

**Ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen
zur Entwicklung des Ciliaten *Cryptocaryon irritans*
in der Fischhaut**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Angelika Dohle
aus
Letmathe

Düsseldorf 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Mehlhorn

Korreferent: PD Dr. G. Schmahl

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 04. 02. 2003

**Gott gibt die Nüsse,
aber er beißt sie nicht auf.**

Johann Wolfgang von Goethe, 1749-1832

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	i-iii
II.	Abkürzungsverzeichnis	iv-v
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	10
2.1	Herkunft der Parasiten und ihrer Wirte	10
2.2	Der Wirt.....	10
2.3	Hälterungsbedingungen.....	11
2.3.1	Hälterungsbedingungen der nicht-infizierten Tiere	11
2.3.2	Hälterungsbedingungen während der Versuche.....	12
2.4	Infektionsmodus	12
2.5	Wasserqualität	12
2.6	Gewinnung der Proben.....	13
2.6.1	Trophonten	13
2.6.2	Protomonten	13
2.6.3	Zysten (Tomonten) und Theronten.....	13
2.7	Verträglichkeitsversuche	14
2.8	Therapeutika.....	14
2.9	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	15
2.9.1	Fixierung und Einbettung – Standardmethode.....	15
2.9.2	Semidünnschnitte und Ultramikrotomie	16
2.9.3	Kontrastierung der Ultradünnschnitte	17
2.10	Fixierung und Einbettung – histochemische Untersuchungen	18
2.10.1	Thiocarbohydrazid-Methode nach Thiéry, 1967.....	18
2.10.2	Alcianblau	19
2.10.3	Rutheniumrot.....	19
2.10.4	Tannin.....	19
2.10.5	Lektin-Gold-Markierungen, Post-Embedding-Methode	20
2.11	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	24
2.11.1	Aufbereitung der Proben	24
2.11.2	Critical-Point-Trocknung	25
2.11.3	Goldbedampfung.....	25

2.12	Zusammenstellung der in den Versuchen verwendeten Chemikalien.....	26
2.13	Lösungen	28
3.	Ergebnisse	29
3.1	Lichtmikroskopische Organisation der verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>Cryptocaryon irritans</i>	29
3.2	Rasterelektronenmikroskopische (REM) Ergebnisse.....	33
3.3	Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen zur Ultrastruktur der unbehandelten <i>Cryptocaryon irritans</i> -Stadien	37
3.3.1	Ultrastruktur der Trophonten und Protomonten.....	37
3.3.2	Cyclostadien der Trophonten von <i>Cryptocaryon irritans</i>	43
3.3.3	Ultrastruktur der Bodenstadien – Tomonten mit Tomiten- von <i>Cryptocaryon irritans</i>	45
3.4	Histochemische Untersuchungen	50
3.4.1	Ultrastruktur der Phoronten nach Fixierung mit Tannin.....	50
3.4.2	Ultrastruktur der Trophonten nach Fixierung mit Alcianblau.....	54
3.4.3	Ultrastruktur junger Trophonten nach Fixierung mit Rutheniumrot.....	57
3.4.4	Ultrastruktur der Trophonten nach Behandlung mit der Thiocarbohydrazid (TCH)-Methode	60
3.4.5	Untersuchungen zu Lektin-Gold-Markierungen nach der Post-Embedding-Methode.....	60
3.4.5.1	Con A	61
3.4.5.2	WGA	62
3.4.5.3	DBA.....	66
3.4.5.4	UEA.....	66
3.4.5.5	LPA	69
3.4.5.6	SBA	73
3.5	Wirksamkeit von Bithionolsulfoxid auf <i>Cryptocaryon irritans</i>	74
3.5.1	Verträglichkeitsversuche	75
3.5.2	Verlauf einer <i>Cryptocaryon irritans</i> -Infektion bei <i>Amphiprion frenatus</i> nach Einmalbehandlung mit Bithionolsulfoxid in verschiedenen Konzentrationsstufen (10 mg/l, 25 mg/l und 50 mg/l); Expositionszeit 24 h u. 48 h	76

3.5.3	Wirksamkeit von Bithionolsulfoxid auf die hautständigen Stadien von <i>Cryptocaryon irritans</i> nach 24stündiger Inkubation mit 10 mg Bithionolsulfoxid /l; TEM-Untersuchungen	77
3.5.4	Wirksamkeit von Bithionolsulfoxid auf die hautständigen Stadien von <i>Cryptocaryon irritans</i> nach 24stündiger Inkubation mit 25 mg Bithionolsulfoxid /l; TEM-Untersuchungen	81
3.5.5	Wirksamkeit von Bithionolsulfoxid auf die hautständigen Stadien von <i>Cryptocaryon irritans</i> nach 24stündiger Inkubation mit 50 mg Bithionolsulfoxid /l; TEM-Untersuchungen	82
4.	Diskussion	83
4.1	Morphologie und Struktur der verschiedenen Stadien von <i>Cryptocaryon irritans</i>	83
4.2	Stand der Forschung bei <i>Cryptocaryon irritans</i>	88
4.3	Etablierung der Infektionen mit <i>Cryptocaryon irritans</i>	89
4.4	Histochemische Untersuchungen	90
4.4.1	Tannin.....	90
4.4.2	Alcianblau	92
4.4.3	Rutheniumrot.....	94
4.4.4	Thiocarbohydrazid (TCH).....	96
4.4.5	Lektine.....	97
4.5	Bithionolsulfoxid und weitere Substanzen gegen <i>Cryptocaryon irritans</i> ...	105
5.	Zusammenfassung	111
6.	Literaturverzeichnis	112

Danksagung

Lebenslauf

II. Abkürzungsverzeichnis

AL	mit Alcianblau markierte Struktur
AXN	Axonem
CE	Cortikale Einstülpung
CI	Cilium
CT	Cytostom
CW	Zystenwand
CY	Cytoplasma
ED	Elektronendichtes Material
EK	Exkretionskanal
EL	Elektronenlichte Vesikel
ELS	Elektronenlichte Strukturen
EX	Extrusom
GA	Golgi-Apparat
K	Kontamination
KL	Kiemenlamelle
LP	Lipideinschlüsse
LZ	Lanzettförmige Organelle
MA	Makronucleus
MI	Mitochondrium
ML	Melanocyt
MS	Membranstapel
MU	Mucozyste
NP	Nephroplasma
NV	Nahrungsvakuole
PM	Plasmamembran
PR	Phoront
RR	Rutheniumrot
S	Spalt
SG	Sekretorische Körnchen
SP	Spongiöse Schicht

SU	Spongiöse Substanz
SV	Spongiöse Vesikel
TI	Tomit
TO	Tomont
TR	Trophont
TZ	Tochterzelle
V	Vakuole
WG	Wirtsgewebe
ZR	Zellreste

1. Einleitung

Mit dem steigenden wirtschaftlichen und ernährungspolitischen Stellenwert der Aquakultur ist auch die Bedeutung der marinen Fischparasiten stark angewachsen.

Angesichts der Tatsache, daß immer mehr Menschen mit den Produkten von immer weniger landwirtschaftlich nutzbarer Fläche auskommen müssen, ergibt sich die Notwendigkeit einer intensivierten Nutzung der aquatischen Ressourcen zur Proteinversorgung. Für das Jahr 2010 liegt die Prognose für landwirtschaftlich nutzbare Flächen pro Kopf der Erdbevölkerung bei 0,2 ha, während es 1996 noch 0,3 ha waren (von Braun 1996). Fisch stellt in den Entwicklungsländern immer noch die Hauptquelle an tierischem Eiweiß dar und ist nach dem Rohöl die wichtigste Devisenquelle (ca. 11 Mrd. US\$ 1998 an Nettoexport). In den westlichen Industriestaaten wird er zunehmend als Alternative zu durch Prionen verseuchtes Rind- und Schafffleisch gesehen (Zell 1990, Weissmann 1991, Bundesministerium für Zusammenarbeit 1998). Außerdem haben die Omega-3-Fettsäuren im Fisch nach neuesten Erkenntnissen positive Einflüsse auf Herzrhythmusstörungen und reduzieren das Risiko eines plötzlichen Todes nach einem Herzinfarkt (Albert et al. 2002).

Überfischung – nach Angaben der FAO sind zwei Drittel der Meere und Gewässer betroffen - und steigende Verschmutzung lassen die weltweiten Erträge des Fischfangs seit 1989 bei ca. 90 Mio. Tonnen stagnieren (Safina 1996, Bundesministerium für Zusammenarbeit 1998).

Der durch Aquakultur erwirtschaftete Ertrag hat sich jedoch seit 1985 verdoppelt und lag 1995 bei ca. 20 Mio. Tonnen (Safina 1996, Watson und Pauly 2001).

Bereits 1982 wies Kinne auf den hohen Stellenwert der Aquakultur in der Zukunft hin. Bis zum Jahr 2025 werden jährlich ca. 100 Mio. Tonnen Fisch benötigt, um das gegenwärtige durchschnittliche Versorgungsniveau aufrechtzuerhalten (Bundesministerium für Zusammenarbeit 1998).

Marine Fischparasiten sind ein allgegenwärtiges Problem. Dabei treten deutliche Unterschiede in Verbreitung und Häufigkeit der Parasiten in freier Wildbahn und mariner Aquakultur auf. Die parasitäre Vielfalt ist zwar bei freilebenden Fischen sehr hoch, aber gerade die Parasiten, deren Entwicklungszyklen in der Umgebung von kultivierten Fischen ablaufen, führen durch ihre hohe Pathogenität zu erheblichen ökonomischen Einbußen (Ogawa 1996).

Durch ständige technische Verbesserungen in der Massenproduktion von Fischen und Verwendung von großen Mengen an Setzlingen unterschiedlichster Fischarten sowie durch die Internationalisierung des Handels mit lebenden Fischen werden durch Parasiten verursachte Erkrankungen weltweit zu einem besonders ernstzunehmenden Problem (Ogawa 1996, Leong 1997, Naylor et al. 2000).

Vergleichbare parasitäre Krankheiten treten auch im Bereich der Seewasser- und Süßwasseraquaristik auf und verursachen hier ebenfalls erhebliche wirtschaftliche Schäden. In der Seewasseraquaristik beispielsweise werden für beliebte Fischarten sehr hohe Preise verlangt, da die bestehende Nachfrage fast nur durch Wildfänge gedeckt wird. Nachzuchten sind noch immer sehr schwierig und mit so großem technischen Aufwand verbunden, daß es sich aus Kostengründen kommerziell nicht lohnt. So kann z.B. ein gewöhnlicher Anemonenfisch aus Wildfängen ab ca. 15 € im Handel erstanden werden, während ein Exemplar aus einer Nachzucht ca. 35 € kostet.

Unter den marinen Fischparasiten innerhalb dieser künstlichen Systeme nimmt der holotriche Ciliat *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951 eine besondere Stellung ein, da er nicht wirtsspezifisch ist und somit fast jede teleostische Fischart befallen kann (Nigrelli und Ruggieri 1966, Wilkie und Gordin 1969, Colorni 1985). Fischimporte fördern seine weltweite Verbreitung (Nigrelli und Ruggieri 1966, Dickerson und Dawe 1995). Ein Verbreitungsschwerpunkt des Parasiten liegt besonders in der Aquarienhaltung und der tropischen Aquakultur, da er bei milden Wassertemperaturen und dichtem Fischbesatz geradezu ideale Lebens- und Propagationsbedingungen vorfindet (Sikama 1938, Brown 1951, Nigrelli und Ruggieri 1966, Huff und Burns 1981, Colorni 1985, Bunkley-Williams und Williams 1994).

Im Jahre 1884 wurde durch Kerbert eine unbekannte Weißpünktchenkrankheit (engl. White Spot Disease) auf verschiedenen Seefischarten entdeckt, die durch "in den Markshöhlen der Placoidschuppen schmarotzenden Infusorien" verursacht wurde. Lange berichtete niemand mehr über diese marine Weißpünktchenkrankheit, deren Pendant im Süßwasserbereich durch den ebenfalls holotrichen Ciliaten *Ichthyophthirius multifiliis* verursacht wird (Hausmann und Hülsmann 1996). (*I. multifiliis* wurde 1869 von Hilgendorf und Paulicki beschrieben und 1876 von Fouquet benannt.) 1938 führte Sikama ein gravierendes Fischsterben in den Seewasseraquarien der kaiserlichen Universität zu

Tokyo auf eine “Art von parasitischen Infusorien” zurück, die morphologisch dem *Ichthyophthirius multifiliis* glichen. 1961 erkannte er aber, daß der marine Parasit sich deutlich von *I. multifiliis* unterschied und schlug den Namen *Ichthyophthirius marinus* vor. Unabhängig davon hatte 1951 auch Brown einen Ciliaten beschrieben, der bei verschiedenen Seefischen ebenfalls eine Weißpünktchenkrankheit verursacht; sie bezeichnete ihn mit dem Namen *Cryptocaryon irritans* (Canella 1972). Browns spätere Untersuchungen ergaben ebenfalls deutliche Unterschiede zu *I. multifiliis*, z.B. im Entwicklungszyklus des Makronucleus (Brown 1951, 1963).

Systematisch wird der Parasit bislang wie folgt eingeordnet (nach Corliss 1979):

Unterreich	Protozoa	
Stamm	Ciliophora	Doflein, 1901
Klasse	Oligohymenophorea	de Puytorac et al., 1974
Ordnung	Hymenostomatida	Delage and Hèrouard, 1896
Familie	Ichthyophthiriidae	Kent, 1881
Gattung	<i>Cryptocaryon</i>	Brown, 1951
Art	<i>Cryptocaryon irritans</i>	Brown, 1951

Mehrere Studien haben allerdings Zweifel aufkommen lassen, ob *C. irritans* tatsächlich zur Ordnung der Hymenostomatida gehört, da z.B. die oralen akzessorischen Membranen fehlen, die bei *Ichthyophthirius multifiliis* vorhanden sind (u.a. Cheung et al. 1979, Colorni 1985, Lynn 1991, Colorni und Diamant 1993, Hausmann und Bradbury 1996, Diggles 1997).

Nach Analysen von RNA-Fragmenten postulierten Diggles und Adlard 1995 eine nähere Verwandtschaft des Parasiten zu den Colpodea als zu *I. multifiliis*, auch wenn *C. irritans* und *I. multifiliis* sich in ihren polymorphen Entwicklungszyklen mit enzystierten und freischwimmenden infektiösen Stadien gleichen (Mehlhorn et al. 1993, Dickerson und Dawe 1995, Wright und Colorni 2002). Diggles und Adlard bezogen allerdings nur drei von zehn Klassen der Ciliophora in ihre Untersuchungen ein. Wright und Colorni verglichen die RNA-Sequenzen des Parasiten jedoch mit denen aller bekannten Klassen der Ciliophora und entdeckten eine noch engere Verwandtschaft zu den Prostomatea. Dabei ist *Cryptocaryon irritans* genetisch so verschieden, daß eine eigene Familie gebildet werden kann (Wright und Colorni 2002). Deshalb fordern die Wissenschaftler folgende Einordnung:

Unterreich	Protozoa	
Stamm	Ciliophora	Doflein, 1901
Klasse	Prostomatea	Schewiakoff, 1896
Ordnung	Prorodontida	Corliss, 1974
Familie	Cryptocaryonidae	Fam. nov. Wright und Colorni, 2002
Gattung	<i>Cryptocaryon</i>	Brown, 1951
Art	<i>Cryptocaryon irritans</i>	Brown, 1951

Der Entwicklungszyklus des Parasiten umfaßt freie, am Boden enzystierte und fisch-assoziierte Stadien.

Als **Trophont** ernährt sich *C. irritans* in der Haut und im Kiemenepithel von ganzen Zellen und Zellbestandteilen, um den Wirt anschließend als reifer **Protomont** zu verlassen (Brown 1963, Nigrelli und Ruggieri 1966, Cheung et al. 1979, Colorni und Diamant 1993). Bei optimalen Bedingungen dauert diese Phase 3-7 Tage (Cheung et al. 1979, Burgess und Matthews 1994, Yoshinaga und Dickerson 1994).

Der Protomont beginnt nach der Anheftung an Substrat mit seiner Enzystierung, wird zum **Tomonten (=enzystiertes Teilungsstadium)**, und innerhalb von 24 h entstehen in seinem Inneren durch multiple Teilungen bis zu 200 Tochterzellen (**Tomiten**). Diese differenzieren sich zu infektiösen freischwimmenden **Theronten** (Schwärmern). Entwicklung und Freisetzung der Theronten verlaufen in asynchronen zeitlichen Abständen (Matthews et al. 1993, Colorni und Diamant 1993). Die infektiösen Schwärmer heften sich an einen geeigneten Wirtsfisch an, dringen als sog. **Phoronten** in Cornea, Kiemen und Haut ein und beginnen dort zu wachsen.

Während des Entwicklungszyklus verändert der Parasit seine Größe und Gestalt. Der Trophont ist anfangs ovoid und nimmt mit der weiteren Entwicklung kugelige Formen bei Durchmessern von 70-450 µm an (Brown 1951, Sikama 1961, Cheung et al. 1979, Colorni 1985, Colorni und Diamant 1993, Matthews et al. 1993). Er hat eine einheitliche Cilienbedeckung. Dabei sind die einzelnen Cilien in Reihen angeordnet, bis zu 9 µm lang und ziehen zu einer oralen Grube hin (Brown 1951).

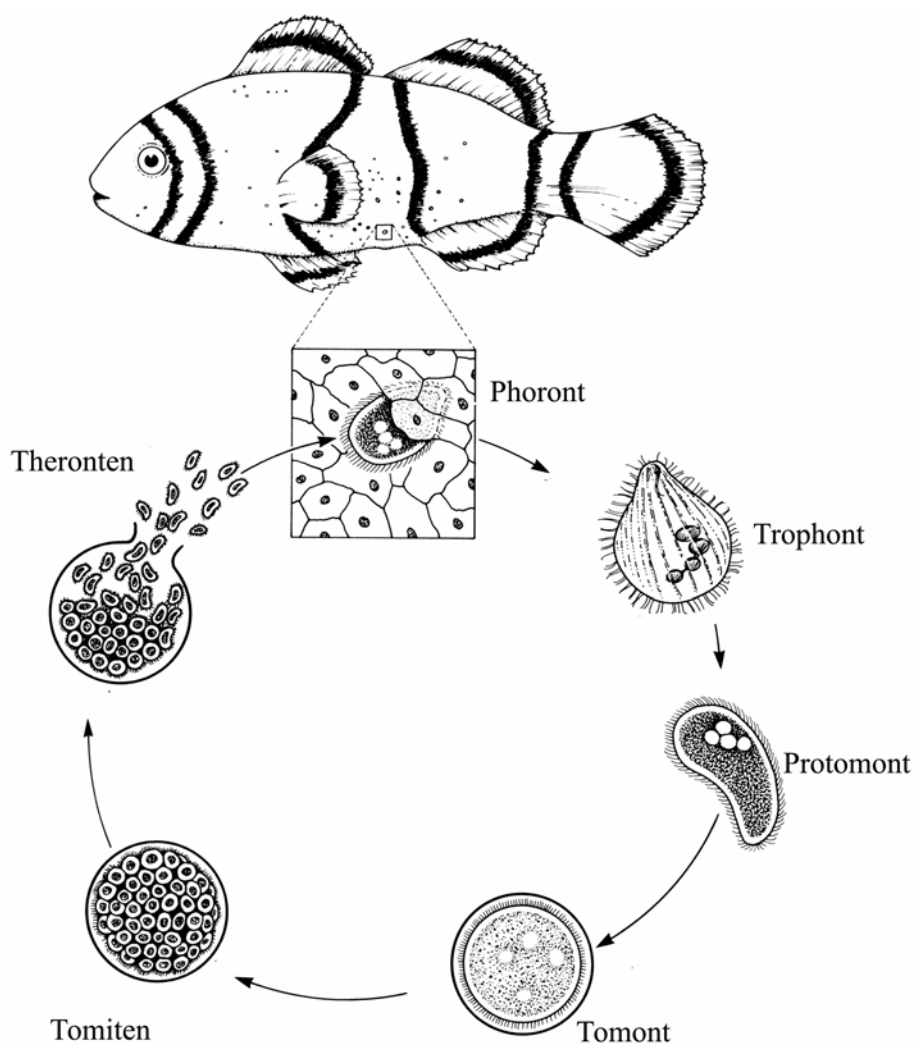


Abb. 1 **Entwicklungszyklus von *Cryptocaryon irritans***
(modifiziert nach Cheung 1993, Keskinetepe und Farmer 1994)

Der infektiöse Theront ist birnenförmig und mißt 25-60 µm in der Länge. Die Anordnung der Cilien ähnelt der des Trophonten und setzt sich aus ca. 40 Reihen mit 8-9 µm langen Cilien zusammen. Die vom Parasiten gebildeten Zysten liegen in ihrer Größe im Bereich von 94 x 170 µm bis 225 x 441 µm (Nigrelli und Ruggieri 1966). Die Zystenwand hat eine Dicke von 0,5-1 µm und besteht aus mehreren Lagen (Matthews et al. 1993).

Cryptocaryon irritans besitzt zwei Nucleustypen, den lappenförmigen Makronucleus und einige kleinere Mikronuclei (Dickerson und Dawe 1995).

Das Mundfeld mit der protrusilen Membran und der kleineren darunterliegenden Membran setzt sich aus einer breiten Vertiefung, dem Cytostom, und der schmalen Region des Cytopharynx zusammen (Brown 1951, Burgess 1992, Colorni und Diamant 1993, Dickerson und Dawe 1995).

Im Unterschied zu *Ichthyophthirius multifiliis* fehlen dem Parasiten die Lieberkühnschen Organellen sowie die kontraktile Vakuolen (Brown 1951, 1963, Nigrelli und Ruggieri 1966, Keskinetepe et al. 1994).

Die Cryptocaryoniasis zeigt sich an den Wirtstieren durch kleine weiße Punkte auf der Körperoberfläche in Verbindung mit einer starken Schleimabsonderung (Sindermann 1977, 1989, Mehlhorn et al. 1992, Dickerson und Dawe 1995). In Anbetracht der Schwere der Krankheitssymptome ist eine Therapie erforderlich.

Zur Kontrolle und Behandlung der Cryptocaryoniasis sind bislang verschiedene Methoden beschrieben worden, von denen Therapien mit chemischen Substanzen und Veränderungen der Salinität am gängigsten waren (Burgess 1992, Dickerson und Dawe 1995). Werden die chemischen Substanzen in Konzentrationen appliziert, die für den Fisch gar nicht oder nur gering toxisch sind, beschränkt sich ihre Wirksamkeit auf die freilebenden Stadien von *C. irritans* (Andrews et al. 1988). Zysten und parasitische Stadien sind resistent (Herwig 1978).

Acriflavin, Malachitgrün und Methylenblau – ursprünglich als Chemikalien zum Beizen und Färben entwickelt – wurden entweder allein oder in Kombination mit anderen Substanzen (z.B. Formalin) als Badetherapie eingesetzt (Herwig 1978), wobei starke Nebenwirkungen auf den Wirtsfisch in Kauf genommen wurden (Herwig 1978, Schäperclaus 1990).

Bis heute gibt es allerdings keine ausreichend wirksame chemische Substanz zur Bekämpfung der (parasitären) Erkrankungen mariner Fische. Die herkömmlichen Medikamente schädigen das ökologische Gleichgewicht durch Abtöten der niederen Tiere. In der Seewasseraquaristik bedeutet dies dann meist den Verlust des gesamten Bestands im Becken.

Eine **Badetherapie** (Einmalapplikation) hat den Vorteil, daß auch bei Nahrungsverweigerung manche Medikamente ihren spezifischen Wirkort erreichen können, da sie sowohl perbranchial als auch perkutan aufgenommen werden. Außerdem werden neben der Medikation von erkrankten Fischen auch gleichzeitig die freilebenden Stadien der meisten Parasiten abgetötet. Diese Form der Behandlung eignet sich überwiegend für Ektoparasiten.

Eine genaue Dosierung der Substanzen ist jedoch oft nicht möglich, da das exakte Volumen in den Fischzuchtanlagen meist nicht bestimmbar ist. Um eine Unterdosierung des Medikamentes zu vermeiden, müssen höhere Konzentrationen eingesetzt werden, die sich wiederum schädlich auf die Fische auswirken können. Bei Anwendung zu geringer Konzentrationen besteht – neben dem therapeutischen Effekt - die Gefahr einer schnellen Resistenzbildung. Allerdings ist dabei zu bedenken, daß sich höhere Einsatzmengen belastend auf die Umwelt auswirken können, eventuell das Gleichgewicht in den Anlagen stören und zudem sehr kostspielig sind. Werden die infizierten Fische in separate Behälter gesetzt, so entsteht durch das Fangen unvermeidlich Streß für die ohnehin schon geschwächten Individuen (Schäperclaus 1990, Treves-Brown 2000).

Bei der **Verabreichung von Medizinalfutter** ist der Substanzbedarf geringer als bei der Badetherapie. Sie hat sich bei der Behandlung von Fischkrankheiten in zahlreichen Fällen bewährt, weil die Anwendung nur selten zu Dosierungsfehlern führt. Bei einem heterogenen Fischbesatz kommt es aber durch eine zu hohe Einmalapplikation bei sensibleren Fischarten schnell zu Intoxikationserscheinungen. Zu geringe Konzentrationen führen zu nur unzureichenden Ergebnissen. Der Nachteil von Medizinalfutter liegt allerdings darin, daß der Fisch Trockenfutter aufnehmen muß. Gerade in der Seewasseraquaristik aber gibt es viele Arten, die nur Lebendfutter fressen. Außerdem neigen erkrankte Fische generell schnell dazu, die Nahrungsaufnahme zu verweigern. Freie parasitäre Stadien können zudem bei Einsatz von Medizinalfutter nicht abgetötet werden.

Die peritoneale Injektion von Medikamenten, bei denen die Fische einzeln aus dem Wasser genommen werden und kurzzeitig narkotisiert werden müssen, ist sehr zeitaufwendig. Diese Behandlungsform eignet sich somit nur für sehr wertvolle Fische und zudem nur für die Behandlung weniger Individuen (Treves-Brown 2000).

Neben diesen klassischen Therapieformen gewinnt die **aktive Immunisierung** eine immer größere Bedeutung in der Bekämpfung von Fischkrankheiten.

Bislang gibt es nur wenige Arbeitsgruppen, die sich mit den Immunantworten von Fischen auf *Cryptocaryon irritans*-Befall beschäftigt haben (Nigrelli und Ruggieri 1966, Colorni 1985, 1987, Burgess 1992, Yoshinaga und Nakatoo 1997).

Anders ist es beim Süßwasserciliaten *Ichthyophthirius multifiliis*. Schon Anfang des 20. Jahrhunderts wurde über eine erworbene Immunität der überlebenden Wirtsfische berichtet (Buschkiel 1910). Seitdem sind zahlreiche Publikationen erschienen, die zeigen, daß von einer Ichthyophthiriose genesene Fische über einen gewissen Zeitraum hin gegen eine erneute Infektion immun sind (u.a. Clark et al. 1987, Dickerson et al. 1993, Dickerson und Dawe 1995, Woo 1997).

Erste Immunisierungen der potentiellen Wirtsfische gegen *Ichthyophthirius multifiliis* wurden schon frühzeitig durch kontrollierte Infektionen erprobt (Parker 1965, Areerat 1974, Clark et al. 1988). Clark und seine Arbeitsgruppe führten 1988 den Nachweis, daß immobilisierende Antikörper, die gegen die Antigene auf der Parasitenoberfläche produziert wurden, bei der erworbenen Immunantwort eine Rolle spielen. Sie stellten fest, daß die Sera von Karpfen und Katzenwelsen die Theronten unbeweglich machen und zudem agglutinieren konnten.

1997 konnte Nagatoo belegen, daß Sera von Fischen, die gegen *C. irritans* immunisiert worden waren, dessen Theronten immobilisierten. Der Mechanismus der Immunisierung gegen *C. irritans* scheint ähnlich wie bei *I. multifiliis* zu verlaufen (Bryant et al. 1999).

Nach Treves-Brown (2000) treten jedoch bei der Entwicklung von Impfstoffen für Fische folgende Schwierigkeiten auf:

- Das Immunsystem der Fische reicht niemals vollständig aus, Infektionen allein zu unterdrücken. Die Wirksamkeit der Impfstoffe muß daher stets kontrolliert werden.
- Es gibt bei Fischen keine konsequent reproduzierbaren natürlichen Infektionen.
- Künstliche Infektionen können reproduziert werden, aber sind kein Maß für den Schutz gegen eine natürliche Infektion.

Bei der Bekämpfung parasitärer Infektionen von Fischen haben die konventionellen Methoden somit nichts an Aktualität verloren.

Bithionolsulfoxid ist eine halogensubstituierte diphenolische Verbindung. Sie wurde hauptsächlich in der Veterinärmedizin als Mittel gegen Cestoden und Trematoden verwendet (Löscher 1999). In besonderen Fällen wurde die Substanz auch zur Therapie der

menschlichen Paragonimiasis eingesetzt (Seneca 1971, Benjapong et al. 1984). Als Fasziofizid ist sie aufgrund ihrer fehlenden therapeutischen Breite und ihrer begrenzten Wirksamkeit allerdings überholt (Löscher 1999).

Mit zunehmender Resistenzbildung von Krankheitserregern bei Fischen gegen gängige Medikamente haben sich einige Arbeitsgruppen in den letzten Jahren mit der Wirksamkeit von Bithionol(derivaten) befaßt (Griffin 1989, Kim und Choi 1998, Madsen et al. 2000, Iglesias et al. 2002). Daher sollen in der vorliegenden Arbeit neben der ultrastrukturellen und histochemischen Charakterisierung der verschiedenen Entwicklungsstadien von *Cryptocaryon irritans* die Effekte von Bithionolsulfoxid (bis [3,5-dichloro-2-hydroxyphenyl]-sulfoxid) auf den Parasiten geklärt werden. Ziele der Arbeit sind daher im Besonderen:

- die ultrastrukturelle Charakterisierung der infektiösen Stadien, während und nach der Penetration in die Fischhaut,
- transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der Entwicklung der hautständigen Parasiten von Beginn der Nahrungsaufnahme bis zur Phase des Größenwachstums,
- die besondere Charakterisierung der Parasitenoberfläche und der Nahrungsvakuolen mit verschiedenen histochemischen Verfahren, unter anderem durch gezielten Einsatz von Lektinen,
- die Überprüfung des Parasiten auf das Vorhandensein von Glykogen, Polysacchariden und saurer Phosphatase,
- die Untersuchung der Wirkung von Bithionolsulfoxid auf die hautständigen Stadien im medizinischen Bad.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft der Parasiten und ihrer Wirte

Der für die Versuchsreihen benötigte holotriche Ciliat *Cryptocaryon irritans* wurde mit verschiedenen natürlich infizierten Palettendoktorfischen (*Paracanthurus hepatus*), Saphir-Riffbarschen (*Chrysiptera cyanea*), Preußenfischen (*Dascyllus trifasciatus*) und Pinzettfischen (*Chelmon rostratus*) aus verschiedenen Zoohandlungen im Rhein/Ruhrgebiet bezogen. Die standardisierte Hälterung und Kultivierung der zyklischen Stadien von *C. irritans* erfolgte mit Weißbinden-Glühkohlenfischen (*Amphiprion frenatus*), die ausschließlich im Zierfischgroßhandel (Fa. Dittmann, Wuppertal) gekauft worden waren. Insgesamt wurden 177 Fische eingesetzt.

2.2 Der Wirt

Systematik (nach Nelson 1994)

Unterreich	Metazoa
Stamm	Chordata
Klasse	Actinopterygii
Ordnung	Perciformes
Familie	Pomacentridae
Unterfamilie	Amphiprioninae
Gattung	<i>Amphiprion</i> Bloch & Schneider, 1801
Art	<i>Amphiprion frenatus</i> Brevoort, 1856

Die Ordnung der Perciformes (Barsche) ist die vielfältigste und größte aller Vertebratenordnungen. Sie dominieren mengenmäßig im Süß- und Seewasser. Diese Ordnung setzt sich aus 18 Unterordnungen, 148 Familien mit bisher 1496 Gattungen und 9293 Arten zusammen, von denen etwa 21 % im Süßwasser leben. Alle anderen Arten verbringen zumindest einen Teil ihres Lebens im Seewasser. Die acht größten Familien

(Gobiidae, Cichlidae, Labridae, Serranidae, Blenniidae, Sciaenidae, Apogonidae und Pomacentridae) stellen rund 57 % der Arten (Nelson 1994).

Anemonenfische leben im tropischen Indopazifik und Roten Meer an Korallenriffen in enger Symbiose mit großen Anemonen. Wahrscheinlich haben diese kleinen Riffbarsche einen Faktor in der Haut, der das Entlassen von Nesselfäden verhindert, so daß sie unbeschadet in sehr enger Bindung mit den Aktinien stehen können (Nelson 1994). In der Seewasseraquaristik gehören sie zu den beliebtesten Pfleglingen (Mayland 1989). Amphiprien bilden feste Paare, die ihr Revier verteidigen und sich nie sehr weit von "ihrer" Anemone entfernen. Der Laich wird in direkter Nähe zur Anemone auf Steinen abgelegt und bewacht. Die planktischen Larvenstadien werden aber nicht betreut (Sterba 1978). *Amphiprion frenatus* kann eine Gesamtlänge von bis zu 14 cm erreichen. Charakteristisch ist bei den Adulten der einzelne weiße Streifen in der Kopfregion, der mit einer besonderen schwarzen Umrandung abgesetzt ist. Seine Wirtsanemone ist hauptsächlich *Entacmaea quadricolor*. Die Verbreitung des "Tomaten-Clownfisches" (*Amphiprion frenatus*) liegt im Westpazifik, Südchinesischen Meer und in benachbarten Gebieten (Fautin und Allen 1992).

2.3 Hälterungsbedingungen

2.3.1 Hälterungsbedingungen der nicht-infizierten Tiere

Zur Hälterung der Amphiprien wurden vier 200 l Glasaquarien mit Bodendekoration eingesetzt, die mit synthetischem Seewasser befüllt waren. Durch Unterbringung der Becken in einer Klimakammer wurde eine konstante Wassertemperatur von $24\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ erreicht. Zur Säuberung des Wassers dienten mit Aktivkohle und poröser Keramik bestückte Intervallinnenfilter (Eheim Aquaplust 2448). Die Illumination erfolgte im Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 h : 12 h. Zur zusätzlichen Entfernung von organischen Substanzen aus dem Wasser wurden Eiweißabschäumer (Minifloter 200) installiert. Im vierzehntägigen Abstand wurde ungefähr ein Drittel der Wassermenge gegen aufbereitetes Aquarienseewasser ausgetauscht. Als Standardfuttermittel dienten gefrorene Salinenkrebse *Artemia salina* (Fa. Redeo Frost) sowie Flockenfutter (Tetra Marin, Fa. Tetra).

2.3.2 Hälterungsbedingungen während der Versuche

Die Hälterung der artifiziell infizierten Amphiprien erfolgte während der Versuche in 25 l Plastikbecken.

Dazu wurden mehrere Becken mit Bodensubstrat eingerichtet. Die Filterung des Wassers wurde über Eheiminnenfilter vorgenommen, die Luftzufuhr über Strömungssteine. Die Versuchsbecken waren in einer Klimakammer mit gleichbleibender Temperatur von 24 ± 1 °C untergebracht (Illumination im Rhythmus L:D = 12 h : 12 h). Täglich wurde ein Viertel des Aquarienwassers ausgetauscht.

Zur Hälterung der Versuchstiere während der medizinischen Bäder dienten 15 l Becken (ohne Bodensubstrat unter Luftzufuhr über Strömungssteine bei konstanter Temperatur von 24 °C).

2.4 Infektionsmodus

Die experimentelle Infektion von nicht-infizierten Amphiprien erfolgte durch ihre Vergesellschaftung mit stark befallenen Schleppfischen.

Die Becken waren analog Punkt 2.3.2 ausgestattet. In dreitägigen Intervallen wurde ein Viertel des Aquarienwassers ausgewechselt. Pro Becken wurden dabei je fünf Versuchsfische mit je zwei stark infizierten Schleppfischen vergesellschaftet. Die Infektionsstärke wurde bei entnommenen und betäubten Fischen mit Hilfe eines Binokulars täglich kontrolliert. Nach 9-14 Tagen waren die Trophonten herangereift und einzelne Individuen verließen ihre Wirte, um nach ihrer Festsetzung auf Substrat die vegetative Propagation zu beginnen.

2.5 Wasserqualität

Zur Herstellung des artifiziellen Seewassers wurde synthetisches Meersalz (Tropic Marin) verwendet, das in entioniertes Wasser eingerührt wurde (ca. 4 kg Salz / 120 l). Mit Hilfe eines Aräometers wurde die gewünschte Dichte des Salzwassers eingestellt.

Das Aquarienwasser der verschiedenen Aquarien in Stammhaltung und Versuch wurde regelmäßig auf die in Tabelle 2.1 aufgelisteten Parameter hin untersucht.

Tabelle 2.1 Testverfahren zur Wasserqualität

Parameter	Testsystem	Hersteller	Wert
Dichte	Aräometer	Tomo Tokyo Momoki	1,0023-1,0027
pH-Wert	Indikator-System	Tetra-Werke	8,0
O ₂ -Gehalt	Indikator-System	Tetra-Werke	7 mg/l
Ammonium NH ₄ /NH ₃	Indikator-System	Tetra-Werke	0,03 mg/l
Nitrit NO ₂	Indikator-System	Tetra-Werke	0,05 mg/l
Nitrat NO ₃	Indikator-System	Tetra-Werke	40 mg/l

2.6 Gewinnung der Proben

2.6.1 Trophonten

Nach erfolgter Infektion wurden die einzelnen Versuchsfische mit MS 222 narkotisiert und anschließend durch Dekapitation getötet. Unmittelbar danach wurden die mit *Cryptocaryon irritans* befallenen Flossen und Epidermisschichten abpräpariert und mit einer Lösung von 0,1 M Na-Cacodylatpuffer in sterilem Seewasser überschichtet. Unter dem Binokular wurden die einzelnen Trophonten inklusive der sie umgebenden Schichten vorsichtig von den größeren Gewebestücken gelöst und in einer 5%igen Glutaraldehydlösung mit (0,1 M Na-Cacodylatpuffer) über Nacht bei 4°C fixiert.

2.6.2 Protomonten

Zur Präparation der Protomonten wurden die infizierten Fische nach der Dekapitation in sterilem Seewasser aufbewahrt und unter dem Binokular beobachtet. Nach ca. fünf Minuten begannen die ehemals hautständigen Trophonten sich als Protomonten vom Wirtsgewebe zu lösen und frei umherzuschwimmen. Diese wurden dann mit einer Pasteurpipette aufgesammelt und analog den Trophonten für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen behandelt.

2.6.3 Zysten (Tomonten) und Theronten

Zur Gewinnung der Zysten und Theronten von *Cryptocaryon irritans* wurden entweder je 100 Zysten vom Substrat abgesammelt oder es wurden gerade verstorbene, stark infizierte Fische in Seewasser aufbewahrt, bis ein Großteil der Parasiten als Protomonten vorlag. Diese hefteten sich nach geraumer Zeit an den Boden der Schale und wandelten sich zu Zysten um. Bei beiden Methoden wurden die Parasiten in Petrischalen mit sterilem Seewasser in einer feuchten Kammer bei 25 °C inkubiert. Der Wasserwechsel erfolgte mehrmals täglich. Die Theronten schöpften zu den unterschiedlichsten Zeiten aus den Zysten und wurden unter dem Binokular mit einer Pasteurpipette gesammelt. Zur Untersuchung des Penetrationsprozesses von *Cryptocaryon irritans* wurden Proben von Fischepidermis mit Theronten inkubiert und an definierten Zeitpunkten nach dem Eindringen für die LM- und TEM-Verfahren fixiert. Dabei erfolgte die Kontrolle der Penetration mit Hilfe eines Binokulars. Zysten und Theronten wurden analog den anderen Proben fixiert.

Um rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen eines ganzen Fisches zu erhalten, wurden trüchtige salzwassertolerante Mollys (*Poecilia latipinna*) innerhalb von 14 Tagen an Seewasser adaptiert und mit infizierten Amphiprien vergesellschaftet. Die Infektion wurde mehrmals täglich kontrolliert und infizierte geeignete Jungfische für die Rasterelektronenmikroskopie entsprechend aufbereitet.

2.7 Verträglichkeitsversuche

Zur Überprüfung der Verträglichkeit des Medikamentes wurden unbehandelte Amphiprien mit verschiedenen Konzentrationen des Bithionolsulfoxid [25 mg/l, 50 mg/l und 75 mg/l] für die Dauer von 72 Stunden inkubiert. Die Hälterung der Tiere erfolgte separat in 15 l Becken.

2.8 Therapeutika

Für die transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Untersuchungen zum Einfluß von Bithionolsulfoxid auf die hautständigen Stadien von *Cryptocaryon irritans* wurde die halogen-substituierte diphenolische Verbindung im medizinischen Bad angewendet. Die Verabreichung des Medikamentes erfolgte in drei verschiedenen Konzentrationsstufen [10 mg/l, 25 mg/l und 50 mg/l] mit Inkubationszeiten von 24 h und 48 h. Anschließend wurden die Proben nach den Standardmethoden fixiert und eingebettet.

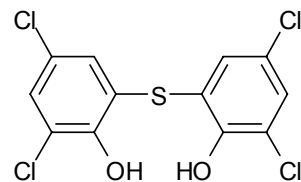


Abb. 2 Bithionolsulfoxid

2.9 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie wurden in der vorliegenden Untersuchung der ultrastrukturelle Feinbau der freien und parasitischen Stadien von *Cryptocaryon irritans* untersucht sowie die Auswirkungen einer Badetherapie auf die Ultrastruktur des Parasiten festgehalten.

2.9.1 Fixierung und Einbettung – Standardmethode

Sämtliche Standardeinbettungen erfolgten mit Araldit, da dieses Epoxidharz nur geringe Schrumpfungen bewirkt und thermisch stabilere Schnitte bietet (Romeis 1989). Die Proben wurden nach folgendem Schema behandelt :

- | | |
|--------------|--|
| 1. Fixierung | 5% Glutaraldehyd in 0,1M Na-Cacodylatpuffer in sterilem Seewasser über Nacht bei 4°C, pH 7,3 |
| 2. Waschen | 4 x je 15 min mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer bei Raumtemperatur (RT) |
| 3. Osmierung | 2% OsO ₄ in Na-Cacodylatpuffer für 2 h bei RT |

4. Waschen 4 x je 15 min mit Na-Cacodylatpuffer bei RT

5. Entwässerung aufsteigende Acetonreihe:

25 % Aceton	5 min	4°C
30 % Aceton	5 min	4°C
40 % Aceton	5 min	4°C
50 % Aceton	5 min	4°C
70 % Aceton	5 min	4°C
80 % Aceton	10 min	4°C
90 % Aceton	10 min	4°C
96 % Aceton	15 min	4°C
100 % Aceton	15 min	4°C
100 % Aceton	10 min	4°C

6. Ansetzen der Araldit-Stammlösung:

Araldit CY 212 1 Teil	Araldit Härter HY 964 1 Teil	Beschleuniger DY 964 2%
--------------------------	---------------------------------	----------------------------

7. Schrittweise Einbettung der Proben in Araldit bei RT

Stammlösung	Aceton	Dauer
1 Teil	3 Teile	30 min
1 Teil	1 Teil	60 min
3 Teile	1 Teil	Über Nacht

8. Endeinbettung

Die Stammlösung wurde frisch angesetzt, sehr gut verrührt und schlieren- sowie luftbläschenfrei auf die Proben gegeben, damit eine vollständige Polymerisation erfolgen konnte. Zur Verdampfung des restlichen Acetons wurden die Proben zwei Stunden im offenen Gefäß unter den Abzug gestellt.

Die Endeinbettung erfolgte in speziellen Silikonformen. Die derart eingebetteten Proben wurden über Nacht bei 45°C, dann drei weitere Tage bei 70°C polymerisiert.

2.9.2 Semidünnschnitte und Ultramikrotomie

Zur Anfertigung von Semidünnschnitten wurden die Probenblöckchen auf eine trapezförmige Oberfläche von ca. 1 x 1 mm² getrimmt, was zu einer nötigen Standfestigkeit des Objektes führte. Geschnitten wurde an einem Ultramikrotom Ultracut E der Fa. Reichert Jung. Zur Herstellung der Semidünnschnitte wurden Glasmesser aus poliertem Fensterglas mit einem Messerbrecher (LBK Knifemaker 7800 B) angefertigt. Damit wurden die Proben bei einer Schnittdicke von 0,3 - 0,5 µm geschnitten. Die Schnitte wurden in einem destillierten Wassertropfen auf gelatinisierte Objektträger gebracht, anschließend trockneten sie bei ~ 70 °C auf einer Heizplatte. Zur Färbung der Semidünnschnitte wurde polychromes Methylenblau (Fa. Chroma) verwendet. Eine optimale Färbung war erreicht, wenn sich ein goldgelber Rand um den Farbtropfen gebildet hatte. Überschüssiges Methylenblau wurde mit reichlich Aqua dest. abgespült. Anschließend wurde das luftgetrocknete Präparat mit Entellan eingedeckelt.

Die fotografische Dokumentation erfolgte an einem Olympus BX 40 Mikroskop auf Farbdiafilmen (Agfachrome RSX).

Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser (Diatome Ultra) mit einer Dicke von 30 – 60 nm erstellt. Anhand von Interferenzfarben ließ sich die Dicke der Schnitte abschätzen (Grau: < 60 nm, Silber: 60-90 nm, Gold: 90-150 nm, Purpur: 150-190 nm, Blau: 190-240 nm). Die Schnitte wurden mit Chloroform gestreckt und auf Formvar-befilmte Kupfergrids (Square 75 Mesh und Square 100 Mesh) aufgefangen.

2.9.3 Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Die Schnitte wurden zuerst mit Uranylacetat kontrastiert, um den Gesamtkontrast der Zellkomponenten zu erhöhen und den Kontrast proteinreicher Strukturen und Nucleinsäuren zu verbessern. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Bleicitrat nach Reynolds, das den Kontrast von Glykogen, Nukleotiden, SH-Gruppen einiger Proteine und mit OsO₄ reagierenden Verbindungen verstärkt. Um Ausfällungen von Bleicarbonat zu vermeiden, erfolgte letztere Kontrastierung in Gegenwart von Natriumhydroxid.

Die Grids wurden nach folgendem Schema behandelt:

- | | | |
|----|------------------|-----------------------------|
| 1. | 50 % Ethanol | Spülen der Grids |
| 2. | 5 % Uranylacetat | 15 min unter Lichtausschluß |
| 3. | 50 % Ethanol | Spülen der Grids |
| 4. | Aqua bidest | Spülen der Grids |
| 5. | 0,02 N NaOH | Spülen der Grids |
| 6. | 5 % Bleicitrat | 20 min unter Lichtausschluß |
| 7. | 0,02 N NaOH | Spülen der Grids |
| 8. | Aqua bidest | Spülen der Grids |

Im Anschluß wurden die kontrastierten Grids vollständig an der Luft getrocknet und in einer Gridbox (EM Specimen) vor Staub geschützt aufbewahrt. Die Durchmusterung und anschließende Dokumentation der Ergebnisse erfolgte an einem Transmissions-elektronenmikroskop von Zeiss, Typ 9 S-2 in einem Bereich von 50 kV sowie an einem Zeiss 902 im Bereich von 80 kV. Die Dokumentation der Bilder erfolgte auf 7 cm x 7 cm Negativen (Agfa Scientia) bzw. 8,3 cm x 10,2 cm Negativen (Kodak electron image).

2.10 Fixierung und Einbettung – histochemische Untersuchungen

2.10.1 Thiocarbohydrazid-Methode nach Thiéry, 1967

Diese histochemische Nachweisreaktion dient der Darstellung von Polysacchariden und Glykogen am Ultradünnschnitt.

Durch das Überführen der Proben in Perjodsäure werden die Polysaccharide oxidiert. So entstehen freie Aldehydgruppen, an die das Thiocarbohydrazid binden kann. Die anschließende Applikation von Silberproteinat führt zur Bindung des Silbers an das TCH, so daß dieser Komplex im Elektronenmikroskop nachweisbar ist.

Für diesen Nachweis wurden die nach dem Standardverfahren eingebetteten Proben im Bereich von 60 nm ultradünn geschnitten. Um eventuelle Ausfällungsreaktionen zu

verhindern, wurden die Schnitte auf mit Formvar befilmte Goldnetzchen (Mesh 150) gebracht und mit Hilfe von Kunststoffpinzetten in die verschiedenen Lösungen überführt. Das Thiocarbohydrazid wurde von der Fa. Sigma bezogen.

- | | | |
|---|---|-----------|
| 1. Überführen der Schnitte in 1 % Perjodsäure | | 30 min |
| 2. Waschen mit Aqua bidest | 3 x | je 10 min |
| 3. Überführen der Schnitte in 0,2 % TCH in 20% Essigsäure | | |
| | Inkubation in feuchter, dunkler Kammer für 24 h | |
| 4. Spülen der Schnitte | | |
| 10 % Essigsäure | | 20 min |
| 5 % Essigsäure | | 20 min |
| 2 % Essigsäure | | 20 min |
| 5. Überführen der Schnitte in 1 % Silberproteinat | | 1,5 h |
| 6. Waschen mit Aqua bidest | 3 x | je 20 min |

Als Kontrolle dienten Netzchen, die nicht mit Perjodsäure und Silberproteinat behandelt worden waren.

2.10.2 Alcianblau

Mit Alcianblau lassen sich saure Mucopolysaccharide nachweisen und der Kontrast der Zellschicht und interzellularen Substanzen erhöhen. Der kationische Farbstoff, der ein zentrales Kupferatom enthält, interagiert primär – ähnlich wie Rutheniumrot – durch Salzbrückenbildungen mit Polycarboxyl- und Sulfatgruppen.

Zur Markierung der Proben wurde 1 % Alcianblau 8 GX (Fa. Sigma) während der Primärfixierung in 5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 90 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Präparate, wie unter 2.9.1 beschrieben, in Araldit eingebettet und für die TEM-Untersuchungen aufbereitet.

2.10.3 Rutheniumrot

Rutheniumrot ist ein niedermolekulares anorganisches Polykation, das elektrostatisch an Polyanionen, wie z.B. Pektin, Hyaluronsäure bindet. In der Elektronenmikroskopie wird Rutheniumrot (Fa. Fluka) in ähnlichen Bereichen wie Alcianblau eingesetzt. Die Markierung beruht auf einer Komplexbildung mit OsO₄. Die zu untersuchenden Präparate wurden wie folgt aufbereitet:

1. Standardfixierung der Proben.
2. Herstellung einer Rutheniumrot-Stammlösung (nach Plattner und Zingsheim 1987, siehe Punkt 2.12).
3. Inkubation der Proben in Rutheniumrot-Stammlösung/OsO₄ 2:1 für 2 h.
4. Standardeinbettung analog Punkt 2.9.1.

2.10.4 Tannin

Die Behandlung mit Tannin führt zu einem erhöhten Kontrast und einer feineren Auflösung von fibrillären Strukturen sowie von Zellmembranen. Der Gerbstoff bildet mit Blei und osmierten Strukturen elektronendichte Komplexe. Allerdings durchdringen nur die niedermolekularen Tanninverbindungen die Zellwände ausreichend.

Zur Markierung mit Tannin wurde nach der Methode von Plattner und Zingsheim (1987) eine 8% ige Tannin-Stammlösung (Fa. Sigma) angesetzt und 1:1 mit 5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer gemischt. Die Inkubation der Proben erfolgte über Nacht. Anschließend wurden die Präparate, wie unter 2.9.1 beschrieben, für die TEM-Untersuchungen aufbereitet.

2.10.5 Lektin-Gold-Markierungen, Post-Embedding Methode

Lektine sind zuckerbindende Proteine mit der Eigenschaft, Zellen zu agglutinieren und/oder Glykokonjugate [= Moleküle mit einem Kohlenhydratanteil (Polysaccharide, Glykoprotein, Glykolipide u.a.)] zu präzipitieren.

Zum spezifischen Nachweis von Zuckern wurde die Post-Embedding Methode - Markierung mit goldgekoppelten Lektinen am Ultradünnschnitt - angewendet.

Zur Erhaltung von fixans-sensitiven Enzymen und Epitopen bedarf es bei der Lektin-Gold-Markierung einer schnellen und spezifischen Probenpräparation. Als Einbettungsmedium eignen sich für die Immunelektronenmikroskopie besonders hochvisköse Acrylharze. Diese dringen schnell in die Gewebe ein und haben eine geringere Hydrophobie als Epoxidharze.

Dabei hat sich das Acrylharz LR-Gold bewährt. LR Gold beinhaltet die Komponente Bisphenol A, die zur zusätzlichen Stabilität des Präparates im Elektronenstrahl führt (Newman und Hobot 1993).

Einbettung in LR Gold:

1. Fixierung	4 % Paraformaldehyd in 0,05 % Glutaraldehyd und 1mM CaCl ₂ pH 7,4 in 0,1 M PBS nach Sørensen, 2 h		
2. Waschen	5 - 6 x in 0,1 M Sørensenpuffer		je 5 min
3. Stoppreaktion	50 mM NH ₄ Cl in 0,1 M Sørensenpuffer		30 min
4. Waschen	5 – 6 x in 0,1 M Sørensenpuffer		je 5 min
5. Entwässerung	aufsteigende Alkoholreihe		
	30 % Ethanol	0°C	15 min
	50 % Ethanol	0°C	15 min
	70 % Ethanol	0°C	30 min
	80 % Ethanol	-20°C	30 min

	96 % Ethanol	-20°C		30 min
3 x	100 % Ethanol	-20°C	je	15 min

6. Schrittweise Einbettung der Proben bei -20°C:

(1:3) LR Gold + 0,5 % Beschleuniger in Ethanol	30 min
(1:1) LR Gold + 0,5 % Beschleuniger in Ethanol	30 min
(3:1) LR Gold + 0,5 % Beschleuniger in Ethanol	45 min
2 x LR Gold + 0,5 % Beschleuniger	je 60 min
LR Gold + 0,5 % Beschleuniger	über Nacht
Frisch angesetztes LR Gold* + 0,5 % Beschleuniger	60 min

* ca. 2 h vor Gebrauch angesetzt, - 20 °C

7. Die Endeinbettung erfolgte in speziellen getrockneten Gelatinekapseln (0,5 cm³) ohne Lufteinschluß.

8. Polymerisation bei -20°C mit UV-Licht;

Die gefüllten Gelatinekapseln wurden auf einem angeschrägten Metallhalter in einen Spezialbehälter bei -20°C gebracht, in dem nach einer Stunde das zur Polymerisation des Harzes notwendige UV-Licht eingeschaltet wurde. Nach weiteren zwei Tagen waren die Proben auspolymerisiert.

Die Ultradünnschnitte zur Lektin-Gold-Markierung wurden auf kohlebedampfte Nickelnetze aufgefangen (Square 150-200 Mesh) und nach folgendem Schema behandelt:

1. Herstellung des Arbeitspuffers:

0,1 M PBS + 0,1 % BSA-C + 0,1 % Tween
 + 1 mM CaCl₂ + 1mM MgCl (bei Concanavalin A: 1 mM MnCl₂)
 steril filtrieren, pH 7

2. Ansetzen verschiedener Verdünnungsreihen der unten aufgeführten Lektine im Arbeitspuffer:

Tab. 2.2 Untersuchte Lektine und ihre Bindungsspezifität

goldgekoppeltes Lektin, Verdünnung; Bezugsquelle	Herkunft	Bindungsspezifität
Concanavalin A (Con A) 1:5, 1:10; Sigma	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -D-Glucose α -D-Mannose
WGA 1:10, 1:20, 1: 40; Sigma	<i>Triticum vulgare</i>	n-Acetyl- β -(1,4)-D- Glucosamin n-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
DBA 1:5, 1:10; Sigma	<i>Dolichos biflorus</i>	n-Acetyl- α -D-Galaktosamin
UEA 1:5, 1:10; Sigma	<i>Ulex europaeus</i>	α -L-Fucose
LPA 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:100; Ey Laboratories Inc.	<i>Limulus polyphemus</i>	n-Acetylneuraminsäure Sialinsäure
SBA 1:5, 1:10, 1:20; Ey Laboratories Inc.	<i>Glycine maxima</i>	β -D-Galaktose n-Acetyl- α -D-Galaktosamin

3. Inkubation der Schnitte mit dem jeweiligen goldgekoppelten Lektin schwimmend auf einem Tropfen: Schnittseite zur Flüssigkeit hingewandt, je 45 min

4. 2 x 10 min Waschen mit PBS-Arbeitspuffer

5. 2 x 10 min Waschen mit normalem PBS

6. 1 x 10 min Waschen mit Aqua dest

7. Kontrastierung 5 min in 5% Uranylacetat in 4 % reinem Ethanol

8. Kontrastierung 5 min in 5% Bleicitrat nach Reynolds

Als Kontrolle diente ein kompetitiver Hemmtest:

Dabei wurde die jeweilige Zuckergruppe am Glykoprotein durch Zugabe des gleichen Zuckers gehemmt und mit dem goldgekoppelten Lektin der jeweiligen Verdünnungsstufe inkubiert. Die Aufbereitung erfolgte nach folgendem Schema:

1. Hemmung am Schnitt, schwimmend auf einem Tropfen
Endkonzentration Zucker + Lektin in jeweiliger Verdünnung

Tab. 2.3. Gehemmte Zucker und ihre assoziierten Lektine

spezifischer Zucker	Endkonzentration	goldgekoppeltes Lektin
n-Acetyl- β -(1,4-D-Glucosamin)	0,2 M	WGA 1:10; 1:20
n-Acetyl- α -D-Galaktosamin	0,2 M	DBA 1:10; 1:20
α -L-Fucose	0,2 M	UEA 1:10; 1:20
α -D-Glucose, α -D-Mannose	0,2 M	Con A 1:10; 1:20
n-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)	0,2 M	LPA 1:10; 1:20
β -D-Galaktose, n-Acetyl- α -D-Galaktosamin	0,2 M	SBA 1:10; 1:20

2. 2 x Waschen der Grids mit unter Pkt. 1 erstelltem Arbeitspuffer je 10 min
3. 2 x Waschen der Grids mit 0,1 M PBS (normal) je 10 min
4. Waschen der Grids mit Aqua bidest 10 min
5. Kontrastierung der schwimmenden Grids:
 - 5 % Uranylacetat in 4 % Ethanol, reinst 5 min
 - 5% Bleicitrat nach Reynolds 5 min

Die Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop von Zeiss, Typ 9 S-2 in einem Bereich von 50 kV auf 7 cm x 7 cm Negativen (Agfa Scientia).

2.11 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Untersuchung der Oberflächenmorphologie von *Cryptocaryon irritans* wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt. Der Informationsgehalt eines REM-Bildes kann viel größer sein als bei einem lichtmikroskopischen Bild gleicher Vergrößerung (Flegler et al. 1995).

2.11.1 Aufbereitung der Proben

Die Fixierung der Proben für die REM erfolgt nach einem ähnlichen Schema wie für die TEM (siehe Pkt. 2.9.1). Hinzu kommt aber die Reinigung der REM-Präparate, da die Oberflächenstruktur zu untersuchen ist.

Die in 5% Glutaraldehyd in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (4 °C/ 24 h) fixierten Rasterproben wurden folgenden Aufbereitungsschritten unterzogen:

1. Waschen	0,1 M Na-Cacodylatpuffer	5-6 x je 5 min
2. Osmierung	2% OsO ₄ in Na-Cacodylatpuffer	10 min
3. Waschen	0,1 M Na-Cacodylatpuffer	5-6 x je 5 min
4. Dehydrierung	aufsteigende Alkohltreihe:	je 15 min
	25 % Ethanol	
	40 % Ethanol	
	50 % Ethanol	
	60 % Ethanol	
	70 % Ethanol	
	80 % Ethanol	
	90 % Ethanol	
	2 x 100 % Ethanol	
5. Intermedium	Ethanol-Aceton 1:1	15 min
	2 x 100 % Aceton	15 min

2.11.2 Critical-Point-Trocknung

Zur Vermeidung von ausgedehnten Schädigungen der REM-Präparate, die bei Lufttrocknung durch die Oberflächenspannung des Lösungsmittels bzw. Wasser durch Verdampfung entstehen würden, wurde auf diese Art der Probentrocknung zurückgegriffen.

Die dehydrierten Proben wurden in eine druckfeste Kammer gebracht, in der durch mehrmaliges Spülen mit flüssigem CO₂ (Übergangsmedium) das Entwässerungsmittel Aceton substituiert wurde. Nach mehreren Spülvorgängen (je 5-6 mal) befand sich nur noch flüssiges CO₂ in der Druckkammer. Dieses wurde langsam so erwärmt, bis Temperatur und Druck den kritischen Punkt erreicht hatten (31 °C, 73,8 bar). Dabei nimmt das Übergangsmedium in seiner flüssigen und gasförmigen Phase die gleiche Dichte an und vermischt sich vollständig, ohne eine Phasengrenze zu durchwandern. Abschließend wurde das jetzt gasförmige CO₂ behutsam aus der Kammer entlassen. Die Proben wurden mit doppelseitigem Spezialband auf REM-Objekthalter (Stubs) geklebt und anschließend mit Gold bedampft. Die Critical-Point –Trocknung erfolgte an einem Balzers Union II 120 Gerät.

2.11.3 Goldbedampfung

Die Goldbedampfung der dehydrierten, getrockneten nicht-leitenden Proben in einem Kathodenzerstäuber Balzers SL 9496 diente der Herstellung einer leitenden Oberfläche bei gleichzeitiger Verhinderung negativer Aufladung. Diese Effekte beruhen auf Ablenkung der durch die Probe emittierten Sekundärelektronen und einer plötzlichen Änderung im Sekundärelektronensignal ungleich verteilter negativer Ladung oder auch auf einer Ablenkung des Elektronenstrahls, infolgedessen das Bild aus unterschiedlichen Bereichen erzeugt wird.

Die auf die Träger aufgeklebten Präparate wurden in den Kathodenzerstäuber eingelegt, in dem nach Verschließen ein Vakuum von 0,1–0,2 Torr erzeugt wurde. Die Vakuumkammer wurde 5–6 mal mit Argon geflutet, bis die Proben bei einem Unterdruck von 0,15 Torr und einer Stromstärke von 18 mA für 5 min in permanenter Argon-Atmosphäre bedampft wurden. Die Auswertung der REM-Präparate erfolgte an einem Leitz-AMR 1000 Rasterelektronenmikroskop bei 30 kV, die Bilddokumentation auf Agfa APX 25.

2.12 Zusammenstellung der in den Versuchen verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Summenformel	Reinheit	[g/mol]	Hersteller
Aceton	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	>99,5	58,08	J T Baker
Alcianblau 8 GX				Sigma
Ammoniumchlorid	NH_4Cl	99,5	53,49	Sigma
Aqua dest	H_2O		18,01	
Benzoinmethylether	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}(\text{OCH}_3)\text{COC}_6\text{H}_5$	98	226,28	Fluka
Bithionolsulfoxid	$\text{C}_{12}\text{H}_6\text{Cl}_4\text{O}_3\text{S}$	99	372,1	Sigma
Bleinitrat	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	>99,5	331,21	Fluka
BSA-C				Aurion
Cacodylatsäure Natriumsalz Trihydrat Pufferan	$\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	98	214,03	Sigma
Calciumchlorid-dihydrat	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	99	147,0	Sigma
Chloroform p.A.	CHCl_3	>99	119,8	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	99	141,96	Fluka
Essigsäure z.A.	CH_3COOH	100	60,05	Fluka
Ethanol z.A.	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	99,8	46,07	Fluka
Ethanol, vergällt	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	96		Fluka
Formvar 15/95 E				Fluka
Glutaraldehyd 25 % in wässriger Lösung	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$	25	100,1	Sigma
Kaliumchlorid	KCl	99	74,55	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	99	136,09	Fluka
Magnesiumchlorid	MgCl_2	98	95,21	Fluka
Manganchlorid Tetrahydrat	$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	99	197,9	Fluka
Methylenblau (nach Unna)	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{S}^+\text{Cl}^-$	85	319,9	Sigma
Monokaliumphosphat	KH_2PO_4	99	136,08	Fluka
MS 222 3-Aminobenzoe- säureethylester	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{CH}_4\text{SO}_3$		261,3	Sigma
Natriumchlorid	NaCl	99	58,44	Fluka
Natriumhydroxidplättchen	NaOH	99	40	Fluka
Natronlauge (1 mol/l)	NaOH	40	40,1	Fluka
Osmiumtetroxid	OsO_4	99,9	254,2	Carl Roth
Paraformaldehyd	$(\text{CH}_2\text{O})_n$	95	30,03	Sigma
Rutheniumrot	$[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_6]$	99	858,42	Fluka
Salzsäure (1 mol/l)	HCl	37	36,46	Fluka

Chemikalien	Summenformel	Reinheit	[g/mol]	Hersteller
Silberproteinat				Fluka
Tannin				Sigma
Thiocarbohydrazid	$(\text{NH}_2\text{NH})_2\text{CS}$	99	106,15	Sigma
tri-Natriumcitrat-2-hydrat z.A.	$\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)\cdot x2\text{H}_2\text{O}$			Sigma
Tween-20 [®]				Aurion
Uranylacetat z.A.	$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{UO}_2\cdot x2\text{H}_2\text{O}$		424,15	Merck

2.13 Lösungen:

Araldit-Stammlösung 10g Araldit CY 212, 10 g Araldit-Härter HY 964, 0,4 g Beschleuniger DY 964

Bleicitrat-Lösung nach Reynolds (1963): 1,33g Bleicitrat, 1,76 g tri-Natriumcitrat-2-hydrat, 30ml abgekochtes Aqua bidest, schütteln, 30 min stehen lassen und mit 8 ml 1 N Natronlauge auf 50 ml auffüllen; pH 12

Fixierlösung für die Elektronenmikroskopie: 5,35 g Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat Pufferan auf 200 ml mit sterilem Seewasser auffüllen, 50 ml Glutaraldehyd dazugeben (25%); pH 7,3

Formvar-Lösung: 0,8% (w/v) Formvar 15/95 E in Chloroform

Gesättigte ethanolische Uranylacetat-Lösung: 10 g Uranylacetat in 250 ml Ethanol [50 % (w/v)] lösen

LR-Gold-Stammlösung:

LR Gold Resin + 0,5 % Benzoinmethylether

Natrium-Cacodylat-Trihydratpuffer: 0,1 M
10,7 g Cacodylsäure-Natriumsalz Trihydrat Pufferan auf 500 ml mit sterilem Seewasser auffüllen pH 7,3

Osmium -Lösung: 1 g Osmiumtetroxid in 0,1 M Na-Cacodylat-Trihydrat-Puffer

Paraformaldehydlösung:

5 g Paraformaldehyd in 50 ml Sørensenpuffer, auf 60°C unter Rühren erwärmen, 2 – 4 Tropfen 1 n NaOH zugeben bis Flüssigkeit klar ist; nach Abkühlen auf 50 ml auffüllen und filtrieren

PBS-Puffer: NaCl (58,44 M), KCl (74,56 M), Na₂HPO₄ (177,99 M), KH₂PO₄ (136,09 M) 80,03 g/ 2,01 g/14,24 g/ 2,04 g in 1000ml Aqua bidest, pH 7,0

Phosphatpuffer nach Sørensen: Lsg A: 0,1 M KH₂PO₄ (13,61 g /l Monokaliumphosphat), Lsg B: 0,1 M Na₂HPO₄·2H₂O (17,8 g /l Dinatriumphosphat) pH 7,4: A/B = 2/8

Rutheniumrot-Stammlösung: 50 mg Ruthenium-rot mit einigen Tropfen Aqua bidest zerstoßeln und auf 15 ml auffüllen. 10 min Schütteln der Lösung bei 60 °C. 15 min Abzentrifugieren bei 1500 g

Tannin-Stammlösung: 8 g Tannin mit 100 ml Aqua bidest erhitzen, auf 70 °C. Rühren und anschließend filtrieren

3. Ergebnisse

3.1 Organisation der verschiedenen Entwicklungsstadien von *Cryptocaryon irritans*: Lichtmikroskopie

Bei Betrachtung mit bloßem Auge äußerte sich die *Cryptocaryon irritans*-Infektion in weißlich-opaken Pünktchen auf der Körperoberfläche, den Flossen, Kiemen und der Cornea der befallenen Fische (Abb. 3-8). Dazu kam eine starke Schleimabsonderung der Haut des Wirtes (Abb. 3).

Lichtmikroskopisch betrachtet erschienen die Hautstadien des Parasiten transparent bei unterschiedlicher Form und Größe (Abb. 6-8).

Nach dem Eindringen in das Wirtsepithel wandelten sich die infektiösen Schwärmer über das Zwischenstadium des Phoronten innerhalb weniger Stunden in das eigentliche Fress- und Wachstumsstadium, den Trophonten, um (Abb. 6, 7). Die Phoronten waren ovoid in einem Größenbereich von 57-76 μm . Nach ca. 48 Stunden begann ihr Größenwachstum im Wirtsepithel. Junge Trophonten erreichten dann bald Durchmesser von 82-187 μm und erschienen ebenfalls ovoid. Reife Trophonten wirkten häufig kugelig und hatten Durchmesser von 241-449 μm (Abb. 5, 7). Diese parasitische Phase in der Haut dauerte 3-8 Tage in Abhängigkeit von der Wassertemperatur.

In der Mundregion dieser holotrichen Ciliaten endete die in ca. 40 Reihen verlaufende, dichte einheitliche Ciliatur des Parasiten, die bei Methylenblau-gefärbten Semidünnschnitten deutlich zu erkennen war (Abb. 8, 12). Die reifen Trophonten waren mit zahlreichen Nahrungsvakuolen gefüllt (Abb. 11-13). Durch ihre hohe Mobilität innerhalb des Wirtsgewebes, was zu Körperverformung führte, lagen die Trophonten in den unterschiedlichsten Gestalten vor (Abb. 11, 12, 13). Der lappenförmige Makronucleus war lichtmikroskopisch deutlich zu lokalisieren (Abb. 11, 14), die Mikronuclei waren aber meist nicht erkennbar.

Nach Verlassen des Wirtes heftete sich der Protomont, der in Größe und Gestalt dem Trophonten ähnelte, binnen weniger Stunden an ein geeignetes Substrat auf dem Boden

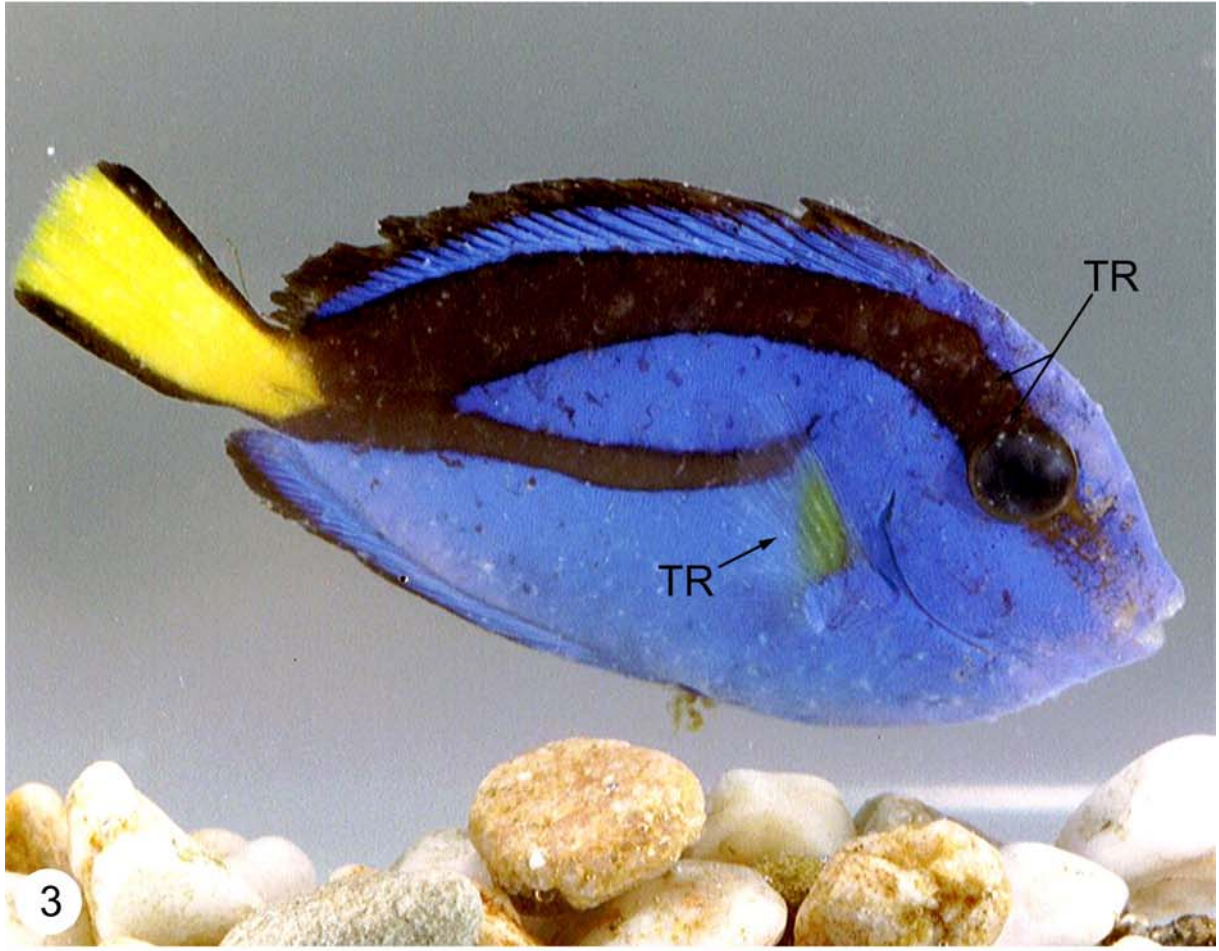
Tafel 1

Abb. 3-4 Übersichtsaufnahmen von mit *Cryptocaryon irritans* infizierten Seewasserrfischen

Abb. 3 Palettendoktorfisch (*Paracanthus hepatus*) mit starker *Cryptocaryon*-Infektion. Der parasitäre Befall ist an den zahlreichen über den gesamten Schleppfisch verteilten weißlich-opaquen Pünktchen deutlich zu erkennen. Auffallend ist auch die Augentrübung des Wirtes. x 2,3

Abb. 4 Weißbinden-Glühkohlenfisch (*Amphiprion frenatus*) mit beginnender *Cryptocaryoniasis*. Im Labor wurden alle Versuchsreihen an artifiziell infizierten *A. frenatus* durchgeführt. x 2,5

Abkürzung: TR, Trophont

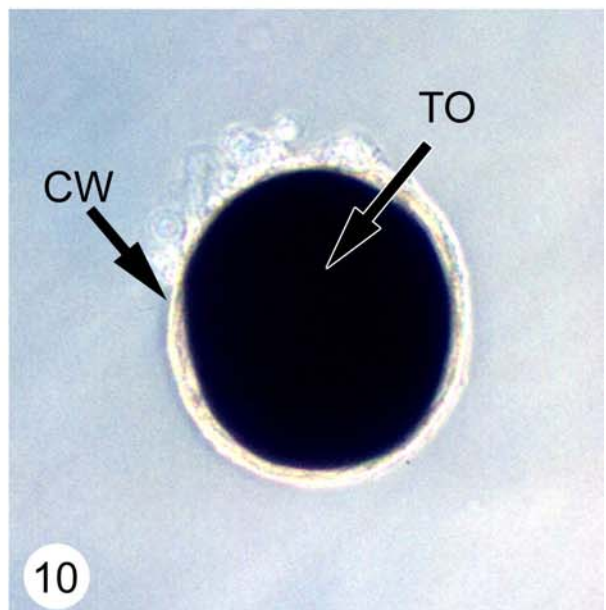
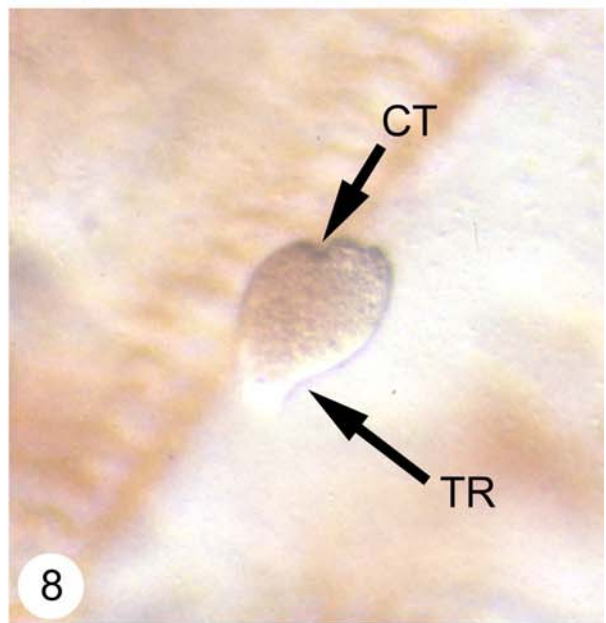
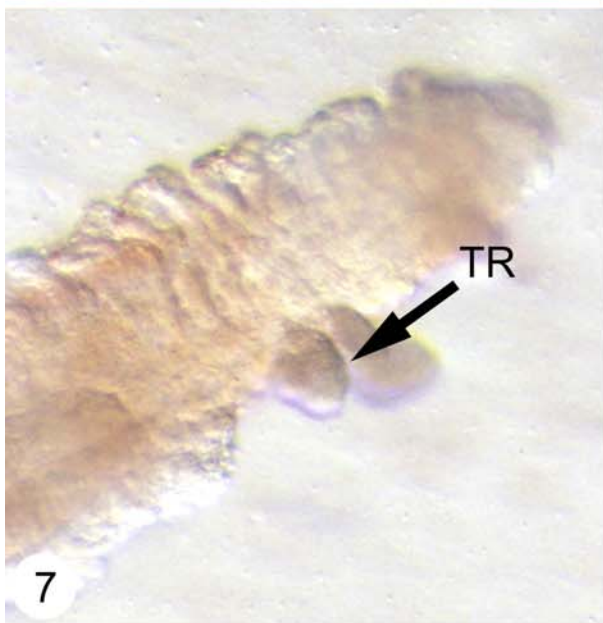
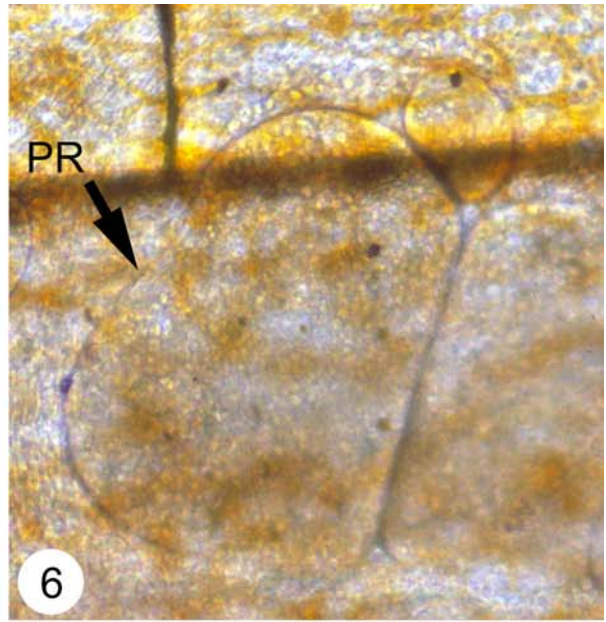
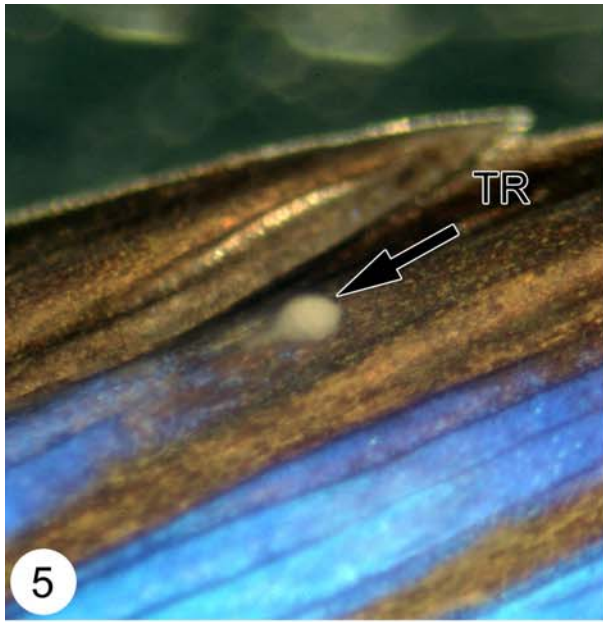


Tafel 2

Abb. 5-10 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Entwicklungsstadien des holotrichen Ciliaten *Cryptocaryon irritans*

- Abb. 5 Reifer Trophont in der Dorsalflosse von *Paracanthus hepatus*. x 20
- Abb. 6 Zwei Phoronten in der Caudalflosse von *A. frenatus*. x 350
- Abb. 7 Trophonten, die sich aus einer Kiemenlamelle herauswölben. x 180
- Abb. 8 Trophont an Kiemenlamelle. Hier ist die Mundregion des Parasiten deutlich zu erkennen. x 670
- Abb. 9 Phasenkontrastaufnahme eines Protomonten. Dieser verliert innerhalb einiger Stunden seine Beweglichkeit und differenziert sich am Substrat zum Tomonten. x 230
- Abb. 10 Phasenkontrastaufnahme eines Tomonten. Die Zystenwand verdickt sich durch Einlagerungen von Cilien, Bakterien und auch unspezifischen Zellbestandteilen. Eine charakteristische cortikale Struktur ist nicht erkennbar. x 270

Abkürzungen: CT, Cytostom; CW, Zystenwand; KL, Kiemenlamelle; PR, Phoront; TO, Tomont; TR, Trophont



Tafel 3

Abb. 11-15 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Semidünnschnitten durch Stadien von *Cryptocaryon irritans* nach Anfärbung mit Methylenblau

Abb. 11 Querschnitt durch einen reifen Trophonten im Fischintegument. Kennzeichnend sind die zahlreichen Nahrungsvakuolen. x 700

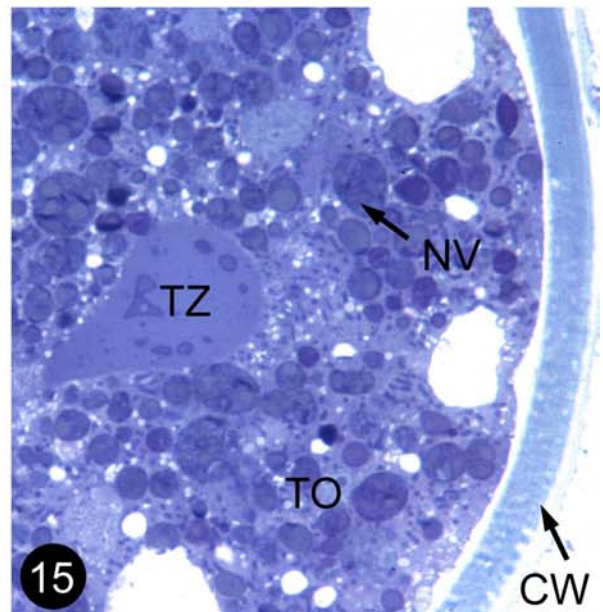
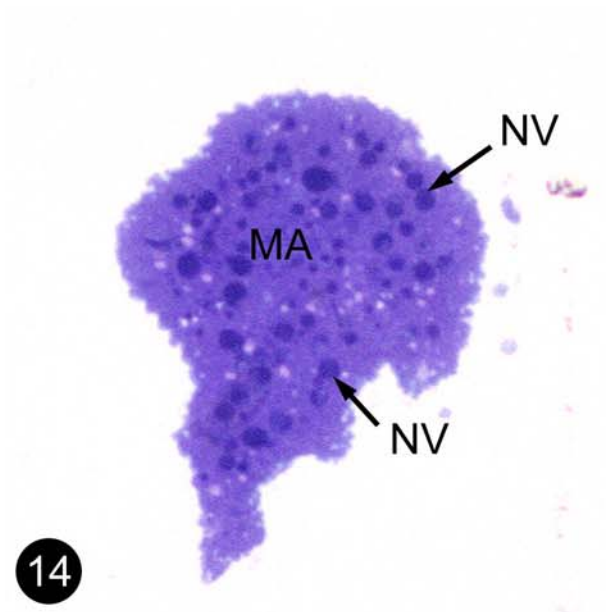
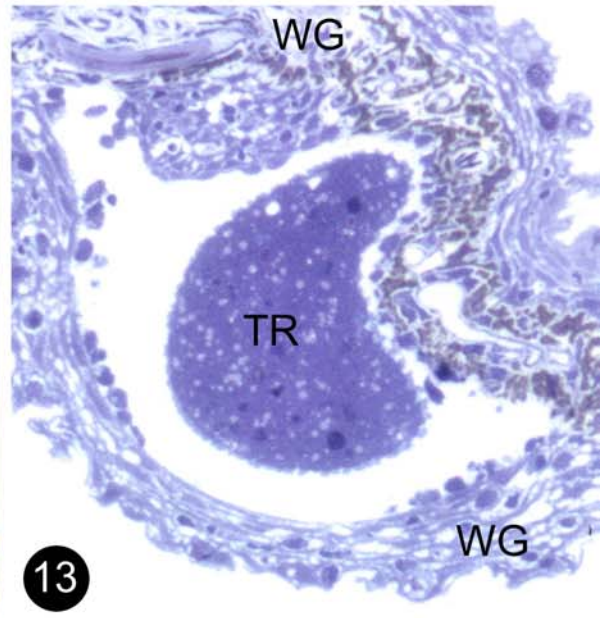
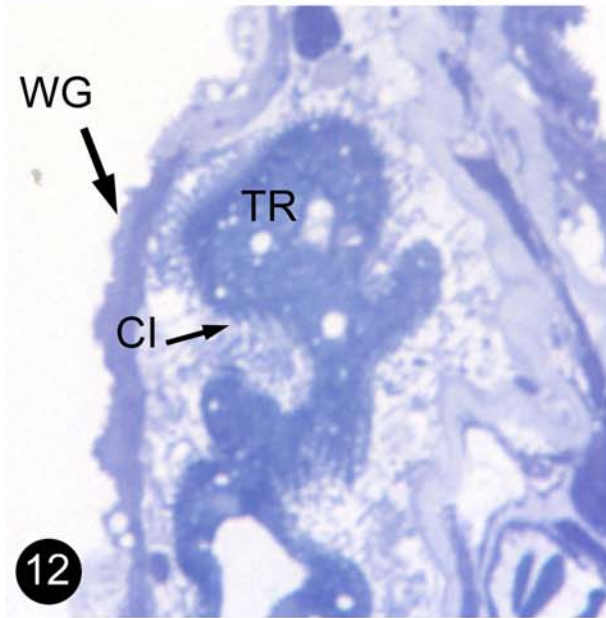
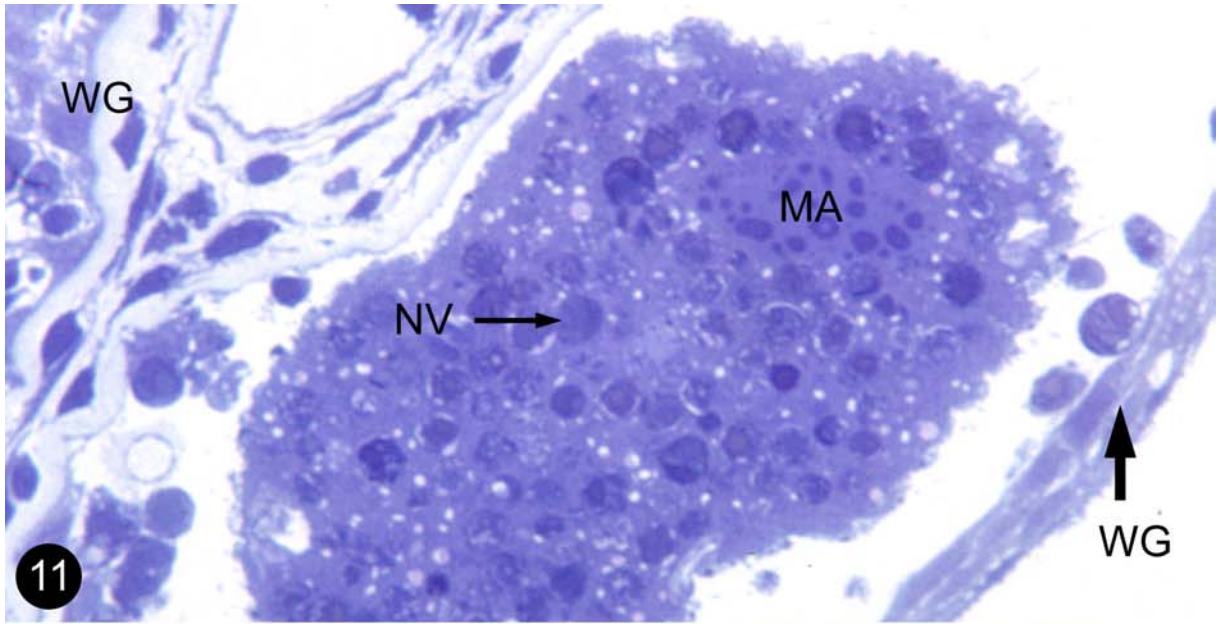
Abb. 12 Längsschnitt durch einen reifen Trophonten. Hier sind die in Reihen angeordneten Cilien des Parasiten deutlich zu erkennen. x 600

Abb. 13 Schnitt durch einen jüngeren Trophonten. Der Parasit ist von einer dicken Lage Wirtsgewebe umschlossen. x 200

Abb. 14 Protomont. Im Cytoplasma sind Nahrungsvakuolen in verschiedenen Stadien der Verdauung erkennbar. x 280

Abb. 15 Früher Tomont mit heranreifender Tochterzelle. Die mehrschichtige Zystenwand ist bis zu 1 μm dick. Im Inneren des Tomonten sind zahlreiche Nahrungsvakuolen vorhanden. x 800

Abkürzungen: CI, Cilium; CW, Zystenwand; MA, Makronucleus; NV, Nahrungsvakuole; TO, Tomont; TR, Trophont; TZ, Tochterzelle; WG, Wirtsgewebe



des Beckens (Abb. 9, 14). Hier differenzierte er sich innerhalb von 24 h zum Tomonten (Abb. 10, 15). Der Tomont (= enzystiertes Teilungsstadium) ist das einzige nicht mit Cilien besetzte Stadium von *Cryptocaryon irritans*. Seine Größe lag im Bereich zwischen 178-419 µm. Durch Einlagerungen von zellulären Resten, Cilien und Bakterien verdickte sich die Zystenwand und erschien mehrlagig, wenn auch eine charakteristische kortikale Struktur nicht zu erkennen war (Abb. 10, 15). Die Zystenwand bestand aus bis zu 10 Lagen und war bis zu 1 µm dick (0,3-1,0 µm). Innerhalb des Tomonten entstanden durch vielfache Teilungen bis zu ca. 260 (131-256) Tochterzellen oder Tomiten (Abb. 15). Diese schlüpfen temperaturabhängig innerhalb von 3-21 Tagen aus dem Tomonten, wobei die meisten der daraus differenzierten, infektiösen Schwärmer (Theronten) nach 6 Tagen freigesetzt worden waren. Im Laufe von 48 Stunden starben die Theronten ab, sofern sie nicht einen geeigneten Wirt gefunden hatten.

3.2 Rasterelektronenmikroskopische (REM) Befunde

Um nähere Informationen zur Oberflächenstruktur des Parasiten zu erhalten, wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Hautstadien durchgeführt.

Zur Darstellung der verschiedenen Hautstadien auf einem einzigen Fisch dienten jeweils an Seewasser adaptierte, experimentell infizierte Jungfische der Gattung *Poecilia latipinna*.

Auf bzw. in der Haut des Fisches waren bald nach der Infektion zahlreiche verschiedene Stadien von *Cryptocaryon irritans* erkennbar. Die Trophonten erreichten sehr unterschiedliche Größen und waren beliebig über den gesamten Körper verteilt. Sie wölbten sich aus der Oberfläche der Fischhaut hervor (Abb. 16, 17). Auch auf der Cornea des Jungfisches befanden sich einige Parasiten (Abb. 16). Mit der Rasterelektronenmikroskopie wurde das Ausmaß der *Cryptocaryon*-Infektion besonders deutlich. Es waren dann nämlich viele sehr junge Trophonten darstellbar, die mit Hilfe des Binokulars bzw. des Mikroskops nicht zu belegen waren.

Beim eigentlichen Versuchsfisch *Amphiprion frenatus* waren ebenfalls verschiedene Wachstumsstadien der Trophonten gleichzeitig zu erkennen. Die Parasiten waren dabei nicht regelmäßig verteilt, sondern bildeten vielmehr regelrechte Ansammlungen (Abb. 18). Die Trophonten erwiesen sich teilweise mit Materialablagerungen bedeckt (Abb. 18, 19,

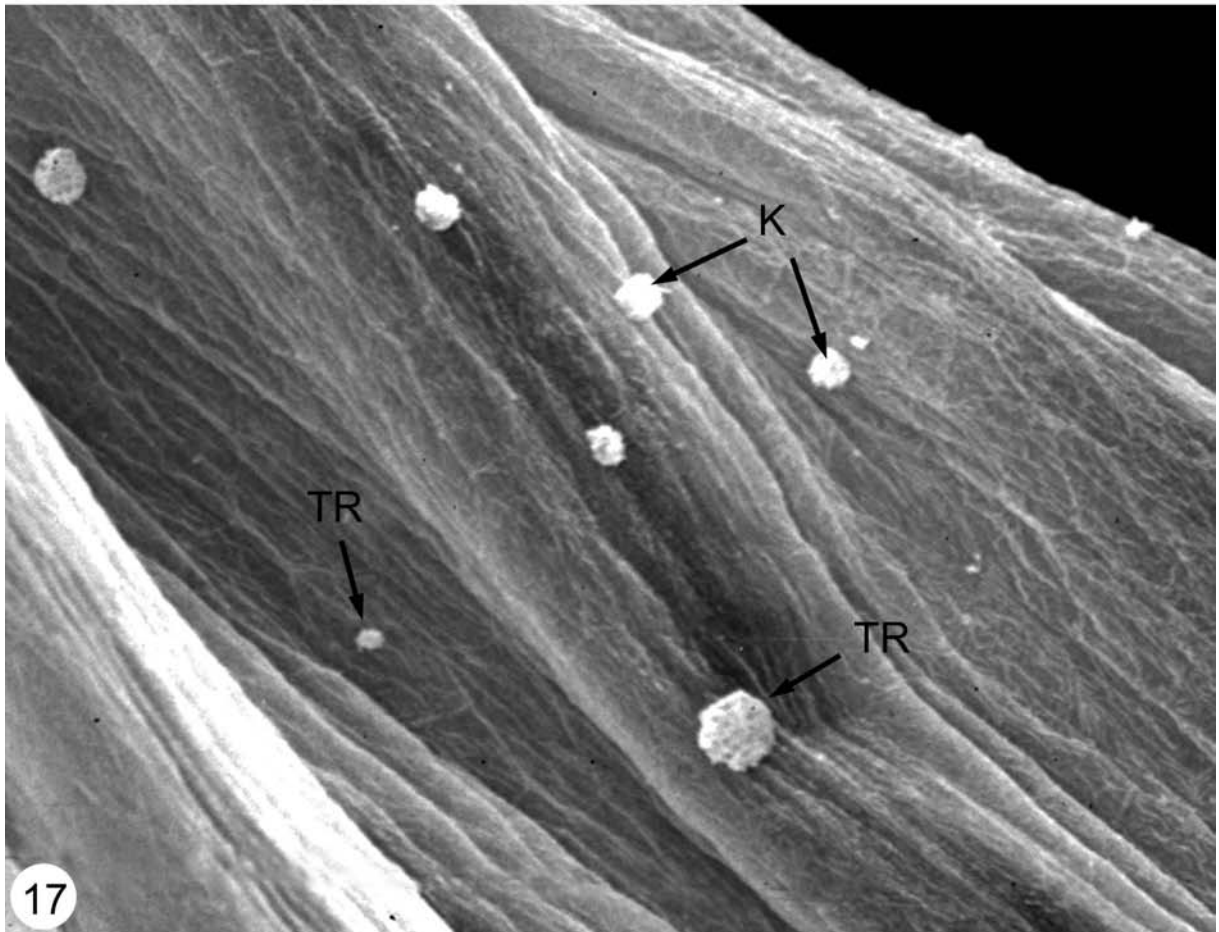
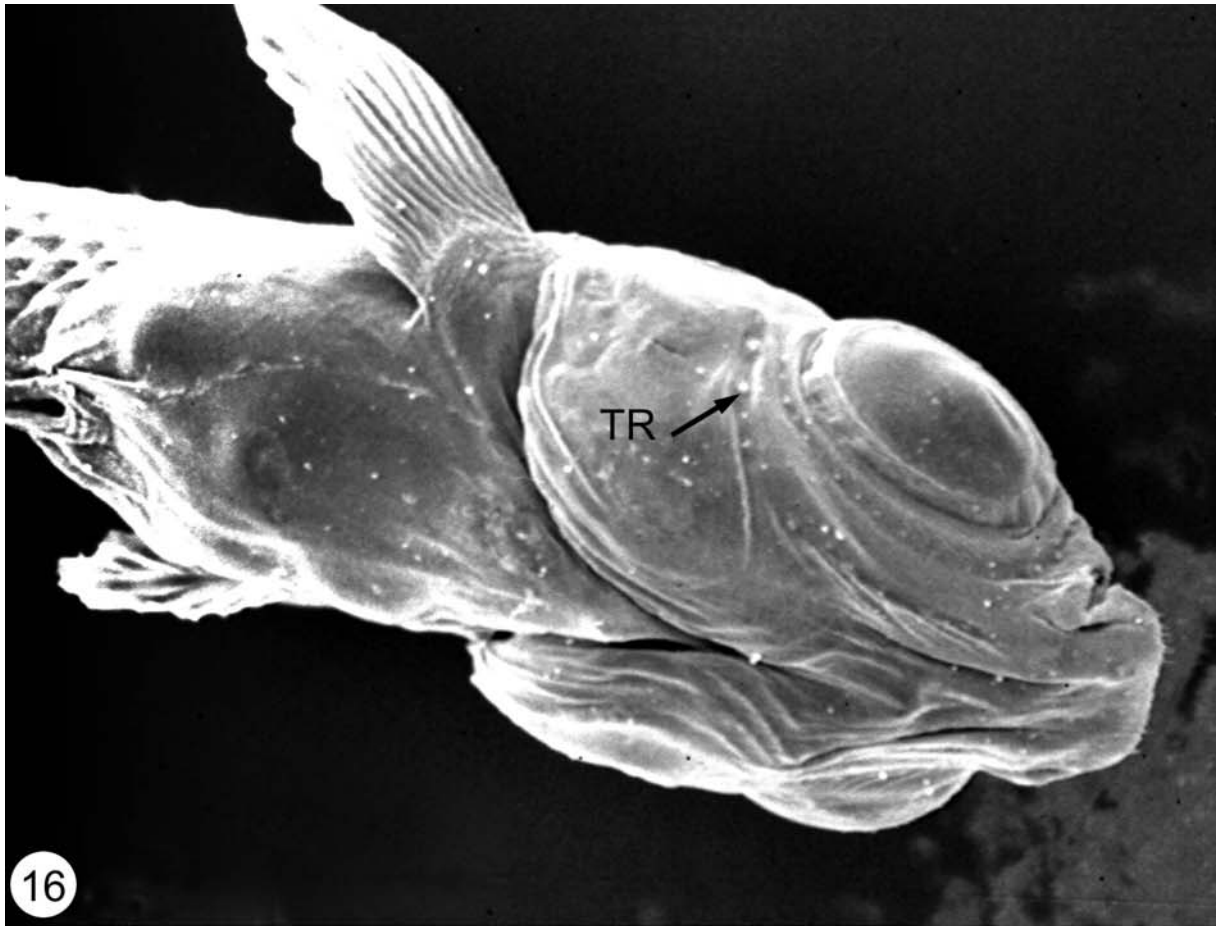
Tafel 4

Abb. 16-17 REM-Aufnahmen von hautständigen Stadien des Ciliaten *Cryptocaryon irritans*

Abb. 16 In Vorversuchen infizierter Jungfisch eines an Seewasser adaptierten Mollys (*Poecilia latipinna*). x 75

Abb. 17 Detailaufnahme der Brustflosse (Pectoralflosse). Deutlich sind die verschiedenen parasitären Wachstumsstadien zu erkennen. x 280

Abkürzungen: K, Kontamination; TR, Trophont



Tafel 5

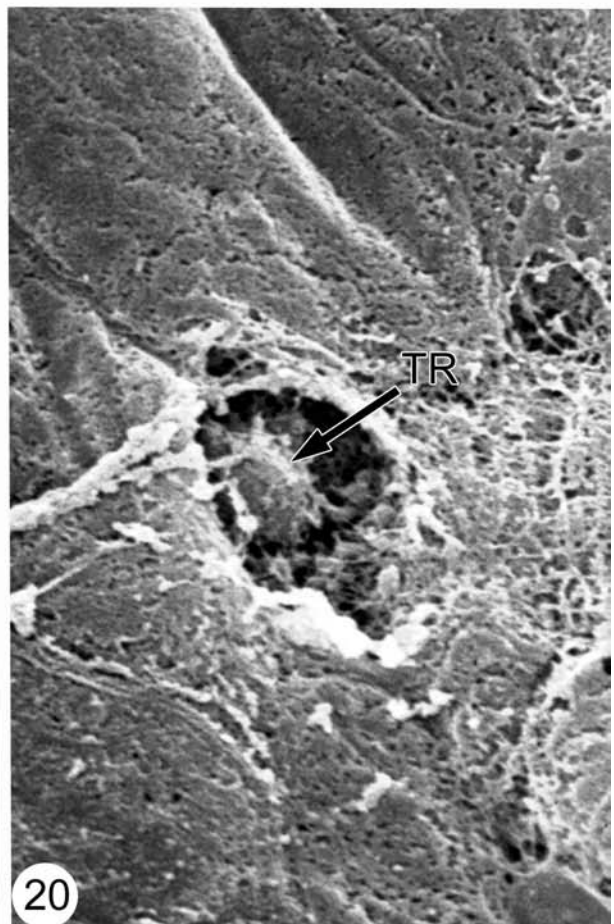
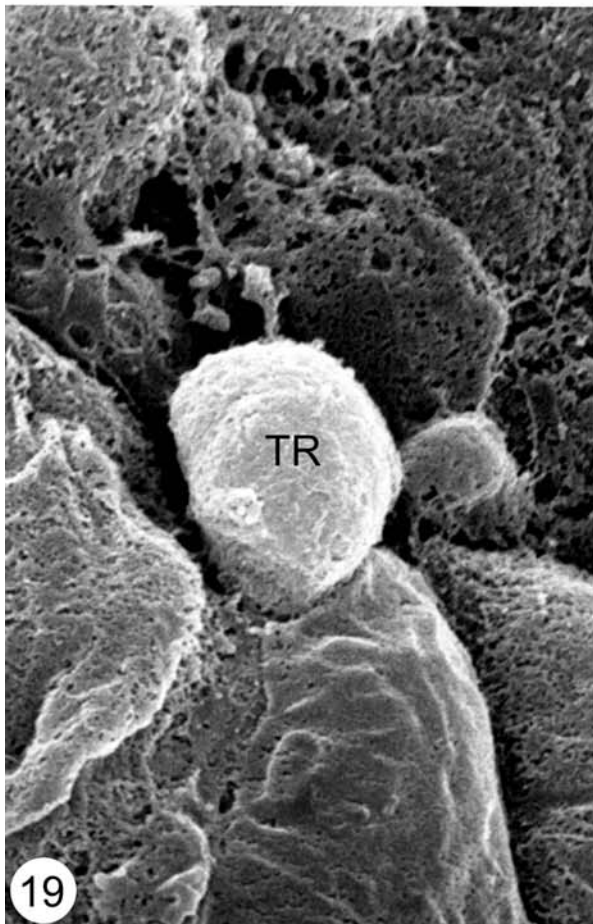
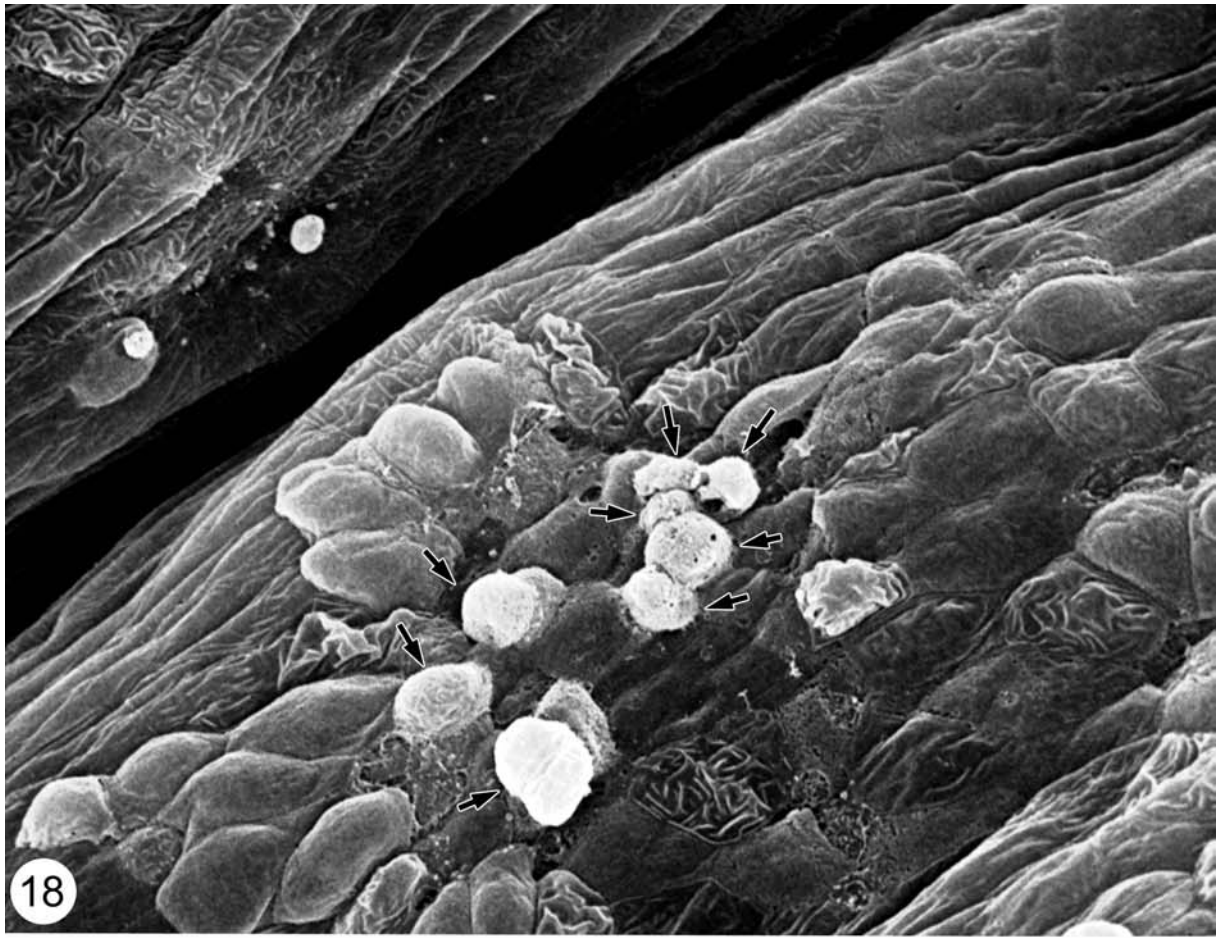
Abb. 18-20 REM-Aufnahmen der Trophonten von *Cryptocaryon irritans* in der Epidermis des Weißbinden-Glühkohlenfisches (*Amphiprion frenatus*)

Abb. 18 Übersichtsaufnahme einer Ansammlung von Trophonten (Pfeile) in der Caudalflosse von *A. frenatus*. x 4950

Abb. 19 Ein in der Fischhaut teilweise eingedrungener früher Theront. x 14350

Abb. 20 Dieser Trophont ist tief in die Haut eingedrungen. An der Penetrationsstelle haben sich muköse Absonderungen (Pfeile) gebildet. x 7900

Abkürzungen: TR, Trophont; WG, Wirtsgewebe



Tafel 6

Abb. 21-24 REM-Aufnahmen von *Cryptocaryon irritans* in verschiedenen Phasen der Penetration

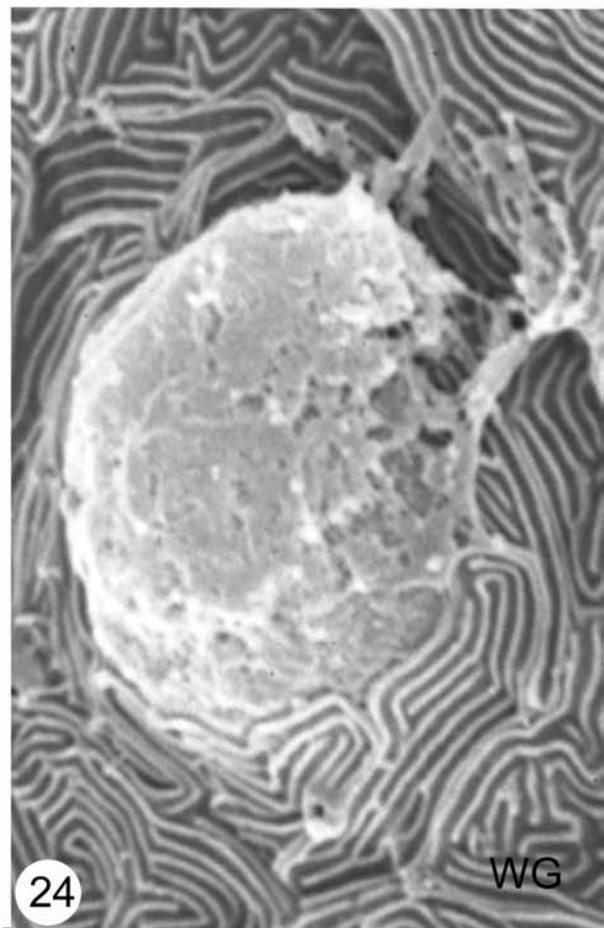
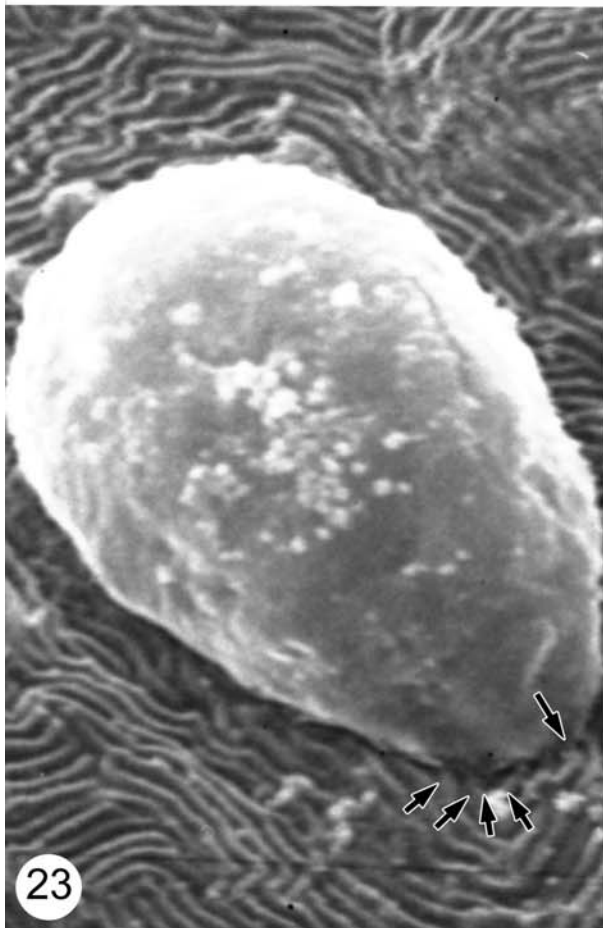
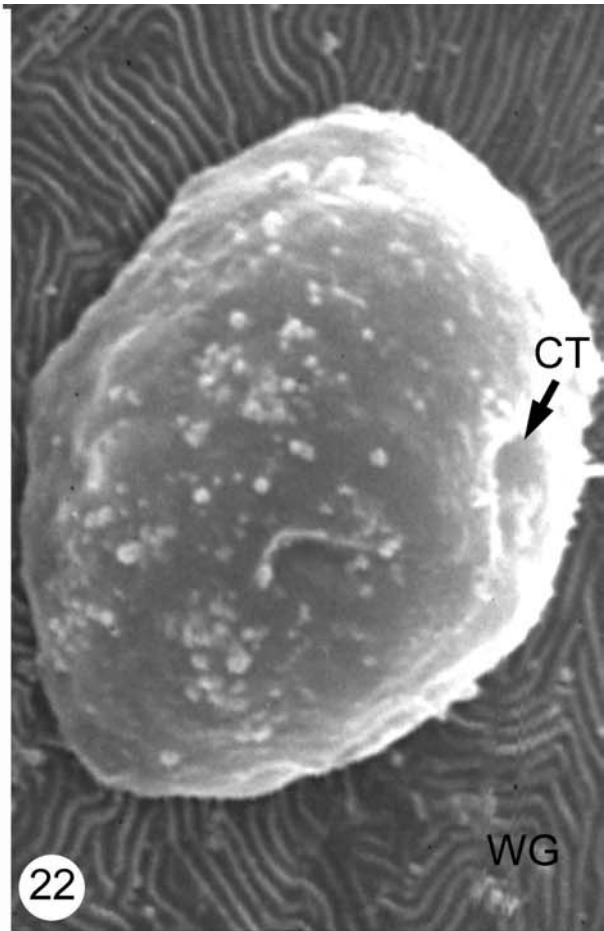
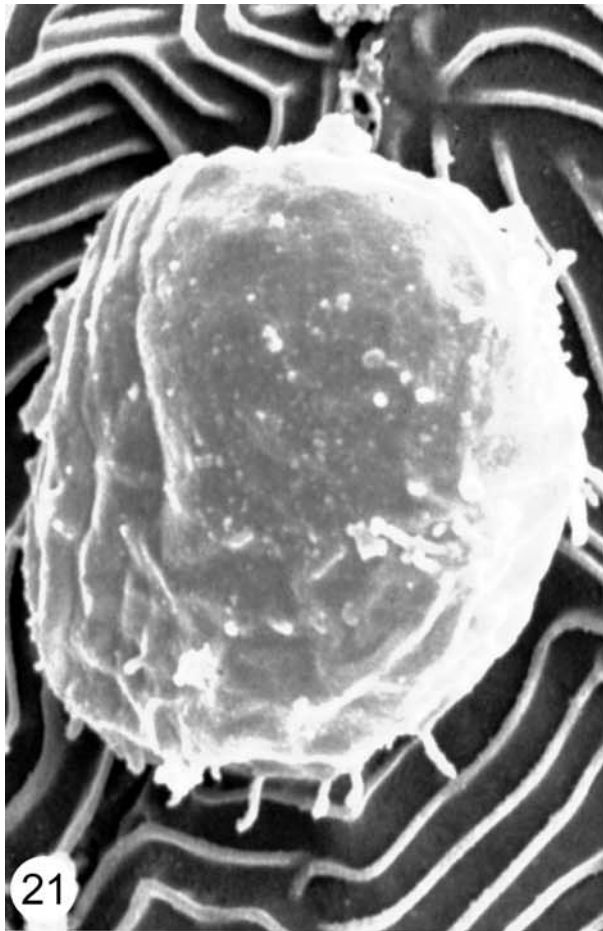
Abb. 21 Theront vor dem Eindringen in das Wirtsgewebe. x 18200

Abb. 22 Theront mit erkennbarem Cytostom. x 14360

Abb. 23 Dieser Theront hat sich mit dem anterioren Pol in das Wirtsepithel gebohrt (Pfeile). x 20100

Abb. 24 Fortgesetzte Penetration in das Wirtsepithel. x 19160

Abkürzungen: CI, Cilium; CT, Cytostom; WG, Wirtsgewebe



23). Das Eindringen des Theronten in das Wirtsgewebe erfolgte sehr schnell. Zwei Minuten nach dem Parasit-Wirt-Kontakt saß der Theront noch auf der Fischhaut (Abb. 21), auch nach drei Minuten war noch keine Veränderung sichtbar (Abb. 22). Innerhalb von vier Minuten bohrte sich dann aber der Parasit mit seinem vorderen Pol in das Epithel ein (Abb. 19, 23), um schließlich noch tiefer in das Wirtsgewebe zu versinken (Abb. 24). Nach etwa 5 min war er bis zur epithelialen Basalmembran vorgedrungen. An der Penetrationsstelle bildeten sich muköse Absonderungen (Abb. 20).

3.3 Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen zur Ultrastruktur der unbehandelten *Cryptocaryon irritans*-Stadien

3.3.1 Ultrastruktur der Trophonten und Protomonten

Kennzeichnend für den holotrichen Ciliaten *Cryptocaryon irritans* sind die zahlreichen, typisch strukturierten Cilien, die die gesamte Körperoberfläche des Parasiten bedecken (Abb. 25, 28, 31- 34).

Die Pellikula der nicht-medikierten Trophonten und Protomonten bestand aus drei Membranen: die Plasmamembran, die alles begrenzte, sowie der äußeren und inneren alveolaren Membran. Die äußere und innere alveolare Membran umgaben den alveolaren Raum (pellicular alveoli), der durch eine spongiös erscheinende Schicht gefüllt wurde (Abb. 25-37). Diese spongiöse Schicht ist für *Cryptocaryon irritans* charakteristisch, und wurde mit zunehmenden Größenwachstum des Trophonten reduziert. Im anschließenden Protomontenstadium war die spongiöse Schicht nur noch als dünne Lage zu erkennen (Abb. 25).

Die in Reihen verlaufenden Cilien entsprangen jeweils aus einer kortikalen Einstülpung, die bis zu 1 µm weit war (Abb. 33, 34). Diese lag zwischen den Zellvorsprüngen, denen die spongiöse Substanz aufgelagert war. Die Länge eines einzelnen Ciliums im Trophontenstadium lag bei 7-9 µm.

Reife Trophonten und Protomonten unterschieden sich morphologisch kaum voneinander (Abb. 25, 27). Unterhalb der spongiösen Schicht befanden sich im Zellcortex zahlreiche kugelig-ovale Mitochondrien mit tubulären Cristae (Abb. 27). Ihr Durchmesser betrug im Schnitt etwa 1 µm. Auch die speerförmigen ca. 0,7 µm großen Mukozysten waren in die-

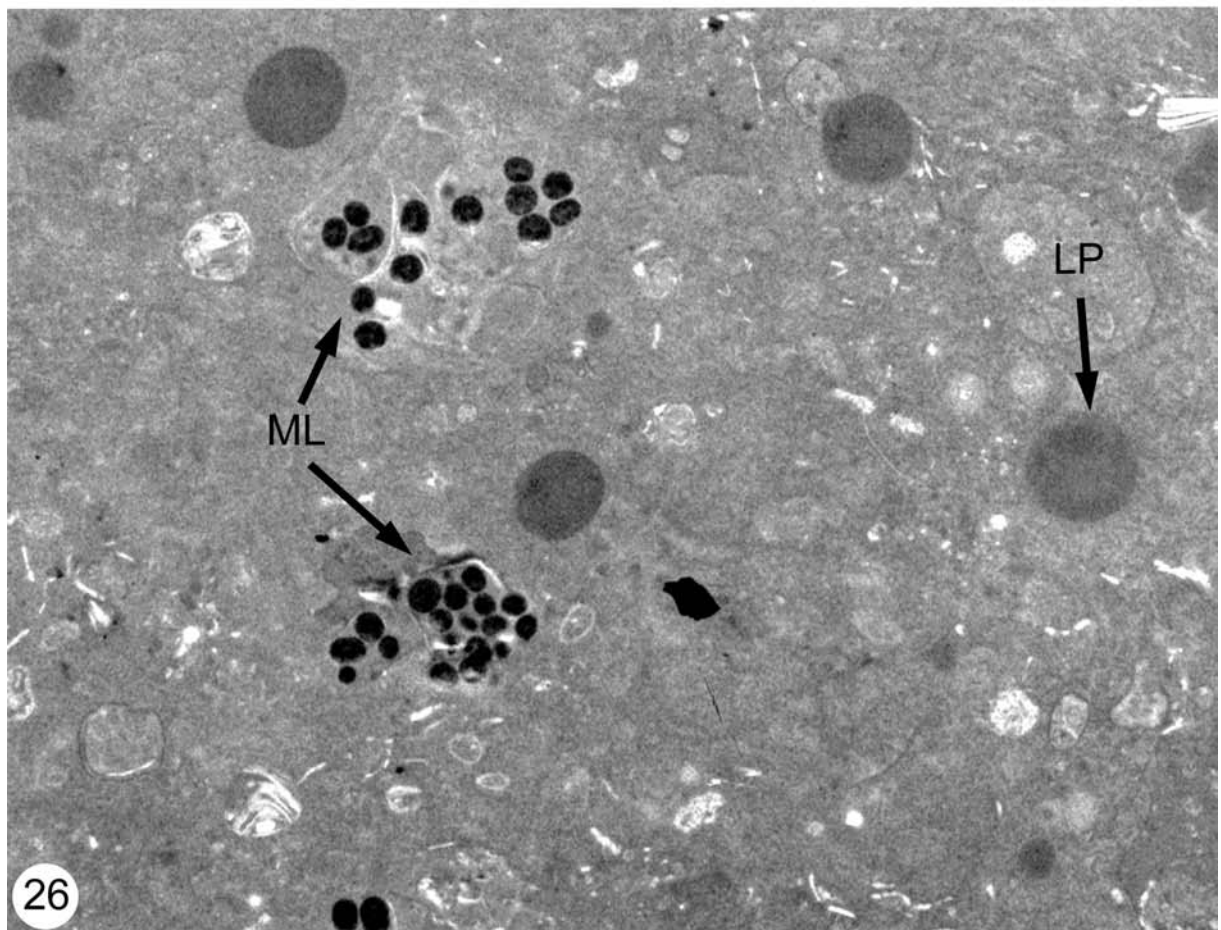
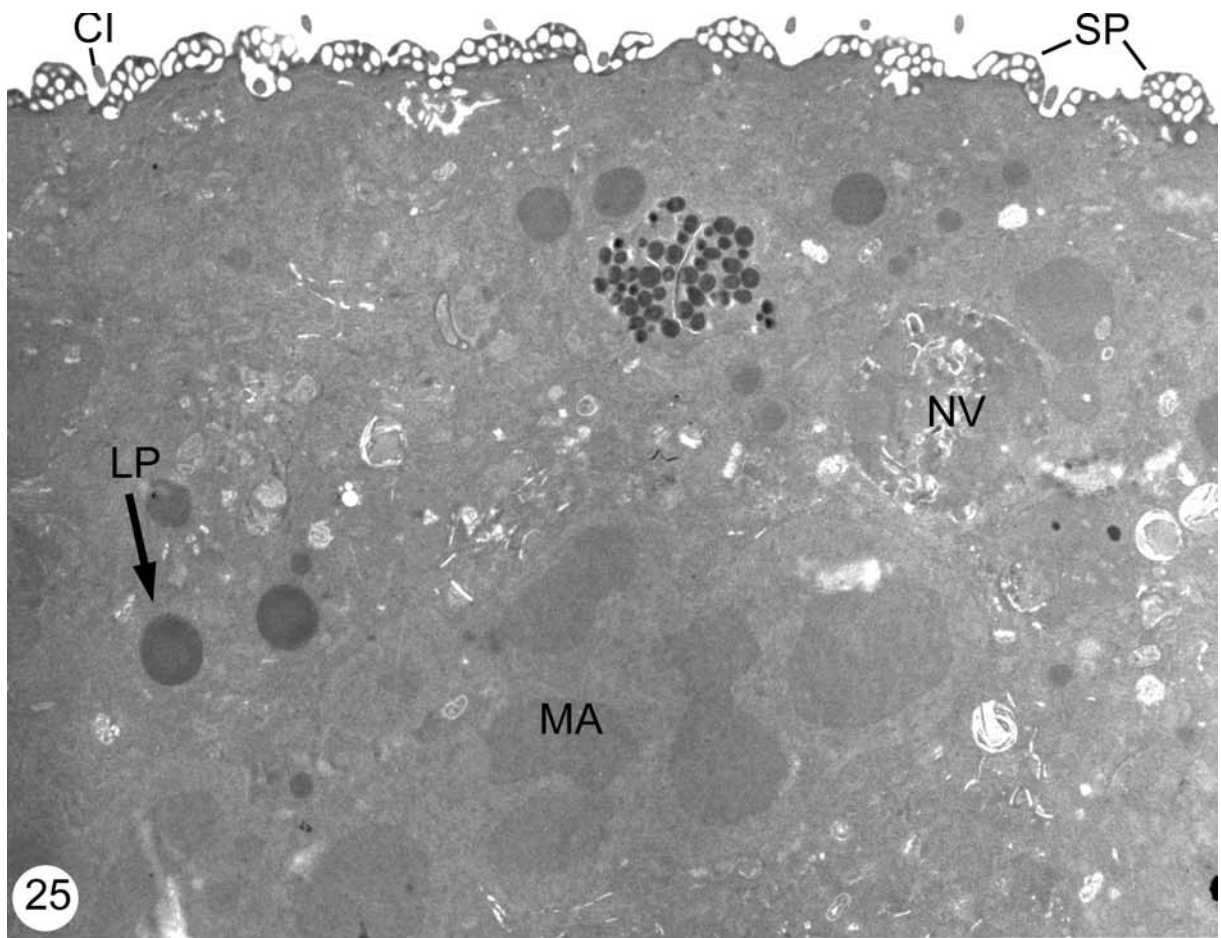
Tafel 7

Abb. 25-26 TEM-Aufnahmen von *Cryptocaryon irritans* nach Verlassen des Wirtsfisches

Abb. 25 Übersichtsaufnahme eines Querschnitts durch die Peripherie eines frühen Protomonten nach Verlassen des Wirtes. Der Parasit wird von einer elektronendichten spongiösen Schicht umhüllt, die mit seiner zunehmenden Entwicklung reduziert worden ist. Der länglich-ovale Makronucleus ist aus vier nicht mehr genau abgrenzbaren Segmenten aufgebaut. In seiner Matrix sind zahlreiche Chromatinschollen verteilt. x 7200

Abb. 26 Schnitt durch den zentralen Plasmabereich. Im Cytoplasma liegen neben Lipideinschlüssen zahlreiche Nahrungsvakuolen verschiedener Cyclosestadien. Vereinzelt sind in den Nahrungsvakuolen Zellreste von Wirtszellen zu erkennen. x 10800

Abkürzungen: CI, Cilium; LP, Lipideinschlüsse; MA, Makronucleus; ML, Melanocyt; NV, Nahrungsvakuole; SP, Spongiöse Schicht



Tafel 8

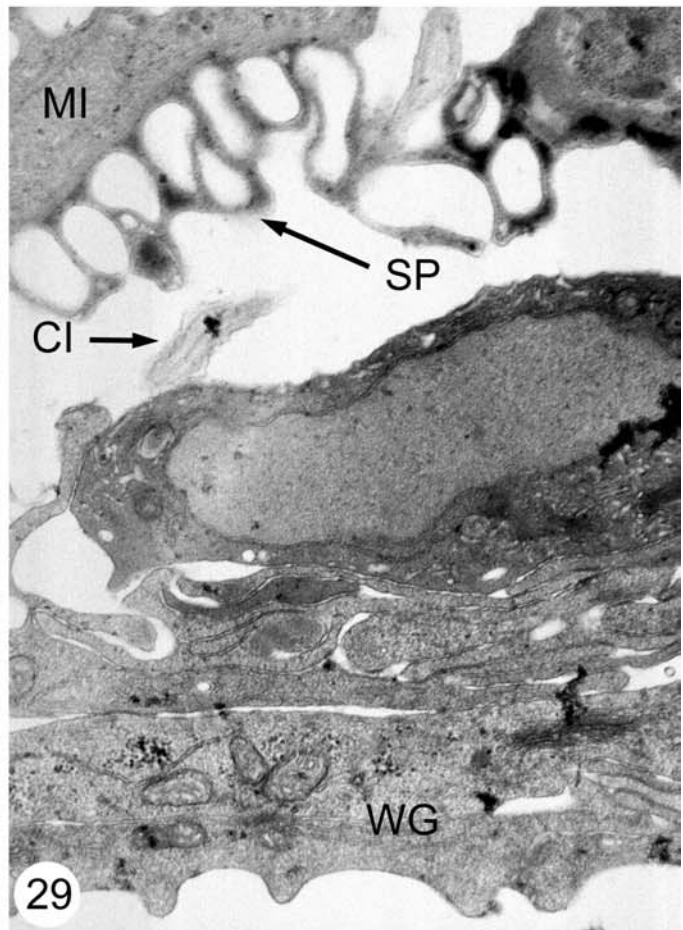
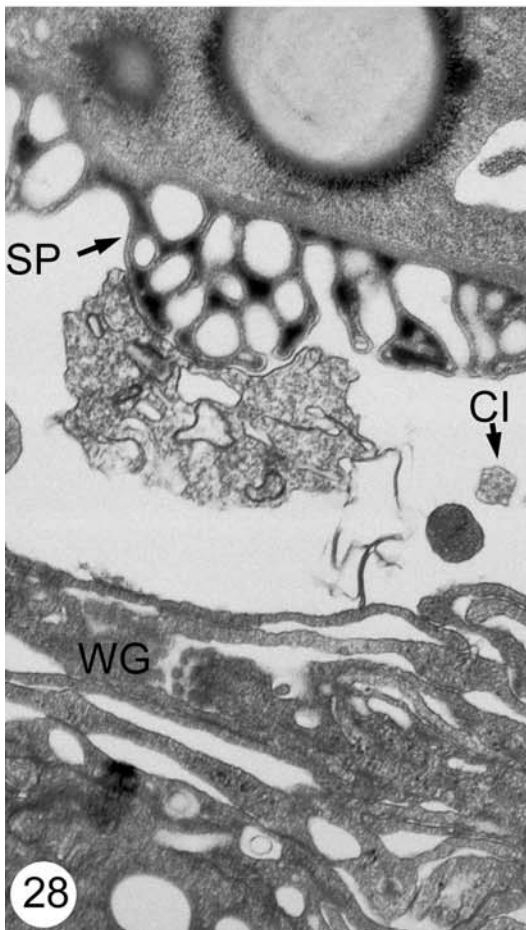
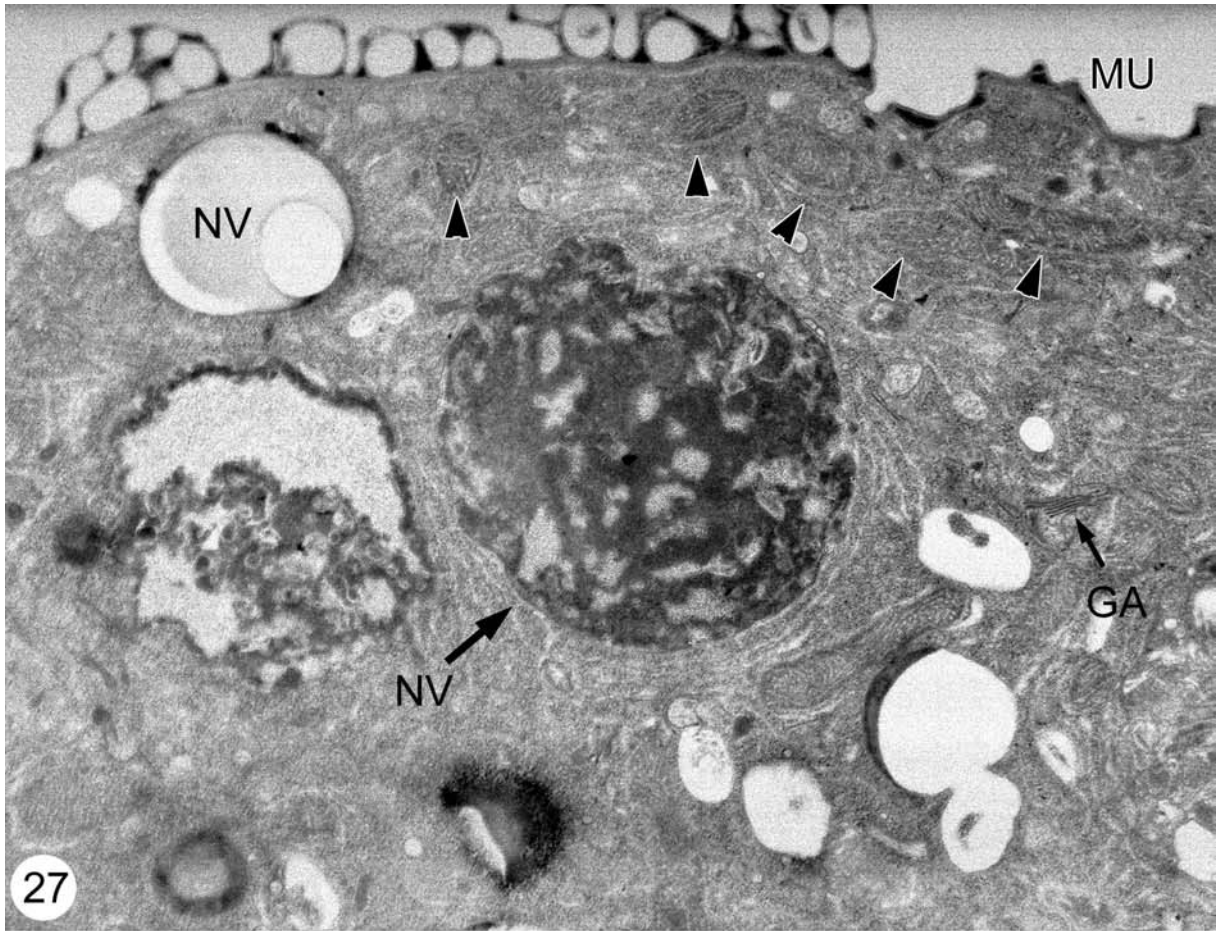
Abb. 27-29 TEM-Aufnahme der Trophonten von *C. irritans* in den Kiemenlamellen

Abb. 27 Trophont im fortgeschrittenen Reifestadium. Unterhalb der spongiösen Schicht befinden sich im Zellcortex zahlreiche Mitochondrien (Pfeilspitzen). Im Inneren einer Nahrungsvakuole ist eine Epidermiszelle des Wirtes erkennbar. x 17860

Abb. 28 Schnitt durch den Grenzbereich Parasit/Wirt. An die spongiöse Schicht hat sich eine Abwehrzelle angelagert. x 22670

Abb. 29 Schnitt durch den Grenzbereich Parasit/Wirt. Zwischen Parasit und Wirt erfolgt kein erkennbarer Kontakt. x 19570

Abkürzungen: CI, Cilium; GA; Golgi-Apparat; MI, Mitochondrium; MU, Mucozyste; NV, Nahrungsvakuole; SP, Spongiöse Schicht; WG, Wirtsgewebe



sem Bereich anzutreffen (Abb. 27, 34, 65). Ihr Erscheinen korrelierte mit der Entwicklung der spongiösen Substanz. Zudem war ein Exkretionskanal im Cortex nachweisbar (Abb. 30). Im Cytoplasma der Stadien lagen zahlreiche Nahrungsvakuolen. Ihre Anzahl stieg mit zunehmendem Wachstum des Trophonten. Dabei fraß der Parasit ganze Wirtszellen, so daß innerhalb der Nahrungsvakuolen verschiedene Epidermiszellen (Abb. 27), Melanozyten (Abb. 25), Granulozyten, Erythrozyten und Makrophagen in verschiedenen Verdauungszuständen anzutreffen waren.

Während Lipideinschlüsse sowohl im Trophonten als auch Protomonten dokumentiert werden konnten (Abb. 25-27), schienen die Golgi-Apparate nur auf den wachsenden Trophonten beschränkt zu sein (Abb. 27, 59). Der Golgi-Apparat bestand dabei aus mehreren abgeflachten Zisternen, deren Ränder teilweise aufgebläht sind (Abb. 59). In ausgereiften Trophonten und anderen Stadien waren Golgi-Apparate nicht mehr nachweisbar (Abb. 114).

Da sowohl der Makro- als auch Mikronucleus von verschiedenen Wissenschaftlern (Brown 1951, Nigrelli und Ruggieri 1966, Colorni und Diamant 1993) bereits eingehend beschrieben sind, wurde die Ultrastruktur der Kerne in dieser Arbeit eher auf generelle Aspekte hin untersucht.

Der Makronucleus setzte sich aus vier Lappen zusammen, deren Anordnung entfernt an einen Halbmond erinnert. Die Membran des Makronucleus hatte eine Doppelmembran. Es traten zahlreiche Kernporen auf.

Mit dem Größenwachstum des Trophonten nahm auch der Makronucleus an Volumen zu und sein elektronendicht erscheinendes "Chromatinnetz" dehnte sich aus (Abb. 25). Im späten Protomonten traten seine vier Segmente nicht mehr derart deutlich hervor. In der weiteren Entwicklung des Parasiten fusionierten sie (Abb. 47).

Auch die Mundöffnung von *Cryptocaryon irritans* ist in der Literatur schon ausgiebig beschrieben worden (Brown 1951, Colorni und Diamant 1993), so daß in dieser Arbeit nur kurz darauf eingegangen wird.

Die Mundöffnung setzte sich aus dem Cytostom (einer breiten Vertiefung) und dem Pharynx (einer engeren Region) zusammen. Sie wurde von einer Krone aus Cilien umgeben, deren Spitzen miteinander eng in Kontakt standen.

Die genauere Untersuchung des Grenzbereiches Parasit/Wirt zeigte keinen erkennbaren Kontakt zwischen Trophont und Wirtsepithel (Abb. 28, 29). In dem bestehenden Zwischen-

Tafel 9

Abb. 30-33 TEM-Aufnahmen von Querschnitten durch den Cortex reifer Trophonten

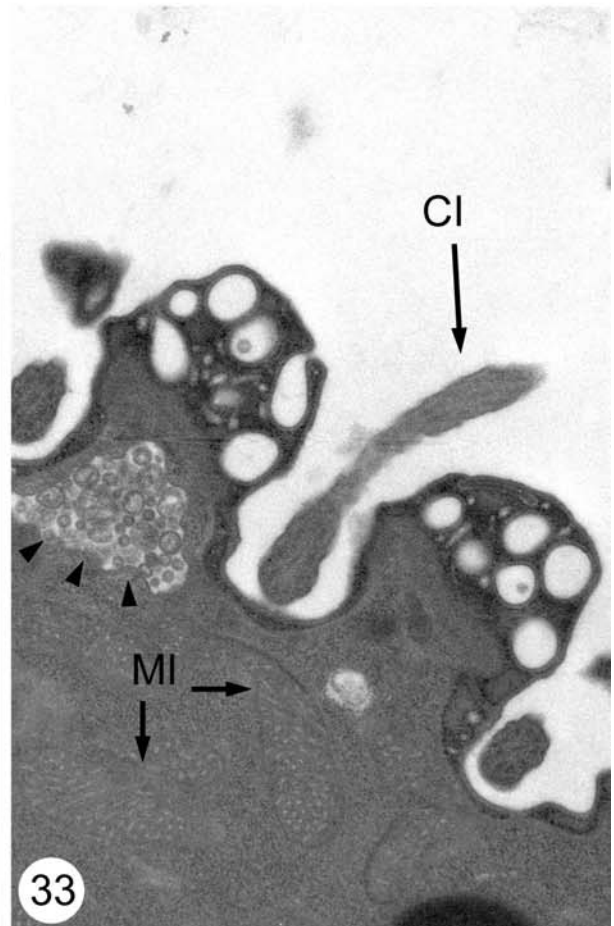
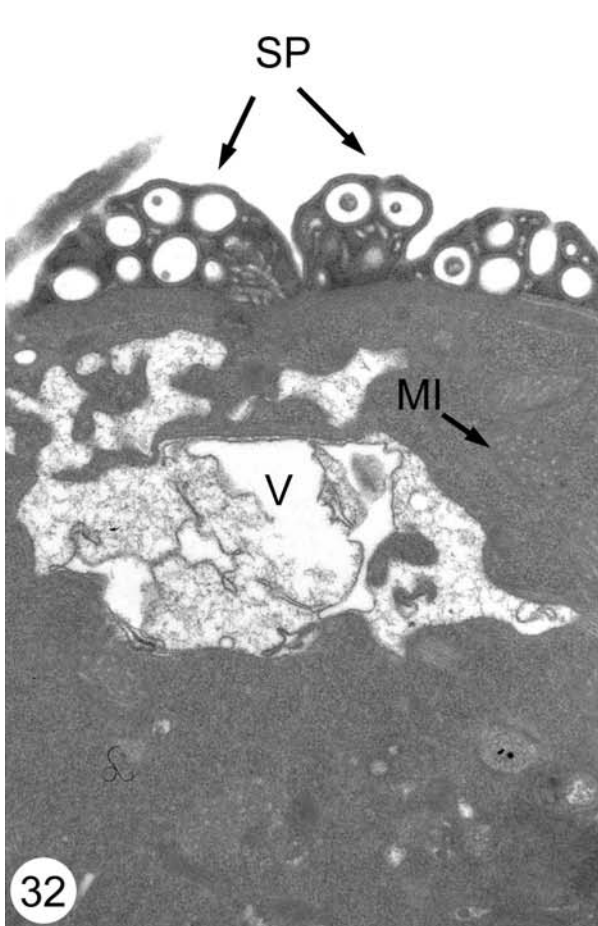
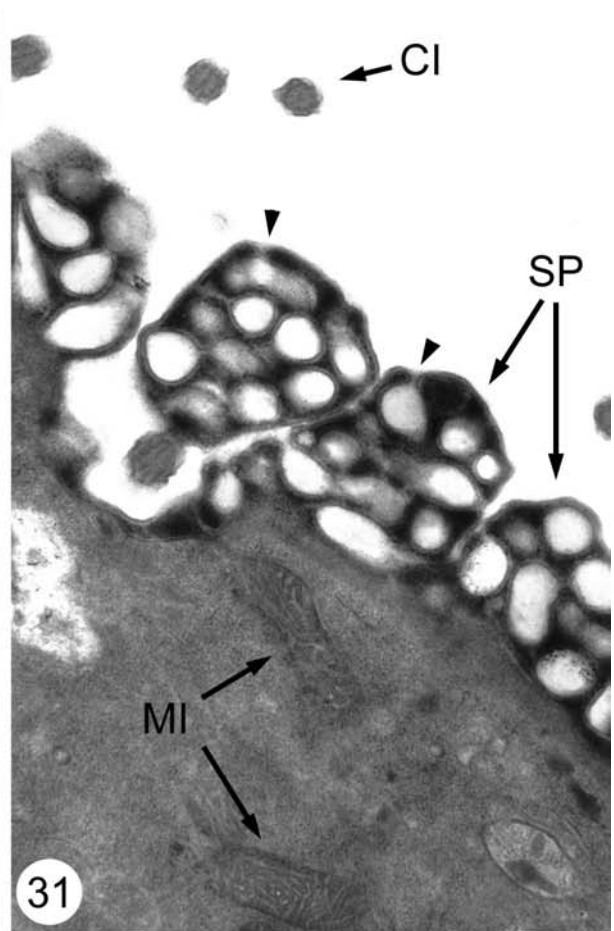
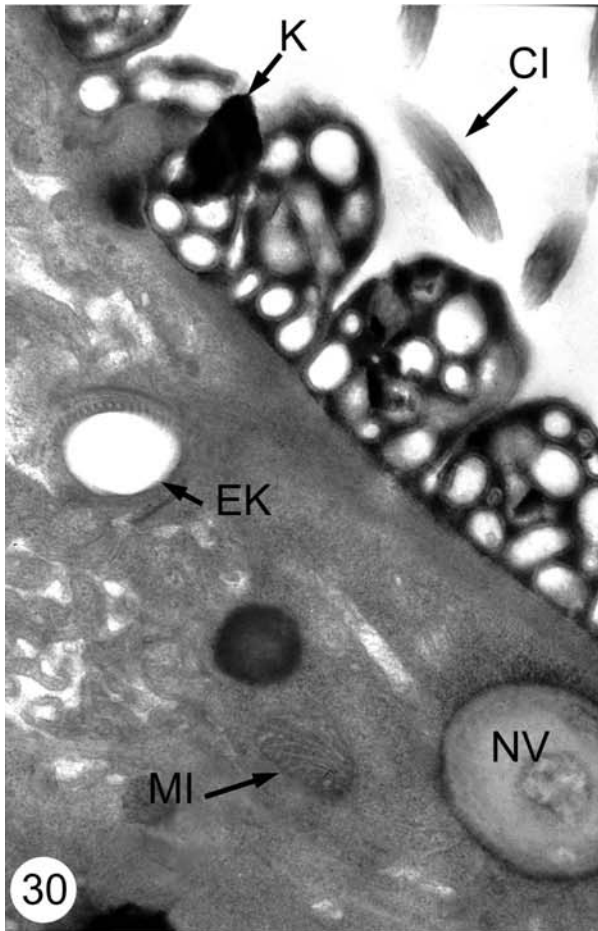
Abb. 30 Randbereich eines Trophonten. Die spongiöse Schicht erscheint elektronendicht. x 30400

Abb. 31 Die vesikelbegrenzenden Membranen sind kontinuierlich mit den Membranen verbunden, die die spongiöse Schicht limitieren (Pfeilspitzen). x 18500

Abb. 32 Im Cortex ist eine Vakuole mit diffusen Einschlüssen anzutreffen. x 19650

Abb. 33 Zahlreiche Mitochondrien liegen im subkortikalen Bereich (peripheren Cytoplasma). Unterhalb der spongiösen Substanz befinden sich cytoplasmatische Einschlüsse unklarer Natur (Pfeilspitzen). x 20900

Abkürzungen: CI, Cilium; EK, Exkretionskanal; K, Kontamination; MI, Mitochondrium; NV, Nahrungsvakuole; SP, Spongiöse Schicht; V, Vakuole



Tafel 10

Abb. 34-37 TEM-Aufnahmen von Trophonten im Bereich des Cortex

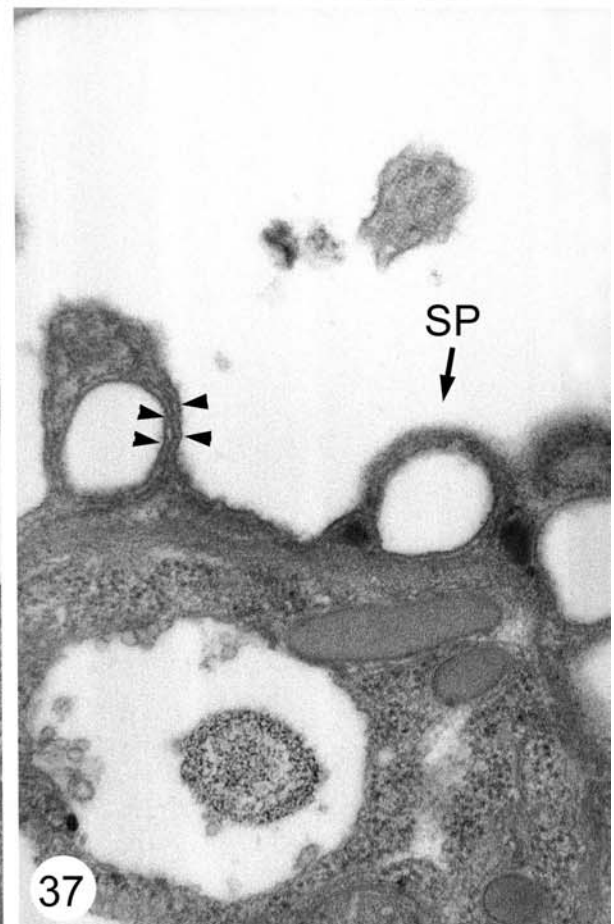
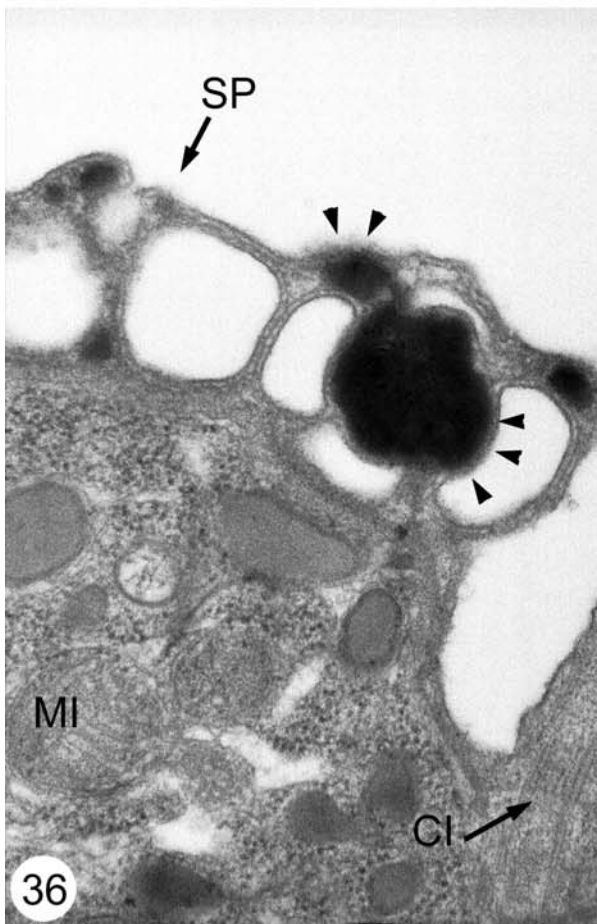
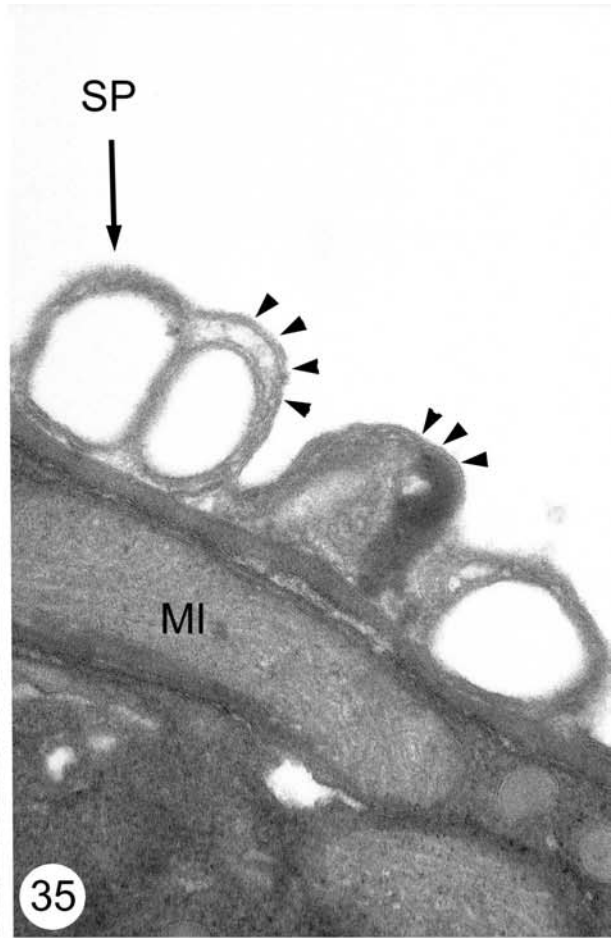
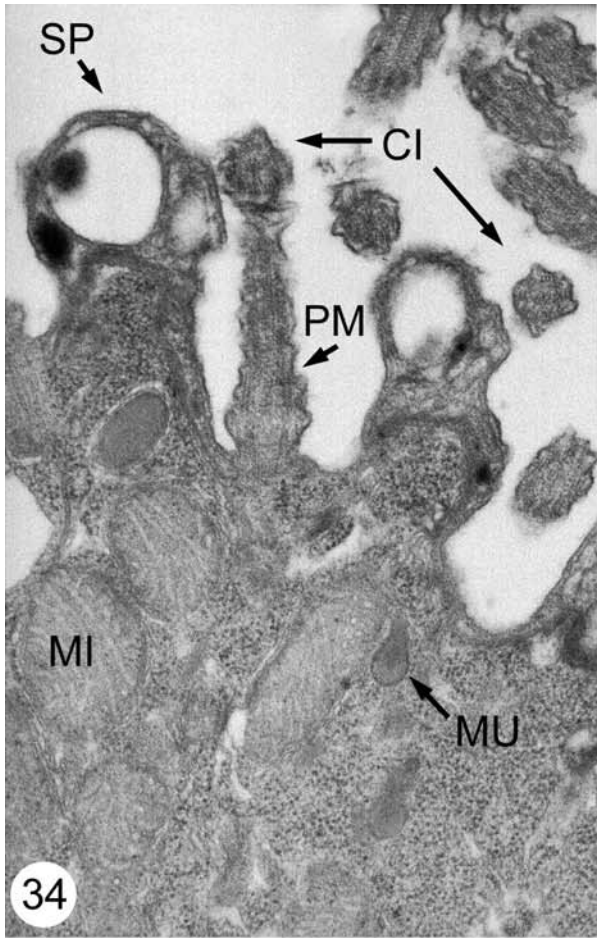
Abb. 34 Zwischen den zellulären Vorsprüngen, denen die spongiöse Substanz aufgelagert ist, ist ein Cilium längsgetroffen. Im peripheren Cytoplasma sind zahlreiche Mitochondrien vorhanden. x 35200

Abb. 35 Die spongiöse Schicht wird von zweilagigen Membranen begrenzt (Pfeilspitzen). x 56000

Abb. 36 Das in der spongiösen Struktur eingelagerte Material erscheint elektronendicht (Pfeilspitzen). x 40000

Abb. 37 Unterhalb der reduzierten spongiösen Schicht befindet sich eine Vakuole mit Einschlüssen unklarer Herkunft. Die spongiöse Struktur wird deutlich von zweilagigen Membranen begrenzt (Pfeilspitzen). x 58180

Abkürzungen: CI, Cilium; MI, Mitochondrium; MU, Mucozyste; PM, Plasmamembran; SP, Spongiöse Schicht



raum waren Cilien und an die spongiöse Schicht angelagerte Abwehrzellen zu erkennen (Abb. 28). Besondere Beachtung fand in dieser Arbeit der Randbereich der verschiedenen Stadien des Ciliaten. Das in der eingangs beschriebenen spongiösen Schicht eingelagerte Material erschien elektronendicht (Abb. 30-37). Die limitierenden Membranen der spongiösen Schicht waren kontinuierlich mit den vesikelbegrenzenden Membranen verbunden (Abb. 31). In Abb. 35 u. 37 war eindeutig zu erkennen, daß die spongiöse Struktur durch zweilagige Membranen begrenzt wurde, der äußeren und der inneren alveolären Membran.

Unterhalb der spongiösen Schicht im Cortex traten neben den zahlreichen Mitochondrien auch Vakuolen auf, deren Einschlüsse unklarer Herkunft waren (Abb. 32, 37). Cytoplasmatische Einschlüsse unbekannter Natur lagen stellenweise direkt unterhalb der zellulären Vorsprünge (Abb. 33).

Wie schon erwähnt, entwickelte sich die spongiöse Schicht mit dem Trophonten und erreichte bei einem drei Tage alten Trophonten ihre maximale Dicke von 3 µm (Abb. 30, 31). In der nachfolgenden weiteren Entwicklung wurde ihre Dicke dann wieder reduziert.

3.3.2 Cyclocestadien der Trophonten von *Cryptocaryon irritans*

Die zahlreichen Nahrungsvakuolen von *Cryptocaryon irritans* konnten analog der Nahrungsvakuolen des konvergenten Ciliaten *Ichthyophthirius multifiliis* anhand ihrer Größe und ihres Kondensationszustands klassifiziert werden (siehe Lobo-da-Cunha und Azevedo 1993).

Vakuolen, die entweder noch fast intakte Wirtszellen enthielten oder deren Inhalt noch nicht kondensiert war, galten als **frühe** Nahrungsvakuolen. Vielfach war dann ein Zwischenraum zwischen Wirtszelle und Vakuole zu beobachten (Abb. 27, 61). Sie waren bei der vorliegenden Untersuchung auch die größten Nahrungsvakuolen innerhalb des Parasiten (Abb. 38, 39).

Mit fortschreitendem Alter der Nahrungsvakuole kam es zu einer Ansammlung von elektronendichtem Material an der Peripherie der Vakuole (Abb. 40). Der Inhalt wurde kondensiert und erschien elektronendicht (Abb. 41). Die Größe der Vakuolen nahm dann ab.

Tafel 11

Abb. 38-43 TEM-Aufnahmen der einzelnen Cyclosestadien reifer Trophonten von *Cryptocaryon irritans*

Abb. 38 Übersichtsaufnahme. Im peripheren Cytoplasma des Trophonten liegen Nahrungsvakuolen verschiedener Stadien. x 9400

Abb. 39 Junge Nahrungsvakuolen mit fast intakten Wirtszellen in den tiefen Plasmaregionen des Parasiten. x 9100

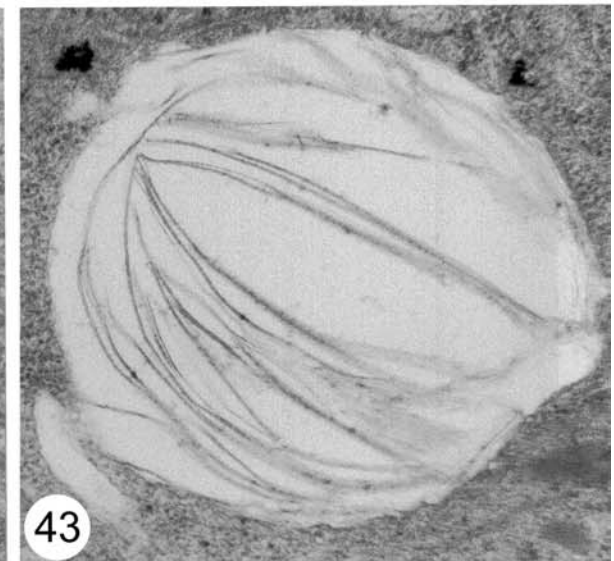
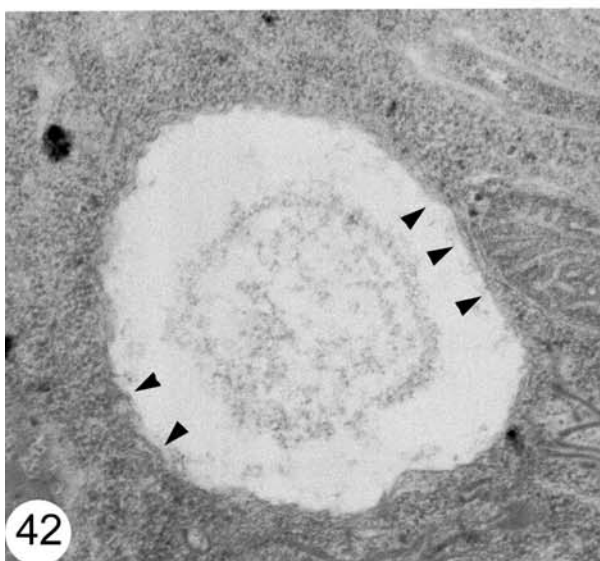
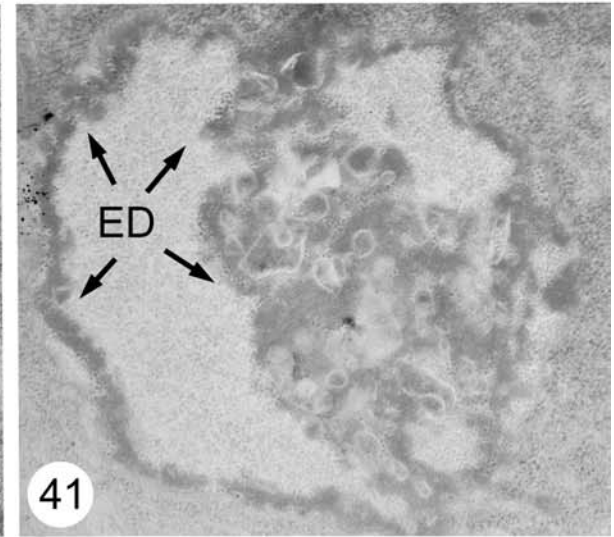
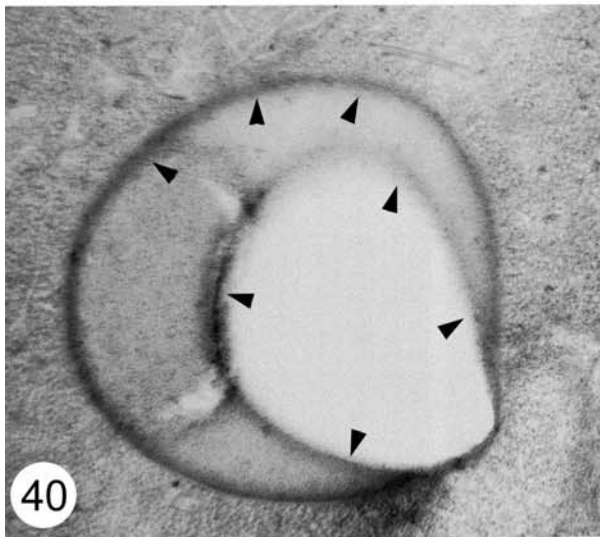
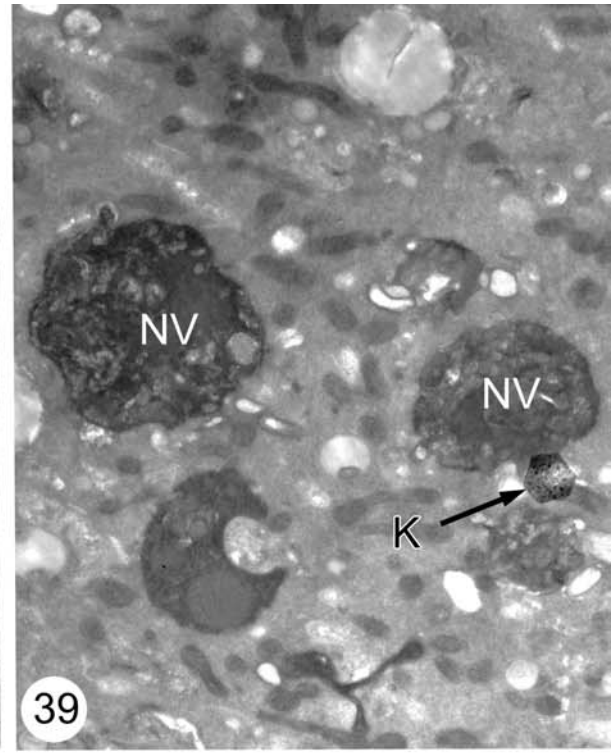
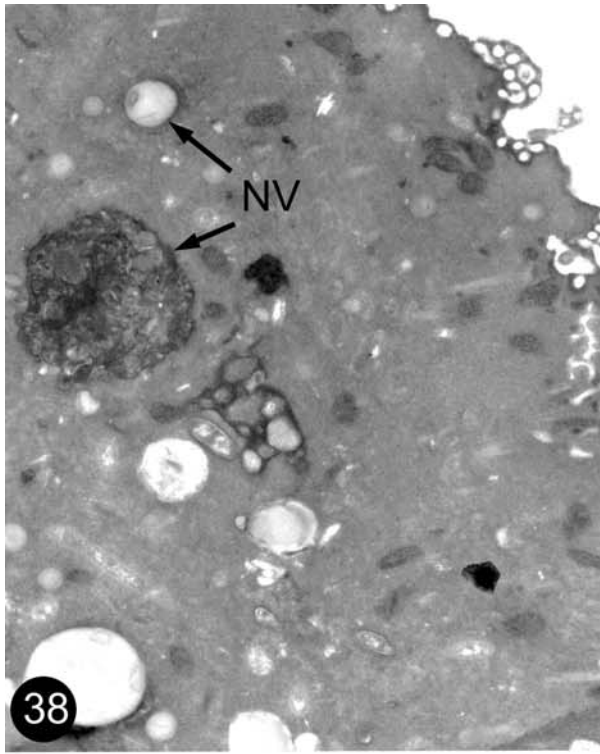
Abb. 40 Ansammlung von elektronendichtem Material an der Peripherie (Pfeilspitzen). x 39530

Abb. 41 Fortgeschrittene Kondensation des Inhalts der Nahrungsvakuole. x 45040

Abb. 42 Späte Nahrungsvakuole mit kondensierter Verdauungsmasse. Charakteristisch ist der leere Raum zwischen Zentrum und Peripherie (Pfeilspitzen). x 33000

Abb. 43 Die Membran löst sich ab und die Vakuole expandiert. x 43520

Abkürzungen: ED, Elektronendichtes Material; K, Kontamination; NV, Nahrungsvakuole



Ältere Nahrungsvakuolen wurden durch einen leeren Raum zwischen Zentrum und Peripherie der Vakuole charakterisiert (Abb. 42). Die Größe dieser Vakuolen unterschied sich hier nicht von denen "mittlerer" Reife. Schließlich löste sich die Membran in Teile auf und es entstand ein Hohlraum (Abb. 43).

3.3.3 Ultrastruktur der Bodenstadien – Tomonten und Tomiten

Nach der Anheftung an geeignetes Substrat wandelte sich der Protomont innerhalb von 24 h zum Tomonten um (siehe 3.1). Der 24 h alte Tomont war bereits von einer mehrlagigen Zystenwand umgeben (Abb. 44). Eine charakteristische Struktur der Zystenwand war nicht erkennbar. Zystenwand und eigentlicher Parasit standen nicht im Kontakt zueinander. An der Peripherie von *C. irritans* waren noch Extrusomen nachweisbar, die spongiöse Schicht fehlte aber (Abb. 44, 50-51). Die randständigen Extrusomen wurden von einer Plasmamembran begrenzt und lagen in verschiedenen Stadien vor (Abb. 50, 51). Zahlreiche winzige, elektronendichte runde Partikel fanden sich im kortikalen Plasma (Abb. 50, 51). Ciliäre Strukturen waren allerdings im frühen Tomonten nicht mehr zu belegen.

Der Cortex des Stadiums sowie das tiefere Cytoplasma enthielten elektronenlichte Vakuolen bzw. Hohlräume (Abb. 44, 45) und zahlreiche kugelig-ovoide Mitochondrien mit tubulären Cristae (Abb. 44). Auch Nahrungsvakuolen in fortgeschrittenen Cyclosestadien waren erkennbar. Sie unterschieden sich nicht von den Nahrungsvakuolen in den Trophonten oder Protomonten (Abb. 44-46). Membranstapel unbekannter Herkunft waren zudem im Cytoplasma zu finden. Vereinzelt treten zu diesem Zeitpunkt sehr junge Tomiten im Cytoplasma auf (Abb. 45).

Im vier Tage alten Tomonten erwiesen sich die Tochterzellen bereits als sehr differenziert. Die Tomiten lagen ohne erkennbare Kontakte untereinander in den Bodenstadien. Die Zwischenräume waren mit unzähligen Cilien gefüllt, da die Tomiten sehr dicht mit Cilien besetzt sind (Abb. 47).

Charakteristisch waren jetzt die Vorstufen der spongiösen Schicht, die als elektronendichter Saum den Parasiten umgaben (Abb. 49, 53).

Tafel 12

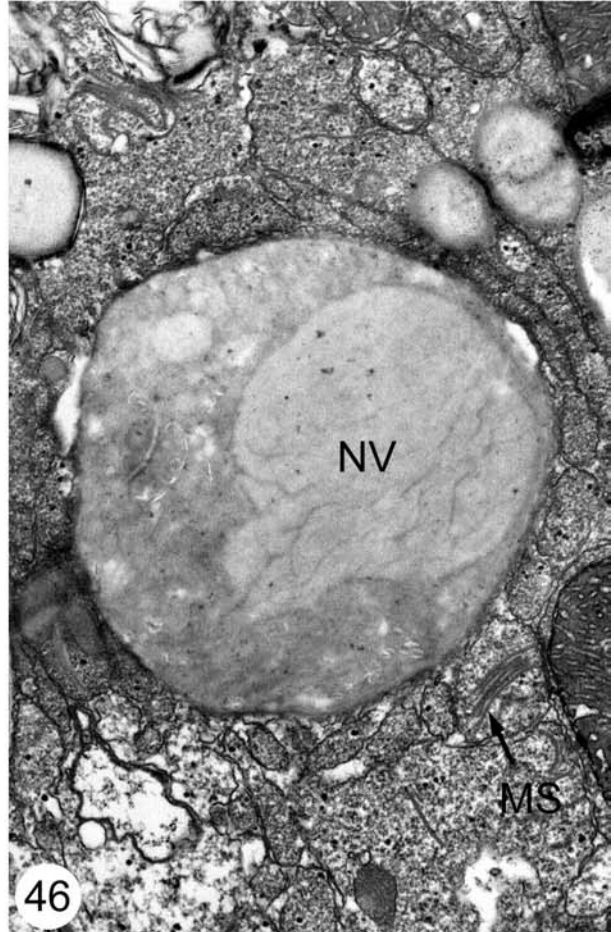
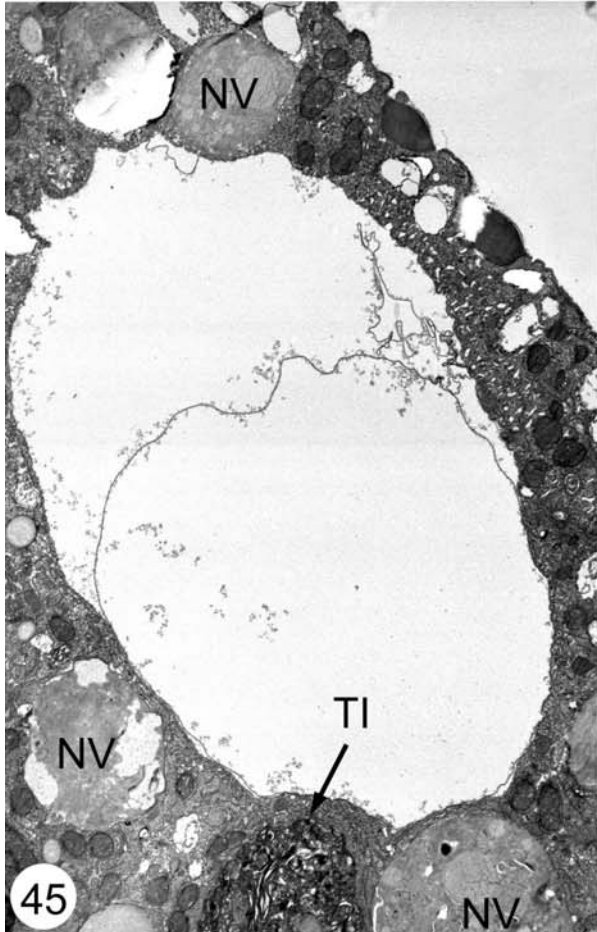
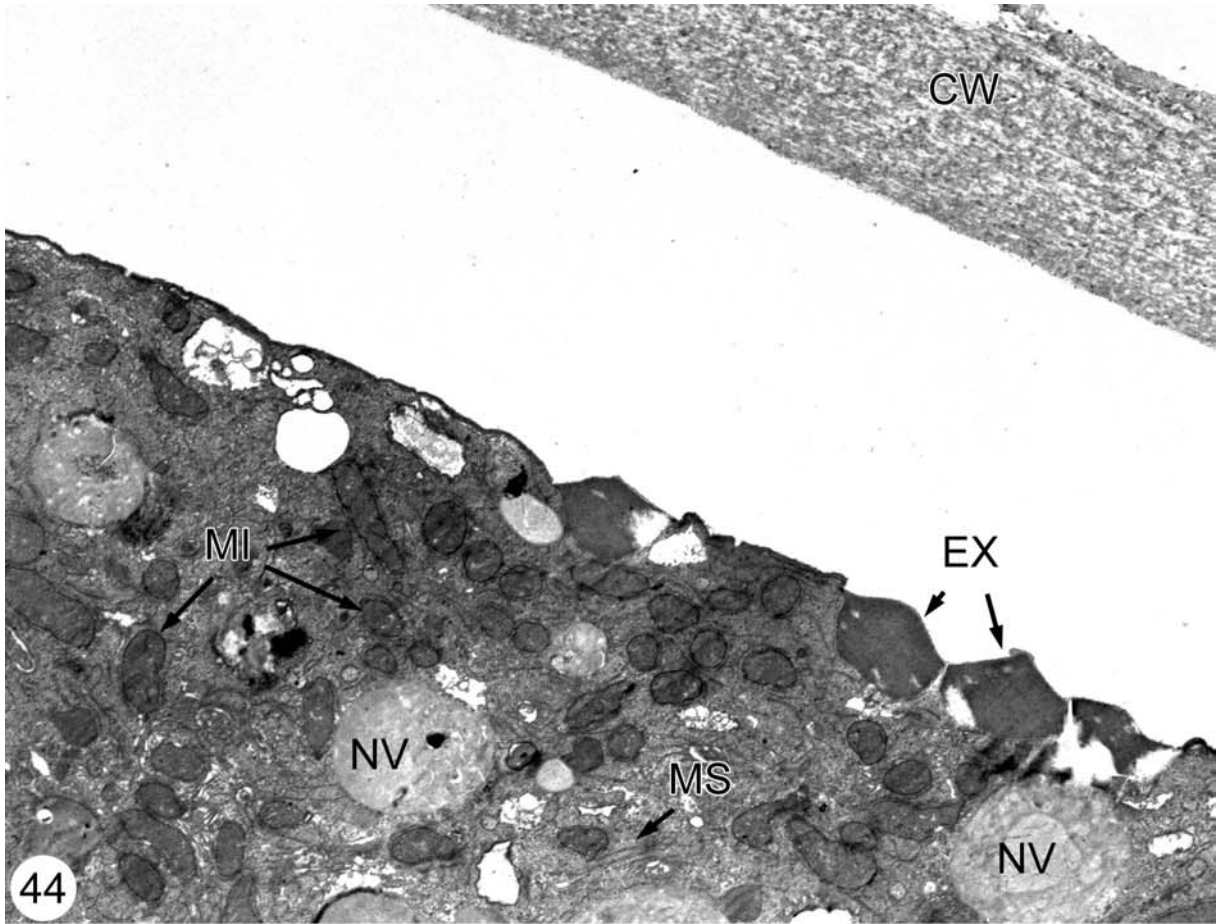
Abb. 44-46 TEM-Aufnahmen der Bodenstadien von *C. irritans*

Abb. 44 Übersichtsaufnahme. Randbereich eines Tomonten. Die mehrschichtige Zystenwand zeigt keine charakteristischen Strukturen. An der Peripherie des Tomonten liegen Extrusomen, im kortikalen Plasma sind neben zahlreichen Mitochondrien auch Nahrungsvakuolen späterer Cyclosestadien anzutreffen. x 7670

Abb. 45 Schnitt durch die Peripherie. Das Plasma ist gefüllt mit Mitochondrien und Nahrungsvakuolen. Unterhalb der großen Vakuole ist ein junger Tomit mit Cilien erkennbar. x 5460

Abb. 46 Die Nahrungsvakuolen innerhalb des Tomonten unterscheiden sich nicht von den Nahrungsvakuolen der Trophonten. x 29470

Abkürzungen: CI, Cilium; CW, Cystenwand; EX, Extrusom; MI, Mitochondrium; MS, Membranstapel; NV, Nahrungsvakuole; TI, Tomit



Tafel 13

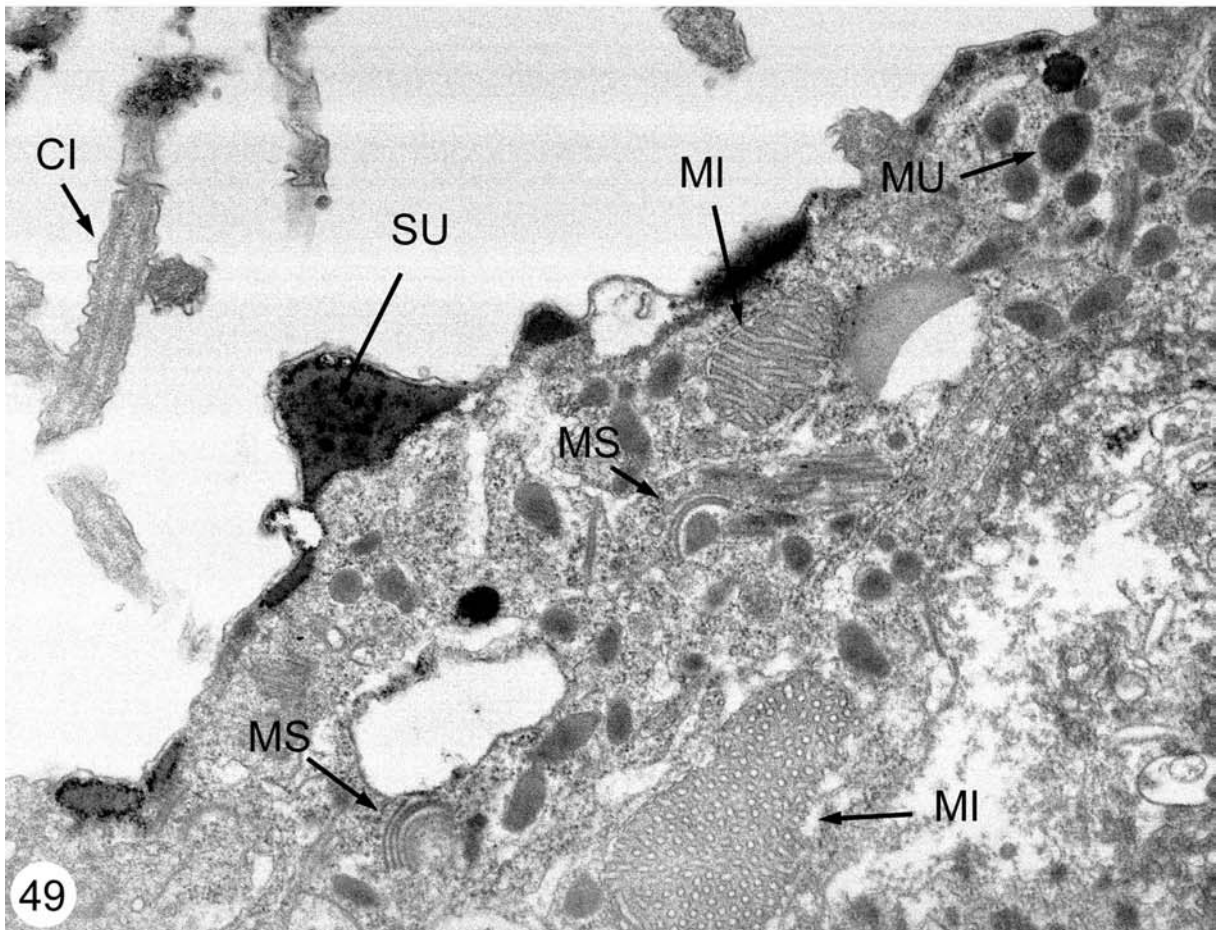
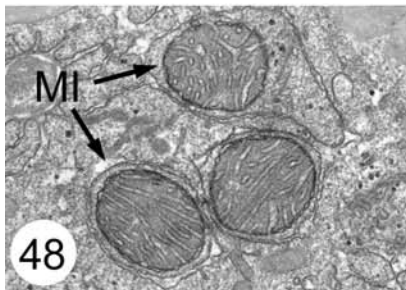
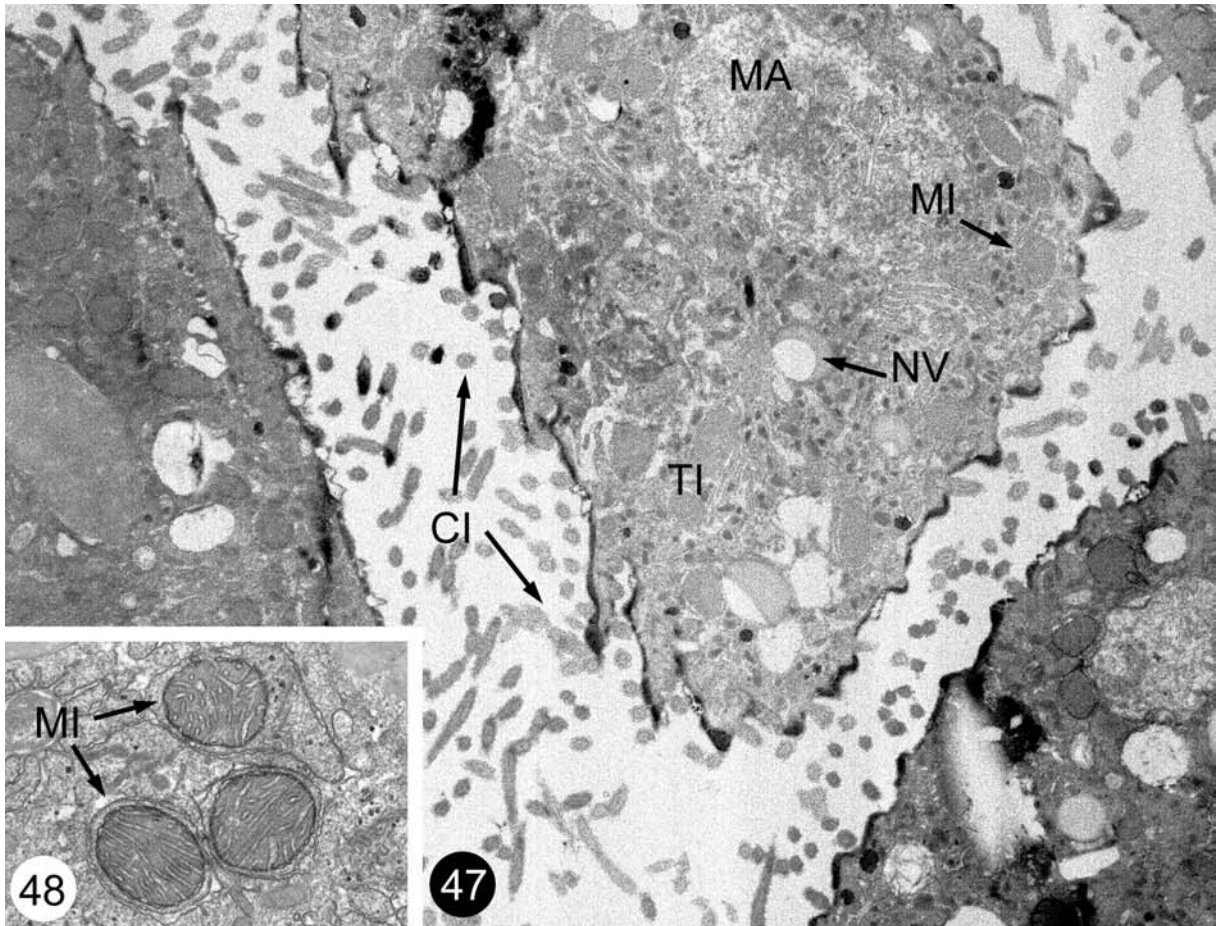
Abb. 47-49 TEM-Aufnahmen reifer Tomiten von *Cryptocaryon irritans*

Abb. 47 Übersichtsaufnahme. Der junge Tomit enthält neben vielen Mitochondrien auch Nahrungsvakuolen. Untereinander haben die Tomiten keinen Kontakt. In den Zwischenräumen sind Anschnitte der Cilien zu erkennen. x 13770

Abb. 48 Schnitt durch die Mitochondrien aus dem Plasma eines Tomiten. Es sind keine Unterschiede zu den Mitochondrien der hautständigen Stadien nachweisbar. x 14900

Abb. 49 Peripherie des Tomiten. Die Vorstufen der spongiösen Schicht sind erkennbar. Unterhalb des Plasmalemmas befinden sich Mucozysten mit teilweise assoziierten Membranstapeln. x 34000

Abkürzungen: CI, Cilium; MA, Makronucelus; MI, Mitochondrium; MS, Membranstapel; MU, Mucozyste; NV, Nahrungsvakuole; SU, Spongiöse Substanz; TI, Tomit



Tafel 14

Abb. 50-53 TEM-Aufnahmen des Cortex der Bodenstadien von *C. irritans*

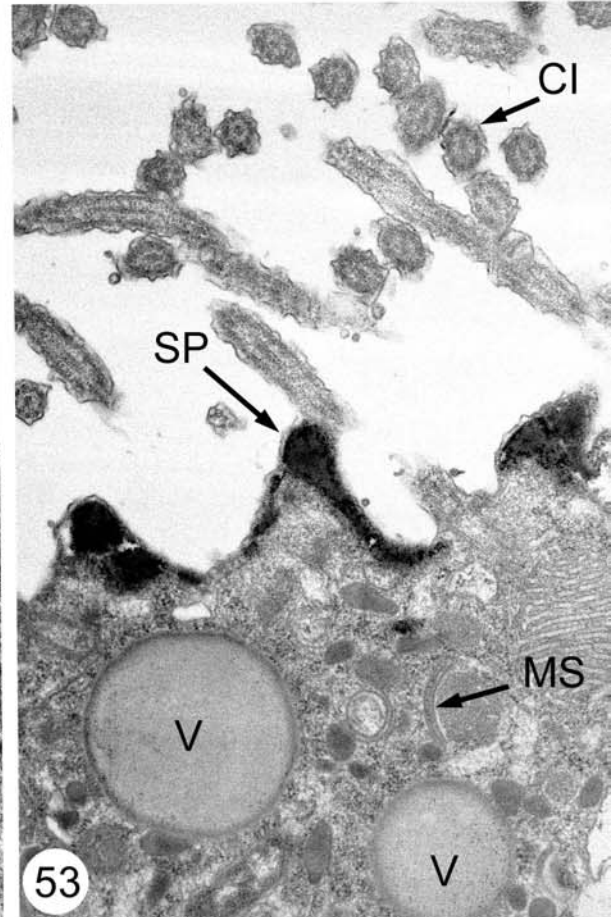
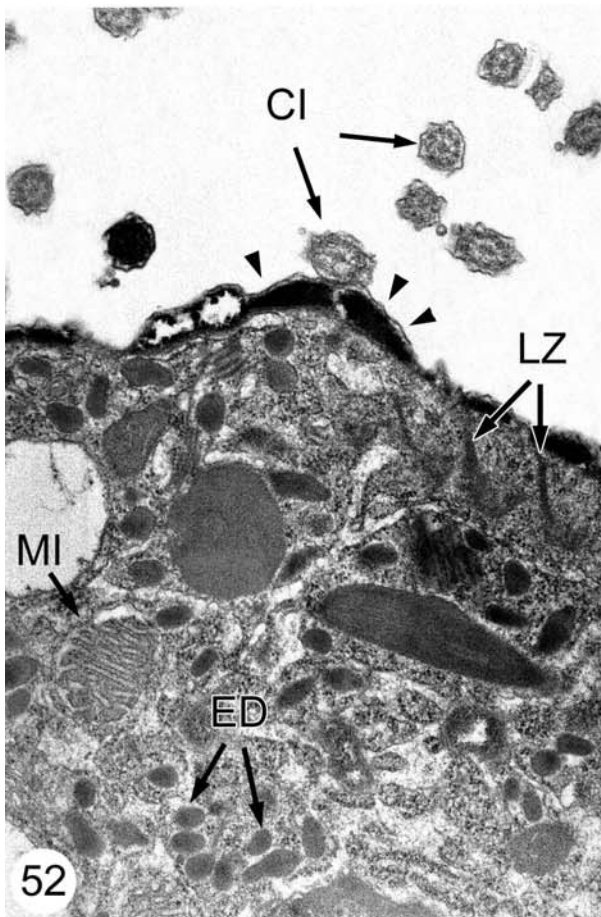
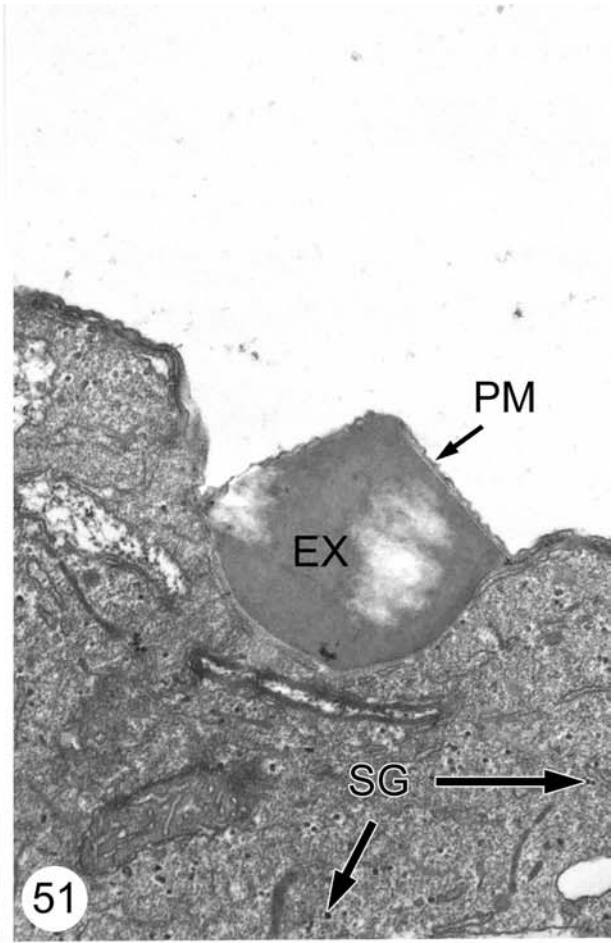
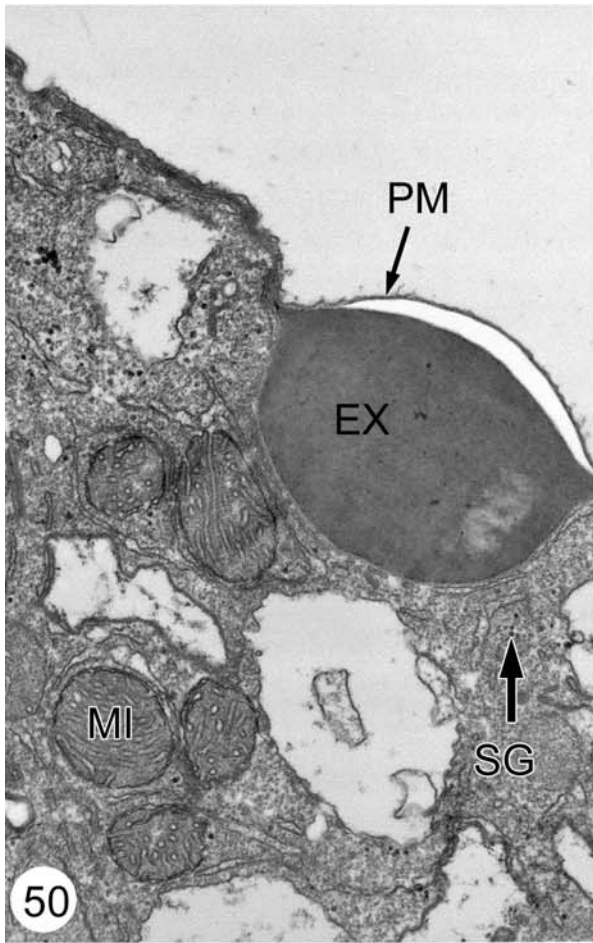
Abb. 50 In den Tomonten sind randständige Extrusomen zu erkennen. Sie werden von der Plasmamembran begrenzt. x 25024

Abb. 51 Dieses Extrusom befindet sich im fortgeschrittenen Zustand und ist kurz davor, die Plasmamembran zu durchstoßen. x 25690

Abb. 52 An der Peripherie des Tomiten ist eine beginnende Sekretion der spongiösen Schicht zu erkennen (Pfeilspitzen). Im kortikalen Plasma befinden sich neben elektronendichten Körnchen auch lanzettförmige Organellen unbekannter Herkunft. x 27200

Abb. 53 Fortgeschrittene Sekretion der spongiösen Schicht. Im Plasma sind neben Vakuolen auch Membranstapel erkennbar. x 27200

Abkürzungen: CI, Cilium; ED, Elektronendichte Körnchen; EX, Extrusom; LZ, Lanzettförmige Organelle; MI, Mitochondrium; MS, Membranstapel; PM, Plasmamembran; SG, Sekretorische Körnchen; SP, Spongiöse Schicht; V, Vakuole



Im äußeren Randbereich des Cortex direkt unterhalb der spongiösen Schicht befanden sich auch symmetrische, lanzettförmige Organellen (Abb. 52). Mitochondrien, Mucozysten und Membranstapel waren ebenfalls nachweisbar (Abb. 52, 53).

Innerhalb des Cytoplasmas traten ebenfalls zahlreiche Vakuolen und kugelig-ovoide Mitochondrien auf (Abb. 47, 49). Letztere unterschieden sich transmissions-elektronenmikroskopisch nicht von denen der hautständigen Stadien. Die Mitochondrien von *Cryptocaryon irritans* zeigten den typischen Aufbau aus zwei Membranen, wobei die innere Membran stets tubulusförmige Invaginationen bildete (Abb. 48, 49). Im Cytoplasma waren außerdem zahlreiche elektronendichte Einschlüsse verschiedener Größe sowie Membranstapel nachweisbar (Abb. 49, 53). Die größeren elektronendichten Einschlüsse stellten frühe Mucozysten dar (Abb. 49), die kleinen schienen bei der Sekretion in Funktion zu treten (Abb. 47, 49).

Im Tomiten erschien der Makronucleus elektronenlichter als in den hautständigen Stadien. Die unter Punkt 3.3.1 beschriebenen vier nucleären Segmente waren zu einer Art großem Knäuel verschmolzen (Abb. 47). Mikronuclei konnten auch hier nicht gefunden werden.

Die ausdifferenzierten Tomiten durchstießen im Schnitt nach ca. 6 Tagen die Zystenwand und schlüpfen dann offenbar innerhalb weniger Minuten aus schmalen Öffnungen auf der Zystenoberseite. Als Theronten suchten sie aktiv einen geeigneten Wirtsfisch. Die Theronten erschienen birnenförmig, dicht mit 8-9 μm langen Cilien besetzt. Sie variierten in der Länge zwischen 42-59 μm . Zum nachfolgenden Stadium, dem Phoronten, gab es kaum morphologische Unterschiede.

Da die Theronten schon Ziel ausgiebiger Studien waren (Brown 1951, Colorni und Diamant 1993, Matthews et al. 1993, Yoshinaga und Dickerson 1994), wurde ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Ultrastruktur der Phoronten gelegt.

Zur Morphologie von *Cryptocaryon irritans* ist festzuhalten, daß trotz unterschiedlicher ultrastruktureller Organisation der verschiedenen Entwicklungsstadien auch in dieser Untersuchung weder die Organellen von Lieberkühn noch kontraktile Vakuolen nachweisbar waren.

3.4 Histochemische Untersuchungen

Zum Schutz vor den Abwehrreaktionen des Immunsystems des Wirtes haben viele Parasiten einen “surface coat” aus aufgelagerten Mucopolysacchariden entwickelt.

Die Darstellung dieses surface coats gelingt mit den verschiedensten Methoden, wobei die meisten auf immun-elektronenmikroskopischen Verfahren basieren. Am günstigsten ist es, die vermuteten Strukturen durch eine spezifische Markierung nachzuweisen. Somit werden sie nicht nur lokalisiert und ihre Schichtdicke bestimmt, sondern es können durch geeignete Markierungsmittel auch Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung des surface coats gezogen werden.

3.4.1 Ultrastruktur der Phoronten nach Fixierung mit Tannin

Tannin (franz.: tanin = Gerbstoff) ist eigentlich ein abgeleiteter Gruppenname für eine Reihe von natürlichen Polyphenolen verschiedenster Zusammensetzung. Sie werden aufgrund ihrer Abstammung von der Gallussäure auch als Gallotannine bezeichnet (Römpp 1998). In der Elektronenmikroskopie wird die Substanz häufig zur ultrastrukturellen Untersuchung der Membran-en, Cilien und fibrillärer Elemente eingesetzt (Luft 1971 a, b, Torikata 1988, Inamitsu et al. 1990). Tannin dient als Beizmittel, wobei osmifizierte Strukturen durch bleihaltige Nachkontrastierungsmittel stark kontrastiert werden. Dabei ist der genaue Wirkmechanismus bis heute nicht bekannt (Robinson 1985). Man vermutet aber, daß durch die Nachfixierung mit OsO_4 eine Ausfällungsreaktion entsteht und so die Proteine sichtbar gemacht werden (Ruider 1995).

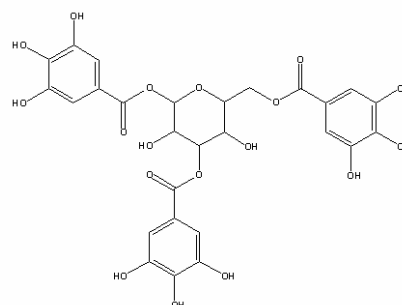


Fig. 3.1 Tannin

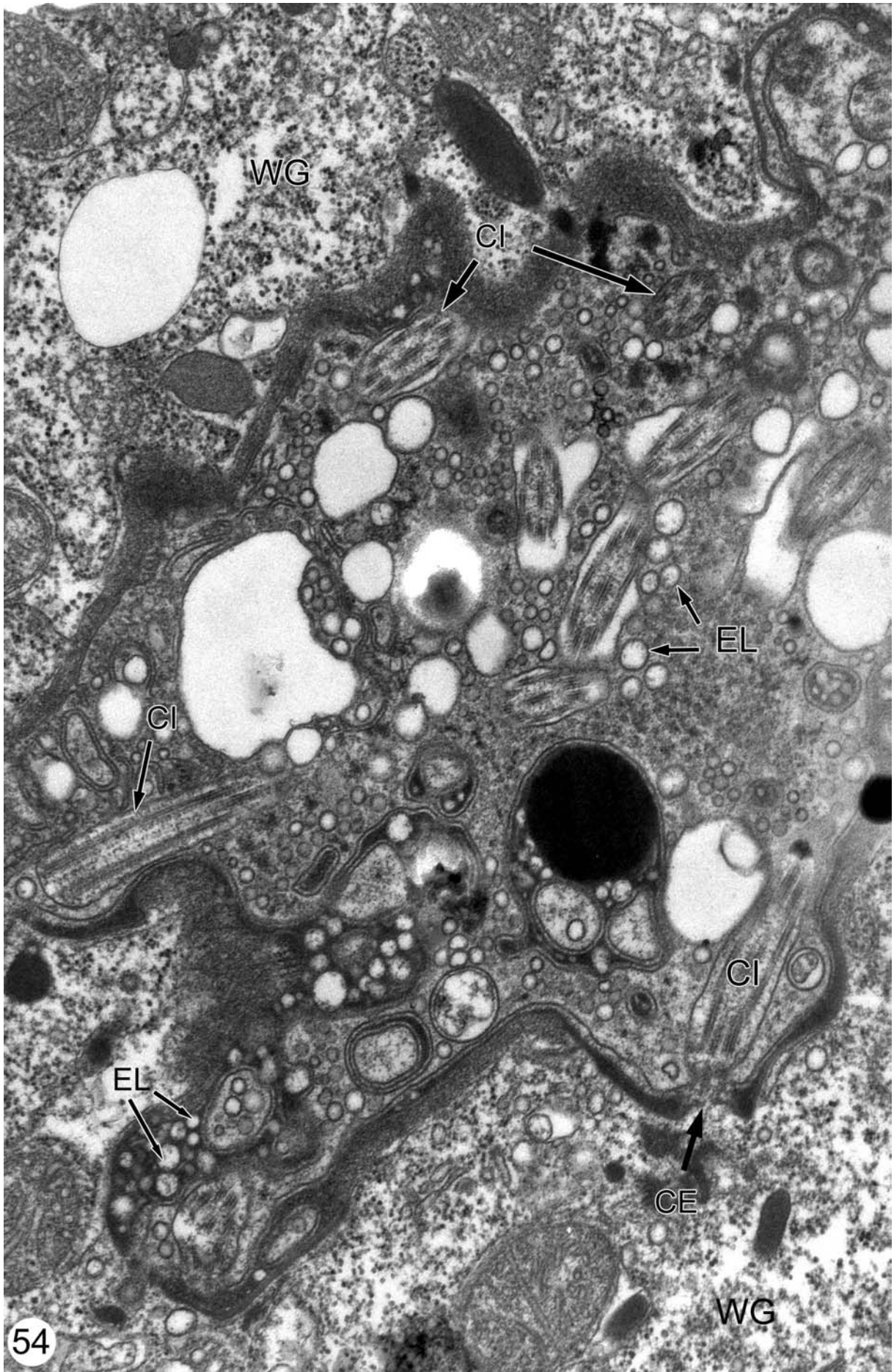
Durch die Behandlung mit Tannin während der Fixierung sollte in dieser Untersuchung die Ultrastruktur des Parasiten im Hinblick auf das Vorhandensein eines surface coats genauer untersucht werden.

Tafel 15

Abb. 54 TEM-Aufnahme eines jungen Phoronten von *C. irritans* im Wirtsgewebe nach Behandlung mit Tannin

Abb. 54 Übersichtsaufnahme, ca. 10 min nach dem Eindringen. Direkt unterhalb des Plasmalemmas ist eine gleichmäßige elektronendichte Schicht von ca. 0,7 μm Dicke nachweisbar. Im Cortex des Phoronten liegen zahlreiche Vakuolen und Cilien. Das Plasma ist mit elektronenlichten Vesikeln angefüllt. Vereinzelt treten Bestandteile der spongiösen Schicht auf. Eine besondere Markierung der Zellorganellen durch Tannin ist nicht zu erkennen. x 45900

Abkürzungen: CE, Cortikale Einstülpung; CI, Cilium; EL, Elektronenlichte Vesikel; WG, Wirtsgewebe



Tafel 16

Abb. 55-58 TEM-Detailaufnahmen junger Phoronten in der Haut des Wirtes nach Tannin-Behandlung

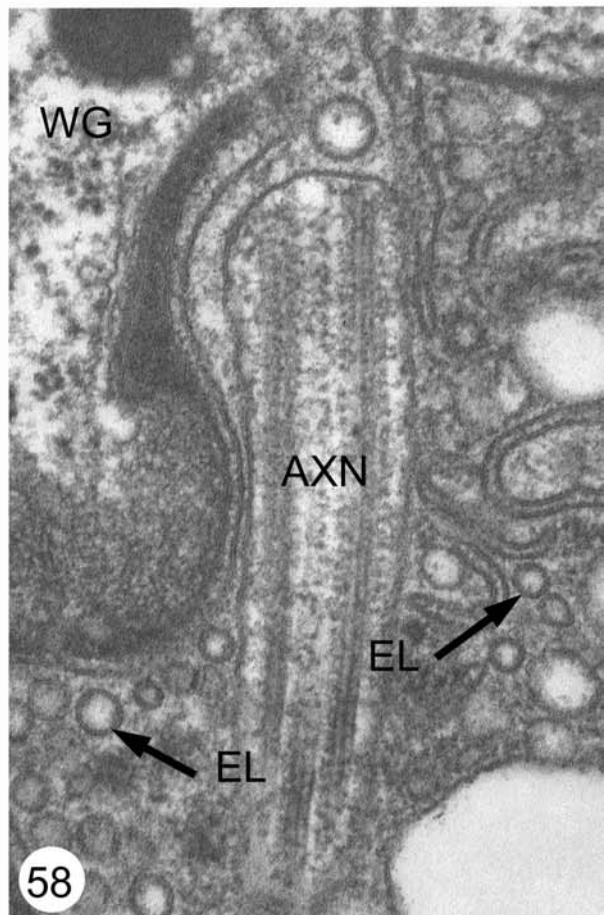
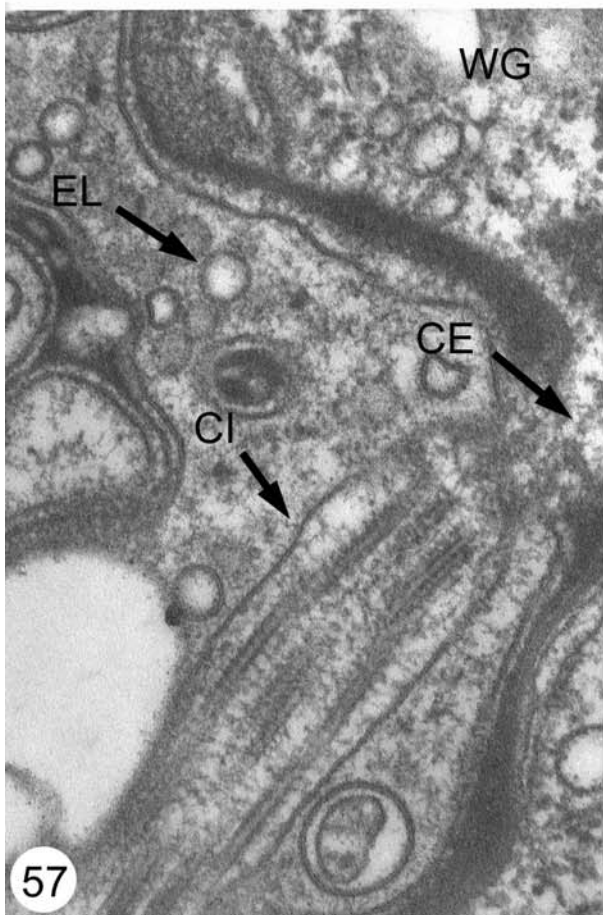
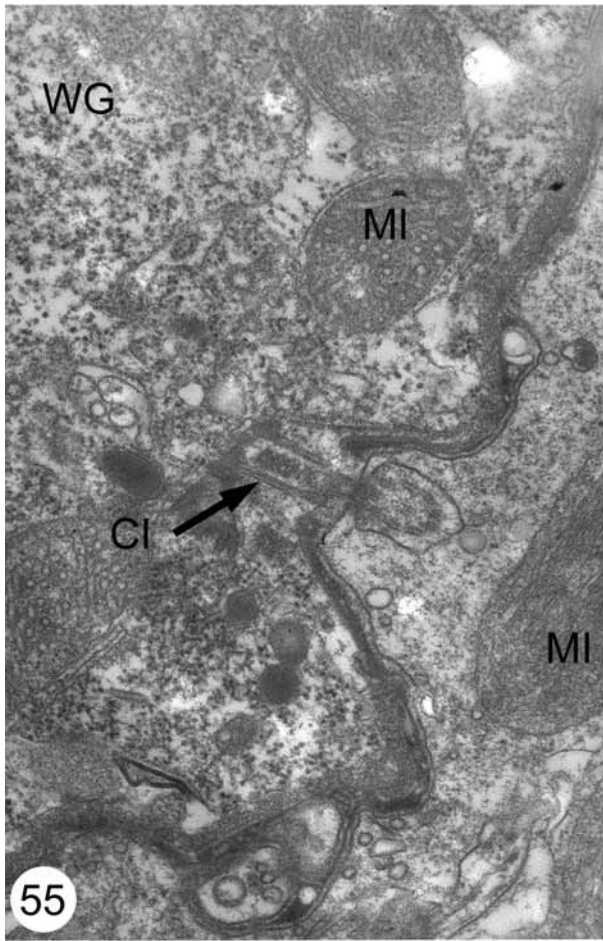
Abb. 55 Schnitt durch den Grenzbereich Parasit/Wirt. Im Cytoplasma des Wirtes ist ein Cilium erkennbar. Im cortikalen Plasma des Phoronten sind nur wenige Mitochondrien nachweisbar. Eine Anlagerung von Tannin ist nicht festzustellen. x 36670

Abb. 56 Grenzbereich Parasit/Wirt. Die elektronenlichten, kreisförmigen Bereiche von spongiöser Struktur bilden die Vorstadien der späteren spongiösen Schicht. Eine spezifische Markierung bestimmter Strukturen durch Tannin läßt sich nicht nachweisen. x 57260

Abb. 57 Schnitt durch den Bereich einer Invagination eines Ciliums im Cortex. Auch hier hat Tannin keine erkennbaren Auswirkungen auf die Zellorganellen.
x 90000

Abb. 58 Das im Cortex des Phoronten liegende Cilium zeigt im Längsschnitt den charakteristischen Aufbau des Axonems. Eine Markierung mit Tannin ist nicht nachweisbar. x 97200

Abkürzungen: AXN, Axonem; CE, Cortikale Einstülpung; CI, Cilium; EL, Elektronenlichte Vesikel; MI, Mitochondrium; SU, Spongiöse Substanz; WG, Wirtsgewebe



Ca. 10 Minuten nach dem Eindringen lag der Phoront komplett im Wirtsepithel vor. Form und innere Organisation dieses frühen Phoronten unterschieden sich deutlich von allen anderen Entwicklungsstadien (Abb. 59). Der Phoront schien sich innerhalb des Wirtsgewebes neu zu strukturieren.

Zwischen Parasit und Wirtsgewebe traten keine erkennbaren Zwischenräume auf (Abb. 54-56). Unmittelbar unterhalb des Plasmalemmas war eine gleichmäßige, fast kontinuierliche elektronendichte Schicht zu erkennen. An einigen Stellen wurde sie durch elektronenlichere Bereiche durchbrochen (Abb. 59). Kortikale Invaginationen von Cilien waren erkennbar (Abb. 54, 57, 58). Die eingelagerten Cilien zeigten im Längsschnitt den charakteristischen Aufbau des Axonems (Abb. 58). Cilien von *C. irritans* zeigen das charakteristische Tubuli-Muster von $9 \times 2 + 2$ (Abb. 64). Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen traten nach der Tanninbehandlung keine erkennbaren Unterschiede auf.

Im Cortex waren nicht nur zahlreiche unterschiedliche Vakuolen, sondern auch viele Cilien nachweisbar. Vereinzelt lagen Cilien des Parasiten aber auch im Cytoplasma des Wirtes (Abb. 55). Bei den vorangegangenen Phasen konnte eine "Einlagerung" der ciliären Strukturen nicht festgestellt werden.

Auch im Tomonten konnten keine eingelagerten Cilien beobachtet werden (Abb. 47-53). Eine besondere Markierung der ciliären Strukturen durch Tannin trat nicht auf.

Es gab mehrere Vakuolentypen unterschiedlichster Größe. Einige waren elektronenlicht und erschienen durch eine einzelne Membran begrenzt, andere waren elektronendichter und von zwei Membranen umgeben (Abb. 54). An Mitochondrien konnten nur wenige im kortikalen Plasma nachgewiesen werden (Abb. 55, 56). Sie unterschieden sich nicht von den Mitochondrien anderer Stadien. Auch hier war keine besondere Markierung mit Tannin erkennbar.

Das Plasma war mit zahlreichen elektronenlichten Vesikeln angefüllt, vereinzelt traten Bestandteile der spongiösen Schicht auf (Abb. 54, 56).

Im Grenzbereich Parasit/Wirt waren elektronenlichte kreisförmige Bereiche von spongiöser Struktur festzustellen. Sie bildeten die Vorstadien der späteren spongiösen Schicht (Abb. 56). Hier war ebenfalls keine spezifische Markierung bestimmter Strukturen durch den Gerbstoff nachweisbar.

Eine spezielle Markierung der verschiedenen parasitären Zellorganellen innerhalb des Phoronten war nicht zu erkennen. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen traten

keine definierbaren Unterschiede auf. Falls die Behandlung mit Tannin Effekte auf den Parasiten gehabt haben sollte, so waren diese nur marginal. Membranen, Cilien und Mitochondrien zeigten keine nachweisbaren An- bzw. Einlagerungen des Gerbstoffs. Sie erschienen auch nicht vergrößert oder aufgebläht. Im Cytoplasma des Parasiten konnten keine eindeutigen Effekte der Behandlung nachgewiesen werden. Die kontrastreiche Darstellung der Präparate könnte auf eine erhöhte Einlagerung von Osmium infolge des Eindringens von Tannin zurückzuführen sein (Abb. 54).

3.4.2 Ultrastruktur der Trophonten nach Fixierung mit Alcianblau

Alcianblau 8 GX ist ein hochpolymerer kationischer Farbstoff, der ein zentrales Kupferatom enthält. In den 60er Jahren wurde die Substanz als zuverlässiges histochemisches Färbereagens für saure Mucopolysaccharide im Lichtmikroskop eingesetzt (Luft 1976). Wahrscheinlich bindet Alcianblau über Salzbindungen an Polymere hoher negativer Ladung (Behnke und Zelander 1970). Im selben Zeitraum wurde Alcianblau in verschiedenen Standardverfahren für die Elektronenmikroskopie getestet. Aber erst 1970 erzielten Behnke und Zelander durch die Kombination von Alcianblau mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid, befriedigende Markierungen. Schofield et al. etablierten 1975 durch Zugabe von $MgCl_2$ ein Verfahren, um besonders Proteoglykane und Glykosaminoglykane zu markieren.

Durch Zugabe von Alcianblau während der Fixierung lassen sich die der Plasmamembran aufgelagerten Mucopolysaccharide durch Komplexbildung mit dem Farbstoff besser darstellen.

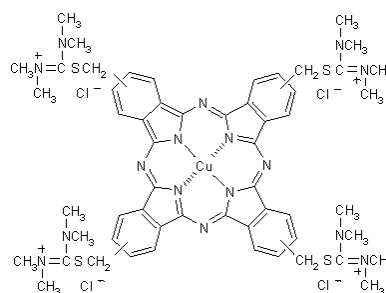


Fig. 3.2 Alcianblau

Tafel 17

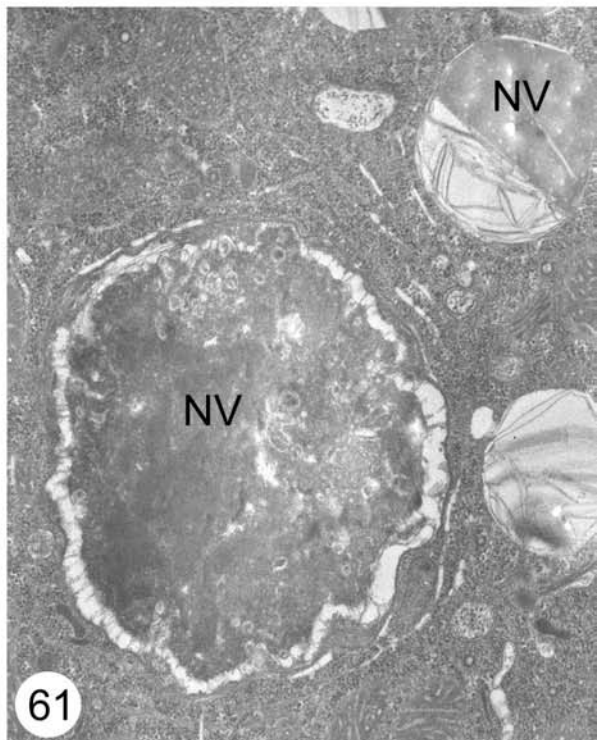
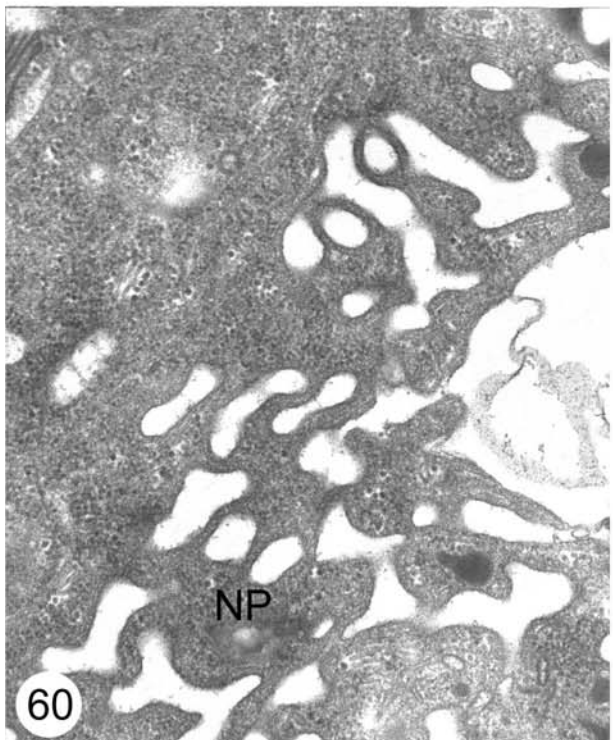
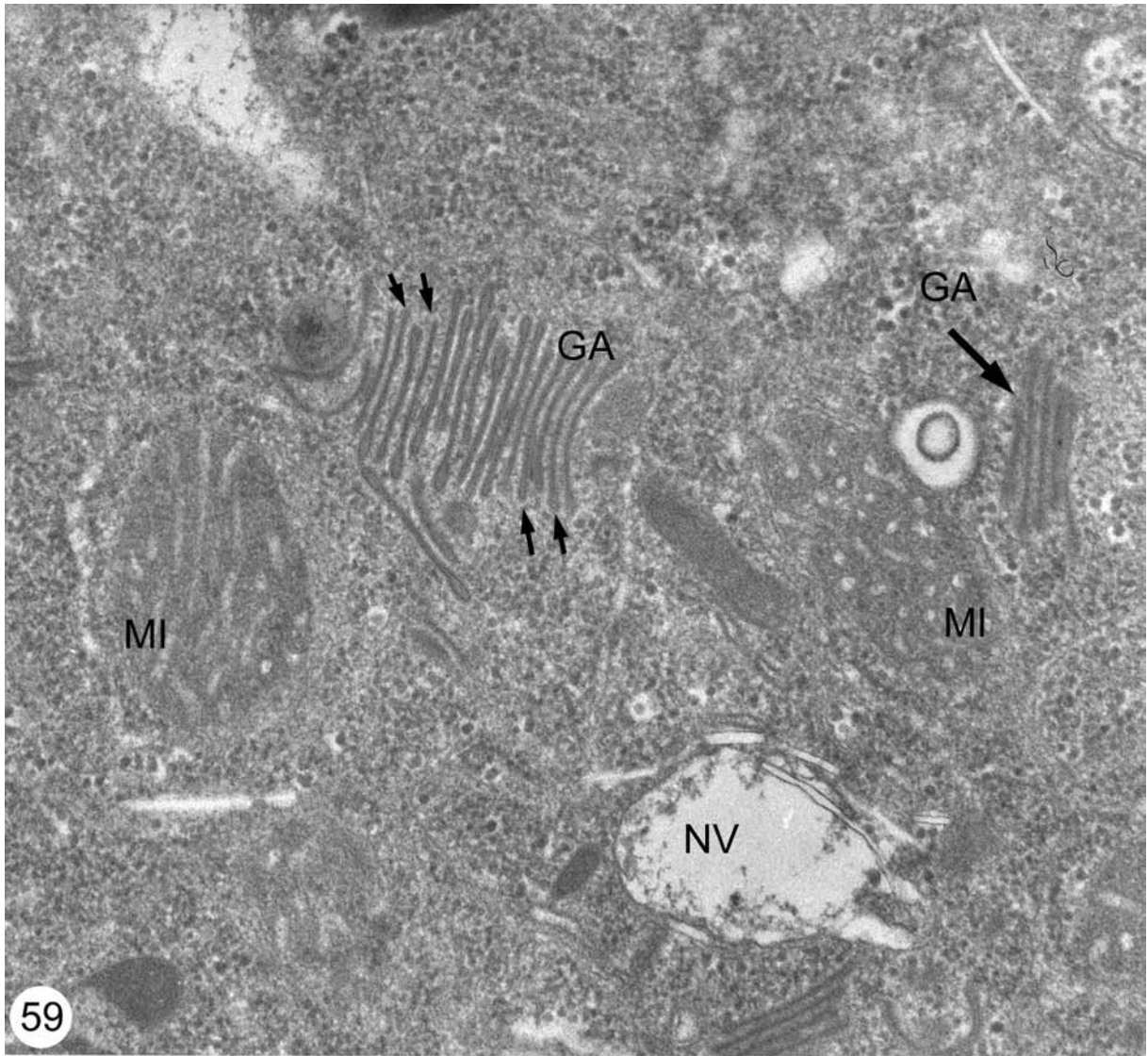
Abb. 59-61 TEM-Aufnahmen junger Trophonten nach Behandlung mit Alcianblau

Abb. 59 Ausschnitt aus dem Cytoplasma. Der Golgi-Apparat besteht im Normalfall aus 3-4 Lamellen (Randbereich der TEM-Aufnahme), kann sich aber auch aus mehr Lamellen zusammensetzen (Bildmitte, Pfeile). Eine Markierung mit Alcianblau ist nicht zu erkennen. x 30340

Abb. 60 Nephroplasma. Auch hier sind keine Anlagerungen von Alcianblau feststellbar. x 36140

Abb. 61 Nahrungsvakuolen mit weitgehend verdauten Wirtszellen. Mit Alcianblau konnten keine Strukturen hervorgehoben werden. x 18600

Abkürzungen: GA, Golgi-Apparat; MI, Mitochondrium; NP, Nephroplasma; NV, Nahrungsvakuole



Tafel 18

Abb. 62-66 TEM-Aufnahmen der Cilien und der spongiösen Schicht der Trophonten nach Behandlung mit Alcianblau

Abb. 62 Peripherie. Nach der Behandlung mit Alcianblau läßt sich an der äußeren Membran der spongiösen Schicht eine diffuse dunkle Linie erkennen. Innerhalb der spongiösen Vesikel ist eine Markierung der Membran mit Alcianblau eindeutig nachweisbar (Pfeilspitzen). x 47000

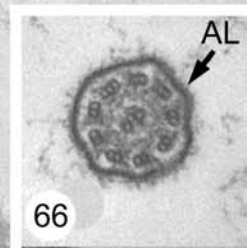
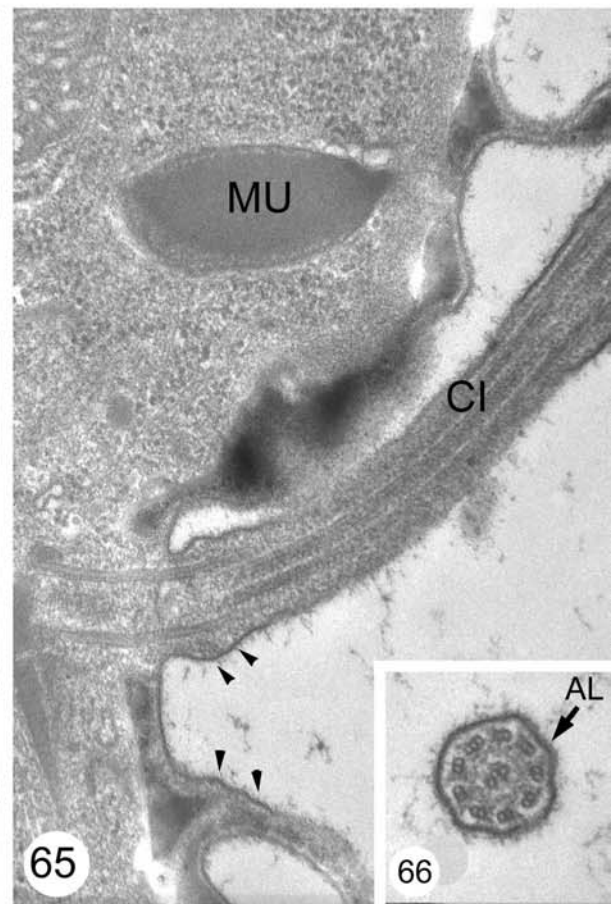
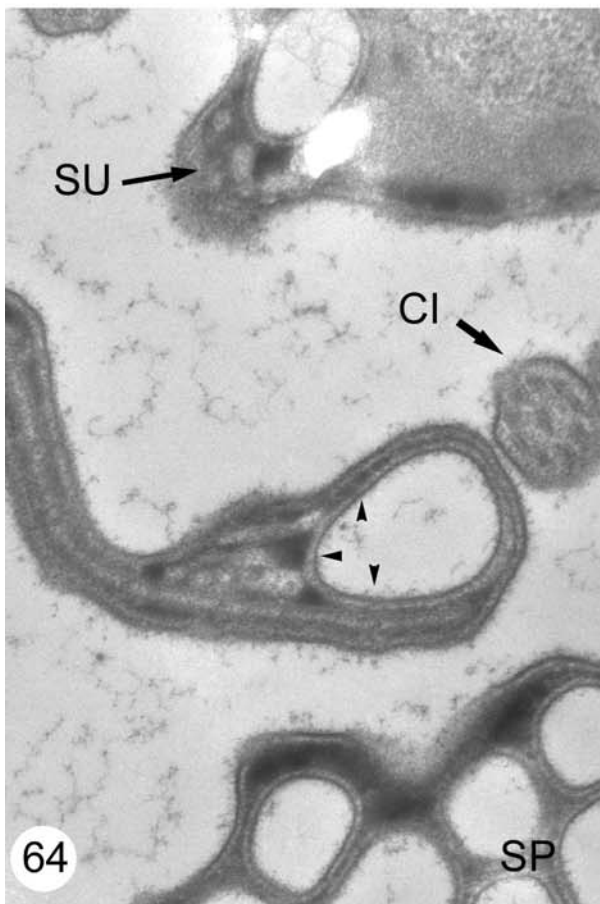
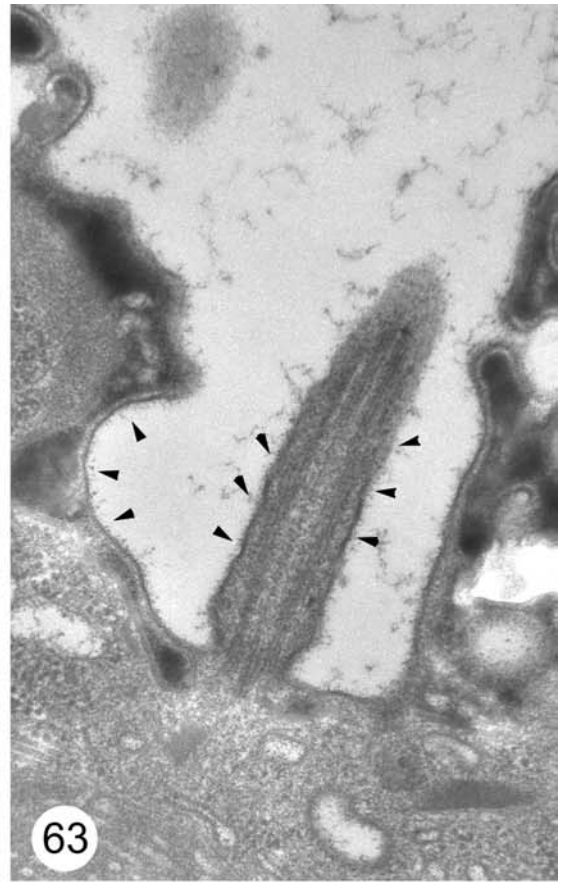
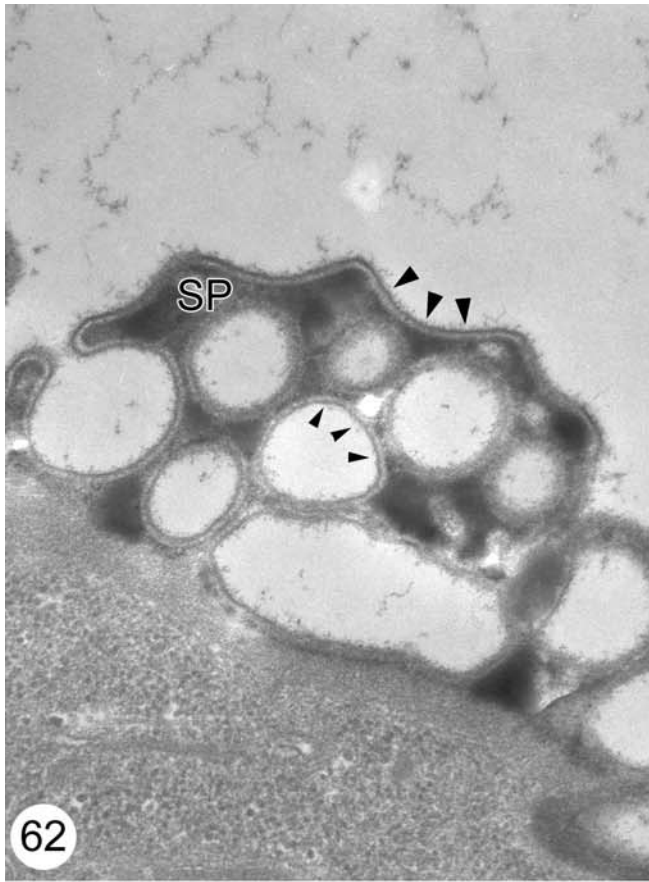
Abb. 63 Alcianblau lagert sich nicht nur an die Cilien, sondern auch an die Membran in der Umgebung der Cilien an (Pfeilspitzen). x 49800

Abb. 64 Die Anlagerung von Alcianblau umfaßt auch die Alveolarmembran des Ciliums (Pfeilspitzen). x 54400

Abb. 65 Die mit Alcianblau darstellbaren Bereiche beschränken sich auf die äußeren Membranen (Pfeilspitzen). Innerhalb des Plasmas sind strukturspezifische Anlagerungen von Alcianblau nicht nachweisbar. x 48000

Abb. 66 Cilienquerschnitt im Bereich des Axonems. Das Cilium zeigt das charakteristische Tubuli-Muster von $9 \times 2 + 2$. Die Anlagerung von Alcianblau erfolgt im Bereich der Plasmamembran. x 77710

Abkürzungen: AL, mit Alcianblau markierte Struktur; CI, Cilium; MI, Mitochondrium; MU, Mucozyste; SP, Spongiöse Schicht; SU, Spongiöse Substanz



Nach der Behandlung mit Alcianblau ließ sich an der Peripherie des jungen Trophonten eine Anlagerung der Substanz erkennen. An der äußeren Membran der spongiösen Schicht war sie als eine diffuse dunkle Linie nachweisbar (Abb. 60). Innerhalb der spongiösen Vesikel hatte sich ebenfalls Alcianblau angelagert (Abb. 60, 62).

Neben der Plasmamembran und der Alveolarmembran der Cilien wurden ebenfalls Membranen in der ciliären Umgebung markiert (Abb. 61, 63, 64). Auch bei charakteristischen Cilienquerschnitten ließ sich eine Bindung des Farbstoffs an die Membran feststellen (Abb. 64).

Im kortikalen Cytoplasma waren jedoch keine Anlagerungen von Alcianblau festzustellen (Abb. 60, 63). Auch innerhalb der tieferen Cytoplasmabereiche waren keine strukturspezifischen Bindungen von Alcianblau nachweisbar (Abb. 59). Im "Nephroplasma" des Parasiten wurden ebenfalls keine Strukturen durch diese Methode hervorgehoben (Abb. 60). Der ausgeprägte Golgi-Apparat zeigte keine Veränderungen nach der Behandlung mit Alcianblau im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abb. 59). Mitochondrien wurden hier ebensowenig durch die Substanz markiert wie Nahrungsvakuolen verschiedener Verdauungszustände (Abb. 59, 61).

Allgemein war festzustellen, daß sich die mit Alcianblau darstellbaren Bereiche nur auf die äußeren Membranen beschränkten. Die Glykokalyx der jungen Trophonten ließ sich mit diesem histochemischen Nachweis also eindeutig hervorheben. Auch der spongiösen Schicht sowie ihrer Vesikel scheinen Mucopolysaccharide aufgelagert zu sein, da auch hier eine eindeutige Komplexbildung mit Alcianblau festzustellen war.

3.4.3 Ultrastruktur junger Trophonten nach Fixierung mit Rutheniumrot

Rutheniumrot ist eine synthetische intensiv gefärbte Substanz, die an Polyanionen wie Hyaluronsäure und Pektin, aber auch an Sialoglykoproteine bindet. Dieses hexavalente Kation wurde 1892 durch Joly entdeckt und seitdem mit Unterbrechungen als histologisches

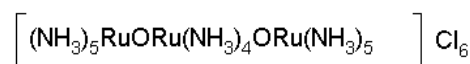


Fig. 3.3 Rutheniumrot

Tafel 19

Abb. 67-72 TEM-Aufnahmen junger Trophonten nach Behandlung mit Rutheniumrot.

Abb. 67 Übersichtsaufnahme. Rutheniumrot lagert sich an der gesamten äußeren Membran des Parasiten an (Pfeilspitzen). x 7800

Abb. 68 Randbereich eines Trophonten. Die Markierung mit Rutheniumrot ist an der äußeren Membran der spongiösen Schicht zu erkennen. Rutheniumrot lagert sich auch an die Membran der spongiösen Vesikel an. Um die Cilien herum kommt es ebenfalls zu einer Anlagerung der Substanz. x 27870

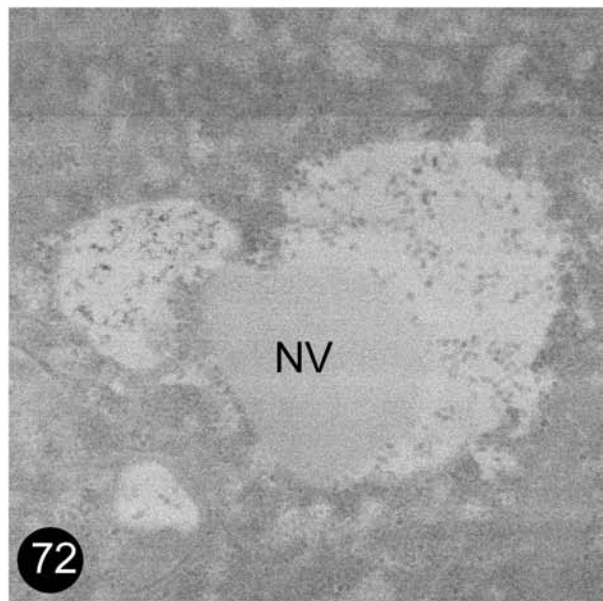
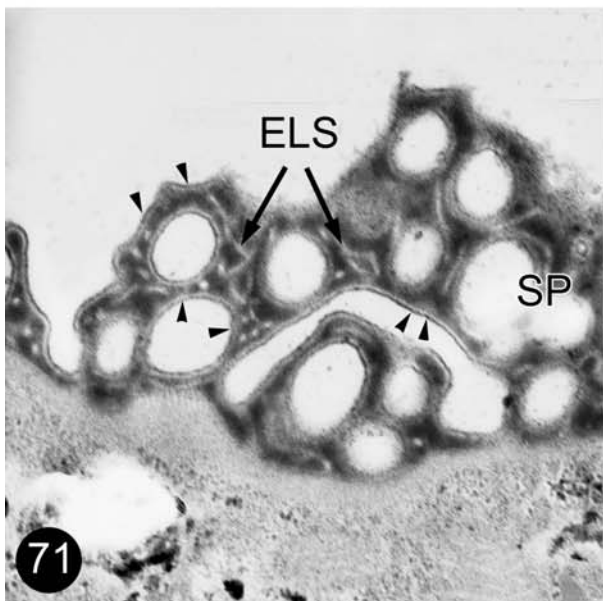
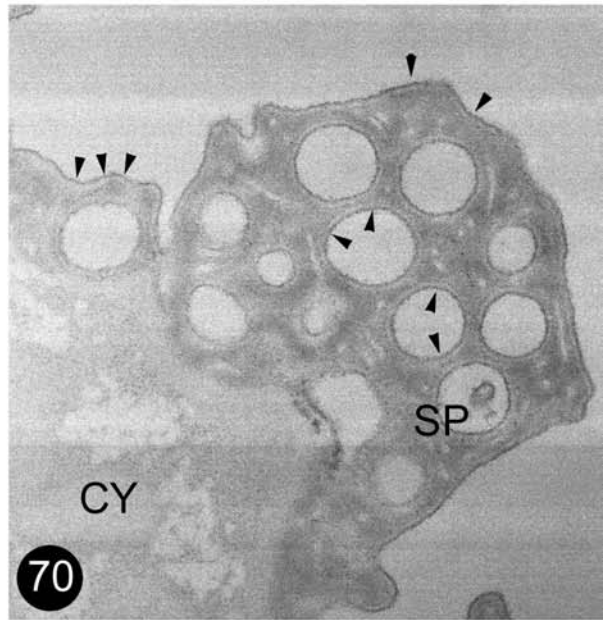
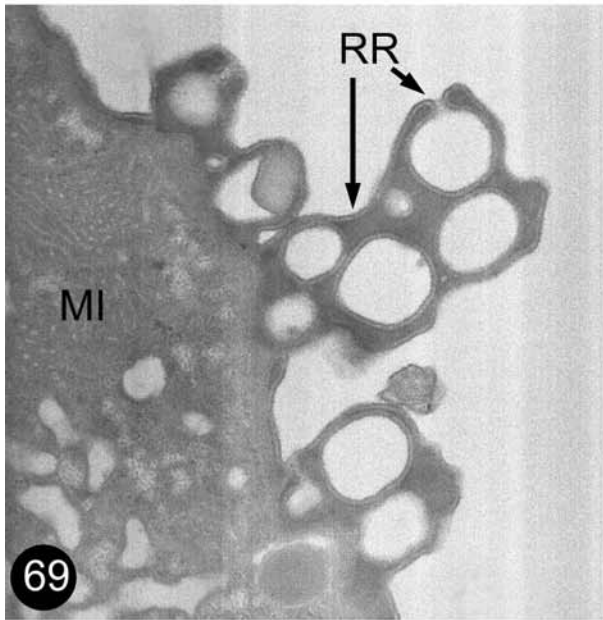
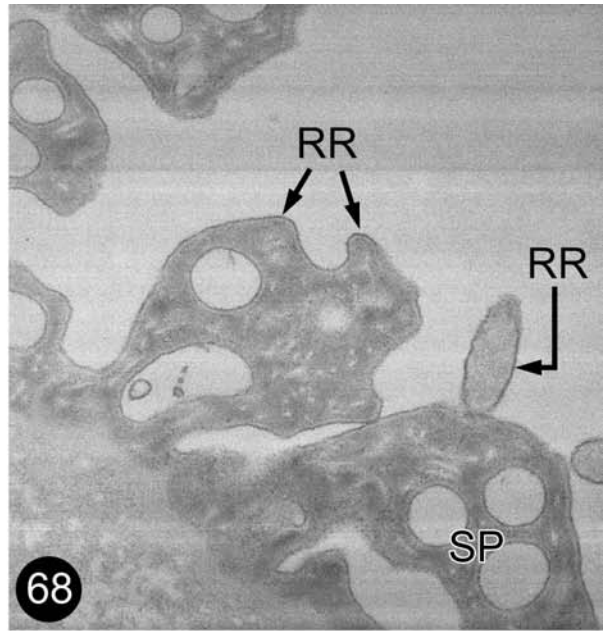
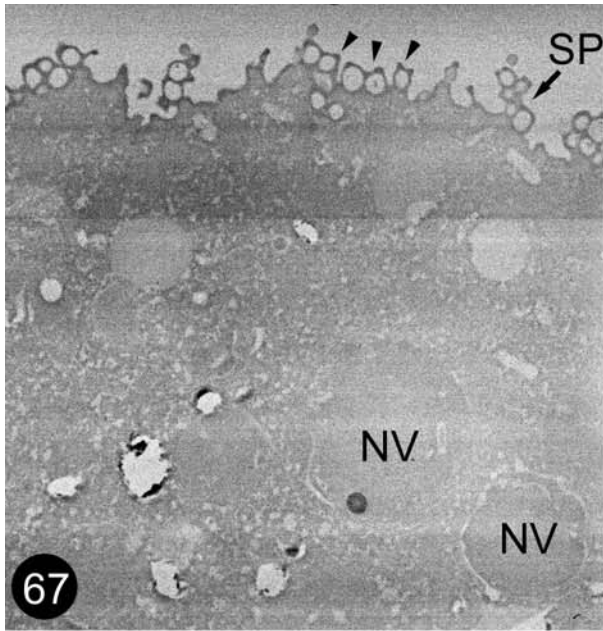
Abb. 69 Die die spongiöse Schicht limitierende kontinuierliche Membran ist mit der vesikelbegrenzenden Membran verbunden. Das angelagerte Rutheniumrot markiert die Kontinuität der Membranen. x 26400

Abb. 70 Deutlich ist die Markierung mit Rutheniumrot als stark elektronendichte Linie zu erkennen (Pfeilspitzen). Im Cytoplasma ist kein Rutheniumrot vorhanden. x 37700.

Abb. 71 Innerhalb der elektronendichten spongiösen Substanz erscheinen elektronenlichte Strukturen. Auch hier ist die Kontinuität der spongiösen Membranen deutlich erkennbar (Pfeilspitzen). x 32450

Abb. 72 Nahrungsvakuole. Eine Anlagerung von Rutheniumrot konnte nicht festgestellt werden. x 45800

Abkürzungen: CI, Cilium; CY, Cytoplasma; ELS, Elektronenlichte Strukturen; MI, Mitochondrium; NV, Nahrungsvakuole; RR, Rutheniumrot; SP, Spongiöse Schicht



Färbemittel verwendet (Luft 1976). Zuerst diente es als semispezifisches Färbereagens, um Pektine im Lichtmikroskop darzustellen, wurde aber zunehmend zum elektronenmikroskopischen Nachweis von Mucopolysacchariden in Geweben genutzt (Luft 1971a, b, 1976).

Proteoglykane (Ruggeri et al. 1977) und sogar die Glykokalyx von sekretorischen und cilienbesetzten Zellen im Kaninchenovidukt (Odor 1991) konnten mit Rutheniumrot dargestellt werden. Ebenso diente die Substanz zur Aufklärung der Struktur der Zona Pellucida in der Maus (Familiari et al. 1989).

Rutheniumrot soll ähnliche Eigenschaften wie Alcianblau, dem unter Punkt 3.4.2 dargestellten kationischen Farbstoff, haben (Ruggeri 1977, Goldberg 1988). Die beiden polyvalenten Färbemittel enthalten ein Metallion und fällen ähnliche Polyanionen aus. Dabei reagiert Rutheniumrot hauptsächlich über elektrostatische oder ionische Kräfte. In Kombination mit OsO_4 wird die Markierung durch den Farbstoff verstärkt, wobei der Mechanismus nicht genau geklärt ist. Rutheniumrot und Alcianblau unterscheiden sich überwiegend in ihrer Ladungsverteilung innerhalb der Moleküle (Luft 1971a).

Nach der Behandlung mit Rutheniumrot war eine Markierung der gesamten äußeren Membran der jungen Trophonten zu erkennen (Abb. 67). Ebenso wie Alcianblau markierte der Farbstoff sowohl die äußere Membran der spongiösen Schicht als auch die Membran der spongiösen Vesikel (Abb. 68-71). Die spongiöse Schicht wurde von einer kontinuierlichen Membran limitiert, die mit der Vesikelmembran verbunden war (Abb. 69, 71).

An den Membranen der Cilien kam es ebenfalls zu einer Anlagerung der Substanz (Abb. 68, 69). Rutheniumrot war als stark elektronendichter Saum zu erkennen (Abb. 70). Innerhalb der elektronendichten spongiösen Schicht erschienen erstmals deutlich elektronenlichte Strukturen (Abb. 71).

Im Plasma des Cortex sowie im übrigen Cytoplasma waren keine Anlagerungen von Rutheniumrot nachzuweisen. Weder Mitochondrien noch Nahrungsvakuolen waren durch die Substanz markiert worden (Abb. 69, 72).

Insgesamt ließ sich feststellen, daß Rutheniumrot ebenso wie Alcianblau nur an die äußeren Membranen gebunden hatte. An den Membranen der Parasiten war eine relativ hohe Anzahl von negativ geladenen Gruppen vorhanden, so daß auch mit dieser Methode die Glykokalyx der Trophonten eindeutig nachweisbar war.

3.4.4 Ultrastruktur der Trophonten nach Behandlung mit der Thiocarbohydrazid (TCH)-Methode

Diese Methode beruht auf einer Reaktion von Thiocarbohydrazid mit freien Aldehydgruppen. Thiéry fand 1967 heraus, daß Thiosemicarbazide oder Thiocarbohydrazid in Kombination mit Albumosesilber elektronendichte Komplexe bilden.

Die Thiocarbohydrazid-Methode eignet sich vor allem, um Zucker nachzuweisen, deren Hydroxylgruppen durch Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert werden. Thiocarbohydrazid bindet an die derart gebildeten Aldehydgruppen. Dabei wirkt sich die Zeitspanne der Behandlung mit TCH auf die markierten Stellen aus. Kurze Inkubationszeiten dienen zur Darstellung von Glykogen, mit längeren Einwirkzeiten lassen sich auch Mucopolysaccharide nachweisen.

Bei *Cryptocaryon irritans* konnte nach Behandlung mit der TCH-Methode in keinem der Stadien eine Darstellung von Glykogen oder Mucopolysacchariden erreicht werden.

3.4.5 Untersuchungen zu Lektin-Gold-Markierungen nach der Post-Embedding Methode

Lektine sind ursprünglich aus Pflanzenextrakten isolierte zuckerbindende Proteine, die die Fähigkeit besitzen, Glykokonjugate zu präzipitieren oder Zellen zu agglutinieren. Ursprünglich wurden sie zur Agglutination von Erythrozyten eingesetzt, weshalb sie auch als Phytohämagglutinine bezeichnet werden (Heß 1999). Sie können ebenfalls aus

tierischen Organismen, wie z.B. der Hämolymphe von Arthropoden, gewonnen werden (Plattner und Zingsheim 1987, Kleinig und Maier 1999).

Lektine binden reversibel und nichtkovalent an spezifische Kohlenhydratreste oder Oligosaccharidgruppen, ohne diese chemisch zu beeinflussen. Durch Konjugation der Lektine mit entsprechenden elektronendichten Markern wie kolloidalem Gold oder Ferritin werden sie in der Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht und somit zu wichtigen Hilfsmitteln (Stryer 1996, Kleinig und Maier 1999).

Zum semispezifischen Nachweis von Glykosylgruppen in den Trophonten von *Cryptocaryon irritans* wurden folgende Lektine in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt:

Tab. 3.1 getestete Lektine zur Lokalisation von Polysacchariden

Lektin	MG (Kilodalton)	Anzahl der Untereinheiten pro Lektinmolekül	Spezifität
Con A	102	4	α -D-Glucose α -D-Mannose
WGA	34	2	n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
DBA	140	4	n-Acetyl- β -(1,4)-D-Galaktosamin
UEA	170	-	α -L-Fucose
LPA	340	12	n-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
SBA	110	4	β -D-Galaktose n-Acetyl- β -(1,4)-D-Galaktosamin

(nach Plattner und Zingsheim 1987)

Die Markierung mit den goldgekoppelten Lektinen erfolgte am Schnitt als Post-Embedding-Methode. Diese Technik hat u.a. den Vorteil, daß sie bei geringem Materialverbrauch oft wiederholbar ist. Die Lektine wurden in verschiedenen Verdünnungsreihen aufgetragen (s. Kapitel 2.10.5, Tab. 2.2), die zuvor experimentell ermittelt worden waren. Dabei wurde eine Inkubationszeit von 45 min angesetzt.

3.4.5.1 Con A

Die Inkubation der Schnitte mit Concanavalin A (Con A) führte trotz mehrerer Wiederholungen der Versuchsreihen zu keiner Markierung der Stadien von *C. irritans*. Goldpartikel waren nur im Fischgewebe nachzuweisen.

3.4.5.2 WGA

Die Inkubation mit WGA in den unterschiedlichen Verdünnungsstufen 1:10, 1:20 und 1:40 führte zu einer eindeutigen Markierung mit kolloidalem Gold innerhalb der Trophonten (Abb. 73-82).

Unabhängig von den Verdünnungsstufen hatten sich die 10 nm großen, mit WGA-gekoppelten Goldpartikel besonders an die Nahrungsvakuolen, die hier in verschiedenen Cycloestadien vorliegen, angelagert (Abb. 73-80, 82). Eine weitere Markierung war innerhalb der spongiösen Schicht festzustellen (Abb. 81).

An die äußere Membran der Parasiten lagerte sich jedoch kein Gold an.

Ebensowenig waren im cortikalen Cytoplasma Goldpartikel zu erkennen. Auch in den tiefen Bereichen des Cytoplasmas konnten keine weiteren spezifischen Strukturen mit WGA-Gold dargestellt werden. In anderen Vakuolen wurde ebenfalls kein kolloidales Gold gebunden.

Bei genauer Untersuchung der mit Goldkörnchen markierten Nahrungsvakuolen war festzustellen, daß sich besonders massiv Goldpartikel in den elektronenlichteren Bereichen innerhalb der Vakuole anlagerten (Abb. 74, 79, 80, 82).

In der unmittelbaren cytoplasmatischen Umgebung der Nahrungsvakuolen wurden keine Goldpartikel nachgewiesen (Abb. 74-82). In den Flossenstrahlen des Wirtsfisches waren größere Ansammlungen von Goldpartikeln zu erkennen.

Als zusätzliche Kontrolle diente die kompetitive Hemmung der vermuteten Zuckergruppe (hier n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin und Sialinsäure) durch Inkubation der Schnitte mit WGA-Gold und der jeweiligen Zuckergruppe.

Tafel 20

Abb. 73-78 TEM-Aufnahmen von reifen Trophonten nach Inkubation mit Gold-WGA (1:10) am Schnitt, zum Nachweis von n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin

Abb. 73 Inkubation mit Gold-WGA (1:10), 45 min. Innerhalb dieser jungen Nahrungsvakuole kommt es zu einer massiven Anlagerung von Goldpartikeln (Pfeile), n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin ist nachweisbar. x 21000

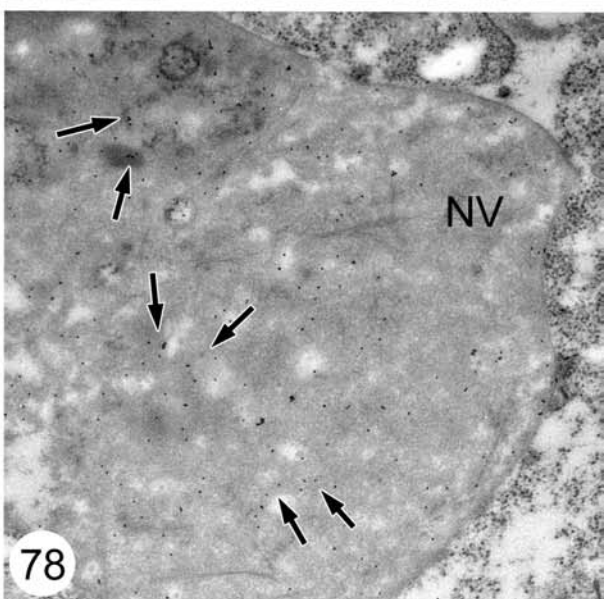
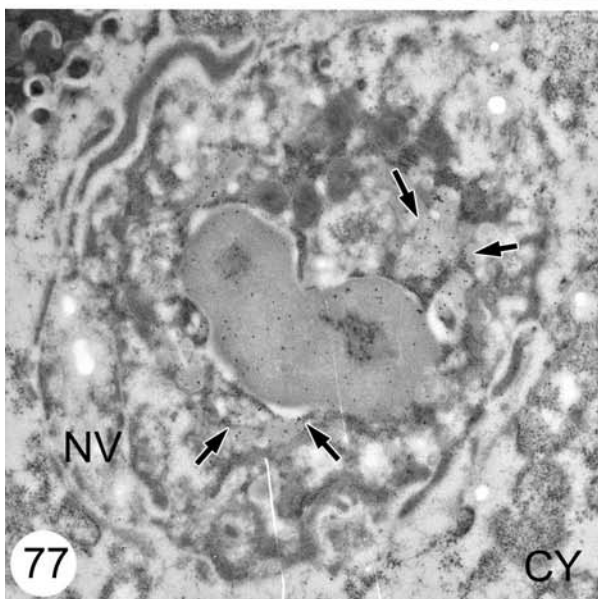
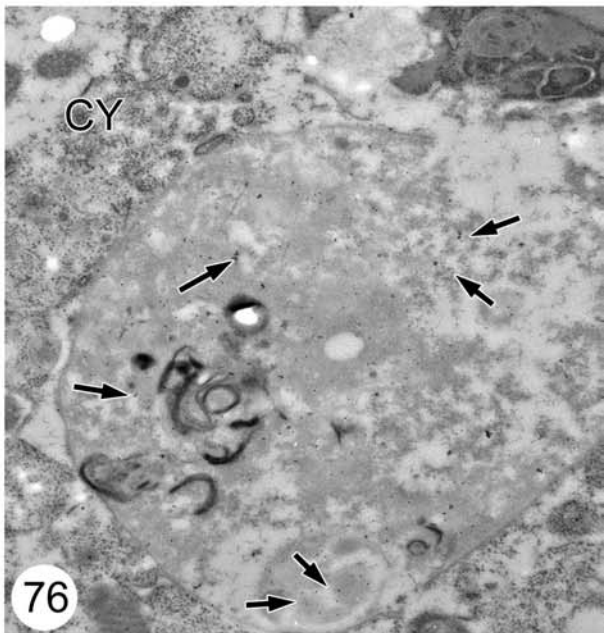
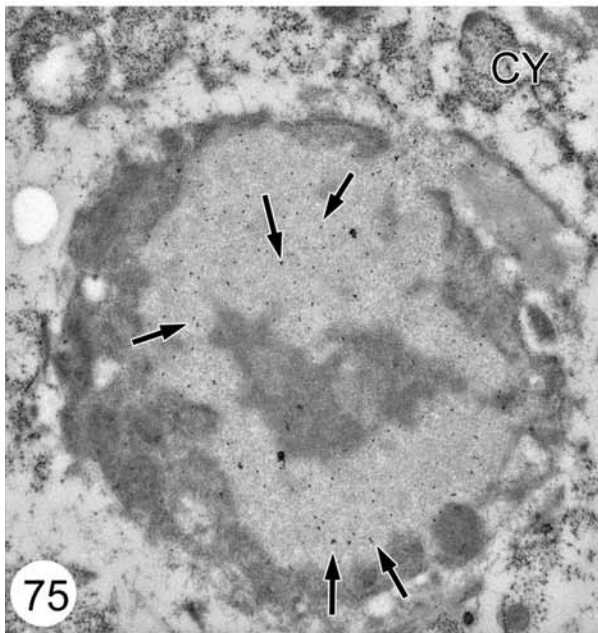
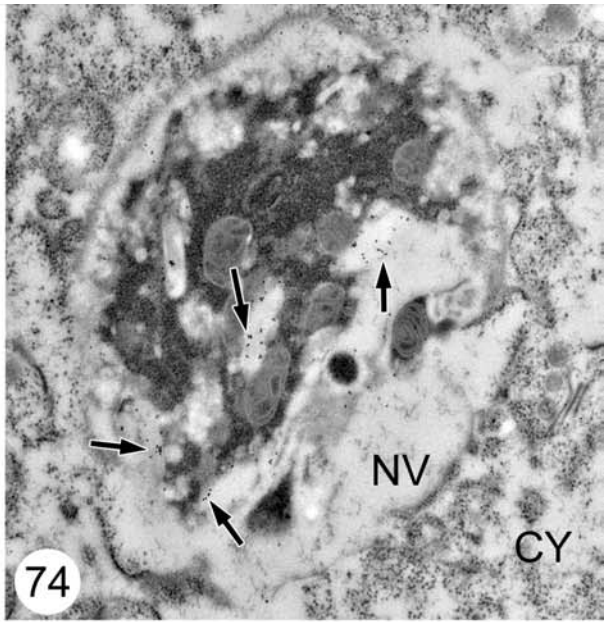
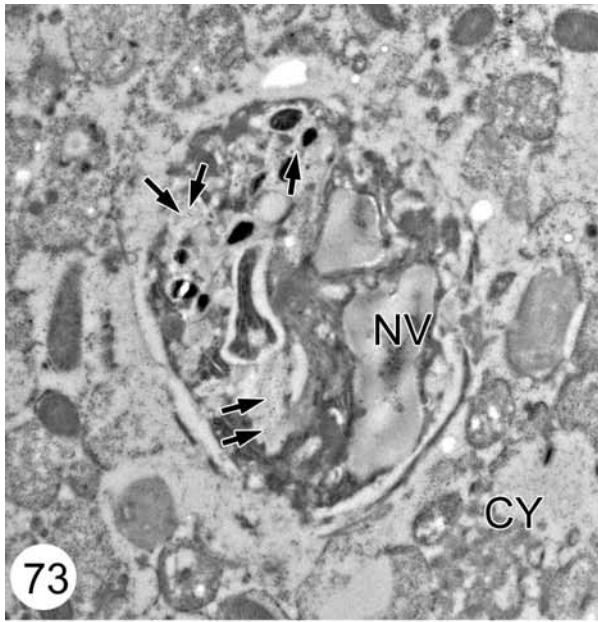
Abb. 74 Inkubation mit Gold-WGA (1:10), 45 min. Die Markierung mit Goldpartikeln beschränkt sich auf Bereiche der Nahrungsvakuolen (Pfeile). Im Cytoplasma des Trophonten ist kein kolloidales Gold nachweisbar. x 19000

Abb. 75 Inkubation mit Gold-WGA (1:10), 45 min. Innerhalb dieser Nahrungsvakuole sind nur die elektronenlichteren Bereiche mit Gold markiert (Pfeile). x 16625

Abb. 76 Inkubation mit Gold-WGA (1:10), 45 min. Die lektingekoppelten Goldpartikel (Pfeile) lagern sich an Nahrungsvakuolen verschiedener Cyclosestadien an. Hier eine reifere Nahrungsvakuole. x 13060

Abb. 77, 78 Inkubation mit Gold-WGA [1:10], 45 min. Weitere Nahrungsvakuolen verschiedener Trophonten. Auch hier ist n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin anhand der lektingekoppelten Goldpartikel nachweisbar (Pfeile). x 13150 bzw. 15200

Abkürzungen: CY, Cytoplasma; NV, Nahrungsvakuole



Tafel 21

Abb. 79-82 TEM-Aufnahmen von reifen Trophonten nach Inkubation mit Gold-WGA am Schnitt in verschiedenen Konzentrationen zum Nachweis von n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin

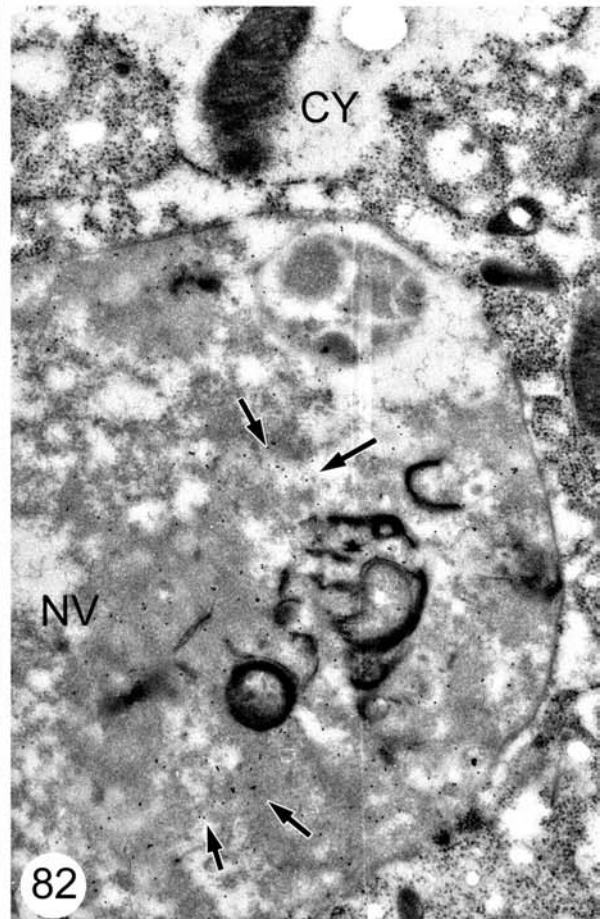
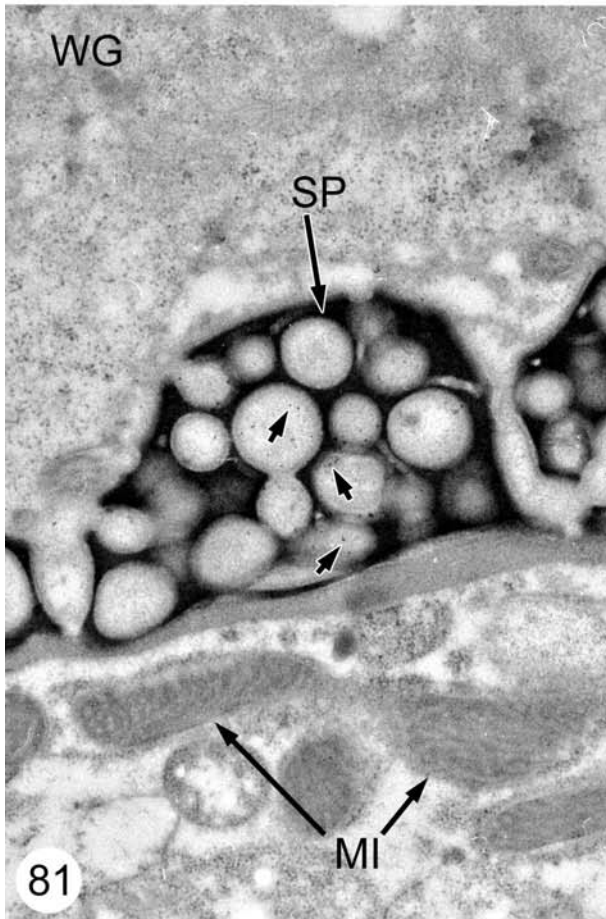
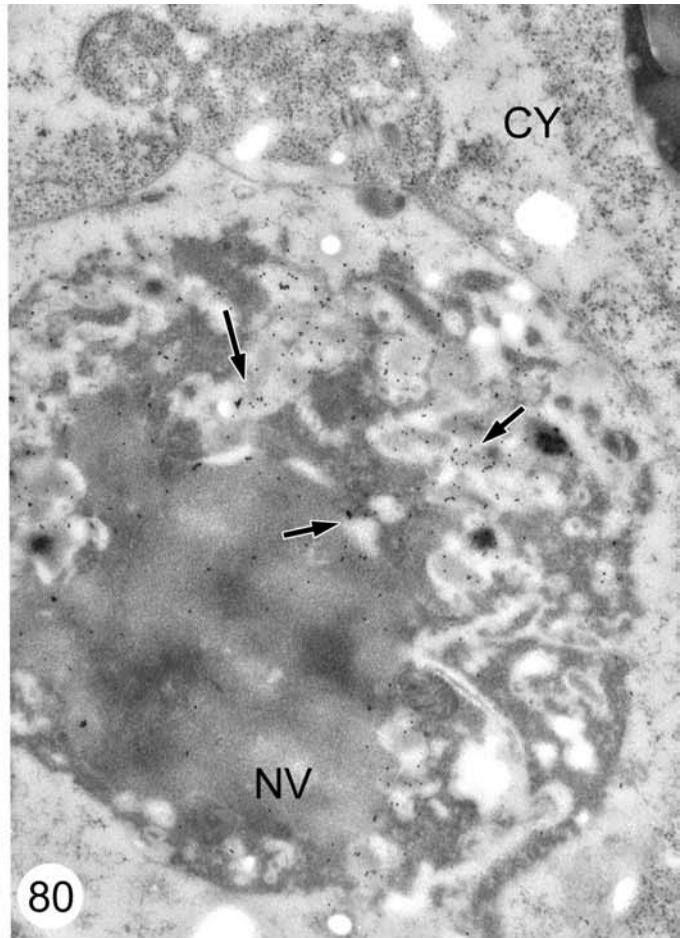
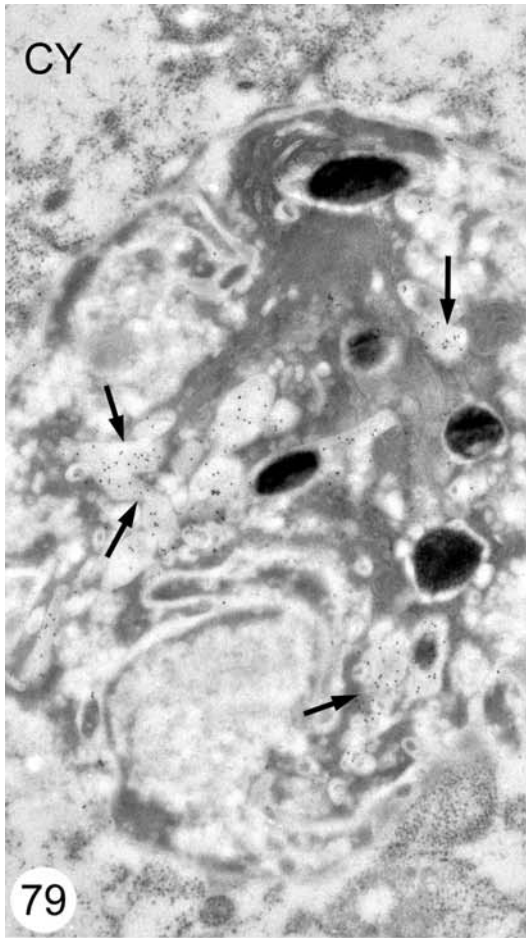
Abb. 79 Inkubation mit Gold-WGA (1:20), 45 min. Auch eine geringere Konzentration des goldgekoppelten Lektins führt zu einer eindeutigen Markierung mit Goldpartikeln (Pfeile) im Lumen der Nahrungsvakuole und somit zum Nachweis für n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin. x 20060

Abb. 80 Inkubation mit Gold-WGA (1:20), 45 min. Bei dieser Nahrungsvakuole haben sich die Goldpartikel besonders in den elektronenlichteren Bereichen angelagert (Pfeile). x 26600

Abb. 81 Inkubation mit Gold-WGA (1:40), 45 min. Innerhalb der spongiösen Schicht kommt es ebenfalls zu einer Ansammlung von Goldpartikeln (Pfeile), was auf ein Vorhandensein von n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin schließen läßt.
x 20050

Abb. 82 Inkubation mit Gold-WGA (1:40), 45 min. In dieser späten Nahrungsvakuole sind die Goldpartikel sowohl in den elektronenlichten als auch –dichten Regionen verteilt (Pfeile). Diese Konzentrationsstufe führt ebenfalls zu einem positiven n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin-Nachweis. x 17100

Abkürzungen: CY, Cytoplasma; MI, Mitochondrium; NV, Nahrungsvakuole; SP, Spongiöse Schicht; WG, Wirtsgewebe



Tafel 22

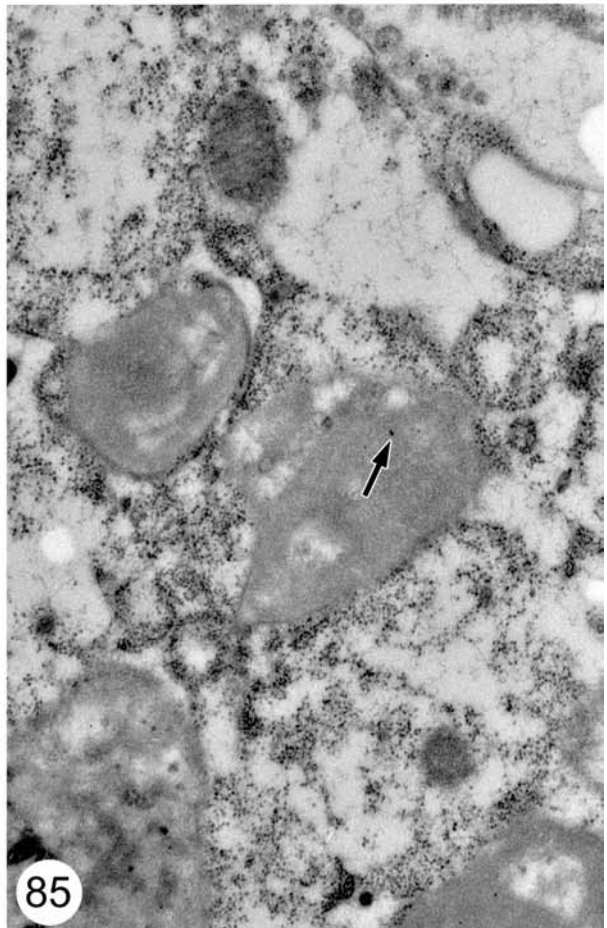
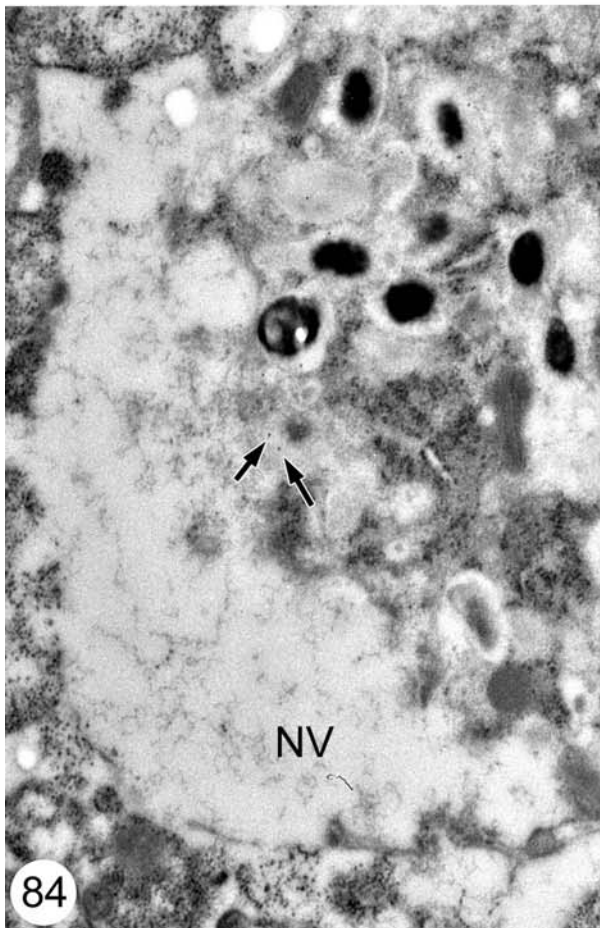
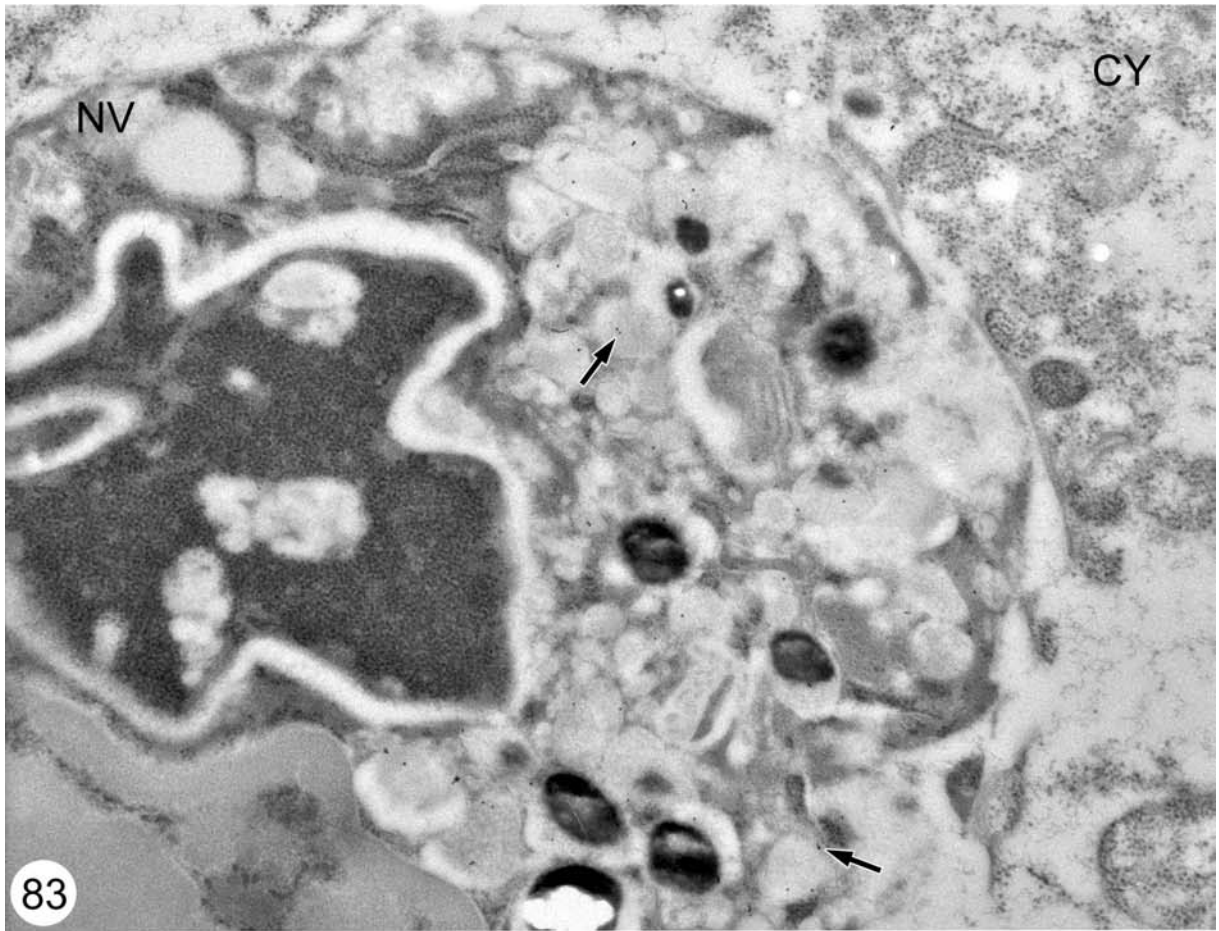
Abb. 83-85 TEM-Aufnahmen von reifen Trophonten nach Hemmtests am Schnitt zur Bestätigung des n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin in den Nahrungsvakuolen

Abb. 83 Nahrungsvakuole mit Wirtszelle im reifen Trophonten. Nach der n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin-Hemmung sind nur noch ganz vereinzelt Goldpartikel nachzuweisen (Pfeile). x 23750

Abb. 84 Auch an den Membranen der reiferen Nahrungsvakuolen kommt es nur zu minimaler Markierung mit Goldpartikeln (Pfeile). x 21380

Abb. 85 Im Vakuoleninneren sind nur sehr vereinzelt Goldpartikel nachweisbar (Pfeil). x 19000

Abkürzungen: CY, Cytoplasma; NV, Nahrungsvakuole



Nach der Anwendung dieser Hemmtests waren in keiner der Nahrungsvakuolen vermehrte Goldpartikel nachweisbar (Abb. 83-85). Sehr vereinzelt auftretende Goldkörnchen im Inneren der Nahrungsvakuolen konnten versuchsbedingt nicht vermieden werden (Abb. 85).

Mit WGA-Gold und der spezifischen kompetitiven Hemmung konnten bei *Cryptocaryon irritans* die Zucker n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin und n-Acetylneuraminsäure eindeutig nachgewiesen werden. Dabei waren sie hauptsächlich im Zentrum der Nahrungsvakuolen, aber auch innerhalb der spongiösen Schicht lokalisiert.

3.4.5.3 DBA

DBA dient zum Nachweis von n-Acetyl- β -(1,4)-D-Galaktosamin. Bei einer Verdünnung von (1: 10) konnten die Goldpartikel nicht im Parasiten nachgewiesen werden. Die Inkubation der Schnitte mit der (1:5) Verdünnung von DBA-Gold führte zu einer unregelmäßigen und diffusen Verteilung der Goldkörnchen im Cytoplasma des Trophonten. Stellenweise lagen die Goldpartikel klumpig im Cytoplasma angeordnet vor (Abb. 88, 89).

Die äußeren Bereiche des Parasiten wurden nicht markiert. In den spongiösen Schichten und im Cortex waren keine Goldpartikel zu erkennen. Auch an Nahrungsvakuolen oder anderen Strukturen wurde das kolloidale Gold nicht gebunden.

Die ungleichmäßige Verteilung des kolloidalen Goldes ist auf eine "Backgroundbildung" zurückzuführen.

Ein eindeutiger Nachweis für n-Acetyl- β -(1,4)-D-Galaktosamin bei den verschiedenen Stadien von *Cryptocaryon irritans* konnte durch die Inkubation mit DBA-Gold nicht erbracht werden.

Tafel 23

Abb. 86-89 TEM-Aufnahmen von reifen Trophonten nach Inkubation mit Gold – UEA, Gold – DBA in verschiedenen Konzentrationen am Schnitt zum Nachweis von α -L-Fucose bzw. n-Acetyl-Galaktosamin

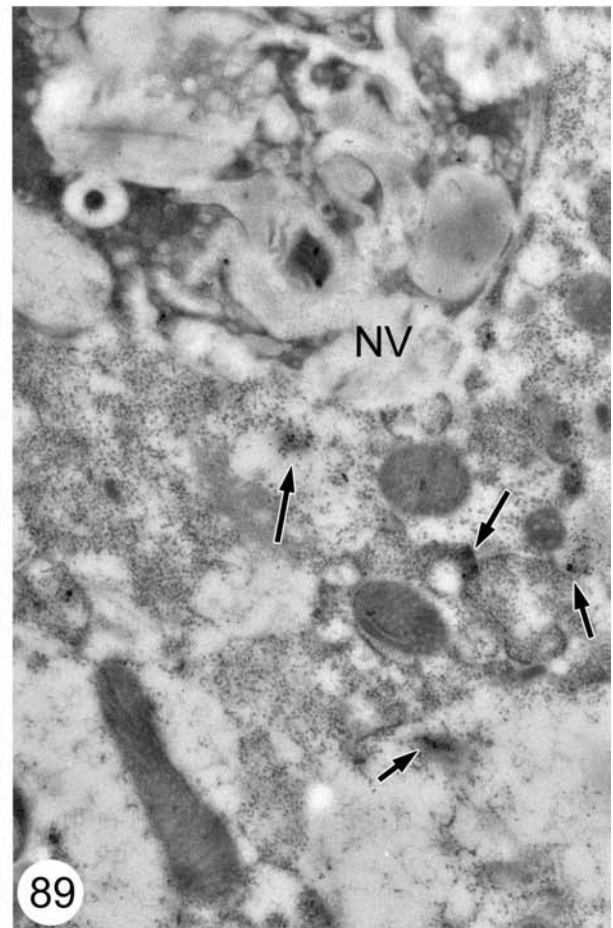
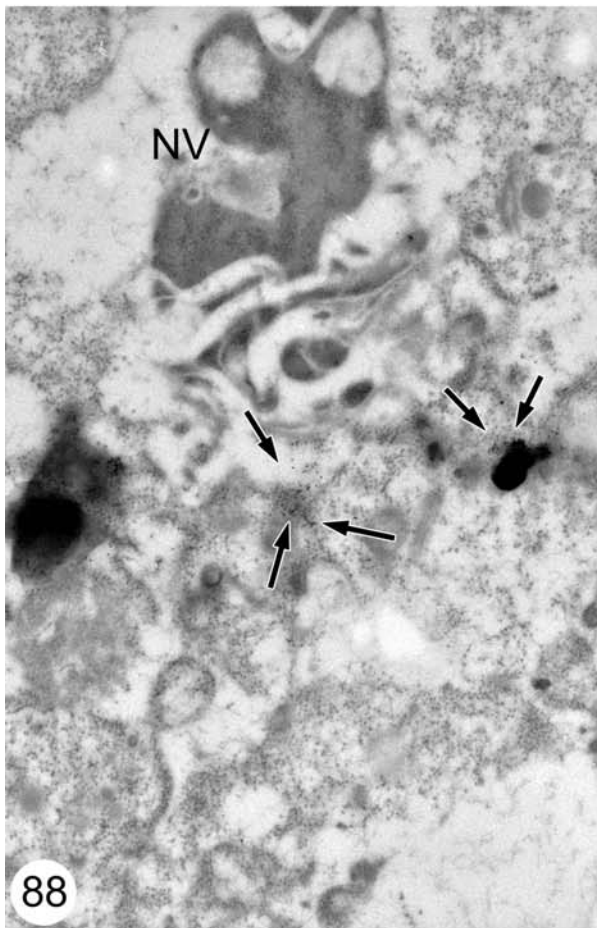
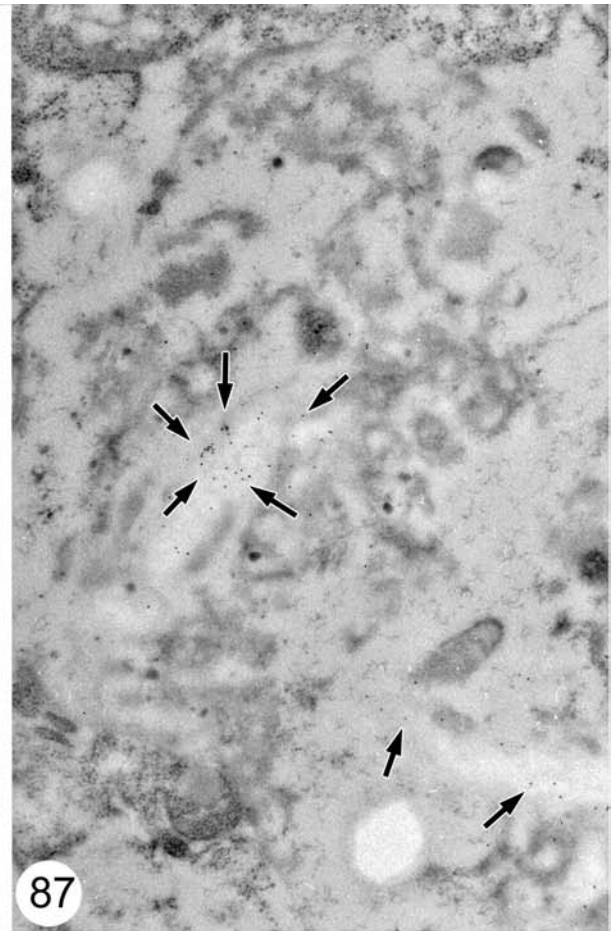
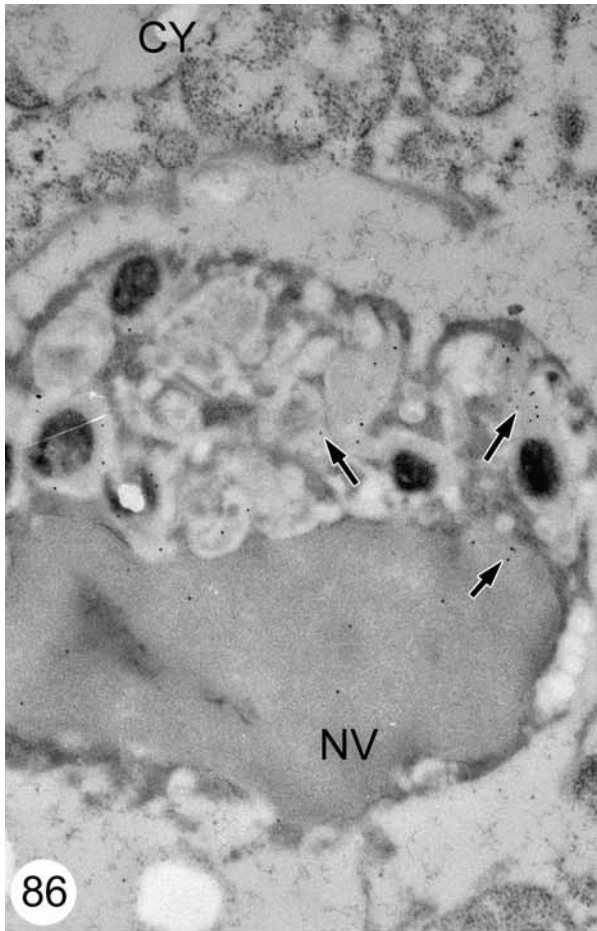
Abb. 86 Inkubation mit Gold-UEA (1:5), 45 min. Innerhalb dieser mit Wirtszellresten gefüllten Nahrungsvakuole ist eine spezifische Ansammlung von Goldpartikeln erkennbar (Pfeile). Im Cytoplasma des Parasiten sind keine weiteren Goldpartikel vorhanden. α -L-Fucose konnte nachgewiesen werden. x 23750

Abb. 87 Inkubation mit Gold-UEA (1:10), 45 min. Auch bei geringerer Lektin-Gold-Konzentration erfolgte die Bindung an den mit Wirtszellresten gefüllten Nahrungsvakuolen. Die Dichte der Goldpartikel unterscheidet sich nicht von der der höheren Konzentration (Pfeile). α -L-Fucose konnte somit eindeutig belegt werden. x 31670

Abb. 88 Inkubation mit Gold-DBA (1:5), 45 min. Im Cytoplasma des Trophonten liegen die Goldpartikel diffus und teilweise auch klumpig neben einer Nahrungsvakuole (Pfeile), was auf "Backgroundbildung" zurückzuführen ist. n-Acetyl-Galaktosamin kann nicht eindeutig nachgewiesen werden. x 19000

Abb. 89 Inkubation mit Gold-DBA (1:5), 45 min. Cytoplasma des Trophonten. Die Goldpartikel sind unregelmäßig und klumpig im Cytoplasma verteilt (Pfeile). Ein positiver Nachweis von n-Acetyl-Galaktosamin ist nicht erfolgt. x 21380

Abkürzungen: CY, Cytoplasma; NV, Nahrungsvakuole



Tafel 24

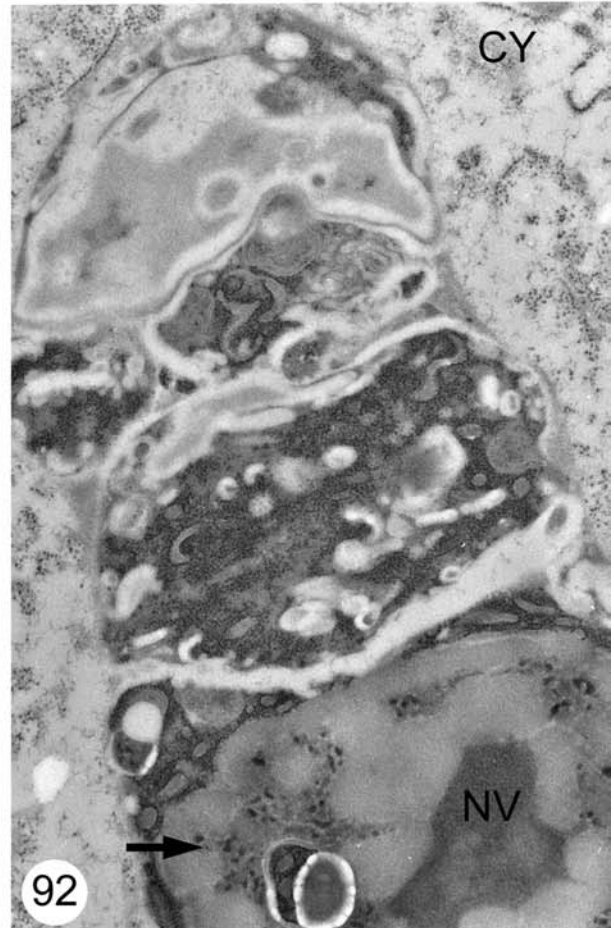
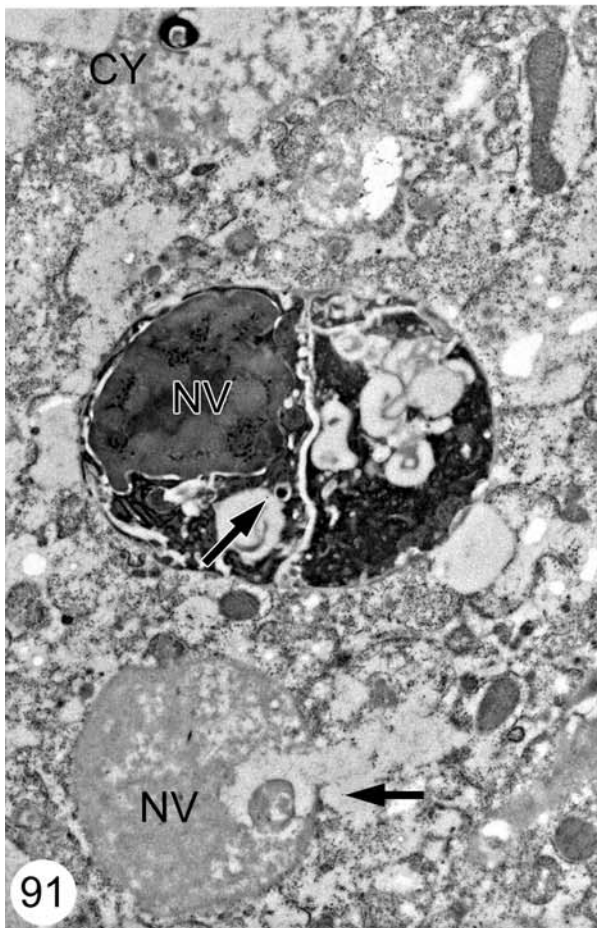
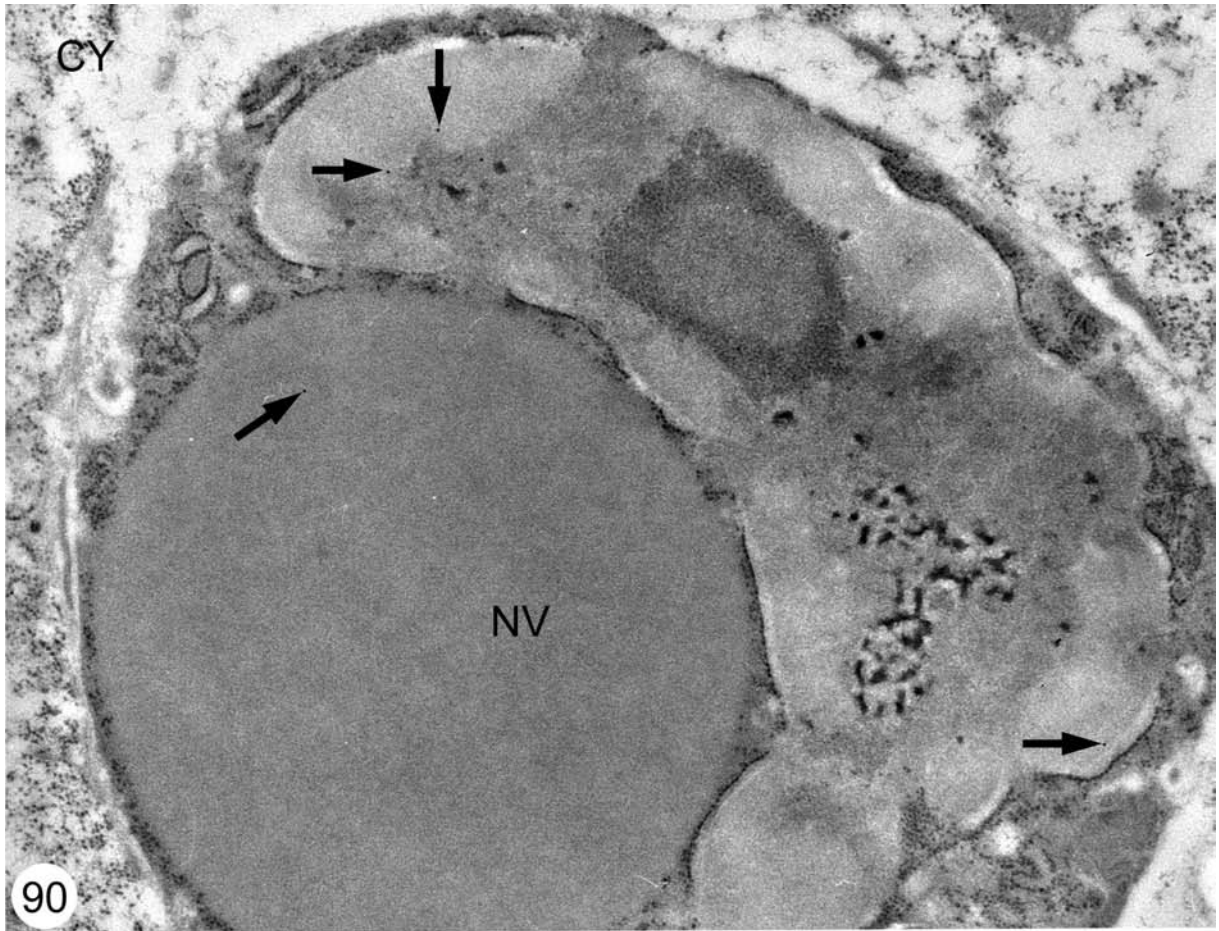
Abb. 90-92 TEM-Aufnahmen von reifen Trophonten nach Hemmtests am Schnitt zur Bestätigung der α -L-Fucose in den Nahrungsvakuolen

Abb. 90 Innerhalb der Nahrungsvakuole lagern sich nach der Fucosehemmung nur noch vereinzelte Goldpartikel an (Pfeile). x 25860

Abb. 91 Im Cytoplasma und in der Nahrungsvakuole sind nur sehr vereinzelte Goldpartikel nachweisbar (Pfeile). x 21790

Abb. 92 Nach der Fucosehemmung ist innerhalb der Nahrungsvakuole nur noch ein Goldpartikel nachweisbar (Pfeil). x 19630

Abkürzungen: CY, Cytoplasma; NV, Nahrungsvakuole



3.4.5.4 UEA

Durch die Inkubation mit UEA-Gold in den Verdünnungsstufen (1:5), (1:10) zum Nachweis von α -L-Fucose wurde kolloidales Gold nur in den mit Wirtszellen gefüllten Nahrungsvakuolen von *Cryptocaryon irritans* gebunden (Abb. 86, 87). Unabhängig von den verschiedenen Konzentrationen lagerten sich in den Nahrungsvakuolen fast gleiche Mengen an Goldkörnchen an (Abb. 86, 87).

Weder an der Peripherie noch im Cytoplasma der parasitären Stadien waren weitere Markierungen mit Goldpartikeln zu erkennen. Auch andere zelluläre Strukturen wurden nicht durch die Inkubation mit UEA-Gold markiert.

Die Inkubation mit UEA-Gold führte in den Flossenstrahlen des Wirtsfisches zur Bindung von zahlreichen Goldpartikeln. Zur Kontrolle des Befundes wurde wiederum ein kompetitiver Hemmtest durchgeführt. Nur sehr vereinzelt Goldpartikel waren nach der Behandlung in einzelnen Nahrungsvakuolen (Abb. 90, 92) zu finden. Auch im Cytoplasma lagen nur vereinzelt Goldkörnchen vor (Abb. 91).

α -L-Fucose konnte somit eindeutig bei *Cryptocaryon irritans* belegt werden.

3.4.5.5 LPA

Der Sialinsäurenachweis wurde durch die Inkubation mit LPA-Gold in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:100) durchgeführt. Dabei band das kolloidale Gold in allen Verdünnungsreihen an relativ kleine Vakuolen, die elektronenlichte und -dichte Einschlüsse enthielten.

Diese Vakuolen lagen in den elektronenlichteren Bereichen des cortikalen Plasmas (Abb. 93, 94) aber auch im Zentrum der Trophonten (Abb. 99).

Die Anlagerung der Goldpartikel erfolgte weder an die spongiöse Schicht noch an die äußeren Strukturen der Trophonten (Abb. 99). Auch Nahrungsvakuolen verschiedener Cyclosestadien wurden nicht durch LPA-Gold markiert (Abb. 94, 99).

Bei geringeren Verdünnungsstufen (1:40, 1:80) des goldgekoppelten Lektins gelang der Sialinsäurenachweis ebenfalls (Abb. 100-106).

Tafel 25

Abb. 93-98 TEM-Aufnahmen von reifen Trophonten nach Inkubation mit Gold-LPA (1:20) am Schnitt zum Nachweis von n-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)

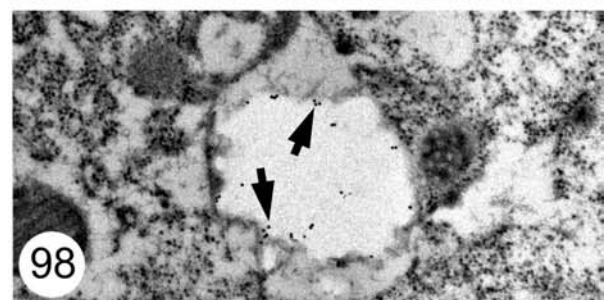
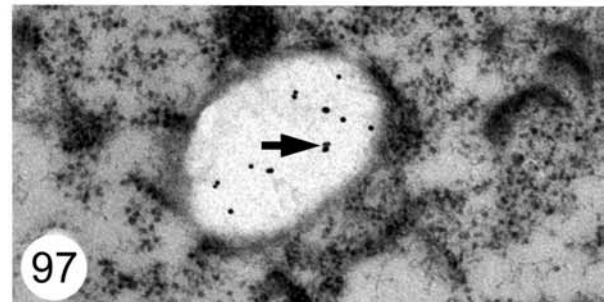
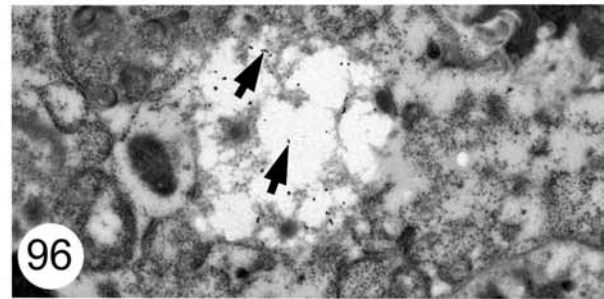
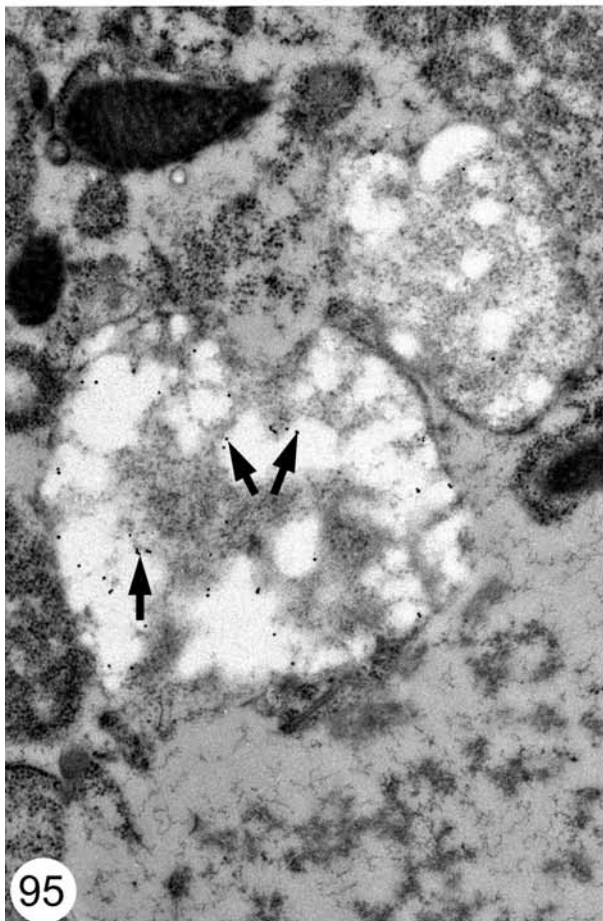
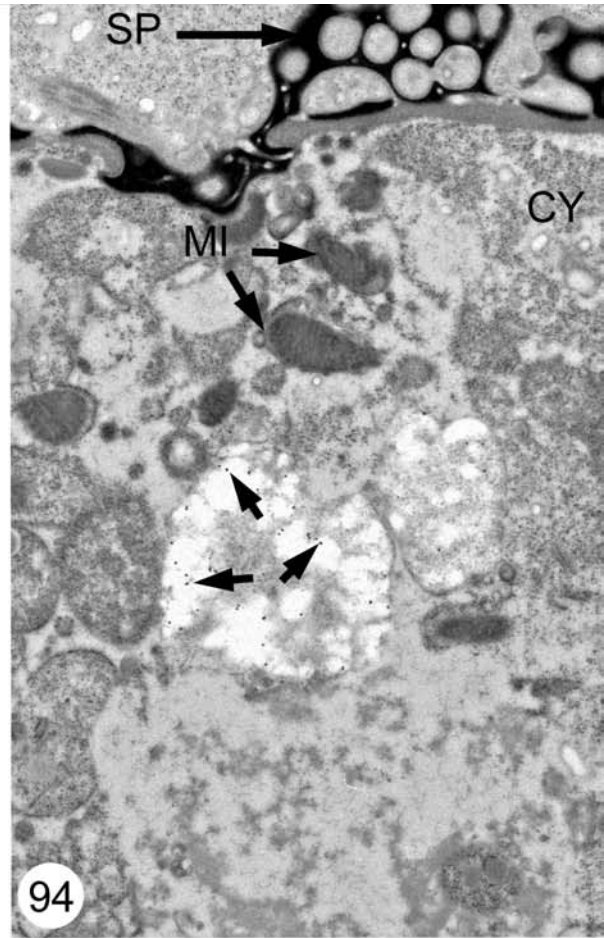
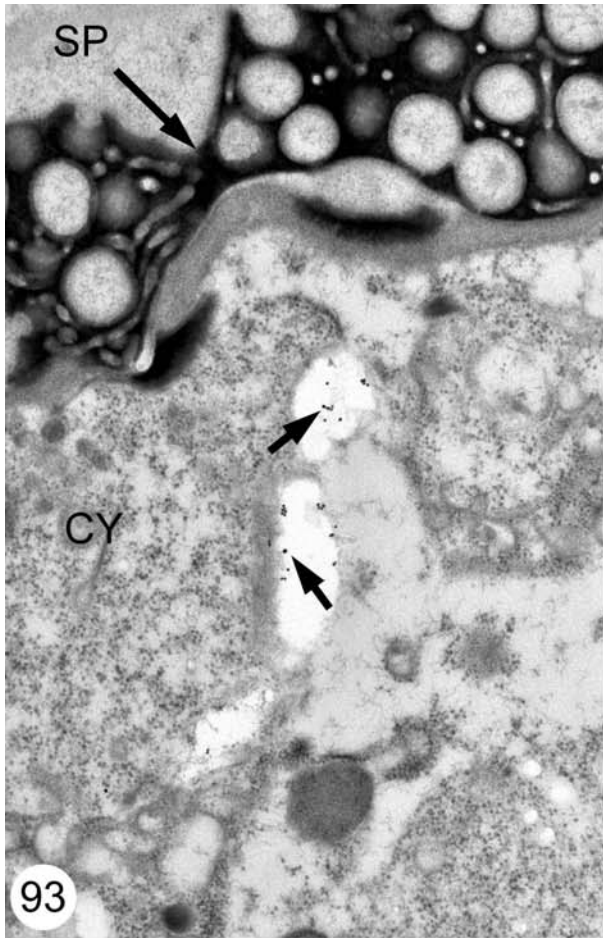
Abb. 93 Inkubation mit Gold-LPA (1:20), 45 min. Peripherie des Parasiten. Die Goldpartikel sind innerhalb des cortikalen Plasmas in den elektronenlichteren Regionen der Vakuolen nachweisbar (Pfeile). x 23220

Abb. 94 Inkubation mit Gold-LPA (1:20), 45 min. Cortikalplasma. Die Anlagerung von Goldpartikeln (Pfeile) erfolgt beim n-Acetylneuraminsäure-Nachweis nur in bestimmten Vakuolen, deren Inhalt nicht definierbar ist. Eine Markierung von Nahrungsvakuolen mit erkennbaren Wirtszellresten konnte nicht nachgewiesen werden. x 14100

Abb. 95 Inkubation mit Gold-LPA (1:20), 45 min. Detailvergrößerung. Auch hier ist die Markierung mit Goldpartikeln an den elektronenlichteren Bereichen der Vakuolen erfolgt (Pfeile). x 19730

Abb. 96-98 Inkubation mit Gold-LPA (1:20), 45 min. Beispiele verschiedener durch Goldpartikel (Pfeile) markierter Vakuolen des Trophonten. N-Acetylneuraminsäure konnte somit nachgewiesen werden. Abb. 96 x 15830; Abb. 97 x 34440; Abb. 98 x 23320

Abkürzungen: CY, Cytoplasma; MI, Mitochondrium; NV, Nahrungsvakuole; SP, Spongiöse Schicht



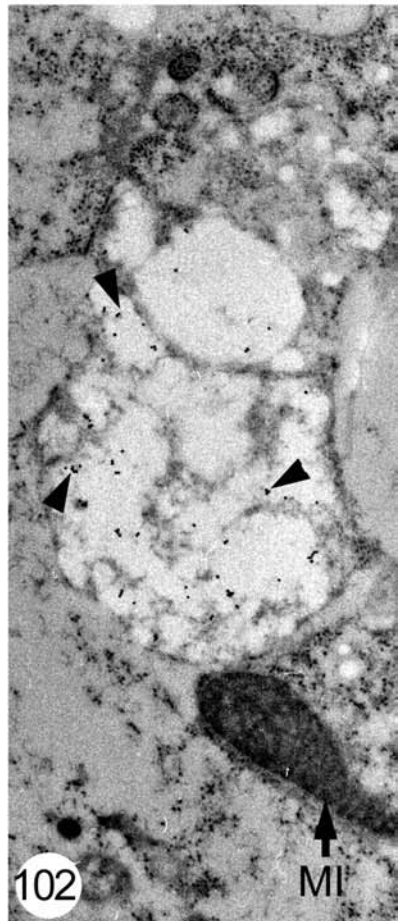
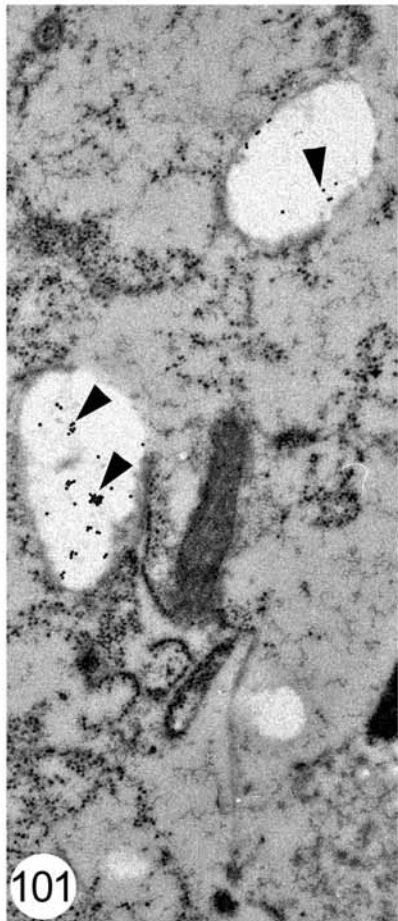
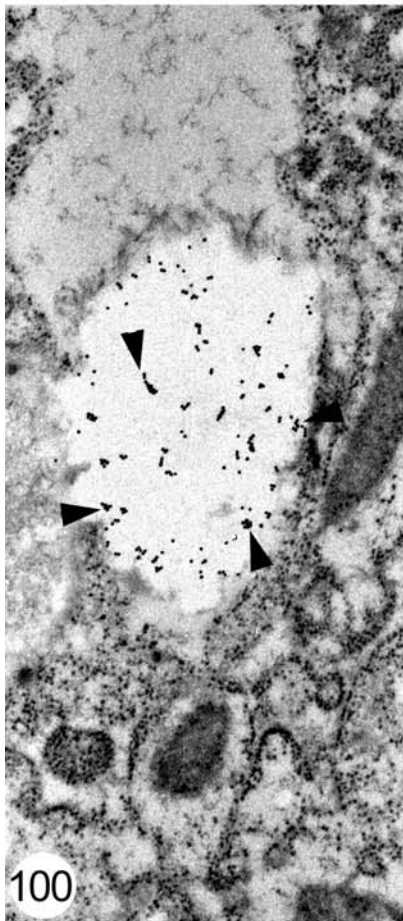
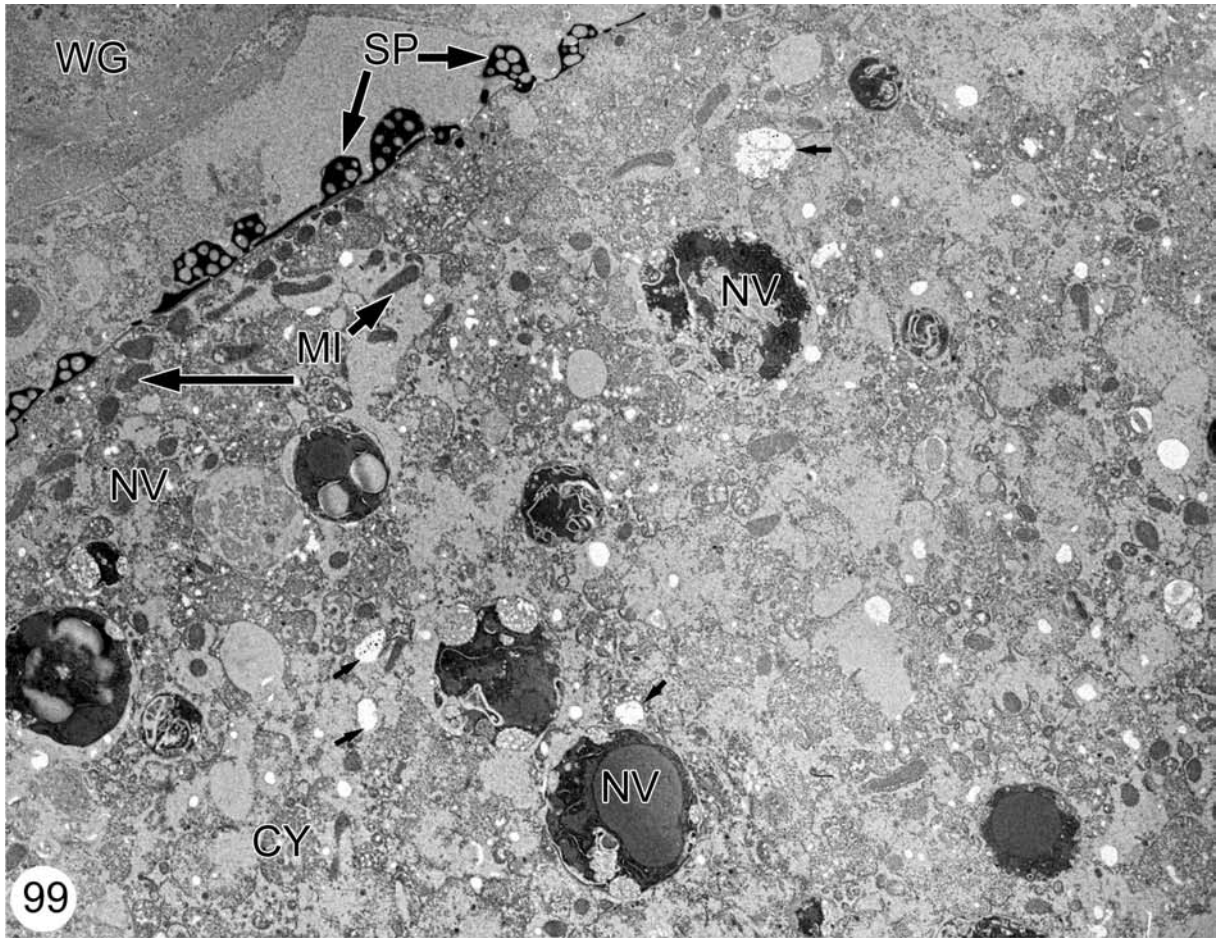
Tafel 26

Abb. 99-102 TEM-Aufnahmen von reifen Trophonten nach Inkubation mit Gold-LPA (1:40) am Schnitt zum Nachweis von n-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)

Abb. 99 Inkubation mit Gold-LPA (1:40), 45 min. Übersicht. Zahlreiche Nahrungsvakuolen verschiedener Cyclosestadien liegen im Cytoplasma eines sehr reifen Trophonten verteilt. Die mit Goldpartikeln markierten Vakuolen sind sehr klein und gerade zu erkennen (Pfeile). x 4320

Abb. 100-102 Inkubation mit Gold-LPA (1:40), 45 min. Detailaufnahmen von Vakuolen aus dem Cytoplasma. Auch bei der geringeren Konzentration gelingt der Sialinsäurenachweis. An die Membranen dieser Vakuolen haben sich zahlreiche Goldpartikel angelagert (Pfeilspitzen). Abb. 100 x 23275; Abb. 101 x 23750; Abb. 102 x 22420

Abkürzungen: CY, Cytoplasma; MI, Mitochondrium; SP, Spongiöse Schicht; WG, Wirtsgewebe



Tafel 27

Abb. 103-110 TEM-Aufnahmen von reifen Trophonten nach Inkubation mit Gold-LPA (1:80) am Schnitt zum Nachweis von n-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) und von reifen Trophonten nach Hemmtests am Schnitt zur Bestätigung der Sialinsäure in den Vakuolen.

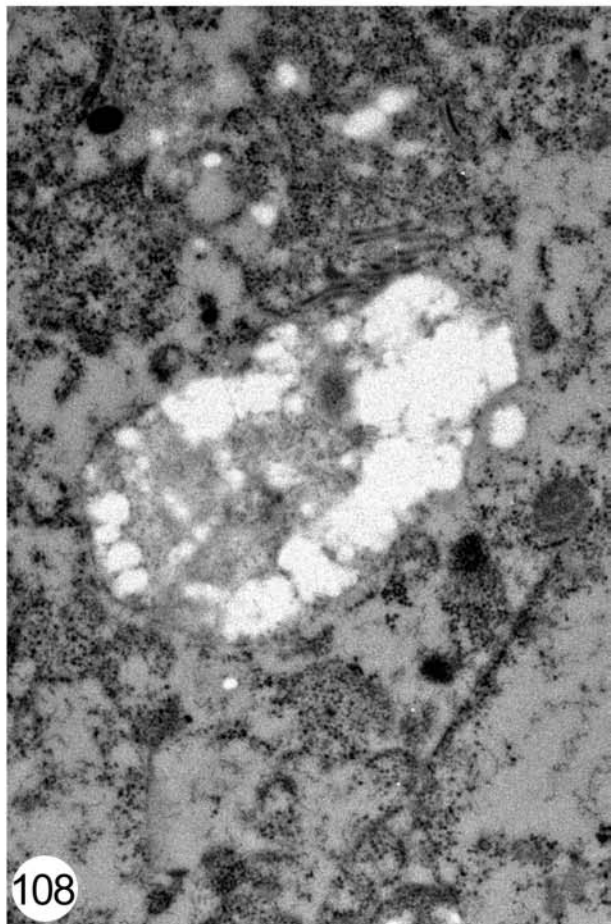
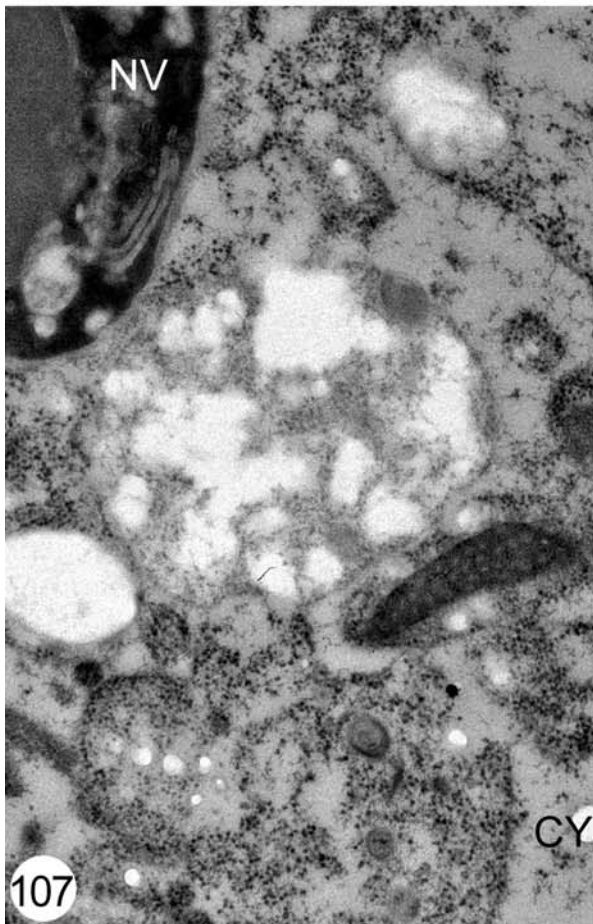
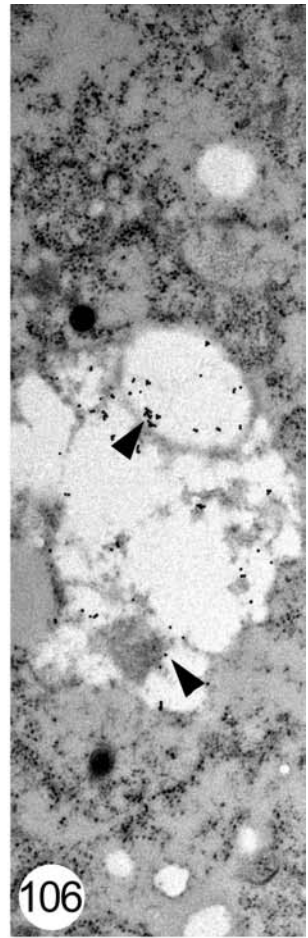
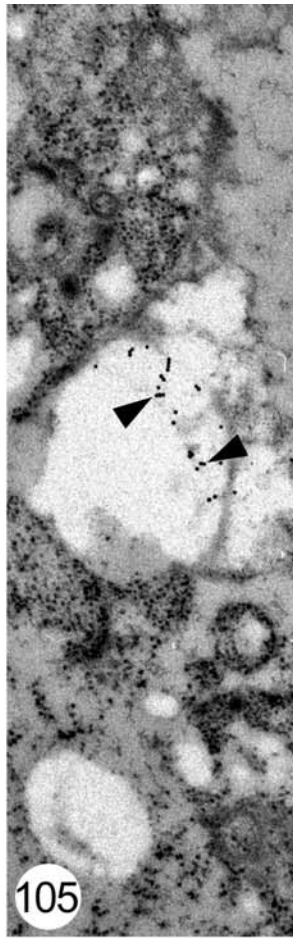
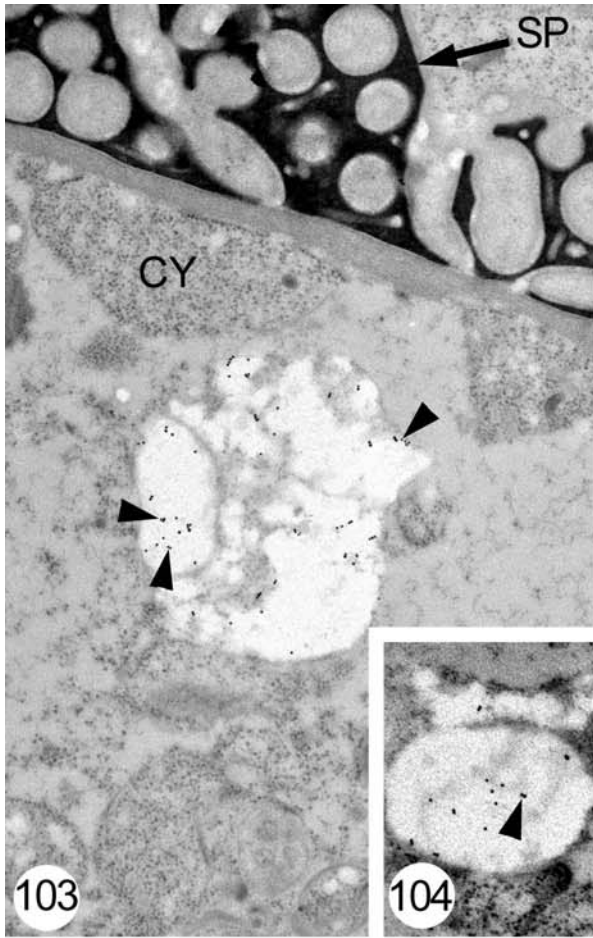
Abb. 103 Inkubation mit Gold-LPA (1:80), 45 min. Peripherie des Trophonten. Auch bei dieser niedrigsten getesteten Konzentrationsstufe konnte die Sialinsäure in diesen Vakuolen durch Markierung mit Goldpartikeln nachgewiesen werden (Pfeilspitzen). Auffallend ist, daß an die spongiöse Substanz keine Goldpartikel angelagert wurden. x 21375

Abb. 104-106 Inkubation mit Gold-LPA (1:80), 45 min. Details aus dem Cytoplasma. Goldpartikel haben sich an die Membranen der Vakuolen angelagert (Pfeilspitzen). Abb. 104 x 24180; Abb. 105 x 25790; Abb. 106 x 28500

Abb. 107 Vakuole im Cytoplasma. Nach der Sialinsäurehemmung konnten keine Goldpartikel mehr nachgewiesen werden. x 28500

Abb. 108 Auch bei dieser Vakuole wurden nach erfolgreicher Blockade keine Goldpartikel mehr angelagert. x 21460

Abkürzungen: CY, Cytoplasma; NV, Nahrungsvakuole; SP, Spongiöse Substanz



Bei allen Verdünnungsstufen lagerten sich die Goldpartikel nicht nur an die Membranen der Vakuolen an (Abb. 101, 106), sondern es wurden auch elektronenlichte Bereiche innerhalb der Vakuolen markiert (Abb. 93, 97, 100).

Auch LPA-Gold wurde im Wirtsgewebe gebunden.

Als Kontrolle der Versuche wurde wiederum ein kompetitiver Hemmtest durchgeführt. Es kam auch in diesem Fall zu keiner Anlagerung der Goldpartikel in den Vakuolen der Trophonten (Abb. 107, 108).

Insgesamt wurde mit dieser Methode ein positiver Nachweis von Sialinsäure oder (n-Acetylaminsäure) bei *Cryptocaryon irritans* erbracht.

3.4.5.6 SBA

Auch die Inkubation mit SBA führte in keiner Versuchsreihe zu Markierungen von spezifischen Strukturen des Parasiten. Weder an seine Oberfläche noch an die Vakuolen waren Goldpartikel gebunden. Nur im Fischgewebe konnten zahlreiche 10 nm große Goldkörnchen nachgewiesen werden.

Tab. 3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Lektin-Gold-Inkubation von *Cryptocaryon irritans* am Ultradünnschnitt

Lektin	nachgewiesener Zucker	nicht nachgewiesener Zucker
Con A		α -D-Glucose α -D-Mannose
WGA	n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin n-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)	
DBA		n-Acetyl- β -(1,4)-D-Galaktosamin
UEA	α -L-Fucose	
LPA	n-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)	
SBA		β -D-Galaktose n-Acetyl- β -(1,4)-D-Galaktosamin

Durch die in dieser Arbeit ausgewählten Lektin-Gold-Markierungen konnten die Zuckergruppen α -L-Fucose, n-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) und n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin in verschiedenen Strukturen der Trophonten von *Cryptocaryon irritans* nachgewiesen werden. Andere Zucker wie n-Acetyl- β -(1,4)-D-Galaktosamin, β -D-Galaktose, n-Acetyl- β -(1,4)-D-Galaktosamin, α -D-Glucose und α -D-Mannose wurden durch die hier vorliegenden Ergebnisse beim Parasiten *C. irritans* ausgeschlossen.

3.5 Wirksamkeit von Bithionolsulfoxid auf *Cryptocaryon irritans*

Bithionol (bis[3,5-dichloro-2-hydroxyphenyl]-sulfid) ist eine Halogen-substituierte diphenolische Verbindung, die von der Struktur her dem Hexachlorophen ähnelt. Vorwiegend wurde die Substanz in der Veterinärmedizin als Mittel gegen Cestoden und Trematoden verwendet, besonders gegen Leberegelbefall bei Wiederkäuern. Wahrscheinlich beruht der fasziolizide Wirkungsmechanismus auf einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Dies führt zu einem ATP-Mangel im Parasiten und somit zu seinem Absterben infolge des Energiemangels (Löscher 1999).

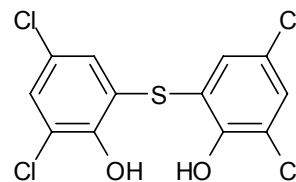


Fig. 3.4 Bithionolsulfoxid

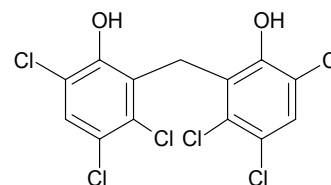


Fig. 3.5 Hexachlorophen

Beim Menschen wurde Bithionol (Lorithidol, Bitin) als Alternative zu Praziquantel gegen Paragonimiasis und Fascioliasis, durch verschiedene *Paragonimus*-Arten bzw. *Fasciola hepatica* hervorgerufen, eingesetzt. Es wurden nur solche Patienten mit Bithionol therapiert, die an Idiosynkrasie, einer angeborenen Unverträglichkeit gegen diese Substanz, litten und starke allergische Reaktionen auf Praziquantel zeigten (Lang 1980, Benjapong et al. 1984, Schlappacasse et al. 1985). Nach Stand der heutigen Forschung sind Bithionol und seine Derivate aufgrund ihrer begrenzten Wirksamkeit und der fehlenden therapeutischen Breite als Fasziolizide überholt.

Bithionolsulfoxid (bis[3,5-dichloro-2-hydroxyphenyl]-sulfoxid) zeigt eine stärkere anthelminthische Wirkung als Bithionol. Bei der Klärung seines metabolischen "Schicksals" wurde experimentell herausgefunden, daß Bitin-S (früherer Handelsname der Substanz) im Körper der Versuchsratten nicht nur zu Bithionolsulfon oxidiert, sondern auch zu Bithionol reduziert wurde. Bithionolsulfon wurde als Bithionolsulfonsäure hauptsächlich über den Urin ausgeschieden, während Bithionol überwiegend in der Galle als Glucuronidkonjugat abgesondert wurde (Meshi et al. 1970).

3.5.1 Verträglichkeitsversuche

Bevor eine gezielte Einmalbehandlung mit Bithionolsulfoxid angewandt werden konnte, mußte die Verträglichkeit der Substanz in Vorversuchen geklärt werden. Die Verträglichkeit wurde nach folgendem Ansatz getestet:

Tab. 3.3 Verträglichkeit von Bithionolsulfoxid nach Einmalbehandlung von *Amphiprion frenatus*

Versuchsansatz	Behandlungsdauer [h]		
	24	48	72
Unbehandelte Kontrolle	0/4*	0/4	0/4
25 mg Bithionol /l	0/4	0/4	0/4
50 mg Bithionol /l	0/4	1/4	1/4
75 mg Bithionol /l	3/4	4/4	

*Anzahl der gestorbenen Fische/Gesamtzahl der Fische pro Testreihe (n=4)

Während der Behandlung mit der Testsubstanz war kein ungewöhnliches Verhalten der Tiere festzustellen. Es gab auch keine Anzeichen dafür, daß die Vitalfunktionen der Fische durch das Medikament eingeschränkt worden wären. Der Verlust eines einzelnen Fisches bei einer Konzentration von 50 mg Bithionol /l lag nahe der Toleranzgrenze. Eine vergleichsweise hohe Dosis des Medikaments ist 75 mg Bithionol /l. Diese Konzentration wurde von *A. frenatus* nicht mehr toleriert und somit auch nicht in den Hauptversuchen getestet.

3.5.2 Verlauf einer *Cryptocaryon irritans*-Infektion bei *Amphiprion frenatus* nach Einmalbehandlung mit Bithionolsulfoxid in verschiedenen Konzentrationsstufen (10 mg/l, 25 mg/l und 50 mg/l); Expositionszeit 24 h u. 48 h

Die nachfolgende Tabelle stellt die Ergebnisse des Verlaufs einer *C. irritans*-Infektion schematisch dar.

Tab. 3.4 Verlauf einer *C. irritans*-Infektion nach Einmalbehandlung mit Bithionolsulfoxid in verschiedenen Konzentrationsstufen

Versuchsdauer [h]	Konzentration Bithionolsulfoxid						Vergleich	
	10 mg/l		25 mg/l		50 mg/l		Kontrolle	
	p _{min} /p _{max}	lebend/tot	p _{min} /p _{max}	lebend/tot	p _{min} /p _{max}	lebend/tot	p _{min} /p _{max}	lebend/tot
0	39/>100	10/0	51/>100	10/0	35/>100	10/0	28/>100	10/0
24	0/7	10/0	0/0	10/0	0/0	9/1	37/>100	7/3
48	0/0	10/0	0/0	10/0	0/0	7/3	59/>100	4/6

p_{min}/p_{max}: min./max. Parasitenzahl pro Fisch

lebend/tot: Anzahl der lebenden/toten Fische

Bithionolsulfoxid wirkte schon in der geringsten Konzentration von 10 mg/l bei einem Expositionszeitraum von 24 h in der Einmaltherapie. Die Anzahl der Parasiten wurde in dieser Zeit drastisch reduziert. Nur noch sehr wenige der hautständigen Stadien waren im Binokular nachweisbar. Nach 48 h waren fast alle Wirtsfische parasitenfrei. Die Versuchsfische zeigten keine dem Medikament zuzuordnenden Auffälligkeiten.

Eine höhere Dosierung (25 mg/l und 50 mg/l) der Substanz bewirkte eine völlige Abnahme der hautständigen Stadien innerhalb des vorgegebenen Zeitraums. 25 mg Bithionolsulfoxid /l wurden zumindest von *A. frenatus* sehr gut toleriert, und es kam dann zu keinen Verlusten unter den Versuchstieren. Bei einer Dosierung von 50 mg Bithionolsulfoxid /l über 24 h lag der Verlust eines Fisches im Bereich des Normalen, da die Wirtstiere zu Anfang der Versuche schon sehr stark infiziert waren. Auffällig ist jedoch, daß ein Verlust von 3 Fischen nach 48 h Therapie auftrat, obwohl die Fische parasitenfrei waren. Dies kann auf die Dosishöhe der Medikation zurückzuführen sein.

Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h konnten in keinem der Versuchsbecken freie Stadien von *Cryptocaryon irritans* nachgewiesen werden.

Im Vergleich zum Verlauf der Infektion der unbehandelten Kontrollen, bei der die Parasitenzahl im Zeitraum von 48 h anstieg und zu starken Verlusten führte, war die Therapie mit Bithionolsulfoxid eindeutig erfolgreich.

3.5.3 Wirksamkeit von Bithionolsulfoxid auf die hautständigen Stadien von *Cryptocaryon irritans* nach 24 stündiger Inkubation mit 10 mg Bithionolsulfoxid /l; TEM-Untersuchungen

Die den Parasiten limitierenden Membranen waren aufgelöst (Abb. 109, 110, 118). Auch die spongiöse Schicht war größtenteils verschwunden bzw. als Einheit nicht mehr nachweisbar (Abb. 110). Im Randbereich der spongiösen Schicht waren elektronenlichte Vesikel zu finden (Abb. 112). Die ciliären Strukturen wurden vermindert und stark geschädigt (Abb. 109, 114, 115).

Das cortikale Plasma erschien elektronenlichter und löste sich flockenartig auf (Abb. 109, 114, 115). Auch Spaltbildungen sind zu sehen (Abb. 113, 114). Im ebenfalls elektronenlichteren Cytoplasma des Parasiten lagen zahlreiche geschädigte Mitochondrien, deren Matrix unterschiedlich elektronenlicht erschien. Ihre Tubuli waren, oft vom Zentrum ausgehend, zerstört (Abb. 109, 110). Teilweise waren in ihrem Inneren durch Bithionolsulfid hervorgerufene Spaltbildungen zu erkennen (Abb. 111). Zahlreiche elektronenlichte Vesikel sowie Zellreste unbekannter Herkunft waren im Cytoplasma verstreut (Abb. 109). Stellenweise waren auch elektronendichte Vesikel nachweisbar, die von den nicht mehr auffindbaren Mucozysten abstammen könnten (Abb. 109, 110).

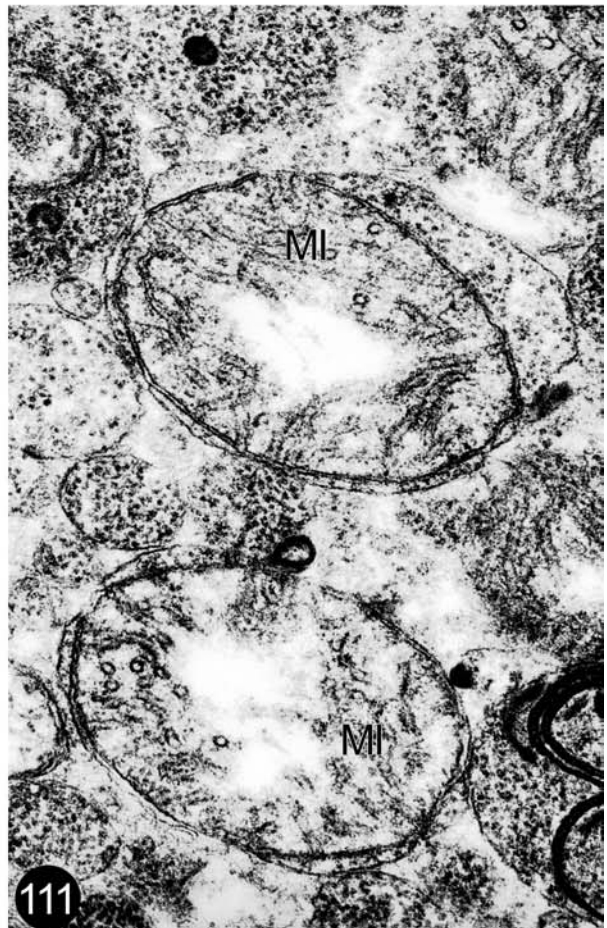
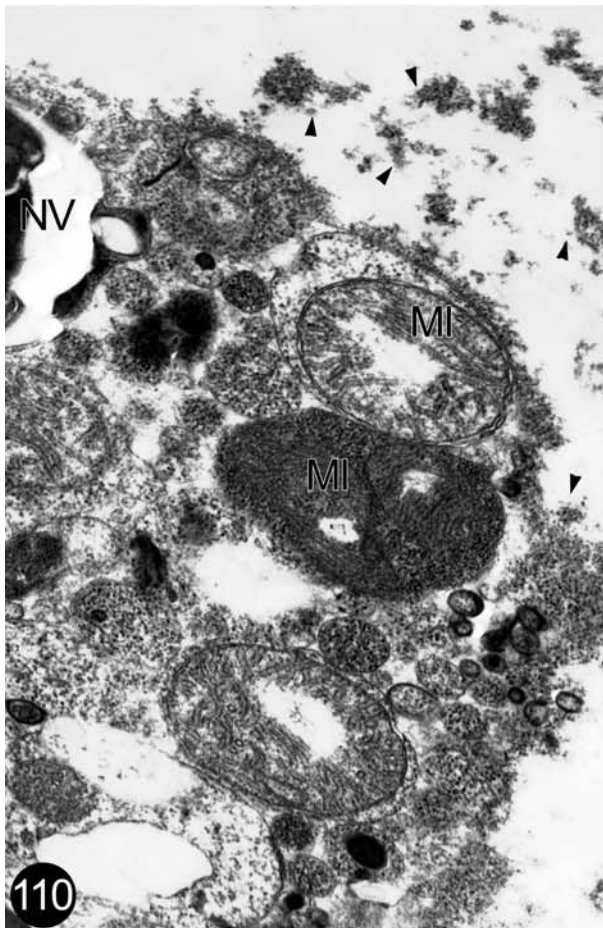
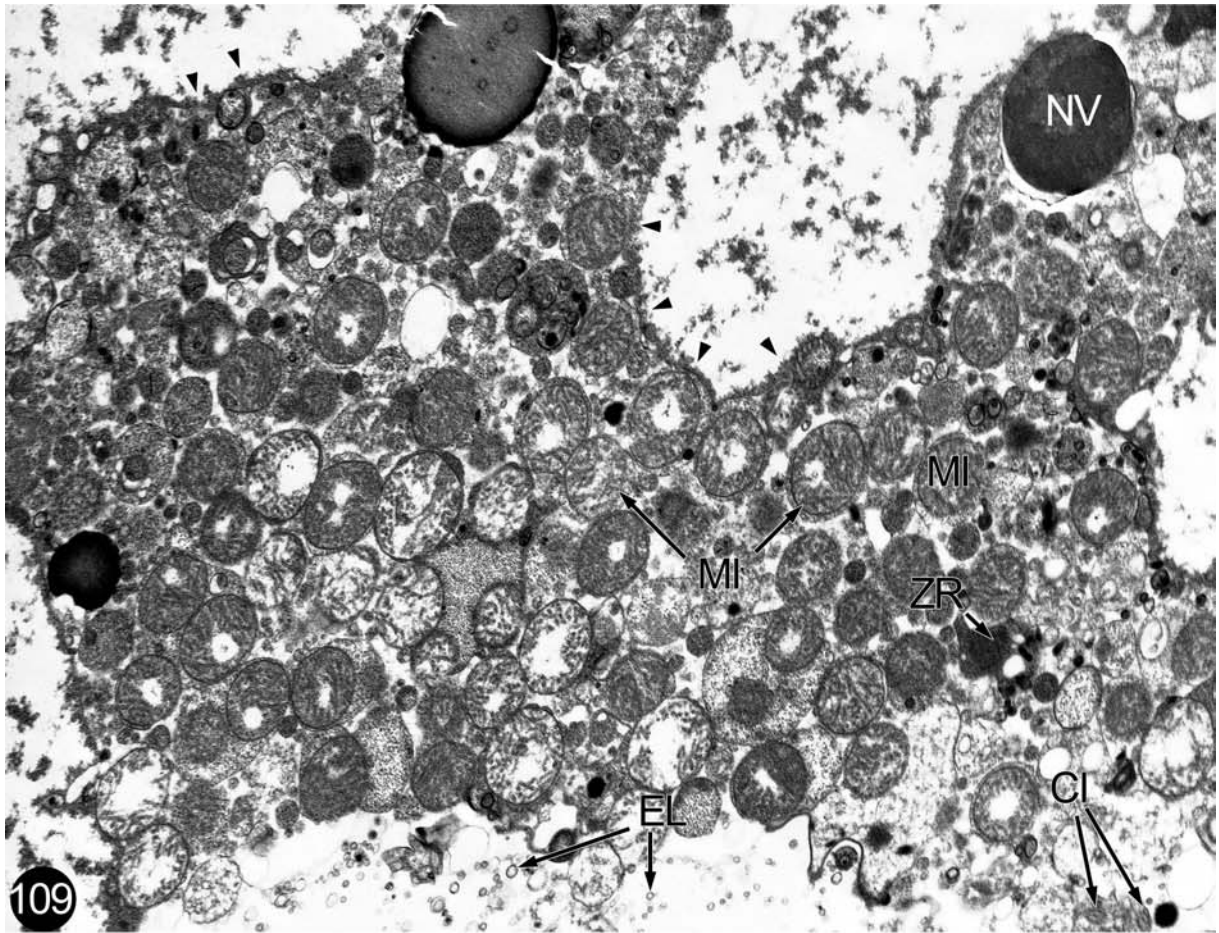
Auch der Makronucleus des Parasiten wurde von Bithionolsulfoxid schon in dieser geringen Konzentration geschädigt. Die Anzahl der Chromatinschollen in der elektronenlichten Matrix wurde reduziert (Abb. 116) und zudem der perinucleäre Raum stark erweitert (Abb. 117).

Tafel 28

Abb. 109-111 TEM-Aufnahmen reifer Trophonten nach einmaliger Behandlung mit Bithionolsulfoxid (10mg/l); Expositionszeit 24 h

- Abb. 109 Übersicht eines Trophonten mit Randbereich. Die spongiöse Schicht ist größtenteils aufgelöst (Pfeilspitzen). Die ciliären Strukturen sind stark geschädigt. Im Plasma liegen zahlreiche geschädigte Mitochondrien, deren Matrix unterschiedlich elektronenlicht erscheint. Ihre Tubuli sind, oftmals vom Zentrum ausgehend, zerstört. Mucozysten sind nicht mehr nachweisbar. Elektronenlichte kleine Vesikel liegen im Plasma verstreut sowie Zellreste nicht mehr identifizierbarer Herkunft. x 10300
- Abb. 110 Peripherie. Stellenweise fehlt die limitierende Membran des Parasiten. Die spongiöse Schicht ist als Einheit nicht mehr nachweisbar. Das cortikale Plasma erscheint elektronenlichter und löst sich flockenartig auf (Pfeilspitzen). Die Tubuli der Mitochondrien sind im Zentrum aufgelöst. x 34000
- Abb. 111 Detailaufnahme. Sowohl der Plasmabereich als auch die Mitochondrien erscheinen stark elektronenlicht. Im Inneren der Mitochondrien sind durch die Medikation hervorgerufene Spalten zu sehen. x 44800

Abkürzungen: CI, Cilium; EL, Elektronenlichte Vesikel; MI, Mitochondrium;
NV, Nahrungsvakuole; ZR, Zellreste



Tafel 29

Abb. 112-117 TEM-Detaillaufnahmen reifer Trophonten nach einmaliger Behandlung mit Bithionolsulfoxid (10mg/l); Expositionszeit 24 h

Abb. 112 Peripherie. Die limitierenden Membranen sind nicht mehr nachweisbar. Im Randbereich der spongiösen Schicht sind elektronenlichte Vesikel zu finden (Pfeilspitzen). x 27000

Abb. 113 Eine Begrenzung des kortikalen Bereiches ist nicht mehr zu belegen (Pfeilspitzen). Spongiöse Vesikel, deren limitierende Membranen vollkommen zerstört sind, liegen direkt zwischen den Mitochondrien.
x 39600

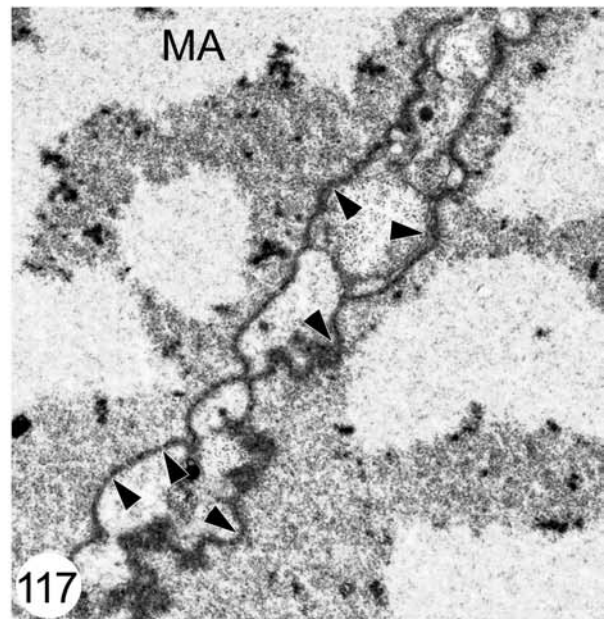
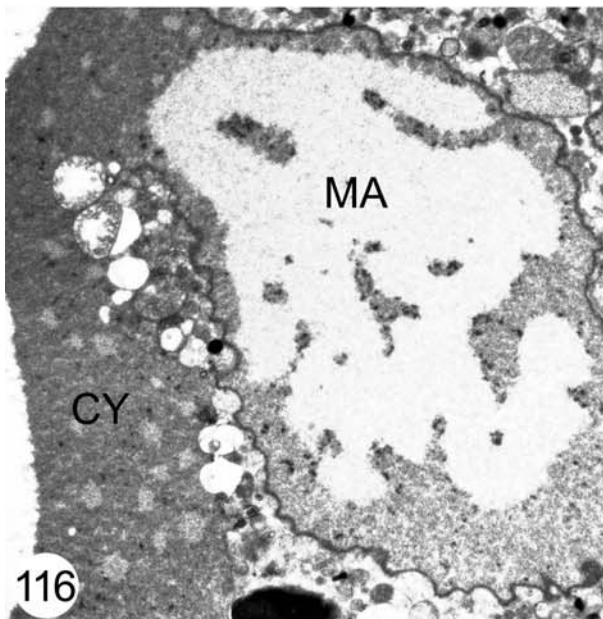
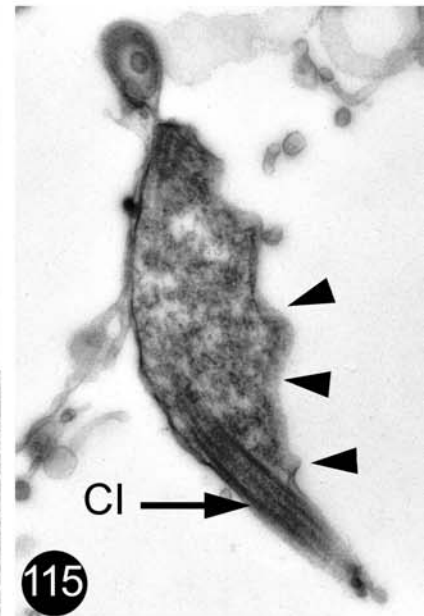
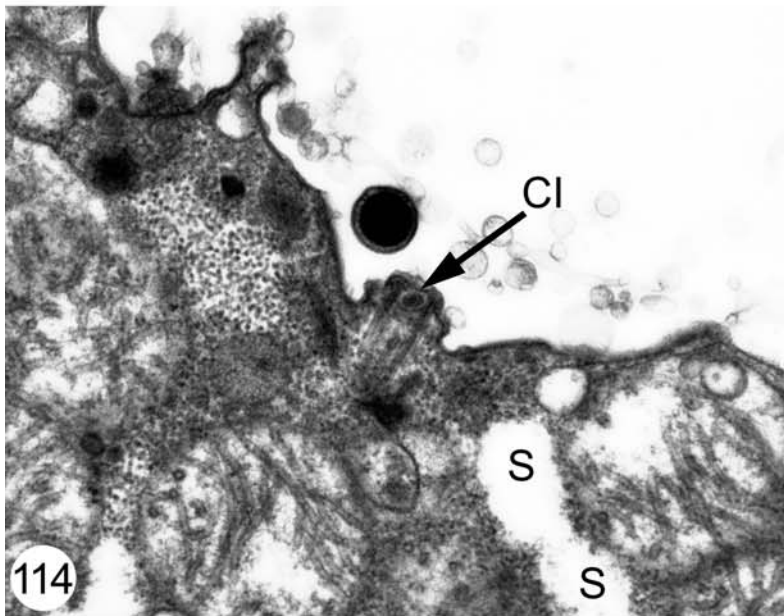
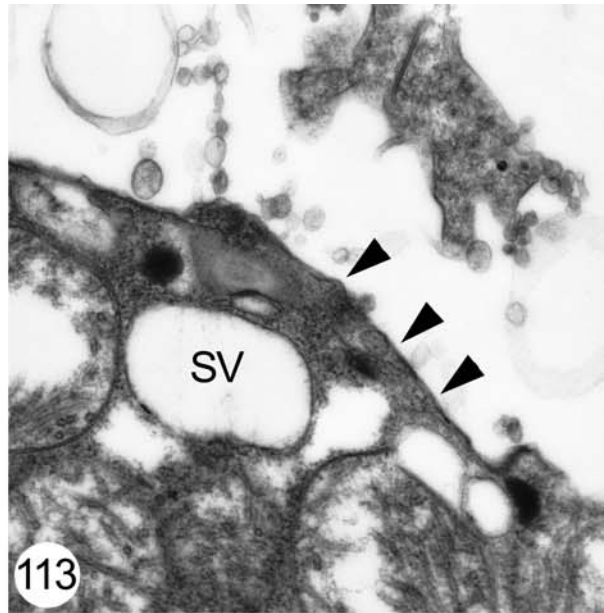
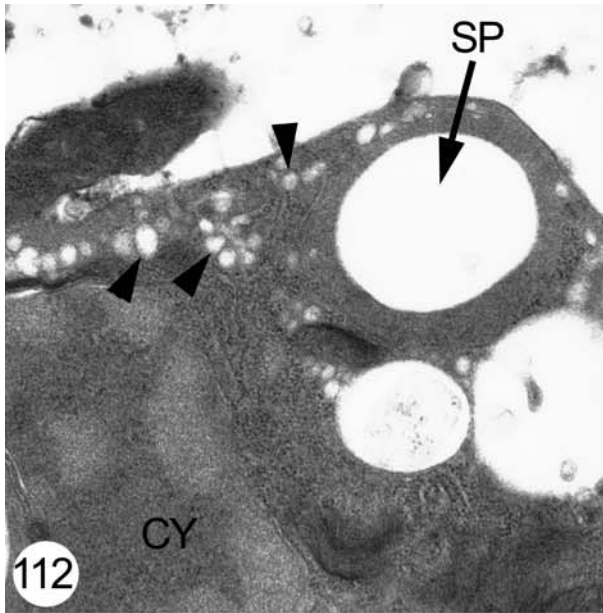
Abb. 114 Peripherie mit Cilienwurzel. Die spongiöse Schicht ist nicht mehr nachzuweisen. Das Cilium ist gebrochen. Innerhalb des elektronenlichter erscheinenden kortikalen Plasmas treten Spalten auf. Die Mitochondrien sind zerstört. x 39600

Abb. 115 Reste eines Ciliums. Bereiche des Axonems sind vergrößert (Pfeilspitzen).
x 22880

Abb. 116 Peripherie mit Makronucleus. Die Anzahl der Chromatinschollen in der elektronenlichten Matrix ist reduziert. x 5700

Abb. 117 Der perinucleäre Raum ist stark erweitert (Pfeilspitzen). x 23400

Abkürzungen: CI, Cilium; CY, Cytoplasma; MA, Makronucleus; MI, Mitochondrium; S, Spalt; SP, Spongiöse Schicht; SV, Spongiöse Vesikel



Tafel 30

Abb. 118-123 TEM-Aufnahmen der einzelnen Cyclocestadien reifer Trophonten von *C. irritans* nach einmaliger Behandlung mit Bithionolsulfoxid (10mg/l); Expositionszeit 24 h

Abb. 118 Ansammlung von Nahrungsvakuolen im elektronenlicht erscheinenden Cytoplasma. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen sind keine Unterschiede festzustellen. x 13500

Abb. 119 Im Cytoplasma des medikierten Parasiten liegt eine junge Nahrungsvakuole mit einer fast intakten Wirtszelle. Das Cytoplasma ist durchsetzt mit elektronenlichten Vesikeln und Zellen nicht mehr definierbarer Herkunft. x 23800

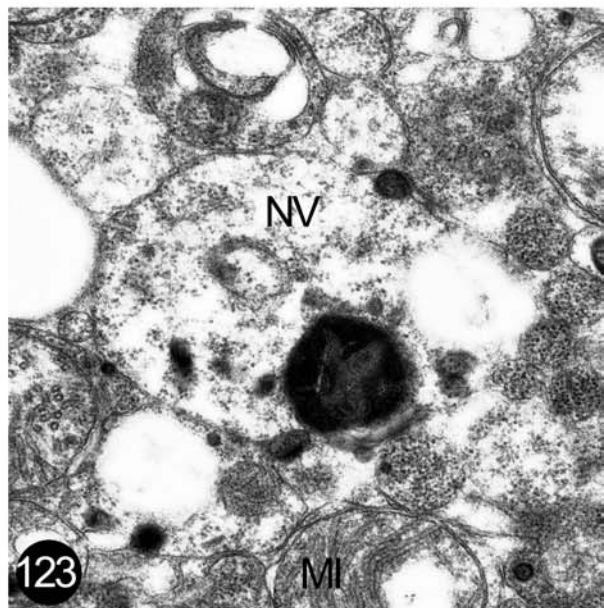
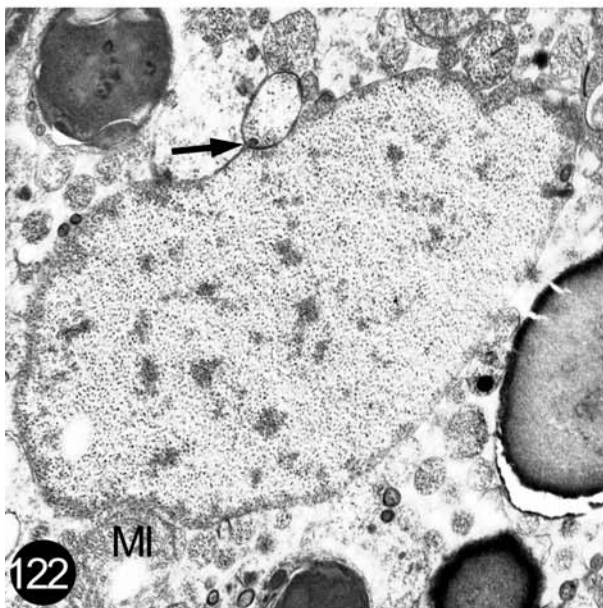
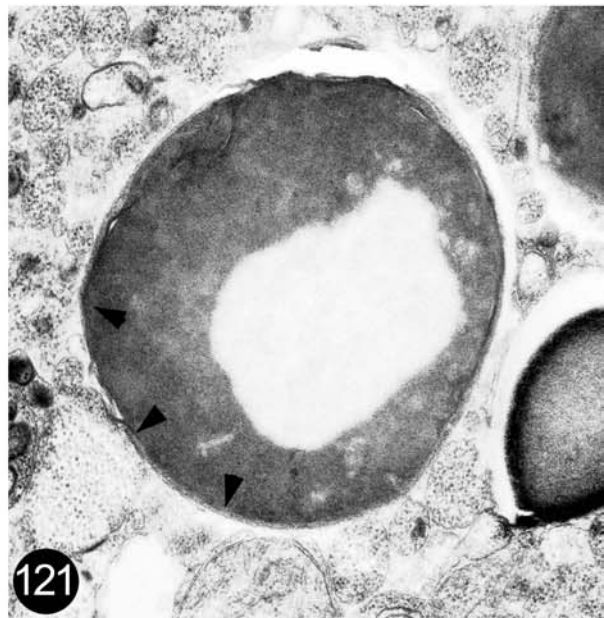
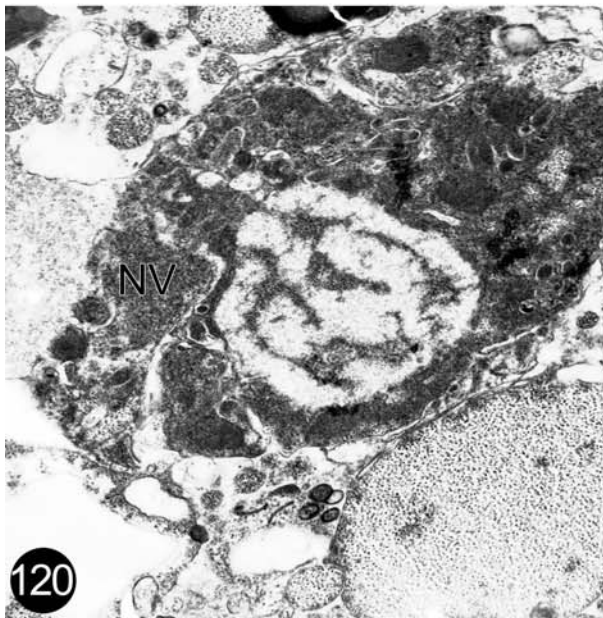
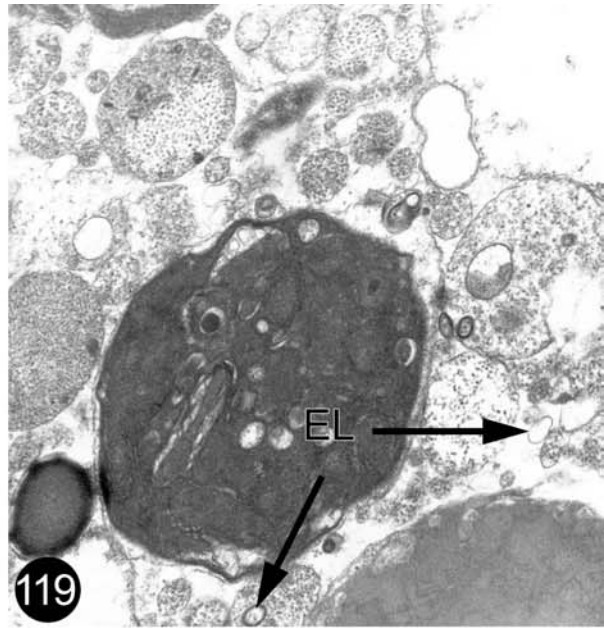
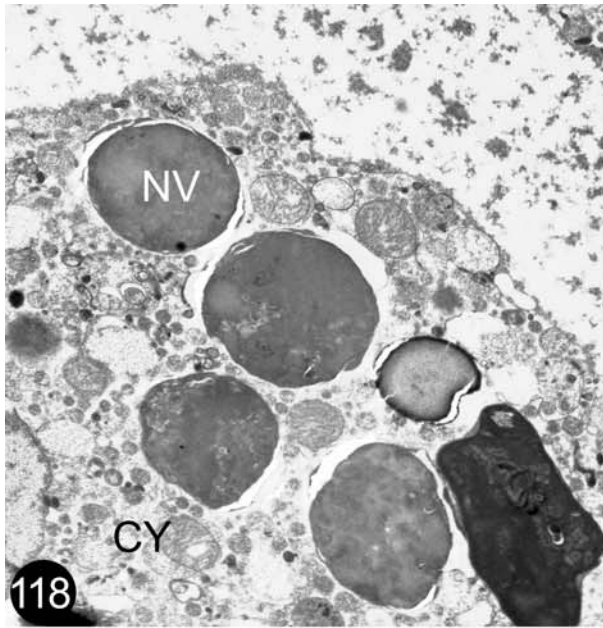
Abb. 120 Epidermiszelle des Wirtes im fortgeschrittenen Verdauungsprozeß. x 16400

Abb. 121 Ansammlung von elektronendichten Material an der Peripherie (Pfeilspitzen) dieser reiferen Vakuole. Im elektronenlichten Cytoplasma liegen Mitochondrien und Vesikel unbestimmten Ursprungs. x 38860

Abb. 122 Reife Nahrungsvakuole. Beginnende Fusion mit einer kleinen Vakuole (Pfeil). Das Cytoplasma erscheint elektronenlicht. x 18000

Abb. 123 Späte Nahrungsvakuole mit kondensiertem Inhalt. Auch hier sind keine Unterschiede zu vergleichbaren Cyclocestadien in unbehandelten Trophonten nachzuweisen. x 25700

Abkürzungen: CY, Cytoplasma; EL, Elektronenlichte Vesikel; MI, Mitochondrium; NV, Nahrungsvakuolen



In der Vergrößerung der Peripherie von *Cryptocaryon irritans* waren sowohl die den Parasiten umsäumenden Membranen als auch die inneren Membranen der spongiösen Vesikel eindeutig zerfallen (Abb. 111-113). Die Begrenzung des kortikalen Bereiches war stellenweise nicht mehr zu erkennen. Reste der spongiösen Schicht lagen teils direkt zwischen den schadhaften Mitochondrien (Abb. 113).

Abb. 114 zeigt eine an der Peripherie des kortikalen Plasmas gelegene Cilienwurzel. Das Cilium war gebrochen. An weiteren ciliären Resten traten Schwellungen im Bereich des Axonems hervor (Abb. 115).

Betrachtet man die Nahrungsvakuolen der medikierten hautständigen Parasiten, so war festzustellen, daß sie im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen unbeschädigt im elektronenlichten Cytoplasma lagen (Abb. 118). Sie schienen die einzig intakten Strukturen innerhalb der stark deformierten, hautständigen Parasiten zu sein und lagen in verschiedenen Cyclolestadien vor (Abb. 118-123).

Sowohl junge Nahrungsvakuolen mit noch fast intakten Wirtszellen (Abb. 119) als auch reifere Vakuolen (Abb. 120, 121) lagen im Cytoplasma neben elektronenlichten Vesikeln und Zellen nicht mehr definierbarer Herkunft. Auch bei sehr späten Nahrungsvakuolen waren keine Unterschiede zu vergleichbaren Cyclolestadien in unbehandelten Trophonten zu erkennen (Abb. 123).

Während der hautständige Parasit durch die Einmalbehandlung mit Bithionol in der geringen Konzentration von 10 mg/l über einen Expositionszeitraum von 24 Stunden förmlich zersetzt wurde, hatte diese Medikation keine Einwirkungen auf die Nahrungsvakuolen und ihre einzelnen Cyclolestadien.

3.5.4 Wirksamkeit von Bithionolsulfoxid auf die hautständigen Stadien von *Cryptocaryon irritans* nach 24 stündiger Inkubation mit 25 mg Bithionolsulfoxid /l; TEM-Untersuchungen

Eine Einmalbehandlung mit Bithionolsulfoxid in der Konzentration von 25 mg/l, 24 h hatte zur Folge, daß die hautständigen Stadien von *Cryptocaryon irritans* nur noch als zelluläre Reste vorhanden waren. Sie wurden so stark geschädigt, daß von der ehemaligen Organisation nichts mehr zu erkennen war. Eine eindeutige transmissionselektronenmikroskopische Dokumentation der verbliebenen Zellreste war somit nicht mehr möglich.

3.5.5 Wirksamkeit von Bithionol Sulfoxid auf die hautständigen Stadien von *Cryptocaryon irritans* nach 24 stündiger Inkubation mit 50 mg Bithionolsulfoxid /l; TEM-Untersuchungen

Auch die Einmalapplikation von Bithionolsulfoxid in der Konzentration von 50 mg/l wirkte eindeutig auf die Phoronten und Trophonten des Parasiten. Nach 24 Stunden waren keine parasitären Stadien mehr nachweisbar. Auch die Zellflocken, die bei der Konzentration von 25 mg/l noch zu finden waren, hatten sich bei dieser Therapiestufe aufgelöst.

Abschließend ist zur Einmalbehandlung mit dieser diphenolischen Verbindung in den hier gewählten Konzentrationen festzustellen, daß sie erfolgreich zur Bekämpfung der hautständigen Stadien von *Cryptocaryon irritans* eingesetzt werden kann. Dabei wurden die Wirtsfische *A. frenatus* nicht geschädigt. Bithionolsulfoxid wirkte schon in der geringen Konzentration von 10 mg/l auf die einzelnen Stadien. Diese waren nach 24 Stunden im Wirtsgewebe noch teilweise nachweisbar. In der Konzentration von 25 mg/l über den gleichen Zeitraum waren die Schäden bereits so groß, daß sie im TEM nicht mehr eindeutig zu dokumentieren waren. Gleiches galt für die nächst höhere Konzentration von 50 mg/l.

In der Praxis war bei einer Cryptocaryoniasis die mittlere Konzentration von 25 mg/l vorzuziehen, da hier der einzelne Fisch bei der geringst möglichen Belastung optimal therapiert wurde.

Weder die niedrigste noch höchste Konzentrationsstufe sind nach diesen Ergebnissen zu empfehlen. Entweder sie wirken nicht optimal auf eventuell sehr resistente *C. irritans*-Stämme oder aber sie belasteten besonders empfindliche Exemplare zu stark (siehe Punkt 3.5.2)

4. Diskussion

4.1 Morphologie und Struktur der verschiedenen Stadien von *Cryptocaryon irritans*

Der holotriche Ciliat *Cryptocaryon irritans* ist seit seiner Beschreibung und Benennung durch Brown (1951) von verschiedenen Forschergruppen im Hinblick auf seine Morphologie untersucht worden (de Graaf 1962, Brown 1963, Nigrelli und Ruggieri 1966, Colorni und Diamant 1993, Matthews et al. 1993, Diggles 1997). Auch unterschiedliche Bekämpfungsmaßnahmen waren der Inhalt einiger Untersuchungen (u.a. Herwig 1978, Cheung et al. 1979, Colorni 1985, 1987, Hirazawa 2001 a, b).

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zur Morphologie des Parasiten stimmten überwiegend mit den schon veröffentlichten Studien zur allgemeinen Biologie des Parasiten überein (Brown 1963, Colorni und Diamant 1993, Matthews et al. 1993).

Die Benennung der in dieser Arbeit beschriebenen verschiedenen Stadien folgte der Terminologie von Canella und Rocchi-Canella (1976) sowie Colorni und Diamant (1993). Der Entwicklungszyklus umfaßte eine parasitische und eine nicht-parasitische Phase, in denen *C. irritans* mehrfach seine Struktur änderte. Während der parasitischen Phase nahm der Ciliat größere Mengen an Nahrung auf und wuchs deutlich heran. Diese hautständigen Stadien wurden analog Colorni und Diamant (1993) als **Phoront** und **Trophont** bezeichnet.

Nach der Ablösung vom Wirtsfisch heftete sich der **Protomont** überwiegend an Bodensubstrat an und bildete den **Tomonten**. Innerhalb des Tomonten entstanden die Tochterzellen oder **Tomiten**. Diese wurden dann als infektiöse freischwimmende Schwärmer (**Theronten**) freigesetzt und konnten einen geeigneten Wirtsfisch befallen. Kurz nach dem Eindringen gestaltete sich der Theront im Fischgewebe zum Phoronten um, der seinerseits mit Beginn der Nahrungsaufnahme zum Trophonten wurde. Die Übergänge zwischen den einzelnen Stadien waren dabei fließend.

Einige Forscher (Matthews et al. 1993, Burgess und Matthews 1994, Diggles und Lester 1996) grenzen die verschiedenen Stadien von *C. irritans* nicht derart scharf ab, sondern

richten sich nach Lom und Dyková (1992), die die Stadien analog zu *Ichthyophthirius multifiliis* benennen. Dabei umfaßt der Begriff Trophont die Hautstadien (Phoront und Trophont) sowie den Protomonten. Tomont, Tomit und Theront bleiben in beiden Terminologien erhalten. Mitunter wird der Trophont aber auch als Trophozoit bezeichnet (Ruider 1995).

In einigen Befunden zur Ultrastruktur widersprechen sich manche Forschungsgruppen. So berichtete Xu et al. (1992) von einer kontraktile Vakuole in der posterioren Region des Tomiten. In den vorliegenden Untersuchungen hingegen konnte eine kontraktile Vakuole bei keinem der verschiedenen Stadien festgestellt werden. Auch andere Wissenschaftler haben das Fehlen der kontraktile Vakuolen bei *Cryptocaryon irritans* als charakteristisch herausgestellt (Colorni und Diamant 1993, Matthews et al. 1993).

Ebenso wurden bislang die elektronendichten, nierenförmigen Organellen von Lieberkühn (sog. "Uhrglasorganellen") bei *C. irritans* nicht nachgewiesen (Matthews et al. 1993, Colorni und Diamant 1993, Keskinetepe et al. 1994). Diese Organellen kommen in der oralen Region der Theronten von *Ichthyophthirius multifiliis* vor und liegen zwischen den ersten beiden Kinetiden (Lynn et al. 1991). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte keine Struktur gefunden werden, die annähernd den Uhrglasorganellen glich.

In dieser Untersuchung zeigte sich auch, daß bis auf den Tomonten sämtliche Stadien mit Cilien besetzt waren. Dies entspricht den Befunden von Burgess 1992, Colorni und Diamant 1993 sowie Diggles 1997. Matthews et al. konnten 1993 jedoch am reifen Trophonten keine Cilien entdecken. Bei der Examinierung der verschiedenen Entwicklungsstadien beschrieben die Forscher aber elektronendichte Einfaltungen der äußeren Membran, die mit zunehmender Reife des Parasiten abnahmen. Dies entspricht den spongiösen Strukturen aus der vorliegenden Arbeit. Ebenso wie bei Colorni und Diamant (1993) konnte auch hier eine Größenabnahme mit fortschreitender Entwicklung dokumentiert werden. Dieser spongiösen Schicht kommt wahrscheinlich eine besondere Rolle in der Abwehr gegen das Immunsystem des Wirtsfisches zu (siehe Pkt. 4.4.5).

Ferner fanden sie in den verschiedenen Stadien endosymbiontische Bakterien (Xenosomen), die in der vorliegenden Untersuchung aber nicht belegt werden konnten.

Auch Diggles (1997) sowie Colorni und Diamant (1993) wiesen diese Endosymbionten nicht nach. Letztere konnten den Golgi-Apparat der Parasiten nur im Trophonten-Stadium darstellen, während Matthews et al. 1993 sogar im Tomiten im Querschnitt semi-zirkuläre

Golgi-Apparate fanden (1993). In den hier vorliegenden eigenen Untersuchungen der Tomiten wurden zwar auch häufiger Membranstapel entdeckt, eine genaue Zuordnung zum Golgi-Apparat konnte aber nicht getroffen werden, denn es fehlten z.B. den einzelnen Lamellen dieser Membranstapel der aufgeblähte Rand. Vielleicht handelte es sich bei diesen Stapeln um die Vorstufen der Golgi-Apparate.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Forschergruppe um Matthews hinsichtlich des Auftretens von Hohlräumen innerhalb des peripheren Cytoplasmas der noch jungen Tomiten überein. Eine Funktion konnte ihnen jedoch nicht zugeordnet werden.

Unterhalb des Plasmalemmas der Tomiten befanden sich in dieser Untersuchung zahlreiche Mucozysten, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Penetration der Haut und somit der Infektion der Wirtsfische spielen. So könnten sie histolytische Enzyme enthalten, die die Penetration in die Fischepidermis erleichtern und eventuell auch die Nahrungsaufnahme vereinfachen (Matthews et al. 1993). Für eine Funktion bei der Penetration spricht, daß die Anzahl der Mucozysten in den hautständigen Stadien rapide abnimmt (Colorni und Diamant 1993, Matthews et al. 1993).

Bei dem parasitären Süßwasserciliaten *Ichthyophthirius multifiliis* werden die Mucozysten des Theronten bei Erreichen des Wirtes ausgeschleudert. Aber auch in diesem Fall ist ihre genaue Rolle bei der Anheftung an den Wirtsfisch unklar, und bisher gibt es widersprüchliche Forschungsberichte. So sollen die Substanzen, die aus den Mucozysten stammen, ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Anheftung spielen, indem dieses klebrige Material den Theronten wie eine Hülle umgibt und die Festheftung erleichtert (Dickerson und Dawe 1995, Ruider 1995). Auch die "Anheftung" durch thigmotaktische Cilien wurde diskutiert (Dickerson und Dawe 1995).

Lytische Enzyme vermuteten auch Colorni und Diamant bei den Trophonten von *C. irritans*. Sie nahmen an, daß die Vesikel der spongiösen Struktur lytische Enzyme enthielten, die bei einer extrazellulären Verdauung benötigt würden. Innerhalb der Vesikel konnten sie durch einen PAS-Test Kohlenhydrate nachweisen (Colorni und Diamant 1993). Da aber die Dicke der spongiösen Schicht mit zunehmender Reife der Trophonten abnimmt und mit den Lektin-Gold-Markierungen in dieser Arbeit eindeutig n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin in den spongiösen Vesikeln nachgewiesen werden konnte (siehe Pkt. 4.4.5), ist die letzte Annahme aber eher unwahrscheinlich.

Die **Wirtsfindung** ist sowohl bei *Cryptocaryon irritans* als auch bei *Ichthyophthirius multifiliis* noch nicht genau geklärt. Die Theronten beider Parasiten schwimmen in

spiralförmigen Bewegungen umher, bis sie auf einen geeigneten Wirt treffen (Dickerson und Dawe 1995, Diggles und Lester 1996 b, eigene Beobachtungen). Die Forschungsgruppe um Haas (1999) hatte zur Wirtsfindung von *I. multifiliis* spezifische "Verhaltensmuster" der Theronten als Antwort auf verschiedene Formen von Fischgewebe und Extrakten aus Fischgeweben beobachtet. So zeigten die Theronten als Reaktion auf Aminosäuren in Kombination mit noch unbekanntem Bestandteilen der Fischhaut Richtungsänderungen und ein spezielles Orientierungsverhalten. Auch auf Glykokonjugate aus der Fischhaut "antworteten" die Theronten mit spezifischem Schwimmverhalten. Bei *C. irritans* konnte jedoch bislang kein derart komplexes und zielgerichtetes Schwimmverhalten festgestellt werden.

Wahrscheinlich sind die Parasiten aber in der Lage, chemische Veränderungen im Wirtsepithel zu erkennen. Stirbt der Wirt, so verlassen nämlich die meisten Trophonten von *C. irritans* und *I. multifiliis* innerhalb von kurzer Zeit den toten Wirtsfisch (Dickerson und Dawe 1995).

Die **Penetration** der Theronten in die Fischhaut ist ebenfalls noch nicht genau geklärt. Fest steht aber, daß *Ichthyophthirius multifiliis* innerhalb von 5 min bis zur Basallamina der Wirtsfische vordringen kann, wobei sich der Parasit mit einem apikalen Perforatorium im Bereich des Cytostoms in das Fischgewebe bohrt (Ruider 1995, Dickerson und Dawe 1995).

Cryptocaryon irritans dringt ebenfalls innerhalb von wenigen Minuten in den Wirtsfisch ein. Dabei liegt die Zeitspanne zwischen 30 Sekunden und wenigen Minuten (Matthews et al. 1993, Colorni und Diamant 1993, Diggles und Lester 1996 b). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings ein Eindringen der Theronten in das Wirtsgewebe innerhalb von Sekunden nicht beobachtet werden. Bei der Penetration bohrte sich der Parasit ähnlich wie *I. multifiliis* mit seinem vorderen Pol in die Fischepidermis in etwa fünf Minuten ein, allerdings fehlte dem Seewasserparasiten ein Perforatorium.

Nachdem das freischwimmende Stadium von *Cryptocaryon irritans* in den Wirt eingedrungen war, setzte eine völlige Umwandlung des Theronten zum Phoronten ein, die bei dieser Art erstmals in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen werden konnte.

Am auffälligsten war dabei die Einlagerung der ehemals randständigen, äußeren Cilien in das Cytoplasma des Parasiten. Das Cytoplasma war gefüllt mit zahlreichen unterschiedlichen Vakuolen bzw. Vesikeln, während nur wenige Mitochondrien vorhanden

waren. Auch Vorstadien der späteren spongiösen Schicht lagen im kortikalen Plasma. Inwieweit diese Umwandlung auch andere Strukturen von *C. irritans* betrifft, ist noch nicht geklärt. Ob die Cilien nur eingelagert werden, um bei der vollständigen Penetration in das Wirtsgewebe nicht hinderlich zu sein und eventuell später wieder "ausgestülpt" werden oder ob sie vollständig abgebaut werden und mit der weiteren Entwicklung des hautständigen Stadiums wieder neu gebildet werden, bleibt unklar. Die Verminderung der ehemals vielen Mitochondrien aus dem Schwärmer ist auch noch nicht geklärt. Das Auftreten der zahlreichen Vesikel läßt allerdings vermuten, daß in der kurzen Zeit vom freien infektiösen Theronten zum hautständigen Phoronten sehr komplexe Prozesse innerhalb von *Cryptocaryon irritans* ablaufen, um den Parasiten bei gleichzeitiger Immunabwehr auf Wachstum und Nahrungsaufnahme vorzubereiten. Auch bei *Ichthyophthirius multifiliis* wurden vergleichbare Befunde noch nicht erhoben.

Die Nahrungsaufnahme spielt bei den hautständigen Stadien von *Cryptocaryon irritans* und *Ichthyophthirius multifiliis* eine besonders wichtige Rolle, da während dieser parasitischen Phase der gesamte Energievorrat für den restlichen Entwicklungs- und Vermehrungszyklus aufgenommen werden muß. Dabei geschieht die Aufnahme von Zellfragmenten und ganzer Zellen aus dem Fischgewebe bei beiden Parasiten mit Hilfe des Cytostoms (Dickerson und Dawe 1995, Diggles 1997) und es kommt zu einem enormen Größenwachstum. Lobo-da-Cunha und Azevedo (1988, 1993) untersuchten die Nahrungsvakuolen und gliederten die verschiedenen Cyclosestadien in den Trophonten von *I. multifiliis*. Dabei unterschieden sie zwischen drei Phasen A, B und C. In der ersten Phase waren die Vakuolen noch nicht kondensiert und ihr Inhalt aus Epidermiszellen des Wirtes noch fast intakt. In Phase B erreichten die Vakuolen eine sehr hohe Kondensation, und in Phase C lag das verdaute Material im Zentrum der Vakuole, umgeben von einem leeren Raum. In den beiden letzten Phasen gelang der Nachweis von saurer Phosphatase und Arylsulfatase (Lobo-da-Cunha und Azevedo 1993).

Auch bei *Cryptocaryon irritans* konnten die Nahrungsvakuolen in diese Phasen unterteilt werden. Die Cyclose läuft offenbar sehr ähnlich wie bei *I. multifiliis* ab. Eine detaillierte Untersuchung der Nahrungsvakuolen und ein cytochemischer Nachweis auf saure Phosphatase bieten sich daher für weitere Untersuchungen an.

4.2 Stand der Forschung bei *Cryptocaryon irritans*

Die Morphologie von *Cryptocaryon irritans* wurde in frühen Arbeiten näher analysiert, und zwar besonders von Sikama (1938, 1961), Brown (1951, 1963) und Nigrelli und Ruggieri (1966). Ein Überblick zur Ultrastruktur der verschiedenen Stadien wurde von Colorni und Diamant (1993) und Matthews et al. (1993) erbracht, wobei allerdings noch viele Details unklar blieben. Andere Studien befaßten sich mit der Existenz verschiedener Stämme des Parasiten und verglichen die Stadien von *C. irritans* aus verschiedenen Regionen miteinander (Diamant et al. 1991, Burgess und Matthews 1995, Diggles 1997, Diggles und Adlard 1997, Jee et al. 2000). Auch der Verwandtschaftsgrad von *C. irritans* und *I. multifiliis* war von Interesse (Diggles und Adlard 1995, Dickerson und Dawe 1995) und konnte erst vor kurzem eindeutig geklärt werden (Wright und Colorni 2002). Wie schon in anderen Studien vermutet, sind beide Ciliaten in ihren Entwicklungszyklen und den durch sie verursachten Krankheitsbildern zwar sehr ähnlich, aber phylogentisch verschieden (Diggles und Adlard 1995). Mittlerweile hat sich herausgestellt, daß *Cryptocaryon irritans* näher verwandt mit *Coleps hirtus* ist als mit *Ichthyophthirius multifiliis* (Wright und Colorni 2002). Es handelt sich somit bei *C. irritans* und *I. multifiliis* um konvergente Fischparasiten.

Diggles und Adlard (1997) fanden durch DNA-Analysen heraus, daß von *Cryptocaryon irritans* verschiedene Stämme existieren. So war der Stamm, der im Gebiet von Heron Island (Australien) auftrat, genetisch enger mit den Stämmen aus Israel und den USA verwandt als mit dem Stamm aus Moreton Bay (Australien).

Andere Forschungsarbeiten setzten sich mit den Effekten unterschiedlicher Parameter (z.B. Salinität, Temperatur) auf die Entwicklung der verschiedenen Stadien auseinander (u.a. Allison 1951). Dabei zeigte sich, daß eine Änderung der Salinität als Kontrollmittel zur Bekämpfung des Parasiten eingesetzt werden konnte (Cheung et al. 1979, Huff und Burns 1981, Diggles und Lester 1996 b, c). (Der Stand zur Bekämpfung der Cryptocaryoniasis mit verschiedenen Substanzen wird unter Pkt. 4.5 beschrieben.)

Durch gezielte Hypo-(<16 ‰) und Hypersalinität (60 ‰) konnten die Trophonten von *C. irritans* vom Wirtsfisch gelöst werden. Dabei wurden die befallenen Fische für 5 Minuten in den jeweiligen Salzkonzentrationen inkubiert und anschließend wieder in normales Seewasser (32 ‰) gebracht. Allerdings hatte diese Methode den Nachteil, daß die Versuchsfische (*Lutjanus campechanus*) innerhalb einer Woche nach der Behandlung

verstarben, da der Streß zu groß war (Huff und Burns 1981). Auch kurzzeitige Süßwasserbäder wurden getestet, wobei es zu unterschiedlichen Ergebnissen kam (Herwig 1978, Cheung et al. 1979). Colorni stellte 1985 fest, daß Bäder im Süßwasser bis zu 18 Stunden keinerlei Auswirkungen auf *C. irritans* hatten. Dies entspricht auch eigenen Beobachtungen an mit dem Parasiten befallenen Brackwasserfischen. Erst später ist der osmotische Schock groß genug, um die Stadien zu zerstören.

Auch die Temperatur hat einen entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung von *C. irritans*. Die bislang beschriebenen Daten wurden bei einer "Normaltemperatur" von 24-25° C gewonnen. Sinkt sie aber über einen längeren Zeitraum auf 20° C ab, so bleiben die Trophonten länger in der Wirtsepidermis, zeigen ein langsames Wachstum und erreichen einen größeren Durchmesser. Die Entwicklungsgeschwindigkeit verlangsamt sich.

Die niedrigere Temperatur wirkte sich auch auf die Größe von Tomonten aus. Sie wurden ebenfalls bei 20° C größer als bei 25° C und produzierten mehr Tomiten als die kleineren Tomonten. Die daraus entstandenen freien Schwärmer waren ebenfalls größer als die Theronten, die unter höheren Temperaturen gewonnen worden waren (Diggles und Lester 1996 b). Vielleicht haben größere Stadien höhere Energiereserven, um effizienter penetrieren zu können. Schließlich haben die Theronten ihre höchste Infektiosität unmittelbar nach dem Schlüpfen aus der Cyste. Bereits 6 Stunden danach liegt die erfolgreiche Infektionsrate bei nur noch 4 % (Yoshinaga und Dickerson 1994, Burgess und Matthews 1994, Diggles und Lester 1996 b).

4.3 Etablierung der Infektionen mit *Cryptocaryon irritans*

Die Kultivierung und Hälterung dieser marinen Parasiten im Labor wurde intensiv von Burgess und Matthews untersucht (Burgess 1992, Burgess und Matthews 1994), wobei sie durch ihre geographische Lage (Plymouth) den Vorteil hatten, genügend Seewasser und Versuchsfische zur Verfügung zu haben. Gleiches gilt für die meisten anderen Forschungsgruppen, die z.B. entweder in Australien (wie die Forscher um Diggles) oder in Israel (wie Colorni und seine Wissenschaftler) am Meer arbeiteten bzw. arbeiten. Ihnen stand immer genügend Material zur Verfügung. In Düsseldorf erwies sich die Etablierung des Parasiten im Labor als sehr schwierig, da die Infektionen meist nach 6-8 Wochen zum Erliegen kamen. Die Ursachen dafür lagen u.a. in den Wasserwechseln mit künstlichem

Meerwasser und teilweise Temperaturschwankungen durch defekte Klimakammern. Mitunter gingen die Infektionen erst gar nicht an, da die zu infizierenden Clownfische schon einmal eine *C. irritans*-Infektion durchgemacht hatten und vorübergehend immun waren (sie ließen sich aber nach ca. 6-7 Monaten erneut infizieren), was aber im Handel nicht ersichtlich war. Auch die Beschaffung des Parasiten war nicht immer sehr einfach, da er ja durch die - im Geschäft erworbenen - infizierten Schleppfische ins Labor gebracht wurde und es für den Handel mit Seewasserrfischen eine Saisonalität gibt. So war es in den Herbst- und Wintermonaten sehr viel einfacher, Seewasserrfische zu bekommen als in den Sommermonaten. Auch mußte bei den infizierten Fischen im Handel immer nachgefragt werden, ob und wann eine Behandlung der Parasitose erfolgt war, um abwägen zu können, ob die Infektion dann im Labor angehen würde. Ein weiterer erschwerender Faktor kam dadurch hinzu, daß in der Zeit, in der diese Arbeit erstellt wurde, die Zahl der Seewasseraquaristik-Läden drastisch abnahm und sich der Markt auf wenige große und im Rhein-Ruhr-Gebiet weit voneinander entfernte Geschäfte konzentrierte.

4.4 Histochemische Untersuchungen

4.4.1 Tannin

Tannin, ein natürliches Polyphenol (siehe Pkt. 3.4.1), ist nicht nur in der Elektronenmikroskopie als "Beizmittel" bekannt, sondern geriet in den letzten Jahren im Zusammenhang mit dem sog. "french paradox" immer wieder in die Diskussion. Trotz ihrer gleich ungesunden Lebensweise und Ernährung sterben die Franzosen doch viermal weniger als z.B. die Briten an Erkrankungen des Herzens, obwohl sie in etwa im gleichen Umfang an erhöhten Cholesterinwerten und Bluthochdruck leiden. Vielen Forschern zufolge liegt dies an der hohen Affinität der Franzosen zum Rotwein und seinen Inhaltsstoffen, insbesondere den Traubenschalen und -kernen. Darin enthalten sind eben Polyphenole wie Catechin, Epicatechin, Quercetin, Resveratrol oder auch Tannin. Beim Menschen wirken sie anti-oxidativ und hemmen die Anlagerung des LDL-Cholesterins an die Gefäßwände. Nach neueren Untersuchungen hemmen Polyphenole auch die Produktion

von Endothelin-1, eine Substanz, die für das Zusammenziehen der Blutgefäße verantwortlich ist (Corder et al. 2001).

Tannin wird auch in der Elektronenmikroskopie häufig verwendet, u.a. um den Kontrast von zellulären und extrazellulären Strukturen zu erhöhen, besonders aber um - analog zu Alcianblau und Rutheniumrot – die Oberflächenbeschaffenheit durch Anlagerung zu charakterisieren (Futaesaku et al. 1972, Ruider 1995). Nach Simionescu und Simionescu (1976 a, b) ist vor allem niedermolekulares Tannin effektiv, denn es dringt zufriedenstellend in die Zellen ein und führt zu einem hohen Kontrast unter besonderer Markierung der Membranen.

Seit 1990 wurde Tannin sogar als Alternative zu OsO_4 in der Immunelektronenmikroskopie etabliert, da es die spezifisch aufbereiteten, empfindlichen Proben nicht schädigt und auch mit kurzen, schonenden Inkubationszeiten ausreichende Kontrastierungen erzielt werden (Stirling 1993).

Durch die Behandlung mit diesem Gerbstoff konnten in früheren Untersuchungen die hautständigen Stadien von *Ichthyophthirius multifiliis* markiert werden. Dabei lagerte sich Tannin, ähnlich wie Rutheniumrot, an die Plasmamembranen im ciliären und im nicht-ciliären Bereich an und der surface coat (Glykokalyx) konnte zudem eindeutig dargestellt werden. Bodenstadien wurden hingegen durch Tannin nicht markiert (Ruider 1995).

Bei den hautständigen Stadien von *Cryptocaryon irritans* konnten durch Tannin weder die Glykokalyx noch besondere Strukturen innerhalb des Parasiten markiert werden. Es kam aber in allen Fällen zu einer kontrastreichen Darstellung der zellulären Strukturen durch Erhöhung der Osmiumeinlagerung.

Im Vergleich zu den Substanzen Alcianblau und Rutheniumrot hätte die Wirkung von Tannin an den Phoronten und Trophonten von *C. irritans* ähnliche Effekte haben müssen. Die vorliegenden Ergebnisse entsprachen auch nicht der eigentlichen Vermutung, mit Tannin ebenfalls wie bei *I. multifiliis* die Glykokalyx, die Plasmamembran sowie die Cilien darstellen zu können. Das Fehlen der Markierungen könnte daran gelegen haben, daß das Tannin nicht im genügenden Maße an die Membranen gebunden hat. Eventuell ist höhermolekulares Tannin nicht genügend in das Gewebe eingedrungen, weil die (bei allen anderen hier vorliegenden Untersuchungen) ausreichende Inkubationszeit in diesem Fall doch zu kurz war - Proben von Seewasserrfischen sind nämlich sehr empfindlich und zersetzen sich trotz Einlagerung in Fixans sehr schnell. Deshalb erfolgte die Primärfixierung maximal über Nacht, oder aber das Tannin wurde bei der Proben-

aufbereitung ausgewaschen. Sichtbare Ausfällungen von Tannin traten jedenfalls nicht auf. Interessanterweise war der Kontrast der Präparate erhöht, was auf eine stärkere Osmiumeinlagerung zurückzuführen ist. Osmiumeinlagerungen basieren aber auf dem Eindringen von Tannin. Dies bedeutet, daß Tannin zumindest im geringeren Maße in den Parasiten gelangt ist. Möglicherweise war aber die Quantität zu gering, um noch an die äußeren Membranen eindeutig zu binden, so daß die Membranproteine der reifen, hautständigen Stadien nicht mit Tannin markiert werden konnten.

Die in dieser Untersuchung gezeigten Abbildungen der Phoronten von *Cryptocaryon irritans* wurden extra ausgesucht, weil sie eine Besonderheit darstellen. Sie zeigen einen gerade in die Fischhaut eingedrungenen Parasiten, der sich umgestaltet. In diesem Falle wäre das Fehlen eines "surface coat" noch erklärbar, denn der "Umbau" vom freien Stadium zum hautständigen Stadium ist noch nicht komplett vollzogen und die Glykokalyx wahrscheinlich noch nicht ausgebildet. Schließlich ist wie bei *Ichthyophthirius multifiliis* (Ruider 1995) auch bei *Cryptocaryon irritans* die Glykokalyx in der vorangegangenen freilebenden Phase nicht notwendig.

4.4.2 Alcianblau

Die Darstellung bestimmter Zellstrukturen mit verschiedenen Farbstoffen bietet eine Möglichkeit, Aufschluß über diese Strukturen zu erhalten und sie näher zu charakterisieren.

Alcianblau zählt zu den beliebten Färbereagenzien in der Elektronenmikroskopie und wird während der Fixierung der Proben dem Fixans zugegeben.

Durch die Kombination von Alcianblau und Glutaraldehyd werden gleichzeitig Mukosubstanzen unlöslich gemacht und Proteinkomponenten fixiert. Der resultierende Komplex aus Farbstoff und Mukosubstanz ist osmiophil. Elektronenmikroskopisch ist er als elektronendichte Anlagerung nachweisbar.

Mit dieser Methode konnten Behnke und Zelandar (1970) die Oberfläche verschiedener Gewebe in der Ratte markieren. Rosenquist wies 1972 die Glykokalyx von Podozyten (Deckzellen des inneren Blattes der Bowmankapsel der Niere; sie sitzen als "Füßchen" der

Basalmembran auf) nach und 1974 später mit Alcianblau die Oberfläche von Regenwürmern durch Burke dargestellt (Luft 1976).

Da Alcianblau an Polyanionen bindet, konnte Goldberg (1988) bei der Koralle *Pseudoplexaura flagellosa* die organische Matrix ihrer kleinen Nadeln (sog. Spicula) darstellen, denn die Polyanionen sind oft mit Calcium-bindenden Anteilen dieser Matrix in den kalkhaltigen Geweben assoziiert.

Am Ciliaten *Tetrahymena pyriformis*, einem nahen Verwandten von *Ichthyophthirius multifiliis*, dem "Süßwasserpendant" zu *Cryptocaryon irritans*, wurde mit der Substanz erfolgreich die äußere Plasmamembran markiert. Bei *I. multifiliis* hingegen war es nicht möglich, diese Membran darzustellen (Ruider 1995, Kovács et al. 1997).

Alcianblau reagiert ähnlich wie Rutheniumrot, einem weiteren hier verwendeten kationischen Farbstoff, durch Salzbindungen mit Polymeren hoher Ladung (siehe Punkt 3.4.3).

Vergleicht man elektronenmikroskopisch Markierungen mit Alcianblau und mit Rutheniumrot, so scheint es keine Unterschiede in den Ergebnissen zu geben (Behnke und Zelander 1970, Luft 1976, Goldberg 1988).

Eigentlich müßte auch mit Alcianblau die äußere Membran von *Ichthyophthirius multifiliis* darstellbar sein, da eine Markierung mit Rutheniumrot ja erfolgreich war (Ruider 1995). Wahrscheinlich sind aber die Salzbindungen von Alcianblau an die negativen Gruppen während der Probenaufbereitung durch Auswaschung zerstört worden.

In der vorliegenden Arbeit konnte die äußere Membran von *Cryptocaryon irritans* sehr gut mit Alcianblau markiert werden, ebenso wie die Membran der spongiösen Schicht (mit ihren Vesikeln) und die Membran der Cilien. Eine Anlagerung erfolgte aber nur an diesen äußeren Strukturen. Markierungen von Organellen innerhalb des Cytoplasmas traten nicht auf.

Bei *Ichthyophthirius multifiliis* sind auf der ciliären Membran Antigene lokalisiert, die in drei Gruppen (G1, G1.1 und G2) unterteilt werden und Ziel der Immunantwort des Wirtes sind (Lin und Dickerson 1992). Darauf basierend beschrieben Dickerson et al. 1993, daß bei *I. multifiliis* tatsächlich mindestens drei unterschiedliche Serotypen auftreten, die als Marker zur Unterscheidung der *I. multifiliis*-Stämme herangezogen werden können. Vom Aufbau ähneln diese Oberflächenproteine den Antigenen von *Tetrahymena* und

Paramecium, deren Antigenausbildung bereits eingehend untersucht worden ist (Bolivar und Guiard-Maffia 1989, Dickerson et al. 1993).

Ähnliches könnte auf *C. irritans* zutreffen, denn dieser Parasit hat sich ja konvergent zu *I. multifiliis* im Seewasser entwickelt, besetzt vergleichbare Bereiche und zeigt in seinem Habitus so viele Übereinstimmungen, daß beide Parasiten jahrzehntlang als nahe Verwandte betrachtet worden sind.

Auch immunologische Untersuchungen zu beiden Parasiten erbrachten ähnliche Befunde. Zum Beispiel werden die Schwärmer beider Arten durch die Seren, die aus den jeweiligen immunisierten Fischen gewonnen wurden, bewegungsunfähig gemacht. Schon 1987 brachte die Arbeitsgruppe um Clark diesen Nachweis für Seren vom Getüpfelten Gabelwels (*Ictalurus punctatus*) bei Befall mit *I. multifiliis*.

1992 untersuchte Burgess an Seren der Dicklippigen Meeräsche (*Chelon labrosus*) die Auswirkungen auf *C. irritans* und kam zum gleichen Ergebnis. Eine weitere Bestätigung erfolgte 1997 durch Yoshinaga und Nakazoe mit Seren von Killifischen (*Fundulus heteroclitus*) bei *C. irritans*-Befall. Sie folgerten daraus, daß der Mechanismus der Immunisierung ähnlich wie bei *I. multifiliis* ablaufen muß.

Auch wenn von einer humoralen oder zell-vermittelten Immunantwort der Fische gegen *C. irritans* immer noch wenig bekannt ist und die Funktionsweisen nicht genau geklärt sind, so läßt die eindeutige Markierung der gesamten Zellmembran, also sowohl der ciliären als auch der nicht-ciliären Bereiche sowie der spongiösen Schicht und ihrer Vesikel doch den Schluß zu, daß analog zu *I. multifiliis* ciliäre Antigene existieren. Darüber hinaus könnte die spongiöse Schicht neben anderen Oberflächenstrukturen auf dem Parasiten ebenfalls als Schutz gegen das Immunsystem der Wirtsfische dienen.

4.4.3 Rutheniumrot

Ruthenium ist ein ähnlicher kationischer Farbstoff wie Alcianblau (siehe Punkt 3.4.3), der sich überwiegend durch die Ladungsverteilung innerhalb seines Moleküls von Alcianblau unterscheidet. Dabei ist die Ladungsverteilung von Rutheniumrot höher als die von Alcianblau, denn letzteres hat weniger Ladungen, die in einem fast 50 % schwereren

Molekül als Rutheniumrot liegen und zudem nicht so mobil sind. Ansonsten agieren die beiden Farbstoffe sehr ähnlich und markieren gleichartige Strukturen (Luft 1971 a, b). Somit hat sich auch diese Substanz in der Elektronenmikroskopie bewährt, wobei sicherlich die umfangreichen Untersuchungen von Luft (1971 a, b, 1976) dabei geholfen haben, diesen Farbstoff zu etablieren. Wie Alcianblau wurde Rutheniumrot Anfang der 70er Jahre zur Erforschung der Nierenstruktur, z.B. durch Fowler, Fuchs und auch Latta, eingesetzt, wobei letzterer die spektakulärsten TEM-Aufnahmen erzielte (Luft 1976). Dabei entsprachen die mit Rutheniumrot gewonnenen Ergebnisse ebenfalls denen von Alcianblau.

Ruggeri et al. entwickelten 1977 eine besondere Methode, um die räumliche Anordnung der Proteoglykane mit Rutheniumrot besser darzustellen. Shepard und Mitchell kombinierten 1977 Rutheniumrot mit *p*-Phenylendiamin und intensivierten so die Darstellung der Gewebe für die Lichtmikroskopie.

Nicht nur bei *Tetrahymena*, sondern auch bei *Ichthyophthirius multifiliis* konnte durch die Anwendung der Substanz ein "surface coat" nachgewiesen werden (Ruider 1995). Der kationische Farbstoff markierte die gesamte Plasmamembran und erstreckte sich über ciliäre und nicht-ciliäre Bereiche während seines gesamten Entwicklungszyklus.

Die äußere Membran von *Cryptocaryon irritans* wurde ebenfalls sehr intensiv durch Rutheniumrot markiert. Diese Bereiche stimmten mit denen, die durch Alcianblau dargestellt wurden, überein.

Innerhalb der elektronendichten spongiösen Schicht waren nach der Behandlung mit dem Farbstoff deutlich elektronenlichte Strukturen zu erkennen, die nach der Zugabe von Alcianblau nicht eindeutig nachweisbar waren. Wahrscheinlich beruht dieser Effekt darauf, daß Rutheniumrot einen noch stabileren Komplex mit OsO₄ eingeht als Alcianblau. Infolgedessen kann durch die Aufbereitung der Proben ein Teil des Alcianblau ausgewaschen worden sein, so daß die Darstellung der markierten Strukturen nicht ganz so intensiv erfolgte wie mit Rutheniumrot.

Die mit Rutheniumrot und Alcianblau erzielten Ergebnisse lassen eindeutig den Schluß zu, daß auch *C. irritans* membranständige Antigene besitzt, die vom Immunsystem des Wirtes als fremd angesehen werden und somit die Bildung spezifischer Antikörper auslösen können.

Auf eine genaue Zusammensetzung der Glykokalyx kann durch den Einsatz von Alcianblau und Rutheniumrot kein Rückschluß gezogen werden, da die Farbstoffe nicht spezifisch genug an einzelne, exponierte, saure Polysaccharide binden.

4.4.4 Thiocarbohydrazid (TCH)

Zur Darstellung der Oberflächenstruktur von *Cryptocaryon irritans* wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Methoden angewandt, wobei die TCH-Methode zum Nachweis von Glykogen und Mucopolysacchariden diente (Thiéry 1967). Dabei bindet Thiocarbohydrazid an Aldehydgruppen, die zuvor durch Oxidation mit Perjodsäure aus den Hydroxylgruppen der Zucker entstanden sind. Thiéry entwickelte diese Methode als Alternative zu der damaligen herkömmlichen PAS- Perjodsäure-(Schiff)-Reaktion mit Silber und Methenamin. Durch seine Technik wurden die Strukturen sehr viel besser und sauberer markiert als es zuvor der Fall war (Luft 1976). Je nach Inkubationszeit mit TCH lassen sich Glykogen oder auch Mucopolysaccharide nachweisen.

Bei *I. multifiliis* gelang Ruider 1995 mit dieser Methode zumindest die Markierung verschiedener cytoplasmatischer Bereiche, Glykogen bzw. Mucopolysaccharide konnten jedoch nicht auf der äußeren Membran lokalisiert werden. Daraus wurde gefolgert, daß dieser Parasit an seiner Oberfläche keine freien Hydroxylgruppen hat, die letztlich als Aldehydgruppen mit Silber und TCH einen Komplex hätten eingehen können.

Die Markierungen innerhalb des Cytoplasmas entsprachen dem Glykogenvorrat des Parasiten, der in der parasitischen Phase angesammelt worden war, um anschließend in der nicht-parasitischen Phase als Energievorrat wieder abgebaut zu werden. Auch in früheren Arbeiten wurde schon ein phasenabhängiges Auftreten spezifischer Nährstoffe festgehalten (Ruider 1995). In dieser Zeit nimmt *Ichthyophthirius multifiliis* keine Nahrung mehr zu sich.

Sowohl die parasitäre Oberfläche als auch die cytoplasmatischen Bereiche der hautständigen Stadien von *C. irritans* konnten mit dieser Methode in den vorliegenden Untersuchungen nicht dargestellt werden. Auch mehrfache Wiederholungen der Versuche führten zu keinerlei Anlagerung des Silber-TCH-Komplexes an die parasitären Strukturen.

Da jedoch *C. irritans* ebenfalls nur während der parasitischen Phase Nahrung aufnimmt (was durch die zahlreichen mit Fischzellen gefüllten Nahrungsvakuolen dokumentiert ist, die ja teilweise noch in den Tochterstadien nachweisbar sind), müßte eigentlich auch ein entsprechender Glykogenvorrat zumindest im parasitären Cytoplasma nachweisbar sein. Eine Äußerung über das Vorhandensein von freien Hydroxylgruppen auf der Oberfläche des Parasiten kann an dieser Stelle nicht gemacht werden. Wahrscheinlich hätte die Inkubationszeit noch verlängert werden müssen. Eine mögliche Zerstörung des Silber-TCH-Aldehydkomplex kann auch in Betracht gezogen werden, da durch die Probenaufbereitung zahlreiche Waschvorgänge bedingt waren. Vielleicht war dieser Komplex etwas instabil und deshalb leicht zu lösen.

4.4.5 Lektine

Diese Proteine, die spezifisch an Kohlenhydratreste binden, werden häufig dazu verwendet, um pathogene Parasiten aufzuspüren, zwischen Arten zu unterscheiden oder auch um einzelne Entwicklungsstadien genauer zu charakterisieren (Xu et al. 2001).

In der Natur liegt die Aufgabe eines Lektins z.B. darin, Rezeptoren auf der Zellwand der Wurzelhaare des Klees mit Lipo- und Kapselpolysacchariden von *Rhizobium trifolii* zu vernetzen. Damit ist es an der Bindung des stickstoff-fixierenden Bakteriums beteiligt (Stryer 1996, Heß 1999). Bakterielle Lektine vermitteln z.B. die Haftung von *E. coli* an die Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes. Sie erkennen die Oligosaccharideinheiten auf der Oberfläche der Zielzellen.

Untersuchungen der Bindung zahlreicher Lektine an diverse Arten von Zellmembranen ergaben, daß die Zuckerreste der Membranglykolipide und -glykoproteine immer auf der extrazellulären Seite der Membran sitzen. Alle bekannten Lektine enthalten zwei oder mehr Bindungsstellen für Kohlenhydrateinheiten. Diese sind für die Verklumpung von Erythrocyten oder anderen Zellen verantwortlich. Die Spezifität eines Lektins wird durch dasjenige Oligosaccharid bestimmt, das das Agglutinationsvermögen kompetitiv hemmt (Stryer 1996).

Lektine haben eine höhere Affinität zu Zellen oder Makromolekülen ("Lektinrezeptoren") als zu einzelnen Zuckern. Es kommt bei der Bindung der Liganden auf zusätzliche

unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen an, die den Komplex stabilisieren. So haben mehrere Lektine eine Affinität zu β -D-Galaktosylresten, unterscheiden sich aber in ihrem Bindungsverhalten zu bestimmten Glykoproteinen oder Zellen. Oft werden die Lektine in ihrer Wirkung mit den humoralen Antikörpern verglichen, es fehlt den Lektinen jedoch an Spezifität (siehe Stryer 1996, Richter 1997, Heß 1999, Etzler 2000).

In der Elektronenmikroskopie werden Lektine seit 1971 eingesetzt, als Nicolson und Singer den ersten Nachweis für das Vorhandensein eines Polysaccharidüberzugs auf der Außenseite der Zellmembran erbrachten.

Lektine können, je nach Verwendungszweck, mit verschiedenen Substanzen gekoppelt werden (Plattner und Zingsheim 1987). In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Post-Embedding-Methode gewählt, da hier die Lektin-Gold-Markierung nach der Einbettung der Probe am Ultradünnschnitt erfolgt. Dies hat den Vorteil, daß man die Versuchsreihen häufiger und mit etwas weniger Aufwand wiederholen kann, da die Schritte zur Markierung mit Lektin-Gold sehr empfindlich sind und die ersten Versuche fast immer fehlschlagen. Außerdem sind diese Fehlschläge leichter nachzuvollziehen als eine Markierung mit Lektin-Gold während der Einbettung, auf die noch zahlreiche Schritte folgen.

Die Entwicklung von Markersystemen mit kolloidalem Gold hat eine lange Tradition in der Immunocytochemie und Histochemie (Roth 1996). Das kolloidale Gold - dessen Partikelgröße in den vorliegenden Untersuchungen bei 10 nm lag - eignet sich hervorragend als Marker in Kombination mit dem jeweiligen Lektin, denn die einzelnen Goldpartikel sind eindeutig als elektronendichte Körnchen im TEM zu erkennen.

Zur spezifischen Einbettung der Proben wurde LR-Gold verwendet, ein Acrylharz, das (im Gegensatz zu konventionellen Epoxidharzen) weitgehend die histochemische Aktivität der Enzyme innerhalb des nur anfixierten Gewebes bewahrt und bei niedrigen Temperaturen (ca. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) polymerisiert (Newman und Hobot 1993). Dadurch bleiben die gewünschten Eigenschaften des Gewebes erhalten.

Die Zuckerreste auf der Zelloberfläche, die normalerweise kovalent mit Glykoproteinen und/ oder Glykolipiden verbunden sind, spielen eine bedeutende Rolle innerhalb der Parasit/Wirt-Interaktion, Zellerkennung und antigenen Wirkung (Antigenität) von Zellen. In den letzten Jahren wurden deshalb vermehrt Studien zur Aufklärung der

membranständigen Zuckerkomponenten durchgeführt. In den späten 80er Jahren wurde die Aufklärung der Glykokonjugate auf der Oberfläche von verschiedenen *Leishmania*-Arten (Jaffe und McMahon-Pratt 1988, Rossell et al. 1990) und *Trypanosoma cruzi* (Zimmermann et al. 1987) intensiviert, letztendlich um neue Therapiemethoden gegen die häufig tödlich verlaufenden Infektionen zu entwickeln.

Es konnte z.B. auch geklärt werden, daß in den Trophozoiten von *Entamoeba invadens* Sialinsäurereste mit Galaktose und n-Acetylgalaktosamin verbunden sind (Ribeiro et al. 1997). Auch die Bedeutung der Oberflächen-assoziierten Glykokonjugate von *Trichomonas vaginalis* bei der Anheftung an die Wirtszelle wurde eingehend untersucht (Mirhaghani und Warton 1998). Dabei beeinflusste die Behandlung des Parasiten mit Lektin seine Anheftung an die Zielwirtszellen entscheidend.

Zur Charakterisierung der oberflächen-assoziierten und intrazellulären Glykokonjugate und -proteine werden mittlerweile neben Lektin-Gold-Markierungen auch andere, molekularbiologische Methoden wie SDS-Page und Immunblotting eingesetzt (Driscoll und Hufnagel 1999, Fuchs et al. 1999).

Bei *Ichthyophthirius multifiliis* konnte mit einer Reihe von goldgekoppelten Lektinen, die das Spektrum der am häufigsten vorkommenden Zuckerreste beinhaltet, keine Markierung der parasitären Oberfläche erzielt werden (Ruider 1995). Allerdings beruhte die Lektin-Gold-Markierung auf der Zugabe der Substanzen während der Einbettung, so daß die Möglichkeit bestand, einen Großteil des Markers bei der weiteren Probenpräparation verloren zu haben.

Durch Inkubation der Theronten von *I. multifiliis* mit hohen Konzentrationen verschiedener Lektine (SBA, LCA, UEA-1 und WGA) gelang es Xu (2001), die Beweglichkeit der Theronten einzuschränken. Er konnte auf den Theronten die Monosaccharide D-Galaktose, L-Fucose, D-Mannose und D-Glucose sowie die Zuckerderivate n-Acetylglucosamin und n-Acetylgalaktosamin nachweisen. Diese und ähnliche Zucker sowie Aminozuckerderivate sind charakteristisch für die Oberfläche vieler Protozoen, so z.B. *Leishmania donovani* und *Entamoeba invadens* (Ribeiro et al. 1997, Cummings und Kwame Nyame 2000, Xu 2001).

Xu's Untersuchungen basierten auf dem Wissen, daß im Schleim auf der Fischhaut zumindest bei einigen Fischarten natürliche Lektine auftreten und sie die Fähigkeit haben,

Mikroorganismen zu agglutinieren. Mit Hilfe der Flow-Cytometrie und der Fluoreszenzmikroskopie stellte er folgendes Theront-Wirt-Modell auf: mögliche Interaktionen zwischen Oberflächenzucker der Theronten und Lektinen auf der Oberfläche des Wirtsgewebes zwischen Lektinen auf der Oberfläche des Theronten und Zuckern auf der Oberseite des Wirtsgewebes sowie extrazelluläre Lektine, die Brücken bilden zwischen Zuckern des Theronten und des Wirtes.

Durch die Markierung der hautständigen Stadien von *Cryptocaryon irritans* mit den Lektinen Con A, WGA, DBA, UEA, LPA und SBA konnten in der vorliegenden Untersuchung n-Acetylglucosamin, n-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) und α -L-Fucose nachgewiesen werden. α -D-Glucose, α -D-Mannose, β -D-Galaktose sowie n-Acetyl- β -(1,4)-D-Galaktosamin wurden am Parasiten trotz mehrfacher Wiederholungen nicht markiert, sie waren bei den hautständigen Stadien nicht vorhanden.

Die hier erzielten Ergebnisse stimmen insofern mit Xu's (2001) Resultaten überein, daß sowohl bei *I. multifiliis* als auch bei *C. irritans* n-Acetylglucosamin auf der Parasitenoberfläche sowie L-Fucose und n-Acetylglucosamin bei *C. irritans* in den Nahrungsvakuolen vorhanden ist.

Die Bedeutung der Glykokalyx für den parasitären Organismus sowie einige Mechanismen zur Unterwanderung der Immunabwehr der Wirte werden an nachfolgenden, bereits intensiv erforschten Beispielen erläutert. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Zuckern.

Die Zusammensetzung der "surface coats" von *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria tropica, und *Trypanosma cruzi*, der die Chagaskrankheit auslöst, sowie weiterer humanpathogener Protozoen ist in jüngeren Studien besonders im Hinblick auf die verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht worden. Allen gemeinsam ist der häufige Umbau der Parasitenoberfläche bzw. der Glykoproteine, um sich vor dem Immunsystem des Wirtes zu schützen (Cummings und Kwame Nyame 2000, Mehlhorn und Piekarski 2001).

Bei der Anheftung und Invasion der Leberparenchymzellen durch Sporozoitien von *P. falciparum* ist beispielsweise das CS-Protein beteiligt (circumsporozoite protein). Dieses Protein erkennt Kohlenhydrat-assoziierte Liganden und enthält eine zellanheftende Sequenz, die allen *Plasmodium*-Arten gemeinsam ist. Man geht heute davon aus, daß an

der initialen Bindung der Sporozoiten und Lipoproteinreste ein Komplex aus Heparansulfat-Proteoglykanen in den Leberparenchymzellen beteiligt ist (Cummings und Kwame Nyame 2000). Nach einer Wachstums- und Vermehrungsphase in der Leber befällt der Parasit über den Blutkreislauf die Erythrozyten.

Dabei wird das Eindringen der Merozoiten wahrscheinlich durch Sialinsäure vermittelt, die an der Erythrocytenoberfläche lokalisiert ist. Es scheint in den Merozoiten verschiedene sialinsäurebindende Proteine zu geben, von denen aber erst zwei identifiziert worden sind. Interessanterweise kann durch Sialinsäure bei *P. gallinaceum*, dem Erreger der Hühnermalaria, die Anheftung der Ookineten an den Kohlenhydrat-Liganden im Mitteldarm der Wirtsmücke *Aedes aegypti* blockiert werden (Cummings und Kwame Nyame 2000).

Trypanosoma cruzi exprimiert eine sehr hohe Zahl von glykosylphosphatidyl-inositol(GPI)-verankerten, variablen Oberflächenglykoproteinen (variant surface glycoproteins, VSG). Der Parasit kann insgesamt mehr als 1000 verschiedene VSGs exprimieren, aber nur eines wird jeweils aktuell exprimiert. Dadurch wird das Wirtsimmunsystem unterlaufen, denn dieses "hinkt" in der Produktion geeigneter Antikörper hinterher. Sobald das Immunsystem in der Lage ist, effektiv gegen das bestimmte Antigen vorzugehen, erscheint eine neue, noch unbekannt Variante auf der parasitären Oberfläche. Ein Kreislauf, der den Tod des Wirtes zur Folge hat.

Gelangt *T. cruzi* während der Blutmahlzeit wieder in die Raubwanze, so wirft es die VSG-Hülle ab. Über den infizierten Kot gelangt sie wieder in den Menschen und exprimiert erneut ihren VSG (Mehlhorn und Piekarski 2001).

Auch bei diesem Parasiten spielt die Sialinsäure eine wichtige Rolle bei der Anheftung an die Wirtszellen. Das betreffende Anheftungsmolekül ist die GPI-verankerte Transsialidase (TS) auf der Parasitenoberfläche. TS funktioniert als normale Transsialidase, kann aber auch die Sialinsäure des Wirtes auf die eigenen Glykokonjugate transferieren, was das Fehlen der parasiteneigenen Sialyltransferase erklärt. Der genaue Invasionsmechanismus von *T. cruzi* ist noch nicht exakt geklärt. Wahrscheinlich kommt dabei den von den Wirtszellen produzierten Lektinen eine besondere Bedeutung zu, aber auch die nur an den amastigoten Stadien vorhandenen Mannose-haltigen Glykoproteine scheinen als Liganden für mannose-bindende Proteine aus menschlichem Serum das Eindringen in die Wirtszellen zu erleichtern (Cummings und Kwame Nyame 2000).

Vor kurzem gelang es einer Forschergruppe (Lischke et al. 2000) die Oberflächenproteine der Blutformen von *Trypanosoma carassii* beim Gewöhnlichen Karpfen (*Cyprinus carpio*) zu bestimmen. Sie konnten Galaktose, n-Acetylglucosamin, Xylose, Sialinsäure, Fucose, Mannose und Arabinose identifizieren, die als Hauptziel der humoralen Immunantwort der Wirtsfische dienen. Eine Variabilität des surface coats konnte hingegen nicht beobachtet werden.

Die hier erwähnten Zucker sind kovalent gebundene Kohlenhydrateinheiten, die über zwei Bindungsarten mit verschiedenen Seitenketten integraler Membranproteine verbunden sind. Dabei enthalten die n-glykosidisch an die Seitenkette von Asparaginresten gebundenen Oligosaccharide eine Grundstruktur aus Mannose- und n-Acetylglucosamineinheiten. An diese Grundstruktur werden auf verschiedenste Weise zusätzliche Zucker angehängt, so daß eine große Vielfalt an Zuckerstrukturen in den Glykoproteinen entsteht (Stryer 1996). Neben zusätzlichen Mannoseeinheiten können auch n-Acetylglucosamin, Galactose, Sialinsäure und L-Fucose an diese Grundstruktur angeheftet werden. Sowohl Fucose als auch Sialinsäure entstehen aus der Mannose.

Sialinsäure dient nicht nur bei Wirt/Parasit-Interaktionen als Signal bzw. "Vermittler", sondern auch bei der Entfernung von Glykoproteinen aus dem Blut. Viele Glykoproteine enthalten sie als endständige Einheiten, die durch Neuraminidasen (auf der Oberfläche von Blutgefäßen) erkannt und entfernt werden. Die freigelegten Galaktoseeinheiten der verbliebenen Reste wiederum werden durch bestimmte Rezeptoren in der Plasmamembran von Leberzellen erkannt und von dieser endocytotisch aufgenommen und somit aus dem Blut entfernt. In diesem Fall reguliert die Proteinstruktur also den zeitlichen Ablauf der Entfernung der Sialinsäure (Stryer 1996).

Ein weiterer bedeutender Zucker ist n-Acetylglucosamin, z.B. ein wichtiger Bestandteil von Chitin, das in den Exoskeletten der meisten Arthropoden enthalten ist und weltweit als zweithäufigstes Biopolymer gilt (Stryer 1996).

Die Synthese der Glykoproteine beginnt im Cytosol. Die Proteine enthalten eine Signalsequenz, die durch ein Signalerkennungspartikel erkannt und so zum endoplasmatischen Reticulum (ER) gelenkt werden. Die n-gebundenen Glykoproteine erhalten das Core (eine Art Grundgerüst aus drei Mannose- und zwei n-Acetylglucosaminresten) ihrer n-gebundenen Zucker von dem Carrier Dolicholphosphat, der einen Block von 14 Zuckerresten auf Asparaginseitenketten überträgt (insgesamt gibt es drei verschiedene Glykolysierungsarten). Noch während ihres Aufenthaltes im ER

werden je Einheit ein Mannose- und drei Glucosereste abgespalten. Transportvesikel bringen die Proteine anschließend zum Golgi-Komplex zur Sortierung und Modifikation (Stryer 1996). Die Hülle der Transportvesikel löst sich vor der Fusion mit anderen Membranen wieder ab. Nach dem **kontinuierlichen Modell** fusionieren diese Transportvesikel und es entstehen auf der cis-Seite neue Zisternen, die mit den Proteinen zusammen den ganzen Stapel durchwandern und auf der Trans-Seite in Golgi-Vesikel aufgelöst werden (Kleinig und Maier 1999). Als Produkt des sehr komplexen Synthesevorgangs der n-glykosidischen Oligosaccharid(seiten)ketten können hybride Oligosaccharidketten (nur der "Arm" mit n-Acetylglucosamin wird verlängert) oder komplexe -ketten (Anknüpfen von mehreren n-Acetylglucosamin-, Galactose-, Fucose- und auch Sialinsäureresten) entstehen. Die fertigen Proteine werden anschließend in Vesikel verpackt und an ihren Bestimmungsort transportiert (Kleinig und Maier 1999).

Wie schon erwähnt, waren die während der Versuche an *Cryptocaryon irritans* nachgewiesenen Zucker n-Acetylglucosamin, Sialinsäure und L-Fucose. Dabei war die L-Fucose ausschließlich in bzw. an mit Wirtszellresten gefüllten Nahrungsvakuolen zu finden. Auch n-Acetylglucosamin lag größtenteils in den Nahrungsvakuolen vor, allerdings konnte auch innerhalb der spongiösen Schicht dieser Zucker lokalisiert werden. Nur die Sialinsäure lag in kleinen Vakuolen, die im Cytoplasma verteilt waren, vor.

Da die L-Fucose nur in den Nahrungsvakuolen vorkam, ist bei *C.irritans* davon auszugehen, daß sie auf der parasitären Glykokalyx keine Rolle spielt und somit dort, anders als bei *I. multifiliis* in den untersuchten Stadien nicht vorhanden ist. Durch das eingesetzte Lektin UEA wurde vielmehr die α -L-Fucose der Wirtszelle markiert.

Nahrungsvakuolen sind Endocytosevesikel, deren Inhalt durch die Fusion dieser Vesikel mit den Vesikeln des endosomalen/lysosomalen Kompartiments in sekundäre Lysosomen gelangt. Dort wird der Inhalt dann abgebaut. Unverdauliche Reste, die sog. Residualkörper, werden durch Exocytose nach außen transportiert (Mehlhorn und Ruthmann 1992, Kleinig und Maier 1999).

Also könnte die nachgewiesene Fucose ein Teilabbauprodukt der Glykoproteine der Fischzelle während der Endocytose in fortgeschrittenen Nahrungsvakuolen gewesen sein.

Ähnliches gilt für n-Acetylglucosamin.

Dieser Zucker liegt ebenfalls zu großen Teilen in den mit Wirtszellresten gefüllten Nahrungsvakuolen vor, diese sind zu einem hohen Anteil markiert. Da aber auch in der spongiösen Schicht eindeutig Goldpartikel nachgewiesen wurden, ist davon auszugehen,

daß die spongiöse Schicht n-Acetylglucosamin eingelagert hat. Hier könnte das Oligosaccharid mehrere Funktionen haben. Beispielsweise wäre es möglich, daß n-Acetylglucosamin, da es ja auch ein Bestandteil von Chitin ist, eine zusätzliche stützende Funktion haben könnte. Schließlich sind die spongiösen Strukturen nur bei den Hautstadien und frühen Protomonten vorhanden. Wahrscheinlicher ist aber, daß der Zucker eine Rolle beim Schutz des Parasiten gegen das Wirtsimmunsystem spielt. Die spongiöse Struktur wird ja mit zunehmender Reife des Trophonten - und somit der Verweildauer am Wirt - reduziert, bis sie schließlich im freien Folgestadium (Protomonten) fast nicht mehr vorhanden ist. Außerhalb des Wirtes braucht *Cryptocaryon irritans* schließlich keinen Schutz mehr vor wirtseigenen Abwehrmechanismen. Für diese Funktion der spongiösen Schicht spricht auch der Befund, daß schon kurz nachdem der Parasit in den Wirt eingedrungen ist, sich der Phoront umgestaltet und erste Vorläufer dieser spongiösen Struktur im Inneren des Phoronten zu erkennen sind. Mit der Vollendung der Umgestaltung könnte auch die Bildung des "surface coat" abgeschlossen sein, der ja eindeutig durch die Farbmarkierungen in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen wurde. Dies würde bedeuten, daß *Cryptocaryon irritans* ein komplexes Schutzsystem hat, das sich aus der spongiösen Struktur und aus der Glykokalyx zusammensetzt, um das Immunsystem des Wirtes geschickt täuschen zu können. Das verwendete Lektin WGA markiert neben n-Acetylglucosamin auch Sialinsäure. Da aber ein separater Test auf Sialinsäure mit LPA durchgeführt wurde und dort ganz andere Strukturen markiert worden waren, kann man eigentlich für WGA diesen Zucker ausschließen. Wahrscheinlich ist WGA für Sialinsäure nicht so spezifisch wie LPA.

Die beim Sialinsäurenachweis markierten Strukturen erwiesen sich als kleinere Vakuolen, die nicht nur im Parasiteninneren, sondern auch in der Peripherie von *C. irritans* lagen.

Hier kann eindeutig davon ausgegangen werden, daß sie vom Parasiten synthetisiert wurde. Vielleicht wurden ja die Vesikel markiert, die die Sialinsäure zu ihrem Bestimmungsort transportieren. Dafür spricht das Vorkommen des Zuckers in den parasitären Randbereichen.

Welche Rolle die Sialinsäure bei *C. irritans* spielt, kann nicht genau bestimmt werden. Vielleicht beeinflußt sie die Parasit/Wirt-Interaktion als "Vermittler" und hat eine entscheidende Funktion bei der Verankerung in der Wirtshaut, ähnlich wie bei *T. cruzi* (Yoshida et al. 1997, Cummings und Kwame Nyame 2000). Auch bei der Penetration von *Toxoplasma gondii* in die Säugerzelle ist Sialinsäure beteiligt (Monteiro et al. 1998).

Die Abwehrzellen des Fisches könnten natürlich durch den Zucker getäuscht werden und den Parasiten erst einmal als "eigen" bzw. nicht-fremd identifizieren.

Die Aufklärung der genauen Funktionen der auf der Glykokalyx vorhandenen Oligosaccharide sowie die Parasit/Wirt-Interaktion und Zellerkennung ist dermaßen komplex, daß sich die Durchführung weiterer Studien zu diesem Thema anbietet. Vielleicht läßt sich ja dann eine für die Wirte schonende Behandlung gegen diesen und ähnliche Parasiten etablieren.

4.5 Bithionolsulfoxid und weitere Substanzen gegen *C. irritans*

Bithionolsulfoxid ist eine halogenierte, diphenolische Verbindung, die in den letzten Jahren immer wieder hinsichtlich ihrer Effekte auf verschiedene Fischparasiten getestet wurde, um Alternativen zu den herkömmlichen Mitteln zu finden (Kim und Choi 1998, Madsen et al. 2000, Iglesias et al. 2002).

So wurde durch eine einmalige orale Verabreichung von 100 mg Bithionol /kg Körpergewicht der Kiemenwurm *Microcotyle sebastis* im Felsenfisch (*Sebastes schlegeli*) erfolgreich bekämpft. In einem zweiten Versuch wurden die infizierten Fische über einen Zeitraum von 10 bzw. 20 Tagen mit 50 mg Substanz /kg Körpergewicht gefüttert. Der Wirkungsgrad der Behandlung mit Bithionol lag bei 100 %. Entsprechende Versuche wurden auch mit Mebendazol, einem Benzimidazolderivat, durchgeführt, wobei Bithionol sich als eindeutig wirksamer erwies. Kim und Choi (1998) konnten in diesem Fall nachweisen, daß eine einmalige Verabreichung einer hohen Dosis von Bithionol und Mebendazol gegen diesen Kiemenwurm erfolgreicher war als eine mehrfache Gabe von niedrigen Dosen.

Bithionol wurde auch gegen eine durch *Trichodina jadratica* hervorgerufene Trichodiniasis beim Aal (*Anguilla anguilla*) in geschlossenen Aquakultursystemen eingesetzt (Madsen et al. 2000). Bisherige Behandlungsmethoden beschränkten sich auf

Kurzzeit- oder Dauerbäder mit Acriflavinderivaten und Formaldehyd (Schäperclaus 1990). Da diese Substanzen aber in Verdacht stehen, karzinogen zu sein, testeten Madsen et al. (2000) 30 verschiedene, weniger bedenkliche Substanzen zur Behandlung dieser Süßwasserparasitose. Bithionol zeigte hier schon bei einer Konzentration von 0,1 mg/l im Süßwasser eine ausreichende Wirkung. Nachteilig erwies sich allerdings, daß bereits geringe Überdosierungen für die erkrankten Fische toxisch waren. Noch unklar ist außerdem, ob eine Behandlung mit Bithionol Rückstände im Fischgewebe hinterläßt. Auch bei anderen Fisch parasitierende Ciliaten, wie z.B. *Tetrahymena pyriformis*, konnten erfolgreich mit Bithionolsulfoxid behandelt werden (Griffin 1989).

Eine weiterer Großversuch an Fischparasiten wurde von Iglesias et al. (2002) durchgeführt. Diese Gruppe fand beim Screening von 52 Antiprotozoenmitteln heraus, daß immerhin 14 Substanzen gegen den Ciliaten *Philasterides dicentrarchi*, der in marinen Aquakulturen zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden führt, innerhalb von 24 Stunden wirksam sind. Dabei führten die meisten Substanzen zur induzierten Zellabrundung und Vakuolenbildung. Teilweise setzte zudem eine Lysis der Zellen ein. Neben Niclosamid und Oxyclozanid war Bithionolsulfoxid am effektivsten. Allerdings war die benötigte Dosis im Seewasser erheblich höher (25 mg/l) als im Süßwasser bzw. PBS-Puffer (3,1 mg/l). Dies entspricht früheren Beobachtungen, in denen die Wirksamkeit von Bithionol auf Seewasserparasiten nicht nachgewiesen werden konnte, da die Dosierung entsprechend den Konzentrationen im Süßwasserbereich gewählt worden und somit zu niedrig war (Kim und Choi 1998). Wahrscheinlich bildet Bithionol mit den im Seewasser gelösten Salzen unwirksame Komplexe, so daß zur erfolgreichen Therapie der verschiedenen Parasitosen die Substanz höher dosiert werden muß.

Bithionol hat als chlorierte Biphenolverbindung auch eine Wirkung auf Zestoden, Trematoden (u.a. *Fasciola hepatica*, *Clonorchis sinensis*, *Paragonimus westermani*) und grampositive Kokken (Forth 1996, Estler 2000). Die Substanz entkoppelt, ähnlich wie die Salicylanilide, den Elektronentransport und führt somit zum Energiemangel im Parasiten (siehe Punkt 3.5).

In der hier vorliegenden Arbeit führte die Behandlung mit 10 mg Bithionolsulfoxid /l nach 24 Stunden zu starken Schädigungen der hautständigen Stadien des Parasiten. Dabei waren fast alle Strukturen des Ciliaten, insbesondere die Mitochondrien, betroffen. Höhere Konzentrationen (25 mg/l und 50 mg/l) der Substanz führten zu einer derartigen

Zerstörung von *C. irritans*, daß transmissionselektronenmikroskopisch nur noch zelluläre Reste nachweisbar waren. Durch diese Ergebnisse kann auf den exakten Wirkort der Substanz innerhalb des Ciliaten kein Rückschluß mehr gezogen werden, denn dazu hat die Substanz zu gut gewirkt.

Bithionol entkoppelt die oxidative Phosphorylierung (Löscher 1999). Dabei ist nicht geklärt, an welcher Stelle die Substanz angreift. Allgemein heben aber Entkoppler die enge Kopplung zwischen Elektronentransport und oxidativer Phosphorylierung auf, indem sie Protonen durch die innere Mitochondrienmembran befördern. Der Elektronentransport läuft dann zwar weiter normal vom NADH zum O₂, aber die mitochondriale ATPase kann kein ATP mehr erzeugen, da die protonenmotorische Kraft an der inneren Mitochondrienmembran zerstört wird.

In dieser Untersuchung konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß die Matrix der Mitochondrien unterschiedlich elektronenlicht erschien und die Tubuli (vom Zentrum ausgehend) zerstört waren. Als Orte der oxidativen Phosphorylierung sind die Mitochondrien in *Cryptocaryon irritans* zahlreich vorhanden, da der Parasit während seines Entwicklungszyklus sehr viel Energie benötigt. Die Mitochondrien des Parasiten sind also ein idealer und empfindlicher Angriffspunkt für entsprechende Therapiemaßnahmen gegen den Ciliaten. Bithionolsulfoxid eignet sich somit, abgesehen vom relativ engen Dosierungsspielraum, sehr gut zur Bekämpfung einer Cryptocaryoniasis. Ein weiteres Screening von weniger toxischen Substanzen, die aber einen ähnlichen Wirkungsmechanismus haben, bietet sich für die Zukunft an.

Herkömmliche chemische Substanzen gegen *Cryptocaryon irritans* und *Ichthyophthirius multifiliis* waren bislang u.a. Formalin und Chininderivate wie z.B. Chininhydrochlorid, Chininsulfat und Quinacrinhydrochlorid (Tareen 1980, Rohde 1993, Dickerson und Dawe 1995, Schmahl et al. 1996). Auch metallische Salze wie die des Kupfers und des Zinks wurden als Langzeitbäder zur Bekämpfung von Fischparasiten empfohlen (Hignette 1981). Malachitgrün, das sehr effektiv gegen eine Ichthyophthiriase wirkt (Ruider 1995, Tojo Rodriguez und Santamarina Fernandez 2001), scheint auf *C. irritans* keine nennenswerten Wirkungen zu haben (Schmahl pers. Komm.). Vielleicht liegt es auch in diesem Falle daran, daß die im Seewasser gelösten Salze mit diesem Triphenylmethanfarbstoff unlösliche Komplexe eingehen oder diese Substanz in eine inaktive Form umgewandelt wird.

Eine weitere, effektive und geeignete Substanz zur Bekämpfung von Fischparasiten ist Niclosamid, ein Salicylanilinderivat, das ursprünglich gegen adulte Zestoden eingesetzt wurde (Robertson und Courtney 1995, Estler 2000, Mehlhorn 2001). Auch dieses Protonophor (ionophorer Protonencarrier) entkoppelt die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien und hemmt im Parasiten die Glucoseabsorption (Estler 2000). Durch eine Überstimulierung der ATPasen kommt es zum ATP-Mangel, Laktat wird angereichert und Proteasen können die Parasiten angreifen. Neben Oxyclozanid war Niclosamid gegen *Philasterides dicentrarchi* besonders effektiv und wurde auch schon erfolgreich gegen *Tetrahymena pyriformis* eingesetzt (Iglesias et al. 2002). Ebenso wie Bithionol hat Niclosamid allerdings einen sehr engen Dosierungsspielraum (Schmahl et al. 1989).

Quinacrin, ein synthetisches Acridinderivat (Gräfe 1992, Forth 1996, Estler 2000), könnte eine weitere therapeutische Alternative gegen *C. irritans* darstellen. Acridinderivate sind gegen grampositive Bakterien wirksam und werden aufgrund ihrer guten Hautverträglichkeit heute hauptsächlich zur Desinfektion verwendet (Forth 1996, Estler 2000). Ursprünglich wurde Quinacrinhydrochlorid als Malariamittel eingesetzt (Longhofer 1988). Eine weitere Funktion von Acridinfarbstoffen (u.a. Proflavin) ist die als Interkalator. Dabei gelangen sie durch ihre Molekülstruktur und mögliche Molekül-Molekül-Interaktionen in den Hohlraum zwischen benachbarte Basenstränge der DNA. Durch die Denaturierung der DNA-Doppelhelix werden RNA- Transkription und -Translokation gehemmt, was zu einer Störung der Proteinbiosynthese der Protozoen führt (Longhofer 1988, Gräfe 1992). Als Therapeutikum wird Quinacrin gegen die Trophozoiten von Giardien und gegen Trichomonaden eingesetzt (Lindsay und Blagburn 1995, Plumb 1999). Bei *in-vitro*-Versuchen wirkte Quinacrin ebenfalls gegen *Tetrahymena pyriformis* und gegen Tomonten von *Ichthyophthirius multifiliis* (Iglesias et al. 2002).

Zur Behandlung von Fischkrankheiten gibt es ein sehr breites Spektrum, das über die Verabreichung von Medikamenten in jeglicher Form (Futter, Einmalapplikation, Injektion, Badetherapie etc.) bis hin zur Veränderung einzelner Parameter der Hälterungsbedingungen reicht. Bei *Cryptocaryon irritans* konnte durch Änderung der Salzkonzentration und der Durchführung kurzzeitiger Süßwasserbäder ein Erfolg gegen die hautständigen Stadien erzielt werden. Zur Bekämpfung der Zystenstadien im Substrat wurde u.a. eine rein mechanische Methode erprobt, die sich allerdings nur für kleinere Flächen (z.B. Boden eines Aquariums) eignet. Dabei wurde der Boden mit einer Lage

feinen sterilen Sandes bedeckt und nach drei Tagen durch eine neue Lage ersetzt. Nach mehrmaliger Wiederholung in dreitägigen Intervallen konnte die *C. irritans*-Infektion gestoppt werden (Colorni 1985).

Auch oral verabreichtes Laktoferrin aus Rindern wurde erfolgreich innerhalb von 28 Tagen an *C. irritans*-Infektionen der Meerbrasse *Pagrus major* von Kakuta und Kurokura getestet (1995). Allerdings überlebte die unbehandelte Kontrollgruppe ebenfalls diesen Zeitraum, was auf eine schwache Infektion hindeutet.

Caprylsäure, eine mittelkettige Fettsäure aus Kokosöl, Butter und anderen genießbaren Ölen, zeigte ebenfalls nach oraler Applikation bei der Meerbrasse gegen *Cryptocaryon irritans* und andere Fischparasiten (*Benedenia seriolae* Monogenea, *Kudoa shiomitsui* Myxozoa) eindeutige Effekte (Hirazawa et al. 2001 a, b).

Es wurden aber nicht nur die Effekte der verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten einer Cryptocaryoniasis untersucht, sondern auch die unterschiedliche Empfindlichkeit einzelner Fischarten gegenüber den Parasiten (Hirazawa et al. 2000). So zeigten drei Fischarten (die Goldbrasse *Sparus aurata*, die Zahnbrasse *Dentex dentex* und die Bernsteinmakrele *Seriola dumerili*) typische Krankheitserscheinungen, während beim Seebarsch (*Dicentrarchus labrax*), bei der Geißbrasse (*Diplodus sargus*) sowie bei der Spitzbrasse (*Diplodus puntazzo*) keine Symptome nachweisbar waren (Rigos et al. 2001). Allerdings wurde keine Aussage darüber gemacht, ob die Fische schon einmal Kontakt mit *Cryptocaryon irritans* gehabt hatten und eventuell gegen den Parasiten immun waren.

Allerdings ist der Immunmechanismus gegen Parasiten bei Fischen hoch kompliziert und trotz zahlreicher Studien noch nicht exakt geklärt.

Die angeborene Immunität des Fisches tritt entweder zwischen den Wirtsarten (“inter-host innate immunity”) oder innerhalb der Wirtsarten (“intra-host innate immunity”) auf. Bei der “inter-host innate immunity” kann z.B. *Oncorhynchus mykiss* mit dem pathogenen Haemoflagellaten *Cryptobia salmositica* (aus *Oncorhynchus* spp. isoliert) infiziert werden, aber nicht mit *Cryptobia catostomi* aus *Catostomus commersoni* (engl. Superior Whitesucker). Sind jedoch nur einzelne Individuen resistent, wie z.B. einige Bachsaiblinge (*Salvelinus fontinalis*) gegen *Cryptobia salmositica* (aber längst nicht alle), so handelt es sich um eine “intra-host innate immunity”. Sie wird ererbt und durch ein dominantes Gen kontrolliert. Als Schutzmechanismus wird dann das Komplement-System aktiviert, um den

Parasiten aufzulösen. *S. fontinalis* erkrankt zwar genauso wie *O. mykiss* an der Parasitose, aber die Verluste sind längst nicht so hoch. Dies liegt an der schnellen und hohen Produktionsrate von α_2 -Makroglobulin, das eine der beiden normalen Antiproteasen darstellt. Es neutralisiert im Blut die vom pathogenen Parasiten produzierte Protease.

Fische, die z.B. eine *C. salmositica*-Infektion überlebt haben, zeigen eine erworbene Immunantwort und sind geschützt, da sie den Antigenen ausgesetzt waren. Die humorale (z.B. Komplement-fixierende Antikörper zur Zell-Lyse) und zell-vermittelte (z.B. T-Zell-Zytotoxizität, Phagozytose) Immunantwort sind Teil der erworbenen Immunität (Woo 1987, 1996).

Obwohl das Immunsystem gut entwickelt ist, haben es einige Parasiten geschafft, davon zu profitieren. So werden *Ichthyophthirius multifiliis* und *Gyrodactylus derjavini* durch Faktoren aktiviert, die in den mukösen Zellen der Wirtshaut zu finden sind. Dabei werden die Theronten von *I. multifiliis* offenbar durch bestimmte Proteine (inklusive Immunglobulin) aus dem Mukus angelockt (Buchmann 2000).

Auch immuno-endokrine Interaktionen sind bei Fischen beobachtet worden. So beeinflussen Cortisol, Wachstumshormone, Prolaktin etc. Funktionen des Immunsystems bei einer Anzahl von Fischen. Allerdings steht die Forschung hier erst noch am Anfang dieser komplexen Zusammenhänge (Harris und Bird 2000).

Für eine wirklich erfolgreiche Bekämpfung von *Cryptocaryon irritans* bietet sich zukünftig eine genaue Erforschung der angeborenen und erworbenen Immunreaktionen der Wirtsfische an. Dabei sollten Aspekte wie Wirtsfindung unter Berücksichtigung von eventueller Chemotaxis (fischeigene Proteine betreffend) sowie Parasit/Wirt-Interaktionen im Hinblick auf den Tarnmechanismus des Ciliaten miteinbezogen werden. Angesichts der vermehrten marinen Aquakulturen zur Nahrungsproduktion wird dieser pathogene, nicht wirtsspezifische Parasit auch in der Zukunft eine besondere Rolle spielen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum Lebenszyklus, zur Ultrastruktur und zur Bekämpfung der verschiedenen Entwicklungsstadien des marinen, holotrichen Ciliaten *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951 durchgeführt. Dabei galt ein besonderer Aspekt der gezielten histochemischen Charakterisierung der Oberfläche der hautständigen Stadien dieses Fischparasiten und seiner Nahrungsvakuolen mit Lektinen und anderen Verfahren. Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Überprüfung der parasitiziden Wirkung von Bithionolsulfoxid, einer diphenolischen Verbindung, auf die hautständigen Stadien des Parasiten bei infizierten Weißbinden-Glühkohlenfischen (*Amphiprion frenatus*).

Während der Untersuchungen wurde festgestellt, daß die infektiösen Stadien (Theronten) des Parasiten innerhalb von 10 Minuten ins Wirtsepithel eindringen. Erstmals konnte nachgewiesen werden, daß sich diese sehr jungen, frisch eingedrungenen Stadien deutlich von den nachfolgenden hautständigen Phoronten und Trophonten, den Wachstums- und Freßstadien, unterscheiden. Besonders auffällig waren dabei die in den Parasiten eingelagerten Cilien sowie zahlreiche elektronenlichte Strukturen im Cytoplasma der Parasiten. Hierbei handelte es sich teilweise um Bestandteile der späteren spongiösen Schicht, einer nur bei den parasitierenden Stadien von *C. irritans* vorkommenden schwammartigen Füllung des alveolaren Raumes. Diese spongiöse Schicht wurde mit zunehmenden Alter der Trophonten reduziert und war bei Verlassen des Wirtsfische nur noch als dünne Lage vorhanden.

Nachdem sich der Protomont an geeignetes Substrat festgeheftet hatte, wandelte er sich in den - von einer bis zu 10-lagigen Zystenwand umgebenen - Tomonten um. Innerhalb dieses Stadiums entstanden bis zu 256 Tochterzellen (Tomiten), die von einem elektronendichten Saum, den Vorstufen der späteren spongiösen Schicht, umgeben waren.

Die zahlreichen Nahrungsvakuolen von *Cryptocaryon irritans* konnten analog der Nahrungsvakuolen des zu diesem Parasiten konvergenten Süßwasserciliaten *Ichthyophthirius multifiliis* klassifiziert werden. Es wurde zwischen frühen, mittleren und älteren Nahrungsvakuolen differenziert. Die Cyclosestadien von *C. irritans* unterschieden sich nicht von den Cyclosestadien, die bei *I. multifiliis* auftraten.

Zur näheren Charakterisierung des vermuteten "surface coat" aus aufgelagerten Mucopolysacchariden wurden die hautständigen Stadien mit Tannin, Alcianblau und Rutheniumrot behandelt. Dabei gelang mit Alcianblau und Rutheniumrot eine Markierung der äußeren Membran sowie der spongiösen Schicht und ihrer Vesikel. *C. irritans* besitzt somit, ähnlich wie *I. multifiliis*, einen "surface coat" zum Schutz gegen das Immunsystem des Wirtsfisches. Wahrscheinlich verfügt der marine Parasit aber auch wie *I. multifiliis* über membranständige Antigene, die beim Wirt die Bildung spezifischer Antikörper auslösen können.

Die Goldmarkierungen mit verschiedenen Lektinen nach der Post-Embedding-Methode führten zum Nachweis von Sialinsäure in kleinen Vakuolen im Cytoplasma, α -L-Fucose ausschließlich in Nahrungsvakuolen und n-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin in den Nahrungsvakuolen und der spongiösen Schicht. Während α -L-Fucose wahrscheinlich ein Abbauprodukt der Glykoproteine der Fischzellen bei der Endocytose ist, hat n-Acetylglucosamin, da es in der spongiösen Struktur vorhanden ist, wahrscheinlich eine Funktion beim Schutz der hautständigen Stadien von *C. irritans* gegen das Immunsystem des Wirtes. Die genaue Rolle der Sialinsäure bei diesem Ciliaten konnte nicht geklärt werden, eventuell beeinflusst sie die Parasit/Wirt-Interaktion.

Das Vorkommen der Zucker α -D-Glucose, α -D-Mannose, β -D-Galaktose und n-Acetyl- β -(1,4)-D-Galaktosamin konnten durch die umfangreichen Tests bei *C. irritans* ausgeschlossen werden.

Bithionolsulfoxid erwies sich in dieser Untersuchung als effektive Substanz gegen den Befall mit *Cryptocaryon irritans*. Bereits bei einer Konzentration von 10 mg Substanz pro l Aquarienwasser in einem 24-stündigen Bad konnten starke Schädigungen der hautständigen Stadien nachgewiesen werden. Die den Parasiten limitierenden Membranen waren zerstört, Cilien geschädigt und der perinucleäre Raum des Makronucleus war stark erweitert. Auffallend waren insbesondere die Schädigungen an den zahlreichen Mitochondrien. Ihre Matrix erschien unterschiedlich elektronenlicht. Ihre Tubuli waren - häufig vom Zentrum ausgehend - zerstört.

Die Nahrungsvakuolen hingegen wurden durch die Medikation nicht verändert. Eine Konzentration von 25 mg Bithionolsulfoxid pro l führte nach 24 Stunden zum Erliegen der Parasitose. Transelektronenmikroskopisch konnten dann nur noch Reste des Parasiten nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PH, Manson JE, Willett WC, Ma J (2002) Blood levels of long-chain n-3-fatty acids and the risk of sudden death. *New Engl J Med* 346: 1113-1118

Allison N (1953) Advancements in prevention and treatment of parasitic diseases of fish. *Trans Am Fish Soc* 83: 221-228

Areerat S (1974) The immune response of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), to *Ichthyophthirius multifiliis*. Master thesis. Auburn University

Behnke O, Zelander T (1970) Preservation of intercellular substances by the cationic dye alcian blue in preparative procedures for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 31: 424-438

Benjapong W, Naeypatimanond S, Benjapong K, Thumaruksa C, Ruttarasarn S, Jaroovesama N (1984) Studies on paragonimiasis: treatment with mebendazole, emetine with mebendazole and praziquantel. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 15: 354-359

Bolivar I, Guiard-Maffia (1989) Cellular localization of the serH surface antigen in *Tetrahymena thermophila*. *J Cell Sci* 94: 343-354

Braun von J (1996) Den Hunger beenden und die Natur erhalten – Vorschau auf den Welternährungsgipfel. *Spektrum Wiss* 11/96: 76-82

Brown EM (1951) A new parasitic protozoan, the causal organism of a white spot disease in marine fish *Cryptocaryon irritans* gen. u. sp. N. *Agenda and Abstr Sci Meet Zool Soc London* 11: 1-2

Brown EM (1963) Studies on *Cryptocaryon irritans* Brown. *Progress in Protozoology Proc First Int Congr on Protozool Prague, Aug 22-31*

- Bryant MS, Lee RP, Lester RJG, Whittington RJ** (1999) Anti-immunoglobulin antisera used in an ELISA to detect antibodies in barramundi *Lates calcarifer* to *Cryptocaryon irritans*. Dis Aquat Org 36: 21-28
- Buchmann K** (2000) Antiparasitic immune mechanisms in teleost fish: a two-edged sword? Bull Eur Ass Fish Pathol 20: 48-59
- Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung** (1998) Sektorkonzept Fischerei und Aquakultur. BMZ, Bonn
- Bunkley-Williams L, Williams EH Jr.** (1994) Diseases caused by *Trichodina spheroidesi* and *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) in wild coral reef fishes. J Aquat Anim Health 6: 360-361
- Burgess PJ** (1992) *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951 (Ciliophora): Transmission and immune response in the mullet *Chelon labrosus* (Risso, 1826). PhD thesis, Plymouth
- Burgess PJ, Matthews RA** (1994) A standardized method for the in vivo maintenance of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) using the grey mullet *Chelon labrosus* as an experimental host. J Parasitol 80: 288-292
- Burgess PJ, Matthews RA** (1995) Fish host range of seven isolates of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora). J Fish Biol 46: 727-729
- Canella MF** (1972) Ce qu'on ne connaît pas sur un holotriche ectoparasite des poissons marins, découvert par le Dr. Sikama et appelé *Cryptocaryon irritans* par Miss Brown. Contributions à la connaissance des Ciliés VII. Ferrara: Univ degli studi 108-132
- Canella MF, Rocchi-Canella I** (1976) Biologie des Ophryoglenina (ciliés hyménostomes histophages). Ann Univ Ferrara Nuova Serie Sez III 3: 1-510

- Cheung PJ** (1993) Parasitic Diseases of marine tropical fishes in: Stoskopf MK [ed.] Fish Medicine. WB Saunders Company Philadelphia
- Cheung PJ, Nigrelli RF, Ruggieri GD** (1979) Studies on cryptocaryoniasis in marine fish: effect of temperature and salinity on reproductive cycle of *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951. J Fish Dis 2: 93-97
- Clark TG, Dickerson HW, Findly RC** (1988) Immune response of channel catfish to ciliary antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*. Dev Comp Immunol 12: 581-594
- Clark TG, Dickerson HW, Gratzek JB, Findly RC** (1987) In vitro response of *Ichthyophthirius multifiliis* to sera from immune channel catfish. J Fish Biol 31: 203-208
- Colorni A** (1985) Aspects of the biology of *Cryptocaryon irritans*, and hyposalinity as a control measure in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata*. Dis Aquat Org 1: 19-22
- Colorni A** (1987) Biology of *Cryptocaryon irritans* and strategies for its control. Aquaculture 67: 236-237
- Colorni A, Diamant A** (1993) Ultrastructural features of *Cryptocaryon irritans*, a ciliate parasite of marine fish. Europ J Protistol 29: 425-434
- Corder R, Douthwaite JA, LeesDM, Khan NQ, Viseu dos Santos AC, Wood EG, Carrier MJ** (2001) Health: Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. Nature 414: 863-864
- Corliss JO** (1979) The ciliated protozoa. –2nd revised ed. 1. Ciliata Pergamon Press Ltd.
- Cummings RD, Kwame Nyame A** (2000) Glycobiology of protozoan and helminthic parasites. In Beat E [ed]: Carbohydrates in chemistry and biology. Wiley-VCH-Verlag, Weinheim

- De Graaf F** (1962) A new parasite causing epidemic infection in captive coralfishes. Bull Inst Oceanogr Monaco 1: 93-96
- Diamant A, Issar G, Colorni A, Paperna I** (1991) A pathogenic *Cryptocaryon*-like ciliate from the Mediterranean Sea. Bull Eur Ass Fish Pathol 11: 122-124
- Dickerson HW, Dawe DL** (1995) *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). In Woo PTK (ed) Fish diseases and disorders Vol 1 CAB International Wallingford pp 181-229
- Dickerson HW, Clark TE, Leff AA** (1993) Serotypic variation among isolates of *Ichthyophthirius multifiliis* based on immobilization. J Euk Microbiol 40: 816-820
- Diggles BK** (1997) Some information on the morphology of *Cryptocaryon irritans* from South-East Queensland, Australia. Europ J Protistol 33: 200-210
- Diggles BK, Adlard RD** (1995) Taxonomic affinities of *Cryptocaryon irritans* and *Ichthyophthirius multifiliis* inferred from ribosomal RNA sequence data. Dis Aquat Org 22: 39-43
- Diggles BK, Adlard RD** (1997) Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans*. J Euk Microbiol 44: 25-32
- Diggles BK, Lester RJG** (1996 a) Infections of *Cryptocaryon irritans* on wild fish from Southeast Queensland, Australia. Dis Aquat Org 25: 159-167
- Diggles BK, Lester RJG** (1996 b) Influence of temperature and host species on the development of *Cryptocaryon irritans*. J Parasitol 82: 45-51
- Diggles BK, Lester RJG** (1996 c) Variation in the development of two isolates of *Cryptocaryon irritans*. J Parasitol 82: 382-388
- Estler CJ** [ed.] (2000) Pharmakologie und Toxikologie. 5. überarb. u. erw. Aufl. Schattauer, Stuttgart, New York

- Etzler ME** (2000) Plant lectins. In Beat E [ed.]: Carbohydrates in chemistry and biology. Wiley-VCH-Verlag, Weinheim
- Familiari G, Nottola SA, Familiari A, Motta PM** (1989) The three-dimensional structure of the zona pellucida in growing and atretic ovarian follicles of the mouse. Scanning and transmission electron-microscopic observations using ruthenium red and detergents. *Cell Tissue Res* 257: 247-53
- Fautin, DG, Allen GR** (1992) Field guide to anemonefishes and their host sea anemones. Western Australian Museum, Francis Street, Perth
- Flegler S L, Heckman JW Jr., Klomparens KL** (1995) Elektronenmikroskopie. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg
- Foissner W** (1993) 1. Colpodea (Ciliophora) in: Matthes D [ed.] Protozoenfauna Vol. 4. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York
- Forth W** (1996) Pharmakologie und Toxikologie. 7. völlig neubearb. Aufl. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Fouquet D** (1876) Notes sur un espèce d'infusoires parasites des poissons d'eau douce. *Arch Zool Exp Gen* 5: 159
- Fuchs N, Ingold K, Sonda S, Bütikofer P, Hemphill A** (1999) Detection of surface-associated and intracellular glycoconjugates and glycoproteins in *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol* 29: 1597-1611
- Futaesaku Y, Mizuhira V, Nakamura H** (1972) The new fixation method using tannin acid for electron microscopy and some observations of biological specimen. *Proc Int Congr Histochem Cytochem* 4: 155-156
- Goldberg WM** (1988) Chemistry, histochemistry and microscopy of the organic matrix of spicules from a gorgonian coral. *Histochemistry* 89: 163-170

- Gräfe U** (1992) Biochemie der Antibiotika. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, New York
- Griffin BR** (1989) Screening of chemicals to control protozoan parasites of fish. Prof Fish Cult 51: 127-132
- Haas W, Haberl B, Hofmann M, Kerschensteiner S, Ketzer U** (1999) Theronts of *Ichthyophthirius multifiliis* find their fish hosts with complex behavior patterns and in response to different chemical signals. Tokai J Exp Clin Med 23: 329-331
- Harris J, Bird DJ** (2000) Modulation of the fish immune system by hormones. Vet Immunol Immunopathol 77: 163-176
- Hausmann K, Bradbury PC** (1996) Ciliates: cells and organisms. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- Hausmann K, Hülsmann N** (1996) Protozoology. 2nd edition Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Herwig N** (1978) Treatment of *Cryptocaryon* - Saltwater Ich. Tropic Fish Hobbyist 26: 55-62
- Heß D** (1999) Pflanzenphysiologie. 10. Auflage UTB Verlag, Stuttgart
- Hignette M** (1981) Utilization de sels metallique comme traitement antiparasitaire en aquariologie marine. Vie marine 3: 133-138
- Hilgendorf F, Paulicki A** (1869) Infusionsthierc als Hautparasiten bei Süßwasserfischen. Centralbl Med Wiss 3: 33
- Hirazawa N, Mitsuboshi T, Hara T, Mori T** (2000) Susceptibility of spotted halibut, *Verasper variegatus*, and Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, to infections of the ciliate, *Cryptocaryon irritans*, and the monogenean, *Neoheterobothrium hirame*. Suisan-zoshoku 48: 215-220

- Hirazawa N, Oshima SI, Hara T, Hata K** (2001a) In vitro assessment of the antiparasitic effect of caprylic acid against several fish parasites. *Aquaculture* 200: 251-258
- Hirazawa N, Oshima SI, Hara T, Mitsuboshi T, Hata K** (2001b) Antiparasitic effect of medium-chain fatty acids against the ciliate *Cryptocaryon irritans* infestation in the red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 198: 219-228
- Huff JA, Burns CD** (1981) Hypersaline and chemical control of *Cryptocaryon irritans* in red snapper, *Lutjanus campechanus*, monoculture. *Aquaculture* 22: 181-184
- Iglesias R, Paramá A, Álvarez MF, Leiro J, Sanmartín ML** (2002) Antiprotozoals effective in vitro against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Dis Aquat Organ* 49: 191-197
- Jaffe CL, McMahon-Pratt D** (1988) The identification of membrane glycoconjugats in *Leishmania* species. *J Parasitol* 74: 548-561
- Jee BY, Kim KH, Park SI, Kim YC** (2000) A new strain of *Cryptocaryon irritans* from the cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dis Aquat Organ* 43: 211-215
- Kabata Z** (1985) *Parasites and diseases of fish cultured in the tropics*. Taylor and Francis, London, Philadelphia
- Kakuta I, Kurokura H** (1995) Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against *Cryptocaryon irritans* infection of Red Sea bream. *Fish Pathol* 30: 289-290
- Karnovsky MJ** (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137
- Kerbert C** (1884) *Chromatophagus parasiticus* – A contribution to the natural history of parasites. United States Commission of Fisheries Report pp 1127-1136

- Keskintepe M, Farmer M** (1994) Light and electron microscopic observations on the ciliate *Cryptocaryon irritans*, a parasite of marine fish. Newsl South Eastern Electr Microsc Soc 10: 7-10
- Keskintepe M, Maselli AG, Farmer Ma, Dickerson HW** (1994) A comparative study of the ciliated fish parasites *Cryptocaryon irritans* and *Ichthyophthirius multifiliis*. 8th International Congress of Parasitology 10.-14. October 1994, Izmir
- Kim KH, Choi ES** (1998) Treatment of *Microcotyle sebastis* (Monogenea) on the gills of cultured rockfish (*Sebastes schelegeli*) with oral administration of mebendazole and bithionol. Aquaculture 167: 115-121
- Kinne O** (1982) Aquakultur und die Ernährung von morgen. Spektrum Wiss 11/82: 46-57
- Kleinig H, Maier U** (1999) Kleinig/Sitte Zellbiologie 4. Auflage Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York
- Kovács P, Müller WEG, Csaba G** (1997) Identification of lectins in the kinetids of *Tetrahymena pyriformis*. Cell Biol Int 21: 17-21
- Lin TL, Dickerson HW** (1992) Purification and partial characterization of immobilization antigens from *Ichthyophthirius multifiliis*. J Protozool 39: 457-463
- Lindsay DS, Blagburn BL** (1995) Antiprotozoan drugs. In Adams HR [ed]: Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa State University Press Ames pp 955-983
- Lischke A, Klein C, Stierhof YD, Hempel M, Mehlert A, Almeida IC, Ferguson MAJ, Overath P** (2000) Isolation and characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, mucin-like surface glycoproteins from bloodstream forms of the freshwater-fish parasite *Trypanosoma carassii*. Biochem J 345: 693-700
- Lobo-da-Cunha A, Azevedo C** (1988) Ultrastructural and cytochemical study of food vacuoles and primary lysosomes in *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora). Europ J Protistol 24: 60-63

- Lobo-da-Cunha A, Azevedo C** (1993) Processing of food vacuoles in the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* after exit from the host. Parasitol Res 79: 272-278
- Lom J, Dyková I** (1992) Protozoan parasites of fishes. Elsevier Verlag, Amsterdam, London
- Longhofer SL** (1988) Chemotherapy of rickettsial, protozoal and chlamydial diseases. Vet Clin North Am Small Anim Pract 18: 1183-1196
- Löscher W, Ungemach FR, Kroker R** (1999) Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, Wien
- Luft JH** (1971 a) Ruthenium red and violet I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. Anat Rec 171: 347-368
- Luft JH** (1971 b) Ruthenium red and violet II. fine structural localization in animal tissues. Anat Rec 171: 369-416
- Luft JH** (1976) The structure and properties of the cell surface coat. Int Rev Cytol 45: 291-368
- Lynn DH, Frombach S, Ewing MS, Kocan K** (1991) The organelle of Lieberkühn as a synapomorphy for the Ophryoglenina (Ciliophora: Hymenostomatida). Trans Am Microsc Soc 110: 1-11
- Madsen HCK, Buchmann K, Møllergaard S** (2000) Treatment of trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) reared in recirculation systems in Denmark: alternatives to formaldehyde. Aquaculture 186: 221-231
- Matthews BF, Matthews RA, Burgess PJ** (1993) *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951 (Ichthyophthiriidae): the ultrastructure of the somatic cortex throughout the life cycle. J Fish Dis 16: 339-349
- Mayland HJ** (1989) Korallenfische und Niedere Tiere. Landbuch-Verlag, Hannover

- Mehlhorn H** [ed.] (2001) Encyclopedic reference of parasitology. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Mehlhorn H, Piekarski G** (1998) Grundriss der Parasitenkunde. 5. Auflage UTB Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Lübeck, Jena, Ulm
- Mehlhorn H, Ruthmann A** (1992) Allgemeine Protozoologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- Mehlhorn H, Mehlhorn B, Schmahl G** (1992) Gesundheit für Zierfische – Parasiten erkennen und bekämpfen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Mehlhorn H, Düwel D, Raether W** (1993) Diagnose und Therapie der Parasitosen von Haus-, Nutz- und Heimtieren. 2. Auflage Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York
- Meshi T, Yoshikawa M, Sato Y** (1970) Metabolic fate of bis(3,5-dichloro-2-hydroxyphenyl)-sulfoxide (bithionol sulfoxide). *Biochem Pharmacol* 19: 1351-1361
- Mirhaghani A, Warton A** (1998) Involvement of *Trichomonas vaginalis* surface-associated glycoconjugates in the parasite/target cell interaction. A quantitative electron microscopy study. *Parasitol Res* 84: 374-381
- Monteiro VG, Soares CP, de Souza W** (1998) Host cell surface sialic acid residues are involved on the process of penetration of *Toxoplasma gondii* into mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett* 164: 323-327
- Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folkes C, Luchenco J, Mooney H, Troell M** (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017-1023
- Nelson JS** (1994) Fishes of the world. 3. Auflage John Wiley & Son Inc., New York

- Newman GR, Hobot JA** (1993) Resin microscopy and on-section immunchemistry. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Nicolson GL, Singer SJ** (1971) Ferritin-conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains for electron microscopy: Application to saccharides bound to cell membranes. Proc Natl Acad Sci 68: 942-945
- Nigrelli RF, Ruggieri GD** (1966) Enzootics in the New York Aquarium caused by *Cryptocaryon irritans* Brown, 1951 (= *Ichthyophthirius marinus* Sikama, 1961), a histophagous ciliate in the skin, eyes and gills of marine fish. Zoologica, New York 51: 97-102
- Odor DL** (1991) Light and electron microscopic observations on ciliated vacuoles and cysts in the oviductal and endocervical epithelia of the rabbit. Am J Anat 190: 334-48
- Ogawa K** (1996) Marine parasitology with special reference to Japanese fisheries and mariculture. Vet Parasitol 64: 95-105
- Parker JC** (1965) Studies on the natural history of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet 1876 an ectoparasite ciliate of fish. PhD Dissertation, University of Maryland
- Plattner H, Zingsheim HP** (1987) Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Plumb DC** (1999) Veterinary drug handbook. Iowa State University Press
- Reynolds ES** (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17: 208-212
- Ribeiro S, de Araujo Soares RM, Sales Alviano C, Da Silva EF, De Souza WD, Angluster J** (1997) Cell-surface carbohydrates of *Entamoeba invadens*. Parasitol Res 83: 801-805

- Richter G** (1997) Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Thieme Verlag, Stuttgart
- Rigos G, Pavlidis M, Divanach P** (2001) Host susceptibility to *Cryptocaryon* sp. infection of mediterranean marine broodfish held under intensive culture conditions: a case report. Bull Eur Ass Fish Pathol 21: 33-36
- Robertson EI, Courtney CH** (1995) Anticestodal and antitrepatodal drugs. In Adams HR [ed.]: Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa State University Press, Ames pp 955-983
- Robinson DG** (1985) Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Rohde K** (1993) Ecology of marine parasites – an introduction to marine parasitology. CAB International, Wallingford
- Romeis B** (1989) Mikroskopische Technik. Böck P (Hrsg.) 17. Auflage Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
- Römpp H** (1998) Lexikon Chemie. 6 Bde Thieme Verlag, Stuttgart
- 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: 294-300
- Ruggeri A, Dell'obro C, Quacci D** (1977) Electron microscopic visualization of proteoglycans with ruthenium red. Histochem J 9: 249-252
- Ruider S** (1995) Pharmakokinetische und histochemische Untersuchungen zur Ichthyophthiriasis bei Zierfischen. Diss Ruhr-Universität Bochum, Bochum
- Safina C** (1996) Die Überfischung der Meere. Spektrum Wiss 1/96: 58-65

- Schäperclaus W** (1990) Fischkrankheiten Teil 1, 2. 5. bearbeitete Auflage Akademie Verlag, Berlin
- Schofield BH, Williams BR, Doty SB** (1975) Alcian blue staining of cartilage for electron microscopy. *Histochem J* 7: 139-149
- Schmahl G, Taraschewski H Mehlhorn H** (1989) Chemotherapy of fish parasites. *Parasitol Res* 75: 503-511
- Schmahl G, Schmidt H, Ritter G** (1996) The control of ichthyophthiriasis by a medicated food containing quinine: efficacy tests and ultrastructure investigations. *Parasitol Res* 82: 697-705
- Seneca H** (1971) Biological basis of chemotherapy of infections and infestations. FA Davis pp 1180
- Shepard N, Mitchell N** (1977) The use of ruthenium red and p-phenylenediamine to stain cartilage simultaneously for light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 25: 1163-1168
- Sikama Y** (1938) Über die Weisspünktchenkrankheit bei Seefischen. *J Shanghai Inst Sci* 4: 112-128
- Sikama Y** (1961) On a new species of *Ichthyophthirius multifiliis* found in marine fish. *Sci Rep Yokosuka City Mus* 6: 66-70
- Simionescu N, Simionescu M** (1976 a) Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. I Procedure, and evidence for mordanting effect. *J Cell Biol* 70: 608-621
- Simionescu N, Simionescu M** (1976 b) Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. II The moiety and functional groups possibly involved in the mordanting effect. *J Cell Biol* 70: 622-633

- Sinderman CJ** (1989) Principal diseases of marine fish and shellfish. Academic Press, San Diego
- Sindermann CJ** (1977) Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. White spot disease of pompano 251-253
- Sterba G** (1978) Enzyklopädie der Aquaristik und Speziellen Ichthyologie. Verlag J Neumann-Neudamm, Melsungen, Berlin, Basel, Wien
- Stirling JW** (1993) Use of tannic acid and silver enhancer to improve staining for electron microscopy and immunogold labeling. J Histochem Cytochem 41: 643-648
- Stryer L** (1996) Biochemie. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg
- Tareen IU** (1980) Heavy infection of the cultured marine fish by *Cryptocaryon irritans* Brown 1951 (Protozoa – Ciliata). Eur Maricult Soc Q Newsl 15: 83-86
- Thiéry JP** (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur souches fines en microscopie électronique. J Microsc 66: 987-1018
- Tojo Rodriguez JL, Santamarina Fernandez MT** (2001) Attempts at oral pharmacological treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 24: 249-252
- Torikata C** (1988) The ciliary necklace – a transmission electron microscopic study using tannic acid-containing fixation. J Ultrastruct Mol Res 101: 210-214
- Treves-Brown KM** (2000) Applied fish pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London
- Watson R, Pauly D** (2001) Systematic distortions in world fisheries catch trends. Nature 414: 534-536
- Weismann C** (1991) The prion's progress. Nature 349: 569-571

- Wilkie DW, Gordin H** (1969) Outbreak of cryptocaryoniasis in marine aquaria at Scripps Institution of Oceanography. *Calif Fish and Game* 55: 227-236
- Woo PTK** (1987) Immune response of fish to parasitic protozoa. *Parasitol Today* 3: 186-188
- Woo PTK** (1996) Protective immune response of fish to parasitic flagellates. *Ann Rev Fish Dis* 6: 121-131
- Woo PTK** (1997) Immunization against parasitic diseases of fish. *Dev Biol Stand* 90: 233-241
- Wright ADG, Colorni A** (2002) Taxonomic re-assignment of *Cryptocaryon irritans*, a marine fish parasite. *Europ J Protistol* 37: 375-378
- Xu DH, Klesius PH, Shoemaker CA** (2001) Effects of lectins on the invasion of *Ichthyophthirius theront* to channel catfish tissue. *Dis Aquat Org* 45: 115-120
- Xu R, Jiang J, Chen B** (1992) Microscopy observations on the life cycle of the *Cryptocaryon irritans*. *Mar Sci* 4: 87-90
- Yoshida N, Dorta ML, Ferreira AT, Oshiro MEM, Mortara RA, Acosta-Serrano A, Favoreto S Jr.** (1997) Removal of sialic acid from mucin-like surfaces molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. *Mol Biochem Parasitol* 84: 57-67
- Yoshinaga T, Dickerson HW** (1994) Laboratory propagation of *Cryptocaryon irritans* on a saltwater-adapted *Poecilia* hybrid, the Black Molly. *J Aquat Anim Health* 6: 197-201
- Yoshinaga T, Nakatoe JI** (1997) Acquired protection of immobilization antibody against *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora, Hymenostomatida) in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) *Fish Pathol* 32: 229-230

Zell RA (1990) Die Jagd nach den Prionen. Bild Wiss 11: 32-28

Zimmermann D, Peters W, Schaub GA (1987) Differences in binding of lectin-gold conjugates by *Trypanosoma cruzi* and *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) in the intestine of *Triatoma infestans* (Reduviidae). Parasitol Res 74: 5-10

Danksagung

Diese Dissertation entstand am Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Ein Teil der Sachmittel zur Erstellung dieser Arbeit wurden durch die DFG unter der Projektnummer SCHM 1248/3-1 zur Verfügung gestellt.

Im Besonderen möchte ich Herrn Prof. Dr. Heinz Mehlhorn für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit sehr herzlich danken. Seine motivierenden und unterstützenden Diskussionsbeiträge waren stets eine hilfreiche Anregung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Günter Schmahl danke ich aufrichtig für sein wissenschaftliches Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für seine Unterstützung und wertvollen Ratschläge.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts und allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, für ihre Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima. Mein Dank gilt auch Herrn Steffen Köhler für seine Hilfe bei der Anwendung der Programme zur Erstellung der Bildtafeln.

Bei Frau Inge Latka bedanke ich mich für ihre engagierte Unterstützung bei den Lektin-Gold-Markierungen.

Frau Karin Aldenhoven und Frau Dipl.-Biol. Susanne Walter möchte ich an dieser Stelle für ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft danken.

Mein ganz großer Dank ist an meine Eltern gerichtet. Besonders meinem Vater möchte ich für seine moralische und finanzielle Unterstützung danken. Er konnte die Vollendung dieser Arbeit nicht mehr erleben.

Und ich danke meinem Mann Georg. Als ich ihn brauchte, war er für mich da.

Lebenslauf

Name: Angelika Dohle
Anschrift: Auf dem Steinstück 14
58769 Nachrodt-Wiblingwerde
Geburtsdatum: 29.03.1968
Geburtsort: Letmathe, jetzt Iserlohn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: röm.-kath.
Familienstand: verheiratet seit dem 22.08.2002, eine Tochter (13 Jahre)

Schulen: 1974-1975 Grundschule in Schwerte
1975-1978 Grundschule in Letmathe
1978-1987 Mathematisch-Naturwissenschaftliches
Gymnasium in Altena; 1987 Abitur

Hochschulbildung: 10/1987-06/1998 Studium der Biologie an der Ruhr-
Universität Bochum; Abschluß Diplom
11/98-12/2002 Promotion an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Berufstätigkeit 10/99-12/2002 wissenschaftliche Hilfskraft

Erklärung:

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. H. Mehlhorn betreut worden.

Düsseldorf, den 13. Dezember 2002

(Angelika Dohle)