# **CD52 : STRUKTURANALYSE EINES**

# **Spermienoberflächenproteins**

# DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie

der Universität Hamburg



# vorgelegt von

# SABINE SCHRÖTER

aus Hamburg

Hamburg 1999

# **CD52 : STRUKTURANALYSE EINES**

# **Spermienoberflächenproteins**

# DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Chemie

der Universität Hamburg



vorgelegt von

# SABINE SCHRÖTER

aus Hamburg

Hamburg 1999

Die vorliegende Arbeit entstand als externe Doktorarbeit in der Zeit vom April 1995 bis Juli 1999 am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg, bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH in Braunschweig und im Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer
- 2. Gutachter: PD Dr. C. Kirchhoff

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 3.12.1999

[Bezügl ich des dreiß igsten Jahrestages der Apol I o-Mondl andung-]

Aus Apol I o können wir heute und in der Zukunft noch I ernen daß man sich in der Wissenschaft und Technol ogie ehrgeizige Ziel e setzen muß . Wenn man wirkl ich entschl ossen sol che Ziel e angeht, wird auch das für kaum real isierbar Gehal tene in endl icher Zeit machbar.

Walter Kröll 1999

Vorstandsvorsitzender des deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt Meinen El tern

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	4
1 Einleitung	5
1.1 CD52 - biologischer Hintergrund	5
1.2 Glycane	10
1.3 GPI-Anker	13
1.4 Analysemethoden	17
2 Problemstellung	
3 Methoden	19
3.1 Probenvorbereitung	
3.1.1 Folch-Extraktion	19
3.1.2 Lymphozytenpräparation	19
3.1.3 Kapazitation der Spermien	20
3.2 <i>Blotting</i> -Methoden	20
3.2.1 Gelelektrophorese und Semi-dry-Transfer	20
3.2.2 Herstellung der <i>Dotblots</i>	21
3.2.3 Immunodetektion von Westernblots und Dotblots	21
3.2.4 Lektindetektion der Proteine	22
3.3 Enzymatische Spaltungen des SP-CD52	22
3.3.1 N-Glycosidase F-Verdau	22
3.3.2 Sialidase-Verdau der Proteinlösung	23
3.3.3 Phospholipase C-Verdau und Triton X-114-Phasentrennung	23
3.4 Aufreinigung des SP-CD52	24
3.4.1 Silanisierung von Glasgefäßen	24
3.4.2 Gelfiltrationschromatografie	24
3.4.3 Reversed phase-HPLC im Rahmen der rein chromatografischen Auftrennung	25
3.4.4 Kationentauscherchromatografie	25
3.4.5 Herstellung der Affinitätssäulen	25
3.4.6 Messung des Proteingehalts	
3.4.7 Durchführung der Affinitätschromatografie	
3.4.8 Dialyse	27
3.4.9 Reversed phase -HPLC im Rahmen der affinitätschromatografischen Auftrennun	ıg27
3.5 Probenvorbereitung für die Strukturanalyse	27
3.5.1 Sequenzierung der Proteine	27
3.5.2 Spaltung des SP-CD52 in N-Glycane und GPI-Peptid	
3.6 Analyse der N-Glycane von SP-CD52	

3.6.1 Entsalzung der Glycane	
3.6.2 MonoQ-Anionenaustauschchromatografie	
3.6.3 Dionex HPAEC-PAD der N-Glycane	29
3.6.4 Permethylierungsreaktion	29
3.6.5 MALDI/TOF-Massenspektroskopie	
3.6.6 Methylierungsanalyse der permethylierten Derivate	
3.6.7 Untersuchung auf Polysialinsäuren	
3.6.8 Endo-β-Galactosidase-Verdau	31
3.7 Analyse des GPI-Peptids von SP-CD52	
3.7.1 Komponentenanalyse	32
3.7.2 Deaminierung des GPI-Peptids	
3.7.3 Delipidierung des GPI-Peptids	
3.7.4 ESI-MS/MS	
3.8 Konformationsberechnungen	
4 Ergebnisse	
4.1 Western - und Lektinblots	
4.1.1 Methoden	
4.1.2 Westernblot-Analyse der Ejakulatbestandteile	
4.1.3 Analytische N-Glycosidase F–Verdaus	
4.1.4 Analytische Sialidase-Verdaus	
4.1.5 In-vitro-Kapazitationsversuche mit lebenden Spermien	40
4.1.6 Versuche mit CD52-N-Glycan-spezifischen Antikörpern	41
4.2 Aufreinigung des SP-CD52	42
4.2.1 Angewendete Methoden	
4.2.2 Säulenchromatografische Aufreinigung	43
4.2.3 Affinitätschromatografische Aufreinigung	45
4.3 Strategie der Strukturanalyse und präparative Aufarbeitung von SP-CD52	47
4.3.1 Mikroheterogenität des SP-CD52: Strategie der Strukturanalyse	47
4.3.2 Präparative Isolierung der N-Glycane und des GPI-Peptids	49
4.4 Strukturanalyse der N-Glycane von SP-CD52: Methoden	50
4.4.1 Trennung der N-Glycane in Ladungsgruppen durch MonoQ-FPLC	
4.4.2 Dionex-HPAEC-PAD-Analyse	
4.4.3 MALDI/TOF-MS-Analyse der N-Glycane nach MonoQ-Auftrennung	55
4.4.4 Endo-ß-Galactosidase-Verdaus	59
4.4.5 Methylierungsanalyse	61
4.5 Strukturanalysen der Oligosaccharide in den einzelnen Ladungsgruppen	63
4.5.1 Ladungsgruppe M2	63

	4.5.2 Ladungsgruppe M3	65
	4.5.3 Ladungsgruppe M4	67
	4.5.4 Ladungsgruppe M4*	68
	4.5.5 Ladungsgruppe M5	69
	4.5.6 Ladungsgruppe M5*	70
	4.5.7 Ladungsgruppen M5/6 und M6	70
	4.5.8 Überblick über die Ergebnisse der N-Glycan-Analyse	72
	4.6 Strukturanalyse des GPI-Ankers von SP-CD52	74
	4.6.1 Vorversuche zur Analyse der Ankerstruktur des SP-CD52: Phospholipase C-Spaltu	ing und
	Triton-X114-Extraktion	74
	4.6.2 Komponentenanalyse des GPI-Peptids von SP-CD52	76
	4.6.3 ESI-MS/MS-Analyse der Phosphatidylinositolfragmente von SP-CD52	78
	4.6.4 ESI-MS-Analyse des delipidierten GPI-Peptids von SP-CD52	83
	4.6.5 ESI-MS/MS-Analysen des gesamten GPI-Peptids von SP-CD52	84
	4.7 Struktur von SP-CD52	88
5	5 Diskussion	91
	5.1 Aufreinigung von SP-CD52 aus dem humanen Ejakulat	91
	5.2 N-Glycane	93
	5.2.1 Struktur der polymorphen N-Glycane von SP-CD52	93
	5.2.2 Potentielle biologische Bedeutung der N-Glycane von SP-CD52	97
	5.3 GPI-Anker	101
	5.3.1 Die ungewöhnliche Struktur des GPI-Ankers von SP-CD52	101
	5.3.2 Potentielle biologische Bedeutung der GPI-Ankerstruktur	104
	5.4 Fazit	107
6	Zusammenfassung	108
7	' Summary	111
8	BLiteraturverzeichnis	114
9	Anhang	123
	9.1 Sicherheit und Handhabung	123
	9.2 Veröffentlichungen	124
	9.3 Posterpräsentationen	125
	Danksagung	126
	Lebenslauf	127

# Abkürzungen

C16/18-MAG	C16- und C18-Monoalkylglycerol
CAMPATH	Cambridge Pathology
CD	cluster of differentiation
Da	Dalton
dHex	Deoxyhexose
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrospray Ionisierungs-Massenspektroskopie
ESI-MS/MS	Elektrospray Ionisierungs-Tandem-Massenspektroskopie
EtP	Ethanolaminphosphat
FID	flame ion detector
FPLC	fast protein liquid chromatography
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GC-MS	Gaschromatografie-Massenspektroskopie
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Hex	Hexose
HexNAc	<i>N</i> -Acetylhexosamin
HexNAc-ol	<i>N</i> -Acetylhexosaminitol
HPAEC	high pH anion exchange chromatography
HPLC	high pressure liquid chromatography
kD	Kilodalton
L	N-Acetyllactosamin-Einheiten
Le <sup>A</sup>	Lewis <sup>A</sup> (Gal $\beta$ (1–3)[Fuc $\alpha$ (1–4)]GlcNAc-R)
Ly-CD52	Lymphozyten-CD52
mAk	monoklonaler Antikörper
MAA	Maackia Amurensis Agglutinin
MALDI/TOF-MS	matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
MMC	Metropolis Monte Carlo
Man	Mannose
m.u.	mass units
NeuAc	N-Acetylneuraminsäure
NMR	nuclear magnetic resonance
PARP	Procyclic Acid Repetitive Protein
PBS	phosphate buffered saline
PI-PLC	phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid (α-Toluolsulfonsäurefluorid)
RP	reversed phase
sLe <sup>X</sup>	Sialyl-Lewis <sup>X</sup> (NeuAc $\alpha$ (2-3)Gal $\beta$ (1–4)[Fuc $\alpha$ (1-3)]GlcNAc-R)
SAGA-1	Sperm Agglutinating Antigen 1
SB12	N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propan-sulfonat
SDS-PAGE	sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis
SNA	Sambucus Nigra Agglutinin
SP-CD52	Seminalplasma-CD52
TBS	Tris buffered saline
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
VIM2	$(NeuAc\alpha(2-3)Gal\beta(1-4)GlcNAc\beta(1-3)Gal\beta(1-4)[Fuc\alpha(1-3)]GlcNAc-R)$
Vol.	Volumeneinheit

# 1 Einleitung

### 1.1 CD52 - biologischer Hintergrund

Die Zelloberfläche besitzt in allen biologischen Systemen eine herausragende Bedeutung, weil sie Zell-Zell-Kontakte vermittelt, die eine Grundvorraussetzung für das Zusammenspiel der Zellen im lebenden Organismus sind. Klassische Beispiele für Zell-Zell-Kontakte sind die Embryogenese, die zellvermittelte Immunantwort und die Befruchtung. Defekte auf der Ebene dieser Wechselwirkungen führen zu Fehlbildungen, zur Entstehung von Krankheiten oder zur Unfruchtbarkeit. Ein Beispiel für eine schwere Krankheit, die als Folge von Defekten im Glycansyntheseweg auftritt, ist das *carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome* (CDGS; Marquardt et al., 1995).

Die für den Organismus so bedeutende Zelloberfläche wird von Proteinen gebildet, die zu über 90% glycosyliert sind (Gahmberg und Tolvanen, 1996). Diese umfangreichste posttranslationelle Modifikation ist sehr vielseitig und kann zur Ausbildung von informativen und funktionellen Strukturen oder dem Schutz der Zellmembran dienen, da die Glycosylierung eine große Bedeutung für die physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften des modifizierten Proteins besitzt.

Für die meisten Glycoproteine liegen keine eindeutigen Erkenntnisse über die Rolle der Kohlenhydratkomponente vor (Rudd und Dwek, 1997).

Es gibt aber Beispiele von Glycoproteinen, bei denen die Rolle der Glycankomponenten definiert wurde. Ein Beispiel ist das humane Glycodelin, bei dem je nach Geschlecht eine unterschiedliche N-Glycosylierung am ansonsten identischen Protein nachgewiesen wurde (Morris et al., 1996). Das Glycodelin A der Frau endometrialen Ursprungs kann die Bindung der Spermien an das Ei verhindern und besitzt immunsuppressive Fähigkeiten, so daß ein vorhandener Embryo vor Immunreaktionen des weiblichen Körpers geschützt wird. Die Seminalplasmaform des Moleküls beim Mann, das Glycodelin S, verfügt dagegen über keine dieser Eigenschaften, seine Funktion ist bislang unbekannt (Morris et al., 1996; Seppala et al., 1998).

Kohlenhydratstrukturen der Eihülle (Zona Pellucida) nehmen vermutlich als Bindungspartner an der Befruchtung teil (Clark et al., 1996; Benoff, 1997). Sialylierte, fucosylierte Lactosamine (Sialyl-Lewis<sup>X</sup> –Motiv) auf Leukozyten stellen Liganden dar für E-Selektinmoleküle auf Endothelzellen und vermitteln über die Erkennung von Kohlenhydrat-Strukturmotiven die Bindung an das Endothel der Blutgefäße.

Bislang sind nur in vereinzelten Fällen Zelloberflächenproteine vollständig, d.h. einschließlich aller posttranslationellen Modifikationen charakterisiert worden. Für die Lymphozytenoberflächenantigene CD59 (Rudd et al., 1997) und CD52 (Treumann et al., 1995) wurden solche Strukturanalysen durchgeführt. Die Spermienoberfläche und ihre sie bedeckende Zuckerschicht, die Glycocalyx, sind seit langem Gegenstand der reproduktionsmedizinischen Forschung. Ihre Bedeutung für die

Befruchtung der Eizelle wurde vielfach untersucht, aber bis heute nicht aufgeklärt (Yanagimachi, 1994). Im Rahmen dieser Dissertation wurde die erste vollständige Strukturanalyse eines humanen Spermienoberflächenproteins durchgeführt, welches gleichzeitig einen Hauptbestandteil der Glycocalyx darstellt.

Die Synthese des CD52-Antigens kann in ausschließlich zwei Geweben des Körpers nachgewiesen werden: in der Milz – dort findet man es auf der Oberfläche von Lymphozyten - sowie im Nebenhoden (Kirchhoff et al., 1993). Gegen das seit langem bekannte Oberflächenantigen der Lymphozyten (Ly-CD52) gibt es einen monoklonalen Antikörper (mAk), den sogenannten CAMPATH-1 Antikörper. Er wird zu therapeutischen Zwecken in der Klinik eingesetzt, unter anderem gegen einige Autoimmunkrankheiten und lymphozytische Leukämie, sowie zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen, da die Komplement-vermittelte Lysis von CD52-tragenden Zellen verursacht (Hale et al., 1983; James et al., 1999). Eine Strukturanalyse des Lymphozytenoberflächenantigens wurde von Xia et al. (1991; 1993) sowie von Treumann et al. (1995) durchgeführt, die eine extensive komplexe N-Glycosylierung sowie einen GPI-Anker an einem ungewöhnlich kurzen, nur aus 12 Aminosäuren bestehenden Peptid identifizieren konnten.

Im Rahmen eines differentiellen Screenings einer humanen Nebenhoden-cDNA Bibliothek wurde 1993 eine mRNA isoliert, die als HE5: humanes epididymales Nebenhodenprotein Nr. 5 bezeichnet wurde (Kirchhoff et al., 1993) und die sich als colinear mit der cDNA-Sequenz von Ly-CD52 herausstellte. Die mRNAs von HE5 und Ly-CD52 stammen vom gleichen Gen (Kirchhoff et al., 1993; Kirchhoff, 1996), welches auf Chromosom 1 lokalisiert werden konnte. Der CAMPATH-1 Antikörper erkennt beide CD52-Antigene. Mit seiner Hilfe wurde festgestellt, daß das HE5/CD52-Antigen während der Nebenhodenpassage vom Nebenhodenepithel auf die Spermienoberfläche übertragen wird. Abb. 1.1a zeigt eine halbschematische Zeichnung des humanen Hodens und Nebenhodens (*Epididymis*) mit zugehörigem Hoden. Testikuläre Spermien sind unter natürlichen Bedingungen weder motil noch befruchtungsfähig und müssen nach der Spermiogenese im Hoden (*Testis*) einen beim Mann ca. 5-6m langen Gang - den sogenannten *Ductus epididymidis* – durchwandern (vgl. Abb. 1.1b). Während dieser Nebenhodenpassage erfolgt eine Reifung der Spermienoberfläche: es werden unter anderem Sekretproteine ausgeschüttet, die mit den Spermien auf unterschiedliche Weise interagieren (Abb. 1.1c). Northernblot-Analysen sowie *in-situ*-Transkript-Hybridisierungen (Kirchhoff et al., 1993; Krull et al., 1993) belegten die post-testikuläre Herkunft von HE5/CD52.

Immunhistochemische Versuche, das Antigen mit dem CAMPATH-1-Antikörper im männlichen Genitaltrakt zu detektieren, zeigten ebenfalls, daß es nicht im Hoden, sondern erst in Epithelzellen des distalen Nebenhodenganges sowie in der entsprechenden luminalen Flüssigkeit nachzuweisen war als auch die reifen Spermien vollständig bedeckte (Hale et al., 1993; Kirchhoff, 1996; vgl. Abb. 1.1c). Das CD52-Antigen aus dem männlichen Genitaltrakt gelangte demzufolge nicht bei der Spermiogenese im Hoden, sondern erst nachträglich auf die Spermienoberfläche. Es wurde im

Gegensatz zum Lymphozyten-CD52 (Ly-CD52) als Spermien- oder Seminalplasma-CD52 (SP-CD52) bezeichnet. Daraufhin beschrieben Kirchhoff und Hale (1996) einen neuartigen Zell-Zell-Transfermechanismus von GPI-verankerten Molekülen. Sie vermuteten unter anderem, daß micellare Strukturen oder Vesikel vom Epithel abgeschilfert und in die Spermienoberfläche integriert werden könnten, was auch in ähnlicher Form von Rooney et al. (1996) beobachtet worden war. Abb. 1.1c zeigt schematisch drei der postulierten Transferprozesse.



Abb. 1.1: (a) Humaner Hoden mit Nebenhoden. Den Übergang vom Hoden zum Nebenhoden bilden mehrere Kanäle (Ia, *Ductuli efferentes*), die schließlich in einen Gang (Ib, *Ductus epididymidis*) münden. Zusammen stellen sie den *Caput*-Abschnitt des Nebenhodens dar. Der Nebenhodengang erscheint im weiteren Verlauf stark geknäuelt. Der mittlere Bereich des Nebenhodens wird als *Corpus*-Abschnitt (II) bezeichnet, gefolgt vom *Cauda*-Abschnitt (III). Daran schließt der *Ductus deferens* als Beginn des Samenleiters an. In (a) ist der *Corpus*-Bereich teilweise freigelegt und erlaubt so einen Blick auf den geknäulten Nebenhodengang. Exemplarisch ist ein Querschnitt im Bereich des *Corpus*-Abschnittes eingezeichnet. Dieser Querschnitt (b) zeigt vier Anschnitte des Nebenhodenganges. Die epitheliale Zellschicht, aus der unter anderem die Sekretion von SP-CD52 erfolgt, ist mit "Ep" bezeichnet, das Innere des Ganges (Lumen) mit "L", die Spermien mit "SP". Ein weiterer Ausschnitt im Bereich der epithelialen Zellwand (c) demonstriert die drei verschiedenen postulierten Transfermechanismen von GPI-verankerten Proteinen (Kirchhoff und Hale, 1996). Die GPI-verankerten Moleküle können entweder durch einen direkten Zell-Zell-Kontakt (1) von der epithelialen Zelloberfläche auf die Spermienoberfläche übertragen werden. Weiterhin ist eine Beteiligung von Transporterproteinen, die über spezifische Rezeptoren an die Zelloberfläche gebunden werden, möglich (2). Die Sekretion von micellaren Strukturen, die in die Plasmamembran des Spermiums integriert werden können, zeigt (3).



Abb. 1.2: Immunhistochemische Nachweise von SP-CD52, die mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des CAMPATH-1-mAk durchgeführt wurden. Rote Färbung zeigt SP-CD52 an. (a) Kryoschnitt aus dem *Corpus*-Abschnitt eines humanen Nebenhodens (Kirchhoff 1996). Die Buchstaben markieren Lumen (L) und epitheliale Zellschicht (Ep) des Nebenhodens. (b) Ejakulatausstrich (das Foto wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C. Osterhoff, IHF, Hamburg). Die Spermien (SP) sind vollständig von SP-CD52 bedeckt.

SP-CD52 ist erst im mittleren *Corpus*-Abschnitt des Nebenhodens immunhistochemisch detektierbar (vgl. Abb. 1.1a) und erreicht dort seine höchste Konzentration (vgl. Abb. 1.2a) (Kirchhoff, 1996; Yeung et al., 1997). Im untersten *Cauda*-Abschnitt werden die Spermien, die vollständig mit SP-CD52 bedeckt sind, für bevorstehende Ejakulationen gelagert. Das Auftreten des Antigens auf der Spermienoberfläche deckt sich mit dem Erwerb der Befruchtungsfähigkeit, gekennzeichnet durch progressive Vorwärtsbewegung und Bindungskapazität an die Eihülle.

Die post-testikuläre Reifung findet aber nicht alleine im Nebenhoden statt, sie verläuft kontinuierlich während der Ejakulation sowie im weiblichen Genital weiter. Diese als Kapazitation bezeichnete Umgestaltung der Membranstruktur im weiblichen Genitaltrakt (Visconti et al., 1998), bei der viele Oberflächenbestandteile abgegeben werden, bereitet das Spermium auf die Bindung der die Eizelle umgebenden Zona Pellucida vor. Diese Reaktion kann auch *in-vitro* nachgeahmt werden, indem die Spermien in einem entsprechenden Medium inkubiert werden. *In-vitro* Versuche mit intakten Spermien und anschließender immunhistochemischer Detektion des Antigens zeigten, daß SP-CD52 auch nach der Kapazitation auf der Spermienoberfläche verbleibt (Focarelli et al., 1998).

Das Rattenhomologe des CD52-Antigens wird auch als Hauptreifungsantigen der Spermienoberfläche bezeichnet (Zeheb und Orr, 1984; Moore et al., 1989; Kirchhoff, 1996). Es konnte erstmals durch eine Galactose-Oxidase/NaB(<sup>3</sup>H<sub>4</sub>)-Markierungsreaktion nachgewiesen werden (Olson und Hamilton, 1978; Hamilton et al., 1986; Moore, 1989). Auf diese Weise ließ sich zeigen, daß fast ausschließlich die Glycane dieses Antigens für eine Enzymreaktion zugänglich und auf diese Weise markierbar sind. Das CD52-Antigen muß also einen Hauptbestandteil der äußeren Spermienoberfläche der Ratte darstellen. Auch auf der reifen humanen Spermienoberfläche ist es stark vertreten (Abb. 1.2b) und hat somit großen Anteil an der Glycocalyx der Spermienoberfläche (Schröter et al., 1999).

Gegen das SP-CD52 existieren eine Reihe von monoklonalen Antikörpern. Im Rahmen der Dissertation wurde der CAMPATH-1-mAk verwendet, der sich gegen die ersten drei C-terminalen Aminosäuren des Peptids sowie gegen den GPI-Anker richtet, außerdem der 097-mAk, der an das Dodecapeptid bindet, der CF1D12-mAk, der hauptsächlich die N-Glycane von SP- und Ly-CD52 erkennt (Hale und Rebello, 1998), sowie der 2E5-mAk, dessen Epitop alleine durch die N-Glycane beider Antigene gebildet wird.

Darüber hinaus existieren zwei spezifisch gegen die N-Glycane des SP-CD52 gerichtete Antikörper, die aber die N-Glycane des Ly-CD52 nicht erkennen. Es handelt sich um den H6-3C4-mAk (Isojima, 1989a) sowie den S19-mAk (Diekmann et al., 1997). Beide besitzen Spermien-agglutinierende Eigenschaften. Der S19-mAk stammt aus einer Immunisierungsreaktion von Mäusen gegen Spermienhomogenate, der H6-3C4-mAk ist ein monoklonaler Heterohybridoma-Antikörper, der aus dem Blut einer Japanerin isoliert werden konnte. Die ansonsten gesunde Frau besaß einen hohen Titer von Anti-Sperm-Antikörpern und war unfruchtbar. Dieser biologische Hintergrund stellte die Analyse der N-Glycane von Seminalplasma-CD52 und den Vergleich ihrer Struktur mit der Struktur der N-Glycane von Lymphozyten in einen hochinteressanten Kontext.

## **1.2 Glycane**

Bei den Glycanen handelt es sich um die am weitesten verbreitete posttranskriptionelle Modifikation von extrazellulären Proteinen. Sie können einen erheblichen Anteil an der Molekülmasse ausmachen und sind durch eine extreme strukturelle Vielfalt charakterisiert. Im Unterschied zu dem in Bindung und Anzahl beschränkten Aminosäurealphabet können eine Vielzahl von Zuckermonomeren auf verschiedenste Arten glycosidisch verknüpft sein, was die Möglichkeiten für ein potentielles, aber bislang unverstandenes Alphabet einer Glyco-Kommunikation erheblich vergrößert.

In der Natur kommen zwei Typen von Glycanen vor: O-Glycane sind α-O-glycosidisch an die Hydroxylgruppe von verschiedenen Hydroxyaminosäuren - hauptsächlich Serin und Threonin neben 4-Hydroxyprolin und 5-Hydroxylysin - gebunden, sowie die N-Glycane, die β-N-glycosidisch mit dem Amidstickstoff einer Asparaginseitenkette des Proteins verknüpft sind (Rademacher et al., 1988). Da das humane CD52-Antigen ausschließlich über N-Glycane verfügt, soll hauptsächlich auf diese Art der Zuckerseitenketten eingegangen werden.

Ort der Biosynthese von N-Glycanen ist die Membran des rauhen Endoplasmatischen Retikulums (ER). Dort übertragen spezifische Glycosyltransferasen aktivierte Monosaccharide auf einen Dolicholphosphatträger, so daß eine Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Grundstruktur entsteht (Abeijon und Hirschberg, 1992). Diese Grundstruktur wird bei der Translokation einer nascierenden Peptidkette als Ganzes auf den Amidstickstoff der Seitenkette des Asparagins übertragen, das sich in einer spezifischen Akzeptorsequenz (Asn-X-Ser/Thr) befindet. X steht hierbei für alle in eukaryotischen Organismen vertretenen Aminosäuren mit Ausnahme des Prolins (Bause, 1983). Diese durch das Akzeptortriplett gebildeten potentiellen N-Glycosylierungsstellen werden nicht unbedingt alle besetzt, da die fortschreitende Faltung des neu synthetisierten Proteins eine sterische Hinderung ausüben kann (Bulleid et al., 1992).

Die Grundstruktur des N-Glycans wird bei seinem Transport durch das Lumen des ER sowie im Golgi-Apparat durch Abspaltung bzw. Hinzufügen von Monosacchariden weiter modifiziert. Es entstehen drei Haupttypen von N-Glycanen, die alle ein Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Pentasaccharid - den sogenannten *common core* - gemeinsam haben, sich aber anhand der Art der anhängenden Antennen unterscheiden.

Beim oligomannosidischen Typ (*high mannose-type*) werden die Antennen ausschließlich durch Mannosen gebildet, der komplexe Typ (*complex-type*) besitzt Lactosamin-Einheiten (-Galß(1-3/4)GlcNAc-) in den Antennen, der hybridartige Typ (*hybrid-type*) schließlich verfügt über beide Arten von Antennen (Rudd und Dwek, 1997). Die N-Glycane von CD52 sind komplexer Natur, deshalb wird dieser Typ im folgenden näher erläutert.

a)  $Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-2Man\alpha 1-6$   $Man\beta 1-4GlcNAc\beta 1-4 GlcNAc\beta 1-N$   $Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-2Man\alpha 1-3$ b)  $4 Fuc\alpha 1-3$   $3 Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-6$   $2 Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-3 Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-2Man\alpha 1-6$   $5 Fuc\alpha 1-6$   $Man\beta 1-4GlcNAc\beta 1-4 GlcNAc\beta 1-N$   $1 NeuAc\alpha 2-3 Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-2Man\alpha 1-3$   $Gal\beta 1-4GlcNAc\beta 1-4$ 

Abb. 1.3: Schematische Struktur von zwei komplexen N-Glycanen vom Typ II. (a) diantennäre Basisstruktur,
(b) triantennäre Basisstruktur (fett) mit terminaler Sialinsäure (1), zusätzlicher Lactosamin-Einheit (2), Lactosaminverzweigung (3) sowie peripherer (4) und proximaler (5) Fucosylierung.

Im Gegensatz zu oligomannosidischen Antennen weisen komplexe Antennen eine Vielzahl verschiedener Modifikationen auf. So können sie Derivate der Sialinsäuren tragen (meist terminal), phosphoryliert oder sulfatiert sein. Fucose kann proximal (am ersten GlcNAc der Chitobiose-Einheit) und zusätzlich peripher an den Antennen sitzen. Seltener treten zusätzliche Acylierungen der Galactose auf (GalNAc). Mehrere Lactosamin-Einheiten hintereinander bilden Polylactosaminketten. Die Lactosamin-Einheiten können wiederum auf zwei Arten verknüpft sein: entweder  $\beta(1-3)$ verknüpft, so daß die selteneren N-Glycane vom Typ I entstehen, oder  $\beta(1-4)$  verknüpft, was zu den häufigeren Typ II-N-Glycanen führt (Nimtz und Conradt, 1993). Daneben besteht die Möglichkeit, daß Galactosen verzweigt vorliegen und weitere Lactosamin-Einheiten an ihrer 6-Position tragen, so daß ein zusätzlicher Arm am N-Glycan entsteht (Leppänen 1997). Abb. 1.3a zeigt die komplexen diantennären N-Glycane vom Typ II, Abb. 1.3b ein Beispiel für ein komplexes triantennäres N-Glycan vom Typ II mit verzweigten, terminal sialylierten Lactosaminantennen und proximaler sowie peripherer Fucosylierung. Da die Glycosylierungen nicht unmittelbar unter genetischer Kontrolle stehen, kann in Abhängigkeit von Enzymausstattung und Substratverfügbarkeit der jeweiligen produzierenden Zelle ein spezies-, gewebe-, zell-, differenzierungs- und sogar polypeptidspezifisches Gemisch aus Glycosylierungsvarianten entstehen (Rudd und Dwek, 1997; Dr. H.S. Conradt, persönliche Mitteilungen), eine Erscheinung, die als Mikroheterogenität bezeichnet wird.

Derartige Modifikationen führen zur Bildung verschiedener Strukturmotive wie beispielsweise (Sialyl-)Lewis<sup>X</sup>-, VIM2- und (Sialyl-)i- sowie (Sialyl-)I-Motiven (Tsuji, 1995; Hounsell 1993). Abb. 1.4 zeigt einige für CD52 relevante Strukturmotive.

a) Fuc $\alpha$ 1-3	
+/-(NeuAcα2-3)Galβ1-4GlcNAc-	(Sialyl-)Lewis <sup>X</sup> - Antigen
<b>b</b> )	
+/-(NeuAcα2-3)Galβ1-3	
Fuca1-4GlcNAc-	(Sialyl-) Lewis <sup>A</sup> - Antigen
c) Fuc $\alpha$ 1-3	
NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-	VIM2 - Antigen
J)	
d)	
+/-(NeuAcα2-3)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-	(2-3Sialyl-) i - Antigen
<b>e</b> )	
+/-(NeuAcα2-3)Galβ1-4GlcNAcβ1-6	
+/-(NeuAcα2-3)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc-	(2-3Sialyl) I - Antigen

**Abb. 1.4:** Verschiedene Strukturmotive von komplexen N-Glycanen. (**a**) zeigt die Struktur des Lewis<sup>X</sup>-Motivs (ohne terminale Sialinsäure) bzw. des Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Motivs (mit terminaler  $\alpha(2-3)$ -gebundener Sialinsäure), das bei N-Glycanen vom Typ II auftritt; (**b**) zeigt das entsprechende (Sialyl-) Lewis<sup>A</sup> -Motiv, das bei N-Glycanen vom Typ I vorkommt; (**c**) zeigt die Struktur des VIM2-Motivs, bei dem die Fucosylierung am nächstinneren GlcNAc von Typ II-N-Glycanen hängt; (**d**) zeigt das (Sialyl-) i–Antigen, das bei polylactosaminhaltigen N-Glycanen vorkommt und (**e**) das an der Galactose durch Lactosamin-Einheiten verzweigte (Sialyl-) I-Antigen. (**d**) und (**e**) können sowohl  $\alpha(2-3)$ - als auch  $\alpha(2-6)$ -gebundene Sialinsäure tragen (Tsuji, 1995).

Die O-Glycosylierung von Proteinen verläuft nicht über eine gemeinsame Grundstruktur, sondern über einen sequentiellen Aufbau der Glycankette. Auf die Hydroxylgruppe einer Aminosäureseitenkette wird aktiviertes UDP-Galactosamin durch eine Polypeptid- $\alpha$ 1-O-GalNAc-Transferase übertragen. Die Kette kann durch spezifische Glycosyltransferasen weiter verlängert werden, wobei die resultierenden Strukturen Monosialo-, Disialo- sowie sechs weitere *core*-Strukturen beinhalten. Im Vergleich zur N-Glycosylierung sind die O-Glycosylierungen allerdings meist weniger komplex. Die häufigste O-Glycanstruktur von Serumproteinen stellt die sogenannte *mucin-type core*-Struktur dar, sie beinhaltet nur ein Tetrasaccharid [NeuAc $\alpha$ (2-3)Gal $\beta$ (1-3)(NeuAc $\alpha$  (2-6))GalNAc-Thr].

## 1.3 GPI-Anker

Membranproteine sind durch eine hydrophobe Transmembranregion oder durch einen Lipidrest in der Membran verankert. Neben der Glycosylierung stellen solche Lipidreste eine weitere posttranslationelle Modifikation dar, im Unterschied zur Transmembranregion, die aus Aminosäuren mit hydrophobem Charakter besteht.

In der Gruppe der Lipidanker bilden die sogenannten Glycosyl-Phosphatidylinositol-(GPI-) Anker eine große Familie. Lipidreste dieser Art können die Proteine im Zusammenhang mit der Fluidität der der Zellmembran verankern. jeweiligen Oberfläche variabel auf Eine Vielzahl von Zelloberflächenproteinen sind durch GPI-Anker an die Zelloberfläche gebunden. Diese Molekülstruktur wurde bei vielen eukaryotischen Organismen nachgewiesen, sowohl bei den Metazoen (Säuger, Fische, Hefen) als auch bei den entwicklungsgeschichtlich sehr alten Protozoen. Bei den zu den Protozoen gehörenden parasitischen Einzellern, den Trypanosomen, wurden GPI-Anker erstmals beschrieben (Ferguson et al., 1988). Solche glycosylierten Phosphatidylinositole stellen bei Trypanosomen die überwiegende Ankerform für Oberflächenproteine dar.

Gemeinsam ist allen GPI-Ankern das Strukturmotiv [Man $\alpha$ (1-4)GlcNAc $\alpha$ (1-6)myoInositol-PO<sub>4</sub>-Lipid]. Darüber hinaus lassen sie sich in zwei Gruppen unterteilen: die ausschließlich in Protozoen vorkommenden freien Glycoinositolphospholipide (GIPLs) und die Protein-Glycosylphosphatidylinositole, die sowohl bei Protozoen als auch bei Metazoen vorkommen (McConville und Ferguson, 1993). Da CD52 einen Protein-GPI-Anker besitzt, bei dem das Plasmamembranprotein mittels einer C-terminalen kovalenten Bindung an den Anker auf der Zelloberfläche exponiert wird, soll im folgenden nur auf diese Gruppe eingegangen werden.

Charakteristisch für die Protein-GPI-Anker, hier kurz als GPI-Anker bezeichnet, ist ein um zwei Mannosen vergrößertes Strukturmotiv: [R-EtP-Man $\alpha$ (1-2)Man $\alpha$ (1-6)-Man $\alpha$ (1-4)GlcNAc( $\alpha$ 1-6)-myoInositol-PO<sub>4</sub>-Lipid]. R steht dabei für das carboxyterminal über Ethanolaminphosphat (EtP) verbrückte Peptid. Während der Biosynthese von GPI-verankerten Proteinen wird im ER ein vorgefertigter GPI-Anker-Vorläufer an das Protein gehängt. Die mRNA GPI-verankerter Proteine enthält, neben einer N-terminalen Signalsequenz als Eintrittssignal für das Lumen des ER, eine C-terminale GPI-Anker-Signalsequenz. Diese wird nach der Translation vom Primärprodukt abgespalten und mittels einer Transamidierungsreaktion durch den GPI-Anker ersetzt (McConville und Ferguson, 1993). Die Struktur eines GPI-Ankers auf einer Zelloberfläche am Beispiel des CD52-Antigens von Lymphozyten zeigt Abb. 1.5. Die zugehörige Strukturformel ist in Abb. 1.6 dargestellt.



Abb. 1.5: Das CD52-Antigen von Lymphozyten. Schematische Struktur einer Form des Ly-CD52-Moleküls auf der Plasmamembran (nach Treumann et al., 1995). Das Dodecapeptid des Moleküls (grün) ist N-glycosyliert (hellblau) mit terminalen Sialinsäuren (rot) und trägt C-terminal einen GPI-Anker (Pentasaccharid: violett). Dieser hängt mit seinen Lipidresten (gelb und orange) in der oberen Lipidschicht (gelb) der Lymphozytenplasmamembran.



Abb. 1.6: Eine ausgewählte Molekülstruktur des Ly-CD52 mit schematischer N-Glycosylierung. Der Anker besitzt das konservierte Motiv [R-EtP-Man $\alpha$ (1-2)Man $\alpha$ (1-6)Man $\alpha$ (1-4)GlcNAc $\alpha$ (1-6)myoInositol-PO<sub>4</sub>-Lipid]. R = Dodecapeptid (grün) mit N-Glycan (hellblau), das terminale Sialinsäuren (rot) trägt. Das Pentasaccharid des GPI-Ankers ist violett gefärbt, in gelb ist das PO<sub>4</sub>-Lipid = sn2-Steaoryl-1-arachidonyl-glycerol-PO<sub>4</sub> dargestellt. Die C-terminale Bindung des Dodecapeptids an das Pentasaccharid erfolgt über Ethanolaminphosphat (EtP). Ans konservierte Motiv des GPI-Ankers ist eine weitere Mannose (violett) und ein Ethanolaminphosphat (pink) gebunden. 50% der Ly-CD52-Moleküle tragen eine Acylierung (Palmitinsäure) am Inositol (orange).

Am Mannoseteil eines GPI-Ankers können zusätzlich Galactose (Gal), N-Acetyl-Galactosamin (GalNAc), Mannose (Man) sowie terminal sialylierte Polylactosaminketten gebunden sein (Treumann et al., 1997). Auch die Lipidreste können variieren: bei Säugern und Fischen wurden bislang Alkylacyl- bzw. Diacylglycerole gefunden, während bei Hefen Ceramide überwiegen. Eine zusätzliche Acylierung (Palmitinsäure) am Inositol, die das Molekül resistent gegen die phosphatidylinositolspezifische Lipase PI-PLC (Roberts et al., 1989) macht, konnte sowohl bei Säugern als auch bei Protozoen nachgewiesen werden. Lyso-Strukturen, die nur eine Lipidgruppe am Glycerol tragen, sind bislang nur für parasitische Protozoen (*Trypanosoma brucei* und *Trypanosoma rhodensiense*) in der Literatur beschrieben worden (Ferguson et al., 1993; Treumann et al., 1997). Alle diese Modifikationen sind spezies-, gewebe- bzw. zellspezifisch (Richier et al., 1992) und bewirken ähnlich der N-Glycosylierung eine (allerdings geringere) Mikroheterogenität des GPI-Ankers. Alleine 7 Varianten konnten im Falle des Ly-CD52-Ankers nachgewiesen werden (Treumann et al., 1995).

Die Funktionen von GPI-Ankern sind vielfältig: so werden in der Literatur Beteiligungen von GPIverankerten Molekülen an Signaltransduktionsprozessen und intrazellulärem *targetting* sowie Potocytosevorgängen beschrieben (Illangumaran et al., 1996; McConville und Ferguson, 1993; Hoessli und Robinson, 1998). GPI-verankerte Moleküle wurden gehäuft in Membranmikrodomänen von Säugerzellen nachgewiesen (Brown, 1992; Cinek und Horejsi, 1992; Varma und Mayor, 1998). Außerdem kann die Anheftung eines GPI-Ankers ein Molekül an die apikale Zelloberfläche dirigieren (Lisanti et al., 1989). Die Verwendung eines GPI-Ankers anstelle einer Transmembranregion ermöglicht eine laterale Mobilität durch einen größeren Diffusionskoeffizienten des Antigens auf der Zelloberfläche, der aber kleiner als der von Lipiden ist (Kooyman et al., 1998). Weiterhin bietet ein Anker ohne Acylierung am Inositol eine potentielle Spaltstelle für PI-PLC.

Isolierte GPI-verankerte Moleküle können micellare Strukturen bilden und bei sogenannten *patching*-Prozessen nachträglich von Micellen auf Zelloberflächen bzw. von einer Zelle auf eine andere übertragen werden (Kooyman et al., 1998). Besonders bei Zellen ohne bzw. mit beschränkten Biosynthesefähigkeiten wie Erythrocyten und Spermien wurde ein solcher Transfer beobachtet, wie bereits für SP-CD52 beschrieben (Kirchhoff und Hale 1996; Yeung et al., 1997).

## **1.4 Analysemethoden**

Um der hohen strukturellen Komplexität des SP-CD52 gerecht zu werden, wurden unterschiedliche Methoden für die Strukturanalyse verwendet:

- die Western- und Lektinblot-Analyse im Anschluß an eine gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine (SDS-PAGE) ermöglichte Aussagen über die grobe Struktur von SP-CD52, da unterschiedliche posttranskriptionelle Modifikationen das Verhalten der Proteine im SDS-Gel beeinflussen: so war durch Westernblot-Analyse ein Vergleich von Ly-CD52 und SP-CD52 bzw. SP-CD52 aus unterschiedlichen Quellen möglich. Mittels verschiedener Antikörper konnten darüber hinaus Epitope bestimmt und das CD52-Antigen in einen biochemischen Zusammenhang mit anderen Untersuchungen gestellt werden. Die Lektinblot-Analysen ermöglichten vorab die spezifische Detektion von Kohlenhydraten der SP-CD52-N-Glycane.
- Die Aufreinigung des SP-CD52-Antigens wurde unter Verwendung von mehreren verschiedenen chromatografischen Methoden durchgeführt. Mittels einer Kombination aus Gelfiltrationschromatografie, *reversed phase-high pressure liquid chromatography* (RP-HPLC) und Affinitätschromatografie wurden die höchsten Ausbeuten erzielt.
- Für die Charakterisierung der N-Glycane wurde ein breites Methodenspektrum verwendet: Anionentauscherchromatografie, insbesondere *Dionex high pH anion exchange chromatography* (HPAEC), Methylierungsanalyse und *matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry* (MALDI/TOF-MS) erlaubten die Bestimmung der verschiedenen Glycoformen von SP-CD52. Eine weitere Untersuchung der N-Glycane war durch den Einsatz von N-Glycosidase F, verschiedenen Sialidasen sowie Endo-β-Galactosidase möglich.
- Der GPI-Anker konnte massenspektroskopisch analysiert werden: Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektroskopie (ESI-MS) und Elektrospray-Ionisierungs-Tandem-Massenspektroskopie (ESI-MS/MS) wurden für die Massenbestimmung und anschließendene Fragmentierung intakter sowie gespaltener GPI-Peptide verwendet. Durch Komponentenanalyse wurde nach Zerlegung des GPI-Peptids in seine Einzelteile das Komponentengemisch mittels GC-MS aufgetrennt und massenspektroskopisch detektiert.

Die Beschreibung der einzelnen Methoden erfolgt im jeweiligen Ergebnisteil.

# 2 Problemstellung

CD52 wird sowohl von Lymphozyten als Bestandteil des Immunsystems als auch vom Nebenhodenepithel als Bestandteil des Reproduktionsapparates synthetisiert und weist gewebespezifische Unterschiede in seinen posttranslationellen Modifikationen auf (Schröter et al., 1997). SP-CD52 zeigte bei der gelelektrophoretischen Auftrennung eine besonders große Anzahl von mikroheterogenen Banden, die aber keineswegs ein Zufallsprodukt, sondern ein reproduzierbares Muster darstellten. Die im folgenden beschriebene Strukturanalyse hatte zum Ziel, diese Mikroheterogenität unter Verwendung der beschriebenen Methoden zu analysieren. Die identifizierten Strukturen sollten daraufhin mit der bekannten Struktur des Lymphozyten-CD52 verglichen werden, um eventuelle strukturelle Unterschiede von CD52 aus dem Genitaltrakt und von Lymphozyten festzustellen.

Die ersten beiden Abschnitte der Arbeit behandeln *Westernblot*-Analysen sowie die Aufreinigung des SP-CD52.

Im zweiten Teil der Arbeit ist die Strukturanalyse beschrieben, die eine vollständige Charakterisierung sowohl der mikroheterogenen N-Glycane des SP-CD52 als auch der unterschiedlichen Strukturen des GPI-Ankers beinhaltet.

# **3 Methoden**

#### 3.1 Probenvorbereitung

#### **3.1.1** Folch-Extraktion

Zur Liquefikation wurden gefrorene Ejakulate 1h bei Raumtemperatur aufgetaut und die vereinigten flüssigen Ejakulate 5min bei 4°C und 2000g zentrifugiert. Das klare Seminalplasma wurde abgenommen, die pelletierten Spermien wurden mit dem zehnfachen Volumen von 150mM Natriumchloridlösung gewaschen. Für die Folch-Extraktion (Folch et al., 1957; Xia et al., 1991) wurde das Volumen des Seminalplasmas durch vier geteilt und ein Teil für die folgende Folch-Extraktion als eine Volumeneinheit (1 Vol.) betrachtet. Das Seminalplasma wurde mit Methanol und Chloroform im Verhältnis (4 Vol. : 11 Vol. : 5,4 Vol.) gemischt und 30min bei Raumtemperatur gerührt. Das Extraktionsgemisch wurde daraufhin 5min bei 2000g zentrifugiert und der Niederschlag verworfen. Zum klaren Überstand wurden 3,5 Vol. Wasser hinzugefügt und das Gemisch erneut 10min bei Raumtemperatur gerührt. Bis zum Auftreten der Phasentrennung wurde die Lösung bei 4°C inkubiert. Die obere hydrophile Phase wurde abgenommen, am Rotationsverdampfer eingeengt und lyophylisiert.

#### 3.1.2 Lymphozytenpräparation

Humane Lymphozyten wurden aus 400ml frischem Eigenblut nach der "Lymphopräp-Methode" (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland) isoliert. Das Blut wurde dazu im Verhältnis 1:1 mit einer Salzlösung (14,5mM 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol-Chlorid (Tris-Cl) pH 7,6, 5mM Calciumchlorid, 5mM Magnesiumchlorid, 14mM Natriumchlorid, 540µM Kaliumchlorid, 0,01% D-Glucose (w/v)) verdünnt. Je 12,5ml Ficoll-Paque-Lösung (Amersham Pharmacia, s.o.) wurden im durchsichtigen Plastikgefäß (50ml, Sarstedt GmbH, Nümbrecht, Deutschland) mit 16ml verdünnter Blutlösung überschichtet und 35min bei Raumtemperatur mit 400g zentrifugiert. Die Lymphozyten, die sich bei der Zentrifugation an der Phasengrenze sammelten, wurden nach Abnahme des darüberliegenden Plasmas vorsichtig abpipettiert. Die vereinigten lymphozytenhaltigen Lösungen wurden mit der Salzlösung auf ihr zehnfaches Volumen verdünnt und im Anschluß daran durch erneute Zentrifugation pelletiert. Die Folch-Extraktion erfolgte analog (vgl. Abschnitt 3.1.1), wobei das Volumen des Lymphozytenpellets als eine Volumeneinheit betrachtet wurde. Die pelletierten Lymphozyten wurden 1:4 mit Wasser verdünnt und das Gemisch für die

Folch-Extraktion verwendet. Vor dem Auftragen aufs Gel wurden die Extrakte unter Einsatz von Dialyseschläuchen mit 1 kD Ausschlußvolumen gegen Wasser dialysiert (Spectrapore, Serva Feinbiochemika GmbH&Co. KG, Heidelberg, Deutschland).

#### 3.1.3 Kapazitation der Spermien

Humanes Ejakulat wurde von einem gesunden Spender zur Verfügung gestellt und 1h bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Verflüssigung zu gewährleisten. Das Ejakulat (3,3ml) wurde gesplittet, eine Hälfte wurde als Kontrolle verwendet und nicht weiter zentrifugiert. Die andere Hälfte wurde in Sarstedttubes (50ml, Sarstedt GmbH, s.o.) vorsichtig auf eine zweischichtige Lösung aus 2ml 90% iger Percollösung (v/v; Percoll: Amersham Pharmacia, s.o.) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; 137mM Natriumchlorid, 2,7mM Kaliumchlorid, 13mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,7mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,6) (unten) und 2ml 47,5% iger Percollösung (oben, v/v) in PBS pipettiert. Die Spermien wurden durch 30minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 600g vom Seminalplasma abgetrennt, sie sammelten sich in der Interphase und als Pellet. Beide Phasen wurden vorsichtig abgesogen und vereinigt. Diese Lösung wurde auf das vierfache Volumen mit PBS aufgefüllt und die Spermien 10min bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Anzahl der Spermien durch Zählung unter dem Lichtmikroskop in einer Zählkammer (nach Neuhauser, Fa. Brandt, Deutschland) bestimmt. Die über den Percollgradienten gereinigten Spermien wurden in 12ml Universal-IVF-Medium (Fa. Medicult/Gück, Berlin, Deutschland) aufgenommen und zusammen mit der Ejakulatkontrolle 6h bei 37°C/ 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die kapazitierten Spermien 20min bei 600g pelletiert, mit 7ml PBS gewaschen und wieder pelletiert. Die Ejakulatkontrolle wurde genauso wie vorher die kapazitierte Probe über den Percollgradienten gereinigt und mit PBS gewaschen. Die Spermienanzahl in beiden Proben wurde erneut bestimmt und anschließend beide Proben Folch-extrahiert. Für die *Westernblot*-Analyse wurden Folch-Extraktmengen, die gleichen Spermienzahlen entsprachen, elektrophoretisch im Gel aufgetrennt.

### 3.2 Blotting-Methoden

#### 3.2.1 Gelelektrophorese und Semi-dry-Transfer

Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurden die Proben in Ladepuffer (100mM Dithiothreit, 50mM Tris·Cl pH 6,8 inkl. 2% *Sodium*dodecylsulfat (SDS), 10% Glycerol, 0,1% Bromphenolblau

(alles w/v)) aufgenommen, so daß ein Endvolumen von 15µl vorhanden war. Die Proben wurden 5min bei 95°C inkubiert und direkt auf das Gel geladen. Im Anschluß an die gelelektrophoretische Auftrennung bei 80V nach der Methode von Laemmli (1970) mit 15% Acrylamidgelen in einer Minigelapparatur (Fa. Phase, Lübeck, Deutschland) wurden die Folch-Extrakte mittels der *Semi-dry*-Methode auf PVDF-Membran (Immobilon-Folie, Fa. Millipore, Molsheim, Frankreich) transferiert. Hierzu wurde das Proteingel auf ein gleichgroßes Stück der Membran gelegt und auf beiden Seiten je vier gleichgroße Stücke Whatmanpapiers (Fa. Whatman International, Ltd., Maidstone, England), die in Transferpuffer (48mM Tris, 39mM Glycin, 20% Methanol (v/v) und 0,037% SDS (w/v)) getränkt waren, positioniert. Das Päckchen wurde entsprechend der Stromrichtung in eine *Semi-dry-Blotting*apparatur (Phase) gelegt und mit einem Strom von 2mA/cm<sup>2</sup> elektrophoretisch auf die Membran transferiert.

#### **3.2.2 Herstellung der** *Dotblots*

Zur Herstellung der *Dotblots* wurden je 1-2µl der in Wasser gelösten Extrakte auf einen methanolgetränkten Streifen PVDF-Membran (Fa. Millipore, s.o.), der mit einem gleichgroßen Stück Whatmanpapier unterlegt war, aufgespottet. Die Membran wurde getrocknet und in Methanol reaktiviert, bevor sie wie die *Westernblots* weiterverwendet werden konnte.

#### 3.2.3 Immunodetektion von Westernblots und Dotblots

Die Membran wurde zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen bei 4°C über Nacht in Trisgepufferter Salzlösung (TBS; 137mM Natriumchlorid, 20mM Tris·Cl pH 7,6) inkubiert, die 1% Blockierungsreagenz (w/v) (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) enthielt. Es wurde 10min bei Raumtemperatur mit TBS inkl. 0,005% Tween 20 (v/v) (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gewaschen, die Detektion erfolgte durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit spezifischen monoklonalen Antikörpern: dem 097-mAk aus Maus (Dr. A. Bernard, Marseille, Frankreich; ascites fluid 1:2000 verdünnt in TBS inkl. 0.1% Blockierungsreagenz (w/v)), dem CF1D12-mAk aus Maus (Dr. M. Hadam, Hannover; Hybridomaüberstand 1:500), dem 2E5-mAk aus Maus (Prof. S. Isojima, Nishinomiya, Japan; Hybridomaüberstand 1:500) und dem CAMPATH-1GmAk aus Ratte (Dr. G. Hale, Oxford, England; gereinigt, 1,6 µg/ml). Die Blots wurden dreimal je 5min mit TBS 0,005% Tween 20 gewaschen die Erstantikörper inkl. und mittels peroxidasegekuppelter Ziege-anti-Maus- oder Ziege-anti-Ratte-Antikörper (Fa. Sigma, s.o.; je 0.4µg/ml) durch Inkubation für 30min bei Raumtemperatur detektiert. Es wurde dreimal je 5min mit

TBS inkl. 0.005% Tween 20 (v/v) gewaschen. Die Entwicklung der *Blots* erfolgte unter Einsatz von zehnfach mit Wasser verdünntem Super Signal Substrat (Fa. Pierce, Rockford, USA) nach den Angaben des Herstellers. Als Filmmaterial wurden dabei Röntgenfilme verwendet (Kodak X-Omat AR-5, Fa. Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA).

#### 3.2.4 Lektindetektion der Proteine

Um die Glycosylierung zu detektieren, wurden die Membranen mit den *geblotteten* Glycoproteinen entsprechend der *Westernblot*-Analyse abgesättigt und gewaschen. Die Detektion erfolgte zuerst mit biotinylierten Lektinen, die in Lektinpuffer (TBS inkl. 0.005% Tween 20 (v/v), 0,1% Blockierungsreagenz (w/v), vgl. Abschnitt 3.2.3 und je 10mM Calciumchlorid, Magnesiumchlorid sowie Manganchlorid) verdünnt worden waren (SNA aus *Sambucus nigra* und MAA aus *Maackia amurensis*; 0,5µg/ml bzw. 0,67µg/ml, Oxford GlycoSystems, Ltd., Oxford, England). Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Membranen dreimal je 10min mit TBS inkl. 0.005% Tween 20 gewaschen. Die Lektine wurden im Anschluß mit einer Lösung aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase inkubiert (Strept-AB Komplex entsprechend den Angaben des Herstellers hergestellt und 1:200 verdünnt, Fa. DAKO, Hamburg, Deutschland). Der Nachweis erfolgte analog zur Immunodetektion mittels Chemilumineszenz und der Belichtung von Röntgenfilmen.

## 3.3 Enzymatische Spaltungen des SP-CD52

#### 3.3.1 N-Glycosidase F-Verdau

Für den analytischen Verdau wurden 50µl der Proteinlösung unmittelbar vor dem Verdau 3min in 0,1M Mercaptoethanol und 0,5% SDS (w/v) auf 95°C erhitzt. Diese Lösung wurde daraufhin zum vorgemischten Inhibitorcocktail (130µl) pipettiert, so daß die Endkonzentrationen des Inhibitorcocktails 200mM Natriumphosphat pH 8,3, 500µM Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA), 290µM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), je 5µg/µl Pepstatin, Antipain und Leupeptin, sowie 1% Tergitol NP40 (v/v, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 10mM 1,10-Phenantrolin betrugen. Es wurden 0,9U N-Gykosidase F (*Flavobacterium meningosepticum*, rekombinant aus *E.Coli*, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) zugesetzt und der Verdau 2h bei 37°C inkubiert (Xia et al., 1991). Zur Kontrolle wurde Proteinlösung unter den gleichen Bedingungen ohne Enzym mitinkubiert. Für den präparativen Verdau wurden 45nmol SP-CD52 in 500µl einer Lösung aus 50mM Natriumphosphat pH 7,8, 10mM EDTA und 0,2% Natriumazid (w/v) aufgenommen. 6U N-Glycosidase F (*Flavobacterium meningosepticum*, rekombinant aus *E.coli*, Boehringer Mannheim GmbH, s.o.) wurden zupipettiert und die Lösung bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch *Westernblot*-Analysen überprüft.

#### 3.3.2 Sialidase-Verdau der Proteinlösung

Die Proteinlösung wurde in einem Volumen von 15µl in 100mM Mercaptoethanol und 0,5% SDS (w/v) 3min auf 95°C erhitzt. Diese Lösung wurde zum vorgemischten Inhibitorcocktail (36µl) pipettiert, so daß die Reaktionslösung eine Endkonzentration von 100mM Natriumacetat pH 5,6, 10mM Calciumchlorid, 500µM EDTA, 290µM PMSF, 5µg/µl Pepstatin und 1% Tergitol NP40 (v/v) aufwies. Nach der Zugabe von 50mU Sialidase (aus *Arthrobacter ureafaciens*, Boehringer Mannheim GmbH, s.o.) wurde die Lösung bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### 3.3.3 Phospholipase C-Verdau und Triton X-114-Phasentrennung

Die Folch-extrahierten und *reversed phase* (RP)-HPLC getrennten Seminalplasmaextrakte wurden gesplittet und je zur Hälfte in 50µl einer Lösung aus 20mM Tris·Cl pH 7,4 inkl. 0,1% Natriumdeoxycholat (w/v), 500µM EDTA, 5µg/µl Pepstatin und 200µmM PMSF gelöst. Eine Hälfte wurde mit 8U Phospholipase C (aus *Bacillus cereus*, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) versetzt und 3h bei Raumtemperatur inkubiert, während die andere Hälfte zur Kontrolle im gleichen Puffer ohne Zugabe von Enzym inkubiert wurde.

Triton X-114 wurde zuvor durch Präkondensation mit butyliertem Hydroxytoluol nach Hooper (1992) gereinigt und diese Detergenzlösung für die Phasentrennungsreaktion verwendet. Die Phospholipase C -verdauten Proben und die nicht verdauten Kontrollen wurden mit je 150µl 10mM Tris·Cl pH 7,4 inkl. 150mM Natriumchlorid sowie 1% Triton X-114 (v/v, Fa. Sigma, s.o.) verdünnt und 5min auf Eis inkubiert (Hooper, 1992). Die Lösungen wurden im Eppendorfgefäß (1,5ml, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vorsichtig auf eine Lösung aus 10mM Tris·Cl pH 7,4, 150mM Natriumchlorid pH 7,4 inkl. 6% Sucrose (w/v) und 0.06% Triton X-114 (v/v) geschichtet. Nachdem die Proben 30min bei 30°C inkubiert worden waren, wurden sie 3min bei 3000g zentrifugiert. Die oberste Phase wurde abgenommen und nochmals mit Triton X-114 versetzt, so daß eine Endkonzentration von 0,5% Triton (v/v) vorlag. Nach 5min Inkubation auf Eis wurde diese Lösung auf dieselbe Sucroselösung geschichtet und nochmals 30min bei 30°C inkubiert, gefolgt von einer

dreiminütigen Zentrifugation bei 3000g. 150µl der oberen Phase wurden abgenommen, sie bildeten die hydrophile Phase. Die Sucroselösung wurde abpipettiert und die darunter entstandene unterste Schicht mit einer Lösung aus 10mM Tris·Cl pH 7,4 und 150mM Natriumchlorid auf 150µl aufgefüllt. Sie bildete die hydrophobe Phase. Alle Phasen wurden an der Vakuumzentrifuge getrocknet und im gleichem Volumen Wasser aufgenommen. Die Analyse der Proben erfolgte mittels der *Dotblot*-Methode.

## 3.4 Aufreinigung des SP-CD52

#### 3.4.1 Silanisierung von Glasgefäßen

Zur Silanisierung der Glasgefäße wurde eine 1%ige Lösung (v/v) von Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (Fa. FLUKA, Seelze, Deutschland) in Methanol (100ml) frisch angesetzt. Nach Zugabe von zwei Tropfen Essigsäure wurden die zu silanisierenden Gefäße mit der Lösung ausgespült und bei 150°C über Nacht erhitzt.

#### 3.4.2 Gelfiltrationschromatografie

Die lyophylisierten Folch-Extrakte wurden in einer gerade ausreichenden Menge Wasser gelöst und 5min bei 40°C inkubiert. Unmittelbar vor dem Beladen einer Superose 12 Gelfiltrationssäule (37x1cm, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland, Ausschlußgröße: ~2000 kD) wurde 5min bei Raumtemperatur bei 14500g zentrifugiert. Die gelchromatografischen Trennungen wurden unter Verwendung von PBS pH 7,6 an einer FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Die SP-CD52 enthaltenden Micellen eluierten im Ausschlußvolumen, die Beladungskapazität der Säule entsprach ca. 7ml Seminalplasma bzw. 0,7ml Seminalplasmaextrakt. Die präparativen Trennungen wurden mit einer selbstgegossenen 90x2,5cm Säule aus Sephadex G50 *superfine-* Gelchromatografiematerial (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, s.o., Ausschlußgröße: >30 kD) durchgeführt, deren Beladungskapazität ca. 80ml Seminalplasma bzw. 8ml Seminalplasmaextrakt entsprach. Als Elutionspuffer wurde eine 120mM Ammoniumcarbonatlösung pH 8,0 eingesetzt und der Verlauf der Chromatografie durch Messung der Absorption der Probe bei 280nm und 220nm verfolgt. Die Fraktionen dieser wie auch aller weiteren Chromatografien wurden durch *Dotblots* auf ihren SP-CD52-Gehalt überprüft. Im Anschluß wurden die vereinigten CD52-enthaltenden Fraktionen lyophylisiert.

# 3.4.3 *Reversed phase*-HPLC im Rahmen der rein chromatografischen Auftrennung

Die chromatografischen Aufreinigungsschritte wurden mit einem *high pressure liquid chromatography* (HPLC)-System der Firma Beckmann (München, Deutschland) durchgeführt. Die erste RP-Trennung im Rahmen der chromatografischen Aufreinigung wurde an einer semipräparativen *reversed phase* (RP)-C8-Säule (20x1cm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Die Säule wurde bei einem Fluß von 2ml/min mit einem Gradienten unter Verwendung von 100mM Ammoniumacetatlösung pH 5,5 inkl. 5% 1-Propanol (Laufmittel A) sowie 60% 1-Propanol (Laufmittel B, beides v/v) betrieben. Der Gradient lief 2min isokratisch auf 100% A, stieg dann in 40min auf 100% B und lief 10min isokratisch auf 100% B. Die Messung der Absorption erfolgte bei 220nm.

Die zweite RP-Trennung im Rahmen der chromatografischen Aufreinigung wurde mit einer semipräparativen RP-C3-Säule (20x1cm, Fa. Macherey-Nagel, s.o.) durchgeführt. Die Flußrate betrug 2ml/min, als Laufmittel A wurde eine Lösung aus 20mM Ammoniumcarbonat pH 8,0 inkl. 20% Methanol (v/v) verwendet, Laufmittel B war eine Lösung aus 20mM Ammoniumcarbonat pH 8,0 inkl. 60% Methanol und 3% Chloroform (jeweils v/v). Der Gradient lief 5min isokratisch auf 100% A, stieg dann in 20min auf 100% B und lief 15min isokratisch auf 100% B. Die Absorption wurde bei 280nm verfolgt.

#### 3.4.4 Kationentauscherchromatografie

Für die Kationentauscherchromatografie wurde eine analytische *sulfonic acid* (SA)-Säule (25x0,4cm, F. Macherey Nagel, s.o.) verwendet. Laufmittel A war eine Lösung aus 20mM Natriumphosphat pH 6,0 inkl. 48% Methanol und 3% Chloroform (beides v/v), die Elution erfolgte mit dem gleichen Puffer, der zusätzlich 1M Natriumchlorid enthielt (Laufmittel B). Der Gradient lief 6min isokratisch auf 100% A, stieg in 17min auf 100% B und lief 12min isokratisch auf 100% B. Die Absorption wurde bei 280nm gemessen.

#### 3.4.5 Herstellung der Affinitätssäulen

Als Trägermaterial wurde epoxy-aktivierte Sepharose 6B (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland) eingesetzt, an die 110mg CAMPATH-1G-mAk pro Gramm Trägermaterial gekoppelt wurden (insgesamt 300mg mAk). Für die Kopplung wurden 10g aktivierte Sepharose in 200ml Wasser aufgenommen und durch einen Glasfilter ca. eine Stunde mit insgesamt 21 Wasser gewaschen. Das Kopplungsmaterial wurde dann in 100ml Kopplungspuffer (100mM Ammoniumcarbonatlösung pH 9,5) aufgenommen und in ein verschließbares Glasgefäß überführt. 27ml der Antikörperlösung (4mg/ml in PBS pH 7,6) wurden zu der Kopplungslösung pipettiert und das Reaktionsgemisch 4h bei 40°C im Wasserbad vorsichtig geschüttelt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Sepharosemedium auf acht kleine Plastiksäulen (Bakerbond SPE Colums Nr. 7121-03, Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland) verteilt und der Durchlauf aufgefangen. Das Trägermaterial wurde wieder ins Reaktionsglas überführt und die nichtgekoppelten Epoxygruppen durch Inkubation mit 70ml 1M Ethanolaminlösung pH 8,0 für 17h bei 40°C abgesättigt. Das Trägermaterial wurde in die acht Säulen pipettiert und mit je 15ml 100mM Natriumacetatlösung pH 5,9 inkl. 500mM Natriumchlorid und 7ml 100mM Tris Cl pH 8,0 inkl. 500mM Natriumchlorid gewaschen. Die Kopplungseffizienz wurde durch Messung der Proteinkonzentration nach der Kopplungsreaktion bestimmt und betrug ca. 70%.

#### 3.4.6 Messung des Proteingehalts

800µl der proteinhaltigen Lösung wurden mit 200µl BioRAD-Protein-Assay-Reagenz (Kat. -Nr. 500-0006, Fa. BioRad, München, Deutschland) gemischt, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595nm bestimmt. Die Nullwerte waren vorher auf den jeweiligen Puffer abgegeglichen worden. Die erhaltenen Werte wurden mit einer Eichgeraden (linearer Bereich: 2-50µg/ml) verglichen, die mit Eichlösungen aus  $\beta/\gamma$ -Rinderglobulin (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) erstellt worden war.

#### 3.4.7 Durchführung der Affinitätschromatografie

Nach Equilibrieren der Affinitätssäulen (je ca. 2 ml Säulenvolumen) mit je 9ml Puffer A (100mM Tris·Cl pH 8,0 inkl. 1% Zwittergent SB12 (w/v, Sigma, s.o.)) wurde das Sepharose-Medium mit Puffer A in ein Plastikgefäß (50ml) gespült. Das Endvolumen betrug ca. 25ml. Gelfiltrierter, lyophylisierter Folch-Extrakt (entsprechend 165ml Seminalplasma) wurde in 30ml Puffer A gelöst und 10min bei 42°C inkubiert. Die antigenhaltige Lösung wurde zum Sepharosemedium pipettiert und das Gefäß 2h bei Raumtemperatur auf einer Wiege inkubiert. Das antigenbeladene Sepharosemedium wurde auf zehn Säulen verteilt und zweimal mit je 2,5ml Puffer A und zweimal mit Puffer A inkl. 500mM Natriumchlorid gewaschen. Der Durchlauf ebenso wie die folgenden Waschschritte wurde aufgefangen. Jede Säule wurde mit 9ml 50mM Diethylamin pH 11,5 inkl. 1% SB12 (Puffer B) eluiert.

Die Eluate wurden in 2ml Schritten in Gefäßen aufgefangen, in die je 90µl 3M Natriumacetat pH 4,0 vorgelegt worden war. Durchlauf und Waschschritte wurden an der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingeengt und auf SP-CD52 durch *Dotblots* überprüft, gegebenenfalls wurde die Affinitätschromatografie wiederholt.

#### 3.4.8 Dialyse

Die Eluate wurden vereinigt und in je 15cm langen und 2,5cm breiten Dialyseschläuchen (Spectra/Por, Ausschlußgrenze 1 kD, Serva Feinbiochemika GmbH&Co. KG, Heidelberg, Deutschland) in dreimal je 51 Wasser über 36h bei 4°C dialysiert. Für die Aufreinigungsschritte wurden die Dialyseschläuche mehrfach verwendet.

# 3.4.9 *Reversed phase*-HPLC im Rahmen der affinitätschromatografischen Auftrennung

Die im Anschluß an die Affinitätschromatografie durchgeführte RP-Trennung wurde mit einer analytischen RP-C8-Säule (12,5x0,4cm, LiChroCART, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,5ml/min durchgeführt. Laufmittel A: 100mM Ammoniumcarbonat pH 8,0, 5% Methanol (v/v), Laufmittel B: 60% Methanol, 3% CHCl<sub>3</sub> (beides v/v). Der Gradient lief 2min isokratisch auf 100% A, stieg in 40min auf 100% B und lief dann 10min isokratisch auf 100% B. Die Trennung wurde durch Messung der Absorption bei 280nm verfolgt.

## 3.5 Probenvorbereitung für die Strukturanalyse

#### 3.5.1 Sequenzierung der Proteine

Die automatisierte N-terminale Aminosäuresequenzierung wurde von der Service-Abteilung der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) unter Verwendung eines Procise<sup>TM</sup> Apparates (Fa. Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) durchgeführt.

#### 3.5.2 Spaltung des SP-CD52 in N-Glycane und GPI-Peptid

Das Reaktionsgemisch der N-Glycosidase F -Spaltung wurde auf eine Konzentration von 100mM Ammoniumacetat pH 5,5 inkl. 5% 1-Propanol (v/v) gebracht, 5min bei 37°C inkubiert und 5min bei Raumtemperatur mit 14500g zentrifugiert. Die Auftrennung erfolgte auf einer analytischen C8-RP-Säule (12,5x0,4cm, LiChroCART, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Flußrate betrug 0,5ml/min, der Gradient lief 5min isokratisch mit Laufmittel A (100mM Ammoniumacetat pH 5,5 inkl. 5% 1-Propanol (v/v)) und stieg innerhalb von 40min auf 100% B an (80% 1-Propanol (v/v)). Die Absorption wurde bei 220nm ermittelt. Reinheit und Konzentration der GPI-Peptide wurde durch N-terminale Aminosäuresequenzierung bestimmt.

## 3.6 Analyse der N-Glycane von SP-CD52

#### 3.6.1 Entsalzung der Glycane

Die isolierten N-glycanhaltigen Fraktionen wurden über eine Sephadex G25 *superfine fast desalting* Säule (10x1cm, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland) an einer FPLC-Anlage derselben Firma entsalzt. Die Fraktionen wurden in je 800µl Wasser aufgenommen, eingespritzt und bei einer Flußrate von 1ml/min mit Wasser eluiert, wobei die Messung der Absorption bei 206nm erfolgte. Die Fraktionen Nr.5-15 (0,4ml-Fraktionen) wurden vereinigt und an der Vakuumzentrifuge getrocknet.

#### 3.6.2 MonoQ-Anionenaustauschchromatografie

Die entsalzten, getrockneten N-Glycane wurden in je 500µl Wasser aufgenommen und auf einer MonoQ-Säule (5x0,5cm, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, s.o.) in die einzelnen Ladungsgruppen getrennt. Bei einer Flußrate von 1ml/min lief der Gradient 5min isokratisch mit 100% Laufmittel A (Wasser), stieg in 15min auf 20% Laufmittel B (500mM Natriumchloridlösung), in 10min auf 30% B und darauf in 1min auf 100% B. Der Gradient lief 5min isokratisch auf 100% B, die photometrische Detektion erfolgte bei 206nm. Die eluierten *Peaks* wurden vereinigt und einzeln entsalzt. Jeder entsalzte *Pool* wurde an der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 500µl Wasser aufgenommen.

#### **3.6.3 Dionex HPAEC-PAD der N-Glycane**

Die Analyse der N-Glycane wurde entsprechend der Methode von Grabenhorst et al. (1998) durchgeführt. Das verwendete Gerät war ein Dionex Bio LC System (Fa. Dionex, Sunnyvale, CA, USA), ausgestattet mit einer CarboPac PA1 Säule (0,4x25cm) in Kombination mit einem gepulsten amperometrischen Detektor (PAD). Die untersuchten N-Glycane (0,1-2nmol) waren vor der HPAEC-PAD-Analyse durch einstündige Inkubation in 100µl 0,2%iger Trifluoressigsäurelösung (w/v) bei 85°C chemisch desialyliert und mit 12,5% Ammoniumhydroxidlösung neutralisiert worden. Alternativ erfolgte die Abspaltung der Sialinsäuren in einer Lösung aus 10mM Natriumacetat, 1mM Calciumchlorid und 0,02% Natriumazid für 2h bei 37°C unter Zugabe von 0,2U/ml Sialidase (aus Vibrio Chloerae, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland). Zur analytischen Trennung wurden 0,1-2nmol der entsalzten, desialylierten N-Glycane in 35µl Wasser gelöst und in eine equilibrierte Säule injiziert. Laufmittel A war 200mM Natronlauge, Laufmittel B war 200mM Natronlauge inkl. 600mM Natriumacetat. Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 1ml/min, der verwendete Gradient lief 5min isokratisch auf 100% A, stieg dann innerhalb von 30min auf 20%B, daraufhin linear innerhalb von 10min auf 30% B und schließlich innerhalb von 2min auf 100% B. Die gepulste amperometrische Detektion wurde mit den folgenden Spannungen und Intervallen durchgeführt:  $E_1 = +50mV$ ,  $T_1 = 480ms$ ;  $E_2 = +500mV$ ,  $T_2 = 120ms$ ;  $E_3 = -500mV$ ,  $T_3 = 60ms$ .

#### 3.6.4 Permethylierungsreaktion

Nach einer Vorschrift von Hakomori (1964) wurden ca. 10% der getrockneten N-Glycane in 200µl frisch bereiteter 1% iger Ammoniaklösung inkl. 0,1% Natriumborhydrid (w/v) aufgenommen und 5h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50µl Essigsäure beendet und die Probe über Nacht im Exsikkator über Calciumchlorid/Kaliumhydroxid getrocknet. Die entstandene Borsäure wurde durch fünffaches Abblasen von 1% iger methanolischer Essigsäure entfernt und die Probe vollständig unter Stickstoff getrocknet. Die getrocknete Pobe wurde daraufhin in 400µl Dimethylsulfoxid aufgenommen und 1h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluß wurde unter Stickstoff 100µl Methylsulfinylreagenz (6,7g Natriumhydrid in 100ml Dimethylsulfoxid, vgl. Hakomori, 1964) zugegeben und 2h bei Raumtemperatur und schließlich 20min bei 50°C weitergerührt. Nach Abblasen von überschüssigem Methyliodid im Stickstoffstrom wurde die restliche Lösung in 5ml Wasser aufgenommen und die Mischung fünfmal mit je 500µl Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 200µl Wasser zurückgewaschen und das Chloroform im Stickstoffstrom abgeblasen. Die getrocknete Probe wurde in 150µl Ethylacetat aufgenommen und auf einer 0,6cm dicken, 20cm langen Sephadex LH20- (Amersham Pharmacia

Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland) Säule mit Ethylacetat als Laufmittel chromatografiert und so von niedermolekularen Verunreinigungen getrennt. Die Elution der Proben konnte durch Tüpfeln auf Kieselgel-Dünnschichtchromatografie-Platten und Besprühen mit Resorcinolreagenz (90% Ethanol, 10% Schwefelsäure, 0,1% Resorcin) gefolgt von kurzer Erwärmung auf 100°C nachgewiesen werden. Die zuckerhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und unter Stickstoff getrocknet. Die permethylierten N-Glycane wurden mit MALDI/TOF-MS vermessen oder im Rahmen der Methylierungsanalyse weiter derivatisiert.

#### 3.6.5 MALDI/TOF-MS

Die N-Glycane wurden reduziert, permethyliert und extrahiert wie beschrieben (vgl. Abschnitt 3.6.4). Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte mittels MALDI/TOF- Massenspektroskopie unter Verwendung eines Bruker REFLEX *time of flight* (TOF) Gerätes, ausgestattet mit einem N<sub>2</sub>-Laser (337nm) mit einer Pulsfrequenz von 3ns und 107-108W/cm<sup>2</sup> Strahlungsintensität auf einer Oberfläche von 0,2mm<sup>2</sup> (Grabenhorst et al., 1995). Hierzu wurden die reduzierten und permethylierten N-Glycane in Wasser gelöst (10pmol/µl) und 1:1 mit einer UV-absorbierenden Matrixlösung (19mg  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure in 400µl Acetonitril und 600µl 0,1% Trifluoressigsäure (v/v)) gemischt. 1µl dieser Lösung wurde auf einem Trägerblock unter einem kalten Luftstrom getrocknet. Die Spektren der permethylierten N-Glycane wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 20kV unter Verwendung der *delayed extraction facility* nach Ablenkung im Reflektron aufgenommen. Das Spektrum des deglycosylierten SP-CD52 wurde unter Verwendung der gleichen Matrix im linearen Modus ohne *delayed extraction* bei einer Beschleunigungsspannung von 28,5kV aufgenommen.

#### 3.6.6 Methylierungsanalyse der permethylierten Derivate

Die permethylierte Probe wurde in 150µl 4M Trifluoressigsäure aufgenommen und 2h bei 100°C inkubiert. Im Anschluß wurden die partiell methylierten Monosaccharide nach dem Abkühlen im Exsikkator über Calciumchlorid/Kaliumhydroxid bei mäßigem Vakuum getrocknet. Nach Zugabe von 100µl frisch bereiteter 1%iger Ammoniaklösung inkl. 0,1% Natriumborhydrid (w/v) wurde 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50µl Essigsäure beendet und die Probe über Nacht im Exsikkator über Calciumchlorid/Kaliumhydroxid getrocknet. Die entstandene Borsäure wurde entfernt durch vorsichtiges fünffaches Abblasen mit Stickstoff von je 200µl 1%iger methanolischer Essigsäure und die Probe vollständig unter Stickstoff getrocknet. Daraufhin wurde die Probe in 150µl Acetanhydrid sowie 20µl Essigsäure aufgenommen und 2h auf 100°C erhitzt. Nach

dem Abkühlen wurde die Lösung im Stickstoffstrom abgeblasen und schließlich in 500µl Chloroform aufgenommen. Nach dreimaligem Waschen mit je 120µl Wasser wurde die Probe vorsichtig im Stickstoffstrom getrocknet (vgl. Hakomori, 1964). Die partiell methylierten peracetylierten Alditolderivate wurden in 150µl einer Lösung aus 90% Cyclohexan und 10% Chloroform (beides v/v) aufgenommen und je 2µl zur gaschromatografischen Auftrennung auf eine 30µm DB5 Kapillarsäule injiziert. Die Detektion erfolgte über ein GCQ *ion trap* Massenspektrometer (Fa. Finnigan MAT, Bremen, Deutschland). Die Derivate wurden anhand ihrer Retentionszeit und ihres charakteristischen *Peak*musters identifiziert (Nimtz et al., 1990).

#### 3.6.7 Untersuchung auf Polysialinsäuren

Je 7,5% der penta- und hexaantennären N-Glycanladungsgruppen wurden permethyliert. Die getrockneten Derivate wurden in 450µl Methanol inkl. 62,5mM Salzsäure aufgenommen und 2h bei 70°C inkubiert. Nachdem die Proben an der Vakuumzentrifuge getrocknet worden waren, wurden sie in 240µl Acetanhydrid und 60µl Essigsäure aufgenommen. Es wurde je 1mg Natriumacetat zugegeben und 2h bei 100°C inkubiert. Die Proben wurden unter Stickstoff getrocknet, in 500µl Wasser aufgenommen und wieder getrocknet. Der Waschvorgang wurde noch dreimal mit je 350µl Wasser wiederholt. Die getrockneten, gewaschenen Proben wurden in 100µl Cyclohexan aufgenommen und je 2µl im GC/MS analysiert (Inoue und Matsumura, 1979).

#### 3.6.8 Endo-B-Galactosidase-Verdau

Der Verdau von jeweils 10% der N-Glycane aus ausgewählten Ladungsgruppen wurde über Nacht in 280µl einer Lösung aus 50mM Natriumacetat pH 5,8 unter Zugabe von 10mU Endo-ß-Galactosidase (aus *Bacteroides fragilis*, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die Reaktionslösung wurde über eine Sephadex G25-Säule entsalzt (vgl. Abschnitt 3.6.1), an der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingeengt und im Anschluß an die Permethylierung mittels MALDI/TOF-MS analysiert.
# 3.7 Analyse des GPI-Peptids von SP-CD52

### 3.7.1 Komponentenanalyse

Zur Hydrolyse wurde die getrocknete Probe (ca. 2nmol GPI-Peptid) in 200µl 625mM methanolischer Salzsäure (4,4ml Acetylchlorid unter Rühren und Eiskühlung eingetropft in 100ml getrocknetes Methanol) und 50µl Methylacetat gelöst und 16h bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 50µl tert. Butanol wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen. Da unter den angegebenen Hydrolysebedingungen teilweise Deacetylierung der Aminozucker auftritt, mußte für den Fall der Anwesenheit dieser Zuckerklasse reacetyliert werden. Die Probe wurde in 250µl Methanol und 25µl Pyridin aufgenommen und nach Schütteln mit 25µl Acetanhydrid versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 15min bei Raumtemperatur wurde bei 40°C mit Stickstoff abgeblasen und 1h über Phosphorpentoxid im Exsikkator getrocknet.

Die Probe wurde dann zur Trimethylsilylierung mit 100µl Pyridin und 50µl Trimethylsilylierungsreagenz (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid inkl. 1% Trimethylchlorsilan) versetzt und 30min bei 70°C erhitzt. Nach Abblasen der Reagenzien im Stickstoffstrom bei 20-30°C wurde die Probe in 100µl Cyclohexan aufgenommen und 2µl direkt auf die Säule injiziert. Die Trennung erfolgte über eine 30µm DB5 Kapillarsäule an einem Gaschromatografen, an den ein GCQ ion trap Massenspektrometer gekoppelt war (Fa. Finnigan MAT, Bremen, Deutschland). Die Derivate wurden anhand ihrer Retentionszeit und ihres charakteristischen Fragmentationsmusters identifiziert.

### 3.7.2 Deaminierung des GPI-Peptids

Deglycosyliertes SP-CD52-GPI-Peptid wurde dreimal mit wassergesättigtem 1-Butanol extrahiert, um noch vorhandene Lipidverunreinigungen zu entfernen. Von ungefähr 0,5nmol des CD52 (*Pool* 1) und 10nmol des CD52 (*Pool* 2) (vgl. Abb. 4.18, S.49) wurden durch eine Deaminierungsreaktion die Phosphatidylinositolreste abgespalten (Treumann et al., 1995). Hierzu wurden die GPI-Peptide in 200µl 50mM Natriumacetat-Lösung pH 4,0 inkl. 250mM Natriumnitrit gelöst und 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 80µl 400mM Borsäure zugegeben und das abgespaltene Phosphatidylinositol dreimal mit je 280µl wassergesättigtem 1-Butanol extrahiert. Die Butanolphase wurde im Stickstoffstrom getrocknet und mit ESI-MS und ESI-MS/MS vermessen.

### **3.7.3 Delipidierung des GPI-Peptids**

2nmol des getrockneten deglycosylierten GPI-Peptids wurden in 100µl 35%iger (w/w) Ammoniak-Lösung aufgenommen und 100µl Methanol zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 6h bei 50°C inkubiert und an der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das delipidierte GPI-Peptid wurde anschließend noch zweimal in je 50µl 50% Methanol (v/v) aufgenommen und an der Vakuumzentrifuge getrocknet, um überschüssiges Ammoniak zu entfernen (Ferguson, 1992).

### **3.7.4 ESI-MS/MS**

Deglycosyliertes GPI-Peptid wurde mit einer Endkonzentration von 10pmol/µl in Methanol inkl. 10mM Ammoniak gelöst und 3µl dieser Lösung in goldbeschichtete Nanospray Glaskapillaren (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland) pipettiert. Die Spitze der Kapillare wurde direkt vor die Eingangsöffnung der Nanospray Ionenquelle eines Q-TOF Massenspektrometers (Micromass, Manchester, England) plaziert und eine Spannung von –1200V angelegt. Für kollisionsinduzierte Fragmentationsexperimente wurden die Mutter-Ionen selektiv aus dem Quadrupol Massenseparator in die Kollisionszelle geschleust und dort durch Beschuß mit Argonmolekülen fragmentiert (kinetische Energie des Kollisionsgases: +40eV). Die resultierenden Tochter-Ionen wurden dann im orthogonalen *time of flight*-Massenspektrometer getrennt und anschließend detektiert. Die abgespaltenen Phosphatidylinositolreste wurden analog an einem TSQ 700 *triple quad* Massenspektrometer (Fa. Finnigan MAT, Bremen, Germany) analysiert.

## 3.8 Konformationsberechnungen

Die Metropolis Monte Carlo (MMC)- Simulationen eines Glycopeptids wurden mit dem Programm GEGOP Ver. 2.7 bei einer Simulationstemperatur von 2400K durchgeführt (Stuike-Prill und Meyer, 1990). Von den  $1,2*10^6$  generierten MMC-Schritten wurden 477840 Konformationen (39,8%) akzeptiert. Für die Darstellung der Verteilung der terminalen Sialinsäuren wurden daraus etwa 24000 Konformationen im konstanten Intervall von 20 Strukturen ausgewählt. Eine Fixierung der selektierten Konformationen auf die drei Atome C $\gamma$ -N $\gamma$ -H $\gamma$  trennte die Beweglichkeit des Peptids von der Glycanflexibilität. Die Auswertung und Darstellung der Moleküle erfolgte mit dem Program SYBYL (Rel. 6.2) der Firma TRIPOS.

# 4 Ergebnisse

### 4.1 Western- und Lektinblots

### 4.1.1 Methoden

Um einen *Western*- oder Lektin*blot* herzustellen, muß die Proteinprobe gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Sie wird dazu in einem Puffer, der *Sodium*dodecylsulfat (SDS) enthält, auf 95°C erhitzt und auf diese Weise denaturiert, wobei sich das SDS proportional zur Masse des Proteins anlagert. Der SDS-Proteinkomplex wird durch das SDS negativ aufgeladen, dadurch wandert er im elektrischen Feld überwiegend entsprechend der Größe des Proteins. Im Anschluß an die Separation werden die im Gel enthaltenen Proteine wiederum elektrophoretisch auf eine spezielle Membran, die spezifische Detektionen ermöglicht, übertragen (*geblottet*). Die Detektion wird durch die Verwendung von hochspezifischen Erstantikörpern möglich, die das Antigen auf dem *Blot* erkennen. In der Regel werden diese Erstantikörper nicht selbst markiert, sondern mit passenden markierten Zweitantikörpern indirekt detektiert. Die Zweitantikörper, die gegen Immunoglobuline der Tiere gerichtet sind, aus denen der Erstantikörper stammt, binden diesen und lassen sich über ihre Markierung auf dem *Blot* beispielsweise durch eine enzymkatalysierte photochemische Reaktion nachweisen.

Bei der Lektin*blot*-Analyse werden anstelle der spezifischen Erstantikörper Pflanzenlektine verwendet, die spezifisch für bestimmte Kohlenhydratmonomere oder Motive sind. Die Detektion der auf dem *Blot* gebundenen Lektine erfolgt über eine Biotinylierung sowohl an den Lektinen als auch an einem Enzym (beispielsweise Peroxidase). Hochaffines Streptavidin vernetzt über mehrere Bindungsstellen sowohl die biotinylierten Lektine als auch das biotinylierte Enzym, so daß entsprechend dem *Westernblot* die Detektion durch eine enzymkatalysierte photochemische Reaktion ermöglicht wird.

### 4.1.2 Westernblot-Analyse der Ejakulatbestandteile

Um die geeignete Quelle zur Isolierung des ursprünglich aus dem Nebenhoden stammenden CD52-Antigens zu ermitteln, wurde humanes Gesamtejakulat durch Zentrifugation in zellfreies Seminalplasma und Spermien getrennt. Alle Proben, die für eine gelelektrophoretische Auftrennung bestimmt waren, wurden zuvor extrahiert (Folch et al., 1957; Xia et al., 1991). Mit Hilfe dieser klassischen Methode der Glycolipidextraktion konnten Lipid-ähnliche Substanzen angereichert werden, zu denen auch die GPI-verankerten Proteine zählen. Das SP-CD52-Antigen ließ sich auf diese Weise etwa um das Zehnfache anreichern. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Extrakte wurden die Untersuchungen des CD52-Antigens mit Hilfe von *Western-* und Lektin*blot-*Analysen durchgeführt. Im Rahmen der *Westernblot-*Analyse erfolgte die Detektion des Antigens (wenn nicht anders beschrieben) mit spezifischen monoklonalen anti-CD52-Antikörpern, im Falle der Lektin*blots* mit Sialinsäure-spezifischen Lektinen. Die Detektion von vergleichbaren Mengen an SP-CD52 aus Gesamtejakulat sowie Seminalplasma und Spermien eines einzelnen Ejakulates ergab ein polymorphes Muster immunoreaktiver Banden im *Westernblot.* Die Mikroheterogenität der Probe war in allen Fällen gleich, so daß sich die elektrophoretische Mobilität sowie das resultierende Bandenmuster des Antigens aus Seminalplasma nicht von der des Antigens unterschied, welches aus Spermien extrahiert wurde. Das komplexe Muster wurde durch jeweils fünf bis sechs Einzelbanden gebildet, die im Bereich von 14-20 kD lagen (Abb. 4.1). Insgesamt 30 verschiedene Ejakulate wurden hinsichtlich der elektrophoretischen Mobilität von CD52 verglichen, sie wiesen nur Unterschiede in der relativen Menge, nicht aber im Bandenmuster auf (nicht gezeigt).



Abb. 4.1: *Westernblot* des epididymalen CD52-Antigens, detektiert mit dem CAMPATH-1 Antikörper. Das Bandenmuster folgender Folch-extrahierter Proben wurde untersucht: Bahn 1: *Pool* aus 9 Spermienproben; Bahn 2: Gesamtejakulat; Bahn 3: Seminalplasma; Bahn 4: Seminalplasma; Bahn 5: Spermien (Bahn 2 - Bahn 5: einzelnes Ejakulat).

Die Intensität von vergleichbaren Mengen Spermienextrakt betrug nur etwa 10% des im Seminalplasmaextrakt detektierten Signals. Dieses Ergebnis bestätigte frühere ELISA-Daten, wonach im Seminalplasma eines Ejakulates wesentlich mehr CD52 enthalten ist als auf den Spermien (Dr. G. Hale, persönliche Mitteilung). Für die anschließende Strukturanalyse wurde demzufolge ausschließlich Seminalplasma verwendet. Die zur Auftrennung des Ejakulates in Seminalplasma und Spermien durchgeführte Zentrifugation bot außerdem den Vorteil, daß im Ejakulat vorhandene zelluläre Verunreinigungen abgetrennt wurden. Normales humanes Ejakulat enthält beispielsweise Lymphozyten in unterschiedlicher Zahl (World Health Organization, 1992).

### 4.1.3 Analytische N-Glycosidase F–Verdaus

Die im *Westernblot* festgestellte Mikroheterogenität ließ eine große N-Glycosylierung des SP-CD52-Antigens vermuten, genauso wie die Differenz der tatsächlichen elektrophoretischen Mobilität (14-20 kD) von der zu erwartenden berechneten Mobilität (ca. 3 kD) des "nackten", nur 12 Aminosäuren langen Antigens. Ein Verdauexperiment mit N-Glycosidase F (vgl. Abb. 4.2) ergab, daß die Mikroheterogenität mit zunehmender Dauer des Verdaus abnahm, während eine neue Bande mit erheblich verringertem Molekulargewicht, aber erhöhter Signalintensität bei ~6 kD sichtbar wurde. Die Abspaltung der N-Glycosylierung bewirkte demzufolge eine Abnahme des Molekulargewichtes, zusätzlich erhöhte sich die Intensität des detektierten Signals, vermutlich weil das Epitop für den Antikörper besser zugänglich wurde.



Abb. 4.2: N-Glycosidase F-Verdau von Folch-extrahiertem Gesamtejakulat. Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Bahn 1: Kontrolle, Bahn 2 bis 7: Zeitverlauf der Reaktion; Bahn 2: 30 Sekunden nach Zugabe des Enzyms, Bahn 3: 1min, Bahn 4: 3min, Bahn 5: 6min, Bahn 6: 10min und Bahn 7: zwei Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur.

Für einen ersten Vergleich zwischen Genitaltrakt- und Lymphozyten-CD52 wurden Folch-Extrakte aus humanem Seminalplasma und Lymphozytenpräparationen mittels *Westernblot*-Analyse verglichen, um ihr Verhalten in der Gelelektrophorese zu untersuchen. Die beiden CD52-Antigene zeigten sowohl vor als auch nach der Abspaltung der N-Glycane einen erstaunlichen Unterschied in ihrem Laufverhalten im elektrischen Feld, was auf nicht unerhebliche Unterschiede in der Struktur ihrer N-Glycane und auch ihres GPI-Ankers hindeutete (Abb. 4.3). Vor der Abspaltung der N-Glycane wiesen sowohl SP-CD52 als auch Ly-CD52 eine beträchtliche Mikroheterogenität auf. Die Muster unterschieden sich tatsächlich sowohl in der Anzahl der Banden (fünf bis sechs Banden bei SP-CD52 bzw. drei Banden bei Ly-CD52) als auch in ihrer jeweiligen Laufweite (14-20 kD bzw. 18-23 kD, Abb. 4.3, Bahn 1, 3). Nach der Deglycosylierung (Abb. 4.3, Bahn 2, 4) war immer noch ein geringer Unterschied in der Laufweite der beiden resultierenden GPI-Peptide zu verzeichnen.



Abb. 4.3: Westernblot der Folchextrahierten CD52-Antigene aus Seminalplasma (Bahn 1, 2) und Lymphozyten (Bahn 3, 4), detektiert mit dem 097-mAk. Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität sind sowohl vor (Bahn 1, 3) als auch nach Abspaltung des N-Glycans mit N-Glycosidase F sichtbar (Bahn 2, 4). In den behandelten Proben sind zusätzlich schwache Banden zu erkennen, die wahrscheinlich unverdaute Reste der am häufigsten vertretenen Glycoformen repräsentieren. Auch diese sind zwischen beiden Antigenen deutlich unterschiedlich.

Weitere *Westernblot*-Untersuchungen der beiden Antigene vor und nach Abspaltung der N-Glycane bestätigten diese Ergebnisse. Es wurden drei CD52-spezifische monoklonale Antikörper verwendet:

a) der 097-mAk, spezifisch für das Dodecapeptidepitop (Hale, 1995); b) der CF1D12-mAk, der an ein Epitop bindet, welches hauptsächlich aus dem N-Glycan besteht (Hale und Rebello, 1998) und c) der CAMPATH-1-mAk, welcher die ersten drei Aminosäuren des Peptidrückgrats sowie Teile des Lipidankers erkennt (Treumann et al., 1995).

Der 097-mAk erkannte sowohl SP-CD52 vor und nach der Abspaltung (Abb. 4.3, Bahn 1, 2; Abb. 4.4, Bahn 1, 7) als auch Ly-CD52 (Abb. 4.3, Bahn 3, 4; Abb. 4.4, Bahn 4, 10). Der CF1D12-mAk, (Abb. 4.4, SP-CD52: Bahn 2, 8; Ly-CD52: Bahn 5, 11) band an die intakten glycosylierten Antigene, ergab jedoch nach der Abspaltung seines Hauptepitops nur ein sehr schwaches Signal. Im Falle des CAMPATH-1-mAks führte die Abspaltung des N-Glycans dagegen wie beschrieben zu einer Verstärkung der Signalintensität (Abb. 4.4, SP-CD52: Bahn 3, 9; Ly-CD52: Bahn 6, 12).



Abb. 4.4: *Westernblot* der CD52-Antigene aus Seminalplasma (Bahn 1– 3, 7–9) und Lymphozyten (Bahn 4–6, 10–12). Die Antigene vor (mit [-] bezeichnet; Bahn 1-6) bzw. nach der Deglycosylierung (mit [+] bezeichnet; Bahn 7–12) wurden unter Verwendung dreier CD52-spezifischer Antikörper verglichen. Bahn 1, 4, 7, 10: 097-mAk; Bahn 2, 5, 8, 11: CF1D12-mAk, Bahn 3, 6, 9, 12: CAMPATH-1-mAk.

### 4.1.4 Analytische Sialidase-Verdaus

Die Bindung der sialinsäurespezifischen Lektine MAA (*Maackia Amurensis* Lektin, erkennt terminal  $\alpha$ (2-3)-gebundene Sialinsäure) und SNA (*Sambucus Nigra* Lektin, erkennt terminal  $\alpha$ (2-6)-gebundene Sialinsäure) durch SP-CD52 ergab, daß beide Sialo-Formen im Glycan vorliegen mußten (Abb. 4.5). Das Bandenmuster der SNA-Detektion erschien im unteren Bereich fast deckungsgleich mit dem Bandenmuster der Antikörperdetektion, während das MAA-Lektin scheinbar nur die größeren N-Glycane erkannte. Das Detektionssignal des SNA-Lektins war dabei deutlich schwächer und erforderte längere Expositionszeiten, was auf eine geringere Menge der  $\alpha$ (2-6)-gebundenen Sialinsäure hindeutete.



Abb. 4.5: *Western-* und Lektin*blots* von Seminalplasmaextrakt. Bahn 1: SP-CD52, detektiert mit dem 097-mAk; Bahn 2: SP-CD52 detektiert mit MAA, Bahn 3: SP-CD52 detektiert mit SNA. Durch die Abspaltung der beiden unterschiedlich gebundenen Sialinsäuren mittels Sialidase sollte geklärt werden, ob Unterschiede der Glycoformen bezüglich ihrer Sialylierung das äußerst heterogene Glycosylierungsmuster des SP-CD52 hervorriefen. Die elektrophoretische Mobilität des SP-CD52 veränderte sich nach der Abspaltung der Sialinsäuren jedoch nicht. Die negativ geladenen Sialinsäuren wirkten sich also nicht auf das Laufverhalten bei der elektrophoretischen Trennung aus (Abb. 4.6). Die Mikroheterogenität mußte demnach andere Ursachen haben.



Abb. 4.6: Western- und Lektinblot von SP-CD52 vor (mit [-] bezeichnet; Bahn 1, 2) und nach (mit [+] bezeichnet; Bahn 3, 4) dem Sialidase-Verdau. Bahn 1 und 3: Antikörperdetektion (mit 097-mAk) des unverdauten sowie verdauten SP-CD52. Bahn 2 und 4: Lektindetektion (mit MAA) des unverdauten bzw. verdauten SP-CD52. Die antikörperdetektierten Banden blieben erhalten, während die lektindetektierten Signale nach dem Dau verschwunden waren.

### 4.1.5 In-vitro-Kapazitationsversuche mit lebenden Spermien

SP-CD52 bedeckt die gesamte Oberfläche von ausgereiften Spermien, die im Cauda-Abschnitt des Nebenhodens gespeichert werden (vgl. Abb. 1.1a und Abb. 1.2b). Für eine biologische Funktion des SP-CD52 im weiblichen Genitaltrakt ist ein Verbleiben des Moleküls auf der Spermienoberfläche auch nach dem nächsten Reifungsschritt - der Kapazitation im weiblichen Genitaltrakt -Vorraussetzung. Die Kapazitationsbedingungen wurden durch einen in-vitro-Versuch nachgestellt, bei dem lebende Spermien gewaschen und in einem in-vitro-Fertilisationsmedium in einem CO2-Brutschrank über verschiedene Zeiträume bei 37°C inkubiert wurden. Dieses Medium wird zur Durchführung von in-vitro-Fertilisationen routinemäßig eingesetzt. Durch die Inkubation im Medium wird eine Kapazitationsreaktion initiert, bei der sich die Spermienoberfläche verändert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Spermienzahl in Seminalplasma inkubiert, da in Seminalplasma keine Kapazitation stattfinden kann (Visconti et al., 1998). Die Detektion der im Anschluß Folch-extrahierten Proben erfolgte sowohl mit dem CAMPATH-1-Antikörper als auch mit den Lektinen MAA und SNA. Abb. 4.7 zeigt, daß das SP-CD52-Antigen auch nach der Kapazitation noch auf den Spermien detektierbar war. Tatsächlich waren sowohl das Antikörpersignal (CAMPATH-1-mAk) als auch das Lektinsignal (MAA) der kapazitierten Spermien erheblich intensiver. SP-CD52 verblieb demnach auch nach der in-vitro-Kapazitation auf den Spermien und wurde durch Entfernung anderer spermienbindender Proteine sogar freigelegt. Das SNA-Lektinsignal war allerdings zu schwach, um Aussagen treffen zu können.



Abb. 4.7: Kapazitationsversuch mit lebenden Spermien. Aufgetragen wurde jeweils die gleiche Anzahl unkapazitierter (-) sowie kapazitierter (+)Spermien nach der Folch-Extraktion. Bahn 1, 2: Detektion mit dem CAMPATH-1-mAk; Bahn 3, 4: MAA, Bahn 5, 6: SNA.

### 4.1.6 Versuche mit CD52-N-Glycan-spezifischen Antikörpern

Der von Prof. S. Isojima (Nishinomiya, Japan) zur Verfügung gestellte 2E5-mAk stammt aus einer Serie von N-Glycan-spezifischen Antikörpern, die spermienimmobilisierende Wirkung besitzen. Er erkennt ebenso wie der Antikörper H6-3C4 (Isojima, 1989b) die N-Glycosylierung eines Nebenhodenspezifischen, glycolipidartigen, hochgeladenen Antigens, unterscheidet im Gegensatz zu diesem aber nicht zwischen SP-CD52- und Ly-CD52-N-Glycanen (Isojima, 1988; Isojima et al., 1987; Diekman et al., 1999). Um die Identität des SP-CD52 mit diesem Antigen zu zeigen, wurden Folch-extrahiertes Seminalplasma und eine hochaufgereinigte Probe von SP-CD52 mit dem 2E5-mAk detektiert (Abb. 4.8a). In beiden Proben war das SP-CD52-Antigen nachweisbar. SP-CD52 ist demzufolge sehr wahrscheinlich identisch mit dem japanischen H6-3C4-Antigen. Die Natur der zusätzlichen Bande, die der 2E5-mAk sowohl im Folch-Extrakt als auch in der hochaufgereinigten Fraktion erkennt, ist allerdings ungeklärt.

SP-CD52 wurde wiederum mit N-Glycosidase F verdaut und die ungedauten (-) sowie verdauten (+) Proben mit dem 2E5-mAk (spezifisch für das N-Glycan) und dem CF1D12-mAk (erkennt sowohl N-Glycan als auch den Anker) detektiert (Abb. 4.8b). Der CF1D12-mAk erkannte auch nach der N-Glycosidase F-Spaltung das deglycosylierte GPI-Peptid, während das Epitop des 2E5-mAks nach der Spaltung verschwunden war.



Abb. 4.8: (a) *Westernblot* des folchextrahierten Seminalplasmas (Bahn 1) und einer hochaufgereinigten SP-CD52-Probe (Bahn 2), detektiert mit dem 2E5-mAk. (b) *Westernblot* des SP-CD52-Antigens vor (mit [-] bezeichnet; Bahn 3, 5) und nach (mit [+] bezeichnet; Bahn 4, 6) der N-Glycosidase F - Spaltung. Die Detektion erfolgte mit dem 2E5-mAk (Bahn 1, 2, 3, 4) und dem CF1D12-mAk (Bahn 5, 6).

# 4.2 Aufreinigung des SP-CD52

### 4.2.1 Angewendete Methoden

Das zentrifugierte und damit zellfreie humane Seminalplasma wurde als Quelle für die Aufreinigung des SP-CD52 verwendet. Der erste Aufreinigungsversuch erfolgte ausgehend von 400ml *gepooltem* Seminalplasma ausschliesslich unter Verwendung von HPLC- und FPLC- Methoden säulenchromatografisch ohne Durchführung einer Affinitätschromatografie. Die Ausbeute war jedoch sehr gering. Im Anschluß daran stellte Dr. G. Hale (Oxford, England) große Mengen des CAMPATH-1-Antikörpers (300mg) zur Verfügung, der für eine affinitätschromatografische Aufreinigung in großem Maßstab verwendet wurde. Für diese zweite Aufreinigung wurden 600ml *gepooltes* Seminalplasma verwendet. Das Schema (Abb. 4.9) zeigt die einzelnen Schritte der Aufreinigung, die durch *Dotblot*-Analysen unter Verwendung des 097-mAks verfolgt wurden.



**Abb. 4.9:** Aufreinigungsschema von SP-CD52 als Flußdiagramm. Linker Zweig des Flußdiagrammes: säulenchromatografische Aufreinigung; rechter Zweig: affinitätschromatografische Aufreinigung. Die Dicke der Pfeile soll die Menge des SP-CD52 im Verlauf der Aufreinigung symbolisieren.

### 4.2.2 Säulenchromatografische Aufreinigung

I) Ejakulate wurden durch Zentrifugation in Seminalplasma und Spermien getrennt.

**II**) Unter Verwendung der Glycolipidextraktion nach Folch (1957) konnte das Antigen aus dem Seminalplasma extrahiert werden. Diese Extraktionsmethode bewirkt durch Einsatz definierter Mengen Chloroform, Methanol und Wasser eine Trennung in hydrophile (obere) und hydrophobe (untere) Phase. SP-CD52 besitzt aufgrund seiner extensiven N-Glycosylierung auch hydrophile Eigenschaften und reicherte sich in der oberen Phase an.

III) Der GPI-Anker kombiniert mit der N-Glycosylierungsstelle bewirkt den bipolaren, amphipatischen Charakter des SP-CD52-Moleküls. Das Antigen liegt daher nicht als Einzelmolekül in Lösung vor, sondern bildet micellare Strukturen aus. Diese hochmolekularen Komplexe konnten durch Gelfiltrations-FPLC abgetrennt werden, da sie Ausschlußvolumen der verwendeten im Säulen eluierten (Ausschlußbereich ~2000kD/ analytische Säule bzw. >30kD/präparative Säule). Das SP-CD52 keine besitzt aromatischen Aminosäuren und konnte deshalb nur bei 220nm detektiert werden.



**Abb. 4.10:** Schematische Phasentrennung bei Folch-Extraktion



**Abb. 4.11:** Gelfiltration des Folch-extrahierten Seminalplasmas mit *Dotblot* der einzelnen Fraktionen (verwendeter mAk: 097); [+] bezeichnet die Positivkontrolle des *Dotblots*. SP-CD52 wurde in Fr. 5 - 8 detektiert. Die Abbildung zeigt die UV-Absorption bei 220nm und 280nm (y-Achse) aufgetragen gegen die Zeit (x-Achse).

IV<sub>chr</sub>) Die durch den GPI-Anker verursachte Hydrophobizität des SP-CD52-Antigens konnte zur weiteren chromatografischen Aufreinigung auf einer semipräparativen C8-RP-Säule genutzt werden. Bei diesem Reinigungsschritt eluierten zwei Pools von SP-CD52 von der Säule, zeitlich nur unwesentlich voneinander getrennt. Diese Pools wurden später durch Verdau-Experimente mit Phospholipase C (spaltet am **GPI-Anker**) näher charakterisiert (vgl. Abschnitt 4.6.1, S.74).



Abb. 4.12: C8-RP-HPLC-Trennung des gelfiltrierten Extraktes mit *Dotblots* der einzelnen Fraktionen. *Pool* I: Fr. 27-31; *Pool* II: Fr. 32-42; *Pool* III: Fr. 43-52. Aufgetragen ist die UV-Absorption bei 220nm (y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse).

V<sub>chr</sub>) Um eine weitere Abtrennung insbesondere von anderen GPI-verankerten Proteinen zu erreichen (hauptsächlich von GPI-verankertem CD59, welches ebenfalls in hoher Konzentration im humanen Ejakulat vorkommt) wurde eine Kationentauscherchromatografie - mit Sulfonsäure als funktioneller Gruppe durchgeführt. Die Sulfonsäure bindet positiv geladene Gruppen und damit auch positiv geladene Aminosäuren, die bei den meisten GPI-verankerten Proteinen, außer bei CD52, vorhanden sind. Andere GPIverankerte Proteine wurden bei diesem Chromatografieschritt auf der analytischen Säule retardiert und so von SP-CD52 getrennt. Durch Zusatz von 48% Methanol sowie 3% Chloroform den verwendeten **Z11** Laufmitteln wurde gewährleistet, daß die amphoteren Moleküle als Einzelmoleküle in Lösung vorlagen. Dieses Gemisch entsprach in seiner Zusammensetzung der hydrophilen Phase der Folch-Extraktion. Die Detektion erfolgte bei 280nm, da das zugesetzte Chloroform bei 220nm stark absorbierte.



**Abb. 4.13:** Kationentauscher-Trennung von vorgereinigtem Antigen mit *Dotblot* der einzelnen Fraktionen. SP-CD52 wurde in Fr. 6 - 12 detektiert. Aufgetragen ist die UV-Absorption bei 280nm (y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse).

**VI**<sub>chr</sub>) Abschließend wurde die Probe nochmals auf einer semipräparativen C3-RP-Säule chromatografiert, um restliche Lipid-Verunreinigungen zu entfernen. Die verwendeten Lösungsmittel und Salze ließen sich durch Lyophylisierung entfernen.



**Abb. 4.14:** C3-RP-HPLC-Trennung von SP-CD52. Die *Dotblot*-Analyse zeigt das Antigen in Fr. 4. Die Abbildung stellt die UV-Absorption bei 280nm (y-Achse) gegen die Zeit in Minuten (x-Achse) dar.

Die Ausbeute aus der rein säulenchromatografischen Aufreinigung war jedoch sehr gering. Wahrscheinlich blieb die hydrophobe GPI-verankerte Substanz an den verwendeten Gefäßen hängen. Eine Silanisierung der Glasgefäße sowie extensives Ausspülen mit Lösungsmitteln konnte die Verluste nicht verringern. Durch Komponentenanalyse der Probe konnte eindeutig Inositol detektiert werden, daneben wurde mit Dionex-Chromatografie Sialinsäure in den aufgereinigten Proben nachgewiesen (nicht gezeigt). Die NMR-spektroskopische Untersuchung auf N-Glycane (unter Verwendung von Lösungsmittelgemischen aus deuteriertem Wasser, Methanol und Chloroform) verlief jedoch negativ.

### 4.2.3 Affinitätschromatografische Aufreinigung

Die affinitätschromatografische Aufreinigung beinhaltete die Durchführung der oben beschriebenen ersten drei Aufreinigungsschritte I) bis III):

Zentrifugation, Folch-Extraktion sowie präparative Gelchromatografie.

 $IV_{aff}$ ) Daran schloß sich eine Affinitätschromatografie in großem Maßstab an, bei der insgesamt 300mg CAMPATH-1G-Antikörper verwendet wurden (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. G. Hale, Oxford). Die Herstellung der Affinitätssäulen unter Verwendung von epoxy-aktivierter Sepharose erfolgte nach den Angaben des Herstellers, die Kopplungseffizienz wurde durch Messung der Proteinkonzentration überprüft. Bei einer Kontrollreaktion wurden ca. 70% des Antikörpers kovalent an das Säulenmaterial gebunden. Die Bedingungen, unter denen die

Affinitätschromatografie durchgeführt wurde, entsprachen den Bedingungen, die bereits zur Aufreinigung des Lymphozyten-CD52-Antigens verwendet worden waren (Xia et al., 1993; Treumann et al., 1995). Im Unterschied zu Natriumdeoxycholat als solubilisierendem Detergenz war Zwittergent SB12 eingesetzt worden - es ließ sich aufgrund seines höheren kritischen Micellarwertes leichter durch Dialyse entfernen. Die Elution des an die Säulen gebundenen Antigens durch einen Diethylaminpuffer mit pH 11,5 ließ nur eine maximal dreifache Benutzung der Säule zu, so daß für die Aufreinigung von 600ml Ausgangsmaterial die gesamte zur Verfügung stehende Menge an Antikörper verbraucht wurde. Die Bindungseffizienz des Antigens an die Säulen wurde durch Überprüfung des SP-CD52-Gehaltes im durchgelaufenen Puffer kontrolliert.

 $V_{aff}$ ) Nach Entfernung der Hauptmenge an Detergenz durch extensive Dialyse wurden die Extrakte nochmals über eine analytische C8-RP-Säule chromatografiert, um eventuell noch vorhandene Detergenzreste zu entfernen. Die Reinheit der SP-CD52-Probe wurde durch terminale Aminosäuresequenzierung bestätigt. Im Rahmen der Sequenzierung konnten keine weiteren Proteine in der Probe nachgewiesen werden. Außerdem ließ sich die Menge an Protein bestimmen: ausgehend von 600ml Ausgangsmaterial waren 138nmol (ca. 1,1mg) SP-CD52-Antigen aufgereinigt worden. Die Sequenzierung ergab eine Lücke an Position 3 der erwarteten Sequenz, so daß an dieser Stelle das Asparagin in glycosylierter Form vorgelegen haben mußte.



**Abb. 4.15:** Abschließende C8-RP-HPLC-Reinigung der SP-CD52-Präparation. Der *Dotblot* zeigt SP-CD52 in Fr. 49-62. Aufgetragen ist die UV-Absorption bei 280nm (y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse).

# 4.3 Strategie der Strukturanalyse und präparative Aufarbeitung von SP-CD52

### 4.3.1 Mikroheterogenität des SP-CD52: Strategie der Strukturanalyse

Die MALDI/TOF-MS-Untersuchung des intakten, N-glycosylierten SP-CD52-Moleküls mit GPI-Anker zeigte eine enorme Mikroheterogenität, die von einem Molekulargewicht von m/z = 6800 bis m/z = 9000 mit einem Maximum bei m/z = 7605 reichte.



**Abb. 4.16:** MALDI/TOF-MS des intakten SP-CD52. Das durchschnittliche Molekulargewicht beträgt m/z = 7605. Die y-Achse zeigt die relative Signalintensität, die x-Achse den Quotienten aus Masse und Ladung (m/z), mit z = [+1] bei den MALDI/TOF-Messungen aufgrund der Bildung von Mono-Natrium-Addukten.

Diese Mikroheterogenität, auf die auch schon die *Westernblot*-Analysen gedeutetet hatten (vgl. Abb. 4.1, S.35 und Abb. 4.3, S.37), erforderte die getrennte Analyse der N-Glycane sowie des GPI-Ankers von SP-CD52. Die detaillierte Vorgehensweise bei der Strukturanalyse ist in der Abb. 4.17 schematisch dargestellt und bietet einen Überblick über die durchgeführten Untersuchungsschritte.



Abb. 4.17: Analysestrategie für SP-CD52. Bei den einzelnen Untersuchungsschritten ist oben links der zugehörige Abschnitt in dieser Arbeit aufgezeigt.

Die für die Strukturanalyse zur Verfügung stehende Menge an SP-CD52 betrug etwa 1,1 mg (138nmol). Durch N-terminale Aminosäuresequenzierung konnte sichergestellt werden, daß die ermittelten Daten mit den genetischen Sequenzdaten von CD52 übereinstimmten und die Analyse nicht durch Verunreinigungen der Probe mit Fremdproteinen beeinträchtigt werden würde. Eine Lücke an Position 3 in der ermittelten CD52-Sequenz (siehe Sequenz oben rechts in Abb. 4.16 sowie Abschnitt 4.2.3, S.46) sprach für eine vollständige N-Glycosylierung des Antigens, da glycosylierte Aminosäuren bei den Abbauzyklen nicht erfaßt werden. Die drei Serinreste am carboxyterminalen Ende konnten dagegen einwandfrei nachgewiesen werden, was gegen eine O-Glycosylierung dieser Aminosäuren sprach.

### 4.3.2 Präparative Isolierung der N-Glycane und des GPI-Peptids

Um N-Glycane und GPI-Anker von SP-CD52 getrennt untersuchen zu können, wurden 95nmol (ca.720µg) SP-CD52 durch Einsatz von N-Glycosidase F verdaut und so die N-Glycane vom GPI-Peptid abgespalten. Beide Anteile konnten mittels C8-RP-Chromatografie quantitativ isoliert werden, da die N-Glycane nicht auf der hydrophoben Säule banden und im Durchbruch eluierten, während die GPI-Peptide retardiert wurden und sich in zwei sehr dicht aufeinanderfolgende *Pools* trennen ließen (vgl. Abb. 4.18). Die aus dem Durchbruch isolierten N-Glycane wurden über eine *Fast Desalting*-Säule entsalzt und getrocknet. Durch *Dotblot*-Analyse wurden die GPI-Peptid-enthaltenden Fraktionen identifiziert und zu *Pool* 1 (Fr. 15-18) und *Pool* 2 (Fr. 20-28) vereinigt, wobei die wahrscheinlich eine Mischung enthaltende Fraktion 19 ausgelassen wurde (siehe Abb. 4.18). Aliquots von beiden *Pools* wurden erneut sequenziert (vgl. Abb. 4.16, S.47, untere Sequenz). Die resultierenden Sequenzdaten belegten die erfolgreiche Abspaltung der N-Glycane: an Position 3 der Sequenz ließ sich anstelle von Asparagin jetzt Aspartat nachweisen, da das (im Falle des glycosylierten SP-CD52 nicht detektierbare) Asparagin durch die Spaltungsreaktion in Aspartat überführt worden war. Der später eluierende *Pool* 2 enthielt den Sequenzdaten zufolge 40mal mehr SP-CD52 als der *Pool* 1.



**Abb. 4.18:** Auftrennung des präparativen N-Glycosidase F-Verdaus von SP-CD52 in N-Glycane und GPI-Peptide. Der *Dotblot* zeigt die Elution des GPI-Peptids in zwei Gruppen (Fr. 15-18 und Fr. 20-28). Die y-Achse zeigt die UV-Absorption bei 206nm, die x-Achse die Zeit in Minuten.

# 4.4 Strukturanalyse der N-Glycane von SP-CD52: Methoden

Für die Analyse der Zuckerstrukturen von SP-CD52 wurden mehrere Techniken verwendet, die im folgenden beschrieben sind. Tab. 1 enthält eine Zusammenfassung ihres Informationsgehaltes.

Techniken	Information	keine Information				
MonoQ- FPLC	Ladung; Mengen- anteil (%)	Struktur; Größe; Verzweigung				
Dionex- HPAEC	Struktur; Größe; Verzweigung; Mengen- anteil (%)	Exakte Größe; Ladung				
MALDI- MS	Exakte Größe; Ladung; Fucosylierung; Mengen- anteil (%)	Exakte Struktur; Verzweigung				
GC-MS (Methylierungs- analyse)	Strukturmotive; Verzweigungen; Bindungstypen	Exakte Struktur; exakte Größe				
Endo-ß- galactosidase- Verdaus	Verzweigungen; Anzahl der Lactosamin- einheiten	Exakte Größe; Ladung				

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Analysetechniken und ihren Informationsgehalt

### 4.4.1 Trennung der N-Glycane in Ladungsgruppen durch MonoQ-FPLC

Die erste Dionex-HPAEC-PAD-Analyse der nativen N-Glycane dokumentierte eine ungewöhnlich hohe Mikroheterogenität (nicht gezeigt), ein großer Anteil der N-Glycane eluierte in der Region hochsialylierter N-Glycane (Nimtz und Conradt, 1993). Die in Abschnitt 4.1.5 (Abb. 4.5, S.38) dargestellten Lektin*blot*s hatten bereits erste Hinweise auf das Vorliegen von sowohl  $\alpha$ (2-3)-(Detektion mit MAA) als auch  $\alpha$ (2-6)-gebundener Sialinsäure (Detektion mit SNA) bei SP-CD52 gegeben. Um den weiteren Gang der Analyse zu vereinfachen, wurden die sialylierten N-Glycane präparativ durch eine Anionentauscherchromatografie an einer MonoQ-Säule in die einzelnen Ladungsgruppen aufgetrennt (Abb. 4.19).



**Abb. 4.19:** Trennung der N-Glycane von SP-CD52 in die einzelnen Ladungsgruppen. Der Bereich der jeweils vereinigten kohlenhydrathaltigen Fraktionen ist durch Klammern gekennzeichnet. Die Ladungsgruppen wurden als M1 bis M6 bezeichnet. Unter der Klammer angegeben ist der mittels Dionex-HPAEC bestimmte prozentuale Anteil der jeweiligen Gruppe an der Gesamtmenge des N-Glycanmaterials. Die y-Achse zeigt die UV-Absorption bei 206nm, die x-Achse die Zeit in Minuten.

Alle Fraktionen wurden aufgefangen und auf ihren N-Glycangehalt untersucht, um sicherzustellen, daß kein N-Glycanmaterial verlorenging. Es wurden elf Gruppen von N-Glycanfraktionen erhalten, die vereinigt, entsalzt, getrocknet und in 500µl Wasser aufgenommen wurden. Sie bildeten die Ausgangsbasis für die im folgenden beschriebene Strukturanalyse. Anhand von HPAEC-PAD (Abb. 4.20, S.53) und MALDI/TOF-MS (Abb. 4.21, S.56; Tab. 2, S.57) wurde nachgewiesen, daß neun der elf gesammelten Fraktionen N-Glycanmaterial enthielten. Diese Fraktionen wurden als M1 bis M6 bezeichnet (vgl. Abb. 4.19, S.51). Die Ladung der einzelnen Gruppen reichte von [-1] (M1) bis [-7] (M6). Gruppe M1 enthielt laut Dionex-HPAEC- und MALDI/TOF-Analyse nur eine geringe Menge an N-Glycanen (7% der Gesamt-N-Glycane), die eine Mischung aus einfach geladenen, hybridartigen sowie nicht aufgetrennten mehrfach geladenen, komplexen N-Glycanen bildeten. Sie wurde nicht näher untersucht. Gruppe M2 (Disialo-Glycane) enthielt 15%, Gruppe M3 (Trisialo-Glycane) enthielt 32%, Gruppe M4 und M4\* (Tetrasialo-Glycane) enthielten 19% sowie 7%, Gruppe M5 und M5\* (Pentasialo-Glycane) enthielten 10% und 4%, Gruppe M5/6 (Gemisch aus Penta- und Hexasialo-Glycane) sowie M6 (Hexa- und Heptasialo-Glycane) enthielten je 3% der gesamten von SP-CD52 abspaltbaren N-Glycane.

### 4.4.2 Dionex-HPAEC-PAD-Analyse

Aliquots der elf Fraktionen sowie des gesamten N-Glycanmaterials vor der MonoQ-Auftrennung wurden zur Erhöhung der chromatografischen Auflösung chemisch desialyliert und mittels Dionex-HPAEC-PAD (*high pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection*) einzeln analysiert.

Mit dieser chromatografischen Methode auf Basis von Anionentauschern ist eine hochauflösende Trennung von geladenen oder neutralen Oligosacchariden sowie auch von Bindungsisomeren möglich. Die HPAEC-PAD-Trennung wird bei einem pH von über 12 durchgeführt, bei dem die Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate in ionisierter Form vorliegen. Aufgrund ihrer unterschiedlichen relativen Aciditäten besitzen die Hydroxylgruppen eine unterschiedliche Bindungsaffinität an die funktionellen positiv geladenen Gruppen der Chromatografiesäule.

Bei unsubstituierten Hydroxylgruppen lautet die Reihenfolge: hemiacetal>2-OH>6-OH>3-OH>4-OH. Darüber hinaus wirkt sich eine Substitution der Hydroxylgruppen auf die Acidität der benachbarten Hydroxylgruppen aus. Auch die räumliche Zugänglichkeit der deprotonierten Hydroxylgruppen zur stationären Phase der Säule ist von großer Bedeutung für das Elutionsverhalten des Oligosaccharids. Kleine Oligosaccharide eluieren außerdem früher als große Oligosaccharide.

Die gepulste amperometrische Detektion (PAD) beruht auf einer Redoxreaktion der Kohlenhydrate an einer Goldelektrode und erlaubt ohne vorhergehende Derivatisierung einen sehr empfindlichen Nachweis im picomol-Bereich. Anhand des Vergleiches der jeweiligen Flächen unter den resultierenden Kurven können Anhaltspunkte über den relativen Anteil jeder Ladungsgruppe am gesamten N-Glycanmaterial erhalten werden (vgl. Abb. 4.20, S.53: Dionex-Profile, Abb. 4.19, S.51: prozentuale Verteilungen der N-Glycane). Diese Art der Konzentrationsbestimmung ist nur näherungsweise einsetzbar, da durch Oxidation der Glycane am Detektor bei großen Oligosacchariden ein entsprechend höherer Strom erzielt wird als bei kleineren Oligosacchariden der gleichen Molarität.



Abb. 4.20: Dionex-HPAEC-Profile der einzelnen Ladungsgruppen M2 bis M6 im Vergleich zum Profil der gesamten N-Glycane (SP-CD52, unterstes Profil) und dem Profil eines Standardgemisches aus komplexen N-Glycanen mit  $\alpha$ (1-6)-gebundener proximaler Fucose (oberstes Profil). Die y-Achse zeigt die detektierte Signalintensität des gepulsten amperometrischen Detektors (PAD), die x-Achse gibt die Elutionszeit an. Das Standardgemisch enthält diantennäre (*Peak* a), triantennäre (*Peaks* b und c: 2,4- und 2,6-Isomere) und tetraantennäre N-Glycane ohne (d) bzw. mit ein (e), zwei (f) oder drei (g) N-Acetyllactosamin-Einheiten (L). Alle N-Glycane wurden vor der Untersuchung desialyliert. Da die Gruppen M5\*, M5/6 und M6 zusammen nur 10% der Gesamtmenge an N-Glycanmaterial enthielten, wurden hier jeweils 10% des N-Glycanmaterials dieser Ladungsgruppen für die Chromatografie aufgewendet, anstelle von 2% im Falle aller anderen untersuchten Gruppen. Das Profil der Gruppe M5/6 ist aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Profil der Gruppe M6 nicht gezeigt.

Das desialylierte Aliquot des gesamten N-Glycanmaterials ergab ein immer noch hochkomplexes *Peak*muster (Abb. 4.20, unterstes Profil), von dem sich nur wenige Strukturen (ca. 10%) durch Vergleich ihrer Retentionszeiten mit den Retentionszeiten bekannter di-, tri- und tetraantennärer Standards ableiten ließen (Abb.4.20, oberstes Profil). Schon die acht aufgeführten Ladungsgruppen (vgl. Abb. 4.19, S.51, M2-M6) enthielten weit über 50 durch Dionex-HPAEC aufgetrennte *Peaks*. Damit wies die einzige N-Glycosylierungsstelle von SP-CD52 mindestens 50 verschiedene Kohlenhydratseitenketten auf.

### 4.4.3 MALDI/TOF-MS-Analyse der N-Glycane nach MonoQ-Auftrennung

beinhaltete neben beschriebenen Die Strukturanalyse der oben Dionex-HPAEC-PAD-Charakterisierung auch massenspektroskopische (MS)- Analysen der sialylierten und z.T. Endo-ß-Galactosidase-verdauten N-Glycane. Bei der MALDI/TOF (matrix-assisted laser desorption/ ionization time of flight)- Massenspektroskopie wird die zu untersuchende Probe mit einer Matrix cokristallisiert, deren Absorptionsmaximum im Bereich der verwendeten Laserwellenlänge liegt. Im Hochvakuum können durch einen intensiven Impuls des Lasers aus der Oberfläche der cokristallisierten Probe durch Natriumionen-Addition positiv geladene Ionen des ansonsten intakten Moleküls (sogenannte einfach bzw. mehrfach geladene Molekülionen der Masse  $[MW + z * M_{Na}]$ , z = Ladung) freigesetzt werden. Aus der Flugzeit, die die Ionen von der Ionenquelle zum Detektor benötigen, läßt sich ihre genaue Masse berechnen (time of flight: Flugzeit-Massenspektrometer). Detektiert wird der Quotient aus Masse und Ladung (m/z). Die Monosaccharidzusammensetzung der untersuchten Glycane kann dann aus der detektierten Masse abgeleitet werden. Unter Berücksichtigung der bekannten Biosynthesewege der N-Glycane ist eine eingeschränkte Anzahl von Strukturvorschlägen möglich.

Für die MALDI/TOF-Analysen wurden die nativen N-Glycane der Ladungsgruppen M2-M6 verwendet. Auch die Endo-ß-Galactosidase-behandelten Proben wurden mittels MALDI/TOF-MS vermessen. Um eine Verbesserung der Flugeigenschaften der N-Glycane für die MALDI/TOF-MS-Analyse zu erreichen, war eine Derivatisierung der N-Glycane durch Permethylierung erforderlich. Alle Proben wurden für die MALDI/TOF-MS-Analyse deshalb reduziert und permethyliert.

Durch MALDI/TOF-Analyse konnte die Anzahl der Sialinsäuren jeder Ladungsgruppe ebenso wie die Anzahl der Lactosamin-Einheiten eindeutig bestimmt werden, wobei auf diese Weise nur die absolute Menge an Lactosamin-Einheiten erfaßt wurde. Typischerweise wurden fucosylierte und Polylactosamin-enthaltende Strukturen durch die MALDI/TOF-MS-Analyse identifiziert. Über Antennarität bzw. Anzahl der Verzweigungen konnten jedoch keine Aussagen getroffen werden. Die relativen Signalintensitäten der aufgrund von Natriumaddition einfach geladenen Molekülionen innerhalb eines Massenspektrums wurden verglichen und so ihre relativen Mengenverhältnisse bestimmt. Zwischen Molekülionen gleicher Masse, aber unterschiedlicher Struktur konnte dabei nicht unterschieden werden.

Die einzelnen MALDI/TOF-Spektren sind in Abb. 4.21 zusammengefaßt. Tab. 2 (S.57) enthält die so gewonnenen MALDI/TOF-Daten jeder Ladungsgruppen inklusive der ihnen auf Basis von Massenkalkulation zugeordneten Strukturen. Die Ungenauigkeit der zur Abschätzung des Glycangehaltes verwendeten Methode fiel jedoch insbesondere bei den höheren Ladungsgruppen ins Gewicht, da die zunehmende Anzahl der Lactosamin-Einheiten schlechtere Flugeigenschaften der N-Glycane im MALDI-/TOF-MS bewirkte und die relativen Mengenverhältnisse verzerrt wurden.



**Abb. 4.21:** MALDI/TOF-MS-Spektren der Ladungsgruppen M2 bis M6. Die Spektren zeigen die absoluten Signalintensitäten (a.i.; y-Achse) in Abhängigkeit von dem Quotienten aus Masse (m) und Ladung (z) (m/z; x-Achse). Z betrug in diesem Fall [+1], weil Mono-Natriumaddukte gemessen wurden.

Ladungsgruppe <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	% <sup>x</sup>	Berechnete	Gemessene	Struktur <sup>e</sup>
0011			Masse <sup>c</sup>	Masse <sup>d</sup>	
M2	8	1.2	2810.2	2810	= [diant. N-Glycan, 2 NeuAc] - Fuc
15.3%	44	6.7	2984.3	2984	= [-"-]
	26	4.0	3433.8	3433	= [-"-] + 1 L
	4	0.6	3608.0	3607	= [-"-] + 1 L + periph. Fuc
	11	1.7	3883.3	3882	= [-"-] + 2 L
	2	0.3	4057.5	4056	= [-"-] + 2 L + periph. Fuc
	4	0.6	4332.8	4332	= [-"-] + 3 L
	1	0.2	4782.3	4780	= [-"-] + 4 L
M3	2	0.6	3621.1	3621	= [triant. N-Glycan, 3 NeuAc] - Fuc
31.8%	30	9.5	3795.2	3796	= [-"-]
	29	9.2	4244.7	4245	= [-"-] + 1 L
	3	1.0	4418.9	4419	= [-"-] + 1 L + periph. Fuc
	18	5.7	4694.2	4695	= [-"-] + 2 L
	3	1.0	4868.4	4869	= [-"-] + 2 L + periph. Fuc
	9	2.7	5143.7	5144	= [-"-] + 3 L
	1	0.3	5317.9	5319	= [-"-] + 3 L + periph. Fuc
	3	1.0	5593.2	5594	= [-"-] + 4 L
	1	0.3	5767.4	5768	= [-"-] + 4 L + periph. Fuc
	1	0.3	6042.7	6044	= [-"-] + 5 L
M4	1	0.2	4606.1	4604	= [tetraant. N-Glycan, 4 NeuAc]
18.5%	3	0.6	5055.6	5054	= [-"-] + 1 L
	34	6.3	5505.1	5503	= [-"-] + 2 L
	3	0.6	5679.3	5677	= [-"-] + 2L + periph. Fuc
	33	6.1	5954.6	5952	= [-"-] + 3 L
	3	0.6	6128.8	6126	= [-"-] + 3 L + periph. Fuc
	18	3.3	6404.1	6401	= [-"-] + 4 L
	2	0.4	6578.3	6575	= [-"-] + 4 L + periph. Fuc
2.5.4.4	3	0.6	6853.6	6851	$= [-^{-n}] + 5 L$
M4*	1	0.5	4431.9	4430	= [tetraant. N-Glycan, 4 NeuAc] - Fuc
7.4%	34	2.5	4606.1	4604	= [-"-]
	4	0.3	4780.3	4///	$=$ [- $^{-}$ ] + periph. Fuc
	4	3.3	5055.6	5054	= [] + 1 L
	4	0.3	5229.8	5226	= [-"-] + 1 L + periph. Fuc
N/5	22	0.3	5505.1	5503	= [] + 2 L
M5	33	3.2	6316.0	6313	= [tetraant. N-Glycan, 5 NeuAc] +3 L ["] $+ 2$ L + period. Eve
9.6%	13	1.2	6490.2	6484	= [-'-] + 3 L + periph. Fuc
	2/	2.0	0/03.3	0/02	= [] + 4 L
	11	1.1	0939.7	0933	= [] + 4 L + peripri. Fuc
	5	1.1	7213.0	7211	= [] + 5L $= ["] + 5L + periph Eve$
M5*	2	0.3	5417.0	5414	= [] + J L + peripri. Fuc $= [totroopt N Cluser 5 New Acl + 1]$
1 3%	66	10.1	5866 5	5863	= [1 - [1 - [1 - [1 - [1 - [1 - [1 - [1
J /0	00	2.0	6040.7	6035	$\begin{bmatrix} - \begin{bmatrix} - \end{bmatrix} + 2 \end{bmatrix} $ $= \begin{bmatrix} - \end{bmatrix} + 2 \end{bmatrix} + periph Fuc$
	10	0.4	6316.0	6312	- [- ] + 2 L + peripri. Fuc $- [-"_] + 3 I$
	4	0.0	6490 2	6487	= [-] + 3L = [-"-] + 3L + periph Fuc

Ladungsgruppe <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	% <sup>x</sup>	Berechnete	Gemessene	Struktur <sup>e</sup>
			Masse <sup>c</sup>	Masse <sup>d</sup>	
M6	21	0.7	6227.9	6225	= [tetraant. N-Glycan, 6 NeuAc] +2 L
3.2%	4	0.1	6503.3	6500	= [-"-] + 3 L - Fuc
(+2.5%)	32	1.0	6677.4	6674	= [-"-] + 3 L
	4	0.1	6851.6	6848	= [-"-] + 3 L + periph. Fuc
	6	0.2	7038.8	7035	= [-"-] + 3 L + NeuAc?
	18	0.6	7126.9	7123	= [-"-] + 4 L
	3	0.1	7301.1	7297	= [-"-] + 4 L + periph. Fuc
	6	0.2	7488.3	7484	= [-"-] + 4 L + NeuAc?
	3	0.1	7576.4	7572	= [-"-] + 5 L
	3	0.1	7937.5	7933	= [-"-] + 5 L + NeuAc?

<sup>a</sup> Ladungsgruppe nach MonoQ-Trennung der nativen N-Glycane und ihr prozentualer Anteil am gesamten Kohlenhydratgehalt

<sup>b</sup> Prozentualer Anteil der einzelnen anhand ihrer Massen identifizierten Kohlenhydrate an der jeweiligen Ladungsgruppe

<sup>x</sup> Prozentualer Anteil der einzelnen Kohlenhydrate am gesamten N-Glycangemisch

<sup>c</sup> Berechnete mittlere Masse des (M+Na<sup>+</sup>)-Ions

<sup>d</sup> Chemische Masse des (M+Na<sup>+</sup>)-Ions, gemessen in der Originalprobe

<sup>e</sup> zugeordnete Kohlenhydratkomponenten, basierend auf der gemessenen chemischen Masse

**Tab. 2:** MALDI/TOF-MS-Analyse der N-Glycane von SP-CD52 (M+Na<sup>+</sup>). L bezeichnet die zusätzlichen N-Acetyllactosamin-Einheiten (-Galß(1-4)GlcNAc-). Die Tabelle enthält jeweils eine Basisstruktur (siehe rechte Spalte, Klammer), darunter sind die identifizierten Serien mit peripherer Fucosylierung sowie zunehmender Zahl von Lactosamin-Einheiten angegeben.

### 4.4.4 Endo-B-Galactosidase-Verdaus

Die MALDI/TOF-Analyse lieferte ausschließlich Informationen über die absolute Anzahl von Lactosamin-Einheiten der N-Glycane. Diese Lactosamin-Einheiten können aber nicht nur lineare Strukturen ausbilden, sondern auch als Verzweigung an der 6-Position der Galactose vorliegen. Da eine derartige Verzweigung im Gegensatz zu linearen Lactosamin-Einheiten nicht durch Endo-ß-Galactosidase spaltbar ist, geben die gegenüber dem Endo-ß-Galactosidase-Verdau resistenten Lactosamin-Einheiten Aufschluß über vorhandene Verzweigungen. Das Enzym spaltet Lactosamin-Einheiten zwischen Galactose und Glucosamin. Nach dem Verdau fehlte an jedem Arm, der vorher eine oder mehrere Lactosamin-Einheiten getragen hatte, eine Galactose. Das abgespaltene terminale Fragment bestand aus drei Monomeren (Gal-GlcNAc-Gal; m/z = 738). Abb. 4.22 zeigt die Dionex-Profile ausgewählter Ladungsgruppen vor und nach der Spaltung durch Endo-ß-Galactosidase. N-Glycane mit Endo-ß-Galactosidase-gespaltenen Antennen eluieren aufgrund ihrer geringeren Größe im Vergleich zu ungespaltenen N-Glycanen früher. Abb. 4.22 zeigt deutlich, daß in jeder der dargestellten Ladungsgruppen eine Verschiebung zu geringeren Elutionszeiten stattfindet. Jede der Ladungsgruppen enthielt demzufolge spaltbare Lactosamin-Einheiten. Die korrespondierenden MALDI/TOF-MS-Analysen dieser Ladungsgruppen sind in Abb. 4.23 (S.60) wiedergegeben. Eine detaillierte Beschreibung der Ladungsgruppen erfolgt in den Abschnitten 4.5.1 bis 4.5.7 (S.63-70).



Abb. 4.22: Dionex-HPAEC-Profile der desialylierten N-Glycane aus den Ladungsgruppen M2 (a), M3 (b), M4 (c) und M5/6 zusammen mit M6 (d). Das jeweils obere Chromatogramm zeigt das Dionex-Profile einer Ladungsgruppe vor der Spaltung durch Endo-β-Galactosidase, das jeweils untere Chromatogramm das korrespondierende Dionex-Profil der N-Glycane dieser Ladungsgruppe nach der Spaltung. Aufgetragen ist die Intensität des PAD-Signals (y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse).



Abb. 4.23: MALDI/TOF-Spektren der sialylierten N-Glycane aus den ausgewählten Ladungsgruppen M2 (a), M3 (b), M4 (c) und M6 (d) vor Verdau mit Endo- $\beta$ -Galactosidase (links); MALDI/TOF-Spektren der desialylierten N-Glycane aus denselben Ladungsgruppen nach Verdau mit Endo- $\beta$ -Galactosidase (rechts). Die y-Achse zeigt die absoluten Signalintensitäten (a.i.), die x-Achse den Quotienten aus Masse (m) und Ladung (z; z = [+1]). Bei den mit x markierten Signalen der unbehandelten Ladungsgruppe M4 (c) handelt es sich um N-Glycane, bei denen ein Arm durch erhöhte Temperatur während der Derivatisierung abgespalten wurde.

### 4.4.5 Methylierungsanalyse

Die Methylierungsanalyse ermöglicht sowohl die Bestimmung der vorhandenen Kohlenhydratmonomere als auch ihrer Bindungen im N-Glycangemisch anhand der vorkommenden Alditolacetate und ihres Verhältnisses untereinander.

Zur Durchführung einer Methylierungsanalyse wurde ein permethyliertes Aliquot jeder Ladungsgruppe hydrolysiert. Die freigesetzten partiell methylierten Monosaccharide wurden nochmals reduziert und so in die entsprechenden Alditolderivate überführt. Abb. 4.24 zeigt das Reaktionsschema. Auf diese Weise konnte die Komplexität des entstandenen Gemisches verringert werden, da nach der Reduktion keine  $\alpha/\beta$ -Anomeren mehr vorlagen. Die im ursprünglichen Oligosaccharid frei vorliegenden Hydroxylgruppen waren auf dieser Stufe bereits permethyliert (Abb. 4.24a), während die erst bei der Hydrolyse freigesetzten Hydroxylgruppen aus den Bindungen innerhalb des Oligosaccharids stammten und durch Peracetylierung markiert wurden (vgl. Abb. 4.24b). Diese Vorgehensweise ermöglichte eine Unterscheidung zwischen gebundenen und freien Hydroxylgruppen der einzelnen Monosaccharide des Glycans. Das entstandene Gemisch aus derivatisierten Monomeren (Alditole) konnte gaschromatisch aufgetrennt und die einzelnen Alditole per Massenspektroskopie identifiziert werden.



**Abb. 4.24:** Allgemeines Reaktionsschema der Derivatisierungsreaktion von N-Glycanen (**a**) mit anschließender Hydrolyse sowie Peracetylierung (**b**). R1 und R2 bezeichnen die benachbarten Kohlenhydrate des N-Glycans.

Die auf diese Weise entstandenen Alditole der einzelnen Kohlenhydratmonomere unterschieden sich entsprechend ihrer Position im N-Glycan in ihrer Substitution durch Methyl- und Acylgruppen. Abb. 4.25 zeigt exemplarisch ein N-Glycan, bei dem die einzelnen Monomere mit Nummern bezeichnet sind. Die aus einer solchen N-Glycan-Struktur durch Derivatisierung resultierenden Alditole sind darunter in der Methylierungsanalyse-Tabelle (Tab. 3, S.62) mit den entsprechenden Nummern bezeichnet. Die Mengen der einzelnen Alditole sind auf die *core*-Mannose (Abb. 4.25) bezogen. Da die Hydrolyse-Effizienz im Rahmen der Derivatisierungsreaktion für die verschiedenen Kohlenhydratmonomere nicht gleich ist, handelt es sich bei der Methylierungsanalyse nicht um eine exakte Bestimmung der jeweiligen Menge von Alditol-Derivaten, sondern um Näherungswerte.



Abb. 4.25: Zusammenhänge zwischen N-Glycansequenz und daraus resultierenden Alditolderivaten. Jedes Monosaccharid des N-Glycans ist mit einer Nummer (rot) bezeichnet, die das bei der Methylierungsanalyse daraus entstehende Derivat in der Methylierungsanalyse-Tabelle angibt. Die Sialinsäuren wurden bei den im Rahmen der Methylierungsanalyse verwendeten Bedingungen nicht detektiert.

Methylierungsanalyse										
			Ladungsgruppe							
Ursprüngliche Position	Schema	Peracetylierte Derivate	M2	M3	<b>M</b> 4	M4	*M5	M5	*M6	
des Monomers im Glycan	Nr.	Fucitol								
periphere/proximale Fucose	1	2,3,4-Tri-O-methyl-	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2	
		Galacitol								
freie terminale Galactose	2	2,3,4,6-Tetra-O-methyl	0.1	0.3	0.4	0.1	0.1	0.1	0.3	
durch NeuAc/GlcNAc 3-subst. Gal.	3	2,4,6-Tri-O-methyl-	2.1	3.2	5.4	4.0	6.5	4.8	4.7	
durch NeuAc 6-subst. Galactose	4	2,3,4-Tri-O-methyl-	0.5	0.3	0.4	0.3	0.2	0.3	0.3	
verzweigte Galactose	5	2,4-Di-O-methyl-		0.4	0.7	0.3	1.1	1.1	2.0	
		Mannitol								
unverzweigte Mannose	6	3,4,6-Tri-O-methyl-	1.8	0.9	0.2	0.2	0.1	0.2	< 0.1	
$\alpha(2,4)$ -verzweigte Mannose	7	3,6-Di-O-methyl-	< 0.1	0.7	0.9	0.9	1.0	0.9	1.0	
$\alpha(2,6)$ -verzweigte Mannose		3,4-Di-O-methyl-	0.1	0.2	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	
core-Mannose	8	2,4-Di-O-methyl-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
		2-N-Methylacetamido-								
		2-deoxyglucitol								
1. GlcNAc (aus Chitobioseeinheit)		1,3,5,6-Tetra-O-methyl	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	
1. GlcNAc (-´´-), fucosyliert	9	1,3,5-Tri-O-methyl-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
GlcNAc aus L / 2.GlcNac (Chitobiose)	10	3,6-Di-O-methyl-	3.6	5.1	7.8	5.6	8.6	7.1	8.1	
durch Fucose substituiertes GlcNAc (Lewis <sup>X</sup> / VIM2-artiges Motiv)	11	6-O-Methyl-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	

**Tab. 3:** Ergebnisse der Methylierungsanalyse für jedes einzelne Zuckerderivat einer jeden N-Glycan-Ladungsgruppe von SP-CD52. Die Resultate der Methylierungsanalyse wurden mit den chromatografischen HPAEC- und den massenspektroskopischen MALDI/TOF-Daten verglichen. Die Resultate der drei unterschiedlichen Untersuchungsmethoden griffen ineinander und ergänzten sich. Sie werden deshalb gemeinsam abgehandelt.

# 4.5 Strukturanalysen der Oligosaccharide in den einzelnen Ladungsgruppen

### 4.5.1 Ladungsgruppe M2

### a) Anzahl der Lactosamin-Einheiten

Die MALDI/TOF-Analyse der Ladungsgruppe M2 (15% des gesamten N-Glycanmaterials) ergab ein intensives Molekülionensignal bei m/z = 2984 [NeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>3</sub>deoxyHexHexNAc-ol+Na<sup>+</sup>] (vgl. Abb. 4.21, S.56, Ladungsgruppe M2 und Tab. 2, S.57). Diese Masse entsprach einer proximal fucosylierten diantennären Struktur, die aufgrund ihrer zweifachen Ladung durch vollständige terminale Sialylierung in der Ladungsgruppe M2 eluierte. Zusätzlich trat eine Serie aus Molekülionen abnehmender Intensität (m/z = 3433, 3882 und 4332) auf, die untereinander eine Massendifferenz von m/z = 449 (Lactosamin-Einheit) aufwiesen.

Im betreffenden Dionex-Profil war in dieser Ladungsgruppe eine Serie von *Peaks* zu sehen, die in fast gleichen, geringfügig abnehmenden Abständen von der Säule eluierten (Abb. 4.20, S.53, Profil M2, *Peak* 2a-e). Der erste *Peak* (2a) - ohne Lactosamin-Einheit - eluierte gleichzeitig mit dem diantennären Standard (Abb. 4.20, oberstes Profil, *Peak* a). *Peaks*, die in sich wiederholenden Abständen eluierten, ließen sich auch beim tetraantennären Standard ohne bzw. mit ein, zwei oder drei Lactosamin-Einheiten detektieren (Abb. 4.20, oberstes Profil, *Peaks* d-g). Daraus ließ sich ableiten, daß es sich um eine Serie diantennärer Strukturen handelte, die keine, ein, zwei oder drei Lactosamin-Einheiten besaßen.

Die Methylierungsanalyse (Tab. 3, S.62) belegte dieses Ergebnis, da keine 2,4- oder 2,6-verzweigte Mannose (3,6- oder 3,4-Di-O-methyl-mannitol) detektiert werden konnte, was das Vorkommen von Strukturen höherer Antennarität ausschloß. Zusätzlich wurde durch MALDI/TOF-MS (Abb. 4.21, S.56, Abb. 4.23, S.60, jeweils Spektrum M2) ein schwaches Signal bei m/z = 2810 detektiert, das als disialylierte diantennäre Struktur ohne proximale Fucose identifiziert werden konnte (vgl. Tab. 2, S.57).

### b) Periphere Fucosylierungen

Eine weitere Serie von *Peaks* erschien jeweils mit einer Intensität von ca. 10% und einem Massenzuwachs von m/z = 174 (Deoxyhexose) im Vergleich zu den oben beschriebenen großen Molekülionensignalen mit mindestens einer Lactosamin-Einheit (m/z = 3433, 3882 und 4332). Daraus ließ sich eine zusätzliche periphere Fucosylierung eines GlcNAcs dieser N-Glycane ableiten. Die Methylierungsanalyse bestätigte diese Annahme, da entsprechende Mengen von 1,3,4-trisubstituiertem GlcNAc (6-O-Methyl-alditol) gefunden wurden. Alle im Rahmen der Methylierungsanalyse

identifizierten GlcNAcs waren ausschließlich 4-substituiert (3,6-Di-O-methyl-alditol bzw. 6-O-Methyl-alditol). Die N-Acetyllactosamin-Antennen aller Ladungsgruppen waren somit ausschließlich vom Typ II, bei dem GlcNAc 4-substituiert ist. Bei Typ I-Antennen liegt das GlcNAc dagegen 3-substituiert vor. Da keine Typ I-Antennen vorkamen, konnte darüber hinaus auch das Auftreten von Lewis<sup>A</sup> – Motiven (Fucosylierung an Position 4 des GlcNAcs) ausgeschlossen werden, da diese Position in Typ II-Antennen bereits durch Gal besetzt ist. Bei den zusätzlichen Fucosylierungen handelte es sich demzufolge entweder um Sialyl-Lewis<sup>X</sup> – (NeuAca(2-3)Gala(1-4)[Fuca(1-3)]GlcNAc-R) oder um VIM2-artige sialylierte Motive (NeuAca(2-3)Gala(1-4)GlcNAca(1-3)-Gala(1-4)[Fuca(1-3)]GlcNAc-R).

Peripher fucosylierte Satelliten*peaks* und somit Sialyl-Lewis<sup>X</sup>/VIM2-Motive traten in der MALDI/TOF-Analyse bei allen untersuchten Ladungsgruppen nur bei Molekülionen auf, die mindestens eine Lactosamin-Einheit trugen. In der Dionex-HPAEC-Trennung eluieren fucosylierte Strukturen unter den beschriebenen Bedingungen vor den nichtfucosylierten Basisstrukturen (Nimtz und Conradt, 1993), sie waren aufgrund ihres geringen Vorkommens (ca. 10% der Einzelsignale) aber dort nicht identifizierbar. Um weitere Informationen über die peripheren Fucosylierungen zu erhalten, wurde zusätzlich ein Endo-ß-Galactosidase-Verdau der desialylierten Ladungsgruppe M2 durchgeführt. Die derivatisierten Edukte wurden wieder mittels MALDI/TOF-MS und Dionex-HPAEC untersucht: Das MALDI/TOF-Spektrum der verdauten Probe (Abb. 4.23a, S.60: links vor, rechts nach der Spaltung) zeigt nach der Spaltung ein dominantes Molekülion bei m/z = 2262[Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>3</sub>deoxyHexHexNAc-ol+Na<sup>+</sup>], entsprechend einer desialylierten diantennären Basisstruktur ohne Lactosamin-Einheiten.

Die Detektion zweier weiterer Signale bei m/z = 2058 (2262 minus ein Hex) und 1854 (2262 minus zwei Hex) ließ die Abspaltung von mindestens ein bzw. zwei Lactosamin-Einheiten erkennen, da eine Galactose (m/z = 204) bzw. zwei Galactosen (zwei Hexosen, m/z = 408) fehlten. Auffälligerweise war kein fucosyliertes terminales Trimer (Gal-GlcNAc-Gal, m/z = 738) detektierbar. Die in dem Bereich von m/z = 700-800 detektierten Signale wiesen alle andere Werte auf. Fucosylierte Strukturen wurden also entweder nicht gespalten – in diesem Fall hätte man aber intakte fucosylierte N-Glycane nach der Spaltung im MALDI/TOF-MS sehen müssen - oder es gab gar keine terminal fucosylierten Strukturen (Lewis<sup>X</sup>), da die Fucosylierung am zweiten GlcNAc von hinten saß (VIM2-Motiv).

Das Dionex-Profil der desialylierten N-Glycane aus Ladungsgruppe M2 vor und nach dem Endo-ß-Galactosidase-Verdau (Abb. 4.22a, S.59, oberes Profil vor dem Dau, unteres Profil nach dem Dau) zeigte, daß nur das diantennäre N-Glycan (Abb. 4.20, S.53, M3, *Peak* 2a) nicht verdaut wurde. Alle anderen *Peaks* eluierten nach dem Verdau wesentlich früher und enthielten demzufolge Lactosamin-Einheiten. Aufgrund der geringen Menge von peripheren Fucosylierungen konnten durch Dionex-HPAEC-Analyse keine Hinweise auf resistente *Peaks* ermittelt werden.

#### c) Sialylierungen

Die Methylierungsanalyse der Ladungsgruppe M2 (Tab. 3, S.62) lieferte Daten über das Verhältnis aus 2,3,4- und 2,4,6-Tri-O-methyl-galacitol entsprechend 1,6- bzw. 1,3-disubstituierter Galactose sowie über die Menge von freier terminaler Galactose (2,3,4,6-Tetra-O-methylgalacitol). Unter Berücksichtigung der Anzahl von 3-substituierten Galactosen in den Lactosamin-Einheiten konnte die Menge an  $\alpha$ (2-6)-gebundener Sialinsäure auf ca. 28% geschätzt werden.

Die Abschätzung wurde wie folgt durchgeführt: Gruppe M2 enthielt diantennäre Strukturen mit durchschnittlich 1,5 Lactosamin-Einheiten (bezogen auf die Höhe der einzelnen *Peaks* im MALDI/TOF-MS). Jeder Arm ohne Lactosamin-Einheit besaß eine Galactose, so daß rein rechnerisch insgesamt 3,5 (= 2 + 1,5) 3-substituierte Galactosen resultierten. 1,5 Galactosen (43%) davon befanden sich in den Lactosamin-Einheiten. Sie mußten für die Abschätzung des Verhältnisses der terminal substituierten Galactosen abgezogen werden. Der durch die Methylierungsanalyse ermittelte Wert für die 3-substituierte Galactose (2,4,6-Tri-O-methyl-galacitol) betrug 2,1. Davon mußten also 43% (0,9) abgezogen werden, so daß ein Wert von 1,2 übrig blieb. Um alle terminalen sowie terminal substituierten Galactosen zu berücksichtigen, wurde der Wert für die freie Galactose (2,3,4,6-Tetra-Omethyl-galacitol = 0,1) und 6-substituierte Galactose (2,3,4-Tri-O-methyl-galacitol = 0,5) addiert; man erhielt einen Gesamtwert von 1,8 für alle terminalen bzw. Sialinsäure-substituierten Galactosen. Bezogen auf die Einzelwerte waren 28% aller terminalen Galactosen aus Ladungsgruppe M2 durch Sialinsäure in  $\alpha$ (2-6)-Position substituiert, 66% waren  $\alpha$ (2-3)-substituiert und 6% lagen frei vor.

Ein Verdauexperiment unter Verwendung von Sialidase aus *Newcastle Disease virus*, die spezifisch Sialinsäure in  $\alpha(2-3)$ -Bindung abspaltet, im Vergleich zu  $\alpha(2-3)$ - und  $\alpha(2-6)$ -spaltender Sialidase aus *Vibrio cholerae* mit anschließender HPAEC-PAD-Analyse bestätigte annähernd diese Verteilung:  $\alpha(2-6)$ -gebundene Sialinsäure lag zu ca. 40% vor (nicht gezeigt). In diesem Fall wurde jedoch die Menge an abgespaltener Sialinsäure aus allen Ladungsgruppen ohne Berücksichtigung der freien terminalen Sialinsäure berechnet. Beide Methoden der Mengenabschätzung stellen keine absoluten Quantifizierungen dar, sprechen aber für eine Substitution mit Sialinsäure überwiegend in  $\alpha(2-3)$ -Position.

### 4.5.2 Ladungsgruppe M3

Die Ladungsgruppe M3 enthielt 32% des gesamten N-Glycanmaterials. Das größte Molekülionensignal bei m/z = 3795 entsprach der Masse nach einem triantennären trisialylierten N-Glycan [NeuAc<sub>3</sub>Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>4</sub>deoxyHexHexNAc-ol+Na<sup>+</sup>] (vgl. Abb. 4.21, S.56, Ladungsgruppe M3 sowie Tab. 2, S.57). Die Serie der im MALDI/TOF-MS identifizierten Molekülionen (m/z = 3796, 4245, 4695, 5144, 5594 und 6044) wies jeweils einen Massenunterschied von m/z = 449 auf, was auf eine Anzahl von null bis fünf Lactosamin-Einheiten (L) schließen ließ. Jedes Signal mit Ausnahme des ersten ohne Lactosamin-Einheit wurde wieder von einem Satelliten mit einer Massendifferenz von

m/z = 174 und einer Intensität von ca. 10%, bezogen auf den jeweiligen Hauptpeak, begleitet. Das Auftreten der Satelliten*peaks* konnte wiederum als periphere Fucosylierung (sLe<sup>X</sup>-/VIM2-Motiv) gedeutet werden. Aus der Dionex-HPAEC-Analyse ließ sich ableiten, daß jeweils Paare aus triantennären Isomeren auftraten. Der erste Peak (Abb. 4.20, S.53, Profil M3, Peak 3a) coeluierte mit dem Peak b des Standards (2,4-verzweigtes triantennäres N-Glycan vom Typ II). Der zweite Peak (3a<sup>^</sup>) besaß die gleiche Retentionszeit wie Peak c des Standards (2,6-verzweigtes triantennäres N-Glycan vom Typ II). Die Peaks 3a bis 3e eluierten in annähernd zweiminütigen Abständen voneinander, wie es für eine wachsende Anzahl von Lactosamin-Einheiten gemäß den MALDI/TOF-MS-Ergebnissen zu erwarten war. Jeder Peak wurde von seinem 2,6-verzweigten Isomer begleitet, 3a von 3a', 3b von 3b' etc.. Die Retentionszeiten sprachen dafür, daß es sich um N-Glycane vom Typ II handelte, da Typ I-N-Glycane eine wesentlich geringere Retentionszeit besitzen (H.S. Conradt, persönliche Mitteilung). In der Methylierungsanalyse fanden sich die unverzweigte Mannose (3,4,6-Tri-O-methyl-mannitol), 2,4-verzweigte Mannose (3,6-Di-O-methyl-mannitol) und 2,6-verzweigte Mannose (3,4-Di-O-methyl-mannitol) in einem Verhältnis von 0.9 : 0.7 : 0.2 (vgl. Tab. 3, S.62). Auch dieses Ergebnis dokumentierte wiederum eine triantennäre Grundstruktur mit überwiegend 2,4verzweigten Isomeren.

Ein desialyliertes Aliquot der Ladungsgruppe M3 wurde mit Endo-ß-Galactosidase verdaut. Die MALDI/TOF-MS Analyse (Abb. 4.23b rechts, S.60) nach dem Dau ergab eine Serie von vier Molekülionensignalen, die 75% der Oligosaccharide repräsentierten und für die sich folgende Strukturen berechnen ließen:

m/z = 2712 [Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>4</sub>deoxyHexHexNAc-ol+Na<sup>+</sup>, triantennär], 2508 [triantennär minus Hex], 2303 (triantennär minus zwei Hex] und 2100 [triantennär minus drei Hex]. Die drei Signale mit m/z = 2508, 2303 und 2100 resultierten aus der Spaltung von ein, zwei oder drei lactosamintragenden Antennen. In der Methylierungsanalyse wurde darüber hinaus verzweigte, 1,3,6-substituierte Galactose (2,4-Di-O-methyl-galacitol) detektiert, die über 10% der Galactosederivate ausmachte. Eine Abschätzung unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Lactosamingehalts der Antennen ergab, daß etwa 16% der Galactosen in den Antennen eine Verzweigung trugen.

Verzweigte Antennen werden nicht von Endo-ß-Galactosidase aus *Bacteroides fragilis* gespalten (Leppänen, Dissertation 1997). Das MALDI/TOF-Spektrum der mit Endo-ß-Galactosidase behandelten Gruppe M3 (Abb. 4.23b rechts, S.60) bestätigte dies. Es wurden zwei zusätzliche Serien von Molekülionensignalen detektiert: die erste Serie umfaßte m/z = 3611 (die Masse entsprach den berechneten Strukturen: diantennär plus drei L, triantennär plus zwei L oder tetraantennär plus L, ungespalten), 3418 (3611 minus Hex) und 3214 (3611 minus zwei Hex). Die zweite Serie lief von m/z = 3162 (diantennär plus zwei L, triantennär plus L oder tetraantennär, ungespalten), 2958 (3162 minus Hex) und 2754 (3162 minus zwei Hex). Diese beiden Serien enthielten ungespaltene Lactosamin-Einheiten, wie sie nur im Falle von Verzweigungen, 6-substituiertem GlcNAc oder Fucosylierungen an der Spaltungsstelle auftreten können (Leppänen, 1997). Die Dionex-Profile vor

und nach dem Dau (Abb. 4.22b, S.59) zeigten, daß zwar ein Großteil der *Peaks* nach dem Verdau eher eluierte, so daß diese *Peaks* N-Glycane mit linearen und somit verdaubaren Lactosamin-Einheiten enthalten haben mußten. Ein geringerer Anteil ließ sich jedoch nicht spalten und eluierte auch nach der Enzymbehandlung an der gleichen Stelle wie vor dem Verdau, was wieder auf Endo-ß-Galactosidaseresistente Verzweigungen hindeutete. Die Abschätzung von freier terminaler Galactose (2,3,4,6-Tetra-O-methyl-galacitol), 1,3-substituierter (2,4,6-Tri-O-methyl-galacitol) und 1,6-substituierter (2,3,4-Tri-O-methyl-galacitol) Galactose (vgl. Tab. 3, S.62) sprach für etwa 78%  $\alpha$ (2-3)-gebundene Sialinsäure sowie je 11%  $\alpha$ (2-6)-gebundene Sialinsäure und freie terminale Galactose in dieser Fraktion. Die Detektion von freier terminaler Galactose in der Methylierungsanalyse war konsistent mit dem Vorliegen von verzweigten – also vierarmigen - Antennen in der ansonsten triantennären, trisialylierten Ladungsgruppe.

### 4.5.3 Ladungsgruppe M4

Die sich in der MonoQ-Elution anschließende Ladungsgruppe M4 enthielt ca. 20% der gesamten N-Glycane. Im MALDI/TOF-Spektrum der Fraktion (Abb. 4.21, S.56, M4) wurde eine Reihe von Molekülionensignalen detektiert, deren Massen sich jeweils um m/z = 449 unterschieden, entsprechend tetraantennären vierfach sialylierten Strukturen mit zwei bis fünf Lactosamin-Einheiten (Hex<sub>9-12</sub>HexNAc<sub>7-10</sub>deoxyHexHexNAc-ol+Na<sup>+</sup>). Bis auf den *Peak* mit m/z = 5054 wurde jeder *Peak* von einem um m/z = 174 vergrößerten Satelliten begleitet, welcher auch in dieser Ladungsgruppe wieder auf eine periphere Fucosylierung schließen ließ (vgl. Tab. 2, S.57). Im entsprechenden Dionex-Profil waren zwei *Peaks* erkennbar (vgl. Abb. 4.20, S.53; *Peak* 4a, 4b), die mit den tetraantennären Standard*peaks* (Abb. 4.20, oberes Standardprofil; *Peak* f: zwei L, *Peak* g: drei L) coeluierten. Das mittels Methylierungsanalyse bestimmte Verhältnis der Mannose (3,6-Di-O-methyl-mannitol) und 2,6-verzweigte Mannose (3,4-Di-O-methyl-mannitol)) betrug 0.2 : 0.9 : 0.9. Dieses Verhältnis deutete ebenfalls auf überwiegend tetraantennäre Strukturen hin, da nur wenig unverzweigte Mannosen detektiert wurden. Die verzweigten Mannose auf.

In dieser Fraktion fand sich die maximale Menge von 1,3,6-trisubstituierter Galactose (2,4-Di-Omethyl-galacitol, ca. 20% der Galactosederivate), so daß ein erheblicher Anteil der Antennen verzweigt vorliegen mußte. Zur Überprüfung wurde ein Aliquot der Fraktion mit Endo-ß-Galactosidase verdaut sowie reduziert und derivatisiert. Die MALDI/TOF-MS-Analyse der verdauten Probe (Abb. 4.22c, rechte Seite) ergab eine Serie aus Molekülionensignalen bei m/z = 3162 (Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>5</sub>deoxyHexHexNAc-ol+Na<sup>+</sup> = diantennär plus zwei L, triantennär plus L oder tetraantennär, ungespalten), 2958 (3162 minus Hex), 2753 (3162 minus zwei Hex), 2549 (3162 minus
drei Hex) und 2345 (3162 minus vier Hex), die aus der Spaltung von zwei bis vier Lactosamin-Einheiten resultierten.

Zudem fand sich noch eine weitere Serie aus vier *Peaks* mit m/z = 3611 (3162 plus L), 3407 (3611 minus Hex), 3203 (3611 minus zwei Hex) und 2999 (3611 minus drei Hex), bei der eine Lactosamin-Einheit nicht verdaut worden war.

Daneben trat eine kleinere Serie mit Signalen bei m/z = 4061 (3162 plus zwei L), 3857 (4061 minus Hex), 3653 (4061 minus zwei Hex) auf, die von N-Glycanen mit zwei intakten, unverdauten Lactosamin-Einheiten stammten. Das Auftreten von solchen unverdauten Lactosamin-Einheiten wies wieder deutlich auf verzweigte Strukturen auch in der Ladungsgruppe M4 hin.

In den korrespondierenden Dionex-Profilen der mit Endo-ß-Galactosidase behandelten N-Glycane (Abb. 4.22c, S.59) eluierten zwar fast alle *Peaks* im Vergleich zu unbehandelten N-Glycanen mit geringeren Retentionszeiten, ein Zeichen für kleinere und damit gespaltene Strukturen. Die meisten N-Glycane enthielten demzufolge neben den Verzweigungen auch noch spaltbare Lactosamin-Einheiten.

#### 4.5.4 Ladungsgruppe M4\*

Während der MonoQ-Trennung eluierte die Ladungsgruppe M4\* sehr dicht hinter der Ladungsgruppe M4. Ihr Anteil an dem gesamten N-Glycanmaterial betrug 7%. Die MALDI/TOF-MS-Analyse eines Aliquots von M4\* (Abb. 4.21, S.56) ergab, daß es sich laut Massenkalkulation auch bei dieser Gruppe tetrasialylierte, wahrscheinlich tetraantennäre Fraktion eine handelte. Drei große um Molekülionensignale mit m/z = 4604 (NeuAc<sub>4</sub>Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>5</sub>deoxyHexHexNAc-ol+Na<sup>+</sup>), 5054 (4604 plus ein L) und 5503 (4604 plus zwei L) konnten detektiert werden. Jedes Signal wurde wieder von einem um m/z = 174 größeren Satelliten begleitet, der ungefähr 10% der Signalintensität des betreffenden großen Peaks besaß, ein Ergebnis, das auf das Vorliegen von peripheren Fucosen auch in dieser Ladungsgruppe hindeutete. Da periphere Fucosylierungen in allen anderen Gruppen nur bei Strukturen auftraten, die über mindestens eine zusätzliche Lactosamin-Einheit verfügten, handelte es sich im Fall des Signals bei m/z = 4604 eventuell um ein triantennäres N-Glycan mit einer Verzweigung. Durch vollständige Sialylierung sowohl an den drei Antennen als auch an der 3-Hydroxygruppe der in 6-Position verzweigten Galactose würde eine peripher fucosylierte Tetrasialostruktur resultieren (m/z = 4777), die aber trotzdem ein VIM2-Motiv tragen könnte.

Im Vergleich zur Ladungsgruppe M4 besaß die Gruppe M4\* wesentlich kürzere Antennen (maximal zwei Lactosamin-Einheiten laut MALDI/TOF-Analysen im Vergleich zu zwei bis fünf Lactosamin-Einheiten in Ladungsgruppe M4) und einen geringeren Anteil an Verzweigungen in Form der 1,3,6-trisubstituierten, verzweigter Galactose (2,4-Di-O-methyl-galacitol; vgl. Tab. 3, S.62). Laut Abschätzung des Anteils an verzweigter Galactose in M4\* lagen nur 9% der Antennen verzweigt vor, im Unterschied zu 20% der Antennen in M4. Diese Unterschiede in der Antennarität fanden ihre

Entsprechung in den zugehörigen Dionex-Profilen (vgl. Abb. 4.20, S.53, Profil M4 und M4\* sowie Standardprofil). Die *Peaks* der Gruppe M4\* eluierten wesentlich früher und waren demzufolge kürzer. Auch die tetraantennären Strukturen ohne (*Peak* 4\*a) und mit einer Lactosamin-Einheit (*Peak* 4\*b) konnten im Chromatogramm durch Vergleich mit den Standard*peaks* d (tetraantennär ohne L) und e (tetraantennär plus ein L) identifiziert werden (oberes Profil). Die Ladungsgruppe M4 wurde also durch die MonoQ-Fraktionierung in zwei Untergruppen aufgetrennt: die Gruppe M4 mit längeren, verzweigten Antennen und der niedrigeren Ladungsdichte eluierte vor der Gruppe M4\*, bei der sich die gleiche Anzahl von Ladungen auf kürzere N-Glycanketten verteilte. Der höhere Anteil an Verzweigungen in Ladungsgruppe M4 wurde auch durch eine größere Menge an freier terminaler Galactose dokumentiert. Immerhin lagen in Gruppe M4 11% der terminalen Galactosen unsubstituiert vor, während der Anteil in Ladungsgruppe M4\* bei nur 3% lag. Der Anteil der Sialinsäuresubstitution in 6-Position war in beiden Gruppen ungefähr gleich und betrug durchschnittlich 9%.

#### 4.5.5 Ladungsgruppe M5

Die Ladungsgruppe M5, die 10% der gesamten SP-CD52-N-Glycane umfaßte, enthielt laut Massenkalkulation im Rahmen der MALDI/TOF-MS-Analyse (Abb. 4.21, S.56, M5) pentasialylierte, tetraantennäre N-Glycane mit drei bis fünf Lactosamin-Einheiten (m/z = 6313 (NeuAc<sub>3</sub>Hex<sub>10</sub>-HexNAc<sub>8</sub>deoxyHexHexNAc-ol+Na<sup>+</sup>), 6762 (6313 plus L) und 7211 (6313 plus zwei L). In der Methylierungsanalyse (Tab. 3, S.62) fand sich in dieser Gruppe der höchste Anteil an 1,3-disubstituierter Galactose (2,4,6-Tri-O-methyl-galacitol), die aus den Lactosamin-Einheiten sowie von Galactosen stammte, die in 3-Position mit Sialinsäure substituiert waren. Durchschnittlich waren in dieser Gruppe vier Lactosamin-Einheiten und eine Verzweigung vorhanden. Der Anteil der Sialinsäuresubstitution in 6-Position nahm zu den höheren Ladungsgruppen hin weiter ab, nur noch 5% der terminalen Galactosen waren in 6-Position mit Sialinsäure substituiert, und nur 3% lagen frei vor.

Darüber hinaus stand die verzweigte 1,3,6-trisubstituierte Galactose (2,4-Di-O-methyl-galacitol) im Verhältnis 1 : 1 zur 1,2,4-trisubstituierten Mannose (*core*-Mannose, 2,4-Di-O-methyl-mannitol), so daß auf fast jedes N-Glycan eine Verzweigung kam. Da es sich laut MALDI/TOF-MS um eine pentasialylierte Struktur handelte, mußte an diesem zusätzlichen Arm die fünfte Sialinsäure lokalisiert sein. Freie terminale Galactose kam nur in Spuren vor. Beim Vergleich der Dionex-Profile von Ladungsgruppe M4 und M5 (Abb. 4.20, S.53, Profil M4 und M5) fiel auf, daß die Elutionszeiten von *Peak* 4b und 5a, 4c und 5b sowie 4d und 5c identisch waren. Bei *Peak* 5a, 5b und 5c der Ladungsgruppe M5 (entsprechend m/z = 6313, 6762 und 7211 in der MALDI/TOF-Analyse) handelte es sich wahrscheinlich um die hier vollständig sialylierten verzweigten N-Glycane, die in ihrer tetrasialylierten Form (entsprechend m/z = 5952, 6401 und 6851) schon in Ladungsgruppe M4 vorkamen. Auch in Ladungsgruppe M5 fanden sich in der MALDI/TOF-Analyse die um m/z = 174

größeren Satelliten*peaks* der korrespondierenden peripher fucosylierten Strukturen. Diese *Peaks* besaßen ca. 30% der Intensitäten der nichtfucosylierten Molekülionen (vgl. Tab. 2, S.57). Eine entsprechend höhere Menge an Fucose konnte auch in der Methylierungsanalyse detektiert werden (Tab. 3, S.62).

### 4.5.6 Ladungsgruppe M5\*

Ladungsgruppe M5\*, die dicht hinter M5 bei der MonoQ-Trennung eluierte, enthielt laut Dionex-Analyse mit 4% des gesamten Glycanmaterials weniger als die Hälfte von M5. Die N-Glycane besaßen aber ähnliche Eigenschaften und wichen nur bezüglich der Länge der Antennen von den Strukturen der Ladungsgruppe M5 ab. Die Massenkalkulation ergab für Ladungsgruppe M5 rechnerisch tetraantennäre Pentasialostrukturen mit drei bis fünf Lactosamin-Einheiten (also pentaantennäre N-Glycane mit zwei bis vier L), während in Ladungsgruppe M5\* rein rechnerisch tetraantennäre Pentasialostrukturen mit zwei und drei Lactosamin-Einheiten überwogen. Die Methylierungsanalyse bestätigte dieses Ergebnis, da in Gruppe M5\* weniger 1,4-disubstituiertes GlcNac (3,6-Di-O-methyl-2-N-methylacetamido-2-deoxyglucitol aus den Lactosamin-Einheiten) detektiert werden konnte als in Gruppe M5.

Auch für diese Gruppe wurde durch die Methylierungsanalyse eine größere Menge an Fucose ermittelt, was durch Vergleich der Molekülionenintensitäten im MALDI/TOF-MS bestätigt wurde. Freie terminale Sialinsäure lag nur in geringer Menge vor, 8% der Sialinsäuren waren  $\alpha$ (2-6)-gebunden.

#### 4.5.7 Ladungsgruppen M5/6 und M6

Durch MALDI/TOF-MS-Analyse der beiden Ladungsgruppen M5/6 und M6, die zusammen ca. 6% der N-Glycane enthielten, wurden hexasialylierte Strukturen identifiziert. Da sich die Dionex-Profile sowie alle anderen Daten der beiden Ladungsgruppen stark ähnelten, wird hier nur auf Gruppe M6 eingegangen. Das MALDI/TOF-Signal mit der geringsten Masse bei m/z = 6225 (Abb. 4.21, S.56, Spektrum M6 und Tab. 2, S.58) konnte als hexasialylierte, tetraantennäre Struktur mit zwei zusätzlichen Lactosamin-Einheiten gedeutet werden (NeuAc<sub>6</sub>Hex<sub>9</sub>HexNAc<sub>7</sub>deoxyHexHexNAc-ol+Na<sup>+</sup>). Diese zusätzlichen Lactosamin-Einheiten mußten terminal - also verzweigt und damit hexaantennär - vorliegen, um eine Bindung der insgesamt sechs Sialinsäuren an sechs Arme zu ermöglichen. Die Methylierungsanalyse bestätigte dieses Ergebnis, da die verzweigten Galactosen (2,4-Di-O-methyl-galacitol) zur *core*-Mannose (2,4-Di-O-methyl-mannitol) im Verhältnis 2 : 1 auftraten.

Die folgenden Signale bei m/z = 6674 (6225 plus L), 7123 (6225 plus zwei L) sowie 7572 (6225 plus drei L) trugen jeweils eine Lactosamin-Einheit mehr, so daß hexaantennäre Hexasialostrukturen mit maximal drei *zusätzlichen* Lactosamin-Einheiten detektiert wurden (vgl. Tab. 2, S.57). Neben diesen Signalen, die 75% des Spektrums ausmachten, traten aber noch drei weitere Signale (insgesamt 15% der gesamten Signalintensität) bei m/z = 7035, 7484 und 7933 auf. Diese drei Signale ließen sich durch eine weitere Sialinsäure erklären, die eine Massendifferenz von je m/z = 361 zu m/z = 6674, 7123 und 7572 verursachte. In Gruppe M6 lagen somit auch heptasialylierte Strukturen vor.

Für die Ladungsgruppen M5, M5\*, M5/6 und M6 wurden Aliquots der derivatisierten, permethylierten Proben auf das Vorkommen von Di- bzw. Polysialinsäuren (NeuAc $\alpha$ (2-8)NeuAc $\alpha$ (2-x)) nach der Methode von Inoue und Matsumura (1979) untersucht. Dazu wurden die Aliquots schonend hydrolysiert, reacetyliert und mittels GC/MS auf das Vorkommen von 2,8-di-O-acetylierten Sialinsäurederivaten überprüft. Diese Derivate sollten beim Vorliegen von Polysialinsäuren detektierbar sein. In keiner der untersuchten Ladungsgruppen konnten nennenswerte Mengen detektiert werden (nicht gezeigt).

Das Dionex-Profil (Abb. 4.20, S.53, Profil M6) der Ladungsgruppe M6 enthielt eine Reihe von *Peaks*, deren Abstände (ca. eine Minute) sich mit steigender Retentionszeit verringerten.

Das Auftreten derartiger Serien von *Peaks* deutete auf Strukturen mit einer hohen Anzahl von Lactosamin-Einheiten hin, (vgl. Abb. 4.20, S.53, Profile M2 und M3). Der gemeinsame Endo-ß-Galactosidase-Dau von M5/6 und M6 führte bei der MALDI/TOF-MS-Analyse (Abb. 4.23d, S.60, rechtes Spektrum) zu drei Serien von Molekülionen, die durch den Verdau von tetraantennären Strukturen mit verzweigten Lactosamin-Einheiten erklärt werden konnten. Jede einzelne dieser Serien wurde durch die Spaltung um bis zu vier Galactosen verkürzt.

Die erste Serie beinhaltete nach dem Verdau Signale bei m/z = 3162 (Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>5</sub>deoxyHexHexNAc-ol+Na<sup>+</sup> = diantennär plus zwei L, triantennär plus L oder tetraantennär, ungespalten), 2958 (3162 minus Hex), 2753 (3162 minus zwei Hex), 2548 (3162 minus drei Hex) und 2344 (3162 minus vier Hex). In diesem Fall mußten die zwei zusätzlichen Antennen mitabgespalten worden sein. Da die Verzweigungen nicht von der Endo-ß-Galactosidase gespalten werden, mußten die Verzweigungen hinter den Spaltstellen gesessen haben.

Die zweite Serie reichte von m/z = 3611 (3162 plus L), 3407 (3611 minus Hex), 3203 (3611 minus zwei Hex), 2999 (3611 minus drei Hex) bis 2795 (3611 minus vier Hex); hier war nur eine Verzweigung mitabgespalten worden.

Die dritte Serie besaß noch beide Verzweigungen und enthielt m/z = 4060 (3162 plus zwei L, nur in Spuren vorhanden), 3856 (4060 minus Hex), 3652 (4060 minus zwei Hex), 3448 (4060 minus drei Hex) und 3244 (4060 minus vier Hex). Das zugehörige Dionex-Profil des Endo- $\beta$ -Galactosidase-Daus (Abb. 4.22d, S.59) zeigte eine vollständige Verschiebung der *Peaks* von hohen Retentionszeiten vor dem Verdau zu niedrigen Retentionszeiten nach dem Verdau. Dies bestätigte, daß fast alle Strukturen

spaltbare Lactosamin-Einheiten neben den Verzweigungen enthielten. Die Menge an  $\alpha(2-6)$ substituierter Sialinsäure im Verhältnis zu  $\alpha(2-3)$ -substituierter Sialinsäure war auch in Ladungsgruppe M6 sehr gering.

### 4.5.8 Überblick über die Ergebnisse der N-Glycan-Analyse

Aus den Daten aller durchgeführten Analysen ließen sich zur Struktur der SP-CD52-N-Glycane folgende Schlüsse ziehen:

Es handelte sich ausschließlich um komplexe N-Glycane vom Typ II mit [Galß(1-4)GlcNAc]-Einheiten, da kein 3-substituiertes GlcNAc gefunden wurde. Ein Teil der N-Glycane waren peripher fucosyliert. Das Auftreten von Fucosylierungen bei Strukturen mit mindestens einer Lactosamin-Einheit sowie Endo-ß-Galactosidase-Verdaus mit anschließender MALDI/TOF-MS-Analyse ergaben, daß es sich wahrscheinlich um ein VIM2-artiges Motiv handelte. In den unteren Ladungsgruppen (bis M4) lag der Anteil an peripher fucosylierten N-Glycanen bei ca. 10-15% und nahm in den Gruppen mit höherer Ladung bis auf ca. 30% zu. Der Sialylierungsgrad der SP-CD52-N-Glycane war sehr hoch, es wurde nur wenig freie terminale Galactose bei der Methylierungsanalyse gefunden. Am häufigsten kamen unsubstituierte Galactosen in den Ladungsgruppen M3 (ca. 12%) und M4 (ca. 11%) vor. In diesen beiden Gruppen konnten auch nicht unerhebliche Mengen an Verzweigungen nachgewiesen werden. Das Verhältnis von  $\alpha(2-3)$ - zu  $\alpha(2-6)$ -gebundener Sialinsäure betrug auf alle Ladungsgruppen bezogen insgesamt etwa 4-5:1. Bezogen auf die einzelnen Ladungsgruppen verschob sich das Verhältnis der Sialinsäuren mit zunehmender Komplexität der N-Glycane zu  $\alpha$ (2-3)substituierten Sialinsäuren. Verzweigungen waren häufig. Insgesamt fast 20% der N-Glycane besaßen pentaantennäre und hexaantennäre Strukturen. Auch in jeder weiteren Ladungsgruppe mit Ausnahme der Ladungsgruppe M2 konnten unterschiedliche Mengen von 6-verzweigter Galactose detektiert werden.

Eine Zusammenfassung von Strukturvorschlägen enthält Abb. 4.26. Die Antennarität der N-Glycane ist nicht auf tetraantennäre Strukturen beschränkt, sondern reicht von diantennär in Ladungsgruppe M2 bis zu hexaantennär in Ladungsgruppe M6.



Abb. 4.26: Strukturvorschläge für einzelne N-Glycanformen des SP-CD52. Dargestellt sind jeweils die häufigsten Strukturen (rechte Seite) sowie die größten Strukturen (linke Seite) aus jeder Ladungsgruppe. [p] gibt den prozentualen Anteil an allen N-Glycanen wieder. Im Falle der hexaantennären Strukturen wurde sogar noch ein N-Glycan mit fünf Lactosamin-Einheiten und sieben Sialinsäuren detektiert, welches allerdings nur in sehr geringer Menge vorhanden ist. Fucosylierte Strukturen wurden hier nicht berücksichtigt, da sie weder zu den größten noch zu den häufigsten Strukturen zählten.  $\blacksquare$  =NeuAc;  $\blacksquare$  =Gal;  $\diamondsuit$  =GlcNAc;  $\blacksquare$  =Man;  $\checkmark$  =Fuc.

## 4.6 Strukturanalyse des GPI-Ankers von SP-CD52

# 4.6.1 Vorversuche zur Analyse der Ankerstruktur des SP-CD52: Phospholipase C-Spaltung und Triton-X114-Extraktion

Schon bei der ersten RP-C8-HPLC-Trennung im Rahmen der chromatografischen Aufreinigung des Gesamtmoleküls (Abschnitt 4.2.2, S.43) war aufgefallen, daß es sich nicht um eine homogene Substanz handelte (Abb. 4.12, S.44). Die SP-CD52-Moleküle wurden dabei in eine früh eluierende bzw. weniger hydrophobe Gruppe (Fr.27-31 = *Pool* I) und in zwei später eluierende und demzufolge stärker hydrophobe Gruppen (Fr.32-42 = *Pool* II; Fr.43-52 = *Pool* III) getrennt.

Um die Gruppen anschließend auf die Eigenschaften ihrer GPI-Anker zu untersuchen, wurden sie mit einer Enzympräparation behandelt, die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC, Sundler et al., 1978) enthielt. PI-PLC spaltet Phosphatidylinositolreste zwischen Inositolphosphat und Glycerin. GPI-verankerte Proteine mit einer freien Hydroxylgruppe an Position 2 des Inositols werden auch von dem Enzym gespalten, Moleküle mit einer Acylierung an dieser Position des Inositols dagegen nicht.

Im Anschluß an den Verdau wurde die enzymbehandelte Lösung mit Triton X-114 extrahiert (Hooper, 1992), da dieses Detergenz die Trennung der Reaktionslösung in hydrophile und hydrophobe Phase bewirkt. Ein aus dem Verdau resultierendes Gemisch aus gespaltenen oder ungespaltenen und damit wahrscheinlich Inositol-acylierten GPI-verankerten Proteinen kann auf diese Weise aufgetrennt werden. Die hydrophoben Substanzen wie PI-PLC-resistente (acylierte GPI-verankerte) Proteine behalten mit dem GPI-Anker ihre Hydrophobizität und lassen sich in der unteren hydrophoben Phase nachweisen. Hydrophile Substanzen bzw. PI-PLC-gespaltene Proteine sind nach der Spaltung des GPI-Ankers in der oberen hydrophilen Phase detektierbar.

Nach der Extraktion wurden die Phasen getrennt, eingeengt und mittels der *Dotblot*-Analyse auf CD52 untersucht. Dafür wurde der 097-mAk verwendet, dessen Epitop (der Aminosäureteil des Moleküls) nicht durch die Spaltung beeinträchtigt wurde. Abb. 4.27 zeigt die Ergebnisse des PI-PLC-Verdaus und der Triton X-114-Extraktion.



Abb. 4.27: *Dotblot*-Analyse des RP-C8-fraktionierten, PI-PLC-gedauten und Triton X-114-extrahierten SP-CD52 (*Pools* I-III). Reihe a) zeigt die hydrophilen Phasen, Reihe b) die hydrophoben Phasen der Extraktion vor (-) und nach (+) dem PI-PLC-Verdau. Für die Detektion wurde der 097-mAk verwendet.

In der unteren Reihe der Abbildung (Abb. 4.27b) ist der CD52-Nachweis in den hydrophoben Phasen jeder Gruppe vor und nach der Spaltung abgebildet. Die obere Reihe (Abb. 4.27a) zeigt die korrespondierenden hydrophilen Phasen. In *Pool* I, der zuerst eluierenden Fraktion, war in der hydrophilen Phase (obere Reihe) vor der Spaltung (-) nur ein sehr schwaches CD52-Signal erkennbar. Nach der Spaltung (+) nahm die Signalintensität deutlich zu. *Pool* II und *Pool* III zeigten dagegen nach der Spaltungsreaktion keine deutliche Zunahme der CD52-Signalintensitäten in den hydrophilen Phasen. Da sich bei der Phasentrennung ein Phasenverteilungsgleichgewicht ausbildete, war auch in den hydrophilen Fraktionen das intakte, ungespaltene GPI-verankerte CD52-Antigen in Abhängigkeit vom gesamten CD52-Gehalt der extrahierten Probe detektierbar. So verursachte die sehr hohe Konzentration von CD52 in *Pool* II die Signale in den entsprechenden hydrophilen Phasen, jedoch zeigten diese CD52-Signalintensitäten nach der PI-PLC-Spaltung keine deutliche Zunahme.

Das Experiment deutete darauf hin, daß mindestens das SP-CD52 in *Pool* I nichtacylierte, PI-PLCspaltbare GPI-Anker enthielt, die sich nach der Spaltung in der hydrophilen Phase anreicherten. Die GPI-Moleküle aus *Pool* II und III waren dagegen überwiegend resistent gegen das Enzym und damit wahrscheinlich am Inositol acyliert.

#### 4.6.2 Komponentenanalyse des GPI-Peptids von SP-CD52

In Abschnitt 4.3.1 (S.47) war bereits die zur Analyse des gesamten SP-CD52-Moleküls angewendete Strategie erläutert worden. N-Glycane und GPI-Peptide wurden nach der präparativen Spaltung mittels RP-HPLC voneinander getrennt (Abschnitt 4.3.2, Abb. 4.18, S.49) und separat analysiert. Zur Analyse der N-Glycane siehe Abschnitt 4.4 (S.50) und 4.5 (S.63). Die Detektion des SP-CD52-GPI-Peptids in den RP-HPLC-Fraktionen erfolgte durch *Dotblot*-Analyse. In zwei nur geringfügig voneinander getrennten Fraktionen, die als *Pool* 1 und *Pool* 2 bezeichnet wurden, konnte das GPI-Peptid nachgewiesen werden. Die Aminosäuresequenzierung ergab 40mal mehr SP-CD52-GPI-Peptid in *Pool* 2 (vgl. Abb. 4.16, S.47, untere Sequenz).

Für die Komponentenanalyse des SP-CD52-GPI-Peptids wurde ein Aliquot der so gewonnenen bis auf die abgespaltene N-Glycosylierung intakten Moleküle aus *Pool* 2 hydrolysiert und in die Komponenten zerlegt (Ferguson, 1992). Um eine Trennung der Einzelkomponenten mittels Gaschromatografie (GC) zu ermöglichen, mußte die hydrolysierte Probe pertrimethylsilyliert werden. Die flüchtigen, derivatisierten Komponenten wurden in einem Heliumstrom als Trägergas über eine mit Silica beschichtete Kapillarsäule geleitet. Durch Interaktion mit dem Säulenmaterial wurden sie unterschiedlich retardiert und eluierten mit spezifischen Retentionszeiten. Die gaschromatografisch aufgetrennten, derivatisierten Komponenten wurden in einem an die GC-Säule angeschlossenen Quadrupol-Massenspektrometer analysiert und mit einem *flame ion detector* (FID) detektiert.

2nmol SP-CD52-GPI-Peptid aus *Pool* 2 wurden für eine qualitative Komponentenanalyse eingesetzt. Nach Methanolyse und Pertrimethylsilylierung der entstandenen Komponenten ließen sich durch GC-MS mehrere Substanzen nachweisen. Abb. 4.28 zeigt das Gaschromatogramm (a) sowie ein Fragmentationsspektrum eines C18-monoalkylierten Ankerspaltprodukts (b) mit zugehörigem Fragmentationsschema (c). Die Probe enthielt Mannose, Glucosamin und Inositol (Inositol war zusätzlich als interner Standard zugefügt worden) neben Galactose und Glucose als Kohlenhydratkomponenten sowie ausschließlich Palmitinsäure und Stearinsäure als Fettsäuren (Abb. 4.28a). Da Glucose, Palmitin- und Stearinsäure in jeder untersuchten Probe detektierbar waren und vermutlich aus Kontaminationen stammten (unter anderem vom Puder der Handschuhe bzw. von Fingerabdrücken), war ihre Herkunft aus der Probe durch diese Untersuchungsmethode nicht eindeutig zuzuordnen. Die Galactose stammte dagegen wahrscheinlich aus Glycolipiden, die die Probe neben dem SP-CD52 enthielt.

Im Gaschromatogramm konnten zwei *Peaks* ähnlicher Intensität identifiziert werden, die charakteristische Fragmentierungsmuster besaßen (Ferguson, 1992). Abb. 4.28a) zeigt das entsprechende Gaschromatogramm, die beiden *Peaks* wurden durch Pfeile markiert. Die gezielte Fragmentation der *Peaks* ergab bei beiden *Peaks* spezifische Tochter-Ionen (m/z = 147, 205, vgl. Abb. 4.28 b und c). Sie konnten als Trimethylsilylderivate von C16:0- bzw. C18:0-alkyliertem Glycerol identifiziert werden und wurden als C16- und C18-Monoalkylglycerol = C16-MAG und

C18-MAG bezeichnet (vgl. Abb. 4.28a). Daraus wurde geschlossen, daß die SP-CD52-GPI-Peptide auch alkylierte Lipidanker enthielten.



Abb. 4.28: Gaschromatografische Auftrennung und massenspektroskopische Analyse der Komponenten des GPI-Peptids von SP-CD52. (a) zeigt das GC der derivatisierten Komponenten von SP-CD52 (x-Achse: % Signalintensität, y-Achse: Zeit in Minuten). Die identifizierten Komponenten sind über den *Peaks* angegeben. In (b) ist das zugehörige Massenspektrum des zweiten Monoalkylglycerol-Signals (C18-MAG) mit einer Retentionszeit von 21:33min wiedergegeben (x-Achse: % Signalintensität, y-Achse: Masse/Ladung). (c) zeigt das entsprechende Fragmentationsschema von C18-MAG.

#### 4.6.3 ESI-MS/MS-Analyse der Phosphatidylinositolfragmente von SP-CD52

Nachdem die Komponenten des GPI-Peptids aus den geschilderten Versuchen bekannt waren, wurde ihre genaue Struktur durch weitergehende massenspektroskopische Analysen bestimmt. Durch Elektrospray-Ionisierungs (ESI)- Massenspektroskopie kann die genaue Masse einzelner Moleküle innerhalb einer Lösung verschiedenster Substanzen bis auf 0,2 Dalton genau bestimmt werden. Die Elektrospray-Ionisierungs-Tandem-Massenspektroskopie (ESI-MS/MS) erlaubt es darüber hinaus, gezielt Moleküle einer bestimmten Masse herauszugreifen und durch Kollisionen mit Gasmolekülen zu fragmentieren. Das Muster der resultierenden Bruchstücke ermöglicht es, die Struktur des betreffenden Moleküls aufzuklären.

Für eine solche Analyse müssen die Moleküle einzeln in ionisierter Form in der Gasphase vorliegen. Die ESI-MS-Technik beinhaltet eine Ionisierungsmethode, bei der die Probe an der Spitze einer goldbeschichteten Glaskapillare verdampft wird. An der Kapillare liegt ein elektrisches Feld an, welches aus der Lösung Aerosole erzeugen kann. Diese feinen Tröpfchen werden im Gegenstromverfahren einem Gas ausgesetzt, das Flüssigkeitsmoleküle aufnimmt. Durch diesen Verdampfungsvorgang erhöht sich die Oberflächenladung der Tröpfchen, und in der Lösung vorliegende Ionen (die beispielsweise durch Ammoniakzugabe erzeugt wurden) werden durch elektrostatische Abstoßung in die Gasphase überführt. Es entstehen so überwiegend Serien von mehrfach geladenen Ionen des gleichen Moleküls, die dann im Massenspektrometer detektiert werden. Dabei wird nicht direkt das Molekulargewicht, sondern das Verhältnis aus Masse und Ladung (m/z) in Form der Molekülionen bestimmt.

Die Kopplung zweier Massenspektrometer in einem Gerät ermöglicht die detaillierte Analyse von Gemischen. Mittels des ersten Massenspektrometers lassen sich aus dem ionisierten Probengemisch gezielt sogenannte Mutter-Ionen auswählen, die dann in einer Kollisionszelle durch Beschuß mit Inertgas fragmentiert werden. Das zweite Massenspektrometer ermöglicht im Anschluß die Auftrennung und Detektion der entstandenen Fragmente, die als Tochter-Ionen bezeichnet werden. Diese Fragmente erlauben Rückschlüsse auf die Struktur der fragmentierten Mutter-Ionen, wie z.B. die Sequenz der Einzelbausteine eines aus vielen Komponenten bestehenden Moleküls. Es können aber auch alle einzelnen Ionen der Probe fragmentiert und im Anschluß das Gemisch der Bruchstücke auf bestimmte m/z-Werte untersucht werden. Die selektierten Tochter-Ionen können dann jeweils bis auf ihre Mutter-Ionen zurückverfolgt werden. Auf diese Weise lassen sich in einem heterogenen Gemisch bestimmte Molekülformen aufspüren, die zwar unterschiedliche Massen, aber gleiche Fragmentierungsmuster mit teilweise identischen Fragmentionen besitzen.

Da es sich bei dem CD52-GPI-Peptid um eine sehr komplexe Struktur handelte, wurde eine ESI-MS/MS-Analyse zuerst nur mit einem Teil des Moleküls durchgeführt. Die Analyse konnte auf diese Weise stark vereinfacht werden. 2nmol des GPI-Peptids aus *Pool* 2 wurden mittels einer Deaminierungsreaktion nach Ferguson (1992) in reduziertes Glycopeptid (Dodecapeptid-EtP-Man $\alpha$ (1-2)Man $\alpha$ (1-6)-Man $\alpha$ (1-4)-Anhydromannitol) und Phosphatidylinositol (Inositol-PO<sub>4</sub>-Lipid) gespalten. Das in der Reaktion gebildete Phosphatidylinositol (vgl. Abb. 4.29 b) wurde durch Extraktion mit 1-Butanol isoliert, eingeengt und in einer ammoniakalischen Lösung aus Chloroform/Methanol im negativen Modus des ESI-Massenspektrometers vermessen. Der negative Modus anstelle des gebräuchlichen positiven Modus wurde gewählt, da im Dodecapeptid des Moleküls keine positiv geladenen Aminosäuren vorlagen. Abb. 4.29 zeigt das ESI-Massenspektrum der Phosphatidylinositole von *Pool* 2 (a), das Fragmentationsspektrum (ESI-MS/MS) eines ausgewählten Massensignals (m/z = 823,5) (c) sowie das zugehörige Fragmentationsschema (b).



**Abb. 4.29:** (a) ESI-Massenspektrum der Phosphatidylinositole aus *Pool* 2. Die intensiven Signale bei m/z = 823,8 und 795,7 entsprachen den palmitoylierten C18- bzw. C16-Monoalkylphosphatidylinositolen, die Signale bei m/z = 585,5 und 557,4 wurden durch die korrespondierenden nichtacylierten Monoalkylphosphatidylinositole hervorgerufen. (b) zeigt das Fragmentationsschema des größten Signals (m/z = 823,5). In (c) ist das zugehörige ESI-MS/MS–Fragmentationsspektrum abgebildet Die ESI-Spektren (a) und (c) zeigen die relative Signalintensität (y-Achse) sowie den Quotienten aus Masse und Ladung (x-Achse).

Das ESI-Massenspektrum (negativer Modus) enthielt vier Signale von deprotonierten Molekülionen abnehmender Intensität. die von unterschiedlichen Formen des Phosphatidylinositols (m/z = 823,5,795,7,585,5 und 557,4) stammten. Diese Ergebnisse wiesen auf Ankerstrukturen mit (ca. 70%) sowie ohne (ca. 30%) zusätzliche Acylierung an einem C16- oder C18-monoalkylierten Phosphatidylinositol hin. Es handelte sich bei den relativen Intensitäten allerdings lediglich um ungefähre Werte, da die ESI-MS-Analyse keine exakte Quantifizierung erlaubte. Die relativen Intensitäten der Molekülionen variierten zwischen den einzelnen Spektren stark. Daneben enthielt das Spektrum sehr wahrscheinlich auch Verunreinigungen mit anderen Membranlipiden, die die Analyse erschwerten. Durch eine gezielte Suche mit der oben beschriebenen Mutter-Ionentechnik konnten aber trotz der Verunreinigungen die von Phosphatidylinositolen stammenden Signale identifiziert werden. Alle Molekülionen der Probe wurden durch Beschuß mit Argon fragmentiert und auf GPI-typische Bruchstücke mit m/z = 79 oder 241 durchsucht. Die entsprechenden Mutter-Ionen konnten dann durch gezielte Fokussierung einzeln fragmentiert und die vollständigen Tochter-Ionenspektra gewonnen werden.

Abb. 4.29c zeigt das Tochter-Ionenspektrum des Massensignals mit der höchsten Intensität (m/z = 823,5) aus dem ESI-Massenspektrum der gesamten Probe (a). Es enthielt die Fragmentionen m/z = 423/405 und m/z = 479. Die Fragmentionen mit m/z = 585, 423 sowie 497 spalteten jeweils Wasser mit m/z = 18 ab und erzeugten die entsprechenden Folgeionen mit m/z = 567, 405 und 479. Das Fragmention mit m/z = 479 konnte nur entstehen, wenn die Acylierung ans Inositol gebunden war (Treumann, 1997; Treumann et al., 1997). Keine andere als die im Fragmentationsschema dargestellte Molekülstruktur (Abb. 4.29 b) würde zur Bildung eines Fragmentions mit dieser Masse führen.

Die hohe Intensität des Ions mit m/z = 405 sprach für ein Fragment, welches durch eine primäre Fragmentation (ohne Berücksichtigung der Wasserabspaltung) gebildet wurde. Dies war bei einer Acylierung des Inositols der Fall (vgl. Fragmentationsschema in Abb. 4.29 b). Bei einer nicht anhand eines Massenunterschiedes identifizierbaren Acylierung des Glycerols hätten zwei aufeinander folgende Fragmentierungen stattfinden müssen, um zum Ion mit m/z = 405 zu gelangen. Die Intensität eines auf diesem Wege entstandenen Molekülions wäre erheblich geringer gewesen als die Intensität des Ions mit m/z = 405.

Treumann (1997; Treumann et al., 1997) beschreibt außerdem, daß die Signalintensitäten von abgespaltenen Fettsäuren sehr gering sind, wenn die Fettsäure aus einer Bindung ans Inositol stammte. Eine hohe Intensität ist dagegen im Falle einer Bindung ans Glycerol zu erwarten. Die sehr schwache Intensität des Carboxylations (m/z = 255) deckt sich mit dieser Aussage.

Das Tochter-Ionenspektrum des zweitgrößten Molekülions aus dem ESI-Massenspektrum (m/z = 795,7; vgl. Abb. 4.29a) zeigte das entsprechende Fragmentierungsmuster mit gleichen Fragmentionen m/z = 479, 255 und den um m/z = 28 verringerten Fragmentionen m/z = 557,7 und 395/377 (nicht gezeigt). Die kleineren Molekülionen (m/z = 557,4 und 585,5) wurden mittels ESI-MS/MS-Analyse als analoge Strukturen ohne Acylierung identifiziert. In beiden Fällen erhielt

man ein intensives Ion (m/z = 241), welches nach Treumann et al. (1995; 1997) durch eine Cyclisierung bei freier 2-Position des Inositols zustande kam.

In keinem Fall konnten diacylierte Monoalkylderivate detektiert werden. Die Verhältnisse zwischen den einzelnen Molekülionensignalen sind in Abb. 4.29 a ersichtlich.

Weitergehende Fragmentationsexperimente ergaben, daß das Ion mit m/z = 823,5 zu etwa 10% auch C16-monoalkylierte Molekülformen beinhaltete, die folglich als Acylierung statt der Palmitinsäure Stearinsäure trugen. Dementsprechend konnten auch Fragmente mit m/z = 377 (statt m/z = 405) und das Carboxylation der Stearinsäure mit m/z = 286 (statt m/z = 255) detektiert werden. Das Molekülion mit m/z = 795,4 beinhaltete darüber hinaus zu ca. 20% C18-monoalkylierte Moleküle mit Myristinsäure satt Palmitinsäure neben 80% palmitoylierten C16-monoalkylierten Molekülen (nicht gezeigt).

Tab. 4 zeigt eine Übersicht über die detektierten Molekülionen. Die angegebenen Mengenverhältnisse der Molekülionen wurden jeweils aus den Signalintensitäten der Fragmentionen eines einzelnen Massenspektrums abgeleitet.

Molekülion	relative Intensität	Alkylierung	Fettsäure
823,8	ca. 10%	C18:0-alkyl	C16:0-acyl
(Pragmenuon: m/2 = 405) 823,8	ca. 90%	C16:0-alkyl	C18:0-acyl
(Fragmention: $m/z = 377$ )	2004	C19.0 alley	C14:0 agul
(Fragmention: $m/z = 405$ )	ca. 20%	C10.0-aikyi	C14.0-aCy1
795, 7 (Fragmontion: $m/z = 377$ )	ca. 80%	C16:0-alkyl	C18:0-acyl
585,5		C18:0-alkyl	
557,4		C16:0-alkyl	

**Tab. 4:** Mengenverhältnisse und Zusammensetzung der Lipidreste in den Phosphatidylinositolen von SP-CD52, wie sie sich anhand der Intensitäten der Fragmentionensignale abschätzen lassen.

Durch ESI-MS/MS-Analyse von *Pool* 1, der in der RP-HPLC-Trennung vor *Pool* 2 eluierte (vgl. Abb. 4.18, S.49), konnten die Molekülionen mit m/z = 557,4 und 585,5 in deutlicher größerer Menge als die Molekülionen mit m/z = 823,5 und 795,4 detektiert werden (nicht gezeigt). Durch RP-HPLC-Trennung wurden die "einbeinigen" Lyso-Formen demzufolge nicht vollständig von den "zweibeinigen" lipidverankerten Molekülen abgetrennt. Treumann et al. (1995) beschreiben dagegen für das Ly-CD52 eine vollständige Trennung in "zweibeinige" und "dreibeinige" Molekülformen.

#### 4.6.4 ESI-MS-Analyse des delipidierten GPI-Peptids von SP-CD52

Um die Analyse des für die ESI-MS-Analyse extrem großen und komplexen Moleküls zu vereinfachen, wurden 2nmol des GPI-Peptids (*Pool* 2) einer basischen Hydrolyse unterzogen. Auf diese Weise wurde die Acylierung entfernt und die Heterogenität der GPI-Peptide verringert. Danach traten in der ESI-MS-Analyse zwei Paare von Signalen auf, die jeweils den C16- und C18-monoalkylierten Molekülformen mit einem Ethanolaminphosphat (C16-monoalkyliert: m/z = 1320,2; C18-monoalkyliert: m/z = 1334,2) bzw. zwei Ethanolaminphosphaten (C16-monoalkyliert: m/z = 1382,6; C18-monoalkyliert: m/z = 1395,8) entsprachen. Abb. 4.30a zeigt eine schematische Zeichnung der delipidierten Moleküle, Abb. 4.30b gibt einen Ausschnitt aus einem ESI-Massenspektrum der deacylierten Probe wieder.



**Abb. 4.30:** (a) Struktur des delipidierten GPI-Peptids von SP-CD52.  $R1 = -C_{16}-H_{35}$  oder  $-C_{18}-H_{37}$ , R2 = H oder Ethanolaminphosphat (EtP). (b) ESI-Massenspektrum des delipidierten *Pools* 2. Die Pfeile markieren die vier Signale der CD52-Derivate. Pfeil 1):  $R1 = -C_{16}-H_{35}$  und R2 = H; Pfeil 2):  $R1 = -C_{18}-H_{37}$  und R2 = H; Pfeil 3):  $R1 = -C_{16}-H_{35}$  und R2 = EtP; Pfeil 4):  $R1 = -C_{18}-H_{37}$  und R2 = EtP.

#### 4.6.5 ESI-MS/MS-Analysen des gesamten GPI-Peptids von SP-CD52

Auf der Grundlage der unter Abschnitt 4.6.3 und 4.6.4 beschriebenen Analysen wurde abschließend das gesamte enzymatisch deglycosylierte SP-CD52 mittels ESI-MS-Analyse im negativen Modus untersucht. Bis auf die fehlende N-Glycosylierung war das Molekül vollständig. Das ESI-Massenspektrum des deglycosylierten SP-CD52 (Abb. 4.31a) zeigte heterogene Gruppen von drei-, vier- sowie fünffach geladenen Molekülionen, entsprechend acht Hauptkomponenten im Verhältnis 2:4:1:2:12:20:4:6. Die Massen der z-fach deprotonierten Molekülionen konnten nach der Formel [m/z = (MW - z\*H)/z] berechnet werden.

Die erste Komponente besaß eine monoisotopische Masse von 2641.9 Da (aus der dreifach negativ geladenen Gruppe von Molekülionen [ $(MW-3*H)^3/3$ ] entsprechend m/z = 879,6, gefolgt von 2669,8 Da (m/z = 889,3), 2764,9 Da (m/z = 920,6), 2792,9 Da (m/z = 930,3), 2880,0 Da (m/z = 959,3), 2908,0 Da (m/z = 968,7), 3003,1 Da (m/z = 1000,4) und 3031,1 Da (m/z = 1009,4). Tab. 5 enthält eine Übersicht über die Molekulargewichte der einzelnen Molekülformen und die m/z - Werte ihrer drei-, vier- und fünffach geladenen Molekülionen.

Ions		R1	R2	R3	Verhältnis
		C16:0-alkyl	C18:0-alkyl	C16:0-alkyl	C18:0-alkyl
		1 EtP	1 EtP	2 EtP	2 EtP
-FS	MW [Da]	2641,9	2669,8	2764,9	2792,9
-FS	z = -3	(879,6)	889,3	(920,6)	930,3
-FS	z = -4	(659,5)	(666,5)		
-FS	z = -5	(527,4)	(533,0)	547,6	
+FS	MW [Da]	2880,0	2908,0	3003,1	3031,1
+FS	z = -3	959,3	968,7	1000,4	1009,7
+FS	z = -4	719,3	726,3	(749,8)	757,0
+FS	z = -5	575,2	580,8		605,4

**Tab. 5:** Molekulargewichte der unterschiedlichen Molekülformen des GPI-Peptids von SP-CD52. Zusätzlich angegeben sind die m/z -Werte der zugehörigen, unterschiedlich geladenen Molekülionenserien mit einer Ladung von z = [-3] bis z = [-5]. Die m/z – Werte in Klammern gehören zu *Peaks*, die im Spektrum zwar vorhanden, aber nicht extra bezeichnet sind.



Abb. 4.31: ESI-MS- und ESI-MS/MS-Analyse des deglycosylierten GPI-Peptids. Das obere Spektrum (a) zeigt einen Ausschnitt aus dem Massenspektrum, der die unterschiedlich geladenen Gruppen der GPI-Ankerformen enthält (z = [-3], z = [-4], z = [-5]); y-Achse: relative Signalintensität, x-Achse: Quotient aus Masse und Ladung. (b) stellt das Fragmentationsschema des palmitoylierten, C18-monoalkylierten SP-CD52-GPI-Peptids dar. (c) zeigt das Fragmentationsspektrum dieser Molekülform (in einem Massenbereich von m/z = 50 bis m/z = 1800; y-Achse: relative Signalintensität, x-Achse: Quotient aus Masse und Ladung.

Diese Gruppen ließen sich in zwei Familien unterteilen: die ersten vier Signale entsprachen Molekülionen, die das CD52-Dodecapeptid mit einem monoalkylierten Lipidanker am GPI-Pentasaccharid ohne weitere Fettsäurereste trugen. Die beiden kleinsten Moleküle dieser Familie (2641,9 Da und 2669,8 Da bzw. dreifach negativ geladen: m/z = 879,6 m/z = 889,3) enthielten je ein Ethanolaminphosphat am GPI-Pentasaccharid, gefolgt von zwei Molekülformen von 2764,9 Da und 2792,9 Da, die um 123 Da größer waren. Sie besaßen demzufolge zwei Ethanolaminphosphatreste (EtP) mehr. Eine weitere Aufspaltung der Paare mit ein und zwei EtP wurde durch die variierende Länge der Alkylketten verursacht: das erste (2641,9 Da, dreifach negativ geladenes Molekülion m/z = 879,6) und das dritte Molekül (2764,9 Da bzw. m/z = 920,6) trugen eine C16:0-Alkylierung, das zweite (2669,8 Da bzw. m/z = 889,3) und das vierte Molekülion (2792,9 Da bzw. m/z = 930,3) trugen dagegen eine C18:0-Alkylierung. Sie unterschieden sich deshalb um 28 Da. Die vier Massen von 2880 Da, 2908 Da, 3003,1 Da sowie 3031,1 Da mit einer wesentlich höheren Signalstärke entsprachen den Inositol-acylierten Molekülen und wiesen zu den ersten vier identifizierten Massen von 2641,9 Da, 2669,8 Da, 2764,9 Da sowie 2792,9 Da jeweils einen Massenunterschied von m/z = 238(m/z = 255 minus Wasser) aufgrund der zusätzlichen Palmitoylierung auf. Die acylierten GPI-Peptide machten ihrer Molekülionenintensität zufolge ungefähr 80% der SP-CD52-GPI-Peptide aus. Molekülionen, die noch eine weitere Acylierung besaßen, konnten in keinem Fall detektiert werden.

Durch eine anschließende ESI-MS/MS-Analyse konnte diese Zuordnung bestätigt und die Struktur dieses komplexen Moleküls eindeutig bestimmt werden. Dazu wurde das dominante Molekülionensignal aus der dreifach negativ geladenen Gruppe mit m/z = 968,7 ausgewählt und selektiv fragmentiert. Abb. 4.31c zeigt das resultierende Tochter-Ionenspektrum sowie das zugehörige Fragmentierungsschema (4.31b).

Das Tochter-Ionenspektrum des deglycosylierten SP-CD52 enthielt unter anderem gleiche Fragmente wie das Tochter-Ionenspektrum des Phosphatidylinositols (vgl. Abb. 4.29, S.80). Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang das Ionenpaar bei m/z = 423,3 und m/z = 405,3 (minus Wasser). Hierbei handelt es sich um das phosphorylierte C18-Monoalkylglycerol. Die wiederum sehr hohe Intensität dieses Ions deutet erneut auf seinen primären Charakter hin (vgl. Abschnitt 4.6.3, S.81), daß heißt, daß die Acylierung am Inositol und nicht am Glycerol vorliegen mußte. Nur so konnte dieses Fragment durch eine einzige Fragmentierungsreaktion freigesetzt werden. Das Molekülionensignal bei m/z = 823,6, entsprechend dem Phosphatidylinositol des Moleküls (Abschnitt 4.6.3), konnte ebenso detektiert werden. Der Verlust der Palmitinsäure wurde durch ein Signal bei m/z = 585,4 dokumentiert, das aufgrund der Bindung der Palmitinsäure ans Inositol entsprechend schwache Signal der abgespaltenen Carboxylations selbst bei m/z = 255,2.

Weitere Einzelheiten zur Struktur des GPI-Ankers ließen sich am nächsten Fragment von m/z = 984,7 ablesen, das zusätzlich zum Phosphatidylinositol auch Glucosamin (m/z = 161 statt 162 bei normalen Hexosen) beinhaltete (vgl. Abb. 4.31b). Die Ladung dieser Fragmentionen entsprach [-1], so daß sich die Massendifferenzen direkt berechnen ließen. Dem Glucosamin folgte eine Mannose, an die

Ethanolaminphosphat gebunden war, ablesbar am zweifach negativ geladenen Signal bei m/z = 634,4(1270,8 Da). Daraus resultierte eine Massendifferenz von 285 Da, entsprechend 162 Da (Hex) plus 123 Da (EtP) zum vorangegangenen Fragment mit ausschließlich Glucosamin. Zwei weitere unsubstituierte Mannosen folgten, ersichtlich an den Fragmentionensignalen bei m/z = 1431.9 (einfach geladen plus Hex) bzw. 715,4 (zweifach geladen plus Hex) und 1594,9 (einfach geladen plus zwei Hex). Die nächste Einheit wurde durch eine Phosphatgruppe gebildet, erkennbar an einem Massenzuwachs von m/z = 80 auf m/z = 1675,0. Eine Serie von intensiven, zweifach geladenen Ionen bei m/z = 1295,1, 1286,1 und 1264,1 konnte Fragmenten zugeordnet werden, die durch die Eliminierung der drei aminoterminalen Aminosäuren (GQD) sowie Wasser und Kohlendioxid entstanden waren. Die korrespondierenden Fragmente der Di- und Tripeptide ließen sich bei m/z = 201,1 (GQ) und m/z = 316,1 (GQD) detektieren. Durch eine weitere ESI-MS/MS-Analyse, die mit der C16-alkylierten Molekülform des GPI-Peptids von SP-CD52 durchgeführt wurde (m/z = 959,3), dreifach negativ geladen), konnten diese Interpretationen bestätigt werden. Die erwartete Massendifferenz von m/z = 28 wurde bei allen Fragmenten gefunden, die das C16-monoalkylierte Glycerol enthielten. Da die übrigen sieben Molekülionen (vgl. Abb.4.31a, S.85 und Tab. 5, S.84) wesentlich kleinere Signale lieferten, konnten sie nicht für eine anschließende ESI-MS/MS-Analyse herangezogen werden. Die Bindungsstelle des zweiten Ethanolaminphosphates konnte aus diesem Grunde nicht genau bestimmt werden. Literaturdaten zufolge sitzt bei Säuger-GPI-Ankern häufig das zweite Ethanolaminphosphat an dem auf das Peptid folgenden Mannoserest des GPI-Pentasaccharids (Treumann, 1997).

### 4.7 Struktur von SP-CD52

Die Glycoformen des SP-CD52 setzten sich aus hochsialylierten di- bis hexaantennären komplexen N-Glycane mit einer großen Anzahl von Lactosamin-Einheiten zusammen. Das größte detektierte N-Glycan bestand aus 31 Monosacchariden inklusive sieben NeuAc, das kleinste N-Glycan umfaßte elf Monomere inklusive zwei NeuAc. Nur ein geringer Anteil (weniger als 10%) der N-Glycane besaß freie terminale Galactosen. Die  $\alpha(2-3)$ -Sialylierung der N-Glycane überwog, allerdings wies in den zwei- und dreifach geladenen Glycangruppen ein nicht unerheblicher Anteil der terminalen Galaktosen  $\alpha(2-6)$ -gebundene Sialinsäure auf (28% in Ladungsgruppe M2, 11% in Ladungsgruppe M3), mit zunehmender Komplexität sank der Anteil an  $\alpha(2-6)$ -gebundener Sialinsäure jedoch auf ca. 6%.

Die über die tetraantennären Strukturen hinausgehenden penta- und hexaantennären Strukturen, die zusammen mindestens 20% der gesamten N-Glycane ausmachten, wurden durch 1,3,6-substituierte, verzweigte Galactosen hervorgerufen. Weiterhin konnte eine große Menge von N-Acetyllactosamin-Einheiten vom Typ II (Galß(1-4)GlcNAc) nachgewiesen werden. Fast jede Ladungsgruppe wies N-Glycane mit maximal fünf Lactosamin-Einheiten auf, so daß aus den unverzweigten Lactosaminantennen (Sialyl-)i- und aus den verzweigten Lactosaminantennen (Sialyl-)I-Strukturmotive resultierten.

Neben einer fast vollständigen proximalen Fucosylierung der N-Glycane traten auch periphere Fucosylierungen auf. In den weniger komplexen Ladungsgruppen lag ihr Anteil bei ca. 10% und stieg in den höheren Ladungsgruppen bis auf ca. 30%. Das Auftreten der peripheren Fucosylierung bei N-Glycanen, die mindestens eine Lactosamin-Einheit besaßen sowie die Abwesenheit von peripher fucosylierten Fragmenten nach Endo-ß-Galactosidase-Spaltungen deutete auf ein VIM2-artiges Motiv statt auf ein klassisches Lewis<sup>X</sup>-Motiv.

Der GPI-Anker des SP-CD52-Moleküls wies ebenso eine Reihe von verschiedenen Molekülformen auf. Die konservierte GPI-Ankersequenz [Man<sub>3</sub>GlcNH<sub>2</sub>Ino] trug ein (60%) bzw. zwei (40%) Ethanolaminphosphatsubstituenten, während am Inositol zu 70-80% eine Palmitoylierung vorlag. Daneben kamen in sehr geringen Mengen Stearinsäure und Myristinsäure vor.

Die ESI-MS/MS-Analyse des intensivsten Molekülions aus dem Gesamtspektrum der intakten GPI-Peptide sowie des deaminierten Phosphatidylinositols ergab, daß der Lipidteil des Ankers von einer ungewöhnlichen Lysophosphatidylstruktur mit sn-1-Alkyl-( $C_{16}$  oder  $C_{18}$ )-2-*lyso*-glycerol gebildet wurde. Die C18-Alkylierungen überwogen dabei im Verhältnis 3 : 2. Da 20-30% der GPI-Peptide keine Inositol-Acylierung trugen, stellte die Alkylierung das einzige "Bein" dieser Molekülformen dar. Damit besitzt der Anker im Vergleich zu anderen GPI-Ankern aus Säugetieren ein sehr geringes Molekulargewicht, da häufig noch weitere Modifikationen wie Mannosereste am GPI-Anker auftreten oder meist zwei bis drei Fettsäuren, die auch größer sein können, vorhanden sind.

Die Abb. 4.32 zeigt ein Beispiel für die Struktur von SP-CD52 mit jeweils einer ausgewählten Molekülform sowohl des N-Glycans als auch des GPI-Ankers.



**Abb. 4.32:** Strukturmodell des SP-CD52. Abb. 4.32 zeigt die Struktur des Moleküls mit C18-alkyliertem GPI-Anker und einem Beispiel für ein hexasialyliertes N-Glycan. Das N-Glycan enthält insgesamt fünf zusätzliche Lactosamin-Einheiten, von denen zwei als Verzweigungen vorliegen. Die genaue Position der Verzweigungen sowie die Sequenz der Lactosamin-Einheiten wurden nicht ermittelt und wurde hier nur exemplarisch auf zwei Antennen verteilt. Das N-Glycan ist blau gefärbt, mit terminalen Sialinsäuren in rot. Das Dodecapeptid des SP-CD52 inklusive Ethanolaminphosphat ist grün gezeichnet, daran schließt sich der Man<sub>3</sub>GlcNH<sub>2</sub>-*core* des GPI-Ankers in violett an. Die Ethanolaminphosphatgruppe am Man<sub>3</sub>GlcNH<sub>2</sub>-*core* ist orange, das Phosphatidylinositol (mit C18-Monoalkylglycerol) des GPI-Ankers ist gelb gefärbt.



Abb. 4.33 zeigt die entsprechende energieminimierte räumliche Struktur der zuvor dargestellten Form des SP-CD52 (erstellt mit dem SYBYL-Programm der Firma TRIPOS). Rot: terminale Sialinsäuren; blau: N-Glycan; grün: Dodecapeptid mit Ethanolaminphosphat; violett: Man<sub>3</sub>GlcNH<sub>2</sub>-*core* des GPI-Ankers; orange: Ethanolaminphosphat; gelb: Phosphatidylinositol des GPI-Ankers. Die enorme Größe des N-Glycans im Vergleich zum GPI-Peptid ist deutlich zu erkennen.

# **5** Diskussion

Die auffälligste biologische Eigenschaft von CD52 ist seine hochspezifische Gewebeverteilung: es kann lediglich auf Bestandteilen des Immunsystems - den Lymphozyten und Monozyten - und im männlichen Reproduktionsapparat - im Nebenhoden und auf Spermien - nachgewiesen werden. Schon erste *Westernblot*-Analysen und Phospholipase C -Verdaus ließen erkennen, daß die aus diesen beiden Quellen stammenden CD52-Antigene in bezug auf N-Glycosylierungsmuster und GPI-Anker signifikante Unterschiede aufwiesen. Das Auftreten von geschlechtsspezifischen Modifikationen im männlichen Genitaltrakt mit anscheinend so unterschiedlichen biologischen Funktionen machte die Strukturanalyse des CD52-Antigens als Zielsetzung der Dissertation zu einer höchst interessanten Aufgabe.

# 5.1 Aufreinigung von SP-CD52 aus dem humanen Ejakulat

Die größte Hürde auf dem Weg der Strukturaufklärung des SP-CD52 stellte die Aufreinigung des Antigens aus dem humanen Seminalplasma dar. *Westernblot*-Analysen von humanen Ejakulaten legten nahe, daß sich das Molekül auf Spermien nicht von dem Molekül, wie es im Seminalplasma vorkommt, unterschied. Das Seminalplasma konnte so als Quelle für das Antigen verwendet und die abgetrennte Spermienfraktion für andere Analysen genutzt werden. Die zur Strukturanalyse notwendige große Menge an Ejakulat wurde durch die Verwendung von *Pools* aus mehreren Ejakulaten gewährleistet. Vorher wurde durch vergleichende Untersuchungen jedoch sichergestellt, daß keine spenderspezifischen Unterschiede in der Immunreaktivität auftraten. Problematisch gestaltete sich die Aufreinigung von SP-CD52 aus einer Glycolipid-ähnlichen Substanz, die nur etwa 0.01% der im Seminalplasma gelösten Proteine ausmachte. Das Seminalplasma enthält eine Vielzahl von Proteinen und unterschiedlichste lipidartige Substanzen, seine Gesamtproteinkonzentration beträgt ungefähr 20mg/ml (eigene Messungen).

Eine Modifikation der Aufreinigung des Ly-CD52, das aus Lymphozytenpräparationen oder Milzextrakt gewonnen wurde (Treumann et al., 1995), war deshalb unumgänglich. Ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt unter Verwendung der Gelfiltrationschromatografie ermöglichte eine Abtrennung der GPI-verankerten Moleküle in Form von micellenartigen Strukturen mit einem Molekulargewicht von über 100 kD von der Hauptmenge der anderen Substanzen. Der Präparationsversuch mit ausschließlich säulenchromatografischen Methoden, d. h. ohne Affinitätschromatografie-Schritt war allerdings weniger erfolgreich, da sich diese Prozedur als sehr aufwendig erwies und nur geringe Ausbeuten erzielte. Erst die Affinitätschromatografie mit Hilfe der extrem großen Menge von 300mg CAMPATH-1-Antikörper, die Dr. G. Hale (Universität Oxford) zur Verfügung stellte, sowie eine

Oberflächenbehandlung der verwendeten Gefäße ermöglichten die affinitätschromatografische Aufreinigung einer ausreichenden Menge an SP-CD52 von sehr hoher Reinheit. Mit insgesamt 1,1mg SP-CD52 konnte eine Strukturanalyse begonnen werden, 700µg erwiesen sich schließlich als ausreichend.

## 5.2 N-Glycane

#### 5.2.1 Struktur der polymorphen N-Glycane von SP-CD52

SP-CD52 und Ly-CD52 besitzen einen identischen, ungewöhnlich kleinen Peptidteil. Das Dodecapeptid fungiert eventuell nur als Träger des N-Glycans, so daß mögliche Funktionalitäten des CD52-Moleküls in seiner N-Glycosylierung vermutet wurden (Kirchhoff und Hale, 1996). Vor dem Hintergrund der Gewebeverteilung von CD52 sind Unterschiede der Funktionen und auch der N-Glycosylierungen von SP-CD52 und Ly-CD52 sehr wahrscheinlich.

Der Unterschied in der Mikroheterogenität der beiden CD52-Antigene unterschiedlicher Herkunft zeigte sich bereits in den Bandenmustern der *Westernblots*. Ly-CD52 bestand aus nur drei dicht aufeinanderfolgenden immunoreaktiven Banden zwischen 19 und 23 kD mit einer Hauptbande bei 20 kD, während SP-CD52 sechs scharf getrennte Einzelbanden mit einer Laufweite von 14 bis 20 kD erkennen ließ. Die zweit- und drittkleinsten Banden schienen dabei die größte Menge des SP-CD52 zu enthalten.

Im Rahmen einer detaillierten Strukturanalyse erfolgte nach der präparativen Spaltung und Trennung von GPI-Peptiden und N-Glycanen zuerst die Charakterisierung der Kohlenhydrate. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß sich die N-Glycane von SP-CD52 aus zumindestens 50 bis zu 110 Glycoformen zusammensetzten, während Ly-CD52 nur 10 bis 20 unterschiedliche Glycoformen aufwies (Treumann et al., 1995). Die extrem hohe Mikroheterogenität des SP-CD52-Moleküls erforderte den Einsatz unterschiedlicher chromatografischer sowie massenspektroskopischer Techniken; allein durch eine Kombination dieser unterschiedlichen Methoden waren zuverlässige Aussagen über die hochkomplexe Zuckerstruktur überhaupt möglich.

Ein Vergleich der für SP-CD52 bei der Strukturanalyse gewonnenen Ergebnisse mit den bekannten Daten für das Ly-CD52 zeigte, daß SP-CD52 nicht nur tetraantennäre und teilweise pentaantennäre komplexe N-Glycane wie das Ly-CD52 aufwies. Vielmehr reichten die identifizierten N-Glycane des SP-CD52 von diantennären bis hin zu hexaantennären Strukturen.

Auffällig war weiterhin eine große Anzahl von Lactosamin-Einheiten und Lactosamin-Verzweigungen. Immerhin vier bis fünf Lactosamin-Einheiten wurden bei 13% der untersuchten N-Glycane detektiert, 17% enthielten drei Lactosamin-Einheiten und ungefähr je 20% der N-Glycane besaßen zwei, eine oder keine Lactosamin-Einheit. Eine exakte Zuordnung der Lactosamin-Einheiten zu den Antennen der N-Glycane konnte mit den verwendeten Analysemethoden nicht erreicht werden. Vergleiche mit anderen Kohlenhydratstrukturen lassen aber vermuten, daß die Lactosamin-Einheiten wahrscheinlich nicht gleichmäßig auf alle Antennen der N-Glycane verteilt sind, sondern sich bevorzugt an den Antennen befinden, die von der C2- und C6-Position der  $\alpha(1-6)$ -gebundenen Mannose gebildet werden (Leppänen, 1997, Lee et al., 1990). Polylactosaminketten, die (Sialyl-)iStrukturmotive bildeten, traten sowohl bei SP-CD52 als auch bei Ly-CD52 auf, ebenso wie Verzweigungen an den Lactosaminketten, die das (Sialyl-)I-Strukturmotiv beinhalteten.

Das größte detektierte N-Glycan von SP-CD52 (Masse des permethylierten Derivates: m/z = 7933) bestand aus insgesamt 31 Kohlenhydratmonomeren mit einer nativen Masse von 6402 Da, das kleinste detektierte N-Glycan besaß dagegen nur eine native Masse von 1445 Da. Eine sehr hohe Mikroheterogenität dokumentierte auch das charakteristische Bandenmuster von SP-CD52 im SDS-PAGE-Gel mit sechs Banden in einem Bereich von ungefähr 14 bis ca. 20 kD. Die Banden wiesen demzufolge einen Abstand von ca. 1 kD auf. Glycosylierte Proteine besitzen im SDS-Gel im Vergleich zu globulären, nichtglycosylierten Proteinen ein anormales Laufverhalten und täuschen ein ungefähr dreifach zu hohes Molekulargewicht vor. Deshalb lag die geschätzte Massendifferenz der Einzelbanden bei ungefähr 330 Da. Eine Lactosamin-Einheit besitzt ein Molekulargewicht von 365 Da, so daß das Bandenmuster im Gel durch eine wachsende Anzahl von Lactosamin-Einheiten hervorgerufen worden sein könnte. Die oben errechnete Massendifferenz der mit MALDI-MS detektierten Glycoformen von etwa 5500 Da wurde aber nicht durch den Westernblot bestätigt, hier konnte nur eine Massendifferenz von vermutlich 2000 Da - ein Drittel der sichtbaren Differenz von ~6000 Da - festgestellt werden. Die tatsächlich größten und kleinsten Molekülformen waren wahrscheinlich nur in Spuren vorhanden und fielen so unter die Detektionsgrenze der Westernblot-Analyse.

Die negativen Ladungen der terminalen Sialinsäuren waren dagegen nicht für die Aufspaltung in sechs Banden verantwortlich, da sich nach einer Sialidasebehandlung das Bandenmuster nicht veränderte. Lektin*blots* sowie Sialidase-Verdaus der N-Glycane mit anschließender Dionex-HPAEC-PAD-Untersuchung zeigten darüber hinaus, daß die  $\alpha(2-3)$ -gebundene Sialinsäure im Verhältnis zur  $\alpha(2-6)$ gebundenen Sialinsäure in deutlichem Überschuß vorlag. Nemansky et al. (1995) beschreiben für  $\alpha(2-3)$ -Sialyltransferase aus humaner Leber eine erhöhte Aktivität bei größeren und höher verzweigten N-Glycanen im Vergleich zu diantennären komplexen N-Glycanen vom Typ II. Dadurch erfolgt eine  $\alpha(2-3)$ -Sialylierung bevorzugt von tri- und tetraantennären Strukturen. Die  $\alpha(2-6)$ -Sialylierung findet dagegen verstärkt an diantennären N-Glycanen ohne weitere Lactosamin-Einheiten statt. Eine ähnliche Verschiebung der Kettentermination von einer  $\alpha(2-6)$ -Sialylierung zu einer  $\alpha(2-3)$ -Sialylierung mit wachsender Komplexität der N-Glycane war auch bei den N-Glycanen von SP-CD52 zu beobachten.

Die N-Glycane von SP-CD52 waren nahezu vollständig sialyliert, woraus eine hohe Gesamtladung der Glycane resultierte. Den größten Anteil von über 30% machten dreifach negativ geladene N-Glycane des SP-CD52 aus. Es konnten aber sogar Glycoformen nachgewiesen werden, die bis zu sieben Sialinsäuren trugen. Polysialinsäuren in  $\alpha$ (2-8)-Bindung lagen nicht vor (Inoue und Matsumura, 1979), demzufolge mußte die siebte Sialinsäure entweder an ein GlcNac einer Lactosamin-Einheit gebunden sein (Hounsell, 1993) oder die 3-Position einer Galactose besetzen, die an ihrer 6-Position eine weitere terminal sialylierte Lactosamin-Einheit trug. Auch das Auftreten eines sechsfach negativ

geladenen höchstwahrscheinlich tetraantennären N-Glycans, welches laut MALDI/TOF-MS-Analyse nur zwei zusätzliche Lactosamin-Einheiten besaß, kann durch eine solche Position der Sialinsäuren erklärt werden. Für die Glycoformen des Ly-CD52 ist dagegen keine vollständige Sialylierung beschrieben.

Zusätzlich zu der fast vollständigen proximalen Fucosylierung der Chitobiose-Einheit trat bei etwa 10 - 15% der N-Glycane von SP-CD52 eine periphere Fucosylierung an den Antennen auf. Da ausschließlich Typ II-N-Glycane gefunden worden waren, mußte es sich entweder um ein Sialyl-Lewis<sup>X</sup> - oder um ein VIM2-artiges Motiv handeln. Verdau-Versuche mit Endo-ß-Galactosidase ergaben keine Hinweise auf Sialyl-Lewis<sup>X</sup> – Motive oder deren Spaltungsfragmente. Außerdem traten Fucosylierungen immer dann auf, wenn mindestens eine Lactosamin-Einheit vorhanden war. Darüber hinaus waren in den höher geladenen Gruppen bis zu 30% der N-Glycane peripher fucosyliert.

Diese Untersuchungsergebnisse sprachen für ein VIM2-artiges Motiv an den Antennen von SP-CD52. Derartige peripher fucosylierte Strukturmotive sind für die komplexen N-Glycane von Ly-CD52 nicht gefunden worden.

Tab. 6 enthält eine Übersicht über die spezifischen Unterschiede der N-Glycane von SP-CD52 und Ly-CD52. Abb. 5.1 zeigt darüber hinaus exemplarisch Strukturvorschläge für die verschiedenen Glycoformen von SP-CD52 im Vergleich zu Ly-CD52. Die Strukturvorschläge von SP-CD52 basieren auf den Ergebnissen der HPAEC-PAD-Analysen, der MALDI/TOF-MS-Messungen, sowie der Methylierungsanalyse (siehe Abb. 4.20, S.53; Abb. 4.21, S.56; Tab. 2, S.57; Tab. 3, S.62) und entsprechen mit Ausnahme von Ladungsgruppe M6 jeweils dem Signal mit dem maximalen Molekulargewicht bzw. der maximalen Anzahl von Lactosamin-Einheiten. In Ladungsgruppe M6 wurde noch ein analoges heptasialyliertes N-Glycane mit unbekanntem Sialylierungsgrad und unbekannter Anzahl von Lactosamin-Einheiten beschrieben worden.

Eigenschaften	Nebenhoden- Epithel	Lymphozyten
Glycotyp	Komplex	Komplex
Anzahl versch. N-Glycane	50-110	10-20
Struktur	Biantennär bis hexaantennär,	Tetraantennär,
	max. 5 Lactosamin-	Lactosamin-
	Einheiten	Einheiten vorhanden
Größe der Oligosaccharide	12 bis max.31	Unbek., mind. 16
Ladungen	-1 bis -7	-2 bis -4
Lewis-/VIM2- Strukturen (Fuc)	10-20%	Nicht gefunden

Tab. 6: Spezifische Unterschiede der N-Glycane von SP-CD52 und Ly-CD52



Abb. 5.1: Strukturvorschläge für die N-Glycane der Ladungsgruppen von Seminalplasma-CD52 (linke Seite) im Vergleich zu den N-Glycanen des Lymphozyten-CD52 (rechte Seite, nach Treumann et al., 1995). Jeweils ein Beispiel der Ladungsgruppen M2 bis M6 ist für SP-CD52 wiedergegeben. Die Ziffern links kennzeichnen die jeweilige Gesamtladung der Gruppe. Die di-, tri- und tetraantennären Basisstrukturen sind hellblau gefärbt, die linearen bzw. verzweigten Lactosamin-Einheiten sind weiß gezeichnet. Nicht experimentell bestimmt wurden die Positionen der Verzweigungen, sie sind exemplarisch eingezeichnet. Terminale Sialinsäuren sind als Kugeln (rot) dargestellt, wobei die Mehrzahl der Sialinsäuren  $\alpha(2-3)$ - verknüpft vorliegen. Klammern deuten im Falle des Ly-CD52 an, daß die Positionen der terminalen  $\alpha(2-3)$ - bzw.  $\alpha(2-6)$ -verknüpften Sialinsäuren unbekannt sind. Als Beispiel für die peripheren Fucosylierungen von SP-CD52 ist am vorletzten GlcNAc (Ladungsgruppe M5) ein Dreieck (gelb) eingezeichnet (VIM2-artiges Motiv).

Zu den ersten Beobachtungen, die epididymale Spermienreifung betreffend, zählt die Zunahme der negativen Oberflächenladung während der Nebenhodenpassage (Bedford, 1963). Daneben wurden Veränderungen Lektinbindungsmuster von Nebenhodenschnitten Verlauf der im des Nebenhodenganges beschrieben (Benoff, 1997), insbesondere eine Zunahme der WGA- (bindet spezifisch GlcNAc und NeuAc) sowie MAA- (spezifisch für  $\alpha$ (2-3)-gebundene Sialinsäure) und SNA-Bindung (spezifisch für  $\alpha$ (2-6)-gebundene Sialinsäure). Diese Änderungen sind höchstwahrscheinlich auf die Zunahme von terminalen Sialinsäuren des SP-CD52 zurückzuführen. Da SP-CD52 bei der Nebenhodenpassage in großer Menge in die Spermienoberfläche integriert wird, erzeugt es eine dichte Ladungswolke und trägt in hohem Maße zu der beschriebenen Zunahme der Oberflächenladung bei. Das N-Glycan des SP-CD52 wirkt sich extrem auf die charakteristischen Eigenschaften des SP-CD52-Moleküls aus, da die Peptidkette extrem kurz ist und zusammen mit dem GPI-Anker weniger als die Hälfte des durchschnittlichen Molekulargewichtes von 7600 Da ausmacht.

Die Dynamik eines derartig hochglycosylierten Moleküls wurde am Beispiel einer ausgewählten tetraantennären, polylactosaminhaltigen, dreifach terminal sialylierten Ly-CD52-Glycanstruktur mit zusätzlicher Lactosamin-Einheit (Struktur nach Treumann et al., 1995, Abb. 1.5, S.14 und 1.6, S.15) durch eine Metropolis Monte Carlo (MMC)- Simulation untersucht (Metropolis et al., 1953). Im Laufe der MMC-Simulation über 1,2\*10<sup>6</sup> MMC-Schritte wurde die räumliche Verteilung der in Abb. 1.6 dargestellten Glycanstruktur ermittelt. Abb. 5.2 stellt den von einer endständigen Sialinsäure populierten Konformationsraum jeder 20. Struktur der insgesamt 4,78\*10<sup>4</sup> erhaltenen Konformationen der MMC-Simulation dar.

Diese reduzierte Darstellung verdeutlicht bereits eine enorme Mobilität und Flexibilität der endständigen Zucker, die zu einer Verteilung der Ladungswolke führt. Diese Ladungswolke der terminalen Sialinsäuren wird im Falle des SP-CD52 durch eine größere Anzahl von sowohl Sialinsäuren als auch Lactosamin-Einheiten noch weiter ausgedehnt und bedeckt die Spermienoberfläche vollständig mit einer Glycosylmatrix.



Abb. 5.2: Stereodarstellung der Dynamiksimulation einer tetraantennären Glycoform des Ly-CD52 (vgl. Abb. 1.6, S.15). Das konformationelle Verhalten des N-Glycans am Dodecapeptid wurde auf Basis einer Metropolis Monte Carlo-Simulation untersucht und das Ergebnis auf 24000 Konformationen reduziert (Kay Böttcher, Hamburg 1997). Die Abbildung eines Kalottenmodells des Ly-CD52-Antigens ohne den GPI-Anker stellt eine willkürlich ausgewählte Konformation dar. Der Peptidteil des Moleküls ist grün gefärbt, während die N-Glycosylierung eine hellblaue Färbung aufweist. Drei terminale Sialinsäuren sind in Rot, Dunkelblau und Gelb dargestellt. Die Dichte der rotgefärbten Punkte zeigt die erhaltenen Positionen der rotgefärbten Sialinsäure an. Um die Dynamik der Kohlenhydratkomponente von der Proteinbeweglichkeit zu separieren, wurden die MMC-Konformationen auf die N-glycosidische Bindung zum Asparagin fixiert.

Durch die schnellen Konformationsänderungen vergrößert sich darüber hinaus die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Wechselwirkung mit Kohlenhydratbindungspartnern (beispielsweise lektinartigen Strukturen) drastisch. Da sowohl das SP-CD52-Molekül auf der Spermienoberfläche als auch wahrscheinlich der potentielle Bindungspartner auf einer epithelialen oder Zelloberfläche fixiert ist, wird die begrenzte Interaktionsmöglichkeit zwischen den beiden Komponenten durch die Dynamik des Kohlenhydratanteils von CD52 optimiert.

Neben der Ausbildung von spezifischen Bindungen über beispielsweise die Sialyl-i-, Sialyl-I- oder Fucosyl-Strukturmotive der SP-CD52-N-Glycane kann die unter Beteiligung von SP-CD52 gebildete dichte Glycocalyx über der Spermienplasmamembran vor unerwünschten Interaktionen schützen. Eine solche negativ geladene Schutzschicht maskiert tiefer gelegene Antigene, die sonst von der Immunabwehr des weiblichen Genitaltraktes erkannt würden.

Auch eine Agglutination der Spermien während der Lagerung im Nebenhoden wird durch ihre Glycocalyx unwahrscheinlich. Eine solche stark negativ geladene Ladungswolke kann nicht nur die Interaktion zwischen den Spermien, sonder auch unspezifische Wechselwirkungen mit dem Nebenhoden- bzw. Vaginalepithel verhindern. Für viele mucinartige Glycoproteine, die extrazelluläre Matrices bilden, wurden anti-adhäsive Funktionen diskutiert (Chiquet-Ehrismann, 1995). Holland et al. (1998) konstruierte anti-adhäsive Glycocalyx-ähnliche Oberflächen, indem er Graphit mit Kohlenhydratmolekülen beschichtete, welches Dextran- und Alkanoylseitenketten besaß. Die Polymere lagerten sich in Lösung mit ihren hydrophoben Seitenketten an das Graphit an, während die Dextranseitenketten in die wäßrige Lösung ragten und eine künstliche Glycocalyx ausbildeten. Durch diese Glycocalyx konnte die Adsorption von Proteinen aus humanem Plasma erfolgreich unterdrückt werden.

Die tatsächliche Bedeutung der N-Glycan-Strukturmotive von SP-CD52 ist jedoch unbekannt. Auf jeden Fall können die zahlreich vorhandenen Lactosamin-Einheiten die Reichweite der Glycocalyx im Vergleich zu dem obigen dynamischen Modell noch erheblich vergrößern.

Homologe des SP-CD52-Antigens sind bei Affe, Hund, Maus, Ratte und einigen weiteren Tieren gefunden worden (Kirchhoff et al., 1993; Kirchhoff, 1996). Alle bekannten CD52-cDNAs besitzen GPI-Ankersequenzen und putative N-Glycosylierungsstellen. Die Peptidteile der homologen Moleküle variieren jedoch so erheblich, daß sie eventuell nur als "Fahnenmast" für das jeweilige N-Glycan dienen könnten. Das Vorkommen des Moleküls bei den untersuchten Tierarten in Kombination mit der Konservierung der N-Glycanbindungsstelle deutet darauf hin, daß das N-Glycan von SP-CD52 eine nicht unerhebliche Bedeutung für die Fertilität besitzt.

Das SP-CD52-Antigen stellt nur in seltenen Fällen das Ziel einer Immunreaktion im ansonsten sehr immunopotenten weiblichen Genital dar (Clark et al., 1996). Beispiele für monoklonale Anti-Spermien-Antikörper sind der Heterohybridoma-mAk H6-3C4 (Isojima et al. 1987) und der S19-mAk (Diekman et al., 1997). Beide sind ausschließlich gegen die N-Glycane von SP-CD52 gerichtet, besitzen Spermien-agglutinierende Wirkung und sind bereits seit 1987 als Anti-Sperm-Antikörper bekannt (Anderson et al., 1987). Das mit SP-CD52 identische, als SAGA-1 (*Sperm Agglutinating Antigen* 1) bezeichnete Antigen des S19-mAks wurde in einem Review über potentielle Oocytenbindungspartner in einer Gruppe von insgesamt elf Spermienproteinen genannt, das schon lange literaturbekannte (Hale et al., 1993, Kirchhoff et al., 1993) SP-CD52/HE5 dagegen nicht (Wassarman, 1999).

Der S19-mAk wurde durch eine Immunisierung von Mäusen gegen humane Spermienhomogenate erzeugt (Diekmann et al., 1997), der H6-3C4-mAk ist dagegen natürlichen Ursprungs. Er stammt aus einer infertilen, aber ansonsten gesunden Frau, die einen hohen Titer von Spermien-agglutinierenden Antikörpern besaß (Isojima et al., 1987). Tsuji et al. konnten nachweisen (1995), daß der H6-3C4-mAk *in-vitro* lebende Spermien agglutinierte. Durch Zugabe unterschiedlicher Zuckerderivate mit Sialyl-i- und Sialyl-I-Antigen-Strukturen wurde die Spermienagglutination verhindert. Der Antikörper mußte somit diese Strukturen erkennen, die in Form der Polylactosaminketten (Sialyl-i-Antigen) sowie der verzweigten Polylactosaminketten (Sialyl-I-Antigen) bei SP-CD52 auftreten.

Ein weiterer Antikörper, der 2E5-mAk, erkennt ebenso SP-CD52 wie der H6-3C4-mAk und wurde freundlicherweise von Prof. S. Isojima (Nishinomiya, Japan) zur Verfügung gestellt. *Westernblot*-

Analysen (Abb. 4.8a, S.41) bestätigten die Identität der beiden Antigene, durch N-Glycosidase F-Verdaus konnte gezeigt werden, daß das Epitop des 2E5-mAks ebenso durch die N-Glycane von SP-CD52 gebildet wird (Abb. 4.8b, S.41), allerdings differenziert dieser Antikörper nicht zwischen SP- und Ly-CD52-Glycoformen wie der H6-3C4-mAk und der S19-mAk (Tsuji et al., 1988; Diekman et al., 1999).

Da sowohl der H6-3C4-mAk als auch der S19-mAk das CD52-Antigen von Lymphozyten dagegen nicht erkennen, können sie scheinbar die posttranslationellen Modifikationen der CD52-Antigene unterscheiden. Im Falle der infertilen Japanerin korrelierten Antikörpertiter und Infertilität, es war aber keine Erkrankung durch eine Autoimmunreaktionen gegen ihre Lymphozyten erkennbar. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Strukturanalysen erfassen alle unterschiedlichen SP-CD52-Glycoformen unabhängig von ihrer Glycosylierung, da zu ihrer Aufreinigung mit dem CAMPATH-1-mAk ein Antikörper verwendet wurde, der nur die ersten drei Aminosäuren und Teile des GPI-Ankers erkennt. Um den Unterschied zu ermitteln, der das exakte Epitop der N-Glycanspezifischen Antikörper H6-3C4 und S19 im Vergleich zu den N-Glycanen des Ly-CD52 ausmacht, müßte eine weitere Affinitätsgebundenen Antigene ermittelt werden. Nur dann kann mit Sicherheit ausgesagt werden, ob das Epitop in der niedrigeren oder höheren Antennarität, der Häufung der Verzweigungen, der vollständigen Sialylierung oder im (Sialyl)-Lewis<sup>X</sup> -Motiv bzw. VIM2-artigen Motiv zu finden ist, oder ob die zu 90% bei Ly-CD52 vorhandene zusätzliche Mannose am GPI-Anker eine Bindung dieser Form des Antigens durch N-Glycan-spezifische Antikörper verhindert.

Im Seminalplasma ist eine große Anzahl von Glycosyltransferasen als auch Glycohydrolasen nachgewiesen worden, die eventuell in der Lage sind, luminale Glycoproteine zu modifizieren (Tulsiani et al., 1999). Im Falle von SP-CD52 wurden allerdings ausschließlich intakte, fast vollständig sialylierte Polylactosaminketten nachgewiesen, die Degradationsprozesse im Lumen des Nebenhodens oder im Ejakulat unwahrscheinlich erscheinen lassen. Darüber hinaus bindet der S19-mAk SP-CD52 bereits im apikalen Bereich der Nebenhodenepithelzellen (Diekman et al., 1999). Diese Beobachtung spricht ebenso gegen eine nachträgliche Modifikation der N-Glycane, da das N-Glycan-Epitop des S19-mAks wahrscheinlich sehr distinkte Strukturmotive besitzt und schon am Ort der Sekretion, den Epithelzellen, vorhanden ist.

## 5.3 GPI-Anker

#### 5.3.1 Die ungewöhnliche Struktur des GPI-Ankers von SP-CD52

Erste Hinweise auf die Ankerstruktur hatten Vorversuche mit Phospholipase-Verdaus in Kombination mit Detergenzextraktionen (Triton X-114) geliefert. Allein ein sehr geringer Anteil von SP-CD52 war im Unterschied zum Ly-CD52-Molekül spaltbar, das nur zu etwa 50% acyliert ist (Treumann et al., 1995). Die GPI-Ankerstruktur von SP-CD52 mußte demzufolge eine Acylierung am Inositol besitzen (Roberts et al., 1989).

Die *Westernblot*-Analyse hatte gezeigt, daß das deglycosylierte GPI-Peptid von SP-CD52 noch kleiner als das des Ly-CD52 war, obwohl schon Ly-CD52 einen sehr kleinen GPI-Anker mit nur wenig Modifikationen besitzt (persönliche Mitteilung, Prof. M.A.J. Ferguson).

Durch massenspektroskopische Analysen (ESI-MS sowie ESI-MS/MS) konnten dann die Phosphatidylinositole von SP-CD52 untersucht und diese Beobachtungen tatsächlich bestätigt werden. Die Massenkalkulation ergab C16- als auch C18-monoalkylierte Formen der überwiegend palmitoylierten SP-CD52-Moleküle. Ein geringer Anteil (ca. 20%) der Moleküle besaß sogar nur einen einzigen Lipidrest in Form der Alkylierung.

Die Palmitoylierung konnte durch Massenkalkulation allein nicht lokalisiert werden, da Glycerolacylierte bzw. Inositol-acylierte Moleküle Strukturisomere mit identischem Molekulargewicht darstellen. Beweise für eine überwiegende Acylierung des Inositols lieferten die Spektren der ESI-MS/MS-Untersuchung der Phosphatidylinositole. Dort war ein Fragment nachweisbar (m/z = 479), das nur bei Inositol-Acylierung auftreten konnte (Treumann et al., 1997). Auch das Verhältnis der Intensitäten von einigen Fragmentionen dokumentierte eine Inositol-Acylierung, da Primärionen wesentlich höhere Intensitäten verursachen als Sekundärfragmente. Die überragende Intensität des Ions mit m/z = 405 deutete auf seinen primären Charakter und damit wiederum auf eine Inositol-Acylierung. Außerdem weisen Carboxylat-Fragmente, die vom Glycerol abgespalten wurden, eine sehr hohe Intensitäten nur sehr gering sind. Bei SP-CD52 war die Intensität des abgespaltenen Carboxylationen-Intensitäten nur sehr gering.

Die Annahme, daß es sich bei der gefundenen Lyso-Struktur um ein Artefakt handeln könnte, bei dem eine Acylgruppe während der Aufarbeitung verloren gegangen war, wurde durch die Tatsache entkräftet, daß die Palmitoylierungen am Inositol labiler als die Acylierungen am Glycerol sind und bereits durch eine einstündige Inkubation bei 40°C mit konzentrierter Ammoniaklösung (35% w/w in Wasser) in Methanol (1:1) abgespalten werden (Güther und Ferguson, 1993). Für die Delipidierung von Acylglycerol ist dagegen eine sechstündige Inkubation bei 50°C nötig (Ferguson, 1992). Da im Falle des SP-CD52 fast ausschließlich Inositol-Acylierungen nachgewiesen wurden, konnte eine

solche Hydrolyse ausgeschlossen werden, da zuerst diese Inositol-Acylierungen verloren gegangen wären.

Die beiden "ein- bzw. zweibeinigen" Molekülformen waren durch C8-RP-HPLC nicht eindeutig chromatografisch getrennt worden. Zwar überwog die "einbeinige" Form in der früher eluierenden Fraktion, die "zweibeinige" dagegen in der später eluierenden Fraktion, beide überschnitten sich aber. Die durch Aminosäuresequenzierung bestimmten Mengenverhältnisse zwischen den beiden *Pools* waren demzufolge wenig aussagekräftig.

Dagegen waren die beiden Ankerformen von Ly-CD52 eindeutig chromatografisch trennbar (Xia et al., 1993; Treumann et al., 1995). Der Lipidanker des Ly-CD52-Moleküls bestand bei der weniger hydrophoben Form aus Disteaorylglycerol und Inositol-palmitoyliertem Steaoryl-Arachidonylglycerol in der hydrophoberen Fraktion (Treumann et al., 1995).

Auch die Ergebnisse der Komponentenanalyse bestätigten das Auftreten von alkylierten GPI-Ankern bei SP-CD52, da Fragmente von Alkylglycerolen nachgewiesen wurden. Nachdem diese strukturellen Besonderheiten aufgeklärt waren, konnte auch das bis auf die abgespaltenen N-Glycane intakte SP-CD52-GPI-Peptid mittels ESI-MS und ESI-MS/MS vermessen und fragmentiert werden. Die ESI-MS/MS-Analyse ergab, daß die Moleküle ein oder zwei Ethanolaminphosphate am Trimannosyl-*cor*e des Ankers sowie in der Mehrzahl eine zusätzliche Inositol-Acylierung trugen.

Bei dem SP-CD52-GPI-Peptid mit einem Molekulargewicht von 2670 Da – 3031 Da handelte es sich um eine der komplexesten Strukturen, die bislang mit ESI-MS/MS vermessen wurden. Standardmessungen werden mit DNA-Fragmenten oder Proteinen durchgeführt, die sich ausschließlich aus Nuklein- oder Aminosäuren zusammensetzen. Eine ESI-MS/MS-Messung eines intakten GPI-verankerten Moleküls mit Glyco-Lipo-Peptido-Phospho-Anteilen ist dagegen nur selten beschrieben worden (Redman et al., 1994). Tab. 7 enthält eine Übersicht über die Unterschiede der GPI-Anker von SP-CD52 und Ly-CD52. Abb. 5.3 zeigt jeweils ein Beispiel für eine GPI-Ankerstruktur des SP-CD52 (links) sowie des Ly-CD52 (rechts).

Eigenschaften	Nebenhoden- Epithel	Lymphozyten
Anzahl der "Beine"	2 (80%) 1 (20%)	3 (50%) 2 (50%)
Inositol- acylierung	80%	50%
Ethanolamin- Phosphat	1 (60%) 2 (40%)	1 (60%) 2 (40%)
Zusätzliche Mannose am GPI-Anker		1 (90%)

Tab. 7: Spezifische Unterschiede der GPI-Anker von SP-CD52 und Ly-CD52



Abb. 5.3: Vergleich der GPI-Ankerstrukturen von CD52 aus dem Genitaltrakt (links) und von Lymphozyten (rechts). Beide GPI-Anker besitzen ein oder zwei Ethanolaminphosphat- (EtNH<sub>2</sub>-PO<sub>4</sub>) Substituenten, wobei [+/-] symbolisiert, daß die zweite Ethanolaminphosphatgruppe nicht bei allen Molekülen auftritt (ca. 30 bis 40% der SP-CD52 sowie der Ly-CD52-Moleküle). CD52 von Lymphozyten trug daneben zu 90% eine zusätzliche Mannose (Man). SP-CD52 war in 80% , Ly-CD52 in 50% der Fälle Inositol-palmitoyliert. Das Glycerol war bei SP-CD52 C16- (ca. 40%) oder C18- (ca. 60%) monoalkyliert, bei Ly-CD52 waren Disteaoryl- bzw. oder Steaoryl-Arachidonylreste (je 50%) ans Glycerol gebunden.
#### 5.3.2 Potentielle biologische Bedeutung der GPI-Ankerstruktur

Ein Transfer-Mechanismus für die Übertragung des SP-CD52 von einer Zelloberfläche auf eine andere wurde von Kirchhoff und Hale formuliert (1996). Da sowohl der Transfermechanismus *in-vivo* (Ilangumara et al., 1996) als auch die Struktur des SP-CD52 bei Säugern sehr selten ist, stellt sich die Frage, ob durch diese Lyso-Struktur der Zell-Zell-Transfer nicht sehr viel schneller als bei GPI-Ankerstrukturen mit zwei Lipideinheiten am Glycerol stattfinden kann. Für den Transferprozeß vom Nebenhodenepithel auf die Spermienoberfläche können die physikochemischen Eigenschaften dieses "zweibeinigen" Moleküls von großer Bedeutung sein. Der Halt in einer Lipidmembran könnte im Vergleich zu Molekülen mit benachbarten Lipideinheiten verringert sein, eventuell ist auch die Integration in die Plasmamembran im Vergleich zum "dreibeinigen" Molekül schneller möglich. Für künstlich erzeugte Lyso-Glycerol-Lipide wurde beobachtet, daß Unterschiede in der Inkorporierung auftraten (Walter et al., 1992; Medof et al., 1996). Für das CD52-Lymphozytenantigen wurden dagegen bislang keine Transferprozesse beschrieben.

Die Lateralmobilität der Moleküle auf der Spermienoberfläche kann auch von derartigen physikochemischen Eigenschaften beeinflußt werden: im Falle der geringeren Hydrophobizität ist wahrscheinlich eine höhere Mobilität des CD52-Antigens in der Membran bei der Kapazitation möglich. Focarelli et al. (1998, 1999) haben immunhistochemisch nachgewiesen, daß auf der Oberfläche von lebenden Spermien nach der Kapazitation SP-CD52 nur noch im Bereich des Äquatorialsegments detektierbar ist und das Spermium wie ein Gürtel umgibt. Eben mit diesem Äquatorialsegment bindet das kapazitierte Spermium an die Zona Pellucida des Eis bei der ersten Stufe der Befruchtung (Arts et al., 1997). Da das CD52 auf unkapazitierten ejakulierten Spermien die gesamte Oberfläche bedeckt (vgl. Abb. 1.2b, S.8), muß bei der Kapazitation eine Umgestaltung der Spermienoberfläche stattfinden, die auch SP-CD52 erfaßt. Auf Westernblot-Ebene verursachte das Folch-extrahierte SP-CD52-Antigen nach der in-vitro-Kapazitation trotz gleicher Spermienzahl ein sehr viel stärkeres Antikörpersignal (Abb. 4.7, S.40). Diese Beobachtung wurde auch auf intakten, in-vitro-kapazitierten Spermien im Rahmen einer fluorescence activated cell sorting (FACS)-Analyse gemacht (Dr. C.H. Yeung, persönliche Mitteilung). Im Rahmen der Kapazitation wird Cholesterin von der Spermienoberfläche abgegeben (Visconti et al., 1998), und GPI-verankerte Moleküle scheinen bevorzugt in cholesterinreichen Membranmikrodomänen (Cavaeolae) angereichert zu sein (Cinek und Horejsi, 1992; Varma und Mayor, 1998). Somit könnte durch einen "kapazitiven" Verlust des Cholesterins das Antigen für den Antikörper besser zugänglich sein bzw. sich durch die Folch-Extraktion mit höherer Ausbeute aus den Zellen extrahieren lassen. In jedem Fall bewies die Westernblot-Reaktion, daß das Antigen nach der in-vitro-Kapazitation auf den Spermien verbleibt.

Bei SP-CD52 wurde eine überwiegende Acylierung des Inositols festgestellt. Falls die Inositol-Acylierung des SP-CD52 an der 2-Position des Inositols sitzt, kann sie das Moleküle vor einer Spaltung durch Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) schützen, die das nichtInositol-acylierte Molekül von der Spermienoberfläche abspalten kann. Sie benötigt für die Abspaltung des Ankers allerdings eine freie Hydroxylgruppe an Position 2 des Inositols und kann 2-Inositol-acylierte GPI-Anker demzufolge nicht spalten (Roberts, 1996). Diekman et al. (1999) beschreiben die Spaltbarkeit des SP-CD52-Moleküls von der Oberfläche gewaschener Spermien durch PI-PLC. Es bleibt jedoch ungeklärt, ob nur der geringe Anteil der monoalkylierten "einbeinigen" Anker an der Gesamtheit der SP-CD52-Molekülformen erfaßt wurde, ob bevorzugt monoalkylierte Strukturen auf die Spermienoberfläche gelangen können, oder ob die Inositol-Acylierung an Position 3 statt an Position 2 des Inositols sitzt.

Im humanen Ejakulat ist eine weitere Phospholipase, PLA2, vorhanden (Kallajoki et al., 1998). Sie spaltet sn-2-Acylierungen vom Glycerol und könnte so für eine nachträgliche Bildung der Lyso-Strukturen verantwortlich sein. Auch hier ist über ihre *in-vivo*-Aktivität jedoch nichts bekannt, da gleichzeitig PLA2-Inhibitoren im Seminalplasma gefunden wurden (Manjunath et al., 1994; Soubeyrand et al., 1998).

Das einzige in der Literatur beschriebene Molekül, welches einen GPI-Anker mit einer vergleichbaren Lyso-Struktur besitzt, stammt aus einem parasitischen Protozoon (*Trypanosoma brucei brucei*) beim Rind und ist eng verwandt mit dem Überträger der afrikanischen Schlafkrankheit beim Menschen (*Trypanosoma brucei rhodensiense*). Es wird als *Procyclic Acid Repetitive Protein* (PARP) bezeichnet (Ferguson et al., 1993; Treumann et al., 1997). Seine von Treumann et al. (1997) unter anderem mittels ESI-MS/MS untersuchten GPI-Ankerstrukturen weisen große Ähnlichkeit zu den SP-CD52-Strukturen auf. Beide Moleküle besitzen eine Inositol-Palmitoylierung an einem Lysoglycerolanker. ein geringer Teil der heterogenen Ankerfraktion von PARP (25%) besitzt sogar ein identisches Phosphatidylinositol (m/z = 823) mit C18-Monoalkylglycerol, beim überwiegenden Teil der Moleküle sitzt allerdings statt der C16-/ C18-Mono*alkyl*ierung eine C16-/C18-Mono*acyl*ierung am Glycerol der Lipideinheit, die für Säuger typischen Ethanolaminphosphatreste fehlen ganz.

Aber die Analogie zwischen SP-CD52 und PARP geht noch weiter: der Trimannosyl-*core* des PARP-GPI-Ankers trägt eine mehrfach sialylierte sowie verzweigte Polylactosaminseitenkette, die bislang nur bei diesem Organismus gefunden wurde (Field et al., 1991; Ferguson et al., 1993; Treumann et al., 1997a). Diese Struktur besteht aus vier bis vierzehn teilweise verzweigten sowie sialylierten Lactosamin-Einheiten (Ferguson et al., 1993) und bildet zusammen mit einer hochmannosidischen N-Glycosylierung des PARP-Proteinteils die Zuckermodifikationen des Moleküls. Das PARP-Molekül ist nur im Entwicklungsstadium nachgewiesen worden, das der Parasit im Magen des übertragenden Insektes - der Tse-Tse-Fliege - einnimmt (prozyklisches Stadium). Dieses Entwicklungsstadium konnte in Kultur gezüchtet und aus den prozyklischen Zellen das PARP isoliert werden.

Das SP-CD52 aus dem männlichen Genitaltrakt und das PARP-Molekül von Trypanosomen weisen eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf: beide Moleküle sind in hoher Zahl auf der Oberfläche der Zellen vertreten, beide Zellarten besitzen eine flagellatenartige Form und bilden eigenständige mobile Einheiten. Sie müssen in feindlicher Umgebung überleben, im weiblichen Genitaltrakt, der eine potente Immunabwehr besitzt (Clark et al., 1996) bzw. im Magen der Tse-Tsefliege, wo sich der Einzeller gegen drohende Verdauung schützen muß.

Die Bedeutung der signifikanten Lyso-Strukturen der Anker ist bislang ungeklärt. Jedenfalls ermöglicht der GPI-Anker eine dichte Packung der Moleküle auf der Zelloberfläche und bewirkt erhöhte Mobilität in der oberen Lipidschicht der Zellmembran im Vergleich zu Transmembranproteinen. So kommt unter anderem die Glycocalyx der Spermienoberfläche zustande, aber auch das stark exprimierte PARP-Molekül bildet durch seine sialylierten polylactosaminhaltigen Zuckerseitenketten eine dichte, geladene Glycocalyx auf der Oberfläche der prozyklischen Zellstadien. Für das PARP-Molekül vermuteten McConville und Ferguson (1993), daß die resultierende geladene Glycocalyx die durch eine Blutmahlzeit ausgelöste Komplementaktivierung an der Oberfläche der Parasiten im Magen der Tse-Tse-Fliege verhindern oder gegen hydrolytische Enzyme schützen könne. Die auffällige Ähnlichkeit dieser molekularen Strukturen und die Gemeinsamkeiten in ihrer biologischen Verwendung scheinen auf ein Beispiel von konvergenter Mimikry hinzuweisen: Strukturen, die keiner genetischen Kontrolle unterliegen und auch keinen gemeinsamen Ursprung besitzen, weisen eine hohe Ähnlichkeit auf.

#### 5.4 Fazit

Der ursprüngliche Titel der Arbeit lautete: "Das Hauptreifungsantigen der Spermienoberfläche-Isolierung eines Glycosylphosphatidylinositol(GPI)- verankerten Glycoproteins und Untersuchung seiner Glycosylierungsstruktur". Abschließend läßt sich festhalten, daß die anfängliche Zielsetzung dieser Arbeit, die in der Strukturaufklärung der N-Glycane bestand, mit Erfolg erarbeitet wurde. Eine Kohlenhydratanalyse von einer solchen, aus der enormen Mikroheterogenität der N-Glycane des SP-CD52 resultierenden Komplexität erfordert extremes *Know-How* neben einer hervorragenden experimentellen Ausstattung und bleibt wenigen darauf spezialisierten Laboren vorbehalten. Trotzdem ist eine absolute Zuordnung mit den heutigen Methoden kaum erreichbar und nicht jede Antenne jeder einzelnen der 50 bis 110 Glycoformen kann exakt beschrieben werden (vgl. Tab. 1, S.50). Durch die Kombination der Untersuchungsergebnisse wurden aber statistische Aussagen ermöglicht, die einen umfassenden Einblick in die Gesamtheit der Glycoformen erlaubten.

Darüber hinaus konnte auch eine komplette Analyse des GPI-Ankers durchgeführt werden. Das Resultat dieser Analyse war eine interessante Lyso-Struktur, die bisher bei Säugern noch nie gefunden wurde.

Alle im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse konnten durch mehrere unabhängige Untersuchungen bestätigt werden und fügten sich zu einem vollständigen Bild des SP-CD52 zusammen. Damit bieten diese Analysen erstmals ein vollständiges Bild eines Spermienoberflächen-Antigens.

### 6 Zusammenfassung

Die Arbeit beinhaltet die detaillierte Strukturanalyse eines humanen Spermienmembran-Antigens, das einen Hauptteil der Spermienglycocalyx ausmacht.

Das humane CD52-Antigen tritt in zwei ganz unterschiedlichen Geweben auf: auf Lymphozyten (Ly-CD52) sowie im Nebenhoden und auf Spermien. Das Spermienantigen (SP-CD52) gelangt erst nach der Spermiogenese während der Nebenhodenpassage von den Epithelzellen des Nebenhodens auf die Oberfläche der Spermien und läßt sich im Ejakulat sowohl auf Spermien als auch im Seminalplasma nachweisen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde das SP-CD52-Antigen aus Seminalplasma aufgereinigt und eine vollständige Strukturanalyse durchgeführt.

Durch Folch-Extraktion ließ sich das Glycolipid-ähnliche SP-CD52 aus Spermien und Seminalplasma anreichern. Der Folch-Extrakt konnte im Anschluß gelelektrophoretisch aufgetrennt werden, *Westernblot*-Analysen ergaben ein für Glycopeptide typisches mikroheterogenes Muster aus fünf bis sechs aufeinanderfolgenden Einzelbanden. Weiterhin wurde festgestellt, daß SP-CD52 von Spermien und aus Seminalplasma keine Unterschiede in seinem elektrophoretischen Laufverhalten aufwies. Auch zwischen den Ejakulaten von 20 Einzelspendern konnten keine Unterschiede hinsichtlich des immunoreaktiven Bandenmusters nachgewiesen werden. Die Bindung von den sialinsäurespezifischen Lektinen SNA und MAA im Rahmen von Lektin*blots* deutete auf eine Sialylierung des Antigens in (2-3) als auch (2-6)-Position hin. Nach der Abspaltung der Sialinsäuren durch Sialidase veränderte sich das Laufverhalten des Antigens nicht. Das charakteristische Bandenmuster wurde demzufolge nicht durch die negativen Ladungen der Sialinsäuren hervorgerufen.

Verdauversuche unter Verwendung von N-Glycosidase F resultierten dagegen in einer dramatischen Reduktion des Molekulargewichtes im *Westernblot* von 14-20 kD auf 6 kD, begleitet von einem Verlust der Mikroheterogenität. Vergleichende Untersuchungen von CD52 aus Seminalplasma und Lymphozyten dokumentierten, daß sich die gewebespezifischen Antigene nicht nur bezüglich ihrer N-Glycosylierung, sondern auch bezüglich ihres GPI-Ankers unterschieden.

Durch *in-vitro*-Kapazitationsversuche mit lebenden Spermien, gefolgt von Folch-Extraktion und *Westernblot*-Analysen konnte nachgewiesen werden, daß das SP-CD52-Antigen bei der *in-vitro*-Kapazitation nicht von der Spermienoberfläche verschwindet und somit weitere Funktionen im weiblichen Genitaltrakt erfüllen kann. Trotz der Verwendung gleicher Spermienzahlen verstärkte sich das *Westernblot*-Signal erheblich durch die Kapazitation, die Ursache hierfür konnte allerdings nicht ermittelt werden.

Mittels des japanischen 2E5-mAks konnte bestätigt werden, daß es sich bei SP-CD52 um das seit langem bekannte Spermien-agglutinierende Antigen (H6-3C4-Antigen; Isojima et al., 1987) handelte.

Die Aufreinigung des Antigens aus zuerst 400ml Seminalplasma wurde anfangs in Ermangelung einer ausreichenden Menge des CAMPATH-1-Antikörpers rein chromatografisch versucht. Es wurde jedoch nur eine sehr geringe Ausbeute erzielt. Trotz der hohen Menge an Ausgangsmaterial konnten mittels NMR-Untersuchungen keine N-Glycane detektiert werden. Eine Komponentenanalyse bestätigte lediglich Inositol in der Probe, außerdem konnte durch Dionex-HPAEC-PAD-Analyse Sialinsäure nachgewiesen werden.

Die affinitätschromatografische Aufreinigung von 138nmol SP-CD52 (etwa 1,1mg) aus 600ml Seminalplasma gelang schließlich unter Einsatz von 300mg des CAMPATH-1-m-Aks. Die in fünf Schritten aufgereinigte SP-CD52-Probe war vollständig N-glycosyliert und enthielt keinerlei Proteinverunreinigungen mehr, was durch Aminosäuresequenzierung belegt werden konnte. Die erhaltene Sequenz war identisch mit der Sequenz des Lymphozytenantigens. MALDI/TOF-MS-Analyse des intakten Moleküls ergab ein sehr breites Signal von m/z = 6800 bis m/z = 9000 mit einem Maximum bei m/z = 7605.

Um eine Aufklärung der gesamten Molekülstruktur zu erreichen, wurden die N-Glycane enzymatisch abgespalten und N-Glycane sowie Anker mittels *reversed phase*-HPLC getrennt isoliert. Auf diese Weise ließen sich zwei *Pools* von GPI-Peptiden gewinnen, die nur unwesentlich getrennt von der Säule eluierten. Die Aminosäuresequenzierung der isolierten deglycosylierten GPI-Peptide in den Fraktionen dokumentierte die Deglycosylierung des Moleküls, da an der Position des vorher nicht detektierbaren Asparagins der N-Glycosylierungsstelle Aspartat in der Sequenz identifizierte wurde. Auch die Mengenverhältnisse der unterschiedlich hydrophoben *Pools* ließen sich so bestimmen: der hydrophobere *Pool* enthielt 40mal mehr SP-CD52-Antigen.

Die HPAEC-PAD-Analyse der von der einzigen N-Glycosylierungsstelle abgespaltenen N-Glycane ergab eine enorme Mikroheterogenität der Glycanformen. Eine präparative MonoQ-Auftrennung der mikroheterogenen Fraktion in neun Ladungsgruppen vereinfachte die Analyse der N-Glycane erheblich. Die charakteristischen Strukturmerkmale der hochkomplexen N-Glycane sowie ihre quantitative Verteilung innerhalb der einzelnen Ladungsgruppen konnten durch den kombinierten Einsatz von HPAEC-PAD, MALDI/TOF-MS, enzymatischen Spaltungsreaktionen und Methylierungsanalyse im Rahmen einer detaillierten Kohlenhydratstrukturanalyse ermittelt werden.

Die Durchführung ergab, daß es sich bei den N-Glycanen von SP-CD52 um hochgeladene (bis zu sieben NeuAc) diantennäre bis hexaantennäre *complex-type* Strukturen vom Typ II handelte. In fast allen Ladungsgruppen konnten bis zu fünf Lactosamin-Einheiten nachgewiesen werden. Alle Ladungsgruppen bis auf die zweifach geladene Gruppe beinhalteten N-Glycane mit Verzweigungen an den Galactosen der Antennen. Bei linearen Antennen trat somit das Sialyl-i-Motiv auf, während verzweigte Antennen das Sialyl-I-Motiv besaßen.

In der zweifach negativ geladenen Gruppe waren knapp 30% der Sialinsäuren  $\alpha(2-6)$  an die Galactose gebunden. Das Verhältnis verschob sich jedoch mit zunehmender Komplexität der N-Glycane hin zur  $\alpha(2-3)$ -Bindung der Sialinsäure, so daß der überwiegende Teil der Sialylinsäuren  $\alpha(2-3)$ -gebunden vorlag. 10-15% der N-Glycane in den unteren Ladungsgruppen besaßen neben einer fast vollständigen proximalen Fucosylierung auch eine periphere Fucosylierung. In den penta- und hexaantennären Ladungsgruppen waren sogar bis zu 30% der N-Glycane peripher fucosyliert. Die

Untersuchungsergebnisse deuteten hierbei auf das Vorliegen eines VIM2-artigen Strukturmotives anstelle eines klassischen Lewis<sup>X</sup>-Motives.

Die Vorversuche mit dem GPI-Peptid zeigten, daß SP-CD52 nur in geringem Maße durch PI-PLC spaltbar war, während die RP-HPLC-Trennungen auf mindestens zwei Gruppen unterschiedlicher Hydrophobizität hindeuteten.

Die ESI-MS-Analyse des enzymatisch deglycosylierten SP-CD52 dokumentierte eine beträchtliche Heterogenität auch dieses Molekülteils. Die zur Strukturanalyse des GPI-Peptids verwendeten unterschiedlichen Analysemethoden ergaben, daß SP-CD52 einen monoalkylierten, bei 80% der Moleküle Inositol-acylierten GPI-Anker besaß. Als zusätzliche Modifikationen wies der Anker noch ein (60%) bzw. zwei (40%) Ethanolaminphosphate an seinem Trimannosyl-*core* auf. Die Alkylketten waren entweder C16- oder C18- Fettalkohole im Verhältnis 2 : 3, während die Inositol-Acylierung neben Spuren anderer Fettsäuren fast nur aus Palmitinsäure bestand.

Die Ergebnisse belegen eindeutig eine Zelltyp-spezifische Modifikation nicht nur des N-Glycans von Seminalplasma-CD52, sondern ebenso seines GPI-Ankers.

Obwohl dieser Befund an sich nicht unerwartet ist, bildet er doch die Grundlage für zukünftige Untersuchungen zur Zelltyp-spezifischen Funktion dieses Moleküls sowie für anwendungsorientierte Fragestellungen im Hinblick auf eine Eignung von CD52 als ein Zielmolekül für alternative Verhütungsmethoden.

## 7 Summary

This thesis deals with the detailed structural analysis of the human sperm membrane antigen SP-CD52, which forms a major part of the sperm glycocalyx.

The human CD52 is exclusively expressed on lymphocytes (Ly-CD52) and in the male genital tract (SP-CD52), where it is shed from the epithelial cells of the epididymal duct into the lumen of the epididymis. In the course of the epididymal passage, this antigen of post-testicular origin is integrated into the surface of the spermatozoa and can be detected after ejaculation both on the spermatozoa and in the seminal plasma.

The SP-CD52 antigen has been purified to a very high degree from pooled human ejaculates and a complete structural analysis has been performed. Taking advantage of the glycolipid-like properties of the SP-CD52 antigen, it was extracted from sperm and seminal plasma using the Folch extraction method. The Folch extracts were subsequently submitted to gelelectrophoretic separation. The Western blot analysis revealed a highly complex pattern, typical for glycosylated proteins. Five to six separate bands ranging from 14 kD to 20 kD identified. It was also shown, that electrophoretic patterns of SP-CD52 from sperm and seminal plasma were similar. The pattern of single donor samples was equally heterogeneous as that of pooled ejaculates. The immunoreactive bands were also stained by sialic acid-specific lectins SNA (binds to sialic acis in  $\alpha(2-6)$ -linkage) and MAA (binds to sialic acis in  $\alpha(2-3)$ -linkage), indicating the presence of terminal sialic acids on the antigen. The treatment with neuraminidase did not change the immunoreactive pattern, suggesting that the negative charge did not affect the electrophoretic mobility.

PNGase F digestion resulted in a drastically reduced electrophoretic mobility suggesting a large N-glycosylation site. The bands at 14-20 kD disappeared, giving raise to a relatively sharp band around 6 kD. Comparative studies using Folch extracts from sperm and from lymphocytes showed that there were cell type-specific differences not only concerning the N-glycosylation sites, but also in regard to the GPI-anchors. It was further demonstraded by *in-vitro*-capacitation studies of live sperm, followed by Folch extraction and Western blot analysis, that SP-CD52 still remained on the sperm surface even after the capacitation reaction. The SP-CD52 antigen therefore seems capable to perform further functions in the female genital tract. The signal intensity on the blot even increased though equal sperm counts were used, but the reason for this could not be elucidated.

SP-CD52 was shown to be identical with the sperm-agglutinating antigen (H6-3C4-Antigen; Isojima et al., 1987) since it was bound by the monoclonal antibody 2E5 which is specific for this antigen.

Purification of the antigen from 400ml seminal plasma first was attempted omitting affinity chromatography, using various chromatographic methods. Only minor amounts of SP-CD52 were obtained, and using NMR examination, no N-glycans were detected. Though, compositional analysis of the preparation confirmed the presence of inositol, and by HPAEC-PAD analysis, also sialic acid

was identified. Using 300mg of the CAMPATH-1 monoclonal antibody, the purification implying affinity chromatography and four other steps resulted in 138nmol (~1,1mg) of SP-CD52, purity of which was confirmed by sequential Edman degradation. The antigen was shown to be fully N-glycosylated an did not contain any protein impurities. The sequence obtained was identical with the cDNA sequence of Ly-CD52. MALDI-TOF analysis of the native SP-CD52 antigen yielded a very broad molecular ion signal, ranging from m/z = 6800 to m/z = 9000 with an apex at m/z = 7605.

To accomplish a complete structural analysis, N-glycans were enzymatically liberated from the molecule by action of PNGase F, and the N-Glycans and the GPI-anchor were separated by RP-C8-HPLC. The GPI-anchor eluted in two partly overlapping pools of different electrophoretic mobility. Dot blot analysis employing the CAMPATH-1 antibody as well as Edman sequencing revealed complete deglycosylation of the molecule, since the formerly missing asparagine from the N-glycosylation site had been turned into an aspartate by the deglycosylation reaction. The later eluting and hence more hydrophobic pool contained nearly 40 times more material

HPAEC-PAD analysis of the cleaved and isolated N-glycans revealed a enormous microheterogeneity. They were preparatively separated into nine charge groups by MonoQ FPLC, whereas this step greatly simplyfied further structural analysis of the N-glycans. Detailed structural analysis of the carbohydrates was performed using HPAEC-PAD, MALDI/TOF-MS, enzymatical cleaving experiments and methylation analysis. It was found, that the SP-CD52-N-glycans were based on bi- up to hexaantennary structures of highly charged (up to -7) terminally sialylated complex-type sugars of type II. Nearly all charge groups contained up to five lactosamine repeats. All charge groups but M2 contained branched lactosamine repeats at the 6-position of the galactose of the linear lactosamines, giving raise to the Sialyl-i-antigen (linear structures) and the Sialyl-I-antigen (branched structures). In charge group M2, around 30% of the sialic acids were  $\alpha(2-6)$ bound to galactose, but the degree of  $\alpha(2-6)$ bound to galactose. Besides complete proximal fucosylation, 10-15% of the N-glycans in charge groups M2 to M4 contained an additional peripheral fucosylation. In charge groups M5 to M6, nearly 30% of N-glycans were peripherally fucosylated. This finding indicated the presence of a VIM2-motif instead of a classical Lewis<sup>X</sup>-motif.

Preliminary experiments with the GPI-peptide showed, that only minor amounts of SP-CD52 could be cleaved by action of phosphoinositolspecific phospholipase C. Moreover, the RP-C8-HPLC separations also indicated at least two groups of GPI-peptides of differing hydrophobicity. The ESI-MS analysis demonstrated a substantial heterogeneity also of this part of the molecule. The various methods used for structural analysis of the GPI-anchor revealed, that the majority of SP-CD52-molecules (~80%) were inositol-acylated. The trimannosylcore of the GPI-anchor possessed one or two additional ethanolaminphosphate substituents. Only C16:0- or C18:0- alkyl chains were detected, whereas the inositol acylation consisted mostly of palmic acid. Only traces of myristic acid or stearic acid could be detected. the results clearly reveal a cell type-specific modification not only of the N-

glycans of seminal plasma CD52, but also of the GPI-anchor. Though this result is not surprising, it is yet the basis for both examinations of the cell type-specific function of this molecule. Moreover, the usage of SP-CD52 in terms of applicability as a target molecule for alternative contraception can only be performed, when the exact structure of the molecule is known.

## 8 Literaturverzeichnis

Abeijon, C. und Hirschberg, C.B. (1992). Topography of glycosylation reactions in the endoplasmatic reticulum. Trends in Biotechnol Sci (TIBS) *17*, 32-36.

Anderson, D.J., Johnson, P.M., Alexander, N.J., Jones, W.R. und Griffin, P.D. (1987). Monoclonal antibodies to human trophoblast and sperm antigens: report of two WHO-sponsored workshops, June 30, 1986, Toronto, Canada. J. Reprod. Immunol. *10*, 231-257.

Arts, E.G., Wijchman, J.G., Jager, S. und Hoekstra, D. (1997). Protein involvement in the fusion between the equatorial segment of acrosome-reacted human spermatozoa and liposomes. Biochem J *325*, 191-198.

Bause, E. (1983). Structural Requirement of N-glycosylation of Proteins. Biochem J 209, 331-336.

Bedford, J.M. (1963). Changes in the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. Nature *200*, 1178-1180.

Benoff, S. (1997). Carbohydrates and fertilization: an overwiew. Mol Hum Reprod 3, 599-637.

Brown, D.A. (1992). Review. Trends Cell Biol 2, 338-343.

Bulleid, N.J., Bassel-Duby, R.S., Freedman, R.B., Sambrook, J.F. und Gething, M.J. (1992). Cell-free synthesis of enzymatically active tissue-type plasminogen activator. Protein folding determines the extent on N-linked glycosylation. Biochem J 286, 275-280.

Chiquet-Ehrismann, R. (1995). Inhibition of cell adhesion by anti-adhesive molecules. Curr Opin Cell Biol *7*, 715-719.

Cinek, T. und Horejsi, V. (1992). The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. J Immunol *149*, 2262-2270.

Clark, G.F., Oehninger, S., Patankar, M.S., Koistinen, R., Dell, A., Morris, H.R., Koistinen, H. und Seppälä, M. (1996). A role for glycoconjugates in human development: the human feto-embryonic defence hypothesis. Hum Reprod *11*, 467-473.

Diekman, A.B., Norton, E.J., Klotz, K.L., Westbrook, V.A., Shibahara, H., Naaby-Hansen, S., Flickinger, C.J. und Herr, J.C. (1999). N-linked glycan of a sperm CD52 glycoform associated with human infertility. FASEB J *13*, 1303-1313.

Diekman, A.B., Westbrook Case, V.A., Naaby Hansen, S., Klotz, K.L., Flickinger, C.J. und Herr, J.C. (1997). Biochemical characterization of sperm agglutination antigen-1, a human sperm surface antigen implicated in gamete interactions. Biol Reprod *57*, 1136-44.

Ferguson, M.A. (1992). Analysis of glycosyl-phosphatidylinositol anchors. In: Lipid modifications of proteins, Hooper, N.M. und Turner, A.J.,s. (Oxford University press, New York, USA), 191-230.

Ferguson, M.A.J., Homans, S.W., Dwek, R.A. und Rademacher, T.W. (1988). Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein to the membrane. Science 239, 753-759.

Ferguson, M.A.J., Murray, P., Rutherford, H. und McConville, M.J. (1993). A simple purification of procyclic acidic repetitive protein and demonstration of a sialylated glycosyl-phosphatidylinositol anchor. Biochem J *291*, 51-55.

Field, M.C., Menon, A.K. und Cross, G.C., 2731-2739. (1991). A glycosyl-phosphatidylinositol anchor from procyclic stage Trypanosoma brucei: lipid structur and biosynthesis. EMBO J. *10*, 2731-2739.

Focarelli, R., Francavilla, S., Francavilla, F., Della Giovampaola, C., Santucci, A. und Rosati, F. (1999). A sialoglycoprotein, gp20, of the human capacitated sperm surface is a homologue of the leucocyte CD52 antigen: analysis of the effect of anti-CD52 monoclonal antibody (CAMPATH-1) on capacitated spermatozoa. Mol Hum Reprod *1*, 46-51.

Focarelli, R., Giuffrida, A., Capparelli, S., Scibona, M., Fabris, F.M., Francavilla, F., Francavilla, S., Giovampaola, C.D. und Rosati, F. (1998). Specific localization in the equatorial region of gp20, a 20 kDa sialylglycoprotein of the capacitated human spermatozoon acquired during epididymal transit which is necessary to penetrate zona-free hamster eggs. Mol Hum Reprod *4*, 119-125.

Folch, J., Lees, M. und Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 226, 407-509.

Gahmberg, C.G. und Tolvanen, M. (1996). Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. Trends Biochem Sci *21*, 308-11.

Grabenhorst, E. Hoffmann, A., Nimtz, M., Zettlmeissl, G. und Conradt, H. S. (1995). Construction of stable BHK-21 cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal $\beta$ (1-4)GlcNAc-R- $\alpha$ (2-6)-sialyltransferase.  $\alpha$ (2-6)-linked NeuAc is preferentially attached to the Gal $\beta$ (1-4)GlcNAc $\beta$ (1-2)Man $\alpha$ (1-3)-branch of diantennary oligosaccharides from secreted recombinant  $\beta$ -trace protein. Eur J Biochem 232, 718-725.

Grabenhorst, E., Nimtz, M., Costa, S. und Conradt, H. S. (1998). *In vivo* specificity of human  $\alpha$ (1-3/4)-fucosyltransferases III-VII in the biosynthesis of Lewis<sup>X</sup> and sialyl Lewis<sup>X</sup> motifs on complex-type N-glycans. J Biol Chem 272, 30985-30994.

Güther, M.L. und Ferguson, M.A.J. (1993). The microanalysis of glycosyl-phosphatidylinositol glycans. In: Glycoprotein analysis in biomedicine, E.F. Hounsell, ed. (Humana Press, Totowa, New Jersey, USA), 99-117.

Hakomori, S. (1964). A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J Biochem *55*, 205-207.

Hale, G., Bright, S., Chumbley, Hoang, T., Metcalf, D., Munro, A.J und Waldmann, H. (1983). Removal of T-cells from bone marrow for transplantation: a monoclonal antilymphocyte antibody that fixes human complement. Blood *62*, 873-882.

Hale, G., Rye, P.D., Warford, A., Lauder, I. und Brito Babapulle, A. (1993). The glycosylphosphatidylinositol-anchored lymphocyte antigen CDw52 is associated with the epididymal maturation of human spermatozoa. J Reprod Immunol *23*, 189-205.

Hale, G. (1995). Synthetic peptide mimotope of the CAMPATH-1 (CD52) antigen, a small glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein. Immunotechnology *1*, 175-187.

Hale, G. und Rebello, P. (1998). Leucocyte typing VI, Volume Report number NL9/676, T. Kishimoto, ed. (Garland, New York, USA).

Hamilton, D.W., Wenstrom, J.C. und Baker, J.B. (1986). Membrane glycoproteins from spermatozoa: partial characterization of an integral Mr = approximately 24,000 molecule from rat spermatozoa that is glycosylated during epididymal maturation. Biol Reprod *34*, 925-936.

Hoessli, D.C. und Robinson, P.J. (1998). GPI-anchors und cell-membranes: a special relationship. Trends in Cell Biol *8*, 87-89.

Hooper, N.M. (1992). Identification of a glycosyl-phosphatidylinositol anchor. In: Lipid modifications of proteins, Hooper, N.M. und Turner, A.J., eds. (Oxford University press, New York, USA), 89-115.

Holland, N.B., Yongxing, Q., Ruegsegger, M. und Marchant, R.E. (1998) Biomimetic engineering of non-adhesive glycocalyx-like surfaces using oligosaccharide surfactant polymers. Nature *392*, 799-801.

Hounsell E.F. (1993). Glossary. In: Glycoprotein analysis in biomedicine, E.F. Hounsell, ed. (Humana Press, Totowa, New Jersey, USA), 297-299.

Illangumaran, S., Robinson, P.J. und Hoessli, D.C. (1996). Transfer of exogenous glycosylphosphatidylinositol(GPI)-linked molecules to plasma membranes. Trends Cell Biol *6*, 163-167.

Inoue, S. und Matsumura, G. (1979). Identification of the N-glycolylneuraminyl group in a trout egg glycoprotein by methylation analysis and gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Carbohydr Res 74, 361-368.

Isojima, S. (1988). Recent advances in defining human seminal plasma antigens using monoclonal antibodies. Am J Reprod Immunol Microbiol *17*, 150-155.

Isojima, S. (1989a). Sperm and seminal plasma antigens relevant to contraceptive vaccine development. Curr Opin Immunol 2, 752-756.

Isojima, S. (1989b). Human sperm antigens corresponding to sperm-immobilizing antibodies in the sera of women with infertility of unknown cause: personal review of our recent studies. Hum Reprod 6,605-612.

Isojima, S., Kameda, K., Tsuji, Y., Shigeta, M., Ikeda, Y. und Koyama, K. (1987). Establishment and characterization of a human hybridoma secreting monoclonal antibody with high titers of sperm immobilizing and agglutinating activities against human seminal plasma. J Reprod Immunol *10*, 67-78.

James, L.C., Hale, G., Waldmann, H. und Bloomer, A.C. (1999). Structure of the therapeutic antibody CAMPATH-1H Fab in complex with a synthetic peptide antigen. J Mol Biol *289*, 293-301.

Kallajoki, M., Alanen, K.A., Nevalainen, M. und Nevalainen, T.J. (1998). Group II phospholipase A2 in human male reproductive organs and genital tumors. Prostate *35*, 263-272.

Kirchhoff, C. (1996). CD52 is the 'major maturation-associated' sperm membrane antigen. Mol Hum Reprod 2, 9-17.

Kirchhoff, C. und Hale, G. (1996). Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. Mol Hum Reprod *2*, 177-184.

Kirchhoff, C., Krull, N., Pera, I. und Ivell, R. (1993). A major mRNA of the human epididymal principal cells, HE5, encodes the leucocyte differentiation CDw52 antigen peptide backbone. Mol Reprod Dev *34*, 8-15.

Kooyman, D.L., Guerard, W.B. und Logan, J.S. (1998). Glycosyl Phosphatidylinositol Anchor. Exp Nephrol 6, 148-151.

Krull, N., Ivell, R., Osterhoff, C., and Kirchhoff, C. (1993). Region-specific variation of gene expression in the human epididymis as revealed by in situ hybridization with tissue-specific cDNAs. Mol Reprod Dev *34*, 16-24.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lee, N., Wang, W.C. und Fukuda, M. (1990).Granulocytic differentiation of HL-60 cells is associated with increase of poly-N-acetyllactosamine in Asn-linked oligosaccharides attached to human lysosomal membrane glycoproteins. J Biol Chem *265*, 20476-20487.

Leppänen, A. (1997). Enzymatic synthesis of blood group I-type polylactosaminoglycans. Thesis, Department of Biosciences, Division of Biochemistry, University of Helsinki. ISSN 1239-9469, 23-25.

Lisanti, M.P., Caras, I.W., Davit, M.A. und Rodriguez-Boulan, E. (1989). Glycophospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. J Cell Biol *109*, 2145-2156.

Mahoney, M.C. (1991). Evaluation of human sperm-zona pellucida tight binding by presence of monoclonal antibodies to sperm antigens. J Reprod fertil *19*, 269-285.

Manjunath, P., Soubeyrand, S., Chandonnet, L. und Roberts, K.D. (1994). Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. Biochem J *303*, 121-128.

Marquardt, T., Ullrich, K., Zimmer, P., Hasilik, A., Deufel, T. und Harms, E. (1995). Carbohydratedeficient glycoprotein syndrome (CDGS)-glycosylation, folding and intracellular transport of newly synthesized glycoproteins. Eur J Cell Biol *66*, 268-723.

McConville, M.J. und Ferguson, M.A.J. (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. Biochem J 294, 305-324.

Medof, M.E., Nagarajan, S. und Tykocinski, M.L. (1996). Cell-surface engineering with GPIanchored proteins. Faseb J *10*, 574-586.

Metropolis, N., Rosenbluth, A.W., Rosenbluth, M.N., Teller, A.H. und Teller E.J. (1953). Chem Phys 21, 1087-1092.

Moore, D., White, T.W. und Ensrud, K.M. (1989). The major maturation glycoprotein on rat cauda epididymal sperm surface is linked to the membrane via phosphatidylinositol. Biochem Biophys Res Comm *160*, 460-468.

Morris, H.R., Dell, A., Easton, R.L., Panico, M., Koistinen, H., Koistinen, R., Oehninger, S., Patankar, M.S., Seppala, M. und Clark, G.F. (1996). Gender-specific glycosylation of human glycodelin affects its contraceptive activity. J Biol Chem *271*, 32159-32167.

Nemansky, M., Schiphorst, W.E. und Van den Eijnden, D.H. (1995). Branching and elongation with lactosaminoglycan chains of N-linked oligosaccharides result in a shift toward termination with  $\alpha$ (2-3)-linked rather than with  $\alpha$ (2-6)-linked sialic acid residues. FEBS Lett *363*, 280-284.

Niemela, R., Penttila, L., Seppo, A., Helin, J., Leppanen, A., Rabina, J., Uusitalo, L., Maaheimo, H., Taskinen, J., Costello, C.E. und Renkonen, O. (1995). Enzyme-assisted synthesis of a bivalent highaffinity dodecasaccharide inhibitor of mouse gamete adhesion. The length of the chains carrying distal alpha 1,3-bonded galactose residues is critical. FEBS Lett *367*, 67-72. Nimtz, M. und Conradt, H. (1993). Oligosaccharide structures of glycoproteins from recombinant mammalian cell lines. In: Protein Glycosylation. Cellular, Biotechnological and analytical aspects, H. S. Coradt, ed. (VCH, Weinheim, Deutschland), 235-248.

Nimtz, M., Noll, G., Paques, E.P. und Conradt, H.S. (1990). Carbohydrate structures of a human tissue plasminogen activator variant expressed in recombinant Chinese hamster ovary cells. FEBS Lett *271*, 14-18.

Olson, G.E. und Hamilton, D.W. (1978). Characterization of the surface glycoproteins of rat spermatozoa. Biol Reprod 24, 431-443.

Rademacher, T.W., Parekh, R.B. und Dwek, R.A. (1988). Glycobiology. Annu Rev Biochem 57, 785-838.

Redman, C.A., Green, B.N., Thomas-Oates, J.E., Reinhold, V.N. und Ferguson, M.A.J. (1994). Analysis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors by electrospray ionization-mass spectrometry and collision induced dissociation. Glycoconjugate J *11*, 187-193.

Richier, P., Arpagaus, M. und Toutant, J.P. (1992). Glycolipid-anchored acetylcholin-esterases from rabbit lymphocytes and erythrocytes differ in their sensitivity to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. Biochim Biophys Acta *1112*, 83-88.

Roberts, M.A. (1996). Phospholipases: structural and functional motifs for working at an interface. FASEB J, 1160-1172.

Roberts, W.L., Myer, J.J., Kuksis, A., Low, M.G. und Rosenberry, T.L. (1989). J Biol Chem 263, 18766-18775.

Rooney, I.A., Heuser, J.E. und Atkinson, J.P. (1996). GPI-anchored complement regulatory proteins in seminal plasma. An analysis of their physical condition and the mechanisms of their binding to exogenous cells. J Clin Invest 97, 1675-1686.

Rudd, P.M. und Dwek, R.A., (1997). Glycosylation: Heterogeneity and the 3D Structure of Proteins. Crit Rev Biochem Mol Biol *32*, 1-100.

Rudd, P.M., Morgan, B.P., Wormald, M.R., Harvey, D.J., van den Berg, C.W., Davis, S.J., Ferguson, M.A. und Dwek, R.A. (1997). The glycosylation of the complement regulatory protein, human erythrocyte CD59. J Biol Chem 272, 7229-7244.

Schröter, S., Kirchhoff, C., Yeung, C.H., Cooper, T. und Meyer, B. (1997). Purification and structural analysis of sperm CD52, a GPI-anchored membrane protein. Adv Exp Med Biol *424*, 233-234.

Seppala, M., Koistinen, H., Koistinen, R., Mandelin, E., Oehninger, S., Clark, G.F., Dell, A. und Morris, H.R. (1998). Glycodelins: role in regulation of reproduction, potential for contraceptive development and diagnosis of male infertility. Hum Reprod *13 Suppl 3*, 262-291.

Soubeyrand, S., Therien, I. und Manjunath, P. (1998). Bovine seminal platelet-activating factor acetylhydrolase: association properties in seminal plasma and with lipoproteins. Biochim Biophys Acta *1392*, 176-184.

Stuike-Prill, R. und Meyer, B. (1990). A new force-field program for the calculation of glycopeptides and its application to a heptacosapeptide-decasaccharide of immunoglobulin G1. Importance of 1-6-glycosidic linkages in carbohydrate.peptide interactions. Eur J Biochem *194*, 903-919.

Sundler, R., Alberts, A.W., Vagelos, P.R. (1978). Enzymatic properties of phosphatidylinositol inositolphosphohydrolase from *bacillus cereus*. J Biol Chem 253, 4175-4179.

Treumann, A., Lifely, M.R., Schneider, P. und Ferguson, M.A. (1995). Primary structure of CD52. J Biol Chem 270, 6088-6099.

Treumann, A., Zitzmann, N., Hulsmeier, A., Prescott, A.R., Almond, A., Sheehan, J. und Ferguson, M.A. (1997). Structural characterisation of two forms of procyclic acidic repetitive protein expressed by procyclic forms of Trypanosoma brucei. J Mol Biol *269*, 529-547.

Treumann, A. (1997). Analysis of the carbohydrate and lipid components of glycosylphosphatidylinositol structures. Methods Mol Biol 76, 213-235.

Tsuji Y., Clausen, H., Nudelman, E., Kaizu, T., Hakomori, S. und Isojima S. (1988). Human sperm carbohydrate antigens defined by an antisperm human monoclonal antibody derived from an infertile woman bearing antisperm antibodies in her serum. J Exp Med *168*, 343-356.

Tsuji, Y. (1995). Carbohydrate antigens recognized by anti-sperm antibodies. In: Immunology of

Human Reproduction, M. Kurpisz und F. Fernandez, eds. (Bios Scientific publishers, Oxford, UK), 23-32.

Tulsiani, D.R.P., Orgebin-Crist, M.C. und Skudlarek, M.D. (1999). Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. J Reprod Fertil Supp *53*, 85-97.

Varma, R. und Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. Nature *394*, 798-801.

Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Bailey, J.L., Ning, X., Fornes, M. und Kopf, G.S. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. J Androl *19*, 242-248.

Walter, E.I., Ratnoff, W.D., Long, K.E., Kazura, J.W. und Medof, M.E. (1992). Effect of glycoinositolphospholipid anchor lipid groups on functional properties of decay-accelerating factor protein in cells. J Biol Chem 267, 1245-1252.

Wassarman, P.M. (1999). Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. Cell *96*, 175-183.

World Health Organization (1992). Collection and examination of human semen. In: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, University of Cambridge Press Syndicate, ed. (Cambridge University Press, Cambridge, UK), 8-10.

Xia, M.Q., Tone, M., Packman, L., Hale, G. und Waldmann, H. (1991). Characterization of the CAMPATH-1 (CDw52) antigen: biochemical analysis and cDNA cloning reveal an unusually small peptide backbone. Eur J Immunol *21*, 1677-1684.

Xia, M.Q., Hale, G., Lifely, M.R., Ferguson, M. A., Campbell, D., Packman, L. und Waldmann, H. (1993). Structure of the CAMPATH-1 antigen, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein which is an exceptionally good target for complement lysis. Biochem J *293*, 633-640.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian Fertilization. In: The Physiology of Reproduction, Knobil. E. und. Neill, J.D., eds. (Raven Press, Ltd., New York, USA), 189-317.

Zeheb, R. und Orr, G.A. (1984). Characterization of maturation-associated glycoprotein on the plasma membrane of rat caudal epididymal sperm. J Biol Chem *259*, 839-848.

# 9 Anhang

## 9.1 Sicherheit und Handhabung

Stoff	Gefährdungspotential	Gefahren-	R-Sätze	S-Sätze
	0	symbole		
Acetonitril	leicht entzündlich, giftig	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Acetylchlorid	ätzend, leicht entzündlich	C, F	11-14-34	9-16-26-45
Acrylamid	giftig	Т	45-46-25/25.1- 48/23/24/25.1	45-53.1
Ammoniumhydroxid >30% (w/w)	ätzend	С	34-50	26-26/37/39- 45-61
Bis(trimethylsilyl)trifluor- acetamid	ätzend	С	10-34	26-36/37/39- 45-61
Chloroform	gesundheitsschädlich	Xn	22-38-40- 48/20/22	36/37
Cyclohexan	leicht entzündlich	F	11	9-16-33
Diethylamin	ätzend, leicht entzündlich	C, F	11-20/21/22- 35	16-26-29- 36/37/39-45
Dimethylsulfoxid	gesundheitsschädlich	Xn	36/37/38	26-36
1,4-Dithio-DL-threit			22-24/25	3-10-16-23
Essigsäureanhydrid	ätzend, leicht entzündlich	C, F	10-34	26-45
Essigsäureethylester	leicht entzündlich	F	11	16-23-29-33
Ethanolamin	gesundheitsschädlich	Xn	20-36/37/38	
Glycidoxypropyltri- methoxysilan	gesundheitsschädlich	Xn	36/37/38	26-36/39
α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure	gesundheitsschädlich	Xn	20/21/22- 36/37/38	26-36
Kaliumhydroxid	ätzend	С	35	26-37/39-45
Leupeptin			63-20/21/22	36
Mercaptoethanol	giftig, umweltgefährdend	T, N	22-23/24-34- 51/53	26-36/37/39- 45-61
Methanol	leicht entzündlich, giftig	F, T	11-23/24/25	16-26-27-45
N,N-Methylenbisacrylamid	gesundheitsschädlich	Xn	22-37/38	22-24/25
Methyliodid	giftig	Т	21-23/25- 37/38-40	36/37-38-45
Natriumazid	giftig	Т	28-32	28-45
Natriumborhydrid	leicht entzündlich, ätzend	F, C	15-34	26-36/37/39- 43.12-45
Natronlauge	ätzend	С	35	26-37/39-45
Natriumhydrid	leicht entzündlich	F	15	7/8-24/2543.12
Natriumnitrit	leicht entzündlich, giftig	F, T	8-25	45
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	ätzend	С	34	26-36/37/39-45
1,10-Phenantrolin				22-24/25
1-Propanol	leicht entzündlich	F	11	7-16
Resorcin	ätzend, umweltgefährdend	C, N	22-36/38-50	26-61
Schwefelsäure	ätzend	С	35	26-30-45
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	reizend	Xi	20/22-42- 36/37/38-41	26-36-22
Trifluoressigsäure	ätzend	С	20-35	9-26-27-28.1-45
Trimethylchlorsilan	leicht entzündlich, ätzend	F, C	11-14-34-37	16-26- 36/37/39-45
Triton X-114	reizend	Xi	36/38	26-36
Zwittergent 12 (3-(N,N- Dimethyldodecylammonio)- propansulfonat)	ätzend	С	20/21/22-34	26-36/37/39-45

Tab. 8: Sicherheitsdaten

### 9.2 Veröffentlichungen

Schröter, S., Kirchhoff, C., Yeung, C.H., Cooper, T. und Meyer, B. (1997). Purification and structural analysis of sperm CD52, a GPI-anchored membrane protein. Adv Exp Med Biol *424*, 233-234.

Kirchhoff, C., Osterhoff, C., Pera, I., Schröter, S. (1998). Function of human epididymal proteins in sperm maturation. Andrologia *30*, 225-232.

Yeung, C.H., Cooper, T.G., Schröter, S., Kirchhoff, C., Nieschlag, E. (1998). Epididymal secretion of CD52 as measured in human seminal plasma by a fluorescence immunoassay. Mol Hum Reprod *4*, 447-451.

Yeung, C.H., Schröter, S., Wagenfeld, A., Kirchhoff, C., Kliesch, S., Poser, D., Weinbauer, G.F., Nieschlag, E. und Cooper, T.G. (1998). Interaction of the human epididymal protein CD52 (HE5) with epididymal spermatozoa from men and cynomolgus monkeys. Mol Reprod Dev *48*, 267-275.

Schröter, S., Osterhoff, C., McArdle, W. und Ivell, R. (1999). The glycocalyx of the sperm surface. Review. Hum Reprod Update *5*, 302-313.

Schröter, S., Derr P., Conradt, H.S., Nimtz, M., Hale, G. und Kirchhoff, C. (1999). Male-specific modification of human CD52. J Biol Chem 274, 29862-29873.

Yeung, C.H., Schröter, S., Kirchhoff, C., Nieschlag, E. Cooper, T.G., (1998). Maturational changes of the CD52-like epididymal glycoprotein on cynomolgus monkey sperm and their apparent reversal after ejaculation. *In Vorbereitung*.

### 9.3 Posterpräsentationen

Symposium "The fate of the male germ cell"
Hamburg, 6.-7. Dezember 1996 *Purification and structural analysis of sperm CD52, a GPI-anchored membrane protein*S. Schröter, C. Kirchhoff, C.H. Yeung, T.G. Cooper und B. Meyer

Eurocarb<sub>9</sub> 1997 Utrecht, Niederlande, 6.-11. Juni 1997 *Structural analysis of sperm membrane CD52* S. Schröter, P. Derr, B. Meyer und C. Kirchhoff

GlycoBioTechnology Symposium
Braunschweig, 3.-8. Mai 1998 *CD52 from sperm and from lymphocytes differs in structure*S. Schröter, P. Derr, K. Böttcher, B. Meyer und C. Kirchhoff

International Workshop on Glycobiology of Fertilization
Venedig, Italien, 10.-12. September 1998 *CD52 in human seminal plasma and on lymphocytes is differentially glycosylated* (Vortrag)
S. Schröter, P. Derr, C. Kirchhoff, B. Meyer, M. Nimtz und H.S. Conradt

Glycostructures in Biological Systems
Hamburg, 2.-4. Dezember 1998
Structural analysis of the human HE5/CD52 antigen
S. Schröter, P. Derr, M. Nimtz, H. Conradt, B. Meyer und C. Kirchhoff

### Danksagung

Bei Priv. Doz. Dr. Christiane Kirchhoff möchte ich mich herzlich für eine fortwährende Rückenstärkung und –deckung bei größtmöglicher Freiheit zur Bearbeitung dieses interessanten und aufregenden Themas bedanken. Herrn Prof. Bernd Meyer danke ich für die großzügige Betreuung dieser externen Doktorarbeit sowie für die freundliche und wertvolle Unterstützung bei ihrer Durchführung. Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Richard Ivell und Prof. Freimut Leidenberger für die hervorragenden Möglichkeiten, die sich mir am IHF mit seinem außergewöhnlichen Forschungsklima boten. Dr. Geoff Hale danke ich für die überaus großzügige Bereitstellung des CAMPATH-1-Antikörpers.

Bei Dr. Manfred Nimtz möchte ich mich für seine großartige Hilfestellung bei den an der GBF durchgeführten Anker-Analysen und natürlich für seinen beruhigenden Einfluß, gekoppelt an den Konsum von zwei Hektolitern Kaffee, bedanken. Und dafür, daß er so getan hat, als ob ich ihm nie auf die Nerven gefallen bin. Ganz besonders gilt mein Dank auch Dr. Harald Conradt. Die überaus großzügige Aufnahme in seinem Labor und seine fortwährende Unterstützung auch im Anschluß an meinen Aufenthalt dort ermöglichten mir eine vollständige Analyse der Glycane - trotz seines Hinweises, daß angesichts einer solchen Mikroheterogenität eigentlich eine Depression fällig sei. Seine Kooperationsbereitschaft wird mir in Erinnerung bleiben, genauso wie die alle intellektuellen Fähigkeiten fordernden Diskussionen. Insbesondere möchte ich an der GBF auch Susanne Pohl danken, die mir den Aufenthalt durch ihre exzellenten Einführungen sehr erleichterte. Anke Waßmann danke ich für die Aufnahme der unglaublich guten ESI- und MALDI-Spektren und ihre Geduld, Andrea Thiepold für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung im Labor. Und beiden natürlich für die außergewöhnlich nette Unterhaltung sowie die Allianz gegen Giftzwerge.

Schließlich sei natürlich meinen Kolleginnen und Kollegen am IHF, besonders Dipl. Ing. Petra Derr und Dr. Caroline Osterhoff, für ihre enorme Teambereitschaft gedankt. Petra hat mir durch ihre Unterstützung sehr geholfen.

Dr. Kay Böttcher gilt mein ganz besonderer Dank für die Durchführung der Metropolis Monte Carlo Simulation sowie für die Hilfe bei dem Molekülmodell. Die Zusammenarbeit und die Diskussionen auf jeder Ebene waren mir eine große Freude, genauso wie die Anteilnahme an meinem Fortschreiten und meinen Fortschritten.

Bei meinem Vater möchte ich mich bedanken – der nie den Glauben verlor, daß es doch noch etwas würde und mich fortwährend unterstützte.

Abschließend bedanke ich mich bei Alexander Maas, der alle meine Hochs und Tiefs mit stoischer Gelassenheit ertragen hat und eigentlich derjenige ist, der durch seinen kompromißlosen Beistand, physische Opfer, Zweisamkeitsverzicht und eine Dauermotivation zum Gelingen dieser Arbeit ultimativ beigetragen hat.

DANKE !

## Lebenslauf

Persönliche Angaben:	Sabine Schröter Wincklerstr.6, 20459 Hamburg	
Geburtstag uort :	6. Februar 1969 in Hamburg	
Familienstand:	ledig	
Nationalität:	deutsch	
Schulausbildung:		
1975 - 1979	Grundschule Glashütte in Norderstedt	
1979 –1988	Lise-Meitner-Gymnasium in Norderstedt	
Juni 1988	Abitur	
Oktober 1988–April 1991	Grundstudium der Chemie an der Christian Albrecht Universität zu Kiel	
21. April 1991	Diplomvorprüfungen	
Mai 1991-Juli 1991	Gasthörer an der Universität Hamburg	
Oktober 1991	Beginn des Hauptstudiums der Chemie mit Schwerpunkt Biochemie an der Universität Hamburg	
Mai 1992-Juli 1992	Aufenthalt an der Universität Rennes, Frankreich, im Rahmen eines Erasmus-Stipendiums	
März 1994	Diplomhauptprüfungen	
Juni 1994-Februar 1995	externe Diplomarbeit am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg über das Thema: "Untersuchung von Protein-Protein-Wechsel- wirkungen mittels Fluoreszenzmarkierung" im Arbeitskreis von Dr. Kevan Willey.	
April 1995 – Juli 1999	externe Doktorarbeit am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg über das Thema: <i>CD52 – Strukturanalyse eines Spermienoberflächen-</i> <i>proteins</i> im Arbeitskreis von Dr. PD Christiane Kirchhoff. Betreuung: Prof. Bernd Meyer, Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg.	
seit April 1995	wissenschaftliche Mitarbeiterin im konfokalen Forschungsprojekt Iv7/4-6 am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg	

Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und nur die angegebenen Quellen bzw. Hilfsmittel und Hilfen verwendet habe. Teile der Arbeit wurden unter den angegebenen Literaturstellen veröffentlicht. Ein weiterer Artikel wurde vom Journal of Biological Chemistry (USA) akzeptiert und befindet sich im Druck. Die Dissertation wurde nicht an anderer Stelle eingereicht.