

Bindung von *Pseudomonas aeruginosa* Lektinen PA-I und PA-II an
Oberflächenepithelien des Menschen

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie des Zentrums
für experimentelle Medizin

Dissertation

Zur Erlangung der Würde der Doktorin/des Doktors der
Medizin an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

(gemäß der PromO vom 18. Januar 2017)

vorgelegt von
Aracelli-Alejandra Meyer-Osores, geb.: Osores-Vigueras

Aus Hamburg

Hamburg 2018

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Udo Schumacher

Erstgutachter/in: Frau PD Dr. Birgit Wulff

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Marcus Altfeld

Datum der Disputation: 30.10.2018

| | | |
|-------------|--|-----------|
| I. | Arbeitshypothese und Fragestellung | 1 |
| II. | Einleitung | 2 |
| 1. | Aufbau der Zellmembran | 2 |
| 2. | Lektine..... | 3 |
| 2.1. | Klassifikation der Lektine..... | 3 |
| 2.2. | Bakterielle Lektine | 4 |
| 3. | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 5 |
| 3.1. | Die Bedeutung von <i>P. aeruginosa</i> als Krankheitserreger | 5 |
| 3.2. | Mikrobiologische Eigenschaften von <i>P. aeruginosa</i> | 8 |
| 3.3. | Pathomechanismus von <i>P. aeruginosa</i> | 9 |
| 3.4. | Biofilmbildung von <i>P. aeruginosa</i> | 12 |
| 3.5. | Alginate von <i>P. aeruginosa</i> | 14 |
| 3.6. | <i>Quorum Sensing</i> bei <i>P. aeruginosa</i> | 16 |
| 4. | Zilien..... | 18 |
| 4.1. | Zilienstruktur und Vorkommen..... | 18 |
| 4.2. | <i>Mukoziliäre Clearance</i> | 19 |
| 5. | Anti-Adhäsive Therapie | 20 |
| III. | Material | 22 |
| 1. | Histologisches Material..... | 22 |
| 2. | Humane Nasenmuscheln mit Flimmerepithel | 22 |
| IV. | Methoden | 23 |
| 1. | Anfertigung von Paraffinschnitten..... | 23 |
| 2. | Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 24 |
| 3. | Immunhistochemische Färbungen..... | 24 |
| 3.1. | Lektin-Histochemie..... | 24 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 3.2. | Lektin-Histochemie und spezifische Zuckerhemmung mit inhibitorischen Monosacchariden (Fukose und Galaktose) | 25 |
| 3.3. | Lektin-Histochemie mit Zusatz von Hyaluronsäure-Oligosacchariden und Viscoseal® | 26 |
| 3.4. | Lektin-Histochemie mit Zusatz von <i>P. aeruginosa</i> -Alginaten und dem Algenalginat Manuacol LB..... | 27 |
| 4. | Zilienschlagmessung am inversen Phasenkontrastmikroskop | 29 |
| 4.1. | Zilienschlagmessung mit Zusatz von Hyaluronsäure-Oligosacchariden und Hyaluronsäure Viscoseal® | 30 |
| 4.2. | Zilienschlagmessung mit Zusatz von <i>P. aeruginosa</i> -Alginaten und dem Algenalginat Manuacol LB..... | 31 |
| 5. | Auswertung | 31 |
| 5.1. | Histologische Auswertung der Immunhistochemie | 31 |
| 5.2. | Statistische Auswertung der Zilienschlagmessungen..... | 32 |
| V. | Ergebnisse | 35 |
| 5.1. | Ergebnisse der histologischen Auswertung | 35 |
| 5.1.1. | Ergebnisse für PA-IL und PA-IIL mit Fukose und Galaktose | 35 |
| 5.1.2. | Ergebnisse für PA-IL und PA-IIL mit den HA-Oligosachhariden..... | 47 |
| 5.1.3. | Ergebnisse für PA-IL und PA-IIL mit Viscoseal®..... | 50 |
| 5.1.4. | Ergebnisse für PA-IL und PA-IIL und Alginaten..... | 53 |
| 5.2. | Histologische Auswertung der Immunhistochemie in Tabellenform..... | 55 |
| 5.3. | Fotos der Immunhistochemie, Lungengewebe PA-IL und PA-IIL | 63 |
| 5.4. | Ergebnisteil der Zilienschlagfrequenz Messung | 67 |
| VI. | Diskussion | 77 |
| VII. | Zusammenfassung | 86 |
| VIII. | Abkürzungsverzeichnis | 88 |
| IX. | Literaturverzeichnis | 89 |
| X. | Danksagung | 105 |
| XI. | Eidesstattliche Erklärung | 106 |

I. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die äußerste Schicht aller Säugetierzellen einschließlich der des Menschen besteht aus einer kohlenhydratreichen Ummantelung namens Glykokalix. Die terminalen Kohlenhydratreste dieser Glykokalix stellen somit die äußerste Schicht der Zellen dar, weshalb diese auch als Anheftungsstellen von Pathogenen benutzt werden kann. Dabei binden sich die Pathogene mit kohlenhydratbindenden Proteinen, Lektinen, an die terminalen Kohlenhydratreste der Glykokalix. Obgleich viele Pathogene solche Lektine benutzen, um sich an menschlichen Zellen zu binden, sind besonders die beiden Lektine von *Pseudomonas aeruginosa* von klinischem Interesse. Man bezeichnet sie als *P. aeruginosa* Lektin I (PA-I oder auch LecA) und *P. aeruginosa* Lektin II (PA-II oder auch LecB), ersteres ist spezifisch für D-Galaktose und letzteres für L-Fukose (Gilboa-Garber, 1982). Mit Hilfe dieser beiden Lektine können sich Pseudomonaden an humane Epithelien binden und sie kolonisieren. Durch Gabe von inhibierenden Monosacchariden können die Pseudomonaden kompetitiv von den Oberflächenepithelien verdrängt werden. Die Wirksamkeit dieses Ansatzes konnte bereits klinisch bei Pseudomonasinfektion im Gehörgang und im Respirationstrakt gezeigt werden (Steuer *et al.*, 1993, von Bismarck *et al.*, 2001). Die Bindungsstellen für die beiden *Pseudomonas*-Lektine sind bisher nur an wenigen Oberflächenepithelien untersucht worden. Daher ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Lektinbindungsstellen von *P. aeruginosa* an weiteren menschlichen bedeckenden Epithelien zu untersuchen.

- Welche Bindungsstellen für die beiden *Pseudomonas*-Lektine und Oberflächenepithelien lassen sich lektinhistochemisch nachweisen?
- Welche ist die minimale Monosaccharidkonzentration um eine Bindung der *Pseudomonas*-Lektine an Oberflächenepithelien im Schnittpräparat und in einem Zilienschlagassay kompetitiv zu inhibieren?

Bei den Flimmerepithelien des Atemtraktes immobilisieren die beiden Pseudomonaslektine den Zilienschlag, wodurch ein wichtiger unspezifischer Abwehrmechanismus geblockt wird, sodass sie leichter die Atemwege kolonisieren können. Da Pseudomonaden häufig die Atemwege von cystische Fibrosekranken besiedeln und bei dieser Erkrankung das Glykosaminoglykan Hyaluronan vermehrt in dem Atemwegsflüssigkeiten auftritt, soll die Interaktion von Hyaluronan mit den Pseudomonaslektinen untersucht werden. Die Pseudomonaden produzieren selbst auch Polysaccharide, sogenannte Alginate, deren Interaktion mit den beiden Lektinen ebenso untersucht werden soll.

II. Einleitung

1. Aufbau der Zellmembran

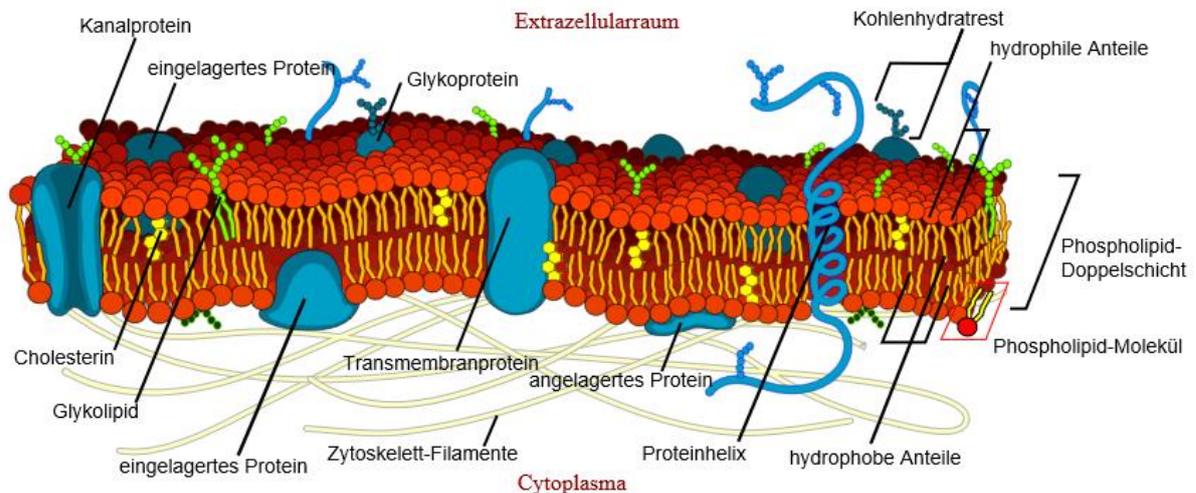


Abbildung 1: Bau der Zellmembran mit Glykokalix an der Außenseite

Referenz: URL: https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Cell-membrane_detailed_diagram_de.svg. [Stand: 05.03.2018, 11.43].

Die Glykokalix bildet einen unterschiedlich breiten Kohlenhydratsaum an der Außenseite der Zellmembran aller eukaryotischen Zellen (siehe Abb. 1). Sie besteht aus Kohlenhydraten, genauer aus Oligosacchariden, die kovalent an die Membranproteine und Membranlipide gebunden sind. Der Aufbau und damit die Funktionen der Glykokalix haben im Laufe der Evolution unterschiedliche Strukturausprägungen erfahren, die je nach Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt sein können. Die Oligosaccharide der Glykokalix sind für die Zellerkennung und die Zellwachstumskontrolle sowie für die interzelluläre Kontaktaufnahme und Zellkommunikation verantwortlich (Buselmaier, 2006). Die Glykokalix verleiht den Zellen Antigen- und Blutgruppeneigenschaften und ist somit auch für Immunreaktionen sehr wichtig. Ferner sichert die Glykokalix die Zellstatik und bietet Schutz gegen chemische Einwirkungen (Feichter & Dalquen, 2000).

2. Lektine

2.1. Klassifikation der Lektine

Um die eben beschriebenen Kohlenhydratreste der Zellmembran zu charakterisieren, bedient man sich unter anderem der Lektine. Lektine sind Proteine oder Glykoproteine die sich spezifisch an Kohlenhydratreste binden können. Wenn sie an Kohlenhydratreste der Zelloberfläche binden, können sie wichtige extrazelluläre Adhäsions-, Agglutinations- und Kommunikationsprozesse vermitteln (Köttgen *et al.*, 2003). Lektine sind phylogenetisch äußerst alte Proteine nicht-immunologischen Ursprungs (Sharon & Lis, 1972) und haben weder eine verwandtschaftliche Beziehung zu Antikörpern, noch weisen sie eine enzymatische Aktivität auf. Lektine besitzen mindestens zwei Zuckerbindungsstellen, sonst wäre ihr Agglutinations-/Präzipitationsvermögen nicht erklärbar (Kocourek & Horejsi, 1981). In der Tat bestehen die meisten von ihnen aus zwei, vier oder sogar mehr, meist gleichartigen Untereinheiten. Sie binden mit hoher Affinität an Zucker, Oligosaccharide sowie an die in Glykoproteinen, Polysacchariden oder Glykolipiden kovalent gebundenen Oligosaccharidreste. Die Kohlenhydratgruppen, mit denen die Lektine reagieren, werden oft als Lektinrezeptoren bezeichnet (Uhlenbruck *et al.*, 1983).

Da Lektine ursprünglich nur aus Pflanzenextrakten isoliert wurden und zur Agglutination von roten Blutzellen (Erythrozyten) eingesetzt wurden, sprach man zunächst von Phytohaemagglutininen. Später stellte sich heraus, dass sie in der Natur ubiquitär anzutreffen sind, so zum Beispiel bei Viren, Bakterien, Schwämme, Algen, Invertebraten und Vertebraten. Dabei binden keineswegs alle Lektine an Erythrozyten. Boyd und Shapleigh führten daher 1954 den Begriff Lektin (lat. legere = auswählen) ein (Boyd & Shapleigh, 1954). 1974 beschrieben Stockert *et al.* erstmals ein Lektin welches aus der menschlichen Leber gewonnen wurde und eine Bindungsspezifität gegenüber Galaktose zeigte (Stockert *et al.*, 1974).

Lektine werden üblicherweise nach ihrer Herkunft benannt, entweder nach ihrem altbekannten trivialen Namen wie z. B. bei der Erdnuss, Erdnuss-Agglutinin (Peanut-Agglutinin=PNA) oder nach ihrer lateinischen Bezeichnung, dann in diesem Fall *Arachis hypogaea*-Agglutinin. Es empfiehlt sich, sie zusätzlich auch nach ihrer

Zuckerspezifität zu klassifizieren. Ihre Spezifität wird durch jenes Mono- oder Oligosaccharid definiert, welches das Agglutinationsvermögen kompetitiv inhibiert. Die große klinische Bedeutung der Lektin-Glykokonjugat-Wechselwirkungen kann an der Beteiligung folgender Prozesse verdeutlicht werden. Sie sind beteiligt an Entzündungen, Immundefekten, Autoimmunitätsprozessen, Infektionskrankheiten, Tumordinvasion und Tumormetastasierung. Durch die Erkenntnis der Lektinbeteiligung an diesen Vorgängen ergeben sich Möglichkeiten nicht nur für die Diagnostik, sondern auch für erste therapeutische Ansätze und Behandlungen (Adam *et al.*, 1997), (von Bismarck *et al.*, 2001) und (Hauber *et al.*, 2008).

2.2. Bakterielle Lektine (Adhäsine)

Den Bakterien dienen die Lektine in Form von Oberflächenproteinen zur Adhäsion an Epitheloberflächen und werden daher häufig als Adhäsine oder Agglutinine bezeichnet (Ofek & Sharon, 1990). Als spezifische Anlagerungs-Faktoren (Erkennungsmoleküle) treten die meisten bakteriellen Adhäsine in spezifische Wechselwirkung mit Glyko-Rezeptoren der Wirtszelle auf, so können sie z. B. an die kohlenhydratreichen Oberflächen der Urothelien oder des Bronchialtraktes binden (Uhlenbruck *et al.*, 1983). Andere Adhäsine interagieren allerdings auch mit bestimmten Proteinen der extrazellulären Matrix und wiederum andere binden an Rezeptoren von Mikroorganismen. Bei den Rezeptoren werden prinzipiell die Zuckerstrukturen erkennenden Lektine von den Proteindomänen erkennenden Adhäsinen abgegrenzt. In der vorliegenden Arbeit sind vor allem die erstgenannten Lektine von besonderer Bedeutung. Es handelt sich immer um eine Protein-Kohlenhydrat-Interaktion, dabei sind die Wirtszellenrezeptoren Zuckergruppen von Glykoproteinen und Glykolipiden (Ganglioside) der Plasmamembran (Bradley, 2003). Die Grundlage für die Interaktion bzw. Bindung zwischen Lektinen und Zuckern sind kooperative Wasserstoffbrückenbindung (H-Brücken).

Als einer der ersten Stufen eines Infektionsprozesses und zumeist als Voraussetzung für eine Infektion gilt die Adhäsion des Erregers an seine Wirtszelle, die von der Kolonisation und der Dissemination der Keime gefolgt sein kann (Beachey, 1981). Bei den Bakterien gibt es verschiedene Anlagerungsmechanismen, auch „Attachment“-Varianten genannt. Es gibt die

spezifischen und unspezifischen Anlagerungen. Zur spezifischen Anlagerungsform zählen die Adhäsion an Zelloberflächen-Kohlenhydrat-Gruppen, Agglutination von suspendierten Zellen und die Fixation an die Plasmamembran von Wirtszellen, wobei bei den beiden erstgenannten die Vermittlung über Lektine erfolgt. Zu den unspezifischen Anlagerungsformen zählen die Adhärenz und die Aggregation (Burkart, 2000). Zusätzlich zur Fähigkeit der Adhäsion besitzen die bakteriellen Lektine auch noch eine weitere bedeutsame Fähigkeit. Sie ermöglichen die intrazelluläre Aufnahme metabolisierbaren Mono- und Oligosachariden, die als Energieträger fungieren (Uhlenbruck *et al.*, 1983). Aufgrund der sich ergebenden Induktion von Infektionen gewinnen Lektine immer mehr als Pathogenitätsmarker an Bedeutung. Die Spezifität der unterschiedlichen Bakterien zu Glykanstrukturen kann erheblich voneinander abweichen. Sogar Subspezies besitzen im internen Vergleich starke Differenzen in Bezug auf ihre Rezeptorspezifität. Dies ist unter anderem durch die hohe Variabilität der Glykanstrukturen zu erklären.

3. *Pseudomonas aeruginosa*

3.1. Die Bedeutung von *P. aeruginosa* als Krankheitserreger

Pseudomonaden verursachen mannigfaltige, häufig tödlich verlaufende Erkrankungen im geschwächten Organismus und haben die höchste Mortalität durch gramnegative Keime verursachten Bakteriämien (Young, 1990). *P. aeruginosa* ist ein bedeutsamer Hospitalismus-Erreger mit hoher Umweltpersistenz, dessen Infektionen im Allgemeinen nur bei kompromittierten Patienten zu ernsthaften Komplikationen führen. Zu dieser Gruppe zählen Patienten, die auf Intensivstationen über längere Zeit künstlich beatmet werden, Verbrennungspatienten, Diabetiker, Patienten mit primärer oder erworbener Immundefizienz (z. B. Aids-erkrankte Patienten) und vor allem Patienten, die an Cystischer Fibrose (CF) leiden (Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994). Etwa 75-90% aller CF-Patienten weisen eine chronische Besiedelung meist im unteren Atemtrakt auf (Pier, 2000). Die CF, auch Mukoviszidose genannt, ist eine Erkrankung, die durch eine Mutation im *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Gen* (CFTR-Gen) auf dem Chromosom 7 verursacht wird. Die Folge ist eine Fehlfunktion der

Chloridkanäle, die dadurch die Zusammensetzung aller exokrinen Drüsen beeinflusst. Es kommt durch die Störung der epithelialen Chloridsekretion zur Bildung eines wasserarmen, abnorm zähflüssigen Sekrets, mit einhergehender Funktionsstörung der betroffenen Organe (Koch & Hoiby, 2000). Durch die Viskositätserhöhung kommt es zu einer verminderten mukoziliären Clearance des Atemapparates, die bereits im Jugendalter zu einer chronischen Besiedlung der Lungen durch Pseudomonaden führt, welche die häufigste Morbidität- und Mortalitätsursache bei diesen Patienten darstellen (Emerson *et al.*, 2002). Vor allem die hohe intrinsische Antibiotikaresistenz sowie die Ausbildung von Biofilmen auf den Oberflächengewebe des Wirtes erschwert die Therapie und Eradikation des Problemkeimes (Conway *et al.*, 2003).

Bei den von CF-Patienten gewonnenen Isolaten handelt es sich meist um *P. aeruginosa*-Stämmen vom schleimigen (mucoiden) Typ (Lyczak *et al.*, 2002). Dieser bezieht sich auf einen von sechs verschiedenen Kolonietypen: klassisch, koliformen-ähnlichen, rauh, runzelig, winzig und mucoiden Typ (Phillips, 1969).

Während eines stationären Aufenthaltes gibt es zusätzlich zu einer prädisponierenden Grunderkrankung, Faktoren und operative Eingriffe (vor allem nach urologischen Operationen), die eine Infektion mit *P. aeruginosa* erleichtern können. Dazu zählen Kanülen, Blasenkatheter, Implantate und Tuben jeglicher Art. Weitere typische Infektionen mit *P. aeruginosa* sind chronische Harnwegsinfektionen und Pyelonephritiden, postoperative Wundinfekte, bakterielle Meningitiden, schwere Enterokolitiden sowie Septikämien (Bodey *et al.*, 1983). *P. aeruginosa* ist in Europa und Nordamerika für 16 % der nosokomialen Pneumonien durch künstliche Beatmung (Wiblin, 1997; Hidron *et al.*, 2008) und somit der zweithäufigste isolierter Erreger. *P. aeruginosa* ist für 12 % der nosokomialen Harnwegsinfektionen durch chirurgische Eingriffe am Urogenitaltrakt oder durch Dauerkatheter (Pollack, 1995), für 8 % der Wundinfektionen nach chirurgischen Eingriffen (Kluytmans *et al.*, 1997) und für 10 % der Sepsisanfälle (Gordon *et al.*, 1998) verantwortlich. Außerhalb des Krankenhauses finden sich vor allem Infektionen bei länger bestehenden Hautdefekten, wie z. B. beim Ulcus cruris und der akuten Otitis externa, die auch bekannt ist als „Badeotitis“ oder „swimmer’s ear“ und häufig während eines Badeurlaub erworben wird (Meyer, 2005).

Bisher wurden hauptsächlich genauere Untersuchungen bezüglich der Bindung von PA-IL und PA-IIL an den Zilien des Atemapparates untersucht. Es zeigte sich, dass durch die Bindung von PA-IL und PA-IIL der Zilienschlag beeinträchtigt wird und somit zu einer Verminderung der mukoziliären Clearance führt (Adam *et al.*, 1997), (Mewe *et al.*, 2005), (Gustke *et al.*, 2012). Diese bildet eine wichtige Grundlage des natürlichen Selbstreinigungsapparates der Atemwege als eine erste Stufe der unspezifischen Bakterienabwehr. Erste Erfolge einer lektinbasierten Therapie der *P. aeruginosa*-Atemwegsinfektion konnte bereits an einem Patienten verzeichnet werden. Ein junger immunsupprimierter Patient nach Chemotherapie und maschineller Langzeitbeatmung, der an einer persistierenden antibiotika-resistenten Pseudomonasinfektion der oberen Atemwege litt, konnte mit einer Galaktose- und Fukose-enhaltender Inhalationslösung von der Infektion geheilt werden (von Bismarck *et al.*, 2001). Ebenso erfolgreich waren Behandlungen von externen Otitiden, die im Vergleich zur lokalen Therapie mit Antibiotika untersucht wurden (Steuer *et al.*, 1993).

Neben der klinischen Bedeutsamkeit mit z. T. hohem pathogenem Potential, stellt *Pseudomonas aeruginosa* durch die Fähigkeit zur Biofilmbildung auf einer Vielzahl verschiedener Oberflächen, auch ein nicht zu verachtendes industrielles Problem dar (Costerton, 1995). Da Infektionen, die durch diesen Keim verursacht werden, außerordentlich schwer antibiotisch zu therapieren sind, die zusätzlich durch die Problematik der Antibiotikaresistenz erschwert wird, ist es dringend erforderlich neue therapeutische Wege um Alternativen zur antibiotischen Therapie zu finden. Eine aussichtsreiche Möglichkeit wäre die Entwicklung einer lektin-vermittelnden Anti-adhäsiven Therapie.

3. 2. Mikrobiologische Eigenschaften von *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist die am längsten bekannte und für den Menschen wichtigste *Pseudomonas*-Spezies. Sie wurde von Gessard 1882 erstmals in Reinkultur gezüchtet, er nannte sie *Bacterium pyocyaneum* („Bakterium des blaugrünen Eiters“). Es handelt sich um ein nicht fermentatives, opportunistisches gramnegatives Stäbchenbakterium, mit einem fakultativ aeroben Stoffwechsel, welches aber auch unter anaeroben Bedingungen Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen vermag (Schlegel, 1992). Aufgrund der Pigmentbildung fluoreszieren die Kolonien vieler Stämme unter UV-Licht. Charakteristisch ist die Bildung der Pigmente Pyoverdin, Pyocanin und Pyorubin und der süßlich-aromatischer, lindenblütenartige Geruch, der durch die Bildung von *o*-Aminoacetophenon bedingt ist (Bradley, 2003). Das Wachstumsoptimum liegt bei 37°C. Durch den Besitz von jeweils einer polaren Begeißelung, Fimbrien und Pili, haben die gramnegativen Stäbchenbakterien die Fähigkeit zur Motilität und die Fähigkeit zur Adhäsion an Oberflächen (O`Toole *et al.*, 1998) (siehe Abb. 2). Durch Ausbildung einer Polysaccharidkapsel können sich die *Pseudomonaden* zusätzlich vor äußeren Einflüssen schützen.

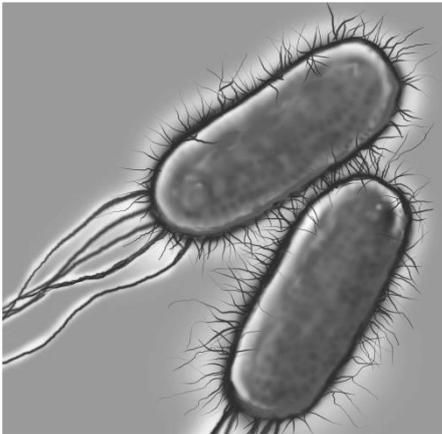


Abbildung 2: *Pseudomonas aeruginosa* mit Darstellung der Geißel und der Pili, die andeutungsweise umhüllt werden vom Biofilm und Alginaten.

Referenz:URL:<https://www.roche.de/diagnostics/krankheiten-erkennen/infektiologie-virologie/sepsis/index.html?q=pseudomonas&sid=bd0fc89de5922451b5237a18b9b79d89>. [Stand:05.03.2018, 11.51].

3.3. Pathomechanismus von *P. aeruginosa*

Wie viele andere Mikroorganismen auch, produzieren *Pseudomonas aeruginosa* Genprodukte, wie z. B. die Lektine PA-I und PA-II, die dem Bakterium eine Adhäsion an den Zelloberflächen sowie eine Schädigung dieser ermöglichen (Plotkowski *et al.*, 1994). Der initiiierende Schritt für eine Kolonisation dieser Keime ist bei Epithelien des Respirationstraktes oder des Gastrointestinal Traktes mittels der Lektine bekannt (Beachey, 1981), (Prince, 1992).

Pseudomonas aeruginosa synthetisiert neben einigen Oberflächen-gebundenen Adhäsine zwei Lektine, das PA-IL (Gilboa-Garber, 1972) und das PA-IIL (Gilboa-Garber *et al.*, 1977), deren kodierende Gene auch als *LecA* und *LecB* bezeichnet werden. Daher leitet sich die Bezeichnung LecA-Protein für das PA-IL und LecB-Protein für das PA-IIL ab (Winzer *et al.*, 2000). Die kodierenden Gene für PA-IL und PA-IIL liegen im Genom relativ weit auseinander (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Die *Pseudomonas* Lektine weisen viele Ähnlichkeiten mit pflanzlichen Lektinen auf, wie zum Beispiel die relativ hohe Resistenz gegenüber Proteolysen, Säuren und hohen Temperaturen (Imberty *et al.*, 2004). Da PA-IL und PA-IIL die Fähigkeit zur Agglutination von Erythrozyten verschiedener Säugetiere besitzen, werden sie auch als Breitspektrumagglutinine bezeichnet (Gilboa-Garber, 1972).

Das PA-IL ist ein tetrameres Protein, welches aus vier gleichen 12,6 kDa großen Untereinheiten mit je einer Zuckerbindungsstelle besteht, von denen jede jeweils ein Calcium-Ion enthält, welches für die Zuckerbindung notwendig ist (Cioci *et al.*, 2003). Die Zuckerspezifität für PA-IL besteht für Melbiose > Methyl- α -D-Galaktose > D-Galaktose > Methyl- β -D-Galaktose > N-Acetylgalaktosamin (Chen *et al.*, 1998). Das PA-I Lektin besteht aus 121 Aminosäuren und wird von den 366 bp großen *lecA*-Gen kodiert (Avichezer *et al.*, 1994).

Das PA-IIL ist ein Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 11,73 kDa pro Untereinheit. Die 114 Aminosäuren von PA-IIL werden von den 345 bp großen *lecB*-Gen kodiert (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Das PA-IIL weist eine Zuckerspezifität auf für *p*-Nitrophenyl- α -L-Fukose > L-Fukose > Fukosamyl = L-Galaktose > D-Mannose > D-Fruktose (Garber *et al.*, 1987). Im Vergleich zu anderen Lektinen weist das PA-IIL eine enorm hohe Affinität zu L-Fukose auf (Bindungskonstante von $K_A = 1,5 \times 10^6$ M) (Gilboa-Garber *et al.*, 2000.)

PA-IL und PA-IIL wurden fast ausschließlich im Cytoplasma detektiert (Glick &

Garber, 1983). Lediglich geringe Mengen der beiden Lektine wurden in der inneren und äußeren Membran sowie im Periplasma nachgewiesen. Dabei hängt die Höhe des extracytoplasmatischen Anteils der Lektine von den jeweiligen Kulturbedingungen ab (Morimoto *et al.*, 2001), (Tielker *et al.*, 2005).

Das LecA-Protein hat *in vitro* vor allem zytotoxische Effekte auf die Zellen des Respirationstraktes, indem es die Wachstumsrate der Epithelzellen sowie die Anzahl der aktiven Zellen des Flimmerepithels vermindert (Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl PA-IL als auch PA-IIL den Zilienschlag *in vitro* gemessen an nasalem Flimmerepithel deutlich reduziert und somit die *mukoziliäre Clearance* herabsetzt. Dabei zeigte PA-IL einen schwächeren Abfall der Zilienschlagfrequenz als PA-IIL (Mewe *et al.*, 2005), (Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994), (Adam *et al.*, 1997).

Die Affinität der beiden Lektine für einfache Zucker konnte sich zu nutzen gemacht werden, indem Anti-Adhäsions-Behandlungen mit den PA-IL und PA-IIL-spezifischen Zuckern bei Infektionen des Atemtraktes erfolgreich angewendet worden konnten (Steuer *et al.*, 1993), (von Bismarck *et al.*, 2001).

Für die Regulationsmechanismen der Genexpression für *lecA* und *lecB* konnten bislang zwei *Quorum Sensing*-Systeme identifiziert werden, das LasR/LasI-System und das RhIR/RhII-System. Die Expression der Gene *lecA* und *lecB* sind zelldichteabhängig und wird durch diese beiden Systeme und den Stationärphasen-Sigma-Faktors RpoS reguliert (Winzer *et al.*, 2000). Damit ist die Synthese der beiden Lektine mit der von weiteren Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* gekoppelt (Whiteley *et al.*, 1999).

P. aeruginosa sezerniert zahlreiche extrazelluläre Enzyme über fünf verschiedene Sekretionswege (Typ I-V und zusätzlich über Membranvesikel), von denen viele als Virulenzfaktoren anzusehen sind und für die außerordentliche Pathogenität verantwortlich sind (Ma *et al.*, 2003). Die Pathogenität von *P. aeruginosa* wird maßgeblich durch die Produktion von zahlreichen zellgebundenen und extrazellulären Virulenzfaktoren bestimmt. Zu diesen rechnet man eine Vielzahl von extrazellulären Enzymen, Pigmente, Glykolipide und das extrazelluläre Polysaccharid Alginate von mucoiden *P. aeruginosa*-Stämmen (Rehm & Valla, 1997), (van Delden, 2004). Eine Übersicht der Virulenzfaktoren ist in Tabelle 1 dargestellt.

Weitere wichtige Komponenten, die zur Virulenzsteigerung von *P. aeruginosa*

führen, sind die Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen, genetische Hypermutableität und phänotypische Anpassungsvorgänge wie z. B. die Produktion von Alginaten (Parsek & Singh, 2003).

Tabelle 1: Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* modifiziert nach Salyers & Whitt 1994, Heck *et al.*, 1986, Winzer *et al.*, 2000 (*) nicht erwiesen; EF-2= Elongationsfaktor 2.

| Virulenzfaktor | Wirkung | Regulations-Mechanismen |
|--------------------------------|--|----------------------------------|
| PA-I Lektin | Adhäsion der Bakterien an das Wirtsgewebe; zytotoxische Effekte gegenüber Epithelzellen des Respirationstraktes | <i>Quorum Sensing</i> |
| PA-II Lektin | Adhäsion der Bakterien an das Wirtsgewebe; zytotoxische Effekte gegenüber Epithelzellen des Respirationstraktes | <i>Quorum Sensing</i> |
| Alginat-Synthese | Adhärenz, Phagozytose-Abwehr, erhöhte Antibiotikaresistenz; Aktivitätssteigerung der Neutrophilen-Elastase | Osmolarität, Stickstoff |
| Adhäsine | Vermitteln die initiale Kolonisierung z. B. von Atemwege und von Wunden | Stickstoffspiegel |
| Neuraminidase | verstärkt die Adhärenz der Pili; ist beteiligt an der Biofilmsynthese | Osmolarität |
| Exoenzym S | vermittelt durch die ADP-Ribosylierung der G-Proteine, Beeinträchtigung der Phagozytoseaktivität, Apoptosewirksam | Temperatur, Sauerstoffangebot(*) |
| Exotoxin A | Hemmung der Proteinbiosynthese durch ADP-Ribosylierung des EF-2; Folge: lokale Gewebsläsion, Herabsetzung der Phagozytose-Aktivität, Zelltodauslösend; in vitro: immunsupprimierender Effekt | Eisen |
| Proteasen: | | |
| • Elastase | Spaltet hydrolytisch Elastin und Kollagen, schädigt dadurch das Lungengewebe sowie Blutgefäße | Bakterienkonzentration(*) |
| • Alkalische Protease | Gewebsinvasion, systemische Infektion | unbekannt |
| • weitere Proteasen | Schädigung der Lungenstruktur und Gewebe im allgemeinen | unbekannt |
| Lipopolysaccharide | verursacht septischen Schock | unbekannt |
| Antibiotikaresistenz | beeinflusst den Therapieerfolg | nicht reguliert |
| Pyocyanin (blaugrünes Pigment) | <i>In vitro</i> : Zelluntergang durch oxidativem Stress bedingt durch die Bildung von Superoxid und Wasserstoffperoxid | unbekannt |

3.4. Biofilmbildung bei *P. aeruginosa*

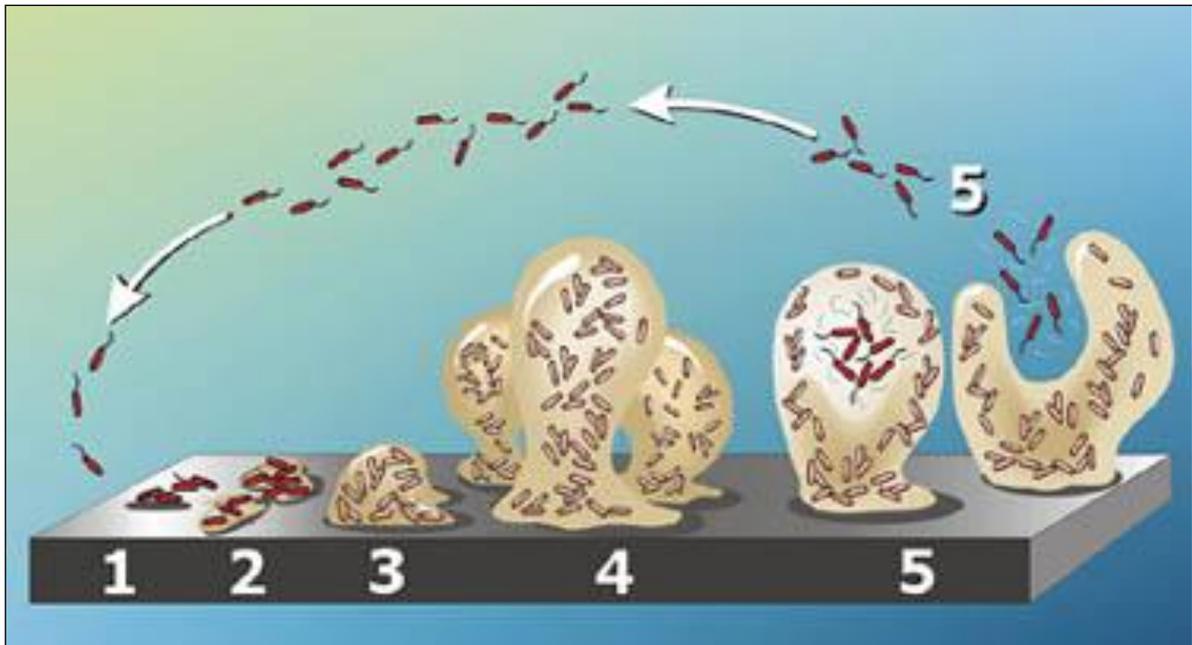


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* in fünf Phasen.

- 1) Initiale, reversible Anheftung von planktonischen Zellen an einer Oberfläche
- 2) Irreversible Anheftung der Zellen, Wachstum zu Mikrokolonien zunächst nur in einer Schicht.
- 1) + 2) Werden als Induktionsphase bezeichnet.
- 3) Übergang zu Makrokolonien in mehreren Zellschichten, Aktivierung des *Quorum Sensing*, Expression von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) mit beginnender Ausbildung der Biofilmarchitektur, logarithmische Wachstumsphase.
- 4) Erlangung des reifen Biofilms, Zwischenräume erlauben Stoffzirkulation und beschreibt die Plateauphase
- 5) Loslösung einzelner Zellen aus dem Biofilm mit erneuter Anheftung während der Ablösungsphase (Stoodley *et al.*, 2002), (Flemming & Wingender 2001).

Als Biofilm werden Aggregate von Mikroorganismen bezeichnet, die an einer festen Oberfläche bzw. Grenzflächen angeheftet sind und in einer Matrix von selbst produzierten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind (siehe Abb. 2). Das gleichzeitige Auftreten von Wasser, verwertbaren Nährstoffen und den Mikroorganismen ist ausreichend, um Biofilme entstehen zu lassen. Dieses funktionell wichtige Zusammenspiel macht deutlich, dass der Biofilm die eigentliche Lebensweise von Bakterien in der Natur darstellt (Flemming & Wingender, 2001).

Die extrazellulären polymeren Substanzen stellen die Schlüsselmoleküle für die Biofilmbildung dar. Sie sind von besonderer Bedeutung für Struktur, Funktion und Zusammensetzung von Biofilmen (Flemming & Wingender, 2001). Die EPS können

an der Adhäsion von Mikroorganismen an Oberflächen beteiligt sein, sie sind für die Kohäsion der Biofilmorganismen besonders für die Entwicklung, Differenzierung und die dreidimensionale Struktur von Biofilmen wichtig (Wingender & Flemming, 1999), (Wolfaardt *et al.*, 1999). Die EPS bestehen hauptsächlich aus Polysacchariden, Proteinen, (Phospho)lipiden, Nukleinsäuren, Glycoproteinen und Glycolipiden. Sie können aktiv von den Zellen ausgeschieden werden oder passiv durch Zellyse freigesetzt werden (Wingender & Flemming, 1999). Die Zusammensetzung der EPS wird vor allem von der Populationszusammensetzung des Biofilms determiniert. Andererseits ist sie abhängig von den Umweltbedingungen, dem Nährstoffangebot und dem Biofilmalter (Ombaka *et al.*, 1983), (Sutherland, 2001).

Biofilme entstehen an Grenzflächen von Wasser und festen Medien sowie an der Grenze von Feststoffen und Luft. Die Mehrheit aller in der Natur, der medizinischen Umgebung und der Industrie vorkommenden Bakterien existiert in Form von Biofilmen (Parsek & Singh, 2003). Sie sind allgegenwärtig und ihr Vorkommen kann sowohl negative als auch positive Auswirkungen haben. So sind Biofilme nicht selten die Ursache für persistierende Infektionen. Bei den Infektionen wird vermutet, dass sie bis zu 65 % als Biofilmphänomene auftreten (Costerton *et al.*, 1999). Besonders gefährdet sind Patienten mit zystischer Fibrose, hospitalisierte Patienten, Patienten mit einer primären oder erworbenen Immunschwäche, Verbrennungspatienten und Kontaktlinsenträger.

Andererseits sorgen Biofilme für ein harmonisches Gleichgewicht zwischen Bakterien und Dermis sowie zwischen Bakterien im Darm und Darmepithel. Der Hauptbestandteil eines Biofilmes besteht aus bis zu 98 % Wasser, welches zusammen mit den extrazellulären polymeren Substanzen eine schleimige Matrix bildet. Die Mikrokolonien der Mikroorganismen leben im Biofilm in kleinen Enklaven. Wassergefüllte Kanäle, die den Nährstoff- und Sauerstofftransport und den Abtransport von Stoffwechselprodukten gewährleisten, sind zur Aufrechterhaltung des Biofilmes von existentieller Bedeutung, siehe Punkt 4 in Abb. 2 (Costerton *et al.*, 1999). Die Fähigkeit zur Biofilmbildung bietet den Mikroorganismen eine Reihe von Vorteilen. So genießen sie einen erhöhten Schutz vor Austrocknung und Schutz vor Bioziden, wie z. B. Desinfektionsmitteln, Chlor oder Antibiotika (Grobe *et al.*, 2001). Das Greifen einer herkömmlichen Antibiotikatherapie ist bei einer Infektion

mit biofilmbildenden Bakterien erschwert, da sie im sessilem Verband im Vergleich zu planktonischen Zellen widerstandsfähiger sind. Für einige Mikroorganismen konnte eine um den Faktor 10-1000x Fach höhere Antibiotikaresistenzrate in Biofilmen ermittelt werden (Mah *et al.*, 2003). Hinzu kommt, dass Bakterien sich innerhalb eines Biofilmes auch der Immunantwort des Wirtes leichter entziehen können als ohne Biofilm (Meluleni *et al.*, 1995). Opsonierende Antikörper und Phagozyten finden weniger Angriffsfläche und können dadurch eine chronische Entzündung auslösen, die den Krankheitsverlauf verlängern bzw. zu weiteren Komplikationen führen können (Hoiby *et al.*, 2001).

3.5. Alginate von *P. aeruginosa*

Alginat sind Polysaccharide, die in der Natur weit verbreitet sind. Sie dienen als Energielieferant (Glykane, Stärke) und bilden stabilisierende Gerüste von Pflanzen und Tieren (Glykogen, Stärke). In Biofilmen sind Alginat wiederum wichtige Bestandteile der EPS und sind somit bei der Bildung von Biofilmen essentiell beteiligt und gewährleisten deren mechanische Stabilität (Wingender *et al.*, 1999). Zwischen mucoiden und nicht-mucoiden *P. aeruginosa*-Stämmen gibt es bezüglich der Produktion der extrazellulären polymeren Substanzen bedeutende Unterschiede. Mucoiden Stämme zeichnen sich durch eine Überexpression des extrazellulären Polysaccharids Alginat aus und sind somit Hauptbestandteil der EPS.

Bei Alginaten handelt es sich um Polysaccharide mit einem relativ hohen Molekulargewicht (ca. 2×10^4 bis 7×10^6). Sie bestehen bei den mucoiden Stämmen vom *P. aeruginosa* hauptsächlich aus dem Uronsäurecopolymer aus β -D-Mannuronsäure und seinem C-5-Epimer α -L-Guluronsäure, welche 1,4-glykosidisch miteinander verbunden sind (Evans & Linker, 1973).

Bei nicht-mucoiden Stämmen sind dagegen Glucose, Mannose und Rhamnose die primären Zuckerbestandteile der EPS (Wozniak *et al.*, 2003), (Matsukawa & Greenberg, 2004). Charakteristisch für die Bakterienalginat ist eine partielle O-

Acetylierung am C2 und/oder am C3-Atom der β -D-Mannuronsäure. Die Anzahl der O-Acetylierung des Alginates kann bei *P. aeruginosa* abhängig sein vom jeweiligen Bakterienstamm, dem Nährmedium und der Wachstumsphase sein (Marty *et al.*, 1992), (Evans & Linker, 1973). Die Acetylgruppen spielen eine große Rolle bei der Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Desinfektionsmittel (Grobe *et al.*, 2001). Neuere Studien zeigen, dass acetylierungsdefekte Mutanten eine herabgesetzte Anheftungs- und Biofilmbildungsfähigkeit besitzen (Nivens *et al.*, 2001), (Tielen *et al.*, 2005).

Mucoide *P. aeruginosa*-Stämme, wie zum Beispiel der FRD1-Stamm (Ohman & Chakrabarty, 1981), kommen hauptsächlich als Keimbesiedlung in Lungen von CF-Patienten vor und werden in geringerer Häufigkeit bei Patienten mit anderen chronischen Lungenerkrankungen (z. B. Bronchiektasien), chronischen Harnwegsinfektionen und chronischen Mittelohrenzündungen nachgewiesen (McAvoy *et al.*, 1989). Außerhalb der Besiedlung von Lungen bei CF-Patienten machen die klinischen Isolate von anderen Infektionen nur 1 % vom mucoiden Typ aus (Doggett *et al.*, 1971). Bei CF-Patienten ist eine Konversion eines initial nicht-mucoiden-Stammes in einen mucoiden-Stamm nicht selten und mit einer zunehmenden Resistenz gegenüber der Antibiotika (vor allem gegenüber Tobramycin) vergesellschaftet und somit oft mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Hentzer *et al.*, 2001), (Costerton *et al.*, 1999). Alginat hat neben den *Pseudomonas*-Lektine auch eine wichtige Adhäsionsfunktion an Oberflächen. Gacesa zeigte, dass mucoide Stämme im Vergleich zu nicht-mucoiden Stämmen sich 10 bis 1000-mal besser an Lungenepithelien anheften können (Gacesa, 1998).

3.6. *Quorum Sensing* in *P. aeruginosa*

Die Fähigkeit von verschiedenen Bakterienarten untereinander zu kommunizieren und sich somit nicht nur individuell sondern auch als Gemeinschaft auf wechselnde äußere Veränderung zu reagieren, nennt man *Quorum Sensing* (QS) (Fuqua *et al.*, 2001). Als *Quorum* wird per Definition die kleinste Populationseinheit bezeichnet, die zu einer koordinierten Aktion befähigt ist. Es existiert ein Schwellenwert an Zelldichte, bei dessen Erreichen erst die QS-Regulation einsetzt (Swift *et al.*, 1996). QS wird von Bakterien benutzt, um ineffiziente Prozesse zu koordinieren, wenn sie nur von einzelnen Zellen durchgeführt würden. Beispiele für solche Aktionen sind die Entwicklung von Biolumineszenz, Synthese von Virulenzfaktoren oder die Biofilmbildung. *Quorum Sensing* ermöglicht den Zellen innerhalb einer Suspension durch Autoinduktion über Expression bestimmter Gene und niedermolekulare Signalmoleküle, wie zum Beispiel den Homoserinlactonen, die Zelldichte der Population zu messen und zu regulieren (Parsek & Greenberg, 2000), (Flemming & Wingender, 2002). Als Signalmoleküle (sog. *autoinducer*) dienen zum Beispiel bei *P. aeruginosa* eine Gruppe verschiedener N-Acyl-L-Homoserinlactone (AHL), die von ihnen selbst produziert werden und mittels Diffusion in die Umgebung freigesetzt werden. Ab einen bestimmten Schwellenwert fungieren sie als Effektormoleküle in genregulierenden Systemen, die in Abhängigkeit von der Zelldichte wirken, welches als *Quorum Sensing* bezeichnet wird (Whitehead *et al.*, 2001).

Durch den amphiphilen Charakter können die Signalmoleküle durch die Membran diffundieren sowie über aktiven Transport exportiert werden und kommen somit in der Regel intra- als auch extrazellulär in gleicher Konzentration vor (Pearson *et al.*, 1999).

Bei *P. aeruginosa* sind zwei *Quorum Sensing*-Regulationssysteme des LuxR/I-Typs bekannt, das LasRI- und das RhIRI-System (Winzer *et al.*, 2000), (Pesci *et al.*, 1999). Bei *P. aeruginosa* werden unmittelbar nach der Anheftung auf Oberflächen bestimmte Gene aktiviert, die zur Bildung der EPS erforderlich sind. Diesem Prozess geht die Synthese und Abgabe von Acyl-Homoserinlactonen voraus, welches wiederum das *Quorum-Sensing* aktiviert und somit die Biofilmbildung ermöglicht (Costerton & Stewart, 2001).

Die Expression zahlreicher Virulenzfaktoren wie zum Beispiel der Lektinproduktion von PA-I und PA-II bei *Pseudomonas aeruginosa* und einen Großteil der Entwicklungs-Regulation zum reifen Biofilm sind QS-abhängig (Toder et al., 1994), (Passador et al., 1993), (Winzer et al., 2000). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass QS das Verhalten und die Koordination von *P. aeruginosa* auf engem Raum optimiert.

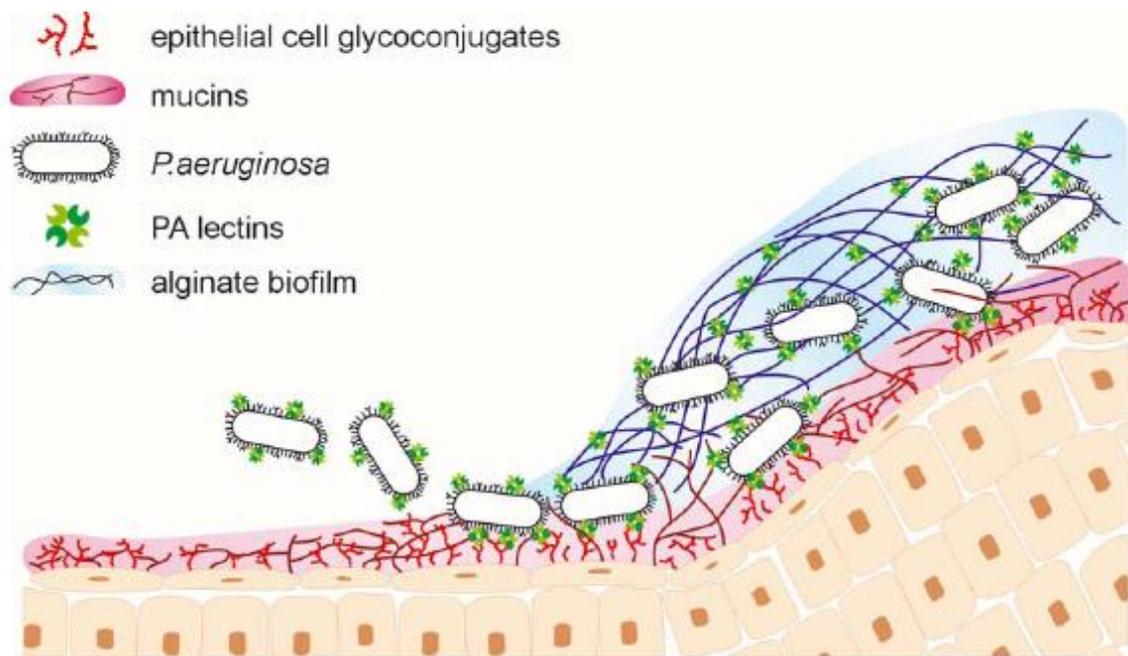


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Interaktion der Pseudomonaslektine an der Anheftung an Wirtsoberflächen und der Biofilmbildung (Imberty et al., 2004).

4. Zilien

4.1. Zilienstruktur und Vorkommen

Zilien sind feine bewegliche Zellfortsätze mit einer Länge von 7 -10 μm und einem Durchmesser von 0,1 – 0,3 μm . Sie treten einzeln als Monozilie oder in büschel- und rasenförmigen Verbänden als Ziliensaum auf. Das innere Faserbündel einer Zilie, das Axonem, wird aus Mikrotubuli gebildet, welche die typische $9 \times 2 + 2$ Struktur aufweisen (siehe Abb. 5). Zentral gelegen befinden sich zwei voneinander getrennte Zentraltubuli, welche von neun peripheren Mikrotubuluspaaren umgeben sind, die aus einem A-Tubulus mit daran angelagerten B-Tubulus bestehen. An jedem A-Tubulus befinden sich ein äußerer und ein innerer Dyneinarm, die zum B-Tubulus des benachbarten Mikrotubuluspaares zeigen. Die äußeren Mikrotubuluspaare sind durch eine Nexin-Brücke untereinander und durch radiale Speichen mit den zwei zentralen Tubuli verbunden. Der Bewegungsmechanismus erfolgt unter ATP-Verbrauch und ist auf die Verschiebung der äußeren Mikrotubuluspaare gegeneinander zurückzuführen (Pan *et al.*, 2005).

Man unterscheidet motile Zilien von den immotilen Zilien. Die motilen Zilien, auch Kinozilien genannt, weisen eine klassische $9 \times 2 + 2$ Struktur auf, die sich aktiv unter Energieverbrauch bewegen. Dazu zählen z. B. die Zilien des Respirationstraktes, welche die mukoziliäre Clearance ermöglichen, die Zilien des Ventrikelsystems, welche den ependymalen Fluss gewährleisten sowie die Zilien der Spermien, welche die Grundlage ihrer Mobilität darstellen (Satir & Christensen, 2007), (Satir & Christensen, 2008). Zilien ohne zentrale Mikrotubuli mit dem Bauplan $9 \times 2 + 0$ sind in der Regel nicht beweglich und werden als nichtmotile Zilien oder auch als primäre Zilien bezeichnet.

Fast alle Zellen der Vertebraten besitzen eine einzelne nichtmotile Zilie, welche sich oft zu spezialisierte Strukturen weiterentwickelt hat, wie zum Beispiel das Außensegment von Photorezeptoren im Auge oder auch das Ende der olfaktorischen Nervenzellen mit den Geruchsrezeptoren (Davenport *et al.* 2005).

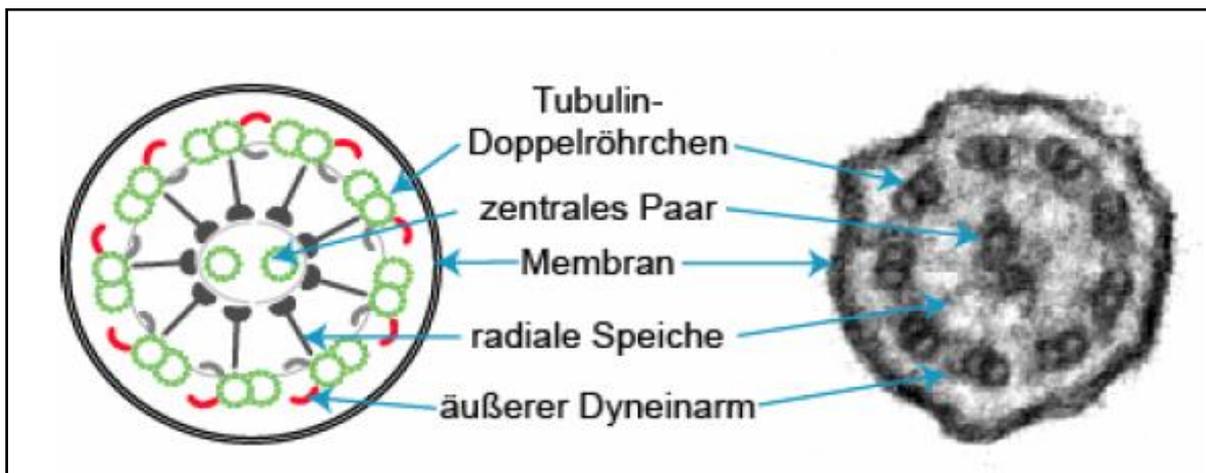


Abbildung 5: Querschnitt durch eine gesunde Zilie mit der 9x2+2-Struktur. Links als Skizze mit der Darstellung der Ultrastruktur der ziliären Architektur, rechts als elektronenmikroskopische Aufnahme. Referenz: URL: <http://www.uniklinik-freiburg.de/kinderklinik/live/forschung/omran.html>. [Stand 26.03.2015, 14.38].

4. 2. Mukoziliäre Clearance

Die Grundlage des natürlichen Selbstreinigungsapparates der Atemwege als eine erste wichtige Stufe der Erregerabwehr stellt die *mukoziliäre Clearance* dar. Die Zilien des respiratorischen Epithels führen unter Energieverbrauch eine peitschenartige Bewegung aus, die aus einer schnellen Bewegung der hoch aufgerichteten Zilien in Richtung des Oropharynx besteht und so den Flüssigkeitsfilm in Richtung des Pharynx über den Ziliensaum bewegt (Abb. 6). Auf diese Weise werden im Schleim gefangene Partikel oralwärts transportiert.

Ist die *mukoziliäre Clearance* vermindert, haben pathogene Keime eine längere Verweildauer im Respirationstrakt und entziehen sich dadurch dem Selbstreinigungsmechanismus. Dadurch haben die pathogenen Keime die Möglichkeit sich durch weitere Virulenzfaktoren im Respirationstrakt auszubreiten und ggf. eine Infektion zu initiieren. In der Literatur wurde bereits die Interaktion der *Pseudomonas* Lektine PA-I und PA-II mit dem humanen respiratorischen Epithel beschrieben (Adam *et al.*, 1997), (Mewe *et al.*, 2005), wobei es zu einer reversiblen Bindung der *Pseudomonas* Lektine an das Flimmerepithel des Respirationstraktes kommt und dadurch die *mukoziliäre Clearance* herabsetzt.

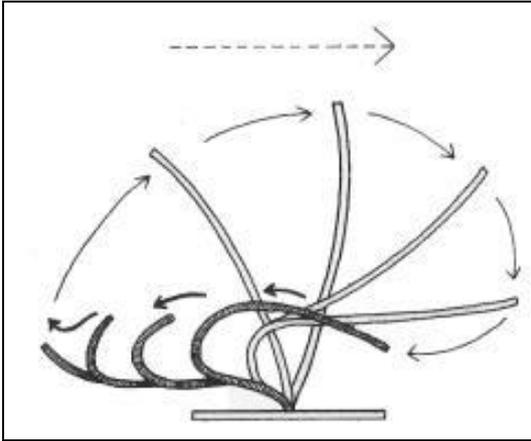


Abbildung 6: Schlagzyklus der Zilien. Phase 1 (helle Zilie): Die eigentliche schnelle Schlagbewegung der hoch aufgerichteten Zilie. Phase 2 (dunkle Zilie): Besteht aus einer langsameren Rückholbewegung zurück zur Startposition. Der gestrichelte Pfeil gibt die oralgerichtete Flussrichtung der periziliären Flüssigkeit an, welche durch den Zilienschlag verursacht wird (Osorio *et al.* 2008)

5. Anti-Adhäsive Therapie

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Infektionen die durch *P. aeruginosa* verursacht werden, oft langwierige und nicht selten sehr schwerwiegende Krankheitsverläufe verursachen können. Weitere Probleme stellen die zum Teil nur unzureichenden therapierbaren Infektionen dar und die zunehmende Resistenzbildung gegenüber den herkömmlichen Antibiotika. Dieses erfordert die Entwicklung neuartiger Medikamente beziehungsweise neuer Behandlungsansätze. Ein hoffnungsvoller neuer therapeutischer Ansatz stellt die Anti-adhäsive Therapie mittels der Blockade von Lektin-Kohlenhydrat-Interaktion durch antiadhäsive Substanzen dar (Irvin & Bautista, 1999), (Mulvey *et al.*, 2001). Die Vorteile der antiadhäsiven Substanzen gegenüber den herkömmlichen Antibiotika liegen darin, dass die Ausbildung von Resistenzen sehr unwahrscheinlich sind, da sie lediglich die Bindung der pathogenen Keime an die Glykokalix des Wirtes unterbinden und somit den ersten ausschlaggebenden Schritt einer entstehenden Infektion verhindern (Ofek *et al.*, 2003). Die Bakterien können sich also nicht vermehren und Mutationen, die während der Replikation auftreten und zu Resistenzen führen könnten, können sich nicht entwickeln. Weitere Vorteile der antiadhäsiven Therapie sind, dass sie nicht bakterizid wirken, dadurch führen sie weder zum Absterben der Bakterien noch beeinflussen sie das

Wachstumsverhalten der Bakterien. Zudem wird die natürliche Flora und das umliegende Milieu durch die Spezifität der Blockade durch die antiadhäsive Therapie geschont (Mulvey *et al.*, 2001).

Als antiadhäsive Substanzen können zum Beispiel Rezeptor-Analoga, Adhäsion-Analoga oder Anti-Lektin-Antikörper fungieren (Gabius, 2000). Hierzu eignen sich Substanzen, die eine Analogie zum Lektin oder zum Rezeptor sowie Anti-Lektin-Antikörper, welches die Bindungsstellen des Lektins blockieren (Irvin & Bautista, 1999). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Monosaccharide die Adhäsion einiger pathogenen Erreger an das Oberflächengewebe der Wirtszelle hemmt. Thomas & Brooks zeigten 2004 in ihrer Studie, dass der Einsatz von Zuckern die Adhäsion mehrerer Bakterienspezies (unter anderem *Pseudomonas aeruginosa*) an alveolare Epithelzellen inhibieren kann (Thomas & Brooks, 2004). Durch Gabe von den inhibierenden Monosacchariden der D-Galaktose und L-Fukose konnten bereits klinisch erfolgreiche Behandlungen der *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion im Gehörgang und im Respirationstrakt erzielt werden (Steuer *et al.*, 1993), (von Bismarck *et al.*, 2001) und (Hauber *et al.*, 2008).

Ein Nachteil bei der Hemmung der bakteriellen Adhäsion durch Zucker besteht darin, dass bedingt durch die niedrige Bindungskonstante hohe Konzentrationen der Zucker notwendig sind, um eine wirkungsvolle Inhibition der Anbindung der Bakterien zu erreichen. Durch den Einsatz von multivalenten Kohlenhydrat-Liganden (Autar *et al.*, 2003) oder durch die Verwendung von Glykomimetika (Ofek *et al.*, 2003) könnte dieses Problem umgangen werden

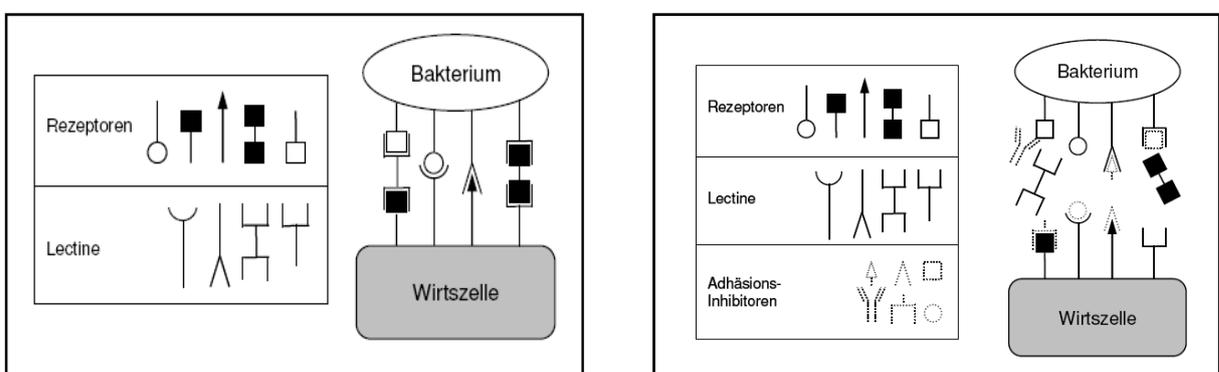


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Lektin-vermittelten Erkennungsmechanismus zwischen Bakterien und den Zellen des Wirtsorganismus und schematische Darstellung des Prinzips der Anti-Adhäsiven Therapie (Gabius, 2000).

III. Material

1. Histologisches Material

Die routinemäßig entnommenen Gewebeproben, die in 10% Phosphat gepufferten Formalin fixiert und danach in Paraffin eingebettet wurden, stammen aus der Gemeinschaftspraxis der Fachärzte für Pathologie von Prof. Dr. med. Andreas Gocht und Dr. med. Andreas Turzynski, aus Lübeck. Das Material der Nasenmuscheln stammt aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, welche intraoperativ entnommen wurden und ebenfalls in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet wurden. Die menschlichen Gewebeproben wurden von unterschiedlichen Patienten entnommen und zeigten zum größten Teil gesundes Gewebe, zum geringeren Teil handelte es sich um pathologisch-verändertes Gewebe, das aber stets auf ein kleines Areal begrenzt war. Zur Auswertung des Bindungsverhaltens der Lektine wurden nur die nicht pathologisch veränderten Areale untersucht und dokumentiert.

2. Humane Nasenmuscheln mit Flimmerepithel

Das nasale Flimmerepithel wurde von Nasenmuscheln (siehe Abb. 1) gewonnen, die intraoperativ aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf entnommen wurden. Die Nasenmuscheln wurden in Form von Stanzen mit Hilfe einer Hautstanze (BIOPSY PUNCH von STIEFEL® Laboratories UK LTD, 6 mm Durchmesser) präpariert und bei 37,0°C im Brutschrank angezüchtet. Als Nährmedium dient das RPMI-1640 Medium (versetzt mit 10 % FCS (*fetal calf serum*), 1 % Penicillin-Streptomycin, 0,9 % Amphotericin B). Das Nährmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Zwischen 20 bis zu 30 % der Nasenstanzen zeigte innerhalb von sieben Tagen ein erfolgreiches Wachstum des Flimmerepithels, so dass diese Stanzen für die folgenden Versuche verwendet werden konnten.

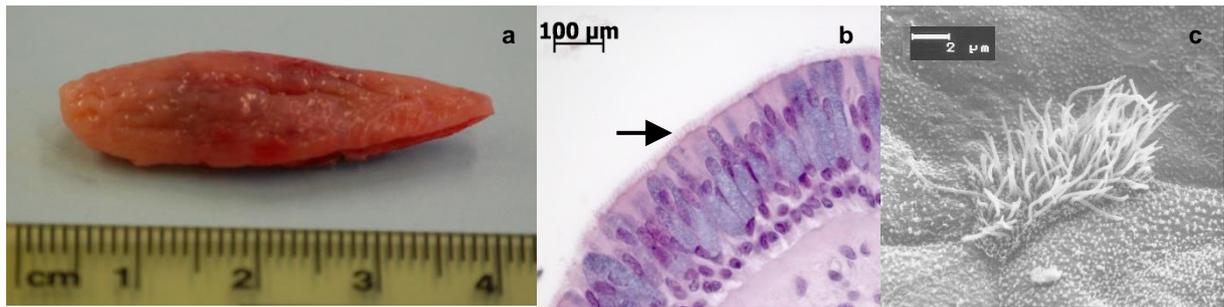


Abbildung 8: a Humane Nasenmuschel **b + c** Humanes respiratorisches Epithel: **b** HE-Färbung mit Ziliensaum (Pfeil). Lichtmikroskop 40x0,75 Vergrößerung **c** Raster Elektronen Mikroskopie Bild, 5000fache Vergrößerung.

IV. Methoden

1. Anfertigen von Paraffinschnitten

Von dem routinemäßig in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden auf silanbeschichtete Objektträger (Histo Bond®, Marienfeld, Deutschland) aufgebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe für die folgenden Färbungen und Reaktionen rehydriert. Bevor mit den angefertigten Paraffinschnitten gearbeitet wurde, erfolgte ein Vergleich bezüglich der Anfärbbarkeit mit *P.aeruginosa*-Lektine PA-I und PA-II zwischen Paraffinschnitten die ca. drei Jahre zuvor geschnitten worden sind, (gelagert in Präparatekästen bei Raumtemperatur), mit frisch angefertigten Paraffinschnitten. Dabei wurden jeweils die gleichen Organ-Blöcke verwendet die ebenfalls bei Raumtemperatur in lichtundurchlässigen Aufbewahrungstüten gelagert wurden.

2. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Zur Übersicht wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung durchgeführt. Die HE-Färbung wurde in einem Färbeautomaten (Varistain, Shandon, Frankfurt, Deutschland) nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Anschließend folgten Inkubationen in destilliertem Wasser für 2 Minuten, Hämalaun für 1 Minute, destilliertem Wasser für 2 Minuten, Leitungswasser für 5 Minuten, Eosin für 3 Minuten und wiederum in destilliertem Wasser für 30 Sekunden. Abschließend wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, dreimal für je 5 Minuten in Xylol inkubiert und mit Eukitt (Kindler, Freiburg, Deutschland) eingedeckelt.

3. Immunhistochemische Färbungen

3.1. Lektin-Histochemie

Alle Inkubationen wurden, soweit es nicht anders beschrieben ist, bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die rehydrierten Schnitte wurden 15 Minuten mit 0,1 % Trypsin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), gelöst in Lektinpuffer (LP bestehend aus: 50 mM Trizma Base, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂ (alle Reagenzien Sigma, Deisenhofen, Deutschland); pH 7,6), in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde unter fließendem Leitungswasser gestoppt, die Schnitte in LP äquilibriert (dreimal fünf Minuten) und anschließend mit 10 µg/ml des jeweiligen biotinylierten Lektins eine Stunde inkubiert.

An Lektinen wurden biotiniliertes PA-I und PA-II Lektin verwendet. Das PA-I Lektin wurde von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen, während das PA-II Lektin von dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Juelich, Deutschland von Herrn Dr. D. Tielker zur Verfügung gestellt wurde. Für das PA-I Lektin gilt eine Zuckerspezifität für D-Galaktose und für das PA-II Lektin Fukose > Mannose. Nach dreimaligem Spülen

in Trispuffer (TBS: 50 mM Trizma Base (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 150 mM NaCl; pH 7,6), wurden die Schnitte mit einem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex (Vectastain, ABC kit, Vektor, Burlingame, Kalifornien, USA) für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Präparate wiederum in TBS gespült und die Farbreaktion durchgeführt: 10 ml einer 4 %igen Natriumnitritlösung wurden mit 400 µl Neufuchsin-Stammlösung (5 g Neufuchsin gelöst in 100 ml 2 n HCl) vermischt. Darauf erfolgt die rasche Zugabe von 200 ml Trispuffer (TBS: 50 mM Trizma Base (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 150 mM NaCl; pH 8,24). Anschließend wurden sofort 40 mg Naphthol-AS-Bisphosphat in 1000 µl DMF gelöst und als Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugegeben. Die Schnitte wurden in dieser Lösung 20 Minuten unter Lichtausschluss belassen. Die Reaktion wurde unter fließendem Leitungswasser (10 Minuten) gestoppt, daraufhin für weitere fünf Minuten in *Aqua dest.* belassen. Abschließend wurden die Präparate in 50 %igem Mayers Hämalaun 8 Sekunden gegengefärbt, 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Abschließend wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, dreimal für je 5 Minuten in Xylol inkubiert und mit Eukitt (Kindler, Freiburg, Deutschland) eingedeckelt. Mit Kontrollschnitten für jedes Lektin wurde auf die gleiche Weise verfahren, nur wurde statt des jeweiligen Lektins mit reinem Lektinpuffer inkubiert. In jeder Serie wurde jeweils ein Schnitt eines Falles, der zuvor positiv für das jeweilige Lektin war, zur Kontrolle der Intensität der Enzymfarbreaktion mitgefärbt.

3.2. Lektin-Histochemie und spezifische Zuckerhemmung mit inhibitorischen Monosacchariden (Fukose und Galaktose)

Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die rehydrierten Schnitte wurden 15 Minuten mit 0,1% Trypsin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), gelöst in Lektinpuffer (LP bestehend aus: 50 mM Trizma Base, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂ (alle Reagenzien Sigma, Deisenhofen, Deutschland); pH 7,6), in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde unter fließendem Leitungswasser gestoppt, die Schnitte in LP äquilibriert (dreimal fünf Minuten). Als spezifische Zuckerhemmung wurde für das PA I-Lektin eine Galaktose-Lösung (D-Galactose von Serva) und für das PA II-

Lektin eine Fukose-Lösung (D (+)-Fucose von Fluka) angesetzt, die eine Stunde lang mit dem entsprechenden Lektin inkubiert wurden, wobei das Gemisch aus Lektin und Zuckerlösung alle 15 Minuten kräftig geschüttelt wurde. Erst daraufhin wurden die Gewebeproben mit 10 µg/ml des jeweiligen biotinylierten Lektins plus entsprechender Zuckerlösung in den Konzentrationen (für jeweils Galaktose und Fukoselösungen gleich 0,05M, 0,1 M, 0,2 M, und 0,3 M) eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte genauso wie in der zuvor beschriebenen Lektin histochemie behandelt. Dabei wurde durch den Zusatz des hemmenden Zuckers die inhibitorische Konzentration des Zuckers quantitativ ermittelt.

3.3. Lektin-Histochemie mit Zusatz von Hyaluronsäure-Oligosacchariden und Hyaluronsäure Viscoseal®

Die Hyaluronsäure-Oligosaccharide wurden in getrocknetem Zustand von Herrn Prof. Dr. P. Prehm aus dem Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie am Universitätsklinikum Münster zur Verfügung gestellt. Die Fraktionierung erfolgte über eine HPLC Trennung. Es wurden Hyaluronan-Oligosaccharide mit unterschiedlich langen Oligosachharidseitenketten verwendet, in folgendem aufgelistet HA4, HA6, HA8, HA10, HA12, HA14, HA16, HA18. Somit variiert die Anzahl der Oligosaccharidseitenketten des Hyaluronan von minimal vier bis zu maximal sechzehn Seitenketten. Für die Versuchsreihe wurden alle Einzelkomponenten in einer Konzentration von 100 µl pro 1,5 ml Lektinpuffer (Stammlösung) gelöst und gepoolt über 24 h im Kühlschrank bei ca. 6 °C inkubiert und dabei alle 6 Stunden kräftig geschüttelt. Auch hier wurde, analog der zuvor beschriebenen Versuchsreihe mit drei Konzentrationen gearbeitet. Für die erste Konzentration erfolgte keine weitere Verdünnung, somit wurde mit einer Konzentration von 10 µl pro 1,5 ml Lektinpuffer gearbeitet. Für die zweite Konzentration wurde eine 1:10-Verdünnung mit RPMI-1640 Medium der Stammlösung und für die dritte Konzentration eine 1:100-Verdünnung ebenfalls mit RPMI-1640 Medium erstellt.

Die Hyaluronsäure stammt von dem Hersteller TRB CHEMEDICA, Rheuma Line, unter dem Handelsnamen Viscoseal®. Die Zusammensetzung setzt sich zusammen aus 1 ml isotonische Lösung, die 5,0 mg Hyaluronsäure enthält,

Natriumsalz sowie Natriumchlorid, Natriummonohydrogen-phosphat, Natriumdihydrogenphosphat und Wasser. Die Hyaluronsäure wurde aliquotiert und im Kühlschrank bei minus 20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Das Auftauen erfolgte, ebenso wie die Lektine PA-I und PA-II, langsam auf Eiswasser. Auch für das Viscoseal® wurden drei Konzentrationen gewählt. Die erste unverdünnte und etwas zäh wirkende Lösung, dann eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung, als Verdünner dienten wie zuvor beschrieben die RPMI-1640 Nährmedien.

Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die rehydrierten Schnitte wurden 15 Minuten mit 0,1% Trypsin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), gelöst in Lektinpuffer (LP bestehend aus: 50 mM Trizma Base, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂ (alle Reagenzien Sigma, Deisenhofen, Deutschland); pH 7,6), in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde unter fließendem Leitungswasser gestoppt, die Schnitte in LP äquilibriert (dreimal fünf Minuten). Für die Versuchsreihe wurden drei Konzentrationen ausgetestet. Die erste Konzentration bestand aus unverdünnter handelsüblicher Hyaluronsäure, bei der zweiten Konzentration wurde die Hyaluronsäure in einem Verhältnis von 1:10 mit Lektinpuffer verdünnt und die dritte Konzentration im Verhältnis von 1:100 verdünnt. Die Reaktionslösungen aus PA-IL und PA-IIL zusätzlich der Hyaluronsäure wurden eine Stunde lang auf dem Roller inkubiert, wobei sie alle 15 Minuten kräftig geschüttelt wurden. Daraufhin wurden die Gewebeschnitten mit 10 µg/ml des jeweiligen biotinylierten Lektins plus Hyaluronsäure eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte genauso wie in der zuvor beschriebenen Lektinhistochemie behandelt.

3.4. Lektin-Histochemie mit Zusatz von *P. aeruginosa*-Alginaten und Algenalginat Manucol LB

Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die rehydrierten Schnitte wurden 15 Minuten mit 0,1 % Trypsin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), gelöst in Lektinpuffer (LP bestehend aus: 50 mM Trizma Base, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂ (alle Reagenzien Sigma,

Deisenhofen, Deutschland); pH 7,6), in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde unter fließendem Leitungswasser gestoppt, die Schnitte in LP äquilibriert (dreimal fünf Minuten). Die Alginat wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Jost Wingender der Gerhard-Mercator-Universität in Duisburg, aus dem Fachgebiet Aquatische Mikrobiologie, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um gereinigte Alginat, die von unterschiedlichen *P. aeruginosa*-Stämme gewonnen wurden (siehe Tabelle 1) und um das Algenalginat Manuacol LB, welches aus Braunalgen gewonnen wurde.

Die Alginat wurden zuvor in Lektinpuffer im Verhältnis 1:1 aufgelöst, d. h. 1mg Alginat in 1ml Lektinpuffer gelöst und dann mindestens für 24 h im Kühlschrank bei 6°C aufbewahrt und alle 6 Stunden kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Alginat aliquotiert und im Kühlschrank bei minus 20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Das Auftauen erfolgte, ebenso wie die Lektine PA-I und PA-II, langsam auf Eiswasser. Das Gemisch aus PA-I Lektin mit den jeweiligen Alginaten Nr. 1-4 sowie das Gemisch aus PA-II Lektin mit den Alginaten Nr. 1-4 wurden eine Stunde lang inkubiert, wobei sie alle 15 Minuten kräftig geschüttelt wurden. Erst daraufhin wurden die Gewebsschnitte mit 10 µg/ml des jeweiligen biotinylierten Lektins plus entsprechender Alginatlösung eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte genauso wie in der zuvor beschriebenen Lektinhistochemie behandelt.

Tabelle 2: Bakterienalginat, gewonnen auf Kulturen.

| Bakterium | Stamm | Besonderheit | Referenz |
|----------------------|--------------|---|------------------------------|
| <i>P. aeruginosa</i> | SG81 | Mucoides Umweltisolat aus einem Aufwuchs eines Abflusses in einem Fleischzerlegebetrieb | (Grobe, 1995) |
| <i>P. aeruginosa</i> | FRD1 | Mucoides Isolat aus dem Sputum eines CF Patienten | (Ohmann & Chakrabarty, 1981) |
| <i>P. aeruginosa</i> | FRD1153 | Mutation im <i>algJ3</i> -Gen des FRD1-Stammes, führt zu einem Defekt in der O-Acetylierung von Alginat | (Franklin & Ohmann, 1993) |

4. Zilienschlagmessung am inversen Phasenkontrastmikroskop

Die Zilienfunktionsanalyse ermöglicht die Messung der Zilienschlagfrequenz in Herz [Hz]. Die Methode lässt damit eine quantitative als auch eine qualitative (Koordination und Amplitude der Zilien) Beurteilung der Zilien zu (Nüßlein *et al.*, 2001). Die normale Schlagfrequenz des respiratorischen und nasalen Flimmerepithels liegt zwischen 10 und 16 Hz (Nüßlein *et al.*, 2001), die je nach Ausstattung und Technik leicht variieren kann. Die Zilienfunktionsanalyse wird an einem inversen Phasenkontrastmikroskop (Leica DM IRB, von Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Deutschland, ausgestattet mit Heiztisch und Photometer, siehe Abb. 2) mit eingegliedeter Software durchgeführt. Zunächst werden das Phasenkontrastmikroskop und der Heiztisch eingeschaltet, der eine Temperatur von 37,0°C entsprechend der physiologischen Körpertemperatur erreichen soll. Vor Zugabe der zu testenden Substanzen, erfolgt zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Zilien, die als erste Zilienschlagfrequenzmessung dokumentiert wird. Wenn der Zilienschlag der einzelnen Stenzen sich im oben genannten Referenzbereich befand, wurden sie für die weiteren Versuche verwendet.

Die zu testenden Substanzen wurden einzeln auf jeweils eine Nasenstanze in einem eigenen 1,5 ml fassenden Reaktionsgefäß appliziert. Unmittelbar nach Hinzugabe erfolgte die erste Messung, die als Zeitpunkt 0 h festgelegt wurde. Für jede Messung gilt, dass zehn verschiedene Messstellen ausgesucht wurden, davon wird jede zweite Messung ausgedruckt und archiviert. Für die Negativ-Kontrolle werden 1000 µl RPMI-1640 Medium auf die Nasenstanze gegeben und ebenfalls unmittelbar nach Hinzugabe die Messung zum Zeitpunkt 0 h durchgeführt und dokumentiert. Bei jedem Versuchsdurchgang läuft neben der Negativkontrolle mit RPMI-1640 Medium eine positiv Kontrolle mit entweder PA-I Lektin mit 10 µg/ml oder PA-II Lektin 10µg/ml mit, um differenzieren zu können, welchen Effekt durch Hinzugabe von weiteren Substanzen in der Interaktion mit den Pseudomonaslektinen zu beobachten ist. Danach erfolgen die Messung des Zilienschlages zum Zeitpunkt nach 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h und 8 h und 24 h nach Inkubation. Die Nasenstanzen werden während des Intervalls bis zur nächsten Messung im Brutschrank (37° C, 5 % CO₂) aufbewahrt und nur zu den Messungen auf dem Heiztisch bei Raumtemperatur aus dem Brutschrank genommen.



Abbildung 9: Phasenkontrastmikroskop Messplatz zur lichtmikroskopischen Zilienfunktionsmessung.

4.1. Zilienschlagmessung mit Zusatz von Hyaluronsäure-Oligosacchariden und Hyaluronsäure (Viscoseal®)

Das Auftauen erfolgte, ebenso wie die Lektine PA-I und PA-II, langsam auf Eiswasser. Für diese Versuchsreihe wurden drei Konzentrationen ausgetestet. Die erste Konzentration bestand aus unverdünnter handelsüblicher Hyaluronsäure Viscoseal®, bei der zweiten Konzentration wurde die Hyaluronsäure Viscoseal® in einem Verhältnis von 1:10 mit RPMI-1640 Medium verdünnt und die dritte Konzentration im Verhältnis von 1:100 mit dem RPMI-1640 Medium verdünnt.

Die Reaktionssubstanzen aus PA-IL beziehungsweise PA-IIL (mit jeweils 10µg/ml) zusätzlich der Hyaluronsäure Viscoseal® beziehungsweise dem Pool der Hyaluronan-Oligosaccharide in den drei unterschiedlichen Konzentrationen wurden 30 Minuten lang auf dem Roller inkubiert, bevor sie dem Reaktionsgefäß mit jeweils einer Nasenschleimhautstanze zugeführt wurden.

Anschließend wurden die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten genauso wie in dem zuvor beschriebenen Ablauf der Zilienschlagmessung am inversen Phasenkontrastmikroskop durchgeführt.

4.2. Zilienschlagmessung mit Zusatz von *P. aeruginosa*-Alginaten und Algenalginat Manuacol LB

Die Alginat wurden in Lektinpuffer im Verhältnis 1:1 aufgelöst, d. h. 1mg Alginat in 1ml Lektinpuffer gelöst und dann mindestens für 24 h im Kühlschrank bei 6° C aufbewahrt und alle 8 Stunden kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Alginat aliquotiert und im Kühlschrank bei minus 20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Das Auftauen erfolgte, ebenso wie die Lektine PA-I und PA-II, langsam auf Eiswasser. Das Gemisch aus PA-I Lektin bzw. PA-II Lektin(jeweils mit 10µg/ml) mit den jeweiligen Alginaten Nr. 1-4 wurden 30 Minuten lang auf dem Roller bei Zimmertemperatur inkubiert, bevor sie zu dem Reaktionsgefäß mit jeweils einer Nasenschleimhautstanze gegeben wurden.

Anschließend wurden die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten genauso wie in dem zuvor beschriebenen Ablauf der Zilienschlagmessung am inversen Phasenkontrastmikroskop durchgeführt.

5. Auswertung

5.1. Histologische Auswertung der Immunhistochemie

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden alle mikroskopischen Auswertungen zweimal, unabhängig voneinander, durchgeführt und diese Ergebnisse miteinander verglichen. Stimmt die Ergebnisse der ersten und zweiten Beurteilung nicht überein, wurden die fraglichen Präparate von einem zweiten, unabhängigen Untersucher beurteilt und die Ergebnisse diskutiert. Die lektinhistochemisch gefärbten Präparate wurden unter einem Axioplan Fotomikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet und zur Befunddokumentation mit einer Zeiss Axio Cam MRc5 (Kodak, Stuttgart, Deutschland) fotografiert. Die Farbintensität wurde in einer Abstufung von nicht angefärbt (-), schwach (+), über mittelgradig (++) bis intensiv (+++) dokumentiert und die Lokalisation der positiven Farbreaktion bezüglich der einzelnen Gewebeabschnitte, bzw. den Zellstrukturen ausgewertet.

5.2. Statistische Auswertung der Zilienschlagmessungen

Die Zilienschlagfrequenz wurde unter dem Einfluss von 10µg/ml PA-IL und 10µg/ml PA-IIL unter dem Zusatz von Hyaluronsäuren (Hyaluronsäure Oligosaccharide und Hyaluronsäure Viscoseal®) und Alginaten untersucht. Die Hyaluronsäuren wurden jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Als Negativkontrolle diente bei jedem Versuch RPMI-Nährmedium, welches keinen signifikanten Einfluss auf die Zilienschlagfrequenz hat, die Frequenz der Zilien betrug stets zwischen 9,3 bis 10,14 Hz, siehe Abbildung 20. Die Negativkontrolle wurde als Bezugsgröße zu den untersuchten Wirkstoffen genommen. Als Programm für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 5 verwendet und die Daten in Form von Liniendiagrammen dargestellt. Zwischen den untersuchten Gruppen von einer Normalverteilung ausgegangen wurde, wurde der One way Anova angewandt und als multipler Vergleichstest kam der Dunnett-Test zur Anwendung. Die Signifikanz wurde wie folgt festgelegt: $p < 0,05 = *$, $p < 0,001 = **$ und $p < 0,0001 = ***$.

V. Ergebnisse

5.1. Ergebnisse der histologischen Auswertung

5.1.1. Ergebnisse für PA-IL und PA-IIL mit Fukose und Galaktose

In der folgenden histologischen Auswertung werden die Ergebnisse der PA-IL und PA-IIL Färbungen allein und nach Zugabe der jeweiligen spezifischen inhibitorischen Monosaccharide beschrieben. Dabei gilt Galaktose als spezifisches inhibitorisches Monosaccharid für PA-IL und Fukose für PA-IIL. Die Versuche wurden in jeweils vier aufsteigenden Konzentrationen mit jeweils 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M und 0,3 M durchgeführt.

Hautabschnitte (siehe Tabelle 3)

Gehörgang

Das Lektin PA-IL färbt das mehrschichtige verhornte Plattenepithel des Gehörganges in einer mittleren Intensität (++) an, die unverändert durch die Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung sich an Intensität verstärkt (+++). Bei der 0,1 M Galaktoselösung zeigt sich eine leichte Abschwächung auf eine mittlere Intensität (++)), die sich bei der nächsthöheren Konzentration von 0,2 M auf eine leichte Anfärbbarkeit (+) abmildert. Durch Zusatz der 0,3 M Galaktoselösung bindet sich das PA-IL nicht mehr an das Epithel (-). Das Färbeverhalten der apokrinen Ceruminaldrüsen gleicht dem der Dermis. Durch PA-IL und PA-IL plus einer 0,05 M Galaktoselösung kommt es zu einer mittleren Anfärbung (++)). Bei Zusatz einer 0,1 M Galaktoselösung kommt es zu einer leichten Anfärbung (+), die ab der Konzentration von 0,3 M nicht mehr nachweisbar ist (-). Das Bindegewebe zeigt eine insgesamt schwächere Anfärbung, das PA-IL erreicht eine leichte Anfärbung vor allem der Kollagenfaser (+), die durch Zugabe der 0,05 und 0,1 M Galaktoselösung bestehen bleibt. Durch Zugabe der 0,2 und 0,3 M Lösung zeigt sich keine Anfärbung mehr (-).

Das PA-IIL allein zeigt eine mittlere Anfärbung des mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel des Gehörganges (++)), welches durch Zugabe einer 0,05 M

Fukoselösung nicht verändert wird. Durch Zugabe von einer 0,1 und 0,2 M Fukoselösung zeigt sich eine Abschwächung der PA-IIL Bindung (+). Durch Zugabe der 0,3 M Lösung wird die Interaktion des Lektins mit dem Epithel vollständig gehemmt (-). Die Dermis zeigt eine mittelgradige Anfärbung durch PA-IIL (++), die durch die 0,05 und 0,1 M Fukoselösung auf eine leichte Anfärbung abgeschwächt wird (+). Durch Zugabe der 0,2 und 0,3 M Fukoselösung kann keine Anfärbung mehr detektiert werden (-). Ähnlich verhält es sich mit den Ceruminaldrüsen, die durch PA-IIL mittelgradig angefärbt werden (++), durch Zugabe der 0,05 M Fukoselösung zeigt sich eine Abschwächung auf eine leichte Anfärbung (+). Ab einer Konzentration von 0,1 M Fukoselösung, kann keine Anfärbung mehr nachgewiesen werden (-). Das Bindegewebe wird insgesamt nur schwach durch PA-IIL angefärbt (+), wobei hauptsächlich die Kollagenfaser eine positive Färbung zeigen. Das gleiche Färbeverhalten zeigt sich durch Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung. Ab der Konzentration von 0,1 M Fukoselösung, zeigt sich keine Farbbindung (-) mehr.

Mundschleimhaut

PA-IL färbt das mehrschichtige unverhornte Plattenepithel nur leicht an (+), dabei treten keine merklichen Unterschiede in den verschiedenen Strata auf (Stratum superficiale, spinosum et basale). Es tritt keine Änderung des Färbeverhaltens durch Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung auf (+). Ab einer Galaktosekonzentration von 0,1 M zeigt sich keine Anfärbung des Epithels mehr (-). Für alle tiefer gelegenen Strukturen, wie dem subkutanem Fettgewebe, dem Bindegewebe, den Muskelfaserbündeln und der Submukosa mit den Drüsen zeigt sich ein identisches Färbeverhalten. PA-IL alleine färbt die genannten Strukturen schwach an (+), die bereits durch Zugabe der am niedrigsten getesteten Galaktoselösung ab einer Konzentration von 0,05 M keine Anfärbung mehr zeigen (-).

PA-IIL färbt das mehrschichtige unverhornte Plattenepithel mittelgradig stark an (++), dabei treten keine merklichen Unterschiede in den verschiedenen Strata auf (Stratum superficiale, spinosum et basale). Die Färbung wird durch Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung abgeschwächt (+) und ab einer Konzentration von 0,1 M

zeigt sich keine Anfärbung mehr (-). Das Bindegewebe und die Muskelfaserbündel werden durch PA-III und ebenso durch PA-III plus der 0,05 M Galaktoselösung leichtgradig angefärbt (+). Die Anfärbung wird ab der nächsthöheren Galaktosekonzentration von 0,1 M aufwärts nicht mehr detektiert (-). Die Submukosa mit den darin enthaltenen Drüsen und das subkutane Fettgewebe werden durch PA-III leicht angefärbt (+), durch Zugabe der am niedrigsten getesteten Fruktosekonzentration zeigt sich keine weitere Anfärbung (-).

Bauchhaut

Die Epidermis wird durch PA-III intensiv angefärbt (+++), dabei werden vor allem die äußerste Schicht des verhornenden Plattenepithels, das Stratum corneum und zusätzlich die Basalmembran angefärbt. Es ergibt sich keine Änderung der Farbintensität durch Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung. Durch die Anwendung einer 0,1 M Galaktoselösung wird eine mittelgradige Färbung (++) erreicht, die durch eine 0,2 M Lösung weiter auf eine schwache Färbung (+) reduziert wird. Durch Zugabe einer 0,3 M Galaktoselösung kommt es zu keiner Anfärbung mehr (-). Die Dermis weist in seiner Anfärbbarkeit keine Unterschiede bezüglich des Stratum papillare und Stratum reticulare auf. Die Dermis und die Bindegewebsfasern, sowie die Myoepithelzellen zeigen eine mittelgradige Anfärbbarkeit (++) durch PA-III, die durch eine 0,05 und 0,1 M Galaktoselösung abgeschwächt wird auf eine leichte Anfärbung (+). Durch Zugabe jeweils einer 0,2 und 0,3 M Galaktoselösung zeigt sich keine weitere Anfärbung der genannten Strukturen (-). Die in der Dermis liegenden ekkrinen Schweißdrüsen werden durch PA-III mittelgradig angefärbt (++) , die durch Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung bestehen bleibt (++) . Durch Zugabe einer 0,1 M Lösung wird diese auf eine leichte Anfärbung (+) abgeschwächt und ab einer 0,2 M Konzentration zeigt sich keine Anfärbung mehr (-). Das subkutane Fettgewebe zeigt durch PA-III und durch Zusatz einer 0,05 M Galaktoselösung, jeweils eine mittelgradige Anfärbbarkeit auf (++) . Bei der nächst höheren Galaktosekonzentration von 0,1 M mildert sich diese ab auf eine leichte Anfärbung (+), die ab der Konzentration von 0,2 M nicht mehr nachweisbar ist (-).

PA-IIL färbt die Epidermis in einer starken Intensität an (+++), auch hier werden das Stratum corneum und die Basalmembran insbesondere stark angefärbt. Bei Zugabe einer 0,05 und 0,1 M Fukoselösung erfolgt eine Reduktion der Anfärbung (++) . Bei einer Konzentration von einer 0,2 M Fukoselösung kommt es zu einer weiteren Abschwächung auf eine leichte Anfärbung (+), bei einer Konzentration von 0,3 M wird die Lektinbindung vollständig inhibiert. Die Dermis wird durch PA-IIL mittelgradig stark angefärbt (++) , die auch durch Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung nicht abgemildert wird (++) . Bei Fukoselösungen in den Konzentrationen von 0,1 und 0,2 M, weist die Dermis eine leichte Anfärbung auf (+), die bei der Konzentration von 0,3 M nicht mehr nachweisbar ist (-). Die ekkrinen Schweißdrüsen und das Bindegewebe werden durch PA-IIL und bei Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung mittelstark angefärbt (++) , die bei einer Konzentration von 0,1 M auf eine leichte Anfärbung abschwächt (+). Ab der Konzentration von 0,2 M werden die Schweißdrüsen nicht mehr angefärbt (-). Das subkutane Fettgewebe wird durch PA-IIL mittelstark angefärbt (++) , es kommt zu keiner Änderung der Farbintensität durch Zugabe von 0,05 und 0,1 M Fukoselösungen (++) . Bei der Konzentration von 0,2 M, wird eine Abschwächung auf eine leichte Anfärbung nachgewiesen (+), die ab der Konzentration von 0,3 M nicht mehr nachgewiesen werden kann (-).

Achselhaut

Die Epidermis lässt sich von ihren verschiedenen Schichten regelmäßig durch PA-IL in mittlerer Intensität anfärben (++) . Durch Zugabe drei aufsteigender Konzentrationen von Galaktoselösungen (0,05, 0,1 und 0,2 M) wird die Epidermis nur noch schwach angefärbt (+) und bei einer 0,3 M Konzentration wird die Epidermis nicht mehr angefärbt (-). Das gleiche Färbeverhalten zeigt die Dermis, wobei die darin liegenden Schweiß- und Talgdrüsen leicht davon abweichen. Die Holokrinen Schweißdrüsen werden durch PA-IL leicht angefärbt (+), die nach Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung bestehen bleibt (+). Ab der Konzentration einer 0,1 M Galaktoselösung kommt es zu keiner Anfärbung mehr (-). Das gleiche Färbeverhalten zeigen die Myoepithelzellen und das Bindegewebe. Die ekkrinen Schweißdrüsen werden ebenfalls durch PA-IL leicht angefärbt (+), die jedoch

bereits nach Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung nicht mehr darstellbar sind und auch bei den höher konzentrierten Lösungen nicht mehr auftreten (-). Das subkutane Fettgewebe wird durch PA-IL mittelstark angefärbt (++) , durch Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung kommt es zur Abmilderung auf eine leichte Anfärbung (+), die ab der nächst höheren Konzentration nicht mehr nachweisbar ist (-).

PA-IIL färbt die Epidermis und das subkutane Fettgewebe mittelstark an (++) , es kommt zu keiner Änderung durch Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung (++) . Bei einer Konzentration von 0,1 M schwächt das Signal auf eine leichte Anfärbung ab (+). Ab einer Konzentration von 0,2 M kommt es zu keiner Anfärbung mehr (-). Die Dermis im Allgemeinen und die darin gelegenen Myoepithelzellen, welche die Schweißdrüsen umgeben, weisen wie das Bindegewebe ein identisches Färbeverhalten auf. Durch PA-IIL werden die genannten Strukturen leicht angefärbt (+). Es kommt zu keiner Änderung durch Zugabe einer 0,05 oder 0,1 M Fukoselösung (+). Bei Konzentrationen von 0,2 und 0,3 M wird kommt es zu keiner weiteren Anfärbung mehr (-). Die Schweiß- und Talgdrüsen werden durch PA-IIL leicht angefärbt (+), es kommt zu keiner Änderung durch eine 0,05 M Fukoselösung. Ab einer Konzentration von 0,1 M kommt es zu keiner Anfärbung (-).

Atemtrakt (siehe Tabelle 4)

Nasenschleimhaut

Das mehrreihige Flimmerepithel zeigt durch PA-IL eine zweifach positive Färbung (++) , dabei färben sich insbesondere die Becherzellen apikal an. Durch Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung kommt es zu keiner Änderung der Färbung (++) . Bei den Galaktosekonzentrationen von 0,1 und 0,2 M kommt es in diesen Arealen nur noch zu einer leichten Anfärbung (+), die ab einer Konzentration von 0,3 M Galaktoselösung nicht mehr nachweisbar ist (-). Die Basalmembran und die Tunica submucosa werden durch PA-IL schwach gefärbt (+), diese schwache Färbung bleibt unverändert b durch Zugabe von Galaktoselösungen in den Konzentrationen 0,05, 0,1 und 0,2 M. Erst durch Zugabe einer 0,3 M

Galaktoselösung wird keine Anfärbung der genannten Strukturen erreicht (-). Das gleiche Färbeverhalten liegt für die intraepithelialen seromukösen Glandulae nasales vor. Das Bindegewebe färbt sich durch PA-IL mittelstark an (++), durch Zusatz von 0,05 bis 0,2 M Galaktoselösungen wird es leichtgradig angefärbt (+) und durch den Zusatz einer 0,3 M Galaktoselösung wird das Bindegewebe nicht mehr angefärbt (-).

Das mehrreihige respiratorische Flimmerepithel wird durch PA-IIL intensiv angefärbt (+++), wobei insbesondere die Becherzellen sich stark anfärben. Durch Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung kommt es zu einer mittelgradigen Anfärbung (++), die beim Zusatz einer 0,1 und 0,2 M Fukoselösung sich auf eine leichte Anfärbung abmildert (+). Bei Zugabe einer 0,3 M Fukoselösung kommt es zu keiner Anfärbung des respiratorischen Epithels mehr (-). Es ergibt sich für folgende Strukturen das identische Färbeverhalten: Basalmembran, Glandulae nasales, Tunica submucosa und Bindegewebe werden durch PA-IIL sowie durch Zusatz einer 0,05 M Fukoselösung mittelgradig angefärbt (++). Bei den Konzentrationen 0,1 und 0,2 M Fukoselösung werden die genannten Strukturen leichtgradig angefärbt (+) und bei der 0,3 M Fukoselösung kann keine Anfärbung mehr detektiert werden (-).

Trachea

Das Flimmerepithel mit den darin liegenden Becherzellen werden durch PA-I Lektin mittelgradig intensiv angefärbt (++). Durch Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung schwächt sich die Anfärbung auf eine leichte ab (+) und ab der nächst höheren konzentrierten Galaktoselösung werden die Strukturen nicht mehr angefärbt (-). Folgende Gewebeabschnitte zeigen ein identisches Färbeverhalten auf und werden im Folgenden zusammengefasst: L. propria mucosae, Glandulae nasales, Tela submucosa, Tunica fibromusculocartilaginea und die Tunica adventitia werden durch PA-I Lektin schwach angefärbt (+), ab einer 0,05 M konzentrierten Galaktoselösung werden die genannten Gewebe nicht mehr angefärbt (-).

Für PA-IIL liegt ein insgesamt sehr einheitliches Färbeverhalten vor. Die gesamten Strukturen der Trachea werden durch PA-IIL leichtgradig angefärbt (+),

die nach Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung nicht mehr vorliegt und auch bei den höheren Konzentrationen nicht mehr auftreten (-). Die einzige Ausnahme stellt das Flimmerepithel mit den Becherzellen auf, sie weisen durch PA-IIL eine mittlere Intensität der Anfärbung auf (++)), die durch Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung auf eine leicht Anfärbung abgemildert wird. Ab der Konzentration einer 0,1 M Fukoselösung werden weder Flimmerepithel, noch die Becherzellen mehr angefärbt (-).

Lunge

Das Flimmerepithel der Tunica mucosa wird durch PA-IL mittelgradig intensiv angefärbt (++)), das unverändert durch Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung erhalten bleibt (++)). Nach Zusatz einer 0,1 und 0,2 M Galaktoselösung kommt es zu einer leichten Anfärbung (+), die durch eine 0,3 M Lösung nicht mehr dargestellt werden kann (-). Die Becherzellen werden durch PA-IL nur leicht angefärbt (+), ebenso bei Zusatz von einer 0,05 M Galaktoselösung (+). Ab einer Konzentration von 0,1 M kommt es zu keiner weiteren Anfärbung der Becherzellen (-). Das gleiche Färbeverhalten liegt für die Lamina propria mucosae, den seromukösen Bronchialdrüsen und den glatten Muskelfasern vor. Die Tunica fibromusculocartilaginea wird weder durch PA-IL, noch durch zusätzlich Galaktoselösungen angefärbt.

PA-IIL färbt das respiratorische Epithel (Flimmerepithel und Becherzellen) der Tunica mucosa mittelgradig intensiv an (++)). Es kommt zu keiner Änderung durch Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung (++)). Durch Zugabe von 0,1 und 0,2 M Fukoselösungen kommt es zu einer Signalabschwächung auf eine schwache Anfärbbarkeit (+), die ab einer Konzentration von 0,3 M vollständig ist (-). Alle übrigen Strukturen der untersuchten Bronchien weisen das gleiche Färbeverhalten auf. Es kommt durch PA-IIL zu einer schwachen Anfärbung (+), die nach Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung nicht mehr darstellbar ist (-) und auch bei den höheren Fukosekonzentrationen nicht zur Darstellung kommen (-). Ausnahme ist auch hier wie bereits zuvor beschrieben, dass die Tunica fibromusculocartilaginea weder durch PA-IIL, noch durch zusätzliche Fukoselösungen in verschiedenen Konzentrationen, anfärben lässt (-).

Geschlechtsorgane (siehe Tabelle 5)

Mamma

Das zweischichtige Epithel der Ducti lactiferi wird durch PA-IL intensiv angefärbt (+++). Eine Abschwächung auf eine mittelstarke Anfärbung erfolgt durch Zugabe von 0,05 und 0,1 M Galaktoselösung (++) . Bei einer 0,2 M Galaktoselösung erfolgt eine Abschwächung auf ein leichtes Farbsignal (+), welches bei einer Konzentration von 0,3 M nicht mehr nachweisbar ist (-). Das Stroma und das Myoepithel werden durch das PA-IL intensiv angefärbt (++) , es ist keine Änderung zu beobachten durch Zugabe durch einer 0,05 M Galaktoselösung (++) . Durch Zusatz einer 0,1 M Lösung kommt es zu einer Abschwächung auf eine leichte Anfärbung (+). Bei den Konzentrationen von 0,2 und 0,3 M Galaktoselösungen wird das Epithel nicht weiter angefärbt (-). Die dargestellten Fettzellen werden intensiv durch PA-IL angefärbt (+++), leichte Abschwächung durch Zugabe einer 0,05 und 0,1 mM Galaktoselösung (++) . Ab einer Konzentration von 0,2 M Galaktoselösung ist keine Anfärbung mehr nachweisbar (-). Das intralobuläre Bindegewebe wird durch PA-IL und durch zusätzlicher Gabe einer 0,05 M Galaktoselösung mittelgradig stark angefärbt (++) . Durch Zusatz einer 0,1 und 0,2 M Galaktoselösung kommt es zu einer leichten Anfärbung (+), die bei der nächst höheren Konzentration nicht mehr nachweisbar ist (-).

Durch PA-IIL werden das Epithel der Ausführungsgänge und das intralobuläre Bindegewebe mittelgradig intensiv angefärbt (++) . Bei Fukoselösungskonzentrationen von 0,05 und 0,1 M kommt es nur noch zu einer leichten Anfärbung (+), die bei der Konzentration von 0,2 M nicht mehr nachweisbar ist (-). Durch PA-IIL werden das Stroma und die Ausführungsgänge umgebenden Myoepithelzellen leichtgradig angefärbt (+). Nach Zugabe einer 0,05 und 0,1 M Fukoselösung bleibt diese unverändert angefärbt (+). Ab der Konzentration einer 0,2 M Fukoselösung kommt es zu keiner Anfärbung der genannten Strukturen mehr (-). Die Fettzellen werden durch PA-IIL mittelstark angefärbt (++) , die durch Zugabe der Fukosekonzentrationen von 0,05, 0,1 und 0,2 M auf eine leichte Anfärbung abgeschwächt wird (+). Bei einer 0,3 M Fukoselösung werden die Fettzellen nicht mehr angefärbt (-).

Uterus

Das einschichtige prismatische Oberflächenepithel des Endometriums wird durch PA-IL mittelgradig stark angefärbt (++), durch Zusatz einer 0,05 und 0,1 M Galaktoselösung zu einer leichten Anfärbung des Epithels (+). Ab der 0,2 M Konzentration werden die Zellen nicht mehr angefärbt (-). Das Endometrium wird durch PA-IL alleine und durch Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung zu einer leichten Anfärbung (+). Ab einer 0,1 M Galaktoselösung wird das Endometrium nicht mehr angefärbt (-). Das Myometrium wird nur alleine durch PA-IL angefärbt, nach Zusatz der Galaktoselösungen in verschiedenen Konzentrationen kommen die glatten Muskelzellen nicht mehr zur Anfärbung. Das Perimetrium wird weder durch PA-IL noch durch Zugabe von Galaktoselösungen in den getesteten Konzentrationen angefärbt.

Das Oberflächenepithel des Endometriums wird durch PA-IIL mittelgradig angefärbt (++), nach Zugabe einer 0,05 und 0,1 M Fukoselösung kommt es zu einer leichten Anfärbung (+), die Lektinbindung wird ab der nächst höheren Fukosekonzentration von 0,2 M vollständig gehemmt (-). Das Stroma der Tunica mucosa (Endometrium) und das Myometrium weisen das gleiche Färbeverhalten auf. Durch PA-IIL kommt es zu einer leichten Anfärbung der genannten Strukturen (+), welches bereits nach Zugabe der am niedrig konzentrierten Fukoselösung von 0,05 M, nicht mehr angefärbt werden (-). Das Perimetrium wird weder durch PA-IIL noch durch Zugabe von Fukoselösungen in den getesteten Konzentrationen, angefärbt (-).

Prostata

Das zweireihige Drüsenepithel wird durch PA-IL intensiv angefärbt (+++). Nach Zugabe der 0,05 M Galaktoselösung zeigt sich eine mittlere Intensität der Anfärbung (++), die bei einer Konzentration von 0,1 M sich abschwächt auf einer leichten Anfärbung (+). Nach Zugabe einer 0,2 und 0,3 M Galaktoselösung wird das Epithel nicht mehr angefärbt (-). Das Stroma und die zahlreiche glatte Muskulatur werden gleichermaßen durch PA-IL angefärbt. Durch PA-IL alleine kommt es zu einer mittleren Intensität der Anfärbung (++), nach Zugabe einer 0,05 M

Galaktoselösung wird eine leichte Anfärbarkeit dokumentiert (+), die auch nicht durch Zugabe von 0,1 und 0,2 M Galaktoselösung verändert wird (+). Nach Zugabe einer 0,3 M Galaktoselösung werden die genannten Strukturen nicht mehr angefärbt (-). Die tubuloalveolären Drüsen werden durch PA-Mittelgradig stark angefärbt (++), nach Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung wird diese auf eine leichte Intensität abgeschwächt (+). Ab einer Konzentration von 0,1 M Galaktoselösung werden die Drüsen nicht mehr angefärbt (-).

Das Drüsenepithel wird durch PA-III ebenfalls intensiv angefärbt (+++), ebenso nach Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung (+++). Bei der Konzentration einer 0,1 M Lösung kommt es zur mittleren Anfärbarkeit (++), die bei der 0,2 M Konzentration weiter auf eine leichte Anfärbarkeit (+) vermindert wird. Bei der 0,3 M Fukosekonzentration kommt es zu keiner Anfärbung der Epithelzellen mehr (-). Das fibromuskuläre Stroma zeigt durch PA-III eine geringe Anfärbung (+), die durch zusätzliche Fukoselösungen in den Konzentrationen von 0,05 und 0,1 M nicht verändert wird. Bei der 0,2 M Fukosekonzentration werden weder das Stroma, noch die glatten Muskelzellen mehr angefärbt (-). Die tubuloalveolären Drüsen werden durch PA-III mittelgradig stark angefärbt (++), diese bleibt unverändert nach Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung. Ab einer 0,1 M Lösung schwächt sich die Anfärbung der Drüsen auf eine leichte Intensität an (+), die ab der nächst höheren Fukosekonzentration inhibiert wird (-).

Gastrointestinaltrakt (siehe Tabelle 6)

Ösophagus

Die Tunica mucosa weist in ihrem Aufbau mit ihrem mehrschichtig unverhornten Plattenepithel der Lamina epithelialis, sowie der Lamina propria und der Lamina muscularis mucosae, keine Unterschiede bezüglich des Färbeverhalten auf. Die Tunica mucosa wird durch PA-IL leichtgradig angefärbt (+). Ab der Zugabe der niedrig dosierten Galaktosekonzentration von 0,05 M, werden die genannten Strukturen nicht mehr angefärbt (-). Das gleiche Bild zeigt sich durch Zugabe der Galaktoselösungen in den Konzentrationen von 0,1-0,3 M. Weder die Glandulae

ösophageales, noch die Tunica muscularis werden durch PA-IL oder PA-IL plus Zugabe von Galaktoselösungen angefärbt.

Die Tunica mucosa wird wie zuvor beschrieben, auch gleichmäßig durch PA-IIL leichtgradig angefärbt (+). Nach Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung kommt es ebenfalls zur leichten Anfärbung (+). Ab der nächst höheren Konzentration von 0,1 M, wird die Tunica mucosa nicht mehr angefärbt. Weder die Tela submucosa inklusiver der Oesophagealdrüsen, noch die Tunica muscularis werden durch PA-IIL/getesteter Fukoselösungen angefärbt (-).

Magen

Das hochprismatische Oberflächenepithel der Tunica mucosa wird durch PA-IL leichtgradig angefärbt (+), keine Änderung der Anfärbung erfolgt durch Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung (+). Ab einer Konzentration von 0,1 M Galaktose wird die Lektinbindung gehemmt. Das identische Färbeverhalten gilt für die Tela submucosa und der Tunica muscularis. Die Zellen der Glandulae gastricae mit ihren unterschiedlichen Abschnitten mit dem Drüsenhals und sekretorischen Endstücken werden durch PA-IL leicht angefärbt (+), die durch Zugabe einer 0,05 und 0,1 M Galaktoselösung erhalten bleibt (+). Ab einer Konzentration von 0,2 M wird die Lektinbindung vollständig inhibiert. Die Lamina propria mucosae und die Serosa werden ausschließlich nur durch PA-IL schwach angefärbt (+). Die Lamina muscularis der Tunica mucosa wird nicht durch PA-IL angefärbt, auch nach zusätzlicher Gabe von den getesteten Galaktoselösungen kommt es zu keiner Anfärbung.

Das hochprismatische Oberflächenepithel färbt sich leicht durch PA-IIL an (+). Die Anfärbbarkeit bleibt nach Zugabe einer 0,05, 0,1 und 0,2 M Fukoselösung unverändert (+). Ab einer Konzentration von 0,3 M, wird keine Anfärbung des Magenepithel mehr detektiert (-). Die Glandulae gastricae der Tunica mucosa werden gleichmäßig mittelgradig (++) stark angefärbt. Durch Zugabe einer 0,05 und 0,1 M Fukoselösung wird die Färbung abgeschwächt (+), die ab der nächst höheren Konzentration von 0,2 M ungefärbt bleibt. Die Lamina propria mucosae, die Tela submucosa und die Tunica muscularis werden durch PA-IIL leichtgradig angefärbt (+), dieses ändert sich nicht durch Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung.

Ab Zugabe einer 0,1 M Fukoselösung bleiben die genannten Gewebsstrukturen ungefärbt (-). Die Serosa und die Lamina muscularis mucosae werden ausschließlich nur durch PA-IIL alleine leichtgradig angefärbt (+). Nach Zugabe von Fukoselösungen in verschiedenen Konzentrationen, kommt es zu keiner Anfärbung mehr (-).

Duodenum

Die Enterozyten bilden zusammen mit den Becherzellen die Epithelschicht der Tunica mucosa, die gleichmäßig leichtgradig durch PA-IL angefärbt wird (+). Keine Änderung der Farbintensität nach Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung (+). Ab einer 0,1 M Galaktosekonzentration wird die Mukosa nicht mehr angefärbt. Das identische Färbeverhalten liegt für die Serosa vor. Im Folgenden verhalten sich die aufgelisteten Strukturen in Bezug auf ihr Lektinbindungsverhalten gleich. Die Submukosa mit dem lockeren Bindegewebe und den Glandulae duodenaes werden nur durch PA-IL leicht angefärbt (+), die nach Zugabe von Galaktoselösungen in verschiedenen Konzentrationen nicht mehr angefärbt werden (-).

Die Mucosa wird mittelgradig durch PA-IIL angefärbt (++) . Durch Zugabe von jeweils 0,05, 0,1 und 0,2 M Fukoselösungen kommt es zu einer leichten Anfärbung (+), ab einer Konzentration von 0,3 M wird die Lektinbindung aufgehoben. Im Folgenden verhalten sich die aufgelisteten Strukturen in Bezug auf ihr Lektinbindungsverhalten gleich. Die Submukosa mit dem lockeren Bindegewebe und den Glandulae duodenaes werden nur durch PA-IIL leicht angefärbt (+), die nach Zugabe von Fukoselösungen in verschiedenen Konzentrationen nicht mehr angefärbt werden (-). Die Serosa wird durch PA-IIL mittelstark angefärbt (++) , nach Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung, kommt es nur noch zu einer leichtgradigen Anfärbung (+), die ab der nächsthöheren Konzentration, nicht mehr zur Darstellung kommt (-).

Jejunum

Die Tunica mucosa mit ihren einzelnen Bestandteilen zeigen für PA-IL und PA-IIL das gleiche Färbeverhalten. Sie werden durch PA-IL und PA-IIL jeweils mittelstark

angefärbt (++)), durch die jeweils spezifischen Zuckerlösungen in den Konzentrationen 0,05, 0,1 und 0,2 M kommt es zu keiner Abschwächung der mittelgradigen Anfärbung (++)). Bei einer Konzentration von 0,3 M werden die Enterozyten nicht mehr angefärbt (-). Auch die Becherzellen zeigen ein identisches Färberhalten, sie werden durch PA-I und -IIL mittelgradig stark angefärbt (++)), es kommt zu keiner Abschwächung durch die spezifischen Zuckerlösungen in den Konzentrationen 0,05 und 0,1 M. Bei der Konzentration von der 0,2 M Zuckerlösungen werden die Becherzellen nur noch leicht angefärbt (+) und ab der nächst höheren Konzentration von 0,3 M Zuckerlösung, wird die Anbindung der Lektine komplett inhibiert und die Becherzellen lassen sich nicht mehr anfärben (-). Die Lamina propria mucosae wird durch PA-IL leichtgradig angefärbt (+). Durch Zugabe von Galaktoselösungen in vier Konzentrationen, wird diese nicht mehr angefärbt (-). Die Lamina propria mucosae wird nur durch PA-IL leicht angefärbt (+). Weder die Lamina muscularis mucosae, die Tela submucosa mit ihrem Bindegewebe, noch die Tunica muscularis werden durch PA-IL oder durch PA-IIL angefärbt (-). Die genannten Strukturen werden ebenfalls nicht durch zusätzliche Galaktoselösungen/Fukoselösungen angefärbt (-). Die Serosa wird jeweils nur durch PA-IL und PA-IIL leicht angefärbt (+). Die Bindegewebssepten werden nur durch PA-IL angefärbt, im Gegensatz zu PA-IIL. Hierbei wird das Bindegewebe durch PA-IIL und durch PA-IIL plus 0,05 M Fukoselösung leichtgradig angefärbt (+). Ab einer Konzentration von 0,1 M Fukoselösung werden das Bindegewebe nicht mehr angefärbt (-). Das Fettgewebe wird durch PA-IL und PA-IIL leicht angefärbt (+), dies bleibt unverändert nach Zugabe der jeweils spezifischen 0,05 M Zuckerlösung (+). Ab der Konzentration von 0,1 M Zuckerlösungen wird das Fettgewebe nicht mehr angefärbt (-).

Ileum

PA-IL färbt die Enterozyten der Mucosa mittelgradig intensiv an (++)), nach Zusatz von 0,05, 0,1 und 0,2 M Galaktoselösung kommt es zu einer leichtgradigen Anfärbung (+). Bei der Konzentration von 0,3 M färben sich die Enterozyten nicht mehr an (-). Die Becherzellen, die neben den Enterozyten die Epithelschicht der

Mucosa bilden und die bindegewebige Lamina propria mucosae, werden durch PA-IL leicht angefärbt (+), ebenso durch Zusatz einer 0,05 und 0,1 M Galaktoselösung (+). Ab der Konzentration von 0,2 M werden die genannten Strukturen nicht mehr angefärbt (-). Ein identisches Färbeverhalten liegt vor für die Lamina propria mucosae, der Tela submucosa, mit in ihr lokalisierten Peyer-Plaques, die Tunica muscularis, der Serosa und das Bindegewebe. Die Lamina muscularis mucosae wird durch keine der durchgeführten Färbungen mit PA-IL angefärbt (-). Das Fettgewebe wird leicht angefärbt durch PA-IL und durch PA-IL plus 0,05 M Galaktoselösung (+). Ab einer Konzentration von 0,1 M, wird das Fettgewebe nicht mehr angefärbt (-).

Die Enterozyten werden durch PA-IIL mittel stark angefärbt (++), ohne Änderung durch Zusatz einer 0,05 M Fukoselösung (++). Bei Konzentrationen von 0,1 und 0,2 M Fukoselösungen kommt es zu einer Abschwächung auf eine leichte Anfärbung (+). Bei einer Konzentration von 0,3 M werden die Enterozyten nicht weiter angefärbt (-). Die folgenden Strukturen weisen das gleiche Färbeverhalten auf und werden daher zusammengefasst: Becherzellen der Mucosa und die Lamina propria mucosae, Tela submucosa mit in ihr liegenden Peyer-Plaques, Tunica muscularis, Binde- und Fettgewebe werden durch PA-IIL leicht angefärbt (+). Durch Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung bleibt das Färbeverhalten (+) unverändert. Ab einer Konzentration von 0,1 M Fukoselösung werden die genannten Strukturen nicht mehr angefärbt (-). Die Lamina muscularis mucosae wird nicht durch PA-IIL bzw. PA-IIL und Fukoselösung angefärbt. Die Serosa färbt sich durch PA-IIL und durch PA-IIL plus Fukoselösungen in den Konzentrationen 0,05 und 0,1 M leichtgradig an (+). Ab der 0,2 M spezifischen Zuckerlösung wird die Serosa nicht mehr angefärbt.

Colon

Die Mucosa zeigt mit den Enterozyten und den Becherzellen für PA-IL und PA-IIL das gleiche Färbeverhalten, es erfolgt eine mittelgradige Anfärbung durch die Lektine (++). Durch Zusatz einer 0,05 M Zuckerlösung wird die Epithelschicht der Mucosa leicht angefärbt (+) und bei der nächst höheren Konzentration von 0,1 M wird sie nicht mehr angefärbt (-). Die Becherzellen werden durch das jeweilige Lektin leichtgradig angefärbt (+), die auch nach Zusatz der 0,05 M jeweils

spezifischen Zuckerlösung nicht verändert wird. Ab der Konzentration von 0,1 M Zuckerlösung werden die Becherzellen nicht mehr angefärbt.

Die Lamina propria mucosae, die Lieberkühn-Krypten bildenden Zellen, das umliegende Bindegewebe und Fettgewebe werden nur durch PA-IL leicht angefärbt (+), durch Zusatz von Galaktoselösungen in den getesteten Konzentrationen kommen diese nicht weiter zur Anfärbung (-). Weder die Lamina muscularis, noch die Tela submukosa werden durch die Färbungen angefärbt (-). Weder die Lamina propriae mucosae, Lamina muscularis mucosae noch die Submucosa werden ausschließlich durch die PA-IIL angefärbt. Nur die in der Submucosa lokalisierten Fettzellen und das Bindegewebe werden durch PA-IIL leichtgradig angefärbt (+).

5.1.2. Histologische Auswertung für PA-IL und PA-IIL mit den HA-Oligosachhariden

Histologische Auswertung der Lektinfärbungen mittels PA-IL und PA-IIL und Zugabe von Oligosachhariden in drei Konzentrationen (unverdünnt, 1:10- und 1:100-Verdünnung). (Siehe Tabelle 8).

Gehörgang

Das Lektin PA-I färbt das mehrschichtige, verhornte Plattenepithel des Gehörganges in einer mittleren Intensität an (++) , dabei kommt es zur gleichmäßigen Anfärbung des Stratum corneum, granulosum und basale. Das gleiche Ergebnis zeigt sich durch Zugabe einer unverdünnten Hyaluronsäure Oligosaccharid-Lösung (HOS-Lösung). Durch Zugabe einer 1:10 verdünnten HOS-Lösung, kommt es zu einer Steigerung der Färbung, das Epithel färbt sich intensiv an (+++). In der 1:100 verdünnten HO-Lösung zeigt sich eine mittelgradige Anfärbung (++) . Das Färbeverhalten der Dermis mit der in ihr lokalisierten Ceruminaldrüsen zeigt sich im Folgenden gleich. Durch PA-IL kommt es zu einer mittleren Anfärbung (++) , durch die unverdünnte HOS-Lösung kommt es zu einer

intensiven Anfärbung (+++). Ebenfalls kann eine intensive Anfärbung durch Zugabe einer 1:10 verdünnten HOS-Lösung dokumentiert werden (+++). Bei der 1:100 verdünnten HOS-Lösung werden die Dermis mit den Ceruminaldrüsen wieder mittelstark angefärbt (++). Das Bindegewebe zeigt durchweg durch alle Färbungen eine mittelstarke Anfärbbarkeit (++).

Das Lektin PA-II färbt die Epidermis einheitlich mittelgradig intensiv an (++). Durch Zugaben von HOS-Lösungen in den drei getesteten Konzentrationen, zeigt sich das gleiche Bild. Es kommt jeweils zu einer leichten Anfärbung der Epidermis (+). Genauso wie die Epidermis zeigt das darunterliegende Bindegewebe das gleiche Färbeverhalten. Die Dermis mit ihren Ceruminaldrüsen färben sich einheitlich in allen durchgeführten Färbungen leichtgradig an (+).

Nasenschleimhaut

Das mehrreihige Flimmerepithel der Tunica mucosa zeigt durch PA-IL eine mittelstarke Färbung (++). Durch Zugabe einer unverdünnten HOS-Lösung kommt es nur zu einer leichten Anfärbung des respiratorischen Epithels (+). Bei der 1:10 und 1:100 verdünnte HOS-Lösung wird das respiratorische Epithel mittelgradig stark angefärbt (++). Die seromukösen Glandulae nasales und die Basalmembran werden durch PA-IL und durch PA-IL plus einer unverdünnten HOS-Lösung leichtgradig anfärben (+). Durch Zugabe einer 1:10 und 1:100 verdünnten HOS-Lösung werden die genannten Strukturen mittelstark angefärbt. Die Tunica submucosa wird durch PA-IL und durch Zugaben von der unverdünnten und der 1:100 verdünnten OS-Lösung jeweils leicht angefärbt (+). Bei der 1:10 verdünnten Lösung kommt es zu einem mittelstarken Farbsignal (++). Das Bindegewebe zeigt durch PA-IL und durch zusätzlicher 1:10 verdünnten HOS-Lösung eine mittelgradige Anfärbung auf (++). Durch Zugabe einer unverdünnten und einer 1:100 verdünnten HOS-Lösung färbt sich das Bindegewebe leichtgradig an (+).

Das respiratorische Epithel wird im Folgenden gleichmäßig angefärbt, es zeigt sich dabei kein Unterschied zwischen dem Flimmerepithel und den schleimbildenden Becherzellen auf. Durch PA-III und bei Zusatz einer 1:10 und einer 1:100 verdünnten HOS-Lösung wird das respiratorische Epithel mittelstark angefärbt (++). Bei der unverdünnten Lösung tritt eine leichte Anfärbbarkeit auf (+). Das gleiche

Färbeverhalten gilt für die Glandulae nasales. Die Basalmembran, die Tunica submucosa und das Bindegewebe, werden durch PA-IIL mittelgradig angefärbt (++) . Bei Zusatz von HOS-Lösungen in den drei analysierte Konzentrationen, werden die genannten Strukturen leichtgradig angefärbt (+).

Lunge

Das Flimmerepithel wird durch das Lektin PA-I mittelstark angefärbt (++) . Auch durch Zusatz der verschieden konzentrierten HOS-Lösungen ändert sich die mittelstarke Anfärbung des Flimmerepithels nicht. Die Becherzellen der Tunica mucosa werden durch PA-IL mittelgradig angefärbt (+). Durch Zugabe der drei verschieden konzentrierten HOS-Lösungen werden die Becherzellen mittelstark angefärbt (++) . Die in der Lamina propria mucosae befindlichen seromukösen Bronchialdrüsen färben sich einheitlich schwach durch PA-IL und zusätzlichen HOS-Lösungen an (+). Die Bronchialdrüsen umgebenden glatten Muskelfasern werden durch PA-IL und der unverdünnten HOS-Lösung mittelstark angefärbt (++) , dagegen kommt es bei der 1:10 und 1:100 verdünnten HOS-Lösung zu einer leichten Anfärbung (+). Keiner der Strukturen der Tunica fibromusculocartilaginea werden durch PA-IL angefärbt. Durch Zugabe von HOS-Lösungen kommt es ebenfalls nicht zur Anfärbung.

PA-IIL färbt das respiratorische Epithel (Flimmerepithel und Becherzellen) der Tunica mucosa mittelgradig intensiv an (++) . Es kommt zu keiner Änderung durch Zugabe einer 1:10 oder 1:100 verdünnten HOS-Lösung (++) . Bei der 1:10 verdünnten HOS-Lösung wird das respiratorische Epithel leichtgradig angefärbt (+). Die Lamina propria mucosae wird durch PA-IIL und durch den Zusatz der unverdünnten HOS-Lösung jeweils leichtgradig angefärbt (+). Bei der 1:10 und 1:100 verdünnten Lösung zeigt sich eine mittelstarke Anfärbbarkeit (++) . Die in der Lamina propria lokalisierten Bronchialdrüsen zeigen ein einheitliches Färbeverhalten. In allen Konstellationen mit PA-IIL und HOS-Lösungen werden diese leichtgradig angefärbt (+). Die glatten Muskelzellen färben sich durch PA-IIL und in den HOS-Konzentrationen: unverdünnt und 1:10 Verdünnung mittelstark an (++) . In der 1:100 verdünnten HOS-Lösung werden die glatten Muskelzellen nur leicht angefärbt (+). Keiner der Strukturen der Tunica fibromusculocartilaginea

werden durch PA-IIL angefärbt. Durch Zugabe von HOS-Lösungen kommt es ebenfalls nicht zur Anfärbung.

5.1.3. Ergebnisse für PA-IL und PA-IIL mit Viscoseal®

Histologische Auswertung der Lektinfärbungen mittels PA-IL und PA-IIL und Zugabe von Viscoseal® in drei Konzentrationen (unverdünnt, 1:10- und 1:100-Verdünnung).

(Siehe Tabelle 9)

Gehörgang

Das Lektin PA-I färbt das mehrschichtige, verhornte Plattenepithel des Gehörganges in einer mittleren Intensität an (++) , dabei wird vor allem das Stratum corneum stark angefärbt. Das Stratum granulosum und basale werden ebenfalls deutlich angefärbt. Durch Zugabe einer unverdünnten Viscoseal®-Lösung färbt sich die Epidermis gleichmäßig intensiv an (+++), in der Viscoseal® 1:10-verdünnten Lösung, schwächt die Anfärbung deutlich ab (+). Bei der 1:100-Verdünnung, nimmt die Farbintensität wieder auf eine mittlere Intensität zu (++) . Das Färbeverhalten der Dermis mit der in ihr lokalisierten apokrinen Ceruminaldrüsen, zeigt sich im Folgenden gleich. Durch PA-IL kommt es zu einer mittleren Anfärbung (++) , durch die unverdünnte Viscoseal®-Lösung kommt es wie zuvor schon die Epidermis, zu einer intensiven Anfärbung (+++). Bei einer 1:10- und 1:100 verdünnten Viscoseal®-Lösung wird die Dermis und die Ceruminaldrüsen jeweils schwach angefärbt (+). Die Basalmembran wird durch PA-IL und durch Zugabe der Viscoseal®-Lösungen in den Konzentrationen 1:10 und 1:100 schwach angefärbt (+). Nur durch Zusatz der unverdünnten Viscoseal®-Lösung kommt es zu einer mittelgradig starken Anfärbung des Bindegewebes (++) .

Das Lektin PA-II färbt die Epidermis gleichmäßig mittelstark an (++) , die unverändert durch Zugabe einer unverdünnten Viscoseal®-Lösung sowie in der Verdünnung 1:10 bestehen bleibt (++) . Bei der 1:100-Verdünnung wird die Epidermis nur schwach angefärbt (+). Die Dermis mit den Ceruminaldrüsen und dem Bindegewebe, zeigen ein gleichmäßiges Färbeverhalten. Durch PA-IIL und Zugabe

einer 1:10 und 1:100 verdünnten Viscoseal®-Lösung kommt es zu einer schwachen Anfärbung der zuvor genannten Strukturen (+). Bei Zugabe der unverdünnten Viscoseal®-Lösung kommt es zu einer mittelgradigen Anfärbung (++).

Nasenschleimhaut

Das mehrreihige Flimmerepithel zeigt eine mittlere Färbung auf(+). Durch Zugabe einer unverdünnten Viscoseal®-Lösung kommt es zu einer intensiven Anfärbung des respiratorischen Epithels (+++). Bei der 1:10 verdünnten Viscoseal®-Lösung wird das respiratorische Epithel schwach angefärbt (+), dagegen kommt es bei der 1:100-verdünnten Lösung zu einem mittleren Farbsignal (++) . Die intraepithelialen seromukösen Glandulae nasales zeigen eine leichte Anfärbung durch PA-IL (+), ebenso bei Zugabe einer 1:10 verdünnten Viscoseal®-Lösung (+). Bei der unverdünnten und bei der 1:100 verdünnten Viscoseal®-Lösung tritt ein mittelstarkes Signal auf (++) . Die darunter liegende Basalmembran wird durch PA-IL, und bei Zusatz einer 1:10 und 1:100 verdünnten Viscoseal®-Lösung schwach angefärbt(+). Nur bei der unverdünnten Viscoseal®-Lösung wird die Basalmembran mittelstark angefärbt (++) . Die Tunica submucosa mit dem Bindegewebe und den elastischen Fasern, zeigt eine schwache Färbung auf (+), ebenso bei den 1:10 und 1:100 verdünnten Viscoseal®-Lösungen (+). Nur bei der unverdünnten Lösung tritt ein intensives Farbsignal auf (+++). Die Glandulae nasales färben sich durch PA-IIL und durch Zugabe einer unverdünnten Viscoseal®-Lösung mittelstark an (++) , bei der 1:10 Verdünnung weisen die Drüsen eine leichte Anfärbung auf (+), die bei der 1:100 Verdünnung nicht mehr nachweisbar ist (-). Durch PA-IIL und bei Zusatz einer unverdünnten und 1:10 verdünnten Viscoseal®-Lösung wird das respiratorische Epithel intensiv angefärbt (+++). Bei der 1:100 verdünnten Lösung tritt eine mittlere Anfärbung auf (++) . Die Basalmembran färbt sich durch PA-IIL und durch Zusatz einer 1:10 und 1:100 verdünnten Viscoseal®-Lösung leichtgradig an (+). Nach Zugabe einer unverdünnten Viscoseal®-Lösung, kann eine mittlere Anfärbung (++) dokumentiert werden. Ein identisches Färbeverhalten kann für die Tunica submucosa und das Bindegewebe verzeichnet werden.

Lunge

Das Flimmerepithel wird durch PA-IL mittelstark angefärbt (++) . Ebenso durch Zugabe unverdünnten Viscoseal®-Lösung (+) . Bei der 1:10 und 1:100 verdünnten Viscoseal®-Lösung wird das respiratorische Epithel leichtgradig angefärbt (+) . Die Becherzellen und die in der Lamina propria mucosae befindlichen seromukösen Bronchialdrüsen färben sich einheitlich schwach durch PA-IL an (+) . Bei Zusatz der unverdünnten Viscoseal®-Lösung kommt es zu einem mittelstarken Farbsignal (++) . Bei der 1:10 und 1:100 verdünnten Lösung werden die genannten Strukturen nur schwach angefärbt (+) . Die Bronchialdrüsen umgebenden glatten Muskelfasern werden durch PA-IL und der 1:10 verdünnten Viscoseal®-Lösung mittelstark angefärbt (++) , dagegen kommt es bei der unverdünnten Lösung zu einer intensiven Anfärbung (+++) . Bei der 1:100 verdünnten Viscoseal®-Lösung färben sich die Muskelfasern nur schwach an (+) . Keiner der Strukturen der Tunica fibromusculocartilaginea werden durch PA-IL angefärbt . Durch Zugabe von Viscoseal®-Lösungen in den drei Konzentrationen, kommt es jeweils zur leichten Anfärbung der drei Bestandteile (+) . Das identische Färbeverhalten liegt bei PA-III und Viscoseal®-Zugaben vor . PA-III färbt das respiratorische Epithel (Flimmerepithel und Becherzellen) der Tunica mucosa mittelgradig intensiv an (++) . Es kommt zu keiner Änderung durch Zugabe einer unverdünnten oder 1:10 verdünnten Viscoseal®-Lösung (++) . Bei der 1:100 verdünnten Lösung wird das respiratorische Epithel leichtgradig angefärbt (+) . Die Lamina propria mucosae, Bronchialdrüsen und die umgebenden glatten Muskelfasern weisen das gleiche Färbeverhalten auf . Die aufgezählten Strukturen werden durch PA-III und durch Zusatz einer 1:100 verdünnten Viscoseal®-Lösung leicht angefärbt (+) . In den unverdünnten und 1:10 verdünnte Viscoseal®-Lösung werde sie mittelstark angefärbt (++) .

5.1.4. Ergebnisse der für PA-IL und PA-IIL und Alginaten

Gehörgang (Tabelle 10)

Das Lektin PA-I färbt das mehrschichtige, verhornte Plattenepithel des Gehörganges in einer mittleren Intensität an (++) . Das gleiche Ergebnis zeigt sich durch Zugabe der vier unverdünnten Alginat-Lösungen (++) . Das Färbeverhalten der Dermis mit der in ihr lokalisierten apokrinen Ceruminaldrüsen zeigt sich im Folgenden gleich. Durch PA-IL kommt es zu einer mittleren Anfärbung (++) , durch die unverdünnten Alginat-Lösungen kommt es ebenfalls zu einer mittleren Anfärbung (++) . Das Bindegewebe zeigt durchweg durch alle Färbungen eine leichte Anfärbbarkeit (+) .

Das Lektin PA-II färbt die Epidermis einheitlich mittelgradig intensiv an (++) . Durch Zugaben von den Alginatlösungen in der unverdünnten Konzentration, wird die Epidermis mit seinen Schichten gleichmäßig jeweils leichtgradig gefärbt (+) .

Das Lektin PA-IIL färbt die Epidermis des Gehörganges mittelstark an (++) . Es zeigt sich das gleiche Ergebnis durch zusätzliche Gabe der vier verschiedenen Alginat-Lösungen. Die Dermis, die Ceruminaldrüsen und das Bindegewebe werden durch PA-IIL und durch zusätzliche Applikation der Alginat-Lösungen nur schwach angefärbt (+) .

Nasenschleimhaut

Das mehrreihige Flimmerepithel und das Bindegewebe werden durch PA-IL und nach Zugabe der Alginat-Lösungen durchweg mittelstark angefärbt (++) . Die Glandulae nasales, die Basalmembran und die Tunica submucosa werden durch PA-IL schwach angefärbt (+) . Keine Änderung des Färbeverhaltens der aufgezählten Strukturen nach Applikation der vier verschiedenen Alginaten.

Das Lektin PA-IIL färbt das mehrreihige Flimmerepithel auch durch Zugabe der getesteten Alginat-Lösungen durchweg intensiv an (+++) . Die Glandulae nasales weisen nach Färbung mit PA-IIL und Alginat-Lösungen ein mittleres Farbsignal auf (++) . Basalmembran, Tunica submucosa und Bindegewebe werden durch PA-IIL und Zugabe der Alginat-Lösungen schwach angefärbt (+) .

Lunge

Das Flimmerepithel der Lunge und die glatten Muskelfasern werde durch das Lektin PA-I mittelstark angefärbt (+). Keine Änderung nach Zugabe der vorliegenden Alginate. Die Becherzellen, Lamina propria und die Bronchialdrüsen werden durch PA-IL schwach angefärbt (+). Dieses Färbeverhalten der Strukturen verändert sich nicht nach Zugabe der Alginate. Nur die Tunica fibromusculocartilaginea wird weder durch PA-IL, noch durch die zusätzliche Applikation der Alginate angefärbt (-).

Das Flimmerepithel mit den schleimbildenden Becherzellen zeigt ein einheitliches Färbeverhalten. Es wird durch PA-IIL mittelstark gefärbt (++)). Durch Zugabe der Alginate kommt es zu keiner Änderung der Farbintensität. Lamina propria, Bronchialdrüsen und glatte Muskelfasern werden durch PA-IIL und Zugabe der Alginate einheitlich schwach angefärbt (+). Auch hier wird die Tunica fibromusculocartilaginea weder durch PA-IL, noch durch die zusätzliche Applikation der Alginate angefärbt (-).

Auf den folgenden Seiten wird die histologische Auswertung in Tabellenform dargestellt, gefolgt von der exemplarischen Fotodokumentation der Immunhistochemischen Färbungen, dargestellt an dem Beispiel des Lungengewebes in Interaktion mit PA-IL/PA-IIL und deren jeweiligen spezifischen inhibitorischen Monosacchariden in den Konzentrationen 0,05, 0,1, 0,2 und 0,3 M.

5.2. Histologische Auswertung der Immunhistochemie in Tabellenform

Tabelle 3: Hautabschnitte unter Zusatz von Pseudomaslektinen PA-IL und PA-IIL und den inhibitorischen Zuckerlösungen in vier Konzentrationen. Histologische Auswertung: (-) keine Anfärbung, (+) schwache Anfärbung, (++) mittelgradige Anfärbung, (+++) intensive Anfärbung.

| | Hautabschnitte | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------|-------------------------|-------|-------|-------|--------|-----------------------|-------|-------|-------|
| | PA-IL | PA-IL + Galaktoselösung | | | | PA-IIL | PA-IIL + Fukoselösung | | | |
| | - | 0,05 M | 0,1 M | 0,2 M | 0,3 M | - | 0,05 M | 0,1 M | 0,2 M | 0,3 M |
| Haut des äußeren Gehörganges | | | | | | | | | | |
| Epidermis | ++ | +++ | ++ | + | - | ++ | ++ | + | + | - |
| Dermis | ++ | ++ | + | - | - | ++ | + | + | - | - |
| Ceruminaldrüsen | ++ | ++ | + | - | - | + | + | - | - | - |
| Bindegewebe | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - |
| Mundschleimhaut | | | | | | | | | | |
| Unverhorntes Plattenepithel | + | + | - | - | - | ++ | + | - | - | - |
| Subkutanes Fettgewebe | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Bindegewebe | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Muskelfaserbündel | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Submucosa mit Drüsen | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Bauchhaut | | | | | | | | | | |
| Epidermis | +++ | +++ | ++ | + | - | +++ | ++ | ++ | + | - |
| Dermis | ++ | + | + | - | - | ++ | ++ | + | + | - |
| Subkutanes Fettgewebe | ++ | ++ | + | + | - | ++ | ++ | ++ | + | - |
| Myoepithelzellen | ++ | + | + | - | - | ++ | ++ | + | - | - |
| Ekrine Schweißdrüsen | ++ | ++ | + | - | - | ++ | ++ | + | - | - |
| Bindegewebe | ++ | + | + | - | - | ++ | + | + | - | - |
| Achselhaut | | | | | | | | | | |
| Epidermis | ++ | + | + | + | - | ++ | ++ | + | - | - |
| Dermis | ++ | + | + | + | - | + | + | + | - | - |
| Subkutanes Fettgewebe | ++ | + | - | - | - | ++ | ++ | + | - | - |
| Holochrine Talgdrüsen | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Ekrine Schweißdrüsen | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Myoepithelzellen | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - |
| Bindegewebe | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - |

Tabelle 4: Atemtrakt unter Zusatz von Pseudomaslektinen PA-IL und PA-IIL und den inhibitorischen Zuckerlösungen in vier Konzentrationen. Histologische Auswertung: (-) keine Anfärbung, (+) schwache Anfärbung, (++) mittelgradige Anfärbung, (+++) intensive Anfärbung.

| Atemtrakt | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-------|-------------------------|-------|-------|-------|--------|-----------------------|-------|-------|-------|
| | PA-IL | PA-IL + Galaktoselösung | | | | PA-IIL | PA-IIL + Fukoselösung | | | |
| | - | 0,05 M | 0,1 M | 0,2 M | 0,3 M | - | 0,05 M | 0,1 M | 0,2 M | 0,3 M |
| Nasenschleimhaut | | | | | | | | | | |
| Mehrrichtige Flimmerepithel | ++ | ++ | + | + | - | +++ | ++ | + | + | - |
| Glandulae nasales | + | + | + | + | - | ++ | ++ | + | + | - |
| Basalmembran | + | + | + | + | - | ++ | ++ | + | + | - |
| Tunica submucosa | + | + | + | + | - | ++ | ++ | + | + | - |
| Bindegewebe | ++ | + | + | + | - | ++ | ++ | + | + | - |
| Trachea | | | | | | | | | | |
| Flimmerepithel | ++ | + | - | - | - | ++ | + | - | - | - |
| Becherzellen | ++ | + | - | - | - | ++ | + | - | - | - |
| L. propria mucosae | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Glandulae tracheales | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Tela submucosa | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Tunica fibromusculocartilaginea | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Tunica adventitia | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Lunge | | | | | | | | | | |
| Flimmerepithel | ++ | ++ | + | + | - | ++ | ++ | + | + | - |
| Becherzellen | + | + | - | - | - | ++ | ++ | + | + | - |
| L. propria mucosae | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Bronchialdrüsen | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Glatte Muskelfasern | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Tunica fibromusculocartilaginea | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tabelle 5: Geschlechtsorgane unter Zusatz von Pseudomaslektinen PA-IL und PA-IIL und den inhibitorischen Zuckerlösungen in vier Konzentrationen. Histologische Auswertung: (-) keine Anfärbung, (+) schwache Anfärbung, (++) mittelgradige Anfärbung, (+++) intensive Anfärbung.

| Geschlechtsorgane | | | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------------------------|-------|-------|-------|--------|-----------------------|-------|-------|-------|
| | PA-IL | PA-IL + Galaktoselösung | | | | PA-IIL | PA-IIL + Fukoselösung | | | |
| | - | 0,05 M | 0,1 M | 0,2 m | 0,3 M | - | 0,05 M | 0,1 M | 0,2 M | 0,3 M |
| Mamma | | | | | | | | | | |
| Stroma | ++ | ++ | + | - | - | + | + | + | - | - |
| Fettzellen | +++ | ++ | ++ | - | - | ++ | + | + | + | - |
| Ductus lacteferi | +++ | ++ | ++ | + | - | ++ | + | + | - | - |
| Myoepithelzellen | ++ | ++ | + | - | - | + | + | + | - | - |
| Intralobuläres Bindegewebe | ++ | ++ | + | + | - | ++ | + | + | - | - |
| Uterus | | | | | | | | | | |
| Epithel | ++ | + | + | - | - | ++ | + | + | - | - |
| Myometrium | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Perimetrium | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Endometrium | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Prostata | | | | | | | | | | |
| Epithel | +++ | ++ | + | - | - | +++ | +++ | ++ | + | - |
| Fibromuskuläres Stroma | ++ | + | + | + | - | + | + | + | - | - |
| Tubuloalveoläre Drüsen | ++ | + | - | - | - | ++ | ++ | + | - | - |

Tabelle 6: Verdauungstrakt Teil 1 unter Zusatz von Pseudomaslektinen PA-IL und PA-IIL und den inhibitorischen Zuckerlösungen in vier Konzentrationen. Histologische Auswertung: (-) keine Anfärbung, (+) schwache Anfärbung, (++) mittelgradige Anfärbung, (+++) intensive Anfärbung.

| Verdauungstrakt Teil 1 | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|-------|-------------------------|-------|-------|-------|--------|-----------------------|-------|-------|-------|
| | PA-IL | PA-IL + Galaktoselösung | | | | PA-IIL | PA-IIL + Fukoselösung | | | |
| | - | 0,05 M | 0,1 M | 0,2 M | 0,3 M | - | 0,05 M | 0,1 M | 0,2 M | 0,3 M |
| Ösophagus | | | | | | | | | | |
| Tunica mucosa mit unverhorntem PE | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Tela submucosa mit Gl. oesophageales | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tunica muscularis | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Magencorpus | | | | | | | | | | |
| Hochprismatisches Epithel | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - |
| Glandulae gastricae | + | + | + | - | - | ++ | + | + | - | - |
| L. propria mucosae | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| L. muscularis mucosae | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Tela submucosa | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Tunica muscularis | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Serosa | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Duodenum | | | | | | | | | | |
| Mukosa | + | + | - | - | - | ++ | + | + | + | - |
| Submukosa | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Glandulae duodenales | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Bindegewebe | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Serosa | + | + | - | - | - | ++ | + | - | - | - |
| Jejunum | | | | | | | | | | |
| Enterozyten | ++ | ++ | ++ | ++ | - | ++ | ++ | ++ | ++ | - |
| Becherzellen | ++ | ++ | ++ | + | - | ++ | ++ | ++ | + | - |
| L. propria mucosae | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L. muscularis mucosae | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tela submucosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tunica muscularis | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Serosa | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Bindegewebssepten | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Fettgewebe | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - |

Tabelle 7: Verdauungstrakt Teil 2 unter Zusatz von Pseudomaslektinen PA-IL und PA-IIL und den inhibitorischen Zuckerlösungen in vier Konzentrationen. Histologische Auswertung: (-) keine Anfärbung, (+) schwache Anfärbung, (++) mittelgradige Anfärbung, (+++) intensive Anfärbung.

| Verdauungstrakt | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------|-------------------------|-------|-------|-------|--------|-----------------------|-------|-------|-------|
| | PA-IL | PA-IL + Galaktoselösung | | | | PA-IIL | PA-IIL + Fukoselösung | | | |
| | - | 0,05 M | 0,1 M | 0,2 M | 0,3 M | - | 0,05 M | 0,1 M | 0,2 M | 0,3 M |
| Ileum | | | | | | | | | | |
| Enterozyten | ++ | + | + | + | - | ++ | ++ | + | + | - |
| Becherzellen | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - |
| L. propria mucosae | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - |
| L. muscularis mucosae | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tela submucosa | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - |
| Tunica muscularis | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - |
| Serosa | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - |
| Bindegewebe | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - |
| Fettgewebe | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Colon | | | | | | | | | | |
| Enterozyten | ++ | + | - | - | - | ++ | + | - | - | - |
| Becherzellen | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - |
| L. propria mucosae | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L. muscularis mucosae | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Krypten | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tela submukosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bindegewebe | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Fettgewebe | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |

Tabelle 8: Hyaluronsäure Oligosaccharide in drei Konzentrationen und Pseudomonaslektine PA-IL und PA-IIL.

Histologische Auswertung: (-) keine Anfärbung, (+) schwache Anfärbung, (++) mittelgradige Anfärbung, (+++) intensive Anfärbung.

| | PA-IL | PA-IL+Hyaluronsäure Oligosaccharide | | | PA-IIL | PA-IIL+Hyaluronsäure Oligosaccharide | | |
|-----------------------------------|-------|-------------------------------------|------|-------|--------|--------------------------------------|------|-------|
| | - | unverdünnt | 1:10 | 1:100 | - | unverdünnt | 1:10 | 1:100 |
| Haut des äußeren Gehörgang | | | | | | | | |
| Epidermis | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | + | + | + |
| Dermis | ++ | +++ | +++ | ++ | + | + | + | + |
| Ceruminale Drüsen | ++ | +++ | +++ | ++ | + | + | + | + |
| Bindegewebe | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + |
| Nasenschleimhaut | | | | | | | | |
| Mehrschichtiges Flimmerepithel | ++ | + | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| Glandulae nasales | + | + | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| Basalmembran | + | + | ++ | ++ | ++ | + | + | + |
| Tunica submucosa | + | + | ++ | + | ++ | + | + | + |
| Bindegewebe | ++ | + | ++ | + | ++ | + | + | + |
| Lunge | | | | | | | | |
| Flimmerepithel | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| Becherzellen | + | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| Lamina propria | + | ++ | + | ++ | + | + | ++ | ++ |
| Bronchialdrüsen | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Glatte Muskelfasern | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | + |
| Tunica fibromusculocartilaginea | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tabelle 9: Hyaluronsäure Viscoseal® in drei Konzentrationen und Pseudomonaslektine PA-IL und PA-IIL.

Histologische Auswertung: (-) keine Anfärbung, (+) schwache Anfärbung, (++) mittelgradige Anfärbung, (+++) intensive Anfärbung.

| | PA-IL | PA-IL+Viscoseal® | | | PA-IIL | PA-IIL+Viscoseal® | | |
|-----------------------------------|-------|------------------|------|-------|--------|-------------------|------|-------|
| | - | unverdünnt | 1:10 | 1:100 | - | unverdünnt | 1:10 | 1:100 |
| Haut des äußeren Gehörgang | | | | | | | | |
| Epidermis | ++ | +++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| Dermis | ++ | +++ | + | + | + | ++ | + | + |
| Ceruminalsekret | ++ | +++ | + | + | + | ++ | + | + |
| Bindegewebe | + | ++ | + | + | + | ++ | + | + |
| Nasenschleimhaut | | | | | | | | |
| Mehrschichtiges Flimmerepithel | ++ | +++ | + | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ |
| Glandulae nasales | + | ++ | + | ++ | ++ | ++ | + | - |
| Basalmembran | + | ++ | + | + | + | ++ | + | + |
| Tunica submucosa | + | +++ | + | + | + | ++ | + | + |
| Bindegewebe | + | +++ | + | + | + | ++ | + | + |
| Lunge | | | | | | | | |
| Flimmerepithel | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | + |
| Becherzellen | + | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | + |
| Lamina propria | + | ++ | + | + | + | ++ | ++ | + |
| Bronchialdrüsen | + | ++ | + | + | + | ++ | ++ | + |
| Glatte Muskelfasern | ++ | +++ | ++ | + | + | ++ | ++ | + |
| Tunica fibromusculocartilaginea | - | + | + | + | - | + | + | + |

Tabelle 10: Alginate und Pseudomonaslektine PA-IL und PA-III

Alginat SG81 wurde aus einem mucoiden *Pseudomonas aeruginosa* Stamm aus einem Fleischereiabfluss gewonnen

Alginat Manuacol LB ist ein Braunalgenalginat

Alginat FRD1153 ist ein mucoider *Pseudomonas aeruginosa* Stamm eines Patienten mit Cystischer Fibrose

Alginat FRD1 ist ein Stamm mit einem Defekt der O-Acetylierung

Histologische Auswertung: (-) keine Anfärbung, (+) schwache Anfärbung, (++) mittelgradige Anfärbung, (+++) intensive Anfärbung.

| | PA-IL | PA-IL+ Alginate | | | | PA-III | PA-III+ Alginate | | | |
|-------------------------------------|-------|-----------------|-------------|---------|------|--------|------------------|-------------|---------|------|
| | - | SG81 | Manuacol LB | FRD1153 | FRD1 | - | SG81 | Manuacol LB | FRD1153 | FRD1 |
| Haut des äußeren Gehörganges | | | | | | | | | | |
| Epidermis | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Dermis | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + | + |
| Ceruminaldrüsen | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + | + |
| Bindegewebe | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Nasenschleimhaut | | | | | | | | | | |
| Mehrschichtiges Flimmerepithel | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Glandulae nasales | + | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Basalmembran | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tunica submucosa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Bindegewebe | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + | + |
| Lunge | | | | | | | | | | |
| Flimmerepithel | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Becherzellen | + | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Lamina propria | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Bronchialdrüsen | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Glatte Muskelfasern | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + | + |
| Tunica fibromusculocartilaginea | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

5.3. Fotos der Immunhistochemie, Lungengewebe PA-IL und PA-IIL mit Fukose und Galaktose

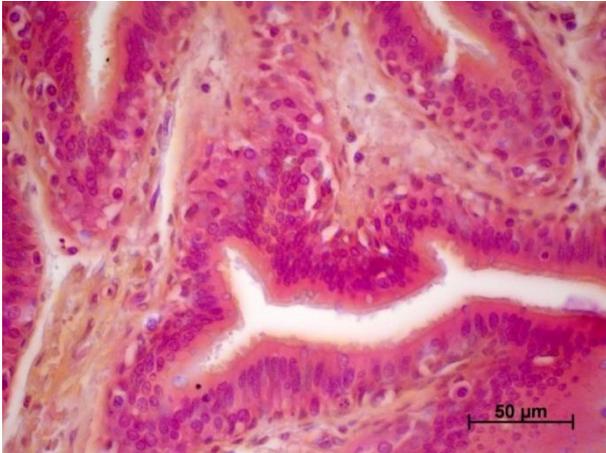


Abbildung 10: Lungengewebe mit PA-IL in der Lektin histochemie, Lichtmikroskopie 20X/0,50 Vergrößerung. Siehe zur histologischen Auswertung Tabelle 4.

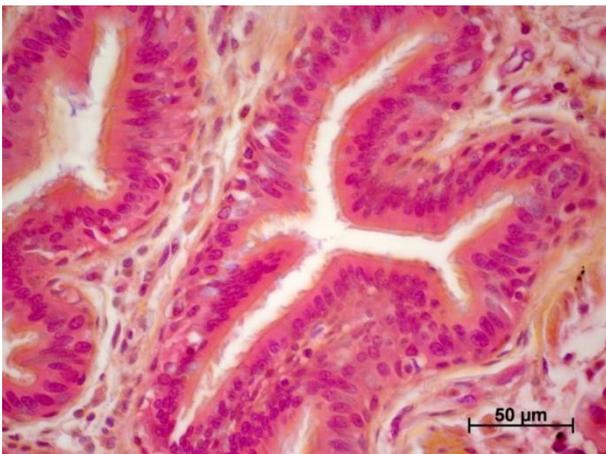


Abbildung 11: Lungengewebe mit PA-IL plus Zugabe einer 0,05 M Galaktoselösung, Lichtmikroskopie 20X/0,50 Vergrößerung. Siehe zur histologischen Auswertung Tabelle 4.

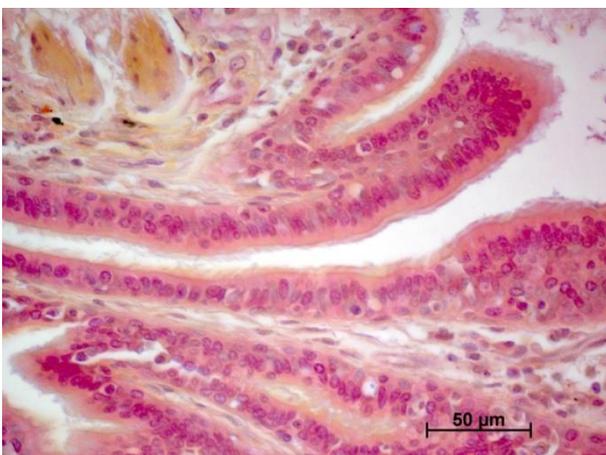


Abbildung 12: Lungengewebe mit PA-IL plus Zugabe einer 0,1 M Galaktoselösung, Lichtmikroskopie 20X/0,50 Vergrößerung. Siehe zur histologischen Auswertung Tabelle 4.

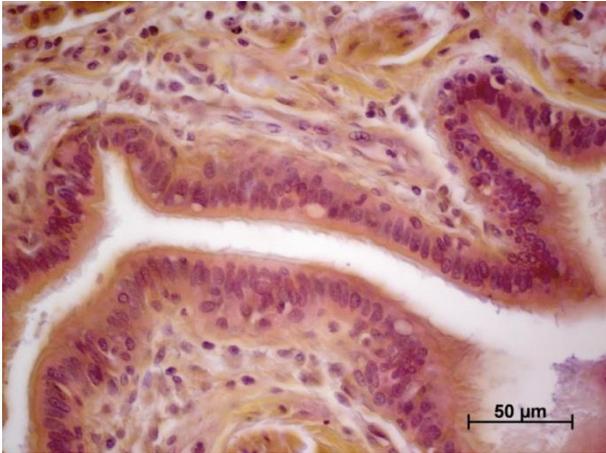


Abbildung 13: Lungengewebe mit PA-IL plus Zugabe einer 0,2 M Galaktoselösung, Lichtmikroskopie 20X/0,50 Vergrößerung. Siehe zur histologischen Auswertung Tabelle 4.

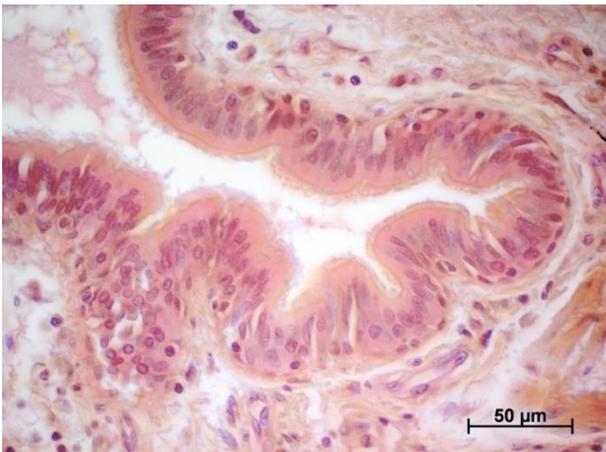


Abbildung 14: Lungengewebe mit PA-IL plus Zugabe einer 0,2 M Galaktoselösung, Lichtmikroskopie 20X/0,50 Vergrößerung. Siehe zur histologischen Auswertung Tabelle 4.

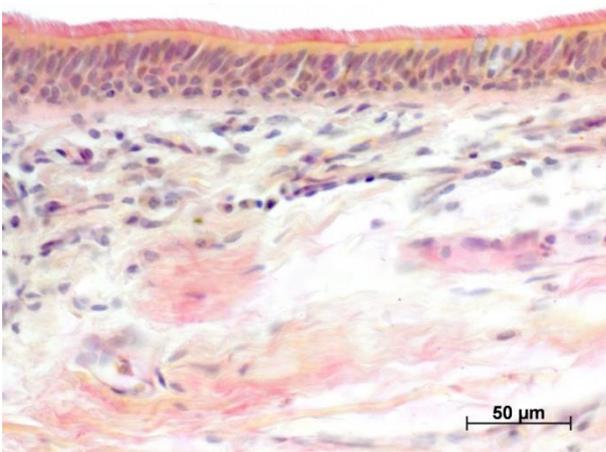


Abbildung 15: Lungengewebe mit PA-IIL in der Lichtmikroskopie, 20X/0,50 Vergrößerung. Siehe zur histologischen Auswertung Tabelle 4.

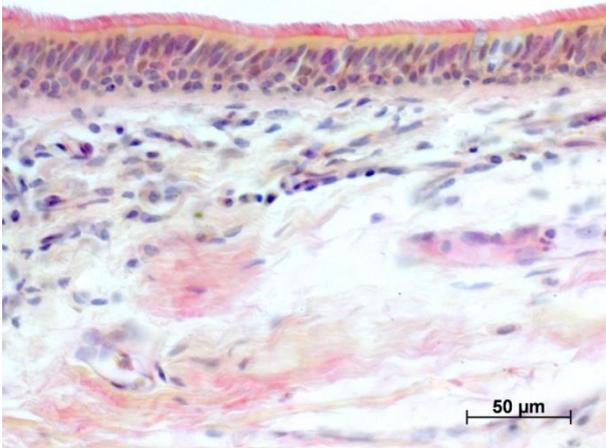


Abbildung 16: Lungengewebe mit PA-IIL plus Zugabe einer 0,05 M Fukoselösung in der Lichtmikroskopie, 20X/0,50 Vergrößerung. Siehe zur histologischen Auswertung Tabelle 4

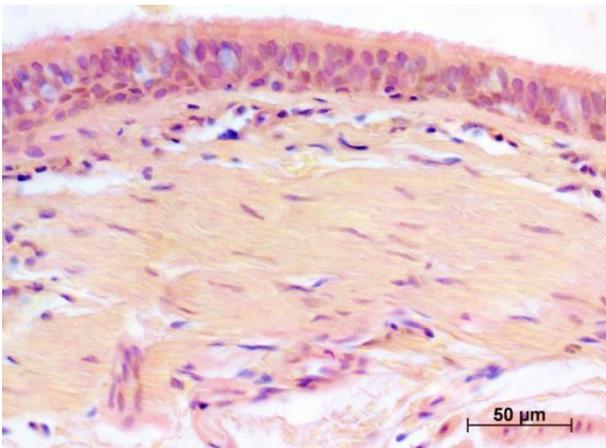


Abbildung 17: Lungengewebe mit PA-IIL plus Zugabe einer 0,01 M Fukoselösung in der Lichtmikroskopie, 20X/0,50 Vergrößerung. Siehe zur histologischen Auswertung Tabelle 4

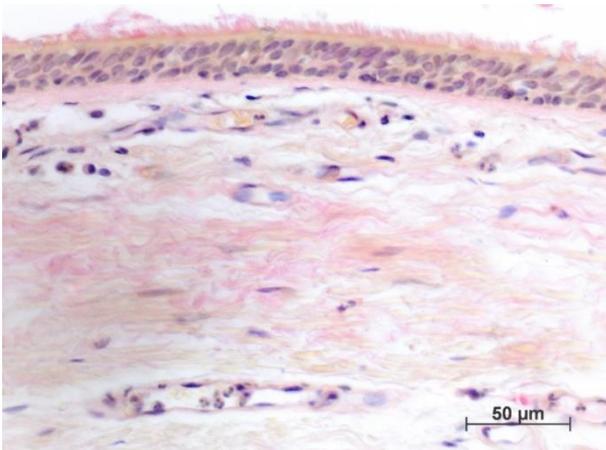


Abbildung 18: Lungengewebe mit PA-IIL plus Zugabe einer 0,02 M Fukoselösung in der Lichtmikroskopie, 20X/0,50 Vergrößerung. Siehe zur histologischen Auswertung Tabelle 4

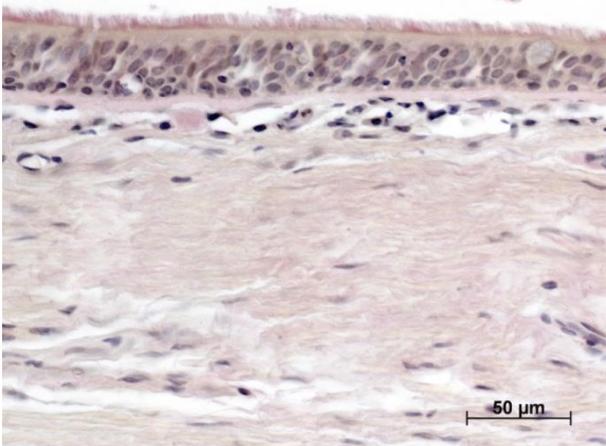


Abbildung 19: Lungengewebe mit PA-IIL plus Zugabe einer 0,02 M Fukoselösung in der Lichtmikroskopie, 20X/0,50 Vergrößerung. Siehe zur histologischen Auswertung Tabelle 4

5.4. Ergebnisteil der Zilienschlagfrequenz Messung

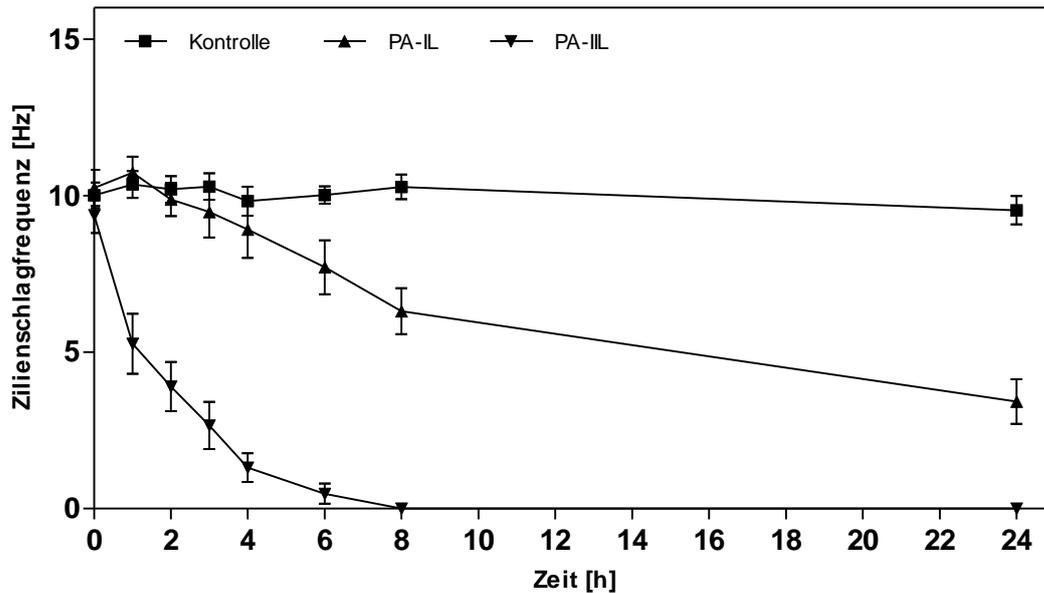


Abbildung 20: Zilienschlagfrequenz humaner Atemwegsepithelien in vitro nach Zugabe von 10 µg/ml PA-IL (▲) und bzw. 10 µg/ml PA-IIL (▼). Kontrolle mit RPMI-Nährmedium (■). PA-IL reduziert im Vergleich zur Kontrolle den Zilienschlag nach 24 Stunden von 9,52 Hz auf 3,42 Hz und ist weniger ziliotoxisch als PA-IIL, das bereits nach 8 Stunden zu einem völligen Sistieren des Zilienschlages führt.

PA-IL senkt zum Zeitpunkt 6 Stunden signifikant den Zilienschlag im Vergleich zur Kontrolle von 10,1 Hz auf 7,7 Hz um 2,4 Hz ($p < 0,001$), zum Zeitpunkt 8 Stunden wird der Zilienschlag von 10,3 auf 6,3 Hz um 4,0 Hz signifikant ($p < 0,0001$) reduziert und zum Zeitpunkt 24 Stunden von 9,5 auf 3,4 Hz um 6,1 Hz ($p < 0,0001$). Das bekannt toxischere PA-IIL (Mewe *et al.*, 2005, Gustke *et al.*, 2012) senkt bereits ab den Zeitpunkt von 1 Stunde signifikant ($p < 0,0001$) den Zilienschlag von 9,8 auf 5,3 Hz um 4,5 Hz, bei allen folgenden Messungen bleibt die hohe Signifikanz bestehen. Zum Zeitpunkt von 8 Stunden kann kein Zilienschlag mehr nachgewiesen werden.

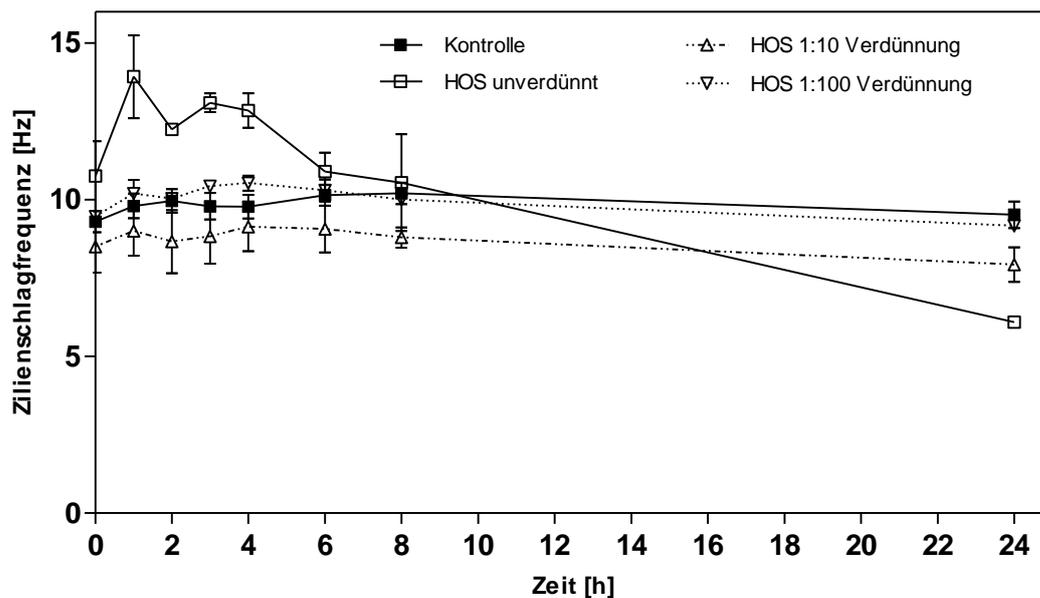


Abbildung 21: Wirkstoffkontrollen mit Hyaluronsäure Oligosachharide (HOS) in drei Konzentrationen, unverdünnt (\square), 1:10 Verdünnung (Δ) und 1:100 Verdünnung (∇) mit Kontrolle (\blacksquare).

Die unverdünnte HOS zeigen zu den Zeitpunkten 1 (Zunahme von 9,8 Hz auf 13,9 Hz um 4,1 Hz, $p < 0,05$) und 3 Stunden (Zunahme von 9,8 auf 13,1 Hz um 3,3 Hz, $p < 0,001$), eine signifikante Zunahme der CBF und zum Zeitpunkt 24 Stunden wiederum einen signifikanten Abfall von 9,5 auf 6,1 Hz um 3,4 Hz ($p < 0,05$). Die Verdünnungen 1:10 und 1:100 der HOS zeigen zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung der Zilienschlagfrequenz.

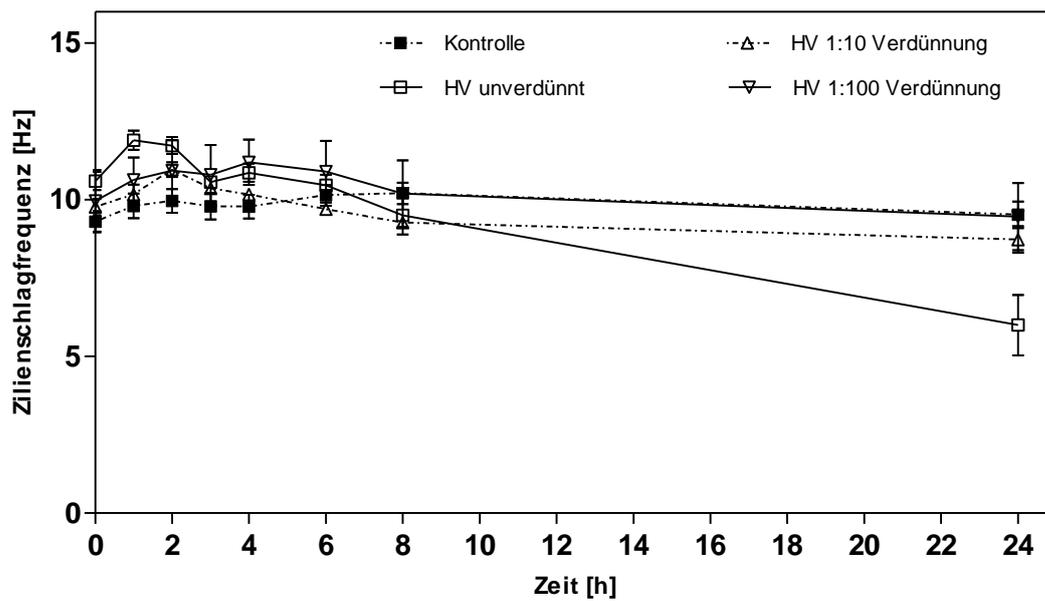


Abbildung 22: Wirkstoffkontrollen mit Hyaluronsäure Viscoseal® (HV) in drei Konzentrationen, unverdünnt (□), 1:10 Verdünnung (Δ) und 1:100 (▽) mit Kontrolle (■).

Die Hyaluronsäure Viscoseal® zeigen in drei verschiedenen Konzentrationen, zu allen gemessenen Zeitpunkten, keine signifikante Änderung der CBF. Lediglich die unverdünnte Konzentration der Hyaluronsäure Viscoseal® zeigt zum Zeitpunkt 24 Stunden einen signifikanten Abfall ($p=0,001$) der Zilienschlagfrequenz von 9,5 auf 6 Hz um 3,5 Hz.

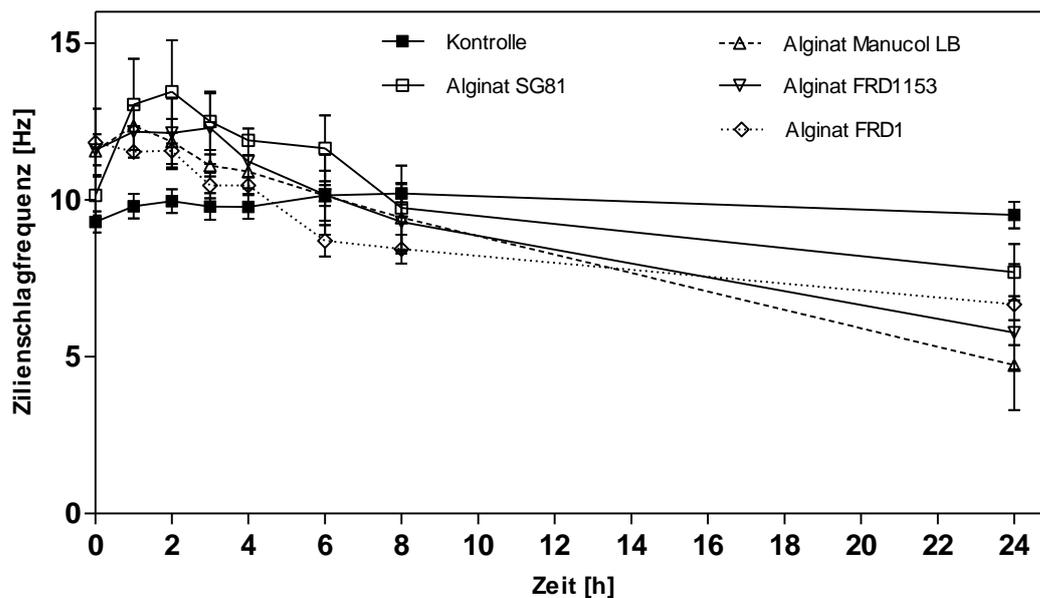


Abbildung 23: Wirkstoffkontrollen der Alginate, Alginat SG81 (□), Alginat Manucol LB (Δ), Alginat FRD1153 (▽), Alginat FRD1(◇) in jeweils einer Konzentration mit Kontrolle (■).

Zum Zeitpunkt 0h erhöhen das Alginat Manucol LB (von 9,3 auf 11,6 Hz um 2,3 Hz), Alginat FRD1153 (von 9,3 auf 11,57 um 2,3 Hz) und FRD1 (von 9,3 auf 11,8 Hz um 2,5 Hz) den Zilienschlag signifikant ($p < 0,05$), dagegen beeinflusst das Alginat SG81 den Zilienschlag zum Zeitpunkt 0 Stunde nicht. Zum Zeitpunkt 1 Stunde wird die CBF nur signifikant erhöht durch Alginat SG81 (von 9,8 auf 11,8 Hz um 3,3 Hz, $p < 0,05$) und Alginat Manucol LB (von 9,8 auf 12,4 Hz um 2,6 Hz, $p < 0,05$). Im Zeitverlauf zwischen 3 und 8 Stunden kommt es zu keiner signifikanten Änderung der Zilienschlagfrequenz. Erst zum Zeitpunkt von 24h kommt es zu einem signifikanten Abfall der CBF durch das Alginat Manucol LB (von 9,5 auf 4,7 Hz um 4,8 Hz, $p < 0,001$) und das Alginat FRD1153 von 9,5 auf 5,7 Hz um 3,8 Hz ($p < 0,05$).

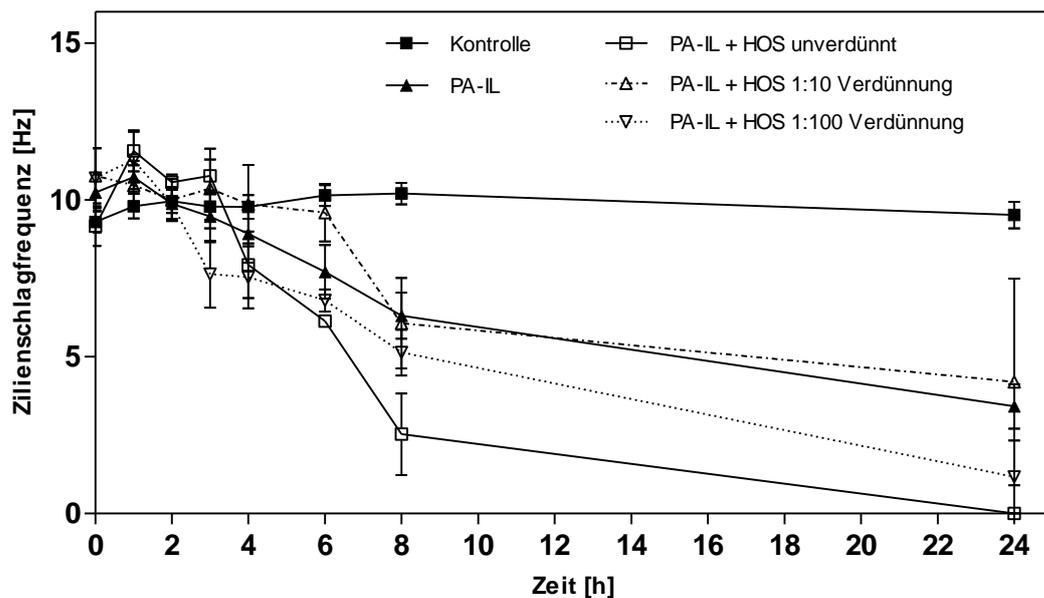


Abbildung 24: PA-IL alleine (▲) und mit Zusatz von Hyaluronsäure Oligosaccharide (HOS) in drei Konzentrationen, PA-IL + unverdünnt HOS (□), PA-IL + 1:10 Verdünnung (△) und PA-IL + 1:100 Verdünnung (▽) mit Kontrolle (■).

PA-IL alleine senkt den Zilienschlag signifikant ab den Zeitpunkt von 6 Stunden im Vergleich zu der Kontrolle mit RPMI-Nährmedium (Abfall von 10,1 auf 7,7 Hz um 2,4 Hz, $p < 0,001$). Zu diesem Zeitpunkt senken PA-IL unter dem Zusatz von HOS unverdünnt (Abfall um 4,0 Hz, $p < 0,001$) sowie in der 1:100 Verdünnung (Abfall um 3,3 Hz, $p < 0,05$) ebenfalls signifikant die CBF. Zur Stunde 8 und 24h bewirken alle untersuchten Wirkstoffe einen signifikanten Abfall der CBF. Dabei Zum Zeitpunkt von 8 Stunden senkt PA-IL alleine (um 3,9 Hz, $p < 0,0001$), PA-IL + HOS unverdünnt (um 7,7 Hz, $p < 0,0001$) und PA-IL + HOS 1:100 Verdünnung (5,1 Hz, $p < 0,0001$) und PA-IL + HOS 1:10 (4,1 Hz, $p < 0,001$) signifikant den Zilienschlag. Zum Zeitmesspunkt von 8 Stunden besteht ein signifikanter Unterschied (Abfall um 3,8 Hz, $p < 0,05$) zwischen der Herabsetzung der CBF, zwischen PA-IL ohne Zugabe eines Wirkstoffes und PA-IL und der unverdünnten HOS. Sowohl PA-IL und PA-IL + HOS in drei Konzentrationen senken den Zilienschlag, dabei reduziert vor allem die Konzentration der unverdünnten HOS den Zilienschlag stärker als PA-IL alleine und ist somit toxischer für die Zilien.

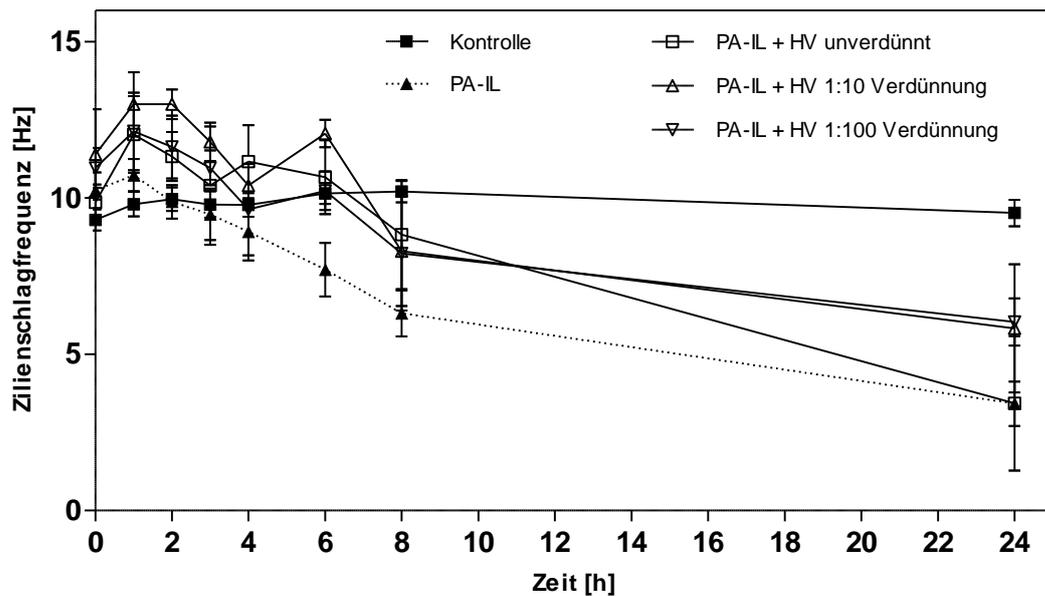


Abbildung 25: PA-IL alleine (▲) und mit Zusatz von Hyaluronsäure Viscoseal® (HV) in drei Konzentrationen, PA-IL + HOS unverdünnt (□), PA-IL + 1:10 Verdünnung (△) und PA-IL + 1:100 Verdünnung (▽) mit Kontrolle (■).

Zum Zeitpunkt von einer 1 und von 2 Stunden erhöht PA-IL + HV in der Verdünnung 1:10 den Zilienschlag signifikant (zur Stunde 1 Erhöhung um 3,2 Hz, zur Stunde 2 Erhöhung der CBF um 3,0 Hz, Signifikanz somit zu beiden Zeitpunkten jeweils $p < 0,05$). Ab den Zeitpunkt von 6 Stunden senkt PA-IL signifikant den Zilienschlag um 2,4 Hz ($p < 0,001$) und ab den Zeitpunkt von 8 Stunden mit einer Signifikanz von $p < 0,0001$ (Abfall der CBF um 4,0 Hz). Zum Zeitpunkt der 24 Stundenmessung senken PA-IL (Abfall der CBF um 6,1 Hz, $p < 0,0001$) und PA-IL + unverdünnte HV (Abfall um 6,1 Hz, $p < 0,0001$) die CBF signifikant sowie PA-IL + 1:10 Verdünnung der HV (Abfall um 3,5 Hz, $p < 0,05$).

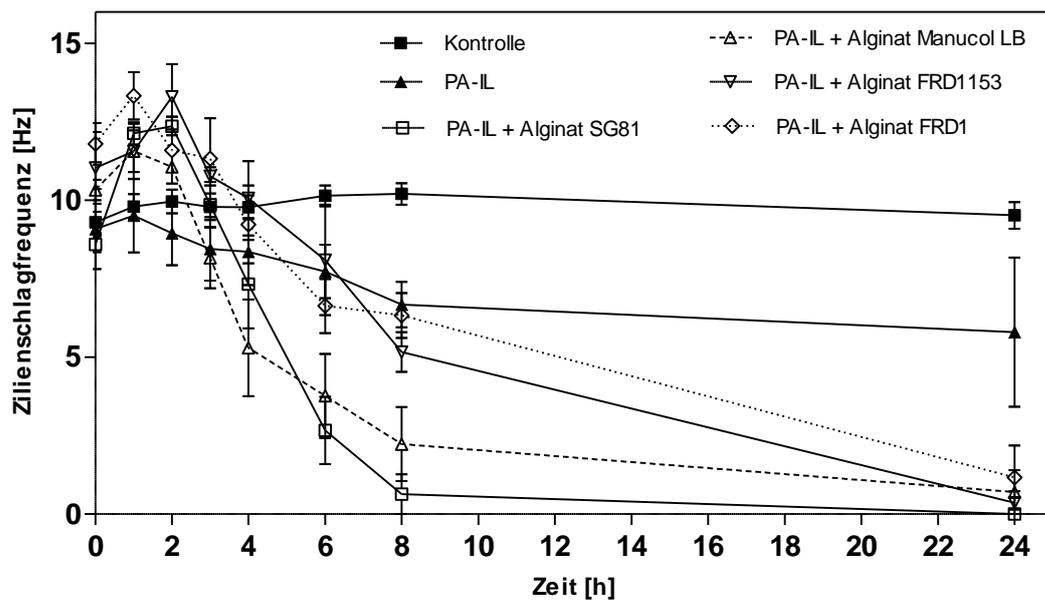


Abbildung 26: PA-IL alleine (▲) und mit Zusatz von PA-IL + Alginat SG81 (◻), PA-IL + Alginat Manucol LB (△), PA-IL + Alginat FRD1153 (▽), PA-IL + Alginat FRD1(◇) in jeweils einer Konzentration mit Kontrolle (■).

Zum Zeitpunkt 1 erhöht der Zusatz Alginat FRD1 zum PA-IL, den Zilienschlag signifikant um 3,5 Hz ($p < 0,001$). Zum Zeitpunkt 2 erhöht PA-IL und der Zusatz von Alginat FRD1153 die CBF um 3,3 Hz ($p < 0,001$). Zur Stunde 4 senkt PA-IL + Alginat Manucol LB die CBF signifikant um 4,5 Hz ($p < 0,001$). Zum Zeitpunkt 6 Stunden senken PA-IL (Abfall um 2,4 Hz, $p < 0,05$), PA-IL + Alginat FRD1 (Abfall um 3,5 Hz $p < 0,05$) den Zilienschlag signifikant. Ebenso PA-IL + Alginat SG81 (Abfall um 7,5 Hz, $p < 0,0001$) und Manucol LB (Abfall um 6,4 Hz, $p < 0,0001$). Zur Stunde 8 senken PA-IL den Zilienschlag um 3,9 Hz ($p < 0,0001$) und PA-IL + Alginat SG81 (Abfall um 9,6 Hz, $p < 0,0001$), + Manucol LB, FRD1153 (Abfall um 8,0 Hz, $p < 0,0001$) die CBF und PA-IL + Alginat FRD1 (Abfall um 3,9 Hz, $p < 0,001$). Zum Zeitpunkt von 24 Stunden senken alle untersuchten Wirkstoffe den Zilienschlag signifikant ($p < 0,0001$). Ab den Zeitpunkt von 8 Stunden senken die vier untersuchten Alginat zusätzlich zu, PA-IL stärker den Zilienschlag, als PA-IL alleine. Somit kann eine stärkere Toxizität angenommen werden.

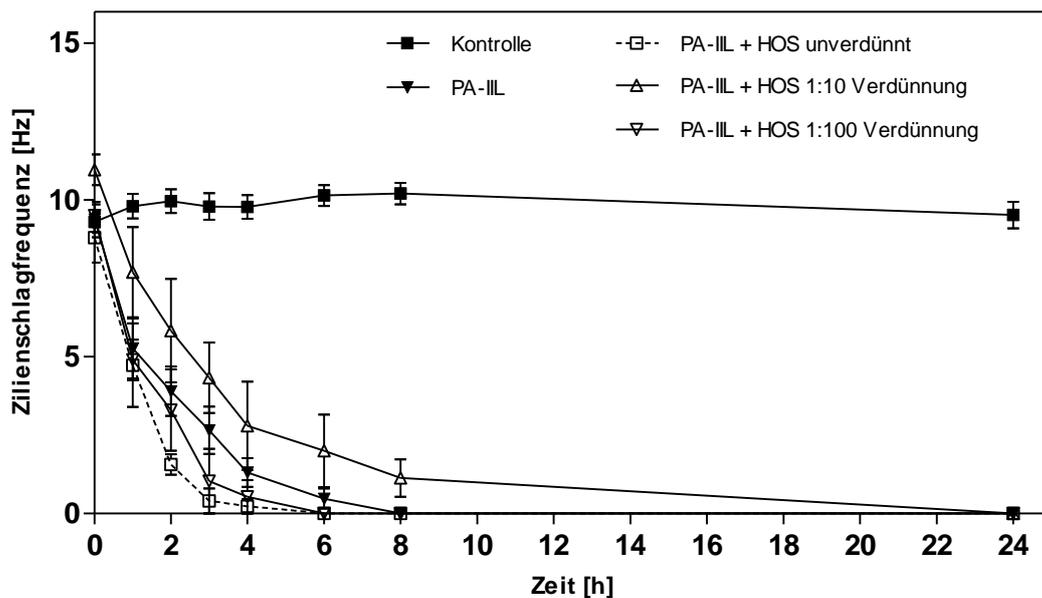


Abbildung 27: PA-IIL alleine (▲) und mit Zusatz von Hyaluronsäure Oligosaccharide (HOS) in drei Konzentrationen, PA-IIL + unverdünnt HOS (□), PA-IIL + 1:10 Verdünnung (△) und PA-IIL + 1:100 Verdünnung (▽) mit Kontrolle (■).

Zum Zeitpunkt von 1 Stunde zeigt PA-IIL einen signifikanten Abfall der CBF um 4,5 Hz ($p < 0,0001$), ebenso wie PA-IIL + HOS unverdünnt mit einem Abfall um 5,1 Hz ($p < 0,001$) und PA-IIL + 1:100 Verdünnung mit einem Abfall um 4,9 Hz ($p < 0,001$). Zum Zeitpunkt von 2 Stunden zeigen alle untersuchten Kombinationen einen signifikanten Abfall der CBF, dabei PA-IIL mit einem Abfall um 6,1 Hz, ($p < 0,0001$), PA-IIL + HOS unverdünnt mit einem Abfall um 8,4 Hz ($p < 0,0001$), PA-IIL + HOS 1:100 Verdünnung mit einem Abfall um 5,5 Hz ($p < 0,0001$) und PA-IIL + HOS 1:10 Verdünnung mit einem Abfall der CBF um 4,1 Hz ($p < 0,001$). Ab den Messzeitpunkt von drei Stunden, führen alle getesteten Wirkstoffe zu einem hochsignifikanten Abfall der CBF ($p < 0,0001$). Dabei zeigen die unverdünnte HOS (Abnahme um 9,4 Hz, $p < 0,0001$) und die HOS 1:100 Verdünnung (Abnahme um 7,4 Hz, $p < 0,0001$) einen jeweils stärkeren Abfall der CBF im Vergleich zu PA-IIL alleine (7,1 Hz, $p < 0,0001$) und weisen somit eine größere Toxizität auf. Die 1:10 Verdünnung der HOS zusätzlich zum PA-IIL zeigt vor dem Zeitpunkt 24 Stunden keinen signifikanten Zunahme der Zilienschlagfrequenz, sie senkt allerdings weniger stark die CBF, nämlich um 9,1 Hz zum Zeitpunkt 8 Stunden, als die anderen beiden untersuchten Verdünnungen führen zu einem nicht mehr nachweisbarem Zilienschlag 0 Hz.

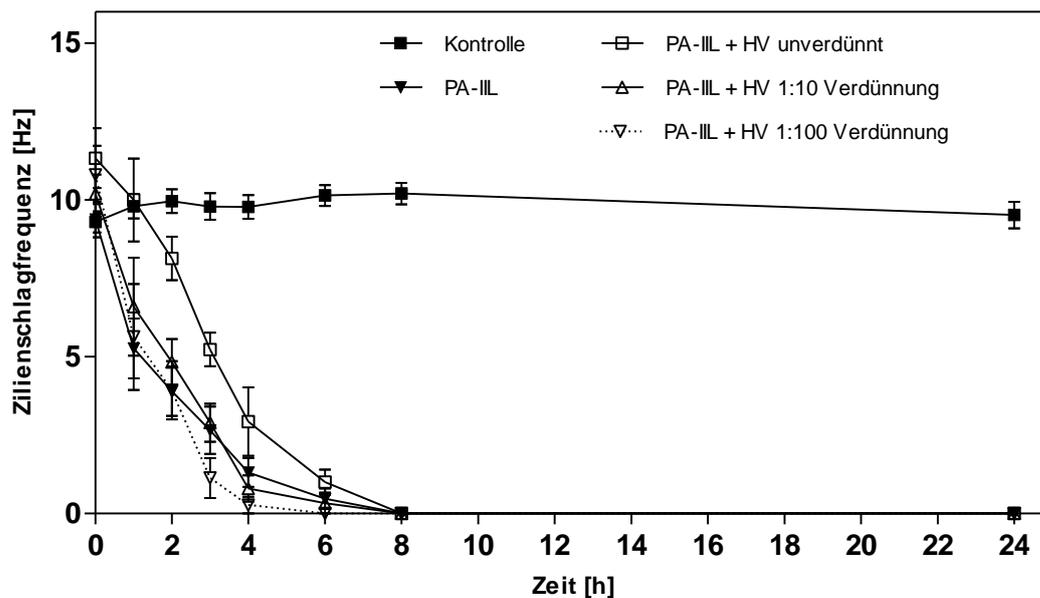


Abbildung 28: PA-IIL alleine (▲) und mit Zusatz von Hyaluronsäure Viscoseal® (HV) in drei Konzentrationen, PA-IIL + HOS unverdünnt (□), PA-IIL + 1:10 Verdünnung (△) und PA-IIL + 1:100 Verdünnung (▽) mit Kontrolle (■).

Zum Zeitpunkt 1 Stunde, senkt PA-IIL den Zilienschlag hochsignifikant um 4,5 Hz ($p < 0,0001$) und PA-IIL + 1:100 Verdünnung um 4,2 Hz signifikant ($p < 0,05$). Zum Zeitpunkt 2 Stunden senken PA-IIL (um 6,1 Hz), PA-IIL + HV 1:10 Verdünnung (um 5,1 Hz) und PA-IIL + 1:100 Verdünnung (um 5,4 Hz) die CBF hochsignifikant (jeweils dabei $p < 0,0001$). Ab den Zeitpunkt von 3 Stunden senken alle untersuchten Wirkstoffkombinationen den Zilienschlag hochsignifikant ($p < 0,0001$). Zum Hierbei senken die 1:10 Verdünnung und die 1:100 Verdünnung zusätzlich zum PA-IIL den Zilienschlag stärker bis vor dem Zeitpunkt von 8 Stunden als PA-IIL alleine und wirken somit toxischer auf das Flimmerepithel des Atemtraktes. Zum Zeitpunkt von 4 Stunden senkt PA-IIL alleine die CBF um 8,5 Hz, während PA-IIL + HV 1:10 Verdünnung die CBF um 9,0 Hz senkt und PA-IIL + 1:100 Verdünnung um 9,5 Hz. Am geringsten senkt zu diesem Zeitpunkt PA-IIL unter dem Zusatz der unverdünnten HV Zugabe den Zilienschlag um 6,8 Hz, hierbei besteht allerdings kein signifikanter Unterschied zu den anderen getesteten Konzentrationen und zu PA-IIL ohne Zusatz.

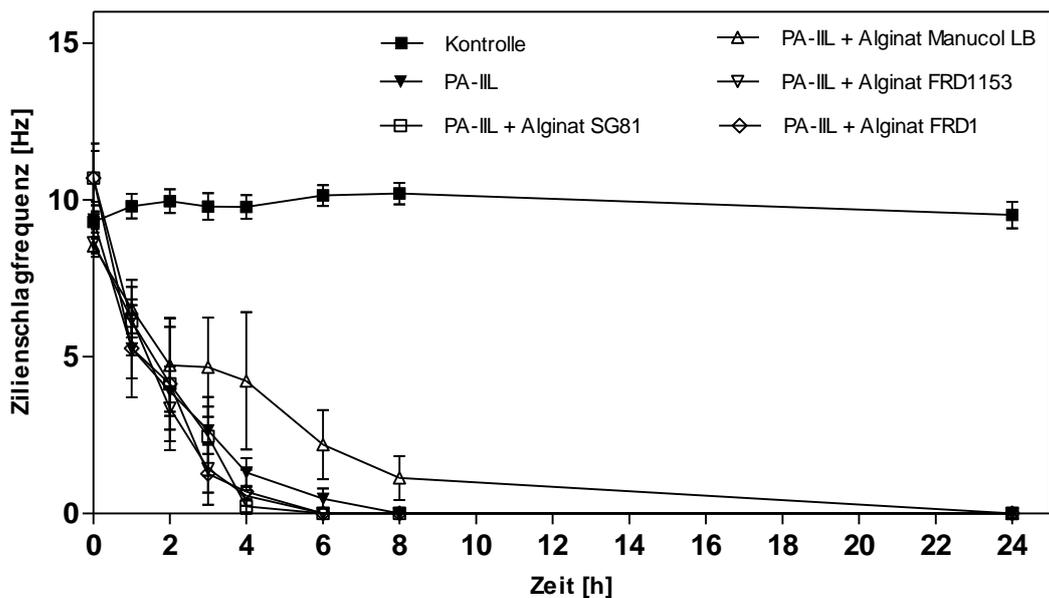


Abbildung 29: PA-III alleine (▲) und mit Zusatz von PA-III + Alginat SG81 (□), PA-III + Alginat Manucol LB (△), PA-III + Alginat FRD1153 (▽), PA-III + Alginat FRD1 (◇) in jeweils einer Konzentration mit Kontrolle (■).

Zum Zeitpunkt von 1 Stunde senkt PA-III hochsignifikant den Zilienschlag um 4,5 Hz ($p < 0,0001$), PA-III + Alginat SG81 um 3,67 Hz ($p < 0,05$) und PA-III + Alginat FRD1153 um 3,6 Hz signifikant ($p < 0,05$) und PA-III + Alginat FRD1 um 4,5 Hz ($p < 0,001$). Zum Zeitpunkt der 2. und 3. Untersuchungsstunde senken alle untersuchten Wirkstoffe den Zilienschlag signifikant (alle $p < 0,0001$, außer Alginat Manucol LB $p < 0,001$). Ab dem Zeitpunkt 4 Stunden senken alle Substanzen die CBF hochsignifikant ($p < 0,0001$). Dabei senkt am wenigsten die CBF das Alginat Manucol LB, zum Zeitpunkt von 8 Stunden besteht sogar ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu PA-III alleine und zu den anderen untersuchten Alginaten (Differenz jeweils von 1,1 Hz). Zur diesem Zeitpunkt führen alle untersuchten Kombinationen bis auf das Alginat Manucol LB zum Sistieren des Zilienschlages. Die Kombination von PA-III + Alginat Manucol LB zeigt zum Zeitpunkt von 24 Stunden, ebenso wie alle anderen getesteten Wirkstoffe, keine nachweisbaren Zilienschlag mehr auf.

VI. Diskussion

Mikrobiologische Besiedlungen von Körperoberflächen spielen in der Medizin eine große klinische Rolle. Um einen Organismus zu infizieren, müssen die besiedelnden Keime mit den Geweben des Wirtes interagieren und an die Zellen und/oder die extrazelluläre Matrix anheften, um sie besiedeln zu können. Um sich an die Wirtsgewebe zu binden, produziert das Bakterium *P. aeruginosa* zwei Lektine, welche sich an die terminalen Zuckerreste der Glykokalix der Zelle und an die Zuckerreste der Glykoproteine der extrazellulären Matrix binden (Adam *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung der beiden Pseudomonas-Lektine PA-IL und PA-IIL an bedeckende Epithelien untersucht. Bisher sind die Bindungsstellen der beiden Pseudomonas-Lektine in der Literatur nur an wenigen ausgewählten Geweben untersucht worden (Klotz *et al.*, 1990 und Kirkeby & Høyer, 1999).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass alle untersuchten menschlichen Oberflächenepithelien PA-IL und PA-IIL binden. Zu diesen Epithelien zählten unterschiedliche Hautareale (Haut des äußeren Gehörganges, Mundschleimhaut, Bauchhaut, Achselhaut), Atemwegsepithelien (Nasenschleimhaut, Trachea und Lunge), Geschlechtsorgane (Mamma, Uterus, Prostata) und der Verdauungstrakt (Ösophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon). Die beiden Lektine färbten ausnahmslos die äußerste Schicht der untersuchten Gewebe an und auch der tieferliegenden Gewebsabschnitte, dabei variierte die Intensität der Anfärbung zwischen schwachem Signal (+), mittlerem Signal (++) bis hin zur intensiven Signalgebung (+++). Die einzigen Ausnahmen von Gewebsstrukturen, die sich nicht durch die beiden Pseudomonaslektine anfärben lassen waren die Tunica fibromusculocartilaginea der Atemwege (siehe Tabelle 4), Das Perimetrium des Uterus (Tabelle 5), beim Ösophagus die Tela submucosa mit den Glandulae oesophageales und der Tunica mucosa sowie beim Jejunum die Lamina muscularis mucosae, der Tela submucosa und der Tunica muscularis (siehe Tabelle 6). Auch die Lamina muscularis mucosae des Ileums wird weder durch PA-IL, noch durch PA-IIL angefärbt (siehe Tabelle 7). Beim Colonabschnitt wird die Tela submucosa weder durch PA-IL, noch durch PA-IIL angefärbt (siehe Tabelle 7).

Durch die Bindung an die Oberflächenepithelien ist es erklärlich, dass *P. aeruginosa* so viele verschiedene Organe infizieren kann (Bodey *et al.*, 1983).

Bei den Hautabschnitten, färbte PA-IIL insgesamt etwas intensiver die Oberflächen an als PA-IL und beim Atemtrakt zeigte sich insbesondere im Bereich der

Nasenschleimhaut eine stärkere Anfärbung. Im Abschnitt der untersuchten Gewebe des Atemtraktes, zeigte sich fast ein identisches Färberverhalten durch PA-IL und PA-IIL. Lediglich die Becherzellen der Lunge ließen sich etwas intensiver durch das PA-IIL anfärben, als PA-IL im Vergleich (siehe auch Tabelle 4). Bei den untersuchten Geschlechtsorganen werden sie Gewebsstrukturen abhängig vom gewählten Pseudomanslektin unterschiedlich stark angefärbt (Tabelle 5). Das PA-IL färbt das Mamma-Gewebe intensiver an und bei dem Prostata-Gewebe gibt es ein stärkeres Farbsignal durch das PA-II Lektin. Im Abschnitt des Verdauungstraktes zeigt sich ein fast identisches Färbeverhalten von PA-IL und PA-IIL (siehe auch Tabelle 6 und 8).

Fukose und Galaktose sind jeweils Monosaccharide, Fukose besteht aus sechs Kohlenstoffatomen und einer Aldehydgruppe am C1-Atom. Die Summenformel ist $C_6H_{12}O_5$. Nach Klassifikation wird Fukose den Desoxyzuckern (6-Desoxy-Galaktose) zugerechnet, sie ist damit der Galaktose strukturell eng verwandt. Die Fukose kommt ebenso wie Galaktose in zwei enantiomeren Formen vor, der L-Fukose und der D-Fukose. Während die Fukose in der Natur untypischerweise in der L-Konfiguration vorkommt, liegt Galaktose wie die meisten natürlichen Zucker in einer D-Konfiguration vor. Die Galaktose ist eine Hexose und hat die Summenformel $C_6H_{12}O_6$. Der strukturelle Aufbau der beiden Zucker legt nahe, dass die beiden Lektine evolutionär eng miteinander verwandt sind und deshalb auch vermutlich ähnliche Färbeverhalten aufweisen (Römpp Online, Georg Thieme Verlag).

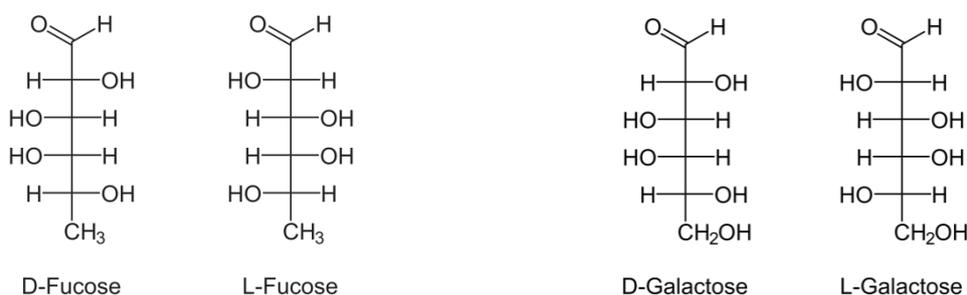


Abbildung 30: Strukturformel von Fukose und Galaktose.

Quelle: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ADL-Fucose.svg> und [-Galactose.svg](#) [Stand: 16.06.2017 10:55].

Dieses zeigt im Grunde die Bedeutsamkeit dieses pathogenen Keimes, dass mittels seiner beiden Pseudomonaslektine eine hohe Bindungsfähigkeit an menschlichen Oberflächenepithelien zeigt. Dieses ist nicht beschränkt auf den Atemtrakt, der Cornea und der Haut, wie bisher in der Literatur beschrieben, sondern ließ sich an allem getesteten Gewebe nachweisen. Besonders interessant stellt sich die intensive Anfärbung des Brust- und Prostata-Gewebes da. Hier scheint es besonders viele Bindungsstellen für die Pseudomonaslektine zu geben, die aber klinisch nicht von Bedeutung sein dürften, da diese Bindungsstellen für die Keime nicht zugänglich sind.

In weiteren Färbungen wurde zusätzlich zu den beiden Lektinen, die jeweiligen spezifischen Zuckerlösungen in vier Konzentrationen getestet, um die minimale Monosaccharidkonzentration zu ermitteln, die eine Bindung der Pseudomonaslektine an dem menschlichen Oberflächengewebe verhindert. Für PA-IL wurden Galaktoselösungen in den Konzentrationen 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M und 0,3 M verwendet; dieselben Fukoselösungen wurden für PA-IIL verwendet. Die Dosierung der Zuckerkonzentrationen wurden nach früheren experimentellen Studien festgelegt (Mewe *et al.*, 2005, Gustke *et al.*, 2012). Bereits in der 0,05 M Konzentration der beiden Monosaccharidlösungen konnte eine beginnende Inhibition der Bindung der Lektine an die Oberflächenepithelien beobachtet werden, die sich dann in den nächsthöheren Konzentrationen von 0,1 M weiter steigert. Bei den 0,3 M Monosaccharidlösungen konnte eine totale Inhibition der Lektinanfärbungen durch PA-IL und PA-IIL an dem menschlichen Gewebe ausnahmslos erreicht werden. Auffällig zeigen sich die Strukturen des Atemtraktes (siehe auch hierzu Tabelle 4), da hier bereits in der geringen Konzentration von 0,05 M die meisten Strukturen schon nicht mehr anfärben ließen. Aber erst bei 0,3 M Zuckerlösungen ist eine vollständige Inhibition erreicht. Bei den Geschlechtsorganen fiel wie zuvor beschrieben, eine besonders intensive Anfärbung durch die Pseudomonaslektine auf, die mit der jeweils spezifischen 0,3 molaren Zuckerlösung aufgehoben werden konnte.

Zwischen den PA-IL mit Galaktosezusatz und PA-IIL mit Fukosezusatz zeigt sich ein ähnliches Färbeverhalten. Es gibt nur leichte Variationen bezüglich der Intensität der Anfärbung. Es wurden aber immer die gleichen Strukturen des menschlichen Gewebes angefärbt oder nicht angefärbt. So zum Beispiel zur Veranschaulichung

wird bei dem Gewebsabschnitt der Nasenschleimhaut das mehrreihige Flimmerepithel durch PA-III etwas stärker angefärbt (+++) als durch PA-II (+). Durch Zusatz des jeweiligen spezifischen Monosaccharids in der 0,05 molaren Konzentration, wird das Flimmerepithel durch PA-III mit der Fukoselösung von der Intensität abgemildert (++) , wogegen PA-II durch die 0,05 molare Galaktoselösung an Intensität nicht beeinflusst wird und bestehen bleibt (++) . Ab der nächsthöheren spezifischen Monosaccharidzusatz zum jeweiligen Lektin gibt es keine Unterschiede mehr bezüglich des Färbeverhaltens zwischen PA-II und PA-III und sind in der 0,1 und 0,2 molaren noch einfach positiv angefärbt (+) und ab der 0,3 molaren Lösung nicht mehr angefärbt (siehe auch Tabelle 4).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mittels der lektin histochemischen Färbung eine zuverlässige komplette Inhibition durch jeweils einer 0,3 M Galaktoselösung für PA-II und einer 0,3 M Fukoselösung für PA-III erreicht werden konnte. Somit ist eine 0,3 M Monosaccharidkonzentration, die minimale Konzentration um eine komplette Anbindung der beiden Pseudomonaslektine zu verhindern. Diese Erkenntnis ist essentiell für die weitere Entwicklung antiadhäsiven Therapien menschlicher *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen. Erste Erfolge konnte bereits in einer klinischen Studie durch Hauber *et al.* (2008) verzeichnet werden. In einer Versuchsreihe an CF-Patienten mit *Pseudomonas*-Besiedlung in der Lunge, wurde mit 10 ml einer 0,1 molaren Galaktose/Fukose-Inhalationslösung inhaliert. Dadurch kam es zu einer signifikanten Senkung der *Pseudomonas aeruginosa*-Besiedlung der Lungen (Hauber *et al.*, 2008). Da die Zuckereinhibition vermutlich nicht vollständig war, konnten zumindest die Selbstheilungskräfte so weit gesteigert werden, dass sie die Keime wirksam bekämpfen konnten.

Alginate sind Polysaccharide, die in Biofilmen einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) bilden. Die Alginate gelten neben den Lektinen als ein wichtiger Virulenzfaktor der *Pseudomonaden*. Die Alginat-Synthese ist unter anderem verantwortlich für die Adhärenz, Phagozytose-Abwehr, erhöhte Antibiotikaresistenz und Aktivierungssteigerung der Neutrophilen-Elastase (Heck *et al.*, 1986). Mucoide *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme zeichnen sich durch eine Überexpression des extrazellulären Polysaccharids Alginat aus und sind somit deren Hauptbestandteil. Wie und ob die Alginate mit den Pseudomaslektinen interagieren, ist bisher noch nicht beschrieben worden. Eine solche Interaktion wäre prinzipiell denkbar, da Lektine Zucker binden. Die zu den Polysacchariden

gerechneten Glykosaminoglykane sowie deren Untergruppe die Proteoglykane interagieren zuckerspezifisch mit Lektinen (Schumacher *et al.*, 1992).

Da sowohl die Pseudomonaslektine als auch die Alginat zu den Pathogenitätsfaktoren der Pseudomonaden gehören, ist eine solche Interaktion auch pathophysiologisch von Interesse. Bei den untersuchten Alginaten handelt es sich um folgende: Alginat SG81, welcher von einem mucoiden *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm aus einem Fleischereiabfluss gewonnen wurde, FRD1-Alginat der von einem mucoiden *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm eines CF-Patienten stammt und das Alginat FRD1153 welcher von einem *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm mit einer defekten O-Acetylierung gewonnen wurde. Die Acetylgruppen spielen eine große Rolle bei der Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Desinfektionsmittel (Grobe *et al.*, 2001) und es ist bekannt, dass acetylierungsdefekte Mutanten eine herabgesetzte Anheftungs- und Biofilmbildungsfähigkeit besitzen (Nivens *et al.*, 2001), (Tielen *et al.*, 2005). Mittels der lektinhistochemischen Färbungen mit jeweils separat PA-IL und den Alginaten SG81, Manucol LB, FRD1153 und FRD1 und PA-IIL und den genannten Alginaten, kam es zu keiner Änderung des Bindungsverhaltens der Pseudomonaslektine an das Gewebe. Es potenziert somit nicht die Anbindung der Pseudomonaslektine an dem menschlichen Gewebe, noch hat es durch seine Eigenschaft als Polysaccharid einen inhibierenden Einfluss bezüglich des Färbeverhaltens, indem es wichtige Bindungsstellen zwischen Pseudomonaslektin und Geweboberfläche okkupiert. Die Bindungsstellen zwischen Pseudomonaslektinen und menschlichem Gewebe werden somit immunhistochemisch durch die getesteten Alginat nicht beeinflusst.

In einer zweiten Methodik, der Zilienschlagmessung, wurde der Einfluss von Pseudomonaslektinen und Alginaten auf die Zilienschlagfrequenz (CBF) untersucht. PA-IL und PA-IIL senken den Zilienschlag signifikant, wobei das PA-IIL toxischer als das PA-IL auf den Zilienschlag wirkt (Mewe *et al.*, 2005, Gustke *et al.*, 2012). Durch die Senkung bzw. das Erliegen der Zilienschlagfrequenz wird die mukoziliäre Clearance gestört, so dass es zu einem erleichterten Anheften von Pathogenen an die Atemwege kommt. Die klinische Bedeutung dieses unspezifischen Abwehrmechanismus wird eindrucksvoll durch Patienten mit primärer ziliärer Dyskinesie demonstriert, die an häufig rezidivierenden Atemwegsinfektionen leiden (Frija-Masson *et al.*, 2012). Es bestehen Unterschiede

zwischen der Interaktion von jeweils PA-IL unter dem Zusatz der Alginat und PA-IIL und den Alginaten (siehe dazu auch Abbildung 26 und 29). So senken die Alginat mit PA-IL den Zilienschlag stärker als im Vergleich zu PA-IIL mit den Alginaten. Vor allem das Alginat Manucol LB, (welches von einer Braunalge abstammt und als unspezifische Kontrolle verwendet wurde), hebt sich hierbei hervor. Im Zusatz zu PA-IL erhöht es deutlich dessen Toxizität, gemessen an dem signifikanten Abfall der CBF. Im Zusatz zu PA-IIL hat es eher einen protektiven Faktor, da es zum Zeitpunkt von 8 Stunden die CBF signifikant erhöht, im Vergleich zu PA-IIL alleine (Differenz von 1,113 Hz, $p < 0,001$). Zum Zeitpunkt von 24 Stunden gibt es allerdings keinen Unterschied mehr, da alle Wirkstoffe mit und ohne PA-IIL zu einem Erliegen des Zilienschlages führen und hier somit keine Protektion durch das Alginat Manucol LB besteht.

In vivo haben die Alginat im Zusatz zu den beiden Pseudomonaslektinen einen unterschiedlichen physiologischen Effekt auf die Zilienschlagfrequenz; dieses unterschiedliche Verhalten in Bezug auf die Interaktion Lektin–Alginat wird nicht in der statischen Lektin histochemie abgebildet.

Hyaluronsäure oder auch Hyaluronan (HA) genannt, ist ein großes Glykosaminoglykan der extrazellulären Matrix (EZM), welches hauptsächlich von Fibroblasten sezerniert wird, jedoch auch von anderen Zellen synthetisiert werden kann. HA spielt eine aktive Rolle in der Regulation der zufälligen Beweglichkeit, Chemotaxis, Invasion, Proliferation, Formgebung und metabolischen Reaktion von Zellen. HA ist im Zusammenhang mit *P. aeruginosa* deshalb von besonderem Interesse, weil Schulz *et al.* (2010) bereits beschrieben hat, dass der CFTR Transporter, welcher bei der cystischen Fibrose mutiert ist, auch HA durch die Plasmamembran von Epithelzellen transportiert. Dadurch kommt es zu einem höheren intrazellulären Verbleib der Hyaluronsäure in den Zellen bei CF-Patienten, die dann vermutlich platzen wodurch HA in das Lumen der Atemwege freigesetzt wird. Dieses HA ist die Ursache für das übermäßig zähe Sputum bei CF-Patienten (Schultz *et al.*, 2010).

Da die Atemwege in CF Patienten überdurchschnittlich häufig von *P. aeruginosa* besiedelt werden (Winkler *et al.*, 1985), (Moore & Mastoridis 2017), stellt sich also die Frage nach der Interaktion von HA mit den beiden Pseudomonaslektinen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Molekulargewichte des HA in der

Interaktion mit den beiden Pseudomonas-Lektinen mit zwei verschiedenen Methoden getestet. Es wurden sowohl niedermolekulare HA Oligosaccharide (HAO) als auch hochmolekulare HA in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen verwendet.

In der Lektinhistochemie wurden exemplarisch an drei Organen (Haut des äußeren Gehörganges, Nasenschleimhaut und Lungengewebe, siehe auch Tabelle 8), die klinisch besonders von der Pseudomonasinfektion betroffen sind, die Kombination aus HAO und PA-IL /PA-IIL getestet. Hier zeigt sich ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der Bindung zwischen PA-IL und PA-IIL. Unter Zusatz von PA-IL plus HAO kommt es zu einer Verstärkung der Anfärbung an allen drei untersuchten Geweben. Vor allem die 1:10 Verdünnung der HAO, verstärkt die Anbindung der Haut des äußeren Gehörganges und der Nasenschleimhaut. Dagegen mildert PA-IIL und die unverdünnten HAO die Anfärbung leicht ab. Ebenso kommt es bei den 1:10 und 1:100 fach-verdünnten HAO zu einer leichten Abmilderung des PA-IIL, im Vergleich zu PA-IIL alleine, nur bei dem Lungengewebe zeigt sich ein fast identisches Färbeverhalten. Am Atemwegsepithel kommt es durch Zugabe von HAO zu PA-IL zu einer erhöhten Lektinbindung an das Oberflächengewebe, während es durch Zugabe von HOS zu PA-IIL zu einer leichten Inhibition an dem Atemwegsepithel kommt. Dieser Befund wird in der zweiten untersuchten Methodik ebenfalls bestätigt. Sowohl PA-IL und PA-IL + HOS in drei Konzentrationen senken den Zilienschlag signifikant, dabei senkt vor allem die unverdünnte HOS den Zilienschlag stärker als PA-IL alleine (siehe auch Abbildung 24, dieses ist besonders zum Zeitpunkt von 8 Stunden zu sehen (3,9 Hz, $p < 0,001$). Somit bewirkt der Zusatz von Hyaluronsäure Oligosaccharide zum PA-IL eine stärkere Toxizität auf die humanen Zilien mit konsequenter Abnahme der Zilienschlagfrequenz. PA-IIL und HAO zeigen ein ähnliches Verhalten, ab dem Zeitpunkt von drei Stunden führen alle getesteten Konzentrationen zu einem hochsignifikanten Abfall der CBF (siehe auch Abbildung 27). Eine einzige Ausnahme stellt sich zum Messzeitpunkt Stunde acht dar, die Kombination aus PA-IIL und der 1:10 verdünnten HAO senkt den Zilienschlag signifikant weniger stark als PA-IIL alleine und stellt zumindest zu diesem Zeitpunkt einen protektiven Faktor dar. Zum nächst gemessenen Zeitpunkt bleibt dieser Effekt nicht erhalten.

Die kommerzielle hochmolekulare Hyaluronsäure (Viscoseal®) wird biotechnologisch aus Streptokokkenkulturen gewonnen und entspricht laut

Hersteller (TRB Chemedica) zu 100 % der Molekularstruktur menschlicher Hyaluronsäure. Hochmolekulare HA (Viscoseal®) verhält sich ähnlich in der Lektinhistochemie wie die niedermolekularen Hyaluronsäureoligosaccharide. PA-IL zusammen mit hochmolekularer HA (Viscoseal®) führt vor allem in der unverdünnten, recht viskösen Form zu einer intensiveren Färbung als PA-IL alleine bei allen drei Organen. Dagegen kommt es in der 1:10 und 1:100 fachen Verdünnung von Viscoseal® zu einer leichten Abmilderung der Anfärbung (siehe auch Tabelle 9). Fast identisch verhält es sich mit PA-IIL mit hochmolekularer HA (Viscoseal®), unter Zusatz der unverdünnten Lösung, kommt es zu einer intensiveren Anfärbung der untersuchten Strukturen, wogegen es in der 1:10 und vor allem in der 1:100 fach-verdünnten hochmolekularen HA (Viscoseal®) Lösung zu einer Abmilderung der Anfärbung kommt. Die Interaktion zwischen hochmolekularer HA (Viscoseal®) und den beiden Pseudomonaslektinen ist somit konzentrationsabhängig. In der viskösen, unverdünnten Lösung, verstärkt es die Bindungsstellen der Lektine zu dem getesteten menschlichen Gewebe, wogegen es in der verdünnten Version zu einer Inhibition der Bindungsstellen kommt.

Der Einfluss von hochmolekularer HA (Viscoseal®) auf den Zilienschlag in Kultur ist abhängig vom gemessenen Zeitpunkt, konzentrationsabhängig und vom Lektin. PA-IL plus dem Zusatz der unverdünnten HV zum Zeitpunkt der Stunde 1 und 2, erhöht den Zilienschlag signifikant, zum Zeitpunkt der 24. Stunde senkt er den Zilienschlag wiederum signifikant, ebenso wie PA-IL ohne Zusatz und mit dem Zusatz der 1:10 HV-Verdünnung. Zu diesem Zeitpunkt senkt PA-IL und HV-Verdünnung 1:100 zwar den Zilienschlag, aber statistisch gesehen ohne Signifikanz (siehe auch Tabelle 15). PA-IIL und der Zusatz der hochmolekularen HA (Viscoseal®) zeigt ein etwas anderes Verhalten. Zwischen dem Messzeitpunkt Stunde 3 bis 8, wirken die HV-Konzentrationen 1:10 und 1:100 zusätzlich zum PA-IIL ziliotoxischer als PA-IIL alleine, dieses bildet sich in einem signifikanten Zilienschlagabfall ab. Zur Stunde 8 kommt der Zilienschlag zum kompletten Erliegen so dass keine Unterschiede mehr beobachtet werden können, (siehe auch Abbildung 28).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der Lektinhistochemie der Zusatz von HOS und hochmolekularer HA (Viscoseal®) konzentrationsabhängig eine Verstärkung oder eine leichte Abmilderung der *Pseudomonaslektine* in der Immunhistochemie führt. Hierbei ist der Effekt der Intensivierung deutlicher als der

Effekt der Abmilderung. *In vitro* ist ein einheitlicheres Bild gegeben, in dem es die CBF signifikant senkt und somit toxischer auf den menschlichen Zilienschlag wirkt. Durch unseren experimentellen Ansatz konnte gezeigt werden, dass HA Oligosaccharide die Bindungsfähigkeit des PA-IL erhöht und es damit ziliotoxischer macht. Dieser Mechanismus könnte erklären, warum gerade CF Patienten so häufig mit *P. aeruginosa* besiedelt werden. Nach diesen Befunden wäre PA-IL Bindung ein entscheidender pathophysiologischer Anheftungsmechanismus. Da *P. aeruginosa* kürzlich den Platz 2 einer WHO Liste der gefährlichen antibiotikaresistenten Keime einnimmt, sollte eine anti-adhäsive Therapie zur Bekämpfung der Pseudomonasinfektion bei CF Patienten verstärkt in den Fokus des Interesses rücken, zumal schon einige klinische Daten vorliegen (von Bismarck *et al.*, 2001 und Hauber *et al.*, 2008).

VII. Zusammenfassung

Die aus Kohlenhydraten bestehende Glykokalix stellt die äußerste Schicht menschlicher Zellen dar, diese Kohlenhydrate dienen als Bindungsstellen für die beiden zuckerbindenden Lektine von *Pseudomonas aeruginosa* (PA-IL und PA-IIL). Über diese Bindung können dann die Pseudomonaden an Gewebeoberflächen anheften und sie besiedeln. Die Bindungsstellen für die beiden *Pseudomonas*-Lektine sind bisher nur an wenigen Gewebsoberflächen untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit konnte lektin histochemisch gezeigt werden, dass die beiden Lektine fast ausnahmslos die Oberflächenepithelien der untersuchten Gewebe anfärben. Durch die Bindung an die Oberflächenepithelien ist es erklärlich, dass *P. aeruginosa* so viele verschiedene Organe kolonisieren und damit infizieren kann. Es konnte die minimale Konzentration des jeweils inhibitorischen Monosaccharid immunhistochemisch ermittelt werden: eine 0,3 M Galaktoselösung für PA-IL und einer 0,3 M Fukoselösung für PA-IIL. Diese Erkenntnis ist essentiell für die weitere Entwicklung antiadhäsiver Therapien menschlicher *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen.

In den Atemwegen liegt eine besondere Situation vor, da die beiden Lektine nach Bindung an die Zilien diese lähmen. Durch das Sistieren des Zilienschlages wird ein wichtiger unspezifischer Abwehrmechanismus in den Atemwegen gehemmt; es kommt zu einer Störung der mukoziliären Clearance. Dieser Mechanismus könnte eine besondere Bedeutung bei der zystischen Fibrose (CF) besitzen. Da bei CF Kranken das Polysaccharid Hyaluronan im Sputum erhöht ist, untersuchten wir auch die Interaktion der beiden Lektine mit Hyaluronan im Zilienschlagassay. Dabei hatten Hyaluronan oligosaccharide praktisch keinen Einfluss auf die Bindung und die Beeinflussung des stark ziliotoxischen PA-IIL, wohl aber auf das schwach ziliotoxische PA-IL, was unter Zugabe von Hyaluronan oligosaccharide so ziliotoxisch wurde wie das PA-IIL. Diese Erhöhung der Ziliotoxizität des PA-IL könnte erklären, warum die Atemwege von CF Kranken so häufig von *P. aeruginosa* besiedelt werden.

VII. Summary

The carbohydrate coat of the cell membrane, the glycocalyx, represents the outermost layer of human cells. The carbohydrates of the glycocalyx serve as binding sites for the two sugar-binding lectins of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* (PA-IL and PA-IIL). *Pseudomonas* bacteria use these two lectins to attach to the tissue surfaces and to subsequently colonize them. To date, the binding sites for the two *Pseudomonas* lectins have only been studied on few tissue surfaces. In the present work it could be shown by lectin histochemistry that the two lectins bind to the surface epithelia of the investigated tissues almost without exception. The attachment to the surface epithelia arguably explains how *p. aeruginosa* can colonize so many different organs and thereby infect them. The minimum concentration of each inhibitory monosaccharide could be determined by immunohistochemistry: a 0,3 M galactose solution for PA-IL and a 0,3 M fucose solution for PA-IIL. This finding is essential for the further development of antiadhesive therapies of human *Pseudomonas aeruginosa* infections.

In the respiratory tract a special situation exists as the two lectins paralyze the airway cilia they attach to. By inhibiting the ciliary beat, an important nonspecific defense mechanism in the airways is inhibited; hence the mucociliary clearance is impaired. This mechanism could be of particular importance in cystic fibrosis (CF) a disease in which the polysaccharide hyaluronan secretion is altered. As hyaluronan in the sputum is increased in CF patients, we also investigated the interaction of the two lectins with hyaluronan in a ciliary beat assay. Hyaluronan oligosaccharides had practically no influence on the binding and the ciliotoxicity of the highly ciliotoxic PA-IIL, but critically increased the ciliotoxicity of the otherwise weakly ciliotoxic PA-IL. This increase in ciliary toxicity of PA-IL could explain why the respiratory tract of CF patients is so commonly colonized by *p. aeruginosa*.

VIII. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| °C | Grad C elsius |
| CBF | c iliary b eat f requency |
| CF | C ystische F ibrose |
| CFTR-Gen | c ystic f ibrosis t ransmembrane c onductance r egulator Gen |
| EPS | e xtrazellulären p olymeren S ubstanzen |
| Gl. | G landulae |
| h | Stunde |
| HA | H yaluronan |
| HAO | H yaluronan O ligosaccharide |
| HOS | H yaluronsäure O ligosaccharide |
| HV | H yaluronsäure V iscoseal® |
| Hz | H ertz |
| L. | L amina |
| LP | L ektin p uffer |
| PA-IL | P seudomonas a eruginosa L ektin I |
| PA-IIL | P seudomonas a eruginosa L ektin II |
| PE | P lattene p ithel |
| QS | Q orum S ensing |

IX. Literaturverzeichnis

Adam EC., Mitchell BS, Schumacher DU, Grant G, Schumacher U (1997) *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: Therapeutic implications of fucose. Am J Respir Crit Care Med. 155: 2102-2104.

Allegra L, Abraham WM, Fasano V, Petrigni G (2008) Methacholine challenge in asthmatics is protected by aerosolised hyaluronan at high (1,000 kDa) but not low (300 kDa) molecular weight. Ital J Chest Dis. 62:297–301.

Allegra L., Patrona S.D., Petrigni G. (2012) Hyaluronic Acid. In: Lever R., Mulloy B., Page C. Heparin - A Century of Progress. Handbook of Experimental Pharmacology, (Eds.) Springer, Berlin, Heidelberg. vol 207, 385-401.

Autar R, Khan AS, Schad M, Hacker J, Liskamp RM, Pieters RJ (2003) Adhesion inhibition of F1C-fimbriated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* PAK and PAO by multivalent carbohydrate ligands. Chembiochem. 4: 1317-1325.

Avichezer D, Gilboa-Garber N, Garber NC, Katcoff DJ (1994) *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin gene molecular analysis and expression in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Acta. 1218: 11-20.

Bajolet-Laudinat O, Girod-de Bentzmann S, Tournier JM, Madoulet C, Plotkowski MC, Chippaux C, Puchelle E (1994) Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. Infect Immun. 62: 4481-4487.

Bassler BL (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.* 2: 582-587.

Beachey EH (1981) Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis.* 143: 325-345.

Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L (1983) Infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis.* 5: 279-313.

Boyd WC, Shapleigh E (1954) Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). *Blood.* 9: 1194-1198.

Bradley S. (2003) Bacteriology 330 Lecture Topic: *Pseudomonas aeruginosa*. University of Wisconsin Department of Bacteriology.
URL:<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>[Stand:03.05.18,10:17].

Burkart T, Skript Bakterielle Adhäsion.URL:http://www.zmk.unibe.ch/unibe/portal/fak_medizin/berzamed/inst_zmk/content/e41895/e54650/e369233/e269093/e269093/e269224/pane269228/e264696/2016_Handbuch-Lehrzahnrzte_ger.pdf [Stand 05.03.2018,10:07].

Buselmaier W. (2006) Zelluläre Strukturelemente. In: *Biologie für Mediziner.* (Hrg.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 20-24.

Chen CP, Song SC, Gilboa-Garber N, Chang KS, Wu AM (1998) Studies on the binding site of the galactose-specific agglutinin PA-IL from *Pseudomonas aeruginosa*. *Glycobiology.* 8: 7-16.

Cioci G, Mitchell EP, Gautier C, Wimmerová M, Sudakevitz D, Pérez S, Gilboa-Garber N, Imberty A (2003) Structural basis of calcium and galactose recognition by the lectin PA-IL of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 555: 297-301.

Conway SP, Brownlee KG, Denton M, Peckham DG (2003) Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am J Respir Med.* 2: 321-332.

Costerton JW (1995) Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol.* 15: 137-140.

Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. (1999) Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.

Costerton, JW, Stewart, PS (2001) Bekämpfung bakterieller Biofilme. *Spektrum der Wissenschaft.* 11: 58-65.

Doggett RG, Harrison GM, Carter RE (1971) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in patients with chronic illnesses. *Lancet.* 1: 236-237.

Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL (2002) *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 34: 91-100.

Evans LR, Linker A (1973) Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 116: 915-924.

Feichter G, Dalquen P (2000) Zytopathologie. In: Pathologie. (Hrg.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Edition 2: 12-13.

Flemming HC, Wingender J (2001) Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biologie in unserer Zeit*. 31: 169-180.

Franklin MJ, Ohmann DE (1993) Identification of algF in the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* which is required for alginate acetylation. *J Bacteriol*. 175: 5057-5065.

Frija-Masson J, Bassinet L, Honoré I, Dufeu N, Housset B, Coste A, Papon JF, Escudier E, Burgel PR, Maître B (2017) Clinical characteristics, functional respiratory decline and follow-up in adult patients with primary ciliary dyskinesia. *Thorax*. 72(2):154-160.

Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*. 35: 439-468.

Gabius HJ (2000) Biological information transfer beyond the genetic code: The sugar code. *Naturwissenschaften*. 87: 108-121.

Gacesa P (1998) Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future prospects. *Microbiology*. 144: 1133-1143.

Garber NC, Guempel U, Gilboa-Garber N, Doyle RJ (1987) Specificity of the fucose-

binding lectin of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. 48: 331-334.

Gilboa-Garber N (1972) Purification and properties of hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* and its reaction with human blood cells. Biochim Biophys Acta. 273: 165-173.

Gilboa-Garber N, Mizrahi L, Garber N (1977) Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. Can J Biochim. 55: 975-981.

Gilboa-Garber N (1982) *Pseudomonas aeruginosa* lectins. Meth Enzymol. 83: 378-385.

Gilboa-Garber N, Katcoff DJ, Garber NC (2000) Identification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA-IIL lectin gene and protein compared to PA-IL. FEMS Immunol Med Microbiol. 29: 53-57.

Glick J, Garber N (1983) The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. J Gen Microbiol. 129: 3085-3090.

Gordon SM, Serkey JM, Keys TF, Ryan T, Fatica CA, Schmitt SK, Borsh JA, Cosgrove DM, Yared JP (1998) Secular trends in nosocomial bloodstream infections in a 55-bed cardiothoracic intensive care unit. Ann Thorac Surg. 65: 95-100.

Grobe S, Wingender J, Truper HG (1995) Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. J Appl Bacteriol. 79: 94-102.

Grobe S, Wingender J, Flemming HC (2001) Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. Zentralbl Hyg Umweltmed. 204: 139-142.

Gustke H, Kleene R, Loers G, Nehmann N, Jaehne M, Bartels KM, Jaeger KE, Schachner M, Schumacher U. (2012) Inhibition of the bacterial lectins of *Pseudomonas aeruginosa* with monosaccharides and peptides. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 31(2):207-15.

Hauber HP, Schulz M, Pforte A, Mack D, Zabel P, Schumacher U (2008) Inhalation with fucose and galactose for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. Int J Med Sci. 5: 371-376.

Heck LW, Morihara K, McRae WB, Miller EJ (1986) Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Infect Immun. 51: 115-118.

Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, Parsek MR (2001) Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. J Bacteriol. 183: 5395-5401.

Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK; National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities (2008) NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. Infect Control Hosp Epidemiol. Nov;29(11):996-1011.

Hoiby N, Krogh JH, Moser C, Song Z, Ciofu O, Kharazmi A (2001) *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect.* 3: 23-35.

Imberty A, Wimmerová M, Mitchell EP, Gilboa-Garber N (2004) Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* 6: 221-228.

Irvin RT, Bautista D. L. (1999) Hope for the post-antibiotic era? *Nature Biotechnol.* 17: 42-47.

Kirkeby S, Høyer PE (1999) Binding properties of the galactose-detecting lectin *Pseudomonas aeruginosa* agglutinin (PA-IL) to skeletal muscle fibres. Quantitative precipitation and precipitation inhibition assays. *Histochem J.* 31(7):485-93.

Klotz SA, Misra RP, Butrus SI (1990) Contact lens wear enhances adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and binding of lectins to the cornea. *Cornea.* 9(3):266-70.

Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 10: 505-520.

Koch C, Hoiby N (2000) Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Respiration.* 67: 239-247.

Kocourek J, Horejsi V (1981) Defining a lectin. *Nature* 290: 188-211.

Köttgen E, Reutter W, Tauber R (2003) Endogene Lectine des Menschen und ihre Zuckerliganden. *Medizinische Klinik*. 98: 717-738.

Kunz LIZ, van Rengen ELJ, Sterk PJ (2006) Inhaled hyaluronic acid against exercise-induced broncho-constriction in asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 19:286–291.

Lyczak J B, Cannon CL, Pier GB (2002) Lung infections associates with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 15: 194-222.

Ma Q, Zhai Y, Schneider JC, Ramseier TM, Saier MH Jr (2003) Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta*. 1611: 223-233.

Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O`Toole GA (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 426: 306-310.

Marty N, Dournes JL, Chabanon G, Montrozier H (1992) Influence of nutrient media on the chemical composition of the exopolysaccharide from mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 77: 35-44.

Matsukawa M, Greenberg EP (2004) Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol*. 186: 4449-4456.

McAvoy MJ, Newton V, Paull A, Morgan J, Gacesa P, Russell NJ (1989) Isolation of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* from non-cystic-fibrosis patients and

characterisation of the structure of their secreted alginate. J Med Microbiol. 28: 183-189.

Meluleni GJ, Grout M, Evans DJ, Pier GB (1995) Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoïd exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. J Immunol. 155: 2029-2038.

Mewe M, Tielker D, Schönberg R, Schachner M, Jaeger KE, Schumacher U (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectins I and II and their interactions with human airway cilia. J Laryngol Otol. 119: 595-599.

Meyer F (2005) Badeotitis externa Urlaubsfolgen für das Ohr. Der Allgemeinarzt 26-28.

Mitchell BS, Schumacher U (1999) The use of the lectin *Helix pomatia agglutinin* (HPA) as a prognostic indicator and as a tool in cancer research. Histo Histopathol. 14: 217-226.

Moore JE, Mastoridis P (2017) Clinical implications of *Pseudomonas aeruginosa* location in the lungs of patients with cystic fibrosis. J Clin Pharm Ther. 42(3):259-267.

Morimoto M, Saimoto H, Usui H, Okamoto Y, Minami S, Shigemasa Y (2001) Biological activities of carbohydrate-branched chitosan derivatives Biomacromolecules. 2:1133-1136.

Mulvey G, Kitov PI, Marcato P, Bundle DR, Armstrong GD (2001) Glycan mimicry as a basis for novel anti-infective drugs. *Biochemie*. 83: 841-847.

Nivens DE, Ohmann DE, Williams J, Franklin MJ (2001) Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol*. 183: 1047-1057.

Nüßlein TG, Griese M, Nicolai T (2001) Ziliendiagnostik. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 149: 826-837.

Ofek I, Sharon N (1990) Adhesin as lectins: specificity and role in infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 151: 91-113.

Ofek I, Hasty DL, Sharon N (2003) Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 38: 181-191.

Ohman DE, Chakrabarty AM (1981) Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of the exopolysaccharide alginate in a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate. *Infect Immun*. 33: 142-148.

Ombaka EA, Cozens RM, Brown MR (1983) Influence of nutrient limitation of growth on stability and production of virulence factors of mucoid and nonmucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*. 5: 880-888.

Osores A, Gustke H, Hinrichs B, Riedel F, Schumacher U. (2008) *Hamburger Ärzteblatt*. Primäre Ziliendyskinesie: Seltene Ursache für Sinusitis, Bronchiektasie oder Infertilität. Mit Schnupfen geboren. *Hamburger Ärzteblatt* 01/2008.

O'Toole GA, Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*. 30: 295-304.

Pan J, Wang Q, Snell WJ (2005) Cilium-generated signaling and cilia-related disorders. *Lab Invest.* 85: 452-463.

Parsek MR, Greenberg EP (2000) Acyl-homoserine lactone *quorum sensing* in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 8789-8793 .

Parsek MR, Singh PK (2003) Bacterial Biofilms: An emerging link to disease Pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 57: 677-701.

Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L, Iglewski BH (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science.* 260: 1127-1130.

Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol.* 181: 1203-1210.

Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci.* 96: 11229-11234.

Phillips I. (1969) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in the clinical laboratory. *J Med Microbiol.* 2: 9-16.

Pier GB (2000) Role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 8822-8828.

Plotkowski MC, Saliba AM, Pereira SH, Cervante MP, Bajolet-Laudinat O (1994) *Pseudomonas aeruginosa*. Selective adherence to and entry into human endothelial cells. *Infect Immun.* 62: 5456-5463.

Pollack M (1995) *Pseudomonas aeruginosa*: Principles and practice of infectious disease. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds) Churchill Livingstone, New York, 1980-2003.

Prince A (1992) Adhesins and receptors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with infection of the respiratory tract. *Microb Pathog.* 13: 251-260.

Rehm BH, Valla S (1997) Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 48: 281-288.

Salyers AA, Whitt DD (1994) Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press, Washington.

Satir P, Christensen ST (2007) Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol.* 69: 377-400.

Satir P, Christensen ST (2008) Structure and function of mammalian cilia. *Histochem Cell Biol.* 129: 687-693.

Schlegel HG (1992) Allgemeine Mikrobiologie. (Hrg.) Thieme Verlag, Stuttgart, 381-385.

Schulz T, Schumacher U, Prante C, Sextro W, Prehm P (2010) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator can export hyaluronan. *Pathobiology*. 77(4):200-9.

Schumacher U, Thielke E, Adam E (1992) A dot blot technique for the analysis of interactions of lectins with glycosaminoglycans. *Histochem J*. 24: 453-455.

Sharon N, Lis H (1972) Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*. 177: 949-959.

Steuer MK, Herbst H, Beuth J, Steuer M, Pulverer G, Matthias R (1993) Hemmung der bakteriellen Adhäsion durch Lektinblockade bei durch *Pseudomonas aeruginosa* induzierter Otitis externa im Vergleich zur lokalen Therapie mit Antibiotika. *Otorhinologica Nova*. 3: 19-25.

Stockert RJ, Morell AG, Scheinberg ICH (1974) Mammalian hepatic lectin. *Science*. 186: 356-356.

Storm van's Gravesande K, Omran H (2005) Primary ciliary dyskinesia: clinical presentation, diagnosis and genetics. *Ann Med*. 37(6):439-49.

Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S, Klapper I (2002) Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 29: 361-367.

Sutherland IW (2001) Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures
Water Sci Technol. 43: 77-86.

Swift S, Throup JP, Williams P, Salmond GP, Stewart GS (1996) *Quorum sensing*:
a population-density component in the determination of bacterial phenotype. Trends
Biochem Sci. 21: 214-219.

Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, Rosenau F,
Jaeger KE (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer
membrane and is involved in biofilm formation. Microbiology. 151:1313-1323.

Thomas RJ, Brooks TJ (2004) Oligosaccharide receptor mimics inhibit *Legionella*
pneumophila attachment to human respiratory epithelial cells. Microb Pathog. 36:
83-92.

Toder DS, Ferrell SJ, Nezezon JL, Rust L, Iglewski BH (1994) *lasA* and *lasB* genes
of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity.
Infect Immun. 62: 1320-1327.

Uhlenbruck G, Gross R, Koch OM, Lee CK (1983) Die Bedeutung von Lektinen für
den Adhäsionsmechanismus von Bakterien. Dtsch Ärzteblatt 80: 27-32.

Uhlenbruck G, Klein PJ (1984) Die praktische Bedeutung von Lektinen,
Sonderdruck Deutsches Ärzteblatt - Ärztliche Mitteilungen. 4: 1-2.

Van Delden (2004) Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. In:
Pseudomonas Vol. 2, Ramos J. L. (Hrg), Kluwer Academic/Plenium Publishers,
New York: 3-46.

von Bismarck P, Schneppenheim R, Schumacher U (2001) Successful treatment of *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infection with a sugar solution – a case report on a lectin based therapeutic principle. *Klin Pädiatr.* 213: 285-287.

Wentworth JS, Austin FE, Garber ., Gilboa-Garber N, Paterson CA, Doyle RJ (1991) Cytoplasmic lectins contribute to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* 4: 99-104.

Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP (1999) Identification of genes controlled by *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 13904-13909.

Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP (2001) *Quorum Sensing* in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 25: 365-404.

Wiblin RT (1997) Nosocomial pneumonia. Prevention and control of nosocomial infections.(Eds.) Williams and Wilkins, Baltimore: 807-819.

Wingender J, Neu T, Flemming HC (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances *Bacterial extracellular polymeric substances?* (Eds.): Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1-19.

Winkler U, Wingender J, Jäger KE (1985) Infektionen der Atemwege mit *Pseudomonas aeruginosa* bei der Cystischen Fibrose. *Klinische Wochenschrift.* 63: 490–498.

Winzer K, Falconer C, Garber NC, Diggle SP, Camara M, Williams P (2000) The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. J Bacteriol.182: 6401-6411.

Wolfaardt GM, Lawrence JR, Korber DR (1999) Function of EPS. In: Microbial extracellular polymeric substances. (Eds.). Springer , Berlin, Heidelberg, New York,171-195.

Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA, Parsek MR (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Proc Natl Acad Sci. 100: 7907-7912.

Young LS (1990) Principles and practice diseases of infectious. Churchill Livingstone 611-636.

X. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher für die Überlassung dieses überaus interessanten Themas. Er brachte mir viel Geduld entgegen mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Prehm aus dem Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie am Universitätsklinikum Münster danke ich für die Überlassung der Hyaluronsäure-Oligosaccharide.

Prof. Dr. med. Andreas Gocht und Dr. med. Andreas Turzynski, aus Lübeck aus der Gemeinschaftspraxis der Fachärzte für Pathologie danke ich für die freundliche Überlassung der Paraffinblöcke.

Herrn Prof. Dr. med. Tobias Lange möchte ich für die Hilfe bei der Erstellung der statistischen Tests danken.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern Marta und Juan-Luis Osores-Vigueras bedanken, ohne die mein Studium und meine Doktorarbeit niemals möglich gewesen wäre.

Ein Dank geht außerdem an meinem Mann Norbert Meyer und unseren Kindern Valentina Clara und Pablo Luis Meyer, die mich motiviert haben und immer an mich geglaubt haben.

Ein großer abschließender Dank geht aber auch an meine Kollegen am Institut der Anatomie, denn die Zusammenarbeit mit Ihnen war ein wichtiger Teil bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Dies gilt insbesondere Frau Feldhaus, Frau Märker, Frau Gehrke, Frau Cöllen und Frau Knies, die mich bei der Durchführung der Laborarbeit ausgezeichnet angeleitet und unterstützt haben.

Die Wissenschaft ist der Verstand der Welt, die Kunst ihre Seele.

Maksim Gorki

XI. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:
(Aracelli-Alejandra Meyer-Osores)