

**Experimentelle Untersuchung zur Charakterisierung eines lockwirksamen
Signalmoleküls der Zwischenwirtsschnecke *Biomphalaria glabrata* für
Schistosoma mansoni, Erreger Intestinaler Bilharziose**

Elisabeth Rabl

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. H. Wagner, Ph. D. [Melbourne])

**Experimentelle Untersuchungen zur Charakterisierung eines
lockwirksamen Signalmoleküls der Zwischenwirtsschnecke *Biomphalaria
glabrata* für *Schistosoma mansoni*, Erreger Intestinaler Bilharziose**

Elisabeth Rabl

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:

1. apl. Prof. Dr. R. Disko.
2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker

Die Dissertation wurde am 24.05.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät der Medizin am 17.07.2002 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	EPIDEMIOLOGIE UND GESCHICHTE	1
1.2	DER PARASITENKREISLAUF	2
1.3	DER WIRTSFINDUNGSMECHANISMUS	4
2	MATERIAL UND METHODE	6
2.1	SCHNECKENHALTUNG	6
2.2	MIRACIDIENGEWINNUNG	6
2.3	ATTRAKTIVITÄTSAUSTESTUNG	7
2.4	SNAIL CONDITIONED WATER	7
2.4.1	SCW-Gewinnung	7
2.4.2	Das SCW-Filtrat	8
2.5	AMMONIUM-SULFAT-FÄLLUNG - SEPARATION DURCH PRÄZIPITATION	9
2.6	BILANZIERUNG DES GEWICHTES DER FRAKTIONEN NACH AMMONIUM-SULFAT-FÄLLUNG	10
2.7	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	12
2.7.1	Gelchromatographische, präparative Auftrennung mit der HPLC mit TSK G 3000 SW	12
2.7.2	Gelchromatographische, analytische Auftrennung mit Superdex 200 HR 10/30	14
2.8	GELELEKTROPHORETISCHE METHODEN	15
2.8.1	Proteinbestimmung	15
2.8.2	SDS-Minigelektrophorese	15
2.8.2.1	Reagenzien für die Herstellung der Gelbestandteile	16
2.8.2.2	Herstellung des Polyacrylamidgels	16
2.8.2.3	Vorbereitung der Elektrodenkammer	17
2.8.2.4	Aufbereitung der Proben	18
2.8.2.5	Auftrennung der Proben und des Standards	18
2.8.3	Färbung von Gelen	18
2.8.3.1	Färbung mit Silbernitrat (Dzandu et al., 1984)	18
2.8.3.2	Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250 (Weber und Osborn, 1969) ...	19

2.9	IMMUNOLOGISCHE METHODEN - GLYCAN DETECTION KIT	19
2.10	AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN CONCAVALIN A-SEPHAROSE.....	21
2.11	ERNEUTE SDS-ELEKTROPHORESE.....	22
2.12	ATTRAKTIVITÄTSTEST NACH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN CON A	23
2.13	DIREKTES EINSETZEN DER SDS-PAGE IN DEN ATTRAKTIVITÄTSTEST.....	23
3	ERGEBNISSE	26
3.1	SCW NACH FILTRATION UND ZENTRIFUGATION	26
3.2	AMMONIUM-SULFAT-FÄLLUNG – SEPARATION DURCH PRÄZIPITATION	26
3.3	CHROMATOGRAPHISCHE VERFAHREN AN DER HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIE)	28
3.3.1	Präparative Auftrennung an der TSK G 3000 SW-Säule.....	28
3.3.2	Analytische Auftrennung an der Superdex 200 HR 10/30-Säule	29
3.4	GELELEKTROPHORETISCHE VERFAHREN.....	31
3.5	IMMUNOLOGISCHE METHODEN - GLYCAN DETECTION KIT	33
3.6	AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN CONCAVALIN A-SEPHAROSE.....	34
3.7	DIREKTES EINSETZEN DER SDS-PAGE IN DEN ATTRAKTIVITÄTSTEST.....	36
4	DISKUSSION	38
4.1	DIE ROLLE EINES CHEMISCHEN STIMULUS IM WIRTSFINDUNGSPROZEß.....	38
4.2	METHODIK UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	40
4.2.1	SCW-Gewinnung	40
4.2.2	Attraktivitätstestung	41
4.2.3	Präparation des SCWs.....	42
5	ZUSAMMENFASSUNG	48
6	LITERATURVERZEICHNIS	50
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	58
8	TABELLENVERZEICHNIS	61

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie und Geschichte

Die Bilharziose (Schistosomiasis) ist eine durch Plattwürmer der Klasse Trematoda (Saugwürmer), Familie Schistosomatidae, verursachte Infektionskrankheit der Tropen und Subtropen. Sie ist weltweit die bedeutendste Wurminfektion und nach Malaria die zweitwichtigste Tropenkrankheit. Nach Schätzungen der WHO haben rund 200 Millionen Menschen Schistosomiasis, 500 bis 600 Millionen sind aufgrund ihrer Lebensbedingungen in den 76 Endemiegebieten exponiert. Jährlich sterben 800 000 von den betroffenen Menschen an den Folgen dieser Krankheit (Lang, 1996).

Als Ursprungsgebiet der Schistosomiasis, deren Geschichte sich bis in die Antike zurückverfolgen lässt, vermutet man die Region der großen Seen in Ostafrika. Die Symptomatik der Bilharziose wurde bereits in alten Papyrusschriften um 1900 v. Ch. dargestellt. Während des napoleonischen ägyptischen Feldzuges 1799-1801 grassierte die Erkrankung in der Truppe. Mit der Ausweitung des Sklavenhandels ab dem 16-ten Jahrhundert wurde *Schistosoma mansoni* durch afrikanische Sklaven nach Amerika importiert und ist heute an der Ostküste Südamerikas (Brasilien und Venezuela), in der Karibik (Haiti, Puerto Rico, Guadeloupe, Martinique, St. Lucia, Montserrat), in Saudi-Arabien und Jemen endemisch (Lang, 1996).

Ein entscheidende Wende in der Geschichte dieser Erkrankung war, als 1851 der in einem Kairoer Krankenhaus arbeitende deutsche Arzt Bilharz während einer Sektion in den Mesenterialvenen eines ägyptischen Jungen kleine fadenförmige Würmer entdeckte. Er nannte diese *Distomium haematobium*, da der Mund und der Bauchsaugnapf der adulten Würmer dem Bild zweier Münder ähnelt. Später fand Bilharz das Ei des Parasiten im Urin der infizierten Patienten und schloss so auf einen Zusammenhang zwischen diesen Erregern und der in weiten Teilen Ägyptens auftretende Hämaturie. Darüber hinaus beschrieb er zwei unterschiedliche Eitypen, die einen mit einem Endstachel und die anderen mit einem Seitenstachel. Erstere stellten sich als Auslöser der Blasenbilharziose und letztere als Erreger der Darmbilharziose heraus. Erst 1889 einigte man sich, den Erreger allgemein als „*Schistosoma*“ (von *schistos* = gespalten; *soma* = Körper) und die durch ihn hervorgerufene Krankheit als Schistosomiasis zu bezeichnen.

Betroffen sind bei allen Arten der Schistosomiasis vor allem ländliche Bevölkerungsgruppen mit niedrigem Lebensstandard und schlechten hygienischen Bedingungen. Dies ist sicherlich ein Hinweis dafür, dass das menschliche Verhalten entscheidend für die Verbreitung der Erkrankung ist. Grundsätzlich allerdings wird die Verbreitung der verschiedenen Schistosomenarten durch das Vorkommen der als Zwischenwirte geeigneten Süßwasserschnecken begrenzt. Zum einen sind also mangelhafte sanitäre Bedingungen in den betroffenen Ländern verantwortlich, zum anderen werden aber auch durch Dammbauten und Bewässerungsprojekte immer neue Reservoirs für die am Parasitenkreislauf beteiligten Schnecken geschaffen (Amankwa et al., 1994).

In den Vordergrund ist zu stellen, dass durch den zunehmenden Tourismus in diese Endemiegebiete auch die Erkrankungsfälle in Deutschland zunehmen.

1.2 Der Parasitenkreislauf

Die Entwicklung und der Lebenszyklus der getrenntgeschlechtlich lebenden Trematoden der Familie Schistosomatidae stimmen bei den verschiedenen Arten im wesentlichen überein. Die adulten Würmer halten sich paarweise vereint je nach Art bevorzugt in den mesenterialen Venen (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*) oder in Venen des Urogenitalsystems (*S. haematobium*) des Endwirts auf (Lang, 1996). Zu Beginn und am Ende eines Zyklus steht der Endwirt. Nach Reifung eines Wurmpaares legt das Weibchen die Eier in das Lumen des Gefäßes ab, worauf diese durch das Endothel in das umgebende Gewebe eindringen. Ein gewisser Teil der abgelegten Eier wandert in die Harnblase, Ureteren oder Darm und wird so mit Urin oder Stuhl ausgeschieden. Gelangen die Eier ins Wasser, schlüpfen daraus die Larven, sogenannte Miracidien, die nur etwa 48 Stunden lebensfähig sind. In diesem Zeitraum müssen sie eine geeignete Zwischenwirtschnecke finden. Nachdem die Miracidien in die Schnecke eingedrungen sind, entwickeln sich in einer Vermehrungsphase über zwei Generationen von Sporozysten in ca. 15 Wochen die Zerkarien, die aus der Schnecke in das umgebende Wasser ausschwärmen und bei Kontakt mit dem geeigneten Endwirt, entweder Mensch oder Säugetier, durch die intakte Haut eindringen. Dies nennt man den Penetrationsvorgang, bei dem die infektiösen Gabelschwanzlarven ihren Ruderschwanz verlieren. Sie gelangen dann über Lymphbahnen, Venen und über die rechte Kammer des Herzens in die Lungenstrombahn, von wo aus sie in die Leber wandern. Die vollständige Reifung und die Paarung der Adulten erfolgt schließlich in den intrahepatischen

Pfortaderästen, von denen dann die erwachsenen Trematoden in Paaren vereint bis in die kleinen mesenterialen Venen (Darmbilharziose) oder in die Venengeflechte des kleinen Beckens (Blasenbilharziose) einwandern.

Dort legen die Weibchen wieder Eier, welche entweder im Darm oder im Urogenitaltrakt granulomatöse Entzündungen hervorrufen und aufgrund cytotoxisch-histolytischer Einwirkung ins Freie gelangen (Piekarski, 1987).

Der Entwicklungsvorgang von der Infektion mit den Zerkarien bis zur Eiausscheidung benötigt in der Regel etwa 30 bis 40 Tage.

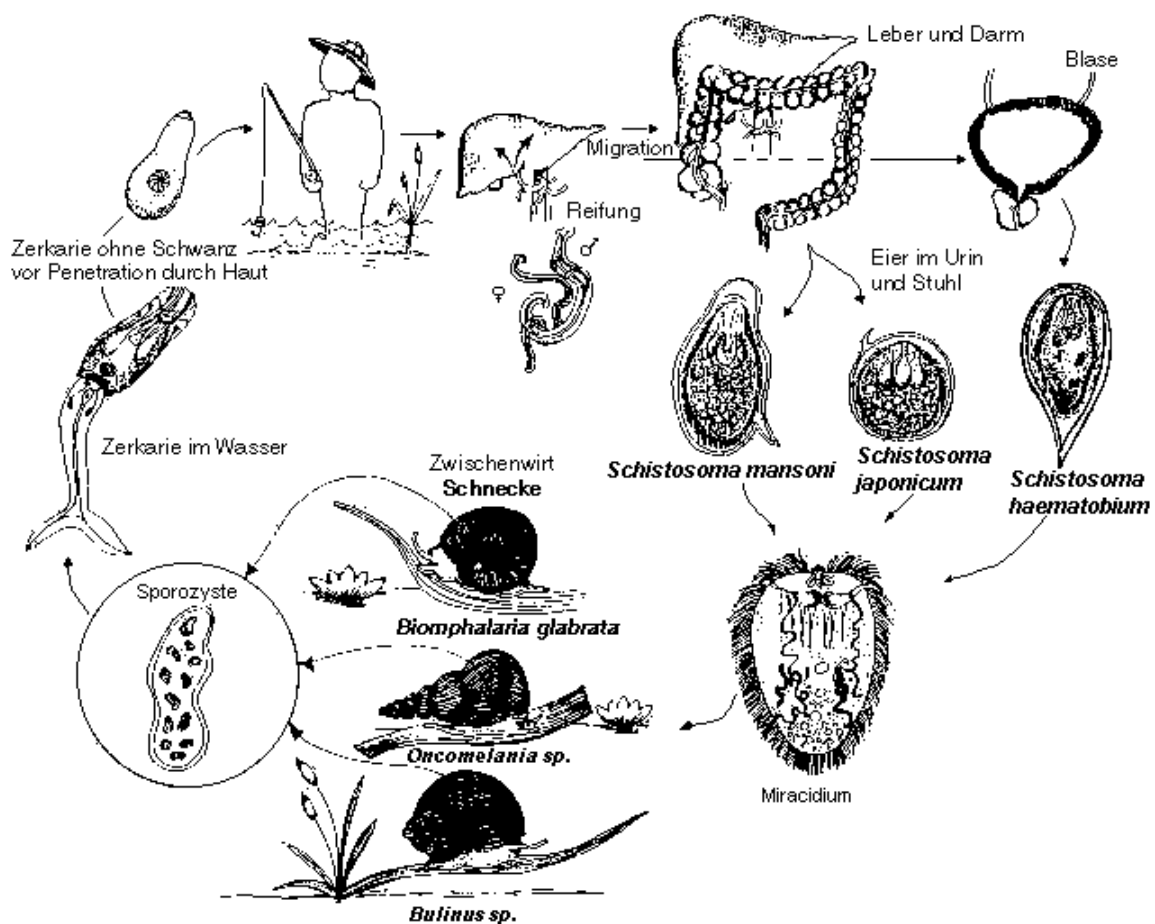


Abbildung 1: Schistosoma mansoni: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus



Abbildung 2: Zwischenwirtsschnecke *Biomphalaria glabrata*

1.3 Der Wirtsfindungsmechanismus

Eine stets weiterwachsende Anzahl von Untersuchungen beschäftigt sich mit der Frage, wie die verschiedenen Parasiten ihren Wirt finden und erkennen. Die meisten Parasiten, welche aktiv ihre Wirte erreichen und infizieren, entwickelten im Laufe der Zeit sehr komplexe Verhaltensmuster und erzielten somit auch eine bemerkenswerte Wirtsspezifität. Die unterschiedlichen Parasitenarten identifizieren ihren Wirt mit Hilfe von Mechanismen und in ständiger Abhängigkeit von den Signalen, die der Wirt aussendet und die sich von den Signalen anderer Spezies unterscheiden, wenn auch nur in ganz minimaler Weise.

Die hohe Komplexität, Spezifität und Vielfältigkeit der Wirtserkennungsstrategien unterstreichen, dass die Wirtsfindung und die Wirtserkennung sehr wichtige Determinanten in der Evolution von Parasiten sind (Haas, 2001).

Diese Arbeit beschäftigt sich im Rahmen der Grundlagenforschung mit dem Kreislauf des Erregers der Darmbilharziose. Ein wichtiger, in seinem Mechanismus immer noch nicht komplett verstandener Prozess, ist die Schaltstelle zwischen Miracidium und dem Zwischenwirt, der Schnecke. Miracidien sind nur für wenige Stunden infektiös und sie scheinen sich deshalb in ihrem Verhalten hauptsächlich auf das Auffinden und das Eindringen in die Zwischenwirtsschnecke zu konzentrieren. Haas postulierte in seiner Veröffentlichung 2001, dass sich das Verhaltensmuster der Miracidien letztlich auf vier Phasen der Wirtsfindung verteilt. In der ersten Phase direkt nach dem Schlüpfen aus dem Ei beherrscht die Zerstreuung das Bild, indem sich die Miracidien, unterstützt durch die Orientierung nach Licht und der Schwerkraft, zunächst von ihrem Ursprung entfernen und dabei schnell und geradlinig schwimmen. Dieses orthokinetische Verhalten (Mason und Fripp, 1977) ist an die

bevorzugten Aufenthaltsorte der Wirtsschnecken angepasst. Die Miracidien reagieren positiv auf Licht und Temperatur (Chernin und Dunavan, 1962; Mason und Fripp, 1977), negativ auf Schwerkraft. Statistisch gesehen gelangen die *Schistosoma mansoni*-Miracidien so in die Nähe der Zwischenwirte, da sich die Schnecken bevorzugt nahe der Wasseroberfläche an Blättern oder Stengeln von Wasserpflanzen aufhalten (Upatham, 1972a, b, c). Diese Orientierung bereits im Lebensraum des Zwischenwirts wird von Haas als die zweite Phase bezeichnet. Die dritte Phase, also sobald die Miracidien in den aktiven Raum der Schnecke gelangen, erfasst die Orientierung der Wimperlarven anhand von chemischen Signalen, die der Zwischenwirt aussendet. Seit Jahrzehnten versuchten etliche Autoren, diesen Schritt der chemokinetischen Orientierung zu entschlüsseln und die lockwirksame Substanz zu identifizieren. Die meisten Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit Miracidien von *Schistosoma mansoni*, aber sehr kontroverse Ergebnisse lassen erahnen, dass bis jetzt noch kein endgültiges Ziel erreicht wurde. Manche Autoren beschrieben kleinmolekulare Bestandteile im attraktiven Material, wie zum Beispiel Aminosäuren, Magnesiumionen, Glukose oder Glutathion. Neuere Veröffentlichungen konnten im Gegensatz dazu die Struktur des attraktiven Materials, das Chernin 1970 als „Miraxon“ bezeichnete, soweit identifizieren, dass behauptet wird, dass eine wichtige Rolle großmolekulare Glykokonjugate spielen. Genau diese zwischenwirtsspezifischen Glykokonjugate sind auch für die letzte Phase der Wirtsfindung verantwortlich, also für die direkte Kontaktaufnahme und die Invasion in die Schnecke.

Klar ist, dass definierte, chemisch lockwirksame Substanzen eine Schlüsselrolle im Mechanismus der Miracidienwirtsfindung übernehmen, und dass es bisher nicht gelungen ist, diese in verschiedenen Präparationsschritten zu isolieren und ihre genaue Zusammensetzung zu identifizieren.

Diese Arbeit beschreibt den neuen Weg, der eingeschlagen wurde, um das „Miraxon“ vielleicht in Zukunft näher beschreiben zu können.

2 Material und Methode

Der Bilharziosekreislauf im Labor

2.1 Schneckenhaltung

Natürliche Zwischenwirte für die Miracidien von *Schistosoma mansoni* sind rein aquatische Lungenschnecken der Gattung *Biomphalaria*. Für die Versuche wurden südamerikanische Wasserschnecken der Art *Biomphalaria glabrata* verwendet (Stamm Hoechst AG, Herkunftsland Brasilien). Die nicht infizierten Schnecken wurden in Glasaquarien bei einer Temperatur von 26-28°C und einem Licht-Dunkelwechsel (LD = 12 : 12) gehalten. In einem eigens dafür eingerichteten fensterlosen Raum benutzten wir Tageslichtleuchtstoffröhren (Osram Daylight 5000 De Luxe L36/W19), um so den künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus aufrecht zu halten. Im Abstand von zwei Wochen wurde das Wasser in den Kunststoff- bzw. Glaszuchtbecken erneuert, das zu gleichen Teilen Leitungswasser und destilliertes Wasser enthielt. In jedem Becken befanden sich jeweils durchschnittlich 80 Schnecken. Sie wurden täglich mit frischem, gewaschenem Kopfsalat gefüttert. Kontinuierliche Luftzufuhr über Aquarienpumpen war gewährleistet.

2.2 Miracidiengewinnung

Als Endwirt innerhalb des Bilharziosekreislaufs dienten männliche weiße NMRI-Mäuse, die durch die subkutane Injektion einer Zerkarienaufschwemmung infiziert wurden. Sobald ein fortgeschrittenes Stadium der Krankheit erreicht war, - etwa nach sechs Wochen, wurden die Tiere getötet. Die larvenhaltigen Eier wurden aus dem Darm isoliert und anschließend mit Hilfe eines Anreicherungsverfahrens konzentriert. Der über Nacht autolytisch zersetzte Darmbrei wurde in eine mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllte Flasche gegeben und zur mechanischen Freisetzung der miracidienhaltigen Eier für zwei Stunden auf einer Schüttelapparatur bewegt. Die durch Gaze gefilterte Suspension verblieb in Petrischalen für eine Stunde bei 4 °C im Kühlschrank. Danach wurden die Darmpartikel an der Oberfläche abgesaugt. Diese Suspension konnte für wenige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden. Abermaliges Absaugen des Überstandes und Auffüllen der Petrischalen mit 28 °C warmem

Wasser unter gleichzeitiger Beleuchtung mit einer Lampe brachte die Miracidien nach kurzer Zeit zum Schlüpfen, so dass mit der Attraktivitätsaustestung begonnen werden konnte (Albrecht,1985, Schmieder, 1988, Netzer, 1990).

2.3 Attraktivitätsaustestung

Zur Vorbereitung der Attraktivitätsaustestung wurde ein Tropfen der Miracidien suspension in eine Petrischale pipettiert . Die auszutestenden Proben wurden mit Aqua bidest. verdünnt und anschließend eine geringe Menge der Lösung in eine Eppendorf-Pipettenspitze gesaugt. Deren breites Ende wurde mit Parafilm verschlossen und die Spitze in den Tropfen der Miracidien suspension getaucht. Unter ein Stereomikroskop gestellt, konnte nun das Verhalten der Tiere beobachtet werden. War die Probe attraktiv, änderte sich das Verhalten der vorher geradlinig und langsam schwimmenden Miracidien in ein „aufgeregtes“ und durch schnelle Richtungswechsel gekennzeichnetes Schwimmen. Die Verhaltensänderung nach Hinzufügen des attraktiven Materials wurde ja nach Stärke in verschiedene Grade eingeteilt. Nicht attraktives Material kennzeichneten wir mit „-“ und attraktives untersuchtes Material versahen wir mit Pluszeichen von „+“ bis „+++“. Dabei wurde jede Substanz mindestens zweimal getestet.

Vor jeder Versuchsreihe ermittelten wir die Qualität der Miracidien suspension mit Hilfe von frisch gewonnenem SCW. Dieses SCW diente ebenfalls als Positivkontrolle.

2.4 Snail Conditioned Water

Chernin benutzte erstmals die Bezeichnung Snail Conditioned Water, womit das Wasser bezeichnet wurde, in welches die Zielschnecken der Miracidien nach einer standardisierten Zeitspanne verschiedene Substanzen (z.B. Schleim, Stoffwechselprodukte) abgegeben haben. In Attraktivitätstests mit Miracidien lässt sich jetzt eine auffällige Beobachtung machen: Das zuvor „inattraktive“ Wasser übt nun eine Anziehungskraft auf die zugesetzten Miracidien aus (Chernin 1970, 1972).

2.4.1 SCW-Gewinnung

Die für die SCW-Herstellung verwendeten uninfizierten Schnecken waren zuvor in ihren Aquarien mit frischem, gewaschenem Kopfsalat gefüttert worden.

Um die SCW-Ausbeute zu steigern, wurde innerhalb der Promotionsarbeit von Niels Zorger (1998) erstmals doppelkonzentriertes SCW eingesetzt, d.h. man versuchte, die doppelte Menge Schnecken für jeden Liter SCW zu verwenden.

Mit einem Aquarien-Fischnetz wurden sie aus den Zuchtbecken entnommen, behutsam mit einem weichen Pinsel unter fließendem Leitungswasser gesäubert und in einen 2000 ml-Standzylinder gesetzt. Etwa 80 Schnecken hatten bei einem Durchmesser von 6-10 mm ein Gesamtgewicht von 300 g. Dann wurde der Standzylinder mit jeweils 600 ml entionisiertem Wasser, temperiert auf 26 °C, gefüllt. Das Gefäß wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und für 16 h bei 26 °C und Tageslichtbeleuchtung in den Zuchtraum gestellt. Anschließend wurde das entstandene SCW zur Entfernung grober Verunreinigungen durch eine doppelte Lage Gaze filtriert, und die Schnecken wieder in die Aquarien gesetzt (Netzer, 1990).

2.4.2 Das SCW-Filtrat

Vor Weiterverarbeitung wurde das frisch gewonnene SCW stets auf Attraktivität kontrolliert (Schmideder, 1988). Das SCW reinigte man mit einem Bakterienfilter der Firma Sartorius mit der definierten Porenweite von 0,2 µm. Dafür wurde ein Filtriergerät (Fa. Nalgene, 250 ml) und eine Elektropumpe zur Erzeugung eines Unterdrucks von 3,0 psi benutzt. Der Filter musste jeweils nach Reinigung von 50 ml SCW-Filtrat gewechselt werden. Das Filtrat wurde zu je 250 ml in 500 ml-Rundkolben rotierend eingefroren und durch eine Wkf-Gefriertrocknungsanlage (Freeze dryer) kryolyophilisiert.

Das erhaltene Pulver war nicht vollständig wasserlöslich, welches nun portionsweise in 6 ml Aqua bidest. mechanisch mit einem Glasspatel und einer Pipettenspitze gelöst wurde und in Zentrifugengläser überführt wurde. In einer Du Pont Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge wurde das resuspendierte Material bei 18000 U/min für 20 min zentrifugiert und der Überstand danach vorsichtig dekantiert und in ein anderes Gefäß pipettiert. Dieses Vorgehen, das wasserlösliche Material, also den Überstand, von dem wasserunlöslichem Material, dem Pellet, zu trennen, wurde noch zweimal wiederholt und die drei Überstände vereinigt.

Somit waren schon die ersten Materialien gewonnen, der Überstand und das Pellet, welche für die Attraktivitätsaustestung zur Verfügung standen.

Die Herstellung des SCW wurde laufend durchgeführt, um immer ausreichend Material für die anstehende Präparation und Analyse zur Verfügung zu haben.

2.5 Ammonium-Sulfat-Fällung - Separation durch Präzipitation

Bei der Ammonium-Sulfat-Fällung werden Proteine mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt, wobei das Prinzip auf „Salting Out at High Salt Concentration“ beruht.

Ein typisches Proteinmolekül in Lösung hat hydrophobe Stellen („patches“). Zudem ordnen sich die Wassermoleküle um dieses Protein herum an. Durch Hinzufügen von Salzen aggregieren die Proteine, da sich die Wassermoleküle zu den Salzen hin orientieren. Folglich werden die hydrophoben „patches“ wieder frei und stehen zur Aggregation mit anderen Proteinen zur Verfügung.

Wir erhofften uns, durch diesen Schritt der Ammonium-Sulfat-Fällung eine zusätzliche Reinigung des SCW-Filtrats zu erreichen.

Zu dem zuvor gewonnenen SCW-Filtrat wurde nun eine 95 %-ige, also gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung hinzugefügt. Ziel war es, fünf verschiedene Fraktionen herzustellen, welche sich durch den Sättigungsgrad des SCW unterscheiden: 30 % (7,5 ml SCW + 3,2 ml der gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung), 45 % (9,5 ml SCW + 2,6 ml der gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung), 60 % (12,0 ml SCW + 4,5 ml der gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung), 75 % (15,5 ml SCW + 9,3 ml der gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung) und vollständig gesättigt (25 ml SCW + 6,5 g des $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Salzes). Schritt für Schritt fügten wir dem SCW eine bestimmte Menge an der gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung hinzu, um somit die einzelnen Fraktionen herzustellen. Die Fraktionen wurden jeweils 2 h im Kühlraum ausgefällt. Die anschließende Zentrifugation (Du Pont Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) mit 15000 U/min für 20 min ermöglichte, das gefällte Sediment vom Überstand zu trennen und diesen Überstand für die nächsten Fällungen auf die weiteren Fraktionen einzusetzen. Das Sediment wurde jeweils nach der Zentrifugation in 10 ml Aqua bidest. gelöst, in MWCO (Mittleres Molekulargewicht) 3500 D Dialyseschläuche abgefüllt und anschließend gegen 5 l dialysiert. Das Dialysewasser wurde nach vier Stunden gewechselt, und die Dialyse schließlich drei Mal durchgeführt.

Nach der Dialyse überführten wir das gefällte Material der verschiedenen Fraktionen jeweils in einen Rundkolben und ließen es gefriertrocknen.

Fünf verschiedene Fraktionen und das gefriergetrocknete Material des nicht fällbaren Überstandes standen nun für einen weiteren Attraktivitätstest zur Verfügung.

Größte Attraktivität auf die Miracidien konnte in Fraktionen beobachtet werden, die auf 60 % und 75 % gefällt wurden (siehe Tabelle 2, Seite 27). Mit dieser Testfällung konnte man also den Bereich genau abstecken, in dem das attraktive Material ausfällt: Der Bereich zwischen

einer Fraktion, die auf 50 % mit Ammonium-Sulfat gefällt ist und einer, die auf 75 % gefällt ist.

Da bisher für die Ammonium-Sulfat-Fällung nur eine geringe Menge an Testmaterial eingesetzt wurde, verlangte nun der nächste Schritt, die fünffache Menge aufzubereiten und zu fällen. Erst dann konnte eine präparative Auftrennung durch chromatographische Methoden durchgeführt werden. Die Ammonium-Sulfat-Fällung beinhaltete folglich nur noch die Fraktionen, - auf 50 % und auf 75 % gefällt, zwischen denen der Bereich der größten Attraktivität in der „Testfällung“ aufgetreten war (auf 50 %: 37,5 ml SCW + 37,5 ml der gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung; auf 75 %: 70,0 ml SCW + 70,0 ml der gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung).

2.6 Bilanzierung des Gewichtes der Fraktionen nach Ammonium-Sulfat-Fällung

Anschließend an die Dialyse füllten wir das gefällte und dialysierte Material in kleine Aufbewahrungsgläser. Nach der folgenden Kryolyophilisation konnten wir das Gewicht der beiden Fraktionen und des Überstandes der auf 75 % gefällten Probe bestimmen (siehe Tabelle 3, Seite 27).

Die Präparationsschritte bis zu diesem Punkt sind in dem in Abbildung 3 gezeigten Laufschemata zusammengefasst:

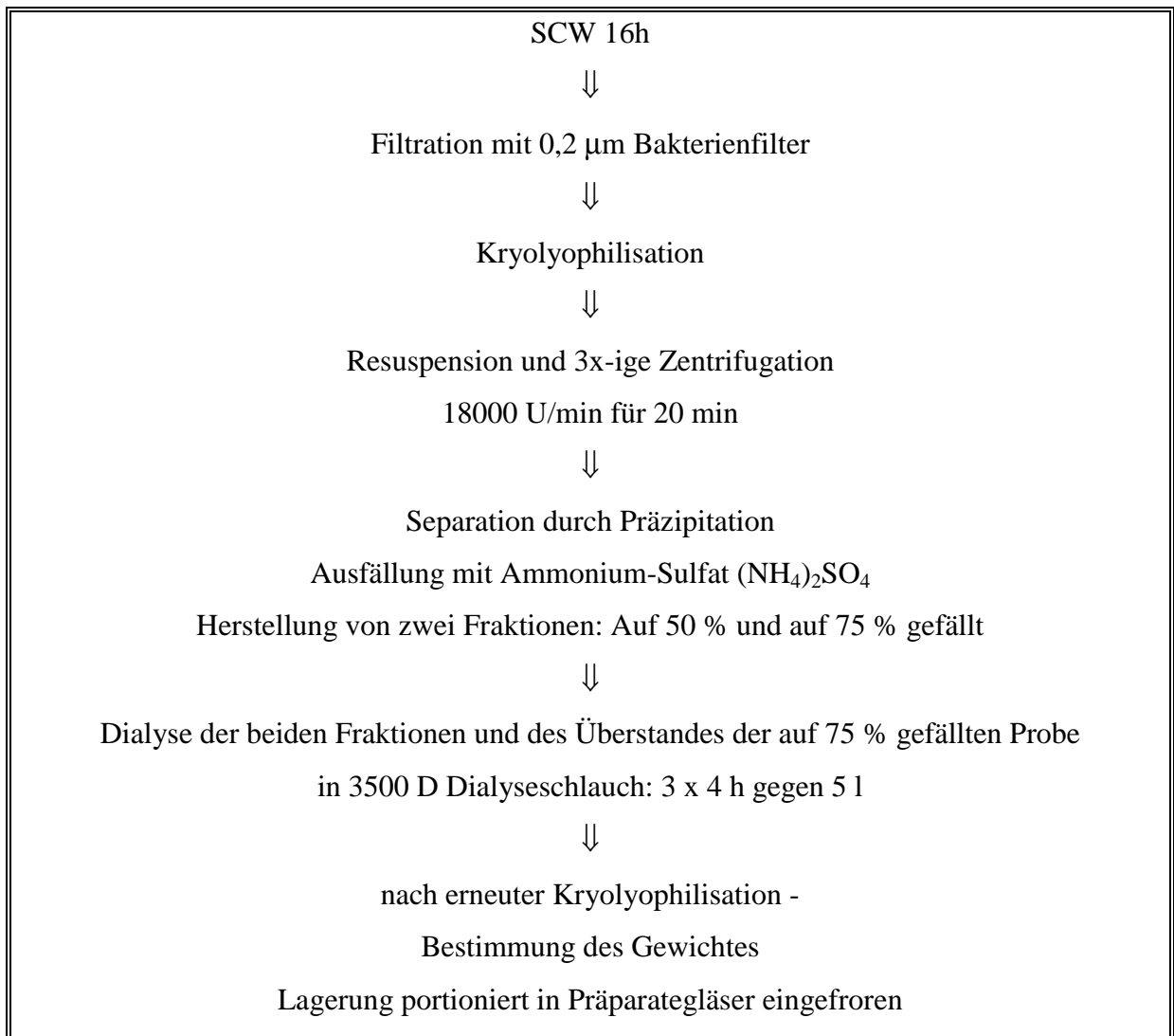


Abbildung 3:Laufschema A der Materialaufbereitung einschl. Ammonium-Sulfat-Fällung – Material für anschließende HPLC-Läufe

2.7 CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN

Hochleistungschromatographie

Mit der Einführung der HPLC (Hochleistungschromatographie) in den siebziger Jahren erfuhr die klassische Flüssigkeitschromatographie eine entscheidende Weiterentwicklung. Ihr wesentlicher Vorteil besteht darin, dass durch den Einsatz von Drücken bis zu 8700 psi relativ große Mengen an Substanzgemischen innerhalb Minuten qualitativ getrennt werden können (Meyer, 1992). Polymorphe Stoffgemische lassen sich heute im Minutenbereich zuverlässig und reproduzierbar trennen.

Jede chromatographische Trennung beruht auf Unterschieden in den Wandergeschwindigkeiten der Probenbestandteile. Dies wird durch verschiedene Aufenthaltswahrscheinlichkeiten in der stationären Phase bewirkt. Mit der bewegten Phase wird das Probenmaterial transportiert. Die chromatographischen Verfahren werden je nach Beschaffenheit der stationären und mobilen Phase eingeteilt (Meyer, 1992).

2.7.1 Gelchromatographische, präparative Auftrennung mit der HPLC mit TSK G 3000 SW

Ausschlusschromatographie (Gelchromatographie)

Für unsere Analysen verwendeten wir die Ausschlusschromatographie, die sich von den anderen Chromatographiemethoden prinzipiell unterscheidet, da hier eine Auftrennung eines Gemisches nicht durch Wechselwirkungen erreicht wird, sondern durch eine Klassifizierung nach der Molekülgröße. Die Säulen sind mit einem porösen Material gepackt. Molekülen, die zu groß sind, um in die Poren eindringen zu können, steht nur das Volumen zwischen den Partikeln zur Verfügung. Sie verlassen deshalb die Säule ungetrennt (Ausschlussmoleküle) innerhalb des sogenannten Retentionsvolumens (Volumen des Eluenten zwischen den Partikeln). Kleinere Moleküle diffundieren in diese Poren, stagnieren und verlassen sie - je nach Größe - zu verschiedenen Zeitpunkten. Je weiter die Moleküle in die Poren eindringen können, desto größer ist der erreichbare Anteil des gesamten Porenvolumens und desto später werden sie eluiert. Das Trägermaterial darf keinerlei adsorbitive Kräfte auf das Probengemisch ausüben, da ansonsten die Separierung nach Molekülgröße gestört würde (Fischer, 1980; Engelhardt, 1977).

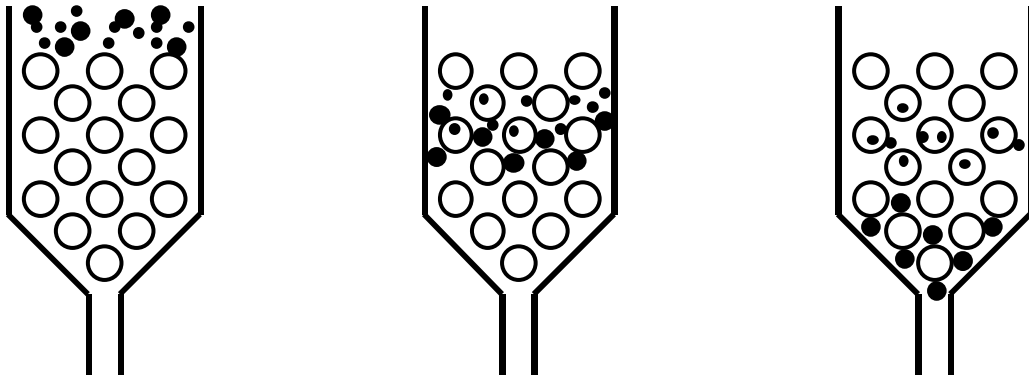


Abbildung 4: Schema zur Theorie der Ausschlusschromatographie: Die großen Kreise stellen die stationäre Phase dar. Beim Passieren der Säule wandern die großen Moleküle (große Punkte) schneller durch die Säule, da sie im Gegensatz zu den kleineren Molekülen (kleine Punkte) nicht in die Poren des Silicagels (stationäre Phase) eindringen können und deshalb nicht abgefangen werden.

Versuchsbedingungen:

Säule: Toso Haas; Bioseparation TSK-Gel, G 3000 SW

Max. Druck: 15 bar

Eluent: Aqua bidest. steril, 0,2

Flow: 3 ml/min

Druck: 6 - 8 bar

Detektionswellenlänge: $\lambda = 210 \text{ nm}$

Temperatur: Raumtemperatur

Überprüfung und Eichung der Säule

Es wurde ein Standardproteingemisch aus den folgenden Proteinen in 100 μl Puffer aufgenommen und unter den gleichen Laufbedingungen eingespritzt.

100 μg Katalase (240 000 M)

100 μg Cytochrom C (12 500 M)

100 μg p-Aminobenzoesäure (137 M)

Auftragungsbedingungen und Versuchsdurchführung

Material: Krylyophilisiertes Sediment der auf 75 % mit Ammonium-Sulfat -
gefällten Probe

Das Material wurde in Aqua bidest. steril 0,2 µm gelöst und anschließend in einer Eppendorf-Zentrifuge 2 min bei 14 000 U/min zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde aufgetragen.

Aufgetragenes Volumen: 150 µl

Aufgetragene Menge pro Lauf: 0,75 mg Material

Aufgetragene Menge insgesamt: 65,0 mg Material

2.7.2 Gelchromatographische, analytische Auftrennung mit Superdex 200 HR 10/30

Versuchsbedingungen

Säule: Superdex 200 HR 10/30; Auftrennung von Proteinen und Peptiden
innerhalb des Molekulargewichts von 10 000 - 60 000

Max. Druck: 15 bar

Eluent: Aqua bidest. steril; 0,2 µm

Flow: 0,5 ml/min

Detektionswellenlänge: $\lambda = 210 \text{ nm}$

Temperatur: Raumtemperatur

Auftragungsbedingungen und Versuchsdurchführung

Aufgetragenes Material: 1. Peakfraktion (Attraktivität +++) nach der Auftrennung
mit TSK G 3000 SW (siehe Abbildung 8, Seite 29)

Das kryolyophilisierte Material wurde wiederum in Aqua bidest. steril 0,2 µm gelöst, anschließend in der Eppendorf - Zentrifuge bei 14 000 U/min für 2 min zentrifugiert. der Überstand wurde dann auf die Säule aufgetragen.

Aufgetragenes Volumen: 75 µl

Aufgetragene Menge pro Lauf: 150 µg Material

aufgetragene Menge insgesamt: 10 mg

2.8 GELELEKTROPHORETISCHE METHODEN

2.8.1 Proteinbestimmung

Bevor das bisher gewonnene Material in willkürlichen Mengen für die anschließenden gelelektrophoretischen Methoden eingesetzt und aufgetragen würde, musste eine Proteinbestimmung durchgeführt werden.

Die Proteinbestimmung wurde mit der Methode nach Lowry, verändert nach Pierce (BCA Protein Assay Reagent) durchgeführt.

Material: Hierfür wurde von jeder Peakfraktion 1, 2 und 3 nach der Superdex 200 HR 10/30-Auftrennung (siehe Abbildung 9, Seite 30) je 0,5 mg entnommen und mehrere Verdünnungsreihen davon hergestellt. Nach einer Photometermessung konnte anhand der Extinktionswerte und anhand des BSA-Standards (Rinderserumalbuminstandards) die Menge an Protein pro mg Material bestimmt werden.

Angestrebt wurde, für das gelelektrophoretische Verfahren genau 2,5 µg Protein von jeder Peakfraktion aufzutragen. Somit musste folglich soviel Volumen von jeder Peakfraktion abpipettiert werden, dass dieses Volumen genau einer Menge von 2,5 µg Protein entsprechen würde.

2.8.2 SDS-Minigelelektrophorese

Verfahren: Zum Nachweis von Proteinen und zur Charakterisierung ihrer relativen Molekülmasse benutzt man die sog. trägergebundene Elektrophorese auf Polyacrylamidbasis.

Will man eine elektrophoretische Trennung der Proteine nur nach dem Molekulargewicht erreichen, so muss man durch geeignete Bedingungen dafür sorgen, mögliche Einflüsse von Ladung und Gestalt auf die Wanderstrecke zu vermeiden. Dies wurde durch Zusatz eines anionischen Detergenz, Natriumdodecylsulfat (SDS), erreicht. Bindung dieses Reagenz in einem steten Verhältnis bewirkt eine uniforme Ladungsverteilung auf den Proteinen. Ein Reduktionsmittel wie Mercaptoethanol zerstört sämtliche Disulfidbrücken in eventuell vorhandenen höheren Strukturen der Proteine. Das Molekulargewicht wird durch den Vergleich mit parallel zur Probe aufgetragenen „Standardproteinen“ abgeschätzt. Die Wanderstrecke ist dem Logarithmus des Molekulargewichts direkt proportional. Zur Identifizierung der Proteinbanden wird das Gel mit einem Farbstoff sichtbar gemacht (Shapiro et al., 1967).

2.8.2.1 Reagenzien für die Herstellung der Gelbestandteile

Das Herstellungsverfahren des Gels wurde für diese Arbeit aufgrund der praktischen Erfahrungen im Institut für Mikrobiologie der LMU München übernommen. Es stammte ursprünglich von Laemmli (1970) und wurde von Fiedler und Mitarbeitern modifiziert.

Material:

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

SDS-Lösung: 10 % (w/v) SDS

Ammoniumpersulfatlösung (APS): 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat

TEMED: N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamid

Hergestellt wurde ein 8 %-iges Gel.

2.8.2.2 Herstellung des Polyacrylamidgels

Die Durchführung der SDS-Page erfolgte nach Lugtenberg et al. (1975). Für das Gießen der Gele wurde eine Elektrophoreseapparatur der Fa. Biometra verwendet. Zuerst wurden die beiden als Gießformen benutzten Glasplatten mit Aceton entfettet, ein Silicondichtungsgummi eingelegt und mit drei Halteklammern aneinander gepresst. Diese Gießform wurde in einen dafür vorgesehenen Ständer platziert und mit einer Wasserwaage horizontal

ausgerichtet. Die Reagenzien wurden unter Berücksichtigung aller Vorsichtsmaßnahmen (Latexhandschuhe, Schutzbrille, Abzug) eisgekühlt in zwei 50 ml Erlmeyerkolben mit Hilfe von Messpipetten und einem Peleusball pipettiert. Da das zuletzt zugegebene TEMED (Tetramethylethylendiamid) die Polymerisation des Acrylamids in Gang setzte, musste nun rasch gegossen werden. Mit einer Pasteurpipette wurde nach und nach das Trenngel von der Plattenmitte aus bis zu einer Höhe von 7 cm in den Glasplattenspalt gefüllt, und dabei darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstanden. Um eine glatte, eben abschließende Gelfront zu erhalten, wurde sofort mit Wasser überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Wasser abgekippt und mit einem Stück Filterpapier vollends vorsichtig entfernt. Nun wurde ebenso mit dem Sammelgel verfahren. In das oben aufgeschichtete Sammelgel wurde ein Probenkamm eingesteckt. Nach seiner Entfernung dienten die entstandenen Taschen als Reservoir für die Proben.

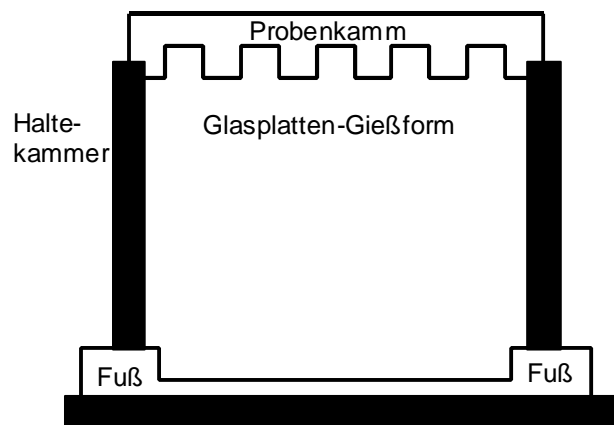


Abbildung 5: Schematische Zeichnung einer Elektrophorese-Apparatur der Fa. Biometra, Frontansicht

2.8.2.3 Vorbereitung der Elektrodenkammer

Nach Entfernung des Dichtungsgummis wurde die Platte mit den Halteklammern an die Kammer fixiert, die Kammer bis oben hin mit Elektrodenpuffer aufgefüllt und an den Hochspannungstransformator angeschlossen. Nach einer Vorlaufzeit von 15 Minuten bei 25 mA konnten wir mit der Auftrennung beginnen.

2.8.2.4 Aufbereitung der Proben

Die zu analysierenden Proben, das heißt Proben 1,2 und 3 aus den vorhergehenden Schritten, wurden in einem Eppendorf-Cup in 15 µl Probenpuffer aufgenommen, gut verschlossen und 5 min bei 100 °C gekocht.

2.8.2.5 Auftrennung der Proben und des Standards

Mit einer 200 µl-Spritze wurden die Taschen des Gels bei ausgeschaltetem Trafo vorsichtig mit den verschiedenen Proben und dem Standardgemisch gefüllt. Als Standard diente uns der Rainbow-Marker 1:10 verdünnt, dessen Bande sich tatsächlich farblich auf dem Gel später darstellten. Bei einer Stromstärke von 12,5 mA beließ man das System solange, bis die Probenfront in das Sammelgel übergetreten war. Dann folgte die eigentliche Auftrennung bei 25 mA. Dieser Vorgang war nach etwa 45 min beendet, als die Laufmittelfront fast das Ende des Gels erreicht hatte.

2.8.3 Färbung von Gelen

2.8.3.1 Färbung mit Silbernitrat (Dzandu et al., 1984)

Die Silbernitrat-Färbung wurde aufgrund ihrer hohen Sensitivität verwendet, um schwer zu erkennende Proteinbanden zu identifizieren.

Das Gel wurde, nach anfänglichem Waschen mit 10 % Ethanol in H₂O bidest., 30 Minuten mit der Färbelösung inkubiert und anschließend 5 bis 10 min in die Entwicklerlösung getaucht, bis sich der Hintergrund des Gels grau verfärbte. Die Entwicklungsreaktion wurde im Stoppbad abgebrochen, und das Gel wieder in Folie eingeschweißt.

Das Prinzip der Silberfärbung ist das gleiche, das man bei der Entwicklung eines Schwarz-Weiß-Fotos anwendet.

Reagenzien:

Waschlösung:	10 % Ethanol in Aqua dest.
Färbelösung:	0,1 % Silbernitrat in Aqua dest. (frisch), bereitgestellt in einem lichtundurchlässigem Gefäß
Entwicklerlösung:	3 % Na ₂ CO ₃ , 0,02 % Formaldehyd aus einer 37 % Stammlösung in Aqua dest. (frisch)
Stoppbad:	1 % Eisessig in Aqua dest.

2.8.3.2 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250 (Weber und Osborn,1969)

Die Polyacrylamidgele wurden 30 min bei Raumtemperatur in 50 ml folgender Färbelösung leicht geschüttelt:

Färbereagenz: 0,63 g Coomassie R 250

113 ml MeOH

113 ml Aqua bidest.

46 ml Eisessig

Das Gel war nun einheitlich tiefblau gefärbt. Um die einzelnen Banden der Proteine nun sichtbar zu machen, musste das Gel langsam entfärbt werden. Dazu wurde es mit Entfärbereagenz übergossen und über Nacht auf einem Schüttler bewegt. Die Entfärbelösung bestand aus Eisessig, Methanol und Wasser im Verhältnis 1:3:6 (v/v).

Für die Auswertung wurde das Gel schließlich mit Hilfe eines Folienschweißers und frei von Luftblasen mit etwas Wasser in eine Kunststoffhülle eingebracht.

2.9 Immunologische Methoden - Glycan Detection Kit

Die Vermutung, dass es sich bei dem untersuchten Material nicht um reine Proteine handeln würde, sondern um Glykoproteine, veranlasste uns, diese Zucker in Glykokonjugaten mittels eines Immunoassays zu detektieren.

Diese Methode dient also zum Nachweis von Glykoproteinen auf Nitrocellulose nach erfolgter SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Dazu mussten die Glykoproteine noch vor der Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel in Lösung oxidiert und mit Digoxigenin markiert werden. Die so derivatisierten Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Nachweis des eingebauten Digoxigenins erfolgte dann auf der Nitrocellulose in einem Enzym-Immunoassay.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf folgenden Schritten: Benachbarte Hydroxyl-Gruppen von Glykokonjugaten werden durch schonende Perjodat-Behandlung zu Aldehydgruppen oxidiert. Das an einen Spacer (Platzhalter) gebundene Steroidhaptan Digoxigenin (DIG) wird über eine Hydrazid-Gruppe kovalent mit der Aldehyd-Gruppe verbunden. Digoxigenin markierte Glykokonjugate werden dann in einem Enzym-Immunoassay mit Hilfe eines Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugats (<DIG> AP) nachgewiesen (siehe Abbildung 6).

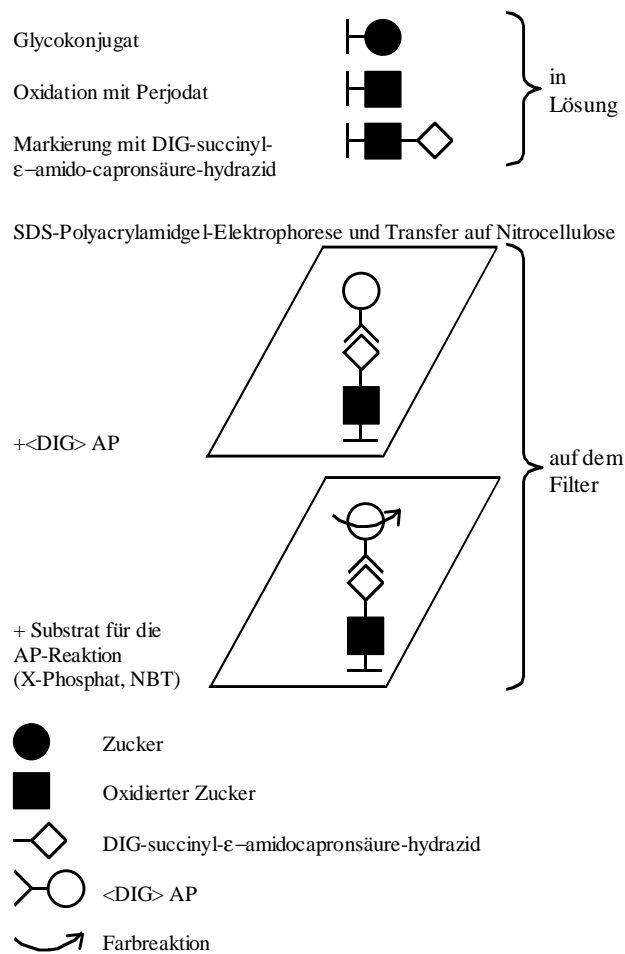


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Glycan Detection Kit, Prinzip zum Nachweis von Zuckern in Glykokonjugaten mittels eines Immunoassays; Schritt 1: Perjodat-Behandlung (Oxidation der Hydroxyl-Gruppen zu Aldehydgruppen), Schritt 2: Bindung des Digoxigenin an die Aldehydgruppe, Schritt 3: Enzymimmunoassay zum Nachweis der mit Digoxigenin markierten Glykokonjugate

Vorgehen:

1. Erneut mussten all die Schritte, wie unter Kapitel 2.8. beschrieben, wiederholt werden. Das heißt, es mussten wiederum ein 8 %-iges SDS-Gel angefertigt, die Proben 1, 2 und 3 aufgetragen werden und anschließend ein Lauf über das SDS-Gel durchgeführt werden. Proben 1, 2 und 3 wurden aus der Auftrennung mit Superdex 200 HR 10/30 übernommen.
2. Als nächster Schritt erfolgte der Western-Blot auf dem Nitrocellulosefilter.
3. Und zuletzt wurde der Glycan Detection Kit eingesetzt. Sämtliche Reagenzien dafür stammten von Boehringer Mannheim Biochemica .

Material: 8 %-iges SDS-Gel
Peak 1 nach Superdex 200 HR 10/30, davon 5,0 µg Protein = 23,0 µl
Peak 2 nach Superdex 200 HR 10/30, davon 2,5 µg Protein = 42,0 µl
Peak 3 nach Superdex 200 HR 10/30, davon 5,0 µg Protein = 34,0 µl
Blotpuffer: 25 mM Tris 15,14 g
192 mM Glycin 72 g
20 % Methanol 1,0 l
0,1 % SDS 5 g ad 5 l pH = 8,5-9,0
Glycan Detection Kit

Falls die Vermutung, dass es sich bei dem zu untersuchenden Material tatsächlich um Glykoproteine handelte, sich bestätigen würde, würden sich bei der Färbereaktion als letzten Schritt des Glycan Detection Kit Banden auf der Nitrocellulose anfärben und darstellen lassen.

2.10 Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose

Das immunologische Verfahren des letzten Schrittes ermöglichte uns, Glykoproteine sichtbar zu machen. Die Affinitätschromatographie wurde anschließend durchgeführt, um diese Glykoproteine voneinander zu trennen.

Das Verfahren beruht darauf, dass Lectine zuckerbindende Proteine sind, die je nach Herkunft unterschiedliche Zucker erkennen. Mit Lectinen, die kovalent mit Gelmaterialien, wie zum Beispiel Sepharose, verknüpft sind, lassen sich Glykoproteine spezifisch aus einem Gemisch von anderen Substanzen entfernen. Durch den Zusatz der entsprechenden monomeren Zucker werden die Glykoproteine wieder von ihrer Bindungsstelle an den Lectinen verdrängt und damit von der Säule entfernt.

Material:

- Elutionspuffer:
- a) 50 mM NH₄-Acetatpuffer
 - b) 20 mM α -Methyl-D-Glucosid-Puffer
 - c) 150 mM α -Methyl-D-Glucosid-Puffer
 - d) 300 mM α -Methyl-D-Glucosid-Puffer

Aufgetragenes Material: 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30-Auftrennung,
davon 0,6 mg = 1750 μ l in Aqua bidest. Gelöst

Vorgehen:

Auf die mit Concanavalin A-Sepharose bepackte Säule wurde der 1. Peak, der aus der Auftrennung mit der Superdex 200 HR 10/30-Säule gewonnen wurde, aufgetragen. Anschließend wurden nacheinander die verschiedenen Elutionspuffer über die Säule geschickt, die in ihrer Reihenfolge die Glykoproteine wieder von ihren Bindungsstellen an den Lektinen verdrängten und damit aus der Säule eluierten. Die Reihenfolge der Elutionspuffer wurde, - wie unter Material angegeben, eingehalten. Zuerst der Ammonium- Acetat-Puffer, der bereits die nicht an das Lectin gebundenen Proteine auswaschen würde. Darauffolgend die α -Methyl-D-Glucosid-Puffer, angefangen mit 20 mM, dann 150 mM und zuletzt 300 mM. Die einzeln eluierten Fraktionen, die durch die Wahl des Puffers definiert wurden, wurden in Eppendorf-Cups aufgefangen und in der Hochgeschwindigkeitszentrifuge SpeedVac getrocknet.

2.11 Erneute SDS-Elektrophorese

Die einzeln aus der Affinitätschromatographie aufgefangenen Fraktionen wurden wiederum auf ein 8 %-iges SDS-Gel aufgetragen.

Material: Fraktion 1: 10 μ l des mit 50 mM NH₄-Acetat-Puffer-eluierten Materials

Fraktion 2: 10 μ l des mit 20 mM α -Methyl-D-Glucosid-Puffer-eluierten Materials

Fraktion 3: 30 μ l des mit 150 mM α -Methyl-D-Glucosid-Puffer-eluierten Materials

Fraktion 4: 50 μ l des mit 300 mM α -Methyl-D-Glucosid-Puffer-eluierten Materials

Vergleichsprobe: Standard = Rainbow-Marker 1:10

Zum Sichtbarmachen der zu erwartenden Banden wurde hierfür die Silbernitrat Färbung, wie unter Kapitel 2.8.3.1 beschrieben, angewandt.

2.12 Attraktivitätstest nach Affinitätschromatographie an Con A

Interessant war nun, wie die Miracidien im Attraktivitätstest auf die einzelnen Fraktionen nach der Affinitätschromatographie and Concanavalin A-Sepharose reagieren würden.

Material: Fraktion 1: 20 µl des mit 50 mM Ammonium Acetat-Puffer-eluierten Materials

Fraktion 2: 20 µl des mit 20 mM α -Methyl-D-Glucosid-Puffer-eluierten Materials

Fraktion 3: 60 µl des mit 150 mM α -Methyl-D-Glucosid-Puffer-eluierten Materials

Fraktion 4: 100 µl des mit 300 mM α -Methyl-D-Glucosid-Puffer-eluierten Materials

Weitere Materialien: NH_4 -Acetat allein

CH_3 -Glucosid allein

Aceton allein

2.13 Direktes Einsetzen der SDS-Page in den Attraktivitätstest

Durch die verschiedenen Methoden der Aufbereitung, - Ammonium Sulfat-Fällung und den gelchromatographischen Auftrennungen an der HPLC mit TSK G 3000 SW und mit Superdex 200 HR 10/30, konnte bisher der größte Teil des nicht attraktiven und damit verunreinigenden Materials abgesondert werden. Dadurch wurde es erst möglich, eine derart gute Auftrennung auch gelelektrophoretisch mit der SDS-Gelelektrophorese zu erreichen.

Somit bot sich an dieser Stelle ein letzter Versuch an, nämlich, das soweit aufbereitete Material einschließlich der Superdex 200 HR 10/39-Auftrennung auf ein SDS-Gel aufzutragen, einen Lauf durchzuführen und das Material des Gels anschließend direkt in einen Attraktivitätstest einzusetzen.

Verfahren:

Die 1. Peakfraktion nach der Superdex 200 HR 10/30-Auftrennung wurde in Aqua bidest. resuspendiert, in Aceton über Nacht gefällt und dann in verschiedenen Verdünnungen auf das SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel für 2,5 h bei 50 °C in Isopropanol auf einem Schüttler gewaschen, um für den Attraktivitätstest eventuell störende Faktoren, wie zum Beispiel SDS oder TRIS-Puffer, aus dem Gel zu entfernen. Das Gel wurde dann sogar nochmals viermal für 10 min mit Aqua bidest. gespült.

Um das Gel nun überhaupt in den Attraktivitätstest einsetzen zu können, mussten die einzelnen Banden mit einer scharfen Klinge voneinander getrennt werden. Eine Spur, die zusätzlich auf das gesamte Gel aufgetragen wurde, musste mit Silbernitrat angefärbt werden. Somit konnte abgeschätzt werden, wo genau die verschiedenen Banden aneinandergrenzen würden, die auf den in den Test eingesetzten Gelteilchen nicht sichtbar waren. Es entstanden Gelteilchen, die direkt für den Test mit Miracidien verwendet werden konnten.

- Material:
- a) 50 µl der 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30 = 10 µg Protein
 - b) 25 µl der 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30 = 5 µg Protein
 - c) 12,5 µl der 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30 = 2,5 µg Protein
 - d) weitere Testmaterialien: SDS-Gel vor Isopropanolwaschung
 - SDS-Gel nach Isopropanolwaschung
 - Gel ohne SDS
 - Gel ohne SDS und ohne TRIS-Puffer

Dort, wo attraktives Material in den Gelteilchen enthalten sein würde, würden die Miracidien versuchen, sich in das Gel hineinzubohren.

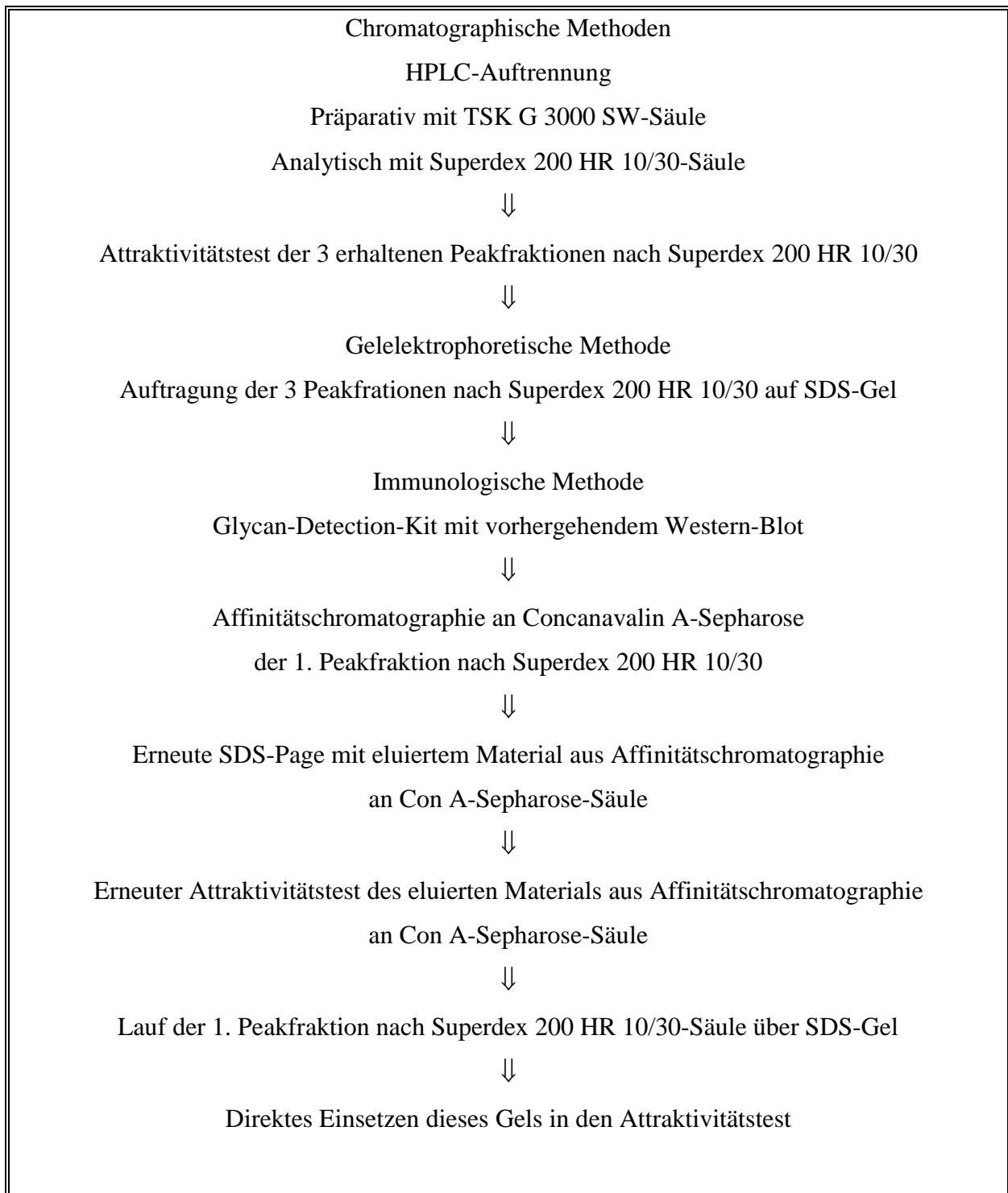


Abbildung 7: Laufschemata B einschließlich chromatographischer, gelelektrophoretischer, immunologischer und affinitätschromatographischer Methoden

3 Ergebnisse

3.1 SCW nach Filtration und Zentrifugation

Das frisch gewonnene SCW, wie unter Kapitel 2.4 beschrieben, wurde zunächst filtriert und anschließend zentrifugiert. Somit erhielt man bereits die erste Trennung, eine Trennung des wasserunlöslichen Anteils des SCW vom wasserlöslichen Material, was als Pellet bezeichnet wurde.

Nach jedem Präparationsschritt wurde sofort im Anschluss ein Attraktivitätstest (siehe Kapitel 2.3) mit den lebenden Miracidien durchgeführt. Dies war letztlich immer die einzige Kontrolle über die Richtigkeit des weiteren Vorgehens, welche Anteile des aufgereinigten SCW verworfen werden konnten.

Dies eindeutige Ergebnis des Tests veranlasste uns, den großen Teil des Ausgangsmaterials, der nicht in Wasser gelöst werden konnte, zu verwerfen.

Tabelle 1: Attraktivitätstest nach Resuspension des SCW in Wasser und 3x-iger Zentrifugation

	Wasserlösliches Material = Überstand	Wasserunlösliches Material = Pellet
1. Durchgang	+++	-
2. Durchgang	+++	-

3.2 Ammonium-Sulfat-Fällung – Separation durch Präzipitation

In früheren Arbeiten wurde das Material, soweit es bisher aufgereinigt war, direkt in die Hochleistungschromatographie eingesetzt. In dieser Arbeitsgruppe wurde ein neuer Schritt in der Reihenfolge der Präparation eingeführt. Man erwartete eine zusätzliche Reinigung des SCW, indem Proteine durch die Ausfällung mit Ammonium-Sulfat von verunreinigendem Material befreit würden. Es wurden fünf verschiedene Fraktionen hergestellt, die sich lediglich im Sättigungsgrad durch das Salz unterscheiden: 30 %, 45 %, 60 %, 75 % und vollständig gesättigt.

Wiederum musste im Anschluss daran das so aufbereitete Material direkt in den Attraktivitätstest mit den Miracidien eingesetzt werden, um den Bereich der größten Attraktivität abgrenzen zu können.

Tabelle 2: Attraktivitätstest des SCW nach Ammonium Sulfat-Fällung: Bestimmung des mit Ammonium-Sulfat gefällten Materials, in dem die größte Attraktivität auf Miracidien steckt

Fraktionen: Sättigungs- grad	30 %	45 %	60 %	75 %	Vollständig gesättigt	Nicht fällbarer Überstand
1. Durchgang	-	+	++	+++	++	-
2. Durchgang	+	++	+++	+++	+	-

Die größte Attraktivität zeigte sich in den Fraktionen, die auf 60 % und auf 75 % gefällt wurden, was bedeutete, dass das attraktive Material im Bereich zweier Fraktionen zu finden sein muss, die eine auf 50 %, die andere auf 75 % gefällt.

Bisher wurde mit sehr wenig Material gearbeitet, gerade ausreichend für diese Testfällung. Um aber präparativ weiter fortfahren zu können, mussten 2,5 g des Ausgangs-SCW in all diese Schritte eingesetzt werden und letztlich auf 50 % und auf 75 % gefällt werden.

Um einen Anhaltspunkt zu haben, mit welcher Menge an aufbereitetem Material man weiterarbeiten konnte und wieviel überhaupt für die nächsten Präparationsschritte zur Verfügung stand, wurde das Gewicht der Fraktionen nach Ammonium-Sulfat-Fällung bestimmt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Bilanzierung des Gewichts nach Ammonium-Sulfat-Fällung

	Sediment der auf 50 % gefällten Probe	Sediment der auf 75 % gefällten Probe	Überstand der auf 75 % gefällten Probe
Gewicht	39 mg	65 mg	227 mg

Zusammenfassend wurde bisher das attraktive Material im Sediment der auf 75 % gefällten Probe angereichert und dadurch ein beachtlicher Teil der verunreinigenden Substanzen abgesondert. Die 30 mg des Sediments der auf 50 % gefällten Probe und die 227 mg des

Überstands der auf 75 % gefällten Probe wurden zunächst außer Acht gelassen , und mit den 65 mg des Sediments der auf 75 % gefällten Probe wurde weitergearbeitet.

3.3 Chromatographische Verfahren an der HPLC (High Performance Liquid Chromatographie)

Die 65 mg waren folglich das Ausgangsmaterial, das für die gelchromatographischen Auftrennungsschritte erstmals eingesetzt wurde.

3.3.1 Präparative Auftrennung an der TSK G 3000 SW-Säule

Die TSK 3000-Säule trennt nach Molekülgröße, wobei die Elution von gelösten Substanzen nach abnehmendem Molekulargewicht erfolgt (Unger, 1995).

Pro Lauf wurden 0,75 mg Material über die Säule geschickt.

In den vorangegangenen Arbeiten wurden bisher immer zwei deutlich abgrenzbare Peakfraktionen beschrieben, die sich im Chromatogramm nach der Elution aus der Säule abzeichneten. In dieser Arbeit konnten mit der TSK G 3000 SW-Säule fünf verschiedene Peakfraktionen eluiert werden, die mit 1, 2, 2b, 3 und 4 (siehe Abbildung 8) benannt wurden.

Die Peakfraktionen wurden getrennt voneinander in Rundkolben gesammelt und zunächst gefriergetrocknet. Bei der folgenden Attraktivitätstestung stellte sich heraus, dass in der 1. Peakfraktion die größte Attraktivität (siehe Tabelle 4) steckte.

Die Ergebnisse von Beer und Zorger konnten reproduziert werden, und wieder konnte ein beachtlicher Teil unattraktiven Materials abgetrennt werden (Diss. Techn. Uni. München, 1997).

Tabelle 4: Attraktivitätstest des Materials nach HPLC-Auftrennung mit TSK G 3000 SW. Eingesetzt wurde das mit Ammonium-Sulfat gefällte SCW. Durch die präparative Auftrennung an der TSK 3000-Säule konnten fünf voneinander getrennte Fraktionen gesammelt werden, die mit Peakfraktion 1, 2, 2b, 3 und 4 benannt wurden.

Peakfraktion	1	2	2b	3	4
1.Durchgang	+	(+)	(+)	-	(+)
2.Durchgang	+++	++	+	+	+

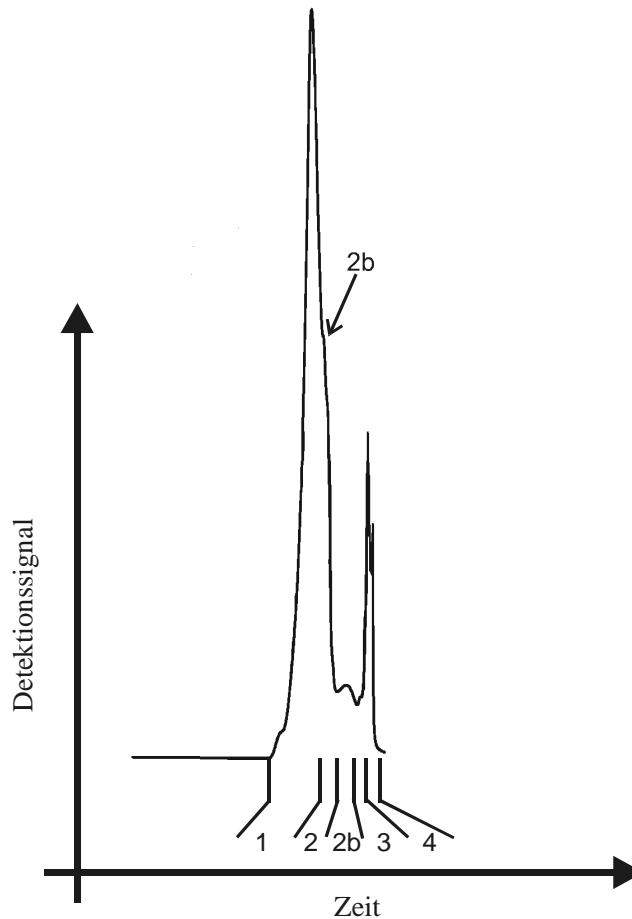


Abbildung 8: Auftrennung des Sediments der auf 75 % gefällten Probe mit TSK G 3000 SW. In die präparative Auftrennung durch die TSK G 3000 SW-Säule wurde das mit Ammonium-Sulfat gefällte SCW eingesetzt. Dadurch konnten fünf voneinander getrennte Peakfraktionen gesammelt werden, die mit 1, 2, 2b, 3 und 4 benannt wurden.

Um über die präparative Auftrennungsfähigkeit der TSK-Säule hinaus eine analytische Auftrennung an der HPLC zu erreichen, strebten wir die Gelfiltration mit der Superdex 200 HR 10/30-Säule an.

3.3.2 Analytische Auftrennung an der Superdex 200 HR 10/30-Säule

Die 1. Peakfraktion nach der Auftrennung mit der TSK G 3000 SW-Säule diente als Auftragungsmaterial für die Läufe über die Superdex 200 HR 10/30, wobei pro Lauf exakt 150 µg Material aufgetragen wurden.

Wiederum konnten bei dieser gelchromatographischen Auftrennung drei verschiedene Peakfraktionen eluiert und in Rundkolben aufgefangen werden (siehe Abbildung 9), die mit 1, 2, und 3 benannt wurden.

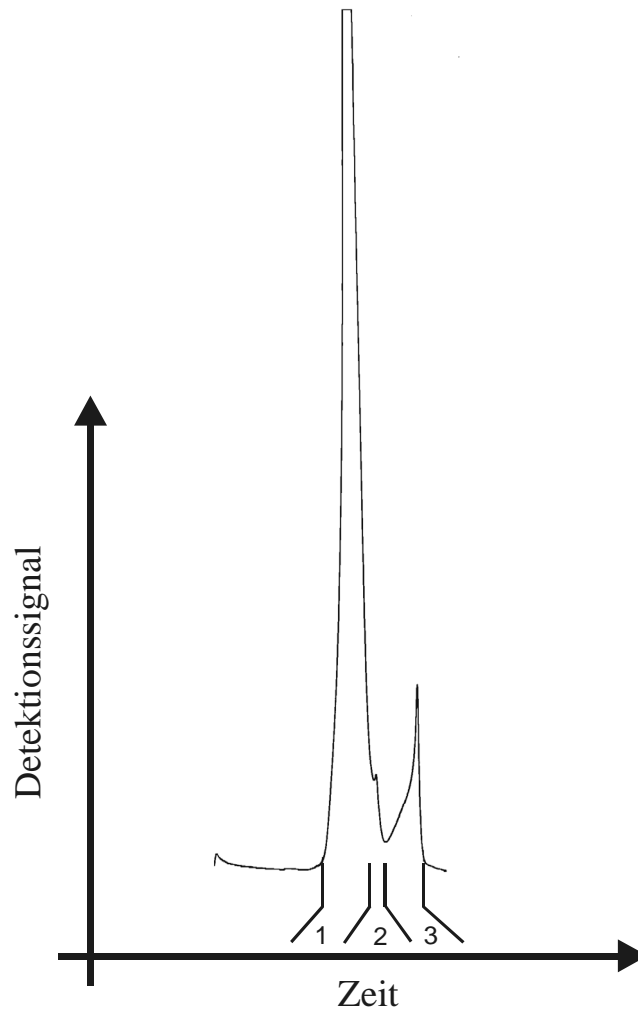


Abbildung 9: Auftrennung der 1. Peakfraktion nach TSK G 3000 SW mit Superdex 200 HR 10/30. In die analytische Auftrennung durch die Superdex 200 HR 10/30-Säule wurde das mit Peakfraktion 1 benannte Material nach der TSK G 3000 SW-Auftrennung eingesetzt. Dadurch wiederum konnten drei voneinander getrennte Peakfraktionen gesammelt werden, die mit 1, 2 und 3 benannt wurden.

Der Attraktivitätstest dieser drei Peakfraktionen zeigte eindeutig, dass in der 1. Peakfraktion die größte Attraktivität steckte, Peakfraktionen 2 und 3 allerdings kaum oder gar keinen anziehenden und lockwirksamen Effekt auf die Miracidien hatten (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Attraktivitätstest der 3 Peakfraktionen nach Superdex 200 HR 10/30

Peakfraktion	1	2	3
1. Durchgang	++	(+)	-
2. Durchgang	+++	(+)	(+)

3.4 Gelelektrophoretische Verfahren

Die chromatographische Auftrennung erlaubte noch nicht, konkrete Aussagen über die Molekülgröße oder den Charakter der Moleküle zu machen.

Vielmehr machten wir uns die gelelektrophoretische Auftrennung mit dem SDS-polyacrylamid-Gel zunutze, um Proteine an sich und Molekülmasse zu charakterisieren.

Primär stellten wir ein 8 %-iges SDS-Gel her, in dessen Probentaschen, so wie es unter Kapitel 2.8.2 beschrieben wurde, genau 2,5 µg Protein von jedem der drei Peaks nach der Superdex 200 HR 10/30-Auftrennung aufgetragen wurden.

Nach Laufende färbten wir das Gel einmal mit Silbernitrat (Dzandu et al., 1984) an (siehe Abbildung 10).

In allen drei Proben, die aufgetragen wurden, sind im oberen Teil, kurz nach Eintritt in das Trenngel, zwei scharfe Banden zu erkennen, weiter mehrere dicke Banden etwa auf der Hälfte der Trenngelstrecke und eine schwach sichtbare Bande im unteren Drittel. Somit konnte keine genaue Aussage über die Molekülmassen getroffen werden, da - verglichen mit dem Standard - sich die angefärbten Banden über das gesamte Trenngel verteilten. Man konnte lediglich behaupten, dass sich das attraktive Material eher im Bereich höherer Molekülmassen befand.

Hervorzuheben allerdings war, dass es erstmals gelungen war, das SCW auch gelelektrophoretisch gut aufzutrennen und darzustellen.

In einem zweiten gelelektrophoretischen Lauf trugen wir 2,5 µg der 1. Peakfraktion auf das 8 %-ige SDS-Gel auf und färbten es anschließend mit Coomassie (Weber und Osborn, 1969) an (siehe Abbildung 11).

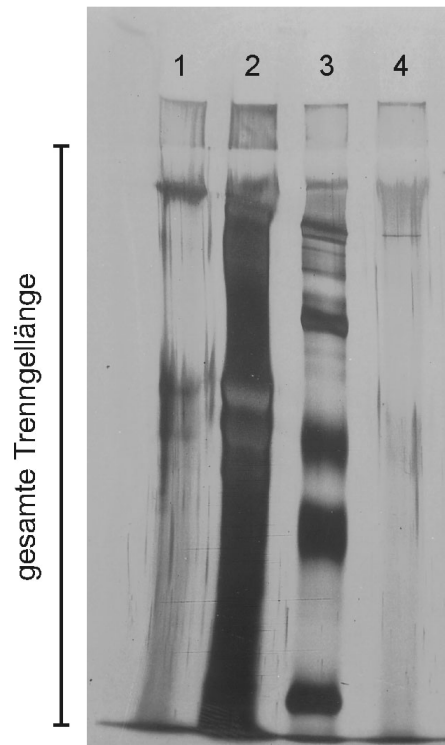


Abbildung 10: 8 %-iges SDS-Gel der 3 Peakfraktionen nach Superdex 200 HR 10/30, Silbernitratfärbung; Spur 1: 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30, Spur 2: 2. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30, Spur 3: Standard = Rainbow-Marker 1:10, Spur 4: 3. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30

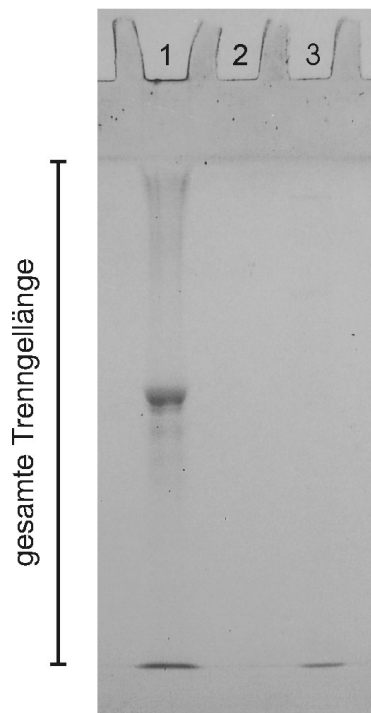


Abbildung 11: 8 %-iges SDS-Gel der 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30, Coomassie-Färbung; Spur 1: 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30, Spur 2: nichts, Spur 3: Standard = Rainbow-Marker 1:10

Bande, die mit der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht wurden, deckten sich weitgehend mit denen der Silbernitratfärbung. Nur die eine Bande im unteren Drittel des Trenngels konnte mit der Coomassie-Färbung besser dargestellt werden.

Unsere Vermutung, dass es sich bei den Banden, die sich auf den SDS-Gelen abzeichneten, nicht um reine Proteine, sondern vielmehr um Glykoproteine handelte, veranlasste uns, im nächsten Schritt auf immunologische Methoden zurückzugreifen.

3.5 Immunologische Methoden - Glycan Detection Kit

Zucker in Glykokonjugaten können mittels eines Immunoassays detektiert werden (siehe Kapitel 2.9). Man setzte in den Glycan Detection Kit (Boehringer Mannheim Biochemica) wiederum die drei Peakfraktionen nach der Superdex 200 HR 10/30-Auftrennung ein. Die darin enthaltenen Glykoproteine mussten vorerst mit Digoxigenin markiert werden, dann mit Hilfe eines SDS-Gels aufgetrennt werden und anschließend auf eine Nitrocellulose übertragen werden. Als letzter Schritt des Glycan Detection Kit wurde eine Färbereaktion durchgeführt (siehe Abbildung 12).

Tatsächlich kamen vier Bande in jeder der Spuren auf der Nitrocellulose zum Vorschein. Diese Tatsache lieferte den Beweis dafür, dass das attraktive Material tatsächlich aus Glykoproteinen bestand, die sich gelelektrophoretisch mit Hilfe eines Immunoassays darstellen ließen (siehe Abbildung 12).

Um diese vier Glykoproteine nun nicht nur gelelektrophoretisch sichtbar werden zu lassen, sondern sie womöglich voneinander trennen zu können, wurde im nächsten Schritt eine Lektin-Säule eingebaut.

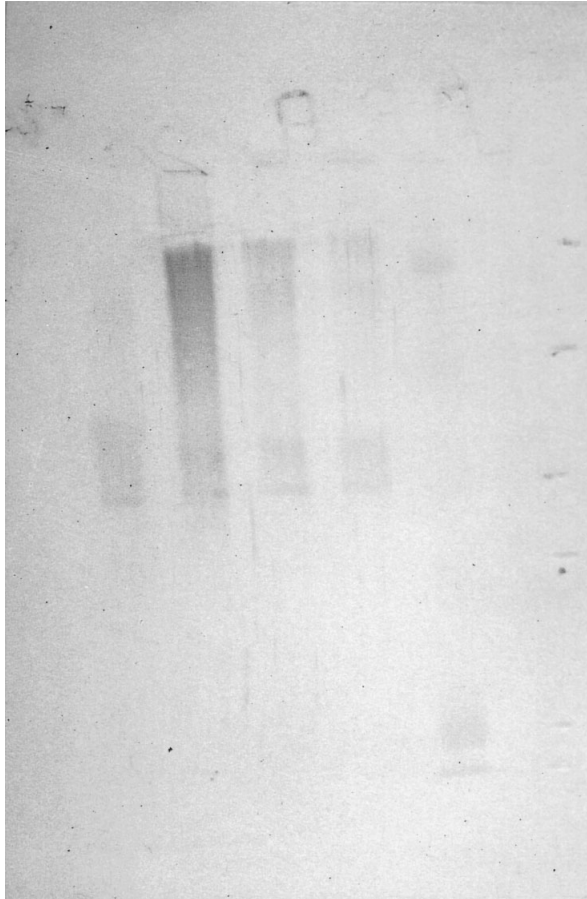


Abbildung 12: Nitrocellulose des Glycan Detection Kit der drei Peakfraktionen nach Superdex 200 HR 10/30. Durch die analytische Auftrennung an der Superdex 200 HR 10/30-Säule konnten drei Peakfraktionen gesammelt werden, in denen Glykokonjugate als Hauptbestandteil des attraktiven Materials vermutet wurden. Zum Nachweis dieser Glykokonjugate wurde der Glycan Detection Kit eingesetzt. Auf der Nitrocellulose kamen vier getrennt voneinander sichtbare Bande zum Vorschein.

3.6 Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose

Das Prinzip, dass mit Lektinen, die kovalent mit Gelmaterialien verknüpft sind, sich Glykoproteine spezifisch aus einem Gemisch von anderen Substanzen entfernen lassen, machten wir uns in diesem Präparationsschritt zunutze.

Auf die mit Concanavalin A-Sepharose gepackte Säule wurde die 1. Peakfraktion nach der Auftrennung an der Superdex 200 HR 10/30-Säule aufgetragen. Der Ammonium-Acetat-Puffer sollte die nicht an das Lektin gebundenen Proteine auswaschen. Darauf folgend wurden die α -Methyl-D-Glucosid-Puffer, angefangen mit 20 mM, dann 150 mM und zuletzt 300 mM

über die Säule geschickt und die so einzeln eluierten Fraktionen in Eppendorf-Cups aufgefangen.

Um diese Fraktionen nun für den Betrachter sichtbar zu machen, wurden sie auf ein 8 %-iges SDS-Gel aufgetragen, und dieses mit Silbernitrat angefärbt (siehe Abbildung 13).

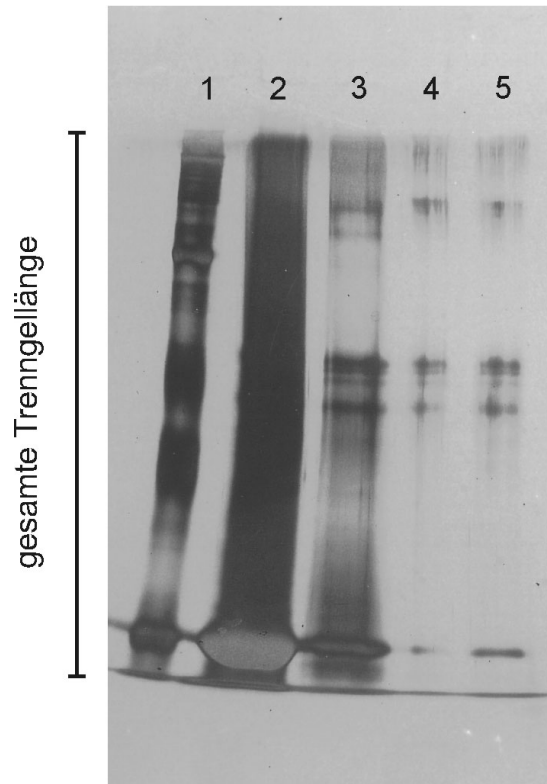


Abbildung 13: 8 %-iges SDS-Gel der Fraktionen nach Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sephrose, Silbernitratfärbung; Spur 1: Standard = Rainbow-Marker 1:10, Spur 2: Fraktion 1 mit Ammonium Acetat-Puffer eluiert, Spur 3: Fraktion 2 mit 20 mM CH₃-Glc-Puffer eluiert, Spur 4: Fraktion 3 mit 150 mM CH₃-Glc-Puffer eluiert, Spur 5: Fraktion 4 mit 300 mM CH₃-Glc-Puffer eluiert

Anhand des Gels (siehe Abbildung 13) konnte die Aussage getroffen werden, dass das zu untersuchende Material, also die 1. Peakfraktion nach der Superdex 200 HR 10/30 Auftrennung, nicht an die mit Concanavalin A- Sepharose bepackte Säule bindet. Schon der Ammonium-Acetat-Puffer hat den größten Teil des aufgetragenen Materials von der Säule gewaschen. Man musste folglich annehmen, dass nichts oder nur wenig der attraktiven Glykoproteine an Glucose, Mannose oder Glucosamin bindet.

Interessant war nun, wie sich die einzelnen Fraktionen nach der Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sephrose in einem Attraktivitätstest verhalten würden.

Die verschiedenen Fraktionen wurden über Nacht mit Aceton gefällt und dann in den Test mit den Miracidien eingesetzt (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Attraktivitätstest der einzelnen Fraktionen nach Affinitätschromatographie an Con A

	Mit NH ₄ - Acetat-Puffer	Mit 20 mM Glucosid- Puffer	Mit 150 mM Glucosid- Puffer	Mit 300 mM Glucosid- Puffer	NH ₄ -Acetat allein	CH ₃ - Glucosid allein	Aceton allein
1. Durchgang	+++	+++	+	+	-	-	-
2. Durchgang	+++	+++	(+)	(+)	-	-	-

Es wurde zunächst klar, dass die Puffer allein und das Aceton keine Attraktivität auf Miracidien hatte und somit das Ergebnis des Tests nicht verfälschten und beeinflussten. Größte Attraktivität steckte in Fraktionen 1 und 2, wobei 3 und 4 nur eine sehr geringe lockwirksame Wirkung auf die Wimpernlarven ausüben konnten (siehe Tabelle 6).

Also übereinstimmend mit dem Ergebnis, das man anhand der SDS-Page, auf die die verschiedenen Fraktionen nach dem Lauf über die Concanavalin-Säule aufgetragen wurden, vertreten konnte, wurde bereits der größte Anteil an attraktivem Material bei der Affinitätschromatographie mit dem Ammonium-Acetat-Puffer und dem 20 mM Glucosid-Puffer von der Säule gewaschen. Dies bedeutete, dass auch im Attraktivitätstest zu diesem Zeitpunkt bestätigen konnte, dass die attraktiven Glykoproteine nicht an Glucose, Mannose oder Glucosamin binden.

3.7 Direktes Einsetzen der SDS-Page in den Attraktivitätstest

Sowie unter Kapitel 2.13 beschrieben, wurde das attraktive Material nach der Superdex 200 HR 10/30-Auftrennung erneut auf ein SDS-Gel aufgetragen, und anschließend dieses Gel direkt in einen Attraktivitätstest mit Miracidien eingesetzt (siehe Abbildung 14). Sobald das Gelstückchen auf die Miracidien eine lockwirksame Attraktivität ausübte, versuchten diese sich in das Gel hineinzubohren.

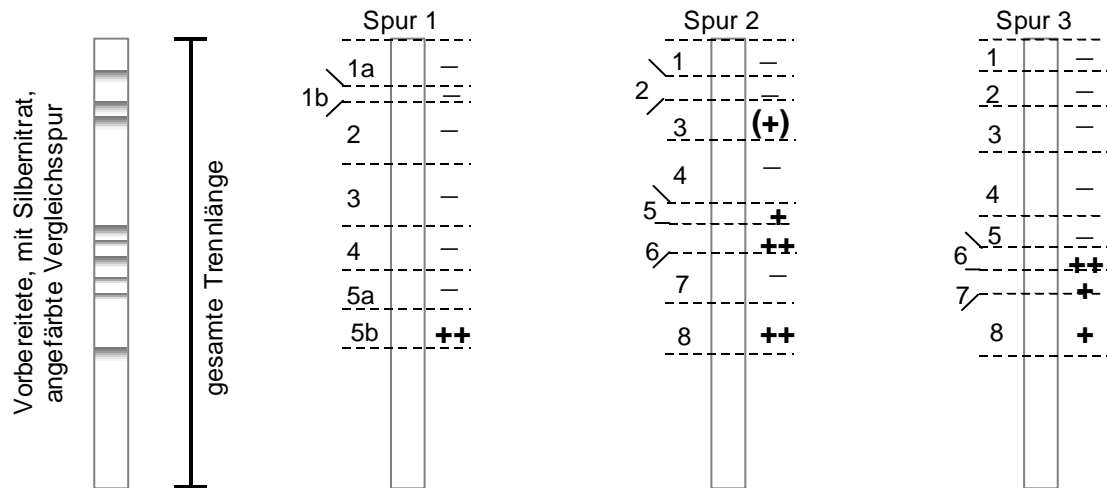


Abbildung 14: Direktes Einsetzen der SDS-Page in den Attraktivitätstest mit Material der 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30-Auftrennung; Spur 1 entspricht 50 μ l der 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30 (10 μ g Protein); Spur 2 entspricht 25 μ l (5 μ g Protein) und Spur 3 entspricht 12,5 μ l (2,5 μ g Protein). An den mit gestrichelten Linien gekennzeichneten Stellen wurde die Gelspur unterteilt, die dadurch entstandenen Gelstückchen wurden direkt in den Attraktivitätstest eingesetzt.

Als Ergebnis war zu bemerken, dass keines der vorbereiteten Gele, auf die lediglich die Vergleichsproben aufgetragen wurden, Attraktivität auf die Miracidien zeigte:

- SDS-Gel vor Isopropanolewaschung: -
- SDS-Gel nach Isopropanolwaschung: -
- Gel ohne SDS: -
- Gel ohne SDS und ohne TRIS-Puffer: -

Betrachtete man die einzelnen Trenngel, auf die attraktives Material aufgetragen wurde, fand man in jeder Verdünnung im unteren Drittel des gesamten Trenngels eine Attraktivität (siehe Abbildung 14).

Zusammenfassend konnte man aus diesem letzten Schritt postulieren, dass sich das „Miraxon“ geleelektrophoretisch wie Moleküle zwischen 30000 und 45000 D verhält.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle eines chemischen Stimulus im Wirtsfindungsprozeß

Eine Wirtsschneckenpopulation stellt für die Larven von Trematoden eine unterschiedlich zusammengesetzte, gemischte Gruppe in ihrer Umwelt dar. Die Individuen einer Schneckenpopulation einer bestimmten Spezies sind morphologisch, physiologisch und genetisch sehr vielfältig. Die Miracidien des Bilharziosekreislaufs sind in der diffizilen Situation, den geeigneten Wirt zu wählen und finden zu müssen, sobald sie mit dieser heterogenen Zwischenwirtsgruppe konfrontiert werden.

Haben Miracidien eine „Präferenz“ für eine individuelle Schnecke gegenüber den anderen?

Welche Rolle spielt ein chemischer Stimulus im Wirtsfindungsprozess?

Angesichts der kurzen Lebensdauer des Miracidiums von nur wenigen Stunden, ist das Verhalten der Larve darauf fixiert, ihren Zwischenwirt zu lokalisieren und zu infizieren. Haas (1988), Schmidt und Roberts (1989) datierten diese Lebensdauer auf 5 bis 6 Stunden, Chernin (1974) immerhin auf 12 Stunden.

Nach Haas (1988) können mindestens vier Phasen der Wirtsfindung unterschieden werden:

- Verteilungsphase („pre-infective dispersal phase“),
- Aufsuchen des Lebensraumes des Zwischenwirts („microhabitat-selection“),
- Orientierung zum Zwischenwirt („host-directed orientation“),
- Anheftung und Eindringverhalten („attachment and penetration“).

Innerhalb ihrer ersten Lebensstunden schwimmen frisch geschlüpfte *S. mansoni*-Miracidien relativ schnell und geradlinig (Mason u. Fripp 1976, Saladin 1979, Sukhdeo u. Mettrick 1987, Haas 1988). Ihr Verhalten scheint dabei geonegativ und photopositiv beeinflusst zu sein, so dass sie nach oben und zum Licht hin gerichtet schwimmen (Wright 1974, Chernin 1974, Haas 1988). Die photopositive Ausrichtung vermögen die Tiere trotz des Fehlens makroskopischer Photorezeptoren, sogenannter Augenflecken („eye spots“), wie sie bei den Miracidien anderer Trematoden (z.B. *Trichobilharzia*) ausgebildet sind, zu leisten. *S. mansoni*-Miracidien besitzen hierfür Photozellen in ihren Zilien, die ihnen diese hochsensible Leistung ermöglichen (Brooker 1972, Sukhdeo u. Mettrick 1987). Chemische Reize spielen in der Verteilungsphase eine untergeordnete Rolle (Saladin 1979, Haas 1995).

In der zweiten Phase, also etwa nach einer Stunde verringern die Miracidien ihre Schwimgeschwindigkeit, während die Rate ihrer Richtungswechsel zunimmt (Mason u. Fripp 1976, Saladin 1979, Haas 1988). Die Larven suchen die ökologischen Nischen ab, in denen sich gewöhnlich ihr natürlicher Zwischenwirt aufhält. Die infektiöse Potenz und Chemosensitivität der Miracidien nimmt dabei zu (Saladin 1979).

Sobald die Larve in die Nähe ihres Wirts gelangt, also den „active space“ (Wilson 1970) erreicht, reagiert sie auf chemische Signalstoffe der Schnecke, die bei den Miracidien eine Verhaltensänderung, „behavioural response“, auslösen (Chernin 1970, Saladin 1979, Samuelson et al. 1984). Messbar sind diese Bewegungsänderungen an einer Zunahme der Rate an Richtungswechseln („rate of change of direction“), sowie eine Zunahme der Schwimgeschwindigkeit (Chernin 1970, Mason u. Fripp 1976, Haas 1988). Wenn das Miracidium den Einflussbereich des chemischen „Lockstoffes“ verlässt, reagiert es mit einer abrupten 180-Wende („180 turnback“) und schwimmt mit einer hohen Rate an Richtungswechseln weiter (MacInnis 1965, Chernin 1970).

In der letzten Phase kommt es schließlich zum Anheften und Eindringen in die Schnecke („attachment, remaining on the host and penetration“). Der Vorgang des Anheftens und der Penetration der Parasitenlarve sind noch weitgehend ungeklärt (Haas 1988, 1992). MacInnis studierte 1965 die Lockwirkung chemischer Signalstoffe an *S. mansoni*-Miracidien, indem er Agarpyramiden mit diesen Stoffen imprägnierte. Einige Wimperlarven versuchten, in die Agarblöcke einzudringen, wobei verschiedene typische Verhaltensmuster beobachtet werden konnten. MacInnis beschrieb diese als Drehung („turning“) nach Berühren der Oberfläche, Kontakte mit Umkehr („contacts with return“), wiederholte Anheftungsversuche („repeated investigation“), Anheftung („attachment“) und letztlich Eindringen in den Zwischenwirt („penetration“).

Während die ersten beiden Phasen, die Verteilungsphase und die Phase, in der die Larven den Lebensraum des Zwischenwirts aufsuchen, instinktiv ablaufen bzw. von Umweltfaktoren (z.B. Licht und Wärme) gesteuert werden, werden die letzten beiden Phasen in großem Maße von chemischen Stimuli ausgelöst (Haberl et al. 1995).

Auf die Frage, ob für die beschriebenen Verhaltensantworten der Miracidien verschiedene oder ein- und derselbe chemische Stimulus verantwortlich sind, finden sich widersprüchliche Antworten und Angaben in der Literatur.

In neuer und aktueller Literatur wird noch ein weiterer Aspekt diskutiert, der auf der Annahme basiert, dass innerhalb des *S. mansoni*- und *Biomphalaria glabrata* - Systems die Größe des Zwischenwirts eine große Rolle spielt (Theron, Rognon u. Pages, 1998). Können

Miracidien zwischen Schnecken von verschiedener Größe und unterschiedlichem Alter unterscheiden? Theron und seine Mitarbeiter beobachteten in einem Wirtsfindungsexperiment Miracidien, die sie einer heterogenen Gruppe von *Biomphalaria glabrata*-Schnecken aussetzten. Die Schnecken unterschieden sich speziell in diesen beiden Merkmalen der Größe und des Alters. Das Ergebnis konnte bekräftigen, dass signifikant mehr Miracidien von mittelalten und mittelgroßen („subadult“) Schnecken angelockt wurden. Sehr junge, unreife („juvenile“) und auch alte, große („adult“) Schnecken zeigten nur geringe Attraktivität auf die Miracidien. Diese Tatsache könnte folglich die Annahme zurückweisen, dass mittelgroße Schnecken nur deshalb eine hohe Infektionsrate aufzeigen, weil sie zufällig einer überproportionalen Stückzahl von Miracidien ausgesetzt wurden (Anderson u. Crombie, 1984). Mittelgroße, subadulte Schnecken locken tatsächlich mehr Miracidien an.

Das Finden und Erkennen der Zwischenwirtsschnecke ist und bleibt Thema vieler Untersuchungen (Haas et al., 1995), wobei mittlerweile Übereinstimmung und Akzeptanz darin gefunden wurde, dass chemische Lockstoffe eine Verhaltensveränderung bei den Wimperlarven auslösen, sobald diese sich dem Wirt nähern und in ihn eindringen.

4.2 Methodik und Interpretation der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde versucht, aus dem SCW von *Biomphalaria glabrata* ein Makromolekül zu isolieren und näher zu beschreiben, das derartige Verhaltensänderungen bei *S. mansoni*-Miracidien auslöst. Durch Filtration, Zentrifugation, Ammonium-Sulfat-Fällung und Dialyse wurde das Material immer weiter aufgetrennt. In den Attraktivitätsmessungen wurde geprüft, ob die separierten Komponenten eine Reizantwort bei den Larven bewirkten. Über chromatographische, gelelektrophoretische und zuletzt immunologische Verfahren wurde schließlich versucht, die attraktiven Fraktionen näher zu charakterisieren.

4.2.1 SCW-Gewinnung

Die SCW-Gewinnung erfolgte nach der Methode von Netzer (1989), der in seiner Dissertationsarbeit die idealen Bedingungen zur Gewinnung von mit attraktivem Material hochangereicherten SCW erarbeitete. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Arbeiten wurde diesmal doppelkonzentriertes SCW verwendet. Eine beachtliche Steigerung der Materialausbeute konnte erreicht werden, indem statt nur 150 g jetzt 300 g Schnecken eingesetzt wurden. Allein durch die Methodik der Aufreinigung in der Filtration, Zentrifugation und

Ammonium-Sulfat-Fällung musste mit gewissen Materialverlusten gerechnet werden, so dass uns die gesteigerte Materialausbeute sehr zu Hilfe kam.

4.2.2 Attraktivitätstestung

Sowohl nach jedem Präparationsschritt, als auch nach anderen Manipulation des SCW spielte die Attraktivitätsmessung eine signifikant wichtige Rolle in der Untersuchung der Wirtslokalisierung von Parasitenlarven. Schließlich stellte dieses Verfahren, in dem getestet wurde, ob eine chemische Verbindung eine Verhaltensänderung bei den Miracidien auslösen kann, die einzige Möglichkeit dar, ein etwaiges Attraktans zu erkennen, um dieses für die weitere Präparation überhaupt verwenden zu können.

Will man den Wirtsfindungsprozess in seiner Gesamtheit klären, muss man berücksichtigen, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt (Haas et al, 1991, Haberl und Haas 1992) und dass verschiedene chemische Stimuli für die einzelnen Phasen der Wirtsfindung verantwortlich sind. Manche Autoren machen sogar das Nichtverständnis des Miracidienverhaltens dafür verantwortlich, dass eben durch die Wahl einer ungeeigneten Austestmethode die Veröffentlichung oft so kontroverser, teilweise zweifelhafter Ergebnisse zustande kommt (Sukhdeo und Mettrick 1987).

Im wesentlichen lassen sich drei Verfahrensprinzipien beschreiben: Die Zählkammer („choice chamber“), die Punktinokulation („point inoculation“) und das Einbringen der Testsubstanzen in feste Medien (Agar). Das erstgenannte Verfahrensprinzip erschien als nicht geeignet, da es sich bei dem Verhalten bei der Wirtslokalisierung nicht um eine zielgerichtete Chemotaxis, sondern um ein Chemoklinokinese handelt (Saladin 1979, Roberts et al. 1979, Sukhdeo u. Mettrick 1987, Haas 1988).

Sowie Chernin 1970 bereits erstmals SCW mit Hilfe einer Glaskapillare in eine Miracidien suspension einbrachte und dabei das Verhalten der Miracidien unter dem Lichtmikroskop beobachtete, wurde dieses Verfahren als „point inoculation“ benannt. Für Chernin war das Ergebnis positiv, wenn sich die Miracidien in einem Schwarm in einer elipsoiden Zone um die getestete Substanz bewegten. Sowohl in den vorangegangenen Arbeiten, als auch in dieser wurde die Methode der Punktinokulation übernommen und als Attraktivitätstest eingesetzt. Zum einen überzeugte sie durch die Einfachheit ihrer Durchführung und zum anderen dadurch, dass bereits geringe Probenmengen für eine eindeutige Aussage ausreichten. Der Nachteil dieser Methode lag sicherlich darin, dass Ergebnisse nicht quantifizierbar waren. Nur mit viel Übung und Erfahrung konnten

Unterschiede in der Stärke des Verhaltens der Wimperlarven erkannt werden, wenn überhaupt.

Auch das Verfahren, die zu testende Probe in Agar einzubringen, machten wir uns im letzten Präparationsschritt dieser Arbeit zunutze. Wissen musste man dazu, dass Haberl und Haas, modifiziert nach MacInnis (1965) das Miracidienverhalten zusätzlich in drei Einzelkategorien unterteilten, nämlich „turning“, „contact with return“ (CR) und „repeatet investigation“ (RI). Dabei hielten sie RI für die typische Reizantwort, die dem Anheftungsprozeß an die Schnecke vorausgeht (Haberl und Haas 1992). Hierzu waren unsere Aussagen über das Verhalten der Miracidien gegenüber dem Testgel sicherlich zu ungenau, um daraus tatsächliche Ergebnisse postulieren zu können.

4.2.3 Präparation des SCWs

Das frisch gewonnene SCW reinigte man vor Weiterverarbeitung mit einem Bakterienfilter der Firma Sartorius mit der definierten Porenweite von 0,2 µm. Das in der darauffolgenden Zentrifugation gewonnene Material, auf der einen Seite das Pellet, das nicht wasserlöslich war, und auf der anderen Seite der Überstand, konnte erstmals in den Attraktivitätstest eingesetzt werden. Bis hier glich die Präparation der, wie sie bereits von Netzer (1989) und Fichtelscherer (1996) beschrieben wurde. Das dabei abgetrennte Kalziumkarbonat-Pellet wurde verworfen, da es, wie schon Fichtelscherer (1996) feststellte, keine Attraktivität zeigte. In den früheren Arbeiten wurde nun das attraktive Material sofort für die chromatographische Auftrennung auf der TSK 3000-Säule eingesetzt. Gestützt auf die Ergebnisse von Fichtelscherer (1996), der eine ausgezeichnete Trennleistung mit einer Molekularsiebsäule als stationäre Phase erzielte, arbeiteten auch Beer (1997) und Zorger (1998) mit dem gleichen Verfahren weiter. Augenmerk wurde stets besonders auf die Identifizierung des Molekülgewichts gelegt. Schon 1988 wurde von Schmideder die Methode der Hochleistungschromatographie (HPLC) eingeführt. Während Schmideder mit einer C18-Umkehrsäule arbeitete und nach erfolgter Auftrennung zu dem Ergebnis kam, dass es sich bei dem gesuchten Molekül um eine kleinmolekulare, sehr polare Substanz handeln muss, beschrieben Fichtelscherer (1996) und Beer (1997) das „Miraxon“ als großmolekular mit einem Molekülgewicht zwischen 10^4 und 10^6 M. Vieles deutet darauf hin, dass es sich beim Wirtsfindungsprozess von *S. mansoni*-Miracidien um ein multifaktorielles Geschehen mit mehreren beteiligten chemischen Stimuli handeln könnte (Chernin 1970, Haberl und Haas 1992). Vielleicht verhielt es sich so, dass in der Tat klein- und großmolekulare Substanzen

eine Rolle spielten, die kleinemolekularen mehr in der Fernwirkung und die großmolekularen in der Nahwirkung.

Diese Vermutung veranlasste uns, den Versuch zu starten, das SCW noch in einem der chromatographischen Auftrennung vorgeschalteten Schritt weiter zu reinigen und aufzubereiten. Wir setzten das bisher nur filtrierte und zentrifugierte SCW in eine Ammonium-Sulfat-Fällung ein. Proteine werden nach dem Prinzip „Salting Out at High Salt Concentration“ ausgefällt. Mit verschiedenen Salzkonzentrationen wurde das SCW behandelt, so dass sich die einzelnen Fraktionen durch ihren Sättigungsgrad mit Ammonium-Sulfat unterschieden: 30 %, 45 %, 60 %, 75 % und vollständig gesättigt. Anschließend wurde das SCW dialysiert und darauffolgend in einen erneuten Attraktivitätstest mit Miracidien eingesetzt. Da sich die größte Attraktivität in dem Bereich zeigte, in dem das Material auf 50 % und auf 75 % gefällt wurde, konnten die restlichen Fraktionen verworfen werden. Die attraktiven Proteine mussten also irgendwo innerhalb dieser beiden Fraktionen des gefällten SCW enthalten sein. Ein großer Teil an verunreinigendem Material konnte wiederum durch die Ammonium-Sulfat-Fällung abgesondert werden.

Erst jetzt machten wir uns die chromatographische Auftrennung mittels Hochleistungschromatographie zunutze. Wir strebten zunächst eine präparative Auftrennung an der TSK 3000-Säule an und trugen das Material auf, das wir als Sediment nach der Ammonium-Sulfat-Fällung auf 75 % gewinnen konnten. Es wurden fünf verschiedene Peakfraktionen eluiert, die wir getrennt voneinander gesammelt haben, um sie dann wiederum in den Attraktivitätstest einzusetzen. Der Test mit den Wimperlarven zeigte eine eindeutig positive Attraktivität in der 1. Peakfraktion. Somit beschlossen wir, die Auftrennung an der TSK 3000-Säule wirklich nur als präparativen Schritt zu nutzen, und die vier anderen Peakfraktionen vorerst außer Acht zu lassen. Vielmehr interessierte uns, diese 1. Peakfraktion noch weiter zu identifizieren. Wir setzten dieses Material nochmals in die Hochleistungschromatographie ein, allerdings ließen wir es über die Superdex 200 HR 10/30- Säule laufen, um eine analytische Auftrennung zu erhalten.

Von früheren Arbeitsgruppen wurde versucht, schon nach einer Auftrennung durch die Hochleistungschromatographie mit anderen Methoden der Identifizierung des „Miraxons“ näher zu kommen. So untersuchte Zorger (1998) die attraktive Fraktion nach einer Auftrennung mit der Hochleistungschromatographie, mit der Gaschromatographie und der Aminosäureanalyse. Bei der Gaschromatographie herrschten die Zucker Galactose und Glucose vor. Auch Mannose und die beiden Aminozucker Glukosamin und Galaktosamin konnten detektiert werden. Diese Ergebnisse deckten sich mit denen von Beer (1997) und

Cordes (1996). Schmideder konnte schon 1988 in dem unbehandelten SCW sechs Zucker, nämlich Rhamnose, Mannose, Arabinose, Galactose, Xylose und Glucose nachweisen, die er anschließend auf ihre Attraktivität hin untersuchte. Erstaunlicherweise konnte er bei keinem der Zucker eine Verhaltensänderung der Miracidien feststellen.

Die verschiedenen Aminosäureanalysen des SCW waren nicht sehr aufschlussreich. Sowohl Zorger (1998), Cordes (1996), Fichtlscherer (1996) als auch Beer (1997) konnten mit ihren Analysen alle im Standard enthaltenen Aminosäuren nachweisen. Auch Schmideder (1998) fand 16 Aminosäuren in dem unaufbereitetem SCW. Bei ihm zeigten Asparaginsäure, Glutaminsäure und Histidin in isolierter Form Attraktivität. Bei der Untersuchung der Abgabe von Aminosäuren verschiedener Wirtsschnecken stießen Thomas und Eaton 1993 bei der Schnecke *Biomphalaria glabrata* auf ebenfalls 16 Aminosäuren und wiesen zusätzlich Phosphoserin und Ethanolamin nach. Für diese Autoren spielten die beiden Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure eine tragende Rolle, da sie in höherer Konzentration von der Schnecke in die Umgebung abgegeben werden. Zusätzlich beschrieb MacInnis 1965 diese beiden Aminosäuren als Auslöser des Penetrationsverhaltens bei *Schistosoma mansoni* (Thomas u, Eaton, 1993). Das vermehrte Auftreten von Aminosäuren und bestimmten Zuckern in den attraktiven Fraktionen ermöglicht die Annahme, dass es sich bei dem „Miraxon“ um ein Glykoprotein oder Proteoglykan handelt. Auch von anderen Autoren wird postuliert, dass die Substanz, die Verhaltensänderungen bei Miracidien auslöst, ein Glykoprotein vom Mucin-Typ sei. Haas und Mitarbeiter (2000) untersuchten „snail-conditioned water“ von *Lymnea truncatula* und *Lymnea stagnalis*, das das typische Wirtsfindungsverhalten bei den Miracidien von *Fasciola hepatica* und *Trichobilharzia ocellata* hervorrief. Auch von ihnen wurde das attraktive Material speziell auf seine Zusammensetzung von Aminosäuren und Kohlenhydrate untersucht. Der Anteil von Serin und Threonin unter den Aminosäuren lag über 30 %, was typisch für ein Glykoprotein vom Mucin-Typ ist. Weiter wurde unter den Zuckern hauptsächlich Galaktose und Fucose gefunden, aber auch kleinere Mengen von neun anderen Monosacchariden. Erneut wurde die Heterogenität der attraktiven Substanz bestätigt.

Der Weg, auf dem wir uns befanden, indem wir das jeweils attraktive Material mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an zwei verschiedenen und hintereinandergeschalteten Säulen auftrennten, führte uns zu einer Säuberung und Reinigung des Materials, wie es bisher noch nicht gelungen war. Bei der Auftrennung an der Superdex 200 HR 10/30-Säule wurden drei voneinander getrennte Peakfraktionen eluiert, von uns aufgefangen und dann in den

Attraktivitätstest eingesetzt. Nur die 1. Peakfraktion konnte eine Verhaltensänderung bei den Miracidien hervorrufen.

Mit dieser Substanz arbeiteten wir weiter und bereiteten es für die Gelelektrophorese mit dem SDS-Polyacrylamidgel vor. In den vorangegangenen Arbeiten konnten ausschließlich Angaben darüber gefunden werden, dass Versuche, die im SCW enthaltenen Proteinkomponenten mit Polyacrylamidgelen aufzutrennen, scheiterten. Auf herkömmlichen 7,5 %-igen bis 10 %-igen Gelen zeichneten sich keine differenzierbaren Bande ab, sondern das Material verschmierte über den gesamten Lauf (Haberl, 1995). Erst als Haberl SDS-Pages mit einem Gradienten von 4 - 22,5 % verwendete, erhielt er verwertbare Ergebnisse.

Wir konzentrierten uns auf das 8 %-ige SDS-Gel, über das wir alle drei Peakfraktionen aus der Auftrennung mit der Superdex 200 HR 10/30-Säule laufen ließen. Sowohl durch die Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969) als auch durch die Silbernitrat-Färbung wurden relativ scharfe Bande detektiert.

Dass es sich bei dem „Miraxon“ um ein Glykoprotein handeln würde, wurde bereits an anderer Stelle diskutiert. Zorger (1998) hatte die Idee, zur genaueren Charakterisierung des hochaufgereinigten SCW immunologische Methoden einzusetzen. Er markierte bestimmte Bande eines SDS-Gels mit Hilfe von Antiserum gegen Galactan der Schnecke *Biomphalaria glabrata* und untersuchte anschließend ihre Zusammensetzung. Der Western-Blot, den er durchführte, konnte kein aussagekräftiges Ergebnis erbringen, da sich das im SCW enthaltene Galactan über den gesamten Gelverlauf verteilt hatte. So schien das Galactan in jedem Gelbezirk enthalten zu sein. Auch Haberl versuchte in seiner Dissertation (1995) Proteine des SCW mit Hilfe der Elektrophorese auf eine PVDF-Membran zu übertragen. Er färbte in seiner Arbeit Glykoproteine mit Hilfe des Digoxigenin-Systems an, wobei die nicht gewünschte Anfärbung des Hintergrunds ihm die Analyse der Proteinbanden erschwerte.

In dieser Arbeit machten wir uns die Substanz Digoxigenin aus dem Glycan Detection Kit der Firma Boehringer Mannheim Biochemica erneut zunutze. Diese Methode diente zum Nachweis von Glykoproteinen auf Nitrocellulose mittels eines Immunoassays. Eingesetzt wurden die drei Peakfraktionen, die wir aus der Auftrennung mit der Superdex 200 HR 10/30-Säule gewinnen konnten. Bei der Färbereaktion als letzten Schritt des Glycan Detection Kit wurden vier klare Bande in jeder Spur auf der Nitrocellulose sichtbar. Das war nun dafür beweisend, dass das attraktive Material tatsächlich aus Glykoproteinen bestand, und dass eine Möglichkeit erarbeitet wurde, diese Glykoproteine auch gelelektrophoretisch darzustellen.

Um diese vier Glykoproteine nicht nur gelelektrophoretisch sichtbar werden zu lassen, sondern sie sogar voneinander zu separieren, wurde in einem darauffolgendem Schritt eine

Lektin-Säule eingebaut. An einer Concanavalin A-Sepharose-Säule sollten affinitätschromatographisch die verschiedenen Glykoproteine getrennt voneinander eluiert werden, insofern das Material überhaupt an die Säule bindet. Als Material setzten wir in diesen Schritt die 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30-Auftrennung ein. Über die Concanavalin A-Sepharose-Säule wurden direkt nach Auftragen des attraktiven Materials die verschiedenen Puffer geschickt, die die Glykoproteine wieder von ihren Bindungsstellen an den Lektinen verdrängen und somit von der Säule eluieren sollten.

Die einzeln aufgefangenen Fraktionen wurden auf ein 8 %-iges SDS-Gel aufgetragen, und dieses wiederum mit Silbernitrat angefärbt. Als Ergebnis konnte jedoch nur die Aussage getroffen werden, dass nichts oder nur sehr wenig der Glykoproteine an Glucose, Mannose oder Glucosamen bindet.

Interessanterweise experimentierten Haas und Mitarbeiter etwa zur gleichen Zeit mit SDS-Gelen, Gelelektrophorese und Lectin-Blots. Sie trennten das resuspendierte SCW primär elektrophoretisch über ein Natrium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamidgel auf, übertrugen dieses Gel direkt auf eine FluoroTrans-Membran. Darauf konnten anschließend Glykoproteine immunologisch detektiert werden, indem sie mit Digoxigenin gekennzeichnete Lectine benutzten. Anscheinend wurde zunächst in der SDS-Page nach Silbernitratfärbung kein einziges Protein sichtbar, erst in den Western-Blots wurden die Glykoproteine entdeckt, als die gekennzeichneten Lectine immunologisch erkannt wurden. Nichtsdestoweniger kamen die Proben mehr als unscharfe Spuren denn als scharfe Bande zum Vorschein, so wie es typisch ist für sehr hoch glykosylierte Mukuskomponenten (Cottrell et al., 1993). Diese sehr verwaschenen Bande verteilten sich über die gesamte Länge der Spuren, das heißt, dass die Proteine eine Größe von 80 kD bis zu 250 kD hatten. Tatsächlich ist auch hier zum Vorschein gekommen, dass das attraktive Material nicht an Mannose, Glukose und Glukosamin bindet, vielmehr aber an Fukose und Galaktose. Zusammenfassend aber postulierten Haas und Mitarbeiter, dass man immer noch von „miracidia-attracting glycoproteins“ (MAGs) sprechen muss, deren effektive Komponenten Aggregate von verschiedenen Typen von Molekülen sind. Um die molekulare Basis des Zwischenwirtsfindungsprozesses von Miracidien zu verstehen, brauchen wir mehr Information über die Strukturen und die terminalen Endungen der Kohlenhydratketten innerhalb der Glykoproteine. Auf einem sicherlich erfolgversprechendem Weg befindet man sich derzeit mit den Lektin-Versuchen. In solchen Versuchen wurden zum Beispiel terminal β -Galaktose-verbundene Amine und β -verbundene Acetylglucosamine in *Lymnaea truncatula* und *L. stagnalis* zum Vorschein gebracht (Haberl und Haas 2000). Und trotzdem konnten die Miracidien zwischen den beiden Spezies

unterscheiden, was vermuten lässt, dass tatsächlich sterische Anordnungen oder auch quantitative Unterschiede in den Glykoproteinen verantwortlich für das spezifische Wirtsfindungsverhalten sind.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Eine der häufigsten und am längsten bekannten Tropenkrankheiten ist die intestinale menschliche Bilharziose, und der weltweit verbreitetste Erreger dafür ist die Trematodenart *Schistosoma mansoni*.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Mechanismus der Zwischenwirtfindung und die dafür notwendigen chemischen Signale genauer zu untersuchen, - ein Makromolekül zu isolieren und näher zu beschreiben.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die durchgeführten Versuchs- und Präparationsschritte beschrieben und deren Ergebnisse erläutert. Am Anfang stand im Mittelpunkt, das attraktive Material, also das SCW, so weit wie möglich aufzubereiten und es von den verunreinigenden Materialien zu befreien. Es standen uns, wie auch in früheren Arbeiten beschrieben, primär die Filtration und die Zentrifugation zur Verfügung. Das bei der Zentrifugation zurückbleibende Pellet konnte keine Verhaltensänderung bei Miracidien hervorrufen und somit verworfen werden. Besonderes Augenmerk wurde auf die bestmögliche Säuberung des Materials gelegt und deshalb der neue, bisher nirgends durchgeführte Schritt der Ammonium-Sulfat-Fällung dazwischengeschaltet. Der daraus resultierende Erfolg wurde erst einige Versuchsschritte später sichtbar. Zunächst wurde eine weitere Materialkonzentration und Auftrennung mit Hilfe der Hochleistungschromatographie an der TSK 3000-Säule und anschließend an der Superdex 200 HR 10/30-Säule erreicht. Beide Säulen erreichten eine Klassifizierung des Materials nach der Molekülgröße, wobei die TSK-Säule lediglich der präparativen Auftrennung diente, die Superdex-Säule hingegen bereits analytische Ergebnisse lieferte. Schließlich gelang es uns, gelelektrophoretisch mit der SDS-Minigelelektrophorese scharfe Bande nach der Anfärbung des Gels zum Vorschein zu bringen. Das war der Erfolg, den wir der Ammonium-Sulfat-Fällung zuschreiben konnten. Da es gelungen war, das Attraktans auf einem SDS-Gel in relativ klaren und scharfen Bande darzustellen, übertrugen wir dieses Gel mit Hilfe einer immunologischen Technik, dem Western-Blot, auf einen Nitrocellulosefilter. Mit Hilfe des Glycan Detection Kit der Firma Boehringer Mannheim Biochemica wurden bei der Färbereaktion als letzter Schritt der „Glycan Detection Kit-Technik“ vier klare Bande in jeder der Spuren auf der Nitrocellulose detektiert. Dies war letztendlich der Beweis dafür, dass das nun hochgereinigte SCW als attraktiven

Hauptbestandteil Glykoproteine enthielt, und dass diese Proteine auch gelelektrophoretisch darstellbar sind.

Im Mittelpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit stand die Diskussion, ob das attraktive Material tatsächlich aus Glykoproteinen besteht und mit welchen Mitteln das verschiedene Arbeitsgruppen dieses bisher nachzuweisen versuchten. Erstaunlicherweise machten sich Haas und Mitarbeiter ungefähr zeitgleich immunologische Methoden und Lectin-Blots zunutze (Kalbe, 2000). Allerdings beschrieben die Autoren, dass es nach wie vor nicht möglich sei, über die genauen Strukturen und terminalen Endungen der Kohlenhydrate suffizient Aussagen zu machen. Diese Erkenntnisse scheinen aber Voraussetzung dafür zu sein, die molekulare Basis des Wirtsfindungsprozesses von Miracidien verstehen und exakt beschreiben zu können.

6 Literaturverzeichnis

Adema, C.M., and Loker, E.S. (1997). Specificity and immunobiology of larval digenean-snail association. In „Advances in Trematode Biology“ (B. Fried and T. K. Graczyk, Eds.), pp. 229-263. CRC Press, Boca Raton, Fl.

Albrecht, E.M. (1985). Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss ausgewählter Säuren auf die Miracidien-Wirtsfindung von *Schistosoma mansoni*. *Diss. Techn. Uni. München, Med-Fak.*

Amankwa, J. A., Bloch, P., Meyer-lassen, J., Ölsen, A. and Christensen, N. O. (1994). Urinary and intestinal schistosomiasis in the Tono Irrigation Scheme, Kassena/Nankana District, Upper East Region, Ghana. *Trop. Med. Parasitol.* 45, 319-323

Anderson, R. M., Crombie. J. (1984). Experimental studies of ageprevalence curves for *Schistosoma mansoni* infection in population of *Biomphalaria glabrata*. *Parasitol.* 89, 79-104

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

Becker, B., Salzburg, M., and Melkonian, M. (1993). Blot analysis of glycoconjugates using digoxigenin-labeled lectins: An optimized procedure. *BioTechniques* 15, 232-235

Beer, F. (1997). Der Zwischenwirtfindungsprozess von *Schistosoma mansoni*: Experimentelle Untersuchungen zur Charakterisierung eines Makromoleküls aus dem Snail Conditioned Water von *Biomphalaria glabrata*, das als chemischer Signalstoff auf Miracidien fungiert. *Diss. Techn. Uni. München, Med- Fak.*

Brooker, B. E. (1972). The sense organs of trematode miracidia, in: *Behavioural aspects of parasite transmission*, Ed.: Canning, E. U. and Wright, C. A., Academic Press Inc., London, New York 171-180

- Carlstedt, I., Sheehan, J. K., Corfield, A. P., and Gallagher, J. T. (1985).** Mucous glycoproteins: A gel of a problem. *Essay in biochemistry* 20, 40-76
- Chernin, E. (1970).** Behavioural response of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other trematodes to substances emitted by snails. *J. Parasitol.* 56, 287-296
- Chernin, E. (1972).** Penetrative activity of *Schistosoma mansoni* miracidia stimulated by exposure to snail-conditioned water. *J. Parasitol.* 58, 209-212
- Chernin, E. (1974).** Some host-finding attributes of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23, 320-327
- Chernin, E. and Dunavan, C.A. (1962).** The influence of host-parasite dispersion upon the capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia to infect *Australorbis glabratus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2, 455-471
- Christensen, N. Ø. (1980).** 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
- Contis, G. and David, A. R. (1996).** The Epidemiology of Bilharzia in Ancient Egypt: 500 Years of Schistosomiasis. *Parasitol. Today* 12, 253-254
- Cordes, B. (1996).** Kurze Ergebniszusammenfassung, Manuskript
- Cottrell, J. M., Henderson, I. F., Pickett, J. A., and Wright, D. J. (1993).** Evidence for glycosaminoglycans as a major component of trail mucus from the terrestrial slug, *Arion ater* L. *Comp. Bioch. Physiol.* 104B, 455-468
- Dzandu, J. K., Deh, M. E., Barrat, D. L. and Wise, G. E. (1984).** Detection of erythrocyte membrane proteins, glycoproteins and lipids in the same polyacrylamid gel using a doublestraining technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1733-1737

Engelhardt, H. (1977). *Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie*, 2. Auflage; Berlin, Heidelberg, New York; Springer Verlag

Etges, F. J. and Decker, C. L. (1963). Chemosensitivity of the miracidium *Schistosoma mansoni* to *Australorbis glabrata* and other snails. *J. Parasitol.* 49, 114-116

Etges, F. J., Carter, O. S. and Webbe, G. (1975). Behavioural and developmental physiology of schistosome larvae as related to their molluscan host. *Ann. New York Acad. Sci.* 266, 480-496

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

Fischer, L.(1980). Gel filtration chromatography. Amsterdam: Biomedical Press

Fountain, D. W. (1982). Lectin-like properties associated with mucus and mucilage of diverse biological origin. *Naturwissenschaften* 69, 450-451

Gallagher, J. T., and Corfield, A. P. (1978). Mucin-type glycoproteins - New perspectives on their structure and synthesis. *Trends in Biochem. Scien.*, 3, 38-41

Haas, W. (1988). Host finding – A physiological effect. In: Melhorn, H. (Hrsg.). *Parasitology in focus. Facts and Trends*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 454-464

Haas, W. (2001). Host finding mechanisms. In: Melhorn, H. (Edition): *Encyclopedic Reference of Parasitology*. Vol. Biology, Structure, Function. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Haas, W., Gui, M., Haberl, B. and Strobel, M. (1991). Miracidia of *Schistosoma japonicum*: approach and attachment to the snail host. *J. Parasitol.* 77, 509-513

Haas, W., Haberl, B., Kalbe, M., and Körner, M. (1995a). Snail-host finding by miracidia and cercariae: Chemical host cues. *Parasitol. Today* 11, 463-472

Haas, W., Körner, M. Hutterer, E., Wegner, M., and Haberl, B. (1995b). Finding and recognition of the snail intermediate hosts by 3 species of echinostome cercariae. *Parasitol. 110*, 133-142

Haas, W., and Haberl, B. (1997). Host recognition by trematode miracidia and cercariae. In „Advance in Trematode Biology“ (B. Fried and. T. K. Graczyk, Eds.), pp.197-227. CRC Press, Boca Raton, FL.

Haas, W., Haberl, B. Hofmann, M., Kerschensteiner, S., and Ketzer, U. (1999). Ichthyophthirius multifiliis invasive stages find their host fish with complex behavior patterns and in response to different chemical signals. *Europ. J. Protistol. 35*, 129-135

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

Haberl, B., Kalbe, M., Fuchs, H., Ströbel, M., Schmalfluss, g., and Haas, W. (1995). Schistosoma mansoni and S. haematobium: Miracidial host-finding behaviour is stimulated by macromolecules. *Internat. J. Parasitol. 25*, 551-560

Haberl, B., Körner, M., Spengler, Y., Hertel, J., Kalbe, M., and Haas, W. (2000). Host-finding in Echinostoma caproni: Miracidia and cercariae use different signals to identify the same snail species. *Parasitol. 120*, 479-486

Haselbeck, A., Schickaneder, E., v.d. Eltz, H., and Hösel, W. (1990). Structural characterization of glycoproteins carbohydrate chains by using digoxigenin-labeled lectins on blots. *Analyt. Biochem. 191*, 25-30

Kalbe, M., Haberl, B., and Haas, W. (1996). Schistosoma mansoni miracidial host-finding: Species specificity of an Egyptian strain. *Parasitol. Res. 82*, 8-13

Kalbe, M., Haberl, B., and Haas, W. (1997). Miracidial host-finding in *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata* is stimulated by species-specific glyconjugates released from the host snails. *Parasitol. Res.* 83, 806-812

Kalbe, M., Haberl, B. and Haas, W. (2000). Snail host finding by *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata*: Compound analysis of miracidia-attracting glycoproteins. *Exp. Parasitol.* 96, 231-242

Kayser, H., Bienz, K. A., Eckert, J. and Lindenmann, J. (1993). *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage; Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York, 476

Körner, M. and Haas, W. (1998). Chemo-orientation of echinostome cercariae towards their snail hosts: the stimulation structure of amino acids and other attractants. *Internat. J. Parasitol.* 228, 517-525

Lang, W. (1996). *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*, 2. Auflage; Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York 103-124

MacInnis, A. J. (1965). Responses of *Schistosoma mansoni* miracidia to chemical attractants. *J. Parasitol.* 51, 731-746

MacInnis, A. J. (1974). Identification of chemical of snail origin that attract *Schistosoma mansoni* miracidia. *Nature* 248, 361-363

MacInnis, A. J. (1976). How parasites find hosts: In „Ecological Aspects of Parasitology“ (C. R. Kennedy, Ed.), pp. 3-20. North.Holland, Amsterdam

Mason, P. R. (1977). Stimulation of the activity of *Schistosoma mansoni* miracidia by snail conditioned water. *Parasitol.* 75, 325-338

Mason, P. R. and Fripp, P. J. (1976). Analysis of the movement of *Schistosoma mansoni* miracidia using dark-ground photography. *J. Parasitol.* 62, 721-727

Mason, P. R. and Fripp, P. J. (1977). Chemical stimulation of *Schistosoma mansoni* miracidial activity. *Z. Parasitenk.* 53, 287-295

Meyer, V. R. (1992). Praxis der Hochleistungschromatographie. Aus der Reihe: Laborbücher, Salle & Sauerländer, Hamburg

Netzer, F. J. (1990). Versuche zur standardisierten Herstellung und Lagerung wässriger Lösungen des Zwischenwirtlockstoffes („SCW“) im Kreislauf der Bilharziose. *Diss. Techn. Univ. München, Med. Fak*

Otsuka-Fuchino, H., Watanabe, Y., Hirakawa, C., Tamiya, T., Matsumoto, J. J. and Tsuchiya, T. (1992). Bactericidal action of a glycoprotein from the body surface of mucus of giant african snail. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C, 607-613

Ottaviani, E., Bolognani Fantin, A. M. and Bolognani, L. (1990). Muramis acid as a glycoconjugate component in Mollusca gastropoda. *Comp. Biochem. Physiol.* 96, 627-632

Piekarski, G. (1987). Die Schistosomen (Pärchenegel). In: Medizinische Parasitologie in Tafeln. 3. Aufl., Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag 162-172

Roberts, T. M., Ward, S. D. and Chernin, E. (1979). Behavioral responses of *Schistosoma mansoni* miracidia in concentration gradients of snail conditioned water. *J. Parasitol.* 65, 41-49

Saladin, K. S. (1979). Behavioral parasitology and perspectives on miracidial host-finding. *Parasitenk.* 60, 197-210

Samuelson, J. C., Quinn, J. J. and Caulfield, J. P. (1984). Hatching, chemokinesis and transformation of miracidia of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 70 (3), 321-331

Schmid, G. D. and Roberts, L. S. (1989). *Foundation of Parasitology*, 4th edition, Times Mirror/Mosby College Publishing, St. Louis, Toronto, Boston, Los Altos 265-279

Schmideder, S. (1988). Charakterisierung des Zwischenwirtlockstoffes 8“Miraxon“) im Kreislauf menschlicher Bilharziose mit Hilfe Flüssigkeitschromatographischer (HPLC) und chemisch-analytischer Untersuchungsmethoden. *Diss. Techn. Univ. München, Med. Fak.*

Shapiro, A. L., Vinuela, E. and Maizel, J. V. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biophys. Res. Commun.* 28, 815-820

Sharon, N. (1987). Nomenclature on glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans. *J. Biol. Chem.* 262, 13-18

Sponholtz, G. M. and Short, R. B. (1976). Schistosoma mansoni miracidia: Stimulation by calcium and magnesium. *J. Parasitol.* 62, 155-157

Strous, G. J., and Dekker, J. (1992). Mucin-type glycoproteins. *Critical Rev. Biochem. and Molecular Biol.* 27, 57-92

Sukhdeo, M. V. K., and Mettrick, D. F. (1987): Parasite behaviour: Understanding platyhelminth responses. *Adv. Parasitol.* 26, 73-144

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

Thomas, J. D. and Eaton, P. (1993). Amino acid medleys of snail origin as possible sources of information for conspecifics, schistosome miracidia and predators. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 781-796

Unger, K. K. and Weber, E.(1995). *Handbuch der HPLC*, 2. Auflage, Darmstadt, GIT Verlag

Uhlenbruck, G., Steinhausen, G., Geserick, G., and Prokopp, O. (1978). Further comparative studies of glycosubstances from different snail albumin glands. *Comp. Biochem. and Physiol.* 59B, 285-288

Upatham, E. S. (1972). Effects of some physico-chemical factors on the infection of *Biomphalaria glabrata* (by miracidia of *Schistosoma mansoni* Sambon in St. Lucia, West Indies. *J. Helminthol.* 46, 317-315

Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412

Weber, L. M. (1982). Untersuchungen zur Anlockung der Miracidien von *Schistosoma mansoni* an die Schnecke *Biomphalaria glabrata*. *Diss. Techn. Univ. München, Med. Fak.*

Wilson, E. O. (1970). *Chemical communication within animal species*, in *Chemical Ecology*, Ed.: Sondheimer, E., Academic Press, New York

Wright, D. G. S. (1974). Responses of miracidia of *Schistosoma mansoni* to an equal energy spectrum of monochromatic light. *Can. J. Zool.* 52, 857-859

Zorger, N. (1998). Experimentelle Untersuchungen zur Charakterisierung des für den Zwischenwirtfindungsprozess von *Schistosoma mansoni* verantwortlichen Miracidienlockstoffes der Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata*. *Diss. Techn. Uni. München, Med-Fak.*

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:

Schistosoma mansoni: Schematische Darstellung des Entwicklungskreislaufs

Abbildung 2:

Zwischenwirtsschnecke Biomphalaria glabrata; aus <http://www.cdfound.to.it/HTML/sch1.htm>

Abbildung 3:

Laufschemata A der Materialaufbereitung einschließlich Ammonium-Sulfat-Fällung – Material für anschließende HPLC-Läufe; aus <http://www.cdfound.to.it/HTML/sm1c.htm>

Abbildung 4:

Schema zur Theorie der Ausschlusschromatographie: Die großen Kreise stellen die stationäre Phase dar. Beim Passieren der Säule wandern die großen Moleküle (große Punkte) schneller durch die Säule, da sie im Gegensatz zu den kleineren Molekülen (kleine Punkte) nicht in die Poren des Silicagels (stationäre Phase) eindringen können und deshalb nicht abgefangen werden

Abbildung 5:

Schematische Zeichnung einer Elektrophorese-Apparatur der Fa. Biometra, Frontansicht

Abbildung 6:

Schematische Darstellung des Glycan Detection Kit; Prinzip zum Nachweis von Zuckern in Glykokonjugaten mittels eines Immunoassays; Schritt 1: Perjodat-Behandlung (Oxidation der Hydroxyl-Gruppen zu Aldehydgruppen), Schritt 2: Bindung des Digoxigenin an die Aldehydgruppen; Schritt 3: Enzym-Immunoassay zum Nachweis der mit Digoxigenin markierten Glykokonjugate

Abbildung 7:

Laufschemata B einschließlich chromatographischer, gelelektrophoretischer, immunologischer und affinitätschromatographischer Methoden

Abbildung 8:

Auftrennung des Sediments der auf 75 % gefällten Probe mit TSK G 3000 SW. In die präparative Auftrennung durch die TSK G 3000 SW-Säule wurde das mit Ammonium-Sulfat gefällte SCW eingesetzt. Dadurch konnten fünf voneinander getrennte Peakfraktionen gesammelt werden, die mit 1, 2, 2b, 3 und 4 benannt wurden.

Abbildung 9:

Auftrennung der 1. Peakfraktion nach TSK G 3000 SW mit Superdex 200 HR 10/30. In die analytische Auftrennung durch die Superdex 200 HR 10/30-Säule wurde das mit Peakfraktion 1 benannte Material nach der TSK G 3000 SW-Auftrennung eingesetzt. Dadurch wiederum konnten drei voneinander getrennte Peakfraktionen gesammelt werden, die mit 1, 2 und 3 benannt wurden.

Abbildung 10:

8 %-iges SDS-Gel der 3 Peakfraktionen nach Superdex 200 HR 10/30, Silbernitratfärbung; Spur 1: 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30, Spur 2: 2. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30, Spur 3: Standard = Rainbow-Marker 1:10, Spur 4: 3. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30

Abbildung 11:

8 %-iges SDS-Gel der 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30, Coomassie- Färbung; Spur 1: 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30, Spur 2: nichts, Spur 3: Standard = Rainbow-Marker 1:10

Abbildung 12:

Nitrocellulose des Glycan Detection Kit der 3 Peakfraktionen nach Superdex 200 HR 10/30. Durch die analytische Auftrennung an der Superdex 200 HR 10/30-Säule konnten drei Peakfraktionen gesammelt werden, in denen Glykokonjugate als Hauptbestandteil des attraktiven Materials vermutet wurden. Zum Nachweis dieser Glykokonjugate wurde der Glycan Detection Kit eingesetzt. Auf der Nitrocellulose kamen vier getrennt voneinander sichtbare Bande zum Vorschein.

Abbildung 13:

8 %-iges SDS-Gel der Fraktionen nach Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose, Silbernitratfärbung; Spur 1: Standard = Rainbow-Marker 1:10, Spur 2: Fraktion 1 mit Ammonium-Acetat-Puffer eluiert, Spur 3: Fraktion 2 mit 20 mM CH₃-Glc-Puffer eluiert, Spur 4: Fraktion 3 mit 150mM CH₃-Glc-Puffer eluiert, Spur 5: Fraktion 4 mit 300 mM CH₃-Glc- Puffer eluiert

Abbildung 14:

Direktes Einsetzen der SDS-Page in den Attraktivitätstest mit Material der 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30-Auftrennung; Spur 1 entspricht 50 µl der 1. Peakfraktion nach Superdex 200 HR 10/30 (10 µg Protein), Spur 2 entspricht 25 µl (5 µg Protein) und Spur 3 entspricht 12,5 µl (2,5 µg Protein). An den mit gestrichelten Linien gekennzeichneten Stellen wurde die Gelspur unterteilt, die dadurch entstandenen Gelstückchen wurden direkt in den Attraktivitätstest eingesetzt.

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:

Attraktivitätstest nach Resuspension des SCW in Wasser und 3x-iger Zentrifugation

Tabelle 2:

Attraktivitätstest des SCW nach Ammonium-Sulfat-Fällung; Bestimmung des mit Ammonium-Sulfat gefällten Materials, in dem die größte Attraktivität auf Miracidien steckt

Tabelle 3:

Bilanzierung des Gewichts nach Ammonium-Sulfat-Fällung

Tabelle 4:

Attraktivitätstest des Materials nach HPLC-Auftrennung mit TSK G 3000 SW. Eingesetzt wurde das mit Ammonium gefällte SCW. Durch die präparative Auftrennung an der TSK 3000-Säule konnten fünf voneinander getrennte Fraktionen gesammelt werden, die mit Peakfraktion 1, 2, 2b, 3 und 4 benannt wurden.

Tabelle 5:

Attraktivitätstest der 3 Peakfraktionen nach Superdex 200 HR 10/30

Tabelle 6:

Attraktivitätstest der einzelnen Fraktionen nach Affinitätschromatographie an Con A

Danksagung

Danke möchte ich Herrn Prof. Dr. R. Disko für die Überlassung des Themas, für seine stets wohlwollende Unterstützung und die wertvollen und unvergesslichen Diskussionen während der Erstellung der Arbeit sagen.

Herrn Prof. Dr. Fiedler gilt ebenso Dank, der mit großem Engagement die Betreuung der Analysen übernommen hat und dessen Mithilfe unentbehrlich für das Gelingen der experimentellen Untersuchungen war.

Großer Dank gebührt ebenfalls Frau Dr. Karin Schubert und Herrn Dr. Norbert Bauer, Mitarbeiter am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Biologische Fakultät der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. Franz Fiedler), für die hilfreiche Unterstützung und das stets angenehme Arbeitsklima.