

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Busch)

**Experimentelle Isolierung und Charakterisierung eines
lockwirksamen Stoffes der Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata* für
den Zwischenwirtsfindungsprozess von *Schistosoma mansoni* Mirazidien**

Philip V. Eckardt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:
Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker
Priv.-Doz. Dr. H. Hochrein

Die Dissertation wurde am 11.05.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 23.09.2009 angenommen.

1	Einleitung	6
1.1	Schistosomiasis	6
1.1.1	Epidemiologie	6
1.1.2	Parasitenkreislauf	7
1.1.3	Der Wirtsfindungsprozeß.....	9
1.2	Schistosomiasis des Menschen	9
1.2.1	Pathogenese und Klinik	9
1.2.1.1	<i>Akute Infektion</i>	10
1.2.1.2	<i>Chronische Infektion</i>	10
1.2.2	Diagnose und Therapie	11
1.3	Vorbeugung und Bekämpfung.....	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Schistosoma mansoni unter Laborbedingungen	13
2.1.1	Schneckenhaltung.....	13
2.1.2	Snail Conditioned Water (SCW).....	13
2.1.3	Mirazidiengewinnung	14
2.1.4	Attraktivitätstestung	15
2.2	Ausgangsmaterial (SCW 1).....	16
2.3	Chromatographische Auftrennung und Analyse.....	16
2.3.1	Das chromatographische Verfahren	16
2.3.2	High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	17
2.3.3	HPLC Apparatur	17
2.3.4	Gelfiltration.....	18
2.3.4.1	<i>Probenaufbereitung</i>	20
2.3.4.2	<i>Analyse mittels HPLC auf Superdex™ 200 HR 10/30</i>	20
2.3.4.3	<i>Auftrennung mittels HPLC auf HiLoad Superdex™ 200 16/60</i>	21
2.3.4.4	<i>Fraktionsgewinnung und -behandlung</i>	21
2.3.5	Fraktionsanalyse mittels Gaschromatographie (GC)	22
2.3.5.1	<i>Probenaufbereitung</i>	22
2.3.5.2	<i>Apparative Bedingungen und Durchführung</i>	23
2.3.6	Fraktionsanalyse mittels Aminosäureanalyse (ASA)	24
2.3.6.1	<i>Probenaufbereitung</i>	24
2.3.6.2	<i>Apparative Bedingungen und Durchführung</i>	24
2.4	Fraktionsanalyse mittels Gelelektrophorese.....	25

2.4.1	Probenaufbereitung	26
2.4.2	Apparative Bedingungen und Durchführung.....	27
2.4.3	Färbung.....	29
2.4.3.1	Färbung mit Coomassie Blau	29
2.4.3.2	Färbung mit Silbernitrat.....	29
3	Ergebnisse	31
3.1	HPLC von SCW 1.....	31
3.1.1	Flüssigkeitschromatographische Analyse von SCW 1.....	31
3.1.2	Flüssigkeitschromatographische Präparation von SCW 1.....	32
3.2	Attraktivitätstestung der Fraktionen von SCW 1.....	33
3.3	Gaschromatographische Analyse.....	34
3.3.1	Analyse der attraktiven Fraktionen F1 und F2 von SCW 1.....	34
3.3.2	Fremdzuckerbestimmung	35
3.4	Gelelektrophoretische Analyse von SCW 2.....	36
3.5	HPLC von SCW 2.....	36
3.5.1	Flüssigkeitschromatographische Analyse von SCW 2.....	37
3.5.2	Flüssigkeitschromatographische Präparation von SCW 2.....	38
3.6	Attraktivitätstestung der Fraktionen von SCW 2.....	39
3.7	Flüssigkeitschromatographische Analyse von F3 und F6	39
3.8	Gaschromatographische Analyse von F3 und F6 aus SCW 2	41
3.8.1	Analyse der attraktiven Fraktionen von SCW 2	41
3.8.2	Vergleiche mit Tris-Puffer.....	43
3.9	Aminosäureanalyse	46
3.9.1	Analyse der attraktiven Fraktionen F 3 und F 6 von SCW 2.....	46
3.9.2	Vergleich mit Tris-Puffer	48
3.10	Attraktivitätstestung chemischer Verbindungen mit einer oder mehreren Stickstoffgruppen	51
4	Diskussion.....	52
4.1	Das Miraxon - ein Rückblick.....	52
4.2	Methodik und Ergebnisse	55
4.2.1	SCW	55
4.2.2	Attraktivitätstestung	55
4.2.3	Präparation mittels HPLC.....	57
4.2.4	Analyse mit Gaschromatographie, Aminosäureanalyse, und SDS-Page....	59

4.3	Der Zwischenwertsfindungsprozess	62
4.4	Ausblick in die Zukunft.....	65
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	69
7	Abbildungsverzeichnis.....	75
8	Danksagung.....	78

1 Einleitung

1.1 Schistosomiasis

1.1.1 Epidemiologie

Die Schistosomiasis ist eine parasitäre Infektion mit sehr unterschiedlicher klinischer Manifestation. Ihr Vorkommen erstreckt sich auf 77 Länder in Afrika, Asien und Südamerika, in denen ca. 200 Millionen Menschen infiziert sind. Die Parasiten sind für deren Fortbestand von dem Vorhandensein eines Zwischenwirtes abhängig. Hervorgerufen wird die Erkrankung durch eine Infektion mit Würmern aus der Klasse der Trematoden (Saugwürmer). Infektionen mit Trematoden ist eine der weltweit häufigsten Wurminfektionen. Nur ca. 10% der 200 Millionen Infizierten erleiden eine erhebliche klinische Symptomatik, eine schwere Erkrankung tritt oft erst nach jahrelanger leichter Symptomatik auf. 90 Millionen zeigen keine klinische Symptomatik. Schätzungen zufolge sterben jährlich ca. 20.000 Menschen an den Folgen der Infektion (Löscher et al. 2000). Die wichtigsten Erreger der Schistosomiasis sind *Schistosoma (S.) japonicum* und *S. mansoni*, Verursacher der intestinalen Schistosomiasis, als auch *S. haematobium*, Verursacher der urogenitalen Schistosomiasis. Daneben gibt es noch einige andere Schistosomenarten, welche nur sehr selten eine Infektion beim Menschen verursachen oder deren Reservoir in der Tierwelt liegt.

Erste Erwähnung fand die Erkrankung als Hämaturie bei Männern ca. 1500 v. Chr. in ägyptischen Papyrusschriften sowie in bildhauerischen Darstellungen an Tempelwänden. Zudem konnten auch verkalkte *Schistosoma* Eier in ägyptischen Mumien der 20. Dynastie (1200 bis 1090 v. Chr.) nachgewiesen werden. Aber auch in babylonischen, alten arabischen und napoleonischen Schriften wurde die Erkrankung beschrieben. Erst durch zunehmende Reisetätigkeiten und den Sklavenhandel im 17. und 18. Jahrhundert kam es zu einer Verbreitung der Krankheit auch in Länder der sogenannten Neuen Welt.

Erst 1851 wurde die Wurminfektion durch Theodor Billharz nach der Autopsie eines Ägypters in Kairo als Ursache für die endemische Hämaturie beschrieben. Er benannte den Wurm als *Distomum haematobium*, die Erkrankung wurde daraufhin oft als Billharziose bezeichnet. Nicht vor Anfang

des 20. Jahrhunderts wurden die drei Hauptspezies als Erreger durch Manson identifiziert, der Parasitenkreislauf mit Erkennung der Rolle der Schnecke als Zwischenwirt wurde erst 1913 durch Miyairi beschrieben. Der Zusammenhang zwischen Hepato- und Splenomegalie und der Schistosomiasis wurde 1904 erstmals von Say aufgezeigt. 1918 wurde von McDonough die erste wirksame Therapie mit Antimonium-Kalium-Tartrat eingeführt. Erst durch den Einsatz von Soldaten in Afrika und Asien während des 2. Weltkrieges und der damit verbundenen Exposition fand die Schistosomiasis mehr Beachtung. In den 50er und 60er Jahren konnte schließlich die Pathogenese als eine granulomatöse Entzündungsreaktion (Löscher et al. 2000) des Wirtes auf die Schistosoma-Eier geklärt werden. Erst in jüngster Zeit kamen effektivere und weniger toxische Medikamente zum Einsatz.
(Strickland und Ramirez 2000)

1.1.2 Parasitenkreislauf

Am Anfang und am Ende des Parasitenkreislaufes der drei Schistosoma Hauptarten steht der Mensch. Die adulten, geschlechtsreifen Würmer leben paarweise vereint mit hoher Spezifität entweder in den intestinalen Venen (*S. japonicum* und *S. mansoni*) oder in den Venen der Blase und des kleinen Beckens (*S. haematobium*). Dabei fressen die männlichen Würmer ca. 40.000 Erythrozyten / Std., die weiblichen sogar 300.000 / Std.. Sie erreichen eine Länge von 6 bis 26 mm, wobei der weibliche Wurm etwas länger und dünner ist. Der breitere männliche Wurm beherbergt den weiblichen in seinem *Canalis gynaecophorus*, welcher durch die nach vorne eingerollten Körperländer gebildet wird. Aus dem Bild, das die vereinten Würmer abgeben, entstand der jetzige Name *Schistosoma* (*schistos* = gespalten und *soma* = Körper). Ihre Lebensdauer wird auf 3 - 5 Jahre geschätzt. Während dieser Zeit legt ein geschlechtsreifes Wurmpaar je nach Art 200 bis 3500 (*S. mansoni* ca. 250 - 400) Eier pro Tag. Diese enthalten jeweils ein Mirazidium, besitzen einen Stachel und haben im Gegensatz zu denen anderer Trematodenarten keinen Deckel. Diese Merkmale dienen auch der artspezifischen Identifizierung. Bei der Wanderung durch die Blasen- und Darmwand bedienen sich die Eier vermutlich einer Immunreaktion des Körpers, anschließend werden sie mit dem

Stuhl oder dem Urin ausgeschieden. Für den weiteren Entwicklungszyklus ist der Aufenthalt im Süßwasser notwendig, da die Eier sonst innerhalb kürzester Zeit austrocknen und absterben. Im Wasser benötigen die Eier noch 6 - 10 Tage zur Reifung, danach bleiben Sie für 2 - 3 Wochen vital. Während dieser Zeit müssen die Mirazidien schlüpfen und den Zwischenwirt finden. Das Schlüpfen wird durch gute äußerer Bedingungen (niedriger Salzgehalt, Licht, Wassertemperatur zwischen 18 - 35° C, geeigneter pH) angeregt. Im Wasser besitzen die je nach Art ca. 50 - 240 × 50 - 85 µm großen Mirazidien aufgrund ihrer Ausstattung mit Zilien eine gute Beweglichkeit und können so aktiv einige Meter im Wasser zurücklegen. Der Zwischenwirt muss innerhalb von ca. 10 Std. infiziert werden.

Als Zwischenwirt dienen amphibische und aquatische Schnecken. Für *S. mansoni* besteht eine hohe Spezifität gegenüber der Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*). Wegen ihrer hohen Empfänglichkeit ist sie für *S. mansoni* der wichtigste Zwischenwirt. Sie ist 7 - 30 mm groß, hat ein flaches Gehäuse, und lebt überwiegend an den meist bewachsenen Ufern von flachen, langsam fließenden oder stehenden Gewässern. Wegen des Hermaphroditismus können sich die Schnecken alleine vermehren. Durch einen im Schneckenschleim enthaltenen lockwirksamen Stoffes werden die Mirazidien angelockt.

Nachdem das Mirazidium in die Schnecke eingedrungen ist, verliert es seine äußere Membran und wird zur primären Sporozyste (Muttersporozyste). Nach ihrer Reifung zerfällt diese und setzt viele sekundäre Sporozysten (Tochtersporozysten) frei, welche schließlich in Mitteldarmdrüse (Leber) und Ovotestis wandern. Dort wird eine Vielzahl an Zerkarien freigesetzt. Eine infizierte Schnecke setzt so täglich mehrere hundert Zerkarien frei. Diese halten sich überwiegend an der Wasseroberfläche auf und besitzen einen Aktionsradius von wenigen Metern. Der Endwirt wird schließlich durch Penetration der Haut infiziert, was innerhalb von 12 Std. geschehen muss. Auch die Zerkarien werden durch einen chemischen Lockstoff, Ceramide der Haut, angelockt (Haas et al. 2008). Durch Abwerfen des Schwanzes, Verlust der Glykokalyx und Anpassung an die Kochsalzkonzentration im Blut verwandeln sich die Zerkarien nach der Penetration in Schistosomula. Diese wandern für die weitere Reifung zunächst in die Lunge und schließen diese

dann in dem Pfortadersystem Leber ab. Das Weibchen kann nur nach der Paarung mit einem Männchen voll ausreifen. Von dort steuern die Wurmpaare ihren endgültigen artspezifischen Aufenthaltsort an, wo sie über Jahre viele Tausende Eier produzieren.

(Löscher et al. 2000)

1.1.3 Der Wirtsfindungsprozeß

Ein besonderes Interesse in der Forschung gilt seit Jahren dem Prozess der Wirtsfindung von Parasiten allgemein, darunter auch die Zwischenwirtsfindung durch die Mirazidien. Hier wird im Sinne der Krankheitsprävention ein Ansatz zur Intervention im Parasitenkreislauf gesucht.

Seit den 60er Jahren wird das Verhalten von Mirazidien auf verschiedene chemische Komponenten im Wasser untersucht. Durch Gewinnung und Aufbereitung von Wasser, in dem sich ein potentieller Zwischenwirt wie zum Beispiel *B. glabrata* aufgehalten hat, konnte schließlich nach einem lockwirksamen Sekret gesucht werden. Chernin hat 1970 dafür den Begriff des snail conditioned water (SCW) eingeführt (dt: durch Schnecken verändertes Wasser). Es konnte gezeigt werden, dass die chemische Veränderung des Wassers (Geruchswolke) um einen Zwischenwirt für die Wahrscheinlichkeit einer Infektion durch Mirazidien entscheidend ist (Hertel et al. 2006).

1.2 Schistosomiasis des Menschen

1.2.1 Pathogenese und Klinik

Die Pathogenese beruht in erster Linie auf der immunologischen Reaktion des Endwirtes auf den Parasiten in den verschiedenen Stadien der Reifung und auf dessen Eier. Letztere spielen bei der Schistosomiasis eine besondere Rolle, da die granulomatöse Entzündungsreaktion auf die Eier für die klinischen Erscheinungen der chronischen Schistosomiasis verantwortlich ist.

1.2.1.1 Akute Infektion

Grundsätzlich ist der Verlauf und die Schwere der Erkrankung von der Anzahl der eingedrungenen Parasiten abhängig. Nach 12 Std. bildet sich die Zerkariendermatitis mit Papeln, Rötung und Juckreiz aus. Ansonsten bleibt die Infektion oft unbemerkt. Nur wenn diese sehr stark ist, kann es durch die in die Lunge gewanderten Schistosomula zu einer Pneumonitis kommen. Die Penetration der Haut und die Reifungsphase in der Leber können auch ohne klinische Symptome ablaufen. Insbesondere rufen die in den mesenterialen und urogenitalen Venen lebenden adulten Würmer durch einen Trick keine Immunantwort hervor. Dies geschieht durch eine Tarnung mittels Adsorption von wirtseigenen Molekülen an ihrer Oberfläche. Die akute Reaktion des Wirtes ist unter anderem abhängig von der Tatsache, ob bereits zu einem früheren Zeitpunkt eine Schistosomainfektion stattgefunden hat und somit Antikörper im Blut zirkulieren.

(Löscher et al. 2000)

1.2.1.2 Chronische Infektion

Die eigentliche Schistosomiasis fängt durch die Immunantwort auf die im Blut zirkulierenden Eier an. Bei starker Infektion kommt es nach 4-6 Wochen durch die Ausschüttung großer Mengen von Eiern durch die herangereiften Würmer zu einer mit Fieber einhergehenden Reaktion, auch Katayama-Syndrom genannt. Die weiteren pathologischen und klinischen Erscheinungen entstehen überwiegend als Folge der granulomatösen Entzündungsreaktion des Wirtes auf die Eier, welche im Endstromgebiet der Kapillaren hängenbleiben. So entstehen ulzerierende und entzündliche Veränderung der Darm - und Blasenschleimhaut mit der typischen Hämaturie, und starkem Anstieg des Risikos für ein Blasenkarzinom. Aber auch mögliche Veränderungen der Lungen und des zentralen Nervensystems (insbesondere durch *S. japonicum*) mit unterschiedlicher klinischer Manifestation können auftreten. Zudem werden gehäuft auch parallel auftretende chronische Infektionen z.B. durch Salmonellen, Hepatitis B oder C Viren beobachtet. Große klinische Bedeutung

hat die Hepatomegalie mit portaler Hypertension und Aszites. Die häufigste Todesursache ist die Ösophagusvarizenblutung wegen portaler Hypertension, gefolgt vom Leberkoma und Sekundärinfektionen. Selten tritt der Tod durch ein ausgeprägtes Katayama-Syndrom ein (Löscher et al. 2000).

(Strickland und Ramirez 2000)

1.2.2 Diagnose und Therapie

Am zuverlässigsten kann die Diagnose durch mikroskopischen Nachweis der Eier oder der aus ihnen geschlüpften Mirazidien im Urin, Stuhl oder sogar in Biopsiematerial (Quetschpräparat) gestellt werden. Zusätzlich können serologische Verfahren mit Nachweis von Antikörpern angewandt werden. Als Screeningverfahren für *S. haematobium* Infektion hat sich die Urinuntersuchung auf Mikrohämaturie mittels Teststreifen bewährt. Desweiteren können die Spätfolgen der Erkrankung durch bildgebende Verfahren wie Sonographie, CT und MRT, aber auch durch endoskopische Diagnostik beurteilt werden. Alle diese Verfahren dienen natürlich auch der Therapiekontrolle.

Im Vordergrund stehen heute die hochwirksamen Medikamente wie Praziquantel, Oxamniquin und Metrifonat. Beim schweren Katayama-Syndrom können auch vorübergehend Corticosteroide zum Einsatz kommen. Bei der Therapie der zerebralen Schistosomiasis kann prophylaktisch der Einsatz von Antikonvulsiva notwendig werden. Zusätzlich können chirurgische Maßnahmen insbesondere zur Beseitigung von Abflussstörungen durch Granulome oder Fibrosen im Urogenitalbereich erforderlich sein, sowie zur Therapie des Blasencarcinoms. Heute wird jedoch aufgrund der sehr guten Rückbildung von Granulomen und sogar Fibrosen durch die medikamentöse Therapie und der damit verbundenen sehr guten Prognose, eine abwartende Haltung hinsichtlich invasiver oder chirurgischer Maßnahmen eingenommen.

(Löscher et al. 2000)

1.3 Vorbeugung und Bekämpfung

Die wichtigste Maßnahme der Vorbeugung ist die Expositionprophylaxe, die unter anderem durch Aufklärung und hygienische Maßnahmen deutlich beeinflusst werden kann. Zudem kann mit Hilfe hochwirksamer und nebenwirkungsarmer Medikamente die Verbreitung durch unselektive oder selektive Bevölkerungsbehandlungen eingedämmt werden. Eine zusätzliche Maßnahme ist die Schneckenbekämpfung durch Eingriffe in ihr Habitat. Möglicherweise könnte auch die Entschlüsselung eines lockwirksamen Stoffes in Zukunft eine Bekämpfung der Schistosomiasis durch Unterbrechung des Parasitenkreislaufes in der freien Natur ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Schistosoma mansoni unter Laborbedingungen

2.1.1 Schneckenhaltung

Um einen Lockstoff aus den multiplen Ausscheidungsstoffen des natürlichen Zwischenwirtes, der Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata* isolieren zu können, wurde diese unter den folgenden Laborbedingungen gehalten. In Glas- bzw. Kunststoffaquarien, welche je zur Hälfte mit Leitungswasser und dest. Wasser gefüllt waren, wurden je ca. 80 o.g. nicht infizierte Wasserschnecken (Albino Stamm Belo Horizonte der Fa. Hoechst AG) bei einer Temperatur von 26-28° Celsius in einem fensterlosen Raum gehalten. Zur Erzeugung des Hell-Dunkelwechsels von 12:12 Stunden wurden Tagesleuchtstoffröhren der Fa. Osram (Daylight 5000 De Luxe L36/W19) benutzt. Für die tägliche Fütterung wurde gewaschener Kopfsalat verwendet. Die Luftzufuhr für das Wasser war durch Aquarienpumpen gewährleistet, das Wasser eines Beckens wurde alle 2 Wochen komplett ausgetauscht.

2.1.2 Snail Conditioned Water (SCW)

Ursprünglich reines Wasser, in dem sich die Wasserschnecken aufhalten enthält nach einem bestimmten Zeitraum von den Schnecken ausgeschiedene Stoffe. Der definitionsgemäß entscheidende Unterschied zu reinem Wasser besteht in der Lockwirkung (Attraktivität) des SCW auf Mirazidien, d.h. diese reagieren auf eine chemische Komponente im SCW.

Um ein standardisiertes SCW zu erhalten, wurden dafür 300g nicht infizierte Schnecken in einem Standzylinder mit 600 ml Leitungswasser und 600 ml entionisiertem Wasser bei einer Temperatur von 26° Celsius eingebracht. Das Gefäß wurde mit einer Alufolie abgedeckt und 16 Stunden bei künstlichem Tageslicht aufbewahrt. Nach Ablauf der 16 Stunden wurden die Schnecken und grobe Verunreinigungen durch Filtrierung mit einer doppelten Lage Gaze entfernt. Da im Rahmen der Dissertation von N. Zorger (1999), um die SCW Ausbeute zu steigern, erstmals mit 300g statt den zuvor benutzten 150g

Schnecken (in 1 l Flüssigkeit) gearbeitet wurde, wurde hier auch der Begriff des doppelt konzentrierten SCW verwendet. Vor der Weiterverarbeitung wurde das SCW stets auf Attraktivität getestet.

Zur Herstellung eines weiter verwendbaren Substrats wurde das SCW zunächst mit einem Bakterienfilter mit einer Porenweite von 2 µm der Fa. Sartorius gereinigt. Für diesen Arbeitsschritt wurde ein Filtriergerät der Fa. Nalgene und eine Elektropumpe zur Erzeugung des Unterdrucks von 3 psi verwendet. Der Filter wurde nach je 50 ml SCW gewechselt, das Filtrat wurde zu je 250 ml in 500 ml Rundkolben rotierend eingefroren und anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage L05 der Fa. Wkf kryolyophilisiert. Die gewonnene Trockensubstanz war in Wasser nicht vollständig lösbar, sodass ein weiterer Aufbereitungsschritt notwendig war. Hierbei wurde das filtrierte und kryolyophilisierte SCW portionsweise in Aqua bidest. gelöst und in Teilen zu je 100 ml in einer Kühlzentrifuge der Fa. Du Pont Sorvall des Typs RC 5B Refrigerated Superspeed Centrifuge bei 18000 U/min für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert, der ungelöste Anteil wurde so oft resuspendiert, bis die wässrige Phase ihre sonst beim Lösen von SCW typisch gelbliche Farbe verlor. Die so gewonnenen Überstände wurden schließlich zusammengeführt und erneut kryolyophilisiert. Der unlösliche Anteil wurde ebenfalls gefriergetrocknet und für Analysen aufgehoben.

(Zorger 1999)

2.1.3 Mirazidiengewinnung

Zur Gewinnung von Mirazidien im Labor für die Attraktivitätstestung des SCW und der später gewonnenen Fraktionen wurden weiße, männliche NMRI-Mäuse durch eine subkutane Injektion mit Zerkarien infiziert. Nach ca. 6 Wochen wurden die Tiere mit Äther eingeschlüpfert, anschließend wurde der Darm entnommen, geöffnet und ausgeschabt. Zur Anreicherung der in dem so gewonnenen Darmbrei enthaltenen Eier wurde dieser nach autolytischer Zersetzung über Nacht in eine Flasche mit physiologischer NaCl-Lösung gegeben und 4 Std geschüttelt. Zur Entfernung der Darmreste wurde der Inhalt der Flasche durch eine Gaze filtriert und anschließend bei 4° Celsius in einer Petrischale für 1 Std. in den Kühlschrank gestellt. Die Darmreste konnten

schließlich von der Oberfläche abgesaugt werden. Die so erhaltene Suspension konnte bei 4°C mehrere Tage aufbewahrt werden. Bei Bedarf wurde schließlich der Überstand erneut abgesaugt, die Petrischale mit 28°C warmen Leitungswasser aufgefüllt und unter eine Lampe gestellt was nach kurzer Zeit zu einem Schlüpfen der Larven führte (Netzer 1990, Zorger 1999).

2.1.4 Attraktivitätstestung

Um eine Substanz bzw. ein Substanzgemisch wie das SCW auf Attraktivität zu testen, wurde dieses unter standardisierten Bedingungen frisch geschlüpfen Mirazidien vorgesetzt. Dabei wurde eine ähnliche wie die 1970 von Chernin beschriebene Methode der „point inoculation“ verwendet. Dafür wurde die auszutestende Substanz punktuell in die Mirazidiensuspension eingebracht und die Reaktion der Mirazidien in Bezug auf diese Stelle beobachtet. Dafür wurde ein Tropfen der Mirazidiensuspension mit 5- 10 Mirazidien in eine Petrischale pipettiert und unter ein Stereomikroskop gestellt. Die zu testende getrocknete Probe wurde in autoklaviertem Aqua bidest. gelöst, dabei wurde eine Konzentration von ca. 0,5 mg/ml angestrebt. Von dem Überstand wurde eine Eppendorf-Pipettenspitze gefüllt - Chernin verwendete ein Glaskapillare (Chernin 1970) - das breite Ende der Pipettenspitze wurde anschließend mit Parafilm verschlossen und die Spitze in der Mitte des Tropfens der Mirazidiensuspension in der Petrischale eingetaucht. So konnte ein langsamer relativ punktueller Austausch zwischen der Probe und der Miracidiensuspension erfolgen. Beim Blick durch das Mikroskop konnte so das Verhalten der Mirazidien vor und nach Einbringen der Probe beobachtet und beurteilt werden. Änderten sich die Schwimmbewegungen von langsam und eher geradlinig zu schnell mit häufigem Richtungswechsel und Akkumulation um die Pipettenspitze, so wurde diese Probe als attraktiv bewertet. Die Einteilung erfolgte schließlich noch in eine geringe (+) bis starke (+ + +) Attraktivität. Löste die Probe keine Verhaltensänderung aus, so wurde die Probe als nicht attraktiv (-) eingestuft. Als Referenzsubstanz diente frisch gewonnenes SCW. Damit konnte die Qualität der Miracidiensuspension getestet werden. Grundsätzlich wurde jede Testung zweimal an zwei

verschiedene Tagen durchgeführt, wobei jede Probe bei einem Test mindestens zweimal auf Attraktivität untersucht wurde. Für jeden Test wurden eine frische Petrischale und eine frische Pipettenspitze verwendet.

(Zorger 1999)

2.2 Ausgangsmaterial (SCW 1)

Als Ausgangsmaterial für diese Arbeit diente nicht das nach oben genannten Verfahren gewonnene SCW, sondern bereits entsprechend dem Verfahren der Dissertation von N. Zorger (1999) aufbereitetes SCW. Dabei wurden bereits einige nicht attraktiven Bestandteile des SCW abgetrennt. Das Material, welches für die vorliegende Arbeit zu Verfügung stand, wurde in drei wesentlichen Schritten aufgetrennt. Zunächst wurde das frisch gewonnene und kryolyophilisierte SCW dialysiert. Anschließend erfolgte die Präparation des SCW mittels HPLC durch 3 verschiedene Filtermaterialien: 1. Gelfiltration mit Bioseparatin TSK®Gel G 3000 SW, 2. Gelfiltration mit Biogel P2, 3. Anionenaustauschchromatographie mit Macro-Prep High Q support Gel. Dabei wurde nur die jeweils attraktive Fraktion des SCW für weitere Auftrennungsschritte verwendet. Vor dem jeweils nächsten Präparationsschritt wurde das SCW dialysiert (Zorger 1999). So stand für die weitere Auftrennung im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein bereits stark aufbereitetes SCW zu Verfügung. Um Missverständnissen vorzubeugen, wird dieses stark aufbereitete SCW im weiteren Verlauf als SCW 1 bezeichnet.

2.3 Chromatographische Auftrennung und Analyse

2.3.1 Das chromatographische Verfahren

Die Auftrennung eines Substanzgemisches beruht bei der Chromatographie ganz allgemein auf einer unterschiedlichen Adsorption der verschiedenen Substanzen in der zu untersuchenden mobilen Phase an die stationäre Phase. So braucht jede Substanz unterschiedlich lang um die stationäre Phase zu passieren und es erfolgt eine qualitative Trennung der Substanzen. Besteht die

mobile Phase aus Gas spricht man von einer Gaschromatographie, wird eine Flüssigkeit verwendet entsprechend von einer Flüssigchromatographie. Als stationäre Phase können feste Teilchen, behandelte Oberflächen oder flüssigkeitsbelegte Träger verwendet werden (Mayer 1992).

2.3.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Bis Anfang der 70er Jahre dauerten Trennungen mit der Flüssigkeitschromatographie oft stundenlang, bereits 1941 wurde von Martin und Syngé eine Steigerung der Wirksamkeit durch Einsatz hoher Drücke zum Durchpressen der mobilen, flüssigen Phase postuliert. Mit Weiterentwicklung der Flüssigkeitschromatographie-Apparaturen, mit Erreichen von Drücken bis 8700 psi, als auch der stationären Phase hinsichtlich Beschaffenheit (Oberfläche, Größe etc.), konnte die Leistungsfähigkeit erheblich gesteigert werden. So war die „High Pressure (oder auch High Performance) Liquid Chromatographie“, kurz HPLC, geboren. Somit stand ein Verfahren zu Verfügung, welches Substanzgemische qualitativ als auch quantitativ (die Flächen unter den vom Integrator aufgezeichneten Signalkurven sind proportional zu der aufgetragenen Substanzmenge) innerhalb von Minuten zu trennen vermochte. Je nach Beschaffenheit, Eigenschaft und insbesondere dem der Trennung zugrunde liegendem Mechanismus der stationären Phase wird die HPLC in Untergruppen eingeteilt. (Mayer 1992)

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit der Gelfiltration, auch Gel- oder Ausschlußchromatographie genannt, gearbeitet (genauere Erläuterung unter Punkt 2.3.4.)

2.3.3 HPLC Apparatur

Für die Durchführung der Untersuchungen wurde eine herkömmliche HPLC-Apparatur verwendet (Abb. 1). Die wesentlichen Bestandteile dafür sind ein Lösungsmittel-Vorratsgefäß(1), eine Hochdruckpumpe(2), ein Manometer(3), eine Säule mit Einspritzventil(4), ein Detektor(5), ein Schreiber/Integrator(6) und ein Fraktionssammler(7).

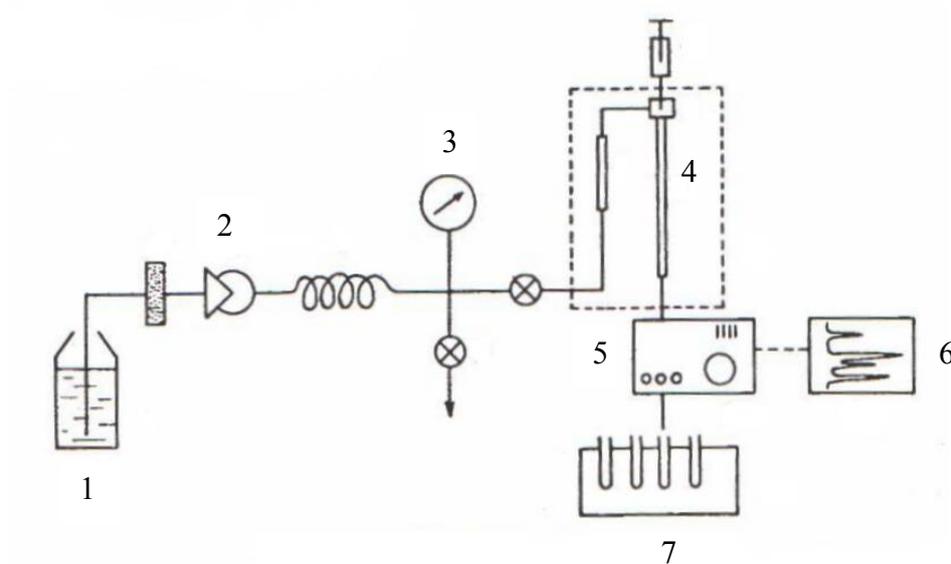


Abb 1: *HPLC Apparatur mit Lösungsmittel-Vorratsgefäß(1), Hochdruckpumpe(2), Manometer(3), Säule mit Einspritzventil(4), Detektor(5), Schreiber/Integrator(6) und Fraktionssammler(7).*

Die verwendeten Geräte stammten alle von der Fa. LKB Bromma:

2150 HPLC Pump, 2156 Solvent Conditioner, 2152 LC Controller, 2151 Variable Wavelength Monitor, 2221 Integrator

2.3.4 Gelfiltration

Für die Gelfiltration wird die Chromatographiesäule mit einem porösen Material gefüllt, welches nicht durch chemische Wechselwirkung, sondern durch Klassifizierung der Molekülgröße eine Auftrennung herbeiführt (Abb 2).



Abb 2: *Auftrennung der Moleküle der mobilen Phase anhand der Molekülgröße (Molekulargewicht)*

Darin besteht auch der Hauptunterschied zu anderen flüssigkeitschromatographischen Verfahren. Da die Molekülmasse im direkten Verhältnis zur Molekülgröße steht, kann somit auch eine Molekülmassenbestimmung durchgeführt werden. So können Moleküle, die eine bestimmte Größe überschreiten, nicht in die Poren der stationären Phase eindringen. Sie werden ausgeschlossen und wandern auf schnellstem Wege durch die Säule. Kleinere Moleküle hingegen verweilen je nach Größe unterschiedlich lange in den Poren, je kleiner desto länger. Die kleinsten Moleküle verlassen die Säule zuletzt. Die Verweildauer ist dabei natürlich auch abhängig von der Porengröße des Materials der stationären Phase. Unterhalb einer bestimmten Größe durchdringen die Moleküle vollständig das Gel und werden somit nicht getrennt. Dadurch hat ein bestimmtes Material einen bestimmten Bereich, bezogen auf die Molekülgröße, in dem eine Auftrennung eines Probengemisches erfolgt (Mayer 1992).

Die für diese Arbeit benutzten Säulen der Firma Pharmacia Biotech (jetzt Amersham Biosciences) waren mit Superdex® Filtrationsgel bepackt. Dabei handelt es sich um Dextran, welches kovalent an stark verzweigte poröse Agaroseperlen gebunden ist. Das benutzte Gel Superdex® 200 prep grade, welches aus Kügelchen mit einem Durchmesser von ca. 34 µm besteht, besitzt eine optimale Auftrennung im Bereich eines Molekulargewichts von 10.000 – 600.000 Daltons, da Fichtelscherer (1996), Beer (1997) und Zorger (1999) das Molekulargewicht des Lockstoffes zwischen 10^4 – 10^6 vermuteten. Für die Durchführung der Untersuchungen standen zwei Säulengrößen zur Verfügung. Für analytische Zwecke wurde die Superdex® 200 HR 10/30 mit einem chromatographischem Bett von 10 × 300 mm verwendet. Hier konnte unter Einsatz kleiner Mengen von Ausgangsmaterial die Auftrennbarkeit zunächst geprüft werden. Zeigte sich auf der kleinen Säule eine Auftrennung wurde zur Auftrennung größerer Materialmengen die größere Säule HiLoad Superdex® 200 16/60 mit einem Bett von 16 × 600 mm verwendet. Vor der Applikation von SCW wurden auf beiden Säulen Testläufe mit Dextran 11.500 und 505.000, Melezitose D(+) und Lysin-Lysin durchgeführt.

2.3.4.1 Probenaufbereitung

Da es sich bei HPLC um ein Trennverfahren mit einer flüssigen Phase handelt, musste das im gefriergetrockneten Zustand vorliegende Substrat zunächst gelöst werden. Dabei wurde vor der Präparation größerer Mengen SCW 1 jeweils eine analytische Auftrennung durchgeführt, um das Auftrennungspotential des verwendeten HPLC-Gels beurteilen zu können. Für die Analyse wurden 1 mg SCW 1 in 800 µl H₂O bid. Ø 0,2 µm (zweifach destilliertes H₂O, welches zusätzlich mit einem Mikrofilter der Fa. Satorius, Porenweite 0,2 µm, filtriert wurde) suspendiert und anschließend in einer Eppendorf-Zentrifuge 3200 5 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Dem Überstand wurden sofort 100 µl entnommen und aufgetragen. Für die Präparation wurde je 1mg SCW 1 in 600 µl Aqua bid.Ø 0,2 µm suspendiert. Diese Konzentration erwies sich im Verlauf vorausgegangener Probeläufe als bester Kompromiss zwischen guter Löslichkeit und Quantität in Bezug auf Effektivität. Das gelöste SCW 1 wurde anschließend 10 min bei 15.000 U/min in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und während der Läufe im Kühlschrank aufbewahrt.

2.3.4.2 Analyse mittels HPLC auf Superdex® 200 HR 10/30

Verfahren :	Gelfiltration mittels HPLC
Säule :	Superdex® 200 HR 10/30 der Fa. Pharmacia Biotech (jetzt Amersham Biosciences)
Aufgetragenes Volumen :	100 µl
Aufgetragene Menge SCW 1:	50 µg
Puffer :	H ₂ O bid. Ø 0,2 µm
Laufparameter :	
Flow :	0,5 ml/min
Absorption :	210 nm
Attenuation:	128
Temperatur :	Zimmertemperatur (20° C)

2.3.4.3 Auftrennung mittels HPLC auf HiLoad Superdex® 200 16/60

Verfahren :	Gelfiltration mittels HPLC
Säule :	HiLoad Superdex® 200 16/60 der Fa. Pharmacia Biotech
Aufgetragenes Volumen :	400µl
Aufgetragene Menge SCW 1:	660 µg
Puffer :	H ₂ O bidest. Ø 0,2 µm
Laufparameter :	
Flow :	1,0 ml/min
Absorption :	210 nm
Attenuation :	512
Temperatur:	Zimmertemperatur

2.3.4.4 Fraktionsgewinnung und -behandlung

Das Auffangen der einzelnen Fraktionen erfolgte manuell anhand der vom Integrator aufgezeichneten Kurve. Während der Läufe wurden die Greiner-Röhrchen zum Auffangen der einzelnen Fraktionen stets auf Eis gekühlt und nach jedem Lauf sofort eingefroren. Nach Beendigung der Läufe wurden alle Fraktionen kryolyophilisiert. Anschließend wurden die entsprechenden Fraktionen mit Aqua bid. resuspendiert, zusammenpipettiert, erneut eingefroren und wieder kryolyophilisiert. Die so gewonnenen Fraktionen wurden an Miracidien auf ihre Attraktivität getestet. Die attraktive(n) Fraktion(en) wurde(n) anschließend mittels Gaschromatographie, SDS-Gelelektrophorese und Aminosäureanalyse weiter untersucht.

2.3.5 Fraktionsanalyse mittels Gaschromatographie (GC)

Ähnlich wie die HPLC handelt es sich bei der Gaschromatographie um eine Hochleistungschromatographie, nur wird hier als mobile Phase ein Gas verwendet. Die Voraussetzung für eine Auftrennung eines Probengemisches ist deren Vorliegen als Gas oder die Möglichkeit der Proben vollständig verdampft werden zu können. Damit SCW Fraktionen letztere Bedingung erfüllen, müssen sie vor der Applikation chemisch verändert werden.

2.3.5.1 Probenaufbereitung

Um die erforderliche chemische Veränderung zu erzielen wurden die Proben zunächst hydrolysiert. Dabei wurde eine Partialhydrolyse mit 2M HCl im verschmolzenen Fiolax-Röhrchen, welches 3 h bei 100° C inkubiert wurde, durchgeführt. Die Probe wurde dann in einer Speed Vac der Fa. Savant getrocknet, mit Aqua bid. nachgewaschen und erneut getrocknet. Dieser erste Schritt diente der Spaltung glykosidischer Verbindungen, eine Voraussetzung, um die Zuckermoleküle weiter chemisch verändern zu können. Hierauf erfolgte zunächst die Reduktion nach Albersheim et al. (1967). Dafür wurde 1 mg der hydrolysierten Probe mit 200µl 0,1 M NH₄OH versetzt und anschließend der pH gemessen. Für das weitere Prozedere war eine neutrale bis leicht alkalische Reaktion notwendig (pH 7–9). Danach wurde die gleiche Menge einer NaBH₄ – Lösung (20 mg/ml in 0,1 M NH₄ OH) zugefügt und das Ganze bei 37° C eine Stunde inkubiert. Das überschüssige Na BH₄ wurde schließlich mit ein bis zwei Tropfen Eisessig zerstört. Das entstandene Borat wurde 3 mal nach Zugabe von je 1 ml Methanol in einem Wärmebad mit 37° C in Form von Borsäuremethylester ausgeblasen. Auf diese Weise wurde die Probe auch letztlich getrocknet. Anschließend wurde sie nach Holligan und Drew (1971) acetyliert: dabei wurden die vorliegenden Zuckeralkohole in Alditolacetate umgewandelt. Dafür wurde der getrockneten Probe in einem Fiolax-Glasröhrchen 0,3 ml eines Acetylierungsgemisches (wasserfreies Pyridin und Essigsäureanhydrid 1 : 1) zugegeben, verschweißt, und bei 60° C eine Stunde im Dunkeln inkubiert und schließlich vorsichtig im Luftstrom getrocknet. Es

folgte eine Lösung mit 1 ml Chloroform und eine Überführung in ein Eppendorf Cup, dann wurde zur Entfernung von Pyridinresten die Probe erneut trocken geblasen. Dieser Vorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Zuletzt wurden ihr je 1 ml Aqua bid. und 1 ml Chloroform zugesetzt, gut durchmischt und 15 min mit 1000 U/min zentrifugiert, um die zwei Phasen voneinander zu trennen. Das Chloroform (die untere Phase) wurde dann in ein neues Glasröhrchen überführt und ein letztes Mal getrocknet (Fichtlscherer 1996).

2.3.5.2 Apparative Bedingungen und Durchführung

Gaschromatograph :	Packard Modell 438 mit Flammenionisationsdetektor
Säule:	Glas, 2 × 1000 mm mit 3% SP 2340 auf 100/200 Supelcoport der Fa. Supelcoport Inc.
Injektortemperatur :	270° C
Detektortemperatur :	280° C
Säulentemperaturprogramm :	140° C 2 min. isotherm 140 – 270° C, 6° C / min. 270° C, 3 min. isotherm
Trärgas :	Stickstoff 15 ml / min
Brenngase :	nachgereinigter Wasserstoff 15 ml / min., synthetische Luft (20/21 vol O ₂ in N ₂) 200 ml / min.
Integrator :	Shimadzu Modell c – R6A
(Zorger 1999)	

Die hydrolysierte, reduzierte und acetylierte, trockene Probe wurde in 10 µl Chloroform gelöst, wovon 2 µl zur Analyse appliziert wurden. Die vom Integrator aufgezeichnete Kurve wurde mit der eines Standards hinsichtlich Qualität und Quantität verglichen.

2.3.6 Fraktionsanalyse mittels Aminosäureanalyse (ASA)

Das letzte Verfahren aus dem Bereich der chromatographischen Verfahren, welches für die Analyse des SCW herangezogen wurde, war die Aminosäureanalyse (ASA). Dabei handelt es sich um eine Ionenaustauschchromatographie, welche auf einer Wechselwirkung zwischen den ionischen Gruppen der stationären Phase und der Probemoleküle beruht. Diese Methode eignet sich unter anderem besonders gut zur Trennung von Aminosäuren (Mayer 1992).

2.3.6.1 Probenaufbereitung

Um die Aminosäuren mittels der ASA identifizieren zu können, mussten die Makromoleküle zunächst in die einzelnen Aminosäuren und Aminozucker gespalten werden. Dies erfolgte mit Hilfe der Totalhydrolyse, wofür die trockene Probe (0,2 mg) in einem Glasröhrchen mit 200 µl 4 M HCL versetzt und das verschlossene Röhrchen anschließend 16 Std. bei 100° C inkubiert wurde. Schließlich wurde die Lösung im Luftstrom getrocknet und mit Aqua bid. suspendiert und erneut getrocknet. Vor dem Auftragen auf die ASA-Säule wurden die trockenen SCW Proben in 50 µl Dilutionspuffer aufgenommen und manuell appliziert. Die Vergleichsproben wurden wegen der maschinellen Auftragung in je 150 µl Dilutionspuffer gelöst (davon gelangten letztlich auch nur 50 µl auf die Säule). Für letztere wurde dabei eine Konzentration von 20 nmol / 50 µl angestrebt.

2.3.6.2 Apparative Bedingungen und Durchführung

Die verwendete Apparatur enthielt eine Säule mit einem Kationenaustauschharz. Die Proben wurden bei niedrigem pH injiziert, bei welchem die Aminosäuren als Kationen vorlagen und so mit hoher Bindungsaktivität an das Harz der Säule gebunden wurden. Anschließend wurden durch eine graduelle Änderung des pH die Aminosäuren je nach pKs

nacheinander eluiert. Für die Detektion im Photometer wird ein Farbstoff durch die Bindung der Aminosäuren an Ninhydrin gebildet (1,3 – Dioxo – 2 Amino – Hydrian), welcher bei einer Wellenlänge von 570 nm absorbiert (Fichtlscherer 1992).

Aminosäureanalysator:	Biotronic LC 6001
Vorwaschsäule:	6 × 80 mm Harz : BTC F Füllhöhe : 30 mm
Trennsäule :	4 × 250 mm Harz : BTC 2710 Füllhöhe : 210 mm
Pufferdurchflußrate :	20 ml / h
Ninhydrindurchflußrate :	20 ml / h
Temperatur :	T1 48,8° C T2 59,2° C T3 64,5° C
Dilutionspuffer :	4,8 g NaOH, 16,8 g Natriumcitrat, 8 ml HCl konz., 1 ml Phenol, 20 ml 25% (v/v) wässr. Thiodiethanol, Aqua bid. ad 1 l, pH 2,2
Integrator:	Shimadzu c – R1A

Zur qualitativen und quantitativen Evaluierung wurde ein Lauf mit einem Standard unter gleichen Bedingungen durchgeführt, welcher für den Vergleich herangezogen wurde (Zorger 1999).

2.4 Fraktionsanalyse mittels Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen. Dabei nutzt sie die Tatsache aus, dass die Proteine aufgrund ihrer positiven und negativen Ladungen in einem elektrischen Feld wandern. Die Wandergeschwindigkeit wird durch ihre Nettoladung, Größe und Form bestimmt. Dabei können die

Proben in einer Flüssigkeit oder in einem Trägermedium aufgetrennt werden. Eine besondere Form der Elektrophorese stellt die hoch-auflösende SDS-Gelelektrophorese dar (SDS = sodium dodecyl sulfate = dt. Natriumdodecylsulfat), welche zur Bestimmung von Molekulargewichten von Proteinen Verwendung findet. Dafür wird aus Monomeren vor jedem Lauf ein hochvernetztes Polyacryamidgel hergestellt. Durch Veränderung der Porengröße kann die Auflösung variiert werden. Um die zwei anderen Faktoren, welche die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine beeinflussen, auszuschalten, wird der Probe ein negativ geladenes Detergens, SDS, zugesetzt. Dadurch werden einerseits alle Proteine gleichsam negativ geladen, andererseits bewirkt das SDS durch Bindung seiner Fettsäureanteile an hydrophobe Bezirke der Proteine eine Entfaltung des Moleküls, wodurch Wechselwirkungen zu Lipiden oder anderen Proteinen aufgehoben werden. Durch Zugabe von Mercaptoethanol werden zudem Proteinkomplexe durch Spaltung von Disulfidbrücken in ihre Einzelteile zerlegt. Somit erfolgt bei der Wanderung der Proteine durch die Poren des Gels, zum positiven Pol, eine Auftrennung nach der Größe und damit nach dem Molekulargewicht.

2.4.1 Probenaufbereitung

Die Erfahrungen aus der Dissertation von N. Zorger (1999) zeigten, dass es für eine einigermaßen saubere Auftrennung der Proteine im SCW durch die SDS – Page der Auftragung einer nur sehr geringen Menge (0,2 mg) des SCW bedurfte. Da es nicht sehr gut möglich war, eine so geringe Menge auszuwiegen, wurden 5 mg der attraktiven SCW-Fractionen in 500 µl H₂O bid Ø 0,2 µm suspendiert, 10 min bei 15.000 U/min (Sorvall) zentrifugiert und anschließend 20 µl dem Überstand entnommen und in der Speed Vac der Fa. Savant getrocknet. Die Probe wurde schließlich in 30 µl Probenpuffer (2% SDS, 10% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau, 1% Mercaptoethanol) aufgenommen, 3 – 5 min. bei 100° C inkubiert und aufgetragen (Zorger 1999).

2.4.2 Apparative Bedingungen und Durchführung

Die Herstellung des Gels erfolgte nach einem Rezept von Laemmli (1970), welches durch Prof. Fiedler und seinen Mitarbeitern aufgrund deren eigenen Erfahrungen leicht modifiziert wurde.

Folgende Stammlösungen wurden für das Gießen der Gele verwendet:

Trenngellösung :	40% (w/v) Acrylamid, 0,73% (w/v) Bisacrylamid
Trenngelpuffer :	750 mM TRIS / HCL pH 8,8
Sammelgellösung :	10% (w/v) Acrylamid, 0,1% (w/v) Bisacrylamid
Sammelgelpuffer :	250 mM TRIS / HCL pH 6,8
Ammoniumpersulfatlösung :	10% Ammoniumpersulfat (APS)
Starter :	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid)

Für die Durchführung der SDS – Page wurden nur Gele mit einem Gehalt von 8% Acrylamid gegossen, da die Erfahrungen von Zorger (1999) keine wesentliche Auftrennung des SCW in einem 10% Gel zeigten. Für das Gießen der Gele wurde dabei folgendes Pipettierschema angewandt:

Lösung	Trenngel 8% (in ml)	Sammelgel (in ml)
Acrylamid	2,5	2,0
Puffer	6,25	2,5
10% SDS	0,125	0,05
Aqua bid.	3,45	0,39
APS	0,15	0,05
TEMED	0,015	0,005
Gesamtmenge	12,49	5,0

Vor dem Pipettiervorgang wurde der Minigelapparat der Fa. Biometra vorbereitet und horizontal ausgerichtet. In diesem konnten Gele mit einer

Länge von 6,5 – 7 cm und einer Dicke von 1mm gegossen werden. Nachdem das Trenngel zusammenpipettiert und mit dem Starter versehen war, wurde es umgehend in die bereitgestellte Apparatur gegossen. Um eine horizontale Oberfläche zu erhalten, wurde es anschließend mit Aqua bid. bedeckt. Nachdem die Polymerisation abgeschlossen war, wurde das Wasser abgegossen und die Oberfläche mit einem Filterpapier trockengetupft. Anschließend folgte das Pipettieren und Gießen des Sammelgels, wobei die Probetaschen mittels eines Probenkammes geformt wurden.

Die Durchführung der SDS-Page erfolgte nach Lugtenburg et al. (1975). Dafür wurde nach Entfernung des Probenkammes und des Dichtungsgummis die Platte mit dem Gel in der Elektrophoresekammer fixiert. Zur weiteren Vorbereitung erfolgte das Auffüllen der Kammer mit Elektrodenpuffer (0,025 M Tris - Puffer, 0,19 M Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3) und das Anschließen an den Hochspannungstransformator. Nach Einbringen der Probe in die Probetasche wurde zunächst für 15 min. ein Strom von 12,5 mA angelegt, danach für die eigentliche Auftrennung 25 mA. Es wurden je ein Lauf von 2 Std. und 4 Std. durchgeführt.

Zum Vergleich lief bei jedem Lauf ein Standard mit, welcher durch die Mitarbeiter von Prof. Fiedler zusammengestellt worden war. Dieser enthielt:

je 0,5 µg / µl	(Molekulargewicht)
Cytochrom C	(12,5 kD)
Chymotrypsinogen	25 kD)
Carbonic Anhydrase	(29 kD)
Ovalbumin	(45 kD)
Rinderserumalbumin	(66 kD)

2.4.3 Färbung

Um die Proteine nach Beendigung des Laufes sichtbar zu machen, wurde zunächst eine Coomassie Blau-Färbung nach Weber und Osborn (1969) durchgeführt. Anschließend wurde zusätzlich die noch wesentlich sensitivere Silbernitrat Färbung nach Dzandu et al. (1984) verwendet. Für die Färbung wurde das Gel vorsichtig der Elektrophoreseapparatur entnommen und durch Abschneiden einer Ecke eindeutig gekennzeichnet.

2.4.3.1 Färbung mit Coomassie Blau

Färbereagenzien :	2,23 g Coomassie Brilliant Blue R 250 B
	400 ml Methanol
	400 ml Aqua deion.
	163 ml Eisessig

Die SDS–Page wurde zunächst in o.g. Färbelösung bei Raumtemperatur für 30 min. leicht geschüttelt und somit vollständig eingefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung.

Entfärbungsreagenz :	100 ml Eisessig
	300 ml Methanol
	Aqua bid. ad 1 l

Das Polyacrylamidgel wurde in der Entfärbungslösung über Nacht auf einem Rüttler bewegt. Aufgrund der irreversiblen Bindung des Farbstoffes an die Proteine konnten diese so sichtbar gemacht werden.

2.4.3.2 Färbung mit Silbernitrat

Die Anfärbung von Proteinen mit Silbernitrat entspricht dem Vorgang bei der Entwicklung von Schwarzweißphotos. Dafür wird das Gel zunächst in eine silberhaltige Färbelösung getaucht, anschließend erfolgt die Entwicklung,

welche schließlich durch Einbringen des Gels in ein Stopbad beendet wird. Die SDS-Page wurde vor dem Färben zweimal hintereinander für je 5 min in 10% Ethanol in Aqua deion. gewaschen. Für die anschließende Färbung wurden folgende Reagenzien verwendet:

Färbelösung :	0,1% Silbernitrat in Aqua deion., frisch hergestellt, in einem lichtundurchlässigem Gefäß bereitgestellt
Entwickler :	3% Na ₂ CO ₃ , 0,02% Formaldehyd in Aqua deion., frisch hergestellt, aus einer 37%igen Stammlösung
Stopbad :	1% Eisessig in Aqua deion.

Nach dem Waschvorgang wurde das Gel in dem lichtundurchlässigen Gefäß in der Silbernitratlösung für 30 min. inkubiert und anschließend für 5 – 10 min in den Entwickler getaucht. Schließlich erfolgte der Abbruch der Entwicklung im Stopbad. Zur Aufbewahrung und Auswertung wurde das Gel zu guter Letzt mit etwas Wasser luftfrei in einer Plastikfolie eingeschweißt.

3 Ergebnisse

3.1 HPLC von SCW 1

Zur Erinnerung möchte ich an dieser Stelle noch einmal darauf hinweisen, dass als Ausgangsmaterial für die von mir durchgeführten Untersuchungen 21mg einer attraktiven Fraktion nach bereits mehrfacher Auftrennung des ursprünglich doppelkonzentrierten SCW vorlag. Dieses hochaufgereinigte SCW wurde mir von meinem Vorgänger N. Zorger als Resultat seiner Dissertation für weitere analytische und präparative Schritte freundlicherweise überlassen. Der Einfachheit halber wird dieses im weiteren Verlauf von mir als SCW 1 bezeichnet.

3.1.1 Flüssigkeitschromatographische Analyse von SCW 1

Um eine weitere Auftrennbarkeit des vorliegenden SCW 1 durch Superdex® 200 prep grade unter Einsatz möglichst geringer Probemengen durchzuführen, wurde dies auf der eher für analytische Zwecke ausgerichteten kleineren HR Superdex® 200 10/30 Säule versucht. Es zeigte sich eine relativ gute Auftrennung (Abb. 3.) mit einem Hauptpeak bestehend aus ca. 4 Fraktionen (F 1-4) und ca. vier weiteren kleinen Peaks (F 5-8). Der Lauf wurde mehrfach wiederholt, um das Ergebnis zu bestätigen, wobei aufgrund der sehr geringen Auftragsmenge von 50 µg auf eine fraktionierte Sammlung verzichtet wurde.

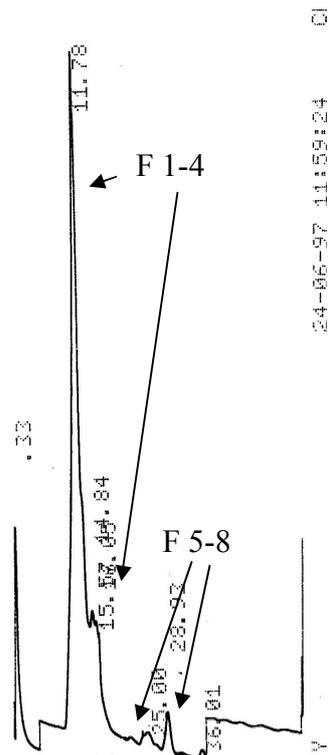


Abb. 3: SCW 1 auf Superdex® 200 HR 13/30, hierbei konnten ca. 8 Fraktionen (F) in einem Hauptpeak (F 1-4) und kleinen Nebenpeaks (F 5-8) identifiziert werden.

3.1.2 Flüssigkeitschromatographische Präparation von SCW 1

Aufgrund der relativ erfolgreichen Auftrennung des SCW 1 schien eine präparative Auftrennung auf der größeren HiLoad Superdex® 200 16/60-Säule sinnvoll. Der Auftrennung großer Mengen gingen jedoch einige Probeläufe voraus. Dies diente unter anderem dazu, die maximale Auftragsmenge bei noch guter Auflösung zu finden. Erwartungsgemäß zeigte der Kurvenverlauf große Ähnlichkeit mit der analytischen Auftrennung bei noch besserer Auflösung aufgrund der doppelten Länge der großen Säule (Abb. 4). Als gute Auftragsmenge stellte sich eine Probenmenge von 660 µg in einem Auftragsvolumen von 400 µl heraus. Die Auftrennung der gesamten vorhandenen Probe (SCW 1) erfolgte in drei Serien an verschiedenen Tagen. Es wurden je Lauf acht Fraktionen gesammelt, nach Beendigung jeden Laufes wurden diese eingefroren und gefriergetrocknet. Danach wurden alle einzelnen

Fraktionen resuspendiert, zusammengefügt und erneut gefriergetrocknet. Somit standen die ersten Fraktionen zur Attraktivitätstestung an Mirazidien zur Verfügung.

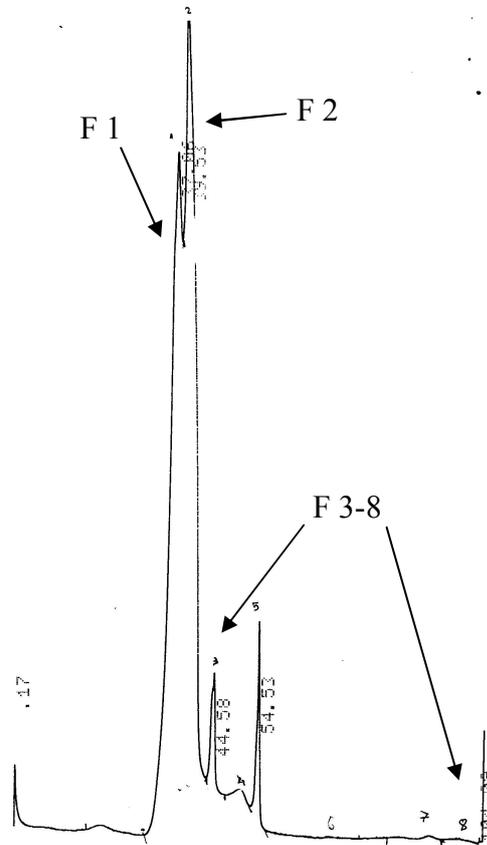


Abb. 4: SCW 1 auf HiLoad Superdex® 200 16/60, es konnten 8 Fraktionen (F 1-8) gesammelt werden.

3.2 Attraktivitätstestung der Fraktionen von SCW 1

Fraktion 1 (F 1) : (+ + +)

Fraktion 2 (F 2) : (+ +)

Fraktion 3 – 8 : (-)

(-) = nicht attraktiv , (+) - (+ + +) = mäßig bis sehr attraktiv (zwei durchgeführte Attraktivitätstestungen lieferten sehr ähnliche Ergebnisse)

Somit war der mengenmäßig größte Teil des Ausgangsmaterials attraktiv. Dabei handelt es sich um die größten Moleküle in dem Probengemisch, da diese als erstes eluierten. Kleinere Moleküle welche keine Attraktivität zeigten,

konnten entfernt werden. Da ein nur geringer Unterschied in der Attraktivität von F1 und F2 festgestellt werden konnte, wurden sie zusammengefaßt zu SCW 2. Die restlichen Fraktionen wurden verworfen.

3.3 Gaschromatographische Analyse

3.3.1 Analyse der attraktiven Fraktionen F1 und F2 von SCW 1

Eine kleine Menge der beiden zusammengefaßten Fraktionen F1 und F2 (im weiteren Verlauf als SCW 2 benannt) wurden entsprechend der Probenaufbereitung unter Punkt 2.3.5.1 aufbereitet und anschließend auf dem Gaschromatographen analysiert (Abb. 5). Der Kurvenverlauf wurde mit einem Standard verglichen. Neben Galaktose, Glukose, Galaktosamin und Glukosamin trat mit einer Elutionszeit von 9,432 Min. noch ein unbekannter Zucker auf, den es zu identifizieren galt.

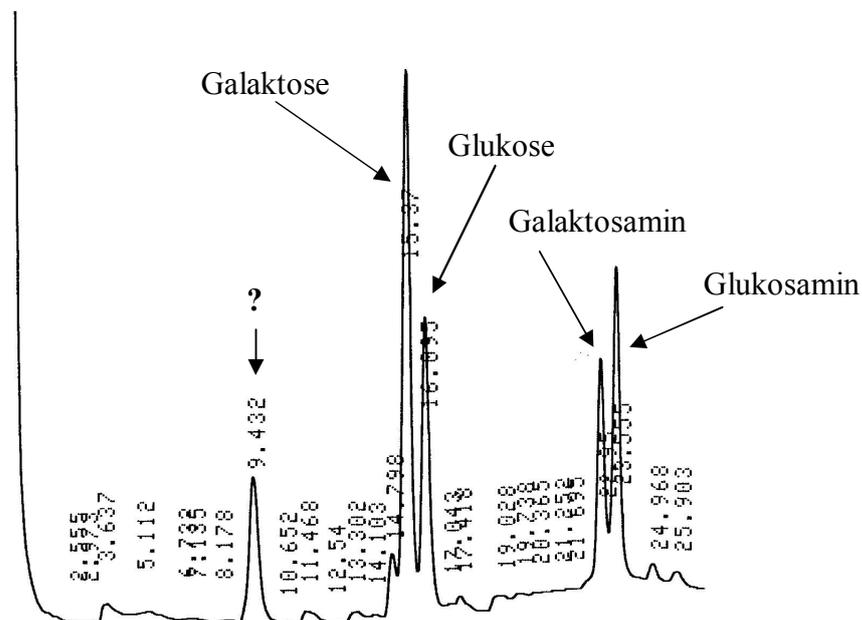


Abb. 5: Gaschromatographie (GC) von SCW 2. neben den anhand des Standards identifizierten Zuckern Galaktose, Glukose, Galaktosamin und Glukosamin trat bei einer Elutionszeit von 9,432 ein unbekannter Zucker (mit einem ? gekennzeichnet) auf.

3.3.2 Fremdzuckerbestimmung

Für die Identifikation des unbekannten Zuckers wurden drei Zucker ausgesucht deren Elutionszeit im o.g. Bereich vermutet wurden: Fukose L(-), Rhamnose L(+) und 6-Desoxyglukose. Die Vergleichsproben wurden zunächst einzeln im GC appliziert. Dafür wurden Lösungen von 400nmol hergestellt, diese wurden ebenfalls reduziert und acetyliert. Je 2 µl wurden dann appliziert. Wegen einer deutlichen Abweichung der 6 - Desoxyglukose wurde diese bei den weiteren Schritten ignoriert. Bei gemeinsamer Applikation von Rhamnose und Fukose zeigte sich ein knapp zweigipfliger Peak, dessen Elutionszeit sich im Bereich der des unbekannten Zuckers befand. Anschließend wurden 2 µl SCW 2 mit je 1 µl der hergestellten Vergleichsproben von Fukose und Rhamnose appliziert. Bei dem direkten Vergleich mit Rhamnose zeigte sich lediglich eine Verbreiterung des unbekannten Peaks (Abb. 6), mit der Fukose zeigte sich jedoch eine deutliche Erhöhung des unbekannten Peaks (Abb. 7) im Vergleich zu der Kurve von SCW 2 alleine (Abb. 5). Somit verhielt sich der unbekannte Zucker im GC wie authentische Fukose.

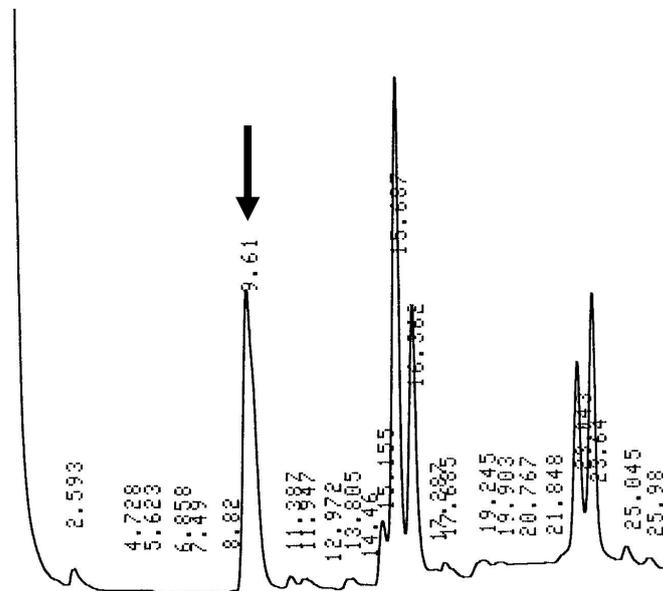


Abb. 6: GC von SCW 2 mit Rhamnose, der Peak des unbekannten Zuckers (Pfeil) ist verbreitert, daher ist eine Übereinstimmung mit dem unbekannten Zucker unwahrscheinlich.

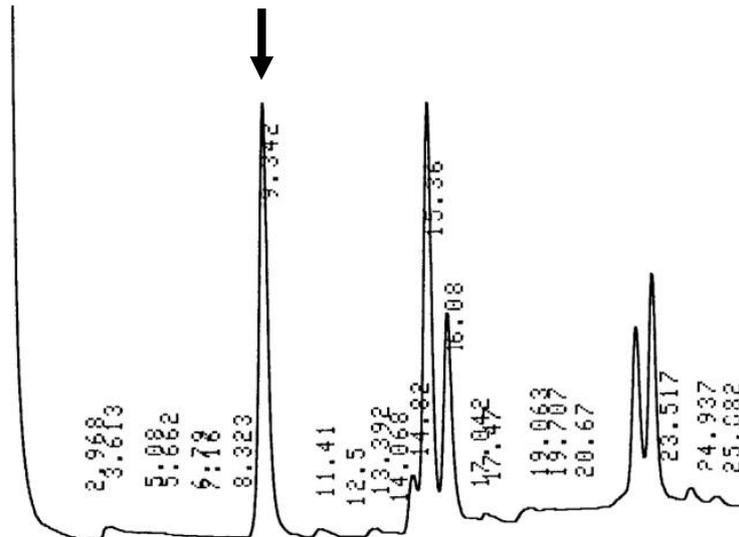


Abb. 7: GC von SCW 2 mit Fukose, die deutliche Erhöhung des Peaks (Pfeil) deutet auf eine Übereinstimmung des unbekanntes Zuckers mit authentischer Fukose

3.4 Gelelektrophoretische Analyse von SCW 2

Zur weiteren Analyse des SCW 2 wurde mit einer kleinen Probenmenge eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Beim ersten Lauf mit einer Laufzeit von zwei Std. war erst nach der Silbernitratfärbung eine diffuse, schwache Bande ganz am Anfang des Trenngels zu sehen. Aus diesem Grund wurde ein zweiter Lauf mit vier Std. Laufzeit durchgeführt, wobei hier nach beiden Färbungen nichts außer einer Art Schmierstreifen entlang des gesamten Laufweges zu erkennen war. Es kam zu keiner Auftrennung der Proteinanteile, was daran Liegen könnte, dass nur ein unwesentlicher Bestandteil von SCW 2 aus Protein besteht. Auf eine Auswertung wurde verzichtet.

3.5 HPLC von SCW 2

Da bei der ersten Auftrennung von SCW 1 ein zweigipfliger Hauptpeak mit nahezu gleicher Attraktivität auftrat, wurde ein erneuter Versuch gestartet, das SCW auf Superdex® 200 prep grade weiter aufzutrennen. Wie vor der ersten

Präparationsserie wurde eine flüssigkeitschromatographische Analyse auf der kleinen Superdex® 200 HR 10/30-Säule durchgeführt.

3.5.1 Flüssigkeitschromatographische Analyse von SCW 2

Das Ergebnis dieses Laufes war eine weitere, überraschend gute Auftrennung von SCW 2 mit früh eluierendem Hauptpeak und mehreren Folgepeaks (Abb. 8). Die Tatsache, dass sich SCW 1 auf der analytischen Säule ähnlich verhielt wie auf der präparativen Säule, veranlasste uns, eine weitere präparative Auftrennung von SCW 2 auf letzterer zu versuchen. Vielleicht kam es aufgrund eines höheren Aufreinigungsgrades des SCW 2 zu einer verbesserten Auflösung.

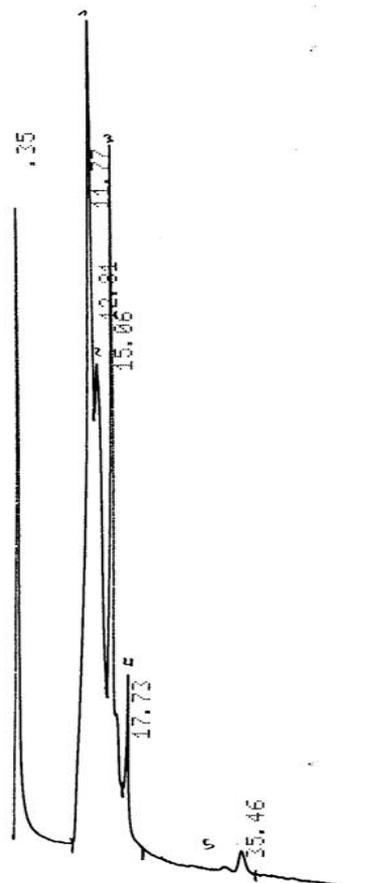


Abb. 8: SCW 2 auf Superdex® 200 HR 13/30, es zeigt sich eine überraschend gute Auftrennung mit mehreren Peaks der zusammengefassten attraktiven Fraktionen F1 und F2 aus SCW 1.

3.5.2 Flüssigkeitschromatographische Präparation von SCW 2

Überraschenderweise kam es bei der Präparation von SCW 2 auf der HiLoad Superdex® 200 16/60 Säule zu einer noch besseren Auftrennung als erwartet (Abb. 9). Es wurden sieben Fraktionen aufgefangen und wie zuvor nach Auftrennung der gesamten Menge die jeweiligen Fraktionen zusammengefasst.

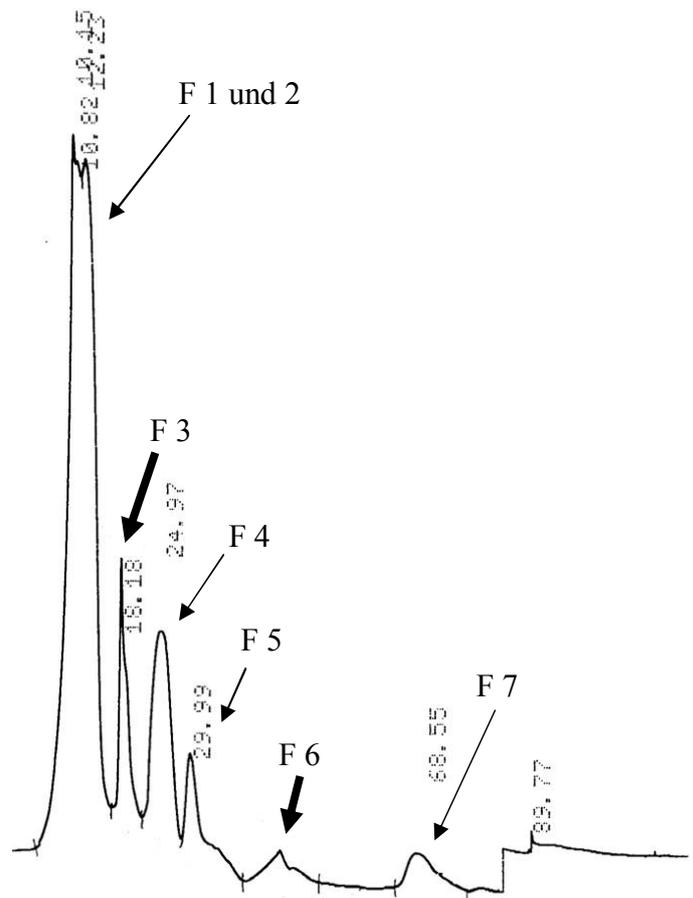


Abb. 9: SCW 2 auf HiLoad Superdex® 200 16/60, es zeigte sich eine überraschend gute Auftrennung mit 7 trennbaren Fraktionen (F 1 bis 7), die attraktiven Fraktionen F 3 und F 6 sind mit einem fetten Pfeil gekennzeichnet.

3.6 Attraktivitätstestung der Fraktionen von SCW 2

Ergebnis :

F1 :	(-)
F2 :	(-)
F3 :	(+ + +)
F4 :	(-)
F5 :	(-)
F6 :	(+ + +)
F7 :	(-)

(-) = nicht attraktiv, (+) - (+ + +) = mäßig bis sehr attraktiv (zwei durchgeführte Attraktivitätstestungen lieferten sehr ähnliche Ergebnisse)

Dieses Ergebnis war sehr überraschend, da die Attraktivität ähnlich der Ergebnisse aus der ersten Auftrennung eher in Fraktion 1 erwartet wurde. Außerdem überraschte die Attraktivität in zwei relativ weit auseinander liegenden Fraktionen. Es stellt sich hier die Frage, ob evtl. die ursprüngliche Substanz aus irgendeinem Grund teilweise zerfallen oder z.B. durch Einwirkung eines Detergenz oder eines Enzyms aufgespalten worden war. Da die Attraktivität aber nicht verloren gegangen war, wurden die zwei attraktiven Fraktionen, F3 und F6 (Abb 9, fette Pfeile), weiter untersucht.

3.7 Flüssigchromatographische Analyse von F3 und F6

Um eine weitere Auftrennbarkeit der attraktiven Fraktionen F3 und F6 von SCW 2 zu untersuchen, wurden sie erneut über die kleine Superdex Säule geschickt. So zeigte F3 entsprechend der Präparation einen schlanken Peak mit kleinen Nebenpeaks (Abb 10), bei F6 kam es zu einer weiteren deutlichen Auftrennbarkeit, was aufgrund des breiten, unscharf begrenzten Peaks bei der Präparation erwartet werden konnte (Abb. 11).

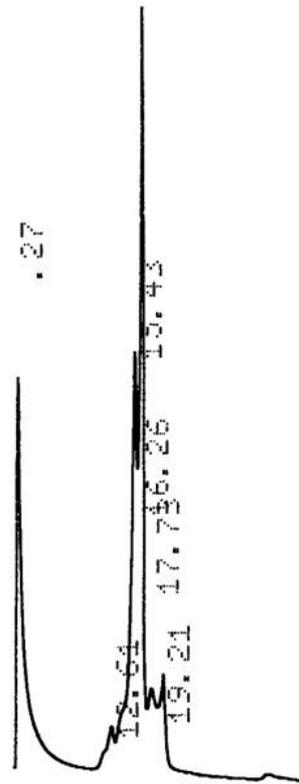


Abb. 10: F3 auf Superdex® 200 HR 13/30, der zuvor schlanke Peak (Abb. 9) zeigt eine weitere Auftrennung.

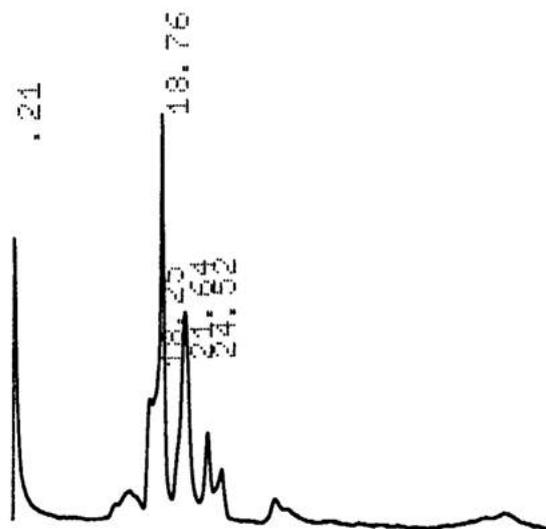


Abb. 11: F6 auf Superdex® 200 HR 13/30, der zuvor breite Peak (Abb. 9) zeigt eine weitere deutliche Auftrennung in einzelne Fraktionen.

3.8 Gaschromatographische Analyse von F3 und F6 aus SCW 2

3.8.1 Analyse der attraktiven Fraktionen von SCW 2

Um von den durch die immer weitere Aufreinigung erheblich weniger werdenden Probemengen auch für andere analytische Verfahren noch etwas übrig zu haben, wurden diesmal nur je 0,5 mg der attraktiven Fraktionen für die GC entsprechend aufbereitet und appliziert. Erstaunlicherweise hatte sich die Anzahl der eluierenden Zucker deutlich reduziert. Außerdem trat in beiden Fraktionen ein unbekannter Zucker in Erscheinung, der im direkten Vergleich von F3 und F6 mit annähernd gleicher Zeit eluierte (Abb. 12, 13).

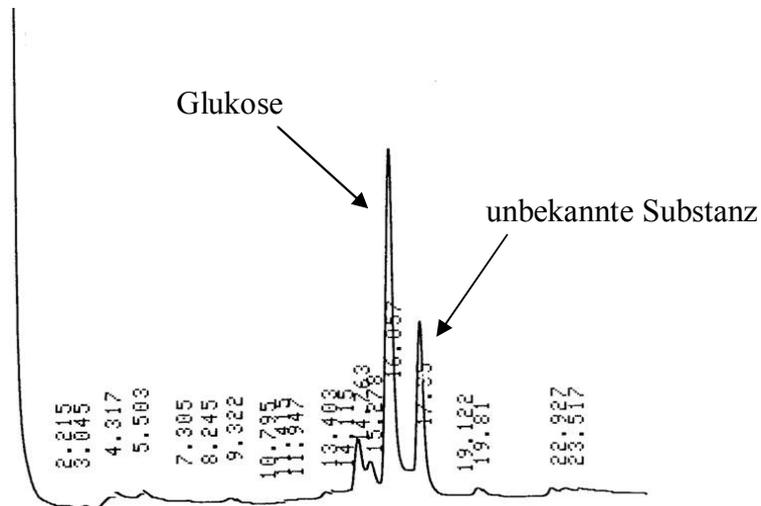


Abb. 12: GC von F 3, neben dem bekannten Zucker Glukose zeigt sich noch ein unbekannter Zucker mit einer Elutionszeit 17,35.

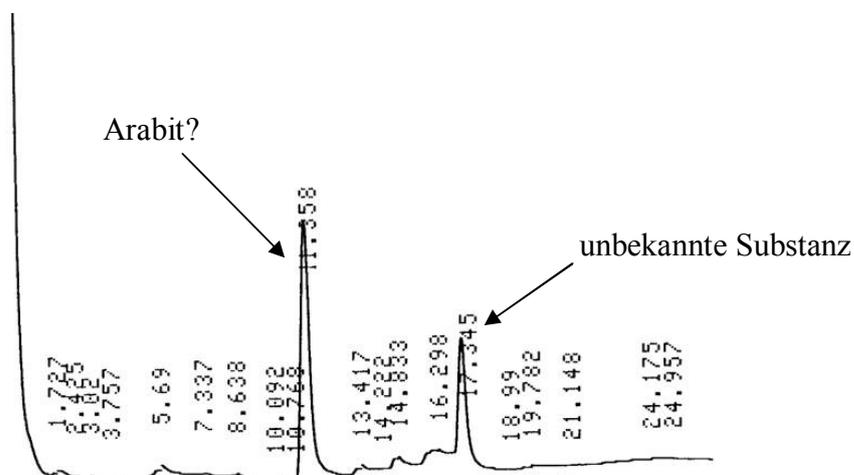


Abb. 13: GC von F 6, neben dem vermuteten Zucker Arabit tritt auch hier ein unbekannter Zucker mit der gleichen Elutionszeit wie in Abb. 12 auf.

Zur Bestätigung das es sich in der Fraktion F 6 tatsächlich um Arabit handeln könnte, wurde ein weiterer Lauf mit der Fraktion 6 zusammen mit Arabit und einem Standard (Glycerin, Erythrit, Threit, Rhamnose, Ribit, Arabit, Manose, Galaktose, Glukose, Inosit, Glukosamin, Galaktosamin) durchgeführt. Dabei kam es zu einer erheblichen Erhöhung des Peaks (Pfeil) der im Standard dem Arabit entspricht (Abb. 14).

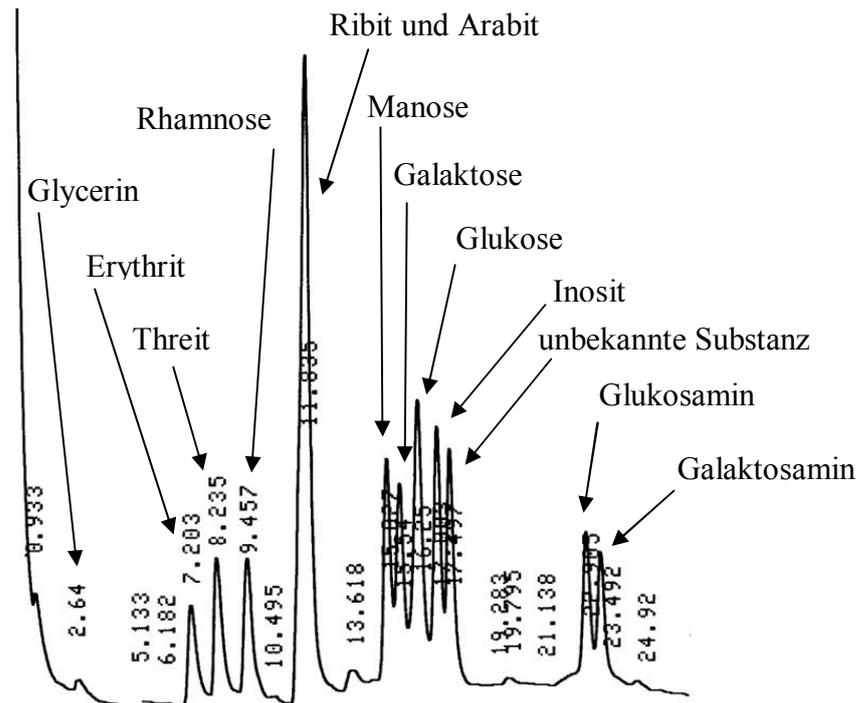


Abb. 14: GC von F 6, Arabit und Standard, die erhebliche Erhöhung des Peaks lässt den Rückschluss zu, dass es sich tatsächlich in der Fraktion F 6 um Arabit handelt. Kurz hinter Inosit ist wieder eine im Vergleich zum Standard unbekannte Substanz zu sehen.

Somit verhielt sich der Zucker in F 6 wie authentisches Arabit. Zudem trat noch in beiden Proben eine unbekannte Substanz in der GC auf, deren Elutionszeit sich mit keiner eines bekannten Zuckers deckte. In o.g. Kombination von F6, Arabit und Standard zeigte sich diese Substanz als zusätzlicher Peak, der kurz nach Inosit eluierte. Bei Vergleichen mit Gaschromatogrammen aus der Dissertation von N. Zorger (1999) kam der Verdacht auf, es könnte sich bei dieser Substanz evtl. um Tris-Puffer (Trihydroxymethylaminomethan) handeln, da Zorger bei einigen

Aufreinigungsschritten Tris-Puffer verwendete. Nachdem festgestellt wurde, dass dieser auch Attraktivität besitzt wurde der Versuch unternommen, das SCW von Tris-Puffer mittels Dialyse und Gelfiltration mit Biogel P2 zu befreien. Bei der anschließend durchgeführten Analyse am GC war der vom Tris-Puffer zu erwartende Peak nicht mehr vorhanden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Entfernung von Tris-Puffer nicht vollständig gelang.

3.8.2 Vergleiche mit Tris-Puffer

Um weitere Aufschlüsse darüber zu erhalten, ob es sich bei der unbekannt Substanz um Tris - Puffer handeln könnte, wurde ein direkter Vergleich mit den attraktiven Fraktionen angestrebt. Das geschah wie üblich durch direkte Beimischung von TRIS zu F3 und F6. Dafür wurde für Tris-Puffer eine Auftragungsmenge von 1 μmol angestrebt. Bei der Probenaufbereitung wurde auf die Hydrolyse verzichtet. Die Reduktion sowie Acetylierung wurde wie beschrieben durchgeführt und anschließend 2 aus 50 μl aufgetragen. Zunächst erfolgte die alleinige GC von Tris-Puffer (Abb. 15), anschließend wurde es zusammen mit F3 (Abb. 16), dann zusammen mit F6 (Abb. 17) und schließlich mit F3 und dem Standard appliziert (Abb. 18). Mit Hilfe dieser Ergebnisse war es nicht auszuschließen, dass es sich bei der unbekannt Substanz um Tris-Puffer handelte, da die Peaks der unbekannt Substanz in F3 und F6 durch zugabe von Tris-Puffer deutlich in der Größe zunahmen.

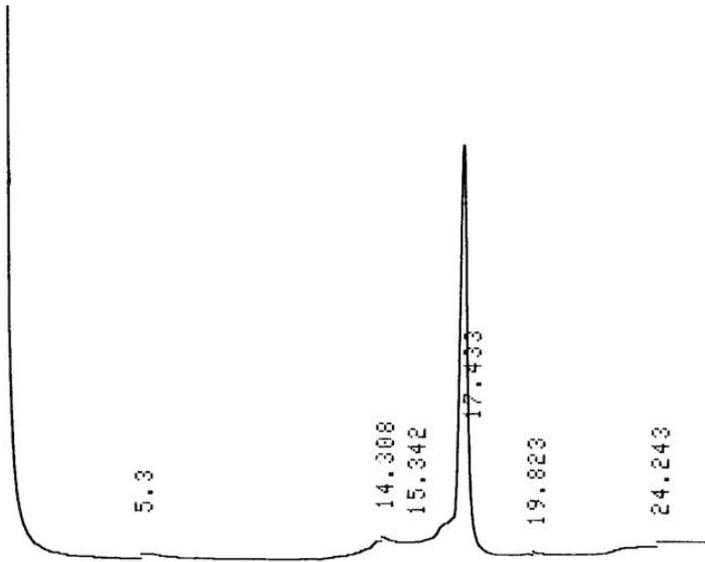


Abb. 15: GC von Tris-Puffer, die Elutionszeit befindet sich im Bereich der gesuchten Substanz.

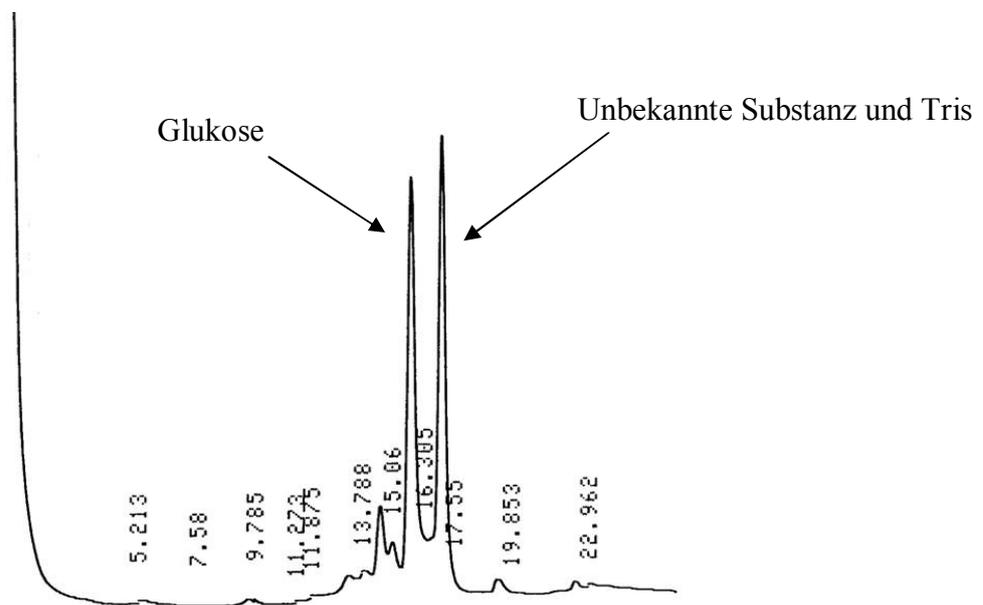


Abb. 16: GC von F 3 und Tris-Puffer, der Peak bei 17,55 ist im Vergleich zu zur GC von F3 alleine (Abb. 12) deutlich erhöht.

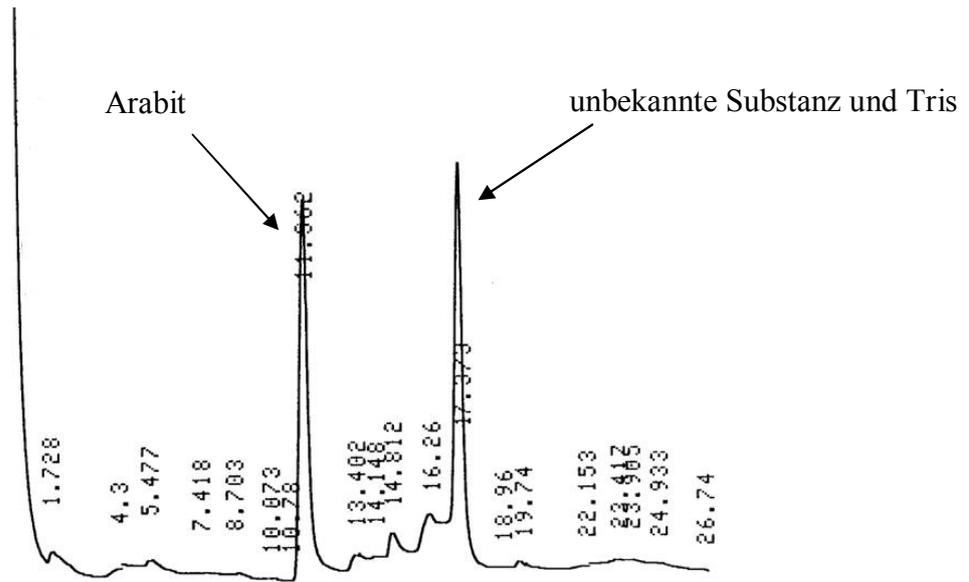


Abb. 17: GC von F 6, Arabit und Tris-Puffer, r der Peak bei 17,379 ist im Vergleich zu zur GC von F6 alleine (Abb. 13) deutlich erhöht.

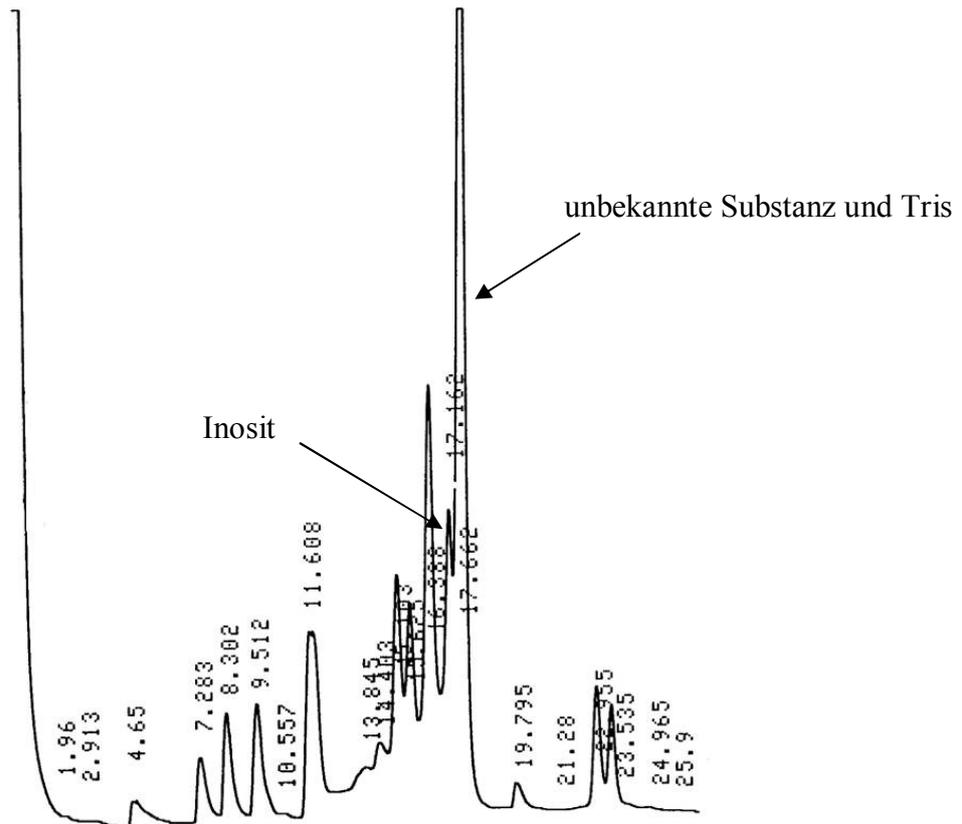


Abb. 18: GC von F 3, Tris-Puffer und Standard, nach dem Inosit eluiert ein sehr großer Peak der die unbekannte Substanz und den Tris Puffer in der Probe zeigt.

3.9 Aminosäureanalyse

Als weiteres analytisches Verfahren stand noch die Aminosäureanalyse zur Verfügung. Es stellte sich die Frage, ob nach deutlicher Reduktion der in der Probe enthaltenen Zucker auch eine Reduktion der Anzahl der Aminosäuren durch die Aufreinigung stattgefunden hatte und welche in den attraktiven Fraktionen noch vorhanden waren. Hinsichtlich der Anzahl an Aminosäuren wurden die Ergebnisse mit denen von N. Zorger (1999) verglichen.

3.9.1 Analyse der attraktiven Fraktionen F 3 und F 6 von SCW 2

Für die Analyse wurden je 0,2 mg F 3 und F 6 einer Totalhydrolyse unterzogen und anschließend aufgetragen. Bei der Fraktion 3 zeigten sich neben einer Reihe sehr kleiner Mengen verschiedener Aminosäuren ein hinsichtlich Quantität alles überragender, sehr spät eluierender Peak (Abb. 19). Ähnlich verhielt es sich bei der Fraktion 6, wobei bei gleicher aufgetragener Probemenge der dominierende Peak im Vergleich zu F 3 wesentlich kleiner war, gleichzeitig auch noch erheblich weniger Aminosäuren vorhanden waren (Abb. 20). Im Vergleich mit der Aufzeichnung eines Standards (Abb. 21) entsprach die Elutionszeit des Hauptpeaks sowohl von F 3 als auch von F 6 am ehesten der von NH_3 . Um das zu untermauern wurde eine Stammlösung von NH_4Cl mit einer Konzentration von 400 nmol / ml hergestellt, sodass im maschinell aufgetragenen Volumen von 50 μl 20 nmol enthalten waren (zur Einsparung von Material wurden F 3 und F 6 manuell aufgetragen). Auch hier zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Elutionszeiten der Hauptpeaks von F 3 und F 6 mit der von NH_4Cl (NH_3) (Abb. 22)

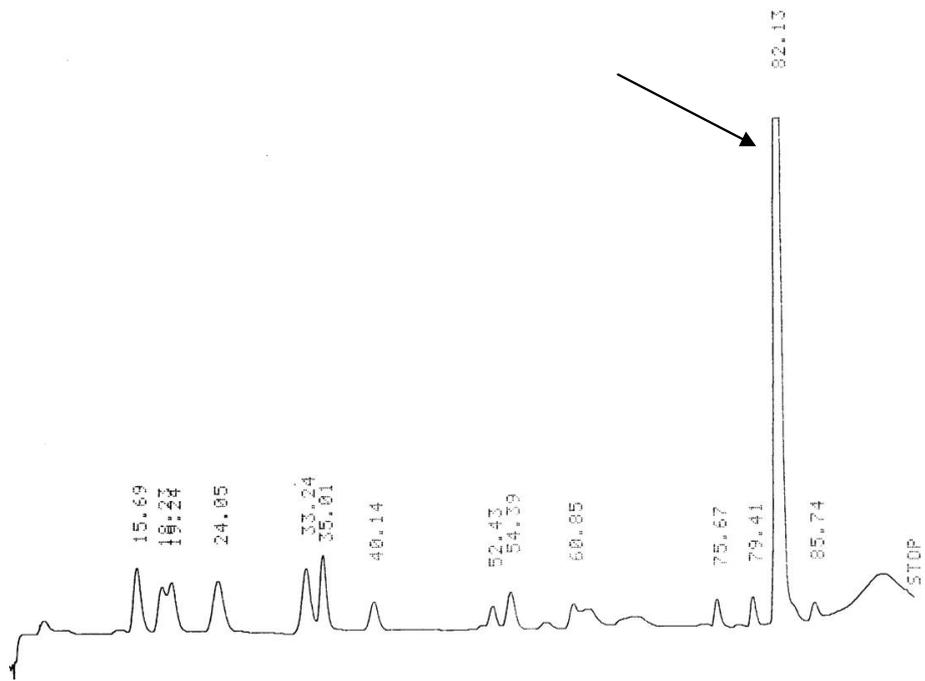


Abb. 19: Aminosäureanalyse (ASA) von F 3, neben einer Vielzahl kleiner Peaks zeigt sich ein großer Peak (Pfeil) mit einer Elutionszeit von 82,13.

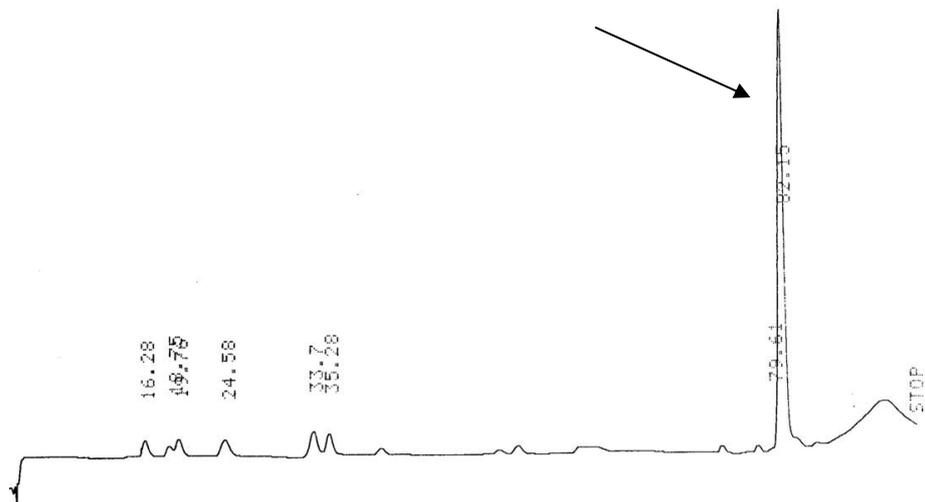


Abb. 20: ASA von F 6, auch hier zeigt sich ein großer Peak (Pfeil) mit einer Elutionszeit von 82,15, ähnlich der von F 3 (Abb. 19).

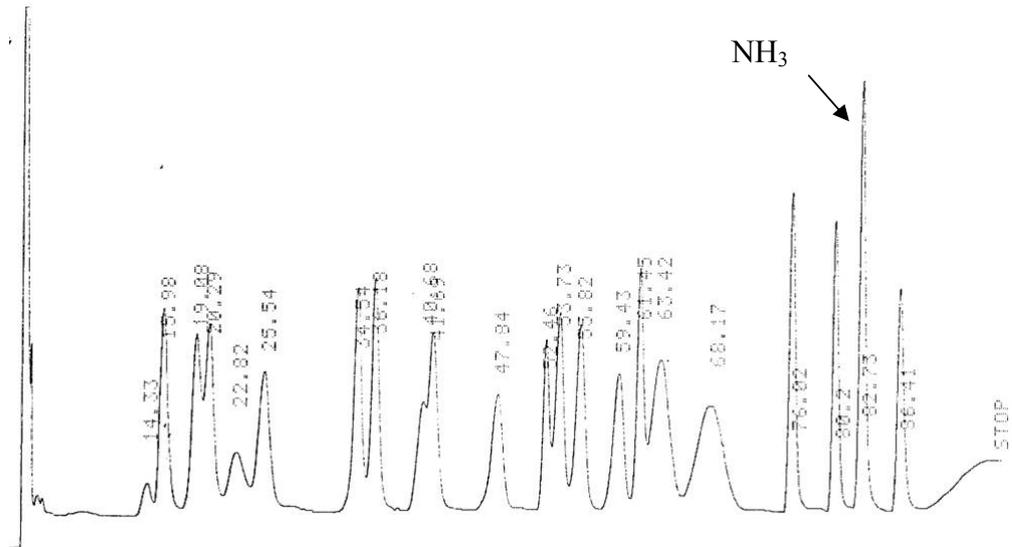


Abb. 21: ASA eines Standards, der größte Peak mit einer Elutionszeit von 82,73 entspricht dem NH_3 im Standard.

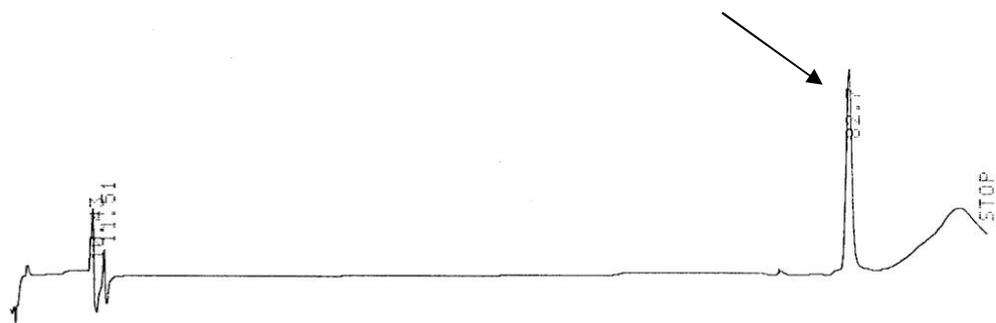


Abb. 22: ASA von NH_4Cl (NH_3), Elutionszeit 82,7(Pfeil).

3.9.2 Vergleich mit Tris-Puffer

Mit der ASA bestand außerdem die Möglichkeit das Vorhandensein von Tris - Puffer in den Fraktionen 3 und 6 zu bestätigen oder zu widerlegen. Um einen weiteren Parameter zu erhalten, wurde neben einem qualitativen auch ein quantitativer Vergleich angestrebt. Für die folgenden Läufe wurden auch mit Tris-Puffer eine Stammlösung von 400 nmol / ml hergestellt, sodass auch hier im Vergleich zu NH_4Cl eine Auftragsmenge von 20 nmol resultierte. Wahrscheinlich aufgrund der freistehenden Aminogruppe von Tris-Puffer, eluierte dieser zu einem sehr ähnlichen Zeitpunkt wie NH_4Cl (NH_3), (Abb. 23).

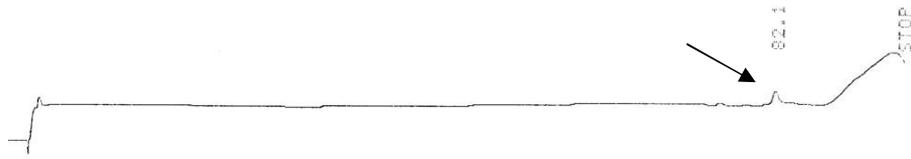


Abb. 23: ASA von Tris-Puffer, Elutionszeit 82,1 (Pfeil).

Desweiteren wurde eine aus der Tris-Stammlösung entnommene Probe vor dem Auftragen einer Totalhydrolyse unterzogen und zunächst allein (Abb. 24), anschließend zusammen mit NH_4Cl aufgetragen (Abb. 25).



Abb. 24: ASA von hydrolysiertem Tris-Puffer, Elutionszeit 82,26 (Pfeil).

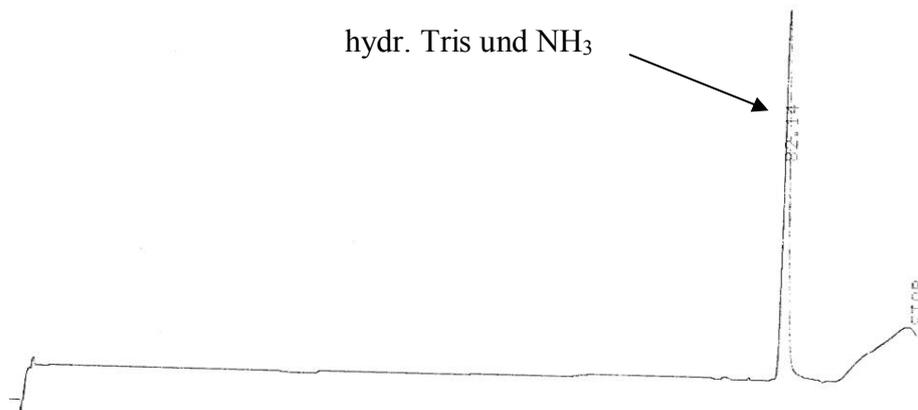


Abb. 25: ASA von hydrolysiertem Tris-Puffer und NH_4Cl es findet sich ein deutlich höherer Peak (Pfeil) im Vergleich zu hydrolysiertem Tris-Puffer (Abb. 24) und NH_4Cl (Abb. 22). Die beiden Substanzen eluieren gleichzeitig.

Hier kam es trotz gleicher aufgetragener Menge von NH_4Cl im Vergleich zum alleinigen Lauf zu einer deutlichen Erhöhung des Peaks, somit eluiert es gleichzeitig mit Tris-Puffer. Zuletzt wurde für einen quantitativen Vergleich

von F 3 und F 6 mit Tris-Puffer von letzterem eine Probemenge von 0,2 mg zunächst hydrolysiert und dann appliziert (Abb. 26).



Abb. 26: ASA von 0,2 mg (effektiv 0,066 mg) hydrolysiertem Tris-Puffer und NH_4Cl (Pfeil).

Leider konnte wegen Materialmangels von F3 und F6 nicht ausprobiert werden, ob sich hier auch die Elutionszeit des jeweils zweiten Peaks mit der von NH_4Cl (NH_3) decken würden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse unter Punkt 3.8.2 und unter der Annahme, dass die jeweils zweiten Peaks bei der ASA der attraktiven Fraktionen 3 und 6 eine identische Elutionszeit haben wie NH_3 , konnte wieder nicht ausgeschlossen werden, dass es sich in den hochaufgereinigten SCW Proben F 3 und F 6 um Tris handelte. Es gab hier jedoch drei deutliche Hinweise darauf, dass es sich bei dem letztlich ungeklärten Peak nicht um Tris-Puffer handelte:

1. Vergleich man die Läufe von je 0,2 mg F 3 und F 6, welche als komplette Menge mit 50 μl Dilutionspuffer manuell aufgetragen wurde, mit dem Lauf von 0,2 mg Tris-Puffer (hydrolysiert), so fiel ein enormer Größenunterschied der Peaks auf. Die Peaks der SCW-Proben waren wesentlich größer, auch wenn man den Faktor Drei berücksichtigte, mit dem die Fläche des Tris-Peaks multipliziert werden müsste, da von den ursprünglichen 0,2 mg Tris, welche in 150 μl Dilutionspuffer gelöst waren, letztendlich aufgrund der maschinellen Auftragung ja nur ein Drittel, also 0,066 mg in 50 μl analysiert wurden.
2. In der Kontroll-GC, welche durch Zorger durchgeführt wurde, nachdem zur Entfernung des Tris-Puffers eine Gelfiltration mit Biogel P2 durchgeführt worden war, zeigte sich nicht der sonst durch Tris hervorgerufene Peak kurz

hinter dem von Inosit (Zorger 1999). Somit konnte von einem Tris-Pufferfreiem Ausgangsmaterial für die vorliegende Arbeit ausgegangen werden.

3. In der gaschromatographischen Analyse der ersten beiden attraktiven Peaks von SCW 1 nach HPLC tauchte ebenfalls kein entsprechender Peak nach Inosit auf.

3.10 Attraktivitätstestung chemischer Verbindungen mit einer oder mehreren Stickstoffgruppen

Somit konnte davon ausgegangen werden, dass eventuell eine Aminogruppe welche auf irgendeine Art und Weise an Zucker (Glucose oder Arabit) gebunden ist, für die Attraktivität nicht unerheblich war. Um diese These zu untermauern, wurden abschließend mehrere chemische Verbindungen mit je ein oder zwei Aminogruppen auf ihre Attraktivität getestet. Dafür wurde von jeder der unten genannten Verbindungen eine Lösung mit autoklaviertem Aqua bid. mit einer Konzentration von 10 mg / ml hergestellt und mittels der unter Punkt 2.1.4 geschilderten Methode getestet:

Tris-Puffer :	(-)
Galaktosamin :	(+ + +)
Glukosamin :	(+ +)
Triethanolamin :	(+ + +)
NH ₄ Cl :	(+ + +)
Harnstoff :	(+)

(-) = nicht attraktiv , (+) - (+ + +) = mäßig bis sehr attraktiv (zwei durchgeführte Attraktivitätstestungen lieferten sehr ähnliche Ergebnisse)

Die Attraktivität von Tris - Puffer konnte nicht bestätigt werden. Es wurde aber eindeutig hier ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer Aminogruppe in einer chemischen Verbindung und deren Attraktivität gesehen, da alle übrigen ausgetesteten Verbindungen mäßig (Harnstoff) bis sehr attraktiv (Galktosamin, Triethanolamin und NH₄Cl) auf die Mirazidien wirkten.

4 Diskussion

4.1 Das Miraxon - ein Rückblick

Schon seit Jahrzehnten wird versucht den Wirtsfindungsprozess von Parasiten genauer zu verstehen. Besonderes Interesse der Forscher galt dabei, aufgrund der weltgesundheitlichen Bedeutung, den Trematoden der Spezies *Schistosoma* und deren Zwischenwirt, einer Süßwasserschnecke. Wegen der starken Verbreitung wurde insbesondere die Beziehung von *S. mansoni* und *Biomphalaria glabrata* sehr genau untersucht. Die Frage war dabei oft die gleiche: Wie finden die Mirazidien zu ihrem Zwischenwirt?

Bereits in den 60er Jahren wurde von einer Attraktivität der Schnecken gesprochen. Die Zwischenwirtfindung wurde also nicht als reiner Zufall gesehen. Vielmehr ging man davon aus, dass die Mirazidien auf chemische Substanzen reagieren, die von der Schnecke an das umgebende Wasser abgegeben wurden. Gleichzeitig stellte A.J. MacInnis eine Attraktivität verschiedener chemischer Substanzen fest, die er jedoch nicht aus den Ausscheidungen der Schnecken gewonnen hatte. Darunter befanden sich verschiedene Aminosäuren, Fettsäuren und Derivate von Neuraminsäure. Zudem reagierten die Mirazidien auf einen pH-Gradienten. 1974 testete MacInnis die Attraktivität einer Aminosäuremischung, welche er aus den gleichen Aminosäuren im gleichen Verhältnis und gleicher Konzentration, wie sie in dem analysierten SCW vorlagen, mischte (MacInnis et al. 1974, MacInnis 1976).

Sponholtz und Short sahen das Attractans, welches 1970 von Chernin als Miraxon bezeichnet wurde, in einem bestimmten Kalzium/Magnesium-Verhältnis mit maximaler Reaktion der Mirazidien bei einem Verhältnis von 0,5/3,5. Tatsächlich konnten sie zeigen, dass die Anwesenheit von Schnecken im Wasser zu einer Verringerung des im Wasser enthaltenen Calciums führte. Magnesium allein bewerteten sie nicht als attraktiv (Sponholtz und Short 1976).

Für weitere Verwirrung sorgten Untersuchungen von Mason (1977), wobei er eine Attraktivität für Peptide im SCW, wegen einer Aufhebbarkeit der Attraktivität durch Proteasen, postulierte. Zudem stellte er eine Veränderung

der Mirazidienaktivität durch Ammoniak fest. Dies führte jedoch nicht zu einer erhöhten Aktivität, sondern zu einer Verlangsamung (Mason und Fripp 1977). Roberts et al. (1978) beschrieben Attraktivität für verschiedene Neurotransmitter, Acetylcholinagonisten und Antagonisten sowie für mehrere anorganische Ione. Samuelson bestätigte die Attraktivität des Neurotransmitters Serotonin (Samuelson et al. 1984).

Ein Jahr später veröffentlichte Plorin Ergebnisse über das Verhalten in Glukoselösung. Dabei untersuchte er auch den Unterschied zwischen einer einheitlichen Konzentration und Konzentrationsgradienten und stellte fest, erst der Gradient führte zu einer Reaktion der Mirazidien (Plorin und Gilbertson 1985). Diese Ergebnisse bekräftigten noch einmal die Untersuchung von Roberts et al. (1979). Sie konnten zeigen, dass Mirazidien in einer gleichmäßigen SCW-Konzentration keine Änderung des Schwimmverhaltens demonstrieren, sondern erst auf einen Konzentrationsgradienten reagierten. Dabei zeigten sie ein Verhalten, das sie dazu befähigte, in Regionen hoher Konzentrationen zu verweilen, was Chernin (1970) als Akkumulation bezeichnete.

Ein weiteres Teil im unendlich erscheinenden Puzzle der Wirtsfindung lieferten Schiff und Dossaji (1991). Sie fanden ein für Mirazidien attraktives Hormon, Ecdysteroid, welches sowohl in Trematoden als Gastropoden vorkommt. Das gleiche Hormon pflanzlicher Herkunft zeigte jedoch keine Attraktivität.

Bis zu diesem Zeitpunkt waren zum einen primär einfache, niedermolekulare chemische Substanzen als lockwirksame Stoffe beschrieben worden, zum anderen wurden diese nicht aus dem SCW isoliert. Bis auf grobe Analysen über Zucker- und Proteingehalt waren wenige Versuche unternommen worden das Miraxon, also die attraktive Fraktion des SCW zu isolieren und dessen Zusammensetzung und Struktur zu analysieren.

Erst Anfang der neunziger Jahre kam es zu einer Kehrtwende. Es wurde versucht, die gesuchte Substanz genauer zu untersuchen. Zudem wurden nicht primär, wie meist zuvor, Substanzen, die nicht aus dem SCW isoliert wurden, an Mirazidien getestet. Für den Lockstoff von Mirazidien von *S. japonicum* ermittelten Haas et al. (1991) ein Molekulargewicht von über 30 kD. Nebenbei fanden sie heraus, dass die Annäherung an den Zwischenwirt relativ

unspezifisch geschah, nicht jedoch die letztendliche Anhaftung an den Zwischenwirt. Dies lieferte erste Hinweise auf das Vorhandensein verschiedener Signale für verschiedene Phasen der Zwischenwirtsfindung. Die Filtration des SCW nach Molekulargröße führte Haberl und Haas (1992) sogar zu der Annahme, es handle sich bei der gesuchten Substanz um ein Molekül mit einem Gewicht von über 300 kD. Aufgrund dessen Empfindlichkeit gegenüber Oxidation und Behandlung mit Lysozym glaubten sie, es handle sich bei dem Makromolekül um ein Glycoconjugat. Diese Ergebnisse wurden durch weitere Untersuchungen bestätigt (Kalbe et al. 1996 und 1997, Haberl et al. 2000). Dabei wurden dann auch Verfahren zur Fraktionierung des SCW insbesondere durch Haberl in Form von Ionenaustausch- und Ausschlusschromatographie verwendet.

Der vorliegenden Arbeit vorausgehend, wurde ebenfalls von Fichtelscherer (1996), Beer (1997), Zorger (1999) und Rabl (2002) im Rahmen ihrer Dissertationen an der TU München versucht, der Zusammensetzung und Struktur des Lockstoffes im SCW auf die Spur zu kommen. Dabei fand zur Auftrennung im wesentlichen die HPLC mit Verwendung unterschiedlicher Auftrennungsmedien (stationäre Phase) Anwendung. Die gewonnenen Fraktionen wurden dabei jeweils auf ihre Attraktivität hin untersucht und die attraktiven Fraktionen weiter aufgetrennt, um so den Lockstoff immer weiter anzureichern und letztendlich eventuell sogar zu isolieren.

Ein wesentlicher Vorteil der vorliegenden Arbeit besteht sicherlich darin, dass für die Präparation und Analyse nicht frisch gewonnenes SCW vorlag, sondern, wie unter Punkt 2.2 beschrieben, durch Zorger (1999) hochaufgereinigtes bzw. mit attraktivem Material stark angereichertes SCW. Somit war eine weitere Anreicherung des Miraxons durch weitere Präparation mittels HPLC, wie sie in keiner der verglichenen Arbeiten beschrieben wurde, möglich.

4.2 Methodik und Ergebnisse

4.2.1 SCW

Da folgender Schritt für diese Arbeit nicht durchgeführt werden musste, soll an dieser Stelle nur kurz auf diesen eingegangen werden. Zur Gewinnung des SCW wurde das von Netzer (1990) erarbeitete Verfahren zur SCW-Gewinnung angewandt. Der Unterschied lag darin, dass Zorger (1999) erstmals die fast doppelte Menge an Schnecken im Wasser hielt um so eine höhere Ausbeute an Material zu erzielen. Haas et al. (1995) sahen zwar eine mögliche Fehlerquelle in zu hohen Konzentrationen bei der Austestung an Mirazidien, jedoch scheint es sogar in Anbetracht erheblicher Materialverluste bei den präparativen und analytischen Schritten notwendig, für zukünftige Untersuchungen eine noch höhere Ausbeute an SCW anzustreben. Eventuell müßte, um möglichst realistische Ergebnisse zu bekommen, bei der Attraktivitätstestung eine den natürlichen Verhältnissen entsprechende Konzentration der auszutestenden Substanz (SCW oder deren Fraktionen) erzeugt werden.

4.2.2 Attraktivitätstestung

Um eine Kontrolle zu haben, ob das gewonnene SCW bzw. die daraus gewonnenen Fraktionen eine Lockwirkung auf Mirazidien ausübt, wurde seit Anfang der Forschung auf verschiedene Art und Weise, die Austestung an frisch geschlüpften Mirazidien unter Laborbedingungen durchgeführt. Zunächst geschah dies unter Anwesenheit lebender Schnecken. Chernin (1970) erprobte erstmals die Austestung des SCW, also Wasser in dem eine bestimmte Anzahl von Schnecken für eine bestimmte Zeit inkubiert waren. Dieses Verfahren wurde in den meisten folgenden Untersuchungen übernommen. Jedoch wurden zum einen sehr unterschiedliche Konzentrationen des SCW verwendet, zum anderen wurde das Verhalten der Mirazidien auf sehr unterschiedliche Weise beobachtet und aufgezeichnet. Während Chernin (1970) ein Stereomikroskop, Sponholtz und Short (1976) die Cinematographie verwendeten, benutzten Mason und Fripp (1976) die Dunkelfeld -

Photographie. Zudem wurden für die Beobachtung und Beurteilung unterschiedliche Gefäße für die Mirazidiensuspension gewählt. Chernin (1970) verwendete einfache kleine Glasschalen mit flachem Boden. Eine weitere Variante waren die sogenannten choice-chambers, Kammern verschiedener Anordnung, bei denen sich die Mirazidien ihren Aufenthaltsort sozusagen aussuchen mussten. Diese fanden insbesondere durch Haberl et al. (1995) und Kalbe et al. (1996 und 1997) Anwendung. Ähnlich verfahren Sponholz und Short (1976), indem sie Glasröhren mit Verbindungsstücken aus Gummi Y-förmig zueinander anordneten.

Des Weiteren gab es signifikante Unterschiede in der Präsentation der zu untersuchenden Substanz. Chernin (1970) brachte das flüssige SCW mittels einer, mit 25 µl SCW gefüllten Glaskapillare punktuell in die Mirazidiensuspension ein (engl: point inoculation). Haberl et al. (1995) erzeugten bewusst Konzentrationsgradienten in einer einarmigen Kammer. Mason und Fripp (1976) untersuchten das Verhalten von Mirazidien in unterschiedlichen, aber uniformen Konzentrationen von SCW. Eine weitere Methode war das Einbringen der zu untersuchenden Substanz in Agar, welcher dann in Form einer kleinen ausgeschnittenen Pyramide in die Mirazidiensuspension eingebracht wurde (Haas et al. 1991, Haberl und Haas 1992, Kalbe et al. 1996). Die letzte Methode diente aber eher der Beurteilung des Verhaltens der Mirazidien bei der Kontaktaufnahme mit dem Zwischenwirt. Eine so große Anzahl an Varianten stellt natürlich auch die Aussagekraft bzw. die Ergebnisse in Relation zueinander in Frage. Haas et al. (1995) sah in der Attraktivitätstestung mit ihren vielen Parametern auch eine mögliche Hauptfehlerquelle bei der Beurteilung attraktiver Substanzen. Zum einen wegen der artifiziellen Verhältnisse, zum anderen aber auch wegen der möglicherweise viel zu hohen, eventuell sogar toxischen Konzentrationen des SCW oder der getesteten chemischen Substanzen, sowie der durch die Verbindungen erzeugten Milieus (z.B. pH).

In der vorliegenden Arbeit wurde im Wesentlichen das Verfahren von Chernin (1970) gewählt, wobei als Gefäß für die Mirazidiensuspension eine Petri-Schale verwendet wurde. Als positiv, oder attraktiv, wurde eine Substanz beurteilt, wenn es zu einer Akkumulation der Mirazidien in einem kleinen Bereich um die eingebrachte Probe kam (Chernin 1970). Die Attraktivität

wurde dabei von gering (+) bis sehr stark attraktiv (+++) eingestuft. Während Chernin (1970) die Probe mittels einer Glaskapillare, welche er komplett entleerte, einbrachte, wurde hier eine oben versiegelte Pipettenspitze verwendet, aus der das aufgereinigte SCW sozusagen langsam herauslaufen konnte. So konnte eine zu schnelle Verteilung der Probe in der Mirazidien suspension vermieden werden. Keine Berücksichtigung fand die den Mirazidien vorgesezte Konzentration der Probe und deren pH, sodass hier eine mögliche, schon von Haas et al. (1995) diskutierte Fehlerquelle liegen könnte. Dies trifft insbesondere für die zum Schluß sehr stark angereicherten Proben zu. Jedoch ist das Vorliegen einer aus dem SCW isolierten, eindeutig negativen, also inattraktiven Fraktion, welche somit als Kontrolle dienen kann, ein deutlicher Hinweis hinsichtlich der guten Aussagekraft der Attraktivitätstestung. Um schließlich die Attraktivität einer Fraktion oder isolierten Substanz zu untermauern, wäre eine Austestung unter möglichst natürlichen Bedingungen hinsichtlich Konzentration, pH, Mirazidienzahl etc. sicherlich notwendig.

4.2.3 Präparation mittels HPLC

Das für die weitere Präparation vorliegende Material war bereits durch Zorger (1999) in mehreren präparativen Schritten aufgereinigt worden, sodass es bereits zu einer Anreicherung des Lockstoffes gekommen war. Zusammenfassend wurde das frisch gewonnene SCW zunächst filtriert, zentrifugiert und dialysiert. Somit waren Moleküle < 30 kD aus dem SCW entfernt. Für die weitere Präparation mittels HPLC wurde das SCW zuerst auf die TSK-3000-Säule (Ausschlußchromatographie), anschließend auf die Macro-Prep HighQ-Support-Säule (Ionenaustauschchromatographie) und schließlich zu Entfernung von Pufferresten auf die P2-Säule aufgetragen. Der letzte Schritt diente nicht mehr dazu, eine weitere Auftrennung des SCW zu erreichen (Zorger 1999).

Das so erhaltene, hochaufgereinigte und mit Lockstoff angereicherte SCW wurde freundlicherweise von Herrn Zorger für diese Arbeit zur weiteren Aufreinigung zur Verfügung gestellt. Dafür wurde erstmals als Trennmittel Superdex® 200 prep grade verwendet, womit zwei unterschiedlich große

Säulen, eine kleine für analytische Zwecke zum Auftragen kleiner Probenmengen und eine große für präparative Zwecke zum Auftragen großer Probenmengen, bepackt waren. Nachdem erste Probeläufe mit Substanzen bekannter Molekülgröße durchgeführt worden waren, erfolgten erste analytische Probeläufe mit dem bereits hochaufgereinigten SCW. Dabei zeigte sich zum einen eine weitere Auftrennbarkeit des SCW, zum anderen wurde sichtbar, dass der größte Anteil der Probe aus sehr großen Molekülen bestand. Da deren Doppelpeak eine Elutionszeit zeigte, welche nur unwesentlich über der von Dextran 505.000 lag, was bedeutete, dass es sich um etwas kleinere Moleküle als das Dextran handelte. Nachdem die Attraktivitätsstestung nach der vollständigen Präparation der gesamten Probemenge auch zeigte, dass sich der Lockstoff in diesen zwei größten Fraktionen befand, konnte somit bestätigt werden, dass es sich bei der gesuchten Substanz um ein Molekül mit einer Größe > 300 kD handeln müsse (Haberl und Haas 1992). Da es bei der ersten Aufreinigung nicht gelang, die ersten zwei Fraktionen, in denen ein Großteil des Materials enthalten war, zu trennen, wurde auf der kleineren analytischen Säule ein erneuter Versuch unternommen, eine weitere Trennung zu erzielen. Überraschend war das Ergebnis insofern, da es sich um das selbe Trenngel handelte wie bei der ersten Auftrennung und somit eine so überaus deutliche, weitere Auftrennung nicht zu erwarten gewesen war. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde eine weitere präparative Serie auf der großen Säule durchgeführt, welche zu einer sehr guten, im Vergleich zur ersten Serie sogar besseren Fraktionierung führte. Warum es bei der zweiten Auftrennung eines zunächst nicht trennbaren Doppelpeaks auf dem gleichen Trenngel zu einer so guten Auftrennung kam, blieb ungeklärt. Mögliche Zerstörung oder teilweise Aufspaltung der noch vorhandenen großmolekularen Substanzen scheint in Anbetracht der Unempfindlichkeit des SCWs und des Lockstoffes gegenüber physikalischen Einwirkungen (Netzer 1990) unwahrscheinlich. Oxidativen oder reduktiven Chemikalien oder Enzymen war das SCW während der präparativen Schritte nicht gewollt ausgesetzt.

Eine weitere Überraschung war die anschließende Attraktivitätstestung, da sich zwei relativ weit voneinander entfernte Fraktionen (F3 und F6) als eindeutig attraktiv herausstellten. Auch hier blieb die Frage offen, warum die attraktive Substanz plötzlich in zwei eindeutig voneinander getrennten Fraktionen

auftauchte und warum nicht wie bei den vorausgegangenen Untersuchungen von Fichtelscherer (1996), Beer (1999), Zorger (1999) und Rabl (2002) die attraktive Substanz in der zuerst eluierenden größten Fraktion enthalten war. Dass die erneute Auftrennung einer attraktiven Fraktion auf dem gleichen Trenngel unter gleichen Bedingungen zu einer weiteren, deutlichen Fraktionierung führen kann, wurde auch von Fichtelscherer (1996) beschrieben, als er sein Ergebnis nach der HPLC mit der selben Methode unter gleichen Bedingungen überprüfen wollte. Dabei kam es ebenfalls zu einer weiteren unerwarteten Auftrennung einer attraktiven Fraktion.

Eine weitere Parallele zeigte sich insofern, dass letztendlich die attraktive Substanz nach Ausschlusschromatographie meistens in einem der kleineren Peaks und somit einen quantitativ eher geringeren Anteil an der Ausgangsmenge auftauchte. Dies führte gegenüber dem ungereinigten SCW zu einer Beseitigung erheblicher Anteile unattraktiver Substanzen und somit zu einer deutlichen Anreicherung des gesuchten Lockstoffes (Fichtelscherer 1996, Beer 1999, Zorger 1999).

Um auch nach der zweiten Präparation des ursprünglichen SCW 1 eine weitere mögliche Auftrennbarkeit zu eruieren, wurden die beiden attraktiven Fraktionen erneut auf die analytische Säule aufgetragen. Dabei zeigte sich für die Fraktion 3 erwartungsgemäß ein großer schlanker Hauptpeak mit kleinen Nebenpeaks, welche als noch bestehende Verunreinigungen durch die Nachbarpeaks bei der Präparation zu werten sind. Die Fraktion 6 konnte weiter aufgetrennt werden, was hinsichtlich der relativ breitgezogenen Form des Peaks bei der Präparation nicht unerwartet war. Aufgrund der nur noch sehr geringen Mengen der für die Analyse zu Verfügung stehenden Substanzmengen wurde an diesem Punkt auf eine weitere Präparation und auch Attraktivitätstestung verzichtet.

4.2.4 Analyse mit Gaschromatographie, Aminosäureanalyse, und SDS-Page

Um einen Aufschluss darüber zu bekommen, aus welchen Bausteinen der Lockstoff möglicherweise zusammengesetzt ist, wurden die drei oben genannten Verfahren eingesetzt. Die attraktiven Fraktionen wurden dafür nach

dem jeweiligen Präparationsschritt auf deren Gehalt an Zucker und Aminosäuren analysiert. Zudem wurde der Versuch unternommen eine Größenbestimmung des eventuell enthaltenen Proteins in Form eines Glykoproteins oder Proteoglykans mittels Gelelektrophorese durchzuführen.

Die nach der ersten Präparation durchgeführte Analyse mittels GC zeigte eine Mischung aus Zuckern (Fukose, Galaktose, Glukose sowie Glukosamin und Galaktosamin sowie geringe Mengen anderer Zucker). Das Vorhandensein von Galaktose, Glukose, Glukosamin und Galaktosamin war bereits von Fichtelscherer (1996), Beer (1999) und Zorger (1999) beschrieben worden. Die Fukose wurde zwar nicht explizit genannt, jedoch ist bei Betrachtung deren Ergebnisse von einem Vorhandensein der Fukose in der attraktiven Fraktion auszugehen, was als Bestandteil der postulierten Glykoproteine plausibel wäre. Auch zeigte sich, wie bereits zuvor beschrieben, ein im Vergleich zu den anderen detektierten Zuckern großer Anteil an Galaktose (Fichtelscherer 1996, Beer 1999, Zorger 1999).

Die anschließend durchgeführte SDS-Gelelektrophorese brachte trotz Berücksichtigung der Erfahrungen von Zorger hinsichtlich Probemenge und Gelzusammensetzung keine verwertbaren Ergebnisse. Da sich weder beim zwei- noch beim vierstündigen Lauf eindeutige Banden trotz Doppelfärbung mit Coomassie-Blau und Silbernitrat zeigten. Während Zorger (1999) noch drei Banden erhielt, welche jedoch nicht weiter analysiert werden konnten, kam nach einem weiteren Präparationsschritt bei der vorliegenden Arbeit nach dem vierstündigen Lauf nur eine verschmierte Spur zur Darstellung. Anzumerken sind an dieser Stelle noch die Ergebnisse von Kalbe et al. (1996 und 1997), die ebenfalls SDS-Pages durchführten, mit jedoch deutlich weniger aufgereinigtem SCW. Zudem benutzten sie eine zusätzliche Färbung von Glukokonjugaten durch Western Blot. Aus diesen Gründen erhielten sie wahrscheinlich eine größere Anzahl von Banden. Bemerkenswert ist aber die Tatsache, dass das SCW unterschiedlicher Schnecken unterschiedliche Anzahl und Lokalisation der Banden zeigte. Auch Fichtelscherer (1996), der SCW Filtrat, Dialysat und auch einmal aufgetrenntes SCW gelelektrophoretisch trennte, erhielt noch eine größere Anzahl von Banden. Ebenso Rabl (2002), die nach zwei präparativen Auftrennungen in der attraktiven Fraktion sowohl bei der Silbernitrat- als auch bei der Coomassie-Blau-Färbung zumindest eine Bande darstellen konnte.

Zusätzlich konnte sie durch Anwendung eines Glycan Detection-Kits das Vorhandensein von Glykokonjugaten nachweisen. Die durch weitere Auftrennung immer weniger werdenden Banden sind ein Hinweis auf den sehr geringen Proteinanteil oder sogar eventuell das Fehlen von Proteinen im Lockstoff.

Nach der zweiten präparativen Auftrennung mit dem Resultat der zwei attraktiven Fraktionen, erfolgte eine erneute gaschromatographische Analyse. Dabei wurde eine deutlich weitere Aufreinigung sichtbar, da jede Fraktion lediglich noch einen Zucker aufwies. In der ersten attraktiven Fraktion war der eindeutig dominierende Zucker die Glucose, sie war auch bei Fichtelscherer (1996), Beer (1999) und Zorger (1999) in den attraktiven Fraktionen vorhanden gewesen. Warum Arabit in der zweiten attraktiven Fraktion eine so dominante Rolle spielte, obwohl es nach der ersten Aufreinigung eher nicht eindeutig zu identifizieren war, kann nur an einer erheblichen Anreicherung durch Wegfall großer Mengen unattraktiven Materials liegen. Dass Arabit im SCW enthalten ist, zeigte Fichtelscherer (1996). Da es in größeren Mengen nur in einer unattraktiven Fraktion des SCW vorkam, ist jedoch zu bedenken, dass in der attraktiven Fraktion eventuell kleine Mengen an Arabit enthalten war, die nicht ausreichten, um im GC detektiert zu werden und erst nach erheblicher Anreicherung durch insgesamt vier präparative Schritte im GC zu einer Detektion führte.

Eine weitere Überraschung zeigte sich bei der nachfolgenden Analyse der zwei attraktiven Fraktionen im ASA. Während bei Fichtelscherer (1996), Beer (1999) und Zorger (1999) noch nahezu alle im Standard enthaltenen Aminosäuren auftauchten, zeigte sich in dieser Arbeit fast ausschließlich oder zumindest in deutlicher quantitativen Dominanz eine Aminogruppe (NH_3). Dieser war auch bei oben genannten Arbeiten bei den Analysen im ASA sowohl in attraktiven als auch unattraktiven Fraktionen vorhanden, jedoch in ähnlichen Mengen wie die anderen Aminosäuren. Zwar eluierte der immer wieder bei Zorger (1999) in der Diskussion stehende Tris-Puffer zur gleichen Zeit wie Ammoniak, ein quantitativer Vergleich zeigte jedoch erneut, dass es sich bei der detektierten Substanz eher nicht um Tris-Puffer handelte.

Somit konnten der Lockstoff oder die Lockstoffe neben einer unbekanntem Substanz im Wesentlichen auf zwei Zucker, und zwar Glucose und Arabit,

vorkommend in zwei unterschiedlich großen Molekülen in Kombination mit NH_3 , reduziert werden. Der Erhebliche Anteil an NH_3 führte schließlich noch zu der Idee, verschiedene kleinmolekulare Substanzen mit einer oder mehreren Aminogruppen einer Attraktivitätstestung zu unterziehen. Tris-Puffer war dabei die einzige Substanz, die keine Attraktivität zeigte; ganz im Widerspruch zu den Ergebnissen von Zorger (1999). Besteht der Lockstoff also aus einem großmolekularen Aminosucker?

4.3 Der Zwischenwirtsfindungsprozess

In den ca. 40 Jahren der Forschung konnten viele Informationen zum Zwischenwirtsfindungsprozess von *S. mansoni* und *B. glabrata* und deren Verwandte gesammelt und geordnet werden. So ist ein wohl allgemein anerkanntes Bild entstanden, welches aber noch immer viele Fragen offen lässt.

Das Auffinden des Zwischenwirtes wird in mehrere Phasen aufgeteilt. Zunächst kommt es zu einem Ausschwärmen der Mirazidien und anschließend zu einem Auffinden des Habitats des Zwischenwirtes. In diesen zwei Phasen wird die Migration wohl eher nicht durch Lockstoffe der Schnecken bestimmt (Haberl et al. 1995). Vielmehr scheint die Orientierung durch eine negative Geotaxis aber positive Phototaxis bestimmt zu sein. Hinzu kommt ein Aufsuchen von Flachwasser, also Ufergewässer, in denen sich die Schnecken aufhalten. Zusätzliche Faktoren wie Temperatur, Wasserbewegung, pH, Salzgehalt, Besiedelung mit sensitiven und nicht sensitiven Schnecken spielen dabei eine Rolle (Christensen 1980).

Dagegen scheinen die zwei folgenden Phasen, die Orientierung zum Zwischenwirt und das Verhalten nach Wirtskontakt, insbesondere von chemischen Signalen bestimmt zu sein (Haberl et al. 1995, Haas et al. 1995). Diese Phasen treten demnach ein sobald die Mirazidien den sogenannten „active space“ (dt. aktiven Raum) erreicht haben, also den Bereich, in dem sich die Schnecken und die von ihr ans Wasser abgegebenen Substanzen befinden (MacInnis 1976, Hertel 2006). Die erste der beiden letzten Phasen war auch Gegenstand dieser Arbeit. Das von Haas et al. (1995) beschriebene Makromolekül in Form eines Glukokonjugates konnte bestätigt werden. Die

Wirkung niedermolekularer Verbindungen fanden keine Berücksichtigung, da sie durch Zorger (1999) mittels Dialyse mit einem MWCO (molecular weight cut off) von 3500 und anschließender Ultrafiltration, bei welcher Moleküle kleiner 30 kD zurückgehalten werden, entfernt wurden. Da nur sehr unwesentliche Anteile an Aminosäuren enthalten waren, jedoch große Mengen an NH₃, konnte die Beschreibung als Glykoprotein oder Proteoglykan durch Zorger (1999) nicht bestätigt werden.

Bei der Orientierung zum Zwischenwirt zeigen die Mirazidien eine deutliche Veränderung ihres Schwimmverhaltens. Durch Erhöhung der Anzahl der Richtungswechsel (engl: rate of change of direction = rcd) (Mason und Fripp 1976) und durch 180° Richtungswechsel (engl: turnback swimming) (Chernin 1970) führt das zu einer Akkumulation der Mirazidien in einem Bereich erhöhter SCW-Konzentration. Dieses Verhalten wird auch als Chemoklinokinese bezeichnet (Saladin 1979). Dabei orientieren sich die Mirazidien an einem Konzentrationsgradienten, wobei das Vorhandensein eines Gradienten zu Erhöhung der rcd führt (Roberts et al. 1979), dessen abrupte Abnahme zum turnback swimming (Roberts et al. 1980). Als Ausnahme gilt *S. japonicum*, deren Mirazidien chemotaktisches Verhalten zeigen (Haas et al. 1991). In dieser Phase zeigen Schistosoma-Mirazidien bis auf Ausnahmen (Kalbe et al. 1996) keine sehr hohe Spezifität. Es kommt teilweise zu einer unspezifischen Anlockung mit jedoch letztendlich spezifischer Penetration, aber teilweise auch zu einer unspezifischen Anlockung und Penetration (Haas et al. 1991). Es gibt sogar Berichte über die Penetration von Schnecken anderer Gattungen (Haas et al. 1995). Die Frage, warum Unterschiede in der Spezifität der Zwischenwirtsfindung durch Schistosoma-Mirazidien auftreten, scheint nicht geklärt. Ein Erklärungsmodell könnte in der Evolution zu finden sein. So konnten genetische Untersuchungen zeigen, dass die Zwischenwirtschnecken vor ca. 2-5 Millionen Jahren aus den Neotropen nach Afrika kamen, die Trematoden der Gattung Schistosoma ursprünglich aus Asien (Morgan et al. 2001). Exportiert wurden die Parasiten nach Südamerika aber vermutlich erst durch den Sklavenhandel im 18. Jahrhundert (Kalbe et al. 1996), sodass für ein Überleben der Parasiten in einer neuen Umgebung eine unspezifische Zwischenwirtsfindung zwingend notwendig war. Dies würde die durch Kalbe et al. (1996) beobachtete

Spezifität der ägyptischer *S. mansoni* Mirazidien gegenüber der unspezifischen Reaktion durch brasilianische *S. mansoni* Mirazidien auf das SCW verschiedener Schnecken erklären.

Für die letzte Phase dieses Prozesses, Verhalten nach Wirtskontakt, liegen deutlich weniger Untersuchungen vor. Haas et al. (1991) konnte zeigen das *S. japonicum* zwar unspezifisch angelockt werden kann, jedoch das Verhalten nach simuliertem Wirtskontakt sehr spezifisch geschieht. Dies geschah durch Präsentation des SCW einmal in flüssiger Form, um die dritte Phase der Wirtsfindung mit erhöhter *rcd* und *turnback-swimming* zu simulieren. Anschließend wurde das SCW in Agar eingebracht, wobei im Falle der weiterhin bestehenden Attraktivität die Mirazidien ihr typisches Verhalten mit Kontakt mit Rückkehr (engl: *contact with return = cr*) und wiederholte Untersuchung (engl: *repeated investigation = ri*). Kalbe et al. (1996) benutzte die gleiche Vorgehensweise, dabei wurde wie auch durch Haas et al. (1991) eine Erhöhung der *ri* und nicht der *cr* als Zeichen für ein positives Verhalten gewertet. Anders als bei den Mirazidien scheint bei den Schnecken hinsichtlich ihrer Eignung als Zwischenwirt eine sehr hohe Spezifität zu bestehen (Basch 1976).

Ob es letztendlich dann zur Infektion der Schnecke kommt, scheint zudem von weiteren Faktoren beeinflusst zu sein. So konnte Magalhaes et al. (1997) zeigen, dass eine bereits bestehende Infektion der Schnecke durch Sporozysten der gleichen oder anderer Gattungen ein Hindernis für die Infektion darstellte. Sogar der Kontakt mit einer ungeeigneten Schnecke könne evtl. zu einem Verlust an Infektiosität gegenüber einer geeigneten Schnecke führen, da anhaftende Fremdstoffe zu einer Immunantwort eben dieser Schnecke führten. Zudem beobachtete Theron et al. (1998), dass die Schneckengröße einen Einfluss darauf hat, als möglicher Zwischenwirt zu dienen. Einzeln den Mirazidien vorgesetzt, konnten die ausgewachsenen Schnecken die größte Reaktion, die jüngsten und somit kleinsten die geringste hervorrufen. Setzte man den Mirazidien eine hinsichtlich Alter gemischte Schneckenpopulation vor, bevorzugten sie jedoch die halb ausgewachsenen Schnecken. Hier zeigt sich auch eindrucksvoll, wie artifizielle Laborbedingungen ein Ergebnis möglicherweise verfälschen können. Die Forderung durch Haas et al. (1995), die Laborbedingungen bei der Untersuchung des Verhaltens von Parasiten in

Bezug auf ihren Wirt besser den natürlichen Begebenheiten anzupassen, scheint, um ein unverfälschtes Bild auch des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zwischenwirtsfindungsprozess zu erhalten, für die Zukunft zwingend.

4.4 Ausblick in die Zukunft

Im allgemeinen scheint es sinnvoll, die von Saladin (1979) geforderte Verhaltens-Parasitologie zur genaueren Erforschung der Parasit-Wirt Interaktion mittels weniger artifizieller Laborbedingungen zu betreiben. Im Speziellen scheinen jedoch hochartifizielle Untersuchungen notwendig, um einzelne Schritte, insbesondere jene mit Beteiligung chemischer Signale, entschlüsseln zu können. Dafür wird es für zukünftige Versuche, das von Chernin (1970) sogenannte Miraxon zu isolieren und identifizieren, notwendig sein, große Mengen an SCW aufzubereiten, um den zwangsläufigen Schwund durch die Präparation, aber auch durch analytische Schritte zu kompensieren. Für die Präparation haben sich die Ionenaustausch- und Ausschlusschromatographie bewährt. Sogar das wiederholte Auftragen auf das gleiche Trenngel brachte eine weitere Fraktionierung. Um wegen eng bei einander liegenden Elutionszeiten schwer trennbare Fraktionen voneinander zu trennen, bestünde noch die Möglichkeit zwei oder mehrere Säulen mit gleichem Trenngel in Serie zu schalten, um so eine bessere Auflösung zu erhalten. Auch bewährt haben sich für die Analyse die Gaschromatographie und die Aminosäureanalyse. In Zukunft wäre neben der Identifizierung enthaltener Substanzen auch deren quantitative Bestimmung wünschenswert. Einen etwas fragwürdigen Stellenwert erhielt in dieser Arbeit die Gelelektrophorese mit SDS-Page. Zum einen, da sie kein verwertbares Ergebnis lieferte, wobei Fehler bei der Vorgehensweise nachträglich nicht auszuschließen sind. Zum anderen, weil die zuletzt gewonnenen, attraktiven Fraktionen nahezu keine Aminosäuren und damit auch keine Proteine enthielten, womit eine eventuelle Identifizierung durch die SDS-Page überflüssig scheint. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Haberl et al. (1995) überein, der durch eine Zerstörung der Proteine im SCW mit Pronase E keinen Verlust der Attraktivität beobachtete. Dies steht jedoch im Gegensatz zu den

Ergebnissen von Fichtelscherer (1996), der durch Behandlung des SCW mit Proteinase K einen Attraktivitätsverlust beobachtete. Zur Charakterisierung unterschiedlicher SCW scheint die SDS - Page wiederum geeignet (Kalbe et al. 1997). Vielleicht wird es ja in Zukunft möglich sein, mittels immunologischer oder auch genetischer Verfahren die Identifizierung des Miraxons zu beschleunigen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, einen in der Zwischenwirtsfindung lockwirksamen Stoffes, den Chernin (1970) als Miraxon bezeichnete, weiter anzureichern, eventuell sogar zu isolieren und mittels den analytischen Verfahren der Gaschromatographie, der Aminosäureanalyse und der Gelelektrophorese zu charakterisieren. Als Ausgangsmaterial diente dafür das bereits im Rahmen der Dissertation von Zorger (1999) deutlich aufgereinigte und somit mit dem lockwirksamen Stoff angereicherte SCW. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit der bereits bewährten Methode der HPLC. Als stationäre Phase diente ein bisher noch nicht verwendetes Trenngel, Superdex® 200 Prepgrade, durch welches, wie auch bei der TSK 3000-Säule, eine Trennung nach Molekülgröße erfolgt. Nach zwei präparativen Serien mit dem oben genannten Trenngel, wobei nach jeder Auftrennung eine Attraktivitätstestung erfolgte, lagen zwei attraktive Fraktionen vor. Bei der Analyse im GC und ASA konnten in beiden Fraktionen im Wesentlichen zwei Bestandteile detektiert werden, und zwar jeweils ein Zucker und Ammoniak (NH_3). Dabei handelte es sich bei den Zuckern in der zuerst eluierenden, attraktiven Fraktion (Fraktion 3) um Glukose, in der zweiten (Fraktion 6) um Arabit. Die Tatsache, dass im Vergleich zu Ammoniak nur sehr geringe Mengen an Aminosäuren detektiert werden konnten, könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass bei der Gelelektrophorese keine Proteinbanden angefärbt werden konnten. Es scheint sich demnach um ein wie von Haberl et al. (1992) und Kalbe et al. (1996 und 1997) beschriebenes großmolekulares Glukokonjugat zu handeln. Die in dem Makromolekül enthaltenen Aminogruppen könnten von großer Bedeutung für die Attraktivität sein. Eine Attraktivitätstestung verschiedener Verbindungen mit einer oder mehreren Aminogruppen zeigt für alle getesteten Substanzen geringe bis sehr starke Attraktivität. Keine der Substanzen zeigte keine Veränderung des Schwimmverhaltens der Mirazidien. Bei den Substanzen handelte es sich jedoch um kleinmolekulare Verbindungen, so dass ein Vergleich mit dem großmolekularen Lockstoff hinkt. Es könnte sich um völlig unterschiedliche Mechanismen zur Erzeugung der Attraktivität handeln, sodass die Attraktivität der kleinmolekularen Substanzen rein zufällig ist. Ob es jedoch wirklich Zufall ist, auf Anhieb fünf attraktive Substanzen aus

Tausenden von chemischen Verbindungen herauszugreifen, ist doch sehr fragwürdig. Somit ist es doch eher wahrscheinlich, dass die Aminogruppen im Lockstoff eine zentrale Rolle spielen. Dient der Zucker somit eventuell sogar nur als Träger, ob nun in Form von Glucose oder Arabit, als wesentlicher Bestandteil des von den Schnecken abgesonderten Schneckenschleims? Auf jeden Fall wird es in Zukunft notwendig sein, größere Mengen an SCW aufzureinigen um so die bei der Aufreinigung erheblichen Schwund zu kompensieren und schließlich noch größere Mengen der attraktiven Substanzen für analytische Zwecke zu Verfügung zu haben.

6 Literaturverzeichnis

AMERSHAM BIOSCIENCES: Gel filtration, Principles and methods (2002)

BASCH, P. F.: Parasitological review: Intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* **39**, 150-169 (1976)

BEER, F.: Die Zwischenwirtsfindung von *Schistosoma mansoni*: Experimentelle Untersuchungen zur Charakterisierung eines Makrosignalmoleküls von *Biomphalaria glabrata*. Diss. Techn. Univ. München, Med. Fak. (1999)

BEHRENS, A.C., NOLLEN, P.M.: Responses of *Echinostoma caproni* miracidia to gravity, light and chemicals. *Int. J. Parasitol.* **22**, 673-675 (1992)

CHERNIN, E.: Interference with the capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia to infect the molluscan host. *J. Parasitol.* **54**, 509-516 (1968)

CHERNIN, E.: Behavioural response of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other trematodes to substances emitted by snails. *J. Parasitol.* **56**, 287-296 (1970)

CHERNIN, E.: Penetrative activity of *Schistosoma mansoni* miracidia stimulated by exposure to snail-conditioned water. *J. Parasitol.* **58**, 209-212 (1972)

CHERNIN, E.: Some host-finding attributes of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **23**, 320-327 (1974)

CHRISTENSEN, N.: A review of the influence of host and parasite-related factors and environmental conditions on the host-finding capacity of the trematode miracidium. *Acta Tropica (Basel)* **37**, 303-318 (1980)

DISSOUS, C., DISSOUS, C.A., CAPRON, A.: Stimulation of *Schistosoma mansoni* miracidia by a 80 kDa glycoprotein from *Biomphalaria glabrata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **21** (3), 203-209 (1986)

DZANDU, J. K., DEH, M. E., BARRAT, D. L., WISE, G. E.: Detection of erythrocyte membrane proteins, glycoproteins and lipids in the same polyacrylamid gel using a doublestaining technique. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1733-1737 (1984)

ETAGES, F. J., CARTER, O. S., WEBBE, G.: Behavioural and developmental physiology of Schistosome larvae related to their molluscan host. *Ann. New York Acad. Sci.* **266**, 480-496 (1975)

FICHELSCHERER, M.: Versuche zur Erfassung und Charakterisierung des Miracidienlockstoffes „Miraxon“ von *Biomphalaria glabrata* - eines Hauptzwischenwirtes im Entwicklungskreislauf von *Schistosoma mansoni*. *Diss. Med. Fak. Techn. Univ. München* (1996)

FUCHS, H., HABERL, B., HAAS, W.: Hostfinding of the Miracidium of *Schistosoma mansoni*. *Zbl. Bakt. Hyg.* **A317**, 43.

GALLAGHER, J. T., CORFIELD, A. P.: Mucin-type glycoproteins - new perspectives on their structure and synthesis. *Trends in Biochem. Scien.*, **3**, 38-41 (1978)

HAAS, W., HABERL, B., KALBE, M., KÖRNER, M.: Snail-host finding by miracidia and cercariae: chemical host cues. *Prasit. Today* **11**, 468-472 (1995)

HAAS, W.: Physiological analysis of cercarial behaviour. *J. Parasitol.* **78**, 243-255 (1992)

HAAS, W., GUI, M., HABERL, B., STRÖBEL, M.: Miracidia of *S. japonicum*: approach and attachment to the snail host. *J Parasitol.* Aug. **77** (4), 509-513 (1991)

HAAS, W. HAEBERLEIN, S., BEHRING, S., ZOPPELLI, E.: *Schistosoma mansoni*: Human skin ceramides are chemical cue for host recognition of cercariae. *Exp. Parasitology* 120 (2008), p. 94-97

HABERL, B., HAAS, W.: Miracidium of *Schistosoma mansoni*: A macromolecular Glycoconjugate as signal for the behaviour after contact with the snail host. *Comp Biochem. Physiol.* **101A**, 329-333 (1992)

HABERL, B., KALBE, M., FUCHS, H., STRÖBEL, M., SCHMALFUSS, G., HAAS, W.: *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* : miracidial host-finding behavior is stimulated by macromolecules. *Inetrnat. J. Parasitol.* **25**, 551-560 (1995)

HABERL, B., KORNER, M., SPENGLER, Y., HERTEL, J., KALBE, M., HAAS, W.: Host - finding in *Echinostoma caproni*: miracidia and cercariae use different signals to identify the same snail species. *Parasitology* **120** (Pt 5), 479-486 (2000)

HERTEL, J., HOLWEG, A., HABERL, B., KALBE, M., HAAS, W.: Snail odour clouds: Spreading and contribution to the transmission success of *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda, Digenea) miracidia. *Oecologia* 147, 173-180, (2006)

KALBE, M., HABERL, B., HAAS, W.: *Schistosoma mansoni* miracidial host finding: species-specificity of an Egyptian strain. *Parasitol. Res.* **82**, 8-13 (1996)

KALBE, M., HABERL, H., HAAS, W.: Miracidial host-finding in *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata* is stimulated by species-specific glycoconjugates released from the host snails. *Parasitol. Res.* **83**, 806-812 (1997)

LÖSCHER, T., RUPPEL, A., SCHUBERT, S.: Schistosomiasis (Billharziose) und andere Tropenkrankheiten in: *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*, 3. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 103-123, (2000)

LUGTENBERG, B., MEIJERS, J., PETERS, R., HOEK, P. V.D., ALPHEN, L. V.: Electrophoretic Resolution of the „major outer membrane protein“ of *Escherichia coli* K12 into four bands. *FEBS Letters*, 58(1), 254-258, (1975)

MAGALHAES, L.A., ZANOTTI-MAHALHAES, E.M., DE CARVALHO J.F.: Observations on the miraxonal attraction exercised by sexually immature or adult *Biomphalaria glabrata* infected or not by *Schistosoma mansoni*. *Rev. Saude Publica* **31** (2), 121-124 (1997)

MASON, P.R., FRIPP, P.J.: Analysis of the movements of *Schistosoma mansoni* miracidia using dark-ground photography. *J. Parasitol.* **62** (5), 721-727 (1976)

MASON, P.R.: Stimulation of *Schistosoma mansoni* miracidia by snail-conditioned water. *Parasitology*, 75 (3), 325-338, (1977)

MACINNIS, A.J.: How parasites find hosts: some thoughts on the inception of host-parasite integration. *Ecological Aspects of Parasitology*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 3-20 (1976)

MACINNIS, A.J., BETHEL, W.M., CORNFORD, E.M.: Identification of chemicals of snail origin that attract *Schistosoma mansoni* miracidia. *Nature* **248**, 361-363 (1974)

MEYER, V.R.: Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Laborbücher. Salle + Sauerländer, Frankfurt a. M., (1992)

MORGAN, J.A., DEJONG, R.J., SNYDER, S.D., MKOJI, G.M., LOKER, E.S.: *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology*, 123 Suppl., 211-228 (2001)

NETZER, J.N.: Versuche zur standardisierten Herstellung und Lagerung wässriger Lösungen des Zwischenwirt-Lockstoffes („SCW“) im Kreislauf der Bilharziose. Diss Techn. Univ. München, Med. Fak. (1990)

PLORIN , G.G., GILBERTSON, D.E.: Behavior of *Schistosoma mansoni* miracidia in gradients and in uniform concentrations of glucose. *J. Parasitol.* **71** (1), 116 (1985)

RABL, E.: Experimentelle Untersuchung zur Charakterisierung eines lockwirksamen Signalmoleküls der Zwischenwirtschnecke *Biomphalaria glabrata* für *Schistosoma Mansoni*, Erreger der Intestinalen Bilharziose, Diss Techn. Univ. München, Med. Fak., (2002)

ROBERTS, T.M., LINCK, R.W., CHERNIN, E.: Effector mechanism in the response of *Schistosoma mansoni* to snail-conditioned water. *J. Exp. Zool.* **211** (2), 137-142 (1980)

ROBERTS, T.M., STIBBS, H.H., CHERNIN, E., WARD, S.: A simple quantitative technique for testing behavioral responses of *Schistosoma mansoni* miracidia to chemicals. **64** (2), 277-282 (1978)

ROBERTS, T.M., WARD, S., CHERNIN, E.: Behavioral responses of *Schistosoma mansoni* miracidia in concentration gradients of snail-conditioned water. *J. Parasitol.* **65** (1), 41-49 (1979)

SALADIN, K.S.: Behavioral parasitology and perspectives on miracidial host-finding. *Z. Parasitenkd.* **60** (3), 197-210 (1979)

SAMUELSON, J.C., QUINN, J.J., CAULFIELD, J.P.: Hatching, chemokinesis and transformation of miracidia of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **70** (3), 321-331 (1984)

SHIFF, C.J., DOSSAJI, S.F.: Ecdysteroids as regulators of host and parasite interactions: a study of interrelationships between *Schistosoma mansoni* and the host snail, *Biomphalaria glabrata*. *Trop. Med. Parasitol.* **42** (1), 11-16 (1991)

SPONHOLTZ, G.M., SHORT, R.B.: *Schistosoma mansoni* Miracidia: Stimulation by Calcium and Magnesium. *J. Parasitol.* **62**, 155-157 (1976)

STRICKLAND, G.T., RAMIREZ, B.L., : Schistosomiasis in: Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases, Eighth Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia (2000), p. 804-832

SUKHDEO, M.V.K., METTRICK, F.: Parasite Behaviour: Understanding Platyhelminth Responses. *Adv. in Parasitol.* **26**, 73-144 (1987)

THERON, A., ROGNON, A., PAGES, J.R.: Host choice by larval parasites: a study of *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* miracidia related to host size. *Parasitol. Res.* **84** (9), 727-732 (1998)

ZORGER, N.: Experimentelle Untersuchungen zur Charakterisierung des für den Zwischenwirtsfindungsprozeß von *Schistosoma mansoni* verantwortlichen Miracidienlockstoffes der Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata*. Diss. Techn. Univ. München, Med. Fak. (1999)

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: *HPLC Apparatur mit Lösungsmittel-Vorratsgefäß(1), Hochdruckpumpe(2), Manometer(3), Säule mit Einspritzventil(4), Detektor(5), Schreiber/Integrator(6) und Fraktionssammler(7).*

Abb. 2 : *Auftrennung der Moleküle der mobilen Phase anhand der Molekülgröße (Molekulargewicht)*

Abb. 3: *SCW 1 auf Superdex™ 200 HR 13/30, hierbei konnten ca. 8 Fraktionen (F) in einem Hauptpeak (F 1-4) und kleinen Nebenpeaks (F 5-8) identifiziert werden.*

Abb. 4: *SCW 1 auf HiLoad Superdex™ 200 16/60, es konnten 8 Fraktionen (F 1-8) gesammelt werden.*

Abb. 5: *Gaschromatographie (GC) von SCW 2. neben den anhand des Standards identifizierten Zuckern Galaktose, Glukose, Galaktosamin und Glukosamin trat bei einer Elutionszeit von 9,432 ein unbekannter Zucker (?) auf.*

Abb. 6: *GC von SCW 2 mit Rhamnose, der Peak des unbekanntes Zuckers (Pfeil) ist verbreitert, daher ist eine Übereinstimmung mit dem unbekanntes Zucker unwahrscheinlich.*

Abb. 7: *GC von SCW 2 mit Fukose, die deutliche Erhöhung des Peaks (Pfeil) deutet auf eine Übereinstimmung des unbekanntes Zuckers mit authentischer Fukose*

Abb. 8: *SCW 2 auf Superdex™ 200 HR 13/30, es zeigt sich eine überraschend gute Auftrennung mit mehreren Peaks der zusammengefassten attraktiven Fraktionen F1 und F2 aus SCW 1.*

Abb. 9: SCW 2 auf HiLoad Superdex™ 200 16/60, es zeigte sich eine überraschend gute Auftrennung mit 7 trennbaren Fraktionen (F 1 bis 7), die attraktiven Fraktionen F 3 und F 6 sind mit einem fetten Pfeil gekennzeichnet.

Abb. 10: F3 auf Superdex™ 200 HR 13/30, der zuvor schlanke Peak (Abb. 9) zeigt eine weitere Auftrennung.

Abb. 11: F6 auf Superdex™ 200 HR 13/30, der zuvor breite Peak (Abb. 9) zeigt eine weitere deutliche Auftrennung in einzelne Fraktionen.

Abb. 12: GC von F 3, neben dem bekannten Zucker Glukose zeigt sich noch ein unbekannter Zucker mit einer Elutionszeit 17,35.

Abb. 13: GC von F 6, neben dem vermuteten Zucker Arabit tritt auch hier ein unbekannter Zucker mit der gleichen Elutionszeit wie in Abb. 12 auf.

Abb. 14: GC von F 6, Arabit und Standard, die erhebliche Erhöhung des Peaks lässt den Rückschluss zu, dass es sich tatsächlich in der Fraktion F 6 um Arabit handelt. Kurz hinter Inost ist wieder eine im Vergleich zum Standard unbekannte Substanz zu sehen.

Abb. 15: GC von Tris-Puffer, die Elutionszeit befindet sich im Bereich der gesuchten Substanz.

Abb. 16: GC von F 3 und Tris-Puffer, der Peak bei 17,55 ist im Vergleich zu zur GC von F3 alleine (Abb. 12) deutlich erhöht.

Abb. 17 : GC von F 6, Arabit und Tris-Puffer, der Peak bei 17,379 ist im Vergleich zu zur GC von F6 alleine (Abb. 13) deutlich erhöht.

Abb. 18: GC von F 3, Tris-Puffer und Standard, nach dem Inosit eluiert ein sehr großer Peak der die unbekannte Substanz und den Tris Puffer in der Probe zeigt.

Abb. 19: *Aminosäureanalyse (ASA) von F 3, neben einer Vielzahl kleiner Peaks zeigt sich ein großer Peak (Pfeil) mit einer Elutionszeit von 82,13.*

Abb. 20 : *ASA von F 6, auch hier zeigt sich ein großer Peak (Pfeil) mit einer Elutionszeit von 82,15, ähnlich der von F 3 (Abb. 19).*

Abb. 21: *ASA eines Standards, der größte Peak mit einer Elutionszeit von 82,73 entspricht dem NH_3 im Standard.*

Abb. 22: *ASA von NH_4Cl (NH_3), Elutionszeit 82,7(Pfeil).*

Abb. 23: *ASA von Tris-Puffer, Elutionszeit 82,1 (Pfeil).*

Abb. 24: *ASA von hydrolysiertem Tris-Puffer, Elutionszeit 82,26 (Pfeil).*

Abb. 25: *ASA von hydrolysiertem Tris-Puffer und NH_4Cl es findet sich ein deutlich höherer Peak (Pfeil) im Vergleich zu hydrolysiertem Tris-Puffer (Abb. 24) und NH_4Cl (Abb. 22). Die beiden Substanzen eluieren gleichzeitig.*

Abb. 26: *ASA von 0,2 mg (effektiv 0,066 mg) hydrolysiertem Tris-Puffer und NH_4Cl (Pfeil).*

8 Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Prof. Dr. R. Disko und seinen Mitarbeitern für die Bereitstellung des Themas und für die Ermöglichung der Durchführung der Experimente sowie die persönliche Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Prof. G. Häcker, der die Einreichung der Dissertation letztlich ermöglichte.

Danken möchte ich zudem Prof. Dr. F. Fiedler und seinen Mitarbeitern, die der Durchführung der Experimente mit Rat und Tat zur Seite standen.