Aus dem Institut für Tieranatomie Lehrstuhl für Tieranatomie I insbesondere Systematische und Topographisch-klinische Anatomie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. H.-G. Liebich

und dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung Lehrstuhl für Physiologie der Tierärztlichen Fakultät Ludwig-Maximilians-Universität Vorstand: Prof. Dr. M. Stangassinger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Privatdozent Dr. Sven Reese und Prof. Dr. B. Kaspers

# Lektinhistochemische Untersuchungen an der Lunge des Haushuhnes unter besonderer Berücksichtigung BALT-assoziierter Strukturen

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

von Christoph Hinterseher aus Bad Hersfeld

München 2005

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

Dekan:Univ.-Prof. Dr. A. StolleReferent:Priv.-Doz. Dr. S. ReeseKorreferent:Univ.-Prof. Dr. K. Hartmann

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meiner Mutter Meiner Schwester und Jacko

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
ABSCHNITT I. Einleitung	1
ABSCHNITT II. Literaturübersicht	3
1. Überblick über die Gliederung des Literaturteils	3
2. Histologie der respiratorischen Räume der Lungen des	
Haushuhnes unter besonderer Berücksichtigung des	
Follikel-assoziierten Epitheliums (FAE) des Primärbrond	chius3
2.1. Systema respiratorium	3
2.1.1. Grundstruktur	
2.1.2. Tunica mucosa respiratorii	5
2.1.2.1. Epithel	5
2.1.2.2. Lamina propria mucosae	6
2.1.2.3. Lamina muscularis mucosae	7
2.1.3. Tunica submucosa	7
2.1.4. Tunica muscularis	7
2.1.5. Tunica serosa mit Tela subserosa	8
2.1.6. Besonderheiten einzelner Abschnitte des respiratorisch	en Systems8
2.2. MALT	9
2.2.1. Bronchius-assoziiertes lymphatisches Gewebe (BALT)	beim Säugetier…11
2.2.2. BALT beim Haushuhn	12
2.2.3. Morphologie des BALT	13
3. Lektine und Lektinhistochemie	15
3.1. Definition des Begriffs "Lektin"	15
3.2. Die Historie der Lektine und der Lektinhistochemie	15
3.3. Struktur und Bindungseigenschaften der Lektine	16

3.4. Funktionelle Kategorisierung der verschiedenen Lektine	19
3.5. Allgemeines über die Eunktionen der Lektine <i>in vivo</i>	
3.6 Lektinhistochemie	23
3 6 1 Allgemeines und Historie	23
3 6 2 Definition	20
3.6.3 Lektinhistochemische Untersuchungen am BAI T/FAF	
verschiedener Organe des Haushuhnes	25
	20
4. Kohlenhydrate der Glycocalix und kohlenhydrathaltige	
Strukturen im Atmungsapparat des Haushuhnes	28
4.1. Mucosale Zuckerreste	29
4.1.1. Allgemeines	
4.1.2. Glycoprotein-Struktur	29
4.1.3. Bedeutung von zuckerhaltigen Strukturen im Mucus für die	
Methode der Lektinhistochemie	32
4.2. Zelluläre Zuckerstrukturen	32
4.2.1. Die Glycocalix	32
4.2.1.1. Allgemeines	32
4.2.1.2. Glycoproteine	33
4.2.1.3. Glycolipide	33
4.2.1.4. Proteoglycane, Glycosaminoglycane und verschiedene	
andere Mucopolysaccharide	34
4.2.2. Intrazelluläre Zuckerstrukturen	36
4.2.2.1. Übersicht über den allgemeinen Glycosylierungs-Stoffwechse	l im
endoplasmatischen Reticulum	
4.2.2.2. Glycosylierung im GOLGI-Apparat	37
4.2.2.3. Bedeutung der Zuckerstrukturen der Zelle für die Lektinhistoc	hemie38
4.3. Zuckerstrukturen des Bindegewebes	39
4.3.1. Allgemeines	39
4.3.2. Proteoglycane und Glycosaminoglycane	39
4.3.3. Kollagene	40

	Inhaltsverzeichnis III
4.3.4. Adhäsive Glycoproteine	40
4.3.5. Bedeutung von Zuckerstrukturen des Bindegewebes	
für die Lektinhistochemie	41
5. Funktion und Bedeutung von Kohlenhydratresten auf	
epithelialen Oberflächen des respiratorischen Systems des	
Haushuhnes	41
5.1. Kohlenhydrate als Rezeptoren für Mikroorganismen	41
5.2. Aerosolische, orale oder kloakale Vaccinierung über Kohle	nhydrat-haltige
Zielstrukturen zellulärer Oberflächen	43
5.3. Kohlenhydrate im Rahmen der oralen oder aerosolischen a	antiadhäsiven
Therapie	44
6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils	45
6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils	45
6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils	45 46
6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils	45 46
6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils	45 <u>46</u> 46
<ul> <li>6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils</li> <li><u>ABSCHNITT III. Material und Methoden</u></li> <li>1. Material</li> <li>1.1. Tiere</li> </ul>	45 46 46 46
<ul> <li>6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils</li> <li>ABSCHNITT III. Material und Methoden</li> <li>1. Material</li> <li>1.1. Tiere</li> <li>1.2. Überblick über die in dieser Arbeit eingesetzten Lektine</li> </ul>	45 46 46 46 46
<ul> <li>6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils</li> <li>ABSCHNITT III. Material und Methoden</li> <li>1. Material</li></ul>	45 46 46 46 46 
<ul> <li>6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils</li> <li><u>ABSCHNITT III. Material und Methoden</u></li> <li>1. Material</li></ul>	
<ul> <li>6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils</li> <li>ABSCHNITT III. Material und Methoden</li> <li>1. Material</li></ul>	
<ul> <li>6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils</li> <li>ABSCHNITT III. Material und Methoden</li> <li>1. Material</li></ul>	
6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils  ABSCHNITT III. Material und Methoden  1. Material 1.1. Tiere 1.2. Überblick über die in dieser Arbeit eingesetzten Lektine  2. Methoden 2.1 Organentnahme und Fixierung 2.2. Dehydratation und Paraffineinbettung 2.2.1. Dehydratation 2.2.2. Paraffinierung/Paraffineinbettung	
<ul> <li>6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils</li> <li>ABSCHNITT III. Material und Methoden</li> <li>1. Material</li></ul>	
<ul> <li>6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils</li> <li>ABSCHNITT III. Material und Methoden</li> <li>1. Material</li></ul>	
<ul> <li>6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils.</li> <li>ABSCHNITT III. Material und Methoden</li> <li>1. Material.</li> <li>1.1. Tiere.</li> <li>1.2. Überblick über die in dieser Arbeit eingesetzten Lektine</li> <li>2. Methoden.</li> <li>2.1 Organentnahme und Fixierung.</li> <li>2.2. Dehydratation und Paraffineinbettung.</li> <li>2.2.1. Dehydratation.</li> <li>2.2.2. Paraffinierung/Paraffineinbettung.</li> <li>2.3. Anfertigung der Paraffinschnitte.</li> <li>2.4. Histologie (Hämatoxylin-Eosin-Färbung).</li> <li>2.5. Lektinhistochemie.</li> </ul>	
<ul> <li>6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils</li></ul>	
6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils	

2.5.3. Trypsinbehandlung	57
2.5.4. Lektininkubation	58
2.5.5. Inkubation mit Streptavidin-Enzym-Konjugat	58
2.5.6. Entwicklung der Farbreaktion der Gewebeschnitte	59
2.5.7. Gegenfärbung, Eindeckung und lichtmikroskopische Auswertung	59
2.6. Kontrollen	59
2.6.1. Überprüfung der Zuckerspezifität	
(Zuckerhemmung/glycosidische Hemmung)	59
2.6.1.1. Überprüfung der Zuckerspezifität mit Glc, GlcNAc und Gal,	
GalNAc, und Man	59
2.6.1.2. Überprüfung der Zuckerspezifität mit Chitotriose	60
2.6.1.3. Überprüfung der Spezifität für Neuraminsäure	60
2.6.2. Negativ-Kontrollen	61

## ABSCHNITT IV. Ergebnisse

<u>62</u>

1. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen in der HE-Färbung	62
1.1. Histologie des Primärbronchius	63
1.1.1. Follikel-assoziiertes Epithel (FAE)	64
1.1.2. Bronchius-assoziiertes lymphatisches Gewebe (BALT)	65
1.2. Sekundärbronchius	67
1.3. Atrien	67
1.4. Parenchym	68
0. Engelarized den labin bistoch en in den Unterstation non	
2. Ergebnisse der lektinnistochemischen Untersuchungen	69
2.1. Primärbronchius	<b>69</b> 73
2. Ergebnisse der lektinnistochemischen Untersuchungen         2.1. Primärbronchius	<b>69</b> 73 74
2. Ergebnisse der lektinnistochemischen Untersuchungen	<b>69</b> 73 74 74
2. Ergebnisse der lektinnistochemischen Untersuchungen	<b>69</b> 73 74 74 76
<ul> <li>2. Ergebnisse der lektinnistochemischen Untersuchungen</li></ul>	<b>69</b> 73 74 74 76 76
<ul> <li>2. Ergebnisse der lektinnistochemischen Untersuchungen</li></ul>	69 73 74 74 76 76 77
<ol> <li>2. Ergebnisse der lektinnistochemischen Untersuchungen.</li> <li>2.1. Primärbronchius.</li> <li>2.1.1. Flimmerepithel.</li> <li>2.1.1.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie.</li> <li>2.1.1.2. Lektine der GalNAc-Kategorie.</li> <li>2.1.1.3. Lektine der Fucose-Kategorie.</li> <li>2.1.1.4. Lektine der Mannose-Kategorie.</li> <li>2.1.1.5. Lektine der Oligosaccharid-Kategorie.</li> </ol>	69 73 74 74 76 76 77 77

2.1.2. Becherzellen	78
2.1.2.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie	78
2.1.2.2. Lektine der GalNAc-Kategorie	78
2.1.2.3. Lektine der Fucose-Kategorie	78
2.1.2.4. Lektine der Mannose-Kategorie	79
2.1.2.5. Lektine der Oligosaccharid-Gruppe	79
2.1.3. FAE	79
2.1.3.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie	79
2.1.3.2. Lektine der GalNAc-Kategorie	81
2.1.3.3. Lektine der Fucose-Kategorie	84
2.1.3.4. Lektine der Mannose-Kategorie	85
2.1.3.5. Lektine der Oligosaccharid-Kategorie	85
2.1.4. Zellen des BALT	86
2.1.4.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie	86
2.1.4.2. Lektine der GalNAc-Kategorie	86
2.1.4.3. Lektine der Fucose-Kategorie	86
2.1.4.4. Lektine der Mannose-Kategorie	86
2.1.4.5. Lektine der Oligosaccharid-Kategorie	87
2.2. Sekundärbronchien	87
2.2.1. Epithel des Sekundärbronchius	87
2.2.1.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie	87
2.2.1.2. Lektine der GalNAc-Katgorie	88
2.2.1.3. Lektine der Fucose-Kategorie	88
2.2.1.4. Lektine der Mannose-Kategorie	88
2.2.1.5. Lektine der Oligosaccharid-Kategorie	88
2.2.2. Subepitheliale Zellen der Sekundärbronchien	88
2.3. Atrien	89
2.3.1. Atrien-Epithel	89
2.3.1.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie	89
2.3.1.2. Lektine der GalNAc-Kategorie	90
2.4. Parenchym	90

3. Ergebnisse der Zucker-Bindungs-Kontrollen (Zuckerhemmung)	91
3.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie	91
3.2. Lektine der GalNAc-Kategorie	91
3.3. Lektine der Fucose-Kategorie	92
3.4. Lektine der Mannose-Kategorie	92
3.5. Lektine der Oligosaccharid-Kategorie	92
4. Negativkontrollen	92
ABSCHNITT V. Diskussion	93
1. Ziel der Arbeit	93
2. Kritik der in dieser Arbeit eingesetzten Methodik	94
3. Diskussion der Ergebnisse	96
3. Diskussion der Ergebnisse	<b>96</b> 96
<ul> <li>3. Diskussion der Ergebnisse</li> <li>3.1. Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen</li> <li>3.2. Lektinhistochemische Untersuchungen</li> </ul>	96 96 97
<ul> <li>3. Diskussion der Ergebnisse.</li> <li>3.1. Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.</li> <li>3.2. Lektinhistochemische Untersuchungen.</li> <li>3.2.1. Allgemein.</li> </ul>	96 96 97 97
<ul> <li>3. Diskussion der Ergebnisse.</li> <li>3.1. Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.</li> <li>3.2. Lektinhistochemische Untersuchungen.</li> <li>3.2.1. Allgemein.</li> <li>3.2.2. Primärbronchius.</li> </ul>	96 96 97 97 97
<ul> <li>3. Diskussion der Ergebnisse.</li> <li>3.1. Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.</li> <li>3.2. Lektinhistochemische Untersuchungen.</li> <li>3.2.1. Allgemein.</li> <li>3.2.2. Primärbronchius.</li> <li>3.2.3. Sekundärbronchius.</li> </ul>	96 96 97 97 99 100
<ul> <li>3. Diskussion der Ergebnisse.</li> <li>3.1. Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.</li> <li>3.2. Lektinhistochemische Untersuchungen.</li> <li>3.2.1. Allgemein.</li> <li>3.2.2. Primärbronchius.</li> <li>3.2.3. Sekundärbronchius.</li> <li>3.2.4. Atrium.</li> </ul>	96 97 97 97 99 100 100
<ul> <li>3. Diskussion der Ergebnisse.</li> <li>3.1. Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.</li> <li>3.2. Lektinhistochemische Untersuchungen.</li> <li>3.2.1. Allgemein.</li> <li>3.2.2. Primärbronchius.</li> <li>3.2.3. Sekundärbronchius.</li> <li>3.2.4. Atrium.</li> <li>3.2.5. Parenchym.</li> </ul>	96 97 97 97 99 100 101
<ul> <li>3. Diskussion der Ergebnisse.</li> <li>3.1. Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.</li> <li>3.2. Lektinhistochemische Untersuchungen.</li> <li>3.2.1. Allgemein.</li> <li>3.2.2. Primärbronchius.</li> <li>3.2.3. Sekundärbronchius.</li> <li>3.2.4. Atrium.</li> <li>3.2.5. Parenchym.</li> <li>3.2.6. Vergleich histologischer Strukturen in der lektinhistochemischen</li> </ul>	96 97 97 97 99 100 101
<ul> <li>3. Diskussion der Ergebnisse.</li> <li>3.1. Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.</li> <li>3.2. Lektinhistochemische Untersuchungen.</li> <li>3.2.1. Allgemein.</li> <li>3.2.2. Primärbronchius.</li> <li>3.2.3. Sekundärbronchius.</li> <li>3.2.4. Atrium.</li> <li>3.2.5. Parenchym.</li> <li>3.2.6. Vergleich histologischer Strukturen in der lektinhistochemischen Untersuchung in verschiedenen Abschnitten der Lunge</li> </ul>	96 97 97 97 99 100 101
<ul> <li>3. Diskussion der Ergebnisse.</li> <li>3.1. Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.</li> <li>3.2. Lektinhistochemische Untersuchungen.</li> <li>3.2.1. Allgemein.</li> <li>3.2.2. Primärbronchius.</li> <li>3.2.3. Sekundärbronchius.</li> <li>3.2.4. Atrium.</li> <li>3.2.5. Parenchym.</li> <li>3.2.6. Vergleich histologischer Strukturen in der lektinhistochemischen Untersuchung in verschiedenen Abschnitten der Lunge des Haushuhnes.</li> </ul>	96 96 97 97 99 100 101
<ul> <li>3. Diskussion der Ergebnisse.</li> <li>3.1. Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.</li> <li>3.2. Lektinhistochemische Untersuchungen.</li> <li>3.2.1. Allgemein.</li> <li>3.2.2. Primärbronchius.</li> <li>3.2.3. Sekundärbronchius.</li> <li>3.2.4. Atrium.</li> <li>3.2.5. Parenchym.</li> <li>3.2.6. Vergleich histologischer Strukturen in der lektinhistochemischen Untersuchung in verschiedenen Abschnitten der Lunge des Haushuhnes.</li> <li>3.2.7. Vergleich histologischer Strukturen in der lektinhistochemischen</li> </ul>	96 97 97 97 99 100 101
<ul> <li>3. Diskussion der Ergebnisse.</li> <li>3.1. Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen.</li> <li>3.2. Lektinhistochemische Untersuchungen.</li> <li>3.2.1. Allgemein.</li> <li>3.2.2. Primärbronchius.</li> <li>3.2.3. Sekundärbronchius.</li> <li>3.2.4. Atrium.</li> <li>3.2.5. Parenchym.</li> <li>3.2.6. Vergleich histologischer Strukturen in der lektinhistochemischen Untersuchung in verschiedenen Abschnitten der Lunge des Haushuhnes.</li> <li>3.2.7. Vergleich histologischer Strukturen in der lektinhistochemischen Untersuchung verschiedener Spezies.</li> </ul>	96 97 97 97 99 100 101 101

Inhaltsverzeichnis VI	
-----------------------	--

ABSCHNITT VI. Zusammenfassung	108
ABSCHNITT VII. Summary	110
ABSCHNITT VIII. Literaturverzeichnis	112
ABSCHNITT IX. Anhang	135
1. Hühner, Hühnerbruteier	132
2. Auflistung der Zusammensetzung verwendeter Reagenzien	132
3. Chemische Substanzen und fertige Gebrauchspräparate	136
4. In den Untersuchungen eingesetzte Geräte	139
Danksagung	140

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
BALT	Bronchus-associated lymphoid tissue
°C	Grad Celsius
d	Tag(e)
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
Fuc	Fucose
g	Gramm
GAG	Glycosaminoglycan
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetyl-Galactosamin
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GlcUA	Glucuronsäure
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin
IdUA	Iduronsäure
IFE	Interfollikuläres Epithel
Kap.	Kapitel
Man	Mannose
mM	Millimol
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
min	Minute(n)
NANA	N-Acetyl-Neuraminsäure/Sialinsäure

Xyl	Xylose
S.	Siehe
Ser	Serin
sek	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
vgl.	Vergleiche
>	größer als
<	kleiner als

#### Abschnitt I. Einleitung

Erkrankungen des Respirationstraktes beim Geflügel sind häufig und spielen daher in der Geflügelwirtschaft eine bedeutsame Rolle. Im Bereich Nutzgeflügel können Erkrankungen des Atmungstraktes von großer ökonomischer Bedeutung sein. Als Auslöser solcher meist multifaktorieller Erkrankungen kommen neben abiotischen Stressoren verschiedene virale, bakterielle, mykotische und parasitäre Erreger wie Trichomonas gallinae, der Erreger des Gelben Knopfes der Taube, in Frage. Kohlenhydratstrukturen in den Schleimschichten des Atmungsapparates und auf den zellulären Oberflächen des Epithels der respiratorischen Organe, im Speziellen im Bereich der beim Geflügel typischerweise weitestgehend unbeweglichen Lungen, die in ihrer Gesamtheit die zelluläre Glycocalix bilden, können dabei nach SHARON und LIS (1993) als Rezeptoren für das Auffinden von Zielzellen für die Adhäsion verschiedener Mikroorganismen fungieren. Folge dieser meist Kohlenhydratvermittelten Adhäsion kann dann zum einen die Eliminierung entsprechender Erreger über unspezifische und spezifische Systeme der körpereigenen Immunabwehr sein. Zum anderen kann die Adhäsion bei Insuffizienz oder beim totalen Versagen der Abwehrmechanismen zum Durchbrechen der respiratorischen Schranke führen und so als Eintrittspforte den ersten Schritt zur Erkrankung des betroffenen Organismus darstellen.

Aus diesem Grund ist die genaue strukturchemische Aufklärung solcher Kohlenhydratstrukturen der luftleitenden und luftaustauschenden Gewebe des aviären Respirationstraktes sowohl im Hinblick auf pathogenetische Mechanismen, als auch hinsichtlich ihrer Funktion als potentielle Zielstrukturen für eine orale Vaccination (KRAEHENBUHL et al., 1997) und probiotisch wirksame bakterielle Floren (nach TUOMOLA et al., 2001) sowie für den Einsatz von Kohlenhydraten im Rahmen der sogenannten "Antiadhäsiven Therapie" (nach SHARON, 1997) notwendig. Die genaue Charakterisierung derartiger Kohlenhydratstrukturen ist durch Verwendung markierter Lektine möglich. Dabei handelt es sich definitionsgemäß um pflanzliche und/oder tierische Proteine oder Glycoproteine mit Kohlenhydrat-bindenden und daher spezifischen Zell-agglutinierenden Eigenschaften.

Durch Einsatz lektinhistochemischer Markierungen ist die genaue histochemische Analyse der Glycosylierung der einzelnen Abschnitte des respiratorischen Apparates der Vögel von proximal nach distal möglich. Bisher existieren nur wenige lektinhistochemische Untersuchungen an Geweben der Vögel, insbesondere des Haushuhnes. Einzelne Arbeiten über lektinhistochemische Untersuchungen von Dünn- und insbesondere Dickdarmabschnitten von KITAGAWA et al. liegen vor, die 2000 zeigen konnten, wie die Lektine DSL, ConA und Jacalin spezifisch an epithelialen Oberflächen und M-Zellen des aviären Caecums binden. JEURISSEN et al. konnten mit den Lektinen SBA und WGA eine Anfärbung des Follikel-assoziierten Epithels (FAE) des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes des Haushuhnes erreichen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bindungsfähigkeit bestimmter biotinylierter Lektine im aviären Respirationstrakt allgemein und in ausgewählten immunrelevanten Abschnitten der aviären Lungen (Primärbronchius, Sekundärbronchius, Atrium, Parenchym), im Speziellen am Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*), zu untersuchen und so erste Grundlagen für die nähere Beschreibung von Zuckeroberflächen im Atmungsapparat der Vögel zu schaffen.

## Abschnitt II. Literaturübersicht

### 1. Überblick über die Gliederung des Literatur-Teils

Der Literatur-Teil wird zunächst eine allgemeine Übersicht zur Histologie der Lungen des Haushuhnes geben (Abschnitt 2). Es schließt sich daran an eine allgemeine Abhandlung zum Thema Lektine, die Geschichte ihrer Entdeckung, ihre allgemeine strukturchemische Morphologie, die Einteilung, Kategorisierung und Funktion und die Methode der Lektinhistochemie (Abschnitt 3). In Abschnitt 4 wird auf das Vorkommen von körpereigenen Kohlenhydratresten in den Lungenräumen eingegangen und damit ein Überblick über die lektinhistochemisch anfärbbaren intraund extrazellulär vorkommenden Strukturen gegeben. Abschnitt 5 schließlich setzt sich mit der Funktion und der allgemeinen Bedeutung solcher Zuckerreste auf der Oberfläche des respiratorischen und des Follikel-assoziierten Epithels (FAE) auseinander. Die zusammenfassende Betrachtung fasst die für die vorliegende Arbeit relevanten Aussagen noch einmal zusammen (Abschnitt 6).

2. Histologie der respiratorischen Räume der Lungen des Haushuhnes unter besonderer Berücksichtigung des Follikel-assoziierten Epitheliums (FAE) des Primärbronchius

## 2.1. Systema respiratorium

#### 2.1.1. Grundstruktur

Die Untersuchung der Lungen und des Luftsacksystems der Vögel hat seit HARVEY Anatomen und Zoologen immer wieder gereizt, denn das Lungen-Luftsacksystem der Vögel ist nicht nur der komplizierteste, sondern auch der wirksamste Atemapparat, der in der Wirbeltierreihe entwickelt worden ist (DUNCKER, 1968).

Der Atmungsapparat der Vögel lässt sich proximodistal nach VOLLMERHAUS und SINOWATZ (1992) unter makroskopischen Aspekten in die folgenden Abschnitte gliedern: Nasenhöhle mit Nasenmuscheln, Nasengängen, Sinus infraorbitalis und Nasendrüse, Kehlkopf, Luftröhre (Trachea), Stimmkopf (Syrinx, Larynx caudalis), Lunge mit Hauptbronchien, Paleopulmo mit seinen Sekundärbronchien, Neopulmo mit seinen Bronchien und Lungenpfeifen (Parabronchien) und schließlich die Luftsäcke, die die Aufgabe der Ventilation der aviären respiratorischen Organe übernehmen. Nasenhöhle, Kehlkopf, Luftröhre und Stimmkopf als obere luftleitende Organe des Atmungsapparates und die Luftsacksysteme der Vögel sollen in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden. Die Lungen des Vogels sind mit der Thoraxwand fest verwachsen und zwischen die Rippen eingelagert, deren Impressionen entlang der Organaußenseite auch deutlich zu sehen sind (COVER et al., 1953). Die Volumina der Lungen der Vögel werden bei der Atmung annähernd nicht verändert, zur Belüftung dienen die als Blasebalg an die Hauptbronchien (Primärbronchien) angeschlossenen Luftsäcke (DUNCKER, 1968). Die Lungen der Vögel kommen also volumenkonstant weit dorsal im Thorax zu liegen und sind allseitig bindegewebig mit der Körperwandung verwachsen. Im Gegensatz zum Säuger existieren beim Vogel nur während der Embryonalphase Pleuralhöhlen, während die Pleura später eine bindegewebige Umbildung erfährt. Die Lunge der Vögel besteht nach KRAUSE (1922) und DUNCKER (1968) jeweils aus den beiden Anteilen Palaeopulmo und Neopulmo. Im Bereich des Palaeopulmo finden Aufzweigungen des Primärbronchius in verschiedene Sekundärbronchien statt - sie werden nach ihrem anatomischen Verlauf als Medioventro-, Mediodorso- und Lateroventrobronchien bezeichnet. DUNCKER beschreibt 1968 des Weiteren an den Übergängen der Primär- in die Sekundärbronchien Lymphfollikel-assoziierte epitheliale Strukturen, die von Bronchius-assoziiertem lymphatischem Gewebe (BALT) unterlagert sind. Im Abschnitt des Neopulmo schließlich findet eine letzte Aufzweigung in die Bronchi laterodorsales statt. Die beschriebenen Sekundärbronchien münden in die sogenannten Parabronchien, die Lungenpfeifen. In der Wandung der Parabronchien befinden sich die Atria, in denen schließlich der Gasaustausch in der Lunge des Vogels stattfindet. Die Lungenpfeifen des Vogels können nach HAZELHOFF (1951) somit funktionell mit den Alveolen der Säugetiere verglichen werden.

Dem Geflügel fehlt ein Zwerchfell – es erfolgt daher auch keine Einteilung in Brustund Bauchhöhle, sondern in eine gemeinsame Leibeshöhle (Cavum trunci commune); die Ventilation der Lunge erfolgt durch die aviären Luftsacksysteme (DUNCKER, 1968, VOLLMERHAUS und SINOWATZ, 1992).

## 2.1.2. Tunica mucosa respiratorii

DUNCKER beschreibt 1968 als Überzug der mucosalen Auskleidung des respiratorischen Apparates beim Geflügel ein mehrreihiges Cilien-tragendes "Flimmerepithel". In den proximalen Abschnitten kommen zahlreiche Becherzellen vor (KRAUSE, 1922), die sich in den distalen Bereichen zunehmend verlieren. Insbesondere der Übergang des Primär- in den Sekundärbronchius bleibt Becherzellen-frei. In diesem Bereich findet sich stattdessen das sogenannte Follikel-assoziierte Epithel (FAE), das als Deckepithel für in der Mucosa liegende Lymphfollikel dient (DUNCKER, 1968). Nach KRAUSE (1922) können beim Geflügel unterschiedlich stark ausgeprägte Formen der Mucosa in den respiratorischen Räumen gesehen werden: In den proximalen Abschnitten (Trachea, Primärbronchien und Sekundärbronchien) enthält die Tunica mucosa eine starke Lamina propria mucosae, während in den distalen Abschnitten wie Parabronchien und Atria nur noch der epitheliale Überzug der Mucosa und eine sehr schwach ausgebildete Tela submucosa verbleiben.

#### 2.1.2.1. Epithel (Lamina epithelialis mucosae)

Beim Epithel der respiratorischen Organe des Geflügels handelt es sich nach VOLLMERHAUS und SINOWATZ (1992) um ein Cilien-tragendes mehrreihiges Flimmerepithel. In den proximalen Abschnitten kommen zahlreiche Becherzellen vor, die sich in den distal gelegenen Räumen zunehmend verlieren (KRAUSE, 1922).

Insbesondere der Übergang des Primär- in den Sekundärbronchius bleibt Becherzellen-frei. Die innere Oberfläche der Bronchien wird von einem respiratorischen Flimmerepithel mit Becherzellen ausgekleidet, dessen Höhe distal kontinuierlich abnimmt, im oberen Drittel des Bronchialbaumes aber deutlich höhere Zellen aufweist als vergleichbare Abschnitte in der Lunge des Säugetieres (OPPEL 1905; KRAUSE, 1922). Die Lamina propria mucosae schließt gemischte Drüsen (Gll. bronchiales) ein, die sich nach außen bis in die Tela submucosa fortsetzen. Diese Drüsen sezernieren nach FISCHER (1905) weniger aktiv als die vergleichbaren Zellen des Säugers ein proteinreiches, seröses, z.T. glycoproteinreiches Sekret. Die in den Bronchien auftretende Flüssigkeit setzt sich aus Schleim, proteinhaltigen Serumbestandteilen, Immunglobulin Laktoferrin Α. und verschiedenartigen Glycoproteinen zusammen (RIGDON, 1959). Diese Substanzen dienen in ihrer Gesamtheit dem Epithelschutz (Cytoprotektion) - sie sollen insbesondere das Anhaften von Bakterien, Viren und anderen Infektionserregern an der epithelialen Oberfläche des Tractus respiratorius erschweren oder wirken auch direkt bakteriostatisch (LIEBICH, 2003)

#### 2.1.2.2. Lamina propria mucosae

Die Lamina propria mucosae zeigt sich nach SCHULZE et al. (1910) reich an lockerem Bindegewebe mit kollagenen, vorrangig aber elastischen Fasern, mit Blutund Lymphgefäßen, Nerven und vereinzelten solitären Lymphknötchen. Es legt sich nach außen eine Schicht glatter Muskulatur an, die in den größeren Bronchien ringförmig, in den kleineren schraubenförmig-scherengitterartig angeordnet ist. Die Anordnung dieser glatten Muskelzellen folgt dem Verlauf der elastischen Fasern, ihre Kontraktionsfähigkeit ist Ursache für die oftmals erhebliche Faltenbildung der Bronchialschleimhaut des Vogels (LIEBICH, 2003). Einzelne hyaline Knorpelscherben bilden das bronchiale Stützskelett. Nahe der Trachea umgeben sie als Knorpelspangen die Bronchien weitgehend vollständig. Mit fortschreitender Verzweigung des Bronchialbaumes nehmen die Spangen an Größe und Vollständigkeit ab (SALT und ZEUTHEN, 1960).

Die Knorpelscherben sind vornehmlich durch elastische Fasersysteme untereinander verbunden, die in das Perichondrium und schließlich auch in den Knorpel selbst einstrahlen (HAUFE und SCHLÜTER, 1964); sie erhöhen so die Flexibilität des Bronchius. Periphere, kleinste Knorpelstücke bestehen nach HAUFE (1964) allein aus elastischem Knorpel. Außen liegt eine peribronchiale, bindegewebige Tunica adventitia an, die Gefäße und Nerven führt (DUNCKER, 1968).

#### 2.1.2.3. Lamina muscularis mucosae

DUNCKER beschreibt 1968, dass der Vogellunge eine deutlich ausgebildete Lamina muscularis mucosae weitgehend fehlt. Nur vereinzelt lassen sich nach DUNCKER und SCHLÜTER (1964) Mucosa-assoziierte glatte Muskelzellen nachweisen, die er als mit den umgebenden Schichten der respiratorischen Schleimhaut stark verwachsen beschreibt.

#### 2.1.3. Tunica submucosa

Auch eine Submucosa ist in den respiratorischen Organen der Vögel nach DUNCKER und SCHLÜTER (1968) nur sehr schwach ausgebildet. HAZELHOFF kann 1951 im Gegensatz dazu mit seiner Arbeitsgruppe bei verschiedenen Truthahn-Linien teilweise stark ausgebildete submucosale Gewebe beobachten.

## 2.1.4. Tunica muscularis

In der Wandung der Parabronchien der distalen Abschnitte der respiratorischen Organe fehlen im Gegensatz zu den Bronchien Drüsen und Knorpeleinlagerungen (FISCHER, 1905 und COVER, 1953). Mit dem Verlust der Becherzellen verschwindet allmählich auch der oberflächliche Kinozilien-Besatz (SCHUMACHER, 1968).

Eine kräftige Tunica muscularis aus mehreren Lagen vorrangig zirkulär angeordneter glatter Muskelzellen, der die Aufgabe der Ventilation der luftführenden Atemwege besondere Bedeutung zukommt, wie sie beim Säugetier gesehen werden kann, fehlt den Vögeln, beschreibt KRAUSE 1922. Die Ventilation wird bei ihnen – wie beschrieben - über das Luftsacksystem erreicht (DUNCKER, 1968).

#### 2.1.5. Tunica serosa mit Tela subserosa

KRAUSE (1922) und OPPEL (1905) beschreiben eine bindegewebige Tunica adventitia, die sich peribronchial an die äußeren Bereiche des respiratorischen Systems anlegt. Nach COVER (1953) fehlt dem Truthahn eine Tunica serosa im Sinne einer Pleura vollständig. Auch bei anderen Geflügelarten konnte von COVER Ähnliches nachgewiesen werden. KRAUSE postuliert 1922, dass nur embryonal von 2 Cava pleurae gesprochen werden kann; postnatal verwächst die Tunica serosa mit der dorsalen Bauchwand bindegewebig – die Lungen bleiben also – wie beschrieben - weitgehend unbeweglich (DUNCKER, 1968).

## 2.1.6. Besonderheiten einzelner Abschnitte des respiratorischen Systems

Obwohl die beschriebene Grundstruktur auf den gesamten respiratorischen Apparat anwendbar ist, so gibt es dennoch zwischen den einzelnen Abschnitten des Atmungstraktes anatomische und histologische Besonderheiten, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll. Schon proximal weist der Atmungsapparat der Vögel verschiedene Eigenarten auf: Der eigentliche Kehlkopf (Larynx cranialis) des Geflügels dient nicht der Stimmbildung. Zur Stimmbildung besitzen die Vögel den sogenannten Larynx caudalis, den Stimmkopf, die Syrinx, im Bereich der Bifurcatio tracheae (VOLLMERHAUS und SINOWATZ, 1992). Weiterhin weist die Trachea der Vögel nach DUNCKER (1968) insofern Besonderheiten auf, als dass die einzelnen hyalinen Knorpelspangen vollkommen geschlossene Ringsysteme bilden, die sich verzahnt mit dem jeweils nächsten Glied verbinden.

Die Trachea der Vögel bildet also ein vollständig geschlossenes Röhrensystem. Die Lunge der Vögel ist weitgehend unbeweglich, der Anteil der in ihrem Parenchym vorkommenden elastischen Fasersysteme sehr gering (KRAUSE, 1922). Dem Geflügel fehlt ein Zwerchfell, sodass die Ventilation des Tractus respiratorius vom nur beim Vogel vorkommenden Luftsacksystem übernommen wird, das sich aus cranialen und caudalen Luftsacksystemen zusammensetzt. In den Wandungen der luftleitenden Abschnitte kommen nach HAZELHOFF (1951) weitestgehend keine glatten Muskelzellen vor, die Lunge des Geflügels bleibt nur wenig kontrahierbar. Wohl aber ist die Vogel-Lunge kollabierbar – sie ist im Bereich der dorsalen Bauchwand bindegewebig verwachsen. Bei Verlust dieses "Halteapparates" kollabiert die Lunge des Geflügels wie DUNCKER schon 1968 beschrieb. Für diese Arbeit bedeutsame Abschnitte des Atmungsapparates sind der Primärbronchius, insbesondere die Übergangsbereiche zum Sekundärbronchius, an denen FAE und BALT-haltige Strukturen gesehen werden können, der Sekundärbronchius und der gasaustauschende Abschnitt der Atrien und schließlich das Parenchym. Besonders an den Randbereichen des Primärbronchius können in der Mucosa auftretende lymphatische Follikel gesehen werden, das sogenannte Bronchius- und Bronchiolusassoziierte lymphatische System (BALT) (DUNCKER, 1968); das das BALT überziehende Epithel weist nach KRAUSE (1922) und OPPEL (1905) deutliche Unterschiede zum übrigen Primärbronchiusepithel auf. Die Zahl der Becherzellen verringert sich deutlich, die einzelnen zellulären Abschnitte tragen meist keine Zellfortsätze mehr. Vereinzelt können – im Gegensatz zum Säuger in der Zahl Zellfortsatz-freien wesentlich zwischen den Epithelzellen geringer Flimmerepithelzellen gesehen werden (COVER, 1953).

#### 2.2. Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)

Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) zeigt in seiner Grundstruktur Ähnlichkeiten mit Lymphknoten. Neben T-Zell-Regionen kommen Anhäufungen von B-Lymphozyten vor und auch andere Antigen-präsentierende Zellen. MALT unterscheidet sich jedoch von Lymphknoten unter anderem durch das Fehlen von zuführenden Lymphgefäßen. Die Zulieferung von Antigenen wird beim MALT vom darüberliegenden Epithel, dem sogenannten Follikel-assoziierten Epithel (FAE) übernommen (vgl. Figur 1). Inmitten dieses besonderen Epithels kommen nach CLEARY et al. (2004) und FUJIMURA et al. (2004) auf den Antigen-Transport spezialisierte Zellen vor, die von den Autoren als M-Zellen beschrieben werden. Lumenseitig zeichnen sich M-Zellen durch das Vorhandensein von Mikrofalten aus (microfold cells). Verschiedene Partikel werden von Zellen dieser Art durch Pinobzw. Phagozytose aufgenommen, in Vesikeln durch das Zellinnere geschleust und an assoziierte Zellsysteme weitergegeben. In charakteristischen basolateralen Taschen sind an M-Zellen verschiedene Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten assoziiert. Diese Zellen nehmen die durch die M-Zelle transportierten Antigene auf, prozessieren sie und präsentieren sie daraufhin den in der Tiefe befindlichen immunkompetenten Zellen. Dabei handelt es sich in der Regel um naive T- und B-Lymphozyten, die durch die Wandungen spezialisierter Blutgefäße, den sogenannten postkapillären Venolen hindurchtreten. Diese zeichnen sich durch die Auskleidung mit einem besonders hohen Endothel aus (high endothelia venules, HEV). Das Vorkommen von HEV darf als charakteristisches Merkmal aller MALT-Strukturen angenommen werden. JEURISSEN et al. beschreiben 1987, wie naive T- und B-Lymphozyten auf diese Art und Weise die Lamina propria erreichen und anschließend auf die Präsentation von Fremdproteinen warten.



Figur 1: Ausschnitt aus einem Follikelassoziierten Epithel (FAE):

Inmitten regulärer, Cilien-tragender Epithelzellen (↓) kommt eine M-Zelle vor (↓); an die M-Zelle in einer basolateralen Tasche assoziiert: ein Lymphozyt (●).

Die Herkunft der auf den Antigen-Transport spezialisierten FAE-Zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Nach GEBERT (1999) gehen FAE-Zellen beim Menschen ebenso wie die Epithelzellen gewöhnlicher Darm-Zotten aus Stammzellen hervor, die im mittleren Drittel der Krypten liegen (vgl. Figur 2). Innerhalb von 3-4 Tagen wandern die noch unreifen Epithelzellen in den FAE-Bereich ein und differenzieren sich zu den verschiedenen morphologisch und histochemisch voneinander abgrenzbaren Zelltypen, wie Enterozyten, Becherzellen und M-Zellen. GEBERT (1999) konnte mit seiner Arbeitsgruppe durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie für das Kaninchen zeigen, dass M-Zellen einer Krypte einen gemeinsamen klonalen Ursprung haben und sich von M-Zellen anderer Krypten im Glycosylierungsmuster unterscheiden. Eine von TAKEUCHI, KITAGAWA et al. (1998) aus Zellkultur-Experimenten an Caecum-Gewebe des Huhns hergeleitete Hypothese, nach der M-Zellen im Normalfall durch Einfluss intraepithelialer Lymphozyten aus bereits vordifferenzierten Enterozyten entstehen, konnte von GEBERT et al. (1999) durch in-vivo-Untersuchungen an den PEYER-Plagues der Maus nicht bestätigt werden.



Figur 2: Übersicht zur Herkunft der FAE-Zellen (modifiziert nach GEBERT (1999):

FAE-assoziierte Krypte
 nicht FAE-assoziierte Krypte
 FAE-Zelle / M-Zelle

#### 2.2.1. Bronchius-assoziiertes lymphatisches Gewebe (BALT) beim Säugetier

Das Bronchius- und Bronchiolus-assoziierte lymphatische Gewebe (Bronchiusassociated lymphoid tissue; BALT) lässt sich taxonomisch den Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) zuordnen, die in verschiedenen Organsystemen Tunica-mucosa-assoziiert gefunden werden (DUNCKER, 1968). Die Existenz von BALT in der Lunge des Säugetiers ist seit über einhundert Jahren bekannt. 1677 beschrieb PEYER Ansammlungen von Lymphozytare Follikel in den Auskleidungen der respiratorischen Organe der Säugetiere. BIENENSTOCK et al. (1973a) untersuchten schließlich lymphatisches Gewebe in den Lungen von Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte, Maus und Hamster, Hund und Schwein, verglichen es mit dem Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe (GALT) und prägten den Begriff des BALT. Es konnten im Bereich der Aufzweigungen der Bronchien, regelmäßig zwischen Arterie und Bronchius gelegen (SMINIA et al., 1989), BALT-Knoten nachgewiesen werden, die von einem FAE überzogen waren (vgl. **Figur 3**). BIENENSTOCK et al. (1973a), KOLOPP-SARDA et al. (1994) und PLESCI et al. (1983) postulierten ein organisiertes Vorkommen von BALT-Strukturen beim Säugetier erst nach Geburt. Es blieb weitgehend unklar, inwieweit erste Anlagen des BALT schon pränatal angelegt sind.

#### 2.2.2. BALT beim Haushuhn

BIENENSTOCK et al. (1973a) untersuchten neben den BALT-Strukturen anderer Spezies auch das BALT des Huhnes. Bei Untersuchungen des Primärbronchius gelang es ihnen sogar, im Bereich der Übergänge von Primär- in Sekundärbronchien fingerförmige, in das Lumen des Primärbronchius ragende, Verdickungen der Tunica mit einer Lupe nachzuweisen. Die anschließende histologische mucosa Untersuchung konnte zeigen, dass es sich bei den Verdickungen um BALT-Strukturen handelte. Später schlossen sich Untersuchungen des BALT mit klassischen histologischen und immunhistochemischen Methoden an. Manche Untersucher (FAGERLAND and ARP, 1993b) konnten lymphozytäre Infiltrate auch bei Eintagsküken nachweisen. Sie beschrieben, dass es sich bei den schon früh gefundenen Zellen um T-Lymphozyten handelt. B-Lymphozyten wanderten in lymphozytäre BALT-Follikel erst in den ersten 2 Lebenswochen ein.

Allerdings ließen sich nach FAGERLAND and ARP (1993b) beim Eintagsküken schon einzelne B-Lymphozyten im Lungenparenchym nachweisen.



Figur 3: Ausschnitt aus einem Follikel-assoziierten Epithel (FAE) im Bereich der respiratorischen Organe:

Inmitten des Becherzell (↓) -reichen respiratorischen Flimmerepithels (↓) kommt eine M-Zelle vor (↓); an die M-Zelle in einer basolateralen Tasche assoziiert: eine Antigen-präsentierende Zelle (∡).

#### 2.2.3. Morphologie des BALT

Die respirationsaktiven Oberflächen der Alveolarepithelien werden beim Säugetier durch ein System der "Selbstreinigung" vor dauerhaften Verunreinigungen z.B. durch aspirierte Partikel und Flüssigkeiten geschützt - es ist von "mucoziliärer Clearance" die Rede (LIEBICH 2003). Diese Aufgabe übernehmen als Bestandteile des Makrophagen-Phagozytose-Systems (MPS) phagozytoseaktive Makrophagen, die aus dem interstitiellen Bindegewebe auswandern und sich innen an der Alveolarwand festsetzen ("Alveolarmakrophagen"). Diese Zellen werden zusammen mit schleimhaltigen Substanzen und abgeschilferten Epithelzellen über das luftleitende System ausgeschieden. Nach jüngsten Erkenntnissen kann die Lunge bei Kalb, Schaf, Ziege, Katze und Schwein als ein Organsystem angenommen werden, dem neben den atmungsaktiven Aufgaben entscheidende Funktionen bei der unspezifischen Phagozytose von im Blut zirkulierenden körperfremden Bestandteilen zukommt. Unterschiedlich funktionsaktive Zellpopulationen übernehmen dabei in der Lunge spezifisch sekretorische, endozytotische und immunzelluläre Aufgaben. In ihrer Gesamtheit werden diese Gewebszellen unter der Bezeichnung BALT (Bronchus-Associated Lymphoid Tissue = Bronchien-assoziiertes lymphatisches Gewebe) zusammengefasst (LIEBICH 2003).

Im Bereich der oberen Atemwege kommen intraepithelial Zellen des sogenannten APUD-Systems (**A**mine **P**recursor **U**ptake and **D**ecarboxylation) vor. Zusammen mit den sogenannten K-Zellen (**K**ultschitzky-Zellen) bilden sie das intraepitheliale, neuroendokrine System des Apparatus respiratorius. Diese Epithelzellen sind insbesondere bei jungen Tieren ausgeprägt, sie stehen mit Nervenendigungen in Kontakt und produzieren Mediator-Substanzen aus der Reihe der biogenen Amine (decarboxylierte Aminosäuren) (LIEBICH, 2003). Im aviären Apparatus respiratorius kann BALT in Form von mucosal angeordneten lymphatischen Follikeln im Bereich der Übergänge des Primärbronchius zum Sekundärbronchius nachgewiesen werden (DUNCKER, 1968).

## 3. Lektine und Lektinhistochemie

#### 3.1. Definiton des Begriffs "Lektin"

Der Begriff der Lektine geht auf GOLDSTEIN et al. im Jahre 1980 zurück. Er umfasst spezifische – ursprünglich nur in Pflanzen gefundene - Kohlenhydrat-Strukturen bindende Proteine nichtimmunogener Herkunft, die die Fähigkeit besitzen, Zellen zu agglutinieren oder Polysaccharide bzw. Glycokonjugate zu präzipitieren (nach Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry) (DIXON, 1981). Lektine wurden lange Zeit nur aus pflanzlichen Geweben isoliert und ihre Blutagglutinierende Eigenschaft stand im Vordergrund ihrer Untersuchung, so dass die chemische Nomenklatur als Konsequenz ursprünglich den Begriff der "Phythämagglutinine" wählte. Die beschriebene Definition hat sich heute gegen die Vorschläge vieler anderer Autoren (FRANZ, 1990) weitgehend durchgesetzt (BROOKS et al., 1997).

## 3.2. Die Historie der Lektine und der Lektinhistochemie

Erste Berichte über hämagglutinierende Eigenschaften verschiedener Pflanzeninhaltsstoffe stammen von STILLMARK im Jahre 1888. Im Rahmen seiner damaligen Dissertationsarbeit beobachtete er das Agglutinieren von Erythrozyten, sobald diese mit dem stark toxischen Pflanzeninhaltsstoff Rizin, einem Extrakt aus den Samen von Ricinus communis, Kontakt bekommen. In den folgenden Jahren wurden weitere toxische Phytagglutinine sowie als Hämagglutinine beschriebene Substanzen bakterieller, viraler und tierischer Herkunft entdeckt und beschrieben. Die heute als "Selectine" beschriebenen Oberflächen-Moleküle von weißen Blutkörperchen liefern eine Erklärung dafür, wie Leukozyten über das sogenannte "rolling" und "sticking" aus der Blutbahn in entzündliche Gewebe wechseln. EHRLICH (1891) verwendete Rizin (aus *Ricinus communis*) und Abrin (aus *Abrus precatorius*) in seinen Untersuchungen über das Immunsystem als Antigene und konnte mit ihrer

Hilfe erstmals Erkenntnisse über die Bildung und Spezifität von Antikörpern gewinnen. Die Reversibilität der Hämagglutination durch pflanzliche Agglutinine wurde durch LANDSTEINER (1902) nachgewiesen. Zusammen mit RAUBITSCHEK gelang es LANDSTEINER 1908 erstmals, nicht-toxische Phytagglutinine zu isolieren, die nach ihrer Herkunft von ihm zunächst als Phasine bezeichnet wurden, weil sie aus Schmetterlingsblütlern der Gattung Phaseolus, insbesondere aus Phaseolus vulgaris, gewonnen werden konnten. Im Jahre 1936 machten SUMMER und HOWELL die Beobachtung, dass das Lektin Concanavalin A (aus Canavalia ensiformis) nicht nur die Agglutination von Erythrozyten verursacht, sondern auch Stärkegranula verklumpt sowie Mucoproteine und Glycogen präzipitiert. Gleichzeitig wiesen beide eine Inhibition der Hämagglutination durch den seltenen Zucker Sucrose nach. Hieraus konnte erstmals die Schlussfolgerung gezogen werden, dass es sich bei Lektinrezeptoren um verschiedenartige Kohlenhydratgruppen, zugehörig zur Glycocalix, also der Zelloberfläche, handeln könnte. Unabhängig voneinander beschrieben sowohl RENKONEN (1948) als auch BOYD und REGUERA (1949) die unterschiedliche Stärke der Hämagglutination in Abhängigkeit von der jeweiligen Blutgruppe und wiesen auf diese Art und Weise für bestimmte Lektine eine Blutgruppenspezifität nach. BOYD verwendete daraufhin gemeinsam mit SHAPLEIGH 1954 erstmals den Terminus Lektin [abgeleitet vom lateinischen legere: auswählen], der ältere Bezeichnungen wie "Phytagglutinin", "Phythämagglutinin", "Phasin", "Normalantikörper", "pflanzliche Antikörper", "natürliche Antikörper" oder "antikörperähnliche Substanzen" verdrängte und sich bis heute durchgesetzt hat (ROTH, 1978; KOCOUREK, 1986; SHARON, 1987).

#### 3.3. Struktur und Bindungseigenschaften der Lektine

Obwohl die weit mehr als hundert heute bekannten Lektine zum Teil größte strukturelle Vielfalt aufweisen, bestehen dennoch einige grundlegende Gemeinsamkeiten. So präzipitieren alle Lektine definitionsgemäß zuckerhaltige Strukturen und führen in der Folge zu Agglutination von Zellen.

Somit muss jedes Lektin mindestens 2 Zuckerbindungsstellen pro Molekül enthalten: es wird von der sog. "Multivalenz" der Lektine gesprochen. Diese Definition nimmt eindeutig Proteine immunogenen Ursprungs aus: Lektine sind damit klar von spezifischen Antikörpern zu trennen (SHARON, 1977; ALROY, 1984; SHARON, 1987). Im Gegensatz zu den sich strukturell untereinander sehr ähnelnden Antikörpern, d.h. Immunoglobulinmolekülen, variieren Lektine z.T. außerordentlich stark in Bezug auf Molekulargewicht, Aminosäure-Zusammensetzung, Metallionenbedarf als Cofaktoren und dreidimensionale Struktur. Das Molekulargewicht der Lektine schwankt dabei zwischen 30.000 und etwa 400.000 Da. In der Regel bauen sich die Lektine aus 2-4 Untereinheiten zusammen. Einige Lektine (z.B. Horseshoe crab- lectin) bestehen unüblicherweise jedoch aus über 20 Untereinheiten und gehören damit zusammen mit dem pentameren Immunoglobulin M zu den größten proteinogenen Strukturen überhaupt. Meist enthält dabei jede der Untereinheiten ie eine Zuckerbindungsstelle; im Regelfall sind die Zuckerbindungsstellen der verschiedenen Untereinheiten eines Lektins identisch. Bekannt sind allerdings auch Ausnahmen mit verschiedenen Zuckerbindungsstellen innerhalb ein und desselben Lektins (nach SHARON, 1987). Bis auf wenige Ausnahmen wie Concanavalin A (Con A), Wheat germ agglutinin (WGA) oder das Peanut agglutinin (PNA) handelt es sich bei den Lektinen meist um Glycoproteine. Die Bedeutung dieser Glycosylierung ist jedoch noch nicht geklärt. Nach SHARON (1987) nimmt sie nämlich offenbar an der Bindungstätigkeit des jeweiligen Lektins nicht teil. Die Zuckerspezifität der Lektine ist grundsätzlich durch jenes Monosaccharid definiert, das im Vergleich zu anderen die lektinbedingte Hämagglutination bzw. Präzipitation von Zellen am wirksamsten hemmt. Zu beachten ist allerdings, dass viele Lektine eine deutlich stärkere Affinität zu Oligosacchariden als zu Monosacchariden zeigen. Für einige Lektine sind sogar ausschließlich Inhibitoren in Form von Oligosacchariden bekannt (SHARON, 1977; ALROY, 1984; GOLDSTEIN und PORETZ, 1986; SHARON, 1987; SHARON und LIS, 1995; BROOKS et al., 1997). In der Regel erfolgt die Bindung der Lektine an die terminalen Glycosylgruppen der Polysaccharide oder Glycoproteine.

Ausnahmen bilden als Beispiel Con A, das auch an interne Mannose- (Man) Strukturen bindet oder WGA, das neben terminalen Zuckern auch interne N-Acetylgalactosamin- (GalNAc) Reste erkennt (GOLDSTEIN und PORETZ, 1986). Einige Lektine sind nach SHARON (1987) zudem in der Lage, Aminosäureassoziierte Zucker zu erkennen. Die stets reversible Bindung (vgl. dazu LANDSTEINER 1902) erfolgt durch Van-der-Waals- und London-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen und besonders über Wasserstoffbrückenbindungen. Im Allgemeinen werden hierbei einige strukturelle Variationen am C2-Atom des gebundenen Zuckers toleriert. Bezüglich der Stellung der Hydroxylgruppen am C<sub>3</sub>und C<sub>4</sub>-Atom besteht dagegen eine nur sehr geringe Toleranz. Ebenfalls häufig in die Bindung einbezogen werden die Hydroxylgruppen des C<sub>6</sub>-Atom und etwas seltener auch die des C<sub>5</sub>-Atom (nach GOLDSTEIN und PORETZ, 1986; SHARON, 1994 und SHARON u. LIS, 1995). Die dreidimensionale Struktur der Zuckerbindungsstelle ist bisher erst bei nur wenigen Lektinen vollständig geklärt. So bilden die Untereinheiten einiger aus Leguminosen isolierter Lektine (z.B. Con A oder Pisum sativum agglutinin [PSA]) eine kuppelförmige Gestalt mit einer flachen Kavität am Scheitelpunkt dieser Kuppel. Diese taschenförmige Inzisur stellt die Zuckerbindungsstelle und damit das sogenannte aktive Zentrum dieses Lektins dar. In den bisher untersuchten Lektinen aus der Pflanzen-Gruppe der Leguminosen sind an der Bindung die Aminosäuren Asparagin, Aspartat und Glycin beteiligt. Es ist vom sog. "Invarianten Anteil" des aktiven Zentrums des Lektins die Rede. Solche invarianten Anteile sind im Bindungsbereich verschiedener Lektinfamilien bekannt, allerdings jeweils mit spezifischer Aminosäurezusammensetzung. Die räumliche Struktur der Bindungstasche wird des Weiteren durch Anordnung einer Reihe von variablen Aminosäuren bestimmt. Von besonderer Bedeutung für die Bindung im Falle der Leguminosen-Lektine sind außerdem Metallionen wie etwa Mangan (Mn<sup>2+</sup>) und/oder Calcium (Ca<sup>2+</sup>), die die Rolle eines indirekten Aktivators zu spielen scheinen, indem sie auf die Positionierung der Aminosäuren in der aktiven Bindungstasche des Lektins einwirken und so die Bindungsspezifität und -affinität positiv beeinflussen. Metallionen sind für etliche weitere Lektine für die Bindung von Zuckern unentbehrlich, z.T. wie bei dem oben genannten Beispiel aus strukturellen Gründen, z.T. auch als direkter Bindungspartner für den Zucker.

Ein Beispiel für ein solches chemisches Verhalten ist unter anderem die Gruppe der sog. Ca<sup>2+</sup>-abhängigen C-Typ-Lektine der Säugetiere (nach *SHARON*, 1994). Der Vollständigkeit halber sei weiterhin erwähnt, dass neben den zuckerspezifischen Bindungsstellen für einige wenige Lektine auch Bindungsstellen für kohlenhydratfreie Liganden vorkommen können (*GOLDSTEIN* und *PORETZ*, 1986).

## 3.4. Funktionelle Kategorisierung der verschiedenen Lektine

Heute wird die chemische Gruppe der Lektine in der Regel nicht mehr - wie früher nach ihrer Herkunft, sondern nach ihrer Zuckerspezifität kategorisiert. So teilen GOLDSTEIN und PORETZ 1986 die Lektine klassisch in folgende Kategorien ein (dabei liegen die aufgeführten Zucker, wenn nicht extra vermerkt, jeweils als D-Isomer vor):

Kategorie 1: Glucose (Glc)- bzw. N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc)-bindende
Lektine
Kategorie 2: Galactose (Gal)- bzw. N-Acetyl-Galactosamin (GalNAc)-bindende
Lektine
Kategorie 3: L-Fucose (Fuc)- bindende Lektine
Kategorie 4: Mannose (Man)- bindende Lektine
Kategorie 5: Oligosaccharide/Sialinsäure (Ol/NANA)-bindende Lektine

Auch andere Autoren nehmen eine der vorangegangenen ähnliche Kategorisierung vor (SHARON, 1994).

 Tab. 1: Überblick über die übliche Lektin-Kategorisierung der in den Untersuchungen verwendeten

 Lektine

Abkürzung	Ausführliche Bezeichnung	Lektin-Kategorie/Monosaccharid-Spezifität
1. Kategorie:	GlucNAc-Gruppe	
DSL	Datura stramonium-Lektin	N-Acetyl-Glucosamin
G(B)SL-II	Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia	N-Acetyl-Glucosamin

Abkürzung	Ausführliche Bezeichnung	Lektin-Kategorie/Monosaccharid-Spezifität
LEL	Lycopersicon esculentum (Tomate)	N-Acetyl-Glucosamin
STL	Solanum tuberosum (Kartoffel)	N-Acetyl-Glucosamin
WGA	Triticum vulgaris/Wheat germ agglutinin (Weizen-Keim)	N-Acetyl-Glucosamin
s-WGA	Triticum vulgaris/Wheat germ agglutinin (Weizen-Keim)	N-Acetyl-Glucosamin

#### 2. Kategorie: GalNAc-Gruppe

ACL/ACA	Amaranthus caudatus	Galactose; N-Acetyl-Galactosamin
BPL	Bauhinia Purpurea	Galactose; N-Acetyl-Galactosamin
DBA	Dolichos biflorus (Afrikanische Pferdebohne)	Galactose; N-Acetyl-Galactosamin
ECL	Erythrina cristagalli	Galactose; N-Acetyl-Galactosamin
G(B)SL-I B4	Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia	Galactose; N-Acetyl-Galactosamin
Jacalin	Artocarpus integrifolia (Brotfruchtbaum, JACK-Frucht)	Galactose; N-Acetyl-Galactosamin
MPL	Maclura pomifera (Osage-Orangen-Baum)	Galactose; N-Acetyl-Galactosamin
RCA-I	Ricinus communis (Rizinusbohne)	Galactose; N-Acetyl-Galactosamin
SBA	Glycine max (Sojabohne)	Galactose; N-Acetyl-Galactosamin
SJA	Sophora japonica (Japanischer Pagoden-Baum)	Galactose; N-Acetyl-Galactosamin
PNA	Arachis hypogaea (Erdnuss)	Galactose; N-Acetyl-Galactosamin
VVA/VVL	Vicia villosa	Galactose: N-Acetvl-Galactosamin

#### 3. Kategorie: Fucose-Gruppe

UEA-I	Ulex europaeus (Europäischer Stechginster)	Fucose		
4. Kategorie: Mannose-Gruppe				
Con A	Canavalia ensiformis (JACK-Bohne/(Schwertbohne)	Mannose; Glucose		
PSA	Pisum sativum (Gartenbohne)	Mannose; Glucose		
LCA	Lens culinaris (Linse)	Mannose; Glucose		
5. Kategorie: Oligosaccharid-Gruppe				
PHA-E	Phaseoulus vulgaris-Erythro-Agglutinin (Rote Kidney-Bohne)	Oligosaccharide; Polysaccharide		
PHA-L	Phaseolus vulgaris-Leuco-Agglutinin (Rote Kidney-Bohne)	Oligosaccharide; Polysaccharide		

Im Rahmen der Lektin-Kategorisierungen können bei den einzelnen Gruppen folgende Besonderheiten gesehen werden:

- **3.4.1. Kategorie 1-Lektine:** Deutlich uneinheitlich stellt sich die Gruppe der **Glucose-** und **GlcNAc**-bindenden Lektine dar: sie setzt sich aus sehr verschiedenartigen Lektinen zusammen, die alle eine vorrangige Spezifität für GlcNAc oder ihre  $\beta$ -1-4 gebundenen Oligomere aufweisen. In diese Gruppe lassen sich die Lektine der botanischen Familien *Solanaceae, Leguminosae* und *Graminaceae* einordnen. Allerdings wird GlcNAc neben Lektinen dieser Gruppe auch von einigen weiteren Vertretern der Man-Kategorie gebunden die Bindung fällt in diesem Fall aber auffallend schwächer aus.
- **3.4.2. Kategorie 2-Lektine:** Der Gruppe der **Gal** bzw. **GalNAc**-bindenden Lektine werden die ältesten bekannten Phytagglutinine wie etwa die Lektine aus *Ricinus communis* oder *Abrus precatorius* zugeordnet. Bei den Vertretern dieser Kategorie handelt es sich bis auf wenige Ausnahmen um Glycoproteine, die für ihre Zuckerbindung Metallionen wie Mn<sup>2+</sup> und/oder das Erdalkalimetall Ca<sup>2+</sup> benötigen.
- **3.4.3. Kategorie 3-Lektine: L-Fuc**-bindende Lektine werden aus sehr unterschiedlichen Quellen isoliert. Sie konnten bisher sowohl in Pflanzen als auch in Pilzen und Tieren gefunden werden. Das bekannteste Lektin aus dieser Gruppe ist das *Ulex europaeus I- agglutinin* (UEA I).
- **3.4.4. Kategorie 4-Lektine:** Lektine mit einer Bindungsspezifität für **Mannose** stammen in der Regel aus Samen der botanischen Gruppe der Hülsenfrüchtler (Familie *Leguminosaceae*). Auch Con A, das derzeit am besten untersuchte Lektin, stammt aus dieser Gruppe. Die meisten der Manbindenden Lektine setzen sich aus 4 Untereinheiten (Domänen) zusammen, bilden also Tetramere: aus je 2 leichten α-Ketten ("light chains") und 2 schweren β-Ketten ("heavy chains").

Die Lektine dieser Gruppe benötigen weiterhin Metallionen, insbesondere Mn<sup>2+</sup> und/oder Ca<sup>2+</sup>, für die Zuckerbindung. Ihre Aminosäure-Primärstruktur ist reich an sauren und hydroxylierten Aminosäuren, enthält aber auffälligerweise wenige oder gar keine der Schwefel-haltigen Aminosäuren Cystein und Methionin. Alle zu dieser Gruppe gehörigen Lektine zeichnen sich durch eine Mitogenität für Lymphozyten aus.

3.4.5. Kategorie 5-Lektine: Die Gruppe der Lektine der Oligosaccharid- und/oder NANA-bindenden Lektine kann aus Invertebraten isoliert werden, nur wenige Ausnahmen auch aus Pflanzen. Die NANA-spezifischen Lektine zeichnen sich nach GOLDSTEIN und PORETZ (1986) häufig durch eine große Zahl von Untereinheiten (oft mehr als 20) ("Eicosamere") aus.

#### 3.5. Allgemeines über die Funktionen der Lektine in vivo

Bis heute ist die eigentliche biologische Funktion der Lektine noch weitgehend ungeklärt. Einige Lektine sollen zu einer Art unspezifischem pflanzlichem Abwehrsystem gehören. So wird von unterschiedlichen Autoren beschrieben, wie bestimmte Lektine recht spezifisch an Pilz-Hyphen binden können, was in der Folge zu einer Inhibition des Wachstums führt und einen pflanzlichen Keim auf diese Weise zu schützen vermag (nach BROOKS et al., 1997). Des Weiteren sollen sie an der Wasser- und Raum-sparenden Speicherung von Eiweißmolekülen in den Proteinkörpern von Leguminosen-Samen mitwirken. Auch die Fixierung von Stickstoff-bindenden Bakterien (Rhizom-Bakterien aus der Gattung *Acetobacter*) an Pflanzenwurzeln der Leguminosen und Kleeartigen soll von Lektinen vermittelt werden (nach ROTH, 1978 und FRANZ, 1990). Neben Lektinen pflanzlicher Herkunft sind aber auch Lektine mikrobieller Herkunft bekannt, die der Adhäsion solcher Mikroorganismen an ihre Zielzellen dienen sollen. Diese als "mikrobielle Adhesine" bezeichneten Moleküle scheinen eine entscheidende Rolle als Kommunikations-Moleküle oder für verschiedenartige Zell-Zell-Interaktionen zu spielen; so zum Beispiel beim sogenannten "targeting", der Anheftung von Mikroorganismen an epithelialen Oberflächen oder auch bei der Bindung und Erkennung zwischen Bakterien und Bakterien-phagozytierenden Zellen (nach MIRELMAN und OFEK, 1986; SHARON und LIS, 1993; LINDHORST, 2000). Auch im Säugetier-Organismus können mittlerweile Lektine nachgewiesen werden. Das weitaus bekannteste – bisher aber unbenannt gebliebene - ist im Augenblick das Gal- und NANAspezifische Lektin der Leber, dessen Funktion in der Eliminierung gealterter Glycoproteine liegen soll. Zuletzt sei noch erwähnt, dass viele Lektine pflanzlicher Herkunft deutliche mitogene und andere proliferative Wirkungen auf Lymphozyten, insbesondere T-Lymphozyten, ausüben (nach FRANZ, 1990) (vgl. Abschnitt 3.4.1).

#### 3.6. Lektin-Histochemie

#### 3.6.1. Allgemeines und Historie

Mit dem in der modernen Medizin zunehmenden Interesse an der Glycobiologie (insbesondere im Zusammenhang mit der Exploration der Zell-Zell-Erkennung, Zell-Kommunikation, rheumatoiden Erkrankungen und der Krebsforschung) gewann auch die Lektin-Histochemie mehr und mehr an Bedeutung. Angewendet wird sie heute dabei zur Lokalisation von Kohlenhydratresten verschiedener Glycokonjugate wie Glycoproteinen, Glycolipiden etc. (LINDHORST, 2000). Die Zucker-spezifischen Lektine lassen sich ähnlich wie mono- oder polyklonale Antikörper bei Zell- und Gewebepräparaten anwenden. Sie können dabei sowohl bei lichtund elektronenmikroskopischen Arbeiten als auch zur Sichtbarmachung von elektrophoretisch aufgetrennten Glycoproteingemischen eingesetzt werden. Lektine stellen somit ein sehr nützliches Werkzeug für eine Charakterisierung und die empirische Erforschung der Verteilungsmuster und Funktionen von Glycokonjugaten dar. Im Augenblick werden bereits über 100 Lektine kommerziell vertrieben (BROOKS et al., 1997). Annähernd alle sind in verschiedenen Untersuchungen an Tier und Mensch bereits mit klassischen Methoden der Lektinhistochemie zum Einsatz gekommen.

## 3.6.2. Definition

Die Lektinhistochemie kann nach BROOKS et al., 1997 definiert werden als *Bindung* eines Lektins an einen gewebsassozierten Kohlenhydratrest, dargestellt durch einen geeigneten makroskopisch oder mikroskopisch sichtbaren Marker. Hieraus ableitbar sind die Grundvoraussetzungen für die lichtmikroskopische Lektin-Histochemie:

- 1. ein passendes Lektin-Isolat
- 2. das obligatorische Erhalten der Kohlenhydratstruktur im zu untersuchenden Zell- oder Gewebepräparat
- 3. ein geeigneter lichtmikroskopisch sichtbarer Marker

Der Erhalt der Kohlenhydratstruktur ist dabei stark abhängig von der Art der Präparation der zu untersuchenden Zellen oder Gewebe. Zur Wahl stehen grundsätzlich 2 verschiedenartige Methoden: die Paraffin-Einbettung bzw. der Kryostat-Schnitt. Dabei ist nach BROOKS et al. (1997) zu beachten, dass es während Entwässerung des Präparates bei der Vorbereitung der zur Paraffineinbettung, der sogenannten "aufsteigenden alkoholischen Reihe", zum Herauslösen aller Lipide und Lipoide und damit auch zum Verlust von Glycokonjugat-Lipiden des zu untersuchenden Gewebes kommt. Zur Sichtbarmachung der Bindungen zwischen Lektin und Glycokonjugat kommen bei der Anwendung der sogenannten indirekten Methode Enzyme (enzymatische Umwandlung eines Chromogen-Substrates in ein im Lichtmikroskop gut sichtbares farbiges Endprodukt) oder fluoreszierende Marker in Frage.

*Indirekte Methoden* arbeiten mit markierten Antikörpern, die gegen das eingesetzte Lektin gerichtet sind oder auch mit Vitamin H, also Biotin-konjugierten Lektinen (wie in dieser Arbeit), die über markiertes Streptavidin sichtbar gemacht werden.
Auch die Verwendung Biotin-gekoppelter Antikörper ist dabei möglich. Zur Bindungsspezifität kann neben Überprüfung der der Lektinfärbung eine Zuckerhemmung durchgeführt werden. Hierbei soll die Zugabe des entsprechenden Mono- oder Oligosaccharids die Lektinbindung rückgängig machen und auf diese Weise die Zucker-Spezifität des eingesetzten Lektins beweisen. Es ist jedoch nicht selten zu beobachten, dass keine vollständige Hemmung zustande kommt. Oft ist sogar nur eine leicht verminderte Bindung zu beobachten. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass viele Lektine, wie bereits beschrieben, affiner mit Oligosacchariden als mit Monosacchariden reagieren. BROOKS et al. (1997) empfehlen, parallel an lektinhistochemische Untersuchungen obligatorisch eine Negativkontrolle durch eine Färbeprozedur unter Auslassung der Inkubations-Prozedur mit Lektinen durchzuführen.

Bei der *direkten Methode* wird dagegen ein direkt mit dem jeweiligen Marker konjugiertes Lektin eingesetzt.

### 3.6.3. Lektinhistochemische Untersuchungen am FAE und BALT verschiedener Organe des Haushuhnes

Lektinhistochemische Arbeiten an Mucosa-assoziierten lymphatischen Geweben sind bisher besonders bei verschiedenen Säugetier-Spezies durchgeführt worden. HO JANG konnte mit seiner Arbeitsgruppe 2004 die spezifische Bindung des Lektins von *Ulex europaeus* (UEA-I) an M-Zellen des Darms von Mäusen und Schweinen nachweisen. PARKS et al. zeigten 2003 wie das gleiche Lektin (UEA-I) an M-Zellen des nasal-associated lymphoid tissue (NALT) im Bereich der Rachenmandeln des Menschen spezifisch zu binden vermag. FOSTER, CLARK, JEPSON und HIRST verwendeten die Lektine UEA-I, ConA und G(B)SL 1 B4 zur Markierung von M-Zellen im FAE der Peyer-Platten der Maus. Ebenfalls in Geweben der Maus konnten TANGO et al. 2000 mit UEA-I sowohl FAE im Bereich des GALT als auch in Bereichen des BALT anfärben. CLARK, HIRST und JEPSON beschreiben 2000 und 2003 erneut wie Lektine als Bioadhäsine zur Applikation mukosaler Vaccinen, verschiedener mukosale Pharmaka und Mikropartikel in Geweben des Darms dienen können. MANTIS und Mitarbeiter können 2000 im Kaninchen-Darm mit den Lektinen Mal-II und RCL-type I Anfärbungen von FAE-Zellen erzielen. TAKATA, OHTANI und WATANABE zeigen ebenfalls im Jahr 2000 eine Bindungs-Spezifität der Lektine UEA-I, GSL-B4, DBA und WGA für Zellen des FAE im NALT von Ratten. LO und seine Arbeitsgruppe beschreiben UEA-I 2003 als M-Zell-spezifisches Lektin im Bereich des Säugetier-FAE. Auch die Arbeitsgruppe um LAMBKIN konnte 2003 eine M-Zell-Spezifität des Lektins UEA-I an FAE-Zellen des Säugetier-Darms nachweisen. Lektinhistochemische Arbeiten an aviären Geweben liegen nur sehr spärlich vor. Die bisher vorliegenden Untersuchungen beschränken sich auf Gewebe des Verdauungsapparates. Arbeiten über Untersuchungen enteraler Gewebe des Haushuhnes durch Methoden der Lektinhistochemie liegen von folgenden Autoren vor: SUPRASERT et al. (1987), SUPRASERT und FUJIOKA (1988), ALROY et al. (1989), KATO et al. (1992), ZHOU et al. (1995), JEURISSEN et al. (1999) sowie KITAGAWA et al. (2000). Während sich die beschriebenen Arbeiten sowie die von ZHOU et al. (1995) mit der Verteilung von Kohlenhydraten auf der luminalen Epitheloberfläche in verschiedenen Darmabschnitten (SUPRASERT et al. [1987]: Colon; SUPRASERT und FUJIOKA [1988]: Caecum; ALROY et al. [1989]: Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon; ZHOU et al. [1995]: Ileum) im Allgemeinen beschäftigen, zielen die Untersuchungen von KATO et al. (1995), JEURISSEN et al. (1999) und KITAGAWA et al. (2000) auf die Detektion von spezifischen FAE-Zellen, insbesondere M-Zellen, in den Tonsillae caecales des Huhnes ab. Die drei letztgenannten Autoren kommen dabei zu außerordentlich unterschiedlichen Ergebnissen. Zur näheren Charakterisierung und Verifizierung der Ergebnisse erscheinen in diesem Sinne weitere Untersuchungen sinnvoll. KITAGAWA et al. konnten 2000 zeigen, wie die Lektine DSL, ConA und Jacalin spezifisch an M-Zell-Oberflächen des aviären Caecums binden. JEURISSEN et al. konnten mit den Lektinen SBA und WGA eine Anfärbung des Follikel-assoziierten Epithels (FAE) des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes erreichen.

Bislang liegen keine Arbeiten über lektinhistochemische Untersuchungen in den Bereichen des Respirationstraktes des Haushuhnes vor. Eine Übersicht über die bisher am Haushuhn, insbesondere am Darm des Haushuhnes, eingesetzten Lektine soll im Folgenden **Tabelle 2** geben.

**Tab. 2:** Vorliegende lektinhistochemische Untersuchungen an verschiedenen Organen, insbesondere des Darms des Haushuhnes: Literaturüberblick (modifiziert nach POHLMEYER, 2002)

Pflanzlicher Ursprung des Lektins	Lektin	Bindungsart	Autoren/Referenzen
Anguilla anguilla	AAA	Epithel Caecum	JEURISSEN et al. (1999)
Arachis hypogea	PNA	Epithel Colon	SUPRASERT et al. (1986), SUPRASERT und FUJIOKA (1988), ALROY et al. (1989), KATO et al. (1992), JEURISSEN et al. (1999), KITAGAWA et al. (2000)
Artocarpus integrifolia	AIA, Jacalin	Becherzellen Colon	KITAGAWA et al. (2000)
Canavalia ensiformis	ConA	Becherzellen Colon	SUPRASERT et al. (1986), SUPRASERT und FUJIOKA (1988), ALROY et al. (1989), KATO et al. (1992), ZHOU et al. (1995), KITAGAWA et al. (2000)
Datura stramonium	DAS	Epithel Duodenum	KITAGAWA et al. (2000)
Dolichos biflorus	DBA	Epithel Bursa FABRICII	SUPRASERT und FUJIOKA (1988), ALROY et al. (1989), KATO et al. (1992), KITAGAWA et al. (2000)
Glycine max	SBA	Caecum-Epithel	ALROY et al. (1989), KATO et al. (1992), ZHOU et al. (1995), JEURISSON et al. (1999), KITAGAWA et al. (2000)
Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia	G(B)SL-I (Isolectin B4)	Caecum-Epithel	ALROY et al. (1989), KATO et al. (1992), KITAGAWA et al. (2000)
Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia	G(B)SL-II	Bursa FABRICII	JEURISSEN et al. (1999), KITAGAWA et al. (2000)
Lens culinaris	LCA	Caecum-Epithel	ALROY et al. (1989), KATO et al. (1992), KITAGAWA et al. (2000)
Limax flavus	LFA	Colon-Epithel	SUPRASERT und FUJIOKA
Lotus tetragonolobus	LTA	Colon-Epithel	JEURISSEN et al. (1999)
Lycopersicon esculentum	LEA	Colon-Epithel	KITAGAWA et al. (2000)
Phaseolus vulgaris E	PHA-E	Colon-Epithel	KATO et al (1992), KITAGAWA et al. (2000)
Phaseolus vulgaris L	PHA-L	Colon-Epithel	KATO et al. (1992), KITAGAWA et al. (2000)

Pflanzlicher Ursprung des Lektins	Lektin	Bindungsart	Autoren/Referenzen
Pisum sativum	PSA	Colon-Epithel	KATO et al. (1992), KITAGAWA et al. (2000)
Ricinus communis	RCA-I	Colon-/Caecum-Epithel	SUPRASERT et al. (1986), SUPRASERT und FUJIOKA (1988), ALROY et al. (1989), KATO et al. (1992), ZHOU et al. (1995)
Ricinus communis	RCA-120 (II)	Colon-/Caecum-Epithel	KITAGAWA et al. (2000)
Solanum tuberosum	STA	Colon-Epithel	KITAGAWA et al. (2000)
Sophora japonica	SJA	Colon-Epithel	KATO et al. (1992), KITAGAWA et al. (2000)
Triticum vulgaris	WGA	Colon-Epithel	SUPRASERT und FUJIOKA (1988), ALROY et al. (1989), KATO et al. (1992), ZHOU et al. (1995), JEURISSEN et al. (1999), KITAGAWA et al. (2000)
Trythrica cristagalli	ECL	Colon-Epithel	KITAGAWA et al. (2000)
Ulex europaeus	UEA-I	Colon-Epithel, Bursa FABRICII	SUPRASERT und FUJIOKA (1988), ALROY et al. (1989), KATO et al. (1992), ZHOU et al. (1995), JEURISSEN et al. (1999), KITAGAWA et al. (2000)
Vicia villosa	VVA	Colon-/Caecum-Epithel	KITAGAWA et al. (2000)

## 4. Kohlenhydrate der Glycocalix und kohlenhydrathaltige Strukturen im Atmungsapparat des Haushuhnes

Als spezifische Kohlenhydrate bindende Proteine oder Glycokonjugat-Proteine können sich Lektine in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Bindungsspezifität an verschiedene Zuckerverbindungen unterschiedlicher zellulärer Strukturen (Glycokonjugate) anlagern. Im folgenden Abschnitt soll in Anlehnung an andere Organe des Haushuhnes und in Anlehnung an andere Tierspezies ein allgemeiner Überblick über die im aviären Atmungsapparat vorkommenden und zu erwartenden Glycokonjugate gegeben werden.

#### 4.1. Mucosale Zuckerreste

#### 4.1.1. Allgemeines

Bei respiratorischem Mucus handelt es sich nach ALLEN et al. (1984) um ein im Rahmen der sogenannten mucoziliären Clearance von epithelialen Becherzellen und anderen Drüsen abgegebenes, meist viskomucöses Gel, das sich typischerweise aus zwei Phasen zusammensetzt: einer der Tunica mucosa zugewandten fest anhaftenden hydrophoben Schicht und einer viskösen aber mobilen flüssigeren Phase. Der Mucus setzt sich zusammen aus verschiedenen hygroskopisch agierenden Glycoproteinen, Wasser, verschiedenen Makromolekülen, Elektrolyten, Mikroorganismen und abgeschilferten Epithelzell-Schollen. Hauptbestandteil des verschiedenartige. meist Schwefel-haltige Mucus sind Muzine. die als Mucopolysaccharide von den Becherzellen sezerniert werden (NEUTRA und FORSTNER, 1987). Der Proteinanteil der Muzine ist im Vergleich zu anderen stark proteinylierten Glycoproteinen sehr gering und beträgt unter Berücksichtigung besonderer tierartlicher Unterschiede etwa 20-23%. Auf den Kohlenhydratanteil entfallen dementsprechend nach WEHRMEYER (1986) und NEUTRA u. FORSTNER (1987) 70-80%.

#### 4.1.2. Glycoprotein-Struktur

Das Grundgerüst der Muzine ist die aus den 21 verschiedenen proteinogenen Aminosäuren über Peptidbindungen gebildete Oligo-Peptidkette. Innerhalb dieser lassen sich sehr regelmäßig zwei Bereiche unterscheiden. Einer dieser Bereiche ist hochglycosyliert und enthält neben anderen Aminosäuren auffallend oft (> 50mol%) das pseudocyclische <u>P</u>rolin, die essentielle Aminosäure <u>T</u>hreonin und das stark polare <u>S</u>erin – es ist dann von der sogenannten *PTS-Region* die Rede.

Der jeweils andere Bereich, im direkten Vergleich mit der PTS-Region der deutlich kürzerer Abschnitt der Peptidkette, erweist sich dagegen als nur wenig glycosyliert und stellt den sogenannten "nackten Polypeptidstrang" dar, der deutlich geringere Konzentrationen der Aminosäuren Threonin und Serin besitzt. Dieser Bereich dient der Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen zu anderen Glycoproteinmonomeren durch Vorkommen der Sulfhydrylgruppen-tragenden Aminosäure Cystein, was schließlich eine Stabilisierung der Muzine durch Polymerbildung bedingt (nach NEUTRA und FORSTNER, 1987; VAN KLINKEN, 1998). Trotz zum Teil erheblicher Variationen in Art, Anzahl und Kombination der auf diesem Polypeptidstrang aufsitzenden Kohlenhydrate, lassen sich dennoch einige Gemeinsamkeiten im Aufbau der Muzine feststellen: Für die Bindung der Oligosaccharidketten an den Peptidstrang kommen prinzipiell zwei Möglichkeiten in Frage. Eine erste ist die Anheftung über eine O-glycosidische Bindung im Bereich der PTS-Region. Bei einer solchen Art von Bindung stellt jeweils ein α-glycosidisch an Serin oder Threonin gebundenes GalNAc das Bindeglied zwischen Protein- und Kohlenhydratanteil – das sogenannte oligosaccharid-core - dar. Da die auf diese Art gebundenen Glycoproteine den Hauptbestandteil des Mucus bilden, werden sie auch als mucinlike glycoproteins bezeichnet. Solche mucin-like glycoproteins sind allerding auch anderenorts anzutreffen, so z.B. als wichtiger Bestandteil der Phospholipid-Bilayer der biologischen Membranen. Für die Core-Region dieser Glycoproteine vom Muzintyp werden verschiedene Strukturen nachgewiesen. Die häufigsten sind die im Folgenden aufgezeigten (modifiziert nach NEUTRA und FORSTNER, 1987; MONTREUIL, 1987; KOBATA und TAKASAKI, 1992):

Diagramm 1a: Übersicht über die häufigsten Morphologien der core-Region der Glycoproteine vom Muzintyp (NEUTRA und FORSTNER, 1987; MONTREUIL, 1987 et al.)





Auf die core region folgt die sogenannte backbone region. Diese Struktur setzt sich bei allen Glycoproteinen vom Muzintyp aus Gal und GlcNAc zusammen. Die Bindung kann dabei auf zweierlei Weise stattfinden: Gal (β 1-3) GlcNAc oder Gal (β 1-4) GlcNAc. Monosaccharide der Peripherie werden im Gegensatz zu den βgebundenen Zuckern der core und backbone region α-glycosidisch verknüpft. Bei allen O-Glycanen sind dies Gal, GalNAc, Fuc und NANA. Der Zuckeranteil im Oglycosidischen Bereich der unterschiedlichen Mucopolysaccharide setzt sich folglich aus ingesamt 5 verschiedenen Monosacchariden zusammen: Gal, GalNAc, GlcNAc, Fuc und NANA. Bei den häufig sulfatierten Muzinen liegt zusätzlich ein an Gal, GalNAc oder GlcNAc gebundener Sulfatrest vor, der über spezielle Coenzym-Systeme angeheftet wird (NEUTRA und FORSTNER, 1987). Die zweite Möglichkeit für die Bindung von Oligosaccharidketten an den Polypeptidstrang ist die Nglycosidische Bindung. Während SCHACHTER und WILLIAMS 1982 über das Fehlen dieses Bindungstyps in den Muzinen berichten, beschreiben dagegen DEKKER und STROUS 1990 diese im Bereich der Cystein-reichen Region, die im Vergleich zur PTS-Region nur wenig glycosyliert ist (nach VAN KLINKEN, 1998). Die N-glycosidische Bindung erfolgt im Gegensatz zur O-glycosidischen als Dolicholphosphat-gesteuerte Verknüpfung von GlcNAc mit der Aminogruppe von Asparagin. Unter den sogenannten N-Glycanen können grundsätzlich drei verschiedene Typen unterschieden werden: Ein Mannose-reicher Typ, der neben GlcNAc nur Man in zum Teil mehrfach verzweigter Form trägt. Der sogenannte komplexe Typ enthält zusätzlich auch andere Zucker wie Gal, Fuc und NANA, zum Teil auch seltene Zucker wie *Rhamnose*. Der dritte mögliche Typ der N-Glycane wird als hybrider Typ bezeichnet.

Bei ihm handelt es sich um eine Intermediärform der beiden erstgenannten - er enthält nach MONTREUIL (1987), KOBATA und TAKASAKI (1992) strukturelle Anteile des Mannose-reichen und des komplexen Typs.

## 4.1.3. Bedeutung von zuckerhaltigen Strukturen im Mucus für die Methode der Lektinhistochemie

Aufgrund des meist sehr hohen Anteils von Glycoproteinen und anderen Glycokonjugaten im Mucus ist bei Untersuchungen mit markierten Lektinen entsprechender Bindungsfähigkeit mit einer weitläufigen Anfärbung der mukoziliären Schleimschicht sowie einzelner Muzingranula in den Becherzellen des respiratorischen Epithels zu rechnen. Durch den gezielten Einsatz von Lektinkits unterschiedlicher Zucker-Spezifität kann die Verteilung verschiedener Mono- bzw. Oligosaccharide und damit das Vorkommen potentieller Adhäsions-Rezeptoren verschiedener pathogener und apathogener Mikroorganismen allerdings näher bestimmt werden.

#### 4.2. Zelluläre Zuckerstrukturen

#### 4.2.1. Die Glycocalix

#### 4.2.1.1. Allgemeines

Neben den Mucinen ist die Glycocalix der Zelle eine der zuckerreichsten Strukturen. Sie übernimmt die Funktion der Kommunikation, wodurch die Zelle mit anderen zellulären Systemen und Molekülen in Verbindung steht. Die Glycocalix wird gebildet aus Kohlenhydratketten der in den Phospholipid-Bilayer der Zellmembran eingebetteten Glycoproteine, Glycolipide und Proteoglycane. Zum Teil sind an ihrer Bildung auch Zuckerreste von Glycoproteinen und Proteoglycanen aus dem Extrazellularraum, die der Zelloberfläche anhaften, beteiligt. Diese Kohlenhydrate überziehen die gesamte Außenseite der Phospholipid-Biomembran als sogenannter *cell coat* (ALBERTS et al., 1994).

#### 4.2.1.2. Glycoproteine

Glycoproteine sind wesentlicher Bestandteil der zuckerhaltigen Komponente der Glycocalix. Es handelt sich um die bereits beschriebenen O- oder N-glycosylierten Glycoproteine. Im Gegensatz zu Mucinen überwiegen allerdings die N-glycosylierten Glycoproteine im Bereich der Zelloberfläche. O-Glycane spielen dagegen nur eine sehr untergeordnete Rolle in der Zuckersprache der Zellen (ALBERTS et al, 1994).

#### 4.2.1.3. Glycolipide

Bei den Glycolipiden handelt es sich in der Regel um Sphingoglycolipide, die im Kontrast zu den Glyceroglycolipiden stehen. Deren Grundbaustein bildet das sogenannte Ceramid, bestehend aus dem Aminodialkohol Sphingosin und je einer langkettigen ungesättigten Fettsäure. Zur Bildung von Glycolipiden wird die terminale Hydroxylgruppe des Sphingosins mit einem oder mehreren Monosacchariden verknüpft. Bei den Monosacchariden kann es sich dabei um Glc, Gal, GalNAc und/oder N-Acetyl-Neuraminsäure handeln. Die beteiligten Monosaccharide werden mit dem Grundbaustein des Sphingolipids durch Ester- oder Anhydridbindungen verknüpft. Die Grundstruktur der Glycolipide lässt sich vereinfacht durch folgende Formel darstellen:

H<sub>3</sub>C-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-CH=CH-CH(OH)-CH-CH<sub>2</sub>-O-Zucker | NH-Acyl (= Fettsäure-Rest)

Insgesamt machen die Glycolipide etwa 5% der Lipidmoleküle der extrazellulären Biomembranschicht aus (KOBATA und TAKASAKI, 1992; ALBERTS et al., 1994). Die Verankerung der Glycolipide in der Zellmembran erfolgt dabei durch den hydrophoben Grundbaustein, den Ceramidanteil. Bis heute sind über 100 Sphingolipide bekannt (SANDHOFF und LEINEKUGEL, 1990).

## 4.2.1.4. Proteoglycane, Glycosaminoglycane und verschiedene andere Mucopolysaccharide

Die 3. Strukturkomponente der Glycocylix stellen die Proteoglycane dar. Proteoglycane sind definiert als Proteine, die mindestens eine kovalent gebundene Glycosaminoglycankette Nomenklatur: "Mucopolysaccharid"-Ketten) (frühere enthalten. Glycosaminoglycane sind in der Regel über Hydroxylgruppen der Aminosäuren an den Proteinanteil gebunden, wobei es sich bei der betreffenden Aminosäure um eine proteinogene alkoholische, zumeist Serin, seltener auch Threonin, handelt. Lediglich Glycosaminoglycane vom Typ Keratansulfat I sind Nglycosidisch mit der Aminosäure Asparagin verknüpft. Dieser Typ ist Bestandteil der Cornea und ist für den Bereich des aviären BALT bisher nicht beschrieben. Hyaluronsäure ist als einziges Glycosaminoglycan nicht an ein Protein gebunden; Ausnahmen von dieser Regel sind allerdings auch schon bekannt (CARSON, 1992). Die Grundstruktur der Glycosaminoglycane beinhaltet Polysaccharidketten aus unverzweigten Disaccharideinheiten, wobei die Disaccharide dabei alternierend jeweils eine Uronsäure und ein Hexosamin (Ausnahme: Keratansulfat) enthalten. Alle Glycosaminoglycane zeichnen sich außerdem durch ihre starke negative Ladung (in der Regel kommt diese durch kovalent gebundene Sulfatreste [SO42-] zustande) und durch ihr hohes Molekulargewicht aus (KJELLÉN und LINDAHL, 1991; CARSON, 1992). Die Grundstrukturen der 5 Glycosaminoglycan-Subklassen (GAG-Typen) sind in **Tabelle 3** wiedergegeben. Bei den GAG-Typen Heparin/Heparansulfat, Keratansulfat und Hyaluronsäure besteht der Aminozucker jeweils aus GlcNAc; Chondroitinsulfat und Dermatansulfat enthalten dagegen GalNAc. Bei der Uronsäure handelt es sich entweder um Iduronsäure oder eine C6-oxidierte Glucuronsäure. Lediglich Keratansulfat enthält statt dem Uronsäure-Anteil Gal.

Mit Ausnahme von Hyaluronsäure enthalten die Glycosaminoglycane zusätzlich negative Ladungen durch kovalent verknüpfte Sulfatgruppen (nach CARSON, 1992). Beispiele für Proteoglycane der Zelloberfläche sind u.a. die Syndecan- (GAG-Typ: Chondroitinsulfat oder Hyaluronsäure) oder Betaglycan-Familie (GAG-Typen: Chondroitinsulfat oder Dermatansulfat) (nach KJELLÉN und LINDAHL, 1991; HARDINGHAM und FOSANG, 1992; ALBERTS et al., 1994).

Die Bindung der Proteoglycane an die Zelloberfläche erfolgt mittels verschiedener Anker-Mechanismen, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll. Als Beispiel sei lediglich die übliche Bindung über den sogenannten GPI-Anker, ein Inositolphosphat oder über den Proteinanteil als hydrophilen Anker erwähnt (CARSON, 1992).

GAG-Typ nach CARSON, 1992	Polymerer Anteil mit repetierenden Disaccharideinheiten	Protein-Bindungsregion
Heparin/Heparansulfat (H/HS)	6-SO3   -(α1-4)IdUA (α1-4) GicN (α1-4) GicUA (β1-4) GicNAc (α1-4) GicUA (β1-3)     2-SO3 SO3 oder AC	Gal (ß1-3) Gal (ß1-4) Xyl (ß) Ser
Dermatansulfat (DS)	-(β1-4) IdUA (α1-3) GalNAc (β1-4) GlcUA (β1-3) GalNAc (β1-4) GlcUA (β1-3)     2-SO3 4-SO4	Gal (ß1-3) Gal (ß1-4) Xyl (ß) Ser
Chondroitinsulfat (CS)	-(ß1-4) GlcUA (ß1-3) GalNAc (ß1-4) GlcUA (ß1-3)   4- oder 6-SO3	Gal (ß1-3) Gal (ß1-4) Xyl (ß) Ser
Keratansulfat (KS)	-(ß1-4) GlcNAc (ß1-3) Gal (ß1-4) GlcNAc (ß1-3) Gal (ß1-4)	Typ I (Cornea):
	6-SO3 6-SO3	GlcNAc (β1-2) Man (α1-3 oder 6) Man (β1-4) GlcNAc (β) Asn
		Typ II (Knorpel):
		GalNAc ( $\alpha$ ) Ser oder Thr
		ι (ß1-3) Gal (α2-3) Sial
Hyaluronsäure (HA)	-(β1-4) GICUA (β1-3) GICNAc (β1-4) GICUA (β1-3) GICNAc (β1-4)-	

 Tab. 3 : Glycosamin-Subklassen (GAG-Typen) (nach CARSON, 1992)

#### 4.2.2. Intrazelluläre Zuckerstrukturen

Die Präsenz intrazellulärer Zuckerstrukturen lässt sich anhand der Biosynthesewege für Glycoproteine, Glycolipide und Proteoglycane veranschaulichen:

### 4.2.2.1. Übersicht über den allgemeinen Ablauf der Glycosylierung-Stoffwechsel im endoplasmatischen Reticulum

Nach der im Anschluss an die Genexpression ablaufenden ribosomalen Proteinbiosynthese entlang des rauen endoplasmatischen Reticulums (ER) können erste Glycosylierungsschritte des zentralen Protein- bzw. Ceramidanteils bereits im endoplasmatischen Reticulum stattfinden. Dies ist der Ort der sogenannten N-Glycosylierung der Glycoproteine. Es werden zunächst im Bereich der cytosolischen Seite der ER-Membran 2 GlcNAc- und je 5 Man-Reste an das jeweilige Carrier-Lipid Dolicholphosphat gebunden. Als Donatoren der Zuckerreste dienen Nukleotidaktivierte Zucker wie UDP-Glucose. Nach einem als "Membranflipping" benannten Phänomen werden anschließend an der luminalen Seite des ER weitere 4 Man- und 3 Glc-Einheiten zugefügt, so dass letztlich ein aus 2 GlcNAc, 9 Man und 3 Glc bestehendes, zunächst Dolichol-gebundenes Vorläufer-Oligosaccharid vorliegt. Dieses Vorläufer-Oligosaccharid wird anschließend über eine entsprechende Transferase en bloc an die Aminogruppe der Aminosäure Asparagin gebunden. Das Asparagin des Proteins muss dabei in der Sequenz Asparagin – x – Serin oder Asparagin - x - Threonin (x = beliebige Aminosäure) vorliegen. Da die Übertragung des Vorläufer-Oligosaccharids sofort nach Eintritt des Asparagin ins Lumen des ER, also noch während der laufenden Proteinbiosynthese erfolgt, wird dieser Vorgang auch als sogenannter cotranslationaler Prozess bezeichnet. Anschließend erfolgt mit dem sogenannten "trimming" die Abspaltung von 3 Glc-Resten und mindestens einer Man-Einheit vom Vorläufer-Oligosaccharid. Das Ergebnis dieses als Trimmprozess beschriebenen Phänomens ist ein **N-Glycan** vom Mannose-reichen Typ (nach KORNFELD und KORNFELD, 1985; HIRSCHBERG und SNIDER, 1987;

ABEIJON und HIRSCHBERG, 1992; KOBATA und TAKASAKI, 1992; NOIVA et al., 1992; ALBERTS et al., 1994). Mit der Bildung des Ceramids beginnt dann auch die Biosynthese der Glycolipide im ER. Ob auch die Glycosylierung mit der Bindung eines Glucosyl- oder Galactosylceramids bereits hier oder wie die nachfolgenden Schritte erst im Golgi-Apparat stattfindet, ist noch nicht endgültig geklärt (SUZUKI et al., 1984, COSTE et al., 1985, 1986).

#### 4.2.2.2. Glycosylierung im Golgi-Apparat

Die im ER gebildeten Strukturen gelangen über Transportvesikel zur sogenannten Cis-Seite des Golgi-Apparates, einem weiteren Ort der Glycosylierung. Hier kann dann eine weitere Prozessierung der im ER gebildeten Mannose-reichen N-Glycane zur Bildung von hybriden und komplexen N-Glycanen führen. Zu diesem Zweck werden der bereits gebildeten Oligosaccharidkette weitere GlcNAc-, Gal- und NANA-Reste, gelegentlich auch Fuc-Reste angefügt. Die Abspaltung einiger Man-Einheiten ist ebenfalls möglich. Als Zuckerdonatoren dienen auch hier Nukleotid-aktivierte Monosaccharide (KOBATA und TAKASAKI, 1992; ALBERTS et al., 1994). Auch die O-Glycane werden im Golgi-Apparat synthetisiert. Im Gegensatz zu den beschriebenen N-Glycanen erfolgt jedoch bei ihnen als erster Schritt kein en-bloc-Transfer einer Oligosaccharidkette, sondern die posttranslationale Verknüpfung eines einzelnen Nukleotid-aktivierten GalNAc mit jeweils den Aminosäuren Serin oder Threonin. Inwieweit auch hier eine Sequenzabhängigkeit besteht, ist aber noch nicht eindeutig geklärt. Auffallend ist aber der hohe Gehalt an der Aminosäure Prolin in der Nähe der Bindungsstellen (JENTOFT, 1990; KOBATA und TAKASAKI, 1992). Auf den ersten Verknüpfungsschritt folgen während des Transportes von der Cis- zur Trans-Seite des Golgi-Apparates weitere Anheftungen von Monosacchariden mittels verschiedener Glycosyltransferasen, die zur Bildung von sogenannten core, backbone und peripheren Regionen führen (nach HIRSCHBERG und SNIDER, 1987; NEUTRA und FORSTNER, 1987; KOBATA und TAKASAKI, 1992). Die stärkste Glycosylierung findet in der Gruppe der Proteoglycane statt.

Auch hier wird zunächst nur eine kurze Oligosaccharideinheit als Proteinbindungsregion auf das Coreprotein übertragen. Allerdings findet das nicht im endoplasmatischen Reticulum statt, sondern im Golgi-Apparat. Erst im Anschluss werden dann die weiteren Zuckerreste einzeln mittels spezifischer Transferasen an diese entstandene Region angeknüpft. Neben der Polymerisation findet auch die Sulfatierung der Proteoglycane und Glycoproteine im Golgi-Apparat statt (nach KJELLÉN und LINDAHL, 1991; Carson, 1992). Eine Ausnahme bildet unter all diesen Systemen die Hyaluronsäure. Sie wird nach PREHM (1984) als Protein-freies Glycosaminoglycan durch einen Enzymkomplex in der Plasmamembran synthetisiert. Wie bereits besprochen, ist der Ort des Beginns der Glycosylierung von Glycolipiden nicht eindeutig geklärt; die nachfolgende Addition von Gal, GalNAc und NANA ist nach SANDHOFF und LEINEKUGEL (1990) dagegen ebenfalls in den Golgi-Zisternen lokalisiert. Nach Beendigung der Glycosylierung werden die Glycoproteine, Proteoglycane und Glycolipide über Transportvesikel an der Trans-luminalen Seite des Golgi-Apparates endgültig ausgeschleust, wobei der Zuckeranteil stets in das Lumen der Vesikel gerichtet ist. Über solche Transportvesikel erreichen die Zuckerstrukturen dann schließlich ihren jeweiligen Bestimmungsort: die Zelloberfläche, sekretorische Vesikel (z.B. Schleimgranula) oder die Lysosomen (NEUTRA und FORSTNER, 1987; SANDHOFF und LEINEKUGEL, 1990; CARSON, 1992).

## 4.2.2.3. Bedeutung von Zuckerstrukturen der Zelle für die Technik der Lektinhistochemie

Auf zellulärer Ebene sind bei der lichtmikroskopisch ausgewerteten Lektinhistochemie Markierungen der Zelloberfläche (Glycocalix) möglich. Im Bronchienbereich ist insbesondere eine Anfärbung der luminalen Oberfläche der Epithelzellen (Flimmerepithel) zu erwarten. Intrazellulär können durch das gehäufte Vorkommen von glycosylierten Strukturen Anfärbungen in verschiedenen Zellorganellen, darunter besonders im Bereich des Golgi-Apparates und des ER erwartet werden. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich besonders auf die Glycokonjugate der Zelloberfläche des respiratorischen Apparates des Haushuhnes, immer im Hinblick auf ihre mögliche Rezeptorfunktion für verschiedene Mikroorganismen. Durch die Kenntnis solcher Rezeptoren könnten zukünftig verschiedene Pharmaka und Vaccinen im Einsatz gegen respiratorische Krankheitserreger des Geflügels besser und zielgerichtet appliziert werden.

#### 4.3. Zuckerstrukturen des Bindegewebes

#### 4.3.1. Allgemeines

Bindegewebe setzt sich aus Bindegewebszellen und der sogenannten extracellulären Matrix (ECM) zusammen. Als interzelluläre Substanz setzt sich die ECM zusammen aus Bindegewebsfasern und der jeweiligen Grundsubstanz. Die Grundsubstanz enthält wiederum die bereits beschriebenen Proteoglycane bzw. Glycosaminoglycane. In sie eingelagert befinden sich die fibrillären, faserhaften Proteine der Bindegewebsfasern Kollagen und Elastin sowie adhäsive Glycoproteine wie Fibronektin und Elastin.

#### 4.3.2. Proteoglycane und Glycosaminoglycane

Der extrazelluläre Raum wird hauptsächlich durch die hochmolekularen Aggregate aus Glycosaminoglycanen und Proteoglycanen ausgefüllt. Die Grundstrukturen entsprechen den bereits unter Kap. 4.1.4. beschriebenen (vergl. Tabelle II.) (nach HEINEGÅRD und PAULSSON, 1984; ALBERTS et al., 1994).

#### 4.3.3. Kollagene

Kollagen besteht aus 3 umeinander gewundenen Polypeptidketten ("triple-helix" – "super coil"), die sich vor allem aus den Aminosäuren Glycin, Prolin, Hydroxyprolin und Hydroxylysin zusammensetzen. Hydroxylysin kann im ER glycosyliert werden (nach KIVIRIKKO und MYLLYLÄ, 1984). Die Kohlenhydrateinheiten bestehen dabei aus Gal oder einem Disaccharid aus Glc und Gal, wobei die Bindung immer Oglycosidisch zwischen dem C1-Atom der Gal und der Hydroxylgruppe von Hydroxylysin erfolgt. In den Kollagenvorläufern, den sogenannten Prokollagenen, kommen auch N-glycosylierte Bereiche vor ("Mannose-reicher Typ"). Diese Bereiche werden im weiteren Verlauf der Biosynthese des Kollagens abgespalten (MILLER, 1984). Aufgrund der unterschiedlichen Molekularstrukturen werden im Augenblick 15 verschiedene Kollagen-Typen unterschieden: unter anderem Faser-bildende, Basalmembran-bildende oder fibrillassoziierte Typen. Die verschiedenen Typen sind dabei unterschiedlich stark glycosyliert (VAN DER REST und GARRONE, 1991). Im Gegensatz zu Kollagen enthält Elastin keinen Hydroxylysin-Bestandteil und liegt auch nicht glycosyliert vor (ALBERTS et al., 1994).

#### 4.3.4. Adhäsive Glycoproteine

Neben den Kollagenen sind auch adhäsive Glycoproteine in die Grundsubstanz eingelagert. Das bekannteste unter ihnen ist das Fibronektin, ein hochmolekulares Glycoprotein aus 2 über ein Disulfidbrücken-Paar verbundenen Untereinheiten. Der Kohlenhydratanteil ist N-glycosidisch an den Proteinanteil geknüpft. Neben Fibronektin befinden sich des weiteren Laminin, Entactin und zahlreiche weitere Glycoproteine in der ECM (nach HAKOMORI et al., 1984).

Abschließend sei noch auf die Struktur der Basallamina, einer Sonderform der extracellulären Matrix, eingegangen. Während die Grundsubstanz von Fibroblasten gebildet wird, wird die Basal-Lamina von den ihr aufsitzenden Zellen synthetisiert.

Sie setzt sich dabei in der Regel aus Kollagen Typ IV, dem Proteoglycan Perlecan (GAG-Typ: Heparansulfat) und den Glycoproteinen Laminin und Entactin zusammen (nach INOUE, 1989; ALBERTS et al., 1994).

## 4.3.5. Bedeutung von Zuckerstrukturen des Bindegewebes für die Lektinhistochemie

Durch das Vorkommen verschiedener Glycosaminoglycane, Glycoproteine und Kollagene der extracellulären Matrix muss auch im Bereich bindegewebiger Strukturen mit Anfärbungen beim Einsatz von markierten Lektinen gerechnet werden. Die lektinhistochemische Anfärbung von Bindegewebe steht allerdings nicht im primären Interesse der vorliegenden Arbeit und darf als Nebenaspekt im Rahmen der Untersuchungen betrachtet und gewertet werden.

### 5. Funktion und Bedeutung von Kohlenhydratresten auf epithelialen Oberflächen des respiratorischen Systems des Haushuhnes

#### 5.1. Kohlenhydrate als Rezeptoren für Mikroorganismen

Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche sind für die Zell-Zell-Kommunikation und Zell-Zell-Erkennung beispielsweise beim Ablauf immunogener Reaktionen und Interaktionen von größter Bedeutung, so z.B. während der Embryogenese oder bei der Adhäsion von Leukozyten an Blutgefäßwände im Rahmen des sogenannten "rolling" und "sticking". Auch für die Anheftung verschiedener Mikroorganismen an Epithelien sind Kohlenhydratreste auf der Oberfläche von Epithelzellen verantwortlich (nach SHARON und LIS, 1993). Viele Bakterien tragen Zelloberflächenstrukturen, als sogenannte Adhäsine bezeichnet, die mit hoher Spezifität an bestimmte Zuckerreste zu binden vermögen. Adhäsine dieser Art werden allgemein auch als *bakterielle Lektine* bezeichnet (nach OFEK und DOYLE, 1994).

Das bekannteste Beispiel für ein bakterielles Lektin ist das von LINDHORST zuletzt im Jahr 2000 beschriebene Mannose-spezifische Adhäsin von Escherichia coli auf den Typ-1-Fimbrien dieser Bakterien-Spezies. Es ist jedoch zu beachten, dass die meisten Bakterien mehr als nur einen Adhäsin-Typ ausbilden und die Anheftung selbst durch verschiedene weitere dann Faktoren (z.B. hydrophobe Wechselwirkungen, Einfluss anderer Oberflächenmoleküle) beeinflusst wird (nach OFEK und DOYLE, 1994). Zusammenfassungen der Kohlenhydratspezifitäten weiterer bakterieller Lektine finden sich bei MIRELMAN und OFEK (1986) und OFEK und DOYLE. 1994. Als Rezeptoren für bakterielle Lektine dienen Kohlenhydratabschnitte, wie sie auch im Mucus oder auf zellulären Oberflächen des respiratorischen Apparates vorkommen. Für den Darm sind verschiedene Zuckerreste in der Schleimschicht und auf den epithelialen Oberflächen als Rezeptoren für Bakterien der residenten Flora, probiotisch wirkende Bakterien (z.B. Lactobacillus animalis und Lactobacillus fermentum) (nach GUSILS et al., 1999), aber auch für pathogene Mikroorganismen beschrieben (nach HIRSH, 1985; FORSTNER und FORSTNER, 1994). Neben den Bakterien nutzen auch Viren solche Methoden der Kommunikation zum "targeting" ihrer Zielzellen. Ein für das Haushuhn bedeutsames Virus ist das Influenza-A-Virus, dessen Hämagglutinin (HA) ebenfalls als Lektin bezeichnet werden kann. Das HA des Influenza-A-Virus bindet spezifisch an Sialinsäure, aviäre Stämme insbesondere an NANA-α2-3 Gal der respiratorischen Organe (nach SHARON und LIS, 1989). Ein weiteres Beispiel bieten REHMANI und SPRADBOW (1995) in einer Untersuchung der Rezeptoren des Newcastle-Krankheit-Virus (Paramyxovirus 1). In ihrer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das Virus an die Enterozyten von Duodenum, Jejunoileum, Caecum, Colorectum und schließlich verschiedene Epithelzellen des Atmungsapparates bindet, nicht aber an die Epithelzellen von Oesophagus, Ingluvies und Drüsenmagen; in Anlehnung an ALROY et al. (1989) nehmen sie als Grund für das jeweilige Bindungsverhalten eine unterschiedliche Zugänglichkeit der Zuckerreste auf den jeweiligen Epithelzellen an. Unterschiedliche Zuckerstrukturen entlang des Gastrointestinaltraktes, des Harnund Geschlechtsapparates und des respiratorischen Systems spielen vermutlich auch bei der Interaktion zwischen Protozoen und Wirtszelle eine Rolle.

So verfügen verschiedene Protozoen über Lektine bzw. Lektin-ähnliche Kohlenhydrat-bindende Proteine, mit deren Hilfe sie an entsprechende Zucker auf der Zelloberfläche des Wirtes binden können. Als Ursache für verschiedene aviäre Atemwegserkrankungen kommt u.a. aus dem Reich der Protozoa der Gattung Trichomonas aus dem Stamm der Sarcomastigophora größere Bedeutung zu.

### 5.2. Aerosolische, orale oder kloakale Vaccinierung über Kohlenhydrat-haltige Zielstrukturen zellulärer Oberflächen

Für den Darm und auch die luftleitenden Organe von Mensch und Tier sind Zellen beschrieben, die auf den Transport partikulärer Antigene in das darunterliegende lymphatische Gewebe spezialisiert sind. Solche Zellen wurden in der Vergangenheit von verschiedenen Autoren auch für den aviären Verdauungsapparat, insbesondere für das Caecum beschrieben, bisher allerdings nicht für die aviäre Lunge. Die Transzytose von Antigenen durch diese als M-Zellen (*microfold cells*) beschriebenen Zellen ruft nachfolgend eine mucosale Immunantwort des Wirtsorganismus hervor (nach NEUTRA et al., 1996; FREY und NEUTRA, 1997; KRAEHENBUHL et al., 1997; NEUTRA, 1998). Der innerhalb des Atmungsapparates verantwortliche Abschnitt dieses mucosalen Teils des Immunsystems ist das BALT. Aus der Funktion des beschriebenen Systems folgt, dass aerosolisch, oral bzw. auch kloakal applizierte Vaccinen für eine möglichst effektive Aufnahme eine hohe M-Zell-Oberfläche (HATHAWAY Bindungsaffinität zur zeigen sollten und KRAEHENBUHL, 1999) und neben der partikulären Struktur möglichst über einen Liganden verfügen sollten, der mit M-Zell-Oberflächen-Komponenten in Interaktion treten kann. Von besonderem wissenschaftlichen Interesse und kritischer Bedeutung ist somit die Architektur der M-Zell-Oberfläche. Da die Glycokalix der M-Zellen reich an komplexen Kohlenhydraten ist, die allesamt als Rezeptoren für lektinartige Moleküle in Betracht kommen können, kommen neben bakteriellen Adhäsinen und Immunoglobulinen auch Lektine als sogenannte targeting molecules für die orale Vaccinierung in Frage (nach FREY und NEUTRA, 1997; LEHR, 2000).

Dass die vermehrte Anheftung bzw. Aufnahme von Lektin-gekoppelten Partikeln an bzw. durch M-Zellen grundsätzlich möglich ist, konnte von NEUTRA et al. im Jahre 1987, JEPSON et al. im Jahre 1996 und auch MANTIS et al. (2000) am Beispiel der Peyer-Plaques des Kaninchens sowie von CHEN et al. (1996) und FOSTER et al. (1998) am Mäuse-Modell, gültig für die Peyer-Plaques und tonsilläre M-Zellen, nachgewiesen werden.

### 5.3. Kohlenhydrate im Rahmen der oralen oder aerosolischen

#### antiadhäsiven Therapie

Das Zustandekommen Lektin-vermittelter Adhäsionen von Mikroorganismen an zelluläre Oberflächenstrukturen ist ein entscheidender Schritt in Hinblick auf die daraus resultierende Infektion eines Organismus. Umgekehrt kann durch Störung der Ligand-Rezeptor-Interaktion zwischen Mikroorganismus und Zielzelle die Besiedelung epithelialer Oberflächen verhindert und die Infektkette so - wie SHARON und LIS 1993, NI und TIZARD, 1996, SHARON, 1996 und schließlich LINDHORST 2000 beschreiben - unterbrochen werden. Als antiadhäsives Agens kommen dabei zum einen Zucker (es handelt sich dabei meist um Oligosaccharid-Strukturen) oder zuckerähnliche Strukturen (als sogenannte Glycomimetika beschriebene Substanzen) in Frage, die den Kohlenhydratresten auf der Oberfläche der jeweiligen Zielzellen entsprechen und so im Stande sind, mikrobielle Lektine zu blockieren (SHARON, 1996, LINDHORST, 2000). Zum anderen kann aber auch die Blockade der zellulären Rezeptoren durch Lektin-ähnliche Liganden die Adhäsion von Mikroorganismen an Epithelien wirksam verhindern, wie SHARON und LIS 1993 beschreiben. Beispiele für die Wirksamkeit dieser "antiadhäsiven Therapie" finden sich unter anderem bei SHARON und LIS (1993), BEUTH et al. (1996) und SHARON (1996). Insbesondere beim Huhn konnten ZHOU et al. (1995) durch Verwendung eines Mannose-Derivates die Anheftung von Salmonella pullorum an epitheliale Zellen des lleums weitgehend inhibieren und OYOFO et al. (1989 a und b) durch Mannose-supplementiertes Trinkwasser sogar die Kolonisation des Blinddarmes von Broilern durch einen Salmonella typhimurium-Stamm signifikant mindern.

#### 6. Abschließende Betrachtung des Literaturteils

In vielen dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Kohlenhydrate verschiedener Glycokonjugate als Rezeptoren für Bakterien, Viren und Protozoen fungieren können. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Vorkommen solcher Kohlenhydrate in den Lungen des Haushuhns, im Speziellen in immunrelevanten Bronchienabschnitten, durch Methoden der Lektinhistochemie zu untersuchen und schließlich näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck sollen zum einen die Technik der Lektinhistochemie selbst und auch verschiedene Lektine, die bisher noch keine Anwendung an der Hühnerlunge fanden, eingesetzt werden. In Hinblick auf die in Abschnitt 5 beschriebene Rezeptorfunktion sind insbesondere die Kohlenhydratreste auf der Zelloberfläche und im Mucus des pulmonalen Systems des Geflügels von Interesse. Um der Vermutung nachzugehen, dass sich das Bronchius-assoziierte lymphatische Gewebe hinsichtlich der Oberflächenstruktur von anderen Abschnitten des Bronchien-Gewebes unterscheidet, sollen im Rahmen dieser Arbeit zum BALT zu rechnende Strukturen im Vergleich zu anderen Strukturen des Respirationstraktes des Haushuhnes untersucht werden.

Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen an Präparations-Proben des BALTenthaltenden Primärbronchius durchgeführt. Zu Vergleichszwecken wurden parallel auch BALT-freie Abschnitte des Primärbronchius und auch BALT-freie Anteile der aviären Lunge wie Sekundärbronchien, Atrien und das Lungen-Parenchym in die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit miteinbezogen.

#### Abschnitt III. Material und Methoden

Ein zusammenfassender Überblick über die Methodik der in dieser Arbeit eingesetzten immunhistochemischen Verfahrensweise kann aus **Diagramm 2** gewonnen werden.

#### III. 1. Material

#### 1.1. Tiere

Für die Entnahme der zu untersuchenden Lungen standen jeweils 5 durch Blutentzug nach vorheriger Betäubung getötete Hühner (*Gallus gallus domesticus*) verschiedener Altersgruppen zur Verfügung. In der ersten Übersichtsuntersuchung wurden Lungen von 10-wöchigen Hühnern der Linie VALO der Firma Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, untersucht, die zuvor aus SPF-Hühnerbruteiern unter Standardbedingungen (Vorbrut: 37,8°C, 60% rel. Luftfeuchte; Schlupfbrut: 37°C, 80% rel. Luftfeuchte, nach SCHOLTYSSEK, 1968) in einem Instituts-eigenen Brutschrank des Institutes für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der LMU München erbrütet worden waren. Die weitere Aufzucht erfolgte dann in Gitterrostkäfigen in einem Instituts-eigenen Stall; Futter und Wasser standen ad libidum zur Verfügung. In sich anschließenden Untersuchungen wurden 3-Tage alte Küken, 1 Woche, 2 Wochen alte Hühner und 3 Wochen alte Tiere miteinbezogen.

#### 1.2. Überblick über die in dieser Arbeit eingesetzten Lektine

Die lektinhistochemischen Untersuchungen wurden am paraffinierten Präparat mit den folgenden 24 Lektinen der Firma VECTOR Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010 durchgeführt:

- Amaranthus caudatus-Agglutinin (Lektin) (ACL)
- Artocarpus-integrifolia-Agglutinin (AIA oder Jacalin)
- Bauhinia purpurea-Agglutinin (Lektin) (BPL)
- Concanavalin A (Con A)
- Datura-stramonium-Agglutinin (Lektin) (DSL)
- Dolichos biflorus-Agglutinin (DBA)
- Erythrina cristagalli-Agglutinin (Lektin) (ECL)
- Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia-Agglutinin I Isolektin B4 (G[B]SL-I)
- Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia-Agglutinin II (G[B]SL-II)
- Lens culinaris-Agglutinin (LCA)
- Lycopersicon-esculentum-Agglutinin (Lektin) (LEL)
- Maclura pomifera-Agglutinin (Lektin) (MPL)
- Peanut-Agglutinin (PNA)
- Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)
- Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin (PHA-L)
- Pisum sativum-Agglutinin (PSA)
- Ricinus communis-Agglutinin (RCA-I)
- Solanum tuberosum-Agglutinin (potato-Agglutinin) (STL)
- Sophora japonica-Agglutinin (SJA)
- Soybean-Agglutinin (SBA)
- Ulex europaeus-Agglutinin I (UEA-I)
- Triticum vulgaris-Agglutinin (WGA)
- Triticum vulgaris-Agglutinin, succinyliert (s-WGA)
- Viscum album-Agglutinin (VVA) (Mistel) (ML II)

Die deutsche Bezeichnung der Pflanzen, aus denen die jeweiligen Lektine stammen, sowie die Zuckerspezifität des jeweiligen Lektins können den **Tabellen 4** und **5** entnommen werden.

**Tab. 4:**Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Lektine, ihre Herkunft, ihrestrukturchemischen Eigenschaften und ihre Bindungs-Referenzen (modifiziert nach BROWN undHUNT 1978)

Abkürzung	Herkunft des Lektins Einordnung nach Linné Lateinischer Name Deutsche Bezeichnung (nach BOERNER, 1966)	Molgewicht	Untereinheiten (UE)
GIcNAc-Kategorie			
DSL	Datura stramonium Stechapfel	86.000 Da	2 S-Brücken verbundene UE: 40.000 und 46.000 Da
G(B)SL-II	Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia	120.000 Da	4 identische UE
LEL	Lycopersicon esculentum Tomate	100.000 Da	1
STL	Solanum tuberosum Kartoffel	100.000 Da	2 dissoziable identische UE
WGA	Triticum vulgaris/ Wheat germ agglutinin Weizen (Keim)	36.000 Da	2 identische UE
s-WGA	Triticum vulgaris/ Wheat germ agglutinin Weizen (Keim)	~36.000 Da	2 identische UE
GalNAc-Kategorie			
ACL/ACA	Amaranthus caudatus	66.000 bis	2 identische UE
BPL	Bauhinia Purpurea	176.000 Da	4 identische UE
DBA	Dolichos biflorus Afrikanische Pferdebohne	120.000 Da	4 identische UE
ECL	Erythrina cristagalli	54.000 Da	2 unterschiedliche UE: 28 000 Da und 26 000 Da
G(B)SL-I B4	Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia	~58.000 Da	Untereinheit "B" des GSL-I
Jacalin	Artocarpus integrifolia Brotfruchtbaum, JACK-Frucht	52.000 Da	4 UE: 2x 10.000 2x 16.000 Da
MPL	Maclura pomifera Osage-Orangen-Baum	40.000 bis 46.000	4 identische UE
RCA-I	Ricinus communis Rizinusbohne	120.000 Da	2 identische UE
SBA	Glycine max Sojabohne	120.000 Da	4 UE
SJA	Sophora japonica Japanischer Pagodenbaum	120.000 Da	2 identische UE
PNA	Arachis hypogaea Erdnuss	110.000 Da	4 identische UE

Abkürzung	Herkunft des Lektins Einordnung nach Linné Lateinischer Name Deutsche Bezeichnung (nach BOERNER, 1966)	Molgewicht	Untereinheiten (UE)
VVA/VVL	Vicia villosa	_	"A"- und "B"-UE
Fucose-Kategorie			
UEA-I	Ulex europaeus Europäischer Stechginster	>3000 Da	2 UE: 1x 31.000 Da 1x 32.000 Da
Mannose-Kategorie			
Con A PSA LCA	Canavalia ensiformis JACK-Bohne, Schwertbohne Pisum sativum Gartenbohne Lens culinaris Speise-Linse	104.000 Da 42.000 Da 49.000 Da	4 identische UE 4 UE: 2x 17.000 Da 2x 6000 Da 4 UE: 2x 17.000 Da 2x 8000 Da
Oligosaccharid-Kategorie			
РНА-Е	Phaseolus vulgaris Erythro-Agglutinin Rote Kidney-Bohne	125.000 Da	4 UE
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leuco-Agglutinin Rote Kidney-Bohne	125.000 Da	4 UE

**Tab. 5:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Lektine, ihren isoelektrischen Punkt, ihre

 Metallionenabhängigkeit, die inhibierenden Zucker und ihre Monosaccharid-Spezifität

Abkürzung	Isoelektrischer Punkt	Metallionen- Abhängigkeit	Inhibierende Zucker	Monosaccharid- Spezifität
GIcNAc-Kategorie				
DSL	рН 8.0	-	Chitotriose > Chitobiose >>GlcNAc	N-Acetyl- Glucosamin (GlcNAc)
G(B)SL-II	-	-	α-β-GlcNAc	A-B-GIcNAc
LEL	-	-	β-D-GlcNAc, β-(1-4) GlcNAc	β-GlcNAc
STL	-	-	β-D-GIcNAc	ß-GlcNAc

Abschnitt III. Material und Methoderi 50	Abschnitt III. Mate	erial und Methoden 50
--	---------------------	-----------------------

Abkürzung	Isoelektrischer Punkt	Metallionen- Abhängigkeit	Inhibierende Zucker	Monosaccharid- Spezifität
WGA	рН 9	-	β-D-GicNAc, β-(1-4) GicNAc-NANA, GalNAc > Lactose > Gal	A-β-GIcNAc
s-WGA	рН 9	-	β-D-GicNAc, β-(1-4) GicNAc-NANA, GalNAc > Lactose > Gal	β-GlcNAc
GalNAc-Kategorie				
ACL/ACA	рН 6.7 bis pH 7.7	-		N-Acetyl- Galactosamin (GalNAc)
BPL	-	-	100mM Lactose	β-1,3-GalNAc
DBA	pH 5.5	-	GalNAc	β-1,3-GalNAc
ECL	-	-	200mM Lactose	β-1,4-GalNAc
G(B)SL-I B4	-	-	500mM Galactose 100mM Raffinose	Galactose α-Gal, α-GalNAc
Jacalin	-	-	Methyl-α-D-Galacto- pyranoside; α-D-Galactose, 800mM Galactose 100mM Melibiose	Galactose
MPL	pH 4.7	-	500mM Galactose	GalNAc
RCA-I	-	-	200mM Galactose oder Lactose	β-Gal, β-GalNAc
SBA	рН 6.0	-	200mM GalNAc	Gal, α-, β-
SJA PNA	pH 5.5	-	200mM GalNAc 200mM Galactose	GaliNAC β-Gal, β-GalNAc Galactosyl-β- GalNAc
VVA/VVL	-	-	200mM GalNAc	α-, β-GalNAc
Fucose-Kategorie				
UEA-I	-	-	50mM - 100mM L- Fucose	<b>Fucose</b> α-Fucose
Mannose-Kategorie				
Con A	рН 5	abhängig von Ca 2+, Mg 2+	200mM α-Methyl-Mannoside	Mannose

Abschnitt III. Material und Methoden 51

Abkürzung	Isoelektrischer Punkt	Metallionen- Abhängigkeit	Inhibierende Zucker	Monosaccharid- Spezifität
PSA	рН 5.9 und pH 7.0	abhängig von Ca 2+, Mn 2+	200mM α-Methyl-Mannoside 200mM α-Methyl-Glucoside	α-Mannose
LCA	pH 8.5	abhängig von Ca 2+, Mn 2+	200mM α-Methyl-Mannoside 200mM α-Methyl-Glucoside	α-Mannose
Oligosaccharid-Kategorie				
PHA-E	pH 6.0	-	100mM Acetat	Oligo- Saccharide
PHA-L	рН 5.2	-	100mM Acetat	Oligo- Saccharide

#### III. 2. Methoden

#### 2.1. Organentnahme und Fixierung

Den frisch geschlachteten Tieren wurden jeweils beide Lungen entnommen und umgehend für mindestens 24h, abhängig von der Gewebedicke, bei Raumtemperatur in Fixationslösung nach BOUIN konserviert. Die übliche BOUIN-Lösung besteht dabei aus 150ml gesättigter wässriger Pikrinsäure, 50ml Formalin, 10ml Eisessig (100% Essigsäure). Während der Fixation war darauf zu achten, dass die Proben von genügend Fixier-Flüssigkeit überdeckt waren. Die Ansätze wurden auf einem automatischen Rüttler bewegt. Optional können die Gewebe-Proben auch in 6%iger Formalinlösung, angesetzt mit einem Anteil Phosphatpuffer oder einem Methanol-Eisessig-Gemisch in einem Verhältnis von 2:1 fixiert werden.

Die Lungen wurden dazu zunächst vorsichtig vom umliegenden Brustraum-Gewebe separiert, anschließend entlang des Septum horizontale vorsichtig freipräpariert und schließlich durch Scherenschlag von der Trachea im Bereich der Bifurcatio tracheae abgesetzt. Die entnommenen Organe mussten anschließend zunächst in die richtige Größe von etwa 1,5x3cm gebracht werden, um eine schnelle Fixierung zu ermöglichen.

War das nicht möglich, konnten die Gewebe-Proben zunächst in eisgekühlte physiologische 0,9% Kochsalzlösung verbracht und so stundenweise aufbewahrt werden. Im Anschluss erfolgte die sorgfältige manuelle Präparation des Primärbronchius, indem die Lungen-Proben entlang der Principal-Bronchien eröffnet wurden. Weitere Präparationen von Sekundärbronchien, Atrien-Abschnitten und Lungen-Parenchym waren abhängig vom Ziel der jeweiligen weiterführenden Untersuchungen.

#### 2.2. Dehydratation und Paraffineinbettung

#### 2.2.1. Dehydratation

Nach Fixierung wurden die Proben zunächst mehrfach minutenlang in 70%igem Ethylalkohol gespült und damit weitestgehend vom Fixativum Pikrinsäure befreit, um sie anschließend zur Dehydratation in eine aufsteigende Alkoholreihe verbringen zu können.

Die Dehydratation erfolgte dabei nach folgendem Protokoll:

Dehydratations-Protokoll	
1. 50%iger Ethylalkohol	stundenweise
2. 70%iger Ethylakohol	½ Tag → wechseln (hier auch konservierbar)
70%iger Ethylalkohol	½ Tag
3. 96%iger Ethylalkohol	½ Tag → wechseln
96%iger Ethylakohol	½ Tag
4. Isopropanol	½ Tag → wechseln
Isopropanol	½ Tag
5. Xylol (zur Alkohol-Verdrängung)	½ Tag → wechseln

Tab. 6: Übersicht über das Dehydratations-Protokoll

Die Proben können bei Bedarf im 70% igen Ethanol für mehrere Tage konserviert und aufbewahrt werden.

#### 2.2.2. Paraffinierung/Paraffineinbettung

An die Dehydratation anschließend wurden die Xylol-getränkten Proben mit RICHARD-ALLAN Scientific Paraffin Type 1-9 zur Einbettung nach folgendem Paraffinierungs-Protokoll weiterbehandelt:

Paraffinierungs-Protokoll	
1. Paraffin Type 1	1 Tag → wechseln
2. Paraffin Type 3	1 Tag → wechseln
3. Paraffin Type 6	1 Tag → wechseln
4. Paraffin Type 9	1 Tag → wechseln
Paraffin Type 9	1 Tag

 Tab. 7: Übersicht über das Paraffinierungs-Protokoll

Die Gewebe-Proben konnten - in Paraffin vom Typ 9 verbracht - bei Bedarf erneut für mehrere Tage konserviert werden. Die während der Dehydratation und Einwirkzeiten Paraffinierung verwendeten Konzentrationen und waren Gewebestärke-abhängig. Es war zu beachten, dass sich die in Tabellen 6 und 7 beschriebenen Angaben zur Dehydratation und Paraffinierung auf Proben mit ca. 1cm<sup>3</sup> Stärke bezogen; bei größeren Proben waren die Dehydratations- und Paraffinierungszeiten jeweils anzupassen. Waren die Proben lange genug im Paraffin mit Type 9 angereichert, wurden sie der automatisierten Einbettungsmaschine in Paraffinblöcke ausgegossen und mittels einer Kühlplatte schnell ausgehärtet oder nach Abkühlung des Paraffins auf Raumtemperatur optional für 24h in einem Gefrierschrank bei etwa -20°C weiter ausgehärtet.

#### 2.3. Anfertigung der Paraffinschnitte

Das Schneiden der Paraffinblock-Präparate erfolgte mit einem halbautomatischen Mikrotom (Rotations-Mikrotom MICROM HM 360 mit Klingen der Ausführung Feather S 35). Die Stärke der histologischen Schnitte betrug regelmäßig 5µm. Nach Transfer in ein Wasserbad mit einer Temperatur von ca. 40°C wurden die Präparate zur besseren Haftung auf beschichtete Objektträger (SUPERFROST PLUS, Firma Menzel) aufgenommen und anschließend mindestens 24h im Wärmeschrank bei etwa 36°C getrocknet.

#### 2.4. Histologie (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

Zur histologischen Auswertung, die den lektinhistochemischen Untersuchungen voranging, wurde mindestens jeweils ein Präparat pro Tier und Lungenabschnitt mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Die Entparaffinierung sowie die nachfolgende Färbung der Präparate wurden manuell und nach folgendem Protokoll vorgenommen:

Entparaffinierungs-/Rehydrierungsprotokoll	
	10 min
	10 mm
Xylol	10 min
2. Isopropanol	5 min
Isopropanol	5 min
3. 96%iger Ethylalkohol	5 min
96%iger Ethylalkohol	5 min
4. 70%iger Ethylalkohol	5 min
5. Aqua dest.	5 min



Hämalaun-Eosin-Färbe-Protokoll	
1. Hämalaun-Färbung mit Hämalaun-Gebrauchslösung	10 min
→ kurz mit Aqua dest. spülen	
ightarrow waschen unter fließendem Leitungswasser	10 min
2. Eosin-Färbung mit Eosin-Gebrauchslösung	3 min
→ waschen: Aqua dest.	30 sec
→ waschen: Aqua dest.	30 sec
$\rightarrow$ Differenzierung des Eosin	Ethanol 70%: 2-10 min
	Ethanol 96%: 5 min
	Isopropylalkohol: 2x 5 min
	Xylol: 2x 10 min
→ anschließend weiter nach Dehydratations-Protokoll	

Tab. 9: Übersicht über das Hämalaun-Eosin-Färbe-Protokoll

Anschließend wurden die einzelnen Präparate mit EUKITT®-Kunststoff auf Xylol-Basis eingedeckt und nach einer etwa 24-stündigen Trockenzeit lichtmikroskopisch bei jeweils 100-, 200-, 400- facher Vergrößerung histologisch ausgewertet.

#### 2.5. Lektinhistochemie

Die lektinhistochemischen Untersuchungen wurden mit den beschriebenen 24 verschiedenen Lektinen aus 5 Zuckerspezifität-Kategorien vorgenommen. Der Ablauf der lektinhistochemischen Untersuchung in Kombination mit der Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode) ist in **Diagramm 2** als Übersicht dargestellt.

Fixierung der entnommenen (	Drgane in gepufferter Lösung nach BOUIN
Wässern, Dehydrierer Erstellen	n und Einbetten in Paraffin Type 9, von Paraffin-Blöcken
Schneiden der Paraffinblö	cke am Mikrotom (5µm Schichtstärke)
Entparaffinierung und Re	ehydrierung der Objektträger-Schnitte
Trypsinbehandlung zur F (0,1% Trypsin in Lektin-Pl	l Freilegung versteckter Kohlenhydrate BS-Puffer; 15min Inkubation bei 37°C)
Waschen de	r Präparate in Aqua dest.
Einstellen des pH-Wertes in PBS-Lektin-Pu	(7,6) durch Überführen der Präparate ffer (3x 5minütige Inkubation)
Inkubation mit 100µl Lek in Feuchter Kammer (1h, F	tinlösung (5µg Lektin/ml Lektinpuffer) Raumtemperatur oder 24h Kühlschrank)
Waschen der F	Präparate in PBS (3x 5min)
Inkubation mit ( Dako Cytomation) Kit in feu	StreptABC Complex/HRP®- ichter Kammer (1h bei Raumtemperatur)
ا Waschen der Präparate in PBS-Lektinpuffer (3x 5min)	
Entwicklung der Meerrettich-Po (SIGMA Fast TM 3,3 (im	eroxidase (HRP) mit dem Chromogen DAB 3-Diaminobenzidine Tablet Sets) Dunkeln 20sec)
Stoppen der Reaktion unt	er fließendem Leitungswasser (10min)
Gegenfärben mit Hän	nalaun in Aqua dest. (1:1) (45sec)
"Bläuen" durch Was	chen in Leitungswasser (10min)
Dehydrierung der gefärbten Ge	ewebeschnitte in aufsteigender Alkoholreihe
Eindecken in	EUKITT® auf Xylol-Basis
Lichtmikroskopiso	he Auswertung der Präparate

Diagramm 2: Übersicht über den Ablauf der lektinhistochemischen Färbereihen

#### 2.5.1. Vorbereitung der Präparate zur Lektinhistochemie

Für die lektinhistochemischen Untersuchungen wurden die Präparate jeweils so vorbereitet wie in den Punkten **2.1.** und **2.3.** bereits dargestellt. Für jeden Untersuchungsgang wurden mindestens 3 Lungenquer- oder Lungenlängsschnitte pro Tier und Probe angefertigt. Bei den Altersgruppenuntersuchungen wurden pro Tier und Altersgruppe je 5 Präparate angefertigt. Die Präparate einer Altersgruppe stammten dabei jeweils von verschiedenen Tieren.

#### 2.5.2. Entparaffinierung und Rehydratation

Die Entparaffinierung und Rehydrierung wurde manuell zur Vorbereitung auf das lektinhistochemische Verfahren nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Entparaffinierungs-/Rehydrierungs-Protokoll		
1. Xylol	10 min	
Xylol	10 min	
2. Isopropanol	5 min	
Isopropanol	5 min	
3. 96%iger Ethylalkohol	10 min	
96%iger Ethylalkohol	10 min	
4. 70%iger Ethylalkohol	10 min	
5. Aqua dest.	10 min	

Tab. 10: Übersicht über das Entparaffinierungs- und Rehydrierungs-Protokoll

#### 2.5.3. Trypsinbehandlung

Zur Demaskierung versteckter Antigenstrukturen wurde die Trypsinbehandlung gewählt; die Präparate wurden für jeweils 15 Minuten in eine 37°C warme Trypsinlösung (Zubereitung: 0,1% Trypsin in Lektinpuffer-Lösung) überführt.

Die Verdauungsreaktion wurde anschließend durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten der Gewebeschnitte in Aqua dest. abrupt beendet.

#### 2.5.4. Lektin-Inkubation

Zur Vorbereitung auf die sich anschließende einstündige Lektininkubation wurden die Präparate zunächst für 5 Minuten in PBS-Lektinpuffer gegeben, um eine Einstellung des pH-Wertes auf 7,6 (pH-Optimum für die Lektinhistochemie) zu erreichen. Es erfolgte daran anschließend eine doppelte Wiederholung der PBS-Inkubation für jeweils 5 Minuten. Überschüssige Flüssigkeit wurde anschließend mit einem saugfähigen Material unter vorsichtiger Schonung des Präparates von den Objektträgern entfernt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit ca. 100µl Lektin-Gebrauchslösung (5µg Biotin-konjugiertes Lektin auf 1ml PBS-Lektinpuffer-Lösung) pro Präparat überschichtet und für ca. 1h in einer Feuchten Kammer bei Raumtemperatur oder 24h bei Kühlschranktemperatur inkubiert. Nicht-gebundenes Lektin wurde im Anschluss durch erneutes dreimaliges Waschen für je 5 Minuten in PBS-Lektinpuffer (pH 7,6) entfernt.

#### 2.5.5. Inkubation mit Streptavidin-Enzym-Konjugat

Zur Markierung der Biotin-konjugierten Lektine fand ein kommerzielles Testkit der Firma Dako Cytomation (Strept.ABC-Complex/HRP®) Verwendung. Hierbei handelt es sich um ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Streptavidin. Nach Entfernung der überschüssigen PBS-Lektinpuffer-Flüssigkeit wurden die Präparate anschließend mit jeweils etwa 50µl der Streptavidin-ABC-Complex/HRP®-Gebrauchslösung überschichtet und für etwa 1h bei Raumtemperatur oder 24h bei Kühlschranktemperatur in einer Feuchten Kammer inkubiert. Anschließend erfolgte wieder ein dreimaliges 5minütiges Waschen in PBS-Lektinpuffer-Lösung.

#### 2.5.6. Entwicklung der Farbreaktion der Gewebe-Schnitte

Zur Sichtbarmachung der markierten Lektine wurden die Präparate für etwa 20 Sekunden mit einer frisch angesetzten DAB-Chromogen-Lösung (SIGMA Fast <sup>™</sup> 3,3-Diaminobenzidine Tablet Sets) bei Dunkelheit überschichtet. Die Reaktion wurde im Anschluss durch Spülen unter fließendem Leitungswasser für etwa 10 Minuten abrupt gestoppt.

#### 2.5.7. Gegenfärbung, Eindeckung und lichtmikroskopische Auswertung

Zur besseren Differenzierung der Kern-Plasma-Verhältnisse und der unterschiedlichen histologischen Strukturen erfolgte anschließend eine 45sekündige Gegenfärbung in einer Hämalaun/Aqua dest.-Lösung in einem Verhältnis von 1:1. Anschließend wurden die Präparate mit einem Eindeckmittel auf Xylol-Basis (EUKITT®) eingedeckt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

#### 2.6. Kontrollen

# 2.6.1. Überprüfung der Zuckerspezifität (Zuckerhemmung/glycosidische Hemmung)

## 2.6.1.1. Überprüfung der Zuckerspezifität mit Glc, GlcNAc und Gal, GalNAc, und Man

Zur Überprüfung der Zuckerspezifität der eingesetzten Lektine wurde zunächst eine 200mM Lösung desjenigen Monosaccharides, das der Spezifität des jeweils eingesetzten Lektins entspricht (Gal, Glc, Man, GlcNAc oder GalNAc), in PBS-Lektinpuffer angesetzt. Parallel dazu wurde von dem zu untersuchenden Lektin eine Lösung in der Konzentration von 20µg Biotin-konjugiertem Lektin pro ml PBS-Lektinpuffer erstellt.

Beide Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und eine Stunde auf einem Rollmischer inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Präparate wie unter den Abschnitten 2.5.1. bis 2.5.3. beschrieben vorbereitet und für 5 Minuten in PBS-Lektinpuffer überführt. Im Anschluss daran wurden die Präparate mit jeweils 100µl der Lektin-Zucker-Lösung überschichtet und etwa 1h bei Raumtemperatur in einer Feuchten Kammer inkubiert. Danach folgte ein dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten. Das weitere Vorgehen entsprach dem in den Abschnitten 2.5.5. bis 2.5.7. beschriebenen. Auf die Gegenfärbung mit Hämalaun wurde dabei verzichtet. Parallel zu jeder Zuckerhemmung wurde jeweils eine Positivkontrolle (entspricht der unter Abschnitt 2.5. beschriebenen Lektinfärbung) und eine Negativ-Kontrolle (vgl. Abschnitt 2.6.2.) durchgeführt.

#### 2.6.1.2. Überprüfung der Zuckerspezifität mit Chitotriose

Die unzureichenden Ergebnisse der Monosaccharid-Hemmung machten es für die Lektine CMA II, DAS und LEA erforderlich, zur Überprüfung der Bindungsspezifität das Trisaccharid Chitotriose (3 GalNAc-Reste) einzusetzen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Chitotriose wurde die Zuckerlösung hier nur auf 100mM angesetzt. Die Konzentration der Zuckerlösung betrug demnach nach Inkubation mit den Lektinlösungen (vgl. Abschnitt 2.6.1.1.) statt 100mM (wie bei den Monosaccharid-Tests) nur 50mM. Die weitere Verfahrensweise gestaltete sich dann wie bei der Hemmung durch die Monosaccharide (vgl. Abschnitt 2.6.1.1.).

#### 2.6.1.3. Überprüfung der Spezifität für Neuraminsäure

Die Gebrauchslösung für dieses Testverfahren wurde hergestellt, indem 10 Einheiten Neuraminidase zu 70ml Natriumacetatpuffer (0,5M, pH 5,5) gegeben wurden. Die Präparate wurden entparaffiniert und, wie unter Abschnitt 2.5.3. bereits beschrieben, mit Trypsin behandelt. Anschließend wurden die Objektträger mit der Präparatseite nach unten auf eine spezielle Schiene in einer Feuchten Kammer gelegt.
Bei dieser Verfahrensweise bleibt ein schmaler Spalt zwischen Schienenboden und Präparat. In diesen Spalt wurde dann die oben genannte Neuraminidaselösung pipettiert. Die Feuchte Kammer wurde anschließend abgedichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die so vorbehandelten Präparate zunächst dreimal 5 Minuten mit PBS-Lektinpuffer gewaschen und anschließend mit je 100µl der entsprechenden Lektinlösung (10µg Biotin-konjugiertes Lektin/ml Lektinpuffer) überschichtet und für 1h bei Raumtemperatur in einer Feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS-Lektinpuffer-Lösung für jeweils 5 Minuten wurde wie in den Abschnitten 2.5.5. bis 2.5.7. beschrieben mit der Färbung fortgefahren. Auch hier wurde jeweils auf eine Gegenfärbung mit Hämalaun verzichtet, Positiv- und Negativkontrollen wurden wie in unter den Abschnitten 2.6.1.1. bzw. Kap. 2.6.2. beschrieben durchgeführt.

### 2.6.2. Negativ-Kontrollen

Es wurde parallel zu jeder Untersuchung und für jede Altersgruppe mindestens eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Für die Negativ-Kontrolle wurde das Protokoll der Lektinfärbung (vgl. Abschnitt 2.5.) wie beschrieben eingehalten, allerdings unter Aussparung der Lektinzugabe (vgl. Abschnitt 2.5.4.). Die Präparate wurden stattdessen mit 100µl des reinen Lektin-PBS-Puffer-Systems (pH 7,6) überschichtet.

# Abschnitt IV. Ergebnisse

## IV.1. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen in der HE-Färbung

Es soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit an dieser Stelle nur zusammenfassend auf die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der untersuchten Präparate eingegangen werden, wobei insbesondere die Strukturen des FAE und BALT besondere Berücksichtigung finden werden. Zudem soll auch auf altersabhängige Besonderheiten und Unterschiede eingegangen werden.

Zur Übersicht über die verschiedenen Abschnitte der lektinhistochemischen Untersuchungsreihen der Haushuhn-Lunge sollen zunächst ein SEM-Bild, dann eine Bild-Serie histologischer Färbepräparate (**Abb. 1** und **2-4**) dienen:





Abb. 1 SEM-Aufnahme: Übersicht Primärbronchius → Sekundärbronchius → Atrien

- blau: Primärbronchius
- blaue Kante: FAE
- rot: Sekundärbronchius
- gelb: Atrien
- grün: Lokalisation der BALT-Strukturen an den Übergängen des Primär- in den Sekundärbronchius

Abb. 2 Übersichtsaufnahme eines Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparates: Primärbronchius, <u>11</u> Wochen altes Tier, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) (5x):

Übersicht über den Primärbronchius (→) und angrenzende Abschnitte des Sekundärbronchius (→); an den Übergängen von Primär- in Sekundärbronchius Lokalisation der BALT-Knoten (→); in den Bildrändern Ausschnitte angrenzender Atrien (\*).



Abb. 3 Übersichtsaufnahme eines Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparates: Atrien, <u>11</u> Wochen altes Tier, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE):

Übersicht über einen Atria-Bereich (\*) im histologischen Schnitt (5x).

Abb. 4 Übersichtsaufnahme eines Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparates: Parenchym, <u>11</u> Wochen altes Tier, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE):

Übersicht über einen Parenchym-Ausschnitt (Parabronchiuswand). Mit (↓) sind Atrien markiert, die sich distal in das Lungen-Parenchym fortsetzen (5x).

# 1.1. Histologie des Primärbronchius

Der Primärbronchius durchzieht an der Bifurcatio tracheae etxrapulmonal beginnend bis caudal reichend die aviäre Lunge. Das den Primärbronchius der Lunge des Haushuhns auskleidende Epithel stellt sich als einschichtiges, mehrreihiges, Cilien tragendes Epithel ("Flimmerepithel") (vgl. **Abb. 5**) dar.



#### Abb. 5 Ausschnitt aus dem Epithel des Primärbronchius:

Mehrreihiges Epithel des Primärbronchius mit Cilien-besetzten Epithelzellen und eingestreuten Becherzellen (↓) (40x).

Besonders im proximalen, der Lungenbasis nahe gelegenen Drittel, kamen punktuell eingestreut intraepitheliale Becherzellen vor, deren Inhalt sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung nur schwach eosinophil anfärben ließ. Die Zahl der Becherzellen konzentrierte sich dabei auf das mittlere Drittel des Primärbronchius-Epithels. Zu den Randbereichen hin verringerte sich ihre Zahl, während in den Übergangs-Bereichen zum Sekundärbronchius in allen untersuchten Präparaten keine Becherzellen mehr gesehen werden konnte. Eine Lamina propria mucosae war in den mittleren Anteilen des Primärbronchius gut entwickelt, verlor sich aber allmählich ebenso wie die Zahl der Becherzellen hin zu den marginalen Anteilen. Bei den 10 bis 11 Wochen alten Tieren konnten vereinzelt subepitheliale Lymphozyten gesehen werden. Eine Tunica muscularis war im Primärbronchius sowohl als Stratum longitudinale als auch als Stratum circulare in allen Bereichen nur sehr schwach entwickelt. Die Ringmuskelschicht der Lamina muscularis mucosae und die Tunica muscularis ließen sich mikroskopisch kaum voneinander unterscheiden. Von außen war das Lungengewebe von einer einschichtigen Zell-Lage umgeben, die regional von Bindegewebszellen unterlagert wurde.

## 1.1.1. Follikel-assoziiertes Epithel (FAE)

Das einschichtige Follikel-assoziierte Epithel überzog das Bronchius-assoziierte lymphatische Gewebe (BALT) (vgl. **Abb. 6**) und anliegende Strukturen im Primärbronchius.



Abb. 6 Ausschnitt aus einem einen BALT-Knoten abdeckenden Follikel-assoziierten Epithel (FAE):

Flach-quaderförmige Epithelzellen des FAE (↑) als abdeckendes Epithel eines BALT-Knotens eines 10 Wochen alten Haushuhnes (40x). FAE kam in allen untersuchten Organen aller Altersstufen, insbesondere in den Randbereichen des Primärbronchius vor. Es zeichnete sich, im Vergleich zu den umgebenden Deck-Epithelzellen des Primärbronchius, durch ein Fehlen von Becherzellen und Cilien-tragenden Epithelzellen aus (vgl. **Abb. 7**). Die FAE-Zellen waren im Gegensatz zu den in der Regel hochprismatisch geformten übrigen Epithel-Zellen des Primärbronchius flach-quaderförmig, an den äußersten Kanten des Primärbronchius wieder langgestreckt, hochprismatisch geformt. Die direkten Übergänge zum Sekundärbronchius zeichneten sich durch besonders platte FAE-Zellen aus, die einem einschichtigen Plattenepithel ähnelten. Innerhalb des Sekundärbronchius vergrößerten sich die Epithelzellen wieder zu hochprismatisch geformten Zellen (vgl. **Abb. 8**).



#### Abb. 7 Ausschnitt aus dem FAE eines <u>10</u> Wochen alten Tieres:

Hochprismatische Zellen des Primärbronchiusepithel wechseln in flachquaderförmige Zellen des FAE (↓); Becherzellen kommen im FAE nicht vor (40x).



#### Abb. 8 Ausschnitt aus einem einen BALT-Knoten abdeckenden Follikel-assoziierten Epithel eines <u>11</u> Wochen alten Tieres:

Innerhalb des Sekundärbronchius wechseln die flach-quaderförmigen FAE-Zellen wieder in hochprismatische Epithelzellen (↓); auch im Sekundärbronchius bleibt das Epithel frei von Becherzellen (40x).

# 1.1.2. Bronchius-assoziiertes lymphatisches Gewebe (BALT)

BALT-Knoten (vgl. **Abb. 9-11**) konnten deutlich ausgebildet insbesondere in den Primärbronchien der 10 und 11 Wochen alten Tiere gesehen werden.

Dabei erstreckten sich die BALT-assoziierten Gewebe in allen Präparaten meist auf die Randbereiche des Primärbronchius und insbesondere auf die Übergänge zum Sekundärbronchius. In der Altersgruppe der 3 Tage alten Tiere konnten nur in einem Organ vereinzelt lymphozytäre Ansammlungen unterhalb des FAE gesehen werden, die im deutlichen Kontrast zu den 10 und 11 Wochen alten Tieren disseminiert erschienen. In den Primärbronchien aller anderen 3 Tage alten Tiere konnte keine Ausbildung von Lymphozyten-Aggregaten beobachtet werden. Die Primärbronchien der 1 Woche alten Tiere erwiesen sich als frei von BALT-Knoten.



#### Abb. 9 Ausschnitt aus dem Primärbronchius eines <u>8</u> Wochen alten Haushuhnes:

Deutliche Ausbildung von BALT-Knoten an den Übergängen des Primärbronchius in die Sekundärbronchien (10x).

Abb. 10 Ausschnitt aus dem Primärbronchius eines <u>10</u> Wochen alten Haushuhnes:

Sichtbar ist die Ausbildung einer bindegewebigen Membran (↓), die den BALT-Knoten vom übrigen Gewebe des Primärbronchius abtrennt (40x).

Erste Entwicklungen einer BALT-Knoten- ähnlichen Struktur konnten bei den Tieren der Altersgruppe 3 Wochen gesehen werden. Im Vergleich zu den 10 und 11 Wochen alten Tieren, bei denen sich die BALT-Knoten zumeist in mehrere Einzelknoten unterteilen ließ, blieben die BALT-Knoten aller anderen Altersgruppen deutlich weniger ausgeprägt und schwächer ausdifferenziert.



Abb. 11 Ausschnitt aus Primärbronchius eines <u>11</u> Wochen alten Tieres:

Starke Entwicklung eines BALT-Knotens an der Aufzweigungsstelle des Primär- in den Sekundärbronchius (20x).

### 1.2. Sekundärbronchius

Das Epithel des Sekundärbronchius ging kontinuierlich aus dem beschriebenen Epithel des Primärbronchius hervor. Die Epithelzellen des Sekundärbronchius erwiesen sich in allen untersuchten Präparaten als zunächst quaderförmig und stark abgeplattet. Im weiteren Verlauf des Sekundärbronchius nahmen sie wieder an Höhe zu, konnten als iso- bis hochprismatisch beschrieben werden. Die Epithelzellen waren Cilien-frei und ohne jede übrige Art von Zellanhängen. Becherzellen kamen im Epithel des Sekundärbronchius nicht vor. FAE und BALT konnten im Sekundärbronchius in keinem der untersuchten Präparate gefunden werden. Sowohl die Tunica mucosa als auch die Tunica muscularis stellten sich in der mikroskopischen Untersuchung des Sekundärbronchius besonders dünn und unscheinbar dar.

### 1.3. Atrien

Das Epithel der Atrien in der Wandung der "Lungenpfeifen" war ein einschichtiges, flaches bis isoprismatisches Epithel, nur an wenigen Stellen kamen vereinzelt auch hochprismatische Zellen vor. In verschiedenen Präparaten konnten intrazelluläre Einschlüsse beobachtet werden, was auf eine mögliche Phagozytoseaktivität des Atrium-Epithels schließen ließ. Eine zur Überprüfung dieses Phänomens im Rahmen einer fortführenden Arbeit vorgenommene Applikation von Tusche-Partikeln in vivo konnte die Vermutungen durch Vorkommen von Tuschetröpfchen in den Epithelzellen der Atrien bei den verschiedenen Altersgruppen bestätigen (**Abb. 12** und **13**). Eine wie im Primär- und Sekundärbronchius beobachtete deutlich ausgebildete Lamina propria mucosae und Tunica muscularis fehlen in den Atrien.



Abb. 12 Blick auf Atrien-Epithel eines <u>11</u> Wochen alten Tieres <u>1h</u> nach Applikation von Tuschepartikeln in vivo (Hämalaun-Färbung):

Dunkle Verfärbung des Atrien-Epithels († ) mit vermutlicher Endocytose von Tusche in die Atrien-Epithelzellen (40x).



Abb. 13 Blick auf Atrien-Epithel eines <u>11</u> Wochen alten Tieres <u>2h</u> nach Applikation von Tuschepartikeln in vivo (Hämalaun-Färbung):

Deutliches Vorkommen von Tuschepartikeln im Bereich der Atrienepithelien mit vermutlicher Endocytose von Tuschepartikeln in die Zellen des Atrium-Epithels (20x).

## 1.4 Parenchym

Das Lungenparenchym wurde gebildet aus den einzelnen Wandungen der Parabronchien, den Atria, die sich als dicht verwobenes Zellsystem darstellten. Besonders bei den 3 Tage und 1 bis 3 Wochen alten Tieren erschien das Lungenparenchym dicht gepackt und stark ineinander verzweigt. In einzelnen Präparaten konnten vereinzelt ins Parenchym eingestreut großkernige runde Zellen beobachtet werden, die der Lymphozytenreihe zurechenbar sind.

## IV.2. Ergebnisse der lektinhistochemischen Untersuchungen

In allen untersuchten Präparaten aller Altersgruppen konnen verschiedene Bindegewebsstrukturen schwach bis stark markiert werden. Solche Anfärbungen verschlechterten teilweise durch erhöhte Hintergrundfärbung den Kontrast der zu untersuchenden Gewebe. Diese Anfärbungen sind nicht Thema der vorliegenden Arbeit und finden im Folgenden weitestgehend keine Beachtung. Ziel dieser Arbeit war die spezifische Darstellung der Oberflächenstrukturen der Lunge des Haushuhnes durch lektinhistochemische Methoden. Besondere Berücksichtigung im Rahmen dieser Arbeit sollen die Ergebnisse der lektinhistochemischen Anfärbbarkeit von zellulären Oberflächenstrukturen des Primärbronchius, Sekundärbronchius, des FAE, des Atriumepithels und schließlich des Parenchyms der Lunge des Haushuhnes finden. Dabei erfolgte die Zuordnung der Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen den Lektin-Kategorien. Eine Übersicht über die Anfärbbarkeit der verschiedenen Strukturen der aviären Lunge geben die **Tabellen 11a** und **11b**.

**Tab. 11a :** Übersicht über die Ergebnisse der lektinhistochemischen Färbereihen mit den Lektinen der 5 verschiedenen Zucker-Kategorien im Bereich des Flimmerepithels, der Becherzellen, des FAE und BALT-assozierter Zellen des Primärbronchius und der Epithelien und subepithelialen Bereiche des Sekundärbronchius

Lektin	Primärbronchius				Sekundärbronchius	
	Flimmer- Epithel	Becher- Zellen	FAE	Zellen des BALT	Epithelzellen	subepitheliale Zellen
Kategorie 1:						
GlcNAc-Gruppe						
DSL	++	-	-	+	++	-

# Abschnitt IV. Ergebnisse 70

Lektin	Primärbronchius				Sekundärbronchius	
	Flimmer- Epithel	Becher- Zellen	FAE	Zellen des BALT	Epithelzellen	subepitheliale Zellen
GSL-II	-	-	+++ subepitheliale Zellen	++ vereinzelte Zellen	-	+
LEL	+	-	-	-	-	-
STL	+	-	-	-	++	-
WGA	-	-	+++ Randbereiche	-	-	-
s-WGA	-	-	+++ Randbereiche	-	-	-
Kategorie 2: GalNAc-Gruppe		1	1	1	I	1
ACL	++ nahe der Becherzellen	+	+ vereinzelte Zellen	-	+	-
BPL	++ nahe der Becherzellen	+	+ vereinzelte Zellen	-	+	-
DBA	+	-	-	-	-	-
ECL	+	-	+++ einzelständige Zellen	-	-	-
GSL-I B4	-	-	-	-	-	-
AIA/Jacalin	+++	+++	-	-	+++	-
MPL	++ nahe der Becherzellen	+	+ vereinzelte Zellen	-	+	-
RCA-I	+	-	-	-	+	-
SBA	-	-	+++ einzelständige Zellen	-	-	-
SJA	-	-	-	-	-	+
PNA	+	-	-	-	-	+
VVA	-	-	+++ einzelständige Zellen	-	-	-
Kategorie 3: Fucose-Gruppe						
UEA-I	-	-	+++ subepitheliale Zellen	++ vereinzelte Zellen	-	-

Lektin	Primärbronchius				Sekundärbronchius	
	Flimmer- Epithel	Becher- Zellen	FAE	Zellen des BALT	Epithelzellen	subepitheliale Zellen
Kategorie 4: Mannose-Gruppe						
Con A	++	++	-	-	+	-
PSA	-	-	-	+ vereinzelte Zellen	-	-
LCA	-	-	-	+ vereinzelte Zellen	-	-
Kategorie 5:						
Oligosaccharide/Sialinsäure-Gruppe						
PHA-E	-	-	-	-	-	-
PHA-L	-	-	-	-	-	-

### Legende zur Tabelle 11a:

- : keine Färbung
- + : schwache Färbung

++ : mäßige Färbung

+++: starke Färbung

**Tab. 11b:** Übersicht über die Ergebnisse der lektinhistochemischen Färbereihen mit den Lektinen der 5 verschiedenen Zucker-Kategorien im Bereich der Atrienepithelien und des Lungenparenchyms des Haushuhnes

Lektin	Atrium		Parenchym
	Epithel	Subepitheliale Zellen	einzelne Zellen
Kategorie 1: GlcNAc-Gruppe			
DSL	+	-	-

Lektin	Atrium	Atrium Parenchym			
	Epithel	Subepitheliale Zellen	einzelne Zellen		
GSL-II	-	+++ vereinzelte große, runde Zellen	+++ vereinzelte große, runde Zellen		
LEL	+	-	-		
STL	-	-	-		
WGA	+++		-		
s-WGA	+++		-		
Kategorie 2: GalNAc-Gruppe	1	1			
ACL	+ unregelmäßig	-	-		
BPL	+ unregelmäßig	-	-		
DBA	-	-	- starke Anfärbung des Bindegewebes		
ECL	+ vereinzelt	-	-		
GSL-I B4	-	-	- starke Anfärbung des Bindegewebes		
AIA/Jacalin	-	-	- starke Anfärbung des Bindegewebes		
MPL	+ unregelmäßig	-	-		
RCA-I	-	-	-		
SBA	-	-	-		
SJA	-	-	-		
PNA	-	-	-		
VVA	-	-	-		
Kategorie 3: Fucose-Gruppe					
UEA-I	-	-	- schwache Anfärbung des Bindegewebes		
Kategorie 4: Mannose-Gruppe					
Con A	-	-	- starke Anfärbung des Bindegewebes		
PSA	-	-	-		
LCA	-	-	-		

Lektin	Atrium		Parenchym	
	Epithel Subepitheliale Zellen		einzelne Zellen	
Kategorie 5: Oligosaccharide-/Sialinsäure-Gruppe				
PHA-E	-	-	- schwache Reaktionen des Bindegewebes	
PHA-L	-	-	- schwache Reaktionen des Bindegewebes	

### Legende zur Tabelle 11b:

- : keine Färbung
- + : schwache Färbung
- ++ : mäßige Färbung
- +++: starke/stärkste Färbung

### 2.1. Primärbronchius



Abb. 14 Übersichtsbild über einen Primärbronchius eines <u>11</u> Wochen alten Tieres (HE):

Das Lumen des Primärbronchius ist grau hinterlegt (5x).

Verschiedene Strukturen des Primärbronchius (vgl. **Abb. 14**) konnten grundsätzlich mit Lektinen der GlcNAc-, der GalNAc-Gruppe, der Fucose- und Mannose-Gruppe, in keinem Fall aber mit Lektinen der Oligosaccharid-Gruppe (PHA-E und PHA-L) dargestellt werden. Lektine der Mannose-Gruppe erzeugten allgemein starke, flächenhafte Farbreaktionen verschiedener Abschnitte des Primärbronchius, während die Anwendung von Lektinen aus der GlcNAc- und GalNAc-Gruppe schwächere, lokalisierte Farbreaktionen innerhalb des Primärbronchius ergab.

## 2.1.1. Flimmerepithel

### 2.1.1.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie

Kategorie 1- Lektine: GIcNAc-Gruppe

- DSL
- GSL-II
- LEL
- STL
- WGA
- S-WGA

Aus der GlcNAc-Kategorie zeigten nur DSL, LEL und STL positive Reaktionen mit dem Flimmerepithel des Primärbronchius. Diese Reaktion der Lektine DSL, LEL und STL erwies sich allerdings als unregelmäßig und konnte nur bei einzelnen Tieren aller Altersgruppen, insbesondere aber bei den 1-3 Wochen alten Tieren, gesehen werden. Während DSL zu deutlichen Farbreaktionen führte, färbten LEL und STL gleichermaßen schwächer basale Anteile der Cilien-tragenden Zellen des respiratorischen Epithels. Diese Farbreaktionen konnten besonders bei den jungen Tieren im Alter von 1-3 Wochen reproduziert werden, aber auch bei den 10 und 11 Wochen alten Tieren gesehen werden (vgl. **Abb 15** und **16**).



Abb. 15 Flimmerepithel des Primärbronchius eines <u>3</u> Wochen alten Tieres; Lektin DSL:

Die basale Kinetosomenreihe (↓) der Cilienbesetzten Zellen des respiratorischen Flimmerepithels konnte mit DSL hoch affin angefärbt werden (40x).



Abb. 16 Flimmerepithel des Primärbronchius eines <u>11</u> Wochen alten Tieres; Lektin ACL:

Neben der Anfärbung des Inhaltes der Becherzellen (●) konnten deutliche Färbungen der basalen Kinetosomenreihe des Flimmerepithels (↑) erreicht werden (20x).

Die durchgeführten Untersuchungen zur Zuckerhemmung der beiden Lektine DSL und LEL konnten erst unter Zugabe des Trisaccharids Chitotriose eine Bindung der beiden Lektine antagonisieren.

Die Anwendung des GlcNAc-spezifischen *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia*-Lektins GSL-II ergab bei den 10 und 11 Wochen alten Tieren regelmäßig die Anfärbung von einzelnen großen runden Zellen, die subepithelial lokalisiert sind (**Abbildungen 17** und **18**).



Abb. 17 Primärbronchius, <u>11</u> Wochen, Lektin GSL-II:

Im Becherzell-reichen Abschnitt des Primärbronchius konnten einzelständige große runde Zellen (↑) angefärbt werden (5x).



Abb. 18 Primärbronchius, <u>11</u> Wochen, Lektin GSL-II:

Anfärbung des Atrium-Epithels; im Becherzell-reichen Abschnitt des Primärbronchius konnten große runde subepithelial gelegene Zellen angefärbt werden (†); unstetig kam es zu Färbungen des Atriumepithels (†) (40x). In einzelnen Präparaten, insbesondere in der Altersgruppe der 10 und 11 Wochen alten Tiere, konnten auch größere Konglomerate solcher Zellen mit gleicher Lokalisation angefärbt werden (vgl. **2.1.4.1.**).

### 2.1.1.2. Lektine der GalNAc-Kategorie

Kategorie 2- Lektine: GalNAc-Gruppe

٠	ACL	•	MPL
٠	BPL	•	RCA-
٠	DBA	•	SBA
٠	ECL	•	SJA
٠	GSL-I B4	•	PNA
٠	AIA/Jacalin	•	VVA

Unter den GalNAc-spezifischen Lektinen zeigten ACL, DBA, ECL, Jacalin, MPL, RCA-I und PNA positive Farbreaktionen im Bereich des Flimmerepithels des Primärbronchius. Unter Verwendung von ACL, ECL, Jacalin, MPL und RCA-I konnten teilweise starke Anfärbungen, insbesondere der basalen Anteile der Cilientragenden Zellen erreicht werden. DBA und PNA führten zu weitaus schwächeren Anfärbungen des Flimmerepithels.

### 2.1.1.3. Lektine der Fucose-Kategorie

Kategorie 3- Lektine: Fucose

• UEA-I

Das einzige in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verwendete Fucosespezifische Lektin UEA-I zeigte in allen untersuchten Präparaten aller Altersgruppen keine Affinität zu Oberflächen der Cilien-tragenden Zellen des Primärbronchius. Bei den 10 und 11 Wochen alten Tieren konnten im Primärbronchius eine Anfärbung von subepithelial gelegenen Zellen erzielt werden, wie sie vergleichbar bei der Anwendung des GlcNAc-spezifischen Lektins GSL-II vorkamen.

### 2.1.1.4. Lektine der Mannose-Kategorie

Kategorie 4- Lektine: Mannose

ConA

• PSA

• LCA

Alle verwendeten Lektine der Mannose-Gruppe (ConA, PSA und LCA) zeigten starke Affinität zu Zellen des Flimmerepithels des Primärbronchius und erzeugten starke Farbreaktionen. Besonders ConA zeigte dabei starke Spezifität für die basale Kinetosomenreihe der Cilien-tragenden Zellen des Flimmerepithels. Die Anfärbbarkeit von Zellen des Flimmerepithels konnte insbesondere bei den 3 Tage alten Tieren regelmäßig gesehen werden. Bei den 1-3 Wochen alten Tieren blieb die Färbeergebnisse in ihrer Intensität hinter denen der 10 und 11 Wochen alten Tiere zurück.

## 2.1.1.5. Lektine der Oligosaccharid-Kategorie

Kategorie 5- Lektine: Oligosaccharide

• PHA-E

• PHA-L

PHA-E und PHA-L zeigten keine Reaktivität mit Zellen des Flimmerepithels.

# 2.1.2. Becherzellen

### 2.1.2.1 Lektine der GlcNAc-Kategorie

N-Acetyl-Glucosamin-spezifische Lektine erwiesen sich in allen untersuchten Präparaten bis auf eine Ausnahme als nicht affin zu Oberflächen oder Inhalten der Becherzellen des Primärbronchius. In vereinzelten Organen führte die Anwendung des GlcNAc-Kategorie-Lektins STL zu feinsten Farbreaktionen mit dem Inhalt einzelner Becherzellen. Diese Reaktion konnte nur bei Organen von Tieren der Altersgruppe 10 und 11 Wochen gesehen werden.

### 2.1.2.2. Lektine der GalNAc-Kategorie

Mit Ausnahme der Lektine ACL, Jacalin und ECL erwiesen sich alle eingesetzten Lektine der N-Acetyl-Galactosamin-Kategorie als nicht affin zu Inhalt oder Oberfläche der Becherzellen. ACL und Jacalin erzeugte in allen Präparaten und Altersgruppen gleichermaßen starke Anfärbungen der Becherzell-Oberfläche und des Becherzell-Inhaltes, insbesondere der 1-3 Wochen alten Tiere. Unter Verwendung von ECL konnte eine nur schwache Anfärbung der Inhalte der Becherzellen erreicht werden, die sich insbesondere bei den 10 und 11 Wochen alten Tieren zeigte.

### 2.1.2.3. Lektine der Fucose-Kategorie

UEA-I führte in allen untersuchten Präparaten zu reproduzierbaren schwachen bis starken Farbreaktionen des Inhaltes von Becherzellen. Die Oberfläche der Becherzellen blieb ungefärbt. Besonders bei den 1-3 Wochen alten Tieren fielen diese Ergebnisse stark positiv aus.

# 2.1.2.4. Lektine der Mannose-Kategorie

Alle Lektine der Mannose-Reihe erzeugten allgemein starke Farbreaktionen mit Inhalt oder Oberfläche von Becherzellen. Besonders unter Anwendung von ConA konnten stärkste Anfärbungen des Becherzell-Inhaltes erzielt werden.

## 2.1.2.5. Lektine der Oligosaccharid-Kategorie

PHA-E und PHA-L zeigten in keinem der untersuchten Organe der verschiedenen Altersgruppen Affinität zu Becherzell-Inhalten oder Oberflächen, Anfärbungen blieben regelmäßig aus.

# 2.1.3. FAE

## 2.1.3.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie

Insbesondere die Lektine WGA und s-WGA und schwächer auch STL aus der Gruppe der N-Acetyl-Glucosamin-spezifischen Lektine, führten zu einer Anfärbung von Zellverbänden des FAE in den Übergangsbereichen zu den Sekundärbronchien. Die angefärbten FAE-Zellen stellten sich in der mikroskopischen Untersuchung als flache, quaderförmige Zellen dar (vgl. **Abbildung 19**). Eine solche positive Farbreaktion beschränkte sich auf die äußersten Randbereiche des FAE, konnte aber mit den gleichen Lektinen im Bereich des Atriumepithels wiederholt werden (vgl. **Abbildungen 20-34**). Das beschriebene Ergebnis konnte besonders bei den 10- und 11-wöchigen Tieren gesehen werden. Schwächer, insgesamt aber ebenfalls positiv waren die Reaktionen mit den gleichen Lektinen bei den Tieren im Alter von 3 Tagen und 1-3 Wochen. Eine Anfärbung von Epithelzellen des mittleren Drittels des Primärbronchius blieb dagegen in allen untersuchten Präparaten und Altersstufen unter Anwendung von GlcNAc-spezifischen Lektinen aus.





Abb. 19 Primärbronchius eines <u>11</u> Wochen alten Tieres, Lektin WGA:

An den Übergängen des Primärbronchius in den Sekundärbronchius konnten zusammenhängende Zellreihen aus quaderförmigen Einzelzellen eingefärbt werden (↓). Zusätzlich konnten spezifisch Atrien-Epithelien markiert werden (↑) (5x).

Abb. 20 Atrium-Epithel eines <u>11</u> Wochen alten Tieres, Lektin WGA:

Im Bereich der Atrien-Epithelien konnten zusammenhängende Zellreihen aus quaderförmigen Einzelzellen dargestellt werden (†) (40x).



#### Abb. 21 Atrium-Epithel eines <u>11</u> Wochen alten Tieres, Lektin WGA:

In den Atrien-Epithelien konnten flache Epithelzellverbände angefärbt werden (↓). Alle weiteren Luft-führenden Gewebe und das Lungen-Parenchym blieben ungefärbt (10x).



In der Übersichtsaufnahme fallen die ausschließlich angefärbten Atrien-Epithelien auf (5x).



# 2.1.3.2. Lektine der GalNAc-Kategorie

Anfärbungen des FAE konnten in allen Untersuchungen mit den N-Acetyl-Galactosamin-spezifischen Lektinen ACL, ECL, SBA und VVA erzielt werden. Mit ACL konnten nur schwache Farbreaktionen erreicht werden. Unter Verwendung von ECL, SBA und VVA konnten im Bereich des FAE in allen untersuchten Präparaten einzelständige, hochprismatische Zellen sehr spezifisch angefärbt werden (vgl. **Abbildungen 25-36**). Besonders die Verwendung von SBA und VVA ergab in allen Altersgruppen mit Ausnahme der 3 Tage alten Tiere vergleichbare, sehr spezifische Färbeergebnisse. Die angefärbten Zellen verteilten sich dabei – wie eingestreut – auf die äußersten Randzonen des FAE, insbesondere der 1-3 Wochen alten und 10 und 11 Wochen alten Tiere. Das Verhältnis von GalNAc-spezifisch angefärbten hochprismatischen FAE-Zellen zu ungefärbt gebliebenen FAE-Zellen in den FAE-Randzonen konnte auf allgemein 1:4 berechnet werden. Die durch SBA, VVA und ECL angefärbten Zellen erwiesen sich als Cilien-frei.



#### Abb. 23 Primärbronchius eines <u>11</u> Wochen alten Tieres, Lektin ECL:

In den Randbereichen des Follikelassoziierten Epithels konnten einzelne hochprismatische Zellen spezifisch eingefärbt werden (1) (5x).

#### Abb. 24 Primärbronchius eines <u>11</u> Wochen alten Tieres, Lektin ECL:

Zu sehen sind in das FAE einzeln eingestreute hochprismatische Zellen, die sich besonders auf die Primärbronchius-Randbereiche verteilen († ) (20x).





#### Abb. 25 Primärbronchius eines <u>10</u> Wochen alten Tieres, Lektin ECL:

In den proximalen Randbereichen des Follikel-assoziierten Epithels konnten einzelne hochprismatische Zellen spezifisch eingefärbt werden (†) (40x).

#### Abb. 26 Primärbronchius eines <u>10</u> Wochen alten Tieres, Lektin ECL:

In den Randbereichen des Follikelassoziierten Epithels konnten einzelne hochprismatische Zellen spezifisch eingefärbt werden (†) (40x).



#### Abb. 27 Primärbronchius eines <u>11</u> Wochen alten Tieres, Lektin SBA:

Im oberen Drittel des Primärbronchius konnten am Übergang zum Sekundärbronchius einzelne hochprismatische Zellen angefärbt werden († ) (40x).



#### Abb. 28 Primärbronchius eines <u>3</u> Tage alten Tieres, Lektin SBA:

In den Randbereichen des Follikel-assoziierten Epithels konnten einzelne hochprismatische Zellen spezifisch eingefärbt werden (↑), unabhängig von der in dieser Altersgruppe nicht ausgebildeten BALT-Struktur (40x).





In den FAE-Randbereichen konnten bei allen Altersgruppen einzelständige, hochprismatisch geformte Zellen angefärbt werden () (40x).



#### Abb. 30 Primärbronchius eines <u>3</u> Wochen alten Tieres, Lektin SBA:

In den Randbereichen des Follikelassoziierten Epithels konnten Zellgruppen hochprismatischer Zellen hochspezifisch angefärbt werden (↓) (40x).



### Abb. 31 Primärbronchius eines <u>3</u> Tage alten Tieres, Lektin VVA/VVL/ML II:

In den Randbereichen des Follikel-assoziierten Epithels konnten einzelne hochprismatische Zellen hochspezifisch angefärbt werden, unabhängig von der Ausbildung einer BALT-Struktur (↓) (40x).



#### Abb. 32 Primärbronchius eines <u>3</u> Tage alten Tieres, Lektin VVA/VVL/ML II:

Vereinzelte, hochprismatische Zellen an den Übergangsregionen des Primärbronchius in die Sekundärbronchien konnten mit VVA hochspezifisch dargestellt werden ( † ) (40x).



Abb. 33 Primärbronchius eines <u>11</u> Wochen alten Tieres, Lektin VVA/VVL/ML II:

In den Randbereichen des Follikel-assoziierten Epithels konnten einzelne breitehochprismatische Zellen spezifisch eingefärbt werden (†) (40x).



An den Übergangskanten des Primärbronchius in den Sekundärbronchius konnten einzelständige, intraepithelial gelegene, hochprismatische Zellen angefärbt werden (↑) (40x).

## 2.1.3.3. Lektine der Fucose-Kategorie

Mit dem Fucose-spezifischen UEA-I konnten in Präparaten der 10 und 11 Wochen alten Tiere einzelne flach-quaderförmige Zellverbände in den äußersten Randbereichen des FAE markiert werden. An einzelnen Präparaten derselben Altersgruppen blieb die beobachtete Anfärbung allerdings aus. Des Weiteren konnten bei den 10 und 11 Wochen alten Tieren – vergleichbar mit den Ergebnissen des GlcNAc-spezifischen GSL-II – einzelne große, runde, subepitheliale Zellen angefärbt werden (vgl. **Abbildungen 35** und **36**). Bei den 3 Tage alten Tieren blieben Färbungen derselben Strukturen regelmäßig aus. Bei den 1-3 Wochen alten Tieren konnten unregelmäßig Anfärbungen einzelständiger flacher Epithelzellen im FAE-Bereich erzielt werden.



Abb. 35 Primärbronchius eines <u>11</u> Wochen alten Tieres, Lektin UEA-I:

Im Becherzell-reichen Abschnitt des Primärbronchius-Epithel konnten vereinzelt große runde subepithelial lokalisierte Epithelzellen eingefärbt werden († ) (20x).



Unregelmäßig wurden mit UEA-I bei den 10 und 11 Wochen alten Tieren begrenzte Bereiche des Atrium-Epithels gefärbt () (40x).

## 2.1.3.4. Lektine der Mannose-Kategorie

Alle verwendeten Mannose-spezifischen Lektine erweisen sich in den Untersuchungen als nicht affin zu Zellen des FAE. ConA färbte in einigen Präparaten schwach und unregelmäßig basale Zellanteile des FAE.

## 2.1.3.5. Lektine der Oligosaccharid-Kategorie

Die Oligosaccharid-spezifischen Lektine PHA-E und PHA-L erwiesen sich in allen untersuchten Präparaten und Altersgruppen als nicht affin zu den verschiedenen Zellen des FAE.

# 2.1.4. Zellen des BALT (Übergänge zu den Sekundärbronchien)

## 2.1.4.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie

In den Untersuchungen mit N-Acetyl-Glucosamin-spezifischen Lektinen konnten mit den Lektinen DSL schwach und undeutlich und GSL-II stark und sehr spezifisch einzelne große runde Zellen im BALT-Knoten angefärbt werden. Die Morphologie dieser Zellen entsprach dabei denjenigen Zellen, die unter GSL-II-Anwendung auch subepithelial im Bereich des Primärbronchius-Flimmerepithels dargestellt werden konnten (vgl. **2.1.1.1**.).

## 2.1.4.2. Lektine der GalNAc-Kategorie

Keines der N-Acetyl-Galactosamin-spezifischen Lektine konnte in den verschiedenen Untersuchungen der verschiedenen Altersgruppen Zellen der BALT-Knoten anfärben. In verschiedenen Präparaten kam es zu unspezifischen, disseminierten Farbreaktionen unter dem Einsatz verschiedener GalNAc-spezifischer Lektine.

## 2.1.4.3. Lektine der Fucose-Kategorie

Mit UEA-I konnten bei den 10 und 11 Wochen alten Tieren vereinzelt große runde Zellen innerhalb des BALT-Knotens angefärbt werden.

# 2.1.4.4. Lektine der Mannose-Kategorie

ConA, PSA und LCA zeigten in allen Untersuchungen aller Altersstufen keinerlei Affinität zu Zellen und Strukturen der BALT-Knoten.

# 2.1.4.5. Lektine der Oligosaccharid-Kategorie

In allen untersuchten Organen der verschiedenen Altersgruppen zeigten die Oligosaccharid-spezifischen Lektine PHA-E und PHA-L keine Affinität zu Zellen und Strukturen des BALT.



## 2.2. Sekundärbronchien

Abb. 37 Übersichtsbild über Sekundärbronchien eines <u>11</u> Wochen alten Tieres (H.-E.):

Die Lumina der Sekundärbronchien sind grau hinterlegt (5x).

Zu Strukturen der zellulären Oberfläche des Sekundärbronchius (vgl. **Abb. 37**) erwiesen sich in allen Untersuchungen und Altersgruppen ausschließlich Lektine der N-Acetyl-Glucosamin- und N-Acetyl-Galactosamin-Kategorie als affin. Insbesondere DSL und LEL aus der GlcNAc-Gruppe und ACL, Jacalin und RCA-I aus der GalNAc-Gruppe führten bei den 10 und 11 Wochen alten Tieren zu recht deutlichen Anfärbungen der Oberflächenepithelzellen des Sekundärbronchius, die bei den Tieren im Alter von 3 Tagen und 1-3 Wochen ausblieben.

## 2.2.1. Epithel des Sekundärbronchius

## 2.2.1.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie

Epitheliale Zellen der Sekundärbronchien der 10 und 11 Wochen alten Tiere konnten besonders gut mit den GlcNAc-spezifischen Lektinen DSL und LEL angefärbt

werden. Die Färbeergebnisse konnten bei den 3 Tage alten und 1-3 Wochen alten Tieren nicht bestätigt werden.

## 2.2.1.2. Lektine der GalNAc-Kategorie

Die GalNAc-spezifischen Lektine ACL, Jacalin und insbesondere RCA-I konnten Zellen der Sekundärbronchien-Epithelien regelmäßig, aber nur schwach anfärben.

# 2.2.1.3. Lektine der Fucose-Kategorien

UEA-I konnte in keinem Präparat zu Anfärbungen der epithelialen Zellen führen.

# 2.2.1.4. Lektine der Mannose-Kategorie

ConA, PSA und LCA zeigten in keiner Altersgruppe spezifische Reaktionen mit Zellen des Sekundärbronchius-Epithels.

## 2.2.1.5. Lektine der Oligosaccharid-Kategorie

PHA-E und PHA-L zeigten in allen untersuchten Präparaten keinerlei Affinität zu epithelialen Zellen des Sekundärbronchius.

## 2.2.2. Subepitheliale Zellen der Sekundärbronchien

In einigen Präparaten der 10 und 11 Wochen alten Hühner konnten ausschließlich mit dem GalNAc-spezifischen Lektin PNA Färbungen von Konglomeraten subepithelialer Zellen der Sekundärbronchien erreicht werden.

# 2.3. Atrien



Abb. 38 Übersichtsbild über Atria in der Lunge eines <u>11</u> Wochen alten Tieres (HE):

Die Lumina der Atrien sind grau hinterlegt (5x).

Zellen der Atria (vgl. **Abb. 38**) der Lungenpfeifen der Lunge des Haushuhnes konnten in den Untersuchungen einerseits mit Lektinen der GlcNAc-Gruppe, andererseits mit Lektinen der GalNAc-Gruppe angefärbt werden.

## 2.3.1. Atrien-Epithel

## 2.3.1.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie

Die Lektine WGA und s-WGA zeigten in allen Untersuchungen höchste Spezifität für epitheliale Zellen der Atrien. Die Lektin-markierten Zellen wurden im Zellverband angefärbt und zeigten flache Quader-förmige Gestalt. Die beschriebenen Färberergebnisse konnten in allen Altersgruppen reproduziert werden und ähnelten den beschriebenen mit WGA und s-WGA an den Übergangskanten des Primär- in die Sekundärbronchien (vgl. **Abbildungen 20-22** unter Abschnitt 2.1.3.1.). Die Anfärbung blieb dabei immer auf das Epithel der Atrien beschränkt. Benachbarte Gewebe und Zellen im Bereich der Atrien wurden nicht eingefärbt. Auch subepithelial gelegene Strukturen wurden mit WGA und s-WGA und s-WGA nicht angefärbt. Schwache Anfärbungen der gleichen Zellen ergab die Anwendung der Lektine DSL und LEL. Bei den 3 Tage alten und 1-3 Wochen alten Tieren blieben in allen Untersuchungen vergleichbare Färbeergebnisse allerdings aus.

# 2.3.1.2. Lektine der GalNAc-Kategorie

Unter den N-Acetyl-Galactosamin-spezifischen Lektinen zeigten ACL, BPL und MPL bei den 10 und 11 Wochen alten Tieren vereinzelte Affinität zu Oberflächenzellen der Atrien. Bei den 3 Tage alten und 1-3 Wochen alten Tieren blieben Färbeergebnisse mit diesen Lektinen aus. Die Untersuchungen der Atrien-Epithel-Zellen mit GalNAcspezifischen Lektinen ergab zusammenfassend eine deutlich schwächere Farbreaktion als mit GlcNAc-spezifischen Lektinen.

### 2.4. Parenchym





Zellen des Parenchyms (vgl. **Abb. 39**) konnten unregelmäßig in allen Untersuchungen und allen Altersgruppen ausschließlich mit GSL-II, einem Lektin der N-Acetyl-Glucosamin-Kategorie angefärbt werden. Dabei entsprach die Morphologie der angefärbten Zellen derjenigen Zellen, die mit demselben Lektin subepithelial im Primärbronchius eingefärbt werden konnten. Bei den 10 und 11 Wochen alten Tieren konnten solche Zellen vermehrt nachgewiesen werden. In einigen Präparaten 3 Tage alter Tiere konnten diese Färbeergebnisse nicht beobachtet werden.

# IV.3. Ergebnisse der Zucker-Bindungs-Kontrollen (Zuckerhemmung)

### 3.1. Lektine der GlcNAc-Kategorie

Die Markierung von zellulären Strukturen durch Lektine der GlcNAc-Gruppe konnte in allen untersuchten Altersgruppen durch Zugabe des jeweiligen inhibierenden Monosaccharids (vgl. **Tabellen 4** und **5** in Abschnitt III 1.2 ) problemlos reduziert bzw. vollständig gehemmt werden. Dies traf insbesondere für die GlcNAcspezifischen Lektine WGA, s-WGA und GSL-II zu. Die spezifische Anfärbung der Anteile des Primärbronchius-Epithels und der Atrien-Epithelien durch WGA und s-WGA blieb in den Zuckerhemmungen regelmäßig aus. Die Markierung von subepithelial gelegenen großen, runden Zellen durch GSL-II konnte ebenso unterbunden werden. Die Anfärbung – und damit die lektinhistochemische Reaktion – der beiden Lektine DSL und LEL derselben Kategorie konnte dagegen erst nach Zugabe des Trisaccharid-Zuckers *Chitotriose* gestört und konzentrationsabhängig auch vollständig unterbunden werden.

## 3.2. Lektine der GalNAc-Kategorie

Die Bindungsreaktionen aller Galactose- und N-Acetyl-Galactosamin-spezifischen Lektine konnte in den Untersuchungen zur Zuckerhemmung in allen untersuchten Organ-Proben wirksam und problemlos durch Zugabe des inhibierenden Monosaccharids gehemmt werden. Eine Notwendigkeit zur Anwendung des Oligosaccharid-Zuckers *Chitotriose* blieb in dieser Kategorie aus. Die Vorbehandlung der Präparate mit Neuraminidase führte zu einer deutlichen Abnahme der spezifischen Bindung der Lektine dieser Zucker-Kategorie, insbesondere der von SBA- und VVA. Andere Lektine der GalNAc-Gruppe reagierten dagegen kaum auf diese Form der durchgeführten Fermentation.

# 3.3. Lektine der Fucose-Kategorie

Die Markierung von zellulären Strukturen durch das einzige in dieser Arbeit eingesetzte Lektin der Fucose-Gruppe UEA-I konnte durch Zugabe von Fucose in allen untersuchten Proben aller Altersgruppen wirksam verhindert werden.

## 3.4. Lektine der Mannose-Kategorie

Von den Lektinen der Mannose-Gruppe erwies sich nur ConA als weniger spezifisch zu seinen Bindungspartnern, konnte aber erneut durch Zugabe von *Chitotriose* unterschiedlicher Konzentration gehemmt werden.

# 3.5. Lektine der Oligosaccharid-Kategorie

PHA-E und PHA-L-Bindungen kamen in den Untersuchungen dieser Arbeit nicht vor. Eine Zuckerhemmungs-Reaktion erschien deshalb nicht nötig.

# IV.4. Negativkontrollen

Alle untersuchten Präparate der verschiedenen Altersgruppen blieben – wie erwartet – in den Bereichen des Primär- und Sekundärbronchius, den Atrien und dem Lungenparenchym weitestgehend negativ. Vereinzelt kam es im Bereich des respiratorischen Flimmerepithels und der luminalen Räume der im Sagittalschnitt befindlichen respiratorischen Organe zu leichten Farbreaktionen.

In den Negativkontrollen konnten vereinzelt Anfärbungen von Bindegewebszügen in den tiefer gelegenen Segmenten des Primärbronchius gesehen werden, die unabhängig von jeder Lektinzugabe reproduziert werden konnten. Die beschriebenen Ergebnisse kamen insbesondere bei den 10 und 11 Wochen alten Tieren vor.

Bei den 3 Tage und 1 bis 3 Wochen alten Tieren blieben die angefertigten Negativkontrollen regelmäßig und vollständig ungefärbt.

# **Abschnitt V. Diskussion**

### V.1. Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch lektinhistochemische Untersuchungen von Lungengewebe des Haushuhnes Informationen über die Verteilung von Zuckerresten und Zuckerkonjugaten auf zellulären Oberflächen der verschiedenen Strukturen der Hühner-Lunge zu erarbeiten. Besondere Berücksichtigung sollten dabei die Zellen des Follikel-assoziierten Epithels und des BALT der Lunge des Haushuhnes finden. Die untersuchten Strukturen sind von besonderem Interesse, weil sie zum einen als potentielle Rezeptor-Stellen respiratorisch relevanter mikrobieller Erreger des Geflügels eine besondere Rolle bei der sogenannten antiadhäsiven Therapie spielen können und zum anderen einen besonderen Angriffspunkt für eine in Zukunft effektiver durchführbare mucosale Vaccinierung darstellen. Um solche modernen Methoden der Vaccinierung erfolgreich anzuwenden, sind Kenntnisse über die genauen Strukturen verschiedener Zelloberflächen-Rezeptoren, insbesondere der von Zuckermolekülen auf zellulären Oberflächen verschiedener Zielgewebe von besonderer Bedeutung. In Hinblick auf die Vaccinierung mittels Antigen-Targeting sind dabei erneut besonders die Oberflächenstrukturen der untersuchten Zellen, die für die jeweilige Antigenaufnahme zuständig sind, von Interesse. Das Vorkommen und die genaue Verteilung der Zuckerstrukturen in verschiedenen Abschnitten der Lunge des Haushuhnes wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine Reihe von lektinhistochemischen Untersuchungen mit Lektinen verschiedener Bindungsspezifitäten am Primärbronchius und Sekundärbronchius, den Atrien und im Parenchym von Lungen-Präparaten verschiedener Altersstufen untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob Hinweise auf Unterschiede im Lektinbindungsverhalten und eventuell vorkommende Bindungsspezifitäten zwischen den verschiedenen Abschnitten der aviären Lunge bzw. zwischen den verschiedenen Altersstufen beobachtet werden können, wie sie für verschiedene Säugetiere in Abschnitten des digestorischen und respiratorischen Apparates bereits von KRAEHENBUHL (1997), JEURISSEN et al. (1999) und POHLMEYER (2002) bekannt und beschrieben sind.

Die vorliegende Arbeit soll als deskriptive Grundlagenarbeit verstanden werden, die vordergründig klären soll, mit welchen möglichen Lektinen ein histochemisches Arbeiten im Bereich der verschiedenen Gewebe der aviären Lunge, besonders hinsichtlich der selektiven Markierung von einzelnen Zellen des FAE und BALT möglich und sinnvoll ist.

### V.2. Kritik der in dieser Arbeit verwendeten Methodik

Die vorliegende Arbeit orientierte sich an vorangegangenen Untersuchungen von POHLMEYER und JEURISSEN in den Jahren 2001/2002/2003, in deren Arbeiten die Methoden der Lektinhistochemie einerseits grundsätzlich nur für Untersuchungen des Verdauungs- und Atmungsapparates der Säugetiere, insbesondere des Schweins und der Maus, andererseits am aviären Gastrointestinaltrakt (Caecum, Colon) zum Einsatz kam. Die in den angegebenen Arbeiten verwendeten Methoden der Lektinhistochemie konnten auch in der vorliegenden Arbeit erfolgreich eingesetzt werden. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit SPF-Eier gewählt, die in Instituts-eigenen Stallungen bebrütet wurden. Dennoch sind zum Teil erhebliche individuelle Unterschiede in der molekularen Ausprägung der außerordentlich variablen Zuckerstrukturen der Zelloberflächen zwischen den einzelnen Tieren nicht auszuschließen (nach ALROY et al., 1989). Die Auswahl der untersuchten Organe (Lungen von 3 Tage, 1 Woche, 2 Wochen, 3 Wochen, 10 Wochen und 11 Wochen alter Hühner der Linie VALO) erfolgte unter besonderer Berücksichtigung des Vorkommens von Bronchiusassoziiertem lymphatischem Gewebe. Dieses wurde während der Präparation lichtmikroskopisch beurteilt. Als Vergleichs-Präparat wurde zusätzlich immer ein weitgehend BALT-freies Lungen-Segment untersucht. Die Lektin-Auswahl zu Beginn der Untersuchungen erfolgte systematisch: Die Untersuchungen wurden jeweils mit mindestens einem Lektin aus jeder der 5 Zucker-Spezifitäten-Kategorien durchgeführt und in Anlehnung an vorangegangene Arbeiten von JEURISSEN und POHLMEYER an Geweben des Verdauungsapparates beim Säugetier in den Jahren 2001, 2002 und 2003, vorgenommen.

Alle verwendeten Lektine und die Methoden der Lektinhistochemie wurden dabei erstmals in Untersuchungen der Lunge des Haushuhns eingesetzt. Die Auswertung aller Untersuchungen, insbesondere die Auswertung der Färbeergebnisse im Anschluss an die lektinhistochemischen Untersuchungen, erfolgte üblicherweise semiguantitative durch Beurteilung und einen direkten Vergleich der Färbeergebnisse der verschiedenen Strukturen und Gewebe einzelner Präparate unter dem Lichtmikroskop bei verschieden gewählten Vergrößerungen in Hinblick auf ihre Spezifität, Sensitivität und Intensität. Der Vergleich mit Arbeiten anderer Autoren am Säugetier kann einerseits durch diese subjektive Beurteilung, feinste methodische Abweichungen (hinsichtlich z.B. der jeweils manuell vorgenommenen Zubereitungen der Lektin-Konzentrationen und -Lösungen oder der Präparation der Gewebeproben, im Speziellen der Schichtdicke der verwendeten Präparate), andererseits besonders durch tierartliche Unterschiede zwischen der zoologischen Klasse der Mammalia und der der Aves, nicht unerheblich erschwert werden. Zudem liegen bisher keine Ergebnisse vergleichbarer Arbeiten zu Untersuchungen mit Methoden der Lektinhistochemie des respiratorischen Apparates des Haushuhnes vor, die einen Abgleich der erzielten Färbeergebnisse ermöglichten. Bei (in dieser Untersuchung nicht verwendeten) nicht-kommerziell biotinkonjugierten Lektinen, kann auch der Grad der Biotinylierung eine unterschiedliche Ausprägung der Farbintensität der fertigen Präparate hervorrufen (CLARK, 2000). Das Ausmaß und auch die Sensitivität der Lektinbindung an Glycokonjugate sind weiterhin abhängig von Parametern wie der Reaktionstemperatur und dem Wasserdampfgehalt der Luft. Beide Reaktions-Parameter können durch die jeweilige Umgebung der Lektin-Reaktion die Bindungseigenschaften der einzelnen Lektine nicht unerheblich beeinflussen. Zum Ausschluss der beschriebenen Störfaktoren musste die lektinhistochemische Untersuchung unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden, die unter anderem durch den Ablauf der lektinhistochemischen Untersuchungen in einer abgeschlossenen Feuchten Kammer gewährleistet werden können. Weiterhin muss bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass die hier angewandte Methodik (paraffinierte Gewebeschnitte in einer Dicke von 5µm) zur Auslösung der lipophilen Glycolipide und somit zum vollständigen Verlust dieser Zuckerstrukturen führen kann, die sich einer lektinhistochemischen Detektion

im Folgenden entziehen (vgl. Abschnitt II, Kap. 3.6.1.), was ein lektinhistochemisches Färbeergebnis nicht unerheblich verschlechtert. Andererseits unterbleiben auf diese Art und Weise zusätzliche Hintergrundfärbungen, die eine Auswertung der lektinhistochemischen Untersuchungen erschweren können. Lipophile Grund vorangehenden Glycokonjugate können aus diesem mit einer Paraffineinbettung lektinhistochemisch nicht erreicht werden. Lektinhistochemische Untersuchungen von lipidlöslichen Glycokonjugaten machen daher eine Präparate-Produktion am Gefrier-Mikrotom erforderlich, bei der Gewebeproben ohne Paraffineinbettung frisch geschnitten werden können und es auf diese Weise nicht zum beschriebenen Verlust der lipidhaltigen Glycokonjugate auf den zu untersuchenden Zelloberflächen kommt.

### V.3. Diskussion der Ergebnisse

### 3.1. Diskussion der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen stimmen mit den Deskriptionen aus Abschnitt II, Kap. 2 weitgehend überein. Die von DUNCKER im Jahre 1968 beschriebene altersabhängige Zunahme von Becherzellen im Epithel des Primärbronchius des Geflügels konnte in allen untersuchten Präparaten der Lungen des Haushuhnes bestätigt werden. Die übrigen Beobachtungen an den einzelnen Segmenten der Lunge des Haushuhnes entsprachen in den Grundzügen der Beschreibung unter Abschnitt II, Kap. 2.1. Bei den untersuchten Organen der 3 Tage alten Tiere konnte nur in einem einzigen Fall eine BALT-Knoten-ähnliche Struktur festgestellt werden, wobei sich die lymphozytären Infiltrate in diesem Fall nicht Knoten-ähnlich, sondern disseminiert darstellten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Kontakte mit Antigenen auch in der frühen Phase der neonatalen Ontogenese in der Lage sind, eine Proliferation von BALT-Strukturen auszulösen. In der Altersgruppe der 1-3 Wochen alten Tiere konnten vereinzelt schwach ausgebildete BALT-Knoten gefunden werden.
Im Bereich des FAE konnten allerdings in allen Altersgruppen deutlich ausgebildete epitheliale Deckzellen, FAE-typisches Epithel gefunden werden, immer unabhängig davon, wie weit ein BALT-Knoten ausgebildet war oder sogar ohne jedes Vorkommen von BALT oder BALT-ähnlicher Strukturen.

#### 3.2. Lektinhistochemische Untersuchungen

#### 3.2.1. Allgemein

Mit allen in dieser Arbeit verwendeten Lektinen konnten prinzipiell in allen untersuchten Präparaten Anfärbungen erzielt werden. Starke Farbreaktionen konnten allgemein mit den Lektinen der Mannose-Kategorie, insbesondere Con A und PSA erzielt werden, was ein grundsätzliches Vorkommen von Mannose-reichen Glycokonjugaten auf den verschiedenen Strukturen bzw. den zellulären Oberflächen der Lunge des Haushuhnes nahe legt. Besonders submucosal gelegene Bindegewebsstrukturen konnten durch Verwendung der Lektine dieser Gruppen stark angefärbt werden. Bei einigen nur schwach reagierenden Lektinen wie PHA-E und PHA-L aus der Kategorie der Oligosaccharid-spezifischen Lektine beschränkte sich die Reaktion in einigen Präparaten auf zum Teil nur sehr leichte Bindegewebs-Reaktionen. Weil die Beschreibung und nähere Charakterisierung der Zuckerstrukturen der Bindegewebe den Rahmen dieser Arbeit übersteigt und diese Strukturen für die Auswertung der vorliegenden Arbeit nicht in vorrangigem Interesse standen, soll auf solche Ergebnisse an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden. Bei der Bewertung der Ergebnisse müssen leichte Reaktionen der Kinetosomen-Reihe des respiratorischen Flimmerepithels, die insbesondere bei den jüngeren Tieren beobachtet werden konnten, berücksichtigt werden. Diese unspezifische Farbreaktion kommt offenbar auch nur bei nicht-Hämalaungegengefärbten Präparaten voll zur Geltung, während sie bei den in den Untersuchungen vorgezogenen gegengefärbten Präparaten deutlich unauffälliger oder ganz unsichtbar bleibt. Der Grund für solche unspezifischen Farbreaktionen scheint die Aktivität endogener Peroxidase zu sein.

Dieses Enzym ist nach Untersuchungen am Dünndarm des Haushuhnes von Jahre 1974 MICHAEL und HODGES im hauptsächlich mit intestinalen Bürstensaumzellen assoziiert, kann aber auch in den bronchialen Geweben nachgewiesen werden. Für die einzelnen Segmente im Atmungsapparat des Haushuhnes im Besonderen liegen bisher keine Erkenntnisse über ein Vorkommen der endogenen Peroxidase vor. Für die lektinhistochemischen Untersuchungen ist eine Inhibition der endogenen Peroxidase mit Levamisol als grundsätzlich möglich beschrieben, jedoch nicht für die endogene Peroxidase in den Bronchialräumen bekannt. Des Weiteren werden Inaktivierungs-Präparationen der endogenen Peroxidase durch verschiedenartig verdünnte Wasserstoff-Peroxid-Lösungen empfohlen. Die grundsätzliche Aktivität dieses Enzyms sollte allerdings durch den Vorgang der Fixation und der Paraffineinbettung weitgehend abgeschwächt worden sein (nach BROOKS et al., 1997). Um verifizierbare Aussagen über die Zuckerbindungs-Spezifität der verwendeten Lektine machen zu können und unspezifische Bindungsreaktionen weitgehend auszuschließen zu können, wurden die Präparate jeweils mit nach Protokoll erstellter Lektinlösung und parallel dazu mit den jeweiligen inhibierenden Zuckern inkubiert. Bei den allermeisten eingesetzten Lektinen konnte die Bindung bereits durch die Zugabe des entsprechenden Monosaccharids deutlich bis vollständig reduziert werden. Die Anheftung der Lektine DSL und LEL aus der GlcNAc-Kategorie konnte dagegen jeweils erst durch Zugabe des Trisaccharids Chitotriose unterbunden werden. Dieses Phänomen ist damit zu erklären, dass viele Lektine zumeist deutlich höhere Bindungsaffinitäten zu Oligosaccharid-Glycokonjugaten als zu Monosaccharid-Strukturen zeigen (vgl. Abschnitt II, Kap. 3.6.1.). Abweichend vom Vorgehen konnten unter den übrigen Lektinen Sialinsäure-Spezifitäten verschiedener Lektine durch eine Vorbehandlung mit Neuraminidase bestätigt werden. Die Bindung solcher Lektine konnte durch diese Maßnahme teilweise deutlich inhibiert werden. KNIBBS et al. (1991) führten aus, dass verschiedene Lektine aus der NANA-Kategorie zwar bevorzugt an das Trisaccharid NANA-α 2, 3-Gal-β 1,4 GlcNAc/Glc binden, dem Sialinsäure-Anteil nach ihren Untersuchungen allerdings weniger Bedeutung für eine etwaige Bindung zukommt, als bei anderen sialinsäurebindenden Lektine.

Die Sialinsäure konnte experimentell – wie KNIBBS, GOLDSTEIN, RATCLIFFE et al. 1991 beschreiben - sogar durch N-Acetyl- oder N-Glycolyl-Gruppen ersetzt werden, ohne die Bindung an das jeweilige Lektin negativ zu beeinflussen. Möglicherweise ist das eine Erklärung für die mangelnde Bindungsreduktion nach Neuraminidase-Digestion.

#### 3.2.2. Primärbronchius

In allen Untersuchungen konnten mit den N-Acetyl-Glucosamin-spezifischen Lektinen WGA und s-WGA epitheliale Oberflächenstrukturen des Primärbronchius angefärbt werden. Ihre Spezifität zu Glucose-haltigen, insbesondere N-Acetyl-Glucosamin-haltigen, Glycokonjugaten der Zelloberflächen lässt auf ein Vorkommen von Glc- oder GlcNAc-haltigen Glycokonjugaten auf epithelialen Zellen des Primärbronchius schließen. Da mit den Glc-/GlcNAc-spezifischen Lektinen WGA und s-WGA unabhängig von der jeweiligen Altersgruppe in allen untersuchten Präparaten gleiche Färbeergebnisse erzielt werden konnten, erscheint das Vorkommen solcher Glycokonjugat-Moleküle entlang des epithelialen Überzugs des Primärbronchius in der Lunge des Haushuhnes regelmäßig zu sein. Als bindungsspezifisch für Zellen des Primärbronchius erwiesen sich weiterhin drei Lektine der GalNAc-Kategorie: SBA, VVA und ECL. SBA und VVA führten zu einer Anfärbung einzelständiger, sich in den Randbereichen des Primärbronchiusepithels befindlicher, hochprismatisch geformter Zellen, die sehr spezifisch markiert werden konnten. Alle der so angefärbten Zellen hielten sich dabei immer in den Zonen des Primärbronchius auf, die auch durch WGA und s-WGA angefärbt werden konnte. Auffällig war eine Färbung von Zellen der beschriebenen Art besonders in den Bereichen des den BALT-Knoten abdeckenden Follikel-assoziierten Epithels des Primärbronchius. Unklar ist, ob es sich bei den einzelständigen Gal- und GalNAc-positiven Zellen um besondere Zellen des FAE im Sinne von M-cell-like-cells handelt, wie sie für den Säuger beschrieben sind.

Interessanterweise konnten die Färbeergebnisse in den marginalen Bereichen des FAE des Primärbronchius mit GlcNAc- und GalNAc-spezifischen Lektinen in den Untersuchungen aller Altersgruppen bestätigt und reproduziert werden, unabhängig davon, wie weit ein BALT-Knoten ausgebildet war. Dies könnte ein Hinweis auf eine von Zellen des BALT unabhängige Aktivität der FAE-Zellen des Primärbronchius des Haushuhns sein. Es stellt sich die Frage, inwieweit ein Follikel-assoziiertes Epithel bereits vor der Ausbildung eines BALT-Knoten vollständig ausdifferenziert ist.

### 3.2.3. Sekundärbronchius

Anfärbungen der Oberflächenstrukturen des Sekundärbronchius konnten sowohl mit Lektinen der Glc-/GlcNAc-Kategorie als auch mit Lektinen der Gal-/GalNAc-Kategorie, im Falle des ConA auch mit einem Mannose-spezifischen Lektin, erreicht werden. Glucose- und Galactose-haltige Glycokonjugate scheinen folglich auch auf Oberflächen der Zellen des Sekundärbronchius vorzukommen. Starke Farbreaktionen in den Übergangsbereichen des Primär- in den Sekundärbronchius in allen Altersgruppen, beweisen dicht positioniert vorkommende Glucose- und Galactose-haltige Glycokonjugate in diesem Bereich.

#### 3.2.4. Atrium

Das Atrien-Epithel ließ sich in allen untersuchten Organen aller Altersgruppen mit den gleichen Lektinen (WGA und s-WGA) besonders spezifisch anfärben, wie sie schon zur Markierung von Oberflächenstrukturen des Primärbronchius dienen konnten. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass beim Haushuhn auf den Zellen des Atriumepithels sowie auf den Epithelzellen des Primärbronchius auch Glucose- bzw. N-Acetyl-Glucosamin-haltige Glycokonjugate vorkommen. Die beschriebenen Färbeergebnisse konnten in allen Altersgruppen bestätigt werden. Auch die lektinhistochemische Untersuchung von 3 Tage und 1-3 Wochen alten Tieren konnte das Vorkommen von GlcNAc-haltigen Glycokonjugaten auf Zellen des Atrium-Epithels bestätigen. Auffallend in allen untersuchten Präparaten aller Altersgruppen war die deutliche und stark spezifische Anfärbung der Atrien-Epithelien (und der beschriebenen Bereiche des Primärbronchius) durch die GlcNAcspezifischen Lektine WGA und s-WGA bei gleichzeitigem Fehlen dieser Reaktion derselben Lektine im Bereich der Parabronchien bzw. der Infundibula. Dieses Phänomen lässt auf eine Glucoseund N-Acetyl-Glucosamin-reiche Oberflächenstruktur derjenigen Bereiche der Lunge des Haushuhnes schließen, die bei der Respiration direkt mit dem Luftstrom in Kontakt stehen. Bei der oralen oder aerosolischen Verabreichung von Pharmaka und Vaccinen könnte diese Erkenntnis von Nutzen sein, um zielgerichtete Applikationen zu ermöglichen. In den lichtmikroskopisch durchgeführten Untersuchungen erschienen die Epithelzellen des Überganges vom Primärbronchius in die Sekundärbronchien und das Atrium-Epithel zudem phagozytotisch aktiv zu sein. Mehrfach konnten in Epithelzellen des Atriums intrazelluläre Einschlüsse nachgewiesen werden.

#### 3.2.5. Parenchym

Die im Parenchym verstreut liegenden, durch GSL-II und UEA-I angefärbten, großen, runden, insbesondere in Organen der 10 und 11 Wochen alten Tiere nachgewiesenen Zellen, zeigten sich als Träger von Glc-, GlcNAc- und Fucose-reichen Zelloberflächen-Glycokonjugaten. Sie konnten regelmäßig subepithelial des Primärbronchius und im Lungen-Parenchym nachgewiesen werden, wurden aber bisher nicht näher charakterisiert.

## 3.2.6. Vergleich histologischer Strukturen in der lektinhistochemischen Untersuchung in verschiedenen Abschnitten der Lunge des Haushuhnes

Bestimmte histologische Strukturen konnten in mehreren untersuchten Abschnitten der Lunge des Haushuhnes aller Altersgruppen gleichermaßen lektinhistochemisch markiert werden. Diese Beobachtung ermöglicht eine Aussage über die Verteilung

Glucose-/GlcNAc-/Galactose-/GalNAc-/Fucose-/Mannosevon und schließlich Oligosaccharide-haltigen Glycokonjugaten auf den Oberflächen zellulärer Glycocalices im Verlauf der einzelnen Segmente der Lunge des Haushuhnes. Zelluläre Glycokonjugate der Oberflächenstrukturen des Primärbronchius der Lunge des Haushuhnes erwiesen sich in der vorliegenden Untersuchung als Glc-, GlcNAc-, Gal- und GalNAc-haltig. Glc- und GlcNAc-spezifische Lektine konnten auch Zellen des Atrium-Epithels in gleicher Weise anfärben. Die Farbreaktion erwies sich als unabhängig vom Alter und der Ausbildung von BALT-Strukturen. Im direkten Vergleich scheinen zelluläre Oberflächenstrukturen des Primärbronchius und der Atrien gleiche Glc- und GlcNAc-haltige Glycokonjugate zu beinhalten.

## 3.2.7. Vergleich histologischer Strukturen in der lektinhistochemischen Untersuchung verschiedener Spezies

Die von NEUTRA et al. (1987) und KRAEHENBUHL (1996) in verschiedenen Untersuchungen erfolgreich an Geweben des Darms des Säugetiers eingesetzten Lektine erwiesen sich in der vorliegenden Arbeit als nur wenig spezifisch bzw. unspezifisch an Geweben der Lunge des Haushuhnes. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass grundsätzliche Übertragungen von am Säugetier erzielten Ergebnissen über die Struktur von zellulären Glycokonjugaten auf die Gewebe des Haushuhnes nicht möglich sind.

#### 4. Abschlussbetrachtung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

(1) Auf den Oberflächen aller untersuchter Abschnitte des respiratorischen Apparates des Haushuhnes sind Gal-, GalNAc-, Glc-, GlcNAc- und Man-

haltige Zuckerstrukturen nachweisbar; weil in einigen Fällen das Bindungsvermögen (und damit die Intensität der Anfärbbarkeit) des gleichen Lektins in der gleichen Konzentration in den verschiedenen untersuchten Abschnitten des Atmungsapparates bzw. bei den verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Altersstufen zum Teil deutliche Unterschiede aufwies, scheint der genaue Aufbau solcher Zuckerstrukturen lokalisations- und eventuell auch altersabhängig zu variieren.

Für alle unter (1) beschriebenen Zuckerstrukturen sind Funktionen als Rezeptoren für mikrobielle Lektine prinzipiell denkbar. Diese als Lektin-vermittelte Adhäsion bezeichnete Anheftung von Mikroorganismen kann einen ersten entscheidenden Schritt zu einer mikrobiellen Kolonisation des aviären Atmungsapparates darstellen. Im Falle für den Vogel pathogener Mikroorganismen bildet eine solche Kolonisation erste Voraussetzungen für eine Infektion. Die Unterbindung der Ligand-Rezeptor-Interaktion im Sinne einer "Antiadhäsiven Therapie" (vgl. Abschnitt II, Kapitel 5.3.) kann zu einer entscheidenden Unterbrechungsreaktion der Infektkette führen. In diesem Sinne konnten u.a. OYOFO et al. im Jahre 1989 die Anheftung eines Fimbrien-Typ-I-positiven Stammes der Gattungs-Gruppe Salmonella typhimurium an Kükendünndärme in vitro durch eine Zugabe von verschiedenen Kohlenhydraten deutlich inhibieren. Als besonders effektiv erwiesen sich dabei D-Mannose und ein weiteres Mannose-Derivat. Entsprechend vermuten die Autoren als epithelialen Bindungspartner für diesen S. typhimurium-Stamm einen Rezeptor mit terminalem Man-Rest. Tatsächlich konnten diese Annahmen in Folgeuntersuchungen bestätigt werden. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten Man-Reste auf den Oberflächen der epithelialen Zellen des Atmungsapparates des Haushuhnes nachgewiesen werden. Vergleichbare Untersuchungen zu Inhibitionen einer mikrobiellen Adhäsion bzw. Invasion im Bereich des Atmungsapparates der Vögel liegen im Augenblick noch nicht vor. Dass die Verminderung der Bindung des mikrobiellen Liganden an den epithelialen Rezeptor durch ein antiadhäsives Agens auch in vivo möglich ist, konnte später durch weitere Versuche von OYOFO et al. ebenfalls im Jahre 1989 bewiesen werden.

konnten durch Verabreichung Man-supplementierten Trinkwassers Sie die Kolonisation von Broiler-Blinddärmen mit S. typhimurium (Fimbrien-Typ-1-positiver Stamm) signifikant reduzieren. ZHOU et al. konnten 1995 zeigen, dass durch die Gabe eines Mannosederivats die Bindung von Salmonella pullorum an das Dünndarmepithel von Hühnerküken deutlich vermindert werden kann. Die Arbeitsgruppe vermutet das für die Adhäsion verantwortliche Man-haltige Glycokonjugat jedoch nicht auf der Epithelzelloberfläche, sondern auf der Oberfläche der Bakterien selbst. Auch zur Bestätigung dieser Ergebnisse im aviären Respirations-Apparat liegen momentan noch keine Untersuchungen vor. Die aufgeführten Beispiele verdeutlichen die Notwendigkeit, genauerer Kenntnisse über strukturchemischen lokalitätsgebundenen die und Eigenschaften bronchopulmonalen Glycokonjugate. An dieser Stelle sei aber erneut darauf hingewiesen, dass für die ordentliche Funktion eines Glycokonjugates als Rezeptor neben der (meist terminal determinierten) Monosaccharid-Spezifität häufig noch weitere, subterminale Zuckeranteile, die räumliche Anordnung der jeweils beteiligten Zucker sowie elektrostatische (in der chemischen Nomenklatur als Van-der-Waals-Kräfte bezeichnet) und hydrophobe Wechselwirkungen (Wasser-Ausschlussnäher Reaktionen) zwischen Ligand (in der vorliegenden Arbeit das jeweilige Lektin) und Rezeptor (auf der jeweiligen Zielzelle: "target cell") von Bedeutung sind. Dieses Phänomen wird in den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen verdeutlicht durch die unterschiedliche Bindungsfähigkeit von Lektinen gleicher Monosaccharid-Spezifität. Es könnte sich als effektiver erweisen, als antiadhäsives Agens Liganden einzusetzen, deren Spezifität für den entsprechenden Rezeptor bzw. Liganden über die einfache Monosaccharid-Spezifität hinausgeht. Daneben muss gegebenenfalls die beobachtete altersabhängige Variation in der Kohlenhydratzusammensetzung der Zell-Oberflächen-Glycocalices berücksichtigt werden. Weitere Untersuchungen zur näheren Charakterisierung der Zuckerstrukturen, z.B. mittels sequentieller enzymatischer Digestion, sind als Grundlage einer derartigen "Antiadhäsiven Therapie" notwendig. Die Entwicklung antiadhäsiver Therapeutika scheint besonders vor dem Hintergrund der steigenden Zahl verschiedener Antibiotika-Resistenzen sowie der daraus resultierenden zunehmenden Restriktion des Antibiotika-Einsatzes auf dem ökonomischen Geflügelsektor von beachtenswerter Bedeutung.

Da Kohlenhydratstrukturen – wie mehrfach beschrieben – als Rezeptoren für Mikroorganismen dienen können, scheint die Beobachtung lokaler Unterschiede in der Verteilung epithelialer Glycokonjugate in der aviären Lunge im Rahmen der vorliegenden Arbeit von großer Bedeutung. Es lassen sich so möglicherweise bekannte Lokalisationsspezifitäten verschiedener protozoärer wie auch bakterieller oder viraler Erreger im Atmungsapparat der Vögel verstehen. Altersabhängige Veränderungen des Zucker-Verteilungsmusters auf epithelialen Zellen verschiedener Gewebe (noch nicht für den Atmungsapparat der Vögel) wurden bereits von anderen Autoren und auch bei anderen Tierarten wie z.B. der Ratte (TAATJES und ROTH, 1990) oder dem Schwein (GELBERG et al., 1992; CHAE und LEE, 1995; KING et al., 1995) beschrieben. Ein Zusammenhang zwischen der Veränderung bestimmter zuckerhaltiger Rezeptoren auf der epithelialen Oberfläche im Laufe der postnatalen Ontogenese des Individuums und altersabhängiger Resistenz bzw. Empfänglichkeit gegenüber verschiedenen bakteriellen, viralen und protozoären Infektionskrankheiten ist dabei immer denkbar.

(2) Zellen des Follikel-assoziierten Epithels des BALT in der Hühnerlunge lassen sich nicht mit in vergleichbaren lektinhistochemischen Arbeiten am Säugetier verwendeten Lektinen anfärben.

Während anderen in verschiedenen Untersuchungen an den Caeca. Darmabschnitten des Haushuhnes und in Lungengewebe des Säugetiers besonders Fucose-spezifische Lektine (insbesondere das Lektin aus Ulex europaeus UEA-I) erfolgreich zum Einsatz kamen, ließen sich diese Ergebnisse nach den Befunden der vorliegenden Arbeit nicht grundsätzlich auf das FAE des Haushuhnes übertragen. In den Untersuchungen mit UEA-I konnten nur bei den 10 und 11 Wochen alten Tieren Färbeergebnisse einzelner Zellen des FAE erreicht werden. Da Fucose-selektive Lektin-Zubereitungen immer aber auch zu Anfärbungen FAE-benachbarter Zellgruppierungen und teilweise deutlichen Bindegewebsreaktionen neigt, kommen Vertreter dieser für das Säugetier von JEURISSEN et al. erfolgreich in verschiedenen Untersuchungen eingesetzten Lektin-Kategorie als selektiver Marker

für FAE-Zellen und Antigen-transportierende Zellsysteme wie m-cell-like-cells in der Lunge des Haushuhnes nicht in Frage. JEURISSEN et al. konnten im Jahre 1999 Markierungen von m-cell-like-cells im Darm des Haushuhnes mit den GlcNAc- und GalNAc-spezifischen Lektinen WGA (Triticum vulgaris) und SBA (soyabean-Agglutinin) und AAA (Anguilla anguilla-Agglutinin) erreichen. Allerdings wurden die erzielten Färbe-Ergebnisse von dieser Arbeitsgruppe auch als eher unspezifisch beschrieben, weil die beiden verwendeten Lektine auch an andere, benachbarte Epithelzellen banden. Zuckerstrukturen auf zellulären Oberflächen des FAE verschiedener Gewebe, insbesondere dem in dieser Arbeit untersuchten Lungenassoziierten FAE, sind vor allem im Hinblick auf orale bzw. aerosolische Vaccination von großer Bedeutung. So könnten Lektine, die spezifisch oder zumindest betont an m-cell-like-cells des Lungen-assoziierten FAE binden, an Antigene gekoppelt werden und nach oraler bzw. aerosolischer Applikation eine verstärkte Bindung und daraus resultierende verbesserte Aufnahme solcher Antigene an bzw. durch Antigentransportierenden Zellen wie m-cell-like-cells vermitteln. Bisher vorliegende Untersuchungen von CLARK et al., 1993, CLARK et al., 1994a, GIANNASCA et al., 1994 und JEPSON et al. im Jahre 1995 an Mäusemodellen konnten zeigen, dass sich m-cell-like-cells der PEYER-Platten bei dieser Tierart selektiv mit UEA-I (Ulex europaeus-Agglutinin I) markieren und somit auffinden lassen. An die gleichen Zellen konnten die Lektine WBA (Winged-bean-Agglutinin) (beschrieben von CLARK et al., 1993) und EEA (Eunonymus europaeus-Agglutinin) (CLARK et al., 1995a) binden. Auch eine besonders selektive Aufnahme von UEA-I durch m-cell-like-cells der PEYER-Platten konnte in Untersuchungen von GIANNASCA et al., 1994, CLARK et al., 1995b) nachgewiesen werden. Sogar ein Targeting von UEA-I-konjugierten Latex-Beats erwies sich in einer Arbeit von FOSTER et al. im Jahre 1998 als sehr erfolgreich. Die spezielle Bindungsfähigkeit von UEA-I an m-cell-like-cells im Darm von Mäusen beschränkte sich dabei allerdings immer auf FAE-Zellen der PEYER-Plaques, caecale m-cell-like-cell-Systeme reagierten jeweils nicht (CLARK et al., 1994 und JEPSON et al., 1995). Eine Oberflächenmarkierung der caecalen m-celllike-cells der Maus gelang CLARK und Arbeitsgruppe (1995a) dagegen bisher mit EEA und BSA-I B4 (Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia- Iso-Agglutinin B4).

Neben den beschriebenen lokalen Unterschieden existieren offenkundlich auch Differenzen zwischen den verschiedenen Spezies. Für m-cell-like-cells der PEYER-Platten des Kaninchens konnte bisher in vivo in Untersuchungen von NEUTRA et al. im Jahre 1987 eine verstärkte Bindungsaffinität für die auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommenen Lektine WGA und RCA-I (Ricinus communis-Agglutinin) festgestellt werden. Das ebenfalls auch in der vorliegenden Arbeit verwendete UEA-I dagegen markierte in ähnlichen Untersuchungen von JEPSON et al im Jahre 1995 beim Kaninchen neben BSA-I, PNA (Peanut-Agglutinin) und erneut WGA m-cell-like-cells in Caecum und Colon, im Gegensatz zur Maus allerdings nicht m-cell-like-cells der PEYER-Platten. Beim Menschen schließlich blieben von SHARMA et al. (1996) und SHARMA und SCHUMACHER (2001) unternommene Versuche, M-cell-like-cell-Systeme lektinhistochemisch selektiv zu markieren, bislang weitgehend erfolglos. Eine Übertragung der Ergebnisse der lektinhistochemischen m-cell-like-cell-Markierung von einer Spezies auf eine beliebige andere erscheint dementsprechend nicht grundsätzlich möglich. Ebenso wie in Untersuchungen an der Maus und am Kaninchen lassen sich in der vorliegenden Arbeit auch für das Haushuhn lokale zum Teil erhebliche Unterschiede in der Ausbildung von Glycokonjugaten verschiedener Zelloberflächen der verschiedenen Segmente der Lunge feststellen. Dies legt die Vermutung einer unterschiedlichen Spezialisierung der untersuchten Zellen nahe. Unterschiedliche regionale Ausprägungen von Zuckerstrukturen sowie Interspezies-Differenzen müssen beim Einsatz von lektinhistochemischen Untersuchungs-Methoden unbedingt berücksichtigt werden. Andererseits gilt gleiches für den Einsatz von Lektinen als Targeting-Moleküle für eine beispielsweise aerosolische Vaccinierung, sowohl bei der Auswahl des jeweils entsprechenden Lektins als auch bei der Applikationsart (oral/aerosolisch). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen abschließend die Vermutung nahe, dass durch die Verwendung von entweder GlcNAc-spezifischen Lektinen oder auch oder zumindest GICNAcund GalNAc-spezifischen GalNAc-spezifischen lektinähnlichen Liganden als Targeting-Molekül die Effektivität der Aufnahme klassisch oral oder aerosolisch applizierter Vaccinen über das FAE der Epithelien des Primärbronchus und im Speziellen über die Epithelien der Atrien der Lungen des Haushuhnes vermutlich erheblich gesteigert werden kann.

#### Abschnitt VI. Zusammenfassung

Glycokonjugate auf epithelialen Oberflächen der aviären Lunge spielen als potentielle Rezeptor-Moleküle für pathogene Mikroorganismen der Vögel eine bedeutsame Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Abschnitte der Lunge des Haushuhns (Primärbronchius mit Follikel-assoziiertem Epithel [FAE] und Bronchius-assoziiertem lymphatischem Gewebe [BALT], Sekundärbronchius, Atrium, Lungen-Parenchym) vom Huhn im Alter von 3 Tagen, 1 Woche, 2 Wochen, 3 Wochen und 10 Wochen lektinhistochemisch untersucht. Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit 24 Biotin-konjugierten Lektinen aus 5 verschiedenen Lektin-Kategorien durchgeführt, die in Hemmversuchen auf ihre Zuckerspezifität überprüft wurden. Die Sichtbarmachung der erfolgten Bindungen am histologischen Schnitt erfolgte nach der Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode.

Für den Primärbronchius können aufgrund der vorliegenden Ergebnisse folgende Aussagen getroffen werden: Das respiratorische Flimmerepithel konnte mit den N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc)-spezifischen Lektinen DSL, LEL und STL, den N-Acetyl-Galactosamin (GalNAc)-spezifischen Lektinen ACL, BPL, Jacalin und MPL und dem Mannose (Man)-spezifischen Lektin ConA angefärbt werden. Becherzellen und Becherzellinhalte konnten mit Jacalin und ConA angefärbt werden. Zusammenhängende, flache Zell-Reihen des FAE an den Übergangsbereichen des Primär- in den Sekundärbronchius konnten in allen Altergruppen besonders spezifisch mit den GlcNAc-spezifischen Lektinen WGA und s-WGA angefärbt werden. Dieses Färbe-Ergebnis erwies sich als unabhängig von jeglicher Ausbildung eines BALT-Knotens. Die GalNAc-spezifischen Lektine SBA, VVA und ECL färbten hochgradig spezifische einzelständige, hochprismatische Zellen innerhalb des FAE aller Altersgruppen an. Einzelne große, runde Zellen mit einer subepithelialen Lokalisation im Primärbronchius konnten mit dem GlcNAc-spezifischen Lektin GSL-II Anfärbungen epithelialer Zellen des Sekundärbronchius angefärbt werden. konnten mit den GlcNAc-spezifischen Lektinen DSL und STL und dem GalNAcspezifischen Lektin Jacalin erreicht werden. Die GlcNAc-spezifischen Lektine WGA und s-WGA färbten in allen untersuchten Präparaten aller Altersgruppen besonders spezifisch die epitheliale Auskleidung der Atrien.

Einzelne große, runde – nicht näher klassifizierte – Zellen des **Parenchyms** konnten mit dem GlcNAc-spezifischen Lektin GSL-II und dem Fucose-spezifischen Lektin UEA-I angefärbt werden.

Die hier erabeiteten Daten bilden die Grundlage für Studien zur Struktur-Funktionsbeziehung am respiratorischen Epithel der Vögel und für Untersuchungen zu Wirt-Parasit-Interaktionen bei respiratorischen Erkrankungen beim Wirtschaftsgeflügel. Durch die hier gelungene Charakterisierung neuer Zellmarker werden Untersuchungen zur Ontogenese des FAE und der assoziierten lymphatischen Strukturen möglich. Ferner werden durch sie schließlich Perspektiven für die Entwicklung wirksamer antiadhäsiver Therapeutika und für eine Effektivierung der oralen oder oronasalen Vaccination durch Antigen-Targeting eröffnet.

#### Abschnitt VII. Summary

Christoph Hinterseher (04.2005):

# Lectin histochemical investigation of the lung of chickens with special emphasis on selected immunorelevant lung segments

Carbohydrates on the surface oft the lung associated epithelium may serve as receptors for a variety of microorganisms. For this reason lectin histochemistry was applied on different chicken-lung-tissue-segments (*Gallus gallus domesticus*) of 3 days, 1-3 weeks and 10 and 11 weeks old chickens. 24 biotinylated lectins with 5 different carbohydrate-specifities were used for histochemistry on parafine embedded tissue. The avidin-biotin-complex ("ABC") method with horserradish peroxidase was used to visualize the binding of lectins to histological sections of chicken lungs. Binding specifity of lectins was confirmed by competitive inhibition using the appropriate sugar or neuraminidase-digestion. Negative controls were incubated with lectin-buffer only. The results of this study indicate the expression of carbohydrate moites containing *Glc*, *GlcNAc*, *Gal*, *GalNAc*, and *Man* monosaccharides on the surface of chicken lung epithelial cells.

In the **primary bronchi** cells of the respiratory epithelium were stained with the N-Acetyl-Glucosamine-specifity (GlcNAc) lectins DSL, LEL and STL, the N-Acetyl-Galactosamine-specifity lectins ACL, BPL, Jacalin and MCL and the Mannose-specifity lectin Con A. Goblet cells were detected by Jacalin and ConA. WGA and s-WGA with GlcNAc-specifity stained flat-square-formed cells in the FAE of the BALT at the junctions of the primary and secondary bronchi. Interestingly, a highly specific binding of these lectins was also observed with the entire epithelium of the atria. These staining patterns were seen in all age-groups and were independent of the development of organised lymphoide structures such as BALT. SBA, VVA and ECL which represent lectins of the Gal- and GalNAc-group were identified as unique markers for cuboid cells of the FAE covering BALT nodules which are exclusively found at the transition-zone of the fimbrinated respiratory epithelium and the FAE. GSL-II stained cuboid to round cells located in the subepithelium of primary bronchi.

GSL-II positive cells with an identical morphology were also found throughout the parenchym with a scattered appearence. Epithelial cells of **secondary bronchi** could be detected by the GlucNAc-lectins DSL and STL and the GalNAc-lectin Jacalin. The **atrium**-epithelium of all age-groups were highly specificly stained with WGA and s-WGA.

These studies provide the basis for further investigations into structure-function relationships at the respiratory epithelium and studies aimed at understanding of host-pathogene interaction at this crutial inner surface. Finally, the development of new and highly specific markers will allow advanced studies on the ontogeny of the FAE and the associated lymphoid structures.

## Abschnitt VIII. Literaturverzeichnis

- ABEIJON, C. und C.B. HIRSCHBERG (1992): *Topography of glycosylation reaction in the endoplasmic reticulum* Trends. Biochem. Sci. 17, 32-36
- ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS und J.D. WATSON (1994):

Molecular biology of the cell

3. Aufl., Garland Publishing, New York, London, S. 483 f., 502, 589-591, 604-608, 971-977, 984, 989-991

- ALLEN, A., D.A. HUTTON, J.P. PEARSON und L.A. SELLERS (1984): Mucus glycoprotein structure, gel formation and gastrointestinal mucus function In: Mucus and Mucosa (Ciba Foundation Symposium 109), Pitman, London, S. 137-151
- ALROY, J. A.A., UCCI und M.E.A. PEREIRA (1984): Lectins: Histochemical probes for specific carbohydrate residues In: R.A. DELELLIS (Hrsg.) Advances in immunhistochemistry Masson Publishing USA, New York, Paris, S. 67-88
- ALROY, J., V. GOYAL, N.W. LUKACS, R.L. TAYLOR, R.G. STROUT, H.D. WARD und M.E.A. PEREIRA (1989):
   Glycoconjugates of the intestinal epithelium of the domestic fowl (Gallus domesticus):
   A lectin histochemistry study

Histochem. J. <u>21</u>, 187-193

AUGUSTINE, P.C. (1985)
 Eimeria meleagrimitis sporozoites: Effect of lectins on invasion of cultured cells

Poultry Sci. <u>64</u>, 2296-2299

- AUGUSTINE, P.C. (2001)
   Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus Eimeria
   Int. J. Parasitol 31 (1), 1-8
- BEFUS, A.D., N. JOHNSTON, G.A. LESLIE und J. BIENENSTOCK (1980): *Gut-Associated lymphoid tissue in the chicken*, I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches J. Immunol. <u>125</u> (6), 2626-2632
- BEUTH, J., B. STOFFEL und G. PULVERER (1996): *Inhibition of bacterial adhesion and infections by lectin blocking*  In: KAHANE, I. und I. OFEK (Hrsg): *Advances in experimental medicine and biology* Vol. 408, Plenum Press, New. York, London, S. 51-56
- BIENENSTOCK, J., JOHNSTON, N. and PEREY, D.Y. (1973a): Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics Lab Invest <u>28</u>, 686-92
- BIENENSTOCK, J., JOHNSTON, N. and PEREY, D.Y. (1973b): Bronchial lymphoid tissue. II. Functional characteristics Lab Invest <u>28</u>, 693-8
- BJERREGAARD, P. (1975):
   Lymphoid cells in the chicken intestinal epithelium
   Cell Tissue Res <u>161</u> (4), 485-495
- BOERNER, F. (1966): *Taschenwörterbuch der botanischen Pflanzennamen* 2. Auflage Verlag P. Parey, Berlin, Hamburg
- BOYD, W.C. und R.M. REGUERA (1949): *Hemagglutinating substances in various plants* J. Immunol. <u>62</u>, 333-339
   zit. Nach J. KOUCOUREK (1986)

- BOYD, W.C. und E. SHAPLEIGH (1954): Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins) Science <u>119</u>, 419
- BROOKS, S. A., A.J. C. LEATHEM und U. SCHUMACHER (1997): Lectin histochemistry, a concise practical handbook Bios Scientific Publishers, S. 8-12, 16-17, 45-98
- BURNS, R.B. (1982): Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (Gallus domesticus)
   Res. Vet. Sci. <u>32</u>, 359-367
- BYE, W.A., C.A. ALLAN und J.S. TRIER (1984): Structure, distribution, and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum Gastroenterology <u>86</u>, 789-801
- CARSON, D.D. (1992): *Proteoglycans in Development*  In: M. FUKUDA (Hrsg.): *Cell surface carbohydrates and cell development* CRC-Press, Boka Raton, S. 257-283
- CHAE, C. und Y.S. LEE (1995): *Age-related lectin histochemical changes in thenporcine small intestine* J. Vet. Med. Sci. <u>57</u> (59), 883-889
- CHEN, H., V. TORCHILIN und R. LANGER (1996): Lectin bearing polymerized liposomes as potential oral vaccine carries Pharm. Res. <u>13</u> (9), 1378-1383
- CLARK, M.A., M.A. JEPSON, N.L. SIMMONS, T.A. BOOTH und B.H. HIRST (1993):

*Differential expression of lectin-binding sites defines mouse intestinal M-cells* J. Histochem. Cytochem. <u>41</u> (11), 1679-1684

 CLARK, M.A., M.A. JEPSON und B.H. HIRST (1995 a): Lectin binding defines and differentiates M cells in mouse small intestine and caecum

Histochem. Cell Biol. 104 (2), 161-168

- CLARK, M.A., M.A. JEPSON, N.L. SIMMONS und B.H. HIRST (1995 b): Selective binding and transcytosis of Ulex europaeus I lectin by mouse Peyer's patch M cells in vivo Cell Tissue Res. 282 (3), 455-461
- CLARK, M.A., M.A. JEPSON, N.L. SIMMONS und B. HIRST (1994): Differential surface characteristics of M-cells from mouse intestinal Peyer's and caecal patches Histochem. J. <u>26</u> (3), 271-280
- CLARK, M.A., B.H. HIRST, and M.A. JEPSON (2000): Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles Arch. Histol. Cytol. 63 (4) 305-307
- CLEARY, P.P., ZHANG, Y. and PARK, H.S. (2004): Nasal associated lymphoid tissue and M cells, a window to persistent streptococcal infections Indian J. Med. Res. <u>119</u>, 57-60
- COSTE, H., M.B. MARTEL, G. AZZAR and R. GOT (1985): UDP-glucose-ceramide glucosyltransferase from porcine submaxillary glands is associated with the Golgi-apparatus Biochem. Biophys. Acta <u>814</u>, 1-7
- COSTE, H., M.B. MARTEL, R. GOT (1986): *Topology of glucosylceramide synthesis in Golgi membranes from porcine submaxillary glands* Biochem. Biophys. Acta <u>858</u>, 6-12
- COVER, M.S. (1953): Gross and microscopic anatomy of the respiratory system of the turkey. II. The larynx, trachea, syrinx, bronchi and lungs Amer. J. Vet. Res. <u>14</u>, 230-238 (1953)
- DAVENPORT, W.D. und E.R. ALLEN (1995):
   Dome epithelium and follicle-associated basal lamina pores in the avian bursa of Fabricius
   Anat. Rec. <u>241</u> (2), 155-162

- DIXON, H.B.F. (1981):
   Defining a lectin
   Nature (London) <u>292</u>, 192
- DEKKER, J. und G.J. STROUS (1990): Covalent oligomerization of rat gastric mucin occurs in the rough endoplasmic reticulum, is N-glycosylation-dependent, and precedes initial O-glycosylation J. Biol. Chem. <u>265</u> (30), 18116-1812
- DUNCKER, H.-R. (1968):
   Der Bronchialbaum der Vogellunge
   Verh. Anat. Ges. <u>62</u>, 287-292 (1968)
- DUNCKER, H.-R., E. HAUFE und O. SCHLÜTER (1964): Die Darstellung der Lungen und Luftsäcke der Vögel, I. Präparator <u>10</u>, 9-16 (1964)
- EHRLICH, P. (1891 a): *Experimentelle Untersuchungen über die Immunität. I. Über Ricin* Dtsch. Med. Wschr. <u>17</u>, 976-979
   zit. nach J. KOUCOUREK (1986)
- EHRLICH, P. (1891 b): *Experimentelle Untersuchungen über die Immunität. II. Über Abrin*  Dtsch. Med. Wschr. <u>17</u>, 1218-1219 zit. nach J. KOUCOUREK (1986)
- FAGERLAND, J.A. and ARP, L.H. (1990):
   A morphologic study of bronchus-associated lymphoid tissue in turkeys
   Am. J. Anat. <u>189</u>, 24-34
- FAGERLAND, J.A. and ARP, L.H. (1993a): Distribution and quantitation of plasma cells, T lymphocyte subsets, and B lymphocytes in bronchus-associated lymphoid tissue of chickens: age-related

differences

Reg. Immunol. <u>5</u>, 28-36

- FAGERLAND, J.A. and ARP, L.H. (1993b): Structure and development of bronchus-associated lymphoid tissue in conventionally reared broiler chickens Avian Dis. <u>37</u>, 10-8
- FERRER, R., J.M. PLANAS, M. DURFORT und M. MORETO (1991): Morphological study of the caecal epithelium of the chicken (Gallus gallus domesticus L.)
   Br. Poult. Sci., <u>32</u> (4), 679-691
- FERRER, R., J.M. PLANAS und M. MORETO (1995): Cell apical surface area in enterocytes from chicken small and large intestine during development Poult. Sci., <u>74</u> (12), 1995-2002
- FISCHER, G. (1905): Vergleichend-anatomische Untersuchungen über den Bronchialbaum der Vögel

Zoologica 19, H. 45, 1-46 (1905)

- FORSTNER, J.F. und G. FORSTNER (1994): Gastrointestinal mucus
   In: L.R. JOHNSON (Hrsg.): Physiology of the Gastrointestinal Tract
   3. Auflage, Raven Press, New York, S. 1255-1283
- FOSTER, N., M.A. CLARK, M.A. JEPSON und B.H. HIRST (1998): Ulex europaeus I lectin targets microspheres to mouse Peyer's patch M cells in vivo

Vaccine 16 (5), 536-541

- FRANZ, H. (1990):
   *100 Jahre Lektinforschung eine Bilanz* Naturwissenschaften <u>77</u>, 103-109
- FREY, A. und M.R. NEUTRA (1997): *Targeting of mucosal vaccines to Peyer's patsch M cell* Behring Inst. Mitt. <u>98</u>, 376-389

- FUJIMURA, Y., TAKEDA, M., IKAI, H., HARUMA, K., AKISADA, T., HARADA, T., SAKAI and OHUCHI, M. (2004): The role of M cells of human nasopharyngeal lymphoid tissue in influenza virus sampling.
   Virchows Arch. <u>444</u>, 36-42. Epub 2003 Oct 10
- GEBERT, A. (1999): Funktion und Differenzierung von M-Zellen im Darm-Immunsystem des Menschen Forschungsbericht der Abteilung Anatomie 2, Hannover, 34-45
- GELBERG, H., H. WHITELEY, G. BALLARD, J. SCOTT und M. KUHLENSCHMIDT (1992): Temporal lectin histochemical characterization of porcine small intestine
  - Am. J. Vet. Res. <u>53</u> (10), 1873-1880
- GIANNASCA, P.J., K.T. GIANNASCA, P. FALK, J.I. GORDON und M.R. NEUTRA (1994):

Regional differences in glycoconjugates of intestinal M-cells in mice: potential targets for mucosal vaccines

Am. J. Physiol. 267 (6 Pt 1), G1 108-121

GOLDSTEIN, I.J., R.C. HUGHES, M. MONSIGNY, T. OSAWA und N. SHARON (1980):
 What should be called a lectin ?

Nature 285, 66

• GOLDSTEIN, I.J. und R.D. PORETZ (1986):

Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specifity of lectins

In: I.E. LIENER, N. SHARON, I.J. GOLDSTEIN (Hrsg.):

The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine Academic Press, Orlando, San Diego, S. 33-247

 GOMEZ DEL MORAL, M., J. FONFRIA, A. VARAS, E. JIMENEZ, J. MORENO und A.G. ZAPATA (1998): Appearance and development of lymphoid cells in the chicken (Gallus gallus) caecal tonsil

Anat. Rec. 250 (2), 182-189

- HAKOMORI, S., FUKUDA, M., SEKIGUCHI, K. und W.G. CARTER (1984): *Fibronectin, Laminin, and other extracellular glycoproteins* In: A.P. PIEZ und A.H. REDDI (Hrsg.): Extracellular matrix biochemistry Verlag Elsevier, New York, Amsterdam, S. 229-275
- HARDINGHAM, T.E. und A.J. FOSANG (1992): *Proteoglycans: many forms and many functions* Faseb J. <u>6</u>, 861-870
- HARVEY, O. (1968):
   Die Lunge der Vögel
   Verh. Anat. Ges. <u>62</u>, 287-292 (1968a)
- HATHAWAY, L.J. und J.P. KRAEHENBUHL (2000): *The role of M cells in mucosal immunity* Cell. Mol. Life Sci. <u>57</u>, 323-332
- HAZELHOFF, E. H. (1951): Structure and function of the lung of birds Poultry Sci., <u>30</u>, 3-10, 1951
- HEINEGÅRD, D. und M. PAULSSON (1984): Structure and metabolism of proteoglycans
   In: A.P. PIEZ und A.H. REDDI (Hrsg.): Extracellular matrix biochemistry
   Verlag Elsevier, New York, Amsterdam, S. 277-328
- HIRSCHBERG, C.B. und M.D. SNIDER (1987): Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi-apparatus
   Appu. Box. Biochem. 56, 62, 97

Annu. Rev. Biochem. <u>56</u>, 63-87

- HIRSH, D.C. (1985):
   *Fimbriae: Relation of intestinal bacteria and virulence in animals* Adv. Vet. Sci. Comp. Med. <u>29</u>, 207-238
- HODGES, R.D. (1974): *The histology of the fowl* Academic Press, London, S. 64-213
- HOFFMAN-FEZER, G. (1973): Histologische Untersuchungen an lymphatischen Organen des Huhnes (Gallus domesticus) während des ersten Lebensjahres
   Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. <u>136</u> (1), 45-58
- INOUE, S. (1989):
   Ultrastructure of basement membranes
   Int. Rev. Cytol. <u>117</u>, 57-98
- JENTOFT, H. (1990): Why are glycoproteins O-glycosylated ? Trends Biochem. Sci. <u>15</u>, 291-294
- JEPSON, M.A., M. A. CLARK, N. FORSTER, C.M. MASON, M.K. BENNET, N.L. SIMMONS und B.H. HIRST (1996): *Targeting of intestinal M cells* J. Anat. <u>189</u> (Pt 3), 507-516
- JEPSON, M.A., C.M. MASON, M.A. CLARK, N.L. SIMMONS und B.H. HIRST (1995): Variations in lectin binding properties of intestinal M-cells
   J. Drug. Target. <u>3</u> (1), 75-77
- JEURISSEN, S.H.M., DUIJVESTIJN, A.M., SONTAG, Y. and KRAAL, G. (1987):

Lymphocyte migration into the lamina propria of the gut is mediated by specialized HEV-like blood vessels Immunology <u>62</u>, 273-7

 JEURISSEN, S.H.M., E.M. JANSE und G. KOCH (1988): Meckel's diverticle: a gut associated lymphoid organ in chicken Adv. Exp. Med. Biol. <u>237</u>, 599-605

- JEURISSEN, S.H.M., E.M. JANSE, G. KOCH und G. F. DE BOER (1989): *Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens* Cell Tissue Res. <u>258</u> (1), 119-124
- JEURISSEN, S.H.M., F. WAGENAAR und E.M. JANSE (1999): Further characterization of M cells in gut-associated lymphoid tissues of the chicken Poult. Sci. <u>78</u> (7), 965-972
- JÖRNS, J. (2002): Lektinhistochemische Untersuchungen an lymphatischen Organen des Huhns Hamburg, Universitätsklinikum Eppendorf, Diss.
- KATO, A., Y. HASHIMOTO, Y. KON und M. SUGIMURA (1992): Are there M cells in the cecal tonsil of chicken ?
   J. Vet. Med. Sci. <u>54</u> (5), 999-1006
- KING, T.P., R. BEGBIE, D. SLATER, M. McFADYEN, A. THOM und D. KELLY (1995):

Sialylation of intestinal microvillar membranes in newborn, sucking and weaned pigs

Glycobiology 5 (5), 525-534

- KITAGAWA, H., T. IMAGWA and M. UEHARA (1996): The apical caecal diverticulum of the chicken identified as a lymphoid organ J. Anat. <u>189</u>, 667-672
- KITAGAWA, H., Y. HASHIMOTO, Y. KON und N. KUDO (1988): Light and electron microscopic studies on chicken intestinal globule leucocytes Jpn. J. Vet. Res. <u>36</u>, 83-117
- KITAGAWA, H, S. SHIRAISHI, T. IMAGAWA und M. UEHARA (2000): Ultrastructural characteristics and lectin-binding properties of M cells in the follicle associated epithelium of chicken caecal tonsils
   J. Anat. <u>197</u>, 607-616

- KIVIRIKKO, K.I. und R. MYLLYLÄ (1984): Biosynthesis of the collagens
   In: A.P. PIEZ und A.H. REDDI (Hrsg.): Extracellular matrix biochemistry
   Verlag Elsevier, New York, Amsterdam, S. 83-118
- KJELLÉN, L. und U. LINDAHL (1991): *Proteoglycans: structure and interaction* Annu. Rev. Biochem. 60, 443-475
- KLEIN, A. (1875):
   Über die lymphatischen Organe
   Verh. Anat. Ges. <u>32</u>, 83-91
- KNIBBS, R.N., I.J. GOLDSTEIN, R.M. RATCLIFFE und N. SHIBUYA (1991): Characterization of carbohydrate binding specifity of the leucoagglutinating lectin from Maackia amurensis. Comparison with other sialic-acid-specific lectins
  - J. Biol. Chem. 266 (1), 83-88
- KOBOTA, A. und S. TAKASAKI (1992): Structure and biosynthesis of cell surface carbohydrates In: M. FUKUDA (Hrsg.): Cell surface carbohydrates and cell development CRC-Press, Boka Raton, S. 1-24
- KOCOUREK, J. (1986):
  - Historical Background
  - In: I.E. LIENER, N. SHARON und I.J. GOLDSTEIN (Hrsg.):

*The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine* Academic Press, Orlando, San Diego, S. 1-32

 KORNFELD, R. und S. KORNFELD (1985): Assembly of asparagine-linked oligosaccharids Annu. Rev. Biochem. <u>54</u>, 631-664  KOLOPP-SARDA, M.N., M.C. BENE, N. MASSIN, J.J. MOULIN and G.C. FAURE (1994): Immunohistological analysis of macrophages, B-cells and T-cells in the mouse

lung

Anat. Rec. 239, 150-7

 KRAEHENBUHL, J.P., S.A. HOPKINS, S. KERNÉIS und E. PRINGAULT (1997):

Antigen sampling by epithelial tissue: Implication for vaccine design Behring Inst. Mitt. <u>98</u>, 24-32

- KRAUSE, R. (1922): Mikroskopische Anatomie der Wirbeltiere in Einzeldarstellungen. II. Vögel und Reptilien Vereinig. wiss. Verleger, Berlin und Leipzig 1922
- LANDSTEINER, K. (1902): Beobachtungen über Hämagglutination Wien. Klein. Rundschau, S.774 Zit. nach J. ROTH (1978)
- LAMBKIN, I., C. PINILLA, C. HAMASHIN, L. SPINDLER, S. RUSSEL, A. SCHINK, R. MOYA-CASTRO, G. ALLICOTTI, L. HIGGINS, M. SMITH, J. DEE, C. WILSON, R. HOUGHTEN and D. O'MAHONY (2003)
   Toward targeting oral vaccine delivery systems: selection of lectin mimetics from combinatorial libraries
   J. Virol. <u>77</u> (14) 7964-7977
- LEHR, C.M. (2000): Lectin mediated drug delivery: the second generation of bioadhesives
   J. Control Release <u>65</u> (1-2), 19-29
- LIEBICH, H.-G. (2003):
   *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere* 4. Auflage
   Schattauer

- LINDHORST, T.K. (2000):
   Wenn Zucker-Attrappen Bakterien zum Narren halten Spektrum der Wissenschaft, März, 16-21
- LO, D., W. TYNAN, J. DICKERSON, J. MENDY, H.W. CHANG, M. SCHARF, D. BYRNE, D. BRAYDEN, L. HIGGINS, C. EVANS, D.J. O'MAHONY (2003): Peptidoglycan recognition protein expression in mouse Peyer's Patch follicle associated epithelium suggests functional specialization Cell Immunol. <u>224</u> (1), 8-16
- MANTIS, N., A. FREY und M.R. NEUTRA (2000): Accessibility of glycolipid and oligosaccharid epitopes on rabbit villus and follicle-associated epithelium Am. J. Physiol. <u>278</u> (6) (Gastrointest. Liver Physiol.), G915-G923
- MILLER, E.J. (1984): Chemistry of the collagens and their distribution In: A.P. PIEZ und A.H. REDDI (Hrsg.): Extracellular matrix biochemistry Verlag Elsevier, New York, Amsterdam, S. 41-81
- MIRELMAN, D. und I. OFEK (1986): *Introduction to m,icrobial lectins and agglutinins*  In: MIRELMANN, D. (Hrsg.) (1986): *Microbial lectins and agglutinins* Wiley & sons, New York, Chichester, S. 1-19
- MONTREUIL, J. (1987): Structure and confirmation of glycoprotein glycans In: K. OLDEN und J.B. PARENT (Hrsg.): Vertebrate Lectins Van Nostrand Reinhold Advanced Cell Biology Series, New York, S. 1-26

 NEUTRA, M.R. (1998): Current concepts in mucosal immunity. V. Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system Am. J. Physiol. 274 (5) Gastrointest. Liver Physiol.), G785-G791  NEUTRA, M.R., E. PRINGAULT und J.P. KRAEHENBUHL (1996): Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses

Annu. Rev. Immunol. 14, 275-300

- NEUTRA, M. R., T.L. PHILLIPS, E.L. MAYER und D.J. FISHKIND (1987): Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicleassociated epithelium of rabbit Peyer's patch Cell Tissue Res. <u>247</u> (3), 537-546
- NI, Y. und I. TIZARD (1996): Lectin-carbohydrate interaction in the immune system Vet. Immunol. Immunopathol. <u>55</u>, 205-223
- NOIVA, R., H.A. KAPLAN, M. GEETHA-HABIB und W.J. LENNARZ (1990): Protein Glycosylation: Oligosaccharyl transferase and a novel recognition protein In: J.A.F. OP DEN KAMP (Hrsg.): Dynamics and Biogenesis of Membranes
  - NATO ASI Series, Vol. 40, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 133-149
- OFEK, I. und R.J. DOYLE (1994): Bacterial adhesion to cells and tissues Chapman and Hall, New York, London, S. 1-15, 321-512
- OLAH, I. und B. GLICK (1978): The number and size of the folliculare epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius Poult. Sci. <u>57</u> (5), 1445-1450
- OLAH, I. und B. GLICK (1992): Follicle-associated epithelium and medullary epithelial tissue of the bursa of Fabricius are two different compartments Anat. Rec. <u>233</u> (4), 577-587
- OPPEL, A. (1905): Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Wirbeltiere. VI. Teil: Atmungsapparat Fischer, Jena 1905

 OYOFO, B.A., J.R. DeLOACH, D.E. CORRIER, J.O. NORMAN, R.L. ZIPRIN und H.H. MOLLENHAUER (1989a)
 Effects of carbohydrates on Salmonella typhimurium colonization in broiler chickens

Avian Dis. 33 (3), 531-534

- OYOFO, B.A., J.R. DeLOACH, D.E. CORRIER, J.O. NORMAN, R.L. ZIPRIN und H.H. MOLLENHAUER (1989b)
   Prevention of Salmonella typhimurium colonization of broilers with D-mannose Poult. Sci. <u>68</u> (10), 1357-1360
- OYOFO, B.A., R.E. DROLESKEY, J.O. NORMAN, H.H. MOLLENHAUER, R.L. ZIPRIN, D.E. CORRIER und J.R. DeLOACH (1989c): Inhibition by mannose of in vitro colonization of chicken small intestine by Salmonella typhimurium Poult. Sci. <u>68</u> (10), 1351-1356
- PLESCI, G. (1983):
   MALT in different species
   Poult. Sci. <u>965</u>, 123-334
- PREHM, P. (1984):
   Hyaluronate is synthesized at plasma membranes
   Biochem. J. <u>220</u>, 597-600
- POHLMEYER, I. (2002): Lektinhistochemische Untersuchungen am Hinterdarm des Haushuhnes unter besonderer Berücksichtigung ausgewählter immunrelevanter Darmbereiche Dissertation 2002, Hannover
- RENKONEN, K.O. (1948): Studies of hemagglutinins present in seeds of some representatives of leguminosae Ann. Med. Exp. Fenn., <u>26</u>, 66-72 zit. nach J. KOUCOUREK (1986)

- RIGDON, R. H. (1959): The respiratory system in the normal white Pekin duck Poultry Sci. <u>38</u>, 196-210
- ROSE, M.E. (1981): *Lymphatic system* In: A.S. King und J. McLELLAND (Hrsg.): Form and function in birds, Vol. 2 Academic Press, London, New York, S. 341-384
- ROTH, J. (1978): *The lectins. Molecular probes in cell biology and membrane research.* Fischer-Verlag, Jena, S. 8-9
- SANDHOFF, K. und P. LEINEKUGEL (1990): *Glycolipids – Intracellular movement and storage disease*  In: J.A.F. OP DEN KAMP (Hrsg.): *Dynamics and Biogenesis of Membranes* NATO ASI Series, Vol. 40, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 1-14
- SALT, G. W. (1960): The respiratory system. In: Marshall, Biology and comparative physiology of birds. Vol. 1, 363-409 Academic Press, New York and London 1960
- SCHACHTER, H. und D. WILLIAMS (1982): Biosynthesis of mucuglycoproteins In: E.N. CHANTLER, J.B. ELDER, M. ELSTEIN (Hrsg.): Mucus in health and disease II Plenum Press, New York, London, S. 3-28
- SCHAT, K.A. und T.J. MYERS (1991): *Avian intestinal immunity* Crit. Rev. Poultry Biol. <u>3</u>, 19-34
- SCHLÜTER, O. (1964):
   Die Darstellung der Lungen und Luftsäcke der Vögel, II.
   Präparator <u>10</u>, 49-60 (1964)

- SCHOLTYSSEK, S. (1968): Handbuch der Geflügelproduktion Ulmer Verlag, Stuttgart, S. 262-267
- SCHUMACHER, L. (1968): *Zum Bronchialbaum des Geflügels* Verh. Anat. Ges. <u>62</u>, 287-292 (1968)
- SCHULZE, F. E. (1910):
   Über die Bronchi saccales und den Mechanismus der Atmung bei Vögeln Sitz.-Ber. Preuß. Akad. Wiss., Berlin 1910, S. 537-538
- SHARMA, R. und U. SCHUMACHER (2001): Carbohydrate expression in the intestinal mucosa Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. <u>160</u>, 1-91
- SHARMA, R., E.J. VAN DAMME, W.J. PEUMANNS, P. SARAFIELD und U. SCHUMACHER (1996): Lectin binding reveals divergent carbohydrate expression in human and mouse Peyer's patches Histochem. Cell Biol., <u>105</u> (6), 459-465
- SHARON, N. (1977):
  - *Lectins* Sci. Am. <u>236 (</u>6), 108-119
- SHARON, N. (1987): Lectins: An overview
   In: K. OLDEN und J.B. PARENT (Hrsg.): Vertebrate Lectins
   Van Nostrand Reinhold Advanced Cell Biology Series, New York, S. 27-45
- SHARON, N. (1996): Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease In: KAHANE, I. und I. OFEK (Hrsg.): Advances in experimental medicine and biology Vol. 408, Plenum Press, New York, London, S. 1-8

- SHARON, N. und H. LIS (1989): Lectins as cell recognition molecules Science <u>246</u>, 227-246
- SHARON, N. und H. LIS (1993): Carbohydrates in cell recognition Sci. Am. <u>268</u> (1), 74-81
- SHARON, N. und H. LIS (1995): Lectins – proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition Essays Biochem. <u>30</u>, 59-75
- SMINIA, T., VAN DER BRUGGE-GAMELKOORN, G.J. and JEURISSEN, S.H.M. (1989):

Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) Crit. Rev. Immunol <u>9</u>, 119-50

- STILLMARK, H. (1888):
   Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiaceen
   Dorpat, Univ., Diss.
- STROUT, R.G., J. ALROY, N.W. LUKACS, H.D. WARD und M.E.A. PEREIRA (1994):

Developmentally regulated lectins in Eimeria species and their role in avian coccidiosis

- J. Parasitol. 80 (6), 946-951
- SUMNER, J.B. und S.F. HOWELL (1936): The identification of the hemagglutination of the jack bean with concanavalin A J. Bacteriol. <u>32</u>, 277-237 zit. nach J. KOUCOUREK (1986)
- SUPRASERT, A., T. FUJIOKA und K. YAMADA (1987): The histochemistry of glycoconjugates in the colonic epithelium of the chicken Histochemistry <u>86</u>, 491-497

- SUPRASERT, A. und T. FUJIOKA (1988): Lectin and ultrastructural cytochemistry of glycoconjugates in the cecal epithelium of the chicken Acta histochem. 83, 141-151
- SUZUKI, Y., C.P. ECKER und H.A. BLOUGH (1984): Enzymatic glycosylation of dolichol monophosphate and transfer of glucose from isolated dolichol-D-glycosyl phosphate to ceramides by BHK 21 cell microsomes

Eur. J. Biochem. <u>143</u>, 447-453

- TAATJES, D.J. und J. ROTH (1990): Selective loss of sialic acid from rat small intestinal epithelial cells during postnatal development: demonstration with lectin-gold-techniques Eur. J. Cell Biol. <u>53</u> (2): 255-266
- TAKATA, S., O. OHTANI und Y. WATANABE (2000): Lectin binding patterns in rat nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and the influence of various types of lectin on particle uptake in NALT J. Anat. 197Pt 4, 607
- TAKEUCHI, KITAGAWA, IMAGAWA (1998): Proliferation and cellular kinetics of villous epithelial cells and M cells in the chicken caecum

J. Anat (1998) 193, pp. 233-239, United Kingdom

- TANGO, M., E. SUZUKI, F. GEJYO und T. USHIKI (2000): The presence of specialized epithelial cells on the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in the mouse Arch Histol Cytol. <u>63</u> (1) 81-95
- VAN DER REST, M. und R. GARRONE (1991): Collagen family of proteins FASEB J. 5, 2814-2823
- VAN KLINKEN, J.-W. (1998): *Mucus, mucins and disease* Amsterdam, Univ., Department of Pediatrics, Diss., S. 133-161

- VOLLMERHAUS, B. und F. SINOWATZ (1992): *Atmungsapparat der Vögel* In: R. NICKEL, A. SCHUMMER, E. SEIFERLE (Hrsg.): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band V: *Anatomie der Vögel* 2. Auflage., Verlag Parey, Berlin, Hamburg, S. 159-175
- WAIBL, H. und F. SINOWATZ (1992): *Kreislaufapparat und Lymphatisches System des Geflügels*  In: R. NICKEL, A. SCHUMMER, E. SEIFERLE (Hrsg.): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band V: *Anatomie der Vögel* 2. Auflage, Verlag Parey, Berlin, Hamburg, S. 283-328
- WEHRMEYER, K. (1986): Isolierung, Eigenschaften und Chemie von Mucoglycopreoteinen Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- ZEUTHEN, E. (1960): The respiratory system. In: Marshall, Biology and comparative physiology of birds. Vol. 1, 363-409 Academic Press, New York and London 1960
- ZHOU, Z.X., Z.P. DENG und J.Y. DING (1995): Role of glycoconjugates in adherence of Salmonella pullorum to the intestinal epithelium of chicks Br. Poult. Sci. <u>36</u>, 79-86

## Abschnitt IX. Anhang

## 1. Hühner, Hühnerbruteier

Alle in dieser Arbeit untersuchten Hühner sind Tiere der Linie VALO, Firma Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven.

**SPF-Status** der Hühnerbruteier laut Kontroll-Zertifikat: frei von Kükenanämievirus, aviären Adenoviren (Serotyp 1-12, EDS), Aviäres Encephalomyelitis-Virus, Geflügel-Leukose-Virus, Aviäres Nephritis-Virus, Aviäres Reovirus, Geflügelpockenvirus, Infektiöse Bronchitis-Virus, Infektiöse Bursitis-Virus (Aviäres Birnavirus), Infektiöses Laryngotracheitis-Virus, Influenza-Virus Typ A, MAREK's disease-Virus, Puten-Rhinotracheitis-Virus, Mycoplasma meleagridis und Mycoplasma synoviae, Newcastle-disease-Virus, Reticuloendotheliuose-Virus, Salmonella pullorum, andere Salmonella spp.

## 2. Auflistung der Zusammensetzung verwendeter Reagenzien

(1) Gepufferte Formaldehyd-Lösung

Gepufferte Formaldehyd-Lösung	
Formaldehyd >35%, gefiltert	100ml
Aqua dest.	900ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	4.0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5g

#### (2) Hämalaun-Eosin-Färbung nach MAYER

(a) Herstellung der Hämalaun-Stamm-Lösung
Hämalaun-Stamm-Lösung	
Lösung A:	
Hämatoxylin-Kristalle Aqua dest.	1g 400ml
→ alles durch Erwärmung lösen	
Hämalaun-Stamm-Lösung	
Lösung B:	
$KAI(SO_4)_2 \ge 12 H_2O$ NaJO <sub>3</sub> Aqua dest.	50g 0,2g 600ml
<ul> <li>→ alles durch Erwärmen lösen</li> <li>→ nach dem Abkühlen beide Lösungen (A + B) mischen und lichtgeschützt aufbewahren</li> </ul>	

Hämalaun-Stamm-Lösung	
Lösung C:	
Chloralhydrat-Kristalle Citronensäure-Kristalle Aqua dest.	50g 1g 100ml

# (b) Herstellung der Hämalaun-Gebrauchs-Lösung

Hämalaun-Gebrauchs-Lösung	
Hämalaun-Stammlösung (Lösung A + B) Chloralhydratgemisch (Lösung C)	200ml 10ml
ightarrow gut mischen und anschließend 24h ruhen lassen	

### (c) Herstellung der 1% Eosin-Stamm-Lösung

Eosin-Stamm-Lösung	
Eosin Aqua dest.	1g 100ml
(d) Herstellung der Eosin- <b>Gebrauchs</b> -Lösung	
Eosin-Gebrauchs-Lösung	
1% Eosin-Stammlösung Aqua dest.	80ml 160ml
ightarrow gemeinsam mit einigen winzigen Thymol-Kristallen in eine Färbeküvette geben	

→ Ansäuern mit Essigsäure

(3) TBS-Puffer (Tris-buffered saline), pH 7,6 bzw. 8,2

TBS-Puffer (pH 7,6 bzw. 8,2)

Tris 50mM NaCl 150mM → in destilliertem Wasser lösen; mit HCl (1N) pH-Wert auf 7,6 bzw. 8,2 einstellen und mit destilliertem Wasser auf 5l auffüllen.

## (4) Lektin-Puffer, pH 7,6 (nach BROOKS et al., 1997)

Lektin-Puffer (pH 7,6)

Tris	50mM
NaCl	150mM
MgCl2	1mM
CaCl2	1mM

→ in destilliertem Wasser lösen; mit Salzsäure (1N) pH-Wert auf 7,6 bringen und mit destilliertem Wasser auf 5I auffüllen

(5) Natrium-Acetat-Puffer pH 5,5

Natrium-Acetat-Puffer (pH 5,5)

Natrium-Acetat

0,5M

→ in destilliertem Wasser lösen und auf pH 5,5 einstellen und mit destilliertem Wasser auf 1I auffüllen

# 3. Chemische Substanzen und fertige Gebrauchs-Präparate

Aceton (extra rein): MERCK, Darmstadt, Art. Nr. 100063

Chloralhydrat: Riedel-de Haen, Seelze, Art. Nr. 15307

Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei) (Na2HPO4), Merck, Darmstadt, Art. Nr. 6346

Galactose: Serva, Heidelberg, Art. Nr. 22020

Glucose: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Art. Nr. G5250

Eosin: Merck, Darmstadt, Art. Nr. 15935

Haematoxylin-Kristalle: Merck, Darmstadt, Art. Nr. 15938

Isopropylalkohol: Merck, Darmstadt, Art. Nr. 9634

Kalialaun (KAI(SO4)2 x 12 H2O): Riedel-de-Haen, Seelze, Art. Nr. 31242

Lektine: Firma VECTOR Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010t:

- Amaranthus caudatus-Agglutinin (Lektin) (ACL), VECTOR laboratories
- Artocarpus-integrifolia-Agglutinin (AIA oder Jacalin), VECTOR laboraties
- Bauhinia purpurea-Agglutinin (Lektin) (BPL), VECTOR laboratories
- Concanavalin A (Con A), VECTOR laboraties
- Datura-stramonium-Agglutinin (Lektin) (DSL), VECTOR laboraties
- Dolichos biflorus-Agglutinin (DBA), VECTOR laboraties
- Erythrina cristagalli-Agglutinin (Lektin) (ECL), VECTOR laboraties
- Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia-Agglutinin I Isolektin B4 (G[B]SL-I), VECTOR laboraties

- Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia-Agglutinin II (G[B]SL-II), VECTOR laboraties
- Lens culinaris-Agglutinin (LCA), VECTOR laboraties
- Lycopersicon-esculentum-Agglutinin (Lektin) (LEL), VECTOR laboraties
- Maclura pomifera-Agglutinin (Lektin) (MPL), VECTOR laboraties
- Peanut-Agglutinin (PNA), VECTOR laboraties
- Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E), VECTOR laboraties
- Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin (PHA-L), VECTOR laboraties
- Pisum sativum-Agglutinin (PSA), VECTOR laboraties
- Ricinus communis-Agglutinin (RCA-I), VECTOR laboraties
- Solanum tuberosum-Agglutinin (potato-Agglutinin) (STL), VECTOR laboraties
- Sophora japonica-Agglutinin (SJA), VECTOR laboraties
- Soybean-Agglutinin (SBA), VECTOR laboraties
- Ulex europaeus-Agglutinin I (UEA-I), VECTOR laboraties
- Triticum vulgaris-Agglutinin (WGA), VECTOR laboraties
- Triticum vulgaris-Agglutinin, succinyliert (s-WGA), VECTOR laboraties
- Viscum album-Agglutinin (VVA) (Mistel) (ML II), VECTOR laboraties

Magnesiumchlorid (MgCl2): Merck, Darmstadt, Art. Nr. 105833

Mannose: Serva, Heidelberg, Art. Nr. 28460

Natrium-Acetat: Merck, Darmstadt, Art. Nr. 106268

Natriumchlorid (NaCl): Merck, Darmstadt, Art. Nr. 106404

Natriumdihydrogenphosphat (NaH2PO4 x H2O), Merck, Darmstadt, Art. Nr. 6346

Natriumjodat (NaJO3), Riedel-de Haen, Seelze, Art. Nr. 30332

N-Butylacetat: Merck, Darmstadt, Art. Nr. 101974

Neuraminidase (Sialidase): Boehringer-Mannheim, Art. Nr. 1585886

NN-Dimethylformamid: Sigam-Aldrich GmbH, Steinheim, Art. Nr. D4551

Richard Allen Paraffine type 1-9: Sherwood Medical, St. Lois, MO, USA, Art. Nr. 8889-502005

Phenol-Kristalle (reinst): Merck, Darmstadt, Art. Nr. 20011000

Serum-Glycerin: Chroma-GmbH, Münster, Art. Nr. 3T013

Thymol-Kristalle (reinst): Merck, Darmstadt, Art. Nr. 1081167

Tris-Puffer: Trizma-Base, Sigma-Aldrich Chemie-GmbH, Steinheim, Art. Nr. T6791

Trypsin- (1:250) Trockensubstanz: Biochrom KG, Berlin, Art. Nr. L2103

Vectastain®-ABC-AP-Kit Standard: Vector Laboratories Inc, Burlingham, CA, USA Art. Nr. AK5000

Xylol: SDS, Peypin, Frankreich, Art. Nr. 0750021

## 4. In den Untersuchungen eingesetzte Geräte

Adhäsions-Objektträger "SuperFrost-Plus": Firma Menzel Art. Nr. 6319470

Brutschrank: Firma Grumbach, Wetzlar

Einbettkassetten: Shandon, bezogen von H.Jürgens & Co, Art. Nr. 67740024

Eppendorf Pipetten: bezogen von Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Gewebeeinbettautomat: MICROM® Cryokonsole AP 280-1-3

Mikroskop: Labormikroskop Leica DM LB, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim

Mikrotom: Rotations-Mikrotom MICROM HM 360

Pipetten-Spitzen: bezogen von Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

### DANKSAGUNG

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. h.c. H.-G. Liebich und Herrn Professor Dr. Bernd Kaspers für die Überlassung des interessanten Dissertations-Themas der vorliegenden Arbeit und die immer sehr freundliche Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Privatdozent Dr. Sven Reese, dem Betreuer dieser Dissertations-Arbeit, bedanken, der mir und dieser Arbeit stets und buchstäblich unermüdlich mit guten und hilfreichen Ideen neue Motivation einhauchte.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in den Instituten für Tieranatomie I und Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung sowie für die stets freundliche Unterstützung danke ich besonders Herrn Professor Dr. Dr. Hans-Georg Liebich und Professor Dr. Bernd Kaspers.

Daneben möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der genannten Institute der tierärztlichen Fakultät der LMU-München herzlich für die immer hilfreiche Unterstützung und Aufmunterung bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt in diesem Rahmen Frau Silvia Mitterer für ihre nicht nur hervorragende fachliche Hilfestellung.

Eine unentbehrliche Hilfe war immer auch Frau Kollegin Grammatia Dalamani – dafür auch ihr herzlichen Dank.

Mein besonderer Dank gilt ferner meiner Mutter, die in jeder Situation meiner bisherigen beruflichen Ausbildung eine unschätzbare Hilfe und voller Verständnis war und immer an mich glaubte und schließlich meiner Schwester für unzählige aufmunternde Zurufe.

Allen diesen Menschen danke ich sehr!

### LEBENSLAUF

#### Christoph Hinterseher

- geb. am 02.November 1975 in Bad Hersfeld
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Religion: römisch-katholisch
- Eltern: Marlies Hinterseher, geb. Krämer, Lehrerin; Walter Hinterseher, Arzt im Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld
- Geschwister: Ruth Hinterseher, Dipl. Sozialpädagogin

#### SCHULISCHE AUSBILDUNG

- 1982-1986: Linggschule Bad Hersfeld (Grundschule)
- 1986-1988: Förderstufe der Gesamtschule Geistal Bad Hersfeld
- 1988-1992: Gymnasialer Zweig der Gesamtschule Geistal Bad Hersfeld
- 1992-1995: Gymnasiale Oberstufe der Modellschule Obersberg Bad Hersfeld 1993 / 1995: Abschluss des Großen Latinums / Abitur

#### BERUFSERFAHRUNG

- Oktober 1995 bis Oktober 1996 Zivildienst in der nephrologischen Abteilung des Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld
- November 1996 bis September 1997 Nebentätigkeit in einer Zoofachhandlung und Mitwirken bei der "Schülerhilfe Bad Hersfeld e.V." in den Fächern Biologie, Chemie und Mathematik

### UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

- ab Wintersemester 1997 Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU)-München
- Februar 2004 Approbation als Tierarzt

#### SPRACHEN

- Englisch : Klassen 5-12
- Latein : Klassen 7-13
- Russisch : Klassen 7-12 (Austausch nach Moskau)

## AUSSERSCHULISCHE AKTIVITÄTEN

 seit 1987 Vogelzucht auf den Gebieten Singvögel (Oscines) und Papageien (Psittaciformes) und Tätigkeit als Ornithologe im NABU-Deutschland