

Bedeutung von Protein-Glykan-Wechselwirkungen bei der Pathogenese von
***Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden**

Martin Knaus

Aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten (Vorstand: Prof. Dr. R.W. Hoffmann) und dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie (Vorstand: Univ. Prof. Dr. H.-J. Gabius) der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Anleitung von
Prof. Dr. M. El-Matbouli und
PD Dr. H. Kaltner

Bedeutung von Protein-Glykan-Wechselwirkungen bei der Pathogenese von *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Martin Knaus
aus München

München 2005

*Die durchgeführten Untersuchungen wurden im Rahmen des Projektes
El 174/1-1 durch die Deutsche Forschungs-Gemeinschaft (DFG) gefördert

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. M. El-Matbouli

Korreferent: Prof. Dr. C. Knospe

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meinen Eltern

In der vorliegenden Arbeit möchte ich von der Möglichkeit Gebrauch machen, die Dissertation kumulativ zu gestalten (§ 6 Abs. 2 Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 01.01.2003). Die in Abschnitt 4.1. dargestellten Ergebnisse sind bereits als englischsprachige Publikation bei dem Journal „*Disease of Aquatic Organisms*“ (Inter-Research) eingereicht und akzeptiert bzw. im Druck. Kapitel 4.2. enthält weitere Ergebnisse, die demnächst ebenfalls in dieser Form als Manuskript in einem internationalen Journal mit Gutachtersystem eingereicht werden.

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>Einleitung</u>	1
2	<u>Literaturübersicht</u>	3
2.1.	Die Drehkrankheit der Salmoniden - Whirling Disease	3
2.1.1.	Taxonomische Einteilung	3
2.1.2.	Vorkommen und Verbreitung von <i>Myxobolus cerebralis</i>	4
2.1.3.	Ätiologie, Entwicklungszyklus und Morphologie	6
2.1.4.	Symptomatik und Pathogenese	12
2.1.5.	Diagnose und Therapie	15
2.2.	Lektine und Glykane	17
2.2.1.	Die Rolle des Lektin-Glykan-Erkennungssystems bei der Pathogenese von Parasiten	17
2.2.2.	Lektine – Definition und Geschichte	20
2.2.3.	Glykohistochemie	23
2.2.4.	Glykane	24
2.2.5.	Pflanzliche Lektine als Tools	28
3	<u>Zielsetzung</u>	32
4	<u>Eigene Untersuchungen – Veröffentlichungen nach §6(2) Promotionsordnung</u>	33
4.1	Ergebnisse – Teil I	33
	M. Knaus, M. El-Matbouli: Lectin-blot analyses on developmental stages of <i>Myxobolus cerebralis</i> in the salmonid host <i>Oncorhynchus mykiss</i> . <i>Dis Aquat Organ.</i> 2005	
4.2	Ergebnisse – Teil II	54
	M. Knaus, H. Kaltner, H. J. Gabius, M. El-Matbouli: Characterisation of carbohydrate-binding sites in different stages of <i>Myxobolus cerebralis</i> .	
5	<u>Zusammenfassende Diskussion</u>	77
6	<u>Zusammenfassung</u>	84
7	<u>Summary</u>	86
8	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	88
9	<u>Literaturverzeichnis</u>	90
	<u>Danksagungen</u>	106
	<u>Persönlicher Werdegang</u>	107

1 Einleitung

Die Drehkrankheit der Salmoniden, oder im Angelsächsischen benannt als „whirling disease“, wurde erstmals in Deutschland 1903 von HOFER beschrieben. Schon 1898 beobachtete er die Kardinalsymptome dieser, von dem Erreger *Myxobolus cerebralis* - einem mehrzelligen Parasiten aus dem Stamm der *Myxozoa* (GRASSÈ 1970) - verursachten Erkrankung bei Regenbogenforellen in Süddeutschland. Die ursprünglich in Nordamerika beheimateten Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) wurden aufgrund ihrer im Vergleich zu den europäischen Bachforellen höheren Wachstumsrate sowie Widerstandsfähigkeit auch in europäischen Aquakulturen eingeführt. Die fehlende Adaptation an bislang europäische Pathogene, aber auch eine Einschleppung von bis dato in Europa unbekanntem Krankheitserregern wurde damit in Kauf genommen. Der von HOFFMAN (1990) beschriebenen und für die 50er Jahre datierten Einschleppung des Erregers auf den amerikanischen Kontinent und damit in ein Ökosystem, welches keine Anpassungsmöglichkeiten gegenüber *M. cerebralis* hatte, folgte eine schier unbeschreibliche Ausbreitung in staatlichen und privaten Forellenzuchtanlagen sowie in den offenen Gewässern von bisher 23 US-Staaten (HEDRICK et al. 1998). Neben finanziellen Verlusten der Aquakulturen, stellen seitdem aber besonders ökologische Aspekte eine große Herausforderung an die Verantwortlichen der Regierungen und der inzwischen zahlreichen privaten Organisationen.

Zukunftsweisende Erkenntnisse verspricht man sich aus Untersuchungen zu Invasions- und Resistenzmechanismen sowie aus der Infektionsprävention, die am Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der LMU München in Kooperation mit US-amerikanischen Instituten durchgeführt werden.

Die molekularen Mechanismen der Invasion und besonders auch der zielgerichteten Migration scheinen bislang beim Infektionsprozess von *M. cerebralis* noch weitgehend ungeklärt. Der Invasion liegen zum einen die spezifische Wirtserkennung und zum anderen die erfolgreiche Adhäsion zugrunde. Verschiedenste Arten der Wechselwirkungen sind dabei bei unterschiedlichen parasitären Erregern beschrieben und werden auch heute bei immer mehr Systemen gefunden. Eines dieser molekularen Interaktionsprinzipien stellt das Glykan – Lektin System dar.

Durch Studien der letzten Jahre wurde gerade dem Bereich der Glykokalyx, insbesondere der Glykan-Epitope, vermehrt Beachtung geschenkt. Deren vielfältigen Variationsmöglichkeiten wird aufgrund unterschiedlicher Monosacharid-Verknüpfungsarten eine bislang weit unterschätzte Funktion als Informationsträger zugesprochen (GABIUS 2001). Gerade diese

Variationsmöglichkeiten sind es, die bei einem hochsensitiven System, wie der Wirtsspezifität von Krankheitserregern, in entscheidendem Maße beteiligt sein könnten. Lektinen, als komplementäre Rezeptoren der Glykane, kommt hierbei eine entscheidende Rolle zu. Aufgrund von Variationen in den Kohlenhydrat-bindenden Domänen (CRDs) des Moleküls binden sie spezifisch und reversibel nur an bestimmte Glykane oder Kohlenhydratmuster. Lektine wurden daher vorwiegend in Verbindung mit solchen Prozessen beschrieben, die ein erhöhtes Maß an Spezifität erfordern, sei es bei immunologischen Reaktionen wie der Antigen-Opsonisierung und der Komplementaktivierung (BUCHMANN 1998) oder Zell-Zell Wechselwirkungen (beispielsweise bei der Anheftung und Gefäßauswanderung von Leukozyten, LASKY 1995), aber auch bei der Invasion von parasitären Krankheitserregern (zum Beispiel: *Plasmodium falciparum*, HADLEY 1986; *Plasmodium falciparum*, ORTEGA-BARRIA & PAREIRA 1991; *Leishmania spp.*, TURCO & DESCOTEAUX 1992).

Gerade in dem Bereich der Ichthyo-Parasitologie kommt der unspezifischen Immunabwehr (innate immunity) eine bedeutende Rolle zu (ELLIS 2001, JONES 2001). Lektine wurden bislang bei verschiedensten Fischarten beschrieben und hauptsächlich von epidermalem Schleim isoliert (KAMIYA et al. 1988, SHIOMI et al. 1989, MURAMOTO et al. 1999, HOSONO et al. 1999), der bekanntlich die erste Infektionsbarriere der Haut gegenüber der Umgebung bildet. Nach EL-MATBOULI et al. (1999) dringen die Triactinomyxon-Sporen von *M. cerebralis* nur über Schleimzellöffnungen, die sich auf der gesamten Epidermis befinden, und über die respiratorischen Epithelzellen der Salmoniden ein. Deshalb vermuteten die Autoren eine chemotaktische Funktion von bisher unbekanntem Bestandteilen des Schleims, welche zusammen mit mechanischen Faktoren die Wirt-Parasit-Interaktion steuern.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Möglichkeit einer Beteiligung von Lektin-Aktivitäten am Infektionsprozess von *Myxobolus cerebralis* abzuklären und potentielle Bindungspartner zu charakterisieren.

Die Studie wurde im Rahmen eines Projekts durchgeführt, welches ohne die finanzielle Unterstützung der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft (DFG) sicher nicht in diesem Umfang hätte realisiert werden können.

2 Literaturübersicht

2.1. Die Drehkrankheit der Salmoniden - Whirling Disease

2.1.1. Taxonomische Einteilung

Der Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden, *Myxobolus cerebralis*, ist ein mehrzelliger Parasit und wird von der *International Commission on Protozoan Nomenclature* (LEVINE et al. 1980) bei den Protozoa zum Stamm der Myxozoa (GRASSÈ 1970) gezählt. Die Vertreter der Myxozoa stellen in ihrer Mehrzahl obligate Parasiten von Avertebraten und poikilothermen Organismen dar. Die Sporenstadien bestehen charakteristischerweise aus Schalenzellen, Polkapseln mit ausschleuderbaren Polfilamenten und generativen Amöboidkeimzellen. Im Stamm der Myxozoa sind 1.350 Arten in 52 Gattungen eingeteilt (LOM & DYKOVÀ 1995). Neben *Myxobolus cerebralis* finden sich hier zahlreiche andere bedeutende Ichthyoparasiten, wie *Tetracapsuloides bryosalmonae*, dem Erreger der Proliferativen Nierenerkrankung der Salmoniden (PKD), *Sphaerospora renicola*, Erreger der Schwimmblasenentzündung der Karpfen und *Hoferellus carassi*, Verursacher der Infektiösen Nierenvergrößerungen der Goldfische (EL-MATBOULI et al. 1992).

Nach MARQUÈS (1984) wird die Klasse der Actinosporea in 44 Arten und 14 Gattungen eingeteilt. Sie sind gekennzeichnet durch ihre charakteristische Morphologie, welche nach Ausscheidung aus dem Wirt eine Flotation im Wasser ermöglicht. Durch die typische Ausbildung von Schalenzellen, die radiärsymmetrisch angeordnet sind, können die einzelnen Arten differenziert werden. Apikal sind Polkapseln ausgebildet, die auch, wie bei den Myxosporea, Polfilamente enthalten. Eine Unterscheidung der einzelnen Arten kann darüber hinaus an der unterschiedlichen Anzahl der infektiösen Amöboidkeimzellen vorgenommen werden. Einige Vertreter aus der Klasse der Actinosporea stellen nachgewiesener Maßen Entwicklungsstadien von Vertretern aus der Klasse der Myxosporea dar (KENT et al. 2001). SMOTHERS et al. (1994) und SCHLEGEL et al. (1996) wiesen zuvor über molekularbiologische Methoden eine Verwandtschaft zu Bilateria nach und belegten so die Mehrzelligkeit der beiden Klassen. Folglich ist eine Überarbeitung der taxonomischen Einteilung gerade in neuerer Vergangenheit vermehrt in die Diskussion geraten. Weiter schlug SIDDALL et al. (1995) eine Zuordnung der Myxozoa zum Stamm der Cnidaria vor. Eine Zuordnung der Myxozoa zu den Metazoa erscheint daher sinnvoll. Die derzeit aktuelle Stellung von *Myxobolus cerebralis* in der systematischen Einteilung ist in Abbildung 1 dargestellt.

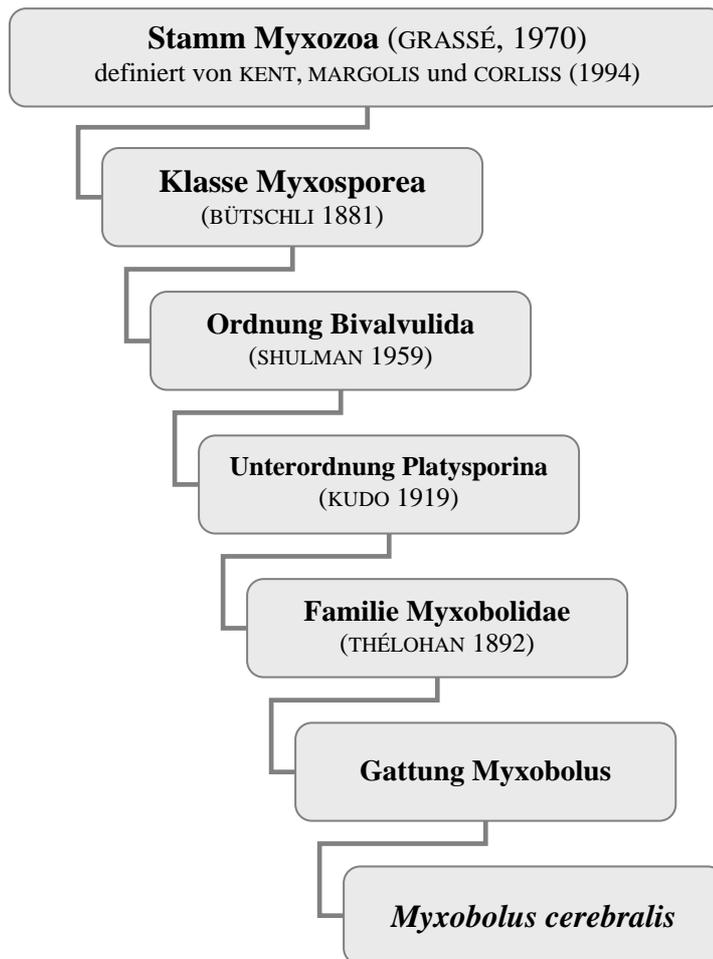


Abbildung 1 Stellung von *Myxobolus cerebralis* in der systematischen Einteilung im Stamm der Myxozoa nach LEVINE et al. (1980), LOM & NOBLE (1984) und LOM & DYKOVÁ (1992).

2.1.2. Vorkommen und Verbreitung von *Myxobolus cerebralis*

Die Drehkrankheit der Salmoniden und ihr Erreger *Myxobolus cerebralis* wurden erstmals bei einer Regenbogenforellen-Population in Deutschland von HOFER 1898 festgestellt und 1903 beschrieben. Nachfolgend wurde die Erkrankung in zahlreichen weiteren Ländern beobachtet und konnte sich bis heute in nahezu allen Forellen-produzierenden Ländern manifestieren (HALLIDAY 1976). Vermutlich wurde die Ausbreitung durch den zunehmenden Handel mit Fischmaterial Mitte des letzten Jahrhunderts begünstigt (HALLIDAY 1976). Auch HOFFMAN (1990) vermutete, dass Forellenfilets aus Dänemark die Ursache für die Verschleppung in die Vereinigten Staaten sein könnten. Nach LOWERS & BARTHOLOMEW (2003) trägt auch der schwach reglementierte Verkehr mit Lebendfutter für Zierfische, wie Tubificiden, zur weltweiten Verbreitung der Myxozoa bei. *Myxobolus cerebralis* gelangte über den Besatz mit klinisch

gesunden, jedoch infizierten Forellensetzlingen in Wildgewässer verschiedenster nordamerikanischer Staaten. Es wurden nachfolgend erkrankte Fische in Flüssen in Pennsylvania (1956), Nevada (1956), später in Connecticut (1961), Virginia (1965), Kalifornien, Massachusetts (1966) und Montana (1993) beobachtet (HOFFMAN 1990, BALDWIN et al. 1997). Bis heute hat die Erkrankung 22 Staaten der USA erfasst (VINCENT 1996). Ein Befall nordamerikanischer Fischzuchtbetriebe folgte und damit eine ökonomische Bedrohung der lokalen Salmoniden-Produktion. So erlangte dieser Erreger, der in den Staaten zuvor völlig unbekannt war, eine vieldiskutierte Stellung in der Öffentlichkeit (WOODBURY 1996). Die globale Bedeutung für die Fischwirtschaft wurde klar, als man neben den USA auch in nahezu allen Salmoniden-züchtenden Regionen der Erde, wie in West- und Osteuropa, der ehemaligen Sowjetunion, Neuseeland und Südafrika *Myxobolus cerebralis* nachweisen konnte (HOFFMAN 1970, HALLIDAY 1976). Südamerika dürfte daher eines der letzten Gebiete mit bedeutender Aquakultur sein, in dem die Drehkrankheit der Salmoniden noch nicht beobachtet wurde (HEDRICK et al. 1998). Untersuchungen bezüglich abweichender Befallsintensitäten in unterschiedlichen Gewässern deuten darauf hin, dass die Morbidität durchaus in Abhängigkeit von sekundären Umweltfaktoren gesehen werden muss. Zu den entscheidenden Parametern gehören unter anderem die Wasserqualität, die Wassertemperatur, der O₂- und CO₂- Gasdruck, die Artenvielfalt und –zusammensetzung (v.a. Populationsprofil von *T. tubifex* (BEAUCHAMP et al. 2002)), verfügbare Nahrungsquellen und die Intensität menschlicher Einflussnahme. Man geht daher von einem, auch schon bei anderen Parasiten bekannten, Phänomen eines faktoriell beeinflussten Geschehens aus. Besonders intensiv genutzte Gewässer, insbesondere jene in sportfischereilichem Fokus, erwiesen sich als prädestiniert für eine erhöhte Prävalenz von *M. cerebralis* (SCHISLER & BERGERSEN 1998, WHIPPS et al. 2004). Bis heute konnte *Myxobolus cerebralis* bei 18 unterschiedlichen Salmoniden-Arten der Gattungen *Oncorhynchus* (HEDRICK et al. 1999b), *Salvelinus*, *Salmo* (BLAZER et al. 2004) und *Hucho* nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich jedoch amerikanische Arten deutlich empfänglicher für eine Infektion als Salmoniden aus europäischer Herkunft (excl. *Hucho hucho*) (HALLIDAY 1976, EL-MATBOULI et al. 1992). Die Regenbogenforelle erwies sich dabei als meist empfänglich für eine Infektion mit *M. cerebralis* und bildete gleichzeitig Symptome von deutlichster Intensität aus (O'GRODNICK 1979). Aber auch zwischen einzelnen Linien von *O. mykiss* konnte man Unterschiede in der Empfänglichkeit feststellen (EL-MATBOULI et al. 2002, HEDRICK et al. 2003). Demgegenüber war die europäische Bachforelle zwar bei erhöhten Dosen für eine Infektion von *M. cerebralis* empfänglich, Krankheitssymptome blieben jedoch weitgehend aus (HOFFMAN et al. 1962, HEDRICK et al. 1999a).

Aufgrund der globalen Bedrohung von Salmoniden-Populationen ganzer Gewässersysteme durch *Myxobolus cerebralis*, wurden zahlreiche Versuche unternommen, um eine weitere Ausbreitung einzudämmen und bestehenden Befall zu begrenzen. So wurden allein von 1965 bis 1984 im Staat Kalifornien 660 Tonnen Fisch und 2,3 Mio. Brütlinge aus kontaminierten Zuchtbetrieben gekeult (MODIN 1998). Weitere radikale Maßnahmen zur Eingrenzung stellten in den siebziger Jahren Chlorid-Desinfektionen ganzer Gewässerabschnitte dar (HNATH 1988). In jüngster Zeit ist man dazu übergegangen, durch Habitatanpassungen den Lebensraum für den oligochaeten Wirt einzuschränken und damit den Entwicklungszyklus zu unterbrechen. Dafür empfiehlt man heute im Bereich der Zuchtbetriebe sedimentarme, und damit vorzugsweise betonierte Wasserleitungen und Teichanlagen, Grundwasser- oder Quellspeisung der Anlagen und regelmäßige Trockenlegung und Desinfektion (NICKUM 1999).

2.1.3. Ätiologie, Entwicklungszyklus und Morphologie

Die Drehkrankheit der Salmoniden wird durch *Myxobolus cerebralis* ausgelöst. Dieser ist als bislang pathogenster Vertreter für Fische aller 1.350 charakterisierten Parasiten vom Stamm der Myxozoa (LOM & DYKOVÀ 1992) bekannt. Der Entwicklungszyklus von *M. cerebralis* blieb noch lange nach der Entdeckung des Erregers unklar. Erst 1984 führten Untersuchungen von WOLF & MARKIW zur Entdeckung, dass der Entwicklung von *M. cerebralis* zwei Wirte und zwei Sporenstadien zugrunde liegen – Myxosporen, die vom Fisch freigesetzt werden und für *T. tubifex* infektiös sind, und Actinosporen, welche wiederum vom Oligochaeten ausgeschieden werden und für Salmoniden infektiös sind (MARKIW & WOLF 1983, WOLF & MARKIW 1984, WOLF et al. 1986). Die Ergebnisse wurden nachfolgend von EL-MATBOULI & HOFFMANN (1989) durch die Bestätigung des Zweiwirtzyklus von *M. cerebralis* sowie die Beschreibung weiterer Entwicklungszyklen der Myxozoa konkretisiert. Aus diesen Studien leitet sich das bis heute gültige Verständnis über den Entwicklungszyklus von *M. cerebralis* ab. Die Entwicklung von *M. cerebralis* in beiden Wirten ist in Abbildung 2 nach EL-MATBOULI & HOFFMANN (1998) schematisch dargestellt.

Infektiöse Myxosporen entwickeln sich im Knorpelgewebe von erkrankten oder lediglich infizierten Salmoniden und werden, hauptsächlich *post mortem*, nach erfolgter Lysis des umgebenden Fischgewebes, in die Umwelt freigesetzt. Neuere Untersuchungen von NEHRING et al. (2002) an Bachforellen und auch Studien von EL-MATBOULI (persönliche Mitteilung) an Regenbogenforellen geben Hinweise darauf, dass eine Freisetzung von Sporen auch bereits *prä mortem* erfolgen könnte. Weitere Verbreitungsmöglichkeiten ergeben sich durch die

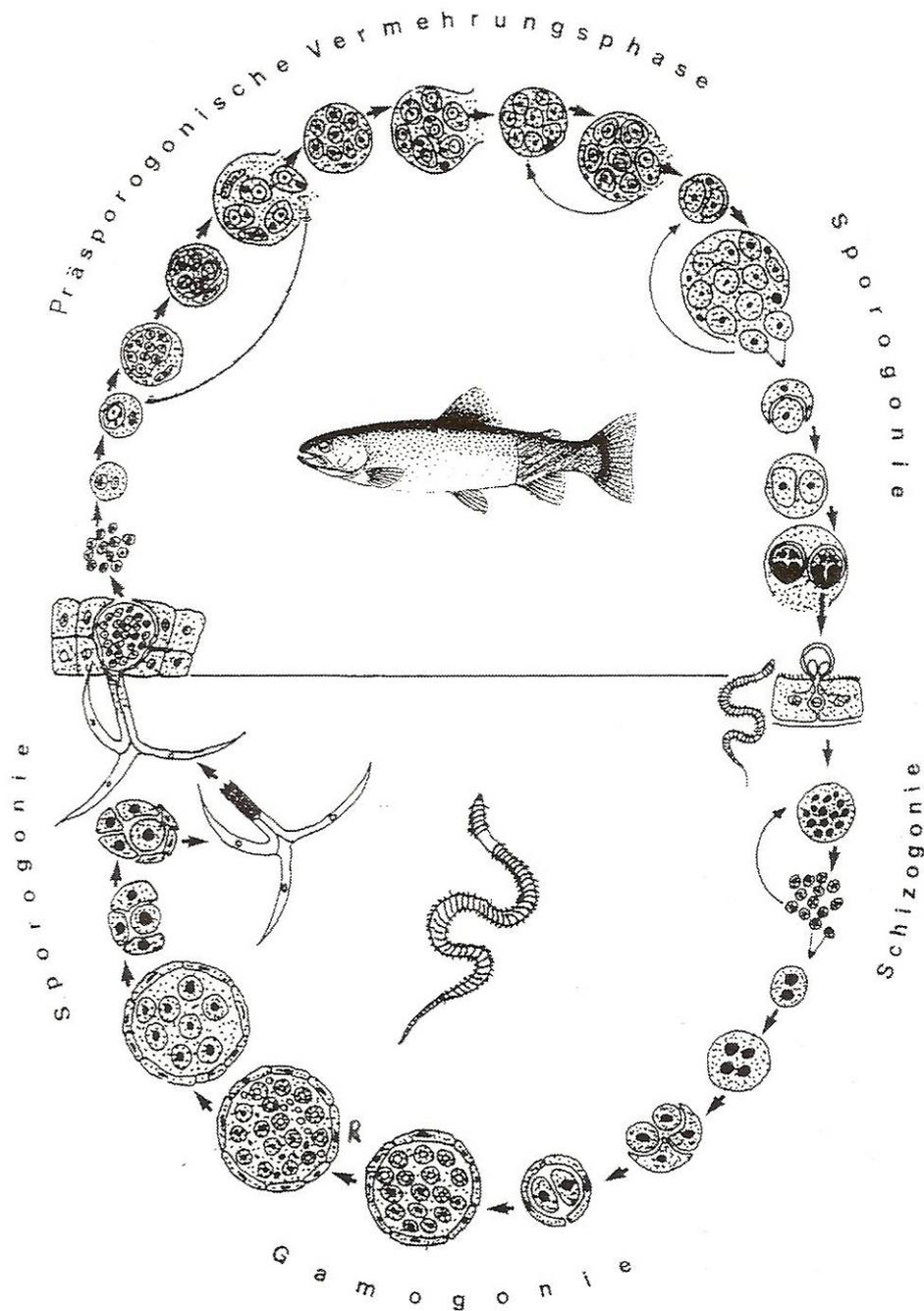


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis*. Nach EL-MATBOULI et al. (1998)

außergewöhnliche Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen. So deuten Passageversuche von EL-MATBOULI & HOFFMANN (1991) darauf hin, dass Sporenmaterial, welches von Fisch-Konsumenten - Mensch, Raubfisch, Vogel oder von anderen Tieren - aufgenommen wird, einer weiten Verschleppung unterliegen kann. Denn, eine bedeutende Beeinträchtigung der Infektiösität der Sporen durch die Intestinal-Passage konnte nicht beobachtet werden. Für die weitere Entwicklung von *M. cerebralis* muss nach dem Freiwerden eine Aufnahme durch Vertreter einer empfänglichen Linie von *Tubifex tubifex* erfolgen (WOLF et al. 1986, EL-

MATBOULI & HOFFMANN 1989). KERANS et al. (2004) machten deutlich, dass ähnlich wie bei *O. mykiss*, auch bei *T. tubifex* linienspezifische Unterschiede in der Empfänglichkeit für *M. cerebralis* vorliegen. Die Infektion der Oligochaeten erfolgt oral durch die zufällige Aufnahme der Myxosporen mit der Nahrung aus dem Sediment. So in den Wirt gelangt, schleudern die Sporen, vermutlich ausgelöst durch chemische und mechanische Reize, ihre Polfilamente aus und adherieren damit am Darmepithel des Oligochaeten (EL-MATBOULI & HOFFMANN 1998). Die Sporenschalen öffnen sich entlang der Nahtlinie und der generative, zweikernige Amöboidkeim von *M. cerebralis* dringt zwischen die Darmepithelzellen des Oligochaeten ein. Dort durchläuft er eine komplexe dreiphasige Entwicklung mit Schizogonie, Gametogonie und Sporogonie. Der Oligochaete *Tubifex tubifex* stellt daher im Zyklus von *M. cerebralis* den Endwirt dar.

Die Schizogonie umfasst multiple vegetative Vermehrungsphasen, in denen die beiden Kerne zuerst mehrere Teilungsschritte vollziehen, um dann als vielkernige Zellen, über Plasmotomie, die Einkernigkeit wiederherzustellen. Das Resultat dieser ersten Vermehrungsstufe sind zahlreiche einkernige Zellen, die interzellulär das Darmepithel des Wurms durchwandern. Während einige der einkernigen Zellen oder Einzellstadien weiteren Kern- und Zellteilungen unterliegen (wobei zusätzliche viel- und einkernige Entwicklungsstadien entstehen), bilden jeweils zwei andere einkernige Stadien ein Zweikernstadium durch Plasmogamie. Diese sind dann ab dem 25. Tag *post infectionem* zwischen den Darmepithelzellen im Endwirt nachweisbar (EL-MATBOULI 1996).

In der Gamogonie teilen sich zunächst die Kerne der Zweikernstadien je einmal, so dass ein Vierkernstadium entsteht. Im Anschluss kommt es zur erneuten Teilung dieser Zellen und zwar in der Gestalt, dass zwei Zellen beginnen, die anderen beiden zu umschließen. Daraus resultieren die entsprechend 60-120 Tage nach der Infektion erkennbaren, vierzelligen Pansporozysten, welche aus zwei äußeren somatischen Hüllzellen und zwei inneren generativen Zellen (α und β) bestehen. Die letztgenannten Zellen durchlaufen drei mitotische Teilungen, so dass sich 16 diploide Gameten entwickeln (JANIZEWSKA 1957, MARQUÈS 1984). Die beiden Hüllzellen teilen sich zweimal mitotisch. Darauf folgend reduzieren sich die 16 diploiden Gameten mittels Meiose zu 16 haploide Gameten mit 16 Polkörpern. Um acht diploide Zygoten zu erhalten, verschmilzt im Weiteren je ein haploider α - mit einem β -Gameten. Diese sind fortwährend von acht somatischen Hüllzellen umgeben (EL-MATBOULI & HOFFMANN 1998).

Ausgehend von den Zygoten, beginnt nun die letzte Entwicklungsphase im Oligochaeten, die Sporogonie. Hierbei teilt sich jede Zygote zweimal mitotisch und bildet so ein Vierzellstadium. Drei dieser Zellen sind peripher lokalisiert, während eine, die den Ursprung des Amöboidkeims der entstehenden Spore darstellt, zentral angeordnet ist. Die drei äußeren Zellen durchlaufen zunächst eine mitotische Teilung, wodurch die Vorläuferzellen der drei Schalenzellen und der drei Polkapselzellen entstehen. Im Anschluss bildet die zentrale Zelle nach sechs mitotischen Teilungen das 64-zellige Sporoplasma der reifen Triactinomyxon Spore. Diese Actinosporen gelangen nach der Ruptur der Pansporozystenwand in das Darmlumen von *Tubifex tubifex*, werden dann über den Kot in das Wasser ausgeschieden und entfalten sich schließlich, osmotisch bedingt, zu der ihnen charakteristischen Ankerform (EL-MATBOULI 1988, EL-MATBOULI & HOFFMANN 1989, EL-MATBOULI et al. 1992). Die Entwicklungszeit beträgt laut Untersuchungen von EL-MATBOULI & HOFFMANN (1998) ca. 90 Tage bei einer konstanten Wassertemperatur von $15 \pm 2^\circ\text{C}$. Wie unter Laborbedingungen ermittelt, werden TAM-Sporen dann mehr als ein Jahr lang mit variierender Intensität ausgeschieden, die das Maximum nach ca. 130 Tagen erreicht (MARKIW 1986).

Aufgrund der charakteristischen Sporenfortsätze, gebildet durch die Schalenzellen, flotieren diese Sporen frei im Wasser und werden passiv in bewegten Gewässern transportiert. Chemische und mechanische Reize werden für die spezifische Wirtserkennung, Adhäsion und Invasion verantwortlich gemacht (EL-MATBOULI et al. 1999). Empfängliche Fischarten infizieren sich mit *Myxobolus cerebralis* vorwiegend transkutan, jedoch liegen durchaus auch Berichte über orale Sporenaufnahme in Form von infizierten Tubifiziden vor (WOLF & MARKIW 1984, EL-MATBOULI & HOFFMANN 1989). Die Haupt-Eintrittspforte wird an den sekretorischen Öffnungen der Epidermisschleimzellen gesehen. Diese befinden sich entlang der gesamten Epidermis und sind ebenso in der Schleimhaut der Maulhöhle zu finden. Vermutlich chemotaktisch gesteuert, kommt es an den sekretorischen Öffnungen zur Extrusion der Polfilamente und dadurch zur Adhäsion der Sporen in diesem Bereich. Die adhärierte Spore bricht apikal im Bereich der Polkapseln auf und entlässt den generativen, 64-zelligen Amöboidkeim in die sekretorische Öffnung, wodurch diesem die Penetration der Epidermis ermöglicht wird. Im Weiteren unterliegen die Keimzellen einer zweiphasigen Entwicklung im Zwischenwirt (Fisch), welche durch eine präsporogonische und eine sporogonische Vermehrungsphase (Sporogonie) geprägt ist. Die Erkenntnisse über diese Entwicklung entstammen den Befunden von MANDOK (1993), EL-MATBOULI et al. (1995) und EL-MATBOULI (1996).

In der Epidermis wandert der kompakte Amöboidkeim zunächst ca. 60 Minuten *post expositionem* (p.exp.) interzellulär umher und lässt sich lichtmikroskopisch schon nach fünf bis zehn Minuten p.exp. nachweisen. Nach zwei bis vier Stunden kommt es zur Lysis der die Keimzellen umhüllenden Zelle und die diploiden Amöboidkeimzellen werden in das epidermale Interstitium frei. Darauf folgend penetriert jede einzelne Keimzelle eine anliegende Wirtszelle in der Epidermis, der Maulschleimhaut oder des respiratorischen Epithels. Die sich nun intrazellulär befindlichen Keimzellen vollziehen eine Zellteilung, wodurch eine sekundäre Zelle entsteht, die von einer Primärzelle umschlossen ist. Auch diese Sekundärzelle teilt sich wiederholt mitotisch, woraus zahlreiche Doppelzellstadien entstehen, die ca. sieben Stunden p.exp. mikroskopisch nachweisbar sind. Nach Ruptur der Primärzelle gelangen diese Stadien in das Zytoplasma der Wirtszelle, die zum Teil lysiert wird. Übrige Stadien werden nach Aufreißen der Wirtszellmembran in das Interstitium frei und penetrieren nun entweder weitere Epithelzellen oder wandern tiefer in die Dermis und Subkutis ein, so dass spätestens nach 24 Stunden keine Entwicklungsstadien mehr in der Epidermis nachweisbar sind (EL-MATBOULI et al. 1995). Eine weitere Vermehrung der Doppelzellstadien, sowohl derer in benachbarten Wirtszellen als auch solcher im Interstitium, erfolgt schließlich durch endogene Teilung der Sekundärzellen. Diese neuen Doppelzellstadien werden erneut frei und wandern ca. vier Tage p.exp. über das Interstitium des peripheren Nervensystems in Richtung Ganglien und Zentralnervensystem. Hierbei vermehren sich diese Doppelzellstadien weiter durch endogene Teilung. Im Verlauf können die Stadien zwischen dem sechsten und vierzehnten Tag p.exp. im Rückenmark und anschließend zwischen dem 16. und 24. Tag p.exp. im Gehirn gefunden werden. Von dort aus wandern sie in das benachbarte Knorpelgewebe, vorwiegend in den Kopf- und Wirbelsäulenbereich, in welchem sich nachfolgend (ab dem 20. Tag p.exp.) die Sporogonie vollzieht. Hierbei setzt ein Wachstum der Primärzellen und die multiple Teilung ihrer fortan vegetativen Kerne ein. Die Sekundärzellen des Stadiums teilen sich ebenfalls und bilden generative Kerne. Dieses mehrzellige Parasitenstadium wird auch als Plasmodium bezeichnet und ist 40 Tage p.exp. im betroffenen Knorpelgewebe histologisch nachweisbar (EL-MATBOULI et al. 1995). Der beschriebene Zyklus kann sich mehrmals wiederholen, bis es zur Verschmelzung einzelner Zellen kommt (EL-MATBOULI et al. 1995). Hierbei umhüllt eine somatische Zelle, die auch *enveloping cell* oder Perizyte genannt wird, eine generative Zelle (Sporoblast-Zelle). Dieses Stadium bezeichnet man als Pansporoblast. Nach wiederholter mitotischer Teilung der Sporoblast-Zellen bilden die resultierenden zwölf diploiden Zellen den Ursprung von zwei *Myxobolus cerebralis* Myxosporen. Ausgehend von je zwei diploiden Ursprungszellen bilden sich Schalenzellen, Amöboidkeim und Polkapseln (HALLIDAY 1973b).

Nach EL-MATBOULI et al. (1992) ist ein histologischer Nachweis dieser infektiösen Sporenstadien ab dem 90. Tag p.exp. möglich.

Wie oben beschrieben, bildet *M. cerebralis* im Laufe des Entwicklungszyklus zwei morphologisch und funktionell unterscheidbare Dauerstadien aus. In den Abbildungen 3 und 4 sind die Morphologien der einzelnen Sporen schematisch illustriert.

M. cerebralis Myxosporen, die im Knorpelgewebe des Fisches heranreifen, haben in der Aufsicht eine runde bis ovale Gestalt. Aus lateraler Sicht sind sie jedoch linsenförmig. Ihre Maße betragen je nach Reifegrad 7,4 bis 9,7 μm in der Länge, 7,0 bis 10,0 μm in der Breite und 6,2 bis 7,4 μm in der Dicke. An den Sporen sind morphologisch unterteilbar: 1.) zwei Schalenzellen, die im Bereich des Äquators, eine Nahtlinie bildend, zusammenhaften, 2.) zwei Polkapseln, welche

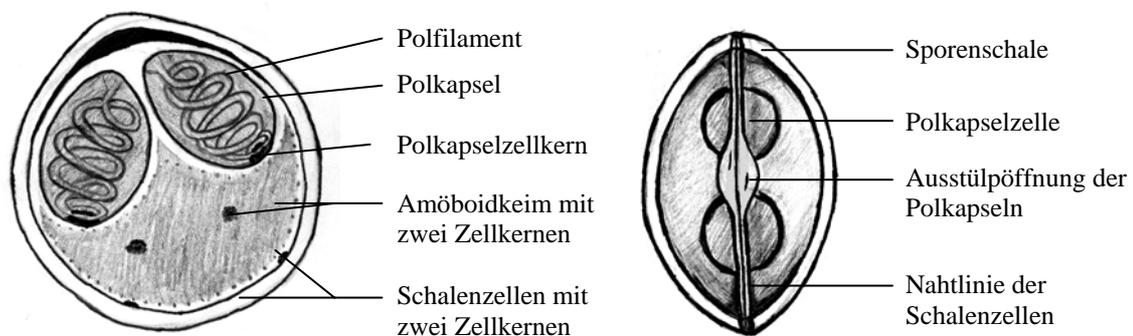


Abbildung 3 Morphologische Darstellung einer Myxospore von *Myxobolus cerebralis* nach EL-MATBOULI (1996).

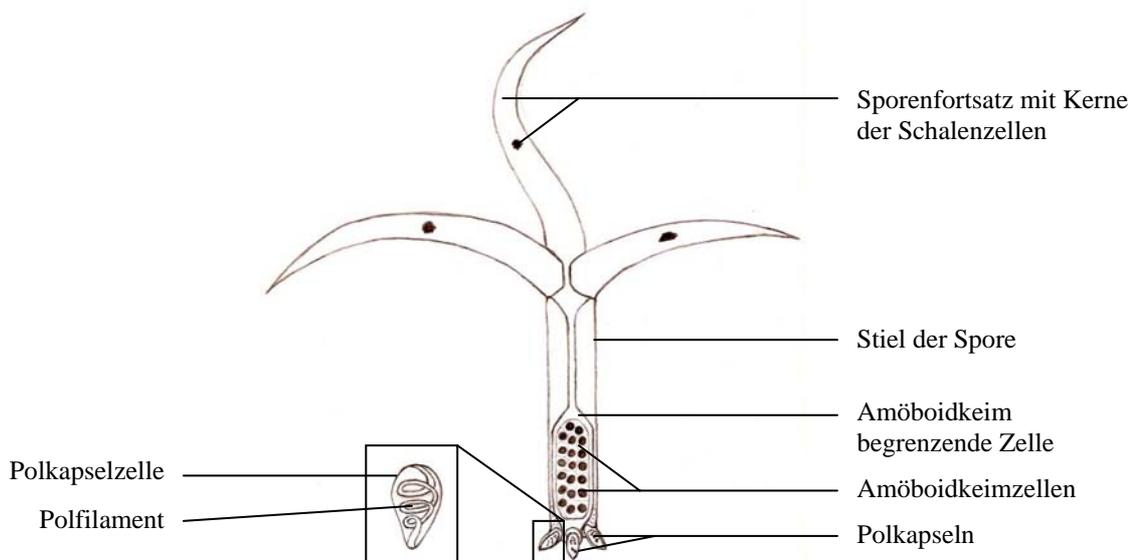


Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Triactinomyxon-Spore von *Myxobolus cerebralis* nach EL-MATBOULI (1996).

ihre jeweils ein Polfilament enthalten, das in ca. sechs Schleifen spiralförmig gewunden ist und 3.) ein generativer Amöboidkeim, der zwei Zellkerne enthält (LOM & HOFFMAN 1971). Diese Myxosporen, die nach dem Freiwerden in das umliegende Sediment gelangen, zeichnen sich durch ihre außergewöhnliche Tenazität aus. So behalten laut HOFFMAN & PUTZ (1969) die Sporen ihre Infektiosität auch nach 30-jähriger Lagerung im Flusssediment. HOFFMAN (1977) und WOLF & MARKIW (1982) konnten eine starke Resistenz gegenüber kalorischen Einflüssen zeigen. So verloren die Myxosporen in einer Temperaturspanne von -20 °C bis +66 °C nicht an Infektiosität.

Das zweite Sporenstadium umfasst die im Darmepithel von *T. tubifex* entwickelten Triactinomyxon-Sporen. Dieses Sporenstadium wurde aus Ermangelung der detaillierten Kenntnisse über den Zyklus von *M. cerebralis* aufgrund der charakteristischen Sporenfortsätze der Klasse der Actinosporea zugeordnet. Diese Fortsätze der Sporenschale befähigen Triactinomyxon-Sporen in Wasser zu flotieren und so zur passiven Fortbewegung. Diese drei, jeweils ca. 194 µm langen Fortsätze schließen sich an einen sogenannten Sporenstiel (ca. 145 µm) an, welcher den generativen Amöboidkeim enthält. Dieser besteht wiederum aus 64 Amöboidkeimzellen. Apikal der Spore befinden sich drei Polkapseln, die ihrerseits jeweils ein spiralförmiges Polfilament enthalten, welches nach Ausschleudern eine Haftung der Spore am Wirtsgewebe ermöglicht (EL-MATBOULI et al. 1995). TAM-Sporen zeichnen sich durch eine vergleichsweise geringe Tenazität aus. HEDRICK et al. (1998) berichten von einer Überlebenszeit der Sporen von ca. sieben Tagen bei Wassertemperaturen von +7 °C, wobei schon geringe Temperatursteigerungen auf +12,5 °C lediglich eine Überlebenszeit von drei bis vier Tagen ermöglichen.

Trotz offensichtlicher, morphologischer Unterschiede von Myxosporen und Triactinomyxonsporen von *M. cerebralis* konnten HAMILTON & CANNING (1988) und MARKIW (1989) mittels FITC-markierter Antikörper eine Kreuzreaktivität gemeinsamer Antigene feststellen. Weitere histologische Arbeiten geben jedoch Hinweise für deutliche Unterschiede in der Antigenpräsentation. So fand STIPPL (2003) eine variierende Präsentation von Glykosylierungsmustern in den einzelnen Sporenstadien.

2.1.4. Symptomatik und Pathogenese

Wie schon vormals erwähnt sind neben der Regenbogenforelle noch weitere Arten der Salmoniden - wenn auch mit abgeschwächter Intensität - empfänglich für eine Infektion mit *M.*

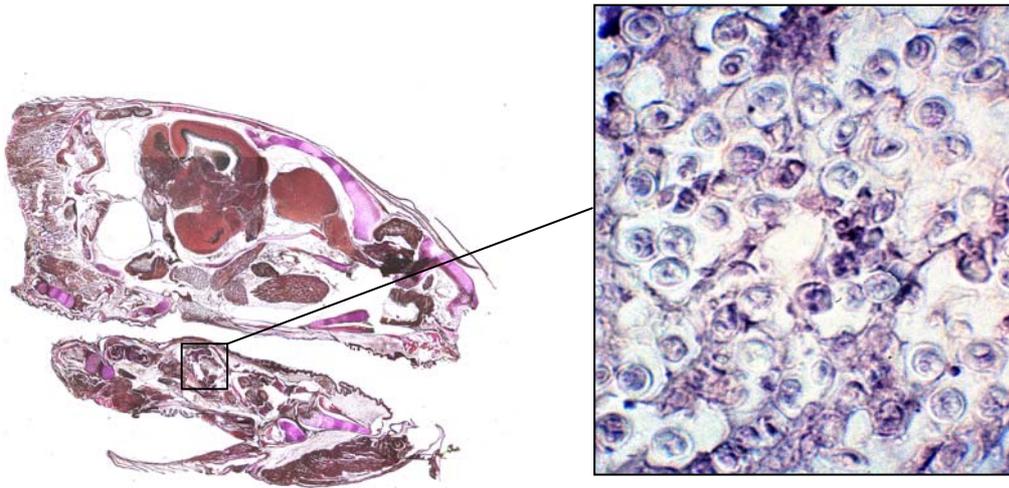


Abbildung 5 Histologischer Längsschnitt durch den Kopf einer infizierten Regenbogenforelle; 5 μ m, Paraffin, Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Vergr.: 5x
Projektion: In Knorpelgewebe gebettete Myxosporen, Vergr.: 400x.

cerebralis (HALLIDAY 1976, EL-MATBOULI et al. 1992). Eine geringere Penetrationsrate exponierter TAM-Sporen geht hierbei mit einer reduzierten Ausprägung klinischer Symptome einher. Auch bei Regenbogenforellen sind Abstufungen in der Intensität der beobachteten Krankheitserscheinungen beschrieben. So hängt die spätere Klinik in entscheidendem Maße vom Alter und der Expositionsdosis mit TAM-Sporen ab (HEDRICK et al. 2000, RYCE et al. 2004). Da das Knorpelgewebe Zielgewebe im Fisch ist, stellt die Drehkrankheit charakteristischer Weise ein Problem bei jungen und vorgestreckten Fischen dar. Je älter die Fische sind, und je geringer der Knorpelanteil im Stützskelett, desto schwächer werden die Krankheitssymptome bei Infektion (HOFFMAN et al. 1962, PUTZ & HOFFMAN 1966). So erreicht man zwar bei einjährigen Forellen durch Dauerexposition mit hohen Dosen von Triactinomyxon-Sporen eine Infektion, nicht jedoch die Ausprägung klinischer Symptome (MARKIW 1992). Ältere Tiere und auch nicht erkrankte Salmoniden müssen daher als potentielle Überträger betrachtet werden (SCHÄPERCLAUS 1931, EL-MATBOULI et al. 1992). Der Name „Drehkrankheit“ leitet sich offenkundig von einem der markanten Kardinalsymptome der Erkrankung ab. So fallen erkrankte Tiere ca. ab dem 60. Tag p.exp. durch spiralförmige Drehbewegungen auf, die durch äußere Reize auslösbar sind. Desweiteren kommt es an der kaudalen Körperpartie zu einer dunklen Verfärbung der Haut (PLEHN 1905, HALLIDAY 1976, SCHÄPERCLAUS 1990). Tiere, die zum Infektionszeitpunkt einen hohen Knorpelanteil im Skelett haben, zeigen zudem deutliche Deformationen an Kopf und Wirbelsäule. Die Genese der Symptomatik ist bei Weitem noch nicht restlos aufgeklärt. Man beobachtete, dass der Befall mit Sporen zu einer breitflächigen

Zerstörung des juvenilen Knorpels (BECHARA et al. 2003) und zu einer nachfolgenden Störung der enchondralen Ossifikation führt. Durch immunhistochemische Studien identifizierten MORRIS et al. (2004) ein Antigen, welches gleichzeitig bei *Tetracapsuloides bryosalmonae* exprimiert wird und das Kopfgewebe von den Myxosporen aus infiltriert. Eine Beteiligung dieses Antigens oder anderer molekularer Faktoren bei der Ausbildung der unregelmäßigen Knorpel-Knochen-Wucherungen sind bis dato noch ungeklärt. Bisweilen geht man jedoch von einer Beteiligung parasitärer Proteasen aus (KELLEY et al. 2003, 2004), die den vorläufigen Knorpel um die Sporen lysieren. Die an „whirling disease“ erkrankten Fische bilden so, ausgehend von massiver Sporen-Proliferation, deformierte Schädel, missgebildete Kiefer (Abbildung 5), verkürzte Kiemendeckel und verkrümmte Wirbelsäulen aus (PLEHN 1905, SCHÄPERCLAUS 1931, HOFFMAN et al. 1962). Diese Skelett-Missbildungen werden darüber hinaus auch für weitere Symptome verantwortlich gemacht. So versucht man die Ursache der Schwarzfärbung durch deformierte Knorpelanteile der Wirbelsäule zu erklären, die durch den mechanischen Druck auf pigment-motorische Neuronen ein Reizzustand hervorrufen, der die Pigmentzellen der innervierten kaudalen Körperpartie mit Dunkelfärbung reagieren lässt (SCHÄPERCLAUS 1990). Auch bei der Genese der charakteristischen Drehbewegungen geht man von Skelettdeformationen als Ursprung aus. Hier vermutete man zunächst, dass Knorpelzubildungen im Bereich des Vestibularorgans, und damit eine Druckschädigung desselben, Ursache des pathologischen Schwimmverhaltens seien (PLEHN 1905, HOFFMAN & DUNBAR 1961). Diese These konnte jedoch von ROSE et al. (2000) eindrucksvoll dadurch widerlegt werden, dass Versuchstiere mit gezielt zerstörtem Vestibularorgan völlig von drehkranken Fischen abweichende Verhaltensmuster zeigten. ROSE et al. (2000) fanden vielmehr histologische Hinweise für induzierte granulomatöse Entzündungen im Bereich des Schädels und der Wirbelsäule. Diese Entzündungen umfassten den Perineuralraum und manifestierten sich vorwiegend dort, wo eine Infiltration des betroffenen Wirbels durch *M. cerebralis* zu erkennen war. Aus diesen Umfangsvermehrungen resultieren jeweils ringförmige Einschnürungen des Wirbelkanals und kranial auch des Hirnstamms. Auf diesen Befunden basierend, formulierten ROSE et al. (2000) ihre Theorie über die Genese der Drehbewegungen erkrankter Regenbogenforellen. Darin gehen sie von einem plötzlichen sensorischen Stimulus aus, beispielsweise dem Kontakt mit einem anderen Fisch, einem lauten Geräusch, oder einem visuellen Reiz, welcher retikulospinale Neuronen triggert und dadurch den Fisch reaktiv zur Flucht vor dem Stimulus veranlasst. Bei einem drehkranken Fisch werden nun, ausgelöst durch die Fluchtbewegungen, fortwährend Reize an den Rückenmarkseinschnürungen gesetzt, die wiederum die Fortführung der Bewegung zur Folge haben. Ein Durchbrechen der Reaktionskette

ist somit nur durch einen kompetitiven Stimulus oder durch ein endogenes neuronales Ereignis möglich.

Der Befall eines Fisches mit *M. cerebralis* ist nicht unmittelbar letal. Aus den vorher dargelegten Gründen, ergibt sich jedoch eine massive Störungen bei der Futteraufnahme. Forellen mit deutlichen Symptomen, vor allem mit starken Deformationen im Kieferbereich, zeigen geringere Zuchtleistungen, kümmern und verenden schließlich an Unterernährung. Eine weitere Ursache für gravierende Verluste, vor allem in Wildgewässern, ist die Beeinträchtigung des Fluchtverhaltens. So werden betroffene Tiere bevorzugt Opfer von entsprechenden Fressfeinden (PLEHN 1905). Unter Laborbedingungen beobachteten EL-MATBOULI et al. (1992), dass die Ausprägung der Symptomatik bezüglich Drehverhalten und Schwarzfärbung mit fortschreitendem Alter der betroffenen Fische reversibel ist. Knöcherne Deformationen bleiben jedoch zeitlebens bestehen.

2.1.5. Diagnose und Therapie

Das typische Krankheitsbild der Drehkrankheit lässt schon adspektorisch einen Verdacht auf eine Infektion mit *M. cerebralis* zu. So können die charakteristischen Symptome bereits 60 Tage post infektionem beobachtet werden (WOLF & MARKIW 1975). Für eine definitive Diagnostik ist jedoch ein eindeutiger Nachweis der Myxosporen von *M. cerebralis* im Knorpelgewebe erforderlich. Dieser kann entweder mikroskopisch, immunologisch oder biochemisch erfolgen. Für den morphologischen Nachweis wird routinemäßig natives Knorpelmaterial zerkleinert und zur Lichtmikroskopie auf einem Objektträger ausgestrichen (HOFFMAN et al. 1968). Um Sporen deutlich sichtbar zu machen, empfiehlt SCHÄPERCLAUS (1931) die histologische Färbung von Schnittpräparaten nach Giemsa oder mittels Methylenblau. Der Einsatz quantitativer Analysen erforderte jedoch die Erfassung möglichst sämtlicher Sporen in einem Gewebeabschnitt. Daher entwickelten MARKIW & WOLF (1974, 1980) und O'GRODNICK (1975) Methoden zur Anreicherung der im Fischgewebe eingebetteten Myxosporen. So werden nach vorherigem, enzymatischen Verdau des Fischgewebes die Sporen in einer Planktonzentrifuge konzentriert. Die Identifikation der Sporen kann spezifisch über die Indirekte Fluoreszenzantikörpertechnik (IFAT) (WOLF & MARKIW 1975), über den serologischen Nachweis (GRIFFIN & DAVIS 1978) und über Immunperoxidase-gekoppelte Antikörper (HOFFMANN et al. 1991) erfolgen. Molekularbiologische Nachweisverfahren wurden von ANDREE et al. (1998) (nested PCR) und BALDWIN & MYKLEBUST (2002) (single round PCR) entwickelt, um bereits zwei Stunden p.exp. genomische DNA von *M. cerebralis* zu detektieren. Weitere Verfahren wurden von

KELLEY et al (2004) evaluiert (real-time PCR, CAVENDER et al. 2004). Vielfache Versuchsansätze erforderten das Sichtbarmachen von Entwicklungsstadien während der Migration im Fisch als auch im Oligochaeten. Eine geeignete Markierungsmöglichkeit dafür stellt die Technik der *in Situ* Hybridisierung dar (ANTONIO 1999).

Diagnostik, welche allein auf der auftretenden Symptomatik basiert, kann in einzelnen Fällen zu Fehldiagnosen führen. So tritt beispielsweise bei Enteritiden, bei der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) und bei der Infektiösen Pankreasnekrose (IPN) abnormes Schwimmverhalten auf (PLEHN 1905, HALLIDAY 1973a). HALLIDAY (1973b) beschreibt, dass Skelettdeformationen ebenfalls bei Fischen auftreten können, die unter haltungs- und ernährungsbedingten Mängeln aufwachsen. Neben zusätzlichen genetischen Ursachen, kommen dafür auch Ascorbinsäure- oder Tryptophanmangel (WOLF et al. 1981) und die Infektion mit *Flexibacter psychrophila* in Betracht (MARGOLIS et al. 1996). Zusätzlich birgt die native, mikroskopische Diagnostik die Verwechslungsmöglichkeit mit Sporen von *Myxobolus kisutchi*, *Myxobolus arcticus* und *Myxobolus insidiosus*. Diese sind zwar ursprünglich nicht im Knorpelgewebe lokalisiert, können aber bei Kontamination durch Nerven- und Muskelgewebe fälschlicherweise in den Ausstrich gelangen. Als Methode der Wahl bleibt für ungeübte Untersucher somit der spezifische Nachweis mittels PCR.

Seit dem ersten Auftreten der Drehkrankheit und den damit einhergehenden ökonomischen Folgen in den Teichwirtschaften bemüht man sich weltweit um die Entwicklung erfolgreicher Therapie- und Prophylaxemöglichkeiten. SCHÄPERCLAUS (1931) postulierte, dass eine erfolgreiche Bekämpfung von *M. cerebralis* nur durch das Keulen und die unschädliche Beseitigung aller infizierter Fische zu bewerkstelligen sei. Dies zog zweifelsohne ungeheure wirtschaftliche Verluste für betroffene Betriebe nach sich. Erst WOLF & MARKIW (1982) fanden heraus, dass lebensmitteltechnische Zubereitungsverfahren, wie das Räuchern, eine Inaktivierung der Myxosporen zur Folge haben. Spätestens nach der Entdeckung der Zweiwirtigkeit von *M. cerebralis* gewannen begleitende hygienische Maßnahmen zunehmend an Bedeutung. So wurde von SCHÄPERCLAUS (1931) und HOFFMAN et al. (1962) schon früh die Reinigung und Desinfektion der Teichanlagen und Bruthäuser mit Branntkalk, Natronlauge oder Chlorkalk empfohlen. Die Alkalität dieser Substanzen bewirkt 1. die Reduktion der Oligochaeten-Population in der behandelten Teichanlage und 2. ein Ausschleudern der Polfilamente der vorhandenen Triactinomyxon-Sporen, so dass diese ihre Infektiosität verlieren (PLEHN 1905, HOFFMAN & HOFFMAN 1972). WAGNER et al. (2003) untersuchten weitere physikalische und chemische Möglichkeiten, die Infektiosität der Triactinomyxonsporen zu beeinflussen. Ein sinnvolles Prozedere für die Sanierung eines Betriebes umfasst also die

unschädliche Beseitigung infizierter Fische, gründliche Desinfektionsmaßnahmen und die Wiederaufzucht mit spezifisch pathogenfreier Brut (NOGA 1996). Für den laufenden Betrieb einer Zuchtanlage erwiesen sich betonierte Teiche vorteilhafter als Naturteiche. Diese bieten deutlich weniger Lebensgrundlage für Oligochaeten und erlauben damit eine Reduktion des Infektionsdruckes. In Wildwasser-gespeisten Betrieben gelangen *Triactinomyxon*-Sporen über die Zuflüsse in die Teichanlage. Untersuchungen von HOFFMAN (1974, 1975), HEDRICK et al. (2000) und NEHRING et al. (2003) zeigten, dass eine wirksame Dekontamination des Zuflusswassers durch Filter und UV-Licht erreicht werden kann.

Die Anzahl an prophylaktischen Empfehlungen sollte nicht über die Tatsache hinwegtäuschen, dass für die Therapie erkrankter Fische noch keine ausreichenden Kenntnisse vorhanden sind. Zwar deuten erste therapeutische Versuche mit TNP-470 und Fumagillin auf eine destruktive Beeinflussung der Sporenreifung im Fisch hin (SCHOTT 2002), jedoch ist noch viel Grundlagenforschung notwendig, um spezifische Therapieansätze zu ermöglichen.

2.2. *Lektine und Glykane*

2.2.1. Die Rolle des Lektin-Glykan-Erkennungssystems bei der Pathogenese von Parasiten

Die Möglichkeit einer Adhäsion ist eine elementare Bedingung für das Überleben von Krankheitserregern, unabhängig ob viralen, bakteriellen oder parasitären Ursprungs. Die Wirtserkennung und, darauf folgend, die Adhäsion an spezifische Wirtszellen sind die ersten Schritte für eine erfolgreiche Infektion. Schon zu Beginn der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurden Lektine und Glykane als Bestandteile eines wechselseitigen Erkennungssystems beschrieben. Die ersten Versuche diesbezüglich wurden von DUGUID et al. (1955) durchgeführt. Sie zeigten, dass die Agglutination von Erythrozyten durch *Escherichia coli* nach Zugabe von Mannose gehemmt werden konnte. Dies führten sie auf eine Beteiligung von Lektinen zurück. Die Voraussetzung, dass eine bakterielle Infektion stattfinden kann, scheint also grundlegend von Lektin-Glykan-Wechselwirkungen beeinflusst zu sein. Natürlich darf diese Interaktion nicht als unidirektionaler Mechanismus verstanden werden. Vielmehr spielen umgekehrt Wechselwirkungen von Wirts-Lektinen mit parasitären Glykanen eine ebenso große Rolle (LOUKAS & MAIZELS 2000). Um also ein Parasit-Wirt-System auf der Basis der Glykanerkennung näher charakterisieren zu können, ist es unerlässlich, Glykane und Oberflächen-assoziierte Lektine sowohl im Wirtsorganismus als auch bei den Parasiten zu untersuchen.

In den vergangenen Jahrzehnten wurden zahlreiche Studien bei einzelligen Parasiten durchgeführt, die zur Aufklärung ihrer jeweils individuellen Infektionsstrategie beitrugen. So vermuteten GAZZINELLI et al. (1991), dass die histochemisch nachgewiesene Anhäufung von Oberflächen-assoziierten Mannose- und Glukose-Epitopen in *Trypanosoma brucei* eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit dem Wirt spielt. Ebenfalls aus *T. brucei* charakterisierten BORST et al. (1996) und FERGUSON (1997, 1999) sog. Various Surface Glycoproteins (VSG), die es dem Parasiten durch Variation ermöglichen, der Wirtsantwort zu entgehen (BORST et al. 1996, RUDENKO et al. 1998). Aber nicht nur die Oligosaccharid-Komponenten der Erkennungsmöglichkeiten von *T. brucei* wurden beleuchtet, sondern auch Zucker-bindende Aktivitäten im Parasiten. So wurde in der trypomastigoten Form neben einer Transsialidase (SCHENKMAN et al. 1991, 1992) auch sogenanntes Penetrin (ORTEGA-BARRIA & PEREIRA 1991) nachgewiesen, das Bindungsaffinität zu Heparin und Heparansulfat aufweist. Penetrin wird eine bedeutende Rolle bei der Wirtszelladhäsion und -invasion zugesprochen (MING et al. 1993, ORTEGA-BARRIA & PEREIRA 1991). Es wird deutlich, dass Parasiten die Expression von Glykanen und eventuell auch von Lektinen, abhängig von ihrem Entwicklungsstand, adaptiv verändern können. Untersuchungen bei *Leishmania donovani* ergaben ähnliche Befunde. Diese präsentieren ein Lipophosphoglykan (LPG) an der Parasitenoberfläche, das ausschließlich im promastigoten Stadium aktiv ist und so die Invasion in die Wirtsmakrophagen vermittelt (TURCO & DESCOTEAUX 1992). Lektin histochemische Untersuchungen von JACOBSON (1994) zeigen, dass nur in der promastigoten Form, nicht jedoch in der infektiösen metazyklischen Form, die Bindung von *Arachis hypogaea* Agglutinin (PNA), das Monosaccharidspezifität für Galaktose besitzt, möglich ist. BUTCHER et al. (1992) charakterisierten darüber hinaus ein Heparin-bindendes Protein, dem sie in Parallelität zu *T. brucei* eine Beteiligung bei der Invasion der Wirtszelle zuweisen. Zudem zeigten Inhibitionstests mit Haptenzuckern und glykohistochemische Untersuchungen, dass die promastigote Form von *Leishmania braziliensis* N-Acetyl-D-Glukosamin-bindende Proteine auf der Oberfläche besitzt (HERNANDEZ et al. 1986, SCHOTTELIUS 1992). Eine Reihe weiterer parasitär lebender Organismen haben ähnliche molekulare Strategien entwickelt, wie beispielsweise *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* oder *Cryptosporidium parvum*. Für diese Übersicht sollen die beiden zuvor behandelten Spezies exemplarisch aufgeführt werden, um die Bedeutung des Erkennungssystems zwischen Parasit und Wirt und die entscheidende Beteiligung der Lektine und Glykane hervorzuheben (BUCHMANN & LINDENSTRØM 2002).

Wie bereits angedeutet sind die molekularen Mechanismen der Adhäsion, Invasion und Migration bei den Myxozoa und somit auch bei *Myxobolus cerebralis* noch weitgehend ungeklärt. Es liegen vorwiegend lektinhistochemische Studien zur Beschreibung der Glykosylierung vor. So untersuchten MUÑOZ et al. (2000) vier Myxosporea-Arten: *Sphaerospora dicentrarchi*, *Polysporoplasma sparisi*, *Zschokkella mugilis* und *Leptotheca sp.*. Die vier Arten zeigten ein unterschiedliches Bindungsverhalten gegenüber den eingesetzten Lektinen. Ein konstantes Glykosylierungsmuster innerhalb der Myxosporea liegt daher nicht vor. Zudem besitzen alle vier Arten unterschiedliche Wirtsfische, eine Anpassung an die jeweiligen Verhältnisse im Wirt ist möglicherweise eine naheliegende Vermutung. Im Fall von *M. cerebralis* ergeben sich aus Versuchen von STIPPL (2003) umfangreiche Ergebnisse bezüglich der Expression und Lokalisation der spezifischen Glykane. Mannose-enhaltende Glykane waren in allen Entwicklungsstadien und in allen morphologischen Kompartimenten der Sporenstadien vorhanden. N-Acetyl-D-Glukosamin, welches den monomeren Bestandteil des Chitins darstellt, wurde vorwiegend in den Polkapseln und den Amöboidkeimzellen lokalisiert. Die Präsentation von Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin variiert in Abhängigkeit des Zyklusstandes des Parasiten. Eine adaptive Expression der entsprechenden Glykane scheint bei *M. cerebralis* möglich zu sein. Interessante Befunde ergaben sich bei der Verwendung von PHA-E (*Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin): An Polkapseln und Amöboidkeimzellen, sowohl an freien Triactinomyxon-Sporen als auch an Myxosporen im Knorpelgewebe konnten dadurch komplexe N-Glykane nachgewiesen werden, die eine sogenannte „bisected“-Modifikation aufweisen. Da diese außergewöhnliche Oligosaccharidstruktur nicht im Fischgewebe nachzuweisen war, geht STIPPL (2003) davon aus, dass gerade diese Struktur eine potente Ansatzstelle für eine Immunantwort von *O. mykiss* bieten könnte. Wie oben beschrieben, interagieren die jeweiligen Sporenstadien von *M. cerebralis* einerseits mit den Darmepithelzellen von *Tubifex tubifex* und andererseits mit Epithelzellen, Nervengewebe und Knorpelgewebe von *Oncorhynchus mykiss*. Von Oligochaeten sind noch keine Daten über Glykanstrukturen oder Lektinaktivitäten im Darm bekannt. Gerade um auch die molekularen Mechanismen, die zur Infektion des Oligochaeten führen, verstehen zu können, wären weitere Untersuchungen diesbezüglich wünschenswert. Mit Blick auf den Fischwirt existieren umfangreiche Studien, die vorwiegend die Epidermis und den epidermalen Schleim charakterisieren. Studien von BUCHMANN (1998) und BUCHMANN & BRESCIANI (1998) wiesen darauf hin, dass der sezernierte Schleim neben Proteinen und Polypeptiden auch einen bedeutenden Anteil an Kohlenhydraten enthält. Zusätzlich berichtete BURKHARDT-HOLM (1997) von einem hohen Anteil an mit Galaktose- und N-Acetyl-D-Galaktosamin-Resten

glykosylierten Konjugaten in Schleimzellen der Epidermis. Schleimzellen des Kiemenepithels enthielten zusätzlich noch signifikante Glykosylierungen mit Mannose und Fukose, was die Autorin der Osmoregulation, einer Funktion des Kiemenepithels, zuschrieb. Wie EL-MATBOULI et al. (1999) berichten, dringen *Triactinomyxon* Sporen ganz gezielt an den sekretorischen Öffnungen der Schleimzellen ein. Molekulare Mechanismen, die gerade zu diesem Invasionsweg führen, werden diskutiert. Der epidermale Schleim von Fischen stellt zudem eine wirkungsvolle Barriere gegenüber eindringenden Krankheitserregern dar. Neben Proteasen, Phosphatasen und Lysozym (FAST et al. 2002) wurden bei verschiedenen Fischarten auch Lektine aus dem Schleim isoliert. Dem Galaktose-bindenden Protein des *Conger myriaster* (NAKAMURA et al. 2001) und dem Laktose-bindenden Protein von *Anguilla japonica* (TASUMI et al. 2002) werden protektive Funktionen in der Infektabwehr, unter anderem über die Aktivierung der Komplementkaskade, zugeordnet. Auch bei den von der Drehkrankheit am stärksten betroffenen Regenbogenforellen wurden Lektine beschrieben. ZHANG et al. (2000, 2001) fanden C-Typ-Lektine (CTL-1 und CTL-2), die in der Zellmembran verankert sind und INAGAWA et al. (2001) beschrieben die molekularbiologische Charakterisierung eines Galektins, das in der Milz, der Kopfniere, dem Thymus, den Zellen der Peritonealhöhle, den Ovarien, den Kiemen und dem Herzen lokalisiert ist. Im epidermalen Schleim, und damit in der äußersten Schicht, die die *Triactinomyxon*-Sporen von *M. cerebralis* für die Infektion passieren müssen, konnte BUCHMANN (2001) Zucker-bindende Aktivitäten mit Spezifitäten für Mannose, Galaktose und Laktose darstellen. Obwohl davon ausgegangen wird, dass die Mehrzahl der beschriebenen Lektine Schutzfunktionen für den Wirt erfüllen, sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass es gerade diese Strukturen sein können, die einem Parasiten, in unserem Fall *M. cerebralis*, über wechselseitige Erkennung zu einer erfolgreichen Anheftung und Infektion verhelfen könnten.

2.2.2. Lektine – Definition und Geschichte

Die Vorstellungen über die Funktion von Kohlenhydraten war bis in die zweite Hälfte des letzten Jahrhunderts auf ihre Rolle als Energielieferant - in Form von Glykogen und Glukose – oder als Stützsubstanz - in Form von Chitin und Zellulose - beschränkt. Erst nach Entdeckung der Glykokalyx, die sich aus den über die Zelloberfläche hinausragenden Kohlenhydratstrukturen von in der Membran verankerten Proteinen und Lipiden zusammensetzt, rückten bis dato ungeahnte Funktionen in den Fokus der Diskussion. Allein für die glykosidische Bindung eines Disaccharids aus Hexa-Pyranosen sind theoretisch 50

verschiedene Konfigurationen möglich (inclusive α - und β -Stereoisomerie), und damit unterschiedliche isomere Formen, die sich in der räumlichen Konfiguration unterscheiden. Daher ist es nicht verwunderlich, dass allein unter Berücksichtigung aller chemischen Faktoren, und unter Verwendung von 20 Einzelzuckern, die Vielfalt von ca. 10^{12} Kombinationsmöglichkeiten besteht (linear und verzweigt), um ein Hexasaccharid zu konfigurieren – Strukturvariationen durch Veresterung der freien OH-Gruppen nicht mitberechnet. Verglichen damit, beschränkt sich die Variationsmöglichkeit der Nucleinsäuren bei vier verwendbaren Purin- und Pyrimidinbasen bei der Verknüpfungsmöglichkeit über 3',5'-Phosphodiester Bindungen auf ein Portfolio von 4^6 möglichen Hexameren (LAINE 1997). Dieser sei auch noch die Kodierungskapazität der 20 Aminosäuren gegenübergestellt, welche $6,4 \times 10^7$ verschiedene Möglichkeiten umfasst. Es wird deutlich, welches ungeheure Informationspotential im System der Kohlenhydrate verborgen ist (GABIUS 2001). Schon Ende des 19. Jahrhunderts, also weit vor der Entdeckung der Glykosylierung von Proteinen und Lipiden in Membranen, wurde der Grundstein für das Verständnis von der Entschlüsselung dieses Zuckercodes gelegt. STILLMARK (1888) beobachtete, dass Rizin, ein Extrakt aus

Lektinfamilie	Strukturmotiv	Ligand	Beispiel
C-type	Konservierte CRD	Variabel (Mannose, Galaktose, Fukose, Heparin Tetrasaccharid); Abhängig von divalenten Kationen	Selektine (E-,L-,P-Selektine) Kolletine, Makrophagen-Mannose-Rezeptor, Endozytose-Rezeptoren
I-type	Immunglobulin-ähnliche CRD	Variabel ($\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$, HNK-1 Epitope, Hyaluronsäure, $\alpha 2,3/\alpha 2,6$ -Sialinsäuren)	CD22
Galectins	Konservierte CRD	β -Galaktoside	Galektine 1,2,3,4,5,6,7,8
Pentraxins	Pentamere Anordnung der Untereinheiten	β -Galaktoside (azetyliert an Position 4 und 6), Phosphorilierte und Sulphatierte Monosaccharide	
P-type	Konservierte CRD	Glykoproteine, die Mannose-6-Phosphat enthalten	Man-6-P-bindendes Protein

Tabelle 1 Aktuelle Klassifizierung tierischer Lektine nach DRICKAMER (1995), CROCKER & FEIZI (1996) und GABIUS (2001)

Ricinus communis, tierische Erythrozyten zu agglutinieren vermag. Später prägten BOYD & SHAPLEIGH (1954a, b) den Begriff Lektin (lateinisch: *legere* - selektieren, auswählen) basierend auf ihren Befunden, dass einige Extrakte nur bestimmte Blutgruppen agglutinierten.

Nachdem sich herausstellte, dass die Reaktion mancher Lektine durch Einfachzucker hemmbar ist (WATKINS & MORGAN 1952, MORGAN & WATKINS 1953), wurden Lektine als pflanzliche Kohlenhydrat-bindende Proteine definiert. Der Extraktion aus verschiedensten Pflanzen folgten erste Lektin-Isolate aus Bakterien (NETER 1956, GILBOA-GARBER 1972), Pilzen (FUJITA et al. 1975), Flechten (ESTOLA & VARTIA 1955), Fischrogen (ANSTEE et al. 1973, TATENO et al. 1998), Schnecken (UHLENBRUCK & PROKOP 1966) und auch aus Organgewebe von Säugetieren (STOCKERT et al. 1974, de WAARD et al. 1976). Heute definiert man ein Lektin als zuckerbindendes Protein/Glykoprotein welches nicht-immunogenen Ursprungs ist und keine enzymatische Aktivität besitzt (BARONDES 1988). Im Verlauf der vergangenen drei Jahrzehnte gewannen Lektine in nahezu allen Bereichen der medizinischen und biochemischen Forschung zunehmend an Bedeutung. So konnte zahlreichen Lektinen, Funktionen in den vielfältigsten biologischen Systemen zugeordnet werden. Sie sind u.a. an der Homöostase von Glykoproteinen der Leber (ASHWELL & HARFORD 1982), an der Organisation der Extrazellular-Matrix (POWELL & WHITNEY 1980), an der Endothel-Adhäsion von Leukozyten für die Auswanderung in das Gewebe (LASKY 1995), an den Abwehrmechanismen gegen Mikroorganismen (KAMIYA et al. 1988, SHIOMI et al. 1989, MURAMOTO et al. 1999, HOSONO et al. 1999) und an der vermittelten Zelladhäsion von pathogenen Mikroorganismen (MING et al. 1993, ORTEGA-BARRIA & PEREIRA 1991) beteiligt.

Ursprünglich erfolgte die Klassifizierung der Lektine nach ihrer Monosacharidspezifität. Einer funktionellen und sequenziellen Verwandtschaft wurde damit jedoch nicht ausreichend Rechnung getragen. Die Nukleotidsequenzen verschiedener tierischer und pflanzlicher Lektine wurden inzwischen charakterisiert, und so zeigte sich, dass die Primärstruktur der einzelnen Lektine eine hohe Variabilität aufweist, auch wenn eine nahezu identische Monosaccharid-Spezifität besteht. Für die spezifische Bindung von Sacchariden ist eine meist streng konservierte Kohlenhydrat-bindende Domäne (Carbohydrate Recognition Domain; CRD) notwendig. Basierend auf Sequenzhomologien und Strukturanalysen der CRD, werden tierische Lektine in fünf Familien eingeteilt (DRICKAMER 1995, CROCKER & FEIZI 1996, GABIUS 2001; Tabelle 1). Durch die charakteristische Tertiärstruktur in der CRD sind molekulare Wechselwirkungen nur mit ganz bestimmten Kohlenhydratmotiven möglich, deren Dissoziationskonstante nach TOONE (1994) lediglich im milli- bis mikromolaren Bereich liegt. Für multivalente Wechselwirkungen bzw. zur Erhöhung der Affinität, beispielsweise bei der Hämagglutination, müssen daher CRDs mehrfach präsentiert werden oder in Cluster angeordnet sein.

Um Lektine biochemisch charakterisieren zu können, müssen sie zunächst detektiert und anschließend aufgereinigt werden. Neben molekularbiologischen Isolierungsmethoden, die auf Sequenzhomologien beruhen, stehen zahlreiche weitere Möglichkeiten zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden konjugierte Mono- und Oligosaccharide verwendet, um Bindungsaffinitäten in einzelnen Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* histochemisch zu lokalisieren und zu charakterisieren.

2.2.3. Glykohistochemie

Seit Jahrzehnten dienen die Hämagglutination und die spezifische Hemmung der Reaktion durch Haptenzucker der Charakterisierung von Lektinextrakten. Seit Ende der achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts steht eine Methode zur Verfügung, die es erlaubt, endogene Lektine auch *in situ* zu detektieren und zu charakterisieren (DANGUY et al. 1991, GABIUS & BARDOSI 1991). Dafür wurden Marker, sog. Neoglykokonjugate entwickelt, die definierte Saccharidstrukturen präsentieren und eine zugesicherte Reinheit aufweisen. Die Bindung des Zuckerliganden an eine Bindungsstelle kann dann über konjugierte Enzyme (alkalische Phosphatase, Peroxidase), Kolloidalgold oder Biotin sichtbar gemacht werden. Als Trägersubstanz dient zumeist kohlenhydratfreies bovines Serumalbumin (BSA) oder Poly(2-Hydroxyethyl)-Acrylamid (PAA), ein inertes synthetisches Polymer. Die für die vorliegende Studie eingesetzten Neoglykokonjugate sind in Tabelle 1 auf Seite 73 (Veröffentlichung II) aufgeführt. Im Vergleich zur Hämagglutination ist der Nachweis von Lektin-Aktivität hiermit nicht nur auf mindestens divalente Lektine, welche zu einer Vernetzung von Erythrozyten notwendig sind, beschränkt, sondern es können auch Aktivitäten erfasst werden, die lediglich eine einzige CRD je Molekül aufweisen (GABIUS 2001). Neuere Studien zeigen erste Einsätze in der Human-Pathologie. Durch die Detektion pathologisch veränderter Expression von Kohlenhydrat-bindenden Strukturen in Tumorzellen soll eine prognostische Aussage über den weiteren Verlauf des Tumorwachstums gemacht werden können (LEGENDRE et al. 2004). GABIUS et al. (1988) charakterisierten erstmals Kohlenhydrat-Bindungsstellen in peripheren Nervenzellen von Schweinen. In der post-akrosomalen Region von Rinder-Spermien konnte mittels FITC-markierten Neoglykoproteinen eine Bindungsaktivität z.B. für Mannose, Mannose-6-Phosphat, Laktose und Maltose nachgewiesen werden (SINOWATZ et al. 1988). Die Autoren gehen davon aus, dass diese Aktivität eine herausragende Rolle bei der Interaktion mit der *Zona Pellucida* spielt. VILLALBA et al. (1987) und ZACCONE et al. (1987) lokalisierten ihrerseits Kohlenhydrat-Bindungsstellen auf der Epidermis von Amphibien. Aus

der Ichthyoparasitologie ist bis heute wenig über den Einsatz der Glykohistochemie bekannt. Es wurde aber bereits von Lektinaktivitäten in der Fischepidermis berichtet (DANGUY & GENTEN 1989, DANGUY et al. 1991), die histochemisch nachgewiesen wurde. Mit einem ersten Versuch in der Anwendung von Neoglykokonjugaten an Ziliaten zeigten KOVACS et al. (1997), dass ein aquatischer Ekto-Kommensale (*Tetrahymena piriformis*) Lektinaktivitäten mit einer Spezifität für Zuckermotive, die β -D-Glukose und Laktose enthalten, in Kinetoplasten exprimiert. Eine Beteiligung bei den komplexen Vorgängen der Zellteilung wird diskutiert. Von Vertretern der Myxozoa liegen noch keine Daten vor, die eine Verwendung von Neoglykokonjugaten bei der Detektion von Lektinen beschreiben. Die in dieser Arbeit beschriebenen Studien stellen zugleich erste Versuche dar, Neoglykokonjugate auch bei Sporenstadien von Organismen einzusetzen. Es werden daraus Hinweise für das Vorhandensein von Lektinaktivität in Sporen von *M. cerebralis* erhofft. Durch die Möglichkeit einer Beteiligung bei der Adhäsion, Invasion und zielgerichteten Migration werden weitere Aufschlüsse über die Wirt-Parasit-Interaktion bei *M. cerebralis* erwartet.

Im Weiteren wird nun ausführlich auf die möglichen Bindungspartner der Lektine eingegangen. Im Fall von *Myxobolus cerebralis* liegen bereits umfangreiche Daten über die Lokalisation einzelner Glykanmotive vor.

2.2.4. Glykane

Exprimierte Proteine erfüllen bei den unterschiedlichsten Organismen - Tieren, Pflanzen oder Pilzen - entscheidende Funktionen in komplexen physiologischen Prozessen. Die Eigenschaften dieser Proteine, aber auch vieler Lipide, lässt sich aber nicht automatisch, allein von ihrer Aminosäuresequenz, ablesen. Posttranslationale Modifikationen sind häufig für die korrekte Proteinfaltung, für den zielgerichteten Transport zum Bestimmungsort und für die funktionellen Eigenschaften unerlässlich. Die häufigste Form der Modifikation von Proteinen stellt die Glykosylierung dar (REUTER & GABIUS 1997). Seit jeher ist die Geschichte der Erforschung von Glykoproteinen eng mit der Untersuchung der Lektine verbunden. Ihnen wird die direkte Vermittlung von spezifischen Erkennungsprozessen zugesprochen (RÜDIGER & GABIUS 1993, GABIUS et al. 1995). Oligosaccharide eignen sich, aus bereits oben genannten Gründen, hervorragend als biologische Informationsträger (LAINE 1997).

Grundsätzlich wird zwischen N-glykosidisch- und O-glykosidisch-gebundenen Oligosacchariden unterschieden. Ein N-Glykosid ist stets mit dem terminalen GalNAc über den Stickstoff des C₄ der Aminosäure Asparagin (Asn) am Trägerprotein verknüpft. Als O-

Glykoside bezeichnet man Zucker-Modifikationen am C₃ Sauerstoff von Serin (Ser) oder Threonin (Thr) des Proteins. Um nun näher auf die beiden Verknüpfungsarten einzugehen, betrachten wir zuerst die strukturellen Eigenschaften der N-Glykane.

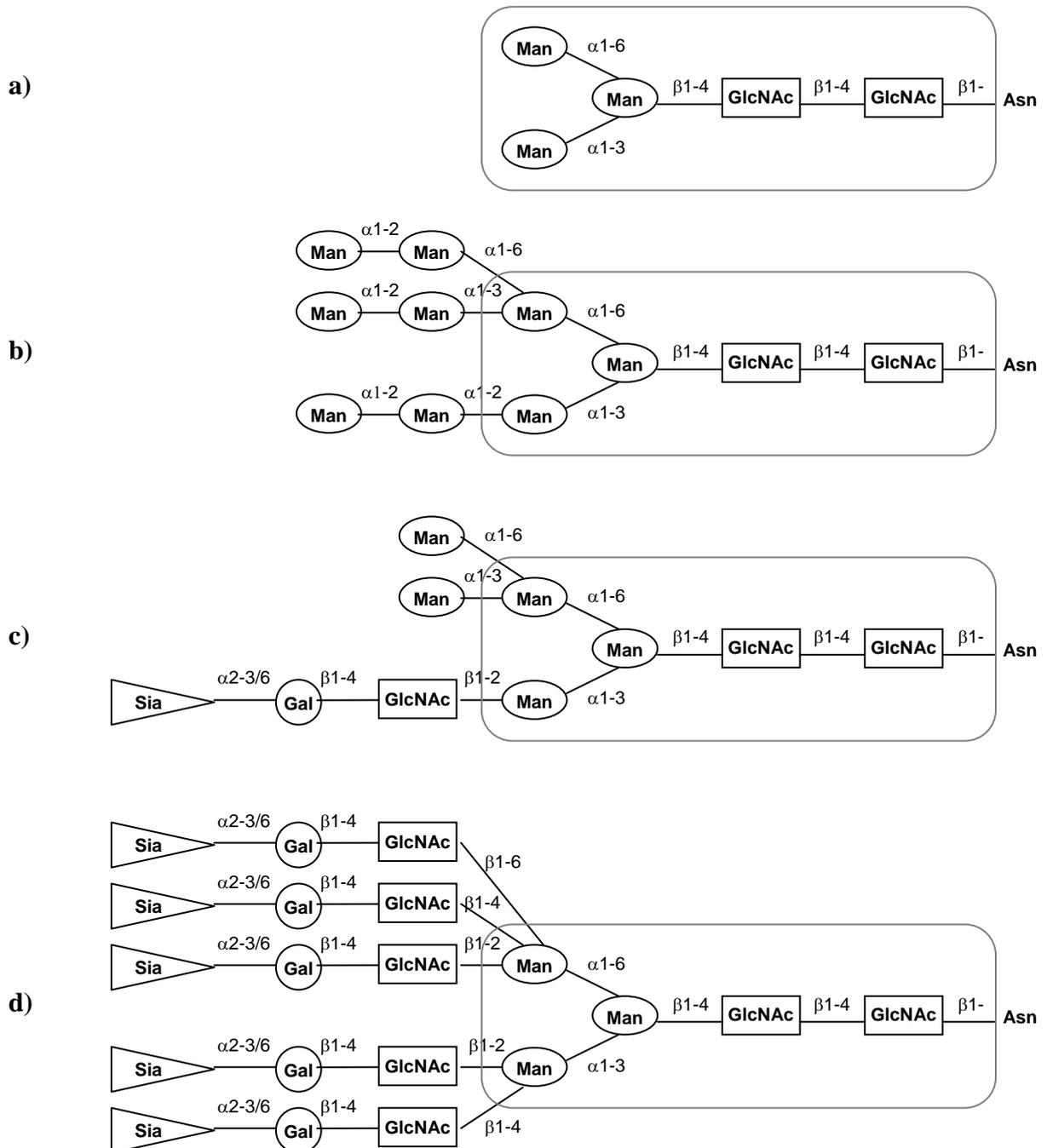


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Gruppen von N-Glykanen nach REUTER & GABIUS (1997); a) Core-Struktur; b) high-mannose-Typ; c) Hybrid-Typ; d) Komplex-Typ

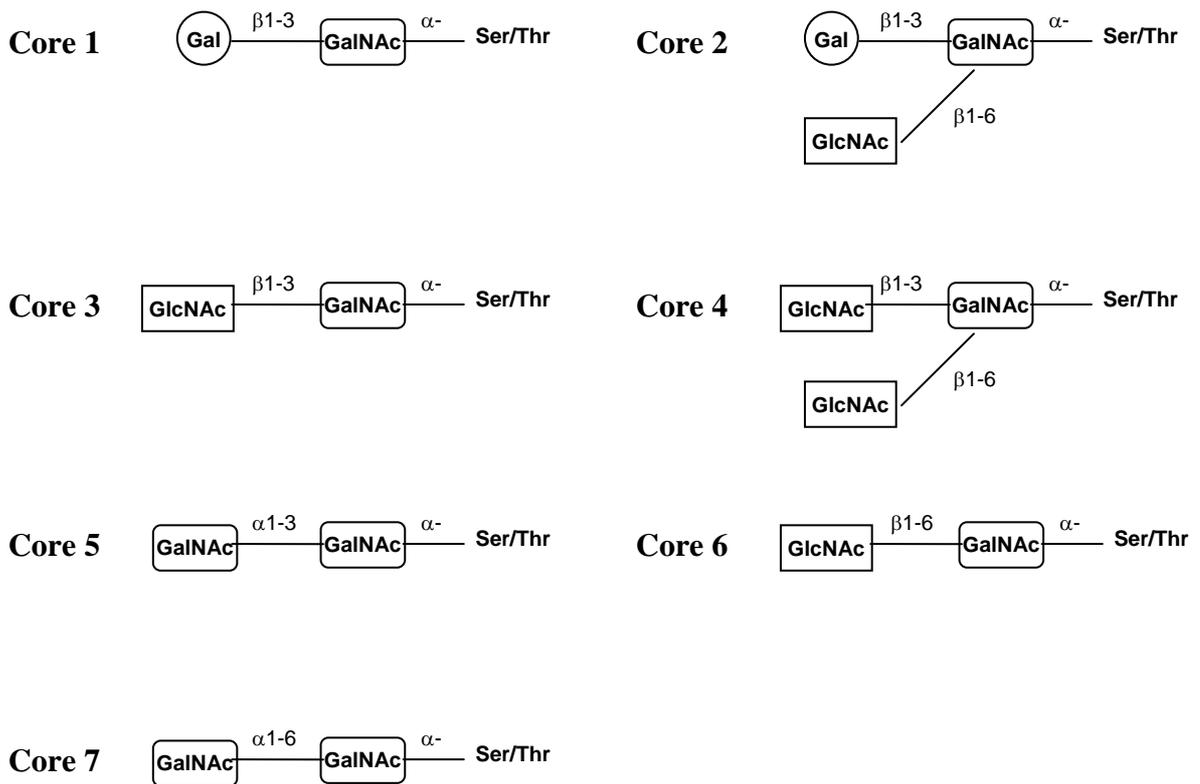


Abbildung 7 Struktur der sieben bekannten Core-Strukturen von O-Glykanen nach REUTER & GABIUS (1997).

Allen N-Glykanen ist die sogenannte Core-Struktur gemeinsam. Sie besteht aus zwei linear β 1-4-verknüpften GlcNAc und drei verzweigten (α 1-6 und α 1-3) Mannosepyranosiden (SHARON & LIS 1997). Diese konstante Struktur kann, hauptsächlich am terminalen Mannoserest jedoch auch innerhalb der Core-Region, weitere Modifikationen enthalten. So unterscheidet man drei Gruppen der Modifikationstypen: 1. den high-mannose Typ; 2. den Hybrid-Typ; und 3. den komplexen Typ. Die Unterschiede der einzelnen Gruppen und die Core-Struktur sind in Abbildung 6 dargestellt. Die Bedeutung jeder einzelnen Zucker-Modifikation wird erst bei ihrem Fehlen deutlich. So führt z. B. die Störung des Einbaus von *L*-Fukose (durch Ausfall der *L*-Fukosyltransferase VII bei KO-Mutanten) zu einer klinischen Depression der Infektabwehr bei Mäusen (HATHAWAY & SHUR 1997). Die Variationsmöglichkeiten der bisher gefundenen O-Glykane sind ungleich größer als die der N-Glykane. Bei Säugetieren sind bei beiden Glykosylierungsarten die terminalen Enden mit Sialinsäure oder *L*-Fukose abgeschlossen (KÖTTGEN et al. 1979a, b). Die bekannten O-Glykane lassen sich in sieben Core-Bereiche einteilen, welche in Abbildung 7 dargestellt sind. Allen ist die Verknüpfung über N-Acetyl-*D*-

Galaktosamin gemeinsam. Zur Aufklärung der Zucker-Strukturen in Glykanen erfolgt zunächst die Trennung von Saccharid- und Proteinteil. In den letzten Jahren sind hierfür spezifische Endoglykosidasen kommerziell verfügbar geworden, die vorwiegend an den Anheftungsstellen der Zuckerketten spalten und nur eine Glykosylierungsart (N- oder O-) berücksichtigen (beispielsweise N-Glykosidase F). So ist eine vereinfachte Differenzierung der beiden Glykosylierungsmuster möglich.

Die genaue Untersuchung von Zuckermodifikationen bei Krankheitserregern ist gerade im Forschungsbereich der Parasitologie und Immunologie von herausragendem Interesse. So ist nicht nur der Proteinbestandteil isolierter Glykane für deren Antigenität verantwortlich, sondern im entscheidenden Maße auch die Zuckerstrukturen als Modifikation (FEIZI & CHILDS 1987). Glykane sind überdies Zielstrukturen für beispielsweise endogene Lektine, die bei der angeborenen Immunität (innate immunity) eine Rolle spielen. Gerade bei Fischen ist die angeborene Immunität von großer Bedeutung bei der Immunabwehr (INGRAM 1980). Diese Erkenntnisse müssen bei der Entwicklung von Antisera und Impfstoffen berücksichtigt werden. Besonders von humanpathogenen Protozoen liegen detaillierte Kenntnisse über deren Glykane vor. So hofft man, dass es durch Strukturanalysen bei Trypanosomen und Leishmanien möglich wird, die Interaktionen des Parasiten mit entsprechenden Kohlenhydrat-bindenden Strukturen des Wirtes zu analysieren und die Immunantwort des Wirtes vorherzusagen. Neben BORST et al. (1996) und FERGUSON (1997, 1999) charakterisierten zahlreiche weitere Arbeitsgruppen sog. Various Surface Glycoproteins (VSG) von *Trypanosoma brucei*, welche einen Bestandteil der Glykokalyx darstellen und dem Parasiten dazu dienen, mittels Antigen-Variation der Wirtsantwort zu entkommen (BORST et al. 1996, RUDENKO et al. 1998). Nach erfolgter Infektion beginnt der Wirt eine Immunantwort gegen diejenigen Glykoproteine zu entwickeln, die im Blut präsentiert werden. Mit der Proliferation in den Zielzellen werden nun variable, unterschiedlich modifizierte, VSG exprimiert, welche lediglich von einem Gen kodiert werden und nach dem Freiwerden im Blut für den Wirt fassbar sind. Die Immunantwort des Wirtes kann nun lediglich die Population erreichen, welche die primären VSG-Epitope präsentieren, nicht jedoch die neu Rekombinierten. Antigen-Variation stellt unter den Protozoen eine offenbar weit verbreitete Strategie zur Vermeidung der Wirtsabwehr dar (GILLIN et al. 1990, 1996, NASH 1992). Desweiteren wurden Glykokonjugate im „Coat“ von *Trypanosoma cruzi*, dem Erreger der Chagas-Krankheit, charakterisiert. Dieser dichte Mantel besteht aus einer Schicht Typ-I-Glykosylinositolphospholipiden (GIPL) (PREVIATO et al. 1990) und zwei Familien kleinerer Muzine (SCHENKMAN et al. 1993), die reich an Galaktose, N-Acetyl-D-Galaktosamin und N-Acetylneuraminsäure sind (FERGUSON et al. 1993). Da Trypanosomen *per se* keine

Sialinsäuren synthetisieren können, übertragen sie wirtseigene Sialinsäuren mittels Transsialidasen auf eigene Muzine. PEREIRA-CHIOCCOLA et al. (2000) gehen davon aus, dass diese Sialinsäuren die terminalen Galaktoseeinheiten maskieren, um so der Wirtsabwehr zu entgehen – ein Vorgang, der als Antigen-Mimikry (DAMIAN 1987, INAL 2004) bezeichnet wird. Auch in der Klasse der Myxosporea bestehen bei einigen Spezies bereits vielfältige Kenntnisse über Glykosylierungsmuster der Entwicklungsstadien. So weisen histochemische Studien von MUÑOZ et al. (1999) auf eine breite Präsenz von Mannose- oder Glukose-, aber auch N-Acetyl-D-Glukosamin-Resten an Polkapseln und Schälzellen zahlreicher Arten von Myxosporea hin. Aus diesen Befunden geht hervor, dass manche Glykane bei Myxosporea Arten-übergreifend konserviert sind. Das vielfältige Auftreten von Chitin-ähnlichen Strukturen (N-Acetyl-D-Glukosamin-Polymere), wie sie bereits von LUKES et al. (1993) in *Myxobolus muelleri* und *M. subepithelialis* vermutet wurden, konnte von STIPPL (2003) ebenfalls in Myxosporen und Actinosporen von *M. cerebralis* festgestellt werden. Weiter wurden Mannoseenthaltende Glykane in allen Entwicklungsstadien gefunden. Interessanterweise zeigten histologische Versuche mit den Lektinen der Spezifitäten für Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin, dass der Parasit scheinbar in der Lage ist, in Abhängigkeit von der Umgebung die Expression oder zumindest die Glykosylierungsmuster anzupassen. Mit *Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin, einem Lektin, das spezifisch sogenannte „bisected“ N-Glykane vom komplexen Typ bindet (siehe auch Tabelle 2), konnten diese speziellen Core-Modifikation an Glykanen von Amöboidkeim und Polkapseln beider Sporenstadien von *M. cerebralis* nachgewiesen werden. Untersuchungen mit SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) und MAA (*Maackia amurensis* agglutinin) deuten darauf hin, dass Sialinsäuren an Parasitenstadien von *M. cerebralis* nicht präsentiert werden.

2.2.5. Pflanzliche Lektine als Tools

Wie aus dem eben Beschriebenen hervorgeht, sind gerade Lektine, welche hinsichtlich ihrer Struktur und Spezifität genauestens untersucht wurden, prädestiniert, um unbekannte Glykokonjugate bezüglich ihrer Kohlenhydrat-Epitope zu charakterisieren. Insbesondere pflanzliche Lektine sind in dieser Hinsicht am genauesten charakterisiert (GOLDSTEIN & HAYES, 1978) und werden zur Detektion von Glykanstrukturen eingesetzt.

Pflanzliche Lektine zeichnen sich durch ihre vorwiegend polymere Struktur, ihre Löslichkeit und ihre multiplen CRDs an einem Molekül aus (LIS & SHARON 1986, RÜDIGER 1997). Besonders Leguminosen sind bekannt für ihren hohen Gehalt an Agglutininen, so enthalten die

Samen von *Phaseolus vulgaris* 1,2 g je 100 g Protein. Doch neben einer Vielzahl von Lektinen, die aus Extrakten von Leguminosen stammen (*Pisum Sativum*, *Canavalia ensiformis*, *Ricinus communis*, *Phaseolus vulgaris*), sind bis heute auch andere bekannt, beispielsweise die von Nachtschattengewächsen (*Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum*, *Datura stramonium*). Sie werden im Endoplasmatischen Retikulum der Zellen synthetisiert und anschließend über den Golgi-Apparat in das Zelllumen entlassen. Die Speicherung erfolgt schließlich, mit Ausnahme des *Datura stramonium* agglutinins (DSA; Stechapfel; BROEKAERT et al. 1988), des Wheat germ agglutinins (WGA; Weizenkeim; KOMAROVA et al. 1993, 1994), des *Artocarpus integrifolia* agglutinins (MAJUMDER & CHATTERJEE 1996) und der anderen zellwandständigen Lektine der Leguminosen (KAUSS & GLASER 1974, KAUSS & BOWLES 1976) in „protein-bodies“ (VAN DRIESSCHE 1988). Obgleich die Synthese der pflanzlichen Lektine intensiv erforscht wurde, sind die jeweiligen Funktionen bisher noch weitgehend unbekannt. Hypothesen deuten darauf hin, dass sie Funktionen als Speicherproteine haben, da sie vorwiegend in Samen, Knollen und Rinden lokalisiert sind (PEUMANN & VAN DAMME 1993). Jedoch ist, im Gegensatz zu klassischen Speicherproteinen, der Anteil der Lektine in den Samen relativ gering. Zudem besitzen Lektine, verglichen mit Speicherproteinen, die für ihre Funktion notwendige CRD und sind vergleichsweise stabil. Auch die Annahme, Lektine seien Nebenprodukte der Speicherproteine, konnte widerlegt werden (WENZEL et al. 1993). Neuere Untersuchungen deuten vielmehr auf regulative Aufgaben in der Pflanzenzelle hin. So konnten bei zahlreichen Lektinen (aus *Phaseolus vulgaris* und *Dolichos biflorus*) spezifische Bindungsfähigkeiten gegenüber verschiedenen Phytohormonen, beispielsweise Indoleessigsäure (UMEKAWA et al. 1990) und Adeninderivaten (ROBERTS & GOLDSTEIN 1982, LOGANATHAN et al. 1992) festgestellt werden. Andere Lektine, wie die von *Griffonia simplicifolia* oder von *Pisum sativum*, besitzen jedoch keine derartigen Affinitäten (MALIARIK & GOLDSTEIN 1988). Darüber hinaus konnten EINHOFF et al. (1986) Lektine beschreiben, die mit pflanzlichen Enzymen interagieren können. Hierbei sind hauptsächlich Glykosidasen bei Leguminosen von den Regulationsmechanismen durch Lektine betroffen, jedoch besteht auch die Interaktionsmöglichkeit mit endogener Phosphatase (LORENC-KUBIS et al. 1981, WIERZBA-ARABSKA & MORAWIEKA 1987). Wie bei Tieren, wird auch bei Pflanzen die vor Infektionen schützende Funktion der Lektine diskutiert. So enthält das Exsudat des Gummibaums (*Hevea brasiliensis*) ein Lektin, welches bei Verletzungen der Rinde die Vernetzung der Latex-Moleküle vermittelt und daher zum Verschluss der Wunde beiträgt (GIDROL et al. 1994). Darüber hinaus besitzt dieses Lektin, das auch als Hevein bezeichnet wird, fungizide Effekte, die die Pflanze nach Verletzung vermutlich vor einem Befall mit

Lektin-Name	Abkürzung	Ursprung	Monosaccharid-spezifität	KH-Motiv
<i>Griffonia simplicifolia</i> Agglutinin I	GSA I	<i>Griffonia simplicifolia</i>	N-Acetyl-D-Galaktosamin	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc-R GalNAc α 1-3Gal-R
<i>Griffonia simplicifolia</i> Agglutinin II	GSA II	<i>Griffonia simplicifolia</i>	N-Acetyl-D-Glukosamin	GlcNAc β 1-4GlcNAc-R
<i>Phaseolus vulgaris</i> Erythroagglutinin	PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Red Kidney-Bean)	1 N-Acetyl-D-Galaktosamin	+/-[NeuAc α 2-3(6)]Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 GlcNAc β 1-4Man β 1-#GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn +/-[NeuAc α 2-3(6)]Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 („bisected complex-type N-glycans“)
<i>Sophora japonica</i> Agglutinin	SJA	<i>Sophora japonica</i> (Japanese Pagoda Tree)	N-Acetyl-D-Galaktosamin	GalNAc β 1-6Gal-R

1: Die Bindung von PHA-E ist nicht mit einem Monosaccharid hemmbar (GOLDSTEIN & HAYES 1978)

Tablelle 2 Charakteristika einzelner, in der Arbeit verwendeter, pflanzlicher Lektine nach GOLDSTEIN & HAYES (1978)

phytopathogenen Pilzen schützt (VAN PARIJS et al. 1991). Viele der bekannten Lektine besitzen toxische Eigenschaften für herbi- und omnivore Organismen. Es liegt daher nahe, dass die zusammen mit Speicherproteinen eingelagerten Lektine dem Schutz vor Fraßfeinden dienen. So binden Lektine von *Phaseolus vulgaris* nach Aufnahme mit dem Futter an Oberflächenglykane von Epithelzellen des Dünndarms, was bei Ratten zu deutlich verminderter Futtermittelnutzung führt. KIJNE et al. (1992) brachten die auffällige Häufung der Lektin-Vorkommen gerade bei Leguminosen mit der Symbiose der Pflanzen mit den Knöllchenbakterien (*Rhizobia*) an den Wurzeln in Verbindung. Die genaue funktionelle Aufgabe der Lektine in diesem System ist aber bis heute unklar.

Aufgrund weitreichender Charakterisierungsarbeiten, steht heute eine Vielzahl pflanzlicher Lektine für den wissenschaftlichen Einsatz zur Verfügung. Pflanzliche Lektine stellen wegen ihrer vielfältigen Bindungsspezifitäten ausgezeichnete Werkzeuge dar, um Oligosaccharid-Bestandteile in biologischen Glykokonjugaten zu charakterisieren. Obwohl die Spezifität der einzelnen Lektine über weit komplexere Strukturen definiert ist, hat sich im Laufe der Zeit eine Einteilung nach der Monosaccharid-Spezifität, das heißt, auf Basis der entsprechend potenten Hemmzucker, etabliert (GOLDSTEIN & HAYES 1978). Die Zuordnung zu einzelnen Gruppen ermöglicht so eine gezielte Auswahl für den Einsatz in der Glykanforschung. Die Charakteristika der für die eigenen Untersuchungen ausgewählten, pflanzlichen Lektine sind in Tabelle 2 aufgeführt. Bei den vielfältigen Anwendungsgebieten pflanzlicher Lektine als Tools müssen neben den jeweiligen pH-Optima auch die Notwendigkeit von divalenten Kationen (Ca^{2+} , Mn^{2+} und Mg^{2+}) berücksichtigt werden. Methodische Möglichkeiten zur Untersuchung unbekannter Glykane ergeben sich beispielsweise in Form der Lektin-Affinitätschromatographie, der Lektin-Histochemie (CUMMINGS 1994) und des Enzyme-linked-lectin-sorbent-assay (ELLSA) (GABIUS & GABIUS 1993). Um eine spezifische Lektinbindung zu detektieren, sind diese an Fluorophoren (FITC), an Biotin, an Enzymen (Peroxidase, alkalische Phosphatase), an Isotope oder Kolloidalgold gekoppelt und kommerziell verfügbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Glykoproteine des Parasiten mittels Lektin-Blotting charakterisiert, wofür Lektine eingesetzt wurden, die mit Biotin markiert waren. Die Methode des Lektin-Blottings wurde zuvor bereits bei Untersuchungen von Glykanen verschiedener anderer Parasiten erfolgreich erprobt. So charakterisierten FENG & WOO (1998) Oligosaccharid-Strukturen von aquatischen Hämoflagellaten (*Cryptobia salmositica*, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*). Über weitere Lektin Blotting Analysen berichten KLABUNDE et al. (2002), GRUDEN-MOVSESIJAN et al. (2002) und D'AVILA-LEVY et al. (2004). Ebenso besteht die Möglichkeit, Lektine an Sepharose oder Agarose zu koppeln, um im Rahmen

einer Affinitätschromatographie die Isolierung von Glykanen zu ermöglichen (LOTAN & NICOLSON 1979, CUMMINGS 1997). Dieses Verfahren ist häufig die Voraussetzung für eine genaue Strukturanalyse der Glykokonjugate.

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Detektion und Lokalisation von Kohlenhydrat-bindenden Aktivitäten mittels Biotin-markierter Neoglykokonjugate in den einzelnen Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* vorzunehmen. Damit soll geklärt werden a.) welche Kohlenhydrat-bindenden Aktivitäten den parasitären Entwicklungsstadien im Rahmen der spezifischen Wechselwirkungen mit Glykanen der Wirtsorganismen zur Verfügung stehen, und b.) ob es Veränderungen im Expressionsmuster bei den einzelnen Entwicklungsstadien gibt, die den jeweiligen Aktivitäten der parasitären Stadien zugeordnet werden können.

Ein weiteres Ziel, dieser Arbeit ist es, die mittels Lektin histochemie identifizierten Glykanstrukturen (STIPPL 2003) parasitärer Stadien mit Hilfe von Lektinaffinitätschromatographie, Lektinblotting und MALDI/MS-Analysen genauer zu charakterisieren. Aus dieser Analyse sollen Befunde gewonnen werden, die zur Klärung der Frage beitragen, inwieweit Glykane parasitärer Stadien eine Immunantwort beim Wirtsorganismus auslösen können.

4 Eigene Untersuchungen - Veröffentlichungen

4.1. *Ergebnisse – Teil I*

Lectin blot studies on proteins of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease

Martin Knaus, Mansour El-Matbouli*

Institute for Zoology, Fish Biology and Fish Diseases, Faculty of Veterinary Science, University of Munich, Kaulbachst. 39, D-80539 Munich, Germany

*Corresponding author. Tel.: +89-2180-3273; E-mail: el-matbouli@lmu.de

ABSTRACT: It is known that *Myxobolus cerebralis* antigens either surficial or secreted, are key modulators for or targets of host immune system compounds. We undertook SDS-PAGE glycoprotein characterisation of *M. cerebralis* developmental stages isolated from infected rainbow trout, and Western blot analyses using selected biotin-labelled plant lectins (GSA-I, PHA-E, SJA, GSA-II) and anti-triactinomyxon polyclonal antibodies. Glycoproteins were isolated with lectin affinity chromatography and prominent bands characterised by matrix-assisted laser desorption/ionisation-mass spectrometry (MALDI/MS). We identified glycoproteins of *M. cerebralis* myxospores which contained carbohydrate motifs reactive with *Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin (proteins 20-209kDa, PHA-E), *Sophora japonica* agglutinin (proteins 7-70kDa, SJA), *Griffonia simplicifolia* agglutinin I (proteins 10-209kDa, GSA-I) and *Griffonia simplicifolia* agglutinin II (proteins 5-40kDa, GSA-II). Mcgp33, a glycoprotein isolated by lectin affinity chromatography was reactive with SJA (about 33kDa). Antiserum produced against *M. cerebralis* triactinomxons was found to have differences in antigenicity of isolated glycoproteins from both *M. cerebralis* myxospores and actinospores. We also demonstrated modified antigen expression, especially involving glycoprotein Mcgp33, in different developmental stages of *M. cerebralis*.

KEY WORDS: *Myxobolus cerebralis* · glycoprotein · lectin · MALDI/MS · lectin blotting · *Oncorhynchus mykiss* · myxozoa · interaction

INTRODUCTION

Myxobolus cerebralis (Myxozoa, Hofer 1903), the causative agent of whirling disease in salmonid fish, has a two-host life cycle (Wolf & Markiw 1984, El-Matbouli & Hoffmann 1989) with an oligochaete (*Tubifex tubifex*) as definitive host (El-Matbouli & Hoffmann 1989, 1998) and a salmonid, in particular rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), as an intermediate host. Waterborne triactinomyxon spores (the actinospore stage) are released from infected oligochaetes, and remain suspended in the water column until they encounter a susceptible salmonid fish. This developmental stage is the only infectious for susceptible fish species (El-Matbouli & Hoffmann 1998). After a rapid process of host recognition, the spores attach to the fish epidermis and release their infective sporoplasms (El-Matbouli et al. 1995). Sporoplasm-cells penetrate the epidermis and migrate to the peripheral nerve system, migrate through the medulla spinalis to their target tissues: cerebral and spinal cartilage. About 60 days after infection, following a period of proliferation, sporogenesis begins and generates thousands of myxobolus spores (the myxospore stage). Myxospores are usually released from the host when it fish dies and decays, but can also remain infectious if the fish is consumed by a predator (El-Matbouli & Hoffmann 1991) and excreted in faeces; Nehring et al. (2002) report that brown trout can expel mature *M. cerebralis* myxospores while alive. In all cases, spores released into the environment can be ingested by the oligochaete host *Tubifex tubifex*, invade its mucosa epithelia and develop interepithelially to the triactinomyxon stage in nearly 90 days.

Parasites such as *M. cerebralis* which have unique life cycles, shuttling between vertebrate and invertebrate hosts, encounter harsh and varied environments both in host tissue and in free spore stages. Survival strategies of these parasites frequently involve the participation of glycoconjugates which can be used to build protective structures, and to facilitate host-parasite interactions. Yet given the wide variety of environmental conditions faced and host adaptation over time to ward off parasite attack, the proteins and glycoconjugates of the parasite must also adapt over time if the organism is to survive. Fish immune systems are mainly based on non-specific immune responses (Ingram 1980) and frequently involve lectin activity in microbial defence (Muramoto et al. 1999, Hosono et al. 1999, Honda et al. 2000). The immune system has to be able to effectively recognise parasite glycan epitopes in order to have some resistance to infection. To counter the host response, protozoans rely on antigen mimicry (Damian 1987, Inal 2004) and antigen variation (Borst et al. 1996, Rudenko 1998), processes which involve surface glycoproteins such as glycoepitopes of N-glycosides (Burghaus et al. 1999, Yang et al. 1999) and O-glycosides (Dieckmann-Schuppert et al. 1993, Khan et al. 1997). In *Trypanosoma brucei*

(Borst et al. 1996, Ferguson 1997, 1999) and *Giardia lamblia* (Gillin et al. 1990, 1996, Nash 1992) a variant surface glycoprotein (VSG) is expressed sequentially to evade the host's immune reaction.

A similar invasion strategy is likely with *M. cerebralis*. A number of studies on protozoan and metazoan parasites implicate glycans and lectins in the complex system of host recognition and pathogenesis (Jacobson & Doyle 1996, Loukas & Maizels 2000, Buchmann & Lindenstrøm 2002). Histochemical studies pointing to carbohydrate motifs on myxozoan parasites are reported from Marin de Mateo et al. (1996), Morris & Adams (2004) and Knaus et al. (2005). These and further research (Petri et al. 2002) discuss wider participation of glycans in adhesion and invasion processes, and in parasite tissue tropism (Bonilha et al. 1995, Ortega-Barria & Boothroyd 1999). Lectin blotting is a common analytical method to investigate and separate these glycoproteins, extracted from parasites (Muñoz et al. 2000, Cohen et al. 2002, Gruden-Movsesijan et al. 2002, d'Avila-Levy et al. 2004). This method also can detect glycan epitopes in a highly sensitive and specific manner.

The current investigation was aimed at characterising and isolating glycoproteins from the myxospore stage of *M. cerebralis*, isolated from infected rainbow trout. Our methodology was generally based on analysis with biotin labelled plant lectins and lectin-affinity chromatography, chosen according to their sugar specificity to identify oligosaccharide moieties. Isolated glycoproteins were analysed using peptide mass fingerprints acquired by matrix-assisted laser desorption/ionisation-mass spectrometry (MALDI/MS).

MATERIALS AND METHODS

***Myxobolus cerebralis* myxospores.** Laboratory infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) overdosed with the anaesthetic MS 222 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) and dissected. The skeleton of the fish was separated and homogenised in a commercial mixer for about 10 min. Suspended spores were then separated and concentrated by means of a plankton centrifuge according to the method described by O'Grodnick (1975), then further purified using a Percoll gradient. In a 15 ml centrifuge tube, Percoll at various concentrations (0%-25 %-50 %-75 %-100 %) was carefully layered, then 2.5 ml of the spore sample added. The tube was centrifuged in a swinging bucket rotor at 400 g for 10 min. Spores were concentrated into a white band which was collected from the interface, diluted in 14 ml distilled water and washed 3 times to get rid of the Percoll solution and to further concentrate the spores.

Glycoprotein sample. A pellet of *M. cerebralis* spores ($\sim 1.5 \times 10^6$) was suspended in sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM 2-mercaptoethanol, 4.0% (v/v) SDS, 0.2% (w/v) bromophenol blue, 20% (v/v) glycerol; Laemmli 1970) and the spores were lysed using a water bath sonicator (Transsonic 310; Elma, Singen KN, Germany) for 10 x 2 min; after each 2 min sonication, the sample was incubated on ice for 1 min. The suspension was then boiled at 95°C for 5 min and centrifuged at 14,000g for 3 min. The supernatant was collected carefully washed 3 times with distilled water on a Microcon[®] Centrifugal Filter Device YM3 (3,000kD; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) to remove buffer and to concentrate the glycoproteins. The samples were aliquoted into microfuge tubes and stored at -80°C.

Discontinuous and reducing SDS-PAGE. An equal volume of 2X SDS loading buffer (see Laemmli 1970) was added to a glycoprotein sample, then boiled at 95°C for 5 min. After centrifugation at 14,000g for 3 min, soluble proteins were run on a 12% polyacrylamide resolving gel and a 5% stacking gel (Sambrook & Russell 2001). Running gels (10 ml) were polymerised by the addition of 100 μ l 10% (w/v) ammonium peroxodisulphate (APS) and 8 μ l N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED). Stacking gels (5 ml) were polymerised by the addition of 40 μ L APS and 4 μ L TEMED. All gels were run using a Mini-PROTEAN[®] II electrophoresis cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) at 130 V constant voltage and running buffer (25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3).

Electrophoretic transfer. After electrophoresis, proteins were transferred to a 0.45 μ m PROTRAN[®] nitrocellulose transfer membrane (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Germany) using a constant voltage of 100 V for 1 h, with transfer buffer (48 mM Tris, 38 mM glycine, 0.037% (v/v) SDS, 20% (v/v) methanol (Sambrook et al. 1989)) in a Mini Trans-Blot[®] electrophoretic transfer cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany).

Lectin blotting. Glycoprotein detection was performed with biotin-labelled plant lectins (listed in Table 1) and applied at the following concentrations: PHA-E 2.0 μ g/ml, GSA I 2.0 μ g/ml, GSA II 2.0 μ g/ml, SJA 2.5 μ g/ml (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Immediately after electro-transfer, unoccupied protein-binding sites on the membrane were blocked by incubation with BSA (bovine serum albumin, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) blocking solution [3% w/v BSA, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.05% v/v Tween[®]20, pH 7.5] overnight at 4 °C with agitation. Membranes were then incubated with the lectins [2.0 μ g/ml in blocking solution containing Ca²⁺/Mn²⁺ (3% w/v BSA, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.05% v/v Tween[®]20, 10 mM CaCl₂, 10 mM MnCl₂, pH 7.5)] for 2 h at room temperature with gentle agitation. The membranes were washed three times each for 10 min

with TTBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.05% v/v Tween[®]20, pH 7.5), then incubated with 0.2 µg/ml streptavidine conjugated with horseradish peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in blocking solution, for 1 h at room temperature with agitation. Membranes were again washed three times each for 10 min with TTBS. Bound lectins were visualised by ECL detection (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) and documented on a CL-XPosure[™] film (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, Germany).

Lectin affinity chromatography. Extracted glycoprotein samples were dissolved in 500 µl TBS. 100 µl of lectin-conjugated agarose-matrix suspension was washed 4 times with TBS washing solution (TBS containing Ca²⁺/Mn²⁺ (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, pH 7.5)). The two solutions were mixed in a 2 ml microfuge tube, then incubated overnight at 4°C with constant rotation. The tube was gently centrifuged 4 times at 700 g for 3 min, between each centrifugation it was rinsed with the washing solution for 15 min. Elution was performed with TBS containing corresponding competitive ligands (PHA-E: 100 mM acetic acid; SJA: 200 mM N-acetyl-D-galactosamine; GSA I: 200 mM β-D-galactose, 200 mM N-acetyl-D-galactosamine; GSA II: 200 mM N-acetyl-D-glucosamine) overnight at 4 °C with agitation. The eluate was collected after centrifugation (700 g for 3 min) and washed 4 times with distilled water in a Microcon[®] Centrifugal Filter Device YM3 (3,000 kDa; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). An SDS-PAGE was performed as described above. Lectin affinity chromatography on extracted *O. mykiss* cerebral proteins served as a control glycoprotein source.

Deglycosylation. Specificity of lectin binding was cross-checked by comparing the performance of deglycosylation of *M. cerebralis* protein samples using a N-Glycosidase F Deglycosylation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany) to hydrolyze N-glycosides from asparagine-coupled protein. Deglycosylation was performed in a 50 ml centrifuge tube (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Germany) after transfer to a nitrocellulose membrane and blocking with 3% BSA as described previously. 4 ml deglycosylation-solution was prepared following Haselbeck & Hösel (1988) (4.0 U/ml N-glycosidase F, 50 mM sodium phosphate, 50 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 10 mM sodium azide, 3.0% w/v BSA, 0.5% v/v Triton X, 0.05% v/v Tween[®]20, pH 7.0). Membranes were incubated for 12 h at 37 °C with agitation, then washed three times each for 10 min in TTBS. Then we processed per the lectin blot protocol described above.

Protein staining. SDS-PAGE bands arising from affinity-purified glycoproteins and myxospore total protein were visualised with a Proteosilver staining kit (Sigma-Aldrich,

Chemie, GmbH, Steinheim, Germany). Total *M. cerebralis* protein was detected by Coomassie Brilliant Blue R-250.

Mass-Spectrometry. Glycoproteins, isolated using lectin-affinity chromatography (described above), were quantified using a peptide mass fingerprint. Briefly, protein bands were excised from the gel, digested with trypsin, and subjected to mass spectrometry (TOPLAB GmbH, Martinsried, Germany) using a Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Foster City, USA). Peptide mass fingerprint data were used to search for corresponding proteins in NCBI databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) including Swissprot protein and Non-redundant databases.

Immunoblotting. Glycoproteins of *M. cerebralis* and those eluted with lectin affinity chromatography were used to perform immunoblotting analyses with anti-triactinomyxon polyclonal antibodies produced in rabbit (anti-TAMpcAb). After separation on SDS-PAGE and transforming to a nitrocellulose membrane (described above), the remaining binding-sites of the membrane were blocked with 5% w/v skim milk in TTBS for 2 h at room temperature with agitation. The membrane was then incubated with anti-TAMpc antibodies 1:1000 (primary antibody) in blocking buffer for 2 h (room temperature, agitation). After washing three times with TTBS, 15 min each, the membrane was incubated with anti-rabbit antibodies conjugated with horseradish peroxidase (secondary antibody, Sigma-Aldrich, Chemie, GmbH, Steinheim, Germany) diluted in blocking buffer for 2 h (room temperature, agitation). After 3 additional 15 min washings in TTBS, bound antibodies were visualised by the ECL system and documented on CL-XPosure™ film. Proteins extracted from TAM spores and *O. mykiss* cartilage were used as controls. Rabbit control antiserum (1:500 diluted) was used on further blots to detect binding of antibodies not specific for TAM antigens.

RESULTS

Lectin blot analyses. The glycoprotein composition of *M. cerebralis* myxospore total protein was examined by binding with corresponding biotin-labelled plant lectins (Table 1), giving rise to banding patterns shown in Figure 1 showing control non-infected *O. mykiss* glycoproteins (a) next to myxospores (b). Specificity controls were included to quantify any binding effects of streptavidin-peroxidase, endogen avidin and peroxidase activities. The glycoprotein bands at about 70 kDa were due to endogenous streptavidin binding activity. Blot affinity studies with GSA I (lanes 1a and 1b) detected GalNAc α 3-terminal epitopes on myxospore proteins with molecular weights between 10 kDa and 210 kDa. In contrast, GSA II

bound to glycans containing GlcNAc moieties with molecular weights less than 18 kDa (lane 2b), with weaker bands corresponding to proteins of 23, 27 and 36 kDa. SJA bound to epitopes carrying terminal GalNAc β : 5 – 18 kDa glycoproteins (lane 3b) with additional binding of 23, 27, 33, 40, 48 and 60 kDa proteins. PHA-E bound a broad variety of higher weight myxospore glycoproteins 12 kDa – 210 kDa (lane 4b) with distinct bands at 19, 23, 48 and 100kDa.

Deglycosylation. N-Glycosidase F was used to verify the specificity of lectin binding. In a modification of the routine protocol, deglycosylation was performed after transfer to a nitrocellulose membrane. The lectin-affinity profile of isolated *M. cerebralis* glycoproteins after deglycosylation is shown in Figure 1, lanes 1c, 2c, 3c and 4c. Deglycosylation appeared to prevent lectin binding in most cases. With GSA II (2c) only a single 4 kDa band remained. Weak bands were also evident with SJA (3c) at 4, 19, 21 and 33 kDa.

Lectin affinity chromatography. Glycoproteins isolated by lectin affinity chromatography were separated on SDS-PAGE and visualised with silver staining (figure 2). The procedure was performed in parallel with control proteins extract from *O. mykiss* to prevent any misinterpretation of resultant bands. Affinity chromatography with the GSA II matrix (lane 2b) resulted in the isolation of a single myxospore glycoprotein at 29 kDa and showed similar results with trout cartilage proteins (lane 2a) with bands at 28 kDa and 31 kDa. With SJA (lane 3b) conjugated agarose matrix a 33 kDa glycoprotein was purified and named Mcgp33. Host cartilage did not generate any comparable bands. No myxospore glycoproteins could be isolated utilising GSA I (lane 1b) and PHA-E conjugated agarose matrix (lane 4b).

Mass-spectrometry. Matrix-assisted laser desorption/ionisation-mass spectrometry was performed on three proteins excised from the affinity gels: 29 kDa (Fig 2, lane 2a), 29 kDa (lane 2b) and Mcgp33 at 33 kDa (lane 3b). The MALDI/MS peptide mass results from the 2a and 2b bands showed significant correlation. The results from Mcgp33 are shown in figure 3. Peptides with molecular weights of 1111.5254, 1433.7130, 2163.0570, 2273.1765 and 2550.2766 (m/z) are known contaminant autolysis products of trypsin. Specific prominent peaks remained at 615.3208, 713.3554, 788.3769, 999.5171 and 1138.5799 (m/z). A database search using these mass data did not indicate any known peptides.

Electrophoresis and immunoblotting. Myxospore proteins separated by SDS-gel electrophoresis gave bands covering a broad molecular weight range between 7 and 200 kDa (fig. 4, lane 1). Lanes 2 and 3 show the results of blotting anti-triactinomyxon polyclonal antibodies (anti-TAMpcAb, produced in rabbit) against glycoprotein extracts from both spore stages of *M. cerebralis*. Antibody reactions on myxospore proteins (lane 2) had molecular masses of 29-210 kDa with dominant bands at 30, 40, 70, 100 and 125 kDa, and a less-intense

band at 7 kDa. The antigen giving rise to the 70 kDa band was found to possess endogen streptavidin binding activity (described above). Anti-TAMpcAb had broad reactivity to proteins of triactinomyxon spores. Lectin-affinity chromatography results are shown in figure 2 (lanes 2b and 3b). Neither GSA II (lane 4) nor SJA (lane 5) showed binding of anti-TAMpcAb.

DISCUSSION

Although a fair amount is known about morphological characteristics of the development and lifecycle of *M. cerebralis*, there remains much to be elucidated regarding the biochemistry of attachment processes of parasite spores to host cells. Carbohydrate motifs in *M. cerebralis* spores, in particular, interact with binding sites both on rainbow trout and oligochaetes and provoke immune responses: processes of glycan recognition which are often mediated by lectins. Buchmann (2001) notes, that mucus of rainbow trout has lectin activity for mannose, galactose and lactose. Knaus et al. (2005) use lectin histochemistry as an indicator of carbohydrate motifs in *M. cerebralis* spores. In the present study, we identified glycoproteins in *M. cerebralis* myxospores through detection with plant lectins. These glycoproteins, putatively responsible for inducing host immune response, were tested against antigens derived from glycoproteins of *M. cerebralis* actinospores (triactinomyxons).

Each of the four plant lectins used, lead to detection of specific glyco-motifs in the myxospore protein extracts. Several bands were detected by more than one lectin, which indicates the presence of multiple oligosaccharide structures. In particular, 23 kDa glycoproteins were reactive with all lectins. Reactivity to *Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin (PHA-E) indicates the presence of trisaccharide units [β -D-Gal(1-3,4)- β -D-GlcNAc(1-2)-D-Man] in so-called bisected complex-type N-glycans (Goldstein & Hayes 1978); these branched N-acetyl-D-glucosamine modifications were present in multiple myxospore glycoproteins. *Griffonia simplicifolia* agglutinin II (GSA II) binds with residues containing N-acetyl-D-glucosamine and GlcNAc β 4GlcNAc, which were located at sites on polar capsules and amoebic germs respectively (Knaus et al. 2005). Almost all of the glycoconjugates we detected were N-glycosylated. We isolated a SJA-binding glycoprotein Mcgp33, which subsequent studies revealed was not detectable by anti-triactinomyxon antibodies. AntiTAM-reactive antigens in myxospores have generally higher molecular masses.

Plant lectins have proven to be extraordinarily useful tools for investigating carbohydrate structure, because of their affinity for specific terminal and internal sugars, carbohydrate

linkages and oligomers, in complex glycans. Lectin blotting has already been used both on purified membrane proteins (Jaffe & McMahon-Pratt 1988) and crude membrane extracts of *Leishmania* promastigotes (Grogl et al. 1987, Rossell et al. 1990). In our case, plant lectins were selected based on the histochemical results of Knaus et al. (2005). Based on morphological observations, the lectins indicated the existence of complex N-glycans located on shell valves, amoebic germs and polar capsules of myxospores in fish cartilage. Epitopes containing both GalNAc α 3- (GSA I) and GalNAc β 6-residues (SJA) were detected on polar capsules and amoebic germs, but not on shell valves.

We also developed a deglycosylation method which allows hydrolysis to be done after the proteins have been transferred to a nitrocellulose membrane. This involved modifying buffers, as noted in the Methods section. A similar approach using polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes has been developed by Weitzhandler et al. (1993) for determination of the complete monosaccharide composition of selected proteins. Our modifications to this procedure allow simultaneous comparison of molecular weights of native and deglycosylated samples; otherwise bands may shift because of mass loss before running in the gel.

Differences in composition between the carbohydrate moieties of host and invading pathogen are also fundamental to the function of an innate immune system – the discrimination of self from non-self (Turner 1996). Immune defence strategies of fish, principally non-specific, rely on successful detection of foreign molecules, especially proteins, the antigenicity of which may be based on both their underlying amino acid structure, as well as post-translational modifications such as glycosylation (Feizi & Childs 1987). Specific immune responses in a fish host may be triggered by glycosylated parasite proteins, released after spore lysis or other contact.

The first barrier a fish presents to an invading pathogen is the mucous layer of the epidermis. Analyses of mucous from several fish species including eel, conger and rainbow trout have revealed various lectin activities, suggesting a defensive role is played by some of the mucous component molecules (Muramoto et al. 1999, Hosono et al. 1999, Honda et al. 2000, Buchmann 2001), although the specific functions of these lectin activities have not been fully elucidated. Epitopes from *M. cerebralis* myxospores contain so-called bisected N-acetyl-D-glucosamine. This is a core modification of complex N-glycans (Goldstein & Hayes 1978) known to be catalysed by N-acetyl-D-glucosamintransferase III (GnT-III); a process which may involve either the parasite's own enzyme activities or the host's own enzyme portfolio. Many studies indicate utilisation of host enzymes by parasites, in order to evade the host's immune response through antigen mimicry (Damian 1987, Inal 2004). With this in mind, we questioned

whether *M. cerebralis* has developed a similar strategy of host mimicry. We have shown that Mcgp33 is expressed in *M. cerebralis* myxospores in the fish host, but not in the triactinomyxon stage, which serves as evidence in favour of Markiw's (1989) postulates of adaptive expression of *M. cerebralis* antigens. Yet other antigens, detected by Hamilton & Canning (1988) and Markiw (1989), were present in both spore stages from fish and oligochaete hosts. We can confirm previous histochemical findings that there is variation of presented carbohydrate moieties in the two spore stages (Knaus et al. 2005).

After release from the fish host, *M. cerebralis* myxospores are ingested by the oligochaete host, *Tubifex tubifex*, in which they then invade the gut epithelia (El-Matbouli and Hoffmann 1998). A possible invading strategy specific for the target tissue of the host can be based on the recognition between lectins and glycans (Jacobson & Doyle 1996, Loukas & Maizels 2000, Buchmann & Lindenstrøm 2002). In a similar manner to the fish host, lectin molecules are suggested to play an important role in invertebrate immune response (Bilej et al. 2000), although no data are available on lectin activity in the gut epithelial cells from *Tubifex tubifex*. The role of the glycan-lectin system in *M. cerebralis* invasion of *T. tubifex* is undoubtedly worth additional investigation, as it may shed new light on the divergent susceptibilities of different strains of *T. tubifex* to the parasite (Beauchamp et al. 2002).

Acknowledgements. This study was supported by funding from the German Science Foundation (DFG), grant number [EL 174/1-1]. We thank Prof. Dr. Ronald P. Hedrick, Department of Medicine and Epidemiology School of Veterinary Medicine, University of California, Davis for kindly providing anti-triactinomyxon polyclonal antibodies. We are further grateful to Mr. Stephen Atkinson and Dr. Sascha Hallett for editing the language.

LITERATURE CITED

- d'Avila-Levy CM, Araujo FM, Vermelho AB, Branquinha MH, Alviano CS, Soares RM, dos Santos AL (2004) Differential lectin recognition of glycoproteins in choanomastigote-shaped trypanosomatids: taxonomic implications. *FEMS Microbiol Lett* 231(2):171-6
- Beauchamp KA, Gay M, Kelley GO, El-Matbouli M, Kathman RD, Nehring RB, RP Hedrick (2002) Prevalence and susceptibility of infection to *Myxobolus cerebralis* and genetic differences among populations of *Tubifex tubifex* from the windy gab reservoir and the upper Colorado river: whirling disease enzootic areas. *Dis Aquat Org* 51: 113-121
- Bilej M, De Baetselier P, Beschin A (2000) Antimicrobial defence of the earthworm. *Folia Microbiol* 45(4):283-300
- Bonilha VL, Ciavaglia Mdo C, de Souza W, Costa e Silva Filho F (1995) The involvement of terminal carbohydrates of the mammalian cell surface in the cytoadhesion of trichomonads. *Parasitol Res* 81(2):121-6
- Borst P, Rudenko G, Taylor MC, Blundell PA, Van Leeuwen F, Bitter W, Cross M, McCulloch R (1996) Antigenic variation in trypanosomes. *Arch Med Res Autumn* 27(3):379-88
- Buchmann K (2001) Lectins in fish skin: do they play a role in host-monogenean interactions? *J Helminthol* 75(3):227-31
- Buchmann K, Lindenstrøm T (2002) Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *Int J Parasitol* 32(3):309-19
- Burghaus PA, Gerold P, Pan W, Schwarz RT, Lingelback K, Bujard H (1999) Analysis of recombinant merozoite surface protein-1 of *Plasmodium falciparum* expressed in mammalian cells. *Mol Biochem Parasitol* 104:171-183
- Cohen AM, Rumpel K, Coombs GH, Wastling JM (2002) Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 32(1):39-51
- Damian RT (1987) Molecular mimicry revisited. *Parasitol Today* 3(9):263-6
- Dieckmann-Schuppert A, Bause E, Schwarz RT (1993) Studies of *O*-glycans of *Plasmodium falciparum* infected human erythrocytes. Evidence for *O*-GlcNAc and *O*-GlcNAc transferase in malaria parasites. *Eur J Biochem* 216:779-788
- El-Matbouli M, Hoffmann R (1989) Experimental transmission of two *Myxobolus spp.* developing bisporogeny via tubificid worms. *Parasitol Res* 75(6):461-4
- El-Matbouli M, Hoffmann RW (1991) Effect of freezing, aging and passage through the alimentary canal of predatory animals on the viability of *Myxobolus cerebralis* spores. *J Aquat Anim Health* 3:260-262
- El-Matbouli M, Hoffmann RW, Mandok C (1995) Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cartilage. *J Fish Biol* 46:919-935
- El-Matbouli M, Hoffmann RW (1998) Light and electron microscopic study on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* in *Tubifex tubifex* to the actinosporean stage triactinomyxon. *Int J Parasitol* 28:195-202

- Feizi T, Childs RA (1987) Carbohydrates as antigenic determinants of glycoproteins. *Biochem J* 245(1):1-11
- Ferguson MAJ (1997) The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352:1295-1302
- Ferguson MAJ (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contribution of trypanosome research. *J Cell Sci* 112:2799-2809
- Gillin FD, Hagblom P, Harwood J, Aley SB, Reiner DS (1990) Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4463-4467
- Gillin FD, Reiner DS (1996) Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol* 50:679-705
- Goldstein IJ, Hayes CC (1978) The lectins: carbohydrate binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 35:127-340
- Grogl M, Franke ED, McGreevy PB, Kuhn RE (1987) *Leishmania braziliensis*: protein, carbohydrate, and antigen differences between log phase and stationary phase promastigotes in vitro. *Exp Parasitol* 63(3):352-9
- Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Sofronic-Milosavljevic L (2002) Lectin-blot analyses of *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory-secretory components. *Parasitol Res* 88(11):1004-7
- Hamilton AJ, Canning EU (1988) The production of mouse anti-*Myxosoma cerebralis* antiserum from Percoll-purified spores and its use in immunofluorescent labelling of Histoiresin-embedded cartilage derived from infected rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Dis* 11:662-668
- Haselbeck A, Hösel W (1988) Studies on the effect of the incubation conditions, various detergents and protein concentration on the enzymatic activity of N-Glycosidase F (Glycopeptidase F) and Endoglycosidase F. *Topics in Biochemistry No. 8* (Roche Molecular Biochemicals)
- Hofer B (1903) Über die Drehkrankheit der Regenbogenforelle. *Allg FischZtg* 28:7-8
- Honda S, Kashiwagi M, Miyamoto K, Takei Y, Hirose S (2000) Multiplicity, structures, and endocrine and exocrine natures of eel fucose-binding lectins. *J Biol Chem* 275(42):33151-7
- Hosono M, Ishikawa K, Mineki R, Murayama K, Numata C, Ogawa Y, Takayanagi Y, Nitta K (1999) Tandem repeat structure of rhamnose-binding lectin from catfish (*Silurus asotus*) eggs *Biochim Biophys Acta* 1472(3):668-75
- Inal JM (2004) Parasite interaction with host complement: beyond attack regulation. *Trends Parasitol* 20(9):407-12
- Ingram GA (1980) Substances involved in the natural resistance of fish infection – a review. *J Fish Biol* 16:23-60
- Jacobson RL, Doyle RJ (1996) Lectin-parasite interactions. *Parasitol Today* 12:55-61
- Jaffe CL, McMahon-Pratt D (1988) The identification of membrane glycoconjugates in *Leishmania* species. *J Parasitol* 74(4):548-61

- Khan AH, Qazi AM, Hoessli DC, Torred-Duarte AP, Senaldi G, Qazi MH, Walker-Nasir E, Nasir-ud-Din (1997) Carbohydrate moiety of *Plasmodium falciparum* glycoproteins: the nature of the carbohydrate-peptide linkage in the MSP-2 glycoprotein. *Biochem Mol Biol Int* 42:655-668
- Knaus M, Kaltner H, Gabius HJ, El-Matbouli M (2005) Lektinhistochemische Darstellung oberflächenassoziierter parasitärer Glykane: Faktoren in der Anheftung und Migration von *Myxobolus cerebralis* im piscinen (*Oncorhynchus mykiss*) und tubifiziden (*Tubifex tubifex*) Wirtsgewebe? EAAP Proceeding (in press)
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5
- Loukas A, Maizels RM (2000) Helminth C-type lectins and host-parasite interactions. *Parasitol Today* 16(8):333-9
- Marin de Mateo M, McGeorge J, Morris D, Kent ML (1996) Comparative studies of PKX and *Sphaerospora* spp from salmonids using lectin and monoclonal antibody staining techniques. *J Fish Dis* 19:55-63
- Markiw ME (1989) Salmonid whirling disease: myxosporean and actinosporean stage cross-react in direct fluorescent antibody test. *J Fish Dis* 12:137-141
- Morris DJ, Adams A (2004) Localization of carbohydrate terminals on *Tetracapsuloides bryosalmonae* using lectin histochemistry and immunogold electron microscopy. *J Fish Dis* 27:37-45
- Muñoz P, Sitja-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P (2000) Antigenic characterization of *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida), a parasite from European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Teleostei: Serranidae). *Dis Aquat Org* 40(2):117-24
- Muramoto K, Kagawa D, Sato T, Ogawa T, Nishida Y, Kamiya H (1999) Functional and structural characterization of multiple galectins from the skin mucus of conger eel, *Conger myriaster*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 123(1):33-45
- Nash TE (1992) Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. *Parasitol Today* 8:229-234
- Nehring RB, Thompson KG, Taurman KA, Shuler DL (2002) Laboratory studies indicating that living brown trout *Salmo trutta* expel viable *Myxobolus cerebralis* myxospores. Pages 125-134 In Bartholomew JL and Wilson JC, editors. Whirling Disease: Reviews and Current Topics. American Fisheries Society, Symposium 29, Bethesda, Maryland
- O'Grodnick JJ (1975) Whirling disease *Myxosoma cerebralis* spore concentration using the continuous plankton centrifuge. *J Wildl Dis* 11(1):54-7
- Ortega-Barria E, Boothroyd JC (1999) A Toxoplasma lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J Biol Chem* 274(3):1267-76
- Petri WA Jr, Haque R, Mann BJ (2002) The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* 56:39-64
- Rossell RJ, Stevens AF, Miles MA, Allen AK (1990) A comparison of the lectin-binding properties of glycoconjugates from a range of Leishmania species. *Parasitol Res* 76(4):294-300
- Rudenko G, Cross M, Borst P (1998) Changing the end: antigenic variation orchestrated at the telomeres of African trypanosomes. *Trends Microbiol* 6:113-117

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning (2001) A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Turner MW (1996) Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 17(11):532-40

Weitzhandler M, Kadlecsek D, Avdalovic N, Forte JG, Chow D, Townsend RR (1993) Monosaccharide and Oligosaccharide Analysis of Proteins Transferred to Polyvinylidene Fluoride Membranes after Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J Biol Chem* 268(7):5121-5130

Wolf K, Markiw ME (1984) Biology contravenes taxonomy in the myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 255:1449-1452

Yang S, Nikodem D, Davidson EA, Gowda DC (1999) Glycosylation and proteolytic processing of 70kDa C-terminal recombinant polypeptides of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 expressed in mammalian cells. *Glycobiology* 9:1347-1356

Figures legend:

Fig. 1. Binding pattern profiles of glycoproteins in discontinuous 12% SDS-PAGE on three protein sources: (a) head cartilage of *O. mykiss*, (b) *M. cerebralis* myxospores and (c) deglycosylated *M. cerebralis* myxospores; using four different lectins GSA I (1), GSA II (2), SJA (3), PHA-E (4), Arrowheads indicate molecular weights of standard proteins.

Fig. 2. Silver stained reducing discontinuous 12% SDS-PAGE of glycoprotein samples prepared by lectin-affinity chromatography, with proteins from (a) *O. mykiss* and (b) *M. cerebralis* myxospores. Lanes 1a and 1b: GSA I, showed no significant affinity with either *O. mykiss* (1a) or *M. cerebralis* (1b). Lanes 2a and 2b: GSA II showed distinct *O. mykiss* glycoprotein bands at 28 and 31 kDa (lane 2a) and a *M. cerebralis* glycan (29 kDa) highly decorated with GlcNAc β 4GlcNAc residues (lane 2b). Lanes 3a and 3b: SJA. *O. mykiss* showed no affinity to SJA (lane 3a) while *M. cerebralis* (3b) contains a glycoprotein highly decorated with GalNAc β 6Gal epitopes (33 kDa). Lanes 4a and 4b: PHA-E showed no significant affinity with either *O. mykiss* (4a) or *M. cerebralis* (4b). Arrowheads at left indicate molecular weights of standard proteins.

Fig. 3. Peptide-mass fingerprint showing Mcgp33 band resulting from protein separation after SJA-affinity chromatography with *M. cerebralis* myxospores.

Fig. 4. Lane 1: Coomassie brilliant blue stain of total protein extracted from developmental stages of *M. cerebralis* in *O. mykiss* following separation by 12% SDS-PAGE. Arrowheads at left indicate molecular weights of standard proteins. Lanes 2 & 3: Antigen detection profiles of *M. cerebralis* myxospores (2) and actinosporeans (3) against anti-TAMpcAb (rabbit) Myxospore antigens reacted to produce banding at 9 kDa and 30-225 kDa. Lanes 4 & 5: Antigen detection profiles of glycoproteins isolated from *Myxobolus cerebralis* by lectin-affinity chromatography against SJA (lane 4) and GSA II (lane 5). Arrowheads at left indicate molecular weights of standard proteins.

Lectin	Abbreviation	Monosaccharide specificity	Potent oligosaccharide
<i>Griffonia simplicifolia</i> agglutinin I	GSA I	GalNAc	GalNAc α 3Gal, GalNAc α 3GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc
<i>Griffonia simplicifolia</i> agglutinin II	GSA II	GlcNAc	GlcNAc β 4GlcNAc
<i>Phaseolus vulgaris</i> erythroagglutinin	PHA-E	no known specificity	Bisected complex-type N-glycans, Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6(GlcNAc β 2Man α 3)(GlcNAc β 4)Man β 4GlcNAc
<i>Sophora japonica</i> agglutinin	SJA	GalNAc	GalNAc β 6Gal

Table 1. Plant lectins used in this study

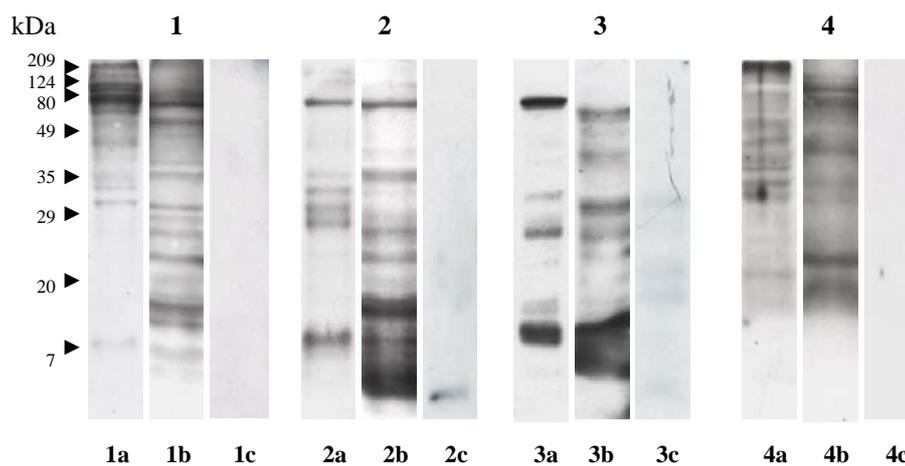


Figure 1.

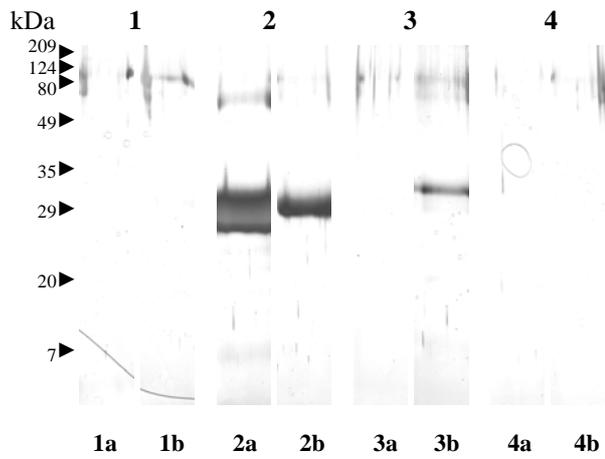


Figure 2.

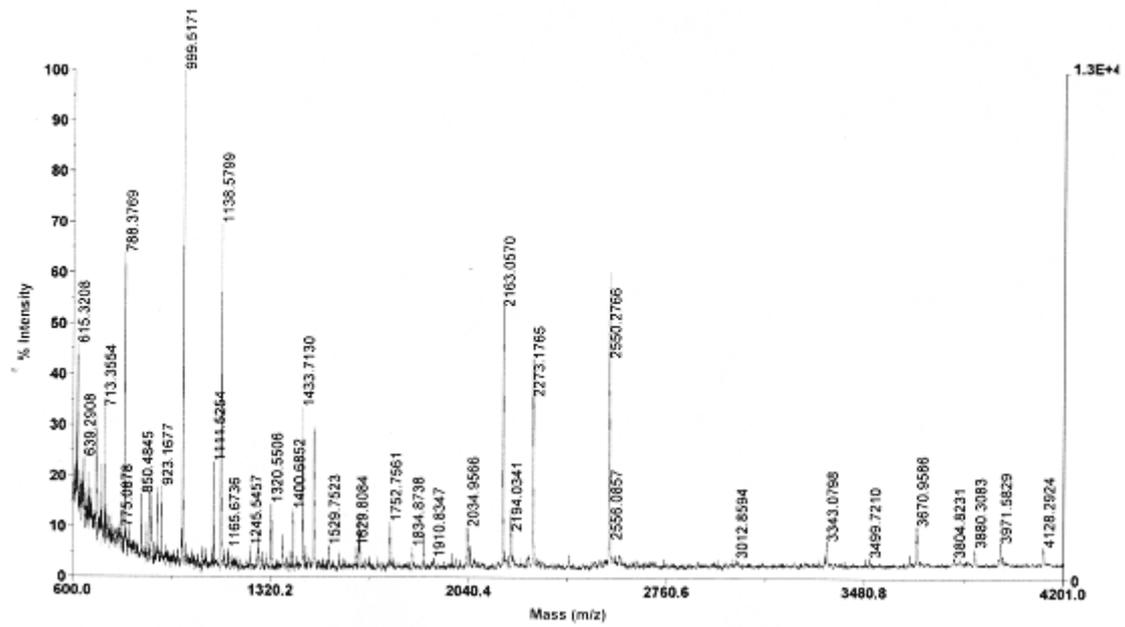


Figure 3.

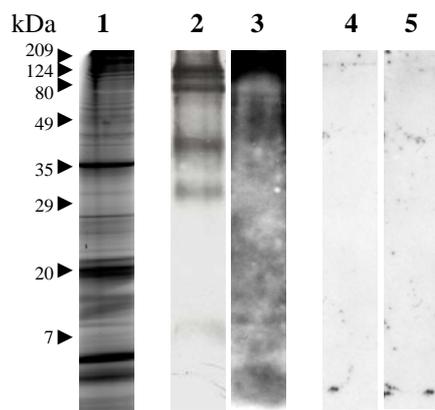


Figure 4.

DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS

Confidential Evaluation of:
[Title; author(s)]

Rau A

Martin Knaus, Mansour El-Matbouli-
Lectin blot studies on proteins of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent
of whirling disease

<p>MS sent out for evaluation on:</p> <p>Please return evaluation within 3 weeks (if possible by Email or Fax) Should you be unable to keep the deadline of 3 weeks, return MS immediately</p> <p><input type="checkbox"/> Please return MS to me <input type="checkbox"/> No need to return MS</p>	<p>Please return evaluation to:</p> <p>Email/Fax:</p>
--	---

General evaluation

- Publish as is
 Acceptable after revision
 Revise and re-submit for additional review
 Publication not recommended

Priority indication

- Key ms
 Important ms
 Useful ms
(competent but repetitive of existing knowledge)

If, in your opinion, the manuscript is clearly below DAO quality requirements or outside DAO's scope you may recommend rejection without investing further time and energy.

Specific evaluation (use separate sheet if more convenient) :

I have read the paper by Knaus and El-Matbouli and it makes a valuable contribution to our knowledge of whirling disease. There are a few minor typographical errors.

In addition, you may like to consider the following : p4 I am unclear if spores are separated on density why they are found at every Percoll interface p7 and Fig 1 GSA I lane a shows head cartilage, lane b shows Myxo spores. I presume the statement at the bottom of page 7 relates to the band profile that exists if one subtracts that the profile occurring in lane a from that in lane b. It is slightly confusing. In addition, clarity may be improved if the authors label the appropriate bands in Fig 1 referred to in the text.

p7 What is the specificity of the anti-triactinomyxon polyclonal antibodies supplied by Ron Hedrick. Reference?

p8 Lectin affinity chromatography. In text lane 2a 27 kDa and 29kDa bands are referred to, yet in the appropriate Fig 2 legend, bands are described as 28 and 31 kDa?

p10 Weitzhandler et al not in reference list

Fig 1 lane 3 b. There appears be be more bands in the region 39-80 kDa in lane b compared to lane a than are referred to in the text.

In conclusion, the clarity of this presentation would be improved by additional labelling of bands in Figures with appropriate cross-referencing to the text.

In addition, there appears to be a large reference list.

Could this be reduced if there is pressure on journal space?

Please sign pink page only and return, together with green page.
White page is for your files.
(Green page may be forwarded to author by editor.)

Date

Signature of Review Editor/Referee

DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS

Confidential Evaluation of:
[Title; author(s)]

Martin Knaus, Mansour El-Matbouli
Lectin blot studies on proteins of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent
of whirling disease

<p>MS sent out for evaluation on:</p> <p>Please return evaluation within 3 weeks (if possible by Email or Fax) Should you be unable to keep the deadline of 3 weeks, return MS immediately</p> <p><input type="checkbox"/> Please return MS to me <input type="checkbox"/> No need to return MS</p>	<p>Please return evaluation to:</p> <p>Email/Fax:</p>
--	---

General evaluation

- Publish as is Revise and re-submit for additional review
 Acceptable after revision Publication not recommended

Priority indication

- Key ms Important ms Useful ms
(competent but repetitive of existing knowledge)

If, in your opinion, the manuscript is clearly below DAO quality requirements or outside DAO's scope you may recommend rejection without investing further time and energy.

Specific evaluation (use separate sheet if more convenient)

Glucoproteins were found to play an important role in the interaction of pathogens with defence pathways of their host. These molecules regulate attachment of micro organisms to cells, invasion into host tissues or cells and, as signalling molecules, are responsible for recognition and direction of host responses. Information on glucoproteins of fish parasites is scarce, and the authors undertook first steps into this broad, and up to now widely neglected area of parasite-host interaction. In conclusion, this is a good manuscript, I recommend a publication in the DAO. There are only few editorial changes needed:

A few misspellings slipped through the authors' final editing and reference for Weitzhandler et al (cited on p 10) is missing in the reference list.

Please sign pink page only and return, together with green page.
White page is for your files.
(Green page may be forwarded to author by editor.)

Date

Signature of Review Editor/Referee

4.2. Ergebnisse – Teil II

Martin Knaus¹, Herbert Kaltner², Hans-Joachim Gabius², Mansour El-Matbouli¹

Characterisation of carbohydrate-binding sites in developmental stages of *Myxobolus cerebralis*

¹Institute for Zoology, Fish Biology and Fish Diseases, Faculty of Veterinary, University of Munich, Kaulbachstraße 39, 80539 Munich, Germany

²Institute for Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary, University of Munich, Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany

H. Kaltner
Institute for Physiological Chemistry
Faculty of Veterinary Medicine
University of Munich
Veterinärstraße 13
D-80539 Munich
E-mail: kaltner@lmu.de
Tel.: +89-2180-3984

Abstract

Glycans and lectins (carbohydrate-binding molecules) form a mutual recognition system which enables parasitic organisms to attach to the host cells and/or take part in the migration of their developmental stages into the target tissue. The aim of the present study was to identify and characterise the potential binding activity of glycoconjugates in different developmental stages of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease in salmonids. The binding patterns of thirteen biotinylated neoglycoconjugates were examined histochemically in thin-sections of infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and oligochaetes (*Tubifex tubifex*), as well as isolated waterborne triactinomyxon spores. We observed distinct structure-selective and developmental stage-regulated expression of certain classes of carbohydrate binding. In triactinomyxon spores, expression of carbohydrate binding activity for α -L-Fuc-BSA-biotin, α -D-GalNAc-BSA-biotin, β -D-GlcNAc-BSA-biotin, Lac-BSA-biotin and ASF-biotin was up-regulated in the polar capsules; shell valves showed no activity. In the gut of *T. tubifex*, polar capsules of the parasite showed strong positive reaction only for β -D-GlcNAc-BSA-biotin. In fish cartilage, polar capsules were negative, but the spore shell valves showed a broad range of carbohydrate binding activity. No activity was detected for either α 6- or α 3-linked N-acetyl-D-neuraminic acid to galactose. An adhesion assay was performed on Glycowell[®]-plates and *Myxobolus* spores were found to specifically adhere to matrices containing residues of lactose, fucose, galactose, N-acetyl-D-galactosamine and N-acetyl-D-glucosamine. This is the first study to identify lectin activity in a myxozoan parasite; activity likely to play a role in recognition systems involved in host specificity and the processes of spore attachment and invasion.

Introduction

Myxobolus cerebralis is a parasite of salmonid fish and the causative agent of whirling disease, one of the most ecological and economical important diseases of salmonids in the northern hemisphere. The parasite poses a significant threat to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) wild populations in North America and hatchery stocks worldwide (Hedrick et al. 1998). High mortality rates of fry and fingerlings in hatchery-reared and feral rainbow trout have also been reported (El-Matbouli et al. 1992; Hedrick et al. 1998). In Germany, the first documented outbreak of whirling disease occurred in 1898 among rainbow trout, imported principally from the northern USA (Hofer 1903).

Investigations of Wolf and Markiw (1984) and El-Matbouli and Hoffmann (1989) established that *Myxobolus cerebralis* has a complex, two-host life cycle. The parasite's primary host is an oligochaete worm *Tubifex tubifex*, in which triactinomyxon actinospores (TAMs) develop in the gut epithelium about 90 days after infection (El-Matbouli and Hoffmann 1989, 1998). TAMs become waterborne after release from the oligochaete and attach to susceptible fish; TAMs are the only developmental stage infectious to fish. Subsequently, the spores release an infectious sporoplasm which penetrates the fish epidermis and migrates via the peripheral nervous system and medulla spinalis to the cerebral and spinal cartilage (El-Matbouli et al. 1995). About 90 days after infection, further multiplication and sporogenesis occurs, which results in production of thousands of myxobolus myxospores in the cartilage and secondary ossified areas of the head and spine. These myxospores are released principally when the fish dies and decays or is consumed by a predator (El-Matbouli and Hoffmann 1991) but can be shed from live fish (Nehring et al. 2002). Although developmental stages of the parasite have been described in detail, mechanisms for invasion of the epidermis, migration through the peripheral and central nervous system, facilitation of cartilage lysis, and initiation of sporogenesis, remain unresolved.

A common theme in host parasite recognition is the involvement of lectin-carbohydrate interactions. There is increasing experimental support for the concept that a) oligosaccharides serve as coding units for biological information (a sugar code) and b) that recognition protein (lectin)-carbohydrate interactions are important in physiological processes such as cell adhesion and migration. We sought to investigate these interactions in *M. cerebralis*.

It is well established that glycoconjugates on the surface of protozoan parasites, such as the glycoproteins of *Trypanosoma brucei* or phosphoglycans of *Leishmania*, are an essential component of parasite virulence (Guha-Nyogie et al. 2001). In helminth parasites, for example

Schistosoma, glycoconjugates on larvae, adult worms and eggs play an important role in the mechanisms that schistosoma utilise to withstand the immunological response of the host (Hokke et al. 2001; Khoo and Dell 2001). In contrast to glycoconjugates, only a few parasite carbohydrate-binding proteins have been identified. The protozoan parasite *Entamoeba histolytica* utilises a Gal/GalNAc-binding lectin on its surface to induce alterations in cell signalling events in host cells, which facilitates invasion of the cell (Petri et al. 2002). In helminthic parasites, expression of galectins and C-type lectins influences the course of infection and the immune response of the host (Loukas and Maizels 2000; Young and Meeusen 2001). In aquatic parasites, surface associated glycans were identified in *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Morris and Adams 2004), *Eudiplozoon nipponicum* (Schabussova et al. 2004), in monogenean parasites (Buchmann and Lindenstrøm 2002) and in *Cryptobia spp.* (Feng and Woo 1998). The interaction of such glycans with lectins including congerin I and II (Muramoto and Kamiya 1992; Muramoto et al. 1999) and AJL 1 and 2 (Tasumi et al. 2002, 2004) in fish mucous, may constitute a recognition system involved in attachment of ichthyoparasites to the epidermis of the host. It remains an open question whether lectin-like activity in aquatic parasites is expressed on their surface.

The first steps in development of *M. cerebralis* in rainbow trout are attachment of TAMs to the epidermis and migration of sporoplasm cells to their target tissues. While these processes have been well documented morphologically, using light and electron microscopy (El-Matbouli et al. 1995), the molecular mechanisms underlying them remain unclear. By histochemically mapping the distribution of endogenous carbohydrate-binding sites on the developmental stages of *M. cerebralis* we sought to better resolve these essential life cycle processes.

The most feasible technique to achieve this objective is to chemically design suitable ligands for histochemical localisation of carbohydrate-binding proteins. Neoglycoproteins have proven to be appropriate ligands and can be produced by conjugating carbohydrate residues onto a histochemically inert polypeptide backbone formed either of protein - generally bovine serum albumin (BSA) - or synthetic polypeptides (PAA, poly(2-hydroxyethyl)acrylamide). Neoglycoproteins can be easily labelled with biotin, for example, and have been used in tumor-histopathology to determine whether carbohydrate-binding sites have prognostic relevance or not (Legendre et al. 2004). The use of biotin labelled neoglycoconjugates has been widely used for lectin characterisation on tissue sections of multiple animal species. Carbohydrate-binding sites have for example been documented on peripheral nerves of pigs (Gabijs et al. 1988) and bovine spermatozoa (Sinowatz et al. 1988). Glycohistochemistry has also been used in lectin research of lower vertebrates. Villalba et al. (1987) and Zacccone et al. (1987) localised

carbohydrate binding sites on the epidermis of amphibians. Binding sites were detected in fish skin by Danguy and Genten, (1989) and Danguy et al. (1991). In protozoans, glycohistochemistry has only been used on *Tetrahymena piriformis*, an ectocommensal of aquatic organisms (Kovács et al. 1997): it was shown that this ciliate contains considerable amount of lectin activity specific for β -D-glucose- and lactose-motifs.

In the present study, biotinylated neoglycoproteins were for the first time introduced to myxozoan parasitology. We have applied a set of biotinylated neoglycoproteins to investigate the presence, localisation and developmental regulation of specific binding sites for lectins in *M. cerebralis*.

Materials and methods

Tissue material and reagents

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *M. cerebralis* were overdosed with MS-222 anaesthetic (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The heads were detached, split longitudinally and either: i. fixed in either Formaldehyde 5% (v/v) or Bouin's solution for 24 h at 4 °C, dehydrated (Tissue-Tek® VIP, Sakura Bayer Diagnostics), then embedded in paraffin wax according to a routine protocol and 4 μ m sections cut using a rotating microtome (1140/Autocut, Reichert-Jung); or frozen, embedded in Tissue-Tek® at -80 °C and cut into 8 μ m sections using a Microm HM 500 OM (Microm GmbH, Walldorf, Germany).

Laboratory cultures of *T. tubifex* oligochaetes maintained at 14 °C were infected with *M. cerebralis* myxospores, which had been isolated and purified from infected rainbow trout tissue. About 90 d post-infection, oligochaetes were fixed for 24 h at 4 °C and processed as described above. TAMs were collected and concentrated from the water above the worm culture, using a 20 μ m nitex screen (Monodur Nr.20, Josef Hepfinger, Munich, Germany). Spore suspensions were allowed to settle at 4 °C for 2 h. The clear supernatant was then transferred to fresh tubes and spores separated and purified using a Percoll gradient (Sigma Chemical Co., Munich, Germany): the supernatant was refiltered through a 20 μ m nitex screen. In a 15 ml centrifuge tube, 2 ml of the filtered TAMs were pipetted onto the top of 10 ml of 20% Percoll. The pellet from the original spore suspension was also processed in this manner to increase the yield of spores. Both tubes were then centrifuged at 250 g for 10 min. Spores became visible as white bands, which were carefully transferred to clean tubes, filtered and washed three times to

remove residual Percoll. The purified TAMs were then concentrated and re-suspended in a small volume of distilled water and a 50 µl aliquot transferred to glass microscope slides and air-dried for counting using an inverted microscope (Axiovert 25, Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany). Slides with at least 30 spores were fixed with 80% (v/v) acetone for 10 minutes at 4 °C.

For the isolation of myxospores, laboratory-infected rainbow trout were overdosed with MS 222 and dissected. Spores were purified from cranial cartilage following a routine protocol: excess soft tissue was dissected away from spore-bearing head cartilage, which was then cut into 0.5-1.0 mm pieces and homogenised in a commercial mixer for 10 min. The spores were then separated and concentrated by means of a plankton centrifuge according to the method of O'Grodnick (1975). Pellets were re-suspended in 2.5 ml distilled water and placed on top of a discontinuous Percoll gradient (100%, 75%, 50%, 25% Percoll solution and distilled water, each 2.5 ml) and centrifuged at 400 g for 10 min. The white spore band from each interface was carefully removed, diluted in 14 ml distilled water and centrifuged to remove Percoll residue. The pellet was resuspended in 500 µl distilled water and a 20 µl aliquot counted using a haemocytometer. Aliquots were transferred to glass slides, air-dried at room temperature and fixed with acetone 80% (v/v) for 10 min at 4 °C. The biotin-labelled glycoconjugates, used in this study are listed in Table 1.

For adhesion assays, GlycoWell™ microplates from Lundonia Biotech AB (Eslöv, Sweden) were used. These plates have various carbohydrates covalently linked to the plastic surface of the microwells via 16-18 atom long flexible spacers. These allow homogenous presentation of all significant epitopes to a protein, rendering the GlycoWell™ plates particularly suitable for studying carbohydrate-protein interactions. Plates bearing the following carbohydrates were included in the assay: mannose, fucose, galactose, lactose, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-neuraminic acid and globotriose. Control reactions were performed either by comparative inhibition with the haptenic sugar or using a microwell plate presenting free N-acetyl moieties to measure the extent of carbohydrate-independent binding. For specificity controls the haptenic sugars, α -D-mannose, α -L-fucose, β -D-galactose, α -D-GalNAc, β -D-GlcNAc and β -lactose, were used (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Histochemistry with biotin-labelled neoglycoconjugates

Histological sections were dewaxed and dehydrated through a xylene and graded alcohol series, then incubated at room temperature for 30 min with 0.3% (v/v) hydrogen peroxide to

block endogenous peroxidase activity. After a washing step, the slides were pre-incubated with a buffered solution of 0.1% (w/v) carbohydrate-free bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 15 min to block unspecific binding sites. After two rinses with HEPES-buffered solution (40 mM HEPES, 10 mM CaCl₂, 10 mM MnCl₂, 10 mM MgCl at pH 7.5 (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Germany)), the slides were incubated with biotin-labelled neoglycoprotein overnight at room temperature. After two washing steps to remove unbound marker, sections were incubated for 30 min at room temperature in a solution of ABC kit reagents (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Finally, bound neoglycoproteins were localised by incubation for 10 min with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (0.05%) and hydrogen peroxide (0.01%) as chromogen substrates (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The reaction was stopped with distilled water and the slides counterstained with Gill's hematoxylin for about 10 sec.

Control reactions to ascertain carbohydrate-depending binding of the markers were performed by competitive inhibition with both biotinylated- and nonbiotinylated-compounds, and with BSA-biotin conjugate. The incubation step was omitted with the biotinylated neoglycoconjugates to exclude any contribution to staining from endogenous biotin, from carbohydrate-independent binding via protein-protein interactions, and from binding of kit-reagents. The degree of staining was assessed using an Olympus BH-2 light microscope (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Germany) and evaluated statistically.

Adhesion assay

GlycoWell[®]-microplates were blocked with 200 µl of 0.1% (w/v) carbohydrate-free BSA solution for 2h at room temperature, to saturate non-specific protein-binding sites. After washing with 100 µl HEPES-buffer (40 mM HEPES, 10 mM CaCl₂, 10 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 7.5), ~5,000 spores, in 100 µl buffered solution, were added to each well and incubated overnight at 4 °C. Subsequently, wells were carefully washed three times, and 100 µl glutaraldehyde 5% (w/v) added for 30 min at room temperature, to fix the attached spores. After an additional three washes, 100 µl distilled water was added to each well and the spores quantified microscopically using an inverted microscope.

Results

In order to evaluate a broad range of carbohydrate binding sites in different developmental stages of *M. cerebralis*, a spectrum of biotin-labelled neoglycoproteins and PAA-conjugated sugars was assessed. We first studied two different fixation protocols in order to quantify any impact of fixative on epitope localisation, i.e. any fixative-dependent artefacts due to solvent ingredients. Bouin's fixative gave the best preservation of spore morphology and least reactivity in the assays, and was our fixative of choice. Cryostat sections were found to have equivalent staining intensity compared with wax sections, with fewer reagents involved which could generate artefacts.

To ensure that staining (signal) strength is dependant exclusively on carbohydrate-lectin interaction, we regularly blocked non-specific protein-binding, biotin-binding and peroxidase-reactive sites in the sections. We also carried out the staining protocol with biotin-labelled BSA, to detect any carbohydrate-independent interaction. We investigated two different buffer systems, and found 10 mM HEPES (pH 7.5, containing divalent cations) generated more distinct signals compared with 20 mM PBS.

Having established optimal experimental conditions, we investigated various developmental stages of the parasite: samples of cartilage from infected rainbow trout, sections of gut epithelium from infected *T. tubifex* and waterborne triactinomyxon spores.

Infected fish: In the first series of experiments we explored the binding capacity of *M. cerebralis* myxospores in the cartilage tissue of infected rainbow trout. Specific fucose-binding sites were intensively revealed in the amoebic germs using α -L-Fuc-BSA-biotin (Figs. 1-2) and L-Rham-BSA-biotin (Fig. 6). With both probes polar capsules were negative, and indeed remained unstained by any neoglycoconjugate, possessing either monosaccharide and di-or polysaccharide moieties (Table. 2). The biotinylated glycoprotein asialofetuin (ASF) showed no staining reactivity. In contrast to amoebic germs and polar capsules, the shell valves showed a broad reactivity towards the neoglycoconjugates and ASF-biotin. The most intense staining was observed with neoglycoproteins carrying α -L-Fuc (Figs. 1 & 2), L-Rham (Fig. 3), β -D-GlcNAc, Lac, Mal (Fig. 4), GalNAc α 3GalNAc and the biotin labelled glycoprotein ASF. Additionally, α -D-Man- and α -D-GalNAc-bearing neoglycoproteins revealed reactive sites, but at lower intensity. No binding sites could be detected with Gal β 3GalNAc-BSA-biotin and PAA conjugates containing the trisaccharides Neu5Ac α 6Gal β 4Glc and Neu5Ac α 3Gal β 4Glc.

Infected oligochaetes: Next we investigated the developmental stages localised in the gut of the primary host, the oligochaete *T. tubifex* (Table. 3). Sporoplasms were prominently stained with α -L-Fuc-BSA-biotin (Figs. 5 & 6), L-Rham-BSA-biotin (Figs. 7 & 8), α -D-GalNAc-BSA-biotin and α -Mel-BSA-biotin (Figs. 9 & 10), and biotinylated ASF (Fig. 11). Minor reactivity was observed with biotinylated α -D-Man-BSA and β -D-GlcNAc-BSA. Polar capsules only indicated binding sites for β -D-GlcNAc-BSA-biotin, and no activity could be detected with any of the other neoglycoconjugates including ASF. Triactinomyxon shell valves showed only weak response to labelled α -D-Man-BSA, α -L-Fuc-BSA (Figs. 5 & 6), α -D-GalNAc-BSA, Lac-BSA and ASF (Fig. 11).

Waterborne triactinomyxon spores: We sought to identify whether the staining pattern and intensities observed for developmental stages in infected *T. tubifex* were similar once mature spores were released from the worm. Both sporoplasm and germ cells reacted strongly with biotinylated α -L-Fuc-BSA and β -D-GlcNAc-BSA (Figs. 12 & 13). Reactive sites of labelled α -Mel-BSA were restricted to the margin of the sporoplasm (Fig. 14). Polar capsules showed an extended pattern of binding sites and exhibited intense staining after incubation with biotinylated α -D-GalNAc-BSA (Fig. 15), Lac-BSA (Figs. 16 & 17) and ASF (Fig. 18), whereas the inner germ cells remained unstained. Only weak reactivities were observed with TAMs on air-dried slides, incubated with biotinylated α -D-Man-BSA, L-Rham-BSA and Neu5Ac α 3Gal β 4Glc-PAA.

Adhesion assay: GlycoWell™ microtitre plates carrying covalently linked N-acetyl-D-glucosamine (1118 ± 212 spores), fucose (1087 ± 97), N-acetyl-D-galactosamine (1080 ± 123) and lactose (1055 ± 119) showed the highest numbers of adherent spores. Galactose (623 ± 90), mannose (298 ± 54), N-acetyl-D-neuraminic acid (405 ± 133) and globotriose (334 ± 58) had lower adherence rates. The control plate with amide-linked acetic acid had 168 spores. Inhibition assays using the respective haptenic sugars N-acetyl-D-glucosamine (273 ± 23), N-acetyl-D-galactosamine (437 ± 53), lactose (435 ± 79), fucose (214 ± 21) and galactose (245 ± 30) showed a significant decrease. Binding to globotriose (338 ± 94) was not reduced by corresponding sugars. In summary, we identified the presence of carbohydrate binding sites on the surface of *M. cerebralis* myxospores in fish cartilage, which enable the parasite to adhere specifically to glyco-matrixes, especially those involving fucose, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine and lactose.

Discussion

Although aspects of the complex lifecycle and development of *Myxobolus cerebralis* in both of its hosts have been extensively investigated, little is known about biochemical factors affecting attachment of the parasite to host cells. Both glycans and lectins are good candidate molecules for investigation of developmental stages of *M. cerebralis* in both hosts: interactions between carbohydrates and lectins are commonly found to be involved in adhesion processes between cells, and cells and tissue matrix, or in attachment of pathogenic organisms to target host cells. According to El-Matbouli et al (1999), *M. cerebralis* triactinomyxon spores penetrate the epidermis of rainbow trout only through the pores of the mucous cells. Since fish mucous is known to contain a diverse pattern of glycans, which are potential binding sites for lectins, it seemed reasonable to analyse whether surface-associated carbohydrate binding activity is present in developmental stages of *M. cerebralis*. A second aim of the study was to prove whether carbohydrate binding activity could be assigned to specific morphological structures in the developmental stages, thereby indicating possible functions of those structures.

We observed clear evidence for structure-selective and developmental stage regulated expression of certain classes of carbohydrate binding activity, especially those for L-Rham-BSA-biotin, α -D-GalNAc-BSA-biotin, β -D-GlcNAc-BSA-biotin, α -Mel-BSA-biotin, Lac-BSA-biotin and ASF-biotin. In waterborne TAMs, carbohydrate binding activity for α -L-Fuc-BSA-biotin, α -D-GalNAc-BSA-biotin, β -D-GlcNAc-BSA-biotin, Lac-BSA-biotin and ASF-biotin, was up-regulated in the polar capsules, whereas shell valves showed no activity. In contrast, developmental stages in the gut of the oligochaete host showed a positive reaction only for β -D-GlcNAc-BSA-biotin in the polar capsules, and the shell valves were weakly reactive with α -D-Man-BSA-biotin, α -L-Fuc-BSA-biotin, α -D-GalNAc-BSA-biotin, Lac-BSA-biotin and ASF-biotin. The polar capsules of *M. cerebralis* myxospores in trout cartilage were completely negative and the shell valves showed a broad range of carbohydrate binding activity. Interestingly, stage-related expression of carbohydrate binding activity was also reported in *Eimeria* species to be exclusively presented on infectious sporozoite stages (Strout et al. 1994).

We detected binding activity on fucose, rhamnose, lactose N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-glucosamine and asialofetuin. In parasites, including protozoa, nematodes and trematodes, lectins (either endogenous or surface-associated) have been shown to play a role in host specificity and interaction, either for adherence/invasion or for evading immunological defence. The nematode *Meloidogyne javanica* expresses carbohydrate binding molecules on its

surface coat, specific for fucose, mannose, glucose and N-acetyl-D-glucosamine (Spiegel et al. 1995). Members of the widespread lectin family, the galectins, were found in *Teladorsagia circumcincta*, the brown stomach worm of ruminants, by Newton et al. (1997). The infective larvae of *Toxocara canis*, a roundworm of dogs, excrete products including a C-type lectin, which has shown to target host glycans and suppress immune response (Loukas et al. 2000). Lectin activity has been also described in cercarial penetration glands of *Diplostomum pseudospathaceum*, a trematode species related to fish (Mikes and Horak 2001). Babal et al. (1999) and Babal and Russell (1999) found a sialic acid-specific lectin on the surface of *Trichostrongylus axei*, the causative agent of bovine trichostrongyliasis. This lectin mediates adhesion on epidermal cells of the urogenital tract. In *Toxoplasma gondii*, a surface-located lectin binds sulphated sugars to mediate parasite adhesion to and invasion of host cells (Ortega-Barria and Boothroyd 1999).

Owing to the capability of lectins to discern specific saccharides or saccharide sequences, they are considered putative host recognition factors (Loukas and Maizels 2000), but probably play other roles. In 2000, Loukas et al. reported that a lectin from infective larvae of *Toxocara canis* is secreted and inhibits the host defence and parasite destruction. Concerning aquatic fish parasites, Buchmann and Lindenstrøm (2002) suggested that parasite-host interactions involve a common recognition system. They demonstrate that oncomiracidia of *Neobenedeniagirellae* could be made to start deciliation and attachment after treating with various carbohydrates.

In this study, we showed that myxobolus spores of *M. cerebralis* show carbohydrate binding sites that likely interact with the gut epithelia of the oligochaete host. We were also able to demonstrate lectin activity on triactinomyxon spores of *M. cerebralis* which points to an interaction with glycan epitopes presented by the fish host. For this to be a host-parasite recognition system, the host must provide the carbohydrate component, and this seems to be the case: analyses of mucus ingredients have shown that besides proteins and polypeptides a wide range of carbohydrates are secreted by the fish (Buchmann and Bresciani 1998; Buchmann 1998). Given that waterborne triactinomyxon spores are known to use secretory openings of mucous cells of the epidermis for adherence and invasion (El-Matbouli et al. 1999) it appears that the binding affinity involving TAMs and mucous is a significant initiator of an infection with *Myxobolus cerebralis*. Additional histochemical efforts indicate a high degree of glycoconjugates with terminal glycosylation of β -galactoside residues in the epidermis and respiratory epithelial cells of *Oncorhynchus mykiss* (Burkhardt-Holm 1997). The parasite lectin

activity and glycan epitopes in the mucus and epidermis of rainbow trout, as presented in this study, seems to form an adequate system to take an important role in the parasite-host interaction.

In the present study we demonstrated for the first time that biotin labelled neoglycoconjugates could be used to characterise lectin activity in a member of the Myxozoa. The protocol we have developed should prove to be a useful tool for the detection of carbohydrate binding activity even involving enclosed morphological structures.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by funding from the German Science Foundation (DFG), grant number [EL 174/1-1]. We kindly thank Mr. Stephen Atkinson and Dr. Sascha Hallett for editing the manuscript.

References

- Babal P, Russell LC (1999) Sialic acid-specific lectin-mediated adhesion of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas mobilensis*. *J Parasitol* 85(1):33-40
- Babal P, Pindak FF, Russell LC, Gardner WA Jr (1999) Sialic acid-specific lectin from *Tritrichomonas foetus*. *Biochim Biophys Acta* 1428(1):106-16
- Buchmann K, Lindenstrom T (2002) Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *Int J Parasitol* 32(3):309-19
- Buchmann K, Bresciani J (1998) Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection. *Parasitol Res* 84(1):17-24
- Buchmann K (1998) Binding and lethal effect of complement from *Oncorhynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Platyhelminthes: Monogenea). *Dis Aquat Organ* 32(3):195-200
- Burkhardt-Holm P (1997) Lectin histochemistry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill and skin. *Histochem J* 29(11-12):893-9
- Danguy A, Genten F, Gabius HJ (1991) Histochemical evaluation of application of biotinylated neoglycoproteins for the detection of endogenous sugar receptors in fish skin. *Eur J Basic Appl Histochem* 35(4):341-57
- Danguy A, Genten F (1989) Comparative lectin-binding patterns in the epidermis and dermal glands of *Bufo bufo* (L.) and *Xenopus laevis* (Daudin). *Biol Struct Morphog* 2(3):94-101
- El-Matbouli M, Hoffmann RW (1989) Experimental transmission of two *Myxobolus* spp. Developing progeny via tubificid worms. *Parasit Res* 75:461-464

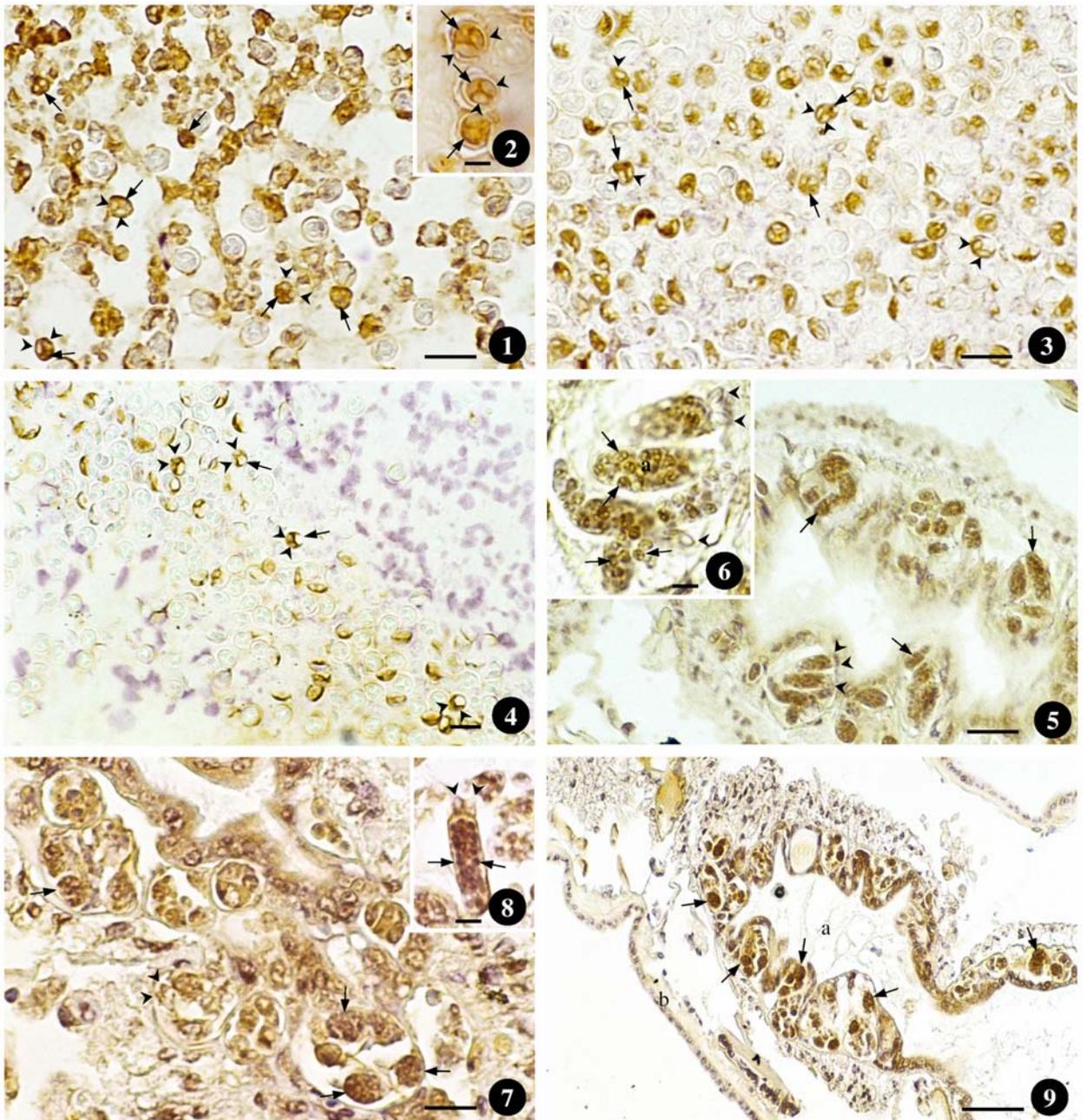
- El-Matbouli M, Hoffmann RW (1991) Effect of freezing, aging and passage through the alimentary canal of predatory animals on the viability of *Myxobolus cerebralis* spores. *Journal of Aquatic Animal Health* 3:260-262
- El-Matbouli M, Fischer-Scherl T, Hoffmann RW (1992) Present knowledge on the life cycle, taxonomy, pathology and therapy of some *Myxosporea spp.* Important for fresh water fish – a review. *Annual Review of Fish Diseases* 2:367-402
- El-Matbouli M, Hoffmann RW, Mandok C (1995) Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cartilage. *Journal of Fish Biology* 46:919-935
- El-Matbouli M, Hoffmann RW (1998) Light and electron microscopic study on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* in *Tubifex tubifex* to the actinosporean stage triactinomyxon. *International Journal of Parasitology* 28:195-202
- El-Matbouli M, Hoffmann RW, Schoel H, McDowell TS, Hedrick RP (1999) Whirling disease: host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ* 35(1):1-12
- Feng S, Woo PT (1998) Identification of carbohydrates on the surface membrane of pathogenic and nonpathogenic piscine haemoflagellates, *Cryptobia salmositica*, *C. bullocki* and *C. catostomi* (Kinetoplastida). *Dis Aquat Organ* 32(3):201-9
- Gabius HJ, Kohnke B, Hellmann T, Dimitri T, Bardosi A (1988) Comparative histochemical and biochemical analysis of endogenous receptors for glycoproteins in human and pig peripheral nerve. *J Neurochem* 51(3):756-63
- Guha-Niyogi A, Sullivan DR, Turco SJ (2001) Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology* 11: 45 - 59
- Hedrick RP, El-Matbouli M, Adkinson MA, McConnell E (1998) Whirling disease. Re-emergence among wild trout. *Immunol. Rev* 166:365-376
- Hokke CH, Deelder AM (2001) Schistosome glycoconjugates in host-parasite interplay. *Glycoconj J* 18(8):573-87
- Hofer B (1903) Über die Drehkrankheit der Regenbogenforelle. *Allgemeine Fischereizeitung* 28:7-8
- Khoo KH, Dell A (2001) Glycoconjugates from parasitic helminths: structure diversity and immunobiological implications. *Adv Exp Med Biol* 491:185-205
- Kovács P, Muller WE, Csaba G (1997) Identification of lectins in the kinetids of *Tetrahymena pyriformis*. *Cell Biol Int* 21(1):17-22
- Legendre H, Decaestecker C, Gbenou MG, Nagy N, Hendlisz A, Andre S, Pector JC, Kiss R, Gabius HJ (2004) Prognostic stratification of Dukes B colon cancer by a neoglycoprotein. *Int J Oncol* 25(2):269-76
- Loukas A, Doedens A, Hintz M, Maizels RM (2000) Identification of a new C-type lectin, TES-70, secreted by infective larvae of *Toxocara canis*, which binds to host ligands. *Parasitology* 121 Pt 5:545-54
- Loukas A, Maizels RM (2000) Helminth C-type lectins and host-parasite interactions. *Parasitol Today* 16(8):333-9

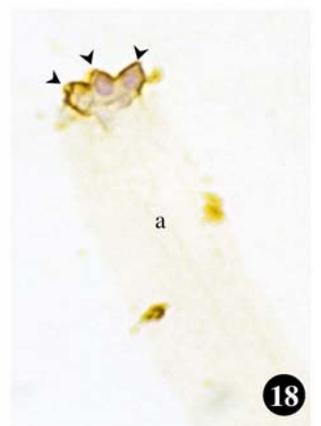
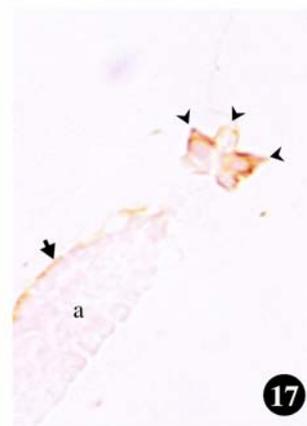
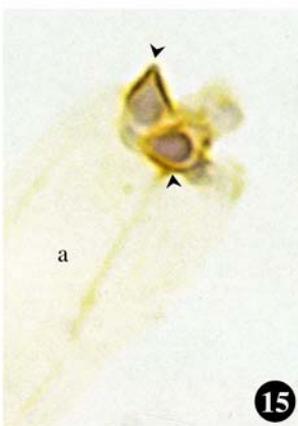
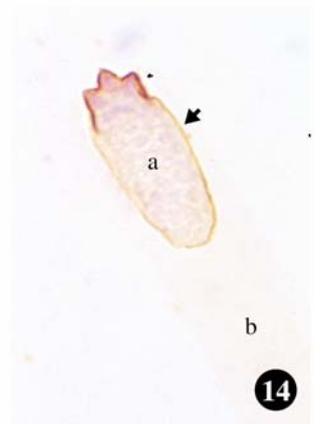
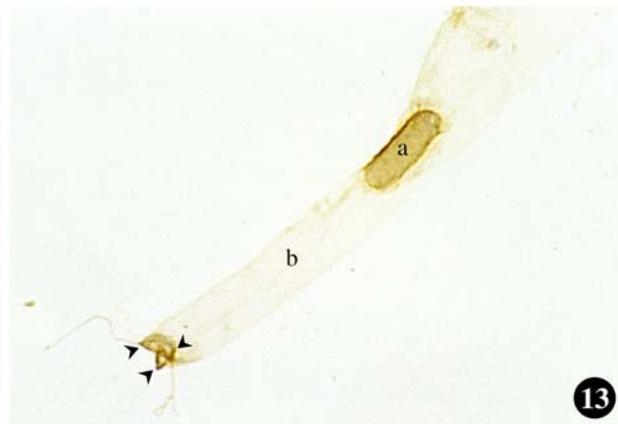
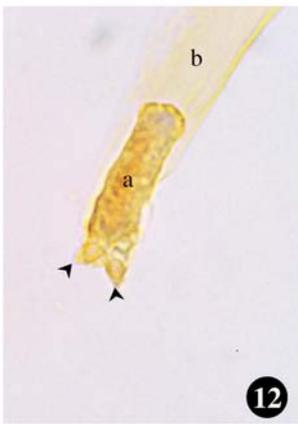
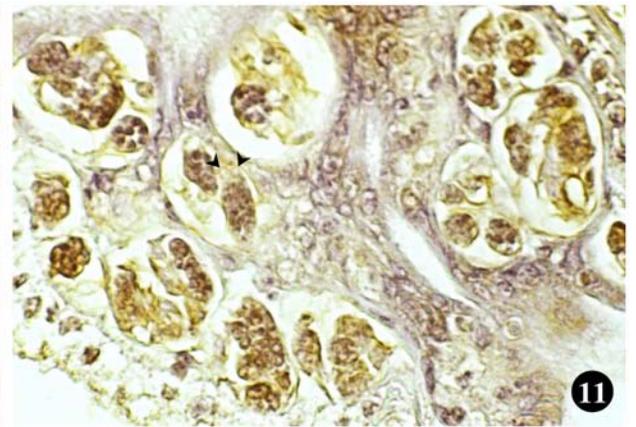
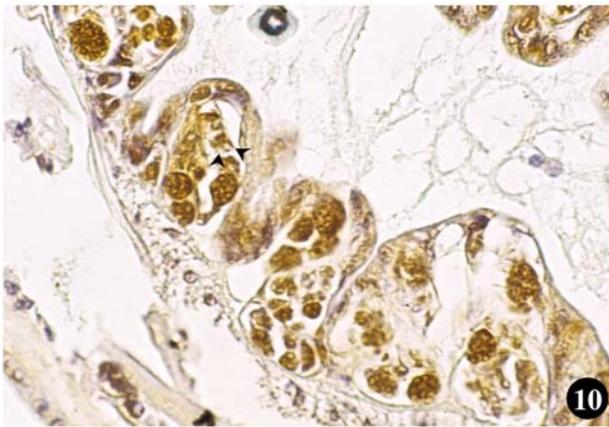
- Mikes L, Horak P (2001) A protein with lectin activity in penetration glands of *Diplostomum pseudospathaceum* cercariae. *Int J Parasitol* 31(3):245-52
- Morris DJ, Adams A (2004) Localization of carbohydrate terminals on *Tetracapsuloides bryosalmonae* using lectin histochemistry and immunogold electron microscopy. *J Fish Dis* 27(1):37-45
- Muramoto K, Kamiya H (1992) The amino-acid sequence of a lectin from conger eel, *Conger myriaster*, skin mucus. *Biochim Biophys Acta* 1116(2):129-36
- Muramoto K, Kagawa D, Sato T, Ogawa T, Nishida Y, Kamiya H (1999) Functional and structural characterization of multiple galectins from the skin mucus of conger eel, *Conger myriaster*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 123(1):33-45
- Nehring RB, Thompson KG, Taurman KA, Shuler DL (2002) Laboratory studies indicating that living brown trout *Salmo trutta* expel viable *Myxobolus cerebralis* (Myxosporea). *American Fisheries Society Symposium* 29:125-134
- Newton SE, Monti JR, Greenhalgh CJ, Ashman K, Meeusen EN (1997) cDNA cloning of galectins from third stage larvae of the parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Mol Biochem Parasitol* 86(2):143-53
- O'Grodnick JJ (1975) Whirling disease *Myxosoma cerebralis* spore concentration using the continuous plankton centrifuge. *J Wildl Dis* 11(1):54-7
- Ortega-Barria E, Boothroyd JC (1999) A Toxoplasma lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J Biol Chem* 274(3):1267-76
- Petri WA Jr, Haque R, Mann BJ (2002) The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* 56:39-64
- Schabussova I, Koubkova B, Gelnar M, Schabuss M, Horak P (2004) Surface carbohydrates of *Eudiplozoon nipponicum* pre- and post-fusion. *J Helminthol* 78(1):63-8
- Sinowatz F, Gabius HJ, Amselgruber W (1988) Surface sugar binding components of bovine spermatozoa as evidence by fluorescent neoglycoproteins. *Histochemistry* 88(3-6):395-9
- Spiegel Y, Inbar J, Kahane I, Sharon E (1995) Carbohydrate-recognition domains on the surface of phytophagous nematodes. *Exp Parasitol* 80(2):220-7
- Strout RG, Alroy J, Lukacs NW, Ward HD, Pereira ME (1994) Developmentally regulated lectins in *Eimeria* species and their role in avian coccidiosis. *J Parasitol* 80(6):946-51
- Tasumi S, Ohira T, Kawazoe I, Suetake H, Suzuki Y, Aida K (2002) Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *J Biol Chem* 277(30):27305-11
- Tasumi S, Yang WJ, Usami T, Tsutsui S, Ohira T, Kawazoe I, Wilder MN, Aida K, Suzuki Y (2004) Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Dev Comp Immunol* 28(4):325-35
- Villalba JM, Navas P, Garcia-Herdugo G (1987) Lectin binding patterns in amphibian epidermis. *Acta Histochem* 81(1):51-7

Wolf K, Markiw ME (1984) Biology contravenes taxonomy in the myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 255:1449-1452

Young AR, Meeusen EN (2004) Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glycoconj J* 19(7-9):601-6

Zaccone G, Fasulo S, Lo Cascio P, Licata A, Ainis L, Affronte R (1987) Lectin-binding pattern on the surface epidermis of *Ambystoma tigrinum* larvae. A light- and electron-microscopic study. *Histochemistry* 87(5):431-8





Figs. 1-4 Carbohydrate-reactive sites of *M. cerebralis* myxospores in sections of rainbow trout cartilage. **(1 & 2)** Clusters of *M. cerebralis* myxospores in paraffin-embedded (1) and cryostat (2) sections. Intense staining of germ cells (▲) using biotinylated α -L-Fuc-BSA. Polar capsules were characteristically moderately stained (▲); host tissue was unreactive. Bar = 10 μ m (1), Bar = 5 μ m (2). **(3)** Cryostat section showing binding sites for L-Rham-BSA-biotin in the majority of germ cells (▲) as detected using biotinylated L-Rham-BSA conjugate. A weaker staining reaction was observed for the inner polar capsules (▲) which was restricted to their outer layer. Bar = 10 μ m. **(4)** Incubated cryostat section of cartilage which had been incubated with biotinylated Mal-BSA conjugate. Staining was nearly exclusive to polar capsules (▲) whereas the amoeboid germs (▲) were negative. Bar = 10 μ m.

Figs. 5-11 Carbohydrate-reactive sites of *M. cerebralis* triactinomyxon spores in sections of gut from infected *T. tubifex* oligochaetes. **(5 & 6)** Developmental stages of triactinomyxons in an infected worm. The amoeboid germs showed a strong staining reaction (▲) to labeled L-Fuc-BSA. No reactive sites were detected on polar capsules (▲). Bar = 20 μ m (5), bar = 5 μ m (6). **(7 & 8)** Developmental stages resolved by incubation with L-Rham-BSA-biotin. A strong staining reaction was present in amoeboid germs (▲) (7) Bar = 10 μ m. A higher magnification showed the strong positive staining (▲) of the amoeboid germ (8). No binding of the conjugate to polar capsules (▲) was observed. Bar = 5 μ m. **(9)** Sections through an infected oligochaete, showing intercellular developmental stages of triactinomyxon (▲) after incubation with α -Mel-BSA-biotin. The intestinal cavity (a) and the integument of the worm (b) were completely negative. Bar = 50 μ m. **(10)** Higher magnification showing strongly-stained amoeboid germ cells (▲) and a lack of reactive sites on the polar capsules (▲). Bar = 25 μ m. **(11)** Developmental stages of triactinomyxon incubated with ASF-biotin. Amoeboid germs (▲) and amoeboid germ cells (▲) were highly reactive whereas a lack of staining was observed in polar capsules (▲). Bar = 25 μ m.

Figs. 12-18 Carbohydrate-reactive sites of waterborne triactinomyxon spores. **(12)** Triactinomyxon spores incubated with L-Fuc-BSA-biotin. The multi-cellular sporoplasm (a) and the apical polar capsules (▲) were intensely reactive. No signal was obtained with the three valve cells (b). Bar = 10 μ m. **(13)** Triactinomyxon spore showing intense staining of the polar capsules (▲) and the dislocated amoeboid germ (a) after exposure to β -D-GlcNAc-BSA-biotin. The shell of the spore (b) and the fired polar filaments were non-reactive. Bar = 10 μ m. **(14)** Waterborne triactinomyxon spores after incubation with labeled α -Mel-BSA. The amoeboid

germ coat is clearly accentuated by staining (▲). **(15)** Triactinomyxon spore showing an intense staining reaction on the polar capsules (▲) after incubation with α -D-GalNAc-BSA-biotin. The shell valve cells (**a**) revealed no staining reactivity. Bar = 5 μ m. **(16 & 17)** Waterborne triactinomyxon spore incubated with β -Lac-BSA-biotin showing positive reaction on the surface of the polar capsules (▲). Staining intensity of amoeboid germ cells (**a**) and the coat of amoeboid germ (▲) was very weak. Bars = 5 μ m. **(18)** Waterborne triactinomyxon spore after incubation with ASF-biotin. Strong staining was evident on the surface of the polar capsules (▲). The amoeboid germ (**a**) was free from any staining. Bar = 5 μ m.

Table 1 Neoglycoconjugates used for the detection of carbohydrate-binding sites.

Neoglycoconjugate	Terminal sugar
α -D-Man-BSA-biotin	mannose
α -L-Fuc-BSA-biotin	fucose
L-Rham-BSA-biotin	rhamnose
α -D-GalNAc-BSA-biotin	N-acetyl-D-galactosamine
β -D-GlcNAc-BSA-biotin	N-acetyl-D-glucosamine
α -Mel-BSA-biotin	melibiose (Gal α 6Glc)
Lac-BSA-biotin	lactose (Gal β 4Glc)
Mal-BSA-biotin	maltose (Glc α 4Glc)
Gal β 3GalNAc-BSA-biotin	galactose β 3N-acetyl-D-galactosamine
GalNAc α 3GalNAc-PAA-biotin	N-acetyl-D-galactosamine α 3N-acetyl-D-galactosamine
Neu5Ac α 6Gal β 4Glc-PAA-biotin	N-acetyl-D-neuraminic acid α 6galactose β 4glucose
Neu5Ac α 3Gal β 4Glc-PAA-biotin	N-acetyl-D-neuraminic acid α 3galactose β 4glucose
ASF-biotin	galactose; ASF is a desialylated glycoprotein (48 kD) with three triantennary N-linked chains primarily with terminal LacNAc residues and three O-linked disaccharide chains (Gal β 3GalNAc α -)

BSA bovine serum albumin; PAA poly(2-hydroxyethyl)acrylamide

Table 2 Presence of carbohydrate-reactive sites in developmental stages of *Myxobolus cerebralis* in *Oncorhynchus mykiss*

Neoglycoconjugate	Tissue component			
	amoebic germ	polar capsule	shell valves	host tissue
α -D-Man-BSA-biotin	-	-	+	-
α -L-Fuc-BSA-biotin	++	-	++	++
L-Rham-BSA-biotin	++	-	++	++
α -D-GalNAc-BSA-biotin	-	-	+	++
β -D-GlcNAc-BSA-biotin	-	-	++	+
Lac-BSA-biotin	-	-	++	-
Mal-BSA-biotin	-	-	++	++
Gal β 3GalNAc-BSA-biotin	-	-	-	++
GalNAc α 3GalNAc-PAA-biotin	-	-	++	++
Neu5Ac α 6Gal β 4Glc-PAA-biotin	-	-	-	++
Neu5Ac α 3Gal β 4Glc-PAA-biotin	-	-	-	+
ASF-biotin	-	-	++	-

- no staining, + weak staining, ++ strong staining

Table 3 Presence of carbohydrate-reactive sites in developmental stages of *Myxobolus cerebralis* in *Tubifex tubifex*, and waterborne triactinomyxon spores.

Neoglycoconjugate	Developmental stages in <i>T. tubifex</i>						Waterborne TAMs			
	sporoplasm	polar capsule	shell valves	host tissue	sporoplasm	polar capsule	shell valves	sporoplasm	polar capsule	shell valves
α -D-Man-BSA-biotin	+	-	+	++	-	+	-	-	+	-
α -L-Fuc-BSA-biotin	++	-	+	++	++	++	++	++	++	-
L-Rham-BSA-biotin	++	-	-	++	-	+	-	-	+	-
α -D-GalNAc-BSA-biotin	++	-	+	++	-	++	-	-	++	-
β -D-GlcNAc-BSA-biotin	+	++	-	-	++	+	++	++	++	-
α -Mel-BSA-biotin	++	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Lac-BSA-biotin	-	+	+	++	-	+	-	-	++	-
Mal-BSA-biotin	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
Gal β 3GalNAc-BSA-biotin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GalNAc α 3GalNAc-PAA-biotin	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
Neu5Ac α 6Gal β 4Glc-PAA-biotin	-	-	-	++	-	-	x	x	x	x
Neu5Ac α 3Gal β 4Glc-PAA-biotin	-	-	-	++	-	-	-	-	+	-
ASF-biotin	++	-	+	++	++	++	-	-	++	-

- no staining, + weak staining, ++ strong staining, x not tested

Table 4 Adhesion of *Myxobolus cerebralis* myxospores to GlycoWell[®]-plates.

Carbohydrate	# spores (mean \pm SD)	
	Not inhibited	Inhibited
blank plate	168 \pm 22	174 \pm 31
Mannose	298 \pm 54	284 \pm 45
Fucose	1087 \pm 97	214 \pm 21
Galactose	623 \pm 90	245 \pm 30
Lactose	1055 \pm 119	435 \pm 79
N-acetyl- <i>D</i> -galactosamine	1080 \pm 123	437 \pm 53
N-acetyl- <i>D</i> -glucosamine	1118 \pm 212	273 \pm 23
N-acetyl- <i>D</i> -neuraminic acid	405 \pm 133	-
globotriose (Gal α 4Gal β 4Glc)	334 \pm 58	338 \pm 94

5 Zusammenfassende Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden die Diskussionen der vorausgegangenen Kapitel 4.1. und 4.2. zusammengefasst. Hierbei werden verstärkt Aspekte aufgegriffen, die in den Diskussionen der vorangestellten Veröffentlichungen nicht berücksichtigt werden konnten.

Für die komplexen Mechanismen der spezifischen Wirtserkennung, der Adhäsion, der Invasion und der Migration im Wirtsgewebe sind molekulare Wechselwirkungen notwendig, die zwischen parasitären Organismen und deren Wirt vermitteln. Es gibt vielfältige Vorstellungen über die Arten der beteiligten Moleküle in einem derartigen Erkennungssystem. Eines der möglichen Interaktionsprinzipien basiert auf der Erkennung von spezifischen Glykosylierungsmustern durch Lektine oder Antikörper (JACOBSON & DOYLE 1996, LOUKAS & MAIZELS 2000). Hierbei ist einerseits die Erkennung von Seiten des Wirts als auch von Seiten des Parasiten von Interesse. So können beispielsweise Glykane sowohl des Wirts als auch des Parasiten von komplementären Molekülen des jeweilig anderen Organismus erkannt werden und so zum Erkennungssystem beitragen. Gerade diese, für die Infektion durch den Erreger notwendigen Moleküle, können zugleich eine hervorragende Ansatzstelle für eine Immunreaktion des Wirts bilden. Die Vielfalt der Konstruktionsmöglichkeiten eines Glykans eröffnet gerade im Pathogenese-Prozess parasitärer Organismen bis jetzt noch ungeahnte Möglichkeiten der Interaktion mit dem Wirt. Durch den Einsatz pflanzlicher Lektine bei der Aufklärung unbekannter Glykosylierungsmuster macht man sich die bereits erworbenen Kenntnisse über die Charakteristika der einzelnen Lektine zunutze, um im Falle der Bindung, Aussagen über das zu untersuchende Glykan machen zu können (DANGUY et al. 1997). So gibt es pflanzliche Lektine, die nur an Strukturen binden, die Fukose enthalten, während andere nur N-Acetyl-D-Galaktosid-Reste binden können. Einige benötigen den spezifischen Zucker in der nicht-reduzierenden Endposition des Oligosaccharids, wohingegen andere Lektine Zucker detektieren, die sich innerhalb der Oligosaccharidkette befinden. Manche Lektine unterscheiden nicht zwischen den anomeren Formen (α - oder β -), während andere die exakte Konfiguration und eine bestimmte Abfolge der Zuckerbausteine benötigen (GOLDSTEIN & HAYES 1978). Durch die gezielte Auswahl geeigneter Lektine wird daher eine oft sehr detaillierte Aussage über das zu untersuchende Glykan möglich.

In Kapitel 4.1. wird unter diesem Aspekt die Untersuchung der Glykoproteine von Myxosporen des Parasiten *Myxobolus cerebralis* beschrieben. Mit Hilfe von Biotin-markierten,

pflanzlichen Lektinen konnte ein 33 kDa großes Glykoprotein (Mcgp33) isoliert werden, das spezifisch in den Myxosporen-Stadien des Parasiten exprimiert wird und Bindungsstellen für das Lektin SJA aufweist. Gestützt auf Lektin histochemische Befunde von STIPPL (2003) scheint die Lokalisation dieses Proteins auf den Amöboidkeim bzw. die Polkapseln der Myxosporen beschränkt zu sein. Die Bindung von SJA weist auf die Präsentation von Zuckern hin, welche N-Acetyl-D-Galaktosamin enthalten. Weitere glykosylierte Proteine wurden mittels Lektin Blotting sichtbar gemacht und je nach Zucker-Spezifität des eingesetzten Lektins, konnten unterschiedliche Bandenmuster generiert werden. So wurden auch bei Lektinen mit identischer Monosaccharidspezifität (GSA I und SJA, GalNAc) deutliche Unterschiede im Bindungsmuster festgestellt. Die Zuordnung eines Lektins zu einer Monosaccharidgruppe lässt daher nur bedingt Rückschlüsse auf die tatsächliche Bindungsreaktion zu. Die spezifische Bindung eines Lektins ist demnach von unterschiedlichen Strukturparametern der Glykane abhängig (LAINE et al. 1996): 1.) von der vorliegenden Zuckersequenz, 2.) von der anomeren Konfiguration, 3.) von den Ringgrößen der beteiligten Monosaccharide, 4.) von den Verknüpfungsarten und 5.) von etwaigen Verzweigungen. Darüber hinaus zeigten zahlreiche Glykoproteine mit ähnlicher Molekularmasse Bindungen mit mehreren eingesetzten Lektinen. So detektierten alle eingesetzten Lektine spezifische Bindungsstellen an Proteinen mit einer Molekularmasse von 23 kDa. Besonderes Augenmerk richtete sich bei der vorliegenden Untersuchung auf das Bindungsverhalten von PHA-E. Für die Bindung von *Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin (PHA-E) ist die Präsenz einer Trisaccharid-Struktur [β -D-Gal(1-3,4)- β -D-GlcNAc(1-2)-D-Man] an Glykanen notwendig - die sogenannten „bisected“ N-Glykane vom Komplex-Typ (GOLDSTEIN & HAYES 1978). Schon STIPPL (2003) berichtete von der Reaktion des Lektins mit Epitopen in Polkapseln und Amöboidkeim der Myxosporen von *M. cerebralis*.

Vergleichbar mit der Verwendung von markierten pflanzlichen Lektinen, hat sich im Laufe der vergangenen Jahre auch der Einsatz von markierten Zuckerstrukturen zur Detektion endogener Lektin-Aktivitäten etabliert. Neben Monosacchariden kommen inzwischen verschiedene, synthetisch konjugierte Di- und Oligosaccharide mit bekanntem Verknüpfungsmuster zur Anwendung. Neoglykokonjugate stellen ausgezeichnete Tools zur Identifizierung und Charakterisierung von Zucker-bindenden Strukturen in *in vivo*- und *in vitro*-Studien dar. Durch das Bindungsverhalten gegenüber einzelnen, definierten Konjugaten lässt sich so eine Kohlenhydrat-bindende Aktivität in histologischen Schnitten lokalisieren und charakterisieren. Die wesentlichen Ergebnisse der lichtmikroskopischen Auswertung und des Adhäsionstests sollen nachfolgend nochmals herausgestellt werden. Durch die parallele

Untersuchung verschiedener Entwicklungsstadien von *M. cerebralis*, also freien TAM-Sporen, Myxosporen im Knorpelgewebe des Fisches und Entwicklungsstadien im Darmepithel des Oligochaeten, konnten auch vergleichende Aussagen über die unterschiedliche Ausprägung des Bindungsverhaltens der einzelnen Stadien gemacht werden. So wurde eine regulative Expression der Zucker-bindenden Strukturen festgestellt, die in einem Bindungsmuster zum Ausdruck kam, das vom Entwicklungsstadium des Parasiten abhängig war. Dies gilt vorwiegend für die Bindung der Zuckerkonjugate, L-Rham-BSA-Biotin, α -D-GalNAc-BSA-Biotin, β -D-GlcNAc-BSA-Biotin, α -Mel-BSA-Biotin, Lac-BSA-Biotin und dem Biotin-markierten Glykoprotein Asialofetuin (ASF). An Polkapseln von freien TAM-Sporen konnte die Bindung von fünf Konjugaten, α -L-Fuc-BSA-Biotin, α -D-GalNAc-BSA-Biotin, β -D-GlcNAc-BSA-Biotin, Lac-BSA-biotin und ASF-Biotin, beobachtet werden, während sich in TAM-Entwicklungsstadien, die in histologischen Schnitten von infizierten Oligochaeten untersucht wurden, lediglich die Bindung von β -D-GlcNAc-BSA-Biotin an den Polkapseln nachweisen ließ. Ebenfalls unterschiedlich stellte sich das Bindungsverhalten für die Konjugate an den Schalenzellen der TAM-Sporen dar. So war mit keinem der Neoglykokonjugate eine Bindung an freien Triactinomyxon-Sporen erkennbar. An Entwicklungsstadien in *T. tubifex* waren nach Inkubation mit α -D-Man-BSA-Biotin, α -L-Fuc-BSA-Biotin, α -D-GalNAc-BSA-Biotin, Lac-BSA-Biotin und ASF-Biotin, schwache Signale an den Schalenzellen zu erkennen. Interessanterweise scheinen Polkapseln in Myxosporen von *M. cerebralis* in histologischen Schnitten infizierter Regenbogenforellen keine Bindungsaffinität gegenüber den eingesetzten Neoglykokonjugaten zu besitzen. Dagegen waren an den Schalenzellen der Myxosporen Aktivitäten für vielfältige Zucker nachweisbar. So kam es zur spezifischen Bindung von α -L-Fuc-BSA-Biotin, Lac-BSA-Biotin, α -D-GalNAc-BSA-Biotin, β -D-GlcNAc-BSA-Biotin, L-Rham-BSA-Biotin, und ASF-Biotin. Die Bindungsaffinität der Spornhülle für die vier erstgenannten Neoglykokonjugate konnte darüber hinaus im Hemm-Adhäsionstest bestätigt werden. Dieser basierte auf einer Matrix (in Form von Mikrotiterplatten), an die spezifische Zuckerstrukturen über Abstandhalter, die 16-18 Atom Dicke aufweisen, kovalent gebunden sind. Die Spezifität einer Sporenadhäsion an diese Matrix wurde mittels kompetitiver Hemmung durch die jeweils gebundenen Hapten-Zucker ermittelt. Diese Befunde weisen erstmalig auf die Präsentation Lektin-artiger Moleküle in einem Vertreter aus dem Stamm der Myxozoa hin.

Die Untersuchungen dieser Dissertation umfassen ganz bewusst sowohl die Charakterisierung von Glykanen als auch von Lektinen in Entwicklungsstadien von *M. cerebralis*. Gerade bei Protozoen, und hier vorwiegend bei humanpathogenen Parasiten, ist die individuelle Strategie der

Wirtserkennung, Infektion und Persistenz, die auf Glykan-Lektin-Wechselwirkungen zurückzuführen ist, gut untersucht. So werden den Mannose- und Glukose-Epitopen, die in auffälliger Häufung in *Trypanosoma brucei* exprimiert werden, Aufgaben bei der Interaktion mit dem Wirtsgewebe und bei der Penetration in die Wirtszelle zugeschrieben (GAZZINELLI et al. 1991). Auch *Leishmania donovani* präsentiert ein Lipophosphoglykan (LPG), welches ganz spezifisch im promastigoten Stadium des Parasiten aktiv ist, woraus die Autoren ebenfalls die aktive molekulare Beteiligung am Invasionsmechanismus in Wirtsmakrophagen ableiten (TURCO & DESCOTEAUX 1992). Vergleichbar mit unseren Ergebnissen, sowohl bei Glykoprotein Mcgp33 als auch bei der Spezifität der Zucker-bindenden Aktivität, scheint *L. donovani* die Expression der Epitope je nach Entwicklungsstand modifizieren zu können. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bereits bei *T. brucei* gemacht. Hier präsentiert der Parasit sog. Various Surface Glycoproteins (VSG) an der äußeren Oberfläche, welche zwar vom Immunsystem des Wirts nach einiger Zeit erkannt werden, aber durch die expressive Variation nachfolgender Parasitengenerationen der endgültigen Eliminierung immer wieder entgehen (BORST et al. 1996, FERGUSON 1997, 1999, RUDENKO et al. 1998). Einer Variation in der Antigenexpression werden demnach vorwiegend zwei Aufgaben zugesprochen: 1.) die Anpassung der Strategie zur Invasion eines Wirtsorganismus - dies hauptsächlich bei mehrwirtigen Parasiten und 2.) die Beteiligung als molekularer Mechanismus zur Vermeidung einer effektiven Wirtsantwort. Der Antigenvariation kommt daher eine entscheidende Aufgabe bei der spezifischen Pathogenität eines Erregers zu. Im Fall von *M. cerebralis* wurden bereits zuvor von MARKIW (1989) und STIPPL (2003) histochemische Beobachtungen über unterschiedliches Färbeverhalten bei einzelnen Entwicklungsstadien gemacht. Auf die Unterschiede im Glykosylierungsmuster besonders zwischen freien TAM-Sporen und deren Entwicklungsstadien wurde bereits oben eingegangen. Insbesondere Kohlenhydratbestandteile von Glykanen sind erwiesener Maßen hochpotente Antigene (FEIZI & CHILDS 1987) und deshalb nach Erkennung geeignet, eine Abwehrreaktion im Wirt auszulösen. MARKIW (1989) postulierte, basierend auf immunhistochemischen Untersuchungen, dass einige *M. cerebralis*-Antigene, die in Stadien im Oligochaeten exprimiert werden, von denen abweichen, die in Stadien im Fisch exprimiert werden. Diese Annahme korreliert ebenso mit Ergebnissen, die bei immunhistochemischen Untersuchungen bei *Tetracapsuloides bryosalmonae* gewonnen werden konnten. MARIN DE MATEO et al. (1996) und MORRIS et al. (1997) beschrieben, dass verschiedene parasitäre Antigene während der Entwicklung in der Niere von Regenbogenforellen in ihrem Expressionsmuster variieren. Eine Anpassung der Präsentationsmuster einerseits von Glykanen, andererseits von Lektinen ist gerade bei *M. cerebralis* unter dem Gesichtspunkt der

Notwendigkeit unterschiedlicher molekularer Invasionsstrategien von herausragender Bedeutung. Nach der Beschreibung des zweiwirtigen Zykluses (EL-MATBOULI & HOFFMANN 1998), muss bewusst sein, dass *Myxobolus cerebralis* zwei individuelle, molekulare Expressionsmuster besitzt, die einerseits den TAM-Sporen die Wirtserkennung, Adhäsion und Invasion an den Fischwirt, und andererseits den Myxosporen dasselbe bei dem Oligochaeten ermöglicht. Der Grad der potentiellen Unterschiede wird bereits bei der morphologischen Gegenüberstellung der beiden Sporenstadien deutlich (EL-MATBOULI 1996). Ein molekulares Erkennungssystem ist, wie auch bei den Lektinen und Glykanen, von der Präsenz möglicher, komplementärer Bindungspartner abhängig. *M. cerebralis* infiziert transepithelial an der Epidermis, den Schleimhäuten der Maulhöhle und dem respiratorischen Epithel der Kiemen von empfänglichen Fischen. Der molekularen Ausstattung des epidermalen Schleims, der Epidermis und dem respiratorischen Epithel des Fischwirtes muss daher unsere Aufmerksamkeit in gleicher Weise gelten, wie den Verhältnissen im Darmepithel von *T. tubifex*. Erste Analysen des Fischschleims durch BUCHMANN & BRESCIANI (1998) und BUCHMANN (1998) ergaben, dass pisciner Schleim neben Proteinen und Polypeptiden, eine große Vielfalt von Kohlenhydraten enthält. Diese stellen einerseits geeignete Bindungspartner für parasitäre Lektine dar, andererseits ist durch die Absättigung parasitärer Lektine, und damit die Verhinderung einer Interaktion an anderer Stelle, eine gewisse unspezifische Schutzfunktion des Wirts denkbar. Umgekehrt enthält gerade epidermaler Schleim von Regenbogenforellen Zucker-bindende Aktivität für Mannose, Galaktose und Laktose (BUCHMANN 2001). Wie bei Lektinen anderer Fischarten (NAKAMURA et al. 2001, TASUMI et al. 2002) wird dieser Aktivität eine bedeutende protektive Funktion bei der unspezifischen Infektabwehr zugeschrieben. Da gerade die Kohlenhydratbestandteile von Glykanen hochpotente Antigene darstellen (FEIZI & CHILDS 1987), soll an dieser Stelle auch auf deren Bedeutung im Zusammenhang mit der Immunantwort des Fisches hingewiesen werden. Die Infektionsintensität und nachfolgend die Ausprägung der klinischen Symptome sind in entscheidendem Maß abhängig vom Alter der Fische zum Infektionszeitpunkt (HEDRICK et al. 2000, RYCE et al. 2004). Die höchsten Befallsintensitäten werden dabei bei sehr jungen Tieren beobachtet. Daher spielen gerade die angeborene Immunität und die unspezifischen Abwehrmechanismen, wie beispielsweise die Lektin-vermittelte Lysis über die Aktivierung von Komplement-Komponenten, eine entscheidende Rolle bei der Infektionsprävention von *M. cerebralis* (TURNER 1996). Ob Unterschiede in der Expression und Sekretion dieser Lektine eine Rolle bei der Wirtsspezifität und daher auch bei der Ausprägung unterschiedlich empfänglicher *O. mykiss* Linien gegenüber *M. cerebralis* spielen können, bleibt aber weiterhin spekulativ. Interessanterweise konnten EL-MATBOULI et al. (1999) die

Sekretöffnungen der Schleimzellen als Haupteintrittspforten für TAM-Sporen identifizieren. Die Autoren vermuteten chemotaktische Ursachen für die Anheftung an genau diesen Regionen der Haut. Die Glykane der Epidermis von Regenbogenforellen ihrerseits enthalten nachweisbare Epitope mit terminalen Resten an β -Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin (BURKHARDT-HOLM 1997). Die Autorin wies an Schleimzellen des respiratorischen Epithels zusätzliche Epitope mit Fukose- und Mannose-Resten nach. Eine Beteiligung, von Lektinen und Glykanen sowohl von Seiten des Parasiten, als auch von Seiten des Wirts, an einer molekularen Interaktion zur Wirtserkennung, Adhäsion und Invasion, ist auch bei der Pathogenese von *M. cerebralis* denkbar.

Da *M. cerebralis*, wie oben beschrieben, die Expression seiner Glykane und Kohlenhydrat-bindenden Strukturen adaptiv anpassen kann, müssen nun auch die molekularen Mechanismen des zweiten Infektionsprozesses des Zyklus separat bewertet werden. In das Wasser freigeordnete Myxosporen von *M. cerebralis* werden, von dem Oligochaeten *T. tubifex* mit der Nahrung aufgenommen und nisten sich schließlich, nach erfolgtem Ausschleudern der Polfilamente und Adhäsion, zwischen den Epithelzellen des Darms zur weiteren Entwicklung ein (EL-MATBOULI & HOFFMANN 1998). Vermutlich spielen bei diesen initialen Prozessen die Glykosylierung und die Zucker-bindenden Moleküle der Myxosporen eine entscheidende Rolle. Leider stehen uns noch keine ausreichenden Daten über die Glykosylierungsverhältnisse und die Präsenz von Lektinen im Darmepithel von *Tubifex tubifex* zur Verfügung. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass auch bei Oligochaeten, Lektine als Faktoren der Infektabwehr eine bedeutende Rolle spielen (BILEJ et al. 2000). In diesem Fall kann man bis jetzt nur spekulieren, ob die beobachteten Unterschiede in der Empfänglichkeit einzelner *T. tubifex* Linien (KERANS et al. 2004) auf unterschiedliche Expressionsmuster der Darmepithelzellen zurückzuführen sind. Weitere Untersuchungen hierzu sind wünschenswert, um auch die Mechanismen, die zu einer Spezifitäts-Determination führen, besser verstehen zu können.

Zuletzt soll auf die Glykosylierung zahlreicher Myxosporen-Proteine mit „bisected“ N-Glykanen eingegangen werden. Um diese Modifikation an der Core-Region zu katalysieren, ist ein spezielles Enzym mit dem Namen N-Acetyl-D-Glukosamin-Transferase III (GnT-III) notwendig. Lektin histochemischen Befunde von STIPPL (2003), die im Fischgewebe auf das Fehlen von Epitopen hinweisen, an die PHA-E bindet, können nicht gehalten werden. Eine interessante Fragestellung zukünftiger Studien könnte zudem sein, ob *M. cerebralis* eigene GnT-III zur Verfügung steht, oder ob die Glykan-Modifikation des Parasiten gleichsam von Fremdenzymen des Wirts (Fisch oder Oligochaete) katalysiert wird. Die letztgenannte

Möglichkeit wird vielfach von Parasiten genutzt, um durch Maskierung der eigenen Antigene mit Wirtsstrukturen, der Infektabwehr des Wirts zu entgehen. Dieser Mechanismus wird daher auch „antigen mimikry“ genannt (DAMIAN 1987, INAL 2004).

Aus den in dieser Arbeit erhaltenen Befunden, kann letztlich die Schlussfolgerung gezogen werden, dass *Myxobolus cerebralis* vielfältige Glykane und Zucker-bindende Proteine entwicklungsabhängig exprimiert, um bekannte Strategien zur Vermeidung der Immunabwehr des Wirtes, und zur Interaktion mit dem jeweiligen Wirtsgewebe zum Zweck der Pathogenese zu nutzen. Überlegungen zur therapeutischen Relevanz der genannten Erkenntnisse führen zu verschiedenen Ansätzen. So ist beispielsweise eine potente Hemmung der für die Infektion notwendigen Bindungsstellen auf *M. cerebralis* (Glykane oder Kohlenhydrat-bindende Proteine) mittels Peptid- oder Glykopeptidliganden denkbar, um präventiv den initialen Adhäsionsvorgang zu verhindern. Auch wenn der spezifischen Abwehr, aufgrund des Alters der vorwiegend betroffenen Tiere, eine untergeordnete Rolle beigemessen wird, so bleibt zu versuchen, ob die Applikation ausgewählter, Pathogenese-relevanter Parasiten-Antigene eine Immunitätsreaktion im Wirt auslösen kann und so zu einer Beeinflussung der Infektionsrate führt. Weitere Charakterisierungsarbeiten bezüglich der detektierten Kohlenhydrat-bindenden Strukturen in *M. cerebralis* werden notwendig sein, um verlässliche Aussagen über mögliche praktikable Maßnahmen zur Blockierung dieser Aktivität, und zur wirkungsvollen Unterbrechung des Entwicklungszyklus von *M. cerebralis* machen zu können.

6 Zusammenfassung

Bedeutung von Protein-Glykan-Wechselwirkungen bei der Pathogenese von *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden

Glykane und Zucker-bindende Moleküle (Lektine) bilden ein wechselseitiges Erkennungssystem, das parasitären Organismen zur Anheftung an die Wirtszellen dienen bzw. an der Migration ihrer Entwicklungsstadien in das Zielgewebe beteiligt sein kann.

Ziel dieser Arbeit war es, Kohlenhydrat-bindenden Aktivitäten mit Hilfe von 13 Biotin-markierten Neoglykokonjugaten in den einzelnen Entwicklungsstadien von *M. cerebralis* beider Wirten histochemisch zu detektieren. Einen weiteren Aspekt stellte die biochemische Charakterisierung parasitärer Glykane der Myxosporen-Stadien dar. Mittels Lektin und Western Blotting wurde das Bindungsmuster ausgewählter Biotin-markierter Pflanzenlektine (GSA-I, PHA-E, SJA, GSA-II) und die Reaktivität gegenüber anti-TAM Antikörpern dargestellt. Einzelne Glykoproteine wurden mit dem Verfahren der Lektin-Affinitätschromatographie isoliert und charakteristische Banden massenspektrometrisch (MALDI/MS) analysiert.

Dabei konnten Bindungsaktivitäten für Neoglykokonjugate festgestellt werden, die strukturspezifisch und vom jeweiligen Entwicklungsstadium abhängig exprimiert werden. So kommt es in Polkapseln von freien TAM-Sporen zur Expression von Kohlenhydrat-bindenden Strukturen für α -L-Fuc-BSA-Biotin, α -D-GalNAc-BSA-Biotin, Lac-BSA-Biotin und ASF-Biotin. In TAM-Stadien im Darmepithel von *T. tubifex*, zeigt ausschließlich β -D-GlcNAc-BSA-Biotin eine positive Reaktion mit den Polkapseln; Schalenzellen zeigten keine Aktivität. Die Polkapseln von Myxosporen im Knorpelgewebe erwiesen sich als negativ, Schalenzellen hingegen zeigten Bindungsaffinitäten zu einer Vielzahl von Neoglykokonjugaten. Außerdem konnte in keinem Sporenstadium Aktivität für die Bindung von α 2-6- oder α 2-3-verknüpfter N-Acetyl-D-Neuraminsäure nachgewiesen werden. In einem Adhäsionsversuch hefteten sich Myxosporen spezifisch an Matrices, die Laktose-, Galaktose-, GalNAc-, und GlcNAc-Reste präsentierten. Zusätzlich konnten Glykoproteine von Myxosporen identifiziert werden, die Epitope als Bindungsstellen für PHA-E (Sporen-Proteine mit 20-209 kDa), SJA (7-70 kDa), GSA-I (10-209 kDa) und GSA-II (5-40 kDa) aufweisen. Affinitätschromatographisch konnte ein Glykoprotein (McGp33) isoliert werden, das Bindungsstellen für SJA aufweist, ein Molekulargewicht von ca. 33 kDa hat und dessen Expression auf das Myxosporen-Stadium des Parasiten beschränkt ist.

Versuche mit TAM-Antiserum deuten auf eine unterschiedliche Expression der Antigene in beiden Sporenstadien, *Myxobolus cerebralis* und *Triactinomyxon*, hin.

Diese Arbeit stellt erstmalig dar, dass Zucker-bindenden Aktivitäten in einem Parasiten aus dem Stamm der Myxozoa vorhanden sind. Vermutlich sind diese Aktivitäten am komplexen Prozess der Wirtserkennung, Anheftung und Invasion der Sporen beteiligt. Darüber hinaus können die untersuchten Aktivitäten eine protektive Funktion für den Parasiten haben und an der Vermittlung einer Abwehrreaktion des Wirts bei der Migration parasitärer Stadien im Wirtsgewebe beteiligt sein.

7 Summary

The role of protein-glycan interactions in the processes of pathogenesis of *Myxobolus cerebralis*, causative agent of whirling disease

Glycans and sugar binding molecules (lectins) form a mutual recognition system which enables parasitic organisms to adhere on host cells and to migrate to target tissue.

The aim of the present study was to detect and localize carbohydrate-binding activities in developmental stages of *M. cerebralis*. The binding patterns of thirteen biotin-labelled neoglycoconjugates were examined histochemically in thin-sections of infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and oligochaete (*Tubifex tubifex*) and preparations of waterborne triactinomyxon spores. A further aim was to characterise glycan epitopes in the myxospore stage of *M. cerebralis*. Lectin and Western blotting analyses were performed by using selected biotin-labelled plant lectins (GSA-I, PHA-E, SJA, GSA-II) and TAM-antiserum. Glycoproteins were isolated by using lectin affinity chromatography and prominent bands were characterised by mass spectrometry (MALDI/MS).

Distinct structure-selective and developmental stage-regulated expression of certain classes of carbohydrate binding was observed. In TAM spores, expression of carbohydrate binding activity specific for α -L-Fuc-BSA-biotin, α -D-GalNAc-BSA-biotin, Lac-BSA-biotin und ASF-biotin was up-regulated in the polar capsules; shell valves showed no activity. In the gut of *T. tubifex*, polar capsules of the parasite showed strong positive reaction only with β -D-GlcNAc-BSA-biotin. In fish cartilage polar capsules were negative, but the spore shell valves showed a broad range of carbohydrate binding activities. No activity was detected for either α 2-6- or α 2-3-linked N-acetyl-D-neuraminic acid. An adhesion assay was performed and myxospores were found to specifically adhere to matrices containing residues of lactose, fucose, galactose, N-acetyl-D-galactosamine and N-acetyl-D-glucosamine. Furthermore it was identified that glycoepitopes of myxospores contain carbohydrate motifs reactive with PHA-E (proteins 7-70 kDa), SJA (7-70 kDa), GSA-I (10-209 kDa) and GSA-II (5-40 kDa). Mcgp33, a glycoprotein isolated by lectin affinity chromatography is reactive with SJA (about 33 kDa) and is exclusively expressed in the myxospore stage. The application of antiserum against triactinomyxon spores of *M. cerebralis* indicates differences in antigenicity of isolated glycoproteins from both, waterborne TAM spores and *M. cerebralis* myxospores.

This is the first investigation which identifies lectin activity in a parasite of the phylum myxozoa. A participation of the characterised molecules is suspected in the parasite to mediate the complex process of host recognition, adhesion and invasion. Furthermore, the detected activities can participate in the protection of the spores against environmental forces and may generate immune reactions during migration in the host tissue.

8 Abkürzungsverzeichnis

ASF	Asialofetuin
Asn	Asparagin
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca	Calcium
CO ₂	Kohlendioxid
CRD	carbohydrate recognition domain/ Kohlenhydrat-bindende Region
°C	Grad Celsius
CTL	C-Typ Lektin
DFG	Deutsche Forschungs-Gemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSA	<i>Datura stramonium</i> agglutinin
ELLSA	Enzyme-linked-lektin-sorbent-assay
et al.	et altera
etc.	et cetera
excl.	exclusive
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fuc	L-Fucose
g	Gramm
Gal	β-Galaktose
GalNAc	N-Acetyl-D-Galaktosamin
GIPL	Glycosylinositolphospholipid
Glc	α-D-Glukose
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glukosamin
GnT-III	N-Acetyl-D-Glukosamin-Transferase III
GSA	<i>Griffonia simplicifolia</i> agglutinin
IFAT	Indirekte Fluoreszenzantikörpertechnik
IPN	Infektiöse Pankreasnekrose
kDa	Kilodalton
Lac	β-Laktose
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPG	Lipophosphoglykan
MAA	<i>Maackia amurensis</i> agglutinin
MALDI/MS	matrix-assisted laser desorption/ionisation-mass spectrometry
Man	Mannose
<i>M. cerebralis</i>	<i>Myxobolus cerebralis</i>
Mel	α-Melibiose
Mio.	Million
µm	Mikrometer
Mn	Mangan
Mg	Magnesium
N	Stickstoff
NeuAc/Sia	N-Acetylneuraminsäure/Sialinsäure
O. mykiss	Oncorhynchus mykiss
OH	Hydroxyl

O ₂	Sauerstoff
P	Phosphat
PAA	Poly(2-Hydroxyethyl)-Acrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
p.exp.	post expositionem
pH	negativer, dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> erythroagglutinin
PKD	proliferative kidney disease of salmonid Proliferative Nierenerkrankung der Salmoniden
PNA	Peanut Agglutinin
Rham	L-Rhamnose
Ser	Serin
Sia/ NeuAc	Sialinsäure/ N-Acetylneuraminsäure
SJA	<i>Saphora japonica</i> agglutinin
SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin
sog.	sogenannte
sp.	Spezies (singular)
spp.	Spezies (plural)
TAM	Triactionmyxon
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
Thr	Threonin
<i>T. tubifex</i>	<i>Tubifex tubifex</i>
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
Vergr.	Vergrößerung
VHS	Virale Hämorrhagische Septikämie
VSG	Various Surface Glycoprotein
WGA	wheat germ agglutinin

9 Literaturverzeichnis

- ANDREE KB, MACCONNELL E, HEDRICK RP (1998) A nested polymerase chain reaction for the detection of genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ. **34**(2): 145-54
- ANSTEE DJ, HOLT PD, PARDOE GI (1973) Agglutinins from fish ova defining blood groups B and P. Vox Sang. **25**(4): 347-60
- ANTONIO DB, EL-MATBOULI M, HEDRICK RP (1999) Detection of early developmental stages of *Myxobolus cerebralis* in fish and tubificid oligochaete hosts by in situ hybridization. Parasitol Res. **85**(11): 942-4
- ASHWELL G & HARFORD J (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. Annu Rev Biochem. **51**: 531-54
- BALDWIN TJ, PETERSON JE, MCGHEE GC, STAIGMILLER KD, MOTTERAM E, DOWNS C (1997) Distribution of whirling disease, caused by *Myxobolus cerebralis*, in salmonid fishes in Montana. In: Whirling Disease Symposium: Expanding the Database. Whirling Disease Foundation, pp. 19-26
- BALDWIN TJ & MYKLEBUST KA (2002) Validation of a single round polymerase chain reaction assay for identification of *Myxobolus cerebralis* myxospores. Dis Aquat Organ. **49**(3): 185-90
- BARONDES SH (1988) Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. Trends Biochem Sci. **13**(12): 480-2
- BEAUCHAMP KA, GAY M, KELLEY GO, EL-MATBOULI M, KATHMAN RD, NEHRING RB, HEDRICK RP (2002) Prevalence and susceptibility of infection to *Myxobolus cerebralis*, and genetic differences among populations of *Tubifex tubifex*. Dis Aquat Organ. **51**(2): 113-21
- BECHARA IJ, YOUSSEF NN, ROBERTS DW (2003) Histologic study of head cartilage degeneration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with the parasite *Myxobolus cerebralis*. J Submicrosc Cytol Pathol. **35**(2): 111-6
- BILEJ M, DE BAETSELIER P, BESCHIN A (2000) Antimicrobial defense of the earthworm. Folia Microbiol (Praha). **45**(4): 283-300
- BLAZER VS, DENSMORE CL, SCHILL WB, CARTWRIGHT DD, PAGE SJ (2004) Comparative susceptibility of Atlantic salmon, lake trout and rainbow trout to *Myxobolus cerebralis* in controlled laboratory exposures. Dis Aquat Organ. **58**(1): 27-34
- BORST P, RUDENKO G, TAYLOR MC, BLUNDELL PA, VAN LEEUWEN F, BITTER W, CROSS M, MCCULLOCH R (1996) Antigenic variation in trypanosomes. Arch Med Res. **27**(3): 379-88
- BOYD WC & SHAPLEIGH E (1954a) Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. J Immunol. **73**(4): 226-31

- BOYD WC & SHAPLEIGH E (1954b) Diagnosis by subgroups of blood groups A and AB by use of plant agglutinins (lectins). *J Lab Clin Med.* **44**(2): 235-7
- BROEKAERT WF, LAMBRECHTS D, VERBELEN JP, PEUMANNNS WJ (1988) *Datura stramonium* agglutinin. Location in the seeds and release upon imbibition. *Plant Physiol.* **86**: 569-574
- BUCHMANN K (1998) Binding and lethal effect of complement from *Oncorhynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Platyhelminthes: Monogenea). *Dis Aquat Organ.* **32**(3): 195-200
- BUCHMANN K & BRESCIANI J (1998) Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection. *Parasitol Res.* **84**(1): 17-24
- BUCHMANN K (2001) Lectins in fish skin: do they play a role in host-monogenean interactions? *J Helminthol.* **75**(3): 227-31
- BUCHMANN K & LINDENSTRØM T (2002) Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *Int J Parasitol.* **32**(3): 309-19
- BURKHARDT-HOLM P (1997) Lectin histochemistry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill and skin. *Histochem J.* **29**(11-12): 893-9
- BUTCHER BA, SKLAR LA, SEAMER LC, GLEW RH (1992) Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal macrophages. A fluorescence flow cytometric analysis. *J Immunol.* **148**(9): 2879-86
- CAVENDER WP, WOOD JS, POWELL MS, OVERTURF K, CAIN KD (2004) Real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) to identify *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ.* **60**(3): 205-13
- CROCKER PR & FEIZI T (1996) Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions. *Curr Opin Struct Biol.* **6**(5): 679-91
- CUMMINGS RD (1994) Use of lectins in analysis of glycoconjugates. *Methods. Enzymol.* **230**: 66-86
- CUMMINGS RD (1997) Affinity chromatography of oligosaccharides and glycopeptides. In: Matejtschuk P (ed.), *Affinity separations: A practical approach*, IRL Press, Oxford, United Kingdom, pp. 123-139
- DAMIAN RT (1987) Molecular mimicry revisited. *Parasitol Today.* **3**(9): 263-6
- DANGUY A & GENTEN F (1989) Comparative lectin-binding patterns in the epidermis and dermal glands of *Bufo bufo* (L.) and *Xenopus laevis* (Daudin). *Biol Struct Morphog.* **2**(3): 94-101
- DANGUY A, GENTEN F, GABIUS HJ (1991) Histochemical evaluation of application of biotinylated neoglycoproteins for the detection of endogenous sugar receptors in fish skin. *Eur J Basic Appl Histochem* **35**(4): 341-57

DANGUY A, CAMBY I, SALMON I, KISS R (1997) Modern glycohistochemistry: A major contribution to morphological investigations. In: Gabius HJ, Gabius S (eds.), Glycosciences Chapman & Hall, London and Weinheim, pp. 547-562

D'AVILA-LEVY CM, ARAUJO FM, VERMELHO AB, BRANQUINHA MH, ALVIANO CS, SOARES RM, DOS SANTOS AL (2004) Differential lectin recognition of glycoproteins in choanomastigote-shaped trypanosomatids: taxonomic implications. FEMS Microbiol Lett. **231**(2): 171-6

DE WAARD A, HICKMAN S, KORNFELD S (1976) Isolation and properties of beta-galactoside binding lectins of calf heart and lung. J Biol Chem. **251**(23): 7581-7

DRICKAMER K (1995) Increasing diversity of animal lectin structures. Curr Opin Struct Biol. **5**(5): 612-6

DUGUID JP, SMITH IW, DEMPSTER G, EDMUNDS PN (1955) Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. J Pathol Bacteriol. **70**(2): 335-48

EINHOFF W, FLEISCHMANN G, FREIER T, KUMMER H, RUDIGER H (1986) Interactions between lectins and other components of leguminous protein bodies. Biol Chem Hoppe Seyler. **367**(1): 15-25

ELLIS AE (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev Comp Immunol. **25**(8-9): 827-39

EL-MATBOULI M (1988) Untersuchungen zum Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis* und *M. cotti* – Übertragung sowie licht- und elektronenmikroskopische Befunde. Diss. Rer. Nat. Ludwig-Maximilians-Universität München

EL-MATBOULI M & HOFFMANN RW (1989) Experimental transmission of two *Myxobolus* spp. Developing progeny via tubificid worms. Parasitology Research **75**: 461-464

EL-MATBOULI M & HOFFMANN RW (1991) Effect of freezing, aging and passage through the alimentary canal of predatory animals on the viability of *Myxobolus cerebralis* spores. Journal of Aquatic Animal Health **3**: 260-262

EL-MATBOULI M, FISCHER-SCHERL T, HOFFMANN RW (1992) Present knowledge on the life cycle, taxonomy, pathology and therapy of some *Myxosporea* spp. Important for fresh water fish – a review. Annual Review of Fish Diseases **2**: 367-402

EL-MATBOULI M, HOFFMANN RW, MANDOK C (1995) Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cartilage. J. Fish Biol. **46**: 919-935

EL-MATBOULI M (1996) Biologie und Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1903 (Myxozoa). Habilitationsschrift aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

- EL-MATBOULI M & HOFFMANN RW (1998) Light and electron microscopic study on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* in *Tubifex tubifex* to the actinosporean stage triactinomyxon. *J. Parasitol.* **28**: 195-202
- EL-MATBOULI M, HOFFMANN RW, SCHOEL H, MCDOWELL TS, HEDRICK RP (1999) Whirling disease: host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ.* **35**(1): 1-12
- EL-MATBOULI M, KÜPPERS MP, MCDOWELL TS, HEDRICK RP (2002) Comparative susceptibility of different rainbow trout strains to infection with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. Fourth International Symposium on Aquatic Animal Health, New Orleans, Louisiana, USA, September 1-5
- ESTOLA E & VARTIA KO (1955) Phytagglutinins in lichens. *Ann Med Exp Biol Fenn.* **33**(4): 392-395
- FAST MD, SIMS DE, BURKA JF, MUSTAFA A, ROSS NW (2002) Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **132**(3): 645-57
- FEIZI T & CHILDS RA (1987) Carbohydrates as antigenic determinants of glycoproteins. *Biochem J.* **245**(1): 1-11
- FENG S & WOO PT (1998) Identification of carbohydrates on the surface membrane of pathogenic and nonpathogenic piscine haemoflagellates, *Cryptobia salmositica*, *C. bullocki* and *C. catostomi* (Kinetoplastida). *Dis Aquat Organ.* **32**(3): 201-9
- FERGUSON MA, MURRAY P, RUTHERFORD H, MCCONVILLE MJ (1993) A simple purification of procyclic acidic repetitive protein and demonstration of a sialylated glycosylphosphatidylinositol membrane anchor. *Biochem J.* **291** (Pt 1): 51-5
- FERGUSON MA (1997) The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **352**(1359): 1295-302
- FERGUSON MA (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci.* **112** (17): 2799-809
- FUJITA Y, OISHI K, SUZUKI K, IMAHORI K (1975) Purification and properties of an anti-B hemagglutinin produced by *Streptomyces sp.* *Biochemistry.* **14**(20): 4465-70
- GABIUS HJ, KOHNKE B, HELLMANN T, DIMITRI T, BARDOSI A (1988) Comparative histochemical and biochemical analysis of endogenous receptors for glycoproteins in human and pig peripheral nerve. *J Neurochem* **51**(3): 756-63
- GABIUS HJ & BARDOSI A (1991) Neoglycoproteins as tools in glycohistochemistry. *Prog Histochem Cytochem* **22**(3): 1-16

- GABIUS HJ & GABIUS S (1993) Detection of tumor-associated expression of carbohydrate-binding proteins (lectins). The use of neoglycoproteins and neoglycoenzymes in glycohistochemical and glycocytological studies. *Methods Mol. Biol.* **14**: 263-75
- GABIUS HJ, KAYSER K, GABIUS S (1995) Protein-Zucker-Erkennung. *Naturwissenschaften* **82**: 533-534
- GABIUS HJ (2001) Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins. *Anat Histol Embryol* **30**(1): 3-31
- GAZZINELLI RT, ROMANHA AJ, FONTES G, CHIARI E, GAZZINELLI G, BRENNER Z (1991) Distribution of carbohydrates recognized by the lectins *Euonymus europaeus* and concanavalin A in monoxenic and heteroxenic trypanosomatids. *J Protozool.* **38**(4): 320-5
- GIDROL X, CHRESTIN H, TAN HL, KUSH A (1994) Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J Biol Chem.* **269**(12): 9278-83
- GILBOA-GARBER N (1972) Purification and properties of hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* and its reaction with human blood cells. *Biochim Biophys Acta.* **273**(1): 165-73
- GILLIN FD, HAGBLUM P, HARWOOD J, ALEY SB, REINER DS, MCCAFFERY M, SO M, GUINEY DG (1990) Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**(12): 4463-7
- GILLIN FD, REINER DS, MCCAFFERY JM (1996) Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol.* **50**: 679-705
- GOLDSTEIN IJ & HAYES CE (1978) The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **35**: 127-340
- GRIFFIN B & DAVIS E (1978) *Myxosoma cerebralis*: Detection of circulating antibodies in infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Res. Board Can.* **35**: 1186-1190
- GRUDEN-MOVSESIJAN A, ILIC N, SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC L (2002) Lectin-blot analyses of *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory-secretory components. *Parasitol Res.* **88**(11): 1004-7
- HADLEY TJ (1986) Invasion of erythrocytes by malaria parasites: a cellular and molecular overview. *Annu Rev Microbiol.* **40**: 451-77
- HALLIDAY MM (1973a) Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids. I. The diagnosis of infection. *Nord Vet Med.* **25**: 345-348
- HALLIDAY MM (1973b) Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids. II. The development and pathology of *Myxosoma cerebralis* in experimentally infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry reared at different water temperatures. *Nord Vet Med.* **25**(7): 349-58
- HALLIDAY MM (1976) The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease of salmonids. *J. Fish Biol.* **9**: 339-357

- HAMILTON AJ & CANNING EU (1988) The Production of mouse anti-*Myxosoma cerebralis* antiserum from Percoll-purified spores and its use in immunofluorescent labelling of Historesin-embedded cartilage derived from infected rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Dis. **11**: 662-668
- HATHAWAY HJ & SHUR BD (1997) Transgenic approaches to glycobiology. In: Gabius HJ, Gabius S (eds.) Glycosciences: Status and Perspectives, Chapman & Hall, London and Weinheim, pp: 507-517
- HEDRICK RP, EL-MATBOULI M, ADKINSON MA, MCCONNELL E (1998) Whirling disease. Re-emergence among wild trout. Immunol. Rev. **166**: 365-376
- HEDRICK RP, MCDOWELL TS, GAY M, MARTY GD, GEORGIADIS MP, MACCONNELL E (1999a) Comparative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brown trout *Salmo trutta* to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease. Dis Aquat Organ. **37**(3): 173-83
- HEDRICK RP, MCDOWELL TS, MUKKATIRA K, GEORGIADIS MP, MACCONNELL E (1999b) Susceptibility of selected inland salmonids to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. J. of Aquatic Animal Health **11**: 330-339
- HEDRICK RP, MCDOWELL TS, MARTY GD, MUKKATIRA K, ANTONIO DB, ANDREE KB, BUKHARI Z, CLANCY T (2000) Ultraviolet irradiation inactivates the waterborne infective stages of *Myxobolus cerebralis*: a treatment for hatchery water supplies. Dis Aquat Organ. **42**(1): 53-9
- HEDRICK RP, MCDOWELL TS, MARTY GD, FOSGATE GT, MUKKATIRA K, MYKLEBUST K, EL-MATBOULI M (2003) Susceptibility of two strains of rainbow trout (one with suspected resistance to whirling disease) to *Myxobolus cerebralis* infection. Dis Aquat Organ. **55**(1): 37-44
- HERNANDEZ AG, RODRIGUEZ N, STOJANOVIC D, CANDELLE D (1986) The localization of a lectin-like component on the Leishmania cell surface. Mol Biol Rep. **11**(3): 149-53
- HNATH JG (1988) Whirling Disease in Michigan: a historical perspective. In: Whirling Disease Management in Northern America, an Emergency Conference, Denver CO, April 12-14
- HOFER B (1903) Über die Drehkrankheit der Regenbogenforelle. Allgemeine Fischereizeitung **28**: 7-8
- HOFFMAN GL & DUNBAR CE (1961) Studies on *Myxosoma cerebralis* (Hofer) Plehn (Protozoa: Myxosporidia), the cause of whirling disease of trout. J. Parasitol. **47**: 29
- HOFFMAN GL, DUNBAR CE, BRADFORD A (1962) Whirling disease of trouts caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States. U.S. Department of the Interior, Special Scientific Report Fisheries **427**: 15pp

- HOFFMAN GL, SNIESKO SF, WOLF K (1968) Approved procedure for determining absence of viral hemorrhagic septicaemia and whirling disease in certain fish and fish products. U.S. Department of the Interior, Fish Disease Leaflet **9**: 7pp
- HOFFMAN GL & PUTZ RE (1969) Host susceptibility and the effect of aging, freezing, heat, and chemicals on spores of *Myxosoma cerebralis*. Progve. Fish Cult. **31**: 35-37
- HOFFMAN GL (1970) Intercontinental and transcontinental dissemination and transfaunation of fish parasites with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). In: Snieszko SF (ed) Symposium on Diseases of Fisheries and Shellfish. American Fisheries Society, pp. 69-81
- HOFFMAN GL Sr & HOFFMAN GL Jr (1972) Studies on the control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). I. The effects of chemicals on spores in vitro and of calcium oxide as a disinfectant in simulated ponds. J. Wildl. Dis. **8**: 49-53
- HOFFMAN GL (1974) Disinfection of contaminated water by ultraviolet irradiation, with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*) and its effect on fish. Trans. Am. Fish. Soc. **103**: 541-550
- HOFFMAN GL (1975) Whirling disease (*Myxosoma cerebralis*): control with ultraviolet irradiation and effect on fish. J. Wildl. Dis. **11**: 505-507
- HOFFMAN GL (1977) Control of whirling disease (*Myxosoma cerebralis*): use of methylene blue staining as possible indicator of effect of heat on spores. J. Fish Biol. **10**: 181-183
- HOFFMAN GL (1990) *Myxobolus cerebralis*, a worldwide cause of salmonid whirling disease. J. Aquat. Anim. Health **2**: 30-37
- HOFFMANN RW, EL-MATBOULI M, HOFFMANN-FEZER G (1991) Nachweis von Antikörpern gegen *Myxobolus cerebralis* bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). In: Verhandlungsband, Tagung der Fachgruppe Fischkrankheiten der DVG, 14.-16. Nov. 1990, Schmiedefeld, pp. 135-139
- HOSONO M, ISHIKAWA K, MINEKI R, MURAYAMA K, NUMATA C, OGAWA Y, TAKAYANAGI Y, NITTA K (1999) Tandem repeat structure of rhamnose-binding lectin from catfish (*Silurus asotus*) eggs. Biochim Biophys Acta. **1472**(3): 668-75
- INAGAWA H, KURODA A, NISHIZAWA T, HONDA T, OTOTAKE M, YOKOMIZO U, NAKANISHI T, SOMA G (2001) Cloning and characterisation of tandem-repeat type galectin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol. **11**(3): 217-31
- INAL JM (2004) Parasite interaction with host complement: beyond attack regulation. Trends Parasitol. **20**(9): 407-12
- INGRAM GA (1980) Substances involved in the natural resistance of fish to infection – A review. J. Fish Biol. **16**: 23-60
- JACOBSON RL (1994) In: Doyle RJ, Slifkin M (eds.), Lectin-Microorganism Interactions, Marcel Decker, pp. 191-223

- JACOBSON RL & DOYLE RJ (1996) Lectin-parasite interactions. *Parasitol Today*. **12**(2): 55-61
- JANIZEWSKA J (1957) Actinomyxidia II. New systematics, sexual cycle, description of genera species. *Zool. Pol.* **8**: 3-34
- JONES SR (2001) The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. *Dev Comp Immunol.* **25**(8-9): 841-52
- KAMIYA H, MURAMOTO K, GOTO R (1988) Purification and properties of agglutinins from conger eel, *Conger Myriaster* (Brevoort), skin mucus. *Dev Comp Immunol.* **12**(2): 309-18
- KAUSS H & GLASER C (1974) Carbohydrate-binding proteins from plant cell walls and their possible involvement in extension growth. *FEBS Lett.* **45**(1): 304-7
- KAUSS H & BOWLES DJ (1976) Some properties of carbohydrate binding proteins (lectins) solubilized from cell walls of *Phaseolus aureus*. *Planta* **130**: 169-174
- KELLEY GO, ADKISON MA, LEUTENEGGER CM, HEDRICK RP (2003) *Myxobolus cerebralis*: identification of a cathepsin Z-like protease gene (MyxCP-1) expressed during parasite development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Exp Parasitol.* **105**(3-4): 201-10
- KELLEY GO, ZAGMUTT-VERGARA FJ, LEUTENEGGER CM, ADKISON MA, BAXA DV, HEDRICK RP (2004) Identification of a serine protease gene expressed by *Myxobolus cerebralis* during development in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ.* **59**(3): 235-48
- KENT ML, MARGOLIS L, CORLISS JO (1994) The demise of a class of protests: taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protest phylum Myxozoa Grassé, 1970. *Can. J. Zool.* **72**: 932-937
- KENT ML, ANDREE KB, BARTHOLOMEW JL, EL-MATBOULI M, DESSER SS, DEVLIN RH, FEIST SW, HEDRICK RP, HOFFMANN RW, KHATTRA J, HALLETT SL, LESTER RJ, LONGSHAW M, PALENZEULA O, SIDDALL ME, XIAO C (2001) Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**: 395-413
- KERANS BL, RASMUSSEN C, STEVENS R, COLWELL AE, WINTON JR (2004) Differential propagation of the metazoan parasite *Myxobolus cerebralis* by *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Ilyodrilus templetoni*, and genetically distinct strains of *Tubifex tubifex*. *J Parasitol.* **90**(6): 1366-73
- KIJNE JW, DIAZ C, DE PATER S (1992) Lectins in the symbiosis between Rhizobia and leguminous plants. In: *Advances in Lectin Research Vol.5*, pp. 15-50
- KLABUNDE J, UHLEMANN AC, TEBO AE, KIMMEL J, SCHWARZ RT, KREMSNER PG, KUN JF (2002) Recognition of *plasmodium falciparum* proteins by mannan-binding lectin, a component of the human innate immune system. *Parasitol Res.* **88**(2): 113-7

KOMAROVA EN, VYSKREBENTSEVA EI, TRUNOVA TI (1993) Change in lectin affinity of cell walls of winter wheat etiolated during low-temperature hardening. Dokl. Akad. Nauk. **329**: 680-682

KOMAROVA EN, VYSKREBENTSEVA EI, TRUNOVA TI (1994) Cell wall lectins in leaves and coleoptiles of wheat germ seedlings during low-temperature hardening. Russ. J. Plant Physiol. **41**: 438-441

KÖTTGEN E, BAUER C, REUTTER W, GEROK W (1979a) Neue Ergebnisse zur biologischen und medizinischen Bedeutung von Glykoproteinen. I. Grundlagen und interdisziplinäre Aspekte. Klin. Wochenschr. **57**: 151-159

KÖTTGEN E, BAUER C, REUTTER W, GEROK W (1979b) Neue Ergebnisse zur biologischen und medizinischen Bedeutung von Glykoproteinen. II. Ausgewählte klinische Fachgebiete. Klein. Wochenschr. **57**: 199-214

KOVÁCS P, MULLER WE, CSABA G (1997) Identification of lectins in the kinetids of *Tetrahymena pyriformis*. Cell Biol Int. **21**(1): 17-22

LAINÉ RO, HUTSON RG, KILBERG MS (1996) Eukaryotic gene expression: metabolite control by amino acids. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. **53**: 219-48

LAINÉ RA (1997) The information-storing potential of the sugar code. In: Gabius HJ, Gabius S (eds.), Glycosciences: Status and Perspectives, Chapman & Hall, London and Weinheim, pp. 1-14

LASKY LA (1995) Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. Annu Rev Biochem. **64**: 113-39

LEGENDRE H, DECAESTECKER C, GBENOU MG, NAGY N, HENDLISZ A, ANDRE S, PECTOR JC, KISS R, GABIUS HJ (2004) Prognostic stratification of Dukes B colon cancer by a neoglycoprotein. Int J Oncol. **25**(2): 269-76

LEVINE ND, CORLISS JO, COX FE, DEROUX G, GRAIN J, HONIGBERG BM, LEEDALE GF, LOEBLICH AR 3RD, LOM J, LYNN D, MERINFELD EG, PAGE FC, POLJANSKY G, SPRAGUE V, VAVRA J, WALLACE FG (1980) A newly revised classification of the protozoa. J Protozool. **27**(1): 37-58

LIS H & SHARON N (1986) Lectins as molecules and as tools. Annu Rev Biochem **55**: 35-67

LOGANATHAN D, OSBORNE SE, GLICK GD, GOLDSTEIN IJ (1992) Synthesis of high-affinity, hydrophobic monosaccharide derivatives and study of their interaction with concanavalin A, the pea, the lentil, and fava bean lectins. Arch Biochem Biophys. **299**(2): 268-74

LOM J & HOFFMAN GL (1971) Morphology of the spores of *Myxosoma cerebralis* (Hofer, 1903) and *M. cartilaginis* (Hoffman, Putz, and Dunbar, 1965). J Parasitol. **57**(6): 1302-8

LOM J & NOBLE ER (1984) Revised classification of the class Myxosporidia Bütschli, 1881. Folia Parasitol. (Praha) **31**: 193-205

- LOM J & DYKOVÀ I (1992) Protozoan parasites of fish. Elsevier, New York, 315pp
- LOM J & DYKOVÀ I (1995) Myxosporea (Phylum Myxozoa). In: Woo (ed.), Fish Diseases and Disorders, Vol.1: Protozoan and metazoan infections, CAB International, Wallington, pp. 97-148
- LORENC-KUBIS I, MORAWIECKA B, WIECZOREK E (1981) Effects of lectins on enzymatic properties, plant acid phosphatases and ribonucleases. In: Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry Vol.1, De-Gruyter-Verlag Berlin, pp. 168-178
- LOTAN R & NICOLSON GL (1979) Purification of cell membrane glycoproteins by lectin affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta.* **559**(4): 329-76
- LOUKAS A & MAIZELS RM (2000) Helminth C-type lectins and host-parasite interactions. *Parasitol Today.* **16**(8): 333-9
- LOWERS JM & BARTHOLOMEW JL (2003) Detection of myxozoan parasites in oligochaetes imported as food for ornamental fish. *J Parasitol.* **89**(1): 84-91
- LUKES J, VOLF P, LOM J (1993) Detection of chitin in spores of *Myxobolus muelleri* and *M. subepithelialis* (Myxosporea, Myxozoa). *Parasitol Res.* **79**(5): 439-40
- MAJUMDER M & CHATTERJEE BP (1996) Subcellular distribution of jacalin in *Atrocarpus integrifolia* seeds. *Cytobios.* **88**: 201-208
- MALIARIK MJ & GOLDSTEIN IJ (1988) Photoaffinity labelling of the adenine binding site of the lectins from lima bean, *Phaseolus lunatus*, and the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *J Biol Chem.* **263**(23): 11274-9
- MANDOK C (1993) Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa: Myxosporea) in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) Diss. Med. Vet. Ludwig-Maximilians-Universität München
- MARGOLIS ML, KENT ML, BUSTOS P (1996) Diseases of salmonids resembling myxosporean whirling disease, and the absence of *Myxosoma cerebralis*, in South America. *Dis. Aquat. Organ.* **6**: 33-37
- MARÍN DE MATEO M, MCGEORGE J, MORRIS D, KENT ML (1996) Comparative studies of PKX and *Sphaerospora* spp. From salmonids using lectin and monoclonal antibody staining techniques. *J. Fish Dis.* **19**: 55-63
- MARKIW ME & WOLF K (1974) *Myxosoma cerebralis*: isolation and concentration from fish skeletal elements- sequential enzymatic digestion and purification by differential centrifugation. *J. Fish Res. Board Can.* **31**: 15-20
- MARKIW ME & WOLF K (1980) *Myxosoma cerebralis*: trypsinization of plankton centrifuge harvests increases optical clarity and spore concentration. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **37**: 2225-2227

- MARKIW ME & WOLF K (1983) *Myxosoma cerebralis* (Myxozoa, Myxosporea) etiologic agent of salmonid whirling disease requires tubificid worms (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle. *J. Protozool* **30**: 561-564
- MARKIW ME (1986) Salmonis whirling disease: dynamics of experimental production of the infective stage – the Triactinomyxon spore. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **43**: 521-526
- MARKIW ME (1989) Portals of entry for salmonid whirling disease in rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.* **6**: 7-10
- MARKIW ME (1992) Experimentally induced whirling disease. I. Dose response of fry and adults of rainbow trout exposed to the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis*. *J. Aquat. Anim. Health* **4**: 40-43
- MARQUÈS A (1984) Contribution a la connaissance des Actinomyxidies: Ultrastructure, cycle biologique, systematique Languedoc, Université des Sciences et techniques, Thèse de Doctorat d'Etat
- MING M, CHUENKOVA M, ORTEGA-BARRIA E, PEREIRA ME (1993) Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. *Mol Biochem Parasitol.* **59**(2): 243-52
- MODIN J (1998) Whirling Disease in California: A Review of its History, Distribution and Impacts, 1965-1997, *J Aquat. Anim Health* **10**: 132-142
- MORGAN WT & WATKINS WM (1953) The inhibition of the haemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars. *Br J Exp Pathol.* **34**(1): 94-103
- MORRIS DJ, ADAMS A, RICHARDS RH (1997) Studies of the PKX parasite in rainbow trout via immunohistochemistry and immunogold electron microscopy. *J. Aquat. Anim. Health* **9**: 265-273
- MORRIS DJ, EL-MATBOULI M, ADAMS A (2004) Extensive release of an antigen associated with the sporogonic stages of *myxobolus cerebralis* (Myxozoa: Myxosporea) is detected by a heterologous antibody raised to *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea). *Folia Parasitol (Praha).* **51**(2-3): 215-20
- MUÑOZ P, PALENZUELA O, ALVAREZ-PELLITERO P, SITJA-BOBADILLA A (1999) Comparative studies on carbohydrates of several myxosporean parasites of fish using lectin histochemical methods. *Folia Parasitol (Praha).* **46**(4): 241-7
- MUÑOZ P, SITJA-BOBADILLA A, ALVAREZ-PELLITERO P (2000) Ultrastructural localisation of carbohydrates in four myxosporean parasites. *Parasite.* **7**(3): 185-91
- MURAMOTO K, KAGAWA D, SATO T, OGAWA T, NISHIDA Y, KAMIYA H (1999) Functional and structural characterization of multiple galectins from the skin mucus of conger eel, *Conger myriaster*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **123**(1): 33-45

- NAKAMURA O, WATANABE T, KAMIYA H, MURAMOTO K (2001) Galectin containing cells in the skin and mucosal tissues in Japanese conger eel, *Conger myriaster*: an immunohistochemical study. *Dev Comp Immunol.* **25**(5-6): 431-7
- NASH T (1992) Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. *Parasitol Today.* **8**(7): 229-34
- NEHRING RB, THOMPSON KG, TAURMAN KA, SHULER DL (2002) Laboratory studies indicating that living brown trout *Salmo trutta* expel viable *Myxobolus cerebralis* (Myxosporea). *American Fisheries Society Symposium* **29**: 125-134
- NEHRING RB, THOMPSON KG, TAURMAN K, ATKINSON W (2003) Efficacy of passive sand filtration in reducing exposure of salmonids to the actinospore of *Myxobolus cerebralis*. *Dis Aquat Organ.* **57**(1-2): 77-83
- NETER E (1956) Bacterial hemagglutination and hemolysis. *Bacteriol Rev.* **20**(3): 166-88
- NICKUM D (1999) Whirling Disease in the United States: A Summary of Progress in Research and Management. *Trout Unlimited* January 1999
- NOGA EJ (1996) Whirling Disease (Black Tail). In: Duncan LL, Steube M, Wilson BJ (eds.), *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*, Mosby-Year Book, INC., pp. 183-185
- O'GRODNICK JJ (1975) Whirling disease *Myxosoma cerebralis* spore concentration using the continuous plankton centrifuge. *J Wildl Dis* **11**(1): 54-7
- O'GRODNICK JJ (1979) Susceptibility of various salmonids to whirling disease (*Myxosoma cerebralis*) in the United States. *Trans. Am. Fish. Soc.* **108**: 187-190
- ORTEGA-BARRIA E & PEREIRA ME (1991) A novel T. cruzi heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell.* **67**(2): 411-21
- PEREIRA-CHIOCCOLA VL, ACOSTA-SERRANO A, DEALMEIDA IC, FERGUSON MAJ, SOUTO-PADRON T, RODRIGUES MM, TRAVASSOS LR, SCHENKMAN S (2000) Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti- α -galactosyl-antibodies. *J. Cell. Sci.* **113**: 1299-1307
- PEUMANNNS WJ, VAN DAMME EJM (1993) Plant lectins: storage proteins with a defensive role. In: Basu J, Kundu M, Chakrabarti P (eds.), *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* Vol. 9, Wiley Eastern Ltd, New Dehli, pp. 27-34
- PLEHN M (1905) Über die Drehkrankheit der Salmoniden *Lentospora cerebralis* (Hofer). *Arch. Protistenkd.* **5**: 145-166
- POWELL JT & WHITNEY PL (1980) Postnatal development of rat lung. Changes in lung lectin, elastin, acetylcholinesterase and other enzymes. *Biochem J.* **188**(1): 1-8

- PREVIATO JO, GORIN PA, MAZUREK M, XAVIER MT, FOURNET B, WIERUSZESK JM, MENDONCA-PREVIATO L (1990) Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. **265**(5): 2518-26
- PUTZ RE & HOFFMAN GL (1966) Transmission of *Myxosoma cerebralis* (whirling disease). Progre. Sport. Fish. Res. 1970, pp. 93-99
- REUTER G & GABIUS HJ (1997) Proteinglykosylierung. Dtsch. Apoth. Ztg **137**: 1319-1335
- ROBERTS DD & GOLDSTEIN IJ (1982) Hydrophobic binding properties of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). J Biol Chem. **257**(19): 11274-7
- ROSE JD, MARRS GS, LEWIS C, SCHISLER G (2000) Whirling disease behaviour and its relation to pathology of brain stem and spinal cord in rainbow trout. J. Aquat. Anim. Health **12**: 107-118
- RUDENKO G, CROSS M, BORST P (1998) Changing the end: antigenic variation orchestrated at the telomeres of African trypanosomes. Trends Microbiol. **6**(3): 113-6
- RÜDIGER H & GABIUS HJ (1993) Lectinologie. Dtsch. Apoth. Ztg **133**: 2371-2381
- RÜDIGER H (1997) Structure and function of plant lectins. In: Gabius HJ, Gabius S (eds.), Glycosciences: Status and Perspectives, Chapman & Hall, London and Weinheim, pp. 415-438
- RYCE EK, ZALE AV, MACCONNELL E (2004) Effects of fish age and parasite dose on the development of whirling disease in rainbow trout. Dis Aquat Organ. **59**(3): 225-33
- SCHÄPERCLAUS W (1931) Die Drehkrankheit in der Forellenzucht und ihre Bekämpfung. Zeitschrift für Fischerei **29**: 521-567
- SCHÄPERCLAUS W (1990) Fischkrankheiten. 5. Auflage, Akademie-Verlag, Berlin
- SCHENKMAN S, JIANG MS, HART GW, NUSSENZWEIG V (1991) A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. Cell. **65**(7): 1117-25
- SCHENKMAN S, PONTES DE CARVALHO L, NUSSENZWEIG V (1992) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. J Exp Med. **175**(2): 567-75
- SCHENKMAN S, FERGUSON MA, HEISE N, DE ALMEIDA ML, MORTARA RA, YOSHIDA N (1993) Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. **59**(2): 293-303
- SCHISLER GJ & BERGERSEN EP (1998) The effect of electrofishing injury and *Myxobolus cerebralis* infection on fingerling rainbow trout. Colorado Cooperative Fish and Wildlife Research Unit. In: Whirling Disease Symposium: Research in Progress 1998, pp. 975-979

- SCHLEGEL M, LOM J, STECHMANN A, BERNHARD D, LEIPE D, DYKOVÀ I, SOGIN ML (1996) Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: Evidence that Myxozoa are Metazoa related to the bilateria. Arch. Protistenkd. **147**: 1-9
- SCHOTT A (2002) Vergleichende Untersuchungen zur Wirksamkeit von Fumagillin und TNP-470 im Rahmen der Bekämpfung der Drehkrankheit bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) Diss. Vet. Med. Ludwig-Maximilians-Universität München
- SCHOTTELIUS J (1992) Neoglycoproteins as tools for the detection of carbohydrate-specific receptors on the cell surface of Leishmania. Parasitol Res. **78**(4): 309-15
- SHARON N & LIS H (1997) Glycoproteins: structure and function. In: Gabius HJ, Gabius S (eds.), Glycosciences: status and perspectives, Chapman and Hall, London and Weinheim, pp. 133-162
- SHIOMI K, UEMATSU H, YAMANAKA H, KIKUCHI T (1989) Purification and characterization of a galactose-binding lectin from the skin mucus of the conger eel *Conger myriaster*. Comp Biochem Physiol B. **92**(2): 255-61
- SIDDALL ME, MARTIN DS, BRIDGE D, DESSER SS, CONE DK (1995) The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria. J Parasitol. **81**(6): 961-7
- SINOWATZ F, GABIUS HJ, AMSELGRUBER W (1988) Surface sugar binding components of bovine spermatozoa as evidence by fluorescent neoglycoproteins. Histochemistry **88**(3-6): 395-9
- SMOTHERS JF, VON DOHLEN CD, SMITH LH JR, SPALL RD (1994) Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. Science. **265**(5179): 1719-21
- STILLMARK H (1888) Über Rizin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Inaugural Dissertation, Dorpat (Tartu)
- STIPPL M (2003) Lokalisierung und Typisierung von Zuckerstrukturen in den Entwicklungsstadien von *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit. Diss. Med. Vet. Ludwig-Maximilians-Universität München
- STOCKERT RJ, MORELL AG, SCHEINBERG IH (1974) Mammalian hepatic lectin. Science. **186**(4161): 365-6
- TASUMI S, OHIRA T, KAWAZOE I, SUETAKE H, SUZUKI Y, AIDA K (2002) Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*. J Biol Chem. **277**(30): 27305-11
- TATENO H, SANEYOSHI A, OGAWA T, MURAMOTO K, KAMIYA H, SANEYOSHI M (1998) Isolation and characterization of rhamnose-binding lectins from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologous to low density lipoprotein receptor superfamily. J Biol Chem. **273**(30): 19190-7

TOONE EJ (1994) Structure and energetics of protein-carbohydrate complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**: 719-728

TURCO SJ & DESCOTEAUX A (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* **46**: 65-94

TURNER MW (1996) The lectin pathway of complement activation. *Res Immunol.* **147**(2): 110-5

UHLENBRUCK G & PROKOP O (1966) An agglutinin from *Helix pomatia*, which reacts with terminal N-acetyl-D-galactosamine. *Vox Sang.* **11**(4): 519-20

UMEKAWA H, TAKAO K, FUJIHARA M (1990) Interaction of Toramame (*Phaseolus vulgaris*) lectin with indole derivatives. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 3295-3299

VAN DRIESSCHE E (1988) Structure and function of Leguminosae lectins. *Adv Lectin Res* **1**: 73-134

VAN PARIJS J, BROEKAERT WF, GOLDSTEIN IJ, PEUMANS WJ (1991) Hevein: An antifungal protein from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* **183**: 258-264

VILLALBA JM, NAVAS P, GARCIA-HERDUGO G (1987) Lectin binding patterns in amphibian epidermis. *Acta Histochem.* **81**(1): 51-57

VINCENT D (1996) Whirling disease and wild trout: the Montana experience. *Fisheries (Bethesda)* **21**: 32-34

WAGNER EJ, SMITH M, ARNDT R, ROBERTS DW (2003) Physical and chemical effects on viability of the *Myxobolus cerebralis* triactinomyxon. *Dis Aquat Organ.* **53**(2): 133-42

WATKINS WM & MORGAN WT (1952) Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. *Nature.* **169**(4307): 825-6

WENZEL M, GERS-BARLAG H, SCHIMPL A, RUDIGER H (1993) Time course of lectin and storage protein biosynthesis in developing pea (*Pisum sativum*) seeds. *Biol Chem Hoppe Seyler.* **374**(9): 887-94

WHIPPS CM, EL-MATBOULI M, HEDRICK RP, BLAZER V, KENT ML (2004) *Myxobolus cerebralis* internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences support recent spread of the parasite to North America and within Europe. *Dis Aquat Organ.* **60**(2): 105-8

WIERZBA-ARABSKA E, MORAWIEKA B (1987) Purification and properties of lectin from potato tubers and leaves; interaction with acid phosphatase from potato tubers. *Acta Biochim. Polon.* **34**: 407-420

WOLF K & MARKIW ME (1975) Serological identification by indirect fluorescent antibody test. *Fish Health* **4**: 8

WOLF K, MARKIW ME, CRUZ JM, GALHANO MH, EIRAS J, HERMAN RL (1981) Non-myxosporidian blacktail of salmonids. *J. Fish Dis.* **4**: 355-357

WOLF K & MARKIW ME (1982) *Myxosoma cerebralis*: inactivation of spores by hot smoking of infected trout. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **39**: 926-928

WOLF K & MARKIW ME (1984) Biology contravenes taxonomy in the myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. Science **255**: 1449-1452

WOLF K, MARKIW ME, HILTUNEN JK (1986) Salmonid whirling disease: *Tubifex tubifex* (Müller) identified as the essential oligochaete in the protozoan life cycle. J. Fish Dis. **9**: 83-85

WOODBURY R (1996) A killer runs through it. Time, June 3, p 64

ZACCONE G, FASULO S, LO CASCIO P, LICATA A, AINIS L, AFFRONTI R (1987) Lectin-binding pattern on the surface epidermis of *Ambystoma tigrinum* larvae. A light- and electron-microscopic study. Histochemistry. **87**(5): 431-8

ZHANG H, NICHOLS K, THORGAARD GH, RISTOW SS (2001) Identification, mapping, and genomic structural analysis of an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing C-type lectin from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Immunogenetics. **53**(9): 751-9

ZHANG H, ROBISON B, THORGAARD GH, RISTOW SS (2000) Cloning, mapping and genomic organization of a fish C-type lectin gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biochim Biophys Acta. **1494**(1-2): 14-22

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt dabei besonders Herrn Prof. Dr. El-Matbouli für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, sowie für die allzeit entgegengebrachte, freundliche Unterstützung und für die beispielhafte fachliche Betreuung bei der Anfertigung der Arbeiten.

Herrn PD Dr. Kaltner möchte ich für seine jederzeit freundliche und geduldige Hilfe in allen Belangen danken. Ohne seine fachliche Unterstützung wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe - Christoph Dörfler, Vanessa Severin, Hatem Soliman, Amine Oucible, M'hamed Oumouna, Dr. Michael Meixner und Dr. Marianne Mattes – bedanke ich mich für die freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Maximilian Stippl für die freundliche Einweisung in die histochemischen Arbeitsmethoden und Frau Christine Kühnhauser-Vogt für die Einführung in die histologischen Präparationstechniken.

Frau Dr. Michaela Lohr und Herrn Michael Mürnseer vom Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der LMU danke ich für unzählige fachliche und freundschaftliche Gespräche.

Ich danke Frau Dr. Daniela Festl, die mich als Mentorin mein gesamtes Studium hindurch begleitet und gefördert hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, bei meinen Großeltern und bei meiner Schwester ganz herzlich bedanken, ohne deren moralische und finanzielle Unterstützung nicht nur diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Jörg und Stephan – Euch beiden einen riesigen Dank.

Ganz besonders herzlich danke ich meiner Freundin Wiebke, die mir in ruhigen Zeiten Antrieb und in hektischen Zeiten Ruhe war. Ohne ihre liebevolle Unterstützung würde diese Arbeit jetzt nicht vor uns liegen.

Persönlicher Werdegang

Name:	Martin Knaus
Geburtsdatum:	6. September 1976
Geburtsort:	München
Eltern:	Josef Knaus Brigitte Knaus, geb. Beichl
Geschwister:	Karoline Knaus
Schulbildung:	1984 - 1987 Grundschule St. Konrad in Haar 1987 - 1996 Ernst-Mach-Gymnasium in Haar 28. Juni 1996 Allgemeine Hochschulreife
Wehrersatzdienst:	1996 - 1997 Zivildienst im Bezirkskrankenhaus Haar, Fachkrankenhaus für Psychotherapie und Neurologie Akademisches Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität München
Hochschulstudium:	1. Oktober 1997 Beginn des Studiums der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians- Universität München 1. April 2003 Abschluss mit der Tierärztlichen Prüfung
Approbation als Tierarzt:	11. April 2003
Promotionsstudium:	Seit 1. Mai 2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter (DFG) am Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät an der Ludwig-Maximilians-Universität München