

Aus der Universitätsfrauenklinik Rostock, Labor für Gynäkopathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Gerber

# **Linear orientierte OH-Gruppen in der Zellwand von Pilzen und Bakterien**

Eine polarisationsoptisch-histochemische Studie

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Gähns, Wiebke

aus Rostock

Bingen am Rhein, 2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0095-3

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med J. Makovitzky, Visiting Professor der Semmelweis Medizinischen Universität Budapest, Abteilung für Gynäkopathologie, Universitätsfrauenklinik Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. L. Jonas, Elektronenmikroskopisches Zentrum, Medizinische Fakultät, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. U. Lindequist, Institut für Pharmazie, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald
4. Gutachter: Prof. Dr. Dr. A. Podbielski, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Medizinische Fakultät, Universität Rostock
5. Gutachter: Dr. rer. nat. D.-C. Fischer, Universitäts-Kinder- und Jugendklinik, Medizinische Fakultät, Universität Rostock

Tag der Verteidigung: 22.06.2010

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	3
1.1	Polarisationsmikroskopie und Doppelbrechung.....	3
1.2	Topo-optische Reaktionen.....	7
1.3	Farbstoffe.....	9
1.3.1	Toluidinblau.....	9
1.3.2	1:9 Dimethyl-Methylenblau (1,9 Dmmb).....	9
1.3.3	Eosin.....	10
1.3.4	Erythrosin.....	10
1.3.5	Bengalrosa B.....	10
1.4	Ziele und Fragestellungen.....	11
1.4.1	Fragestellungen.....	11
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Zellen.....	14
2.1.1	Bakterien.....	14
2.1.2	Pilze.....	14
2.1.3	Paraffinpräparate.....	14
2.1.4	Phagozytosepräparate.....	15
2.2	Aufbereitung.....	16
2.2.1	Ausstrichpräparate.....	16
2.2.2	Paraffinpräparate.....	16
2.2.3	Entparaffinierung.....	16
2.3	Reaktionen.....	16
2.3.1	ABT- (ABD-) Reaktion.....	16
2.3.2	Sialinsäurespezifische Reaktion.....	17
2.3.3	KOH-ABT und KOH-Sialinsäurespezifische Reaktion.....	17
2.3.4	PB KOH-ABT und PB-KOH-Sialinsäurespezifische Reaktion.....	18
2.3.5	PB-Sialinsäurespezifische Reaktion.....	18
2.3.6	Saure Hydrolyse.....	19
2.3.7	Alkalische Hydrolyse.....	19
2.3.8	Sialinsäureextraktion.....	19
2.3.9	Charge Transfer Reaktion.....	20
2.3.10	Methylierung.....	20
2.3.11	CIBR (Chemically Intesified Basophilic Reaction).....	20
2.3.12	CEC-Methode (Critical Electrlyte Concentration Method).....	21
2.4	Mikroskop.....	21
3	Ergebnisse.....	23
3.1	Pilze.....	23
3.1.1	Saccharomyces cerevisiae.....	23
3.1.2	Candida albicans.....	28
3.1.3	Candida glabrata, Candida kruzei, C.andida tropicalis.....	31
3.1.4	Cryptokokkus neoformans.....	33

3.2 Bakterien.....	37
3.2.1 <i>Bacillus cereus</i> .....	37
3.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> und <i>Listeria ivanovii</i> .....	40
3.2.3 <i>Helicobacter pylori</i> .....	43
3.3 Phagozytose.....	45
3.3.1 ABT-Reaktion, KOH-ABT-Reaktion, PB-KOH-ABT-Reaktion, Sialinsäure spezifische Reaktion, KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion.....	45
3.3.2 Charge Transfer Reaktion.....	48
3.3.3 Alkalische Hydrolyse.....	49
3.3.4 CIBR und CEC.....	49
3.4 Charge Transfer Reaktion.....	50
3.4.1 Pilze.....	51
3.4.2 Bakterien.....	54
4 Diskussion.....	58
4.1 Allgemeine Vorbemerkungen.....	58
4.1.1 Pilze.....	58
4.1.2 Bakterien.....	60
4.1.3 Phagozytose.....	63
4.1.4 Grundlagen der polarisationsoptischen Analyse.....	64
4.2 ABT- und ABD-Reaktion.....	66
4.3 KOH- und PB-KOH-ABT- und KOH- und PB-KOH-ABD-Reaktion.....	69
4.4 Sialinsäure spezifische Reaktion.....	71
4.5 KOH- und PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion.....	76
4.6 Alkalische Hydrolyse, saure Hydrolyse und Sialinsäureextraktion.....	78
4.7 CIBR und CEC-Methode.....	80
4.8 Analyse der Bakterienoberflächen.....	83
4.8.1 <i>B. cereus</i> .....	83
4.8.2 <i>H. pylori</i> .....	84
4.8.3 Listerien.....	85
4.9 Interpretation der Ergebnisse der Phagozytosepräparate.....	86
4.10 Charge Transfer Reaktion.....	89
4.10.1 Interpretation der Ergebnisse der Charge Transfer Reaktion.....	92
5 Zusammenfassung.....	95
6 Literatur.....	98
7 Abkürzungen.....	107
8 Abbildungsverzeichnis.....	109
9 Lebenslauf.....	112
10 Veröffentlichungen.....	114
10.1 Abstracts.....	114
10.2 Artikel.....	114
11 Selbstständigkeitserklärung.....	116
12 Danksagung.....	117

# 1 EINLEITUNG

Die Analyse von Strukturen auf submikroskopischer Ebene ist eine der größten Bemühung der medizinischen Forschung. Entscheidende Schritt hierfür lieferte zum einen die Entwicklung des Elektronenmikroskops, zum anderen aber auch die Herstellung spezifischer monoklonaler Antikörper in der Immunologie/Immunhistochemie zur Darstellung spezifischer Gruppen und Merkmale. Hiermit sind hochspezifische Analysen möglich. Ziel dieser Dissertation soll es sein zu beweisen, dass es durch die Anwendung der einfachen, kostengünstigen und schnellen topo-optischen Reaktionen und dem Polarisationsmikroskop möglich ist, dieselben molekularen Strukturen nachzuweisen, wie sie zum Beispiel die Elektronenmikroskopie oder andere hochspezifische Methoden zeigen. Zusätzlich ist es mit den topo-optischen Reaktionen möglich die Orientierung von Moleküle zur der Zelloberfläche zu bestimmen.

Seit dem Ende des 19. Jahrhundert wird die Polarisationsmikroskopie für die submikroskopische Strukturforschung eingesetzt. In der Medizin gilt die Polarisationsmikroskopie auch heute noch als Standardverfahren zur Diagnose der kollagenen Kolitis mit der von Ebner Phenol Reaktion wie auch der Amyloidose, bei der sich das Amyloid nach der Kongorotfärbung im polarisierten Licht doppelbrechend (anisotrop) und mit einer tief grünen Polarisationsfarbe darstellt. Ebenso erfolgt mit der Polarisationsmikroskopie die Unterscheidung verschiedener Kristalle. Die Zusammensetzung von Harnsteinen zum Beispiel kann mit der Polarisationsmikroskopie unterschieden werden: in Bezug auf die Länge haben die Uratkristalle ein linear negatives Vorzeichen, Kalziumpyrophosphatkristalle dagegen ein linear positives.

## ***1.1 Polarisationsmikroskopie und Doppelbrechung***

Grundlegende Funktionsweisen der Polarisationsmikroskopie in der Histologie findet man bei Scheuner et Hutschenreiter (1978). Das Polarisationsmikroskop entspricht einem modifizierten Durchlichtmikroskop. Dem Durchlichtmikroskop wird ein Polarisator hinzugefügt, der zum einen das Licht linear polarisiert und zum anderen die zweite bei der Polarisation entstehende Teilwelle durch Totalreflexion oder Totalabsorption auslöscht. Den besten Effekt erreicht man mit einer

## Einleitung

stärkeren Lichtquelle und spannungsfreien Objektiven. Die verbleibende Teilwelle des Lichtes breitet sich je nach Polarisation linear oder zirkular im Raum aus (siehe Abb 1-1).

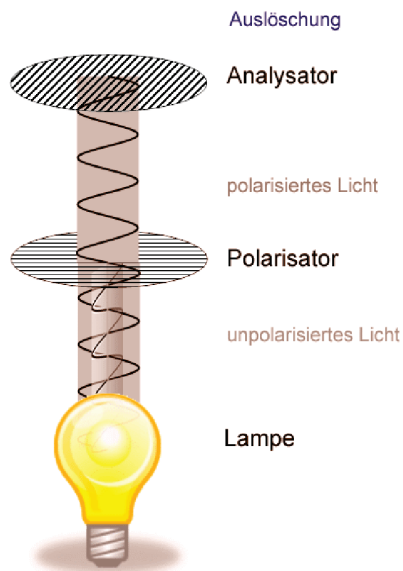


Abbildung 1-1: Polarisation des Lichts im Polarisationsmikroskop

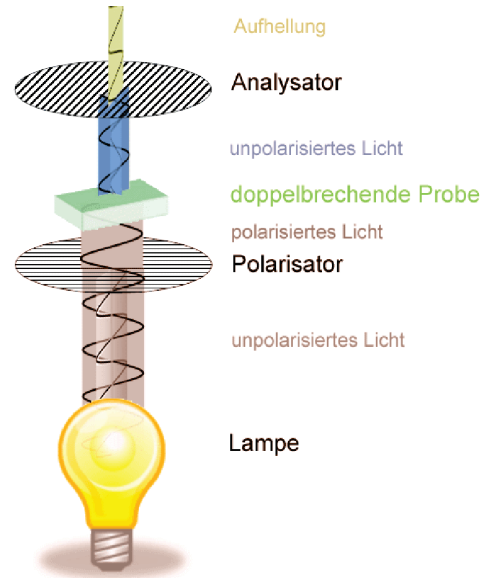


Abbildung 1-2: Polarisationsmikroskop mit anisotropem Objekt

Ist das Objekt, auf das das polarisierte Licht trifft anisotrop, wird es in zwei Wellen geteilt, die sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und Richtung im Raum ausbreiten. Zu einer polarisationsoptisch sichtbaren Doppelbrechung kommt es, wenn die beiden Schwingungsebenen der Teilwellen des Lichtes senkrecht zueinander stehen. Dies ist dann der Fall, wenn es Strukturen auf oder im Objekt gibt, die gerichtet orientiert sind (siehe Abb 1-2). Die anschauliche Darstellung dieser Theorie erfolgt mit Hilfe der Indikatrix. Sie stellt eine im Raum gekrümmte Fläche dar. Für biologische anisotrope Objekte entspricht die Indikatrix in Abhängigkeit von der Lichteinfallrichtung meist einem Rotationsellipsoid. Die Differenz der Schwingungsebenen des durch das Objekt polarisierten Lichts bezeichnet man als Doppelbrechung, die sich mit Hilfe der Schwingungsrichtung der polarisierten Teilwelle, des Brechungsindex und des Lichteinfalls berechnen lässt. Für den Betrachter erscheint ein doppelbrechendes (anisotropes) Objekt ungefärbt hell. Mit verschiedenen Farbstoffen gefärbt erscheint es grün, gelb, orange oder rot vor einem dunklen Hintergrund. Mit Hilfe eines Analysators, der im wesentlichen einem zweiten Polarisator entspricht, ist es möglich den Gangunterschied, also die Differenz der

## Einleitung

Geschwindigkeit der zwei Teilwellen zu bestimmen. Hiermit lässt sich auch bestimmen, welches Vorzeichen und damit auch welche Orientierung die doppelbrechende Struktur besitzt. Mit dem Vorzeichen der Doppelbrechung lässt sich der Aufbau submikroskopischer Strukturen analysieren. Man unterscheidet hierbei zwischen dem relativen und dem wahren Vorzeichen. Da in biologisch-histologischen Objekten die Gangunterschiede meist nur sehr gering sind, kann das wahre Vorzeichen der Doppelbrechung, welches sich auf die optische Achse des Objektes bezieht, nur sehr schwer bestimmt werden, so dass man auf das relative Vorzeichen zurückgreift. Dieses beschreibt die Lage der zu untersuchenden Struktur in Relation auf eine morphologische Struktur. In dieser Arbeit wird sich dabei auf die Zelloberfläche bezogen. Zum Nachweis spezifischer Moleküle und Gruppen sind spezifische histochemische Reaktionen wie zum Beispiel die mPAS (mild periodic acid-Schiff reaction) so adaptiert worden, dass lichtmikroskopisch die bereits bekannte Analyse auf molekularer Ebene, polarisationsoptisch aber zusätzlich eine submikroskopische Strukturanalyse erfolgen kann.

Lichtoptisch zeigen doppelbrechende Strukturen das Phänomen der Metachromasie. Romhányi, einer der Pioniere der topo-optischen Reaktionen, gelang es mit seinen Untersuchungen die von Sylén (1954) formulierten Vorstellungen zur Metachromasie zu bestätigen:

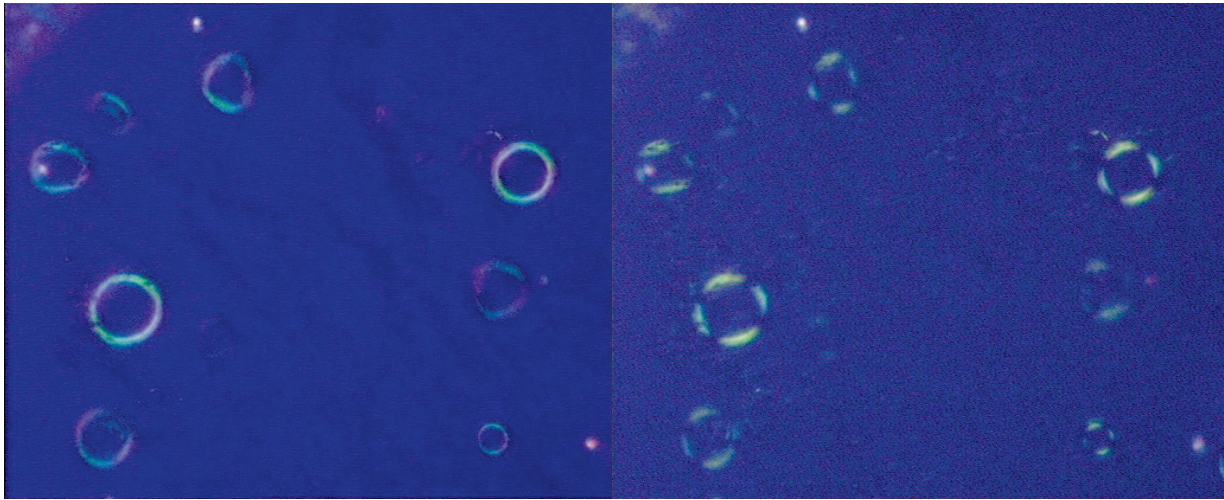
- Die Metachromasie, also eine Farbänderung von blau nach rot (Verschiebung der Wellenlänge), entsteht als Ergebnis einer parallel-co-planaren Assoziation von Farbstoffmolekülen (basische Thiazinfarbstoffe).
- Nur diejenigen Polyanionen sind metachromotrop, deren farbstoffbindende Gruppen dichter als 5 Å beieinander liegen. Bei einer Entfernung unter 5 Å treten die  $\pi$ -Elektronen miteinander in Wechselwirkung, wodurch die rote Farbe hervorgerufen wird. Die Bindung der Farbstoffmoleküle erfolgt im allgemeinen gerichtet.

Auch die Anisotropie ist abhängig vom Abstand zwischen den doppelbrechenden Molekülen bzw. den an der Reaktion teilnehmenden Gruppen. Der anisotrope Effekt tritt dann auf, wenn der Abstand zwischen 0,4 und 0,6 nm ( $0,1\text{ nm} = 10^{-10}\text{ m} = 1\text{ Å}$ ) liegt und ist besonders deutlich, wenn die nachzuweisenden Strukturen in einer bestimmten Orientierung vorliegen. Zur Analyse des Vorzeichens und damit der Orientierung der gebundenen Farbstoffmoleküle mit den topo-optischen Reaktionen wurde die Gips Rot I Platte und die sogenannte  $\lambda$ -Platte in

## Einleitung

Subparallelstellung genutzt, mit der Gangunterschiede von wenigen nm durch einen Farbumschlag nach gelb oder blau bzw. hell oder dunkel sichtbar werden. Das Vorzeichen der Doppelbrechung ist dann linear positiv, wenn das Präparat ungefärbt oder nach der Färbung in der Additionsstellung hell (gelb) und in der Subtraktionsstellung dunkel (blau) wird. Die lange Achse der Indexellipse des Objektes verläuft also parallel zur gewählten Bezugsrichtung. Bei einem linear negativen Vorzeichen der Doppelbrechung ist die Achse senkrecht zur Bezugsrichtung orientiert. Da es sich bei den von uns mit linear polarisierten Licht untersuchten Mikroorganismen um Zellen handelt, entstehen im sichtbaren Bild immer Bereiche von vollständiger Dunkelheit. Diese sind dadurch zu erklären, dass sich hier die Schwingungsrichtung parallel zu der des Polarisators befindet. Das Licht durchkreuzt das Objekt unbeeinflusst und zeigt damit auch keinen anisotropen Effekt. Im zirkular polarisierten Licht erscheinen diese Bereiche dann mit anisotropen Effekt, also kreisförmig und mit einer kontinuierlichen Doppelbrechung (siehe Abb 1-3, 1-4). Ebenso verhält sich die Membran auch, wenn man sie durch die subparallel  $\lambda$ -Platte im linear polarisierten Licht betrachtet. Sektoren der vollständigen Dunkelheit wechseln sich mit hellen und dunklen (gelben und blauen) Sektoren ab. Relevant zur Beurteilung des Vorzeichens sind die Sektoren die sich entsprechend der Schwingungsrichtung des Lichts links unten bzw. rechts oben im Bild befinden.

## Einleitung



*Abbildung 1-3: C. albicans Sialinsäure  
spezifischen Reaktion zirkular polarisiertes  
Licht x400*

*Abbildung 1-4: C. albicans Sialinsäure  
spezifische Reaktion linear polarisiertes Licht  
x400*

Im linear polarisierten Licht erscheint ein Objekt in einer bestimmten Farbe. Diese sogenannte Interferenzfarbe entspricht einem Gangunterschied ( $\lambda$ ) und somit einer bestimmten Ordnung. Zur Analyse der Schwingungsrichtung bringt man ein zweites Objekt bekannter Schwingungsrichtung in den Strahlengang mit ein. Stimmen die Schwingungsrichtungen überein, addieren sich die Gangunterschiede und es kommt zu einer Interferenzfarbe höherer Ordnung. Subtrahieren sich die Gangunterschiede, so kommt es zu einer Interferenzfarbe niedriger Ordnung.

## ***1.2 Topo-optische Reaktionen***

Nur wenige Strukturen besitzen ungefärbt eine starke Anisotropie wie z.B. Stärkekörner. Zellmembranen besitzen eine latente Doppelbrechung. Mit Hilfe der von Romhány (1963, 1966) eingeführten topo-optischen Reaktionen ist es möglich die latente Doppelbrechung der Membranen zu verstärken und somit zu analysieren. Die Strukturierung der extrazellulären Matrix wurde erst durch die topo-optischen Reaktionen ermöglicht, wie die Strukturanalyse der RNA, DNA, Cellulose und Kollagen- und Muskelfasern (Schmidt 1937, Frey-Wyssling 1938, Romhányi 1966). Topo-optische Reaktionen sind Reaktionen, die durch eine gerichtete Farbstoffbindung in der Lage sind, eine latent vorbestehende Anisotropie zu verstärken. Als

## Einleitung

Beispiel seien die Erythrozytenschatten (erythrocyte ghosts) genannt. Sie haben ungefärbt einen Gangunterschied von 0,4 nm und einen schwachen anisotropen Effekt. Nach der Färbung mit Toluidinblau im Rahmen einer topo-optischen Reaktion mit der Präzipitationsmethode vergrößert sich der Gangunterschied um den Faktor 100 (40 nm).

Nach Romhányi (1966) unterscheidet man zwei Typen von topo-optischen Reaktionen. Bei Typ I-Reaktionen handelt es sich um solche topo-optischen Reaktionen, bei denen die Farbstoffmoleküle an eine vorbestehende, räumlich orientierte, ionische Gruppe binden. Ein Beispiel ist die Bindung von Toluidinblau bei verschiedenen pH-Werten an negativ geladene (ionische) Gruppen, z.B. ( $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^-$  Gruppen bei pH 1,  $\text{PO}_4^-$  Gruppen bei pH 3 und  $\text{COOH}^-$  Gruppen bei pH 5).

Für Reaktionen vom Typ II, die vorwiegend in dieser Arbeit verwendet wurden, werden die ionischen Gruppen zur Farbstoffbindung durch vorangestellte chemische Reaktionen geschaffen (Makovitzky 2003). Sie dienen entweder dem Nachweis von negativen Ladungsträgern der Membranen (Charge Transfer Reaktion) oder dem spezifischen Nachweis von Kohlenhydraten oder Glykosaminoglykanen. Zur Färbung werden entsprechend der Reaktion kationisch oder anionische Farbstoffe verwendet. Nach den meisten Reaktionen wird nach der Färbung eine Behandlung mit einem Gemisch aus Kaliumjodid und Kaliumferricyanid an den Präparaten vorgenommen. Dies dient erstens der Stabilisierung der Farbstoffbindung und zweitens erhöht es noch einmal die Intensität der Doppelbrechung. Nach Hebenstreit und Keller (1968) werden von 1 Mol Kaliumferricyanid 3 Mol Toluidinblau gebunden. Das nach Romhányi (1963) durch eine topo-optische Reaktion erhaltene Produkt ist ein orientiertes Farbstoffaggregat, dass aus drei Komponenten besteht:

1. das Substrat, das für die orientierte Farbstoffbindung verantwortlich ist.
2. der gebundene Farbstoff
3. das Präzipitat

Die in unseren Analysen benutzten Reaktionen sind alle spezifisch in Abhängigkeit vom pH-Wert, einer bestimmten Temperatur und auf eine bestimmte Konzentration geeicht, so dass es möglich ist, spezifische Gruppen auf molekularer Ebene nachzuweisen und gleichzeitig ihre räumliche Lage in indirekter Weise zu bestimmen.

## **1.3 Farbstoffe**

### **1.3.1 Toluidinblau**

Toluidinblau gehört zu den Thiazinfarbstoffe. In wässriger Lösung vorliegend hat es einen pH-Wert zwischen 3,06 und 6,62. Als kationischer Farbstoff ist es ein bevorzugter Bindungspartner für saure Gruppen in Polyanionen (vorrangig Glykosaminoglykane, Nukleinsäuren und Polypeptide bei verschiedenen pH-Werten) mit denen Toluidinblau ein Salz ausbildet. In Abhängigkeit vom pH-Wert der Toluidinblaulösung lassen sich die unterschiedlichen sauren Gruppen anfärben. Bei einem pH-Wert  $< 2,2$  liegen die sulfatierten, sauren Gruppen dissoziiert vor und können mit Toluidinblau eine Bindung eingehen. Mit steigendem pH-Wert liegen zunächst die phosphatierten sauren Gruppen (pH-Wert  $> 3$  und  $< 4,6$ ) und später auch die Carboxylgruppen (pH-Wert  $< 5,0$ ) dissoziiert vor und können eine Bindung mit Toluidinblau eingehen.

Werden die Toluidinblaumoleküle orientiert gebunden, verändert sich das Absorptionsmaximum im Licht, was sich lichtoptisch in einem Wechsel von Orthochromasie (blaue Farbe, 630 nm) zu Metachromasie (rote Farbe, 550 nm) darstellt. Polarisationsoptisch erscheinen isotrope Objekte, bei denen die Toluidinblaumoleküle ungerichtet gebunden sind, farblos bzw. weiß, während anisotrope Objekte, bei denen die Toluidinblaumoleküle orientiert gebunden sind, sich farblich darstellen. Hierbei variiert das Farbspektrum von rot-orange über gelb bis grün, wobei eine tiefgrüne Polarisationsfarbe für eine optimale Farbstoffbindung spricht (Romhányi 1963, 1966, Scheuner et Hutschenheiter 1975).

Die atomare Grundlage der Entstehung der Metachromasie bei Toluidinblau erfolgt über das Wasserstoff tragende Stickstoffatom im Toluidinblaumolekül. Hierüber ist Toluidinblau in der Lage Komplexe auszubilden. Diese Komplexe können mit einem Gemisch aus Kaliumjodid und Kaliumferrizyanid stabilisiert und dadurch der Farbeffekt verstärkt werden (Hebenstreit et Keller 1968).

### **1.3.2 1:9 Dimethyl-Methylenblau (1,9 Dmmb)**

1:9 Dimethyl-Methylenblau gehört wie Toluidinblau zu den Thiazinfarbstoffen und verfügt über

## Einleitung

6 Methylgruppen. Am häufigsten wird es zur metachromatischen Darstellung von Glykosaminoglykanen genutzt (Módis 1991, Richter 2005). Schon bei geringen Konzentrationen an gebundenem 1,9 Dmmb an Glykosaminoglykane ändert sich das Absorbtionsspektrum von 1,9 Dmmb hin zu einer sichtbaren Metachromasie. Dieser Komplex ist auch ohne Präzipitation stabil. Des weiteren ist 1,9 Dmmb gegen hohe Salzkonzentrationen, niedrige pH-Werte und hohe Temperaturen lange stabil, so dass auch unter erschwerten Reaktionsbedingungen deutliche Farbumschläge sichtbar werden.

### **1.3.3 Eosin**

Eosin gehört zu den Xanthenfarbstoffen und ist somit ein saurer Farbstoff. Es ist als Eosin Y mit einer gelblichen Farbe und als Eosin B mit einem bläulichen Farbton vorhanden, wobei bei unseren Untersuchung das Eosin Y Verwendung findet. Am häufigsten findet Eosin in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung in der Histologie und Zytologie seine Anwendung. In dieser Arbeit ist Eosin als Farbstoff für die Charge Transfer Reaktion genutzt worden. Hier wirkt er als Elektronenakzeptor, welche Funktion es über die endständigen Bromatome ausübt.

### **1.3.4 Erythrosin**

Erythrosin gehört wie Eosin zu den Xanthenfatbstoffen. Die Fähigkeit Elektronen aufzunehmenden erhält es durch die endständigen Jodgruppen. Erythrosin finden eine verbreitete Anwendung in der Lebensmittelchemie. Es ist gegenüber hohen Temperaturen und alkalischen pH-Werten stabil. In sauren Lösungen bildet sich die schwer lösliche Erythrosinsäure aus.

### **1.3.5 Bengalrosa B**

Hierbei handelt es sich um das Natriumsalz des Bengalrosa. Bengalrosa ist ein Xanthenfarbstoff, der Fluorescein ähnlich ist. Entdeckt wurde Bengalrosa 1882 von Gnehm. Häufige Verwendung findet es in der Analytischen Chemie und der Mikroskopie. Ebenso wir Bengalrosa in der Augenheilkunde zur Diagnostik in Form von Augentropfen verwendet. Es besteht aus 4 Kohlenstoffringen, die endständig mit Chlor und Jod substituiert sind. Es ist gut wasserlöslich

## Einleitung

und in dieser Arbeit im Rahmen der Charge Transfer Reaktion als wässrige Lösung verwendet worden.

### ***1.4 Ziele und Fragestellungen***

János Fischer und Levente Emödy haben Mitte der 70er Jahre polarisationsoptische Untersuchungen mit der „anisotropen PAS Reaktion“ (ABT-Reaktion) und der KOH-ABT Reaktion an Pilzen und Bakterien durchgeführt und hiermit Erkenntnisse über den Wandaufbau und gleichzeitig die räumliche Lage der Zuckerketten an der Zelloberfläche gewonnen. Seit dieser Zeit hat sich die biochemische und chemische Strukturaufklärung schnell weiterentwickelt und es sind neue polarisationsoptisch-histochemische Methoden entstanden. So sind z.B. Sialinsäure, O-acyl-Sialinsäure und Glykosaminglykankomponenten auf der Oberfläche von Pilzen und Bakterien bestimmt worden.

In dieser Arbeit wollen wir mit neuen für die Polarisationsmikroskopie adaptierten topo-optischen Reaktionen (z.B. ABD-Reaktion, Sialinsäure spezifische Reaktion, O-acyl-Sialinsäure spezifischer Reaktion, verlängerte PAS-Reaktion (CIBR), CEC-Methode) bestimmte Komponenten biochemisch selektiv darstellen und analysieren (Makovitzky 1984, Módos 1991, Richter 2005). Mit den neuen Methoden sollen bei ausgewählten Bakterien und Pilze die Zelloberflächen analysiert und die Methodik in Hinblick auf die ultrastrukturelle Aussagefähigkeit auf molekularer Ebene beurteilt werden. Gleichzeitig sollten der Wandaufbau von verschiedenen Bakterien und Pilzen mit den Ergebnissen von Fischer und Emödy verglichen werden und die Ergebnisse der neuen Reaktionen interpretiert und mit den bereits gewonnenen Erkenntnissen verglichen werden.

#### ***1.4.1 Fragestellungen***

1. Lassen sich mit Hilfe der ABT-Reaktion (ABD-R), der Sialinsäure- und der O-acyl Sialinsäure spezifischen topo-optischen Reaktion und deren Modifikationen ultrastrukturelle Unterschiede der Membran verschiedener *Candida spp* (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida kruzei*, *Candida tropicalis*) zeigen?

## Einleitung

2. Lassen sich in der Kapsel des Pilzes *C. neoformans* Zuckerketten und Sialinsäure nachweisen? Wie sind diese in Bezug auf die Zelloberfläche räumlich orientiert?

3. Gibt es Unterschiede zwischen der inneren und äußeren Membranhälfte bei der heterogenen Formen von *C. neoformans*? Wenn es diese gibt, spiegelt sich diese in der Orientierung der Zuckermoleküle oder möglicherweise auch der Sialinsäure wieder?

4. Gibt es polarisationsoptisch ultrastrukturelle Unterschiede im Wandaufbau von Pilzen zwischen histologischen Präparaten mit einer Infektion (Candidiasis, Cryptokokkenmeningitis) und Ausstrichpräparaten aus kulturell gezüchteten Pilzen?

5. Kann man bei *C. albicans* auch ein Doppelsystem in der Zelloberfläche erkennen? Wenn ja, wie sind die Zuckerketten und Sialinsäuremoleküle in diesem System orientiert?

6. Zeigen sich mit der zuckerspezifischen ABT-R (ABD-R), der Sialinsäure spezifischen topo-optischen Reaktion und deren Modifikationen Unterschiede im Wandaufbau zwischen Gram-positiven und Gram-negative Bakterien? In wie weit können wir mit den topo-optischen Reaktionen eine Aussage über die räumliche Orientierung der verschiedenen Komponenten Zuckerketten, Sialinsäure und Glykosaminoglykane treffen?

7. Ändern sich der ultrastrukturelle Aufbau und die Doppelbrechung der Zelloberfläche der Bakterien während und/oder nach der Phagocytose?

8. Findet eine „de novo“ O-acyl Sialinsäure Synthese an der Oberfläche der phagozytierenden neutrophiler Leukozyten statt?

9. Können mit Hilfe der CEC-Methode und der verlängerten anisotropen PAS Reaktion (CIBR-Methode) die GAG Komponente von Pilzen und Bakterien selektiv dargestellt

## Einleitung

werden?

10. Lassen sich mit der Charge Transfer Reaktion negative Ladungsträger auf der Zelloberfläche von Pilzen und Bakterien mit anionischen Farbstoffen selektiv nachweisen, wenn ja, sind diese in einem orientierten Zustand angeordnet? Ist es möglich mit Hilfe von chemischen Reaktionen (Methylierung, Lipidextraktion, alkalische Hydrolyse) die Gruppen zu analysieren, die für die Charge Transfer Reaktion verantwortlich sind?

11. Sind die Zucker- und Sialinsäurekomponenten auf der Zelloberfläche der Pilze und Bakterien gleichartig verteilt? Wenn ja, lässt sich hier ein bestimmtes Verteilungsmuster zwischen den einzelnen Spezies erkennen?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Zellen

#### 2.1.1 Bakterien

Gram-positive Stäbchen-Bakterien: *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Listeria ivanovii* (*L. ivanovii*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*)

Gram-negative Stäbchen-Bakterien: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), *Campylobacter coli* (*C. coli*), *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. Pneumoniae*) 486 mit und ohne Kapselantigen K2, 492 mit und ohne Kapselantigen K1, *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*) 591 O-Antigentyp O1 mit und ohne Kapselantigen K1, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) NTUH-2044 magA+

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Virologie der Universität Freiburg Deutschland und dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Medizinischen Fakultät der Universität Pécs, Ungarn.

#### 2.1.2 Pilze

*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida glabrata* (*C. glabrata*), *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*), *Candida kruzei* (*C. kruzei*), *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*).

Züchtung der Pilze auf SDA (Sabouraud dextrose agar) für 24h bei 37°C in PBS-Puffer gelöst und mit 4%-igem Formalin (PBS gepuffert) bei pH 7,4 fixiert.

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Immunologie der Medizinischen Fakultät der Universität Pécs, Ungarn.

#### 2.1.3 Paraffinpräparate

Die in üblicher Technik hergestellten Paraffinpräparate von Soor-Ösophagitiden und cerebraler Cryptokokkose stammen aus dem Archiv des Institutes für Neuropathologie der Freien

Universität Berlin.

### **2.1.4 Phagozytosepräparate**

**Nährmedium:** Luria-Bertani Bouillon aus Trypton (10 g/l), Pilzextrakt (5g/l) und NaCl (10 g/l) sowie Glukose (2 g/l).

**Wachstumsbedingungen:** Wachstum in 100 ml oben genanntem LB-Medium bei 37°C für eine Nacht bei 150 Umdrehungen pro Minute.

**Versuchstiere:** 7-8 Wochen alte männliche NMRI Mäuse einer hygienisch pathogenfreien Umgebung von Charles Rivers Hungary.

#### **Aufbereitung der Bakterien**

- Zentrifugieren des Nährbouillon bei 9300 g bei 4°C
- Dreimaliges Waschen mit PBS bei pH 7,4.
- Lösen des Pellets in PBS
- Photometrisches ( $\lambda_{600}$ ) Herstellen einer Dichte von  $1 \times 10^9$  cfu<sup>1</sup>/ml.

#### ***In vivo* Phagozytose**

- Jeweils sechs Mäuse werden mit  $5 \times 10^8$  Bakterien in 0,5 ml intraperitoneal geimpft (eine Hälfte bekapselte Stämme, andere Hälfte unbekapselte Stämme)
- Nach 5 Minuten, 1, 2, 4, 8, und 24 Stunden töten einer Maus mittels Genickbruch
- Spülen der Peritonealhöle mit 1 ml PBS
- Aspirat (ca. 0,9 ml) in Eppendorfgefäße auf Eis kühlen
- Zur Prävention von Fibrinablagerungen die Lösung mehrfach pipettieren
- Aspirat mit derselben Menge sterilen, deionisierten Wassers zur Hämolyse möglicher Weise vorliegender Erythrozyten versetzt
- Gemisch für 3 Minuten mit PBS (1650 g) bei 4°C spülen
- Fixieren der Zellen nach dem Waschen in 1,5 ml 4%igem PBS gepufferten Formaldehyd
- 0,1 ml gleichmäßig auf einem Glästräger verteilen und lufttrocknen
- dreimaliges Waschen in deionisiertem Wasser für 2 Minuten zur Elimination der Salze

---

<sup>1</sup> cfu: colonie forming units = koloniebildene Einheiten

## **2.2 Aufbereitung**

### **2.2.1 Ausstrichpräparate**

- Lösen der kulturell gewachsenen Erreger in 0,9%igem NaCl
- Auftragen einiger Tropfen der Suspension auf einen Objektträger
- Trocknen an der Luft oder in gepufferten Formalindampf 1-2 Minuten (0,1% Formalin, gepuffert mit PBS bei pH 7.4)

### **2.2.2 Paraffinpräparate**

- Eingangspräparate (aus Magen, Kolon, Ösophagus und Zerebrum) werden fixiert
- Fixierung in 4%igem PBS gepufferten Formalin bei pH 7,4 für 2-4 h
- Einbettung in Paraffin
- Herstellung von mikroskopischen Präparaten in Form von 2-4µm dicken Zuschnitten
- Aufbringen auf Objektträger
- Entparaffinierung

### **2.2.3 Entparaffinierung**

- Entparaffinierung in Xylol bei 80°C für 24 h
- Entfernung des Xylol in einer absteigenden Alkoholreihe (absolut, 96%, 80%, 70%) bei Raumtemperatur für jeweils 5 min
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 10 min

## **2.3 Reaktionen**

### **2.3.1 ABT- (ABD-) Reaktion**

*Entsprechend der „anisotrope PAS-Reaktion“*

*lichtoptisch nach Malanin 1970, polarisationsoptisch nach Romhányi et al. 1975 und Romhányi et Molnár 1974 und Makovitzky 1984*

## Material und Methoden

- 1%ige Periodsäurelösung bei Raumtemperatur für 30 min
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 3 min
- Gesättigte Natriummetabisulfitlösung ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) bei Raumtemperatur für 30-45 min
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 10 min
- Färbung mit 0,1%igem Toluidinblau bzw. 1,9-Dimethyl Methylenblau bei pH1 bei Raumtemperatur für 5 min
- Abgießen bzw. Abtupfen der Farbstofflösung
- Präzipitation mit 1%igem Kaliumferrizyanid und 1%igem Kaliumjodid im Verhältnis 1:7 (bei der ABD-Reaktion muss nicht präzipitiert werden)
- Abdecken mit Gummi arabicum, das mit einigen Tropfen der Präzipitatlösung gemischt wurde, und einem Deckglas.

### **2.3.2 Sialinsäurespezifische Reaktion**

*nach Makovitzky 1980*

- 0,01%ige Periodsäurelösung bei 4°C für 10min
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 3 min
- Gesättigte Natriummetabisulfitlösung bei Raumtemperatur für 60 min
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 10 min
- Färbung mit 1,9-Dimethylmethylenblau bei pH1 bei Raumtemperatur für 5 min
- Abgießen bzw. abtupfen der Farbstofflösung
- Präzipitation mit frisch angesetztem 1%igem Kaliumjodid und 1%igem Kaliumferrizyanid im Verhältnis 7:1, das anschließend mit Aqua dest im Verhältnis 1:20 (Präzipitat:Aqua dest) verdünnt wird
- Abdecken mit Gummi arabicum, dem einige Tropfen der Präzipitatlösung zugesetzt wurden, und einem Deckglas.

### **2.3.3 KOH-ABT und KOH-Sialinsäurespezifische Reaktion**

*Nach Reid et al. 1973, Culling et al. 1971, Fischer 1976 und Makovitzky 1980, 1981*

## Material und Methoden

- 70%iges Ethanol bei Raumtemperatur für 5 min
- 0,5%iges Kaliumhydroxid in 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur für 30 min
- 70%iges Ethanol bei Raumtemperatur für 5 min
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 3 min

*Fortsetzen der ABT- oder ABD-Reaktion oder fortsetzen der Sialinsäure spezifischen Reaktion*

### **2.3.4 PB KOH-ABT und PB-KOH-Sialinsäurespezifische Reaktion**

*Nach Fischer 1978 und Culling et al. 1974 und Makovitzky (1984)*

- 1%ige Periodsäure bei Raumtemperatur für 30 min
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 3 min
- 1%iges Natriumborohydrid bei Raumtemperatur für 30 min
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 3 min
- 70%iger Ethanol bei Raumtemperatur für 5 min
- 0,5%iges Kaliumhydroxid in 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur für 5 min

*Fortsetzen der ABT- oder ABD-Reaktion oder fortsetzen der Sialisäure spezifischen Reaktion*

### **2.3.5 PB-Sialinsäurespezifische Reaktion**

*Nach Makovitzky (1984)*

- 0,4mM Periodsäure in einer 1M Salzsäurelösung bei 4°C für 60 min
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 3 min
- 1%iges Natriumborohydrid bei Raumtemperatur für 30 min
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 3 min
- Gesättigte Natriummetabisulfitlösung bei Raumtemperatur für 60 min
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 10 min
- Färbung mit 1,9-Dimethylmethylenblau bei pH1 bei Raumtemperatur für 5 min
- Abgießen bzw. abtupfen der Farbstofflösung

## Material und Methoden

- Präzipitation mit 1%igem Kaliumjodid und 1%igem Kaliumferrizyanid im Verhältnis 7:1, das anschließend mit Aqua dest im Verhältnis 1:20 verdünnt wird
- Abdecken mit Gummi arabicum, dem einige Tropfen der Präzipitatlösung zugesetzt wurden, und einem Deckglas.

### **2.3.6 Saure Hydrolyse**

*Nach Quintarelli et al. (1960)*

- 2M Salzsäure bei 56 °C für 3 h
- unter fließendem Wasser gründlich spülen
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 5 min

*Durchführung der Sialinsäure spezifischen Reaktion wie unter 2.3.2 beschrieben.*

### **2.3.7 Alkalische Hydrolyse**

*Nach Geyer und Scheibner (1970)*

- 70%iges Ethanol bei Raumtemperatur für 5 min
- alkoholische Bariumhydroxidlösung (3 ml gesättigte wässrige Bariumhydroxidlösung in 100ml 70%igem Ethanol) bei 56°C für 6 bis 24h
- unter fließendem Wasser gründliche spülen
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 5 min

*Durchführung der ABT-Reaktion wie unter 2.3.1 beschrieben.*

### **2.3.8 Sialinsäureextraktion**

*Nach Feuerstein (1978)*

- 0,1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung bei 90°C für 2h
- unter fließendem Wasser gründlich spülen
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 5 min

*Durchführung der Sialinsäure spezifischen Reaktion wie unter 2.3.2 beschrieben.*

### **2.3.9 Charge Transfer Reaktion**

*Mit Chlorpromazin nach Romhányi 1975*

- Phenothiazin (Chlorpromazin und neu von uns: Imipramin, Pipolphen, Teperin, Flupentixol, Fluphenazin, Thioridazin, Perphanazin, Protipendyl, Levomepromazin oder Zuclopenthixol) bei Raumtemperatur für 3 bis 5 min
- sehr vorsichtiges abspülen mit Aqua dest
- Xanthenfarbstoff in 0,1%iger wässriger Lösung für 7 bis 10 min
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 5 min
- Abdecken mit Gummi arabicum

### **2.3.10 Methylierung**

*Nach Lilie (1959)*

- Präparate in eine Lösung aus 0,5 ml konzentrierter Salzsäure und 49,5 ml Methanol bei 60°C für 6h, 12h, 18h oder 24h bringen
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 5 min

*Fortsetzen der Charge Transfer Reaktion*

### **2.3.11 CIBR (Chemically Intensified Basophilic Reaction)**

*Nach Scott et Dorling 1969 und Módis 1991*

- 2%ige wässrige Periodsäurelösung bei Raumtemperatur für 2 h
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 5 min
- 1%ige wässrige NaBH<sub>4</sub>-Lösung bei Raumtemperatur für 4 min (frisch angesetzt)
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 5 min
- 1%ige Periodsäure bei Raumtemperatur für 24 h
- Aqua dest bei Raumtemperatur für 5 min

*Fortsetzung der ABT-Reaktion beginnend mit der 30-minütigen Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Behandlung (Natriummetabisulfit)*

### 2.3.12 CEC-Methode (Critical Electrlyte Concentration Method)

*Nach Romhányi 1963, Scott et Dorling 1965 und Módis 1974*

- nach Sørensen werden Phosphatpufferlösungen mit unterschiedlicher  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration bei konstantem pH-Wert hergestellt (pH 5,2,  $[\text{MgCl}_2]$  0,1M, 0,5M, 1,0M, 1,8M). Siehe Tabelle.
- Die  $\text{MgCl}_2$ -Lösungen werden mit einer 1%igen Toluidinblau-Lösung (pH 5,2) im Verhältnis  $\text{MgCl}_2$ :Toluidinblau = 9:1 gemischt
- Färben der Präparate mit den verschiedenen Farbstofflösungen bei Raumtemperatur für 5 min
- Abgießen bzw. Abtupfen der Farbstofflösung
- Präzipitation mit 1%igem Kaliumferrizyanid und 1%igem Kaliumjodid im Verhältnis 1:7
- Abdecken mit Gummi arabicum, das mit einigen Tropfen der Präzipitatlösung gemischt wurde, und einem Deckglas

#### Phosphatpuffer nach Sørensen:

x ml Stammlösung A + (100-x) ml Stammlösung B

Stammlösung A: 11,876g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  auf 1l Wasser

Stammlösung B: 9,078g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf 1l Wasser

$[\text{MgCl}_2]$ in mol/l	0,1	0,5	1,0	1,8
Phosphatpuffer (0,01M) pH 5,2-5,4 in ml	47,5	37,5	25	5
Phosphatpuffer (0,01M) pH 5,2-5,4 mit $\text{MgCl}_2$ (2,0 mol/l)	2,5	12,5	25	45

## 2.4 Mikroskop

Axioskop 2 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) ausgestattet mit einer MC 80 DX Kamera (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), zwei Polarisationsfiltern und einem einsetzbaren Gammakompensator in subparallel Stellung.

## Material und Methoden

Die Fotografien wurden auf einem Diapositivfilm von 24x36 mm angefertigt und anschließend mit einem Diascanner vom Typ HP Photosmart P20 bei einer Auflösung von 2400 dpi digitalisiert. Eine abschließende Bearbeitung der Bilder erfolgte zur Aufhellung und Verdeutlichung von Kontrasten.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Pilze

##### 3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

###### **ABT- (ABD-), KOH-ABT- und PB-KOH-ABT-Reaktion:**

Diese drei Reaktionen dienen dem Nachweis benachbarter OH-Gruppen in Zuckermolekülen, der selektiven Darstellung der O-acyl Gruppen und der Bestimmung der räumlichen Orientierung der Zuckerketten auf molekularer Ebene in Bezug auf die Oberfläche der Zellen. Mit der ABT-Reaktion lassen sich die frei liegenden benachbarten OH-Gruppen darstellen. Die Vorbehandlung mit alkoholischer KOH-Lösung (0,5g KOH in 100ml 70%igem Ethanol) führt dazu, dass zusätzlich die OH-Gruppen an der Reaktion teilnehmen, die durch eine O-Acylierung mit dem Zuckermolekül verbunden sind. Die Vorbehandlung mit Periodsäure und nachfolgendem Borohydrid führt dazu, dass die freien OH-Gruppen blockiert werden, so dass sie nicht an den weiten Reaktionsschritten (ABT-Reaktion) und somit auch nicht an der abschließenden Reaktionen teilnehmen. Anschließend werden die O-acylierten OH-Gruppen durch KOH freigelegt, so dass diese selektiv an der Reaktion teilnehmen.

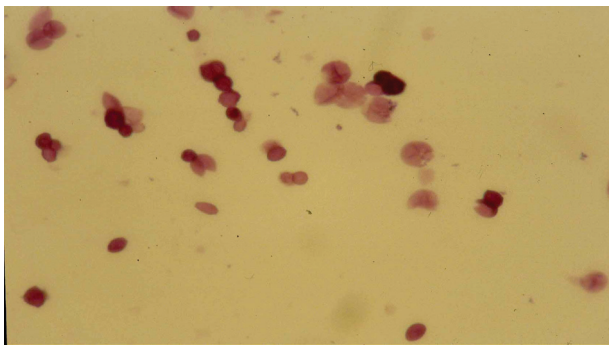


Abbildung 3-1: *S. cerevisiae* PB-KOH-ABT-Reaktion lichtoptisch x100

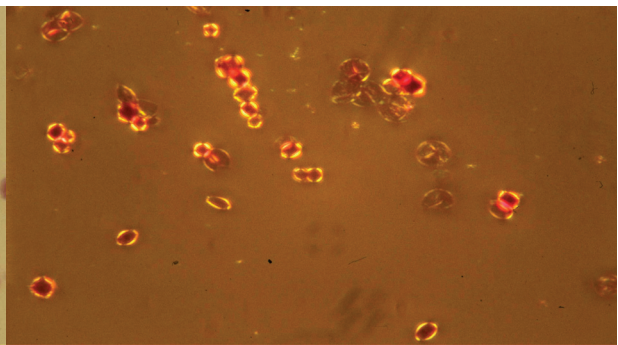


Abbildung 3-2: *S. cerevisiae* PB-KOH-ABT-Reaktion polarisationsoptisch x100

*S. cerevisiae* besitzt sowohl N- wie auch O-acylierte Zucker an seiner Oberfläche. Dies ist an der positiven Reaktion mit einer grünen Polarisationsfarbe, die die Zelloberfläche nach Anwendung

## Ergebnisse

der Reaktionen zeigt, zu erkennen. Die Orientierung der Zuckerketten im Verhältnis zur Zelloberfläche wurde mit der subparallel  $\lambda$ -Platte bestimmt. Hier zeigte sich nach der ABT-Reaktion bei additiver Kompensation eine Aufhellung (gelbe Polarisationsfarbe). Dementsprechend ist das Vorzeichen in Bezug auf die Länge linear positiv (radiär negativer Sphaerit). Die linear orientierten OH-Gruppen sind membranparallel ausgerichtet. Somit liegen die Zuckerketten senkrecht zur Membranoberfläche orientiert vor. Nach der Anwendung der KOH-ABT-Reaktion bei den Ausstrichpräparaten mit *S. cerevisiae* zeigt sich in Additionsstellung der subparallel  $\lambda$ -Platte ebenfalls eine Aufhellung des rechten unteren Sektors des Pilzes. Den Beweis, dass auch die O-acylierten Zuckerketten, wie aus den Ergebnissen der KOH-ABT-Reaktion zu vermuten ist, parallel zur Zelloberfläche angeordnet sind, erbrachte die PB-KOH-ABT-Reaktion mit einem linear positiven Vorzeichen (radiär negativer Sphaerit). Siehe auch Abb. 3-1, 3-2.

### **Sialinsäure, KOH-Sialinsäure und PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion:**

Mit diesen Reaktionen kann auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* Sialinsäure und O-acylierte-Sialinsäure (9O-acylierte-Sialinsäure) spezifisch nachgewiesen werden. Lichtoptisch sieht man bei den Ausstrichpräparaten nach den einzelnen Reaktionen eine Metachromasie der Zelloberfläche. Polarisationsoptisch erkennt man nach der Sialinsäure spezifischen Reaktion und der PB-KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion eine grüne Polarisationsfarbe, während nach der KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion die Polarisationsfarbe eher gelblich erscheint (siehe Abb. 3-3, 3-4). Interessant ist, dass die Vorzeichen der untersuchten Strukturen nicht einheitlich sind. Während die Sialinsäure und O-acyl-Sialinsäure spezifische Reaktion zu einem linear negativen Vorzeichen bei *S. cerevisiae* führen, ändert sich die Polarisationsfarbe nach der PB-KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion unter der subparallel  $\lambda$ -Platte in Additionsstellung nach gelb und zeigt so ein linear positives/radiär negatives Vorzeichen der hier vorhandenen 9O-acyl Sialinsäure an, dass heißt die OH-Gruppen sind nicht einheitlich angeordnet, sondern die 9O-acyl-Sialinsäure senkrecht zu der unveresterten und O-acylierten Sialinsäure.

## Ergebnisse

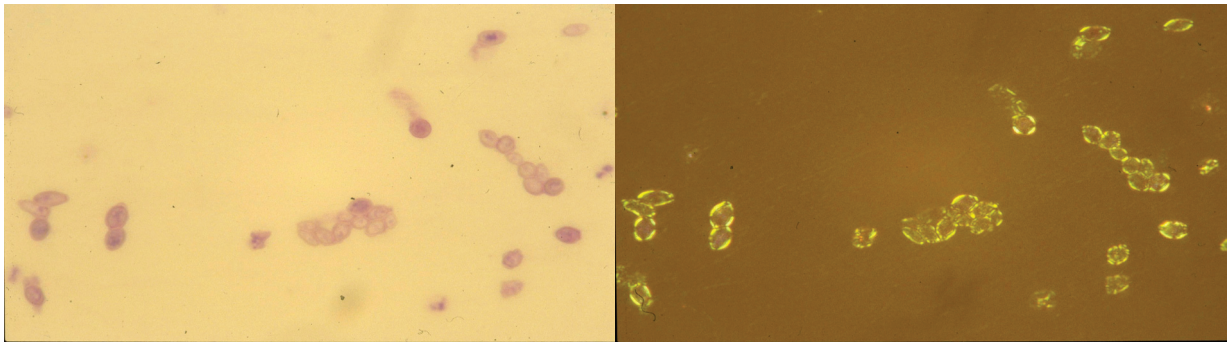


Abbildung 3-3: *S. cerevisiae* KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x100

Abbildung 3-4: *S. cerevisiae* KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x100

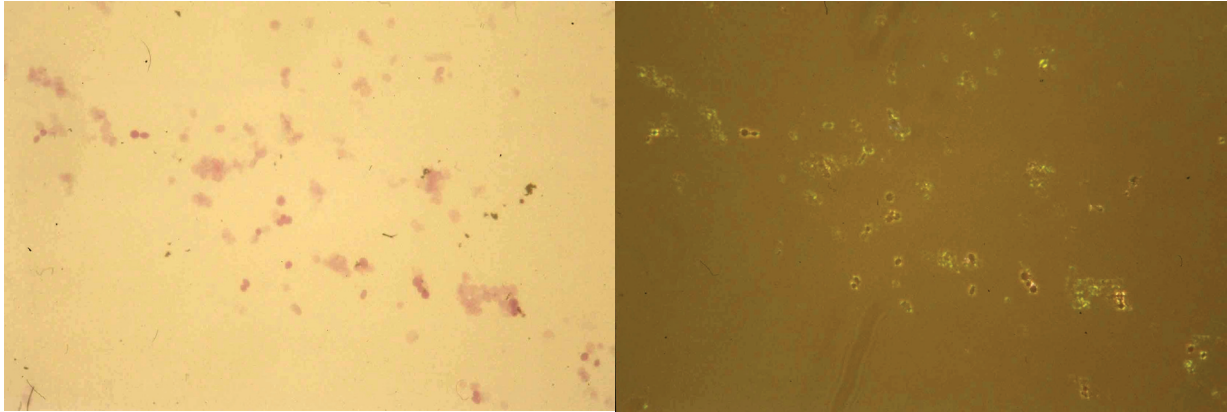
### Saure/alkalische Hydrolyse und Sialinsäureextraktion:

Diese der ABT- oder Sialinsäure spezifischen Reaktion vorangestellten Reaktionen sollen die Strukturen, die mit der angeschlossenen Reaktion nachgewiesen werden, durch chemische Reaktionen entfernen oder blockieren. Es soll also die Spezifität der Reaktionen nachgewiesen werden. Bei einer alkalischen Hydrolyse werden Kohlenhydratverbindungen abgebaut. In mehreren Versuchen mit *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die ABT-Reaktion im Anschluss an eine alkalische Hydrolyse angewandt in ihrer Intensität einen deutlich geringeren anisotropen Effekt aufwies. In den so behandelten Präparaten zeigte sich auch ein Wandel des originären Vorzeichens. So sind an der Oberfläche jetzt linear negativ orientierte Zuckerketten auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* zu sehen. Die Zuckerketten sind also membranparallel orientiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass hier ein Doppelsystem vorhanden ist, in dem die Zuckerketten in entgegengesetzten Richtungen orientiert gebunden sind. Unter den linear positiv orientierten Zuckermolekülen liegen direkt weitere linear negativ orientierte Zuckermoleküle.

Die saure Hydrolyse und die Sialinsäureextraktion sind zwei weitere Vorbehandlungen, die selektiv Sialinsäure entfernen können und mit denen die Darstellung des Doppelsystem erneut möglich ist. In unseren Ergebnissen wurde das vor allem nach der sauren Hydrolyse besonders deutlich. Hier zeigte die Zelloberfläche von *S. cerevisiae* nach der sauren Hydrolyse und angeschlossener Sialinsäure spezifischen Reaktion zu einem großen Teil keine Doppelbrechung, während die Metachromasie lichtoptisch schwach erhalten blieb. Die Zellen von *S. cerevisiae*, die noch eine Doppelbrechung hatten, zeigten eine diskontinuierliche Doppelbrechung, zum Teil

## Ergebnisse

konnte man auch eine Zweiteilung der Membran mit einem einerseits linear negativen (radiär positiver Sphaerit), andererseits linear positiven (radiär negativer Sphaerit) Vorzeichen erkennen.



*Abbildung 3-5: S. cerevisiae*  
*Sialinsäureextraktion 120 min lichtoptisch x40*

*Abbildung 3-6: S. cerevisiae*  
*Sialinsäureextraktion 120 min*  
*polarisationsoptisch x40*

Auch nach der 80 bzw. 120 minütigen Sialinsäureextraktion war die im Anschluss durchgeführte Sialinsäure spezifischen Reaktion schwach positiv mit einem linear negativen/radiär positiven Vorzeichen (siehe Abb. 3-5, 3-6). Nach einer 120-minütigen Sialinsäureextraktion ließ sich eine deutliche Reduktion der Intensität der Doppelbrechung, nicht aber ein vollständiger Verlust nachweisen. Auch lichtoptisch war nach 120 Minuten noch eine Metachromasie sichtbar. Der vollständige Verlust der Doppelbrechung sowie der Metachromasie und somit keine Farbstoffbindung konnte nach einer 180-minütigen Sialinsäureextraktion erreicht werden.

### **CIBR und CEC-Methode:**

Mit der CIBR soll überprüft werden, ob sich auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* uronsäurehaltige Glykosaminoglykane in einem orientierten Zustand befinden. Die Ausstrichpräparate von *S. cerevisiae* zeigen nach der CIBR eine deutlich positive Reaktion in Form von einem feinen anisotropen Effekt mit tiefgrüner Polarisationsfarbe. Unter Betrachtung mit dem Kompensator erkennt man, dass das Vorzeichen der uronsäurehaltigen Glykosaminoglykane linear negativ/radiär positiv ist. Dementsprechend sind die linear orientierten OH-Gruppen an den Positionen C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> senkrecht zur Zelloberfläche und die Zuckerkette parallel zur Zelloberfläche ausgerichtet.

## Ergebnisse

Bei der CEC-Methode haben die Farbstofflösungen eine unterschiedliche Molarität mit der spezifisch verschiedene Komponenten der Glykosaminoglykane dargestellt werden können. Bei dieser Methode beruht die Selektivität auf der Konzentration an Magnesiumionen. Die Ergebnisse für die Zelloberfläche von *S. cerevisiae* sind wie folgt: Positive Reaktionsergebnisse, also eine Doppelbrechung mit grüner Polarisationsfarbe erhält man bei Färbungen mit den Toluidinblaulösungen, die mit der Phosphatpufferlösung der  $\text{MgCl}_2$ -Konzentrationen **0,1 mol/l**, **0,5 mol/l** und **1,0 mol/l** versetzt sind (siehe Abb. 3-8, 3-10). Auffällig ist, dass die lichtoptische Metachromasie nur bei Konzentrationen von **0,1 mol/l** und **1,0 mol/l** vorhanden ist. Bei der  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration von **0,5 mol/l** zeigt sich lichtoptisch eine Orthochromasie (siehe Abb. 3-7, 3-9). Die Färbung mit der Phosphatpufferlösung, die eine  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration von **1,8 mol/l** enthält ist negativ. Hier ist keine Färbung und kein anisotroper Effekt erkennbar.

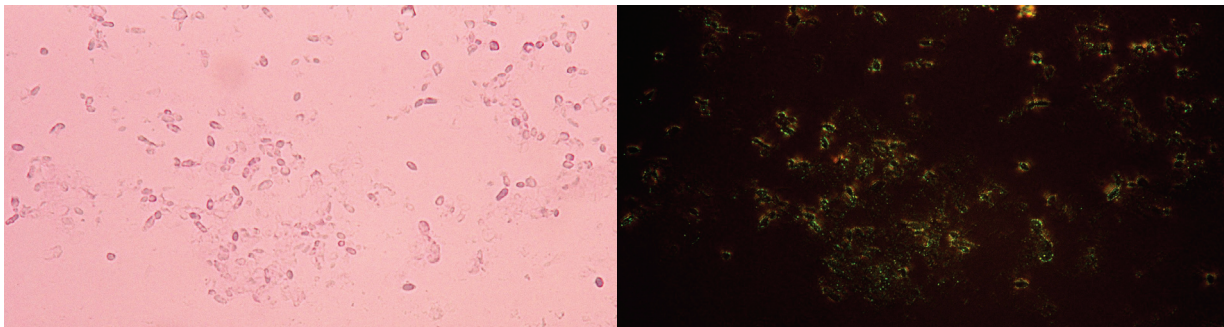


Abbildung 3-7: *S. cerevisiae* CEC  $\text{MgCl}_2$   
[0,5mol/l] lichtoptisch x40

Abbildung 3-8: *S. cerevisiae* CEC  $\text{MgCl}_2$   
[0,5mol/l] polarisationsoptisch x40

Auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* befinden sich demnach Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Dieses Ergebnis stimmt mit dem der CIBR überein. Das Vorzeichen der Doppelbrechung ist linear negativ.

Aufgrund den Ergebnisse der CIBR sind die linear orientierten OH-Gruppen senkrecht auf der Zelloberfläche orientiert und somit die Uronsäuremoleküle parallel ausgerichtet.

## Ergebnisse

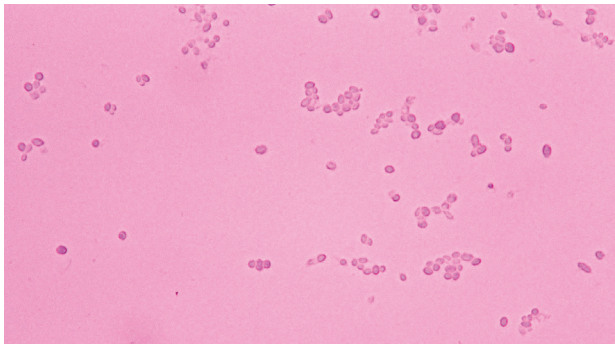


Abbildung 3-9: *S. cerevisiae* CEC  $MgCl_2$  [1,0mol/l] lichtoptische x40

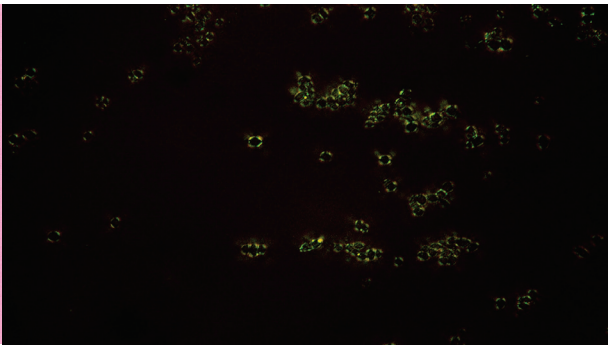


Abbildung 3-10: *S. cerevisiae* CEC  $MgCl_2$  [1,0mol/l] polarisationsoptisch x40

### 3.1.2 *Candida albicans*

#### ABT- (ABD-), KOH-ABT- und PB-KOH-ABT-Reaktion:

*C. albicans* stellt sich in den topo-optischen Reaktionen immer gut und leicht erkennbar dar. Sowohl die ABT- als auch die ABD-Reaktion sind gut geeignet Zuckerketten auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Die Zuckerketten zeigen sich im polarisierten Licht mit einer tiefgrünen Polarisationsfarbe (siehe Abb. 3-11) und einer kräftigen lichtoptischen Metachromasie. Die weitere Analyse mit der subparallel  $\lambda$ -Platte zeigt, dass das Vorzeichen der Zuckerketten auf der Zelloberfläche von *C. albicans* linear positiv, radiär negativ ist. Die OH-Gruppen sind parallel zur Zelloberfläche angeordnet. Dementsprechend sind die Zuckerketten senkrecht auf der Membranoberfläche gebunden. Dieselben Ergebnisse erhielten wir gleich ob wir die freien Zuckerketten, zusätzlich die O-acylierten oder nur die O-acylierten Zuckerketten nachwiesen. Bei allen wurde in der Additionsstellung eine gelbe, in der Subtraktionsstellung eine blaue Polarisationsfarbe registriert.

## Ergebnisse

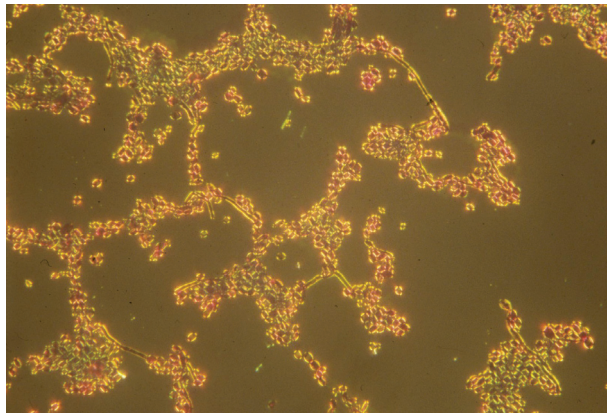


Abbildung 3-11: *C. albicans* ABD-Reaktion  
polarisationsoptisch x20

### **Sialinsäure, KOH-Sialinsäure und PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion:**

Der Nachweise von Sialinsäure erfolgt über die OH-Gruppen, die sich an den C-Atomen in den Positionen C<sub>7</sub> bis C<sub>9</sub> befinden. Diese OH-Gruppen können spezifisch durch die milde Oxidation bei einer niedrigen Periodsäurekonzentration und niedrigen Temperatur angegriffen werden. Die Ausstrichpräparate von *C. albicans* zeigten nach Anwendung der Sialinsäure spezifischen Reaktion eine kräftige tiefgrüne Polarisationsfarbe, was für eine optimale und eindeutige orientierte Bindung der Farbstoffmoleküle spricht. Auch die Analyse des Vorzeichens zeigte eindeutig, dass die Sialinsäure auf der Zelloberfläche von *C. albicans* linear negativ, radiär positiv orientiert ist. Die rechten, unteren Sektoren der Zelloberfläche verändern ihre Farbe in Additionsstellung eindeutig nach blau und in Subtraktionsstellung eindeutig nach gelb.

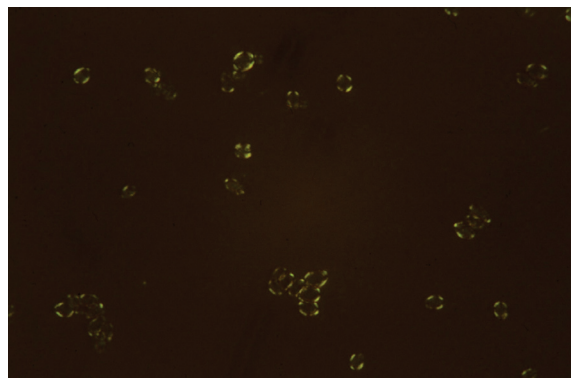


Abbildung 3-12: *C. albicans* Sialinsäure  
spezifische Reaktion polarisationsoptisch x40

## Ergebnisse

Auch die KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion brachte ähnlich deutliche Ergebnisse. Eine tiefgrüne Polarisationsfarbe und ein linear negatives Vorzeichen zeigen auch hier die OH-Gruppen senkrecht zur Zelloberfläche orientiert an.

Eine schwächere Reaktion erhält man im polarisierten Licht nach den Reaktionsschritten der PB-KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion. Trotzdem zeigt auch diese Reaktion ein eindeutiges Ergebnis durch eine optimale Farbstoffbindung in der grünen Polarisationsfarbe an. Schaut man die den Zellen von *C. albicans* in Additionsstellung unter der  $\lambda$ -Platte an, so sieht man, dass das Vorzeichen der 9O-acyl Sialinsäure linear positiv/radiär negativ ist. Die 9O-acyl-Sialinsäure ist also anders orientiert als die Sialinsäure bzw. deren OH-Gruppen.

### **Saure/alkalische Hydrolyse und Sialinsäureextraktion:**

Mit der alkalischen Hydrolyse wurde auch bei *C. albicans* versucht terminale Zuckermoleküle aufzuspalten, so dass diese der ABT-Reaktion nicht mehr zu Verfügung stehen. Nach anwenden der ABT-Reaktion im Anschluss an die alkalische Hydrolyse zeigte sich bei *C. albicans* weiterhin einen anisotropen Effekt. Dieser war in seiner Intensität aber deutlich herabgesetzt. Am auffälligsten ist aber, dass sich das Vorzeichen von linear positiv nach linear negativ geändert hat. Die Zuckerketten sind parallel zur Zelloberfläche angeordnet, wodurch deutlich wird, dass bei *C. albicans* wie auch bei *S. cerevisiae* ein Doppelsystem vorliegt, das mit Hilfe der alkalischen Hydrolyse aufgezeigt werden kann.

Nach der Hydrolyse mit einer milden Salzsäure, mit der sich selektiv die Sialinsäure entfernen lässt, wurde die Sialinsäure spezifische Reaktion benutzt. Lichtoptisch zeigte sich hier nur noch eine sehr schwache Metachromasie. Polarisationsoptisch wurden sowohl absolut negative Präparate wie auch solche mit einer dezenten Doppelbrechung bei linear negativem Vorzeichen registriert (siehe Abb. 3-13, 3-14). Die Farbstoffmoleküle sind senkrecht zur Zelloberfläche orientiert gebunden. Auch die ebenso selektive Entfernung der Sialinsäure mit Schwefelsäure (Sialinsäureextraktion) erbrachte nach der Sialinsäure spezifischen Reaktion eine stark reduzierte Doppelbrechung. Doch auch hier blieb das Vorzeichen linear negativ, radiär positiv. Erst nach einer 220-minütigen Sialinsäureextraktion verschwanden Metachromasie und Doppelbrechung vollständig.

## Ergebnisse

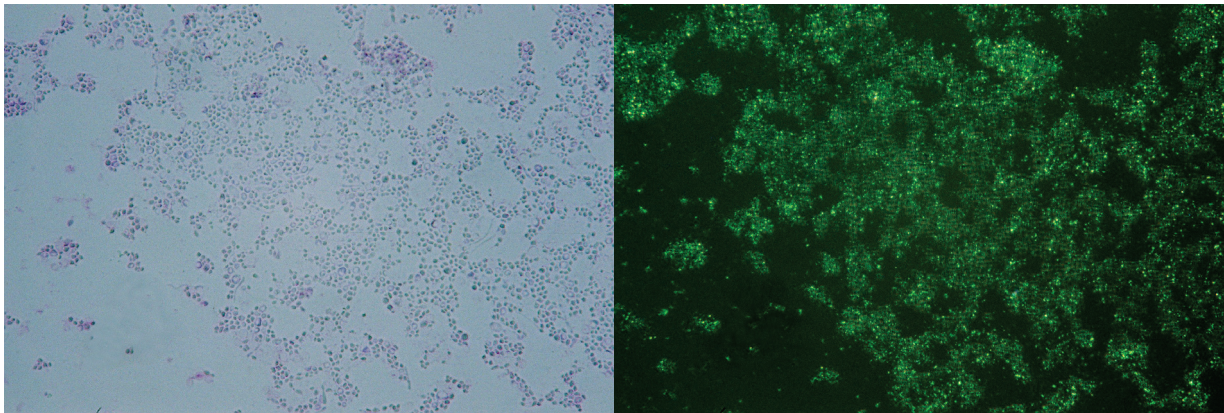


Abbildung 3-13: *C. albicans* saure  
Hydrolyse+Sialinsäure spezifische Reaktion  
lichtoptisch x40

Abbildung 3-14: *C. albicans* saure  
Hydrolyse+Sialinsäure spezifische Reaktion  
polarisationsoptisch x40

### **CIBR und CEC-Methode:**

Bei *C. albicans* war es ebenso wie bei *S. cerevisiae* möglich mit der CIBR uronsäurehaltige Glykosaminoglykane selektiv nachzuweisen. Wir registrierten eine Metachromasie und Doppelbrechung mit tiefgrüner Polarisationsfarbe mit linear negativem Vorzeichen. Die Farbstoffmoleküle sind senkrecht zur Zelloberfläche orientiert gebunden. Dies zeigt, dass die OH-Gruppen in den Positionen C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> ebenfalls linear gebunden und senkrecht zur Zelloberfläche orientiert sind. Zur differenzierteren Analyse der Glykosaminoglykane wurde die CEC-Methode angewandt. Hierbei zeigt sich nur bei einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von **0,1** mol/l eine positive Reaktion mit einem linear negativen, radiär positiven Vorzeichen. Mit dieser Reaktion konnte Hyaluronsäure auf der Zelloberfläche von *C. albicans* selektiv nachgewiesen werden, wobei die OH-Gruppen senkrecht auf der Zelloberfläche stehen.

### **3.1.3 *Candida glabrata*, *Candida kruzei*, *Candida tropicalis***

#### **ABT- (ABD-) Reaktion und Sialinsäure spezifische Reaktion:**

Die Analyse der Zelloberfläche mit der ABT- und ABD-Reaktion sowie der Sialinsäure spezifischen Reaktion erfolgte zum Nachweis benachbarter (linear orientierter) OH-Gruppen und Sialinsäure. Die oben genannten Candidastämme besitzen auf ihrer Zelloberfläche Oligosaccharidketten. Dies zeigt sich lichtoptisch durch eine Metachromasie und

## Ergebnisse

polarisationsoptisch durch eine grüne Polarisationsfarbe nach Anwenden der oben genannten Reaktionen. Unter Verwendung der subparallel  $\lambda$ -Platte zeigten sich hinsichtlich der Orientierung der Farbstoffmoleküle aber deutliche Unterschiede. ***C. kruzei* hat ein linear positives Vorzeichen (radiär negativer Sphaerit). *C. kruzei* verhält sich damit im polarisierten Licht wie *C. albicans*. Bei *C. glabrata* und *C. tropicalis* hingegen sind die Farbstoffmoleküle genau entgegengesetzt orientiert gebunden. Ihr Vorzeichen ist linear negativ (radiär positiver Sphaerit). Die Zuckerketten auf *C. albicans* und *C. kruzei* sind im Verhältnis zur Zelloberfläche also senkrecht gebunden, während die Zuckerketten auf den Pilzen *C. glabrata* und *C. tropicalis* parallel zur Zelloberfläche angeordnet sind.** Die vergleichenden Versuche mit 1,9-Dmmb (ABD-R) anstelle von Toluidinblau zeigten dieselben Ergebnisse sowohl in der Polarisationsfarbe wie auch im Hinblick auf die Orientierung der Zuckerketten. Allein die Intensität betreffend ergaben sich Differenzen (stärkere anisotrope Effekte mit der ABD-Reaktion).

Die Ergebnisse der Sialinsäure spezifischen Reaktion zeigten ein anderes Bild als die ABT-Reaktion. Die Reaktion ist bei *C. glabrata*, *C. tropicalis* und *C. kruzei* deutlich positiv ausgefallen. Dies zeigt sich an einer durchweg kräftigen tiefgrünen Polarisationsfarbe. Bei der Analyse des Vorzeichens konnten hier nicht wie bei der ABT-Reaktion Spezies spezifische Unterschiede erkannt werden. Die Vorzeichen waren immer linear negativ, radiär positiv. Die Farbstoffmoleküle und damit auch die linear orientierten OH-Gruppen der Sialinsäure sind also senkrecht zur Zelloberfläche angeordnet.

### **PB-KOH-ABT- und PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion:**

Der selektive Darstellung der O-acylierten Zuckerketten mit der PB-KOH-ABT-Reaktion zeigte bei den drei *Candida ssp.* Einheitliche Ergebnisse. Bei allen war eine auf die Zellmembran beschränkte lichtoptische Metachromasie und polarisationsoptische Doppelbrechung zu erkennen. Das Vorzeichen der Farbstoffmoleküle stellte sich linear negativ, radiär positiv dar. Hieraus ergibt sich, dass die O-acylierten Zuckermoleküle parallel zur Zelloberfläche orientiert sind.

Die Ergebnisse der PB-KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion zum Nachweis von 9O-acyl-

## Ergebnisse

Sialinsäure waren nicht einheitlich. Alle zeigten mit einer grünen Polarisationsfarbe eine optimale Farbstoffbindung an. **Das Vorzeichen war bei *C. tropicalis* linear positiv, wie es sich auch bei dem Nachweis der 9O-acyl-Sialinsäure auf der Zelloberfläche von *C. albicans* zeigte. *C. glabrata* und *C. kruzei* zeigten unter Verwendung der subparallel  $\lambda$ -Platte eine in der Additionslage dunkle (blaue) Polarisationsfarbe, die für ein linear negatives Vorzeichen (radiär positiver Sphärit) steht.** Die Farbstoffmoleküle und damit auch die terminalen, linear orientierten OH-Gruppen von *C. glabrata* und *C. kruzei* sind senkrecht zur Zelloberfläche ausgerichtet.

### **CIBR und CEC-Methode:**

Mit der CIBR gelang auf allen drei *Candida ssp.* der Nachweis uronsäurehaltiger Glykosaminoglykane auf der Zelloberfläche. Eine lichtoptische Metachromasie und eine polarisationsoptisch grüne Farbe zeigten dies deutlich an. Das Vorzeichen ist linear negativ, radiär positiv. Mit der CEC-Methode ist die Zelloberfläche auf Glykosaminoglykane und Proteoglykane untersucht worden. Hier gelang der Nachweis von Keratansulfat auf der Zelloberfläche von *C. kruzei* und der Nachweis von Hyaluronsäure auf der Zelloberfläche von *C. glabrata*. In beiden Fällen haben die Proteoglykane ein linear negatives Vorzeichen, da die Toluidinblaufarbstoffmoleküle senkrecht auf der Oberfläche orientiert gebunden sind.

### **3.1.4 *Cryptokokkus neoformans***

#### **ABT- (ABD-) und PB-KOH-ABT-Reaktion:**

Nach der ABT-Reaktion zeichnet sich lichtmikroskopisch wie auch polarisationsmikroskopisch sehr deutlich die Zelloberfläche gegen die Kapsel ab. Beide Strukturen zeigen lichtmikroskopisch eine Metachromasie. Polarisationsoptisch erkennt man eine hochorientierte Bindung der Zuckerketten auf der Zelloberfläche wie auch auf der Kapsel in Form einer tiefgrünen Polarisationsfarbe. Die Analyse der räumlichen Orientierung der Zuckerketten zeigt, dass die Farbstoffmoleküle auf der Zelloberfläche senkrecht zu der Oberfläche orientiert gebunden sind, damit liegen die linear orientierten OH-Gruppen senkrecht. Hieraus folgt, dass die Zuckermoleküle parallel zur Zelloberfläche orientiert vorliegen. Die Zuckerketten der Kapsel

## Ergebnisse

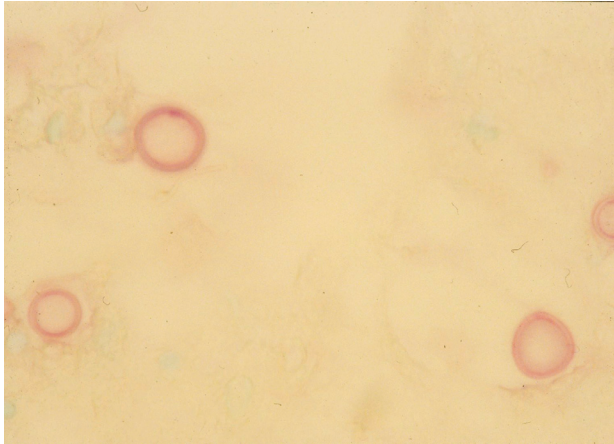
verhalten sich genau entgegengesetzt. Sie sind senkrecht auf der Kapsel gebundenen. Die Kapsel der heterogene Form von *C. neoformans* besteht dementsprechend aus einer inneren und äußeren Membran, deren Zuckerketten entgegengesetzt orientiert sind.

O-acylierte Zuckerketten, die mit der PB-KOH-ABT-Reaktion nachgewiesen werden, konnten bei *C. neoformans* ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Hier zeigte sich noch deutlicher als bei der ABT-Reaktion eine Unterscheidung in der Orientierung der Zuckerketten auf der Zelloberfläche und auf der Kapsel. Unter Verwendung der subparallel  $\lambda$ -Platte konnte das Vorzeichen bestimmt werden. Die Farbstoffmoleküle, und damit auch die vicinalen OH-Gruppen, sind linear negativ auf der Zelloberfläche orientiert. Auf der Kapsel sind die OH-Gruppen der O-acylierten Zuckerketten linear positiv, also wieder entgegengesetzt denen der Zelloberfläche orientiert. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich, dass die Zuckerketten auf der Zelloberfläche parallel und auf der Kapsel senkrecht orientiert gebundenen sind.

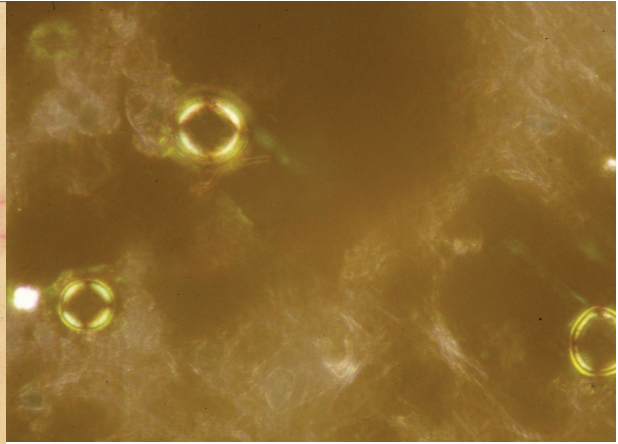
### **Sialinsäure, KOH-Sialinsäure und PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion:**

Der Nachweis von Sialinsäure auf der Zelloberfläche wie auch in der Kapsel von *C. neoformans* war positiv. Ein linear negatives Vorzeichen der Sialinsäure spezifischen Reaktion zeigt senkrecht auf der Zelloberfläche gebundene, vicinale (terminale) OH-Gruppen der Sialinsäure an. Die benachbarten OH-Gruppen der Sialinsäure, die in die Kapsel integriert ist, verhält sich entgegengesetzt. Das Vorzeichen ist hier linear positiv, woraus sich ergibt, dass die Farbstoffmoleküle, deren Orientierung der der OH-Gruppen der Atome C<sub>7</sub> bis C<sub>9</sub> entspricht, parallel zur Kapsel ausgerichtet ist (siehe Abb. 3-15, 3-16, 3-17, 3-18). Nach Anwendung der KOH- und PB-KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion erhielten wie ebenfalls eine deutlich positive Reaktionen sowohl auf der Zelloberfläche wie auch auf der Kapsel in Form einer grünen Polarisationsfarbe im polarisierten Licht. Dementsprechend sind auf der Zelloberfläche von *C. neoformans* O-acyl- und auch 9O-acyl-Sialinsäure vorhanden. Die Untersuchungen mit der subparallel  $\lambda$ -Platte brachten dieselben Ergebnisse, wie die einfache Sialinsäure spezifische Reaktion: die OH-Gruppen der 9O-acyl-Sialinsäure sind auf der Zelloberfläche senkrecht und auf der Kapsel von *C. neoformans* parallel gebunden.

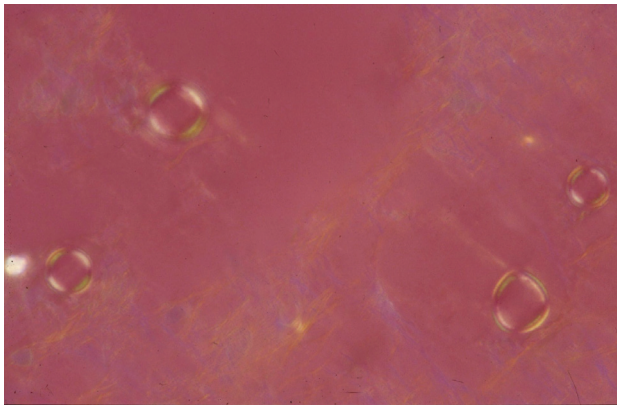
## Ergebnisse



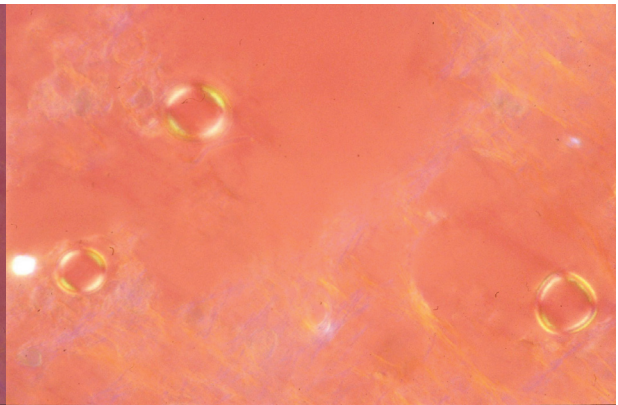
*Abbildung 3-15: C. neoformans bei Cryptococcenencephalitis Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x100*



*Abbildung 3-16: C. neoformans bei Cryptococcenencephalitis Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x100*



*Abbildung 3-17: C. neoformans bei Cryptococcenencephalitis Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch bei additiver Kompensation x100*



*Abbildung 3-18: C. neoformans bei Cryptococcenencephalitis Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch bei subtraktiver Kompensation x100*

### **Saure/alkalische Hydrolyse und Sialinsäureextraktion:**

Die alkalische Hydrolyse mit anschließender ABT-R wurde für die Analyse auch bei *C. neoformans* angewendet. Hiernach konnten wir lichtoptisch zum Teil noch eine Metachromasie feststellen. Viele der Zellen zeigten jedoch eine ausgeprägte Orthochromasie. Polarisationsoptisch bestätigte sich das Bild, dass mit der alkalischen Hydrolyse viele der OH-Gruppen der Glykoproteine entfernt worden sind. Die Polarisationsfarbe variierte zwischen grün

## Ergebnisse

und rot-orange. Die orthochromatischen Pilze zeigten im polarisierten Licht keine Doppelbrechung mehr. Das Vorzeichen der Zellen, die eine Doppelbrechung zeigten, war uneins. Es waren sowohl Zellen mit linear negativem wie auch linear positivem Vorzeichen zu sehen. Erhalten geblieben ist, dass die OH-Gruppen der Zelloberfläche und die der Kapsel senkrecht zueinander orientiert sind.

Um selektiv die Sialinsäure auf der Zelloberfläche und Kapsel von *C. neoformans* zu entfernen wurde auch hier die saure Hydrolyse mittels Salzsäure und die Sialinsäureextraktion mittels Schwefelsäure der Sialinsäure spezifischen Reaktion vorangestellt. Nach der Sialinsäureextraktion war es uns nicht möglich mit der Sialinsäure spezifischen Reaktion (120-180 min) einen anisotropen Effekt nachzuweisen. Nach der sauren Hydrolyse gelang es, noch eine Restdoppelbrechung der Kapsel und der Zelloberfläche zu erkennen. Mit Hilfe der subparallel  $\lambda$ -Platte konnte gezeigt werden, dass die linear orientierten OH-Gruppen auf der Zelloberfläche und der Kapsel entgegengesetzt (senkrecht und parallel) orientiert vorliegen. Dementsprechend haben wir ein linear negatives Vorzeichen für Zelloberfläche und ein linear positives Vorzeichen für die Kapsel der dort liegenden Sialinsäure festgestellt.

### **CIBR und CEC-Methode:**

Uronsäurehaltige Glykosaminoglykane können mit der CIBR nachgewiesen werden. Nach der Anwendung der CIBR bei *C. neoformans* war im polarisierten Licht eine Doppelbrechung der Zelloberfläche mit linear negativem und der Kapsel mit linear positivem Charakter zu sehen.

Mit Hilfe der CEC konnte gezeigt werden, dass zumindest ein Teil der uronsäurehaltigen Glykosaminoglykane Hyaluronsäure ist. Bei den getesteten Konzentrationen an  $\text{MgCl}_2$  in der Phosphatpufferlösung konnte nur bei einer Konzentration von **0,1** mol/l ein anisotroper Effekt gesehen werden. Das Vorzeichen war hierbei auf der Zelloberfläche linear negativ und auf der Kapsel linear positiv (siehe Abb. 3-19, 3-20, 3-21). Lichtoptisch beschränkt sich die Metachromasie auf die Zelloberfläche. Die Kapsel selbst zeigte eine Orthochromasie.

## Ergebnisse

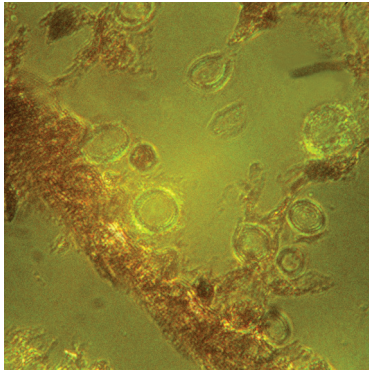


Abbildung 3-19: *C. neoformans* CEC  $\text{MgCl}_2$  [0,1mol/l] polarisationsoptisch x400

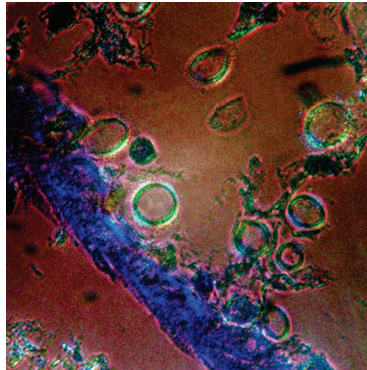


Abbildung 3-20: *C. neoformans* CEC  $\text{MgCl}_2$  [0,1mol/l] additiv x400

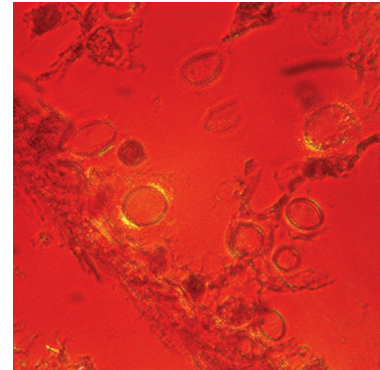


Abbildung 3-21: *C. neoformans* CEC  $\text{MgCl}_2$  [0,1mol/l] subtraktiv x400

## 3.2 Bakterien

### 3.2.1 *Bacillus cereus*

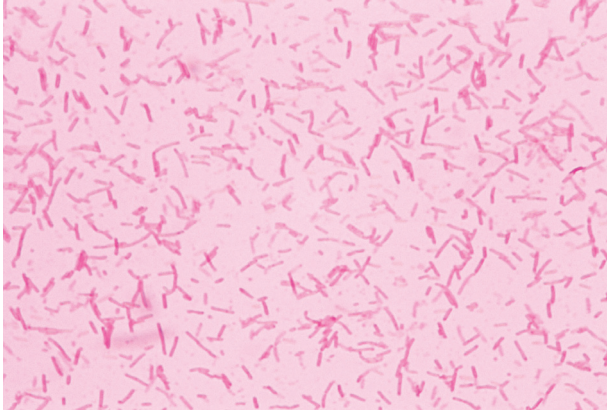
#### ABT- (ABD-), KOH-ABT- und PB-KOH-ABT-Reaktion:

Die ABT-Reaktion erbrachte bei *B. cereus* eine kräftige lichtoptische Metachromasie. Auch polarisationsoptisch zeigt sich eine eindeutige Anisotropie in einer tiefgrünen Polarisationsfarbe, die für eine optimale Farbstoffbindung spricht. Betrachtet man *B. cereus* unter der subparallel  $\lambda$ -Platte, so erkennt man, dass das Vorzeichen nach Anwendung der ABT-Reaktion linear positiv, radiär negativ ist. Selbe Ergebnisse zeigen sich auch mit der Anwendung der ABD-Reaktion (siehe Abb. 3-22, 3-23).

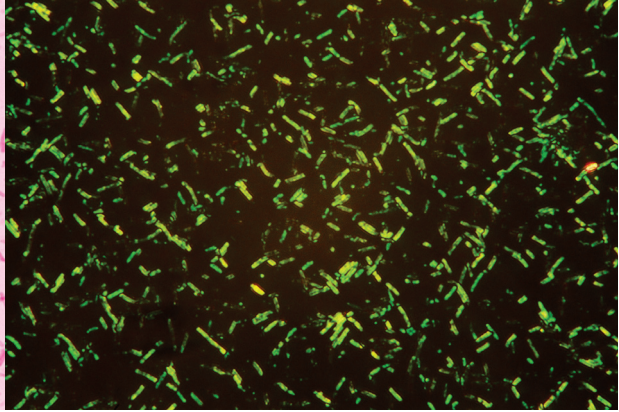
Nach Anwendung der KOH-ABT-Reaktion, mit der zusätzlich O-acylierte Zuckerketten mit in die ABT-Reaktion einbezogen werden, zeigt sich lichtoptisch weiterhin eine Metachromasie. Auch polarisationsoptisch ist die Anisotropie in Form der grünen Polarisationsfarbe sichtbar. Im Vergleich zu der Intensität der Doppelbrechung nach der reinen ABT-Reaktion ist diese jedoch herabgesetzt. Mit Verwendung der subparallel  $\lambda$ -Platte registriert man das Vorzeichen als linear negativ, radiär positiv. Also ein im Vergleich zur ABT-Reaktion entgegengesetztes Vorzeichen. Nach der Anwendung der PB-KOH-ABT-Reaktion zur alleinigen Darstellung der O-acylierten Zuckerketten ist lichtoptisch eine schwache Metachromasie zu erkennen. Im polarisierten Licht

## Ergebnisse

ist die Doppelbrechung schwach zu erkennen. Das Vorzeichen ist auch hier linear negativ, radiär positiv.



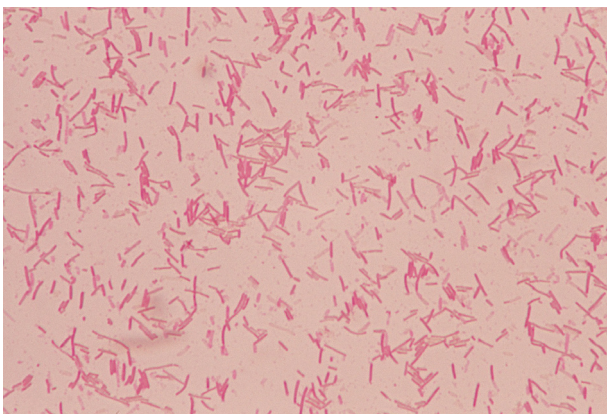
*Abbildung 3-22: B. cereus ABD-Reaktion  
lichtoptisch x100*



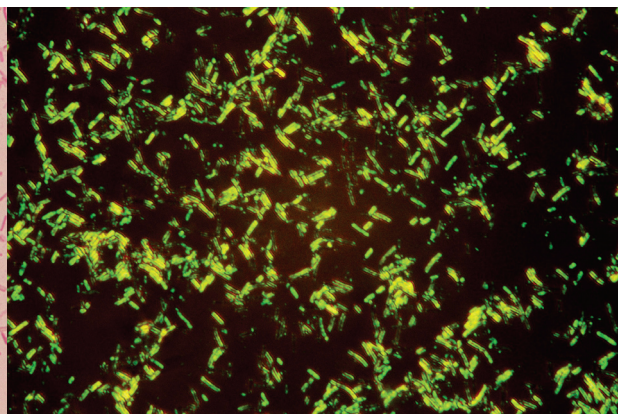
*Abbildung 3-23: B. cereus ABD-Reaktion  
polarisationsoptisch x100*

### **Sialinsäure, KOH-Sialinsäure und PB-(KOH-)Sialinsäure spezifische Reaktion:**

Nach Anwendung der einfachen Sialinsäure spezifischen Reaktion erscheint die Zelloberfläche von *B. cereus* mit einer kräftige Metachromasie (siehe Abb. 3-24). Im linear polarisierten Licht erscheint die Zelloberfläche mit einer grünen Polarisationsfarbe (siehe Abb. 3-25). Die Analyse des Vorzeichen zeigt dieses linear positiv, radiär negativ an. Dies zeigen auch die zirkular polarisierten Aufnahmen (3-26, 3-27) an.

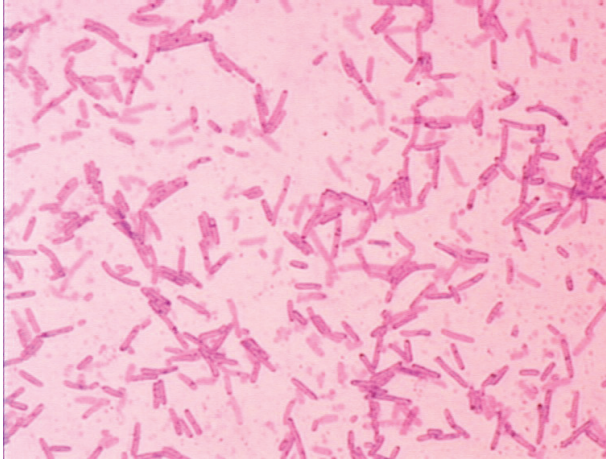


*Abbildung 3-24: B. cereus Sialinsäure  
spezifische Reaktion lichtoptisch x100*

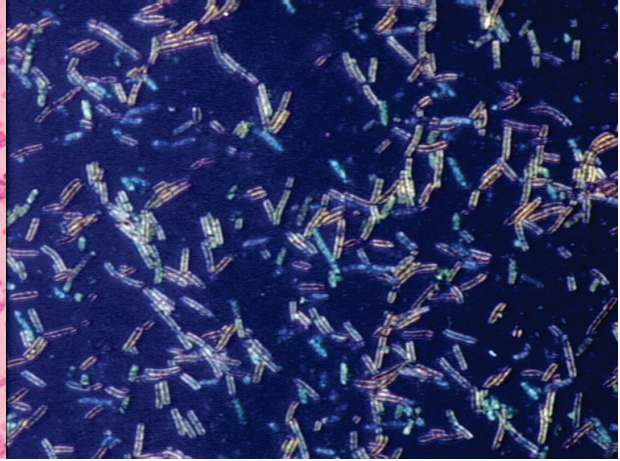


*Abbildung 3-25: B. cereus Sialinsäure  
spezifische Reaktion polarisationsoptisch x100*

## Ergebnisse

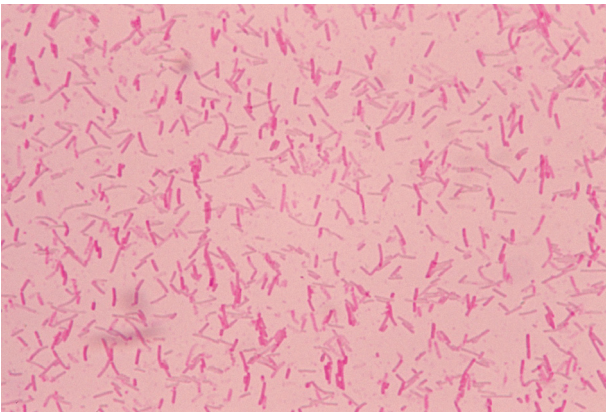


*Abbildung 3-26: B. cereus Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch zirkular polarisiert x100*

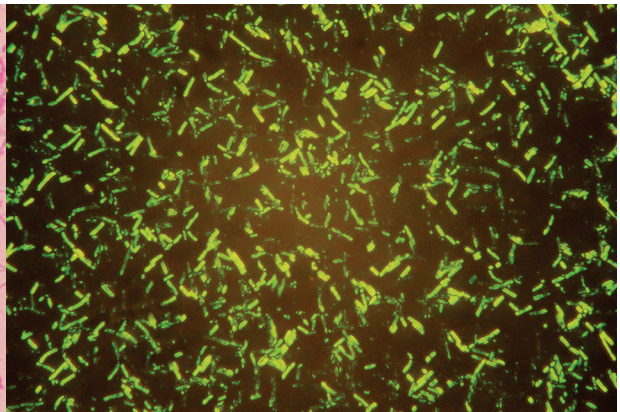


*Abbildung 3-27: B. cereus Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch zirkular polarisiert x100*

Mit der KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion können neben der freien N-acylierten Sialinsäure zusätzlich auch O-acylierte Sialinsäure dargestellt werden. Bei *B. cereus* zeigte sich nach Anwenden der KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion lichtoptisch eine Metachromasie und polarisationsoptisch eine Doppelbrechung mit grüner Polarisationsfarbe.



*Abbildung 3-28: B. cereus PB-Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x100*



*Abbildung 3-29: B. cereus PB-Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x100*

Das Vorzeichen unter der subparallel  $\lambda$ -Platte ist jetzt linear negativ, radiär positiv. Die Analyse der Zelloberfläche mit der PB-(KOH-)Sialinsäure spezifischen Reaktion erbracht einen guten

## Ergebnisse

Effekt. Sowohl die lichtoptische Metachromasie wie auch die polarisationsoptische Anisotropie waren deutlich zu erkennen. Das Vorzeichen der Doppelbrechung war linear positiv, radiär negativ (siehe Abb. 3-28, 3-29, 3-30, 3-31).

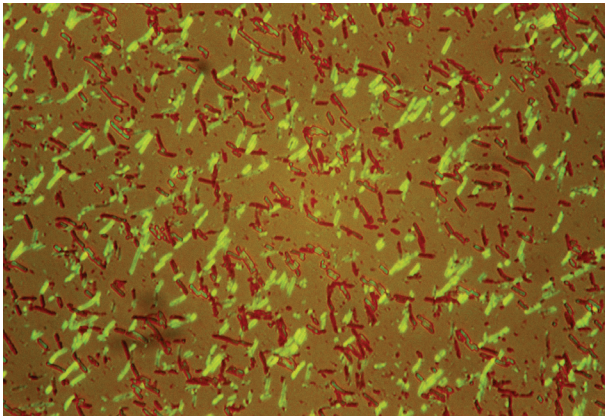


Abbildung 3-30: *B. cereus* PB-Sialinsäure  
spezifische Reaktion additive Kompensation  
x100

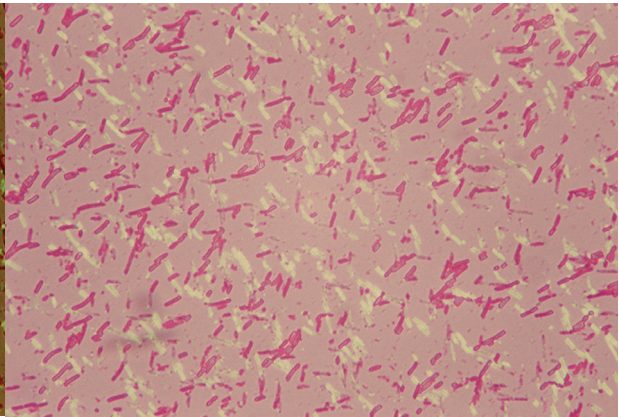


Abbildung 3-31: *B. cereus* PB-Sialinsäure  
spezifische Reaktion subtraktive Kompensation  
x100

### Saure/alkalische Hydrolyse und Sialinsäureextraktion:

Mit der sauren Hydrolyse kann wie auch mit der Sialinsäureextraktion Sialinsäure von der Zelloberfläche entfernt werden. Nach diesen Vorbehandlungen wurde bei *B. cereus* die Sialinsäure spezifische Reaktion angewandt. Lichtoptisch war hier eine Orthochromasie zu sehen. Polarisationsoptisch konnte keine Doppelbrechung festgestellt werden. Mit der alkalischen Hydrolyse werden nicht nur Sialinsäuren, sondern Kohlenhydrate verschiedener Arten abgebaut. Nach Anwendung der ABT-Reaktion zur Darstellung von Zuckermolekülen mit vicinalen OH-Gruppen, konnte weder eine Metachromasie (man sah eine Orthochromasie) noch eine Anisotropie (keine Doppelbrechung) registriert werden. Nach Anwenden der KOH- bzw. PB-KOH-ABT-Reaktion waren die Metachromasie und Anisotropie ebenfalls verschwunden.

### 3.2.2 *Listeria monocytogenes* und *Listeria ivanovii*

#### ABT- (ABD-), KOH-ABT- und PB-KOH-ABT-Reaktion:

Die ABT-Reaktion zur Darstellung vicinaler OH-Gruppen in Zuckermolekülen auf der Zelloberfläche von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* erbracht ein positives Reaktionsergebnis.

## Ergebnisse

Lichtoptisch zeigte sich eine kräftige Metachromasie und polarisationsoptisch eine Anisotropie. Bei beiden Bakterien war das Vorzeichen der Doppelbrechung linear positiv, radiär negativ mit einer tiefgrünen Polarisationsfarbe. Nach Anwendung der KOH-ABT-Reaktion verhielten sich die beiden Bakterien unterschiedlich. Die lichtoptische Metachromasie war bei beiden sichtbar. Auch die Anisotropie konnte bei beiden Bakterien festgestellt werden, das Vorzeichen der Doppelbrechung mit der subparallel  $\lambda$ -Platte unterschied sich jedoch. *L. monocytogenes* zeigte weiterhin ein linear positives, radiär negatives Vorzeichen, während *L. ivanovii* eine linear negatives, radiär positives Vorzeichen der Doppelbrechung hatte. Die Anwendung der PB-KOH-ABT-Reaktion zur alleinigen Darstellung der O-acylierten Zuckerketten erbrachte bei den beiden *Listerien spp.* dasselbe Ergebnis. *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* zeigen hier lichtmikroskopisch eine Metachromasie und im linear polarisierten Licht eine Anisotropie mit einer grünen Polarisationsfarbe (siehe Abb. 3-32, 3-33). Das Vorzeichen war linear negativ, radiär positiv.

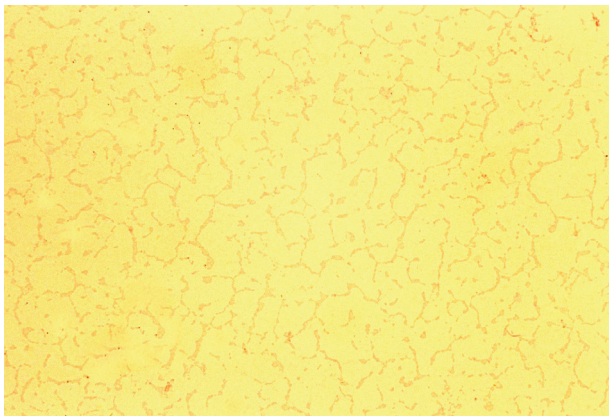


Abbildung 3-32: *L. monocytogenes* PB-KOH-ABT-Reaktion lichtoptisch x100

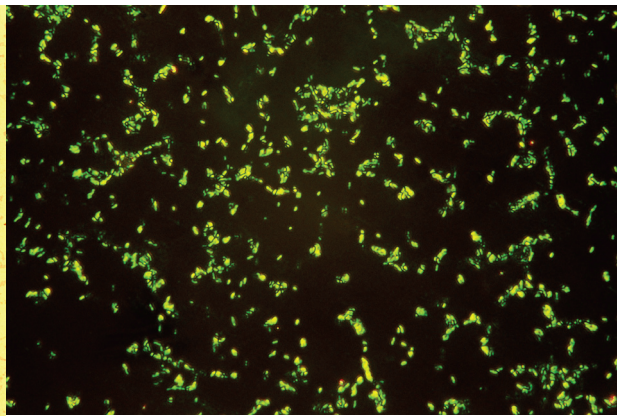
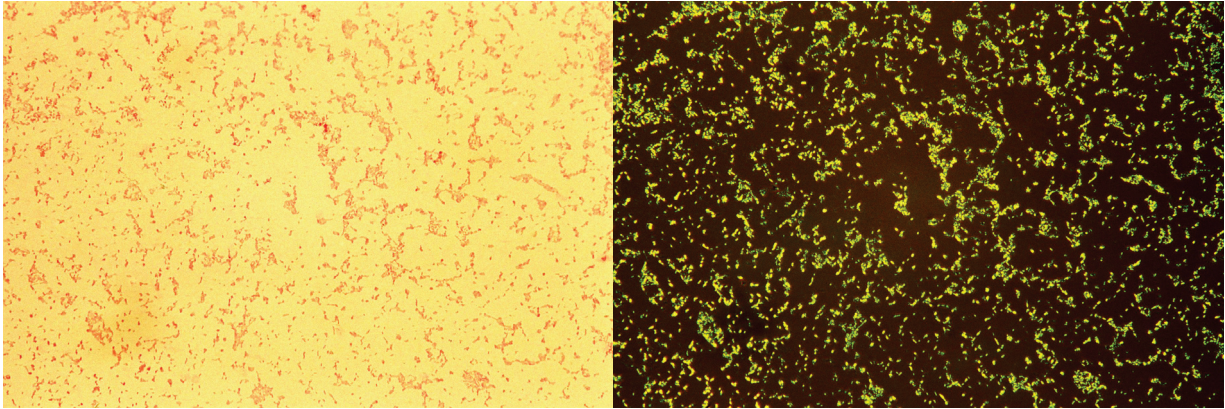


Abbildung 3-33: *L. monocytogenes* PB-KOH-ABT-Reaktion polarisationsoptisch x100

### **Sialinsäure, KOH-Sialinsäure und PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion:**

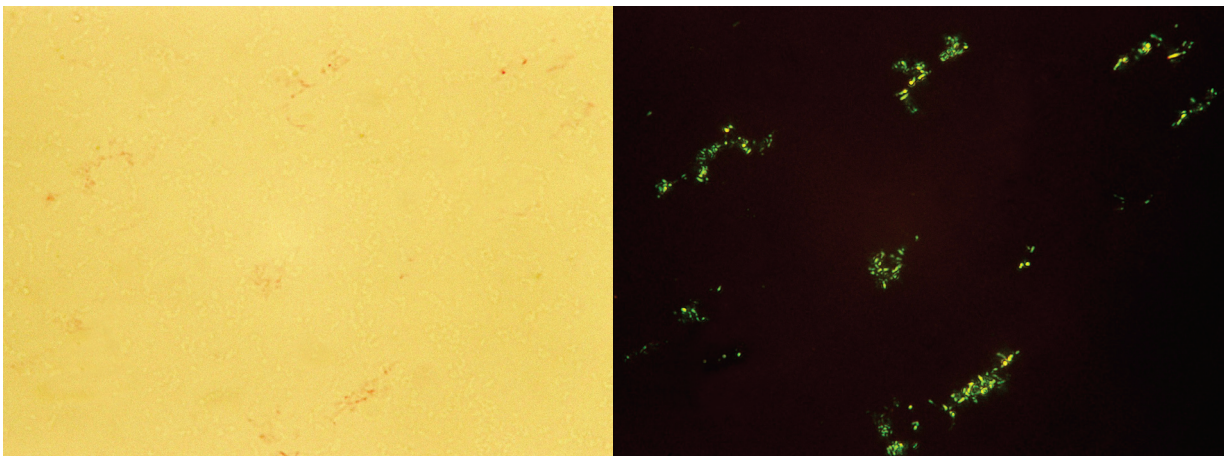
Die Darstellung der Sialinsäure auf der Zelloberfläche der *Listerien spp.* erfolgte mit der Sialinsäure spezifischen Reaktion. Neben der lichtoptischen Metachromasie war polarisationsoptisch eine sehr kräftige grüne Polarisationsfarbe zu sehen (siehe Abb. 3-34, 3-35). Das Vorzeichen dieser Doppelbrechung war bei beiden Arten linear positiv, radiär negativ.

## Ergebnisse



*Abbildung 3-34: L. monocytogenes Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x40*      *Abbildung 3-35: L. monocytogenes Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x40*

Das Ergebnis blieb auch nach der Vorbehandlung der Präparate mit alkoholischer KOH-Lösung linear positiv, radiär negativ. Schaltet man der KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion aber noch eine Blockierungsreaktion mit Periodsäure und  $\text{NaBH}_4$  vorweg, ändert sich das Vorzeichen der Doppelbrechung in ein linear negatives, radiär positives Vorzeichen. Die O-acylierte Sialinsäure ist also senkrecht zu der N-acetylierte Neuraminsäure (Sialinsäure) orientiert (siehe Abb. 3-36, 3-37).



*Abbildung 3-36: L. monocytogenes PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x100*

*Abbildung 3-37: L. monocytogenes PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x100*

### Saure/alkalische Hydrolyse und Sialinsäureextraktion:

Zur Entfernung der Sialinsäure stehen zwei chemische Verfahren zur Verfügung. Zum einen die

## Ergebnisse

saure Hydrolyse mit Salzsäure und zum anderen die Sialinsäureextraktion mittels Schwefelsäure. Beide Reaktionen wurden bei *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* angewandt und der Erfolg der Entfernung, bzw. die Spezifität der Sialinsäure spezifischen Reaktion anschließend mit der Sialinsäure spezifischen Reaktion überprüft. Bei beiden Bakterienarten ließ sich nach der Reaktion weder lichtoptisch noch polarisationsoptisch Sialinsäure nachweisen.

Die alkalische Hydrolyse entfernt Zuckermoleküle auf der Zellmembran. Mit der ABT-Reaktion ließ sich nach der alkalischen Hydrolyse bei *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* keine Doppelbrechung mehr nachweisen. Während bei *L. ivanovii* auch lichtmikroskopisch eine Orthochromasie zu sehen war, konnte man bei *L. monocytogenes* noch eine dezente Metachromasie erkennen.

### 3.2.3 *Helicobacter pylori*

Die Gram-negativen *H. pylori* lagen uns in einer kokkoiden Form und einer Stäbchenform vor. An beiden Formen konnte mit der Whartin-Starry Silberimpregnation eine positive Reaktion gesehen werden. Die Whartin-Starry-Versilberung lässt die *H. pylori* durch eine Silberanlagerung größer erscheinen. Auch mit dieser ursprünglich nicht für die Polarisationsmikroskopie adaptierten Reaktion konnte an *H. pylori* mit der Whartin-Starry Silberimpregnation sowohl bei den Stäbchen als auch bei den Kokken von *H. pylori* eine auffallende Anisotropie im polarisierten Licht registriert werden.

#### **ABT- (ABD-), KOH-ABT- und PB-KOH-ABT-Reaktion:**

*H. pylori* wurde sowohl aus einer kulturellen Züchtung als auch als Paraffinpräparat aus kolonisierter Magenschleimhaut untersucht. Die ABT-Reaktion erbrachte bei beiden Präparaten an *H. pylori* hinsichtlich der Metachromasie und der Doppelbrechung keinen Unterschied. Beide zeigten eine Doppelbrechung mit einem linear negativen radiär positiven Vorzeichen. Ebenso verhielt es sich auch nach der KOH-ABT-Reaktion und der PB-KOH-ABT-Reaktion. Lichtoptisch sah man bei den Präparaten eine Metachromasie der Zellmembran. Polarisationsoptisch zeigte sich eine Anisotropie, deren Doppelbrechung ein linear negatives, radiär positives Vorzeichen hatte. (siehe Abb. 3-38, 3-39)

## Ergebnisse

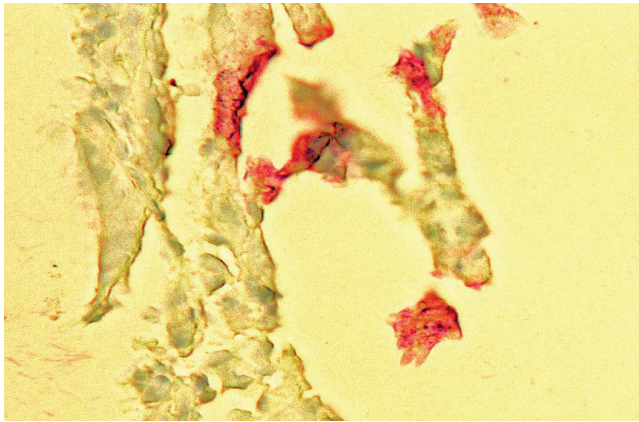


Abbildung 3-38: *H. pylori* Paraffin-Präparat PB-KOH-ABT-Reaktion lichtoptisch x40

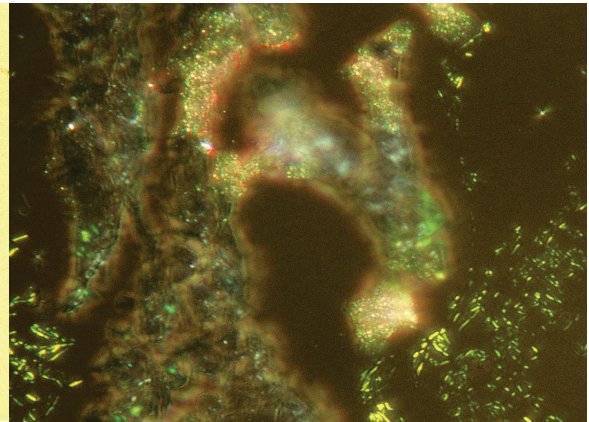


Abbildung 3-39: *H. pylori* Paraffinpräparat PB-KOH-ABT-Reaktion polarisationsoptisch x40

### Sialinsäure, KOH-Sialinsäure und PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion:

Nach der Anwendung der Sialinsäure spezifischen topo-optischen Reaktion an Ausstrichpräparaten und Paraffinpräparaten von *H. pylori* konnte lichtoptisch eine Metachromasie der Zellwand gesehen werden. Im linear polarisierten Licht zeigte sich eine kräftige Anisotropie mit einem linear negativen, radiär positiven Vorzeichen der Doppelbrechung. Zum Nachweis 9O-acylierter Sialinsäure wurden die KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion und die PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion angewendet.

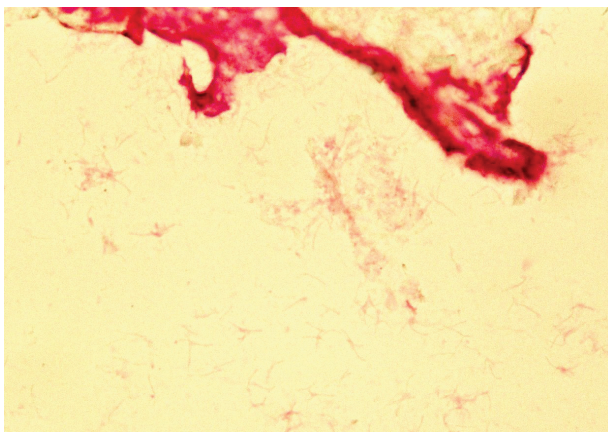


Abbildung 3-40: *H. pylori* Paraffinpräparat PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x40

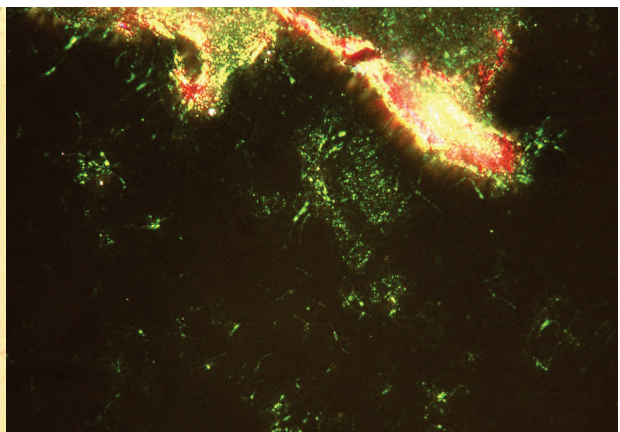


Abbildung 3-41: *H. pylori* Paraffinpräparat PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x40

## Ergebnisse

Auch mit *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*, die aus derselben Familie wie *H. pylori* stammen, wurden ABT-Reaktion und Sialinsäure spezifische Reaktionen durchgeführt. Die Ergebnisse der *Campylobacter spp.* stimmten mit denen von *H. pylori* überein (siehe Abb 3-42, 3-43).

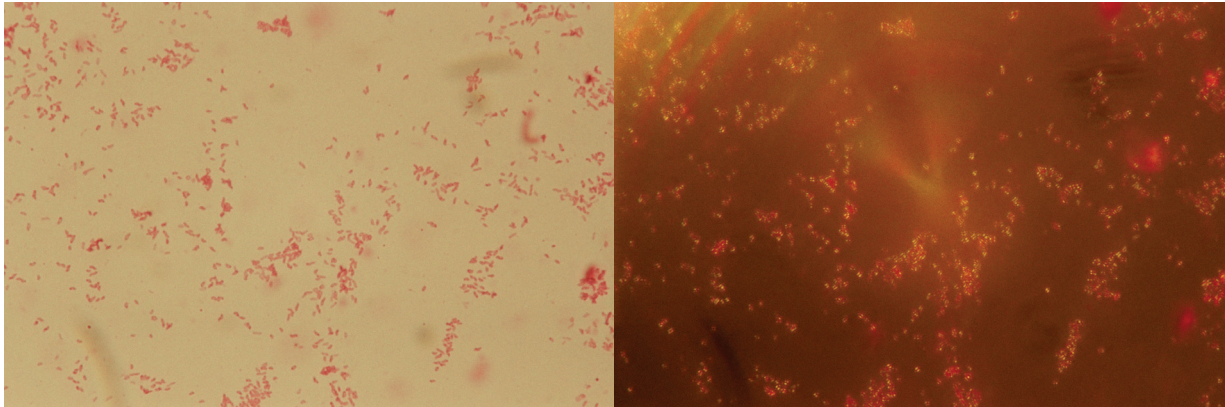


Abbildung 3-42: *C. jejuni* ABT-Reaktion  
lichtoptisch x40

Abbildung 3-43: *C. jejuni* ABT-Reaktion  
polarisationsoptisch x40

### 3.3 Phagozytose

#### 3.3.1 ABT-Reaktion, KOH-ABT-Reaktion, PB-KOH-ABT-Reaktion, Sialinsäure spezifische Reaktion, KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion

Die bekapselten *Klebsiellen* zeigten bei der ABT-Reaktion, der KOH-ABT-Reaktion, der PB-KOH-ABT-Reaktion, der Sialinsäure spezifischen Reaktion und der KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion eine lichtmikroskopische Metachromasie und eine polarisationsoptische Doppelbrechung. Die Zelloberfläche zeigte bei allen Reaktionen ein linear negatives, radiär positives Vorzeichen. Die unbekapselten *Klebsiellen* zeigten ebenfalls bei allen zuvor genannten Reaktionen einen anisotropen Effekt. Dieser stellte sich allerdings weniger intensiv als bei den bekapselten *Klebsiellen* dar. Vor allem aber war bei der ABT-Reaktion und der KOH-ABT-Reaktion das Vorzeichen der Doppelbrechung linear positiv und radiär negativ, während das Vorzeichen bei der PB-KOH-ABT-Reaktion und der KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion sich weiterhin linear negativ, radiär positiv darstellte. Auch bei der Sialinsäure spezifischen Reaktion

## Ergebnisse

blieb das Vorzeichen linear negativ, radiär positiv, allerdings unter einer deutlichen Intensivierung der Doppelbrechung. Ebenso verhält sich auch die aggressive *Klebsiella pneumoniae* des Typ NTUH-K2044. Auch sie zeigt lichtoptische eine Metachromasie und polarisationsoptisch eine Anisotropie mit einem linear negativen, radiär positiven Vorzeichen.

### Inkubationszeit 5 Minuten:

Der größte Teil der bekapselten Bakterien liegt außerhalb der Phagozyten. Nur ein geringer Teil hat sich an die Oberfläche der Phagozyten angelagert (siehe Abb. 3-44, 3-45). Das Färbeverhalten, die Anisotropie und das Vorzeichen sind identisch zu dem vor Beginn der Phagozytose. Die bekapselten Bakterien haben wie die *in vitro* Präparate ein linear negatives, radiär positives Vorzeichen. Die unbekapselten *Klebsiellen* stellen sich wie die bekapselten dar, mit dem Unterschied, dass sie in einer höheren Anzahl an die Oberfläche der Phagozyten angelagert sind. *Klebsiellen* des Typ NTUH-K2044 lagern sich nicht an die Phagozyten an.

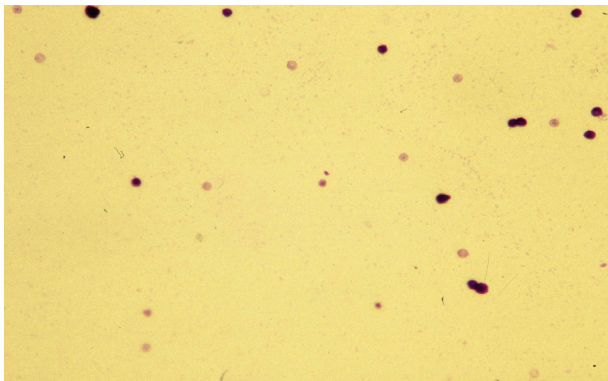


Abbildung 3-44: Phagozytose unbekapselte *Klebsiellen* nach 5-minütiger Inkubation KOH-ABT-Reaktion lichtoptisch x40

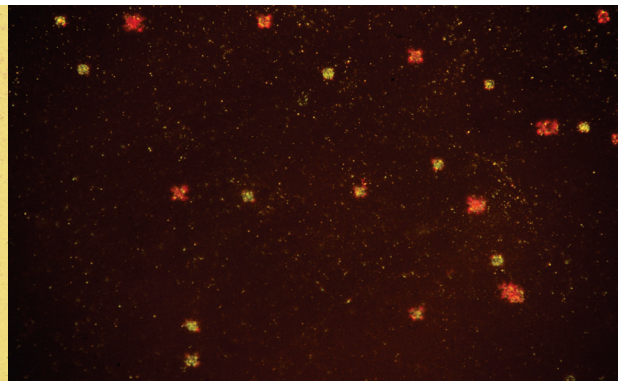


Abbildung 3-45: Phagozytose unbekapselte *Klebsiellen* nach 5-minütiger Inkubation KOH-ABT-Reaktion polarisationsoptisch x40

### Inkubationszeit 30 Minuten:

Nach 30 Minuten hat die durch die ABT-Reaktion und KOH-ABT-Reaktion induzierte Doppelbrechung bei den Phagozyten eine geringere Intensität als nach der ABT-Reaktion und KOH-ABT-Reaktion nach 5-minütiger Inkubationszeit. Alle anderen Reaktionen (PB-KOH-ABT-Reaktion, Sialinsäure spezifische Reaktion, KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion) zeigten im Vergleich mit den Ergebnisse der 5-minütigen Inkubationszeit bei den Phagozyten und einem Großteil der Bakterien keinen Unterschied. Es zeigt sich jedoch, dass die unbekapselten *Klebsiellen* zum Teil in den Phagozyten/Leukozyten erscheinen. Ein Teil der unbekapselten, in

## Ergebnisse

der Peritonealflüssigkeit liegenden *Klebsiellen* hat das Vorzeichen der Doppelbrechung ins Gegenteil verkehrt. Auch die phagozytierte Bakterien besitzen dieses umgekehrte Vorzeichen.

### **Inkubationszeit 1 Stunde:**

Nach einer Stunde Inkubationszeit im Peritoneum der Mäuse zeigt sich jetzt auch bei den **bekapselten** *Klebsiellen* eine deutliche Abnahme der Intensität der Doppelbrechung mit linear negativem Vorzeichen. Die Bakterien sehen angeschwollen mit mosikartigen Doppelbrechungen aus und zeigen eine rasch beginnende Phagozytose an. Weiterhin sieht man schon phagozytierte *Klebsiellen*, die jegliche Doppelbrechung verloren haben (Isotropie/zum Teil auch mit umgekehrten Vorzeichen). Hierbei handelt es sich zu einem größeren Teil um unbekapselte als bekapselte *Klebsiellen*. In den Präparaten mit *Klebsiella* NTUH-K244 sieht man weiterhin keine Anlagerung an die Phagozyten.

### **Inkubationszeit 2 Stunden:**

Nach zwei Stunden erhöht sich die Anzahl der bereits phagozytierten *Klebsiellen*, wobei wieder der Anteil der unbekapselten *Klebsiellen* höher ist, als die Anzahl der bekapselten *Klebsiellen*. Die phagozytierten Bakterien haben ihre Doppelbrechung in der ABT-Reaktion vollständig verloren. Nach Anwenden der ABT-Reaktion und KOH-ABT-Reaktion konnte nach 2 Stunden ein Vorzeichenwechsel bei den phagozytierten *Klebsiellen* von linear positiv nach linear negativ gesehen werden.

### **Inkubationszeit 4 Stunden:**

Nach vier Stunden wurden weitestgehend alle Bakterien phagozytiert. An den phagozytierten *Klebsiellen* beherrschen jetzt die mosaikartige Doppelbrechung mit linear positivem Vorzeichen. Bei den restlichen *Klebsiellen* ist die Doppelbrechung vollständig ausgelöscht (abb. 3-46, 3-47). Die Phagozyten stellen sich mit einer intensiveren Doppelbrechung als nach 2 Stunden dar. Weiterhin ausgenommen von diesen Ergebnissen bleibt der Subtyp NUTH-K2044. Dieser lagert sich auch nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden nicht an die Zelloberfläche an.

## Ergebnisse

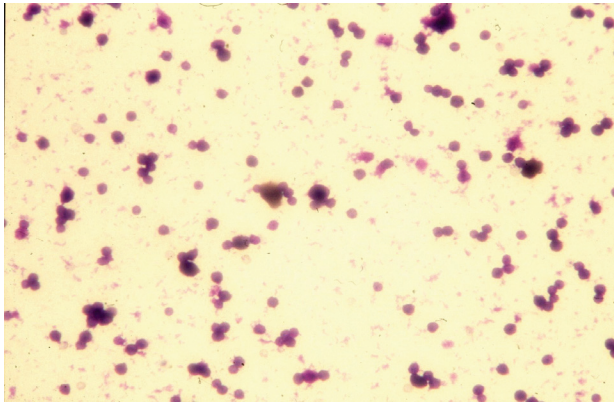


Abbildung 3-46: Phagozytose bekapselte Klebsiellen nach 4-stündiger Inkubation KOH-ABT-Reaktion lichtoptisch x40

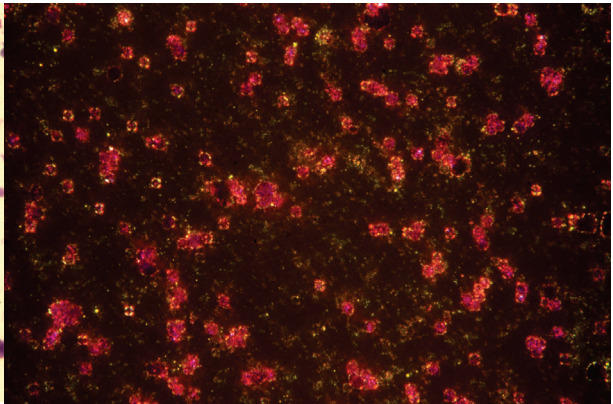


Abbildung 3-47: Phagozytose bekapselte Klebsiellen nach 4-stündiger Inkubation KOH-ABT-Reaktion polarisationsoptisch x40

### Inkubationszeit 12 Stunden:

Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden der *Klebsiellen* im Mäuseperitoneum ist polarisationsmikroskopisch keine Doppelbrechung und somit auch keine Anisotropie mehr sichtbar. Vom Typ UNTH-K2044 konnten nach einer so langen Inkubationszeit keine Präparate mehr gewonnen werden, da die Mäuse diese Zeit nicht überlebten.

Die Leukozyten stellten sich mit einer zarten Metachromasie und einer feinen zeitabhängigen Doppelbrechung nach der KOH-ABD-, PB-KOH-ABT- und PB-KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion dar. Die Anisotropie war lediglich auf die Zelloberfläche der Leukozyten begrenzt. Dieses Phänomen stellte sich erst nach einer Inkubationszeit von mindestens 2 Stunden dar, ist aber nach einer inkubationszeit von 4 Stunden wesentlich intensiver. Bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten oder 1 Stunde konnte die Doppelbrechung nach der PB-KOH-ABT- und PB-KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion nicht gesehen werden.

### 3.3.2 Charge Transfer Reaktion

Bei der Charge Transfer Reaktion gab es keine Unterschiede zwischen den einzelnen *Klebsiellen* spp. und deren Kapsel. In allen Präparaten stellte sich die Zellmembran der *Klebsiellen* wie auch der Phagozyten doppelbrechend mit einem linear positiven, radiär negativen Vorzeichen dar (Abb. 3-48, 3-49). Phagozytierte *Klebsiellen* zeigten wie oben schon beschrieben auch hier zu

## Ergebnisse

einem geringen Anteil keine Doppelbrechung. Die phagozytierten, doppelbrechenden *Klebsiellen* zeigte im Gegensatz zu den nicht phagozytierten einen Vorzeichenwechsel hin zu einen linear negativen, radiär positiven Vorzeichen (Gähns et al. 2007).

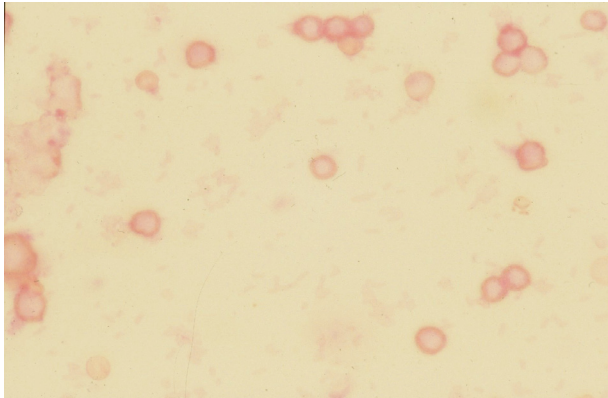


Abbildung 3-48: Phagozytose *Klebsiellen* nach 4-stündiger Inkubation Charge Transfer  
Reaktion mit Eosin lichtoptisch x100

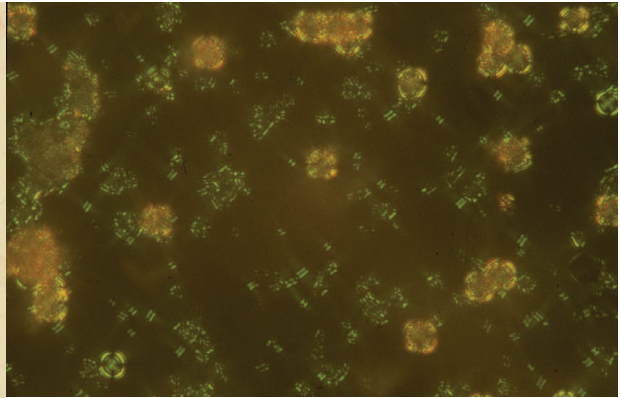


Abbildung 3-49: Phagozytose *Klebsiellen* nach 4-stündiger Inkubation Charge Transfer  
Reaktion mit Eosin polarisationsoptisch x100

### 3.3.3 Alkalische Hydrolyse

Die alkalische Hydrolyse ist mit Bariumhydroxid durchgeführt worden um Zuckermoleküle auf der Zelloberfläche zu entfernen. Als Kontrolluntersuchung wurde im Anschluss die ABT-Reaktion durchgeführt, die entsprechend zum Nachweis von Zuckerketten dient. Nach Abschluss der alkalischen Hydrolyse und ABT-Reaktion konnte auf der Zelloberfläche der *Klebsiellen* keine Doppelbrechung gesehen werden. Die Membran der Phagozyten/neutrophilen Granulozyten stellte sich diskontinuierlich mit einem linear negativen, radiär positiven Vorzeichen dar.

### 3.3.4 CIBR und CEC

Mit der CIBR konnten auf der Zelloberfläche der Phagozyten und *Klebsiellen* uronsäurehaltige Glykosaminoglykane nachgewiesen werden. Dies war an einer grünen Polarisationsfarbe nach der CIBR im polarisierten Licht erkennbar (siehe Abb 3-50, 3-51). Auch lichtoptisch konnte eine Metachromasie gesehen werden. Die Orientierungsanalyse mit der subparallel  $\lambda$ -Platte zeigte, dass die Glykosaminoglykane linear negativ, radiär positiv auf der Zelloberfläche orientiert gebunden sind. Mit der CEC zeigte sich eine lichtoptische Metachromasie und

## Ergebnisse

polarisationsoptische Anisotropie bei  $\text{MgCl}_2$ -Konzentrationen von 0,5 mol/l und 0,1 mol/l. Auf der Zelloberfläche der *Klebsiellen* und Phagozyten sind dementsprechend Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat in einem orientierten Zustand gebunden.

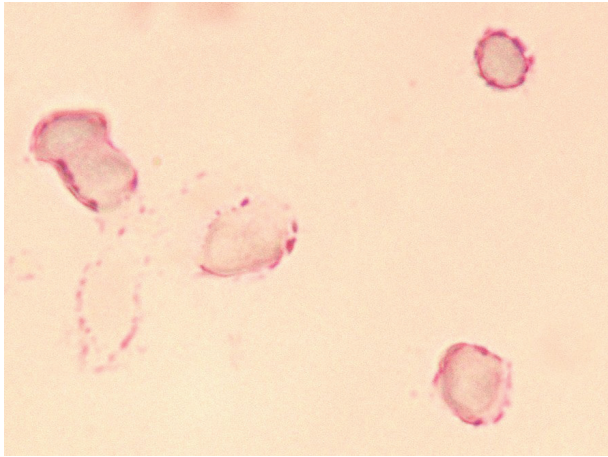


Abbildung 3-50: Phagozytose CIBR lichtoptisch  
x100

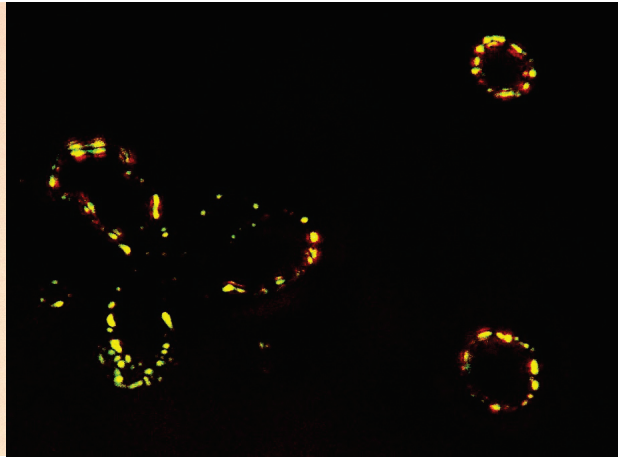


Abbildung 3-51: Phagozytose CIBR  
polarisationsoptisch x100

### 3.4 Charge Transfer Reaktion

Die Charge Transfer Reaktion wurde mit bis zu elf Elektronendonatoren (Chlorpromazin, Imipramin, Pipolphen, Teperin, Flupentixol, Fluphenazin, Thioridazin, Perphenazin, Protipendyl, Levomepromazin, Zuclopenthixol), die aus der Gruppe der Phenothiazine, bzw. einer strukturverwandten Gruppe stammen, durchgeführt. Die anschließende Färbung erfolgte mit einem Xanthenfarbstoff. Hier wurden von uns drei verschiedene Xanthenfarbstoffe anhand der von ihnen produzierten Anisotropie hinsichtlich der Polarisationsfarbe und Orientierung miteinander verglichen: Eosin, Bengalrosa B und Erythrosin. Nach Anwendung von Chlorpromazin oder einem der Phenothiazine zeigten die Präparate der Pilze und Bakterien ungefärbt polarisationsoptisch eine schwache Doppelbrechung, die sich durch spülen mit Aqua dest wieder aufheben ließ. Nach dem Auswaschen zeigten die Pilze und Bakterien wieder die Isotropie, die sie vor Durchführung des ersten Schrittes der Charge Transfer Reaktion hatten. Führt man die Spülung sehr vorsichtig durch bleibt noch eine schwache Restdoppelbrechung mit linear positiven Vorzeichen übrig. Eine anschließende Färbung entsprechend dem zweiten

## Ergebnisse

Schrittes der Charge Transfer Reaktion z.B. mit Eosin führt wieder zu einer kräftigen Anisotropie. Bei der Charge Transfer Reaktion handelt es sich also um eine additive topo-optische Reaktion, die nach Molnár und Fischer (1992) zu einer 20fachen Verstärkung des anisotropen Effekts führt. Diese Tatsache konnten auch wir mit unseren Ergebnissen bestätigen.

Die *Candida spp.* und *C. neoformans* zeigten im Wasser, im Gummi arabicum und nach einer 3-minütigen Behandlung mit Chlorpromazin eine schwache Doppelbrechung mit einem linear positiven Vorzeichen. Die Chlorpromazin Moleküle sind an der Oberfläche parallel ausgerichtet. Nach der Färbung mit einem der Xanthene blieb das Vorzeichen weiterhin linear positiv, die Intensität der Anisotropie war jedoch um ein Vielfaches verstärkt.

Zur Identifizierung der teilnehmenden Struktur an der Charge Transfer Reaktion führten wir an den untersuchten Präparaten eine Lipidextraktion (Chloroform:Methanol 3:1 für 24 h, bei 60°C) und Methylierung durch.

### 3.4.1 Pilze

#### **Saccharomyces cerevisiae:**

Die Charge Transfer Reaktion mit der angeschlossenen Färbung mit Xanthenfarbstoffen dient dem selektiven Nachweis gerichteter negativer Ladungsträger auf der Zelloberfläche. Bei *S. cerevisiae* war es möglich mit Chlorpromazin als Elektronendonator und verschiedenen anionischen Xanthenfarbstoffen (Eosin, Erythrosin und Bengalrosa B) eine orientierte Farbstoffbindung und dadurch eine Anisotropie darzustellen. Lichtmikroskopisch ließ sich eine Metachromasie und polarisationsoptisch eine rosa-rote Polarisationsfarbe registrieren. Unter Verwendung der subparallel  $\lambda$ -Platte in Additionsstellung zeigten sich die rechten, unteren Sektoren der Zelloberfläche in einer gelben Farbe. Beim Wechsel in die Subtraktionsstellung änderte sich die Farbe des betreffenden Sektors nach blau. Die negativen Ladungsträger der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* haben also ein linear positives Vorzeichen (radiär negativer Sphaerit). Somit sind die Farbstoffkomplexe parallel zur Zelloberfläche orientiert. Die Anisotropie und Metachromasie ist auch nach einer 72-stündigen Lipidextraktion bei 60° C mit einem Gemisch aus Chloroform:Methanol 3:1 unbeeinflusst geblieben. Erst eine Methylierung über 12-18 Stunden führte zu einer Auslöschung der Metachromasie und Anisotropie.

## Ergebnisse

### **Candida albicans:**

*C. albicans* ist mit allen elf oben genannten Molekülen/Elektronendonatoren untersucht worden. Anschließend sind die Färbungen mit Eosin, Erythrosin und Bengalrosa B durchgeführt worden. Nach der Färbung mit Eosin zeigte sich im polarisierten Licht eine grüne Polarisationsfarbe (siehe Abb 3-52, 3-53). Die Färbungen mit Erythrosin und Bengalrosa B führten zu einer rot-orangen Polarisationsfarbe. Die Charge Transfer Reaktion mit den untersuchten Elektronendonatoren erbrachte mit den drei Farbstoffen ein linear positives Vorzeichen. Die Farbstoffmoleküle sind dementsprechend parallel zur Zelloberfläche angeordnet.

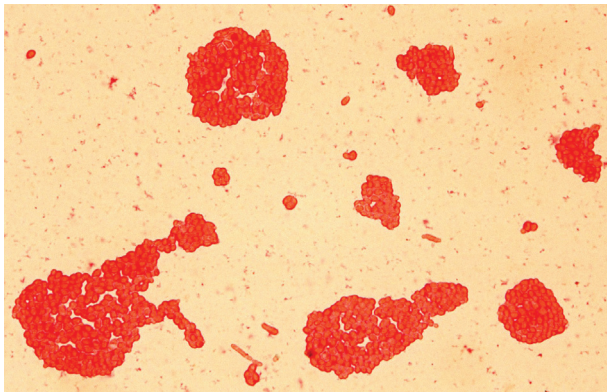


Abbildung 3-52: *C. albicans* CT-R (Pipolphen, Eosin) lichtoptisch x40

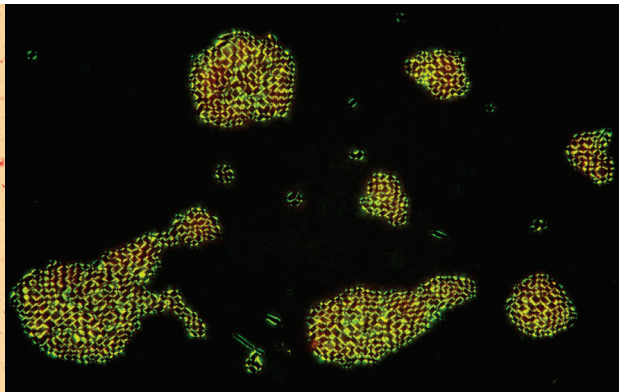


Abbildung 3-53: *C. albicans* CT-R (Pipolphen, Eosin) polarisationsoptisch x40

Nach einer Methylierungszeit von 6h war die Doppelbrechung nach der Charge Transfer Reaktion schon deutlich herabgesetzt. Nach 12h und 18h reduzierte sich die Doppelbrechung weiter. Nach 24h Methylierung war es nicht mehr möglich im polarisierten Licht einen anisotropen Effekt zu sehen. Weiterhin führten wir nach der Methylierung eine ABT-Reaktion durch. Im Unterschied zur originären ABT-Reaktion führten wir die Färbung nicht mit Toluidinblau durch, sondern schlossen an dieser Stelle eine Charge Transfer Reaktion an. Das Ergebnis zeigte eine lichtoptische Metachromasie und eine polarisationsoptische Anisotropie mit grüner Polarisationsfarbe, die für eine optimale orientierte Farbstoffbindung und für die räumliche Orientierung der Zuckerketten bzw. deren OH-Gruppen spricht.

### **Candida glabrata, Candida kruzei und Candida tropicalis:**

Bei der Anwendung der Charge Transfer Reaktion verhielten sich die *Candida* spp. einheitlich. Sie alle zeigten mit einem der Elektronendonatoren und den anionischen Farbstoffen Eosin,

## Ergebnisse

Erythrosin und Bengalrosa B einen anisotropen Effekt im polarisierten Licht. Die Polarisationsfarbe variierte dabei zwischen den einzelnen Farbstoffen. Charge Transfer Reaktionen, die mit Eosin durchgeführt wurden, zeigten polarisationsoptisch eine grüne Polarisationsfarbe (siehe Abb. 3-54, 3-55). Erythrosin und Bengalrosa B stellen sich im polarisierten Licht rot-orange dar (siehe Abb. 3-56, 3-57). Das Vorzeichen aber war bei allen *Candida ssp.* linear positiv, radiär negativ. In der Additionslage haben wir eine Aufhellung (gelb) und in der Subtraktionslage eine Verdunklung (blau) gesehen.

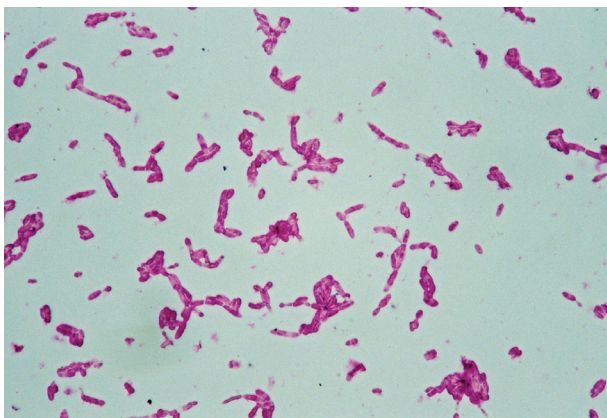


Abbildung 3-54: *C. kruzei* CT-R  
(Chlorpromazin, Eosin) lichtoptisch x100

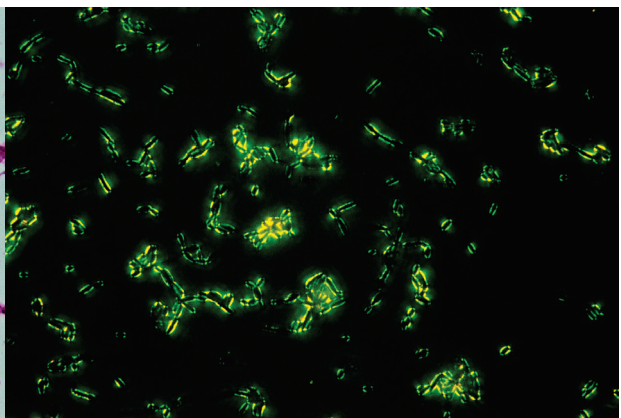


Abbildung 3-55: *C. kruzei* CT-R  
(Chlorpromazin, Eosin) polarisationsoptisch x100

In weiteren Versuchen wurde der Charge Transfer Reaktion eine Methylierung vorangestellt. Bereits nach 6h waren bei *C. kruzei* und *C. tropicalis* mit keinem der drei Xanthenfarbstoffe ein anisotroper Effekt mehr darstellbar. *C. glabrata* zeigte nach 6h mit den Farbstoffen Erythrosin und Bengalrosa B ebenfalls keine Doppelbrechung. Mit Eosin war noch eine herabgesetzte Doppelbrechung zu sehen. Die Doppelbrechung von *C. glabrata* ließ sich nach längerer Methylierungszeit (>24h) auch für den Farbstoff Eosin auslöschen.

## Ergebnisse

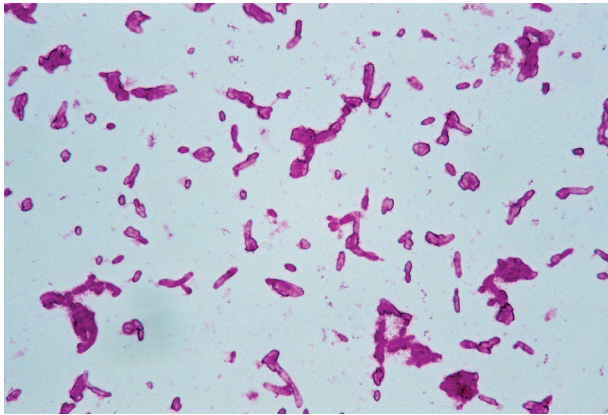


Abbildung 3-56: *C. kruzei* CT-R  
(Chlorpromazin, Bengalrosa B) lichtoptisch  
x100

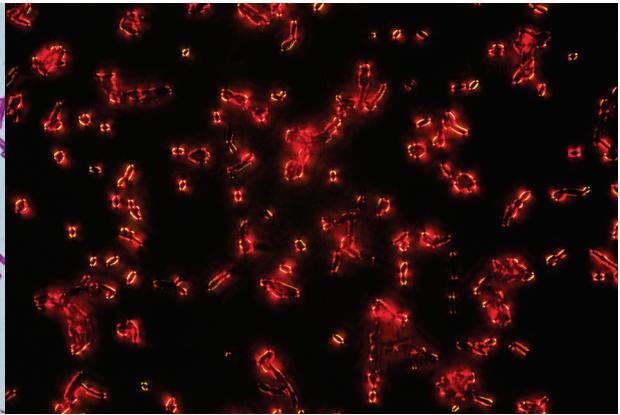


Abbildung 3-57: *C. kruzei* CT-R  
(Chlorpromazin, Bengalrosa B)  
polarisationsoptisch x100

### **Cryptococcus neoformans:**

An *C. neoformans* wurde die Charge Transfer Reaktion mit Chlorpromazin als Elektronendonator durchgeführt. Als Farbstoff wurde Eosin in 1%iger und 0,1%iger Konzentration verwendet. Lichtoptisch sah man nach diesen Reaktionen eine kräftige Metachromasie. Polarisationsoptisch zeigt sich eine gelb-grüne Farbe. Die Abgrenzung der Zelloberfläche gegen die Kapsel ist nur schwer zuerkennen. Bei additiver Kompensation erkennt man die Unterschiede in der Orientierung der negativen Ladungsträger auf der Zelloberfläche und Kapsel. Während sich auf der Zelloberfläche die entsprechenden Sektoren verdunkeln, hellen sich dieselben Sektoren auf der Kapsel auf. Das Vorzeichen der negativen Ladungsträger auf der Zelloberfläche ist dementsprechend linear positiv, radiär negativ und auf der Kapsel linear negativ, radiär positiv. Der Vergleich des 0,1%igen mit dem 1%igen Eosin zeigte, dass die Farbtintensität mit der niedrigeren Konzentration zwar geringer ist, dafür aber die Abgrenzung der einzelnen Strukturen leichter erfolgen kann.

### **3.4.2 Bakterien**

#### **B. cereus:**

Die Charge Transfer Reaktion wurde genutzt um negativer Ladungsträger auf der Zelloberfläche von *B. cereus* nachzuweisen. Als Elektronendonator wurden Chlorpromazin, Imipramin,

## Ergebnisse

Pipolphen, Teperin, Levomepromazin und Zuclopenthixol eingesetzt. Anschließend wurden jeweils die drei anionischen Xanthenfarbstoffe Eosin, Erythrosin und Bengalrosa B zur Darstellung genutzt. Nach den Färbungen sah man lichtoptisch eine violettfarbene Metachromasie. Polarisationsoptisch zeigte sich eine Doppelbrechung mit grüner Polarisationsfarbe nach der Färbung mit Eosin und eine rot-orange Polarisationsfarbe nach der Färbung mit Erythrosin oder Bengalrosa B und einem linear positiven, radiär negativen Vorzeichen. Zur Blockierung der negativen Ladungsträger reichte für *B. cereus* eine 6-stündige Methylierung aus, um für alle Xanthenfarbstoffe mit einem der Elektronendonatoren die Charge Transfer Reaktion vollständig in Form einer lichtoptischen Orthochromasie und polarisationsoptischen Isotropie auszulöschen.

### **Helicobacter pylori:**

Auch bei *H. pylori* ist versucht worden mit der Charge Transfer Reaktion die negativen Ladungsträger darzustellen. Hierbei ist zwischen *H. pylori* aus einer kulturellen Züchtung und *H. pylori* aus einem Paraffinpräparat des Magen verglichen worden. Zusätzlich wurden bei den kulturell gezüchteten *H. pylori* zwei Kulturmedien (Agarplatten und Flüssigmedium) verglichen. Am besten auszuwerten waren die Präparate aus dem Flüssigmedium (siehe Abb. 3-58, 3-59). Hier sah man eine kräftige Metachromasie und mit Bengalrosa B, Eosin und Erythrosin eine deutliche Doppelbrechung mit einem linear positiven, radiär negativen Vorzeichen. Ebenso verhielten sich auch die Ausstrichpräparate der auf den Agarplatten gezüchteten *H. pylori*. Allerdings waren die Färbungen und auch die Doppelbrechung in ihrer Intensität hier wesentlich schwächer. Das Vorzeichen zeigt sich hier ebenfalls linear positiv, radiär negativ. An den Paraffinpräparaten zeigten sich mit Bengalrosa B, Eosin und Erythrosin eine schwach positiven Reaktion in Form einer lichtoptischen Metachromasie und einer polarisationsoptischen Anisotropie. Das Vorzeichen der Doppelbrechung war ebenfalls linear positiv, radiär negativ.

## Ergebnisse

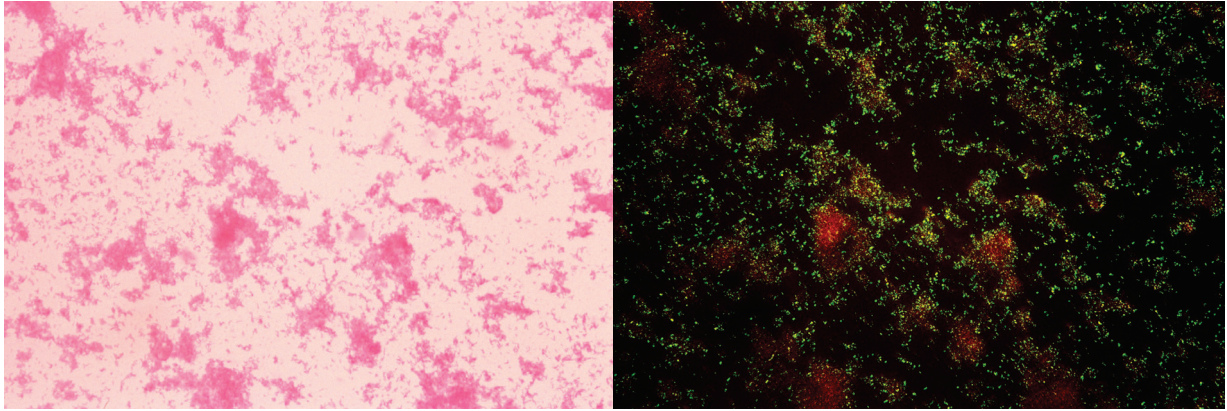


Abbildung 3-58: *H. pylori* (Flüssigmedium) CT-R (Chlorpromazin, Eosin) lichtoptisch x40      Abbildung 3-59: *H. pylori* (Flüssigmedium) CT-R (Chlorpromazin, Eosin) polarisationsoptisch x40

### **Campylobacter jejuni und Campylobacter coli:**

Auf Agarplatten gezüchtete *C. coli* und *C. jejuni* wurden mit Hilfe der Charge Transfer Reaktion auf das Vorhandensein von negativen Ladungsträgern untersucht. Wie bei den anderen Bakterien wurde auch hier ein Phenothiazin und ein Xanthenfarbstoff verwendet. Die Analyse nach der Reaktion zeigte lichtoptisch sowohl bei *C. coli* als auch bei *C. jejuni* eine Metachromasie und polarisationsoptisch bei beiden *Campylobacter* spp. eine Doppelbrechung mit grüner Polarisationsfarbe und linear positivem, radiär negativem Vorzeichen (siehe Abb. 3-60, 3-61).

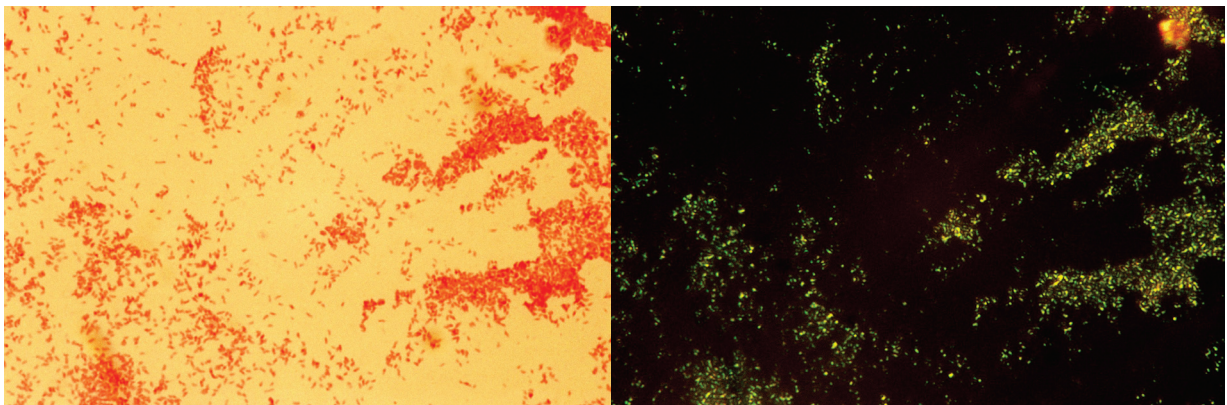


Abbildung 3-60: *C. jejuni* CT-R (Chlorpromazin, Erythrosin) lichtoptisch x40

Abbildung 3-61: *C. jejuni* CT-R (Chlorpromazin, Erythrosin) polarisationsoptisch x40

### **Klebsiella pneumoniae:**

Nach der Charge Transfer Reaktion konnte bei *K. pneumoniae* eine lichtoptische Metachromasie und eine polarisationsoptische Anisotropie gesehen werden (siehe Abb. 3-62, 3-63). Das

## Ergebnisse

Vorzeichen der Doppelbrechung war linear positiv, radiär negativ. Der Vergleich der beiden Stämme 486 und 492 zeigte keinen Unterschied in der Intensität der Doppelbrechung und der Orientierung der negativen Ladungsträger. Auch die Analyse der *K. pneumoniae* mit verschiedenen Kapselkomponenten (hier als 486 K2 und 492 K1 dargestellt) erbrachte weder im Hinblick auf das generelle Reaktionsergebnis noch im Hinblick auf die Orientierung einen Unterschied. Das Vorzeichen stellte sich bei allen Bakterien in Bezug auf die Länge linear positiv, radiär negativ dar.

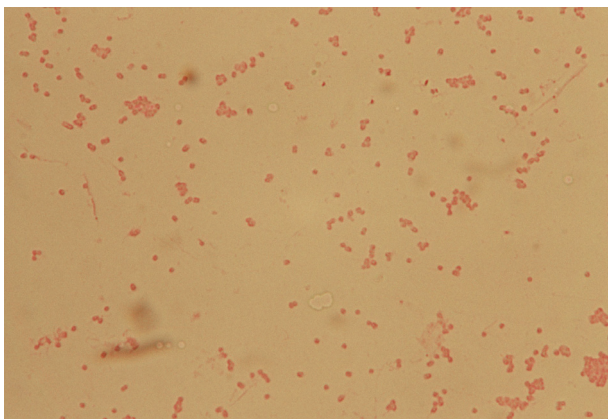


Abbildung 3-62: *K. pneumoniae* 486 CT-R  
(Chlorpromazin, Erythrosin) lichtoptisch x100

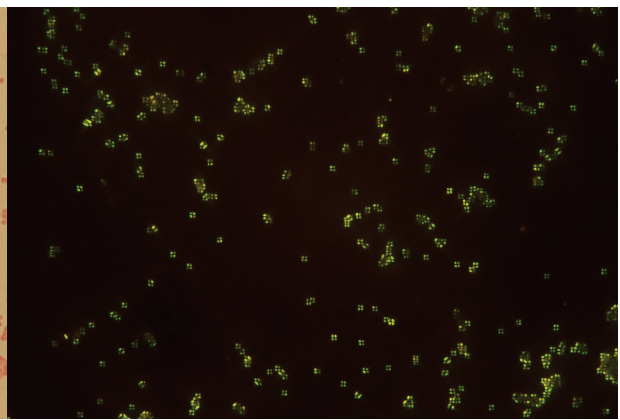


Abbildung 3-63: *K. pneumoniae* 486 CT-R  
(Chlorpromazin, Erythrosin)  
polarisationsoptisch x100

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Allgemeine Vorbemerkungen

#### 4.1.1 Pilze

##### Wandaufbau:

Im Zentrum der Zelle liegt der Zellkern der Pilze, der von einer Membran umgeben ist. Der im Zellkern liegende Chromosomensatz kann diploid (z.B. *C. albicans*) oder haploid (z.B. *C. tropicalis*) sein. Humanpathogene Pilze sind Deuteromyceten (Fungi imperfecti), da ihre Fortpflanzung nicht der sexuellen oder asexuellen Vermehrung zugeordnet werden kann. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört zu den perfekten Pilzen. Sein Chromosomensatz ist abhängig von der Phase des Vermehrungszyklus haploid oder diploid. Das Zytoplasma der Pilze ist von einer Zellmembran umgeben, die von einer Doppellipidschicht gebildet wird. Im Gegensatz zur tierischen und menschlichen Zelle wird das Steroid Cholesterin, welches ein Teil des Grundgerüsts der Zellmembran ist, gegen das Steroid Ergosterin ausgetauscht. Des weiteren besteht die Doppellipidschicht aus Phosphoglycerolipiden, die aus zwei Fettsäuren gebildet werden, die mit Cholin, Ethanolamin, Serin oder Inositol verestert sind. Um die Plasmamembran besitzen die Pilze eine starre Zellwand, die aus Polysacchariden, Mannoproteinen und Chitinpolymeren besteht. Chitin ist ein Polymer aus N-Acetylglukosamin, dass in mikrofibrillären Bündeln angeordnet ist. Es ist  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpft. N-Acetylglukosamin unterscheidet sich von Glukose dadurch, dass an Position C<sub>2</sub> die OH-Gruppe durch eine Acetamingruppe ersetzt wurde. Chitin ist jedoch nicht in den Zellwänden aller Pilze zu finden. *S. cerevisiae* beispielsweise besitzt dieses nur in den Knospen, die sich zur Vermehrung ausbilden. Neben Chitin enthält die Zellwand noch die Hemizellulosen Glukan und Mannan. Diese sind in Spezies spezifischen Verhältnissen so angeordnet, dass sich außen eine Schicht unterschiedlich phosphorylierten Mannans befindet. Die Zusammensetzung der äußeren Schicht ist artenspezifisch und wird zur Systematik verwendet. Unter der Schicht aus Mannan und Glukan folgt eine Schicht aus alkalilöslichem  $\beta$ -Glukan. Die innerste Schicht besteht aus alkaliunlöslichem  $\beta$ -Glukan und gibt der Zelle ihre Form und Festigkeit. Zusätzlich enthält die

## Diskussion

Zellwand Glykoproteine und Glykolipide, die vorrangig mit Oligosacchariden verbunden sind (Spencer et Spencer 1997).

Der Zellwandaufbau von *S. cerevisiae* und *C. albicans*, mit welchen es diese Dissertation unter anderem beschäftigt, unterscheidet sich kaum in den Bestandteilen der Membran, sondern vorrangig in der Zusammensetzung dieser (siehe Tab). Grundbestandteil ist ein  $\beta$ -1,3 glykosidisch verknüpftes Netz aus  $\beta$ -Glukan. Bei *C. neoformans* weicht die Zusammensetzung der Membran stark ab. Hauptbestandteil (35%) ist  $\alpha$ -1,3 Glukan. Nur ein geringer Anteil (15%) ist  $\beta$ -Glukan, wobei hiervon vor allem das  $\beta$ -1,6 verknüpfte dominiert.

	$\beta$ -Glukan		$\alpha$ -Glukan	Mannoproteine	Chitin
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50% $\beta$ -1,3	10% $\beta$ -1,6	Nicht vorhanden	40%	1-3%
<i>Candida albicans</i>	40% $\beta$ -1,3	20% $\beta$ -1,6	Nicht vorhanden	35-40%	1-2%

Tabelle 1: Zusammensetzung der Zellmembran von *S. cerevisiae* und *C. albicans* im Vergleich

### Untersuchte Pilze:

*Saccharomyces cerevisiae* ist als einzelne Zelle betrachtet einer der größten Pilze die es gibt. Aus diesem Grunde soll diese sogenannte „Bäckerhefe“ als einziger nicht humanpathogener Erreger hier Beachtung finden.

*Candida spp* sind die einzigen Pilze, die in der gastrointestinalen, vaginalen und oralen Flora physiologisch vorkommen können. Sie gehören zu den opportunistischen Krankheitserregern. Über die Mannoproteine auf der Zelloberfläche binden sie an die Epithelien. *C. albicans* und *C. tropicalis* bilden sog. Keimschläuche aus, um in die Wirtszellen einzuwachsen. Die häufigsten Infektionen werden mit *C. albicans* beobachtet. Der Pilz wächst besonders gut im dunklen, feuchten und warmen Milieu. Beispiele für eine Infektion sind beim Säugling die Windeldermatitis, sowie beim Erwachsenen der Soor des Mundes, Rachens oder des Ösophagus.

*Cryptokokkus neoformans* soll in dieser Arbeit aufgrund seiner Aggressivität, seiner

## Diskussion

humanpathologischen Relevanz und seiner auffälligen Kapsel untersucht werden. Der Nachweis von *C. neoformans* ist stets pathologisch. Allerdings führt nicht jede Infektion mit *C. neoformans* zu einer klinischen Symptomatik oder therapiepflichtigen Infektion. Klinisch relevant und in diesen Fällen häufig auch lebensbedrohend ist eine Cryptokokkusinfektion bei immunsupprimierten Menschen, wie z.B. HIV-Infizierte. Auch im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen wie malignen Lymphomen auf treten Cryptokokkusinfektion gehäuft auf (Tietz et al. 2005).

Für die Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen und dem menschlichen Immunsystem und für die Virulenz von *C. neoformans* ist die Polysaccharidkapsel, die den Pilz umgibt von entscheidender Bedeutung (Bose et al. 2003). Die Kapsel enthält vor allem zwei verschiedene Polysaccharide: 90% der Kapsel ist aus Glukuronoxylomannan (GXM) aufgebaut und weitere 7% bestehen aus Galaktoxylomannan (GalXM). Als dritten Bestandteil gibt es noch Mannoproteine, die für die zellvermittelte Immunität verantwortlich zu sein scheinen. Bekannt ist, dass GXM aus  $\alpha$ -1,3 glykosidisch verbundener Mannose, die Xylosyl- und Glukuronyl-Gruppen besitzt, aufgebaut ist. Etwa zwei Drittel der Mannose ist 6O-acetyliert. Die Struktur von GalXM ist wesentlich schwieriger zu analysieren. Bei dem Grundgerüst handelt es sich um ein  $\alpha$ -1,6 Galaktose Polymer, das mit weiteren Seitenketten versehen ist. Die Seitenketten wiederum besitzen Galaktosyl-, Mannosyl- und Xylosyl-Gruppen.

Neuere biochemische Untersuchungen zeigen, dass *C. albicans* und *C. neoformans* terminal sowohl Sialinsäure, O-acyl Sialinsäure,  $\alpha$ -2,6-sialyl-galaktosyl-Strukturen wie auch  $\alpha$ -2,3-sialyl-galaktosyl-Strukturen auf der Oberfläche besitzen, wovon die  $\alpha$ -2,6-sialyl-galaktosyl-Strukturen deutlich überwiegen (Rodrigues et al. 1997, Jones et al. 1995, Rodrigues et al. 2003, Masuoka 2004).

### 4.1.2 Bakterien

#### Wandaufbau:

Bakterien zählen zu den Prokaryonten und haben somit neben einer Zellwand auch eine Zellmembran. Gram-positiven Bakterien liegt die Zellmembran innen der Zellwand an. Gram-negative Bakterien haben eine sehr viel dünnere Zellwand. Dieser liegt aber sowohl innen als

## Diskussion

auch außen eine Zellmembran an. Die Zellwand liegt im sogenannten periplasmatischen Raum. Die Zellmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in die Proteine integriert sind. Diese dienen durch ihre negative Ladung häufig als Energiespeicher für die Bakterien. Die Zellmembran dient als Permeabilitätsbarriere. Die Festigkeit der Membran wird durch Hopanoide verstärkt. Hierbei handelt es sich um Triterpene, die den in Eukaryonten vorkommenden Steroiden strukturell ähnlich sind (Köhler et al. 2001).

Die Gram-positiven Bakterien enthalten in ihrer Zellmembran Teichonsäure, die bei Gram-negativen Bakterien nicht vorkommt. Die Teichonsäure ist in der Zellmembran (dann als Lipoteichonsäure bezeichnet) oder Zellwand kovalent gebunden und reicht bis zur Zelloberfläche. Teichonsäure besteht aus Glycerol-Phosphat-Polymeren und Ribitol-Phosphat-Polymeren, die mit Zucker und D-Alanin verbunden gemeinsam ein stark negativ geladenes Polymer bilden (negativer Ladungsträger).

Der Aufbau der äußeren Zellmembran der Gram-negativen Bakterien weicht von dem der inneren Schicht ab. Die äußere Membran enthält viele Lipoproteine und Lipopolysaccharide. Lipopolysaccharide bestehen aus drei Anteilen. Mit der äußeren Membran in Verbindung steht das Lipid A. Hierbei handelt es sich um ein Phosphoglykolipid (biphosphoryliertes N-Acetylglukosamin-Disaccharid mit meist vier Fettsäuren verknüpft), dass auch als Endotoxin bezeichnet wird und als solches für die allgemeinen Entzündungsreaktion (Prostaglandinfreisetzung und Fieber) verantwortlich ist. An das Lipid A schließt sich die Core-Region an. Diese ist in ihrem Aufbau recht konstant. Die innere Core-Region enthält drei Keto-desoxy-octonsäuren und drei z.T. phosphorylierte Heptosen. Die sich anschließende äußere Core-Region enthält fünf Hexosen. Nach außen abschließend folgt eine Polysaccharidkette, in der sich bis zu 25 aus drei bis fünf Monosacchariden bestehende Einheiten wiederholen. Die Zusammensetzung der Zucker ist sehr variabel und Bakterien spezifisch. Sie wird auch als O-Antigen bezeichnet (Hof et al. 2000).

Die Zellwand der Bakterien, die die Struktur und Form der Zellen und somit den inneren Druck und eine mechanische Festigkeit erhält, ist eine sogenannte Mureinschicht. Es handelt sich um eine Schicht aus Peptidoglykanen. Die N-Acetylmuraminsäure und das N-Acetylglukosamin bilden alternierend ein Netzwerk mit  $\beta$ -1,4-glykosidischen kovalenten Bindungen. An die

## Diskussion

Muraminsäure sind weiterhin kovalent Tetrapeptide gebunden. Die Zellwand der Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien unterscheidet sich vor allem in der Dicke der Peptidoglykanschicht. Während die Schicht bei Gram-negativen Bakterien meist nur aus einer Schicht besteht und nur ca. 2 nm dick ist (ca. 10% der Zellwand) weisen Gram-positive Bakterien häufig bis zu 40 Schichten auf. Der Peptidoglykananteil der Zellwand liegt bei ca. 90%. Die Mureinschicht hat dadurch eine Dicke von 20-28 nm (Madigan et Martinko 2006).

### **Bakterienarten:**

*Bacillus cereus* ist ein Gram-positives Stäbchenbakterium. Es spielt für den Menschen vor allem als Erreger von Lebensmittelintoxikationen eine Rolle, wobei es als fakultativ pathogen gilt. *B. cereus* produziert viele extrazelluläre Enzyme (Lecithinase, Amylase, Kollagenase, Phospholipase, Protease und Urease) sowie Enterotoxine, die bei unsachgemäßer Lagerung von Nahrungsmitteln in großer Menge gebildet werden. Des Weiteren wird *B. cereus* in der Mikrobiologie zur Gewinnung von Antibiotika genutzt.

*Listeria monocytogenes* und *Listeria ivanovii* sind zwei Gram-positive Stäbchenbakterien und die einzigen humanpathogenen ihrer Spezies. Ähnlich wie bei *H. pylori* ist auch bei *Listerien spp.* beim Menschen eine Besiedelung häufig festzustellen, während eine Erkrankung sehr viel seltener auftritt. *L. monocytogenes* kann über die humorale Immunabwehr (Antikörper, bzw. Immunglobuline) nicht eliminiert werden. Es bedarf der Hilfe von T-Lymphozyten und Zytokinen damit die Wirtszelle sich gegen die Infektion mit *L. monocytogenes* wehren kann. Aus diesem Grunde erkranken vorrangig Menschen mit einer Leukämie oder mit einer Steroidtherapie, bei denen die zelluläre Immunität reduziert ist. Auch Schwangere können an einer Listeriose erkranken, was besonders gefährlich ist, da die Infektion möglicherweise auf den Fetus übergreifen und zu einem Abort führen kann (Hof et al. 2003).

*Helicobacter pylori* ist ein Gram-negatives mikroaerophiles Spiralenbakterium, das es auch in einer kokkoiden und einer Stäbchenform gibt (Dunn et al 1997). Charakteristisch ist eine hohe Aktivität des Bakteriums an Urease (Montecucco et al 2001). *H. pylori* hat vor allem in den

## Diskussion

letzten 20 Jahren an Bedeutung gewonnen, seit bekannt ist, dass es Ursache einer Gastritis, der sogenannte Typ B Gastritis, sein kann und bei einer akuten Gastritis zu einem gastralen Ulkus und bei einer chronischen Gastritis zu einem Margenkarzinom führen kann (Marshall et al 1983, 1984). Inzwischen ist es Standard, dass bei einer Ösophago-gastro-duodenoskopie bei klinischem Verdacht immer eine Biopsie zur histologischen Aufarbeitung und Untersuchung auf eine *H. pylori* Besiedelung entnommen wird. Bisher ist noch nicht eindeutig geklärt, welche Bedeutung die asymptomatische Besiedelung mit *H. pylori* hat. Chronische Besiedlungen können wie schon erwähnt das Risiko für ein Magenkarzinom erhöhen.

*Klebsiella spp.* sind überall in der Natur zu finden. Sie kommen sowohl im Boden, auf Pflanzen und im Wasser als auch auf humaner nasopharyngealer und gastrointestinaler Schleimhaut vor (Bagley et al. 1978, Matsen et al. 1974, Rosenthal und Tager 1975). In der Humanmedizin sind *Klebsiellen spp.* als Verursacher der sogenannten Friedberger Pneumonie und Harnwegsinfekten bekannt (Felson et al. 1949, Ronald 2003), die vorwiegend als nosokomiale Infektionen bei immunsupprimierten Patienten auftreten (Schaber et al. 1991). Die Kapsel der *Klebsiellen spp.* kann aufgrund der Kohlenhydratstruktur, die sich aus repetitiven Oligosacchariden zusammensetzt, in 77 Serotypen unterteilt werden (Ørskov und Ørskov 1984). Die hier verwendeten Serotypen mit den Kapselantigenen K1 und K2 haben eine besonders hohe virulente Potenz vor allem im Mäuseperitoneum (Mizuta et al. 1983). Möglicherweise ist die besonders hohe Virulenz durch die stark vertretene Mannose begründet (Ofek et al. 1993).

Als dritter *Klebsiellen* Subtyp wurde das Bakterium *Klebsiella pneumoniae* NUTH-K2044 im Prozess der Phagozytose untersucht. Dieses zeichnet sich klinisch dadurch aus, dass es zu Leberabszessen führt, die in einer Großzahl der Fälle tödlich verlaufen. Im Unterschied zu den anderen *Klebsiellen* besitzt NUTH-K2044 auf der Zelloberfläche das Protein magA (Fang et al. 2004, Wu et al. 2009).

### **4.1.3 Phagozytose**

Phagozytose beschreibt die Aufnahme von Material in eine Zelle. Auf diesem Weg werden zum Beispiel Bakterien und Pilze unschädlich gemacht und aus dem befallenen Körper eliminiert. Im

## Diskussion

menschlichen Organismus unterscheidet man zwei Immunsysteme. Zum einen das angeborene Immunsystem und zum anderen das erworbene Immunsystem. Das angeborene Immunsystem erkennt Mikroorganismen über sogenannte Toll-like-Rezeptoren (TLR) an der Zelloberfläche zur Phagozytose befähigter Zellen. Die Bindungsstruktur des TLR auf dem ortsfremden Material wird als pathogen-associated molecular pattern (PAMP) bezeichnet. PAMPs sind bei Bakterien vorrangig die Lipopolysaccharide der Gram-negativen Bakterien und Triacyl Lipopeptide, Peptidoglykane oder Lipoteichonsäure der Gram-positiven Bakterien. Die korrespondierende TLR unterscheiden sich. bei Gram-positiven Bakterien handelt es sich um die TLR-2 Familie und bei Gram-negativen um Rezeptoren aus der TLR-4 Familie. Nach der Phagozytose werden MHC-Klasse-II-Antigene auf der Zelloberfläche von Makrophagen präsentiert, die aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten bestehen und von CD4 positiven Zellen (sog. T-Helferzellen) erkannt werden können. Diese MHC-Komplexe sind Fragmente des phagozytierten Mikroorganismus, der in Endosomen und/oder Lysosomen abgebaut wurde und ist spezifisch für diesen. Phagozytierte Mikroorganismen werden in der Zelle zerlegt. Über verschiedene Zytokine (Interferon  $\gamma$ , Interleukin-1, -3, -6, -10, -12, TNF- $\alpha$ , - $\beta$ , TGF- $\beta$  und B-Zell stimulierender Faktor) werden anschließend weitere Prozesse zur schnellen Elimination der Erreger aktiviert, die vorrangig über das erworbene Immunsystem ablaufen (Land 2004).

Das Erworbene Immunsystem funktioniert über Antigene und Antikörper, und mündet schließlich mit dem Komplementfaktor C3 als zentralem Punkt ebenfalls in einer Phagozytose.

Die Virulenz und damit die Fähigkeit von *K. pneumoniae*, das in dieser Arbeit im Prozess der Phagozytose beobachtet wurde, sich vor dem Immunsystem des Wirtsorganismus zu schützen ist vorrangig in der Kapsel lokalisiert (Cryz et al. 1984). Die Kapsel bietet vor allem vor der frühen, unspezifischen Phase der granulozytären Phagozytose und den bakteriziden Serumfaktoren Schutz (Podschun et al. 1992, Alvarez et al. 2000).

### **4.1.4 Grundlagen der polarisationsoptischen Analyse**

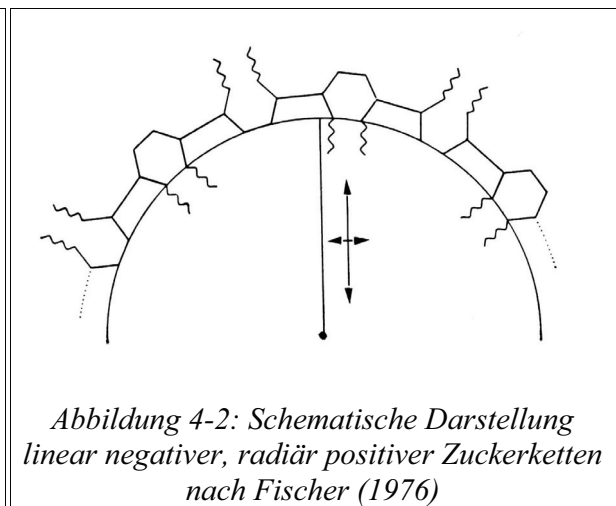
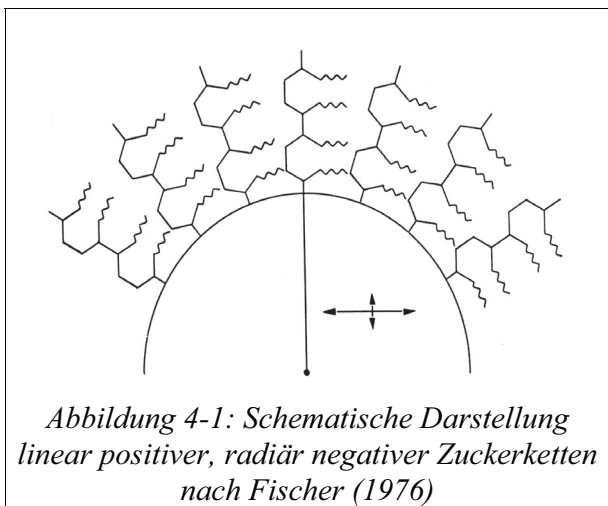
Die Analyse der räumlichen Orientierung der Zuckerketten beruht auf dem Modell von Janós Fischer. Mit der subparallel  $\lambda$ -Platte kann die Ausrichtung der Farbstoffmoleküle, bzw. der benachbarten (vicinalen) linear orientierten OH-Gruppen bestimmt werden. Wenn die linear

## Diskussion

orientierten OH-Gruppen senkrecht oder parallel zum Rest der Zuckermoleküls und damit der Zuckerkette angeordnet sind, kann die Orientierung der Zuckerketten zur Zelloberfläche exakt auf molekularer Ebene bestimmt werden.

Registriert man in der Additionslage eine Aufhellung (gelbe Farbe), ist das Vorzeichen in Bezug auf die Oberfläche linear positiv. Ist im Gegensatz dazu eine Verdunkelung (blaue Farbe) sichtbar, ist das Vorzeichen linear negativ. Bei einem linear positiven Vorzeichen sind die Zuckermoleküle senkrecht, bei linear negativem Vorzeichen parallel zur Oberfläche orientiert ausgerichtet.

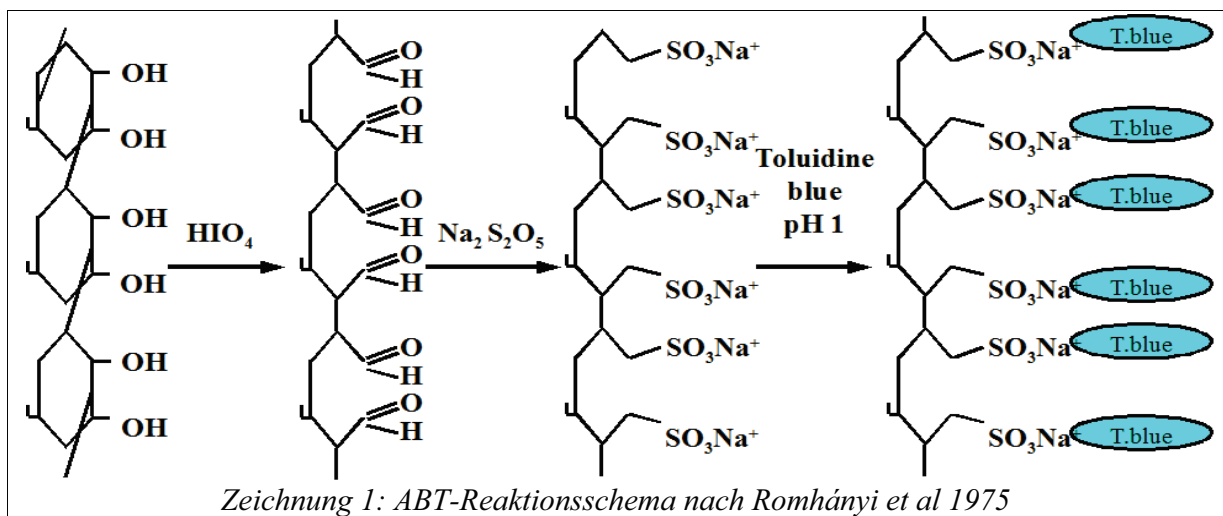
Mit der subparallel  $\lambda$ -Platte wird im folgenden die Orientierung der Farbstoffmoleküle im Verhältnis zur Zelloberfläche bestimmt. Die endständigen, neu gebildeten Sulfonsäuremoleküle binden bei pH1 selektiv Toluidinblau oder 1,9 Dmmb. Hieraus leitet sich dann die Orientierung der linear orientierten OH-Gruppen und entsprechend die Orientierung der Zuckermoleküle und der Zuckerketten ab (siehe Abb. 4-1, 4-2).



Bei der Bestimmung der räumlichen Lage der Sialinsäure kann das Modell von Fischer nicht in gleichem Maße angewandt werden wie bei der Bestimmung der räumlichen Lage der Zuckerketten. Auch hier wird unter der subparallel  $\lambda$ -Platte die Orientierung der Farbstoffmoleküle, entsprechend also die Orientierung der benachbarten, linear orientierten OH-Gruppen, bestimmt. Anders als bei der Analyse der Zuckerketten kann hier aber nicht auf die Orientierung der Sialinsäuremoleküle auf der Zelloberfläche geschlossen werden, da die endständige Sialinsäure nicht Teil des Benzolrings ist und somit räumlich nicht eindeutig positioniert ist (Romhányi et al. 1975, Fischer 1976, Makovitzky 1984, Richter 2005).

## 4.2 ABT- und ABD-Reaktion

Die ABT- (Aldehydbisulfit Toluidinblau-) Reaktion ist eine der ältesten topo-optischen Reaktionen und entspricht der anisotropen PAS-Reaktion. Eingeführt wurde sie auf der Grundlage der PAS-Reaktion zur Mucindarstellung 1946 von McManus als lichtoptische Reaktion 1970 von Malanin. 1974 wurde sie von Romhányi polarisationsoptisch adaptiert. Dieser topo-optischen Reaktion liegt die metachromatische Färbung von Glykogenderivaten zugrunde, die Malanin 1970 beschrieb. Prinzip der ABT- (ABD-) Reaktion ist es, dass linear orientierte, vicinale OH-Gruppen durch 1 %ige Periodsäure (30 min bei Zimmertemperatur) selektiv oxidiert werden. Die oxidierten Gruppen werden anschließend sulfatiert, indem die Präparate mit Natriummetabisulfit behandelt werden. Die neu gebildeten  $\alpha$ -Hydroxysulfonat-Gruppen können mit Toluidinblau oder einem anderen Thiazinfarbstoff bei einem pH-Wert von 1 selektiv gefärbt werden (siehe Zeichnung 1).



Eine lichtoptische, basophile Metachromasie zeigt an, dass sich Toluidinblau zu Salz-Komplexen verbunden hat. Da die Toluidinblau-Lösung einen pH-Wert von 1 hat, stehen für die Salzbildung nur die in den vorangegangenen Reaktionen sulfatierten, endständigen Zuckerketten in einem dissoziierten, optimalen Zustand zur Verfügung. Da in den vorangestellten Reaktionen die benachbarten OH-Gruppen in Aldehyde umgewandelt und anschließend sulfatiert worden sind,

## Diskussion

zeigt die Metachromasie an, dass benachbarte OH-Gruppen in der zu untersuchenden Struktur linear orientiert vorliegen. Im polarisierten Licht können darüber hinaus weitere Aussagen gemacht werden. Ist eine Anisotropie, wie sie sich in unseren Präparaten zeigte, vorhanden, beträgt der Abstand zwischen den Toluidinblau Molekülen und damit auch den benachbarten OH-Gruppen 2-5Å, denn nur in diesem Abstand kommt es zu einer sichtbaren Metachromasie und Anisotropie. Zum zweiten kann festgehalten werden, dass eine Doppelbrechung mit grüner Farbe sich dann zeigt, wenn die Toluidinblau Moleküle in einer Richtung orientiert, optimal gebunden sind und sich Mikroaggregate mit Toluidinblau gebildet haben.

Mit Hilfe der  $\lambda$ -Platte in Subparallelstellung werden zwei Polarisations Ebenen gegeneinander verschoben. Dies führt dazu, dass sich die Farbe der Doppelbrechung aufhellt (gelb) oder verdunkelt (blau). In der Additiven Lage entspricht eine Aufhellung einem linear positiven Vorzeichen (radiär negativer Sphaerit), eine Verdunklung entspricht einem linear negativen Vorzeichen (radiär positiver Sphaerit). Dies ermöglicht eine Aussage darüber, ob die Toluidinblau Moleküle senkrecht oder parallel zur Zelloberfläche ausgerichtet sind. Da sich die Toluidinblau Moleküle an die  $\alpha$ -Hydroxysulfonat-Gruppen binden, entspricht die Orientierung der Toluidinblau Moleküle der Orientierung der OH-Gruppen. Aufgrund von Fischer's Modell (siehe Abb 62, 63) wissen wir, dass die OH-Gruppen im rechten Winkel zu der Richtung der Zuckerketten stehen. Somit können wir durch die Orientierung der Toluidinblau Moleküle, die der Orientierung der OH-Gruppen entsprechen, Rückschlüsse auf die Orientierung der Zuckerketten im Verhältnis zur Zelloberfläche ziehen.

An Stelle von Toluidinblau kann auch der Farbstoff 1,9 Dimethyl Methylenblau (1,9 Dmmb) zur Darstellung der benachbarten, linear orientierten OH-Gruppen genutzt werden. Auch 1,9 Dmmb besitzt die Fähigkeit bei gerichteter Bindung im polarisierten Licht eine Doppelbrechung hervorzurufen. 1,9 Dmmb zeichnet sich dadurch aus, dass im Verhältnis zu Toluidinblau bei einem niedrigen pH-Wert zu einem früheren Zeitpunkt in das Di-Kationen-Stadium wechselt. Als zweifach positiv geladenes Molekül lagert es sich durch elektrostatische Wechselwirkungen an die bei der Bisulfid Addition entstandenen  $\alpha$ -Hydroxysulfonat-Gruppen an.

Die Analyse der Zelloberfläche der verschiedenen Pilze zeigte, dass die Zellwände linear orientierte Zuckerketten besitzen. Nativ im polarisierten Licht betrachtet erschienen die Pilze

## Diskussion

isotop. Nach der ABT-Reaktion zeigten die Pilze eine deutliche Anisotropie mit einer kräftigen Polarisationsfarbe. Die Orientierung der Zuckerketten unterscheidet sich aber in den einzelnen Spezies (siehe Tab 2). *C. neoformans* und *C. albicans*, die in der Humanmedizin sicherlich die klinisch relevanten Pilze sind, haben die gleiche Orientierung der Zuckerketten auf der Zelloberfläche. Sie sind linear positiv, radiär negativ orientiert. Zwischen den *Candida spp.* gibt es jedoch Variationen. Auf der Zelloberfläche von *C. kruzei* sind die Zuckerketten in derselben Orientierung gebunden wie bei *C. albicans*, nämlich linear positiv, radiär negativ. *C. tropicalis* und *C. glabrata* hingegen verhalten sich genau entgegengesetzt. Hier sind die Zuckerketten linear negativ (radiär positiv) orientiert und somit senkrecht zur Zelloberfläche gebunden. Besonders interessant sind die Untersuchungsergebnisse mit der heterogenen Form von *C. neoformans*. Die Zuckerketten auf der Zelloberfläche stellen sich bei der ABT-Reaktion wie die von *C. albicans* dar. *C. neoformans* besitzt zusätzlich eine Kapsel. Diese zeigt nach der ABT-Reaktion ebenfalls eine Doppelbrechung, die dem Nachweis von Zuckerketten mit vicinalen OH-Gruppen entspricht. Analysiert man unter der subparallel  $\lambda$ -Platte die Orientierung dieser Zuckerketten, so fällt auf, dass sie genau entgegengesetzt zu den Zuckerketten der Zelloberfläche orientiert sind, nämlich linear negativ und radiär positiv.

Spezies	Orientierung
<i>C. albicans</i>	Linear positiv, radiär negativ
<i>C. glabrata</i>	Linear negativ, radiär positiv
<i>C. kruzei</i>	Linear positiv, radiär negativ
<i>C. tropicalis</i>	Linear negativ, radiär positiv
<i>C. neoformans</i>	Linear positiv, radiär negativ (innen)
<i>C. neoformans</i>	Linear negativ, radiär positiv (Kapsel)
<i>S. cerevisiae</i>	Linear positiv, radiär negativ

*Tabelle 2: Orientierung der Pilzspezies mit der ABT-Reaktion*

Periodsäure führt zur oxidativen Spaltung von Kohlenhydraten. Periodsäure ist in der Lage benachbarte OH-Gruppen (vicinale Diolen) in Aldehydgruppen umzuwandeln. Hierbei kommt es zu einer Spaltung der Bindung im Zuckermolekül zwischen den OH-Gruppen tragenden Kohlenstoffatomen. Proteine und Lipide nehmen an der Oxidation durch Periodsäure kaum teil.

## Diskussion

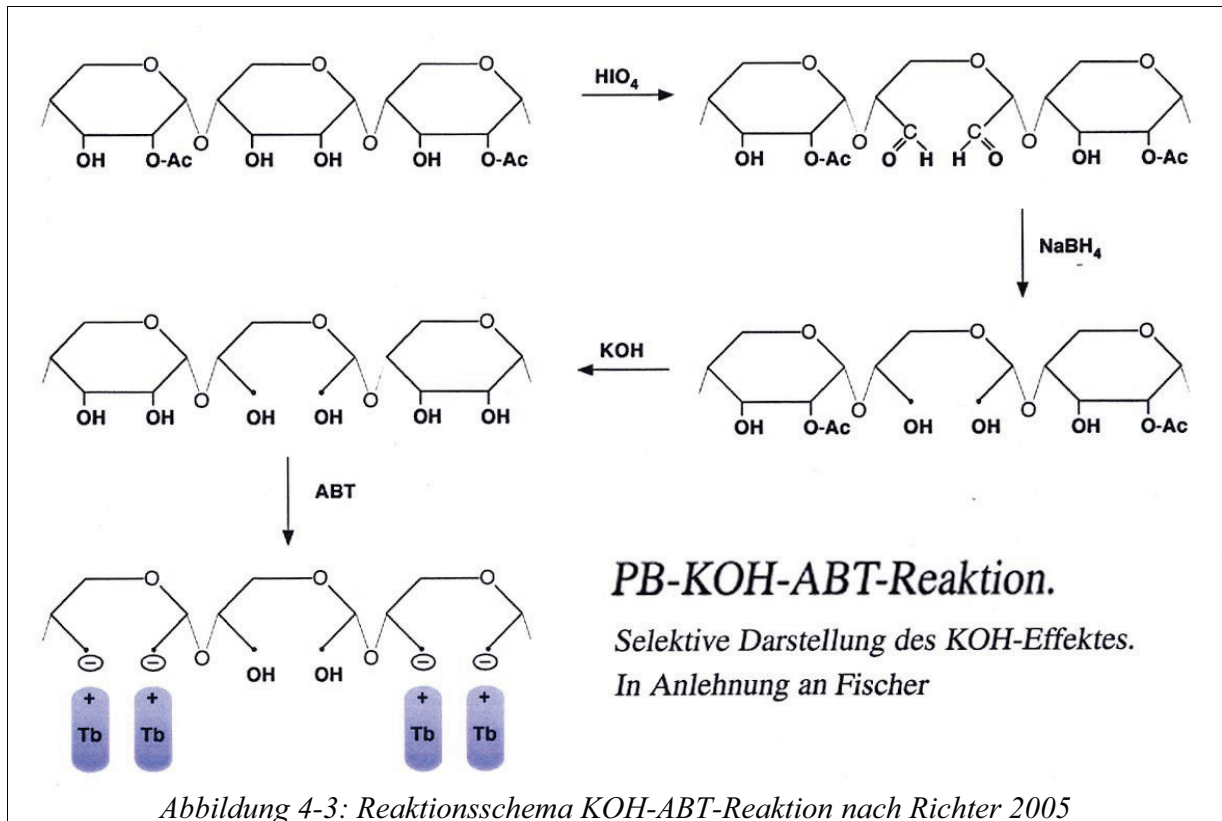
Dies ist zum einen durch die nur in geringem Maße vorhandenen periodensäurereaktiven Gruppen begründet. Andererseits ist die Reaktionsfähigkeit aufgrund der Fixierung durch Formalin deutlich herabgesetzt. Die Intensität der lichtoptisch sichtbaren Metachromasie ist abhängig von der Anzahl benachbart vorliegender alkoholischer OH-Gruppen. Vicinale Dióle finden man in verschiedenen Kohlenhydraten, wie zum Beispiel Glukose, Mannose, Galaktose, Fruktose, Glukosaminen, Galaktosaminen und Sialinsäure. Es ist bekannt, dass für die einzelnen Moleküle unterschiedlich lange Inkubationszeiten mit Periodsäure nötig sind, um die Aldehyde auszubilden. So findet zeitlich gesehen zunächst eine Oxidation der endständigen OH-Gruppen (z.B. die der Sialinsäure) statt, bevor die OH-Gruppen aus dem Pyranosering, die recht fest in diesen integriert sind, zu Aldehyden gespalten werden. Hierin begründet sich die Reaktionszeit vom 30 min zur Spaltung endständiger OH-Gruppen.

Die Sulfatierung mit Natriummetabisulfit, die der Oxidation durch Periodsäure folgt, führt zu einer erhöhten Anlagerung von Toluidinblau/1,9 Dmmb Molekülen und verstärkt somit den optischen Effekt. Die ABT-Reaktion entspricht in dem ersten Schritt der PAS Reaktion. Jedoch ist der Reaktionskomplex durch das Schiff-Reagenz nicht gerichtet gebunden und aus diesem Grund für polarisationsoptische Analysen nicht verwertbar, da es nicht zur Ausbildung einer Anisotropie kommt. Bei der ABT-Reaktion kommt es zu einer gerichteten Bindung der Farbstoffmoleküle an orientierte OH-Gruppen, was zu einer Doppelbrechung führt, die im polarisierten Licht sichtbar ist.

### ***4.3 KOH- und PB-KOH-ABT- und KOH- und PB-KOH-ABD-Reaktion***

Die Vorbehandlung der Präparate mit KOH bzw. mit PB-KOH ermöglicht es O-acylierte substituierte OH-Gruppen an der sich anschließenden ABT-Reaktion teilnehmen zu lassen. Die alkalische Vorbehandlung führt dazu, dass O-acylierte Zuckerketten in OH-Gruppen umgewandelt werden. Diese stehen dann als zusätzliche Gruppen für die Oxidation mit Periodsäure zur Verfügung und erhöhen die Bindungskapazität für Toluidinblau (siehe Abb 4-3).

## Diskussion



Die Ergebnisse, die wir nach der KOH-ABT-Reaktion mit den verschiedenen Pilzspezies erhielten entsprachen denen der reinen ABT-Reaktion. Bei einigen Präparaten ließen sich leichte Unterschiede in der Intensität der Doppelbrechung feststellen.

Mit der KOH-ABT-Reaktion gelang es Módis 1991 selektiv periodreaktive Monosaccharide in glomerulären Membranen nachzuweisen. Kürzlich gelang es Richter (2007) mit derselben Reaktion auch in Amyloidablagerungen O-acyl-haltige Kohlenhydrate nachzuweisen, so dass die Anwendung der ABT-Reaktion mit ihrer Modifikation, auch wenn sie schon seit langem bekannt ist, uns heute noch neue Erkenntnisse über den ultrastrukturellen Aufbau von Zelloberflächen und submikroskopischen Strukturen liefert.

Um diese Untersuchungen zu objektivieren kann die PB-KOH-ABT-Reaktion angewandt werden. Hier wird der KOH-ABT-Reaktion eine Behandlung der Präparate zunächst mit Periodsäure und anschließend mit Natriumborohydrid vorangestellt. Die Periodsäurebehandlung oxidiert die freie OH-Gruppen, die sich nach der Anwendung der ABT-Reaktion darstellen. Das

## Diskussion

Natriumborohydrid blockiert die oxidierten OH-Gruppen, so dass diese für die weiteren Reaktionsschritte nicht mehr zur Verfügung stehen. Mit der dann folgenden milden Alkalisierung werden die O-acylierten Zuckerketten in OH-Gruppen umgewandelt. Mit der ABT-Reaktion werden jetzt selektiv die O-acylierten Zuckerketten dargestellt. Die Ergebnisse im Überblick zeigt Tab. 3. Hier zeigt sich, dass die O-acylierten Zuckerketten in ihrer Orientierung in Bezug auf die Zelloberfläche nicht immer der Orientierung der freien Zuckerketten entsprechen. Bei *C. kruzei* und *C. neoformans* sind die freien Zuckerketten entgegengesetzt zu den O-acylierten Zuckerketten orientiert. Die Zuckerketten der Kapsel von *C. neoformans* enthalten, wie das positive Reaktionsergebnis zeigt, ebenfalls O-acylierte Zuckerketten. Diese sind wie auch bei der ABT-Reaktion senkrecht zu den O-acylierten Zuckerketten der Zelloberfläche orientiert. Die weiteren, untersuchten Pilze haben die freien Zuckerketten und die O-acylierten Zuckerketten gleich sinnig orientiert gebunden.

Spezies	Orientierung
<i>C. albicans</i>	Linear positiv, radiär negativ
<i>C. glabrata</i>	Linear negativ, radiär positiv
<i>C. kruzei</i>	Linear negativ, radiär positiv
<i>C. tropicalis</i>	Linear negativ, radiär positiv
<i>C. neoformans</i>	Linear negativ, radiär positiv (innen)
<i>C. neoformans</i>	Linear positiv, radiär negativ (Kapsel)
<i>S. cerevisiae</i>	Linear positiv, radiär negativ

Tabelle 3: Orientierung der Pilzspezies mit der PB-KOH-ABT-Reaktion

### 4.4 Sialinsäure spezifische Reaktion

Die Sialinsäure wurde 1952 erstmals von Klenk beschrieben. 1962 wurde die Struktur des Sialinsäuremoleküls von Kuhn und Brossmer entschlüsselt. Die Sialinsäure ist ein Monosaccharid bestehend aus 9 Kohlenstoffatomen und weist folgende Charakteristika auf (Lorini 2004):

- Eine Carboxylgruppe an der Position C<sub>1</sub>

## Diskussion

- Eine Aminogruppe an der Position C<sub>5</sub>
- Hydroxylgruppen an den Positionen C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub> und C<sub>9</sub>
- Eine Ketogruppe an der Position C<sub>2</sub>, die unter physiologischen Bedingungen mit der Hydroxylgruppe an C<sub>7</sub> einen pyranoiden Halbacetalring ausbildet.

Es sind bislang ca. 50 Derivate der Sialinsäure bekannt, die durch N- und O-Substitutionen entstehen und spezifisch für ein bestimmtes Gewebe und einen bestimmten Entwicklungsstadium sind (Varki 1993). Beim Menschen am häufigsten vertreten ist die N-Acetyl-Neuraminsäure und die 9-O-Acetyl-N-Acetyl-Neuraminsäure. Meist ist die Sialinsäure endständig in  $\alpha$ 2,3-,  $\alpha$ 2,6- oder  $\alpha$ 2,8-Stellung an Glykoproteine oder Glykolipide gebunden.

Adhäsionsvorgänge und Interaktionen zwischen Zellen finden häufig auf der Basis spezifischer Sialinsäurederivate statt. Für die gerichtete Zellwanderung, Entzündungsreaktionen oder maligne Prozesse sind bereits spezifische Sialinsäuren als Leitstruktur identifiziert worden. Als Bestandteil von Selektinen, Siglecs (sialic acid binding immunoglobulin like lectins) sowie durch ihre negative Ladung trägt Sialinsäure zu Abstoßungs- oder Adhäsionsvorgängen bei.

Terminale Sialinsäuren stabilisieren die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Struktur in die sie eingebunden sind. In Muzinen zum Beispiel erhöhen sie die thermische und proteolytische Stabilität und damit die Schutzfunktion der unterliegenden Schleimhautschicht.

Auch die auf der Zelloberfläche von Erythrozyten bereits bekannte Sialinsäure erhöht die negative Ladung der Zellmembran. Hierdurch wird eine interzelluläre Abstoßung erzeugt die vor einer Agglutination schützt. Andererseits lösen die Sialinsäuren auf Erythrozyten bei Blutgruppeninkompatibilitäten eine Immunantwort aus. Auf anderen Zellen, wie zum Beispiel den Hepatozyten hat die terminale Sialinsäure eine Maskierungsfunktion. Enzyme zur Aufnahme oder Abbau von bestimmten Molekülen können diese durch die Sialinsäure, die endständig an das spezifische Molekül gebunden ist nicht mehr erkennen. Reguliert wird die Expression der Sialinsäure auf der Zelloberfläche durch Sialyltransferasen. Der Abbau der Sialoverbindungen erfolgt in den Lysosomen durch Sialidasen. Bei einer Störung der ordnungsgemäßen Speicherung oder des ordnungsgemäßen Abbaus der Sialinsäure kommt es zu Erkrankungen wie der Salla-Krankheit, den Sialidosen, den Gangliosidosen oder der Galaktosidose, die zum Krankheitskreis der lysosomalen Speicherkrankheiten gehören (Schauer 1988).

## Diskussion

Auch viele Makrophagen erkennen die zu phagozytierenden Partikel an terminalen Sialinsäurederivaten. Thrombozyten und Erythrozyten verlieren mit zunehmender Lebensdauer Sialinsäuren an ihren terminalen Sialinsäureketten auf der Zelloberfläche. Diese schützen die Thrombozyten und Erythrozyten vor der Phagozytose durch die Makrophagen (Kupffer-Zellen). Die Länge der Sialinsäurekette ist also ein indirekter Maßstab für die Lebensdauer der Blutzellen (Schlepper-Schäfer et al. 1980). Auch Erythropoetin, das die Erythropoese stimuliert, besitzt terminale Sialinsäuren bei deren Verlust die Stimulierung der Blutbildung deutlich schwächer wird (Wasley et al. 1991, Egrie 2001). Die Makrophagen des Peritoneums besitzen auf ihrer Oberfläche einen Rezeptor, der desialylierte Partikel und Zellen erkennt und bindet. Sialinsäure als Teil der Selektine verringert die Affinität von Leukozyten, Thrombozyten und Endothelien und erniedrigt die Integrinaktivierung, über die es zu Zellkontakten kommt. Somit ist auch die entzündungsgerichtete Wanderung von Leukozyten durch Sialinsäure gesteuert.

Weiterhin bekannt ist, dass Viren Rezeptoren besitzen, mit der sie an Sialinsäure auf der Zelloberfläche der Wirtszelle binden können. Besonders intensiv untersucht worden ist dies am Beispiel der Influenzaviren (Hirst 1941, Hirst 1942, McClelland et al. 1941): Durch 9-O-Acetylierung der Sialinsäure auf der Zelloberfläche konnte zum Beispiel für das Influenzavirus A und B eine Bindung an die Wirtszelle verhindert werden, während bei Influenza C-Viren eine Infektion durch diese Interaktion erleichtert wurde (Ghaderi 2006). Auf pathogenen Bakterien sitzende Adhäsine sind Sialinsäure bindende Lektine, mit Hilfe derer die Bakterien an die Wirtszelle binden können (z.B.: *H. pylori* (Miller-Podraza 1997), *Escherichia coli* K99 bei Schweinen (Yuyama 1993) oder die Toxine von *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium botulinum* und *Clostridium tetani* (Richards et al. 1979, Schengrund et al. 1991)). Andererseits verhindert die Sialinsäure, dass die Bakterien vom Wirt erkannt und somit eliminiert werden können. Bei *Trypanosoma cruzi* hat man gesehen, dass es in der Lage ist, nachdem es sich an eine Wirtszelle gebunden hat, auf der eigenen Zelloberfläche dieselbe Sialinsäurestruktur zu exprimieren, wie sie die Wirtszelle trägt und so in der Lage ist, der Abwehr des Wirtes zu entgehen (Colli 1993, Tomlinson et al. 1994). Auch werden immer wieder neue therapeutische Ansätze zur antiinfektiösen Therapie via Sialinsäure-haltiger Strukturen untersucht. Je größer der Anteil an Sialinsäure auf der Zelloberfläche von Mikroorganismen ist, desto infektiöser scheinen diese zu

## Diskussion

sein.

Des weiteren gibt es noch die sogenannten Siglecs. Hierbei handelt es sich um eine Unterfamilie von Immunglobulinen die aus Lectinen bestehen. Siglecs sind hochspezifisch für bestimmte Zellen. Beispiele sind das Siglec1 für einen Makrophagensubtyp, das CD33 für myelotische Vorläuferzellen, das CD22 für die B-Zell-spezifische Immunabwehr und das Siglec4 für die myelinspezifische neuronale Entwicklung von Oligodentrozyten und Schwannzellen. Die Erkennung dieser Siglecs ist streng vom Sialinsäurederivat der Seitenkette abhängig (Kelm 1994).

Embryonalzellen schützen sich vor dem mütterlichen Immunsystem, indem ihre Zelloberfläche mit langen Sialinsäureketten maskiert ist (Schauer 1985), die mit zunehmender Entwicklung kürzer werden.

Die Funktion der Glykoproteine ändert sich bzw. wird bestimmt durch Variationen der Sialinsäurederivate. Der Somatostatinrezeptor kann nach Desialylierung seine Liganden sehr viel schlechter binden (Pilatte et al. 1993).

Auch bei der humoralen und zellulären Infektabwehr spielt Sialinsäure eine Rolle. Die Aktivierung des Immunsystems durch Antikörper wird über die Sialinsäure vermittelt. Auch kann z.B. die Sialinsäure von *C. albicans* direkt mit dem iC3b-Glykoproteinrezeptor in Verbindung treten, und so eine Immunantwort auslösen. Andersherum scheint es Anzeichen dafür zu geben, dass der alternative Weg der Immunantwort durch O-acylierte Sialinsäure unterdrückt werden kann. *C. neoformans* schützt sich vor Phagozytose durch das Expressieren von Sialinsäure auf der Zelloberfläche. Die Sialinsäure besetzte Kapsel von *C. neoformans* dient als zusätzliche Schutzbarriere vor einer Phagozytose im befallenen Wirt.

Viele Tumoren besitzen eine hohe Sialinsäurekonzentration auf ihrer Zelloberfläche. Häufig korreliert der Malignitätsgrad positiv mit der Sialylierung. Hierdurch entziehen sich die Tumorzellen erstens dem Immunsystem und erhöhen zweitens ihre Adhäsionspotenz.

Sialinsäure kann von Zellen sowohl de novo in zwei Schritten im Zellkern und im Golgi Apparat synthetisiert als auch recycelt werden.

Die beschriebenen Funktionen der Sialinsäure zeigen eindeutig, dass ihre Struktur tief in die

## Diskussion

Prozesse der interzellulären Kommunikation eingebunden ist. Somit ist es nicht verwunderlich, dass bereits bei einigen Mikroorganismen Sialinsäure auf der Zelloberfläche nachgewiesen worden ist. Die Interaktionen zwischen Makrophagen und Blutzellen lassen darauf schließen, dass es auch Pilzen und Bakterien möglich ist ihre, Virulenz, Toxizität und Resistenz dem Immunsystem gegenüber über Sialinsäure zu lenken. Ebenso kommt der Verdacht auf, dass das Immunsystem aufgrund verschiedener Sialinsäurestrukturen fremde Zellen jeglicher Art erkennt und aus dem Organismus entfernen kann.

Wir haben mit der Sialinsäure spezifischen Reaktion, wie sie 1980 von Makovitzky in Anlehnung an die lichtoptische milde PAS-Reaktion eingeführt wurde, die Zelloberfläche von *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kruzei*, *C. glabrata* und *C. neoformans* auf Zellausstrichen aus Zellkulturen durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei allen Pilzen eine positive topo-optische Reaktion in Form einer lichtoptischen Metachromasie und einer polarisationsoptischen Anisotropie. Sialinsäure ist also auf der Zelloberfläche verschiedener auch humanpathogener Pilze vertreten. Bei *C. neoformans* zeigt sich hier auch deutlich, dass sowohl die Zelloberfläche des Pilzes wie auch die Kapsel, die die Zelle umgibt Sialinsäure enthält. Die Literatur zeigt, dass man davon ausgehen kann, dass Sialinsäure durchaus eine entscheidende Rollen in der Pathogenität und Virulenz der Pilze und der Immunreaktion des besiedelten Wirts spielt. Mit Hilfe der  $\lambda$ -Platte in Subparallelstellung konnten wir nicht nur Sialinsäure licht- und polarisationsoptisch nachweisen, sondern auch deren Orientierung auf der Zelloberfläche bestimmen. Eine Übersicht hierzu gibt Tab. 4.

Pilzspezies	Orientierung
<i>C. albicans</i>	Linear negativ, radiär positiv
<i>C. glabrata</i>	Linear negativ, radiär positiv
<i>C. kruzei</i>	Linear negativ, radiär positiv
<i>C. tropicalis</i>	Linear negativ, radiär positiv
<i>C. neoformans</i> (Zelloberfläche)	Linear negativ, radiär positiv
<i>C. neoformans</i> (Kapsel)	Linear positiv, radiär negativ
<i>S. cerevisiae</i>	Linear negativ, radiär positiv

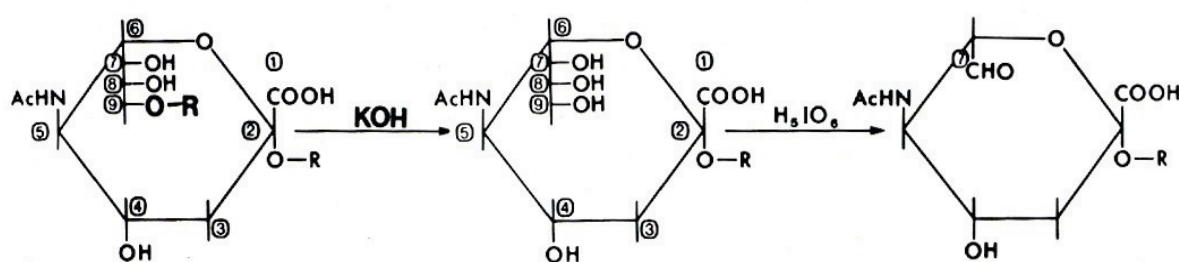
Tabelle 4: Orientierung der Pilzspezies mit der Sialinsäure spezifischen Reaktion

## Diskussion

Anders als bei der ABT-Reaktion variiert das Vorzeichen bei der Sialinsäure spezifischen Reaktion nicht zwischen den Spezies. Auch wenn mit der Sialinsäure spezifischen Reaktion lediglich die Orientierung der OH-Gruppen an den C-Atomen 7, 8 und 9 bestimmt werden kann, ist trotzdem davon auszugehen, dass auch die Sialinsäure, bzw. ihr Halbacetalring in einem orientierten Zustand auf der Zelloberfläche gebunden ist. Aufgrund der biochemischen Gesetze ist davon auszugehen, dass, wenn die terminalen OH-Gruppen der Sialinsäure in einem orientierten Zustand gebunden sind, auch das weite Molekül in einem orientierten Zustand an die Zelloberfläche gebunden ist. In welchem Winkel die beiden Molekülabschnitte (terminale OH-Gruppen der C-Atome 7-9 und der Halbacetalring) zueinander stehen bleibt jedoch offen.

### ***4.5 KOH- und PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion***

In Anlehnung an die PB-KOH-ABT-Reaktion ist es auch möglich durch Vorbehandlungen der Ausstrichpräparate zusätzliche oder nur bestimmte Derivate der Sialinsäure an der Sialinsäure spezifischen Reaktion teilnehmen zu lassen. Die Vorbehandlung mit KOH, entsprechend einer milden Alkalisierung führt zu einer Verseifung von O-acylierten Sialinsäuren, die dann der sich anschließenden Sialinsäure spezifischen Reaktion zusätzlich für die gerichtete Farbstoffbildung zur Verfügung stehen (siehe Abb 4-4).



Scheme of the KOH-sialic acid-specific topo-optical reaction.

*Abbildung 4-4: Atommodell der KOH Vorbehandlung für die KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion*

Die mit dieser Reaktion beobachteten Farbstoffbindungen wurden mit der  $\lambda$ -Platte in Subparallelstellung analysiert und zeigten die Ergebnisse der Tab. 5. Hinsichtlich der

## Diskussion

Orientierung zeigte sich kein Unterschied zu den Orientierungen, die mit der alleinigen Sialinsäure spezifischen Reaktion, die nur die N-acyl-Neuraminsäure zeigt, gewonnen wurden.

<b>Pilzspezies</b>	<b>Orientierung</b>
C. albicans	Linear negativ, radiär positiv
C. glabrata	Linear negativ, radiär positiv
C. kruzeii	Linear negativ, radiär positiv
C. tropicalis	Linear negativ, radiär positiv
C. neoformans	Linear negativ, radiär positiv (innen)
C. neoformans	Linear positiv, radiär negativ (Kapsel)
S. cerevisiae	Linear negativ, radiär positiv

*Tabelle 5: Orientierung der Pilzspezies mit der KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion*

Die OH-Gruppen der C-Atome 7-9 der Sialinsäure sind dementsprechend also, gleich ob sie ohne Substituenten, N-acyliert oder O-acyliert vorliegen parallel zur Zelloberfläche ausgerichtet, da die 1,9 Dmmb-Moleküle senkrecht zur Oberfläche an die OH-Gruppen gebunden sind. Diese Feststellung unterstützen die Ergebnisse, die wir nach der Anwendung der PB-KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion gewonnen haben. In Anlehnung an die PB-KOH-ABT-Reaktion ist es mit dieser Reaktion möglich die OH-Gruppen der N-acyl-Neuraminsäure mit Borohydrid zu blockieren, so dass sie an der sich anschließenden Reaktion nicht mehr teilnehmen. Die milde Alkalisierung mit KOH dient dann wieder dazu, die O-acylierten Sialinsäuren zu verseifen, so dass sie an der Sialinsäure spezifischen Reaktion teilnehmen können.

Zusammenfassend ist zu den ABT-Reaktionen und Sialinsäure spezifischen Reaktionen festzuhalten, dass an der Zelloberfläche verschiedener Pilze Zuckermoleküle, Sialinsäure und 9 O-acyl-Sialinsäure vorkommen und auf dieser gleichmäßig kontinuierlich verteilt sind. Die gleichmäßige Verteilung wurde mit der topo-optischen Reaktionen auch auf der Zelloberfläche von Erythrozyten, Lymphozyten und Thorambozyten gesehen (Makovitzky 1984). Auch bei diesen Zellen fand keine sogenannte Cap Bildung (Mehransammlung von einem Molekül an einem bestimmten Bereich auf der Membran) statt.

#### ***4.6 Alkalische Hydrolyse, saure Hydrolyse und Sialinsäureextraktion***

In den Ergebnissen ist die alkalische Hydrolyse beschrieben worden. Hier wird mit einer alkoholischen Bariumhydroxidlösung eine Hydrolyse, also eine Abspaltung von Wasser, hervorgerufen. Hierdurch wird die Anzahl der OH-Gruppen in Kohlenhydraten verringert. Demenstprechend ist auch davon auszugehen, dass sich auch die Anzahl der vicinalen OH-Gruppen verringert, so dass wir vermuteten, dass die ABT-Reaktion zur Darstellung benachbarter OH-Gruppen schwächer ausfallen muss. Diese Erwartungen sind wie die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, bestätigt worden. Ausnahmslos konnte die Intensität der Doppelbrechung der Zellmembran der Pilze mit der alkalischen Hydrolyse vor einer ABT-Reaktion deutlich herabgesetzt und zum Teil sogar vollständig ausgelöscht werden.

Besonders interessant und eindrucklich war die Anwendung der alkalischen Hydrolyse vor der ABT-Reaktion bei *C. albicans* und *S. cerevisiae*. Lichtoptisch zeigte sich nach einer mittleren Inkubationszeit von 12 h eine weiterhin kontinuierliche Metachromasie. Polarisationsoptisch zeigte sich jedoch ein deutlich anderes Bild als bei der ABT-Reaktion. Die Doppelbrechung, die zuvor einer gleichmäßigen anisotropen Membran entsprochen hat, stellt sich jetzt diskontinuierlich und mit einer unterschiedlich breiten anisotropen Membran dar. Die Dichte der benachbarten OH-Gruppen ist durch die alkalische Hydrolyse also deutlich herabgesetzt worden. Die Analyse des Vorzeichens mit der subparallel  $\lambda$ -Platte zeigt für die verbliebenen anisotropen Bereiche der Zellmembran einen Vorzeichenwechsel für *C. albicans* und *S. cerevisiae* von linear positiv hin zu linear negativ an. Somit konnte mit dieser Vorbehandlung gezeigt werden, dass auch *S. cerevisiae* und *C. albicans* auf der Zelloberfläche ein doppelschichtiges Kohlenhydratsystem besitzen, in dem die Zuckerketten entgegengesetzt orientiert sind. Während *C. neoformans* von einer Kapsel zum zusätzlichen Schutz umgeben ist, auf der die Zuckerketten entgegengesetzt zu denen der Zelloberfläche orientiert sind, ist bei *C. albicans* und *S. cerevisiae* diese Schutzfunktion ebenso vorhanden, indem beide von einer zweilagigen Schicht aus Zuckerketten umgeben sind, die ebenfalls entgegengesetzt orientiert sind. Bei einfacher Anwendung der ABT-Reaktion wird dies nicht deutlich. Erst durch die alkalische Hydrolyse

## Diskussion

konnten die oberflächlich liegenden Kohlenhydrate entfernt werden, so dass jetzt die darunter liegenden Kohlenhydrate sich in der ABT-Reaktion darstellen.

Sialinsäure ist  $\alpha$ -glykosidisch an Kohlenhydrate vor allem als Bestandteil von Glykoproteinen gebunden. Mit der sauren Hydrolyse und der Sialinsäureextraktion kann diese Bindung selektiv gespalten werden und so die Sialinsäure von der Zelloberfläche entfernt werden (Schauer 1973). Wendet man nach der sauren Hydrolyse und der Sialinsäureextraktion die Sialinsäure spezifische Reaktion an, wird diese negativ (also isotrop) ausfallen, da die Sialinsäure durch die vorherige Reaktion selektiv entfernt wurde.

In unseren Versuchen wurde für die saure Hydrolyse Salzsäure (HCl) und eine Reaktionszeit von 3 Stunden gewählt (Richter 2005). Anschließend wendeten wir die Sialinsäure spezifische Reaktion an. Sehr eindrücklich zeigte sich hier bei *S. cerevisiae* eine Reduktion der Doppelbrechung bei erhaltener Metachromasie. Die Reduktion der Doppelbrechung zeigte sich zum einen in einer verminderten Intensität der Anisotropie, andererseits in einer diskontinuierlichen Anisotropie. Die Anwendung der  $\lambda$ -Platte in Subparallelstellung zeigte eine andere Orientierung der Sialinsäure auf der Zelloberfläche als nach der alleinigen Anwendung der Sialinsäure spezifischen Reaktion. Zum einen sieht man einen Vorzeichenwechsel zu einem linear positiven Vorzeichen hin, zum anderen zeigt sich bei einigen *S. cerevisiae* bei genauem Hinsehen eine Zweiteilung der Membran. Die Orientierung der beiden Schichten ist entgegengesetzt zueinander ausgerichtet. Mit der sauren Hydrolyse konnte nicht nur die Spezifität der Sialinsäure spezifischen Reaktion kontrolliert werden, sondern auch gezeigt werden, dass auch die Sialinsäure, wie schon bei den Kohlenhydraten mit der alkalischen Hydrolyse gesehen, zwei geschichtet in der Membran vertreten ist. Wie die Kohlenhydrate sind auch die Sialinsäuren in beiden Schichten entgegengesetzt orientiert gebunden.

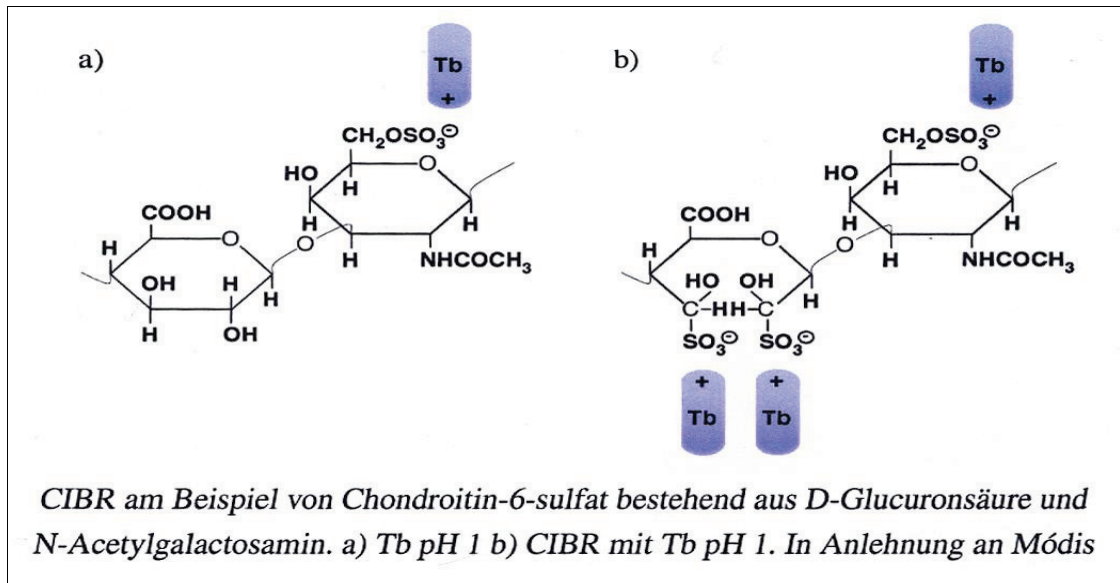
Die Sialinsäureextraktion mit Schwefelsäure zeigte nach der Sialinsäure spezifischen Reaktion nach 120 Minuten Reaktionszeit eine deutliche Reduktion der Anisotropie. Ein Verlust der Doppelbrechung konnte nach einer Reaktionszeit von 180 Minuten erreicht werden. Auch der Vorzeichenwechsel zu einem linear negativen Vorzeichen bei *S. cerevisiae* konnte mit der subparallel  $\lambda$ -Platte gesehen werden. Die Zweiteilung der Zelloberfläche konnte mit der Sialinsäureextraktion nicht dargestellt werden, da sie aggressiver die Sialinsäure entfernt, als die

saure Hyrdolyse.

#### ***4.7 CIBR und CEC-Methode***

Die CIBR (chemically intensivied basophilic reaction) nach Scott JE und Dorling J (1969) und Módis (1991) dient dem Nachweis urosäurehaltiger, sulfatierter Glykosaminoglykane. Der Mechanismus beruht auf der Tatsache, dass es in der Natur Unterschiede in der Reaktionszeit zur oxidativen Herstellung von Aldehyden aus OH-Gruppen gibt. Die schnell reagierenden OH-Gruppen können anschließend mit  $\text{NaBH}_4$  blockiert werden. Schließt man dann wieder eine Oxidation mit Periodsäure an, so werden langsam reagierende vicinale OH-Gruppen zu Aldehyden oxidiert. Das Reaktionsschema zeigt Abb. 4-5. Die Reaktionszeit beträgt 24 Stunden um die vicinalen OH-Gruppen der Uronsäure von Glykosaminoglykanen zu oxidieren. Uronsäurehaltige Glykosaminoglykane sind zum Beispiel in Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat enthalten. Abschließend können die neu entstandenen Aldehyde nach der Reaktion mit Hydroxysulfonat mit einem kationischen Farbstoff (Toluidinblau) gefärbt werden. Da sich auch ursprünglich im Molekül befindliche Sulfatgruppen bei der CIBR mit anfärben, muss die Intensität der Reaktion mit einer einfachen Toluidinblau-Färbung verglichen werden. Hierbei konnten wir keinen Unterschied in er Intensität feststellen. Die Färbung mit Toluidinblau muss aber bei der Toluidinblaufärbung wie auch im Rahmen der CIBR bei einem niedrigen pH Wert (am besten 1,0) erfolgen. Bei einem solch niedrigen pH Wert liegen die Carboxylgruppen undissoziiert vor und werden so an der Reaktion nicht teilnehmen können.

## Diskussion



*Abbildung 4-5: Reaktionsschema der CIBR nach Richter 2005*

Nachdem mit der CIBR nicht nur im Knorpelgewebe, sondern auch in Amyloidablagerungen uronsäurehaltige Glykosaminoglykane nachgewiesen werden konnten, sollte auch bei Mikroorganismen, die ebenfalls zu ausgeprägten Veränderung in erkrankten Geweben führen können, die CIBR angewendet werden. Die Uronsäurehaltigen GAG sind überwiegend sulfatiert. Es gelang uns positive Reaktionsergebnisse in Form einer Anisotropie bei folgenden Pilzen zu sehen: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kruzei*, *C. glabrata*, *S. cerevisiae*, *C. neoformans*.

Die Critical electrolyte concentration method (CEC) ist eine weitere Methode, mit der selektiv Sulfatgruppen von Glykosaminoglykanen dargestellt werden können. Das Prinzip dieser Reaktion ist es, mit Elektrolyten (hier Magnesiumionen) Carboxylgruppen zu blockieren, so dass sie keine Farbstoffbindung mehr eingehen können. Der pH Wert der Farbstofflösungen ist bei dieser Reaktion, die von Scott et al. (1965, 1969) entwickelt wurde neutral. Die Farbstoffkationen (z.B. Toluidinblau) konkurriert mit anderen Kationen (hier. Magnesiumionen) um die Bindungsstellen an negativ geladenen Carboxyl- und Sulfatgruppen des Substrats. Physiologischer Weise hat der Farbstoff die höhere Affinität zu den negativ geladenen Gruppen um die es mit den Magnesiumkationen konkurriert. Ab einer bestimmten Konzentration an  $Mg^{2+}$  aber werden die Bindungsstellen vorrangig mit den Magnesiumkationen besetzt. Diesen Punkt bezeichnet man als Kritische Elektrolytkonzentration, die für sulfatierte Glykosaminoglykane

## Diskussion

höher liegt, als für carboxylierte Glykosaminoglykane. Für polarisationsoptische Untersuchungen hat Módis (1974, 1991) Magnesiumchloridlösungen mit Toluidinblau als Farbstoff bei einem pH Wert von 5,2 empfohlen. Carboxylgruppen können den Farbstoff Toluidinblau nur in Gegenwart niedriger Elektrolytkonzentrationen (max. 0,1 mol/l) binden. Bei höheren Magnesiumkonzentrationen ist eine Anfärbbarkeit mit Toluidinblau hier nicht mehr gegeben.

Ein typisches Glykosaminoglykan mit ausschließlich Carboxylgruppen ist Hyaluronsäure, die sich entsprechend dem oben erklärten Reaktionsmechanismus bei einer Elektrolytkonzentration von 0,1 mol/l nachweisen lässt. Der Nachweis von Hyaluronsäure gelang uns bei allen getesteten Pilzen (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans*). Die Phagozyten zeigten im gesamten untersuchten Zeitraum der Phagozytose keine Doppelbrechung für Hyaluronsäure.

Heparansulfat ist ein Glykosaminoglykan, dass pro Disaccharideinheit mehrere Sulfatgruppen besitzt. Dies ist der Grund dafür, dass auch bei Elektrolytkonzentrationen von 1,8 mol/l noch immer eine Bindung der Farbstoffkationen und damit auch eine Metachromasie bei dieser hohen Magnesiumionenkonzentration in der Farbstofflösung möglich ist. Heparansulfat konnten wir auf keinem der Pilze nachweisen. Keratansulfat ist auch ein überwiegend sulfatiertes Glykosaminoglykan, jedoch mit einer geringeren Dichte an Sulfatgruppen als das Heparansulfat. Aus diesem Grunde kann zwischen beiden mit einer unterschiedlichen Magnesiumkonzentration unterschieden werden. Keratansulfat kann selektiv mit einer Konzentration von 1,0 mol/l angefärbt werden. Eine Metachromasie und Doppelbrechung sahen wir bei *S. cerevisiae* und *C. kruzei*. Bei einer Konzentration von 0,5 mol/l lassen sich Glykosaminoglykane anfärben, die sowohl Carboxyl- als auch Sulfatgruppen in einem etwa ausgeglichenen Verhältnis besitzen. Hierzu gehört unter anderem das Chondroitinsulfat, das wir auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* nachweisen konnten.

Mit Hilfe der CIBR und der CEC konnten wir nachweisen, dass auch auf Pilzen Glykosaminoglykane auf der Zelloberfläche in orientiertem Zustand vorhanden sind. Diese sind zu einem großen Teil sulfatiert und teilweise auch uronsäurehaltig. Darüber hinaus konnten wir im polarisierten Licht zeigen, dass die Glykosaminoglykane linear orientiert auf der Zelloberfläche gebunden sind. Diese Ergebnisse in Verbindung mit den Ergebnissen der bereits beschriebenen topo-optischen Reaktionen zeigen, dass die Zellwand der Mikroorganismen nicht

## Diskussion

nur ein fein gegliedertes, molekular organisiertes Werk ist, sondern dass auch die Ausrichtung der Moleküle in Bezug auf die Zelloberfläche und die Umgebung einer strengen Ordnung gehorcht, deren Bedeutung wir bis jetzt nur erahnen können.

### **4.8 Analyse der Bakterienoberflächen**

1976 und 1978 führten Emödy und Fischer ABT-Reaktion an Bakterien durch. Sie konnten polarisationsoptisch keinen Unterschied zwischen der Zelloberfläche Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien feststellen. Die von uns an Bakterien durchgeführten Reaktion haben gezeigt, dass sich auf der Zelloberfläche neben den schon bekannten Polysacchariden und Kohlenhydratketten auch Sialinsäure und Derivate dieser befinden. Weiterhin erbrachte auch die CEC und CIBR positive Reaktionsergebnisse.

#### **4.8.1 *B. cereus***

Wir haben mit Hilfe der ABT und PB-KOH-ABT-Reaktion bei *B. cereus* beobachtet, dass die vicinalen OH-Gruppen der Polysaccharid Komponenten, die die Zellwand bilden, eine räumliche Orientierung in zwei verschiedenen Richtungen haben: erstens haben wir nach der ABT-Reaktion eine in Bezug auf die Oberfläche linear positive Doppelbrechung mit positivem Dichroismus gesehen. Die Polysaccharid Komponenten sind also senkrecht zur Oberfläche mit spiralartigem Ablauf der freien vicinalen OH-Gruppen orientiert. Zweitens haben wir nach der KOH-ABT bzw. PB-KOH-ABT- Reaktion eine linear negative Doppelbrechung und negativen Dichroismus registriert. Die Polysaccharidketten, deren OH-Gruppen teilweise O-acyliert sind, laufen membranparallel. Die O-acyl bzw. O-lactyl Gruppen kommen in Muraminsäure vor, deren Existenz in Zellwänden gesichert (Ghuysen 1968) und deren Spaltung durch alkalischer Lösung bekannt ist. Bei Immersionsvergrößerung konnten wir in der seitlichen Region der Zellwand eine intensive Doppelbrechung mit linear negativem Vorzeichen registrieren. In der mittleren Zone sahen wir eine linear positive Doppelbrechung, also eine entgegengesetzte Richtung. Die zu der Zelloberfläche parallel lokalisierten Polysaccharidketten liegen in ihrer räumlichen Strukturierung als eine helikale Linie um das Bakterium herum. Auf Grund der Untersuchungen

## Diskussion

von Fischer (1978) nehmen wir an, dass die Polysaccharidketten über eine dreidimensionale räumliche Struktur verfügen. Unterstützend hierzu zeigten Loeff et al. 2008, dass *B. cereus* unterschiedliche Kohlenhydrate und Polysaccharide in der Zellwand haben. Ebenso zeigten sie, dass diese sich in ihrer Menge und Verteilung zwischen den einzelnen Spezies unterscheiden. Weitere Analysen zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen der Pathogenität der *B. cereus* Typen und der Kohlenhydratverteilung besteht.

Mit den Sialinsäure spezifischen Reaktionen konnten wir zeigen, dass die Sialinsäure und O-acyl Sialinsäure in ihrer Struktur gleichsinnig zu der der Polysaccharide angeordnet ist. Bei *B. cereus* gibt es neben den linear positiven Polysaccharidketten auch linear negative Polysaccharidketten, deren Struktur von der Sialinsäure nachempfunden wird.

Die Bakterienwand von *B. cereus* hat nach unseren Untersuchung also zwei entgegengesetzte Oligosaccharidkomponenten, anhand derer sich die Sialinsäure und O-acyl Sialinsäure ausrichten.

### 4.8.2 *H. pylori*

*H. pylori* gebührt auch mehr als 20 Jahre nach seiner Entdeckung durch Warren und Marshall noch immer eine große Aufmerksamkeit. Seine Interaktionen im menschlichen Körper variieren zwischen einer asymptomatischen Besiedlung, einer bakteriellen Gastritis und einem durch eine chronische Infektion ausgelösten Magenkarzinom. Trotz vieler Untersuchungen und Studien konnte bis jetzt nicht geklärt werden, worin die Unterschiede liegen. Gezeigt werden konnte, dass *H. pylori* in der Zellwand und im Zytoplasma viele Proteine besitzt, über die einer Adhäsion und Interaktion mit dem Mucus der Magenschleimhaut möglich ist (Ernst und Gold 2000). Einige hiervon binden über sialylierte Moleküle. Beispiele hierfür sind HP-NAP (Helicobacter pylori neutrophil-activating protein), HpaA (N-acetylneuraminyllactose-binding fimbrial hemagglutinin) und SabA (Sialyl-Lewis a/x binding adhesin) (Mahdavi et al 2002, Unemo et al 2005). Weiterhin gibt es Untersuchungen über eine Bindung von *H. pylori* an Laminin. Hierzu gibt es zwei Theorien, von denen die eine besagt, dass *H. pylori* über Lectine mit der terminalen Sialinsäure der Laminine in Kontakt tritt und die zweite, dass die Lipopolysaccharide von *H. pylori* mit dem Laminin interagieren (Odenbreit 2005, Ota et al 1998, Borén et al 1994). Walz

## Diskussion

gelang es 2006 ersteren Weg über die terminale Sialinsäure zu beweisen. Gram-negative Bakterien wie *H. pylori* besitzen auf ihrer Oberfläche Oligosaccharidketten, die sich mit der ABT-Reaktion und KOH-ABT-Reaktion darstellen lassen. Mit unseren Methoden konnten wir auch Sialinsäure und o-acyl-Sialinsäure auf der Zelloberfläche von *H. pylori* nachweisen. In Zusammenschau der Ergebnisse von Walz sehen wir die Sialinsäure auf der Zelloberfläche mit eine coating Funktion zum Schutz vor der phagozytierenden System, während die Sialinsäure Rezeptoren auf der Zelloberfläche zum Eindringen in die Wirtszellen dient.

### 4.8.3 *Listerien*

Die ABT-Reaktion zur Darstellung linear orientierter OH-Gruppen zeigte in Form einer Metachromasie nicht nur, dass diese bei *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* vorhanden sind, sondern aufgrund der kräftigen Anisotropie, dass diese hochorientiert auf der Zelloberfläche gebunden sind. Mit der PB-KOH-ABT-Reaktion gelang auch der Nachweis linear orientierter O-acylierter Kohlenhydrate. Überraschend war die unterschiedliche Orientierung der N-acylierten Kohlenhydrate auf der Oberfläche der Bakterien. Hier zeigten *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* eine entgegengesetzte Bindung der N-acylierten Kohlenhydrate. Legt man die Theorie (Loeff et al. 2008) zugrunde, dass die Verteilung und Anordnung der Kohlenhydrate Spezies typisch ist und zwischen den einzelnen Arten minimal differiert, scheint es nur logisch, dass auch hier diese feine Differenz sichtbar ist. Die helikale Struktur der Kohlenhydrate scheint sich bei den untersuchten *Listerien* in den N-acylierten Kohlenhydratketten zu unterscheiden.

In Bezug auf die Sialinsäure zeigte sich kein Spezies spezifischer Unterschied. *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* verhielten sich hinsichtlich einer kräftigen Anisotropie wie auch der Orientierung gleich. Auffällig ist hier jedoch, dass die o-acylierte Sialinsäure entgegengesetzt zu der N-acylierten oder nicht acylierten Sialinsäure gebunden ist. Die *Listerien* lassen sich also durch die Ergebnisse der Sialinsäure spezifischen Reaktion in eine Art einteilen, während sie sich durch die ABT-Reaktion und deren Modifikationen unterscheiden lassen.

Weiterhin führten wir zur Überprüfung dieser Reaktionsergebnisse an den *Listerien* die saure Hydrolyse und die Sialinsäureextraktion durch. Mit beiden Reaktionen konnte die gesamte Sialinsäure entfernt werden, so dass wir hiermit zeigen konnte, dass die gewonnenen Ergebnisse

## Diskussion

tatsächlich eine Darstellung der Sialinsäure dienen. Die alkalische Hydrolyse zur Blockierung der ABT-Reaktion konnte ebenfalls erfolgreich angewendet werden. Weder bei *L. ivanovii* noch bei *L. monocytogenes* konnte eine Anisotropie gesehen werden. Auffällig war, dass bei *L. monocytogenes* eine schwache Metachromasie nach der alkalischen Hydrolyse persistierte. Dies passt zu dem Ergebnis, dass die N-acylierten Kohlenhydrate bei *L. monocytogenes* linear positiv wie die unsubstituierten Kohlenhydrate orientiert sind. Bei *L. ivanovii* sind diese linear negativ gebunden. Möglicherweise summiert sich die Schicht der linear negativ orientierten OH-Gruppen bei *L. monocytogenes* und lässt sich dadurch schlechter mit einer alkalischen Hydrolyse blockieren.

### ***4.9 Interpretation der Ergebnisse der Phagozytosepräparate***

Die *Klebsiellen* spp. zeigen vor Beginn der Phagozytose nach anwenden der ABT-Reaktion eine deutliche Doppelbrechung. Die bekapselten Formen stellen sich hierbei mit einem linear negativen, radiär positiven Vorzeichen dar, wohingegen sich die unbekapselten *Klebsiellen* linear positiv, radiär negativ zeigen. Zur Interpretation dieser Ergebnisse muss bedacht werden, dass die Farbstoffmoleküle, deren Orientierung hier bestimmt worden ist, im rechten Winkel zu den Polysaccharidketten stehen. Da die Farbstoffmoleküle dieselbe Orientierung wie die OH-Gruppen haben, entspricht erstens die Orientierung der Farbstoffmoleküle derjenigen der OH-Gruppen und zweitens sind auch die OH-Gruppen im rechten Winkel zu den Polysaccharidketten gebunden. Die Oberfläche der bekapselten *Klebsiellen* hat dementsprechend Polysaccharide auf der Zelloberfläche, die parallel zur Zelloberfläche orientiert sind. Die unbekapselten *Klebsiellen* haben ebenfalls Polysaccharide auf der Zelloberfläche jedoch sind diese senkrecht zur Zelloberfläche orientiert. Dies zeigt die polarisationsoptische Doppelbrechung.

Die von Fischer und Emödy (1976, 1978) durchgeführten Untersuchungen an Bakterien zeigten wie oben beschrieben, keine Unterschiede zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien. Beide führten ihre Untersuchungen auch an *Klebsiellen* durch. Ein Vergleich ihrer Ergebnisse mit unseren fällt schwer, da sich in ihren Untersuchungen weder Aussagen über das

## Diskussion

Vorhandensein des O-Antigens finden lässt, noch lassen sich andere strukturelle Unterschiede in der Zelloberfläche abgesehen von dem Vorhandensein von Polysacchariden und Peptidoglykanen ausmachen.

Die Anwendung der KOH-ABT-Reaktion zeigte dieselben Ergebnisse wie die ABT-Reaktion. Mit der KOH-ABT-Reaktion werden O-acyl-substituierte OH-Gruppen aufgespalten und stehen als dann wieder freie OH-Gruppen zusätzlich zur Verfügung, unterscheiden sich jedoch nicht von den freien OH-Gruppen. Eine alleine Darstellung der O-acylierten Kohlenhydrate gelingt durch die Anwendung der PB-KOH-ABT-Reaktion. In der Periodsäure-Borohydrid-Reaktion werden die freien OH-Gruppen blockiert. Anschließend werden die O-acyl-substituierten OH-Gruppen aufgespalten und stehen ausschließlich der sich anschließenden ABT-Reaktion zur Verfügung. Hierbei zeigte sich sowohl bei den bekapselten, als auch bei den unbekapselten *Klebsiellen* ein linear negatives, radiär positives Vorzeichen. In Bezug auf die O-acylierten Kohlenhydrate macht es also keinen Unterschied, welche *Klebsiellen spp.* man untersucht. Während bei der bekapselten Form der *Klebsiellen* die O-acylierte Kohlenhydrate in der gleichen Orientierung gebunden sind wie die freien Kohlenhydrate, sind bei der unbekapselten *Klebsiellen* die O-acylierten Kohlenhydrate entgegengesetzt zu den freien Kohlenhydraten orientiert. Die Anzahl der O-acylierten Kohlenhydrate scheint jedoch nur gering zu sein, denn die Doppelbrechung und die Bestimmung des Vorzeichens bei der ABT-Reaktion ist eindeutig zu bestimmen. Die entgegengesetzte Orientierung der O-acylierten Kohlenhydrate wird erst nach Blockierung der freien Kohlenhydrate sichtbar.

Die bekapselten *Klebsiellen* haben 3 Schichten die Kohlenhydrate enthalten: erstens eine Schicht aus Peptidoglykanen, zweitens die Lipopolysaccharidschicht und drittens eine Schicht aus Polysacchariden (Kelly et al. 1993, Whitefield et al. 1991, Arakawa et al. 1991). Es werden weitere Untersuchungen mit topo-optischen Reaktionen nötig sein, um die einzelnen Komponenten auf ihre Orientierung hin zu untersuchen.

Sialinsäure ist in der Vergangenheit als Komponente der Lipopolysaccharide von *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*) (Gamiani et Kenne 1993) nachgewiesen worden und unter anderem in der Kapsel von *Streptokokken* Gruppe B und *Neisseria meningitidis* Serogruppe B (Weesels et al. 1989, Blacklow et Warren 1962).

## Diskussion

Uns gelang es erstmals Sialinsäure in *Klebsiella pneumoniae* nachzuweisen. Viel mehr noch gelang es uns sowohl auf der Zelloberfläche bekapselten wie auch unbekapselter *Klebsiellen* Sialinsäure nachzuweisen.

Die Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Phagozytose zeigten nach 5 Minuten noch keine phagozytierten *Klebsiellen* und nur vereinzelt Anheften von *Klebsiellen* an die Zelloberfläche der Phagozyten. Weder bei den frei liegenden noch bei den angelagerten *Klebsiellen* zeigte sich (unabhängig von der Kapsel) ein Unterschied in der Orientierung zu den Ergebnissen der *Klebsiellen*, die nicht in das Mäuseperitoneum injiziert wurden. Nach 30 Minuten/1 Stunde der Phagozytose zeigen sich im Vergleich der bekapselten und unbekapselten *Klebsiellen* eine höhere Rate an phagozytierten *Klebsiellen* bei der unbekapselten Form. Auffällig ist, dass die phagozytierten *Klebsiellen* keine bis eine sehr schwache Doppelbrechung ihrer Zelloberfläche zeigten mit zum Teil umgekehrten Vorzeichen. Nach zwei Stunden sah man auch bei den bekapselten *Klebsiellen* einige phagozytierte Bakterien, die nach und nach ihre Doppelbrechung verloren, bzw. das Vorzeichen umwandelten. Die unbekapselten *Klebsiellen* zeigten nach 1-2 Stunden Inkubationszeit der Phagozytose bereits einen Wechsel des Vorzeichens sowohl im Peritoneum als auch in den Phagozyten/Leukozyten. Dieses Phänomen zeigten die bekapselten *Klebsiellen* ebenfalls, allerdings erst nach einer Inkubationszeit von vier Stunden. Die phagozytierten, bekapselten und unbekapselten *Klebsiellen* zeigen erst eine mosaikartige Doppelbrechung. Zeitgleich hiermit und mit einiger Zeitverzögerung erfolgte anschließend bei den Bakterienreste eine erneute Vorzeichenumwandlung.

Das Phänomen der zunächst verschwindenden Doppelbrechung mit anschließendem Wiedererscheinen mit einem inversen Vorzeichen (linear positiv) ist bereits 1978 von Fischer und Emödy beschrieben worden. Ursache der verzögerten Phagozytose und der verspäteten Lyse scheint die zusätzliche Schutzbarriere der Kapsel zu sein.

Die Betrachtungen der Leukozyten zeigten eine sehr feine nur auf die Zelloberfläche begrenzte Anisotropie nach Anwendung der PB-KOH-ABT-Reaktion und der PB-KOH-Sialinsäure spezifischen Reaktion. Diese war jedoch erst nach einer Inkubationszeit von mindestens 2 Stunden erkennbar. Diese Ergebnisse zeigen, wie schon Fischer vermutete, dass im Prozess der Phagozytose es auf der Zelloberfläche der Leukozyten zu einer de-novo Synthese O-acyl-

## Diskussion

haltiger Radikale kommt.

Eine gesonderte Betrachtung der Ergebnisse verdient der *Klebsiellen* Subtyp UNTH-K2044. Dieses Bakterium zeichnet sich durch eine besonders hohe Virulenz aus. Ursache hierfür ist das Membranprotein magA, welches die Phagozytose der *Klebsiellen* verhindert. Aufgrund dieses Proteins kam es nicht zu einer Anlagerung der Bakterien an die Phagozyten und somit auch nicht zu einem Vorzeichenwechsel. Die *Klebsiellen* Typ NUTH-K2044 zeigten zu jedem Zeitpunkt der Untersuchungen ein linear negatives, radiär positives Vorzeichen. Diese Untersuchungen stützen die Theorie, dass der Prozess der Phagozytose zu einer Umorientierung der Kohlenhydrate und Sialinsäure auf der Zelloberfläche der Bakterien führt und darüber hinaus sich auch die Zelloberfläche der Phagozyten verändert. Zur weiteren Klärung der Unterschiede des *Klebsiellen* Subtyp NUTH K2044 sind weitere Untersuchungen mit erneuten Phagozytoseversuchen notwendig.

### ***4.10 Charge Transfer Reaktion***

Die ersten polarisationsoptisch adaptierten Charge-Transfer-Reaktionen (CT-R) wurden von Romhányi 1968 beschrieben, der den Reaktionsmechanismus analysierte. Definitionsgemäß werden bei einer CT-R Elektronen zwischen zwei Molekülen übertragen. Grundlagen dieser Arbeit sind die Untersuchungen der Zelloberfläche von verschiedenen Strukturen und Bakterien mit der CT-R (Romhányi 1975, 1978, Molnár et al., 1992). Mit der CT-R lassen sich polarisationsoptisch negative Ladungsträger auf der Zelloberfläche nachweisen. Die polarisationsoptische Adaption der CT-R stammt von Romhányi (1978) auf der Grundlage der von Lábos (1966) entdeckten Tatsache, dass Chlorpromazin mit Eosin einen Transfer Komplex ausbildet. Die Zelloberfläche der Bakterien und Pilze hat durch das Vorhandensein von Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen eine negative geladene Oberfläche. Um die räumliche Orientierung der negativen Ladungsträger darzustellen nutzt man nicht kationische Farbstoffe wie z.B. bei der ABT-Reaktion, sondern lässt mit Hilfe von Elektronendonatoren (hier z.B. Phenothiazine) zunächst eine elektrostatische Bindung entstehen, bei der die Elektronen der negativen Gruppe aus der Membran den Akzeptor anziehen und locker binden. An den

## Diskussion

Elektronendonator kann dann ein anionischer Farbstoff ebenfalls über elektrostatische Kräfte binden. Durch die elektrostatischen Bindungen, die immer auch weitere Anziehungs- und Abstoßungseffekte innerhalb der Membran nach sich ziehen, werden die Elektronendonatoren und damit auch die Farbstoffmoleküle der Orientierung der negativ geladenen Moleküle/Gruppen entsprechend an die Membran integriert.

Ein klassischer Elektronendonator ist das Methylenblau, welches der Struktur des Toluidinblau ähnlich ist. Methylenblau gilt auch als das erste Phenothiazin, dessen Wirkstoffgruppe zur CT-R für diese Arbeit genutzt wurde. Phenothiazine besitzen aufgrund ihrer Struktur eines elektronenreichen, dreigliedrigen Heterozyklus ein starkes Oxidationspotential. Dieser Heterozyklus baut sich wie folgt auf:

Das Zentrum bildet ein zentraler Schwefel- und Stickstoff-haltiger Ring mit zwei annilierten Benzolringen. Die positive Ladung liegt im Chlorpromazinmolekül in der Seitenkette.

An dieses Grundgerüst erfolgen die gruppenspezifischen Substitutionen:

Phenothiazine von Chlorpromazin-Typ (Promethazin (Prothazin=Atosil®), Chlorpromazin (Propaphenin®) (siehe Abb 4-6), Levomepromazin (Neurax®) haben am zentralen Stickstoffatom eine Kohlenwasserstoffkette, die ein weiteres Stickstoffatom enthält.

Phenothiazine vom Pecazin-Typ, Thioridazin (Melleril®) haben am zentralen Stickstoffatom eine Piperidinylalkyl-Seitenkette.

Phenothiazine vom Perphenazin-Typ (Decentan®), Fluphenazin (Lyogen®) haben am zentralen Stickstoffatom ein Piperazinylalkyl-Seitenkette.

Azaphenothazine wie Protipendyl (Dominal forte®) haben in einem der annilierten Benzolringe ein Stickstoffatom.

Thioxanthene wie Flupentixol (Fluanxol®) und Zuclopentixol (Ciatyl-Z®) haben im zentralen Ring nur Schwefel, aber keinen Stickstoff gebunden.

Bei der CT-R wird zunächst der Stickstoff reduziert. In ihrer ungebundenen Struktur besitzen die Phenothiazine innerhalb des Moleküls eine gewinkelte Struktur von 130-170°. Nach der CT-R hebt sich der Winkel auf und die Phenothiazine entwickeln eine plane Struktur, die eine polarisationsoptische Analyse zulässt.

## Diskussion

Eosin, Erythrosin und Bengalrosa B haben sich alle als geeignete, anionische (negative geladene) Farbstoffe für die CT-R erwiesen. Diese sind in 0,1 %igen Lösungen mit Aqua dest. oder 0,9%igen NaCl-Lösungen für die Reaktionen genutzt worden.

Die einfache Färbung der Pilze und Bakterien ohne eine vorangegangene CT-R mit einem

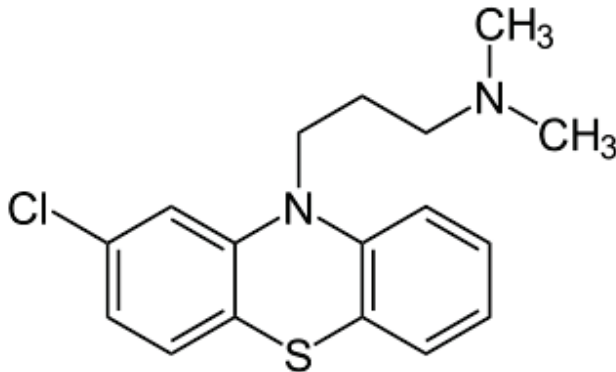


Abbildung 4-6: Strukturformel Chlorpromazin

Phenothiazin erbrachte immer ein negatives Ergebnis, was heißt, dass bei keinem der Präparate weder im ungefilterten noch im polarisierten Licht eine Färbung bzw. Doppelbrechung gesehen werden konnte. Ebenfalls auffällig war, dass keine Unterschiede im Reaktionsergebnis zwischen den üblicherweise mehrstündig mit Paraffin fixierten Präparaten und den für 30 sec in 4 %igem PBS-gepufferten Formalin bei pH 7,4 fixierten Präparaten gab.

Die Anwendung der CT-R an den Pilzen zeigte ausnahmslos an allen Präparaten eine 20-fach stärkere Intensität der Doppelbrechung, so dass es sich hier definitionsgemäß um eine additive topo-optische Reaktion handelt.

Zur Analyse der an der CT-R teilnehmenden Strukturen sind weitere Vorbehandlung vor der CT-R durchgeführt worden. Eine 30 minütige Vorbehandlung mit 1 %iger Periodsäure führte zu einer absoluten Auslöschung der Doppelbrechung nach Anwendung der CT-R. Auch eine vorangegangene Methylierungsreaktion mit Salzsäure und Methanol für 6-24 h erbrachte eine deutliche Reduktion und in den meisten Fällen sogar eine Auslöschung der Doppelbrechung im polarisierten Licht.

Zur weiteren Untersuchung der CT-R haben wir für die Pilze zusätzliche Elektronendonatoren untersucht. Dies waren 1 %ige wässrige Lösungen von Imipramin und Teperin. In ihrer Struktur

## Diskussion

ähneln diese Moleküle in ihrer chemischen Struktur den Phenothiazinen. Die Ergebnisse entsprachen denen, die wir mit den Phenothiazinen erhielten.

### ***4.10.1 Interpretation der Ergebnisse der Charge Transfer Reaktion***

Romhányi vermutete zunächst, dass eine Anwendung von Chlorpromazin nach einer Färbung mit Eosin an doppelbrechenden Strukturen einen Präzipitationseffekt haben würde, wie man es von der Präzipitation durch das Kaliumjodid-Kaliumferricyanid Gemisch bei der Toluidinblaufärbung und der ABT-Reaktion kannte. Eine Doppelbrechung stellte er jedoch nur fest, wenn er das vermutete „Präzipitat“ Chlorpromazin vor der Färbung mit Eosin anwendete. Da Chlorpromazin selbst eine positive Ladung besitzt, kann es folglich nur an negativ geladene Strukturen binden. Romhányi führte seine Untersuchungen 1968 an Erythrozyten durch, die nach der CT-R ein linear positives Vorzeichen hatten. Ebenso haben Erythrozyten nach der einfachen Färbung mit Eosin ein linear positives Vorzeichen. Es ist also davon auszugehen, dass die Chlorpromazinmoleküle ebenso wie die Eosinmoleküle membranparallel (mit ihrem größeren Brechungsindex) orientiert gebunden sind. Romhányi führte weitere Untersuchungen mit der CT-R durch. Unter anderem untersuchte er aus Lecithin und Wasser ausgebildete sogenannte elementare Membranen (Myelinfiguren). Lecithin und Wasser bilden eine Membran aus, die nur aus Wasser und Lipiden besteht. Im polarisierten Licht sieht man an dieser Membran ein linear negatives, radiär positives Vorzeichen. Nach der Reaktion mit Chlorpromazin registrierte Romhányi ein linear positives Vorzeichen (radiär negativer Sphärit), welches membranparallel gebundenen Chlorpromazinmolekülen entspricht.

Die Myelinscheiden der humanen Nervenfasern zeigen ein anderes Phänomen. Sie zeigen nativ eine auffallende Anisotropie durch die Lipoproteinmembran. Nach der CT-R verschwindet der anisotrope Effekt mit der Zeit dadurch, dass die Chlorpromazin Moleküle membranparallel orientiert liegen. Die Pi-Granula der Neurilemma, die sich unter der Zelloberfläche befinden, entwickeln zeitgleich eine Anisotropie. Dieser Effekt ist dadurch begründet, dass sich die Chlorpromazinmoleküle in die Zellmembran einlagern (interkalieren) und dadurch zu einer Umorientierung der Proteine und Lipide und somit zu einem Verlust der Orientierung führen. An die Pi-Granula hingegen lagert sich das Chlorpromazin orientiert an, so dass hier eine

## Diskussion

Doppelbrechung sichtbar wird. Dieser Effekt ist aufgrund des Bindungsprinzips der CT-R auswaschbar. Nach Spülen mit Aqua dest stellt sich die Doppelbrechung der Myelinscheide wieder dar. Ein weiteres Beispiel eines strukturellen Syntropismus von Chlorpromazin sah Romhányi ähnlich dem der Myelinfiguren an der Lipidmembran der äußeren Stäbchen der Retina: frische, unfixierte Präparate der Retina zeigten eine Isotropie der Stäbchen, die daraus resultiert, dass die Eigendoppelbrechung der Membranlipide durch die Formdoppelbrechung der Diskusmembranproteine (linear negatives Vorzeichen) kompensiert wird. Nach einer Behandlung mit Chlorpromazin zeigen die Retinastäbchen in Bezug auf die Länge ein linear negatives Vorzeichen. Die Chlorpromazinmoleküle liegen also senkrecht orientiert in der Lipidschicht (wie bei Myelinfiguren) (Romhányi 1975, 1978).

Wir haben bei unseren Versuchen an allen Pilzen und Bakterien mit der CT-R (Phenothiazinvorbehandlung sowie Färbung) ein positives Reaktionsergebnis mit linear positivem Vorzeichen in Bezug auf die Länge erhalten. Nach der Charge Transfer Reaktion konnte die Farbstoffbindung (Phenothiazin-Farbstoff-Komplex) durch waschen mit Aqua dest wieder entfernt werden. Nach dem Auswaschen konnte auch ein doppelbrechender Effekt im polarisierten Licht nicht mehr gesehen werden. Nach erneuter Anwendung der CT-R war die Doppelbrechung mit linear positivem Vorzeichen reproduzierbar. Übereinstimmend mit Romhányi (1978) sind wir der Meinung, dass die CT-R eine reversible Reaktion und keine Folge einer Strukturdestruktion ist.

Zur weiteren Analyse der negativen Ladungen, die an der CT-R teilnehmen, haben wir mit einigen vorangestellten Reaktionen versucht diese zu identifizieren. Unsere Vermutung war, dass die OH-Gruppen den wesentlichen Anteil an der negativen Ladung einer Membran haben. Zum einen haben wir zum Beweis hierfür vor der CT-R eine 30 minütige Behandlung mit 1 %iger Periodsäure durchgeführt. Aus der ABT-Reaktion ist seit langem bekannt, dass 1 %ige Periodsäure dazu führt, dass benachbarte OH-Gruppen zu Aldehyden reduziert werden. Nach der Vorbehandlung mit Periodsäure konnte mit der CT-R keine Anisotropie mehr gesehen werden. Eine weitere Reaktion, die die Hypothese, dass die OH-Gruppen die an der CT-R teilnehmenden Gruppen sind, ist eine Methylierung. Eine mindestens 6-stündige Behandlung der Präparate mit einer Lösung aus Methanol und konzentrierter Salzsäure (im Verhältnis 99:1) führt zu einer

## Diskussion

Methylierung und somit Blockierung der OH-Gruppen der sauren Gruppen im Molekül (Molnár et al 1992, Gährs et al 2007). Die Ergebnisse der Untersuchungen an *B. cereus* stimmen mit denen von Molnár et al. 1992 durchgeführten Untersuchungen überein.

Die Zellwand der Bakterien wird neben der Lipidschicht von einem Netz aus Polysacchariden gebildet. Hierbei ist das führende Glukosederivat das N-Acetylglukosamin. Dieses bildet in vernetzter Form als Chitin auch das Grundgerüst der Zellwand der Pilze.

Aufgrund der OH-Gruppen sind die Glukosederivate stark in elektromechanische Wechselwirkungen eingebunden. Die gleichmäßige Verteilung des anisotropen Effektes an der Zelloberfläche lässt darauf schließen, dass die Polysaccharide auf der Zelloberfläche gleichmäßig verteilt sind. Weiterhin für diese Theorie spricht, dass die Polysaccharide in der Zellmembran zur Aufrechterhaltung ihrer mechanischen Festigkeit und zum Schutz dienen. Diese Funktionen werden vor allem dadurch gesichert, dass die Polysaccharide stark systematisch vernetzt sind. Diese Vernetzung führt dazu, dass die Polysaccharide in einer bestimmten Weise angeordnet sein müssen. Aufgrund vorangegangener polarisationsoptischer Untersuchungen hat sich gezeigt, dass die Polysaccharidketten parallel oder senkrecht zur Membran angeordnet sind. An die fest orientierten Peptidoglykane lagern sich die Chlorpromazinmoleküle und hieran die Farbstoffmoleküle orientiert an.

Die Vorbehandlung mit Periodsäure und die Methylierung führen zu einer Blockierung der OH-Gruppen. Die Folge ist, dass die orientierten OH-Gruppen der Peptidoglykane nicht mehr für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen, die Doppelbrechung also nicht mehr vorhanden ist und polarisationsoptisch eine Isotropie erscheint. Lichtoptisch ist noch immer eine Eosinophilie zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass eine nicht orientierte Farbstoffbindung vorliegt. Bei einigen Erregern war auch nach einer Vorbehandlung eine schwache Doppelbrechung sichtbar. Da die OH-Gruppen der Peptidoglykane, die das Gerüst der Zellwand bilden, bereits blockiert sind, ist davon auszugehen, dass bei diesen Bakterien und Pilzen weitere negative Ladungsträger vorliegen, die orientiert an die Zelloberfläche gebunden sind. Sie scheinen aber prozentual nur einen geringen Anteil auszumachen. Die Farbstoffmoleküle sind weiterhin membranparallel orientiert ausgerichtet.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Arbeiten zeigten den Wert der verschiedenen topo-optischen Reaktionen und deren Einsatzmöglichkeit in der submikroskopischen Strukturforschung. Auch wenn diese Reaktionen nicht zum Spektrum der Routinediagnostik gehören und die großen Entdeckung hiermit schon einige Jahre zurückliegen, konnten wir mit dieser Arbeit doch zeigen, dass die strukturelle Analyse auf submikroskopischer Ebene mit den modernen Verfahren wie Elektronenmikroskopie oder Immunhistochemie konkurrieren bzw. diese ergänzen kann. Umso mehr muss die Polarisationsmikroskopie als eine sinnvolle Ergänzung zur Strukturanalyse gesehen werden. Besondere Beachtung muss hier der Fähigkeit der Polarisationsmikroskopie mit ihren topo-optischen Reaktionen gewidmet werden, dass sie nicht nur in der Lage ist die Moleküldichte darzustellen, sondern auch die Orientierung der Moleküle analysiert werden kann. Es ergibt sich mit der Polarisationsmikroskopie die Möglichkeit, die räumliche Lage der Zuckermoleküle, der linear orientierten OH-Gruppen, Sialinsäuren und auch der GAG-Komponenten auf molekularer Ebene zu bestimmen.

Die von uns durchgeführten Untersuchungen widmeten sich speziell der Suche nach linear orientierten OH-Gruppen auf der Zelloberfläche verschiedener Bakterien und Pilze.

Die topo-optischen Reaktionen mit den Pilzen *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. neoformans* und *S. cerevisiae* brachten uns folgende Erkenntnisse:

Die *Candida spp.* besitzen auf ihrer Zelloberfläche linear orientierte Kohlenhydrate und Sialinsäure, was an der polarisationsoptischen Doppelbrechung zu sehen ist. Der Farbstoff lagert sich orientiert an die OH-Gruppen an, so dass auch diese hochorientiert auf der Zelloberfläche gebunden sind. Weiterhin lassen sich mit den topo-optischen Reaktionen Unterschiede zwischen den einzelnen Pilzen hinsichtlich der Orientierung der OH-Gruppen zeigen. Nicht nur zwischen den Pilzen *Cryptokokkus*, *Saccharomyces* und *Candida* zeigen sich diese Unterschiede, sondern auch innerhalb einer Spezies können Unterschiede gesehen werden. Wir haben dies am Beispiel der *Candida spp.* nachweisen können. Mit der alkalischen und sauren Hydrolyse und der Sialinsäureextraktion gelang es uns nicht nur die Spezifität unserer Reaktionen zu bestätigen, sondern auch in der Zellwand der Pilze ein Doppelschichtsystem der Kohlenhydrate und

## Zusammenfassung

Sialinsäure nachzuweisen. So zeigt sich bei den Pilzen, dass es zwei Schichten von linear orientierten OH-Gruppen gibt, die in ihrer Orientierung senkrecht zueinander ausgerichtet sind. Besonders schön darzustellen war auch *C. neoformans* mit seiner Kapsel. Hier konnte mit den topo-optischen Reaktionen die gegensätzliche Orientierung der Strukturen der Kapsel und der Zellwand herausgearbeitet werden. Weiterhin gelang es uns mit der CIBR uronsäurehaltige, größtenteils sulfatierte Glykosaminoglykane bzw. Proteoglykane auf der Zelloberfläche der Pilze nachzuweisen. Auch diese sind in einem bestimmten Zustand orientiert gebunden. Weitere Analysen der Glykosaminoglykane zeigten, dass es sich bei diesen vorrangig um Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Keratansulfat handelt.

Bei den Bakterien *H. pylori*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* konnten wir folgende Ergebnisse erzielen:

Die übliche Teilung der Bakterien in Gram-positive und Gram-negative kann mit der Polarisationsmikroskopie nicht dargestellt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Bakterienwand und die Orientierung der OH-Gruppen unabhängig voneinander sind. Wir konnten in allen Bakterien linear orientierte OH-Gruppen und Sialinsäure nachweisen. Auch konnten wir O-acyl und 9O-acyl-Sialinsäure auf der Zelloberfläche der Bakterien nachweisen. Hierbei zeigte sich, dass bei *H. pylori* sowohl die Zuckerketten wie auch die Sialinsäure und ihre Derivate immer linear negativ gebunden sind. Anders ist es bei den *Listerien* und *B. cereus*. Hier zeigen sich jeweils entgegengesetzte Orientierungen der unsubstituierten Zuckerketten und Sialinsäure und den o-acylierten Derivaten, wobei die o-acylierten Moleküle linear negativ gebunden sind, während die originäre Orientierung linear positiv ist.

Die Untersuchungen des Prozess der Phagozytose zeigten:

In Abhängigkeit von der Oberfläche können sich *Klebsiellen* gegen eine Phagozytose schützen. So konnten *Klebsiellen* mit dem aggressiven Kapselprotein magA nicht an die Phagozyten anlagern, während *Klebsiellen* ohne Kapsel schon nach kurzer Inkubationszeit phagozytiert wurden. Weiterhin zeigten unsere Versuche, dass die Phagozytose zu einer Umorientierung der linear orientierten Kohlenhydrate auf der Zelloberfläche führte. Auch die Phagozyten (Makophagen, Leukozyten) verändern ihre Zelloberfläche. In diesen Zellen findet während des Prozesses der Phagozytose eine intrazelluläre „de novo“ Synthese von 9O-acyl Sialinsäure statt,

## Zusammenfassung

die anschließend auf der Zelloberfläche angelagert wird.

Die Charge-Transfer Reaktion bestätigte uns unsere Erkenntnisse darüber, dass:

Auf allen Pilzen und Bakterien an der Oberfläche negative Ladungsträger vorhanden sind. Auch konnte gezeigt werden, dass diese im orientierten Zustand und somit linear orientiert auf der Zelloberfläche gebunden sind. Dafür spricht der Doppelbrechungseffekt. Auch konnten wir zeigen, dass ein wesentlicher Teil der negativen Ladungsträger OH-Gruppen sind, indem wir mit einer Methylierung die OH-Gruppen blockiert haben, so dass diese der Charge Transfer Reaktion nicht mehr zur Verfügung standen. Auch eine Periodsäure Reaktion, die die OH-Gruppen in Aldehyde umwandelt, führte dazu, dass die Ergebnisse der Charge Transfer Reaktion negativ ausfielen.

Insgesamt sind topo-optische Reaktionen eine kostengünstige, schnelle und sichere Methode eine submikroskopische Strukturanalyse durchzuführen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse können in Zusammenschau mit immunhistochemischen Verfahren sicher zu einer weiteren Aufklärung der immunologischen Prozesse, einer Infektion und Phagozytose beitragen.

## 6 LITERATUR

- Alvarez D, Merino S, Tomas JM, Benedi VJ, Alberti S (2000): Capsular polysacchride is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect Immun*, 68:953-5.
- Arakawa Y, Ohta M, Wacharotayankun R, Mori M, Kido N, Ito H, Komatsu T, Sugiyama T, Kato N (1991): Biosynthesis of *Klebsiella* K2 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* HB101 requires the functions of rmpA and the chromosomal cps gene cluster of the virulent strain *Klebsiella pneumoniae* Chedid (O1:K2). *Infect Immun*, 59:2043-50.
- Bagley ST, Seidler RJ, Talbot HW Jr, Morrow JE (1978): Isolation of *Klebsiella* from within living wood. *Appl Environ Microbiol*. 36:178-85.
- Blacklow RS, Warren LJ (1962): Biosynthesis of sialic acids by *Neisseria meningitidis*. *Biol Chem*. 237:3520-6.
- Borén T, Normark S, Falk P (1994): *Helicobacter pylori*: molecular basis for host recognition and bacterial adherence. *Trends Microbiol* 2:221-228.
- Bose I, Reese AJ, Ory JJ, Janbon G (2003): A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2 (4):655-63
- Chi-Tai F, Yi-Ping C, Chia-Tung S, Shan-Chwen C, Jin-Town W (2004): A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. *JEM* 199(5):697-705
- Colli W (1993):. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J* 7(13): 1257-64
- Cryz SJ Jr, Furer F, Germanier R (1984): Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide. *Infect Immun* 43:440-1.
- Culling CF, Reid PE, Dunn WL (1971): The effect of the saponification upon certain histochemical reactions of the epithelial mucins of the gastrointestinal tract. *J Histochem Cytochem* 19 (11):654-62
- Culling CF, Reid PE, Clay MG, Dunn WL (1974): The histochemical demonstration of O-acetylated sialic acid in gastrointestinal mucins. Their association with the potassium hydroxide-periodic acid-Schiff effect. *J Histochem Cytochem* 22 (8):826-31
- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ (1997): *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 10:720-741.

## Literatur

- Egrie JC, Browne JK (2001): Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). Br J Cancer 84(Suppl 1): 3-10
- Ernst PB, Gold BD (2000): The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. Annu Rev Microbiol 54:615-640.
- Felson B, Rosenberg LS, Hamburger MJ (1949): Roetgen findings in acute Friedländer's pneumoniae. Radiology. 53:559-65.
- Feuerstein H, Geyer G (1978): Eine Modifikation der Sialinsäure-Bestimmung am Erythrozyten. Folia Haematol, 105(5):679-83
- Fischer J (1976): Demonstration of microorganism in tissues by the ABT and KOH-ABT topo-optical reactions. Acta Morphol Acad Sci Hung 24 (3):203-14
- Fischer J (1977): Optical polarization reveals different ultrastructural molecular arrangement of polysaccharides in the yeast cell walls. Acta Biol Acad Sci Hung 28:49-58.
- Fischer J (1978): *Poliadehiddé alakitható makromolekulók orientációjának polarizációs optikai elemzése komplex biológiai strukturákban. (Die Orientierung der in Polyaldehyde umwandelbaren Makromoleküle und deren polarisationsoptische Analyse in komplexen biologischen Strukturen)*. PhD thesis, Pécs
- Fischer J, Emödy L (1976):Molecular order of carbohydrate components in cell walls of bacteria, fungi and alge according to the topo-optical reactions of vicinal OH groups. Act Microbiol Acad Sci Hung 23:87-108.
- Fischer J, Emödy L (1978): *Bakteriális sejtfal és mambrán polysaccharidok ultrasrtuktúrája és változásai a fagocitózis során (Ultrastructure of the bacterial cell wall and mambrane polysaccharides and their changes during phagocytosis)*. MTA Biol Oszt Közl 21:465-73.
- Frey-Wyssling A (1938): Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Gebr. Bornträger. Berlin.
- Gamian A, Kenne L (1993): Analysis of 7-substitued sialic acid in some Enterobacterial lipopolysaccharides. J bact. 175:1508-13.
- Gähns W, Makovitzky J (2007): Polarisationsoptischer Nachweis bei Pilzen und Bakterien. Biospektrum 13:646-8.
- Geyer G, Scheibner C (1970): Untersuchungen über die alkalische Hydrolyse von Nucleinsäuren im Gewebeschnitt. IV. Abbaueffekte von Kohlenhydratverbindungen nach verstärkter

## Literatur

- Hydrolyse. Zugleich ein Beitrag zur Histochemie der Glykokalix. Acta Histochem, 37:148-53.
- Geyer G, Scheibner C (1970): Untersuchungen über die alkalische Hydrolyse von Nukleinsäuren im Gewebeschnitt. Acta Histochem, 35(2):269-76.
- Ghaderi D (2006): Das Schlüsselenzym der N-Acetylneuraminsäurebiosynthese, UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase: Expression und strukturelle Charakterisierung. Dissertation Berlin.
- Hebenstreit D, Keller G (1968): Untersuchungen über den Einfluss komplexer Cyanide sowie ein- und mehrwertiger Anionen auf die Metachromasie von sauren Mukopolysacchariden und Toluidinblau. Dissertation. Erfurt
- Hirst GK (1941): Agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus Science. 94: 22-23
- Hirst GK (1942): Adsorption of influenza virus hemagglutinins and virus by red blood cells J Exp Med, 76: 195-209 aus Kelm, S. et al. (1997), Sialic acids in molecular and cellular interactions. Intern Review Cyto, 175: 137-240
- Hof H, Müller RL, Dörries R (2000): Mikrobiologie. MLP Duale Reihe. Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Jones L, Hobden C, O'Shea P (1995): Use of a real-time fluorescent probe to study the electrostatic properties of the cell surface of *Candida albicans*. Mycol Res 99:969-76
- Kelly RF, Severn WB, Richards JC, Perry MB, MacLean LL, Tomas JM, Merrino S, Whitfield C (1993): Structural variation in the O-specific polysaccharides of *Klebsiella pneumoniae* serotyp O1 and O8 lipopolysaccharide. Mol Microbiol 10:615-25.
- Kelm S, Schauer R, Manuguerra JC, Gross HJ, Crocker, PR (1994): Modifications of cell surface sialic acids modulate cell adhesion mediated by sialoadhesin and CD22 Glycoconj J, 11: 576-585
- Klenk E, Lauenstein K (1952): : The Carbohydrate Groups of the Submaxillar Mucin and Uromucoproteins. Isolation of Neuramic Acid as Metabolite. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 291(3):147-52
- Klessen C (1977): Specificity and Control Reactions on Carbohydrate Histochemistry. Acta Histochem Suppl 18:45-58
- Klessen C (1978): Cytochemical Studies of Neutrophil Granulocytes Using the Iron Binding Reaction. Verh Anat Ges 72:513-4

## Literatur

- Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G (2001): Medizinischer Mikrobiologie. Vol 8. Urban und Fischer
- Kuhn R, Brossmer R (1962): Die Konfiguration der Sialinsäuren. Angew Chem 74:252-3
- Lábos E (1966): Evidence of complex formation between chlorpromazine and different xanthene dyes. Nature 209:201-2
- Land WG (2004): Immunsuppressive Therapie. Grundlagen und Prinzipien der Alloimmunität und ihrer Suppression, Band 1. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York
- Leoff C et al. (2008): Cell Wall Carbohydrate Compositions of Strains from the Bacillus cereus Group of Species Correlate with Phylogenetic Relatedness. J Bacteriol 190 (1):112-21.
- Lorini PV (2004): Biochemical-Engineering von HL-60-Zellen: Integrin-Expression und Integrin-vermittelte Adhäsion. Dissertation Berlin
- Madigan MT, Martinko JM (2006): Brock Mikrobiologie. Pearson Studium
- Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Ångström J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadström T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarström L, Borén T (2002): *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. Science 297:573-578.
- Makovitzky J (1980): Ein topo-optischer Nachweis von C8-C9-unsubstituierten Neuraminsäureestern in der Glykokalix von Erythrocyten. Acta histochem 66 (2):192-6
- Makovitzky J (1981): Conversion of Thiazine Dyes in Submicroscopic Structural Determinations. Acta Histochem Suppl 24:207-20
- Makovitzky J (1984): Polarization optical analysis of blood cell membranes. Progr Histo Cytochem, 15:1-100.
- Makovitzky J (2003): Polarisationsmikroskopie in der submikroskopischen Strukturforschung: Geschichte und Theorie. BIOSpektrum 9 (4):375-6
- Malanin GI (1970): Metachromatic staining of sodium bisulfite addition derivatives of glycogen. J Histochem Cytochem 18 (11):834-41
- Matsen JM, Spindler JA, Blosser RO (1974): Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. Appl Microbiol 28:672-8.

## Literatur

- Marshall, B. J. und Warren, J. R. (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1(8390): 1311-5
- Masuoka, J (2004): Surface Glycanes of *Candida albicans* and other Pathogenic Fungi: Physiological Roles, Clinical Uses, and Experimental Challenges. *Clin Microbiol Reviews* 17(2): 281-310
- McClelland L, Hare R (1941): The adsorption of influenza virus by red cells and a new *in vitro* method of measuring antibodies for influenza virus in the embryonated egg. *Can J Public Health*, 32: 530-8
- McManus (1946): Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature* 158:202
- Miller-Podraza H, Bergstrom J, Milh MA, Karlsson KA (1997): Recognition of glycoconjugates by *Helicobacter pylori*. Comparison of two sialic acid-dependent specificities based on haemagglutination and binding to human erythrocyte glycoconjugates. *Glycoconj J* 14(4): 467-71.
- Ming-Fang W, Chih-Ya Y, Tzu-Lung L, Jin-Town W, Feng-Ling Y, Shih-Hsiung W, Bor-Shen H, Teh-Ying C, Ming-Daw T, Chi-Hung L, Shie-Liang H (2009): Humoral Immunity against Capsule Polysaccharide Protects the Host from *magA*<sup>+</sup> *Klebsiella pneumoniae*-Induced Lethal Disease by Evading Toll-Like Receptor 4 Signaling. *Infect Immun* 77(2):615-21
- Mizuta K, Ohta M, Mori M, Hasegawa T, Nakashima I, Kato N (1983): Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsule (K) types. *Infect Immun* 40:56-61.
- Módis L (1974): Topo-optical investigations of mucopolysaccharides (acid glycosaminoglycans). In *Handbuch der Histochemie*, Volume II. Gustav Fischer Verlag
- Módis L (1991): Organization of the extracellular matrix: a polarization microscopic approach. CRC Press
- Molnár J, Fischer J, Nakamura MJ (1992): Mechanism of chlorpromazine binding by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 62:309-14.
- Montecucco C, Rappuoli R (2001): Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:457-466.
- Odenbreit S (2005): Adherence properties of *Helicobacter pylori* : impact on pathogenesis and adaptation to the host. *Int J Med Microbiol* 295:317-324.

## Literatur

- Ofek I, Kabha K, Athamna A, Frankel G, Wozniak DJ, Hasty DL, Ohman DE (1993): Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a. *Infect Immun* 61:4208-16.
- Ørskov I, Ørskov F (1984): Serotyping of *Klebsiella*. *Methods Microbiol* 14:143-64.
- Ota H, Nakayama J, Momose M, Hayama M, Akamatsu T, Katsuyama T, Graham DY, Genta RM (1998): *Helicobacter pylori* infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. *Virchows Arch* 433:419-426.
- Pilatte Y, Bignon J, Lambre CR (1993): Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology* 3(3): 201-18
- Podschun R, Penner I, Ullmann U (1992): Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. *Microbiol Pathol* 13:371-9.
- Quintarelli G, Tsuiki s, Hashimoto Y, Pigman W (1960): Histochemical studies of bovine salivary gland mucines. *Biochem Biophys Res Commun* 2:423-33.
- Reid PE, Culling CFA, Dunn WL (1973): Saponification-induced increase in the periodic acid-Schiff reaction in the gastrointestinal tract. Mechanism and distribution of the reactive substance. *J Histochem Cytochem* 21 (5):473-82
- Reid PE; Culling CFA, Dunn WL (1978): A histochemical method for the identification of 9-O-acetyl sialic acids and investigation of bovine submaxillary gland and intestinal mucins. *J Histochem Cytochem* 26:187-92
- Reid PE, Culling CFA, Dunn WL, Clay MG (1976): The use of a transesterification technique to distinguish between certain neuraminidase resistant epithelial mucins. *Histochem* 46:203-7.
- Remmele W, Bettendorf U (1996): Pathologie. Springer Verlag. Berlin. Vol 2, Band 2:192.
- Richards RL, Moss J, Alving CR, Fishman PH, Brady RO (1979): Cholera toxin: a bacterial lectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(4): 1673-6.
- Richter S (2005): Amyloidose des Respirationstraktes. Eine polarisationsoptisch - histochemische Untersuchung mit klinischem Bezug. Diss. Universität Rostock. Germany
- Roberts GP (1977): Histochemical detection of sialic acid residues using periodate oxidation. *Histochem J* 9(1):97-102
- Rodrigues ML, Rozental S, Cocciro JNSS, Angluster J, Alviano CS, Travassos LR (1997): Identification of N-acetylneuraminic acid and its 9-O-acetylated derivatives on the cell surface

## Literatur

- of *Cryptococcus neoformans*: Influence on fungal phagocytosis. Infect Immun 65:4937-42
- Rodrigues ML, Dobroff ASS, Couceiro JN, Alviano CS, Alviano CS, Schauer R, Travassos LR (2003): Sialoglycoconjugates and sialyltransferase activity in the fungus *Cryptococcus neoformans* Glyconjugate J 19:165-73
- Romhányi G (1963): Über die submikroskopische Grundlage der metachromatischen Reaktion. Acta Histochem 15:201-33
- Romhányi G (1978): Ultrastructure of biomembranes as shown by topo-optical reactions. Acta biol Acad Sci hung 29 (4):311-65
- Romhányi G (1988): *Topooptikai reakciók és szerepük a biológiai ultrastruktúra kutatásokban (The topo-optical reactions and their roles in biological ultrastructural research)*. In: Tolnai M, editor (Hungarian). Lecture at the Hungarian Academy of Science (25<sup>th</sup> March 1983) Akadémiai Kiadó. Budapest.
- Romhányi G, Molnár L (1974): Optical polarisation indicates linear arrangement of rhodopsin oligosaccharide chain in rod disk membranes of frog retina. Nature 249 (456):486-8
- Romhányi G, Deák G, Fischer J (1975): Aldehyde bisulfite-toluidine blue (ABT) staining as a topo-optical reaction for demonstration of linear order of vicinal OH groups in biological structures. Histochemistry 43 (4):333-48
- Ronald A (2003): The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. Dis Mon 49:71-82.
- Rosenthal S, Tager IB (1975): Prevalence of gram-negative rods in the normal pharyngeal flora. Ann Intern Med 83:355-7.
- Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP (1991): Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Am J Med 91:72S-5S.
- Schauer R (1973): Chemistry and biology of the acylneuraminic acid. Angew Chem Int Ed Engl, 12(2):127-38
- Schauer R (1985): Sialic acids and their role as biological masks. Trends Biochem Sci 10: 357-60
- Schauer R (1988): Sialic acid as antigen determinants of complex carbohydrates. Adv Exp Med Biol 228:47-72.
- Schengrund CL, DasGupta BR, Ringler NJ (1991): Binding of botulinum and tetanus neurotoxins to ganglioside GT1b and derivatives thereof. J Neurochem 57(3): 1024-32

## Literatur

- Scheuner G, Hutschenreiter J (1972): Polarisationsmikroskopie in der Histophysik. Georg Thieme Verlag Leipzig
- Scheuner G, Hutschenreiter J (1975): Das Auftreten von Metachromasie, Doppelbrechung und Dichroismus durch die Toluidinblaureaktion. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (ISBN 3-437-10401-2) und Progr Histochem Cytochem 7 (2):1-73
- Schlepper-Schäfer J, Kolb-Bachofen V, Kolb H (1980): Analysis of lectin-dependent recognition of desialylated erythrocytes by Kupffer cells. Biochem J 186(3): 827-31
- Schmidt WJ (1937): Die Doppelbrechung von Krayoplasma, Cytoplasma und Metaplasma. Gebr. Bornträger. Berlin.
- Scott JE, Dorling J (1965): Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions. Histochemie 5 (3):221-33
- Scott JE, Dorling J (1969): Periodate oxidation of acid polysaccharides. A PAS method for chondroitin sulphates and other glycosamino-glycuronans. Histochem 19 (4):295-301
- Scott JE, Harbinson RJ (1969): Periodate oxidation of acid polysaccharides. Rates of oxidation of uronic acids in polyuronides and acid mucopolysaccharides. Histochem, 19(2):155–61.
- Spencer JFT, Spencer DM (1997): Yeasts in natural and artificial habitats. Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Spicer SS, Lillie RD (1959): Saponification as a means of selectively reversing the methylation blockade of tissue basophilia. J Histochem Cytochem 7(2):123-5
- Sylvén (1954): Metachromatic dye-substrate interactions. Q J Microsc Sci, 95(3):327–58.
- Szentgyörgyi A 1960): Introduction to submolecular biology. Academic Press. New York, London.
- Tietz H-J, Nenoff P, Ullmann AJ (2005): Organmykosen auf einen Blick: Diagnostik und Therapie lebensbedrohlicher Pilzinfektionen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Tomlinson S, Pontes de Carvalho LC, Vandekerckhove F, Nussenzweig V (1994): Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. J Immunol 153(7): 3141-7
- Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergström J, Borén T, Danielsson D, Teneberg S (2005): The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. J Biol Chem 280:15390-15397.

## Literatur

- Varki A (1993): Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiol* 3 (2):97-130
- Warren, J. R. und Marshall, B. J. (1983): Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet* 1, Seite 1273-1275.
- Wasley LC, Timony G, Murtha P, Stoudemire J, Dorner AJ, Caro J, Krieger M, Kaufman RJ (1991): The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin. *Blood* 77(12):2624-32
- Weber P, Harrison FW, Hof L (1975): The histochemical application of dansylhydrazine as a fluorescent labeling reagent for sialic acid in cellular glycoconjugates. *Histochemistry* 45(4):271-7
- Wessels MR, Rubens CE, Benedi VJ, Kasper DL (1989): Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. *Proc Nat Acad Sci USA* 86:8983-7.
- Whitfield C, Richards JC, Perry MB, Clarke BR, MacLean LL (1991): Expression of two structurally distinct D-galactan O antigens in the lipopolysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* serotyp O1. *J Bacteriol* 173:1420-31.
- Yuyama Y, Yoshimatsu K, Ono E, Saito M, Naiki M (1993): Postnatal change of pig intestinal ganglioside bound by *Escherichia coli* with K99 fimbriae. *J Biochem (Tokyo)* 113(4):488-92

## 7 ABKÜRZUNGEN

mPAS	Milde Periodsäure Schiff Reaktion
Å	Armström
ABT	Aldehyd-Bisulfit-Toluidin
PB	Periodsäure Borohydrid
KOH	Kaliumhydroxid
bzw	beziehungsweise
m	Meter
nm	Nanometer
1,9 Dmmb	1,9-Dimethyl Methylenblau
z.B.	Zum Beispiel
<i>spp</i>	Plural von species
g	Gramm
ml	Mililiter
OH-Gruppen	Hydroxylgruppen
C	Kohlenstoffatom
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. kruzei</i>	<i>Candida kruzei</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptokokkus neoformans</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L. ivanovii</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>

### Abkürzungen

K. pneumoniae	Klebsiella pneumoniae
NaBH <sub>4</sub>	Natriumborohydrid
GXM	Glukuronoxylomannan
GalXM	Galaktoxylomannan
TLR	Toll-like receptor
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
TNF	Tumornekrosefaktor
TGF	Tissue growth factor
Siglecs	sialic acid binding immunoglobulin like lectins
NaCl	Natriumchlorid

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Polarisation des Lichts im Polarisationsmikroskop.....	4
Abbildung 1-2: Polarisationsmikroskop mit anisotropem Objekt.....	4
Abbildung 1-3: <i>C. albicans</i> Sialinsäure spezifischen Reaktion zirkular polarisiertes Licht x400....	7
Abbildung 1-4: <i>C. albicans</i> Sialinsäure spezifische Reaktion linear polarisiertes Licht x400.....	7
Abbildung 3-1: <i>S. cerevisiae</i> PB-KOH-ABT-Reaktion lichtoptisch x100.....	23
Abbildung 3-2: <i>S. cerevisiae</i> PB-KOH-ABT-Reaktion polarisationsoptisch x100.....	23
Abbildung 3-3: <i>S. cerevisiae</i> KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x100.....	25
Abbildung 3-4: <i>S. cerevisiae</i> KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x100..	25
Abbildung 3-5: <i>S. cerevisiae</i> Sialinsäureextraktion 120 min lichtoptisch x40.....	26
Abbildung 3-6: <i>S. cerevisiae</i> Sialinsäureextraktion 120 min polarisationsoptisch x40.....	26
Abbildung 3-7: <i>S. cerevisiae</i> CEC MgCl <sub>2</sub> [0,5mol/l] lichtoptisch x40.....	27
Abbildung 3-8: <i>S. cerevisiae</i> CEC MgCl <sub>2</sub> [0,5mol/l] polarisationsoptisch x40.....	27
Abbildung 3-9: <i>S. cerevisiae</i> CEC MgCl <sub>2</sub> [1,0mol/l] lichtoptische x40.....	28
Abbildung 3-10: <i>S. cerevisiae</i> CEC MgCl <sub>2</sub> [1,0mol/l] polarisationsoptisch x40.....	28
Abbildung 3-11: <i>C. albicans</i> ABD-Reaktion polarisationsoptisch x20.....	29
Abbildung 3-12: <i>C. albicans</i> Silainsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x40.....	30
Abbildung 3-13: <i>C. albicans</i> saure Hydrolyse+Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x40 .....	31
Abbildung 3-14: <i>C. albicans</i> saure Hydrolyse+Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x40.....	31
Abbildung 3-15: <i>C. neoformans</i> CEC MgCl <sub>2</sub> [0,1mol/l] polarisationsoptisch x400.....	36
Abbildung 3-16: <i>C. neoformans</i> CEC MgCl <sub>2</sub> [0,1mol/l] additiv x400.....	36
Abbildung 3-17: <i>C. neoformans</i> CEC MgCl <sub>2</sub> [0,1mol/l] subtrktiv x400.....	36
Abbildung 3-18: <i>B. cereus</i> ABD-Reaktion lichtoptisch x100.....	37
Abbildung 3-19: <i>B. cereus</i> ABD-Reaktion polarisationsoptisch x100.....	37
Abbildung 3-20: <i>B. cereus</i> Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x100.....	38
Abbildung 3-21: <i>B. cereus</i> Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x100.....	38
Abbildung 3-22: <i>B. cereus</i> PB-Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x100.....	38
Abbildung 3-23: <i>B. cereus</i> PB-Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x100.....	38
Abbildung 3-24: <i>B. cereus</i> PB-Sialinsäure spezifische Reaktion additive Kompensation x100...	39
Abbildung 3-25: <i>B. cereus</i> PB-Sialinsäure spezifische Reaktion subtraktive Kompensation x100 .....	39
Abbildung 3-26: <i>L. monocytogenes</i> PB-KOH-ABT-Reaktion lichtoptisch x100.....	40
Abbildung 3-27: <i>L. monocytogenes</i> PB-KOH-ABT-Reaktion polarisationsoptisch x100.....	40
Abbildung 3-28: <i>L. monocytogenes</i> Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x40.....	41
Abbildung 3-29: <i>L. monocytogenes</i> Sialinsäure spezifische Rektion polarisationsoptisch x40....	41
Abbildung 3-30: <i>L. monocytogenes</i> PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x100 .....	41
Abbildung 3-31: <i>L. monocytogenes</i> PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x100.....	41

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-32: H. pylori Paraffin-Präparat PB-KOH-ABT-Reaktion lichtoptisch x40.....	43
Abbildung 3-33: H. pylori Paraffinpräparat PB-KOH-ABT-Reaktion polarisationsoptisch x40..	43
Abbildung 3-34: H. pylori Paraffinpräparat PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion lichtoptisch x40.....	44
Abbildung 3-35: H. pylori Paraffinpräparat PB-KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion polarisationsoptisch x40.....	44
Abbildung 3-36: C. jejuni ABT-Reaktion lichtoptisch x40.....	44
Abbildung 3-37: C. jejuni ABT-Reaktion polarisationsoptisch x40.....	44
Abbildung 3-38: Phagozytose unbekapselte Klebsiellen nach 5-minütiger Inkubation KOH-ABT- Reaktion lichtoptisch x40.....	46
Abbildung 3-39: Phagozytose unbekapselte Klebsiellen nach 5-minütiger Inkubation KOH-ABT- Reaktion polarisationsoptisch x40.....	46
Abbildung 3-40: Phagozytose bekapselte Klebsiellen nach 4-stündiger Inkubation KOH-ABT- Reaktion lichtoptisch x40.....	47
Abbildung 3-41: Phagozytose bekapselte Klebsiellen nach 4-stündiger Inkubation KOH-ABT- Reaktion polarisationsoptisch x40.....	47
Abbildung 3-42: Phagozytose Klebsiellen nach 4-stündiger Inkubation Charge Transfer Reaktion mit Eosin lichtoptisch x100.....	48
Abbildung 3-43: Phagozytose Klebsiellen nach 4-stündiger Inkubation Charge Transfer Reaktion mit Eosin polarisationsoptisch x100.....	48
Abbildung 3-44: Phagozytose CIBR lichtoptisch x100.....	49
Abbildung 3-45: Phagozytose CIBR polarisationsoptisch x100.....	49
Abbildung 3-46: C. albicans CT-R (Pipolphen, Eosin) lichtoptisch x40.....	51
Abbildung 3-47: C. albicans CT-R (Pipolphen, Eosin) polarisationsoptisch x40.....	51
Abbildung 3-48: C. kruzei CT-R (Chlorpromazin, Eosin) lichtoptisch x100.....	52
Abbildung 3-49: C. kruzei CT-R (Chlorpromazin, Eosin) polarisationsoptisch x100.....	52
Abbildung 3-50: C. kruzei CT-R (Chlorpromazin, Bengalrosa B) lichtoptisch x100.....	52
Abbildung 3-51: C. kruzei CT-R (Chlorpromazin, Bengalrosa B) polarisationsoptisch x100.....	52
Abbildung 3-52: H. pylori (Flüssigmedium) CT-R (Chlorpromazin, Eosin) lichtoptisch x40.....	54
Abbildung 3-53: H. pylori (Flüssigmedium) CT-R (Chlorpromazin, Eosin) polarisationsoptisch x40.....	54
Abbildung 3-54: C. jejuni CT-R (Chlorpromazin, Erythrosin) lichtoptisch x40.....	55
Abbildung 3-55: C. jejuni CT-R (Chlorpromazin, Erythrosin) polarisationsoptisch x40.....	55
Abbildung 3-56: K. pneumoniae 486 CT-R (Chlorpromazin, Erythrosin) lichtoptisch x100.....	56
Abbildung 3-57: K. pneumoniae 486 CT-R (Chlorpromazin, Erythrosin) polarisationsoptisch x100.....	56
Abbildung 4-1: Schematische Darstellung linear positiver, radiär negativer Zuckerketten nach Fischer (1976).....	64
Abbildung 4-2: Schematische Darstellung linear negativer, radiär positiver Zuckerketten nach Fischer (1976).....	64
Abbildung 4-3: Reaktionsschema KOH-ABT-Reaktion nach Richter 2005.....	69
Abbildung 4-4: Atommodell der KOH Vorbehandlung für die KOH-Sialinsäure spezifische Reaktion.....	75
Abbildung 4-5: Reaktionsschema der CIBR nach Richter 2005.....	80

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4-6: Strukturformel Chlorpromazin.....	89
--------------------------------------------------	----

## 9 LEBENS LAUF

### **Persönliche Daten**

Geburtsdatum: 27. Januar 1981  
Geburtsort: Hamburg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Beruflicher Werdegang**

Seit März 2009 Gastroenterologie des St. Hildegardiskrankenhaus des  
Katholischen Klinikums Mainz  
Feb 2008 – März 2009 Pneumologie des St. Hildegardiskrankenhaus des  
Katholischen Klinikums Mainz  
Nov 2007 – Jan 2008 III. Medizinische Klinik für Hämatologie und Onkologie am  
Universitätsklinikum Mannheim

### **Ausbildungsdaten**

Mai 2005 – Aug 2010 Dissertation: „Die Bedeutung der linear orientierten OH-  
Gruppen in der Wand von Mikroorganismen. Eine  
Polarisationsoptisch-histochemische Studie“  
Okt. 2000 – Juli 2007 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock  
Staatsexamen mit der Abschlussnote 2,33  
Sept. 1993 – Juni 2000 Halepaghen Gymnasium Buxtehude  
Allgemeine Hochschulreife Abschlussnote 2,3

### **Praktika**

Febr. 2006 - Jan. 2007 Praktisches Jahr an der Universität Rostock (Fächer:  
Pulmonologie, Nephrologie, Unfallchirurgie,  
Kinderchirurgie, Anästhesie und Intensivmedizin)  
Okt. – Nov. 2005 u.

### Lebenslauf

Sept. – Okt. 2003	Famulatur Klinik für Innere Medizin, Elbeklinikum Buxtehude
Oktober 2005	Famulatur Kinderklinik, Helioskliniken Berlin
September 2005	Famulatur Praxis für Allgemeinmedizin, Rostock
Febr. - März 2005	Famulatur Kinderfachklinik Satteldüne, Amrum
Febr. - März u. Sept. 2001, Sept. – Okt. 2000	Team Assistant im Kingston Hospital, London, England

## 10 VERÖFFENTLICHUNGEN

### 10.1 Abstracts

- Linear orientated OH-groups in biological structures  
Gähns W, Tigyi Z, Makovitzky J  
35. Membrán-Transzport Konferencia 2005 Május 24-27, Sümeg (Ungarn), p 50
- Linear oriented OH groups in the capsule of various fungi  
Gähns W, Tigyi Z, Emödy L, Makovitzky J  
MPT and Hungarian Division of IAP  
64. Pathológus Kongressus 2005 szept 22-24, Pécs (Ungarn), p 31-32
- Topo-optical detection of sugar chains and sialic acid on the surface of phagocytic and bacterial cell during phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae* in mouse  
Tigyi Z, Gähns W, Emödy L, Makovitzky J  
János Fischer Memorial Symposium September 15 2006. Szeged (Ungarn) p 6
- Polarisation optical analysis of the surface of human pathogenic fungi  
Gähns W, Tigyi Z, Emödy L, Makovitzky J  
János Fischer Memorial Symposium September 15 2006. Szeged (Ungarn) p 7
- Topo-optical investigation of phenothiazine induced charge transfer reactions in various yeast cell walls  
Tigyi Z, Emödy L, Gähns W, Makovitzky J  
Acta Microbiologica et immunologica Hungarica 54. Suppl. 2007, p 132-133
- Topo-optical investigation of phenothiazine induced charge transfer reactions in various yeast cell walls  
Tigyi Z, Emödy L, Gähns W, Molnár J, Makovitzky J  
38. Membrán-Transzport Konferencia 2008 Május 20-23, Sümeg

### 10.2 Artikel

## Veröffentlichungen

- Topo-optical investigations on the cell wall of various yeasts  
Gähns W, Tigyi Z, Emödy L, Makovitzky J  
Acta Microbiol et Immunol Hung 2005, suppl 44:52
- Selektive Darstellung der linear orientierten Hydroxyl-Gruppen und deren Bedeutung in der Membran humanpathogener Mikroorganismen  
Gähns W, Tigyi Z, Emödy L, Makovitzky J  
Biospektrum 2, 2006, p. 173-175
- Polarisationsoptischer Nachweis bei Pilzen und Bakterien  
Gähns W, Makovitzky J  
Biospektrum 6, 2007, p. 646-668
- Polarization optical analysis of the surface structures of various fungi.  
Gähns W, Tigyi Z, Emödy L, Makovitzky J  
Acta Histochem online publications, 2009
- Topo-optical investigations on the surface of bacterial cells during the phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae* in mouse.  
Tigyi Z, Gähns W, Emödy L, Makovitzky J.  
Acta Histochem online publication 2009
- Die submikroskopische Analyse der pathogenen Pilze und Bakterien mit topo-optischen Reaktionen  
Gähns W, Tigyi Z, Emödy L, Makovitzky J  
Festschrift für Prof. Dr. Stefan Pollak  
Rote Reihe des Schmidt-Römhild-Verlags. Im Druck

## **11 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine weiteren als die angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

### **ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE**

Hiermit erkläre ich, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Wiebke Gährs

Rostock, den 23.04.2009

## Danksagung

# 12 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei den Instituten, die mich bei dieser Arbeit durch Material unterstützt haben.

Dies sind im Besonderen:

- Das Institut für Mikrobiologie und Immunologie der Universität Pécs in Ungarn, im besonderen Herr Dr. Zoltán Tigyí und Herr Prof. Dr. Levente Emödy
- Das Deutsches Referenzzentrum für Helikobakter pylori, Campylobakter jejuni und Campylobacter coli n der Universität Freiburg i. Brg. Im besonderen Herr Prof. Dr. Kist
- Die Praxis für Pathologie am Südstadtklinikum der Hansastadt Rostock
- Das Institut für Mikrobiologie und Immunologie der Universität Freiburg, im besonderen Herrn. Prof. Dr. Manfred Kist

Ich bedanke mich für das Überlassen des Themas von Herrn Josef Makovitzky (Mitglied der Ungarischen Wissenschaftlichen Akademie zu Budapest) ehem. Leiter des Labor für Gynäkopathologie. Insbesondere bedanke ich mich für die Erklärung und Nutzung der Polarisationsmikroskopie, für die Tagung, auf der ich selbst einen Vortrag halten durfte und seine unermüdliche Hilfe bei der Fertigstellung der Doktorarbeit.

Abschließend möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich seelisch und moralisch im Studium und bei dieser Dissertation begleitet haben, allen voran meine Eltern, meine Schwester und mein Freund.