mit einigem Verlust an Analysenmaterial verbunden war. Die Achat-Viscera sowie Haut und Viscera der Posthornschnecke erwiesen sich als leichter zu verarbeiten, gänzlich unproblematisch zu präparieren waren allerdings nur die Schneckeneier.

Die Ammonsulfatfällung zur Abtrennung der Proteine wurde in zwei Schritten durchgeführt, was sich vor allem bei der Präparation der Achat-Haut als notwendig erwies. Die starke Schleimproduktion des Schneckengewebes erschwert die Abtrennung der Proteine und wird leicht als Verunreinigung über mehrere Präparationsschritte verschleppt. Durch die fraktionierte Ammonsulfatfällung konnte der Schleim etwas besser abgetrennt werden.

Die Glykoproteine wurden einem proteolytischen Abbau mit Thermolysin unterzogen. Das Enzym selbst ist in hoher Reinheit erhältlich, sein Temperaturoptimum liegt bei 50 °C, eine Temperatur, bei der wenige andere Enzyme optimale Aktivität zeigen. Der proteolytische Abbau ist notwendig, um die anschließende Hydrolyse der ßglycosidischen Bindungen durch PNGase A zu ermöglichen. Die Glykosidase kann nur von Glykopeptiden, nicht aber von Glykoproteinen Glykane freisetzen. Die Reinigung der Glykopeptide nach dem proteolytischen Abbau mittels Kationenaustauscher führte wieder bei der Achat-Haut zu Schwierigkeiten. Das Waschen der Säule mit Essigsäure dauerte über Nacht, da wieder die Viskosität der Verunreinigungen einen kontinuierlichen Durchfluss verhinderte.

Die N-Glykane wurden mittels Gelfiltration entsalzt und anschließend lyophilisiert.

Zur Detektion der Glykane mittels Orcinol nach dem Entsalzen ist zu bemerken, dass die Kohlenhydratkonzentrationen in den kleineren Ansätzen oftmals nicht ausreichend waren um durch Tüpfeln erfasst zu werden.

Es war daher notwendig die gewünschten Fraktionen nach der Gelfiltration "blind zu poolen".

Die trockenen Glykanproben wurden mit 2-Aminopyridin markiert und für HPLC-Analysen vorbereitet. Von den N-Glykanproben der Posthornschnecke und von denen der Achat-Eier wurde ein Teil unmarkiert für MALDI-TOF Analysen vorbereitet. Weiters wurde nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure und Anthranilsäure Markierung eine Monosaccharidanalyse durchgeführt.

#### 5.1.2. N-Glykanpräparation aus Bg-Zellen

Bei dieser Version der N-Glykan Präparation wurde auf die Ammonsulfatfällung verzichtet. Die abgeernteten Zellen wurden in HCI homogenisiert und sofort einem proteolytischen Abbau mit Pepsin unterzogen. Der Vorteil dieser Protease liegt in ihrem pH-Optimum von pH 2,0, andere Enzymaktivitäten können unter diesen Bedingungen weitgehend ausgeschlossen werden. Außerdem zeigt Pepsin gegenüber Thermolysin eine höhere Effizienz. In früheren Arbeiten [7, 42] wird von einer möglichen Beeinflussung der Ergebnisse durch Oligosaccharid-Verunreinigungen des Enzyms berichtet. Diese Bedenken konnten im Rahmen dieser Präparation weder bestätigt noch widerlegt werden.

Im weiteren Verlauf unterscheidet sich diese Version der Präparation von der ursprünglichen Vorgehensweise darin, dass die freigesetzten N-Glykane über einen Kationentauscher und eine RP-Säule gereinigt wurden, was einen positiven Effekt auf die Reinheit der Glykanproben hatte.

Die Glykane aus den Zellen wurden mit Aminopyridin, nicht aber mit Anthranilsäure markiert, da die Menge dafür nicht ausreichend war. Ein unmarkierter Teil konnte für MALDI-TOF Analysen herangezogen werden.

### 5.2. HPLC – Methodenoptimierung

#### 5.2.1. Anthranilsäure-Monosaccharidanalyse Methodenoptimierung

Nachdem das besondere Interesse in der Analyse der geladenen Glykane lag, wurde die Monosaccharidanalyse vor allem im Hinblick auf Sialinsäuren durchgeführt. Aber auch ein eventuelles Vorkommen ungewöhnlicher Monosaccharide sollte überprüft werden.

Zunächst wurde eine Gradientenoptimierung durchgeführt, um die einzelnen Monosaccharide besser auftrennen zu können.

Der ursprüngliche Gradient wurde von 35 auf 48 Minuten verlängert und etwas abgeflacht, wodurch Methylgalaktose detektiert werden konnte und auch einige andere Monosaccharide besser getrennt wurden, ohne dass es zu Peakverbreiterungen kam. Nach weiteren Versuchen konnte der Gradient schließlich ohne nachteilige



Abb. 27: Gradientenoptimierung - Monosaccharidanalyse

Auswirkungen auf 41 Minuten verkürzt werden.



\* Verunreinigung



Abb. 29: : Standard-Monosaccharide, Gradient 2, 48 Minuten

\* Verunreinigung



Abb. 30: Standard-Monosaccharide, Gradient 3, 41 Minuten \* Verunreinigung

Tabelle 2: Retentionszeiten der Standard-Monosaccharide

# Gradient 1, 35 Min

	Minuten
GlcN	9,35
ManN	9,88
GalN	10,08
RP	13,1
DeoxyGlc	14,65
Gal	14,98
Man	15,52
Glc	16
GalU	16,23
Ara	17,02
Хуі	17,77
GlcU	18,05
Fuc	18,23
Rha	18,35

Gradient 2, 48 Min	
	Minuten
GlcN	10,1
ManN	10,82
GalN	11,17
RP	13,8
DeoxyGlc	17,39
Gal	18,03
Man	18,95
Glc	20
GalU	20
Ara	21,19
Xyl	22,19
GlcU	23,29
Fuc	23,38
Rha	23,72
4MeGal	27,93
2MeGal	31,89
GICNAC	24,93

#### Gradient 3, 41 Min

	Minuten
GIcN	9,01
ManN	9,57
GalN	9,85
RP	13,2
DeoxyGlc	15,58
Gal	16,08
Man	16,82
Glc	17,57
GalU	17,82
Ara	18,85
Xyl	19,98
GICU	20,8
Fuc	20,84
Rha	21,07
4MeGal	24,72
2MeGal	27,98

Die Gradientenänderung bewirkte ein besseres Elutionsverhalten der Standard-Zucker im gegenseitigen Vergleich. Die Detektierbarkeit von 4-O- und 2-O-Methylgalaktose und die Retentionszeit von Xylose sind speziell erwähnenswert. In anderen Bereichen konnte keine, oder nur eine geringe Verbesserung in der Trennung der einzelnen Monosaccharide erreicht werden. Dieses Verhalten beruht auf einer großen Ähnlichkeit der Hydrophobizität mancher Zucker.

Als Sialinsäure-Standards wurden NANA, NGNA, KDO und KDN ausprobiert.

Leider ist die Methode der Markierung offensichtlich für Sialinsäuren nicht anwendbar. Im Fall von N-Glykolylneuraminsäure, 2-Keto-3-deoxy-Nonulonsäure und 2-Keto-3-deoxy-Octulonsäure lagen die zur Verfügung stehenden Konzentrationen unter der Nachweisgrenze. Bei der Analyse der N-Acetylneuraminsäure konnte nicht, wie bei den anderen Monosaccharidstandards ein einzelner Peak zugeordnet werden, vielmehr scheint die Sialinsäure während der Markierung Abbauten zu unterliegen, die eine eindeutige Identifizierung letztendlich unmöglich machen.





\* Verunreinigung

Die eluierten Peaks ließen sich zwar bekannten Monosaccharidpeaks zuordnen (Abb. 31), was aber auf die Behandlung mit Trifluoressigsäure und anschließende Derivatisierung oder auf Verunreinigungen zurück zu führen ist.

Die Identifizierung von Sialinsäuren - geschweige denn die Unterscheidung - mittels Monosaccharidanalyse ist mit dieser Methode somit leider nicht möglich.

### 5.2.2. Versuch einer Methodenetablierung: analytische AIEX-HPLC

Das Ziel dieser Versuche war es, ungeladene, einfach und mehrfach negativ geladene Oligosaccharide über AIEX-HPLC aufzutrennen, um die Aufreinigung, Separation und Zuordnung unterschiedlicher Glykanstrukturen zu vereinfachen.

Im Laufe dieser Methodenentwicklung wurden sowohl ein starker (SAX-Strong Anion Exchange), als auch ein schwacher (DEAE-Diethylaminoethyl) Anionentauscher verwendet; Laufmittel und Gradienten wurden mehrfach geändert. Konstant gehalten wurden die Flussrate von 1 ml/min sowie natürlich die Bedingungen der fluorimetrischen Detektion - Ex/Em: 320/400 nm. Als Standard-Oligosaccharide standen zur Verfügung:

- > Isomaltose mit 5 Glukoseeinheiten
- > GnGn Standard
- > N-Glykane aus Fetuin
- N-Glykane aus IgG
- > N-Glykane aus Transferrin, in sialylierter und desialylierter Form

Im Folgenden ist ein Überblick über die verschiedenen Variationen angeführt.

Tabelle 3: Bedingungen für die analytische AIEX-HPLC

SAX- Strong Anion Exchange	DEAE- Diethylaminoethyl
A: 5 mM NH₄H₂PO₄ pH 2,8 B: 750 mM NH₄H₂PO₄ pH 3,7	A: 10 mM NH₄Form pH 9,0 B: 0,3 M NH₄Form pH 9,0
Gradient 1	Gradient 1
time 0 24 25 30	time 0 10 35 36 41 50
% B 0 80 0 0	% B 0 0 100 100 0 0
Gradient 2	A: 30 % MeOH in 10 mM NH₄Form pH 9,0
time 0 5 15 16 20	B: 0,3 M NH₄Form pH 9,0
% B 0 0 10 0 0	
	A: H <sub>2</sub> O
A: H <sub>2</sub> O pH 3,0	B: 0,3 M NH₄Form pH 9,0
	Gradient 2
	time 0 6 25 28 30 31 38
B: 0.5 NaCloH 3.0	% B 0 5 50 100 100 0 0
A' 1 mM NH/Ac pH 3.0	A: 30 % MeOH in H <sub>2</sub> O
B 1 mM NH $_{\rm AC}$ pH 3.0 + 0.5 M NaCl	B: 0.3 M NH <sub>4</sub> Form pH 9.0
Gradient 3	Gradient 3
time 0 12 13 17	time 0 15 45 46 51 60
% B 0 40 0 0	% B 0 0 100 100 0 0
A: 5 mM NH₄Ac pH 8,0	
B: 1 mM NH₄Ac pH 3,0 + 0,5 M NaCl	
Gradient 4	
time 0 4 10 15 16 20	
% B 0 0 10 40 0 0	
A: H₂O	
B: 1 M NH₄Form pH 9,0	
[A. 10  Inverse net + 9.0]	
Gradient 5	
time 0 15 45 46 51 60	
% B 0 0 100 100 0 0	

Letztendlich mussten die Versuche leider ergebnislos abgebrochen werden, da keinerlei Auftrennung erreicht wurde. Unter keinen Bedingungen konnte eine Bindung der Oligosaccharide an die Säule bewirkt werden, was natürlich die Voraussetzung einer ladungsabhängigen Elution darstellt.

#### 5.3. N-Glykan-Präparation für SDS-PAGE und Western Blot

Als Vorbereitung für die SDS-PAGE wurden die Schnecken aufgetaut und seziert, Haut und Viscera wurden getrennt voneinander weiter verarbeitet, der Darm wurde verworfen. Das Schneckengewebe wurde in Puffer homogenisiert und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert. Zunächst wurde Tris/HCI-Puffer, mit und ohne Zugabe von SDS verwendet, sowie Versuche mit direkter Homogenisierung in SDS-Loading buffer durchgeführt. Später wurde auf RIPA-Puffer umgestellt, der aufgrund von Detergenzien und Zusatz eines Proteaseinhibitors für die Proteinextraktion, vor allem bei Membranproteinen besser geeignet war und zu wesentlich besseren Ergebnissen führte. Auch im Hinblick auf die Homogenisierung wurden verschiedene Möglichkeiten ausprobiert. Es wurden Versuche mit einem Glashomogenisator, Mörser, Bohrer und Stössel, Ultra Turrax und Ultraschallbad, sowie Kombinationen durchgeführt. Die besten Ergebnisse konnten mit dem Ultra Turrax und anschließender Ultraschallbadbehandlung erreicht werden. Dennoch war bei sehr zähen Geweben keine vollständige Homogenisierung möglich, da die Mengen für die vorhandene Größe des Ultra Turrax sehr klein waren und durch die Schaumbildung des Puffers nicht allzu lange homogenisiert werden konnten.

Folgende Schnecken wurden für die präparative SDS-PAGE und anschließende Aufreinigung für massenspektroskopische Analysen herangezogen:

Biomphalaria glabrata (Haut), Cepea hortensis (Haut), Eier, Haut und Viscera von Achatina fulica, Planorbarius corneus (Haut) und Eiersack von Limax maximus.

*Bg*-Haut, Cepea-Haut, Achat-Eier und Limax-Eiersack wurden direkt in SDS-Loading buffer homogenisiert, abzentrifugiert und der Supernatant direkt auf das Elektrophoresegel aufgetragen. Im Fall von Achat-Haut und –Viscera, sowie Posthorn-Haut wurden die zuvor hergestellten Präparationen mit RIPA-Puffer verwendet.

Die präparativen Elektrophoresegele wurden wie unter Pkt 4.1.7. beschrieben nur solange unter Spannung gesetzt, bis der mitgeführte Standard sich aufzutrennen begann.

An diesem Punkt wurde die Elektrophorese abgebrochen und die Banden fixiert, gefärbt und der Hintergrund entfärbt.

Wie unter Pkt 4.1.8. beschrieben wurden die Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten, mit Acetonitril entfärbt und einem proteolytischen Abbau mit Trypsin unterzogen. Die Glykopeptide wurden extrahiert und die Glykane mittels PNGase A freigesetzt. Die Reinigung erfolgte über Mini-Chromatographie-Säulchen. Nach der Elution mit 2 % Essigsäure wurden die Glykanproben in der Speed Vac getrocknet, in Wasser aufgenommen und auf das MALDI-Target gespottet.

#### 5.4. N-Glykan-Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot

Eine Möglichkeit Informationen über Glykanstrukturen von Glykoproteinen zu erhalten, ist die Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese und die anschließende Durchführung eines Western Blots, wobei verschiedene Lektine und Antikörper für die Detektion genutzt werden können.

Für die elektrophoretischen Analysen wurden verschiedene Schnecken herangezogen: Achatina fulica, Biomphalaria glabrata, Planorbarius corneus, Limax maximus, Arion Iusitanicus, Cepea hortensis und Arianta arbustorum.

Die Qualität der Ergebnisse war abhängig von der Schneckenart – trotz mehrmaliger Versuche konnten in manchen Fällen keine analysierbaren Ansätze hergestellt werden.

Teilweise lässt sich diese Beobachtung auf den Zusammenhang zwischen Zähigkeit des Gewebes und Prinzip der Homogenisierung zurückführen. Da für diese Art der Präparationen mit kleinen Mengen und Volumina gearbeitet wurde, war mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht immer eine optimale Homogenisierung realisierbar. (siehe Pkt. 4.1.6.)

Als Vorbereitung für die SDS-PAGE wurden die Schnecken in Puffer homogenisiert, wobei für 100 mg Gewebe 1 ml Puffer verwendet wurde, die festen Bestandteile wurden abzentrifugiert.

Die benötigte Konzentration für die SDS-PAGE musste bei jeden Ansatz neu ermittelt werden; die Konzentrationsangaben [mg Gewebe/ml Puffer] konnten lediglich als Richtwerte herangezogen werden, da eben die Probenvorbereitung nicht mit reproduzierbarer Effizienz durchführbar war.

Als Richtwert kann angegeben werden, dass von den 100 mg/ml-Ansätzen zunächst meist mit einer 1:10 Verdünnung für die SDS-PAGE gearbeitet wurde. Auf genaue Konzentrationsangaben wird in weiterer Folge allerdings verzichtet, da es sich nicht um sinnvolle quantitative Angaben handelt.

Mit allen Proben wurde eine Methanol-Fällung durchgeführt, nachdem vorige Versuche ohne Methanol-Fällung nicht mittels SDS-PAGE auftrennbar waren. Offensichtlich war

die Abtrennung der Proteine von anderen Gewebeinhaltsstoffen dabei so unvollständig, dass die Verunreinigungen die Elektrophorese unmöglich machten.

Bevor zu der unter Punkt 4.1.6. beschriebenen Präparation mit RIPA-Puffer übergegangen wurde, wurden auch noch andere Puffer-Varianten ausprobiert.

Die Elektrophorese-Gele wurden, sofern kein Western Blot durchgeführt wurde, mit Coomassie Brillant Blue gefärbt.

Als Größenstandard wurde für alle Gele und Blots der Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet.



Abb. 32: SDS-PAGE von Achat Haut und Eiern mit Tris/HCI mit und ohne SDS

- 1 Achat Haut in Tris/HCI
- 2 Achat Eier in Tris/HCI
- 3 Achat Haut in Tris/HCI mit SDS
- 4 Achat Eier in Tris/HCI mit SDS

Die in den Bahnen 1 und 2 aufgetragenen Proben wurden in Tris/HCI Puffer homogenisiert, bei den Ansätzen in den Bahnen 3 und 4 wurde dem Puffer 1 % SDS zugesetzt.

Es ist deutlich erkennbar, dass das zugesetzte SDS offensichtlich eine bessere Herauslösung der Proteine bewirkte.



Abb. 33: SDS-PAGE von Achat Haut, Eiern und Viscera mit RIPA

1 – Viscera 2 – Eier 3 – Haut, Stössel 4 – Haut, Ultra Turrax + Ultraschallbad 5 – Haut, Ultra Turrax

In diesem Fall wurden die Präparationen mit RIPA-Puffer durchgeführt. Die Homogenisierung der Viscera wurde mit dem Ultra Turrax durchgeführt, die Eier ausschließlich durch Pipettieren homogenisiert. Im Fall der Haut wurden drei verschiedene Varianten angewandt, wobei sich die Kombination aus Ultra Turrax und Ultraschallbad als effektivste herausstellte, was an der Intensität der Banden erkennbar ist.

An dieser SDS-PAGE lässt sich erkennen, wie sehr die Ausbeute der Präparationen von der Beschaffenheit des Gewebes abhängt, da in allen Fällen die Ausgangskonzentrationen sowie die Verdünnungen gleich waren.

Im Fall der RIPA-Präparationen war eine Methanol-Fällung nicht notwendig. Dies führte dazu, dass die in Abb. 33 aufgetragenen Probenmengen um etwa den Faktor 15 (!) niedriger konzentriert waren, als jene in Abb. 32.

Diese Tatsache führte zu der Entscheidung weitere Präparationen für die Elektrophorese mit RIPA-Puffer durchzuführen.



Abb. 34a und b: SDS-PAGE verschiedener Schnecken

Im Vergleich der *Bg* Zellen mit den Proben aus Achat Haut und *Bg* Viscera ist erkennbar, dass die Zellen ein wesentlich weiteres Spektrum an Proteinen zu enthalten scheinen als die Gewebe der ausgewachsenen Schnecken. Außerdem waren die Proteine aus den Zellen einfacher zu präparieren. In dem, nach demselben Verfahren, aufgereinigten Medium der *Bg* Zellkulturen konnte nur eine Proteinbande nachgewiesen werden. Eine Detektion mittels Lektin Blot war nicht möglich.

Für die Lektin-Blots wurde mit fünf Lektinen unterschiedlicher Spezifität gearbeitet, wobei vier davon die Fähigkeit besitzen Sialinsäuren zu binden.

SNA (*Sambucus Nigra* Lectin) gilt als spezifisch für α-2,3 und α-2,6 gebundene, endständige Sialinsäuren, MAA I (*Maackia Amurensis* Lectin I) und MAA II (*Maackia Amurensis* Lectin II) zeigen ausschließlich Affinität zu α-2,3 gebundenen Sialinsäuren, WGA (*Wheat Germ* Agglutinin) wurde ursprünglich zur Detektion von endständigem N-Acetylglukosamin verwendet, bindet aber ebenfalls Sialinsäuren. RCA (*Ricinus Communis* Agglutinin I) besitzt Bindungsspezifität für endständige Galaktose.

Allerdings scheinen alle erwähnten Lektine zu den genannten auch teilweise andere Strukturen binden zu können. Daher müssen Ergebnisse aus Western Blots mit Lektin-Detektion mit Vorbehalt betrachtet werden. Die besten Erfolge wurden mit SNA erreicht, die anderen Lektine, vor allem MAA I und II lieferten recht wechselhafte Ergebnisse.

Alle verwendeten Lektine waren biotinylierter Form und konnten somit mit Streptavidin detektiert werden.

Streptavidin selbst war mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt, wodurch letztendlich die, durch violette Färbung der jeweiligen Banden erkennbare Umsetzung des Substrats erfolgte.

Weiters wurde ein Antikörper, nämlich Anti-Horseradish-Peroxidase (rabbit) zur Detektion fukosylierter und xylosylierter Strukturen eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem zweiten, ebenfalls mit Alkalischer Phosphatase gekoppeltem, Antikörper.

Nebst den Glykoproteinen aus Schnecken wurden Fetuin und MMXF als Positivkontrollen analysiert.



Abb. 35: SNA-Blot von Haut verschiedener Schnecken

Arion
 Arianta
 Biomphalaria glabrata
 Posthorn
 Fetuin

Die eindeutige Färbung der Positivkontrolle Fetuin, welche erwiesenermaßen endständig sialylierte N-Glykane besitzt, lässt darauf schließen, dass in allen analysierten Schnecken endständig gebundene Sialinsäuren vorkommen. Allerdings lässt sich auf

diese Weise nicht feststellen in welcher Form diese Zucker mit dem Protein verbunden sind.

In weiterer Folge wurden Hautpräparationen der verschiedenen Schnecken parallel, unter Verwendung unterschiedlicher, oben beschriebener Lektine, geblottet.

Für alle Blots wurden bewusst dieselben Konzentrationen der jeweiligen Proben eingesetzt, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen.



Abb. 36: SNA-Blot verschiedener Schnecken

I – Achat Haut	
----------------	--

7 – Cepea Haut 8 – Cepea Viscera

9 - Arianta Haut

- 2 Achat Viscera
- 3 Achat Eier
- 4 Posthorn Haut
- 5 Posthorn Viscera
- 10 Arianta Viscera 11 – Fetuin
- 6 Bg Zellen









Abb. 38: MAA I Blot verschiedener Schnecken

1 – Achat Haut	7 – Cepea Haut
2 – Achat Viscera	8 – Cepea Visce

- 8 Cepea Viscera
- 3 Achat Eier
- 4 Posthorn Haut
- 5 Posthorn Viscera
- 11 Fetuin

9 - Arianta Haut 10 - Arianta Viscera Wie schon in vorigen Versuchen erwies sich auch hierbei die Detektion der Glykoproteine mit SNA am verlässlichsten. Verdeutlicht wird diese Feststellung bei Betrachtung der Positivkontrolle Fetuin, die durch Bindung von SNA deutliche Banden zeigt, im Falle von WGA nur schwach aufscheint und bei MAA I Detektion nicht mehr nachweisbar ist.

Ob diese Ergebnisse Hinweise auf die tatsächlichen Bindungsspezifitäten der Lektine darstellen oder die Blots nicht immer optimal durchgeführt wurden, konnte nicht herausgefunden werden.

Es ist jedoch erkennbar, dass die Schärfe der Banden beim SNA Blot und MAA I Blot besser ist, als bei der Verwendung von WGA, wenngleich das Gesamtergebnis beim MAA I Blot eher dürftig ausfällt.

Die Ergebnisse der Proben der Achat Haut sind in allen Fällen enttäuschend, lassen sich aber wie schon erwähnt mit der schwierigen Verarbeitbarkeit des Materials erklären. Die Viscera lieferte zumindest bei Detektion mit SNA etwas bessere Ergebnisse, die Banden um 24 kDa waren auch bei den anderen Blots noch erkennbar.

Bemerkenswert ist, dass die Achat Eier mit WGA, jedoch nicht mit SNA eine sehr starke Färbung aufwiesen. Differenzierte Banden waren leider nicht erkennbar.

Posthorn Haut und Viscera lieferten auch keine besonders guten Ergebnisse, lediglich die Zellen der *Biomphalaria glabrata* konnten mit jedem der drei Lektine gut gebunden werden und somit eindeutig detektiert werden.

Die Proben der anderen beiden Schnecken, Arianta und Cepea, ergaben schwache und undeutliche Banden, es lässt sich aber erkennen, dass die Glykoproteinmuster vor allem im Bereich um 15 kDa denen der anderen Schneckenpräparationen ähnlich sind.

Mit SNA konnten in fast allen Proben in diesem Molekulargewichtsbereich Banden detektiert werden. Es könnte sich dabei möglicherweise um Glykoproteine handeln, die in allen Gastropoden synthetisiert werden. Der Versuch diese aus dem SDS-PAGE Gel zu extrahieren und mittels MALDI-TOF-MS zu analysieren scheiterte an zu geringen Probemengen.





1 – Achat Haut	7 – Bg Zellen
2 – Achat Viscera	8 – Cepea Haut
3 – Achat Eier	9 – Cepea Viscera
4 – Posthorn Haut	10 – Arianta Haut
5 – Posthorn Viscera	11 – Arianta Viscera
6 – Bg Zellen	12 – Fetuin

Nachdem mit AntiHRP die Glykanstrukturen MMX, MMF<sup>3</sup> und MMXF<sup>3</sup> detektiert werden können, ergibt sich der Schluss, dass in vielen der analysierten Schnecken fukosylierte und xylosylierte Strukturen vorkommen.

Die Zellen von *Biomphalaria glabrata*, Bahn 6 und 7, zeigen nur schwache Banden. Dieses Ergebnis stimmt mit jenen der massenspektrometrischen Analysen überein.

Bei den Proben aus Haut und Viscera von Achat- und Posthornschnecke wurden auch bei der Monosaccharidanalyse mittels HPLC Xylose und Fukose detektiert. (siehe Pkt. 5.5.3.). Warum die Färbung der Achat Viscera so schwach ausfiel ist fraglich.

Im Fall der Achat Eier bestätigen sowohl die Monosaccharidanalyse als auch die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS das Vorhandensein xylosylierter und fukosylierter N-Glykan-Strukturen.




Posthorn Haut
Posthorn Viscera
Bg – Zellen
Achat Eier
Fetuin

Die Proben für diesen Blot wurden den Präparationen nach Ammonsulfat-Fällung und Dialyse entnommen.

Die Banden der Posthorn Haut und Viscera wurden dadurch schärfer, bei den Achat Eiern konnte leider keine Verbesserung erzielt werden.

Bei den *Biomphalaria glabrata* Zellen in Bahn 3 ist zu erkennen, dass die Ausgangsmenge für diese Art der Präparation zu gering war.

## 5.4.1.Ergebnisse der enzymatischen Abbauten

Proben der Achatschnecke, *Biomphalaria glabrata* und der Posthornschnecke wurden für enzymatische Abbau-Versuche herangezogen.

Dafür wurden einige Mikroliter der jeweiligen Probe zunächst getrocknet und anschließend mit enzymspezifischem Puffer und Enzym, zumeist über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abbau wurden wieder eine SDS-PAGE sowie ein Western Blot durchgeführt.

Nachdem das Hauptaugenmerk auf der Detektion endständig sialylierter N-Glykane lag, wurden hierfür Sialidase, zum Abbau endständiger Sialinsäuren, und PNGase F, zum Abbau von N-Glykanen, verwendet. Versuche mit Essigsäure zur chemischen Desialylierung und Abbau mit PNGase A brachten keine Erfolge.



Abb. 41a Abb. 41b Abb. 41a und b: SNA Blot (a) und RCA Blot (b) von Fetuin

1 - nicht abgebaute Probe
2 - Abbau mit Sialidase 1:10
3 - Abbau mit Sialidase 1:1000

Nachdem Sialinsäuren in N-Glykanen endständig zumeist an Galaktose gebunden sind, sollte mit diesen Blots der Abbau mit Sialidase sichtbar gemacht werden.

Der Fetuin Standard wurde wie unter Pkt. 4.2.2. beschrieben abgebaut, gemeinsam mit einer unbehandelten Probe elektrophoretisch aufgetrennt und dann geblottet.

Links bindet das verwendete *Sambucus nigra* Lektin die endständigen sialylierten Glykane der Probe in Bahn 1, die desialylierten Glykoproteine in Bahn 2 und 3 werden, je nach Grad der Desialylierung nur schwach bzw. gar nicht gebunden.

Bei Detektion mit *Ricinus* Lektin ergibt sich nahezu ein Negativ zur SNA-Detektion. Nur schwach wird die nicht enzymatisch abgebaute Probe gebunden, während die Färbung in Bahn 2 und 3 auf eine starke Bindung und somit auf einen hohen Anteil an Galaktose hinweist, die nach enzymatischem Abbau der Sialinsäuren den endständigen Zucker der Glykane darstellt.

Leider ließ sich dieser Nachweis mit keiner der Schneckenproben eindeutig durchführen.

Die enzymatischen Abbauten lieferten nur im Falle der Posthornschnecke Ergebnisse. Die Abbauten der Achatschnecke sowie *Biomphalaria glabrata* schienen nicht erfolgreich gewesen zu sein, allerdings ist hier auch die mangelhafte Reproduzierbarkeit der Lektin Blots als mögliche Fehlerquelle in Betracht zu ziehen.



Abb. 42: WGA Blot von Posthorn Viscera und Fetuin

1 – nicht abgebaute Probe
2 – Abbau mit PNGase F
3 – Abbau mit Sialidase 1:100

In Bahn 1 wurden die nicht abgebauten Proben von Posthorn Viscera und Fetuin aufgetragen. Die Proben in Bahn 2 wurden mit PNGase F abgebaut. Im Falle von Fetuin ist nur eine schwache Färbung erkennbar, die endständig sialylierten N-Glykane wurden erfolgreich abgespalten. Auch bei der Schneckenprobe sind ein Shift und eine Abschwächung der Banden sichtbar. Das mit Sialidase behandelte Fetuin in Bahn 3 weist keine Banden mehr auf. Die Glykoproteine wurden desialyliert, womit eine Detektion mit WGA nicht mehr möglich ist. Dieser Abbau war bei der Viscera der Posthornschnecke nicht erfolgreich, was auf eine Bindung der Sialinsäuren schließen lässt, die mit der zur Verfügung stehenden Sialidase nicht spaltbar ist.



Abb. 43: SNA Blot von Posthorn Haut und Fetuin

1 – nicht abgebaute Probe 2 – Abbau mit N-Glykosidase F 3 – Abbau mit Sialidase 1:10 4 – Abbau mit Sialidase 1:1000

In Bahn 1 der Schnecke sowie der Kontrolle ist die starke Färbung der nicht enzymatisch abgebauten Glykoproteine erkennbar.

Bahn 2 zeigt die Proben, die mit N-Glykosidase F abgebaut wurden. Der Unterschied zur unbehandelten Probe zeigt, dass in der Haut der Posthornschnecke N-glykosidische Bindungen an Proteinen vorkommen, die mit PNGase F abbaubar sind. Diese Glykoproteine liegen im Massenbereich zwischen 20 und 30 kDa. Nachdem die Banden in diesem Bereich auch in den Bahnen 3 und 4, bei den Proben die mit Neuraminidase abgebaut wurden, nicht oder abgeschwächt aufscheinen, scheint es sich um endständig sialylierte N-Glykane zu handeln. Jene Banden, die sowohl beim PNGase F Abbau als auch bei den Desialylierungsversuchen erhalten blieben, sind daher vermutlich polysialylierte Strukturen, die weder von dem einen noch von dem anderen Enzym angegriffen werden können.

## 5.5. HPLC - Analyse der N-Glykane

# 5.5.1. AIEX-HPLC zur Auftrennung geladener und ungeladener Glykane der Achatschnecke

Die PA-markierten Oligosaccharidproben wurden in wenig Wasser gelöst und mittels AIEX-HPLC in geladene und ungeladene Fraktionen aufgetrennt.

Durch einen analytischen Lauf mit kleinem Injektionsvolumen wurden die Fraktionen festgelegt, danach wurde die Probe in mehreren Durchgängen fraktioniert, um die Säule nicht zu überladen. Die Peaks wurden gesammelt, gepoolt und schließlich am Rotavapor eingeengt.



Abb. 44: Achat-Viscera, Fraktionierung mittels MonoQ-HPLC

Das Ziel war, die enthaltenen N-Glykanstrukturen aufzutrennen, einerseits um weitere Analyseschritte übersichtlicher zu machen, andererseits um die geladenen Glykane, denen besonderes Interesse zukam, von neutralen Strukturen zu trennen und somit gezielt analysieren zu können.

Die Viscera wurde in drei Fraktionen geteilt, zwei ungeladene (1 und 2) und eine vermeintlich geladene Fraktion (3) (siehe Abb. 44).

Die Haut wurde lediglich in eine ungeladene und eine geladene Fraktion aufgeteilt.

Das Ergebnis dieses Verfahrens ist nicht zufriedenstellend, da die Auftrennung der Glykane nicht wie geplant funktioniert hat, wie sich bei späteren Analysen bestätigt. Es muss in Betracht gezogen werden, dass diese Methode nicht unbedingt für die Trennung von geladenen und neutralen Oligosaccharidstrukturen geeignet ist.

## 5.5.2. RP-HPLC der PA-markierten Glykane

Um einen Überblick über die enthaltenen N-Glykan Strukturen zu erhalten wurden die Proben über eine Reversed Phase HPLC-Säule analysiert. Als Standard wurde Isomaltose, mit unterschiedlicher Kettenlänge (3 bis 11 Glukoseeinheiten) verwendet. Je mehr Glukoseeinheiten, umso stärker sind die hydrophoben Wechselwirkungen mit der C18-Säule, die Elution erfordert einen höheren organischen Anteil im Laufmittel als für kurzkettige Isomaltose.

Dieses Verhalten gilt prinzipiell auch für Glykane – größere Strukturen weisen hydrophobere Eigenschaften auf und eluieren deshalb später. Allerdings können auch andere Strukturmerkmale (z.B. Fukosylierungen) das Elutionsverhalten maßgeblich beeinflussen.



Abb. 45: RP-HPLC der N-Glykane von Achat-Haut



Abb. 46: RP-HPLC der gesamten N-Glykane von Posthorn Haut und Viscera



Abb. 47: RP-HPLC der gesamten N-Glykane von Achat Eiern

Auch hier wiesen die analysierten Proben noch störende Verunreinigungen auf, es konnte daher leider keine exakte Trennung der N-Glykane erzielt werden. Zwar lässt sich erkennen, dass in allen Proben Glykane unterschiedlicher Hydrophobizität enthalten sind, allerdings waren die Proben zu wenig aufgereinigt und auch die Gesamtmenge zu gering um eine Fraktionierung und separate Weiterführung der einzelnen Peaks zu begründen.

In den Chromatogrammen der Achat-Haut lässt sich erkennen, dass die geladenen Fraktionen keine detektierbaren Strukturen mehr enthielten, während in der neutralen Fraktion unterschiedliche Strukturen aufscheinen.

Das bestätigt die Zweifel in Bezug auf die Effizienz der ladungsabhängigen Auftrennung der Glykane mittels Mono Q.

## 5.5.3. Monosaccharidanalyse

Die Oligosaccharidproben wurden vor der Markierung mit Anthranilsäure mit 4 M Trifluoressigsäure hydrolysiert. Dabei ist zu bemerken, dass bei der Hydrolyse die Acetylgruppe von N-Acetylhexosaminen abgespalten wird. Es ist anzunehmen, dass diese Reaktion auch bei N-Acetylneuraminsäure stattfindet.

Als Vergleichsprobe wurde ein Fibrin-N-Glykan-Standard mitgeführt. Ebenfalls analysiert wurden ältere N-Glykan Präparationen von Haut und Viscera aus Arion lusitanicus.



Abb. 48: Monosaccharidanalyse von Fibrin

Die Monosaccharidanalyse von Fibrin - Glykanen ließ eine eindeutige Zuordnung der, für den säugertiertypischen komplexen Typ von N-Glykanen gängige Zucker Galaktose, Mannose und Glukosamin, durch Hydrolyse aus N-Acetylglukosamin entstanden, zu. In geringer Menge konnten Fukose und Galaktosamin detektiert werden. Hinweise auf methylierte Strukturen oder ungewöhnliche Zucker gab es keine.



Abb. 49: Monosaccharidanalyse von Achatina fulica - Haut und Viscera (geladene Fraktionen nach MonoQ)

Die Proben aus Haut und Viscera der Achat Schnecke wurden vor der Monosaccharidanalyse mittels AIEX-HPLC in geladene und ungeladene Fraktionen aufgetrennt. Die geladenen Fraktionen wurden hydrolysiert, mit Anthranilsäure markiert und analysiert.

In der Viscera konnten sowohl Galaktosamin als auch Glukosamin in annähernd gleicher Konzentration detektiert werden, während diese beiden Zucker in der Haut nicht nachgewiesen werden konnten. Dieses sehr unwahrscheinliche Ergebnis ist vermutlich auf Präparationsprobleme zurückzuführen. Weiters wurden in der Haut Xylose und Fukose in ähnlicher Konzentration nachgewiesen, während in der Viscera Fukose gegenüber Xylose überwiegt. Außerdem bemerkenswert scheint die hohe Galaktose-Konzentration in der Viscera.

Sowohl in der Haut als auch in der Viscera konnte methylierte Galaktose nachgewiesen werden. Überraschend ist die Detektion von Deoxyglucose und Arabinose in beiden Proben.

Eine genaue Quantifizierung der enthaltenen Monosaccharide ist nicht möglich, da die einzelnen Zucker unterschiedliche Bindungseigenschaften aufweisen und eine Standard-Quantifizierung nicht durchgeführt wurde.



Abb. 50: Monosaccharidanalyse von Planorbarius comeus - Haut und Viscera

Von der Posthornschnecke wurden alle präparierten N-Glykane der Monosaccharidanalyse unterzogen, ohne vorangehende ladungsabhängige Auftrennung. Sowohl in der Haut als auch in der Viscera konnten Glukosamin und Galaktosamin detektiert werden, die Konzentration an GalN war jedoch in der Viscera niedriger als in der Haut. Galaktose und Mannose sind in beiden Proben enthalten, Glukose konnte nur in der Haut nachgewiesen werden.

Das Vorkommen von Fukose und Xylose bestätigte sich auch in den Anti-HRP-Blots.

Die Posthorn Schnecke scheint weniger methylierte Strukturen zu enthalten als die Achat Schnecke gemessen an der relativen Konzentration an Methylgalaktose.



Abb. 51: Monosaccharidanalyse von Achatina fulica - Eier

In den N-Glykan Proben der Achat Eier konnten nahezu keine Hexosamine detektiert werden, dafür in relativ hohen Konzentrationen die Zucker Galaktose und Mannose. Glukose war nicht nachweisbar. Weiters wurden Xylose, Fukose und Methylgalaktose nachgewiesen. Ein Peak vor dem Reagenzpeak konnte nicht zugeordnet werden, dieselbe Substanz wurde auch in der Probe aus Achat-Viscera detektiert.

Es wurden weiters ältere Proben von N-Glykanen aus Haut und Viscera von Arion *lusitanicus* sowie O-Glykan Proben aus Arion-Viscera analysiert. Die Ergebnisse wichen nicht sehr von jenen der anderen Schnecken ab, allerdings wiesen die Proben Verunreinigungen auf, die eventuell im Zuge der längeren Lagerung durch Abbauten entstanden sein könnten.

# 5.6. MALDI-TOF-MS- Analyse der N-Glykane

Die bei der AIEX-HPLC erhaltenen Fraktionen der Achatschnecke, sowie die fertig präparierten, unmarkierten Oligosaccharidproben der übrigen Ansätze wurden mittels MALDI-TOF-MS analysiert, um die Glykanstrukturen zu identifizieren. Weiters wurden die aufgereinigten Proben aus der präparativen SDS-PAGE mittels MALDI-TOF-MS analysiert.

Als Standard wurden N-Glykane aus Fibrin herangezogen.

Wie oben erwähnt verdeutlichten sich bei den massenspektroskopischen Analysen die Unterschiede zwischen den einzelnen Präparationen.

Von den Proben aus Achat-Haut, sowie Haut und Viscera der Posthornschnecke konnten keine auswertbaren Spektren ermittelt werden. Die Ansätze aus der präparativen Elektrophorese lagen offensichtlich in zu niedriger Konzentration vor – auch hier konnten leider keine Strukturen identifiziert werden.

Aus jenen Präparationen, die am unkompliziertesten verlaufen waren, die der Achat-Eier und der *Bg*-Zellen, ließen sich Strukturen ermitteln.

Auch in der N-Glykanpräparation der Achat-Viscera konnte eine Glykanstruktur ermittelt werden.

Generell erwies sich der negative mode des MALDI-TOF-MS als sensitiver als der positive mode, niedrigere Konzentrationen (1:10 bis 1:100 verdünnter) konnten noch detektiert werden, außerdem schienen Verunreinigungen im negative mode weniger ausschlaggebend.

Diese Tatsache ist für die Analytik geladener Strukturen nicht nachteilig, allerdings stellen Vergleiche zwischen geladenen und neutralen Strukturen derselben Probe eine gewisse Schwierigkeit dar.

# 5.6.1. MALDI-TOF-MS von Fibrin

Als Standard und zum Vergleich von positive und negative mode wurde eine bereits vorhandene N-Glykan Präparation aus Fibrin analysiert.



Abb. 52: MALDI-TOF-MS-Analyse von Fibrin N-Glykanen, positive mode

Tabelle 4: Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von Fibrin N-Glykanen

Masse [Da]	mögl. Struktur
1298,91 [M+Na]	MGal/Man4Gn
1501,09 [M+Na]	GnGal
1663,13 [M+Na]	GalGal
1679,91 [M+K]	GalGal



Abb. 53: MALDI-TOF-MS-Analyse von Fibrin N-Glykanen, negative mode

Masse [Da]	mögl. Struktur
1847,79 [M+?]	?
1931,26 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGal
1946,93 [M+H <sup>+</sup> ]	SASA (fragmentiert)
2195,21 [M+?]	?
2208,58 [M+?]	?
2221,80 [M+H <sup>+</sup> ]	SASA

?

2234.01 [M+?

Tabelle 5: Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von Fibrin N-Glykanen

Aus der massenspektrometrischen Analyse von Fibrin im positive und negative mode lassen sich die für Säugetiere typischen N-Glykanstrukturen sehr gut ablesen. Während im positive mode nur die neutralen Strukturen, v.a. die diantennäre Struktur mit endständiger Galaktose als Natrium- und Kalium-Addukt (GalGal) aufscheinen, lassen sich im negative mode auch die geladenen Strukturen, mit einer (SAGal) bzw. zwei endständigen Sialinsäuren (SASA) nachweisen.

Im negative mode werden vorwiegend Wasserstoff-Addukte gebildet. Aufgrund der Analyse im Reflector-mode kommt es bei doppelt sialylierten Strukturen (SASA) zu einer teilweisen Fragmentierung (einseitige Desialylierung) nach dem Reflektor, was zu einem Shift im TOF-Verhalten führt. Die betroffenen Moleküle weisen somit eine Flugzeit auf, die zwischen jener der einfach – und der zweifach sialylierten Strukturen liegt. Im Spektrum zeigt sich dieser Shift durch einen zusätzlichen Peak, der um 14 Da größer ist als jener der einfach sialylierten Struktur. Im konkreten Fall handelt es sich um den Peak bei 1946,93 Da (SASA\*).

Massenspektrometrisch ließen sich aus der Fibrinpräparation neutrale, sowie einfachund zweifach sialylierte diantennäre Glykanstrukturen ermitteln.



5.6.2. MALDI-TOF-MS von N-Glykanen aus Biomphalaria glabrata

Abb. 54: MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Bg-Zellen, positive mode

Tabelle 6: Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Bg-Zellen

Masse [Da]	mögl. Struktur
932,066 [M+Na]	MM
947,278 [M+Na]	MM+CH <sub>3</sub>
961,107 [M+Na]	MM+2 CH <sub>3</sub>
1077,27 [M+Na]	MMF
1095,25 [M+Na]	Man4
1106,31 [M+Na]	MMF+2 CH <sub>3</sub>
1257,05 [M+Na]	Man5
1297,15 [M+Na]	MGal/Man4Gn
1417,46 [M+Na]	Man6
1579,26 [M+Na]	Man7
1662,23 [M+Na]	GalGal
1741,06 [M+Na]	Man8
1902,86 [M+Na]	Man9
2027,32 [M+Na]	GalGalGal



Abb. 55: MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Bg-Zellen, negative mode

Tabelle 7: Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Bg-Zellen

Masse [Da]	mögl. Struktur
1927,14 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGal
2196,72 [M+?]	?
2295,47 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGalGal

Die massenspektrometrische Analyse der *Biomphalaria glabrata*-Zellen im positive mode zeigt, dass die N-Glykane vor allem hochmannosidische Strukturen enthalten (Man4 bis Man9), teilweise sowohl in methylierter, als auch in fukosylierter Form. Di- und triantennäre komplexe Strukturen scheinen ebenfalls vorhanden zu sein. Im negative mode war letztendlich nur eine einzige Struktur nachweisbar, deren Masse von 2295,47 Da einer triantennären, einfach sialylierten Glykanstruktur entspricht.

Die N-Glykane wurden enzymatischen Abbauten mit Endoglykosidase H und  $\beta$ -Galaktosidase unterzogen, um die ermittelten Strukturen zu bestätigen.

84



5.6.3. MALDI-TOF-MS von N-Glykanen aus Achatina fulica

Abb. 56: MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Viscera von Achatina fulica, negative mode

Im Fall der N-Glykanpräparation aus Haut und Viscera von Achatina fulica lieferte die massenspektrometrische Analyse nur eine einzige nachweisbare Struktur. Im negative mode konnte in der geladenen Fraktion der Viscera nach der MonoQ eine Struktur bei 2011,93 Da detektiert werden, was der Masse eines diantennären, einfach sialylierten, pyridylaminierten Glykans (SAGal-PA) als Wasserstoff-Addukt entspricht. Um einen Irrtum oder eine Verunreinigung auszuschließen, wurde die Probe mehrfach gemessen – das Ergebnis blieb unverändert. Im positive mode konnte keine korrespondierende neutrale Struktur nachgewiesen werden.

Die neutralen Fraktionen der Viscera, sowie alle Proben der Haut lieferten keine Ergebnisse.



Abb. 57: MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Eiern von Achatina fulica, positive mode

Masse [Da]	mögl. Struktur
962,397 [M+Na]	MM+2 CH <sub>3</sub>
1074,96 [M+Na]	MMF
1260,09 [M+Na]	Man5
1606,85 [M+?]	?
1768,14 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGn
1890,81 [M+Na]	GalGalF+SO₄
1930,57 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGat
1952,71 [M+Na]	SAGal
2077,13 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGalF

Tabelle 8: Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Eiern von Achatina fulica



Abb. 58: MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Eiern von Achatina fulica, negative mode

Tabelle 9: Ergebnisse de	r MALDI-TOF-MS-Analyse von	N-Glykanen aus I	Eiern von Achatina fulica
--------------------------	----------------------------	------------------	---------------------------

Masse [Da]	mögl. Struktur
1028,98 [M+Na]	MM+CH₃+SO₄
1041,83 [M+H <sup>+</sup> ]	MMX
1041,83 [M+Na]	MM+2 CH <sub>3</sub> +SO <sub>4</sub>
1190,63 [M+H <sup>+</sup> ]	MGn+SO₄
1303,03 [M+?]	?
1546,04 [M+?]	?Gal
1765,88 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGn
1927,88 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGal
2073,39 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGalF
2182,30 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGalF+2 CH <sub>3</sub> +SO <sub>4</sub>

Die Analyse der Achat-Eier lieferte interessante, zum Teil ungewöhnliche Ergebnisse. Im positive mode wurden methylierte und fukosylierte Strukturen (MM+2 CH<sub>3</sub> und MMF), sowie Man5 detektiert, was auch mit den Ergebnissen der Monosaccharidanalyse übereinstimmt. Außerdem wurden Massen ermittelt, die auf sialylierte und sulfatierte Glykanstrukturen hinweisen (SAGn, SAGal und SAGalF, sowie sulfatiertes GalGal).

Im negative mode konnten diese teilweise geladenen Strukturen ebenfalls, sogar mit intensiveren Signalen nachgewiesen werden.

Besonders die ermittelten Strukturen SAGn, SAGal und SAGalF liefern interessante Hinweise auf das Vorkommen von sialylierten N-Glykanen in Schnecken. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass es bei vormaligen MALDI-TOF-Analysen von Glykanen unterschiedlicher Herkunft nicht möglich war, teilweise geladene Strukturen im positive mode nachzuweisen.

Die Präparationen der Achat-Eier wurden enzymatischen Abbauten mit β-Galaktosidase, N-Acetylglukosaminidase und Fukosidase unterzogen, um die ermittelten Strukturen nach Möglichkeit zu bestätigen. Weiters konnte mit freundlicher Genehmigung von Prof. Friedrich Altmann von DI Martin Pabst eine Analyse der N-Glykane aus Achat-Eiern mittels LC-ESI-Q-TOF-MS durchgeführt werden.

#### Tabelle 10: Ergebnisse der LC-ESI-Q-TOF-MS von Eiern aus Achatina fulica

MALDI-TOF		ESI-Q-TOF	
Masse [Da]	mögl. Struktur	Masse[Da]	mögl. Struktur
1765,88 [M+H+]	SAGn	1767,7 [M+H+]	Core+HexNAc+NeuGc+2 Pentosen+SO₄
			Core+2 Hex+3 Deoxyhexosen+SO <sub>4</sub> +CH <sub>3</sub>
1927,88 [M+H+]	SAGal	1929,7 [M+H+]	Core+Hex+HexNAc+NeuGc+2 Pentosen+SO₄
			Core+2 HexNAc+3 Deoxyhexosen+2 SO <sub>4</sub> +CH <sub>3</sub>
			Core+3 Hex+3 Deoxyhexosen+SO <sub>4</sub> +CH <sub>3</sub>
			Core+2 HexNAc+NeuAc+NeuGc+CH <sub>3</sub>
2073,39 [M+H+]	SAGalF	2075,6 [M+H+]	Core+Hex+HexNAc+Deoxyhexose+NeuGc+2 Pentosen+SO4
			Core+2 Hex+HexNAc+NeuAc+Pentose+SO₄
			Core+3 Hex+2 Deoxyhexosen+Pentose+3 SO <sub>4</sub> +CH <sub>3</sub>
			Core+2 HexNAc+4 Deoxyhexosen+2 SO <sub>4</sub> +CH <sub>3</sub>
			Core+3 Hex+4 Deoxyhexosen+SO <sub>4</sub> +CH <sub>3</sub>
			Core+2 HexNAc+Deoxyhexose+NeuAc+NeuGc+CH <sub>3</sub>
			Core+Hex+2 HexNAc+2 NeuGc+CH <sub>3</sub>
2182,30 [M+H+]	SAGalF+SO₄+2 CH <sub>3</sub>	2183,7 [M+H+]	Core+Hex+HexNAc+3 Deoxyhexosen+NeuGc+SO₄
			Core+2 Hex+HexNAc+2 Deoxyhexosen+NeuAc+2 SO <sub>4</sub>
			Core+Hex+2 HexNAc+Deoxyhexose+3 Pentosen+2 SO4
			Core+4 Hex+Deoxyhexose+3 Pentosen+SO <sub>4</sub>

Abkürzungen:

Core (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) : Grundstruktur der N-Glykane Hex (Hexose) : z.B. Glukose, Mannose, Galaktose HexNAc (N-Acetyl-Hexosamin) : z.B. N-Acetyl-Glukosamin, N-Acetyl-Galaktosamin, N-Acetyl-Mannosamin NeuAc (N-Acetylneuraminsäure) Pentose : z.B. Xylose NeuGc (N-Glykolylneuraminsäure) Deoxyhexose: z.B. Fukose SO<sub>4</sub> (Sulfat)

CH<sub>3</sub> (Methylrest)

Mit dieser, sehr genauen und sensitiven Methode wurden etwas abweichende, aber auch vielfältigere Möglichkeiten des Glykanaufbaus in den Eiern der Achat Schnecke aufgeworfen. Nur wenige dieser Varianten scheinen unter Berücksichtigung der bis dato bekannten Gesetzmäßigkeiten der Glykan-Synthese und der bislang analysierten Strukturen in Gastropoden auch tatsächlich realistisch. Allerdings scheint damit zumindest die Vermutung bezüglich des Vorkommens negativ geladener Glykane in Schneckeneiern gefestigt. Zur Verifizierung einer bestimmten Struktur wären, abgesehen von enzymatischen Abbauten auch weitere Präparationen, sowie die Etablierung einer effizienten Vorreinigung notwendig.

Die N-Glykan-Proben der Bg-Zellen sowie der Achat-Eier wurden ihrer angenommenen Struktur entsprechenden enzymatischen Abbauten unterzogen. Dafür wurde 1 µl der jeweiligen Probe über Nacht mit Enzym-Puffer-Ansatz inkubiert und anschließend ein weiteres Mal mittels MALDI-TOF-MS analysiert.

### 5.6.4. Ergebnisse der enzymatischen Abbauten in Bg-Zellen

Im Fall der Bg-Zellen wurde zunächst ein Abbau mit Endoglykosidase H durchgeführt. Dieses Enzym spaltet Glykane zwischen den beiden inneren GlcNAc-Resten, allerdings ausschließlich hochmannosidische Strukturen (Man 4 bis Man 9), an die keine anderen Zucker gebunden sind. Methylierungen beeinträchtigen die Aktivität nicht.



Abb. 59: MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Bg-Zellen nach Endo H Abbau, positive mode

Ein Shift um 203 Da entspricht einem abgespaltenen GlcNAc-Rest und bestätigt somit, dass es sich um eine hochmannosidische Struktur handelt.

Tabelle 11: Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus *Bg*-Zellen nach Endo H Abbau \*die Massen der gekennzeichneten Peaks verringerten sich im Vergleich zur nicht abgebauten Probe (Abb. 54, Tabelle 6) um 203 Da.

mögl. Struktur
MM
MM+2 CH <sub>3</sub>
Man5*
MMF
Man4
MMF + 2 CH <sub>3</sub>
Man6*
Man7*
Man8*
GalGal
Man9*
GalGalGal

Die vermuteten hochmannosidischen Glykane ließen sich mit Endo H abbauen, während jene Strukturen, die in der ursprünglichen Probe (Abb. 54, Tabelle 6) als komplex angenommen wurden oder kleiner als Man4 waren, unverändert blieben.

Man4, mit 1096,37 Da konnte mit der Endoglykosidase ebenfalls nicht abgebaut werden, was darauf schließen lässt, dass bei dieser Struktur die vierte Mannose nicht in  $\alpha$ 1,3-Bindung am Core gebunden ist.

Die Glykan-Proben aus Bg-Zellen wurden einem weiteren Abbau mit Exogalaktosidase unterzogen, um auch die vermuteten di – und triantennären komplexen Strukturen zu bestätigen.



Abb. 60: MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Bg-Zellen nach Endo H und ß-Gal Abbau, positive mode

Tabelle 12: Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus *Bg*-Zellen nach Endo H und ß-Gal Abbau \*die Massen der gekennzeichneten Peaks verringerten sich im Vergleich zur nicht abgebauten Probe (Abb. 54, Tabelle 6) um zwei- bzw. dreimal 162 Da.

Masse [Da]	mögl. Struktur
961,416 [M+Na]	MM+2 CH <sub>3</sub>
1054,01 [M+Na]	Man5
1106,20 [M+Na]	MMF + 2 $CH_3$
1215,91 [M+Na]	Man6
1338,33 [M+Na]	GnGn*
1378,54 [M+Na]	Man7
1541,92 [M+Na]	GnGnGn* / Man8

Wenngleich die Resultate der MALDI-TOF-Analysen - vermutlich aufgrund von unvermeidbaren Verlusten und Verunreinigungen - mit jedem weiteren Enzym-Abbau schlechter wurden, so ließ sich in diesen Fall noch erkennen, dass die di- und triantennären Strukturen mit ß-Galaktosidase abgebaut werden konnten. GnGn, mit 1338,33 Da und GnGnGn, mit 1541,92 Da sind die jeweiligen Abbauprodukte, wobei die Masse von 1541,92 Da zusammenfällt mit der Masse des mit Endoglykosidase abgebauten Man8.

### 5.6.5. Ergebnisse der enzymatischen Abbauten in Achat-Eiern

Bei den Eiern der Achat-Schnecke sollte versucht werden die im negative mode ermittelten Strukturen zu verifizieren. Nachdem neutrale Strukturen im negative mode normalerweise nicht detektierbar sind, wurde nicht der naheliegende Abbau mit Sialidase durchgeführt. Stattdessen wurde versucht, den jeweils endständigen Zucker des neutralen Astes (Galaktose bzw. GlcNAc) sowie die Fukose enzymatisch abzubauen. Im Hinblick auf die Defukosylierung stellte sich das Problem, dass zwar α1,2 und α1,6-Fukosidase zur Verfügung standen, jedoch kein Enzym, welches α1,3-gebundene Fukose vom Core abspalten kann. Die Ergebnisse der durchgeführten Western-Blots (siehe Pkt. 5.4., Abb. 39) ließen allerdings auf genau diese Art der Bindung schließen, da der zur Detektion verwendete Antikörper - Anti-Horseradish-Peroxidase – neben Xylose ausschließlich für α1,3-gebundene Fukose spezifisch ist. Ein zur α1,3-Fukose Entfernung häufig verwendeter Abbau mittels Flusssäure ist in diesem Fall nicht möglich, da dadurch auch Sialinsäuren abgespalten würden.



Abb. 61: MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Eiern von Achatina fulica nach ß-Gal Abbau, negative mode

Tabelle 13: Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Eiern von Achatina fulica nach ß-Gal Abbau \*die Massen der gekennzeichneten Peaks verringerten sich im Vergleich zur unbehandelten Probe (Abb. 58, Tabelle 9) um 162 Da.

mögl. Struktur
MM+CH <sub>3</sub> +SO <sub>4</sub>
MMX
MM+2 CH <sub>3</sub> +SO <sub>4</sub>
MGn+SO₄
?
?*
?*
SAGn*
SAGnF*
SAGal
?

SAGal und SAGalF konnten enzymatisch zu SAGn und SAGnF abgebaut werden, wobei der Abbau im Fall von SAGal nicht vollständig war. In der ursprünglichen Probe (Abb. 58, Tabelle 9) wurde dem Peak bei 1766 Da die Struktur SAGn zugeordnet. Überraschenderweise konnte auch in diesem Fall die Masse durch enzymatischen Abbau mit Exogalaktosidase um 162 Da verringert werden. Somit muss angenommen werden, dass die Ausgangsstruktur eine endständige Galaktose enthielt. Ein weiterer, bereits in der unbehandelten Probe nicht identifizierter Peak bei 1546 Da, wurde um 162 Da verringert. Einige Massen konnten leider weiterhin nicht zugeordnet werden.



Abb. 62: MALDI-TOF-MS-Analyse von N-Glykanen aus Eiern von Achatina fulica nach α1,6-Fuc Abbau, negative mode

Masse [Da]	mögl. Struktur
1549,06 [M+?]	?
1768,99 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGn
1867,07 [M+?]	?
1891,37 [M+?]	?
1930,65 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGat
2076,39 [M+H <sup>+</sup> ]	SAGalF

Tabelle 14: Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse von N-Glykanen aus Eiern von Achatina fulica nach α1,6-Fuc Abbau

Es besteht die Möglichkeit, dass SAGalF (2076,39 Da) zumindest teilweise zu SAGal (1930,65 Da) abgebaut werden konnte, wobei SAGal auch in der ursprünglichen Probe bereits detektiert werden konnte. Eine genaue Quantifizierung war leider nicht möglich, vergleicht man jedoch die Intensitäten der Peaks (SAGal und SAGalF) in beiden Spektren (Abb. 58 und Abb. 62) miteinander, so lässt sich erkennen, dass in der α1,6-Fuc-abgebauten Probe der SAGal-Peak relativ zum SAGalF-Peak eine höhere Intensität aufweist. Dieses Verhalten würde für einen teilweisen Abbau und somit für das Vorkommen α1,6-gebundener Fukose in N-Glykanen der Achat-Eier sprechen.

Die enzymatischen Abbauten mit Glukosaminidase und α1,2-Fukosidase konnten leider nicht ausgewertet werden.

# 6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zu entwickeln bzw. zu optimieren, um weiterführende Informationen über N-Glykane in Schnecken, und im Besonderen über geladene N-Glykane zu erhalten.

In früheren Arbeiten [4, 7, 13, 43, 44] wurden bereits Untersuchungen im Bereich der neutralen und geladenen Glykane, in erster Linie mit der Schnecke *Arion lusitanicus* durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 7 Schneckenarten untersucht, darunter Nackt-, Gehäuse-, Land- und Wasserschnecken, sowie – wo verfügbar - auch Zellkulturen und Eier.

Weiters wurde versucht ein möglichst breites Spektrum an Methoden anzuwenden, zum einen, um keine Möglichkeit der Analyse unversucht zu lassen, und zum anderen, um für weiterführende Arbeiten einen guten Überblick zu gewinnen.

Nicht für alle Schneckenproben konnten alle Methoden angewandt werden, einige Versuche konnten wegen mangelnder Ergebnisse nicht ausgewertet oder weitergeführt werden.

Die Schwierigkeiten der N-Glykanpräparation aus Achat-Schnecken lassen sich zum Teil sicherlich auf das schwierige Ausgangsmaterial zurückführen. Bei dem Versuch Verunreinigungen und Schleim abzutrennen, scheint zuviel von den zu analysierenden Glykoproteinen verloren gegangen zu sein.

Generell muss erwähnt werden, dass die Beschaffenheit des Schneckengewebes, im speziellen der Haut, eine wirklich gute Aufreinigung nahezu unmöglich macht. Eine effiziente Möglichkeit den Schleim zu entfernen, ohne einen Großteil der zu reinigenden Glykoproteine zu verlieren, konnte bislang nicht gefunden werden.

Auch die Aktivitäten der Enzyme Thermolysin und PNGase scheinen unter diesen Bedingungen nicht optimal gewesen zu sein, was einen weiteren Verlust durch nicht freigesetzte N-Glykane bedeutete.

Zum anderen war die Ausgangsmenge an Material – 3 ausgewachsene Achat-Schnecken – für die etablierten Erstpräparationsschritte zu groß. Kleinere Mengen wären leichter zu handhaben gewesen, was sich bei den folgenden Präparationen der Posthorn-Schnecke zeigte.

Dabei trat allerdings das Problem zutage, dass die N-Glykanpräparation mit Ammonsulfat-Fällung und Thermolysin-Abbau für kleine Ausgangsmengen ineffizient arbeitet. Somit war zwar die Umsetzung einfacher, die Ergebnisse jedoch ebenfalls eher dürftig. Die Art der Präparation und die Verarbeitbarkeit des jeweiligen Ausgangsmaterials spiegeln sich letztendlich in den Ergebnissen der N-Glykananalysen wider.

Die erste Version (Ammonsulfatfällung und Thermolysinabbau) [7] erwies sich als weniger effizient, sowohl die Präparation der Glykane als auch die Entfernung von Begleitstoffen betreffend. Während aus der Haut keine Strukturen nachgewiesen werden konnten, ließen sich aus der Viscera zumindest Hinweise auf negativ geladene Glykane ermitteln. Tatsächliche Ergebnisse wurden nur bei der Aufreinigung der Achat-Eier erhalten, die wesentlich unproblematischer zu verarbeiten waren, als das Gewebe der ausgewachsenen Schnecken.

Die zweite, für die Zellen angewandte, Version der N-Glykanpräparation (direkter Abbau mit Pepsin) [41], scheint zu einer besseren Ausbeute zu führen und außerdem für kleinere Ausgangsmengen besser geeignet zu sein. Allerdings liegen für diese Methode keine Erfahrungswerte mit ausgewachsenen Schnecken und den damit verbundenen Störfaktoren vor.

Um die weitere Auftrennung und Analyse der N-Glykane fluorimetrisch detektieren zu können, wurden die Oligosaccharide mit 2-Aminopyridin markiert. Die dafür benötigten Bedingungen mit starker Säure und Hitze stellen im Zusammenhang mit geladenen Oligosacchariden ein Problem dar, da es durch die Bedingungen auch leicht zu einem Verlust der endständigen Sialinsäuren kommen kann. Methoden die Markierung unter milderen Bedingungen durchzuführen wurden von G. Pöltl entwickelt [45], mussten hier aber wegen Problemen mit der Entfernung der großen Mengen 2-Aminopyridin abgebrochen werden.

Für die Monosaccharidanalyse wurde die Markierung mit Anthranilsäure durchgeführt und optimiert. Diese Methode ließ sich für nahezu alle Zucker mit gutem Erfolg anwenden, ist jedoch leider für N-Acetylneuraminsäure und ihre Derivate nicht geeignet.

Für die elektrophoretischen Analysen mittels SDS-PAGE und Western Blot war es erforderlich eigene Präparationen anzufertigen, da auf diesem Weg nur intakte Glykoproteine, nicht aber abgetrennte Glykane analysiert werden können.

Es wurden verschiedene Puffer sowie Homogenisierungsmethoden ausprobiert, letztlich setzte sich die Kombination aus RIPA-Puffer, Ultra Turrax und Ultraschallbad durch.

Wie auch schon bei den größeren Ansätzen zur Präparation der N-Glykane, erwiesen sich Ausgangsmaterial und –menge als Problemfaktoren. Es wurde hier mit sehr kleinen Mengen gearbeitet, was in Kombination mit der Beschaffenheit des Schneckengewebes,

insbesondere der Haut, und den technischen Gegebenheiten zu unvollständiger Homogenisierung und damit natürlich zu Verlusten an Analysenmaterial führte.

Gute Ergebnisse lieferten Proben der Posthornschnecke, die im Rahmen der N-Glykanpräparation nach der Ammonsulfatfällung elektrophoretisch analysiert wurden. Für diese Methode der SDS-PAGE Vorbereitung wäre allerdings wieder eine größere Ausgangsmenge erforderlich, die nicht in allen Fällen verfügbar war.

Die Auftrennung der präparierten und PA-markierten N-Glykane in neutrale und geladene Fraktionen wurde nur mit den Proben aus Haut und Viscera der Achatschnecke durchgeführt. Nach der Trennung konnte nur eine einzige Struktur aus der geladenen Fraktion der Viscera ermittelt werden. Dabei handelte es sich um ein diantennäres einfach sialyliertes Glykan. Die massenspektrometrischen Analysen der neutralen Fraktionen brachten keine Ergebnisse, wenngleich die Auftrennung mittels Reversed Phase HPLC auf eine Vielzahl von Strukturen schließen ließ. Auch die Proben aus den Posthorn- und Achat Eier Präparationen schienen zu wenig aufgereinigt.

Große Hoffnungen wurden in die Optimierung der Methode zur Auftrennung anthranilsäure-markierter Monosaccharide mittels HPLC gesetzt. Die Hydrolyse der präparierten N-Glykane und die anschließende Ermittlung der entstandenen Monosaccharide kann zwar keinen Aufschluss über die Struktur der N-Glykane, jedoch über das Vorhandensein bestimmter Zucker, und damit über Unterschiede zwischen verschiedenen Schneckenarten geben. Im Fall der Achat Eier zeigten die Ergebnisse auch gute Übereinstimmungen mit den Ergebnissen der MALDI-TOF-MS.

Leider ließen sich Sialinsäuren nicht, wie erhofft, ebenfalls nach der Glykanhydrolyse als Monosaccharide nachweisen. Die Bedingungen bei der Probenvorbereitung scheinen zum Abbau der relativ empfindlichen Sialinsäuren zu führen.

Das Ziel der Methodenetablierung einer analytischen AIEX war es, ungeladene, einfach und mehrfach negativ geladene Oligosaccharide über HPLC auftrennen zu können. Dies hätte die Aufreinigung, Separation und Zuordnung unterschiedlicher Glykanstrukturen wesentlich vereinfacht. Theoretisch sollten jene Gruppen, die negative Ladungen tragen, bei pH-Werten unterhalb ihres Neutralisationspunktes (pK<sub>s</sub>-Wert) in ungeladener, darüber in geladener Form vorliegen. In diesem Fall sollte spezielles Augenmerk auf sialylierte Glykane gelegt werden, der pK<sub>s</sub>-Wert von Sialinsäuren liegt ca. bei 2,6.

Beim Auftragen in geladenem Zustand auf eine AIEX-Säule, sollten dementsprechend die geladenen Oligosaccharide an die Austauschergruppen des Gels binden, die

ungeladenen ohne zu binden eluieren. Durch Änderung der Konditionen zu niedrigerem pH-Wert sollten die negativ geladenen Gruppen ihre undissozierte Form annehmen und entsprechend der Anzahl ihrer Ladungen eluieren.

Aufgrund verschiedener Pufferwirkungen, ist es allerdings in der Praxis kaum möglich durch Absenken des pH-Wertes eine Trennung zu erzielen, daher werden die, an ein Ionentauschergel gebundenen Substanzen durch Erhöhung der Ionenstärke im Elutionsmittel, also durch eine Verdrängungsreaktion an den ionisierbaren Gruppen eluiert. Letztendlich mussten die Versuche leider ergebnislos abgebrochen werden, da keinerlei Auftrennung erreicht wurde. Unter keinen Bedingungen konnte eine Bindung der Oligosaccharide an die Säule bewirkt werden, was natürlich die Voraussetzung einer ladungsabhängigen Elution darstellt. Es ist nicht auszuschließen, dass die Misserfolge im Falle der DEAE-Säule nicht unbedingt an der prinzipiellen Methodik, sondern eventuell am Alter der verwendeten Säule gelegen haben könnten.

Für weitere Versuche mit einer anderen schwachen Ionentauscher-Säule standen leider keine Möglichkeiten zur Verfügung; es gibt Hinweise darauf, dass eine WAX (Weak Anion Exchange) – Säule für die beschriebenen Anforderungen geeignet sein könnte.

Der Erfolg der elektrophoretischen Analysen war, wie schon erwähnt, stark von der Probenvorbereitung abhängig. Die besten Ergebnisse wurden zweifellos durch Reinigung der Glykoproteine mittels Ammonsulfatfällung erreicht. Diese Behandlung wurde allerdings nur mit Haut und Viscera der Posthorn Schnecke durchgeführt. Bei zu kleinen Ausgangsmengen sind die Vorbereitungen, die diese Methode erfordert nicht durchführbar, beziehungsweise ist die Proteinkonzentration am Ende zu niedrig, wie sich am Beispiel der *Bg*-Zellen zeigte. Außerdem war das eigentliche Ziel, eine möglichst unkomplizierte Variante der Glykoprotein-Präparation zu entwickeln, um schnelle Analysen zu ermöglichen. Als guter Kompromiss stellte sich die Präparation mit RIPA-Puffer heraus, da dafür die Ausgangsmengen gering gehalten werden konnten, keine Methanolfällung notwendig war, und auch ohne Ammonsulfat-Fällung eine recht scharfe Auftrennung der Banden bei der Elektrophorese erreicht werden konnte.

Für die Western Blots wurden in erster Linie Lektine zur Detektion der Glykoproteine herangezogen, da diese, aus Pflanzen isolierten Proteine spezifisch Zuckerstrukturen binden.

Sambucus Nigra Lectin bindet vor allem endständige Sialinsäuren in α2,6-Stellung, eventuell auch in α2,3-Stellung, sowie möglicherweise endständiges N-Acetylgalaktosamin. *Maackia Amurensis* Lectin I wird zur Detektion von Strukturen mit terminalen Galβ1,4-GlcNAc Bindungen, aber auch von endständigen Sialinsäuren in α2,3-Position, jedoch nicht α2,6-Position verwendet.

*Maackia Amurensis* Lectin II ist in seiner Bindungsspezifität noch nicht vollständig erfasst, zeigt aber Affinität zu α2,3-gebunden Sialinsäuren.

*Wheat Germ* Agglutinin bindet Glykanstrukturen mit terminalen N-Acetylglukosaminen, sowie angeblich Sialinsäuren in α2,3-Position.

*Ricinus Communis* Agglutinin I eignet sich zur Detektion endständiger Galaktose- und N-Acetylgalaktosamin-Resten und somit zum Nachweis desialylierter Glykane.

Prinzipiell lässt sich zur Arbeit mit Lektinen sagen, dass die Beschreibungen ihrer Bindungsspezifitäten in der Literatur und von Firmen nicht völlig übereinstimmen, weiters ist wichtig zu bedenken, dass die Bindungsspezifitäten meist mit gängigen Säugertierglykanen etabliert wurden. Wechselwirkungen mit anderen Gruppen bei völlig anderen Strukturen sind möglich und wahrscheinlich.

Alle verwendeten Lektine waren in biotinylierter Form und konnten somit mit Streptavidin, einem Protein aus *Streptomyces avidinii* bestehend aus vier gleichen Untereinheiten, mit je einer Biotin-Bindungsstelle detektiert werden. Streptavidin selbst war mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt, wodurch letztendlich die, durch violette Färbung der jeweiligen Banden erkennbare Umsetzung des Substrats erfolgte. Für die Detektion von RCA 1 wurde allerdings Goat-Anti-Biotin-Ig verwendet, da es eine höhere Spezifität gegenüber Biotin aufweist und somit bei eventuell unspezifischen Hintergrund-Bindungen bessere Ergebnisse liefert [1].

Als einziger tatsächlicher Antikörper wurde Anti-Horseradish-Peroxidase (rabbit) eingesetzt. Anti-HRP bindet jene für Pflanzen typische Glykanstruktur mit Xylose in  $\beta$ 1,2-Stellung und/oder Fukose in  $\alpha$ 1,3-Stellung, nicht aber in  $\alpha$ 1,6-Position. Die Detektion dieses Antikörpers erfolgte mit Goat-Anti-rabbit-Ig, ebenfalls als Alkalische Phosphatase Konjugat.

Die Ergebnisse der Lektin Blots waren von sehr unterschiedlicher Qualität. Die verlässlichsten und reproduzierbarsten Ergebnisse wurden mit SNA erzielt, bei Detektion mit WGA traten öfter verschmierte, unscharfe Banden zutage, MAA I und MAA II lieferten wechselhafte Ergebnisse in Hinblick auf die Reproduzierbarkeit.

Die Gründe für die unterschiedlichen Qualitäten der Lektine konnten leider nicht eruiert werden, diese Problematik ist aber schon von früheren Arbeiten bekannt. Jene Blots, die mit Anti-HRP durchgeführt wurden, lieferten sehr stabile und reproduzierbare Ergebnisse.

Nachdem keine Vorselektion der Proteine getroffen wurde, zeigten die Blots oft eine Vielzahl an Banden. Speziell im Fall der *Bg*-Zellen war dies zu beobachten. Letztlich lieferten aber alle analysierten Schnecken Hinweise auf Glykoproteine mit

endständig gebundenen Sialinsäuren. Eindeutige Schlüsse über die Art und Weise der Bindung sowie über die gesamte Oligosaccharidstruktur konnten daraus aber nicht gezogen werden. Vor allem die Unterscheidung zwischen O-Glykanen und N-Glykanen wird dadurch nur in beschränktem Ausmaß durch PNGase F Behandlung möglich.

Die Ergebnisse mit Anti-HRP bestätigten die Vermutung, dass die meisten Schnecken, mit Ausnahme der *Bg*-Zellen, auch fukosylierte und xylosylierte Glykanstrukturen besitzen.

Im Fall der Posthornschnecke konnten weiterführende Ergebnisse durch enzymatische Abbauten mit N-Glykosidase F und Neuraminidase erzielt werden. Es konnten jene Banden identifiziert werden, bei denen es sich offensichtlich um Glykoproteine mit Nglykosidisch gebundenen, endständig sialylierten Oligosacchariden handelt. Diese Glykoproteine liegen im Massenbereich zwischen 20 und 30 kDa.

Auswertbare Ergebnisse bei der MALDI-TOF Analyse lieferten die Präparationen aus *Biomphalaria glabrata* Zellen und Eiern der *Achatina fulica*. Das sind jene Proben, deren Präparationen entweder aufgrund der Beschaffenheit des Ausgangsmaterials (Eier) oder wegen Änderungen im Präparationsschema (Zellen) anders verliefen als die Präparationen aus ganzen Schnecken.

Generell erwies sich der negative mode des MALDI-TOF-MS als sensitiver als der positive mode, niedrigere Konzentrationen (1:10 bis 1:100 verdünnter) konnten noch detektiert werden, außerdem schienen Verunreinigungen im negative mode weniger ausschlaggebend. Diese Tatsache ist für die Analytik geladener Strukturen nicht nachteilig, allerdings stellen Vergleiche zwischen geladenen und neutralen Strukturen derselben Probe eine gewisse Schwierigkeit dar.

Die *Bg*-Zellen enthielten vor allem hochmannosidische Strukturen – teilweise methyliert, die durch Abbau mit Endoglykosidase H bestätigt werden konnten, aber auch di- und triantennäre komplexe Glykane konnten detektiert werden. Diesen wurden im negative mode auch einfach sialylierte Strukturen (SAGal und SAGalGal) zugeordnet. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die *Bg*-Zellen in *fetal-calf-serum* hältigem Medium gezüchtet wurden, was zu dem Schluss veranlasst, dass jene komplexen, sialylierten N-Glykanstrukturen aus einer Verunreinigung durch das Medium stammen könnten, und nicht aus den Zellen selbst. Im Bewusstsein einer eventuellen Verfälschungsquelle wurde das Medium, nach abzentrifugieren der Zellen, einer Glykoproteinanalyse mittels Lektin-Blot unterzogen (siehe Pkt 5.4., Abb 34a). Dabei konnten aber keine sialylierten Glykoproteine nachgewiesen werden.

Es muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Zellen, mit der Nahrung aufgenomme Zellbausteine in ihrem eigenen Stoffwechsel verwenden können, selbst wenn sie selbst nicht in Lage sind diese Bausteine zu synthetisieren. Im speziellen Fall könnten also Zellen sialylierte Glykanstrukturen synthetisieren sofern ihnen über das Medium Sialinsäuren bzw. sialylierte Glykoproteine zur Verfügung gestellt werden.

Somit ergibt sich als einzig sichere Möglichkeit zur Analyse von N-Glykanen aus *Bg*-Zellen das Züchten der Zellen in serumfreiem Medium. Versuche diesbezüglich wurden bereits durchgeführt, scheiterten jedoch daran, dass für die Zellen eine bestimmte Mindestkonzentration an *fetal-calf-serum* im Medium lebensnotwendig zu sein scheint.

Die Analyse der Achateier lieferte sehr vielfältige Ergebnisse. Es wurden sowohl methylierte, als auch fukosylierte und eventuell xylosylierte kleinere Glykane gefunden. Im höheren Massenbereich konnten auch sialylierte Strukturen, mit und ohne Fukosylierung nachgewiesen werden. Auch Sulfatgruppen könnten vorhanden sein, einige Massen konnten allerdings nicht zugeordnet werden.

Spezielles Augenmerk wurde auf die Peaks SAGn, SAGal, SAGalF sowie SAGalF in methylierter und sulfatierter Form (Abb. 58, Tabelle 9) gelegt.

Diese Probe wurde mit freundlicher Genehmigung und Unterstützung von Prof. Friedrich Altmann und DI Martin Pabst mittels LC-ESI-Q-TOF-MS analysiert. Weiters wurden enzymatische Abbauten durchgeführt, um bestimmte Strukturen zu verifizieren. Während bei dem MALDI-TOF-MS die Genauigkeit der Massenangabe nicht unbedingt für eine eindeutige Zuordnung einer Masse zu einer Struktur ausreicht, liefert das ESI-Q-TOF-MS wesentlich verlässlichere, genauere Massen.

Die so erhaltenen Ergebnisse ließen rein rechnerisch eine Vielzahl an möglichen Glykanstrukturen zu, wobei nicht alle davon nach glykobiologischen Gesichtspunkten realistisch erschienen.

Von den durchgeführten enzymatischen Abbauten konnten nur jene nach ß-Galaktosidase und  $\alpha$ 1,6-Fukosidase - Behandlung massenspektrometrisch ausgewertet werden. Die Ergebnisse festigten die Annahme, dass die Strukturen SAGal und SAGalF in Achat Eiern vorkommende N-Glykane sind. Es kann weiters vermutet werden, dass zumindest ein Teil der enthaltenen Fukose  $\alpha$ 1,6-gebunden ist. Die Frage, ob Fukose auch in  $\alpha$ 1,3-Bindung vorliegt, konnte in Ermangelung eines passenden Enzyms nicht beantwortet werden.

Einige der erhaltenen Massen konnten keiner bekannten Glykanstruktur zugeordnet werden, ließen sich aber teilweise mit den eingesetzten Enzymen abbauen. Daraus ergibt sich, dass zwar der endständige Zucker eindeutig bezeichnet werden kann, der Rest der Glykanstruktur aber einen noch unbekannten Aufbau hat.

Weitere Präparationen, sowie enzymatische Abbauten wären zur genaueren Identifizierung der angenommen sowie der unbekannten Strukturen notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in allen analysierten Schneckenproben Hinweise auf endständig sialylierte Glykoproteine, sowie xylosylierte und fukosylierte Strukturen gefunden werden. Die Analysen wurden mittels Lektin-Blot, HPLC und massenspektrometrisch durchgeführt. Einige der gefundenen Strukturen konnten durch spezifische enzymatische Abbauten bestätigt werden. Obwohl Nachweise mit Lektinen nicht immer die erforderliche Reproduzierbarkeit aufweisen [13], konnten die Beobachtungen über das Vorkommen von Sialinsäuren in Gastropoden durch frühere Arbeiten mit *Arion lusitanicus* [10] untermauert werden.

In Proben der *Planobarius corneus* konnten mittels Lektinblots sowohl in der Haut als auch in der Viscera endständig sialylierte Glykoproteine detektiert werden. Bei Glykoproteinen der Haut im Molekulargewichtsbereich zwischen 20 und 30 kDa sind die Sialinsäuren an N-Glykane gebunden, was durch enzymatische Abbauten bestätigt wurde. Die Monosaccharidanalyse ergab, dass in der Posthornschnecke auch xylosylierte und fukosylierte Oligosaccharidstrukturen vorliegen. Methylierte Glykane sind im Vergleich zur Achat Schnecke in geringerem Ausmaß vorhanden.

Aus den Proben von ausgewachsenen Exemplaren der Achatina fulica konnten nur wenige Oligosaccharidstrukturen ermittelt werden. Geladene Glykane sind, wenn überhaupt, als O-Glykane gebunden, nur in der Viscera konnte eine diantennäre, einfach sialylierte Struktur nachgewiesen werden. Die Haut scheint ausschließlich neutrale N-Glykane zu enthalten. Mittels Monosaccharidanalyse konnte gezeigt werden, dass Fukose und Xylose gängige Zucker in den Glykoproteinen der Achat Schnecke sind.

In den Eiern von *Achatina fulica* wurden massenspektrometrisch hochmannosidische Strukturen (Man5 bis Man9) detektiert, die zum Teil auch in methylierter Form vorliegen. Diese Beobachtung ist sehr interessant, da bei Untersuchungen der Eier von *Arion lusitanicus* [10] keine methylierten Glykane gefunden wurden. Weiters sind Fukosylierungen in den Eiern, wie auch in den anderen Geweben der Achat Schnecke häufig, auch Xylosylierungen sind möglich. Ein großer Teil der höhermolekularen, komplexen N-Glykane liegt in negativ geladener Form vor, die Ladungen sind vermutlich auf endständige Sialinsäuren und Sulfatreste zurückzuführen. Die Strukturen SAGal und SAGalF konnten durch enzymatische Abbauten bestätigt werden, zumindest ein Teil der Fukose dürfte in α1,6-Bindung vorliegen. Einigen der detektierten N-Glykane konnte keine definitive Struktur zugeordnet werden, was sich damit erklären lässt, dass Schnecken ein weites Spektrum an Glykosylierungsmöglichkeiten besitzen [7, 40] von denen viele noch unbekannt sind.

In den Zellen von *Biomphalaria glabrata*, dem Zwischenwirt von *Schistosoma mansoni* wurden überwiegend hochmannosidische N-Glykanstrukturen (Man5 bis Man9) ermittelt. Die Core Struktur (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) kommt in methylierter und fukosylierter Form vor. Die Glykanstruktur Me<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> konnte auch schon von Marxen et al [39] nachgewiesen werden. Weiters konnten komplexe N-Glykane, di- und triantennär, detektiert und durch Enzymabbauten bestätigt werden. Diese scheinen auch eine einfache endständige Sialylierung zu besitzen, allerdings ist diesbezüglich eine Beeinflussung durch das *fetal calf serum* hältige Medium nicht völlig auszuschließen.

Wenngleich auch die genauen Mechanismen und entsprechenden Enzyme der Proteinglykosylierung in Schnecken noch nicht völlig bekannt sind, so deuten doch die bisherigen Ergebnisse der Glykananalysen aus Gastropoden darauf hin, dass Schnecken sich als wichtige Modellorganismen in der Glykobiologie durchsetzen könnten. In dieser, sowie in früheren Arbeiten wurden methylierte, fukosylierte, xylosylierte, sialylierte und vermutlich sulfatierte Glykanstrukturen in Schnecken nachgewiesen. Damit stellen Gastropoden eine interessante glykobiologische Schnittstelle zwischen Säugetieren, Pflanzen und Nematoden dar. Möglicherweise könnten mithilfe dieser Erkenntnisse schon bald umweltverträglichere Schneckenbekämpfungsmittel hergestellt werden.

Generell würde die weitere Erforschung der Glykan-Biosynthesewege in Gastropoden vermutlich auch Fortschritte im Verständnis der Glykosylierungen anderer Organismen ermöglichen.

Das bessere Verständnis der Interaktionen zwischen Schnecken und humanpathogenen Parasiten, welche nachweislich in hohem Maße von Glykokonjugaten gesteuert werden,
würde es eventuell ermöglichen gezielt in die Entwicklung der Trematoden einzugreifen und somit der weitverbreiteten Tropenkrankheit Schistosomiasis Schranken zu setzen, noch bevor es zur Infektion des Endwirts kommt.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit von Schnecken ist die Entwicklung von Zellkultursystemen zur Produktion rekombinanter Glykoproteine. Sollten sich zukünftig die bisherigen Beobachtungen bezüglich der Fähigkeit von Gastropoden zur humanen Glykosylierung auch auf genetischer Ebene bestätigen, würde sich auch auf dem pharmazeutisch-medizinischen Sektor ein völlig neues Forschungsfeld ergeben.

## 7. Abkürzungen und Strukturverzeichnis

## 7.1. Abkürzungen

AcCN	Acetonitril	
AIEX	Anion – Ion Exchange Chromatography	
APS	Ammoniumpersulfat	
Ara	Arabinose	
CIEX	Cation – Ion Exchange Chromatography	
CMP	Cytidin-Monophosphat	
DC	Dünnschicht Chromatographie	
DC-SIGN	Dentritic cell - specific ICAM-3 grabbing non-integrin (Lektin)	
DEAE	Diethyl-Aminoethyl	
DeoxyGlc	Deoxy-Glukose	
DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid	
DiAcTridH	1,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose	
Dolichol-P	Dolichol-Phosphat	
DTT	1,4-Dithiothreitol	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
Endo H	Endoglykosidase H	
ER	Endoplasmatisches Reticulum	
ESI	Electrospray Ionization	
F <sub>c</sub> -Region	kristallines Fragment eines Antikörpers	
FMRF-Amid	Phe-Met-Arg-Phe-NH <sub>2</sub>	
Fuc	Fukose	
Gal	Galaktose	
GalN(Ac)	(N-Acetyl-)Galaktosamin	
GalU (GalA)	Galakturonsäure	
GDP	Guanosindiphosphat	
Glc	Glukose	
GlcN(Ac)	(N-Acetyl-)Glukosamin	
GIcU (GIcA)	Glukuronsäure	
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie	
HRP	Horse Radish Peroxidase	

ICAM-3	Intercellular Adhesion Molecule 3	
IgE	Immunglobulin E	
lgG	Immunglobulin G	
lgM	Immunglobulin M	
KDN	2-Keto-3-deoxy-Nonulonsäure	
KDO	2-Keto-3-deoxy-Octulonsäure	
	Liquid Chromatography	
	Liver and lymph node - specific ICAM-3 grabbing non-integrin (Lektin)	
L-SIGN		
MAA	Maackia Amurensis Agglutinin (Lektin)	
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight	
Man	Mannose	
ManN(Ac)	(N-Acetyl-)Mannosamin	
Me-Gal	Methyl-Galaktose	
MHC	Major Histocompatibility Complex	
MonoQ	Quartenäres Ammonium	
MS	Massenspektrometrie	
NANA	N-Acetyl-Neuraminsäure	
NeuAc	N-Acetyl-Neuraminsäure	
NeuGc	N-Acetyl-Glykolylsäure	
NGNA	N-Acetyl-Glykolylsäure	
NP 40	Nonidet P-40 (nichtionisches Detergens)	
ODS -	Octadecyl Silane (C 18)	
PA	2-Aminopyridin	
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
PNGase A	Peptid-N-Glykanase A	
PNGase F	Peptid-N-Glykanase F	
Q-TOF	Quadrupol-Time of Flight	
R	Rest	
RCA	Ricinus Communis Apolutinin (Lektin)	
Rha		
RIDA	Radioimmunoprecinitation	
	הבאבוזבה בווקזב	

SA	Sialinsäure
SAX	Strong Anion Exchange
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
Sia	Sialinsäure
SNA	Sambucus Nigra Agglutinin (Lektin)
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THAP	Trihydroacetophenol
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UDP	Uridindiphosphat
WAX	Weak Anion Exchange
WGA	Wheat Germ Agglutinin (Lektin)
ХуІ	Xylose

,

## 7.2. Strukturenverzeichnis



Abb. 63: Glykanstrukturen, die den mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Massen entsprechen (siehe Pkt. 5.6.)

## 8. Literatur

- Bill R.M., Revers L., Wilson I.B.H., Protein Glycosylation, Kluwer Academic Publishers (1998)
- [2] Taylor M.E., Drickamer K., Introduction to Glycobiology, Oxford University Press (2003)
- [3] Weerapana E., Imperiali B., Review: Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems,
  Glycobiology vol. 16 no. 6 (2006), 91R-101R
- [4] Voglmeir J., Glycosylation Pattern of Gastropods (A. lusitanicus),Diplomarbeit (2006, BOKU Wien)
- [5] Brooks S.A., Dwek M.V., Schumacher U., Functional and molecular glycobiology, BIOS Scientific Publishers Ltd (2002)
- [6] Wuttke M., Charakterisierung der Struktur und Funktion von rekombinantem und aus Knochen aufgereinigtem humanem Bone Sialoprotein,
   Dissertation (2000, Universität Köln)
- [7] Gutternigg M., Untersuchung der Glykosylierung von Gastropoden: neutrale Glykane aus Arion lusitanicus,
   Diplomarbeit (2002, BOKU Wien)
- [8] Szymanski C.M., Yao R.J., Ewing C.P., Trust T.J., Guerry P., Evidence for a system of general protein glycosylation in *Camylobacter jejuni*, Mol. Microbiol. vol. 32 (1999), 1022-1030
- [9] Altmann F., The role of protein glycosylation in allergy,Int. Arch. Allergy Immunol. Vol. 142 (2) (2007), 99-115
- Bürgmayr S., Grabher-Meier H., Staudacher E., Sialic acids in gastropods, FEBS Letters vol. 508 (2001), 95-98
- [11] Altmann F., Staudacher E., Wilson I.B.H., März L., Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins, Glycoconjugate Journal vol. 16 (1999), 109-123

- [12] Wilson I.B.H., Zeleny R., Kolarich D., Staudacher E., Stroop C.J.M., Kamerling J.P., Altmann F., Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs. Widespread occurrence of Lewis a, core a1,3-linked fucose and xylose substitutions,
  Glycobiology vol. 11 no. 4 (2001), 261-274
- [13] Bürgmayr S., Sialylierung von Gastropoden, Diplomarbeit (1999, BOKU Wien)
- [14] Altmann F., Fabini G., Ahorn H., Wilson I.B.H., Genetic model organisms in the study of N-glycans,
  Biochimie vol. 83 (2001), 703-712
- [15] Altheide T.K., Hayakawa T., Mikkelsen T.S., Diaz S., Varki N., Varki A., Systemwide Genomic and Biochemical Comparison of Sialic Acid Biology Amongst Primates and Rodents – Evidence for Two Modes of Rapid Evolution, Journal of Biological Chemistry vol. 281 (35) (2006), 689-702
- [16] Weiss P., Ashwell G., The glcoprotein receptor: properties and modulation by ligand, Prog. Clin. Biol. Res. vol. 300 (1989), 169-184
- Shinya K., Ebina M., Yamada S., Ono M., Kasai N., Kawaoka Y., Influenza virus receptors in the human airway,
   Nature, Brief Communications vol. 440 (2006), 435-436
- [18] Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., Biochemie/Kapitel 11 Kohlenhydrate, Spektrum Akademischer Verlag (2003, 5. Auflage)
- [19] Li P., Wan Q., Feng Y., Liu M., Wu J., Chen X., Zhang X.-L., Engineering of N-glycosylation of hepatitis C virus envelope protein E2 enhances T cell responses for DNA immunization, Vaccine vol. 25 (2007), 1544-1551
- [20] Goffard A., Callens N., Bartosch B., Wychowski C., Cosset F.-L., Montpellier C., Dubuisson J., Role of N-linked Glycans in the Function of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins, Journal of Virology (2005), 8400-8409
- Shah M.M., Fujiyama K., Flynn C.R., Joshi L., Sialylated endogenous glycoconjugates in plant cells,
  Nature biotechnology, Brief Communications vol. 21 (12) (2003), 1470-1471

- [22] Séveno M., Bardor M., Paccalet T., Gomord V., Lerouge P., Faye L., Glycoprotein sialylation in plants?, Nature biotechnology, Correspondence to [21]
- [23] Zeleny R., Kolarich D., Strasser R., Altmann F., Sialic acid concentrations in plants are in the range of inadverent contamination,
  Planta vol. 224 (2006), 222-227
- [24] Cummings R.D., Nyame K., Glycobiology of schistosomiasis, FASEB Journal vol. 10 (1996), 838-848
- [25] Kayser F., Bienz K., Eckert J., Zinkernagel R., Medizinische Mikrobiologie Schistosomiasis, Thieme Verlag (2001, 10. Auflage)
- [26] Hokke C.H., Yazdanbakhsh M., Schistosome glycans and innate immunity, Parasite Immunity vol. 27 (2005), 257-264
- [27] Khoo K.-H., Huang H.-H., Lee K.-M., Characteristic structural features of schistosome cercarial N-glycans: expression of Lewis X and core xylosylation,
  Glycobiology vol. 11. no. 2 (2001), 159-163
- [28] Van Remoortere A., Bank C.M.C., Kwame Nyame A., Cummings R.D., Deelder A.M., Van Die I., Schistosoma mansoni – infected mice produce antibodies that cross-react with plant, insect and mammalian glycoproteins and recognize the truncated biantennary N-glycan Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-R, Glycobiology vol. 13 no. 3 (2003), 217-225
- [29] Smithers S.R., Terry R.J., Immunity in schistosomiasis, Ann. N.Y. Acad. Sci. vol. 160 (1969), 826-840
- [30] Horák P., Kolářová L., Molluscan and vertebrate immune responses to bird schistosomes,
  Parasite Immunology vol. 27 (2005), 247-255
- [31] McIntosh R.S., Jones F.M., Dunne D.W., McKerrow H., Pleass R.J., Characterization of immunoglobulin binding by schistosomes, Parasite Immunology vol. 28 (2006), 407-419
- [32] Thors C., Jokiranta T.S., Meri T., Kairemo K., Meri S., Lindner E., Immunoglobulin uptake and processing by *Schistosoma mansoni*,
  Parasite Immunology vol. 28 (2006), 421-428

- [33] Smithers S.R., Terry R.J., Hockley D.J., Host antigens in schistosomiasis, Proc. Roy. Soc. London Series B: Biol. Sci vol. 171 (1969), 483-494
- [34] Lommerse J.P.M., Thomas-Oates J.E., Gielens C., Préaux G., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G., Primary structure of 21 monoantennary and diantennary N-linked carbohydrate chains from α-D-hemocyanin of *Helix pomatia*,
  Eur. J. Biochem. vol. 248 (1997), 195-222
- [35] Van Kuik J.A., Sijbesma R.P., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G., Wood E.J., Primary structure of a low-molecular-mass N-linked oligosaccharide from hemocyanin of *Lymnaea* stagnalis. 3-O-methyl-D-mannose as a constitutent of the xylose-containing core structure in an animal glycoprotein, Eur. J. Bioch. vol. 160 (1986), 621-625
- [36] Van Kuik J.A., Sijbesma R.P., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G., Wood E.J., Primary structure determination of seven novel N-linked carbohydrate chains derived from hemocyanin of Lymnaea stagnalis. 3-O-methyl-D-galactose and N-acetyl-D-galactosamine as constituents of xylose-containing N-linked oligosaccharides in an animal glycoprotein, Eur. J. Bioch. vol. 169 (1987), 399-411
- [37] Dolashka-Angelova P., Beck A., Dolashki A., Beltramini M., Stevanovic S., Salvato B., Voelter W., Characterization of the carbohydrate moieties of the functional unit RvH1-a of *Rapana* venosa haemocyanin using HPLC/electrospray ionization MS and glycosidase digestion, Eur. J. Bioch. vol. 374 (2003), 185-192
- [38] Kurokawa T., Wuhrer M., Lochnit G., Geyer H., Markl J., Geyer R., Hemocyanin from the keyhole limpet *Megathura crenulata* (KHL) carries a novel type of N-glycan with Gal(β1-6)Man-motifs,
  Eur. J. Bioch. vol. 269 (2002), 5459-5473
- [39] Marxen J.C., Nimtz M., Becker W., Mann K., The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin, Biochim. Biophys. Acta vol. 1650 (2003), 92-98
- [40] Gutternigg M., Ahrer K., Grabher-Meier K., Bürgmayr S., Staudacher E., Neutral N-glycans of the gastropod *Arion lusitanicus*, Eur. J. Bioch. vol. 271 (2004), 1348-1356
- [41] Rendić D., Recombinant and native expression of eukaryotic glycosyltransferases, Dissertation (2004, BOKU Wien)

- [42] Schopfhauser H., Entwicklungsbedingte Änderungen der N-Glykosylierung in Kartoffeln, Diplomarbeit (2002, BOKU Wien)
- [43] Grabher-Meier H., Strukturanalyse von N-Glykanen aus Schnecken, Diplomarbeit (1999, BOKU Wien)
- [44] Ahrer K., Strukturuntersuchung neutraler N-Glykane aus Arioniden, Diplomarbeit (2001, BOKU Wien)
- [45] Pöltl G., Loss of sialic acids during the derivatisation reaction, Weekly Mail, issue 14 (23. Dez. 2005)