

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

**Ultrastrukturelle, glykohistochemische  
und immunzytochemische  
Untersuchungen am Blut der Pute  
(*Meleagris gallopavo var. domesticus*)**

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

von Pia Ivonne Bitterlin  
aus München

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

*Meiner Mutter gewidmet*

**INHALTSVERZEICHNIS**

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VI
<b>I. EINLEITUNG</b> .....	1
<b>II. LITERATURÜBERSICHT</b> .....	2
1 ALLGEMEINES ZUM BLUT .....	2
1.1 Zusammensetzung und Aufgaben des Blutes .....	2
1.2 Besonderheiten des Vogelblutes .....	2
1.3 Hämatopoese .....	3
1.4 Spezielle Hämatologie der Pute .....	5
2 CHARAKTERISIERUNG DER EINZELNEN BLUTZELLEN .....	6
2.1 Erythrozyten .....	6
2.1.1 Allgemeines .....	6
2.1.2 Erythropoese .....	6
2.1.3 Zahl und Morphologie der aviären Erythrozyten .....	9
2.1.4 Zytoskelett der Erythrozyten .....	12
2.1.5 Aufgaben .....	15
2.2 Thrombozyten .....	16
2.2.1 Allgemeines .....	16
2.2.2 Thrombopoese .....	16
2.2.3 Zahl und Morphologie der aviären Thrombozyten .....	17
2.2.4 Zytoskelett der Thrombozyten .....	20
2.2.5 Aufgaben .....	21
2.3 Heterophile Granulozyten .....	22
2.3.1 Allgemeines .....	22
2.3.2 Bildung .....	23
2.3.3 Zahl und Morphologie der aviären Heterophilen .....	24
2.3.4 Zytoskelett .....	26
2.3.5 Aufgaben .....	27
2.4 Eosinophile Granulozyten .....	29
2.4.1 Allgemeines .....	29
2.4.2 Bildung .....	30
2.4.3 Zahl und Morphologie der aviären Eosinophilen .....	30
2.4.4 Zytoskelett .....	32
2.4.5 Aufgaben .....	32
2.5 Basophile Granulozyten .....	34
2.5.1 Allgemeines .....	34
2.5.2 Bildung .....	35
2.5.3 Zahl und Morphologie der aviären Basophilen .....	35

2.5.4	Zytoskelett .....	37
2.5.5	Aufgaben .....	37
2.6	Monozyten .....	38
2.6.1	Allgemeines .....	38
2.6.2	Bildung .....	38
2.6.3	Zahl und Morphologie der aviären Monozyten .....	39
2.6.4	Zytoskelett .....	40
2.6.5	Aufgaben .....	41
2.7	Lymphozyten .....	42
2.7.1	Allgemeines .....	42
2.7.2	Lymphopoese .....	42
2.7.3	Zahl und Morphologie der aviären Lymphozyten .....	43
2.7.4	Zytoskelett .....	45
2.7.5	Aufgaben .....	45
3	GLYKOHISTOCHEMIE .....	48
3.1	Definition, Vorkommen und Aufbau der Lektine .....	48
3.2	Einteilung der Pflanzenlektine .....	49
3.3	Anwendung von Lektinen und Lektinhistochemie.....	50
3.4	Zuckerstrukturen und Lektinbindungsstellen aviärer Blutzellen.....	51
4	IMMUNZYTOCHEMIE .....	53
4.1	Definition und Anwendung .....	53
4.2	Technik .....	53
4.3	Immunhämatologische Differenzierung der Lymphozyten.....	54
5	ZYTOSKELETT.....	56
5.1	Allgemeines .....	56
5.2	Mikrotubuli .....	57
5.3	Aktinfilamente (Mikrofilamente).....	57
5.3.1	Nicht-Muskel Myosin.....	58
5.4	Intermediärfilamente .....	59
<b>III. MATERIAL UND METHODEN</b> .....		<b>60</b>
1	UNTERSUCHUNGSMATERIAL.....	60
2	LICHTMIKROSKOPIE.....	61
2.1	Übersichtsfärbungen .....	62
2.1.1	Hemacolor® Schnellfärbung .....	62
2.1.2	Hämalaun-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) .....	63
2.1.3	Giemsa-Färbung .....	63
2.1.4	Färbung nach May-Grünwald.....	64
2.1.5	Panoptische Färbung nach Pappenheim .....	65
2.1.6	Sirius Red-Färbung.....	66
2.1.7	Toluidinblau-Färbung .....	67

2.2	Substrathistochemische Färbungen .....	68
2.2.1	Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS) .....	68
2.2.1.1	PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung .....	69
2.2.2	Alcianblau-Färbung .....	70
3	ELEKTRONENMIKROSKOPIE .....	71
4	GLYKOHISTOCHEMIE .....	72
4.1	FITC-markierte Lektine .....	72
4.1.1	Vorbehandlung mit Hemmzuckern.....	74
4.2	Biotinylierte Lektine .....	75
4.3	Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	77
5	IMMUNZYTOCHEMIE .....	79
5.1	Immunzytochemischer Nachweis der Lymphozyten-Antigene .....	79
5.2	Immunzytochemischer Nachweis von Eosinophil major basic protein.....	80
6	ZYTOSKELETT.....	82
6.1	Nachweis von Aktin.....	83
6.2	Immunzytochemischer Nachweis von Vimentin, Tubulin, Nicht-Muskel Myosin und Panzytokeratin.....	84
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>86</b>
1	BLUTBILDER .....	86
2	LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN .....	88
2.1	Übersichtsfärbungen .....	88
2.1.1	Erythrozyten .....	88
2.1.2	Thrombozyten.....	90
2.1.3	Heterophile Granulozyten.....	92
2.1.4	Eosinophile Granulozyten .....	95
2.1.5	Basophile Granulozyten .....	97
2.1.6	Monozyten.....	100
2.1.7	Lymphozyten.....	103
2.2	Substrathistochemische Färbungen .....	105
2.2.1	Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS) .....	105
2.2.1.1	PAS mit Amylase-Vorbehandlung.....	108
2.2.2	Alcianblau-Färbung .....	110
2.2.2.1	Alcianblau-Färbung pH 1.....	110
2.2.2.2	Alcianblau-Färbung pH 2,5.....	112
3	ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN .....	114
3.1	Erythrozyten.....	114
3.2	Thrombozyten .....	115
3.3	Heterophile Granulozyten .....	117
3.4	Eosinophile Granulozyten.....	119
3.5	Basophile Granulozyten .....	120

3.6	Monozyten .....	122
3.7	Lymphozyten .....	124
4	GLYKOHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN .....	126
4.1	Für Glukose/Mannose spezifische Lektine .....	126
4.1.1	Bindung von Concanavalin Agglutinin (ConA-FITC) .....	126
4.1.2	Bindung von Lens culinaris Agglutinin (LCA-FITC) .....	131
4.1.3	Bindung von Pisum sativum Agglutinin (PSA-FITC).....	135
4.2	Für Galaktose spezifische Lektine .....	138
4.2.1	Bindung von Peanut Agglutinin (PNA-FITC).....	138
4.2.2	Bindung von Ricinus communis Agglutinin (RCA-FITC).....	138
4.2.3	Bindung von Viscum album Agglutinin (VAA-Biotin-Streptavidin/FITC).....	138
4.3	Für N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure spezifische Lektine.....	138
4.3.1	Bindung von Wheat germ Agglutinin (WGA-FITC).....	138
4.4	Für N-Acetyl-Glukosamin spezifische Lektine.....	143
4.4.1	Bindung von succinyliertem Wheat germ Agglutinin (WGAs-FITC).....	143
4.5	Für N-Acetyl-Galaktosamin spezifische Lektine .....	147
4.5.1	Bindung von Griffonia simplicifolia Agglutinin-I (GSL-I-FITC).....	147
4.5.2	Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA-FITC).....	147
4.5.3	Bindung von Soybean Agglutinin (SBA-FITC) .....	147
4.5.4	Bindung von Saphora japonica Agglutinin (SJA-Biotin-Streptavidin/FITC).....	147
4.6	Für Galaktose und N-Acetyl-Galaktosamin spezifische Lektine .....	149
4.6.1	Bindung von Sambucus nigra Agglutinin (SNA-Biotin-Streptavidin/FITC) .....	149
4.7	Für L-Fukose spezifische Lektine .....	152
4.7.1	Bindung von Ulex europaeus Agglutinin-I (UEA-I-FITC) .....	152
4.8	Oligosaccharid-bindende Lektine .....	152
4.8.1	Bindung von Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E-FITC) .....	152
4.8.2	Bindung von Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L-FITC) .....	155
4.8.3	Bindung von Maackia amurensis Agglutinin-I (MAA-I-Biotin-Streptavidin/FITC).....	158
4.9	Ergebnisse der Hemmzucker-Vorbehandlung.....	161
4.10	Ergebnisse der Neuraminidase-Vorbehandlung .....	162
5	IMMUNZYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN .....	163
5.1	Immunzytochemischer Nachweis der T-Lymphozyten-Antigene.....	163
5.1.1	Bindung des CD8 $\alpha$ -Antikörpers .....	163
5.1.2	Bindung des CD4-Antikörpers .....	165
5.2	Immunzytochemischer Nachweis von Eosinophil major basic protein.....	166
6	ZYTOSKELETT.....	166
6.1	Aktin .....	166
6.2	Vimentin .....	169
6.3	Tubulin.....	173
6.4	Nicht-Muskel Myosin .....	175

---

6.5	Panzytokeratin.....	175
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>176</b>
1	BLUTPROBEN .....	176
2	LICHTMIKROSKOPIE.....	177
3	ELEKTRONENMIKROSKOPIE .....	184
4	GLYKOHISTOCHEMIE .....	191
5	IMMUNZYTOCHEMIE .....	200
5.1	T-Lymphozyten-Antigene.....	200
5.2	Eosinophil major basic protein.....	201
6	ZYTOSKELETT.....	202
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>208</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>211</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>213</b>
1	VERZEICHNIS DER GEBRAUCHSLÖSUNGEN .....	213
2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	227
3	TABELLENVERZEICHNIS.....	233
4	LITERATURVERZEICHNIS .....	235
5	DANKSAGUNG .....	256

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ABC	Avidin-biotin-complex
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ADP	Adenosindiphosphat
Afrik.	Afrikanisch
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
BDMA	Benzyl dimethyl amine
BCR	B-Zell Rezeptor
BFU	Burst-forming unit
B. U. T.	British United Turkeys
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony-forming unit
CFU-B	Colony-forming unit basophil
CFU-E <sub>0</sub>	Colony-forming unit eosinophil
CFU-G	Colony-forming unit granulocyte
CFU-GM	Colony-forming unit granulocyte monocyte
CFU-M	Colony-forming unit monocyte
CFU-S	Colony-forming units in the spleen
Chin.	Chinesisch
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin Agglutinin
CSFs	Colony-stimulating factors
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin

DDSA	Dodecenylsuccinic anhydride
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTS	Dense tubular system
Embp	Eosinophil major basic protein
EM	Elektronenmikroskopie
Eos-CSF	Eosinophil-colony-stimulating factor
ERY	Erythrozyten
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
fl	Femtoliter
Fuc	L-Fukose
g	Gramm
G-Aktin	Globuläres Aktin
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetyl-Galaktosamin
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
G/L	Giga/Liter
GHC	Glykohistochemie
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
GM-CSF	Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor
G <sub>0</sub> -Phase	Ruhephase einer Zelle
GSL-I	Griffonia simplicifolia Agglutinin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H.E.	Hämalaun-Eosin
Hkt	Hämatokrit
IgA	Immunglobulin der Klasse A
IgE	Immunglobulin der Klasse E

IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IgY	Immunglobulin der Klasse Y
IHC	Immunhistochemie
IL-1	Interleukin-1
IL-3	Interleukin-3
IL-12	Interleukin-12
IP <sub>5</sub>	Inositol-Pentaphosphat
Konz.	Konzentration
L	Liter
LCA	Lens culinaris Agglutinin
LEU	Leukozyten
LM	Lichtmikroskopie
M	molar
MAA-I	Maackia amurensis Agglutinin
Man	Mannose
MBP	Major basic protein
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
M-CSF	Monocyte-specific colony-stimulating factor
MCV	Mean corpuscular volume
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHC-I	Major histocompatibility complex der Klasse I
MHC-II	Major histocompatibility complex der Klasse II
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer

---

mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MPS	Mononukleäres Phagozytose-System
MTOC	Mikrotubulus-Organisationszentrum
Multi-CSF	Multispecific-colony-stimulating factor
N	normal
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Neu5Ac	5-N-Acetyl- $\alpha$ -Neuraminsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NMA	Nadic methyl anhydride
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAS	Periodic-acid-Schiff
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PHA	Phytohämagglutinin
PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin
PNA	Peanut Agglutinin
PSA	Pisum sativum Agglutinin
RCA	Ricinus communis Agglutinin
RNA	Ribonucleic acid
SBA	Soybean Agglutinin
SB	scale bar
SCS	Surface connected system
SJA	Saphora japonica Agglutinin
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
SO <sub>2</sub> -Wasser	Sulfit-Wasser

---

TCR	T-Zell-Rezeptor
TH1	T-Helferzelle vom Typ 1
TH2	T-Helferzelle vom Typ 2
T/L	Tera/Liter
TRITC	Tertramethylrhodamineisothiocyanat
UEA-I	Ulex europaeus Agglutinin
U/min	Umdrehungen pro Minute
VAA	Viscum album Agglutinin
Var.	Varietas
vgl.	vergleiche
W	Wochen
WGA	Wheat germ Agglutinin
WGAs	Wheat germ Agglutinin succinyliert
2,3-BPG	2,3-Biphosphoglycerat

## **I. Einleitung**

Vögel erfreuen sich nicht nur als Haustiere großer Beliebtheit, sondern stellen zum Teil auch wichtige lebensmittelliefernde Nutztiere dar. Mit steigendem Gesundheitsbewusstsein der Menschen hat sich die Pute heutzutage zu einem immer wichtiger werdenden Fleischlieferanten entwickelt. Kommerzielle Haltungssysteme gehen mit einer hohen Besatzdichte und dadurch bedingtem erhöhten Infektionsdruck einher. Zur Vermeidung von Verlusten sollten Krankheiten frühzeitig erkannt werden. Als wichtiger Bestandteil der Diagnostik bietet sich hierbei die Untersuchung des Blutes an. Deshalb ist es von Vorteil, neben den Referenzwerten, auch die Morphologie der Blutzellen klinisch gesunder Tiere zu kennen. So können Abweichungen, die zum Beispiel durch Anämien, Infektionen, Vergiftungen oder auch systemische Erkrankungen entstehen, leichter erkannt werden. Diese Arbeit bietet eine ausführliche Beschreibung von Morphologie und Struktur der Putenblutzellen, wie sie in der Literatur in ihrer Gesamtheit bisher nicht vorkommt.

In vorliegender Arbeit werden in einer Literaturübersicht zunächst sowohl allgemeine Besonderheiten des Vogelblutes als auch individuelle Eigenheiten des Blutes der Pute beschrieben. Gegenstand der Untersuchungen stellen dann die zellulären Bestandteile des Blutes der Pute dar. Dabei wird mit Hilfe lichtmikroskopischer Färbemethoden die Morphologie der einzelnen Blutzellen beschrieben. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen ermöglichen ferner eine genaue Charakterisierung ihrer Ultrastruktur. Im Rahmen glykohistochemischer Untersuchungen werden Bindungsstellen der Blutzellen für bestimmte Pflanzenlektine identifiziert, wodurch sich ein Rückschluss auf das Kohlenhydratmuster dieser Zellen ergibt. Des Weiteren wird das Binden von Antikörpern gegen bestimmte Antigene der Lymphozyten getestet und das Zytoskelett aller Blutzellen mit Hilfe histochemischer Methoden untersucht. So liefert diese Doktorarbeit eine umfassende Charakterisierung der Blutzellen der Pute. Abschließend werden die Ergebnisse auch mit bereits bekannten Befunden beim Strauß und Huhn verglichen, um so die Besonderheiten der Putenblutzellen herauszuarbeiten.

## II. Literaturübersicht

### 1 Allgemeines zum Blut

#### 1.1 Zusammensetzung und Aufgaben des Blutes

Das Blut setzt sich aus dem flüssigen Blutplasma und einem geformten Bestandteil, den Blutzellen, zusammen. Letztere können in rote Blutkörperchen (Erythrozyten), weiße Blutkörperchen (Leukozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten) unterteilt werden. Die Leukozyten teilt man weiter in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten ein (Sinowatz und Hees, 2006). Der Hämatokrit beschreibt den Anteil der zellulären Bestandteile des Blutvolumens (Pschyrembel, 2004) und wird in Prozent angegeben (Kraft et al., 2005). Beim Vogel liegt er speziesabhängig zwischen 31 und 55 % (Gylstorff und Grimm, 1998). Blutplasma besteht zum größten Teil aus Wasser. Darin gelöst sind Plasmaproteine (Albumin, Globuline, Fibrinogen und Enzyme), harnpflichtige Substanzen, Kohlenhydrate, Lipide und Elektrolyte. Blutserum stellt Blutplasma ohne Fibrin dar, welches nach dem Gerinnen des Blutes vom Blutkuchen unterschieden werden kann (Gassmann und Lutz, 2010a).

Blut ist der Vermittler im Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid zwischen Lungen und Gewebe und dient ebenso dem Transport dieser Gase (Gassmann und Lutz, 2010b). Darüber hinaus befördert es Nährstoffe, Hormone sowie Vitamine (Hummel, 2000) und Wärme, wodurch die Temperatur innerer Organe reguliert (Gassmann und Lutz, 2010b) und die Körpertemperatur aufrecht erhalten wird (Sinowatz und Hees, 2006). Es schützt durch verschiedene Komponenten und Faktoren des Blutgerinnungssystems den Organismus vor Blutverlust und dient ferner der Aufrechterhaltung der Homöostase (Gassmann und Lutz, 2010b). Außerdem beteiligt sich das Blut an der Abwehr des Körpers (Sinowatz und Hees, 2006).

#### 1.2 Besonderheiten des Vogelblutes

Im Gegensatz zu den roten Blutkörperchen des Säugers sind die Erythrozyten des Vogels oval und ebenso wie die Thrombozyten kernhaltig. Charakteristisch sind

beim Vogel ein niedrigerer Plasmaproteingehalt und ein doppelt so hoher Blutglukosewert im Vergleich zum Säugetier (Smith et al., 2000). Das Blutplasma des Vogels enthält mehr Kalium, aber weniger Natrium (Gylstorff und Grimm, 1998) und Albumin als das der Säuger (Hummel, 2000). Die Funktion der neutrophilen Granulozyten übernehmen die heterophilen Granulozyten. Die Faktoren V und VII fehlen im Gerinnungssystem, andere Faktoren (IX und XII) sind nur in geringen Konzentrationen vorhanden. Beim Vogel ist für die Gerinnung der Extrinsic-Faktor (Gewebethromboplastin) wichtiger als der Intrinsic-Faktor (Gylstorff und Grimm, 1998). Je nach Alter und Geschlecht macht das Blutvolumen beim Vogel etwa 5 bis 13 % des Körpergewichts aus (Bezzel, 1977) und beträgt pro 100 g Körpermasse zwischen 6 und 10 ml (Hummel, 2000).

### **1.3 Hämatopoese**

Die erste primitive Hämatopoese findet beim Vogel im Dottersack statt (Bienzle und Smith, 1999). Dort entstehen in einer ersten Phase „Blutinseln“ als solide Ansammlungen identischer Zellen (Dieterlen-Lièvre, 1987). Peripher liegende Zellen flachen sich ab und werden zu Angiothelzellen, die sekundär in der Lage sind Blutzellen zu bilden (Rüsse und Sinowatz, 2008). Aus zentral befindlichen Zellen werden hämatopoetische Stammzellen. Nach der Teilung entwickeln sich diese Stammzellen zu primitiven Erythrozyten (Dieterlen-Lièvre, 1987). Im Embryo findet die Hämatopoese zunächst nicht in speziellen Organen, sondern diffus in der paraaortalen Region statt (Dieterlen-Lievre et al., 1996). Die meisten dieser, im Embryo gebildeten, Stammzellen werden erst in der darauf folgenden zweiten Phase der Hämatopoese aktiviert (Lassila et al., 1982), in der eine weitere Generation an Stammzellen, sowohl extraembryonal im Dottersack als auch intraembryonal, entsteht (Dieterlen-Lièvre, 1987). Die ersten im Dottersack gebildeten Stammzellen werden nach und nach von den im Embryo entstehenden Stammzellen ersetzt (Dieterlen-Lièvre und Martin, 1981) und besiedeln die Rudimente der hämatopoetischen Organe Milz, Thymus (Dieterlen-Lièvre, 1987), Bursa Fabricii (Lassila et al., 1982) und das Knochenmark (Beaupain et al., 1979). Nach dem Schlupf findet die Hämatopoese vor allem im Knochenmark statt (Bounous und Stedman, 2000).

Die ersten Blutkörperchen sind die Hämozytoblasten (Rüsse und Sinowatz, 2008). Diese nicht determinierten, pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen werden auch als “colony forming units in the spleen” (CFU-S) bezeichnet, da sie in der Lage sind in der Milz hämopoetische Kolonien zu bilden (Liebich, 2010). Sie sind der Ursprung aller Zelltypen des lymphohämatopoetischen Systems (Sinowatz und Hees, 2006) und gehören dem Stammzellpool des Knochenmarks an (Gassmann und Lutz, 2010c). Pluripotente Stammzellen bleiben die meiste Zeit ihres Lebens in einer Ruhephase ( $G_0$ -Phase) und teilen sich nur nach Bedarf. Diese unauffälligen, etwa 12  $\mu\text{m}$  großen, Zellen mit basophilem Zytoplasma (Liebich, 2010) besitzen eine große Regenerationsfähigkeit (Gassmann und Lutz, 2010c). Teilung, Vermehrung (Proliferation), Differenzierung, Mobilität und Aktivität der hämatopoetischen Zellen werden von Zytokinen als interzellulären Mediatoren reguliert, die ihre Wirkung über Oberflächenrezeptoren der Zielzellen vermitteln (Liebich, 2010).

Nach der Teilung einer pluripotenten Stammzelle entstehen zwei Tochterzellen. Eine verbleibt als weitere Stammzelle im Stammzellpool, die andere entwickelt sich zur determinierten hämatopoetischen Vorläuferzelle (Progenitorzelle) (Liebich, 2010). Diese entstehende, multipotente Vorläuferzelle gehört entweder der myeloischen oder der lymphatischen Zellreihe des Teilungspools an. Die myeloische Stammzelle bildet die Vorstufe für den reifen Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten oder Granulozyten. Die lymphatische Stammzelle wird zum reifen B- oder T-Lymphozyten (Gassmann und Lutz, 2010c). Durch weitere Teilungen entstehen unipotente, also auf eine Differenzierungsrichtung festgelegte, bzw. bipotente Tochterzellen (Sinowatz und Hees, 2006). Diese können *in vitro* zur Cluster- oder Koloniebildung angeregt werden, wodurch sich ihre Bezeichnung als “burst-forming unit” (BFU) oder “colony-forming unit” (CFU) erklären lässt (Liebich, 2010). Der Zelltyp, zu dem sich eine Vorläuferzelle entwickelt, wird durch Prä- oder Postfix angegeben. Nur CFU-GM (bipotent) ist eine Differenzierung in zwei Zelltypen, sowohl Monozyt als auch neutrophiler Granulozyt, möglich (Gassmann und Lutz, 2010c). Die kleinen und basophilen Vorläuferzellen, die man von den Hämozytoblasten kaum unterscheiden kann, zeigen alle ein ähnliches morphologisches Bild (Sinowatz und Hees, 2006). Im weiteren Verlauf entwickeln sich die Progenitoren zu den jeweiligen Blasten des

Reifungs- und Speicherpools (Gassmann und Lutz, 2010c). Aus ihnen entstehen nach weiteren Teilungen und Differenzierungen schließlich reife Blutzellen (Sinowatz und Hees, 2006). Dabei können Erythrozyten (Erythropoese), Granulozyten (Granulopoese), Lymphozyten (Lymphopoese), Monozyten (Monopoese) und Thrombozyten (Thrombopoese) unterschieden werden (Liebich, 2010).

#### **1.4 Spezielle Hämatologie der Pute**

Während der ersten zwei Lebenswochen einer Pute sinkt die Zahl ihrer Erythrozyten, wohingegen die der Leukozyten stetig steigt. Dieser Anstieg lässt sich auf eine Zunahme der Lymphozyten zurückführen. Mit dem Alter der Tiere nimmt die Gesamtleukozytenzahl, bedingt durch einen Anstieg der heterophilen Granulozyten, weiter zu. Adulte Tiere zeigen die höchsten Gesamtleukozytenwerte (Venkataratnam und Clarkson, 1962). Im Gegensatz zum heterophilen Blutbild, das zum Beispiel Graupapageien besitzen, haben Puten, ebenso wie Hühner, ein lymphozytäres Blutbild (Wedel, 2004). Somit ist der Lymphozyt der am häufigsten vorkommende Leukozyt im peripheren Blut der Pute (Bounous et al., 2000; Moreira dos Santos Schmidt et al., 2009; Straková et al., 2010). Moreira dos Santos Schmidt und Mitarbeiter (2009) konnten zeigen, dass für einige Blutparameter, - wie die Anzahl der Erythrozyten, den prozentualen Anteil an Lymphozyten und basophilen Granulozyten sowie der Plasmaproteinkonzentration, deutliche Unterschiede bezüglich Alter und Geschlecht existieren. Zum Beispiel ist die Zahl der basophilen Granulozyten bei 30 bis 32 Wochen alten, weiblichen Tieren deutlich höher, als die der 19 bis 23 Wochen alten. Sie führten dies auf den physiologischen Stress durch die beginnende Legeperiode der älteren Hennen zurück (Moreira dos Santos Schmidt et al., 2009). Auch das Zuchtziel beeinflusst hämatologische Parameter. So zeigen Puten, gezüchtet für die Fleischproduktion, geringere Lymphozytenzahlen, aber höhere Werte heterophiler Granulozyten und Erythrozyten, als Tiere, die der Eiproduktion dienen (Bayyari et al., 1997; Bounous und Stedman, 2000). Im Allgemeinen gibt es jedoch nur wenige Angaben über hämatologische Referenzwerte für domestizierte Puten (Bounous und Stedman, 2000).

## 2 Charakterisierung der einzelnen Blutzellen

### 2.1 Erythrozyten

#### 2.1.1 Allgemeines

Reife Vogelerythrozyten sind größer als die der Säuger, jedoch kleiner als die roten Blutzellen der Reptilien und Amphibien (Campbell und Ellis, 2007). Ihre Größe beträgt je nach Spezies zwischen 10,7 x 6,1 µm und 15,8 x 10,2 µm (Hartman und Lessler, 1963; Sturkie und Griminger, 1976). Die reifen Erythrozyten der Pute sind, ebenso wie die des Huhnes, etwa 12 x 6 µm groß (Bounous und Stedman, 2000). Usami et al. (1970) geben für Putenerythrozyten sogar eine durchschnittliche Länge von 15 µm und eine mittlere Breite von 7,2 µm an (Usami et al., 1970). Mit dem Alter steigt die Zahl der Erythrozyten und sie ist bei männlichen Tieren höher als bei weiblichen (Venkataratnam und Clarkson, 1962; Hebert et al., 1989; Howlett et al., 2002; Moreira dos Santos Schmidt et al., 2009). Im Vergleich zu den Säugererythrozyten, deren Lebensspanne je nach Tierart 60 bis 160 Tage beträgt (Gassmann und Lutz, 2010c), ist die Überlebenszeit aviärer Erythrozyten kurz (Sturkie und Griminger, 1976). So werden die roten Blutkörperchen des Huhnes 28 bis 35 Tage alt, die der Taube 35 bis 45 Tage und die von Wachteln 33 bis 35 Tage (Sturkie und Griminger, 1976).

#### 2.1.2 Erythropoese

Während der embryonalen Entwicklung entstehen, in einer frühen Phase der Blutbildung, aus den im Dottersack gebildeten hämatopoetischen Stammzellen ausschließlich primitive Erythrozyten (Dieterlen-Lièvre, 1987). Eine nur kleine Menge der primitiven Erythrozyten ist intraembryonalen Ursprungs. In der darauf folgenden Phase der Erythropoese, die ab dem fünften Tag der Embryogenese beginnt, entstehen definitive Erythrozyten, die sich zum größten Teil aus intraembryonalen Stammzellen entwickeln. Ein kleiner Anteil ist extraembryonalen Ursprungs (Beaupain et al., 1979; Lassila et al., 1982; Dieterlen-Lièvre, 1987). Die von Dieterlen-Lièvre und Martin (1981) beschriebenen hämatopoetischen Stammzellen in der ventralen Wand der dorsalen Aorta beim drei Tage alten Hühnerembryo (Dieterlen-Lièvre und Martin, 1981) konnten von Geerts und Mitarbeitern (1993) durch immunhistochemische

Methoden nicht als Zellen erythropoetischen Ursprungs erkannt werden. Demzufolge schlossen Geerts und Mitarbeiter daraus, dass diese Zellen myelo-poetischer, lymphopoetischer oder granulopoetischer Abstammung sein mussten. Orte der Bildung definitiver Erythrozyten können bei Hühnerembryonen ab dem fünften Tag der Embryogenese paraaortal nachgewiesen werden, deren Größe bis zum siebten bzw. achten Entwicklungstag zunimmt und anschließend wieder abnimmt (Geerts et al., 1993). Ab dem zehnten Tag der embryonalen Entwicklung findet die Erythropoese auch in der Milz statt und mit dem 13. Entwicklungstag beginnt sie in geringem Maße auch im Knochenmark (Beaupain et al., 1979). Auch in Thymus und Bursa Fabricii findet eine Erythropoese statt (Lassila et al., 1982). Nach dem Schlupf ist das rote Knochenmark der alleinige Ort der Bildung roter Blutkörperchen. Während der Entwicklung des Tieres reduziert sich das Volumen des erythropoetischen Knochenmarks, welches beim adulten Vogel nur noch in Schwanzwirbeln, Furkula, Skapula, Ulna, Radius, Femur und Tibiotarsus zu finden ist. Ein Drittel des blutbildenden Knochenmarks befindet sich in den beiden Femura (Schepelmann, 1990).

Im Gegensatz zum Säuger, bei dem die Bildung roter Blutzellen im Knochenmark extravaskulär auftritt, findet die Erythropoese beim Vogel intravaskulär statt (Sorrell und Weiss, 1982). Ort der aviären Erythropoese im Knochenmark ist das Lumen der medullären Sinus (Campbell, 1967). Diese Sinus werden von einem nahezu kontinuierlichen Endothel ohne Basalmembran ausgekleidet (Campbell, 1967; Bounous und Stedman, 2000). Im Endothel der Sinus befinden sich Poren, die einen Austausch zwischen intra- und extravaskulären Blutzellen ermöglichen. Frühe Stadien der erythropoetischen Zellreihe befinden sich nahe der Sinuswand, wohingegen die reiferen Formen eher zentral im Lumen zu finden sind (Campbell, 1967). Beim Säuger existieren im Knochenmark sogenannte Erythroblasteninseln mit einem zentralen Makrophagen und darum gruppierten Erythroblasten. Die Erythropoese findet, bis zur Stufe des Retikulozyten, in enger Assoziation mit den Makrophagen statt. Diese, auch als Ammenzellen bezeichneten, Zellen versorgen die erythropoetischen Zellen teilweise mit Eisen und anderen Substraten (Wurzinger und Peschl, 2005). Beim Vogel sind Makrophagen im Knochenmark eher selten anzutreffen und sie scheinen die Blutzellbildung nicht wie beim Säuger zu unterstützen. Eine wichtige Rolle spielen vermutlich jedoch

interzelluläre Verbindungen zwischen unreifen Blutzellen bis zur Stufe des Retikulozyten und sinusoidalen Endothelzellen (Sorrell und Weiss, 1982).

Die Reifungsstadien der Erythropoese gleichen denen des Säugers (Campbell, 2006). Ursprung des reifen Erythrozyten ist die pluripotente hämatopoetische Stammzelle, aus der, durch Teilungen die myeloische Stammzelle hervorgeht. Durch weitere Teilung erfolgt die Entwicklung zum Proerythroblast (Gassmann und Lutz, 2010c; Liebich, 2010). Diese langen, runden, tief basophilen Zellen enthalten einen großen, runden, zentralen Kern. Letzterer weist grob granuliertes Chromatin und große Nukleoli auf. Das Zytoplasma ist tief basophil mit helleren Bereichen. Diese stellen höchstwahrscheinlich Mitochondrien dar (Campbell, 2006). Der Proerythroblast teilt sich schnell, wobei seine Kerngröße abnimmt (Liebich, 2010).

Die nächste Stufe stellt der basophile Erythroblast dar, der seinem Vorgänger im Erscheinungsbild ähnelt. Auch diese Zelle enthält einen großen Zellkern, umgeben von einem schmalen Saum an blauem Zytoplasma. Unterscheidungsmerkmal ist das Fehlen der hellen zytoplasmatischen Bereiche und der prominenten Nukleoli. Das basophile Zytoplasma enthält häufig rötliche Bereiche, die auf den Beginn der Hämoglobinproduktion hinweisen (Campbell und Ellis, 2007). Um diese Synthese zu steigern, inkorporieren basophile Erythroblasten vermehrt Ferritin von anliegenden Makrophagen durch Mikropinozytose (Liebich, 2010).

Die nächste Vorstufe zum reifen Erythrozyten kann man anhand des Aussehens des Zytoplasmas in drei Stadien einteilen. Der frühe polychromatische Erythroblast stellt das erste Stadium dar. Sein Zytoplasma erscheint homogen basophil und der runde Kern enthält verklumptes Chromatin. Sein kleinerer Nachfolger, der späte polychromatische Erythroblast, besitzt ein geringeres Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Der Zellkern kann eine bereits leicht ellipsoide Form aufweisen und das Zytoplasma erscheint durch die zunehmende Hämoglobinproduktion grau (Campbell und Ellis, 2007). Schließlich steigt durch weitere Differenzierungsschritte der Hämoglobingehalt, wohingegen der der basophilen Organellen abnimmt und es entsteht der orthochromatische Erythroblast (Liebich, 2010). Diese Zelle, mit ellipsoider Form und eosinophilem Zytoplasma, stellt das dritte Stadium dar (Campbell und Ellis, 2007).

Der Retikulozyt ist die letzte Vorstufe in der Entwicklungsreihe der Erythrozyten (Liebich, 2010). Diese Zellen sind etwas größer als die reifen Erythrozyten und ihr Chromatin ist lockerer strukturiert (Scope, 2011). Sie entwickeln sich innerhalb von 24 bis 48 Stunden zu reifen roten Blutkörperchen. Im Zuge dieses Reifungsprozesses nimmt die Anzahl einiger Membran- sowie der Transferrin- und Fibronektinrezeptoren ab, die Menge der Zellorganellen reduziert sich, die Zellgröße verringert sich und die Hämoglobinkonzentration nimmt zu (Jain, 1993). Bei Regeneration und Blutverlust treten Retikulozyten verstärkt im Blut auf (Sinowatz und Hees, 2006). Beim Säugetier tritt durch Verdichtung und Schrumpfung des Chromatins eine Kernpyknose mit anschließender Ausschleusung des Zellkerns ein (Liebich, 2010). Eine solche E nukleation findet beim Vogel nicht statt, wodurch die reifen Erythrozyten ihren Zellkern behalten (Sturkie und Griminger, 1976; Liebich, 2010).

Wie beim Säuger, wird auch die Erythropoese der Vögel, sowohl durch Hypoxie als auch durch Blutverlust angeregt (Rosse und Waldmann, 1966). Bei schlechter Sauerstoffversorgung der Gewebe wird aus den Nieren vermehrt Erythropoetin abgegeben (Sinowatz und Hees, 2006) und bewirkt eine erhöhte Produktion erythropoetischer Zellen im Knochenmark und ihre Differenzierung zu reifen roten Blutzellen. Das in der Niere gebildete Glykoprotein (Sturkie und Griminger, 1976) bindet an Rezeptoren auf erythroiden Vorläuferzellen und verhindert so deren programmierten Zelltod (Apoptose). Diese reifen dann zu Retikulozyten heran und werden in das zirkulierende Blut abgegeben (Gassmann und Lutz, 2010c). Das aviäre Erythropoetin, ein humoraler Faktor, unterscheidet sich vom Erythropoetin der Säuger insofern, als dass es für seine Funktionalität zwar auf seine Proteinstruktur, nicht aber auf Sialinsäure angewiesen ist. Ferner ist das aviäre Erythropoetin nicht zur Stimulation der Erythropoese beim Säugetier fähig und umgekehrt zeigt das Erythropoetin der Säuger beim Vogel keine Wirksamkeit (Rosse und Waldmann, 1966).

### **2.1.3 Zahl und Morphologie der aviären Erythrozyten**

Die Erythrozytenzahl wird von Alter, Geschlecht, Hormonen und Hypoxie beeinflusst (Sturkie und Griminger, 1976). Auch Krankheiten üben einen Effekt aus (Bienzle et al., 1997). Sofort nach dem Schlupf sinkt die Anzahl der roten

Blutkörperchen gefolgt von einem stetigen Anstieg bis zur Geschlechtsreife (Venkataratnam und Clarkson, 1962; Phelps et al., 1987). In ihrer Studie fanden Venkataratnam und Clarkson (1962) ferner heraus, dass männliche und weibliche Puten unterschiedliche Erythrozytenzahlen aufweisen. Im Mittel betrug die Anzahl bei adulten männliche Puten  $2,65 \times 10^6 / \text{mm}^3$ , die der adulten weiblichen Tiere  $2,48 \times 10^6 / \text{mm}^3$  (Venkataratnam und Clarkson, 1962). Andere Autoren geben ähnliche Werte an. So haben domestizierte, männliche Puten im Mittel  $2,38 \times 10^6 / \text{mm}^3$  rote Blutkörperchen, wohingegen weibliche Puten durchschnittlich  $2,24 \times 10^6 / \text{mm}^3$  Erythrozyten besitzen (Sturkie und Griminger, 1976).

Das MCV (mean corpuscular volume) ermöglicht einen Rückschluss auf die durchschnittliche Größe der roten Blutkörperchen (Clark et al., 2009). Für Wildputen werden in der Literatur Werte von 162 fl (Femtoliter) pro Zelle angegeben (Straková et al., 2010).

Zur Bestimmung des Hämoglobingehalts im Einzelerythrozyten dient der MCH (mean corpuscular hemoglobin), der den mittleren Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten wiedergibt (Scope, 2011). Für die domestizierte Pute ist ein Wert von 42,6 pg (Bounous und Stedman, 2000), für die Wildpute ein Wert von 50,36 pg pro Zelle in der Literatur angegeben (Straková et al., 2010). Die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC) liegt bei der Pute bei 29,6 % (Bounous und Stedman, 2000). Untersuchungen an Puten haben gezeigt, dass Jungtiere geringere Hämoglobinwerte haben und diese mit dem Alter der Tiere ansteigen (Sell und Nathanael, 1978). Der Hämatokrit liegt, je nach Vogelspezies, zwischen 31 und 55 %. Er nimmt bei den meisten Vögeln während der ersten Lebenswochen ab. Bis zur Geschlechtsreife steigt er mit leichten Schwankungen wieder (Gylstorff und Grimm, 1998). Adulte Puten haben mittlere Hämatokritwerte zwischen 30,8 % und 38,5 % (Sturkie und Griminger, 1976; Bounous und Stedman, 2000).

Die Erythrozyten der Pute haben eine elliptische Form und enthalten homogen eosinophiles Zytoplasma. Ihr zentral liegender Kern ist rund bis oval (Bounous und Stedman, 2000) und beinhaltet einheitlich dichtes Chromatin, welches mit dem Alter der Zelle mehr und mehr kondensiert (Scope, 2011). Im Zytoplasma befinden sich einige Mitochondrien und Polysomen und vereinzelt Stränge des endoplasmatischen Retikulums (Beam et al., 1979). Putenerythrozyten stellen sich

unter dem Rasterelektronenmikroskop als ovoide Zellen mit flacher, glatter Oberfläche dar, die zentral eine kernbedingte Vorwölbung haben können (Hawkey und Dennett, 1990; Clark et al., 2009). Im Vergleich zum Säuger weisen die roten Blutzellen der Pute eine geringere Deformierbarkeit auf (Usami et al., 1970).

Retikulozyten sind größer als reife Erythrozyten (Fernandez und Grindem, 2000) und machen weniger als 10 % der Gesamterthrozyten im Blut gesunder Vögel aus (Scope, 2011). Deshalb ist das Auftreten ungleich großer Erythrozyten, eine Anisozytose, beim Vogel in geringem Maße physiologisch (Campbell und Ellis, 2007). Die Pute hat im Mittel etwas mehr Retikulozyten als die meisten Säuger (Bounous und Stedman, 2000). Generell lassen sich aggregierte von punktierten Retikulozyten unterscheiden (Fernandez und Grindem, 2000). Erstere stellen frühere Zellformen dar, bei denen der Kern von aggregiertem, retikulärem Material ringartig umgeben wird (Campbell, 2006). Die retikulären Strukturen sind Reste zytoplasmatischer RNA (Scope, 2011). Diese Zellen werden auch als polychromatische bzw. polychromatophile Erythrozyten oder Polychromatozyten bezeichnet (Fernandez und Grindem, 2000). Durch die große Menge an RNA (Clark et al., 2009) färbt sich ihr Zytoplasma bläulich-pink an (Fernandez und Grindem, 2000). Die Mehrfarbigkeit entsteht aufgrund der blauen Färbung der RNA und der orangen Anfärbung des Hämoglobins. Eine Zunahme der Polychromatophilen wird als Polychromasie bezeichnet (Weiss und Tvedten, 2006). In geringem Maße ist diese beim Vogel physiologisch. Während der weiteren Reifung der Zellen wird das retikuläre Material weniger und verteilt sich im Zytoplasma. Punktierte Retikulozyten, die reiferen Zellformen, enthalten diese RNA-Reste in Form von Punkten und Granula (Campbell, 2006).

Veränderungen der Erythrozytengröße haben Auswirkungen auf das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV) (Campbell, 2006). Dieses variiert je nach Vogelspezies (Clark et al., 2009) und beträgt beim Huhn zwischen 90 und 140 fl (Bounous und Stedman, 2000). Wie bereits beschrieben ist eine geringe Anisozytose beim Vogel normal (Campbell und Ellis, 2007). Abnormal große Erythrozyten werden als Makrozyten bezeichnet (Kraft et al., 2005). Diese stellen vermutlich die jüngere, frisch aus dem Knochenmark in die Zirkulation entlassene, Zellgeneration dar, wohingegen die kleineren Zellen bereits alternde

Erythrozyten repräsentieren (Hebert et al., 1989). Auch Erythroblasten können im Blut gesunder Tiere beobachtet werden (Clark et al., 2009). Zu den farblichen Abweichungen zählen, neben den bereits erwähnten polychromatischen Erythrozyten, die hypochromatischen. Diese anormal blassen Zellen können zytoplasmatische Vakuolen und einen pyknotischen Kern enthalten. Eine Abnahme des MCHC spiegelt eine deutliche Hypochromasie wieder. Bei einem Eisenmangel ist die Anzahl der hypochromatischen Erythrozyten erhöht (Campbell und Ellis, 2007). Eine basophile Tüpfelung der roten Blutkörperchen tritt bei Anämien und seltener auch bei Bleivergiftung der Tiere auf. Verteilt über das Zytoplasma enthalten die Erythrozyten dann punktförmig zusammengelagerte, kleine, unregelmäßig basophile Granula (Campbell, 2006). „Heinz bodies“ stellen runde, ovale oder gezackte Erythrozyteneinschlüsse dar, die durch oxidative Denaturierung des Hämoglobins entstehen (Jain, 1993). Während sie sich beim Säuger im Zytoplasma befinden, kommen sie beim Vogel sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleoplasma vor (Simpson, 1971). Abnormal geformte rote Blutkörperchen werden als Poikilozyten bezeichnet (Kraft et al., 2005). Im peripheren Blut von Vögeln ist eine geringe Poikilozytose normal. Ausgeprägte Formabweichungen deuten auf Fehlentwicklungen der Erythrozyten hin und können manchmal bei Anämien beobachtet werden (Campbell, 2006). Kernlose Erythrozyten, sogenannte Erythroblastide, machen weniger als 1 % der Erythrozytenpopulation bei gesunden Vögeln aus (Clark et al., 2009). Selten finden sich bei gesunden Vögeln sogar Erythrozyten mit zwei Zellkernen (Campbell, 2006). Rote Blutzellen in Zellteilung werden ebenfalls im peripheren Blut klinisch gesunder Vögel beobachtet (Clark et al., 2009).

#### **2.1.4 Zytoskelett der Erythrozyten**

Generell lassen sich in den Vogelerythrozyten drei Komponenten des Zytoskeletts mit unterschiedlicher Proteinstruktur unterscheiden: Intermediärfilamente, das marginale Band aus Mikrotubuli und das auf Spektrin basierende Membranskelett. Die Intermediärfilamente setzen sich aus den beiden Polypeptiden Vimentin und Synemin zusammen (Lazarides, 1984) und bilden ein gewundenes, verflochtenes Netzwerk im Zytoplasma (Granger et al., 1982). Vimentin stellt den Hauptbestandteil der Filamente dar (Granger und Lazarides, 1982; Lazarides, 1984) und bindet über Rezeptoren sowohl an die Plasmamembran als auch an den

Zellkern. Die Bindungsstellen der Plasmamembran für Vimentin unterscheiden sich von denen des Zellkerns sowohl in ihrer Funktion als auch Spezifität (Georgatos und Blobel, 1987). Synemin hingegen dient der Quervernetzung der Vimentinfilamente, indem es in periodischen Abständen von etwa 180 nm peripher an diese bindet (Granger und Lazarides, 1982; Moon und Lazarides, 1983; Lazarides, 1984). Das Verhältnis von Vimentin zu Synemin innerhalb aviärer Erythrozyten beträgt in etwa 50:1 (Granger et al., 1982). So bilden die Intermediärfilamente in den aviären Erythrozyten ein dreidimensionales Netzwerk, welches den Kern mit der Plasmamembran verbindet. Außerdem verbinden sie auch die Plasmamembranen der gegenüberliegenden Seiten einer Zelle miteinander (Granger und Lazarides, 1982). Durch diese Verbindungen behält der Zellkern seine zentrale Position und die Zelle erhält ihre typische Form (Harris und Brown, 1971). Die Intermediärfilamente befinden sich innerhalb der Erythrozyten räumlich getrennt von den Mikrotubuli (Granger und Lazarides, 1982). Letztere liegen in kernhaltigen Erythrozyten, wie sie auch Vögel besitzen, gebündelt als sogenanntes marginales Band vor. Das Bündel aus Mikrotubuli, welches die Zelle umgibt, liegt direkt unterhalb der Plasmamembran und verläuft parallel zur flachen Zelloberfläche (Fawcett, 1959; Goniakowska-Witalińska und Witaliński, 1976; Sloboda und Dickersin, 1980). Ein solches Band existiert auch in den aviären Thrombozyten (Behnke, 1970). Beim Huhn setzt es sich aus nur wenigen, sehr langen Mikrotubuli zusammen (Murphy und Wallis, 1983). Behnke (1970) schätzt die Anzahl der Band-bildenden Mikrotubuli in Hühnererythrozyten auf zehn bis 25 (Behnke, 1970), Goniakowska-Witalińska und Witaliński (1976) geben eine Zahl von zehn bis 16 Mikrotubuli für die Erythrozyten der Hühner an. Die Anzahl der Mikrotubuli hängt mit der Größe der roten Blutkörperchen zusammen. So befinden sich in den großen Erythrozyten der Reptilien oder Amphibien mehr Mikrotubuli, als in den kleineren roten Blutzellen der Vögel (Goniakowska-Witalińska und Witaliński, 1976). Auch das Alter der Zellen beeinflusst die Menge der Mikrotubuli. Besitzen unreife rote Blutzellen maximal 40 Mikrotubuli, so sinkt ihre Anzahl mit dem Reifegrad der Zellen (Barrett und Dawson, 1974). Hauptbestandteil der Mikrotubuli ist Tubulin (Cohen, 1991), ein globuläres Polypeptid (Liebich, 2010). Es macht 1 % des Gesamtproteins der aviären Erythrozyten aus (Murphy und Wallis, 1983) und setzt sich aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin zusammen (Linhartová et al., 2002). Während einige Autoren die

Meinung vertreten, dass das marginale Band der Aufrechterhaltung der Zellform der Erythrozyten dient (Fawcett, 1959; Goniakowska-Witalińska und Witaliński, 1976), sprechen sich andere dagegen aus. Behnke (1970) fand heraus, dass Hühnererythrozyten nach einer Entfernung der Mikrotubuli durch Kältebehandlung ihr typisches, scheibenförmiges Aussehen beibehielten. Er schloss daraus, dass das marginale Band in den roten Blutzellen der Hühner nicht der Wahrung der typischen Zellform dient. Thrombozyten von Hühnern wiesen anschließend hingegen eine irreguläre Zellform auf. Seiner Meinung nach ist das marginale Band nicht in allen Zellarten für die Aufrechterhaltung der Zellform verantwortlich (Behnke, 1970). Den Einfluss des marginalen Bands auf die Zellform nahmen auch Barrett und Dawson (1974) zum Anlass ihrer Untersuchungen von unreifen und reifen Hühnererythrozyten. Sie stellten ebenso fest, dass ein Entfernen des marginalen Bands die Form zirkulierender, reifer roter Blutkörperchen nicht beeinflusste. Jedoch veränderte sich dadurch die Zellform der unreifen roten Blutzellen und die Autoren wiesen den Mikrotubuli eine Rolle bei der Entwicklung der flachen Form der Erythrozyten während ihrer Reifung zu (Barrett und Dawson, 1974). Im Gegensatz zu diesen *in vitro* Untersuchungen sind Erythrozyten *in vivo* unterschiedlichen Bedingungen des Blutstroms ausgesetzt und an diese durch geeignete mechanische und rheologische Eigenschaften angepasst (Cohen et al., 1982). Das marginale Band verhindert eine, durch Zirkulationskräfte bedingte, Deformation der Zellen im Blutstrom (Linhartová et al., 2002) und könnte *in vivo* durchaus an der Aufrechterhaltung der Zellform der Erythrozyten beteiligt sein (Cohen et al., 1982). Aufgrund von Ähnlichkeiten der Proteinzusammensetzung und Funktion geht man davon aus, dass die Grundstruktur des aviären Membranskeletts mit dem der Säuger vergleichbar ist (Cohen, 1991). Es setzt sich hauptsächlich aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spektrinen zusammen (Granger et al., 1982; Lazarides, 1984) und enthält darüber hinaus Aktin, das durch die Spektrinmoleküle quervernetzt wird (Cohen et al., 1980). Dieses Proteinnetzwerk liegt unterhalb der Erythrozytenmembran (Branton et al., 1981; Granger et al., 1982; Repasky et al., 1982; Lazarides, 1984) und ist mit dieser assoziiert. So bindet  $\beta$ -Spektrin an Ankyrin, das wiederum an das integrale Membranprotein „band 3“ gekoppelt ist (Bennett und Stenbuck, 1979a; Bennett und Stenbuck, 1979b; Branton et al., 1981; Lazarides, 1984). Ferner ist das Netzwerk über das Protein 4.1 mit der Erythrozytenmembran verbunden

(Sinowatz und Hees, 2006). In aviären Erythrozyten stellt Goblin als Protein der Plasmamembran das Analogon zu Ankyrin der Säugererythrozyten dar (Beam et al., 1979; Granger et al., 1982; Lazarides, 1984). Die Funktion des Membranskeletts besteht in erster Linie in der Wahrung der ellipsoiden Form der kernhaltigen Erythrozyten (Cohen et al., 1982; Granger und Lazarides, 1982).

### 2.1.5 Aufgaben

Wichtigste Aufgabe der Erythrozyten ist der Sauerstoff- ( $O_2$ ) und Kohlenstoffdioxid- ( $CO_2$ ) Transport durch Hämoglobin. Dieses, auch als roter Blutfarbstoff bezeichnete, Chromoprotein befindet sich im Zytoplasma der Erythrozyten und hat die Fähigkeit  $O_2$  und  $CO_2$  reversibel zu binden (Liebich, 2010). So nehmen Erythrozyten  $O_2$  in der Lunge auf und transportieren es zur Abgabe an periphere Gewebe. Von diesen wiederum befördern sie  $CO_2$  zur Abatmung an die Lunge zurück (Gassmann und Lutz, 2010c). Aviäres Hämoglobin ist, wie das der Säuger, aus vier eisenhaltigen Häm-Untereinheiten aufgebaut. Jedoch unterscheiden sich die Protein-Teile der Untereinheiten, die Globine, von denen der Säugetiere (Sturkie und Griminger, 1976). Die Sauerstoffbindungsaffinität wird durch Phosphatverbindungen in den Erythrozyten beeinflusst (Isaacks und Harkness, 1980). Vogelerythrozyten enthalten Inositol-Pentaphosphat ( $IP_5$ ), beim Säuger hingegen reguliert 2,3-Biphosphoglycerat (2,3-BPG) die Sauerstoffbindung an Hämoglobin (Isaacks und Harkness, 1980; Bounous und Stedman, 2000; Campbell und Ellis, 2007). Durch die Bindung von 2,3-Biphosphoglycerat an Hämoglobin nimmt dessen Sauerstoffaffinität ab und die Sauerstoffmoleküle werden dann vom Hämoglobin leichter an das Gewebe abgegeben (Horn, 2009). Beim Vogel ist die Sauerstoffbindungsaffinität von Hämoglobin geringer als beim Säuger (Christensen und Dill, 1935). Ursächlich hierfür ist Inositol-Pentaphosphat (Campbell, 2006), dessen Funktion vermutlich der von 2,3-BPG der Säugererythrozyten ähnelt (Isaacks et al., 1986). Die geringere Sauerstoffaffinität von aviärem Hämoglobin, also höhere Abgabebereitschaft für Sauerstoff, hängt vermutlich mit einem verstärkten Sauerstoffbedarf während des Fluges zusammen (Waibl und Sinowatz, 2004). Aufgrund des leistungsstarken Atmungsapparates der Vögel wird der  $CO_2$ -Level des Blutes sehr konstant gehalten, so dass Kohlenstoffdioxid eine nur geringe Wirkung auf die Sauerstoffaffinität hat

(Bounous und Stedman, 2000). Dafür spielt der pH-Wert beim Vogel eine größere Rolle. Sinkt dieser, so nimmt auch die Affinität zu Sauerstoff ab, was vermutlich mit der Bindung von Inositol-Pentaphosphat an Hämoglobin zusammenhängt (Isaacks et al., 1986; Bounous und Stedman, 2000).

## **2.2 Thrombozyten**

### **2.2.1 Allgemeines**

Die Thrombozyten der Vögel sind ebenso wie die aviären Erythrozyten kernhaltig (Gylstorff und Grimm, 1998; Campbell, 2006; Campbell und Ellis, 2007; Clark et al., 2009; du Plessis und van Wilpe, 2009; Scope, 2011). In der Regel sind sie kleiner als die roten Blutkörperchen und als alle Leukozyten des Vogels (Clark et al., 2009), jedoch deutlich größer als die Blutplättchen der Säuger. Im Blutaussstrich haben Thrombozyten eine hohe Tendenz zur Aggregation, was ihre Zählung erschweren kann. Die durchschnittliche Thrombozytenzahl beim Vogel liegt zwischen 20 000 und 30 000/ $\mu$ l Blut (Scope, 2011). Nach den Erythrozyten sind sie die zweithäufigsten Zellen des Vogelblutes (Campbell und Ellis, 2007). Über die Überlebenszeit der Thrombozyten ist nur wenig bekannt (Lam, 1997). In vitro ist sie kurz und beträgt nur wenige Stunden (Lam, 1997; Wigley et al., 1999).

### **2.2.2 Thrombopoese**

Die Thrombopoese findet, ebenso wie die Erythropoese, beim adulten Vogel intravaskulär in den Sinus des Knochenmarks statt (Latimer und Bienzle, 2000). Im Gegensatz zum Säuger, bei dem sich Thrombozyten durch Abschnürung aus Megakaryozyten bilden (Sinowatz und Hees, 2006), existieren letztere nicht im Knochenmark des Vogels (Jain, 1993). So nimmt man an, dass Thrombozyten aus mononukleären Zellen des Knochenmarks entstehen (Campbell, 2006), welche noch nicht eindeutig identifiziert wurden (Bounous und Stedman, 2000). In der Entwicklung der Thrombozyten lassen sich Thromboblasten und unreife sowie reife Thrombozyten unterscheiden. Die runden bis ovalen Thromboblasten haben nur wenig Zytoplasma. Dieses färbt sich tief basophil an und kann hellere Bereiche und zytoplasmatische Blasen enthalten. Der Kern enthält feines bis

punktiertes Chromatin und einen, bis zu mehrere Nukleoli. Abhängig von ihrem Reifegrad können unreife Thrombozyten in drei Stadien eingeteilt werden. So sind die frühen unreifen Thrombozyten runde bis ovale Zellen, die mehr Zytoplasma enthalten, als ihre Vorgänger. Das Chromatin ist unregelmäßig verklumpt und das basophile Zytoplasma kann Vakuolen enthalten. Die nächste Stufe stellt der mittlere unreife Thrombozyt dar, dessen Form leicht länglich oder unregelmäßig sein kann. Im blassblauen Zytoplasma kommen manchmal Granula und Vakuolen vor und das Chromatin ist stark verklumpt. Der späte unreife Thrombozyt ist etwas kleiner als sein Vorgänger und oval. Sein blassblaues Zytoplasma weist an einem der Zellpole häufig Granula auf (Campbell, 2006; Campbell und Ellis, 2007).

### 2.2.3 Zahl und Morphologie der aviären Thrombozyten

Im Blutaussstrich werden neben einzelnen Zellen vor allem Aggregate aus mehreren Thrombozyten gefunden (du Plessis und van Wilpe, 2009). Die Gesamtzahl der im Blut vorkommenden Thrombozyten liegt physiologischerweise zwischen  $20$  und  $30 \times 10^9 / L$  (Sturkie und Griminger, 1976; Waibl und Sinowatz, 2004; Scope, 2011). Hühner haben je nach Rasse zwischen  $25,4$  und  $60,3 \times 10^9$  Thrombozyten pro Liter Blut, Enten im Mittel  $30,7 \times 10^9 / L$  (Sturkie und Griminger, 1976). Daimon und Uchida (1978) untersuchten die Thrombozyten von Hühnern. Sie geben eine Länge von etwa  $10 \mu m$ , sowie eine Breite von ungefähr  $5 \mu m$  an (Daimon und Uchida, 1978). Etwas geringere Werte geben du Plessis und van Wilpe (2009) für den Fahlgeier und den Weißrückengeier an. Die durchschnittliche Länge der Thrombozyten dieser beiden Vogelarten liegt zwischen  $5,6$  und  $5,8 \mu m$ , die mittlere Breite zwischen  $2,6$  und  $2,7 \mu m$  (du Plessis und van Wilpe, 2009).

Die Zellform der aviären Thrombozyten ist variabel. So kommen neben ovalen und runden auch spindelförmige Thrombozyten vor (Waibl und Sinowatz, 2004; Scope, 2011). Die Thrombozyten der Pute sind rund bis leicht oval (Bounous und Stedman, 2000) und haben ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Die Form des Kerns ist rund bis oval (Campbell und Ellis, 2007). Er befindet sich zentral in der Zelle und wird von einem klaren Zytoplasma umgeben (Bounous und Stedman, 2000). Der Anteil an Heterochromatin überwiegt den an Euchromatin (Maxwell,

1974). Das Kernchromatin der Pute ist fein granuliert und zu Aggregaten unterschiedlicher Größe zusammengelagert, die sich sowohl im Nukleoplasma als auch angelagert an die verdickte Kernmembran befinden (Simpson, 1968). Das Zytoplasma aviärer Thrombozyten beinhaltet ein bis mehrere eosinophile spezifische Granula (Campbell und Ellis, 2007), die speziesabhängig jedoch auch fehlen können (Meseguer et al., 2002; du Plessis und van Wilpe, 2009). Simpson (1968) beschreibt das Granulum als auffallendste Zellorganelle der Putenthrombozyten. Elektronenmikroskopisch konnte er ein bis drei runde bis ovale Granula darstellen, die an den Zellpolen lagen. Diese waren homogen osmiophil oder komplett ausgefüllt von dicht gewundenen Membranen. Andere, vermutlich degenerierte Granula, enthielten verschieden große Vakuolen sowie kleine osmiophile Granula (Simpson, 1968). Generell weist die Größe der zytoplasmatischen Granula starke Variationen auf (Enbergs, 1975). Bei Blutaussstrichen beginnen die spezifischen Granula bald zu degenerieren und bilden Vakuolen. Schließlich sind sie nur noch als leere Vakuolen im Zytoplasma sichtbar (Hodges, 1977). Einige Autoren vertreten die Meinung, dass diese Granula 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) enthalten (Kuruma et al., 1970; Waibl und Sinowatz, 2004; Campbell, 2006; Campbell und Ellis, 2007), das bei der Thrombozytenaggregation von Bedeutung ist (Stiller et al., 1975). Andere fanden jedoch heraus, dass die spezifischen Granula nicht biogene Amine-, sondern saure Phosphatase-Aktivität zeigen und somit lysosomaler Natur sind (Sweeny und Carlson, 1968; Daimon und Uchida, 1982). Außerdem enthalten aviäre Thrombozyten einige etwa 250 nm große Vesikel, die vermutlich primäre Lysosomen darstellen (Daimon und Uchida, 1982).

Im Zytoplasma befinden sich darüber hinaus etwa 0,2 bis 1 µm große Vakuolen, die von einer Membran umgeben werden (Daimon und Uchida, 1978). Sie sind, abgesehen von einem oder zwei elektronendichten Granula oder amorphem elektronendichten Material, welches der Membran anliegt, leer (Daimon und Uchida, 1982). Daimon und Uchida (1982) untersuchten Hühnerthrombozyten und fanden heraus, dass die Granula in den Vakuolen Monoamine enthielten. Sie schlossen daraus, dass die peripher in den Vakuolen gelegenen Granula den „dense bodies“ der Blutplättchen der Säuger entsprechen (Daimon und Uchida, 1982). Ebenso wie die Blutplättchen, beinhalten die aviären Thrombozyten zwei

Endomembransysteme: das „dense tubular system“ (DTS) und das „offene kanalikuläre System“ (surface connected system, SCS) (Daimon und Uchida, 1978; Wurzinger und Zanner, 2005). Ersteres setzt sich aus der Kernhülle, dem rauen endoplasmatischen Retikulum, dichten Tubuli und konzentrischen Strukturen innerhalb der Zellmembran zusammen (Daimon und Uchida, 1978). Es dient als Speicher für Kalzium (Wurzinger und Zanner, 2005). Das offene kanalikuläre System ist wiederum ein Netzwerk kleiner Kanäle, die aus Einsenkungen der Plasmamembran entstehen. Quer angeschnitten stellen sich diese Kanäle als Vesikel dar (Daimon und Uchida, 1985; Wurzinger und Zanner, 2005). Darüber hinaus gehören dem System vermutlich auch leere zytoplasmatische Vakuolen an (Daimon et al., 1977; Grecchi et al., 1980; du Plessis und van Wilpe, 2009), die Glykosaminoglykane enthalten und sich am Transport oder Speichern von Kalzium beteiligen (Daimon et al., 1977). Man nimmt an, dass das kanalikuläre System der Vergrößerung der Plasmamembran dient, um so den Austausch von Metaboliten zwischen der Zellmembran und dem Extrazellularraum zu erhöhen (Daimon und Uchida, 1985). Elektronenmikroskopisch können in den Thrombozyten außerdem Golgi-Apparat, Mitochondrien, Mikrotubuli, glattes endoplasmatisches Retikulum, Lipidtröpfchen und Glykogeneinschlüsse im Zytoplasma gefunden werden (Maxwell, 1974). In ihrem Erscheinungsbild ähneln die Thrombozyten häufig den kleinen Lymphozyten, von denen sie anhand ihres Zytoplasmas unterschieden werden können (Campbell, 2006). Unter dem Elektronenmikroskop haben Thrombozyten ein dichteres Zytoplasma und enthalten weniger Chromatin als die kleinen Lymphozyten (Simpson, 1968).

Aktivierte Thrombozyten bilden zytoplasmatische Vakuolen, oder zeigen eine Erweiterung des Zytoplasmas (Hawkey und Dennett, 1990; Fudge, 2000a). Diese morphologischen Veränderungen hängen vermutlich mit ihrer Funktion als Phagozyten zusammen (Fudge, 2000a). Weitere Anzeichen der Aktivierung sind eine unscharfe, äußere zelluläre Begrenzung (Campbell und Ellis, 2007) und die Ausbildung von zytoplasmatischen Pseudopodien (Campbell und Ellis, 2007; du Plessis und van Wilpe, 2009). Die unscharfe Zellbegrenzung entsteht durch die Bildung von unregelmäßigen schleier- oder fadenförmigen Pseudopodien (Fey, 1966).

#### 2.2.4 Zytoskelett der Thrombozyten

Ebenso wie die aviären Erythrozyten, besitzen aviäre Thrombozyten ein marginales Band aus Mikrotubuli (Behnke, 1970; Daimon und Uchida, 1982; Meseguer et al., 2002). In Hühnerthrombozyten setzt es sich aus etwa 20 bis 35 Mikrotubuli zusammen und liegt direkt unterhalb der Plasmamembran, wo es die Zelle umrandet (Behnke, 1970). Zur Untersuchung dieses Bands wandte Behnke (1970) unterschiedliche chemische und physikalische Methoden an Frosch- und Hühnererythrozyten, sowie Hühnerthrombozyten und Blutplättchen des Menschen an. Er fand heraus, dass sich nach Entfernen der Mikrotubuli aus den Hühnerthrombozyten deren Zellform veränderte, während ein Entfernen des Bands aus den Hühnererythrozyten keine Wirkung auf deren Form hatte (Behnke, 1970). So scheint das marginale Band in den Thrombozyten der Vögel, im Gegensatz zu dem der aviären Erythrozyten, eine die Zellform wahrende Funktion zu haben (Behnke, 1970; Meseguer et al., 2002). Als Vertreter der kernhaltigen Thrombozyten untersuchten Lee und Mitarbeiter (2004) die Thrombozyten des Katzenhais. Im Zytoplasma konnten sie ein aus F-Aktin bestehendes Band finden, welches nahe dem marginalen Band verlief und mit peripher liegenden Mikrotubuli in Verbindung stand. Darüber hinaus befand sich F-Aktin auch netzartig angeordnet im Randbereich der Zelle, wohingegen es im Zellinneren nicht zu sehen war. Dieses Netz aus F-Aktin umgab das marginale Band. Nach Aktivierung der Thrombozyten nahm die Zelle eine andere Form an, die Anordnung und Lokalisation von Aktin veränderte sich und auch das marginale Band verformte sich. Lee und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass die, durch die Aktivierung bedingte, Formveränderung der Thrombozyten auf der Umverteilung von F-Aktin beruht und vermuteten, dass die Verformung des marginalen Bands somit ein passives Geschehen ist. Sie nahmen an, dass die Verbindung zwischen dem marginalen Bündel und dem Band aus F-Aktin die Mikrotubuli stabilisiert und so die Zellform bewahrt wird (Lee et al., 2004). Auch die Thrombozyten der Hühner enthalten Aktin (DaMatta et al., 1998). Tablin und Taube (1987) konnten in den Blutplättchen von Mensch und Rind Vimentin nachweisen. Ihrer Meinung nach verbinden die Vimentinfilamente die Mikrotubuli mit der Plasmamembran und sind so verantwortlich für die Scheibenform dieser Zellen (Tablin und Taube, 1987).

### 2.2.5 Aufgaben

Die Hauptaufgabe der Thrombozyten liegt, wie die der Blutplättchen, in der Beteiligung an der Hämostase (Sweeny und Carlson, 1968; Kunicki und Newman, 1985). Wie die Blutplättchen der Säuger (Jain, 1993; Horn, 2009; Wurzinger und Zanner, 2005) werden die aviären Thrombozyten durch Serotonin, Thrombin und Kollagen aktiviert (Kunicki und Newman, 1985; O`Toole et al., 1994), jedoch nicht durch ADP (Belamarich et al., 1968; Grant und Zucker, 1973). Da sowohl der Faktor XII (Didisheim et al., 1959; Archer, 1971; Sturkie und Griminger, 1976; Spurling, 1981; Belleville et al., 1982; Espada, 2000) als auch Präkallikrein (Saito et al., 1974; Spurling, 1981; Belleville et al., 1982; Espada, 2000) und Kininogen dem aviären Blutplasma fehlen (Saito et al., 1976; Spurling, 1981; Belleville et al., 1982; Espada, 2000), und der Faktor IX beim Vogel mit geringerer Aktivität als beim Menschen vorhanden ist (Belleville et al., 1982), geht man davon aus, dass für die Blutgerinnung der Vögel vor allem der extrinsische Weg von Bedeutung ist (Sturkie und Griminger, 1976; Belleville et al., 1982; Espada, 2000; Scope, 2011), während beim Säuger die intrinsischen Faktoren eine zentrale Rolle spielen (Scope, 2011). Außerdem enthalten die Thrombozyten der Vögel nur wenig Thromboplastin. Dieses stammt vor allem aus den geschädigten Zellen des, die Gefäße umgebenden, Gewebes (Waibl und Sinowatz, 2004). In diesem Zusammenhang untersuchten Doerr und Hamilton (1981) die Gerinnung von Hühnerblut. Sie konnten zeigen, dass der Kontakt von Blut zu Glas oder Kaolin die Gerinnung beschleunigte und neben Gewebsthromboplastin auch intrinsisches Thromboplastin im Blut gebildet wurde. Ihrer Meinung nach haben Vögel ein funktionierendes intrinsisches System, das jedoch langsamer und schwächer ist als das der Säuger (Doerr und Hamilton, 1981). Der extrinsische Weg der Blutgerinnung erfolgt beim Vogel schnell. So fanden Belleville und Mitarbeiter (1982) an Untersuchungen von Wachteln heraus, dass 60 Sekunden nach einer Venenläsion das angrenzende Endothel komplett von Fibrin bedeckt und Thromben bestehend aus Thrombozyten, Fibrinfäden und Erythrozyten um und über die Läsion ausgedehnt waren (Belleville et al., 1982).

Den aviären Thrombozyten kommt neben der blutstillenden auch eine phagozytotische Funktion zu (Hodges, 1977; Scope, 2011). So konnten Wigley

und Mitarbeiter (1999) zeigen, dass diese fähig sind, verschiedene Bakterien, darunter vor allem Salmonella-Arten, zu phagozytieren. Auch zeigten die Thrombozyten gegenüber den Bakterien Aktivitäten des „oxidative burst“. Wigley und Mitarbeiter schrieben den aviären Thrombozyten daher eine Rolle bei der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen zu (Wigley et al., 1999). Lam (1997) konnte an Hühnerthrombozyten zeigen, dass diese einen Faktor sezernieren, der zur Migration von Lymphozyten führt und, dass sie selbst die Fähigkeit besitzen zu wandern. Ferner fand er heraus, dass Thrombozyten an Virus-infizierten Zellen anhaften, jedoch nicht fähig sind, Wasserstoffperoxid herzustellen oder einen sauerstoffabhängigen Weg im Sinne eines „oxidative burst“ zu nutzen, um phagozytiertes Material zu verdauen. Aufgrund ihrer phagozytotischen und migratorischen Eigenschaften schloss auch er daraus, dass Thrombozyten eventuell eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Infektionen spielen (Lam, 1997). Vogelthrombozyten scheinen eine Reihe von Partikeln und Organismen phagozytieren zu können und sind daher vermutlich unspezifische Phagozyten (Wigley et al., 1999). Jedoch gibt es auch Autoren, die eine echte Phagozytose anzweifeln, da sich die scheinbar aufgenommenen Partikel im offenen kanalikulären System befinden und somit in Kontakt mit dem Extrazellularraum stehen (Meseguer et al., 2002).

## **2.3 Heterophile Granulozyten**

### **2.3.1 Allgemeines**

Aufgrund der Färbbarkeit ihrer Granula teilt man die Granulozyten in heterophile, eosinophile und basophile Granulozyten ein. Den Hauptanteil macht der heterophile Granulozyt aus (Gylstorff und Grimm, 1998). Er wird auch als polymorphonuklearer pseudoeosinophiler Granulozyt bezeichnet (Sturkie, 1965) und stellt das Äquivalent zum neutrophilen Granulozyten der Säuger dar (Hodges, 1977), von dem er sich aber sowohl morphologisch als auch in biochemischer Hinsicht unterscheidet (Latimer und Bienzle, 2000). Der Heterophile stellt den zweithäufigsten Leukozyten im Blut des Geflügels dar (Freeman, 1971), dessen mittlerer Durchmesser 8,8 µm beträgt (Campbell und Ellis, 2007). Morphologisch unterscheiden sich die Heterophilen verschiedener Vogelspezies nur geringfügig

voneinander (Maxwell, 1973; Hawkey und Dennett, 1990).

### 2.3.2 Bildung

Während der embryonalen Entwicklung besiedeln granulozytäre Stammzellen Milz, Niere, Lunge, Thymus, Gonaden, Pankreas, das Knochenmark und andere Gewebe und bilden dort Herde der Granulopoese. Beim adulten Vogel findet sie deshalb in verschiedenen Geweben, darunter auch intramedullär, statt (Lucas und Jamroz, 1961; Jones, 1973; del Cacho et al., 1991; Campbell, 2006; Campbell und Ellis, 2007). Im Knochenmark entstehen Granulozyten, im Gegensatz zu aviären Erythrozyten und wahrscheinlich auch Thrombozyten, extravaskulär intersinusoidal (Campbell, 1967; Freeman, 1971; Hodges, 1977; Jain, 1993). Man nimmt an, dass die Entwicklung der aviären Granulozyten der der Säuger gleicht (Hawkey und Dennett, 1990; Campbell, 2006). So gehören alle Granulozyten der myeloiden Stammzellreihe an (Gassmann und Lutz, 2010c). Durch Teilung und Differenzierung entsteht aus dieser Stammzelle eine Progenitorzelle, die auch als „colony forming unit“ (CFU) bezeichnet wird. CFU-B entwickelt sich zum basophilen Granulozyten und CFU-Eo wird zum eosinophilen Granulozyten. Aus CFU-GM („colony forming unit granulocyte monocyte“) geht CFU-G („colony forming unit granulocyte“) hervor, die sich anschließend zum Myeloblasten differenziert (Wurzinger und Peschl, 2005). Diese Vorläuferzelle gilt als gemeinsam für alle der drei Granulozytentypen (Campbell und Coles, 1986; Liebich, 2010) und hat einen Durchmesser von 15  $\mu\text{m}$  (Liebich, 2010). Myeloblasten sind große, runde Zellen, die keine Granula enthalten (Fudge, 2000b). Ihr Kern ist ebenfalls rund und beinhaltet prominente Nukleoli und fein retikuläres Chromatin (Campbell, 2006). Durch zahlreiche Zellorganellen ist ihr Zytoplasma stark basophil. Aus den Myeloblasten gehen Promyelozyten hervor, die mit einem Durchmesser von 18 bis 25  $\mu\text{m}$  die größten Zellen innerhalb der Entwicklungsreihe darstellen (Liebich, 2010). Durch einen Anstieg des Zytoplasmas, das jetzt hellblau erscheint, haben Promyelozyten ein geringeres Kern-Zytoplasma-Verhältnis als ihre Vorgänger. Der Zellkern ist häufig undeutlich begrenzt und Nukleoli fehlen. Promyelozyten enthalten erste, unreife Granula, die sich je nach Art des Granulozyten morphologisch voneinander unterscheiden (Campbell, 2006). Ab diesem Stadium ist eine Differenzierung zwischen heterophilen, eosinophilen und basophilen Granula möglich (Liebich,

2010). Die Granula der heterophilen Promyelozyten stellen sich meist als orange ovale Strukturen dar. Darüber hinaus beinhalten heterophile Promyelozyten auch magentarote Granula (Campbell und Coles, 1986). Innerhalb einer Woche differenzieren sich die unreifen zu spezifischen Granula (Liebich, 2010). Die nächste Entwicklungsstufe stellt der Myelozyt dar. Dieser ist kleiner als seine Vorgänger, rund und enthält bereits spezifische Granula, anhand derer die eindeutige Zuordnung der Zellen jetzt leicht möglich ist. Der Zellkern ist rund bis oval und das Chromatin stärker kondensiert als das der Vorgänger. Neben den spezifischen stäbchenförmigen Granula beinhaltet das hellblaue Zytoplasma der heterophilen Myelozyten auch unreife Granula und Ringe (Campbell, 2006). Durch weitere Differenzierung entsteht der kleinere Metamyelozyt. Bereits über die Hälfte des Zytoplasmas werden nun von eosinophilen Granula bedeckt (Campbell und Coles, 1986; Campbell, 2006). Der Zellkern ist bohnenförmig und enthält kondensiertes Chromatin (Campbell und Coles, 1986). Ab diesem Entwicklungsstadium wandern viele Zellen im Knochenmark durch die Sinuswände in die Zirkulation ein und beenden ihre Reifung vermutlich intrasinusoidal (Hodges, 1977). Als letzte Vorstufe zum reifen heterophilen Granulozyten entwickelt sich der stabkernige Granulozyt. Dieser ähnelt dem reifen Granulozyten mit Ausnahme des Zellkerns, der nicht segmentiert, sondern länglich oder U-förmig ist (Bounous und Stedman, 2000; Campbell, 2006). Während der weiteren Entwicklung erfolgt durch Einschnürungen eine Segmentierung des Zellkerns (Sinowatz und Hees, 2006).

Die Granulopoese wird vor allem durch Interleukin-3 (IL-3, multi-CSF) und verschiedene Kolonie-stimulierende Faktoren (colony-stimulating factors, CSFs), darunter GM-CSF und G-CSF, reguliert, die unter anderem von aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten und Stromazellen des Knochenmarks gebildet werden (Jain, 1993).

### **2.3.3 Zahl und Morphologie der aviären Heterophilen**

Der heterophile Granulozyt stellt die häufigste Granulozytenart dar und macht beim Vogel durchschnittlich 25 bis 40 % der Gesamtleukozytenzahl aus (Waibl und Sinowatz, 2004). Bounous und Mitarbeiter (2000) geben für Wildputen eine ungefähre Spanne zwischen 4000 und 27 600 Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut an (Bounous et

al., 2000). Ähnlich sind die Werte von Bounous und Stedman (2000), die in etwa zwischen 4000 und 24 200 Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut betragen (Bounous und Stedman, 2000). Durch Stress steigt die Zahl der Heterophilen (Freeman, 1971). So stellten Venkataratnam und Clarkson (1962) bei ihren Untersuchungen der Blutzellen der Pute einen Anstieg der heterophilen Granulozyten mit Zunahme des Alters der Tiere fest und begründeten diese Zunahme mit einer gesteigerten Produktion der Heterophilen ausgelöst durch Stress (Venkataratnam und Clarkson, 1962). Die Größe der heterophilen Granulozyten variiert je nach Vogelspezies (Scope, 2011). Bei Pute und Huhn beträgt der Durchmesser eines reifen Heterophilen im Mittel  $13\ \mu\text{m}$  (Bounous und Stedman, 2000).

Die heterophilen Granulozyten von Pute und Huhn sind runde Zellen mit farblosem Zytoplasma, das stäbchenförmige Granula enthält (Bounous und Stedman, 2000). Lichtmikroskopisch stellen sich diese Granula nach Romanowsky-Färbungen rötlich bis orangefarben dar (Bounous und Stedman, 2000; Campbell und Ellis, 2007). Beeinflusst durch die Färbemethode können die Granula auch atypisch erscheinen (Campbell und Ellis, 2007) und ihre Morphologie kann je nach Vogelspezies variieren. Der Zellkern ist reich an Heterochromatin (Maxwell, 1973), zwei- bis dreifach gelappt und wird teilweise von den zytoplasmatischen Granula bedeckt (Bounous und Stedman, 2000). Elektronenmikroskopisch lassen sich Pseudopodien und seltener auch Lobopodien beobachten (Maxwell und Trejo, 1970). Im Zytoplasma der meisten aviären Heterophilen können drei Arten von Granula unterschieden werden (Ericsson und Nair, 1973; Daimon und Caxton-Martins, 1977; Robertson und Maxwell, 1991). Typ I macht beim Huhn 48,3 % aller Granula aus und ist etwa  $1,5\ \mu\text{m}$  lang sowie  $0,6\ \mu\text{m}$  breit (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Diese primären Granula sind rund, oval oder stäbchenförmig (Ericsson und Nair, 1973; Maxwell, 1973; Daimon und Caxton-Martins, 1977) und enthalten häufig einen „central body“ (Ericsson und Nair, 1973; Robertson und Maxwell, 1991; Campbell und Ellis, 2007), dessen Morphologie abhängig von der Vogelspezies differieren kann. In den meisten Fällen ist er jedoch rund (Campbell und Ellis, 2007). Maxwell (1973) fand bei vergleichenden Untersuchungen der heterophilen Granulozyten sechs verschiedener Vogelspezies ein bis mehrere „central bodies“ in den großen dichten Granula. Bei der Pute zählte er bis zu drei dieser zentralen Einschlüsse,

die einen Durchmesser von bis zu 0,6  $\mu\text{m}$  hatten (Maxwell, 1973). Primäre Granula beinhalten saure Phosphatasen, was vermuten lässt, dass es sich bei diesen Strukturen um Lysosomen handelt (Topp und Carlson, 1972a). Die Granula vom Typ II sind kleiner und weniger elektronendicht als Erstere. Beim Huhn sind sie mit 24,7 % an der gesamten Granulamenge vertreten und ihr Durchmesser beträgt etwa 0,5  $\mu\text{m}$  (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Sie enthalten einen exzentrisch gelagerten Einschluss, an dessen Aufbau vermutlich Proteine beteiligt sind (Robertson und Maxwell, 1991). Die dritte Art von Granula hat einen Durchmesser von ungefähr 0,1  $\mu\text{m}$  und ihr Anteil an der Gesamtmenge aller Granula beträgt beim Huhn 27 % (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Im Inneren dieser runden oder ovalen Granula befindet sich ein elektronendichter Kern, der von einer elektronentransparenten Peripherie umgeben wird (Ericsson und Nair, 1973; Daimon und Caxton-Martins, 1977; Campbell und Ellis, 2007). Die Granula von Typ III konnten nicht in den Heterophilen der Gans und der Ente nachgewiesen werden (Maxwell, 1973). Manche Autoren vertreten die Meinung, dass es sich bei den drei Arten von Granula um unterschiedliche Reifestadien der Granula handelt (Dhingra et al., 1969; Santos et al., 2003). Weiterhin befinden sich im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten Mitochondrien, Golgi-Apparat, Zentriolen, Glykogenpartikel und Bündel gewellter Fibrillen, die zwischen den großen Granula und parallel zur Plasmamembran verlaufen (Maxwell und Trejo, 1970).

Unreife heterophile Granulozyten werden im aviären Blut nur selten gesehen (Campbell und Coles, 1986). Morphologisch zeichnen sie sich im Allgemeinen durch eine verstärkte Basophilie des Zytoplasmas, einen unsegmentierten Kern und unreife zytoplasmatische Granula aus. Am häufigsten finden sich Myelozyten und Metamyelozyten (Campbell und Ellis, 2007).

#### **2.3.4 Zytoskelett**

Bei seinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte Enbergs (1975) sowohl Mikrotubuli als auch Bündel von Mikrofilamenten in den Heterophilen des Hausgeflügels nachweisen. Ferner erwähnt er eine Verbindung zwischen den Aktinfilamenten und den spezifischen Granula. Demnach sollen Mikrofilamente an den Bewegungen der Granula im Zytoplasma beteiligt sein (Enbergs, 1975).

Auch Terashima und Mitarbeiter (1992) konnten Aktin aus den heterophilen Granulozyten des Huhnes isolieren (Terashima et al., 1992). In den Neutrophilen des Kaninchens verlaufen Aktinfilamente uniform unterhalb der Plasmamembran (Oliver et al., 1978) und auch Myosin weist eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma auf (Valerius et al., 1981). Die Mikrotubuli stellen in den neutrophilen Granulozyten des Menschen sehr dynamische Strukturen dar, die vom Zentrosom nahe dem Zellkern in die Zellperipherie strahlen (Ding et al., 1995). Auch Vimentinfilamente konnten in den humanen Neutrophilen nachgewiesen werden (Malech et al., 1977; Parysek und Eckert, 1984). Neutrophile Granulozyten haben die Fähigkeit zur Chemotaxis, sich amöboid fortzubewegen und zu phagozytieren (Wurzinger und Zanner, 2005). Dabei stellen Aktin und das damit assoziierte Myosin vermutlich die wesentlichen Antriebselemente dar (Valerius et al., 1981). Auch die Vimentinfilamente scheinen bei der Fortbewegung der neutrophilen Granulozyten von Bedeutung zu sein (Parysek und Eckert, 1984). Zur Migration bilden die Zellen am vorderen Ende das Lamellipodium aus, das viel F-Aktin enthält. Am hinteren Zellende entsteht der Uropod, der Mikrotubuli und Intermediärfilamente beinhaltet und dessen Bildung von Aktin reguliert wird (Vicente-Manzanares und Sánchez-Madrid, 2004). Ferner kommt den Mikrotubuli laut Ryder und Mitarbeitern (1982) sowohl bei der Phagozytose als auch bei der Degranulation der Zellen eine Funktion zu. In humanen Neutrophilen konnten sie nach der Phagozytose von Bakterien eine enge Verbindung der Mikrotubuli zu Vesikeln, Phagosomen und Granula, sowie die Anordnung letzterer entlang der Mikrotubuli, feststellen (Ryder et al., 1982). Ihre Aufgabe besteht vermutlich im Leiten der Granula und Vakuolen durch die Zelle (Hoffstein und Weissmann, 1978). Wie in anderen eukaryotischen Zellen auch, dienen die Mikrotubuli außerdem der Zellteilung (Vicente-Manzanares und Sánchez-Madrid, 2004).

### **2.3.5 Aufgaben**

Die Funktion des aviären heterophilen Granulozyten ähnelt der des Neutrophilen der Säuger (Bounous und Stedman, 2000). Die amöboid beweglichen Heterophilen der Vögel bekämpfen eindringende Mikroorganismen durch Phagozytose und anschließende Zerstörung (Hodges, 1977; Gylstorff und Grimm, 1998) mit Hilfe sauerstoffabhängiger und -unabhängiger Mechanismen (Campbell

und Ellis, 2007). So konnten Brune und Mitarbeiter (1972) in Untersuchungen beweisen, dass heterophile Granulozyten von Hühnern fähig sind Gram-negative und Gram-positive Bakterien, sowie Hefen zu phagozytieren und abzutöten (Brune et al., 1972). Dringen Pilze oder Bakterien in das Gewebe ein, kommt es zur Auswanderung (Emigration) der Granulozyten aus den Blutgefäßen ins Gewebe (Wurzinger und Zanner, 2005; Göbel und Kaspers, 2010). Zunächst bewirken Aktivoren aus Makrophagen am Endothel die Bildung von Adhäsionsmolekülen, die ein Anhaften der Granulozyten am Endothel ermöglichen (Göbel und Kaspers, 2010). In den Endothelzellen führen dann intrazelluläre Prozesse zur Öffnung der Verbindungen benachbarter Zellen und die Granulozyten sind so in der Lage aus den Blutgefäßen ins Gewebe einzuwandern (Diapedese). Durch ihre amöboide Beweglichkeit können sie sich auch auf geschädigte Zellen zubewegen (Wurzinger und Zanner, 2005). An diesem, als Chemotaxis bezeichneten, Vorgang sind Bestandteile des Zytoskeletts, wie Mikrofilamente und Mikrotubuli, beteiligt (Jain, 1993). Ausgelöst wird er durch Spaltprodukte des Komplementsystems und durch Chemokine der myeloiden Zellen. Durch das Anhaften von Proteinen, sogenannter Opsonine, an die Oberfläche der Mikroorganismen, werden sie als fremd markiert (Opsonisierung) und so von den Granulozyten unter Zuhilfenahme von Rezeptoren erkannt. Diese beginnen dann die Erreger zu umfließen und sie in eine intrazelluläre Vakuole, das Phagosom, aufzunehmen. Letzteres verschmilzt anschließend mit den Lysosomen zum Phagolysosom (Göbel und Kaspers, 2010). Die Phagozytosefähigkeit aviärer Heterophiler ist geringer als die von humanen oder kaninen Neutrophilen (Brooks et al., 1996). In den Phagolysosomen werden, angeregt durch die Phagozytose, aus molekularem Sauerstoff toxische Sauerstoffmetaboliten wie Superoxidanionen oder Wasserstoffperoxid gebildet („respiratory burst“), die ebenso wie die Inhaltsstoffe der Lysosomen (Lysozym, saure Hydrolasen) anschließend die phagozytierten Fremdpartikel zerstören (Tizard, 1992; Jain, 1993; Göbel und Kaspers, 2010). Lysozym ist in den heterophilen Granulozyten in höherer Konzentration als in den Neutrophilen enthalten (Rausch und Moore, 1975). Es stellt ein antibakterielles Enzym dar, das Bestandteile der Zellwand der Bakterien, sogenannte Peptidoglykane, spaltet (Göbel und Kaspers, 2010). In den Granula der Heterophilen der Hühner und der Pute entdeckten Evans und Mitarbeiter (1994) kationische Peptide mit

bakterizider Wirkung. Ihrer Meinung nach sind diese Peptide als sauerstoffunabhängiger Mechanismus hauptverantwortlich für die antimikrobielle Funktion der Heterophilen der Vögel (Evans et al., 1994). Phagozytierende Heterophile verbrauchen aber auch Sauerstoff und bilden sowohl Superoxidanionen als auch Wasserstoffperoxid, welche auch extrazellulär entlassen werden (Dri et al., 1978; Campbell und Ellis, 2007). Auch Lam und Mitarbeiter (1996) konnten nachweisen, dass heterophile Granulozyten sauerstoffabhängige Mechanismen nutzen, um Bakterien zu phagozytieren und abzutöten (Lam et al., 1996). Ihnen fehlt aber die Myeloperoxidase, welche in den neutrophilen Granulozyten der Säuger eine große Rolle bei der sauerstoffabhängigen Bekämpfung von Bakterien spielt (Brune et al., 1972; Jain, 1993; Campbell und Ellis, 2007). Heterophile Granulozyten haben auch die Fähigkeit andere Zellen aufzunehmen (Topp und Carlson, 1972b) und können Zelltrümmer oder Fremdkörper durch Phagozytose beseitigen (Göbel und Kaspers, 2010). Die zur Abtötung der Erreger gebildeten toxischen Substanzen sowie die Enzyme aus den Lysosomen führen anschließend auch zum Tod und zur Lyse der heterophilen Granulozyten selbst (Wurzinger und Zanner, 2005). So gelangen lysosomale Enzyme ins umliegende Gewebe wodurch auch Zellen in die Auflösungsprozesse miteinbezogen werden können (Wurzinger und Zanner, 2005; Liebich, 2010).

## **2.4 Eosinophile Granulozyten**

### **2.4.1 Allgemeines**

Mit einem Anteil von 2 bis 4 % an der Gesamtleukozytenmenge kommen eosinophile Granulozyten im aviären Blut in nur geringer Anzahl vor (Waibl und Sinowatz, 2004). In einem aviären Blutausschrieb werden sie meist am seltensten gezählt (Latimer und Bienzle, 2000). Ihre Größe ist mit der der heterophilen Granulozyten vergleichbar (Sturkie und Griminger, 1976), kann jedoch stärkere Variationen aufweisen (Freeman, 1971). Morphologisch unterscheiden sich die Eosinophilen teilweise sogar innerhalb einer taxonomischen aviären Ordnung und sie sind häufig nur schwer von den Heterophilen abzugrenzen (Fudge und Joseph, 2000). Im Gegensatz zu den heterophilen Granulozyten ist der Kern der

Eosinophilen weniger stark gelappt (Waibl und Sinowatz, 2004) und intensiver gefärbt (Gylstorff und Grimm, 1998).

#### **2.4.2 Bildung**

Der gemeinsame Ursprung aller Granulozyten liegt in der myeloischen Stammzelle. Als unipotente Stammzelle geht aus ihr anschließend CFU-Eo hervor (Gassmann und Lutz, 2010c). Diese entwickelt sich dann zum Myeloblasten, der die gemeinsame Vorläuferzelle aller Granulozyten darstellt (Liebich, 2010). Unter Punkt 2.3.2 wurde auf die Morphologie der einzelnen Vorläuferzellen bereits eingegangen, so dass hier nur noch die Besonderheiten der eosinophilen Granulopoese hervorgehoben werden sollen.

Der eosinophile Promyelozyt stellt die nächste Stufe in der Entwicklungsreihe dar und enthält bereits primäre Granula, die sich hell anfärben und nach der Färbung nach Wright orange darstellen. Dunkle magentafarbene Granula und Ringe, die im heterophilen Promyelozyten zu sehen sind, finden sich hier nicht (Campbell, 2006). Die typischen eosinophilen Granula treten zum ersten Mal im Stadium des Myelozyten auf (Campbell und Coles, 1986), der keine basophilen Granula oder ringförmigen Strukturen wie der heterophile Myelozyt zeigt. Über den Metamyelozyten und den darauf folgenden stabkernigen Granulozyten entwickelt sich schließlich der reife eosinophile Granulozyt (Campbell, 2006). Die Produktion der Eosinophilen und ihre Abgabe aus dem Knochenmark in das Blut werden von den Lymphokinen Eos-CSF (Eosinophil-colony-stimulating factor), Eosinophilopoietin und „Eosinophil-releasing-factor“ reguliert, die von T-Lymphozyten gebildet werden. Die Eosinophilopoese dauert zwei bis sechs Tage. Bereits ein bis zwei Tage später gelangen die eosinophilen Granulozyten ins periphere Blut und treten anschließend nach wenigen Stunden in das Gewebe über (Jain, 1993).

#### **2.4.3 Zahl und Morphologie der aviären Eosinophilen**

Die Zahl der im aviären Blut zirkulierenden eosinophilen Granulozyten ist gering (Waibl und Sinowatz, 2004). Für Wildputen finden sich in der Literatur Werte zwischen 0 bis etwas über 400 Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut (Bounous und Stedman, 2000; Bounous et al., 2000). Das Alter der Tiere scheint keinen besonderen Effekt auf

die Anzahl der Eosinophilen zu haben (Venkataratnam und Clarkson, 1962; Moreira dos Santos Schmidt et al., 2009). Beim Huhn beträgt ihre Größe zwischen 4 und 11  $\mu\text{m}$ , durchschnittlich jedoch 7,3  $\mu\text{m}$  (Waibl und Sinowatz, 2004). Die eosinophilen Granulozyten der Pute haben einen Durchmesser von etwa 12  $\mu\text{m}$  (Bounous und Stedman, 2000).

Das Zytoplasma der runden bis unregelmäßig geformten Eosinophilen ist hellblau (Bounous und Stedman, 2000) und ihr Kern meist zweifach gelappt (Scope, 2011). Bei der Pute ist der Zellkern häufig nicht segmentiert (Maxwell und Siller, 1972). Oftmals wird er von den eosinophilen Granula völlig verdeckt (Scope, 2011). Diese sind im Zytoplasma unregelmäßig verteilt (Maxwell und Trejo, 1970) und färben sich je nach Vogelspezies mattrot bis orange oder purpurrot an (Scope, 2011). Ihre Morphologie zeigt intra- und interspezifisch deutliche Unterschiede (Maxwell und Siller, 1972). So können die eosinophilen Granula anhand ihres Inhalts in drei Gruppen eingeteilt werden: Granula mit kristallinem Inneren (Gruppe 1), Granula mit nicht-kristallinem Inhalt (Gruppe 2) und homogene Granula (Gruppe 3). Jene der Gruppe 1 wurden ausschließlich bei Vögeln der Ordnung Anseriformes, zum Beispiel bei der Pekingente oder dem Singschwan, gefunden. Der Kormoran oder auch die Möwe sind Vertreter der Gruppe 2. Zur 3. Gruppe gehört neben dem Huhn oder dem Pinguin auch die Pute. Diese Granula sind komplett homogen und haben eine runde bis ovale Form. Die Eosinophilen der Pute beinhalten im Durchschnitt zehn Granula (Maxwell, 1978b), die 0,5 bis 1,5  $\mu\text{m}$  groß sind (Maxwell und Siller, 1972). Die meisten Vögel haben nur einen Typ eosinophiles Granulum (Maxwell, 1978b). Jedoch fanden Maxwell und Siller (1972) in ihren Untersuchungen heraus, dass die Eosinophilen der japanischen Wachtel und die des Perlhuhnes zwei Typen von Granula enthalten, die der Felsentaube sogar drei. Bei der Pute beobachteten sie nur einen Typ von Granula (Maxwell und Siller, 1972). Auch Enbergs (1975) fand nur einen Granulumentyp bei der Pute. Jedoch stellte er fest, dass nicht alle Granula vollständig homogen elektronendicht sind. Neben den stark osmiophilen Granula fand er drei weitere, weniger dichte Granula mit entweder feingranulärem, feingranulär-vesikulärem oder tubulärem Inhalt in den Eosinophilen der Pute. Auffallend war außerdem ihre beachtliche Größe (Enbergs, 1975). So kommen innerhalb der Ordnung der Galliformes und der

Columbiformes Variationen bezüglich der Typen von Granula vor. Andere Ordnungen weisen dagegen nur einen Typ von Granula auf (Maxwell, 1978b). Die Granula der Eosinophilen der Säuger enthalten das Major basic protein (MBP) (Gleich et al., 1973; Gleich et al., 1974), das ungefähr 55 % der Gesamtproteinmenge der Granula ausmacht (Gleich et al., 1974) und in ihrem Kern zu finden ist (Lewis et al., 1978). Dieses zytotoxisch wirkende Protein, das nach der Aktivierung der Eosinophilen freigesetzt wird (Rothenberg und Hogan, 2006), lässt sich mit Hilfe immunhistochemischer Methoden darstellen (Dellon et al., 2012).

Elektronenmikroskopisch lassen sich im Zellkern der Eosinophilen ein bis zwei Nukleoli und im Zytoplasma Golgi Apparat, Zentriolen, pinozytotische Vesikel, Vakuolen (Maxwell und Trejo, 1970), wenige, kleine Mitochondrien, Sekrettröpfchen, verzweigte Mikrotubuli (Maxwell und Siller, 1972) und raues endoplasmatisches Retikulum darstellen (Santos et al., 2003). Darüber hinaus haben aviäre eosinophile Granulozyten auch Pseudopodien (Maxwell und Trejo, 1970).

#### **2.4.4 Zytoskelett**

Die eosinophilen Granulozyten des Menschen enthalten Aktin. Die Polymerisation von G- zu F-Aktin spielt sowohl für die Veränderung der Zellform als auch für die Fortbewegung dieser Zellen eine entscheidende Rolle. In Studien an humanen Eosinophilen konnten Buckland und Mitarbeiter (2003) zeigen, dass Histamin die Polymerisation von Aktin induzieren kann (Buckland et al., 2003). Mikrotubuli gehen in den humanen Eosinophilen vom Zentrosom, nahe dem Zellkern, aus und strahlen in die Zellperipherie (Ding et al., 1995). Maxwell und Trejo (1970) fanden in elektronenmikroskopischen Untersuchungen an den eosinophilen Granulozyten von Hühnern sowohl längs als auch quer verlaufende Mikrotubuli (Maxwell und Trejo, 1970). Des Weiteren konnte Enbergs (1975) ungeordnet oder in Bündeln auftretende Mikrofilamente in den aviären Eosinophilen nachweisen (Enbergs, 1975).

#### **2.4.5 Aufgaben**

Die eosinophilen Granulozyten der Säuger sind in der Lage Bakterien und andere

Fremdpartikel zu phagozytieren. Die in den eosinophilen Granula enthaltene Peroxidase bildet mit Wasserstoffperoxid und einem Halogen einen Komplex, der neben seiner bakteriziden Wirkung vor allem der Zerstörung von Parasiten dient. Antiparasitär wirksam sind darüber hinaus auch das Major basic protein, Sauerstoffmetaboliten, die Lysophospholipase und die hydrolytischen lysosomalen Enzyme. Liegt eine parasitäre Infektion vor, werden spezifische IgG-Antikörper gebildet, die an die Oberfläche der Parasiten binden. Am Ort der parasitären Infektion werden aus Gewebemastzellen nach Binden von IgE-Antikörpern bioaktive Substanzen, wie Histamin, freigesetzt, die wiederum eine Gewebseosinophilie bedingen. Durch Interaktion mit den parasitär gebundenen IgG werden die Eosinophilen im Gewebe aktiviert und setzen ihre Granula oder deren Inhaltstoffe frei, die dann die Parasiten zerstören (Jain, 1993). Eosinophile sind ferner in der Lage Antigen-Antikörperkomplexe zu phagozytieren und Stoffe zu bilden, die Entzündungsreaktionen im Gewebe begrenzen können. Durch das Freisetzen der Antagonisten vom Entzündungsmediator Histamin spielen sie außerdem eine wichtige Rolle bei allergischen Erkrankungen, bei denen häufig eine Eosinophilie auftritt (Wurzinger und Zanner, 2005). Darüber hinaus ist der eosinophile Granulozyt an fast allen Entzündungsprozessen aktiv beteiligt und führt durch die Sekretion zytotoxischer Proteine zur Zerstörung von Gewebe. Eine aktive Beteiligung konnte zum Beispiel bei Asthma oder ulzerativer Kolitis nachgewiesen werden (Jain, 1993).

Die Funktion der eosinophilen Granulozyten des Vogels ist nicht völlig klar (Scope, 2011). Man geht davon aus, dass sie auch bei parasitären Infektionen sowie bei bestimmten allergischen Reaktionen vermehrt in betroffenen Geweben auftreten (Hodges, 1977). Santos und Mitarbeiter (2003) konnten in den Eosinophilen des Wegebussards kationische Proteine nachweisen, die beim Säuger an der Abwehr von Infektionen durch Bakterien, Parasiten oder Helminthen beteiligt sind (Young, 2000; Santos et al., 2003). Ferner enthalten die aviären eosinophilen Granulozyten, ebenso wie die der Säuger, die Myeloperoxidase (Peroxidase) (Jain, 1993; Santos et al., 2003), ein lysosomales Enzym mit bakterizider Wirkung (Santos et al., 2003). In den eosinophilen Granula kommen darüber hinaus saure Phosphatasen und Arylsulfatasen vor, weshalb einige Autoren die Meinung vertreten, dass es sich bei diesen Granula

um primäre Lysosomen handelt (Daimon und Caxton-Martins, 1977; Maxwell, 1978a), die unter anderem der Zerstörung von phagozytierten Mikroorganismen (Sinowatz und Hees, 2006) und Parasiten dienen (Jain, 1993). Enbergs (1975) konnte bei seinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Puteneosinophilen Hinweise dafür finden, dass die Granula Substanzen an die Umgebung abgeben (Enbergs, 1975). Eine Eosinophilie kommt beim Vogel allerdings eher selten vor (Gylstorff und Grimm, 1998; Fudge und Joseph, 2000; Waibl und Sinowatz, 2004) und scheint T-Zell-unabhängig zu sein (Maxwell und Burns, 1986). Sie konnte beim Huhn und der Schleiereule während der Mauser festgestellt werden (Gylstorff und Grimm, 1998). Bei der experimentellen Infektion von Hühnern mit Schistosomen stieg die Zahl der Eosinophilen im peripheren Blut (Ferris und Bacha, 1986). Jedoch kommt es bei einer parasitären Infektion eines Vogels nicht immer zu einer Zunahme der Eosinophilen, weshalb der eosinophile Granulozyt keinen verlässlichen Indikator für den Parasitenstatus eines aviären Patienten darstellt. Hypersensitivitäts-Syndrome führen beim Vogel nicht zu einer Eosinophilie (Fudge und Joseph, 2000) und auch ein anaphylaktischer Schock hat beim Vogel keinen Anstieg der eosinophilen Granulozyten zur Folge (Maxwell und Burns, 1986). In Studien an Hühnern konnten Maxwell und Burns (1986) ferner keinen Zusammenhang zwischen einer Eosinophilie und einer erhöhten Anzahl an IgE-Antikörpern im Plasma feststellen (Maxwell und Burns, 1986). Während die Eosinophilen beim Säuger eine wichtige Rolle in Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp spielen, scheinen sie beim Vogel im Entzündungsgeschehen bei Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ von Bedeutung zu sein (Maxwell, 1984).

## **2.5 Basophile Granulozyten**

### **2.5.1 Allgemeines**

Mit ungefähr 2 bis 4 % der Leukozyten kommen basophile Granulozyten im Vogelblut häufiger vor als im Säugerblut (Waibl und Sinowatz, 2004). In der Regel sind sie bei gesunden Vögeln zahlreicher im Blut vertreten als die eosinophilen Granulozyten (Latimer und Bienzle, 2000) und geringfügig kleiner

als diese (Freeman, 1971). Ihre Form und Größe entspricht in etwa der der heterophilen Granulozyten (Sturkie und Griminger, 1976). Basophile stellen Verwandte der Gewebsmastzellen dar, die aufgrund morphologischer und biochemischer Gemeinsamkeiten ähnliche Funktionen haben, oder sogar mit diesen zusammenarbeiten (Enbergs, 1975). Trotz der Ähnlichkeiten stellen die basophilen Granulozyten nicht die Vorläufer der Mastzellen dar (Wurzinger und Zanner, 2005).

### **2.5.2 Bildung**

Die Basophilen entwickeln sich ebenso wie die bereits beschriebenen beiden Granulozytenarten aus einer myeloischen Stammzelle, aus der durch Teilung dann CFU-Ba entsteht (Gassmann und Lutz, 2010c). Der daraus hervorgehende Myeloblast wird zum basophilen Promyelozyten, der primäre basophile Granula enthält. Diese sind allerdings kleiner als die der reifen basophilen Granulozyten und die der heterophilen Promyelozyten. Als nächste Vorstufe wird der basophile Myelozyt gebildet, der dann die spezifischen basophilen Granula enthält. Über den Metamyelozyten und den stabkernigen Granulozyten entwickelt sich schließlich der reife basophile Granulozyt. Da dieser einen unsegmentierten Kern besitzt, kann die stabkernige Vorstufe nicht eindeutig identifiziert werden (Campbell, 2006). Reguliert wird die Bildung der basophilen Granulozyten von den „Basophilopoietinen“ Interleukin-5, Interleukin-3 und GM-CSF, die von aktivierten T-Lymphozyten gebildet werden (Jain, 1993).

### **2.5.3 Zahl und Morphologie der aviären Basophilen**

Im peripheren Blut der Wildpute finden sich in etwa zwischen 0 und 2 200 basophile Granulozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut (Bounous et al., 2000). In ihren Untersuchungen an Puten konnten Moreira dos Santos Schmidt und Mitarbeiter (2009) bei weiblichen Tieren einen Anstieg der Basophilenzahl mit dem Alter beobachten. Sie stellten diese Erhöhung in Zusammenhang mit dem Stress, bedingt durch die beginnende Legeperiode der älteren Hennen (Moreira dos Santos Schmidt et al., 2009). Dagegen konnten Venkataratnam und Clarkson (1962) in Studien keine altersbedingten Veränderungen der Basophilenzahl bei Puten zeigen (Venkataratnam und Clarkson, 1962). Die runden Basophilen der Pute haben einen Durchmesser von circa  $12 \mu\text{m}$  (Bounous und Stedman, 2000).

Im farblosen Zytoplasma befindet sich ein runder, zentral oder exzentrisch gelegener, meist unsegmentierter Zellkern (Hodges, 1977; Bounous und Stedman, 2000), der selten auch zweig gelappt sein kann. Bei der Pute ist er nicht gelappt und liegt meist exzentrisch in der Zelle (Maxwell, 1973). Er färbt sich schwach basophil an und wird häufig von den runden bis kurzstäbchenförmigen Granula überdeckt (Scope, 2011), die wegen ihrer Wasserlöslichkeit oft nur in geringer Anzahl nachweisbar sind (Gylstorff und Grimm, 1998). Aufgrund ihres Gehalts an Heparin zeigen die zytoplasmatischen Granula mit basischen Farbstoffen eine metachromatische Färbung (Enbergs, 1975). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Basophilen von Hühnern konnten Maxwell und Trejo (1970) vier verschiedene Arten von Granula beobachten. Alle waren rund bis halbmondförmig und hatten in etwa die gleiche Größe, jedoch unterschied sich ihr Inhalt (Maxwell und Trejo, 1970). Dagegen fanden Daimon und Caxton-Martins (1977) nur zwei Typen von Granula in Hühnerbasophilen. Typ I war ungefähr 0,6 µm groß und wies je nach Reifestadium unterschiedlich elektronendichten Inhalt auf. Diese Granula waren denen der menschlichen basophilen Granula ähnlich. Granula vom Typ II hatten nur einen Durchmesser von 0,1 µm und homogen elektronendichten Inhalt (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Bei der Ente, Gans, Wachtel, Taube, dem Perlhuhn sowie der Pute konnten drei verschiedene Typen von Granula in den Basophilen nachgewiesen werden. Die Granula vom Typ I hatten elektronendichten Inhalt und bei der Pute einen Durchmesser von 0,2 bis 0,6 µm. Sie waren vor allem nach Glutaraldehyd-Fixierung zu sehen. Die bei der Pute häufiger vorkommenden und größeren Granula vom Typ II, die hauptsächlich nach Fixierung mit Acrolein beobachtet wurden, hatten gestrichelten Inhalt und einen mittleren Durchmesser von 1,0 µm. Die dritte Art Granulum mit wabenartigem Inhalt war vor allem nach Glutaraldehyd-Fixierung sichtbar. Unklar war, ob die unterschiedlichen Typen von Granula Ergebnisse der Fixierung waren, verschiedene Reifestadien der Granula darstellten oder unterschiedliche Granulapopulationen repräsentierten (Maxwell, 1973). Andere zelluläre Bestandteile, die unter dem Elektronenmikroskop nachgewiesen wurden, sind Pseudopodien (Maxwell und Trejo, 1970), Nukleoli, Golgi Apparat, Mitochondrien, Glykogenpartikel, endoplasmatisches Retikulum und Lipidtröpfchen (Maxwell, 1973).

#### 2.5.4 Zytoskelett

In humanen basophilen Granulozyten konnten Aktin und Tubulin nachgewiesen werden. Man geht davon aus, dass beiden eine Rolle bei der Freisetzung von Histamin zukommt (Nielsen et al., 2004). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Basophilen des Huhnes fanden Maxwell und Trejo Mikrotubuli, die parallel zur Plasmamembran verliefen (Maxwell und Trejo, 1970). Im Bereich der spezifischen Granula kommen in den aviären basophilen Granulozyten darüber hinaus auch Mikrofilamente vor (Enbergs, 1975).

#### 2.5.5 Aufgaben

Die Aufgaben der aviären basophilen Granulozyten sind unklar. Jedoch nimmt man an, dass sie den Aufgaben der Basophilen und denen der Mastzellen der Säuger ähnlich sind (Campbell, 2006), da ihre Granula ebenfalls Histamin enthalten (Chand und Eyre, 1978a; Dieterlen-Lièvre, 1988). So führt Histamin aus den Granula von Mastzellen zur Erweiterung kleiner Gefäße und einer Erhöhung ihrer Permeabilität und trägt damit unmittelbar zu den Kardinalssymptomen einer Entzündungsreaktion bei (Gratzl und Wurzinger, 2005). Beim Vogel dienen die aviären Basophilen als Zielzellen von Entzündungsprozessen und Hypersensitivitätsreaktionen (Chand und Eyre, 1978b; Gylstorff und Grimm, 1998). Sie beteiligen sich vermutlich regelmäßig an Entzündungsreaktionen, bei denen sie schon früh in das betroffene Gewebe einwandern (Waibl und Sinowatz, 2004). Durch bestimmte chemische und biologische Agentien, wie zum Beispiel das *Escherichia coli* Endotoxin, Terpentin oder *Staphylokokkus aureus*, können experimentell lokale Entzündungsreaktionen beim Vogel erzeugt werden, an denen viele Basophile mitwirken (Fudge und Joseph, 2000). Im Zusammenhang mit chronischen Atemwegserkrankungen, ausgelöst durch *Aspergillus* oder Bakterien sowie bei Gewebszerstörungen kann eine Basophilie beobachtet werden (Wedel, 2004). Auch starker Stress kann zu einer Basophilie führen (Fudge und Joseph, 2000; Latimer und Bienzle, 2000). Den aviären basophilen Granulozyten wird auch eine Rolle bei der Reaktion des Wirtes auf innere und äußere Parasiten zugesprochen (Latimer und Bienzle, 2000). So zeigten Ferris und Bacha (1986) in ihren Untersuchungen, dass nach der Infektion mit Schistosomen die Zahl der Basophilen im peripheren Blut von Hühnern deutlich anstieg (Ferris und Bacha,

1986). Außerdem stellte sich in Studien heraus, dass basophile Granulozyten von Hühnern, die an Arthus-Reaktionen beteiligt sind, Fremdpartikel phagozytieren können (Dhodapkar et al., 1982). Ferner wird davon ausgegangen, dass die basophilen Granulozyten eine zytotoxische Wirkung auf Rous-Sarkome haben. Bei der experimentellen Infektion von Hühnern mit dem *Rous-Sarkom-Virus* konnten Burton und Higginbotham (1966) eine Infiltration von Basophilen in den entstandenen Tumor beobachten. Sie vermuten, dass das in den Granula enthaltene Heparin die Entwicklung des Tumors hemmen kann (Burton und Higginbotham, 1966).

## 2.6 Monozyten

### 2.6.1 Allgemeines

Im Allgemeinen lassen sich weiße Blutzellen in Granulozyten und Agranulozyten einteilen. Zu letzteren gehören neben den Lymphozyten auch die Monozyten (Liebich, 2010). Diese stellen die größten Leukozyten des aviären Blutes dar (Campbell, 2006). Ihr Anteil an der Gesamtleukozytenmenge beträgt 1 bis 3 % (Latimer und Bienzle, 2000). Aviäre Monozyten lassen sich häufig nur schwer von den großen Lymphozyten unterscheiden (Sturkie und Griminger, 1976; Waibl und Sinowatz, 2004). Jedoch sind sie mit einem mittleren Durchmesser von 8 bis 17  $\mu\text{m}$  (Waibl und Sinowatz, 2004) etwas größer als diese (Gylstorff und Grimm, 1998).

### 2.6.2 Bildung

Im Knochenmark gehen durch Teilung und Differenzierung aus pluripotenten Hämoytoblasten myeloische Stammzellen hervor (Wurzinger und Peschl, 2005), die sich dann jeweils zur CFU-GM („colony-forming unit-granulocyte-monocyte“) entwickeln (Jain, 1993). Diese Vorläuferzelle differenziert sich anschließend zu CFU-M, aus der nach weiteren Entwicklungsschritten der Monoblast entsteht, der morphologisch nicht vom Myeloblasten zu unterscheiden ist (Wurzinger und Peschl, 2005). Die darauf folgende Vorstufe stellt der frühe Promonozyt dar. Dieser entwickelt sich über den späten Promonozyten schließlich zum reifen Monozyten (Campbell und Coles, 1986). Reguliert wird die gesamte

Monozytopoese durch Interleukin-3 und „granulocyte-monocyte colony-stimulating factor“ (GM-CSF). Die Differenzierung zu den jeweiligen Vorstufen wird ferner durch M-CSF („monocyte-specific colony-stimulating factor“) beeinflusst, der von aktivierten Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und Endothelzellen gebildet wird (Jain, 1993). Reife Monozyten werden früh aus dem Knochenmark in das zirkulierende Blut entlassen. Hier verbleiben sie nur kurz und wandern schließlich über Blutgefäße in Gewebe ein, wo sie sich zu Gewebemakrophagen differenzieren (Latimer und Bienzle, 2000).

### 2.6.3 Zahl und Morphologie der aviären Monozyten

Die in der Literatur angegebenen Durchschnittswerte für aviäre Monozyten sind sehr variabel (Freeman, 1971). Für die Wildpute ist ein Referenzbereich von ungefähr 0 bis 3950 Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut beschrieben (Bounous et al., 2000). Howlett und Mitarbeiter (2002) untersuchten den Einfluss des Alters auf verschiedene Blutparameter bei unterschiedlichen Trappenarten. Bei Jungvögeln konnten sie deutlich höhere Monozytenzahlen im Vergleich zu älteren Tieren feststellen (Howlett et al., 2002). Bei der Pute scheint die Zahl der Monozyten hingegen keinen altersbedingten Veränderungen zu unterliegen (Venkataratnam und Clarkson, 1962). Aviäre Monozyten sind größer als aviäre Lymphozyten und heterophile Granulozyten (Hodges, 1977). Die Monozyten der Pute haben einen mittleren Durchmesser von etwa 14  $\mu\text{m}$  (Bounous und Stedman, 2000).

Die Form aviärer Monozyten ist in der Regel rund. Ihr reichlich vorhandenes Zytoplasma zeigt eine blaugraue Färbung. Unter dem Lichtmikroskop sind Vakuolen oder feine eosinophile Granula zu erkennen (Campbell, 2006). Ferner weist das Zytoplasma häufig zwei Zonen auf: einen inneren Bereich, der sich dunkler anfärbt und einen sich heller darstellenden, äußeren Bereich (Gylstorff und Grimm, 1998; Campbell, 2006). Der rundlich bis nierenförmige Kern färbt sich durch eine lockere Chromatinverteilung schwach an und liegt exzentrisch in der Zelle (Scope, 2011). Häufig ist im Zytoplasma der sogenannte Hof zu erkennen. Dieser bezeichnet die, an die Kerneinbuchtung angrenzende, Zytoplasmaregion und ermöglicht eine Unterscheidung von Monozyten und Lymphozyten. Lichtmikroskopisch erscheint dieser Bereich vakuolisiert und beinhaltet orangefarbene Bezirke (Hodges, 1974). Elektronenmikroskopisch

entspricht diese Vakuolisierung wahrscheinlich den aktiven Golgi-Zisternen. Durch eine unterschiedliche Ausdehnung des Golgi-Komplexes erklärt sich vermutlich die variierende Ausprägung des Hofes. Ferner entsprechen die orangefarbenen Bereiche im Hof wahrscheinlich den osmiophilen Granula, die auch im übrigen Zytoplasma nachzuweisen sind. Sie sind 0,1 bis 0,5 µm groß, haben eine runde bis längliche Form (Enbergs, 1975) und stellen Lysosomen dar (Maxwell und Trejo, 1970; Dieterlen-Lièvre, 1988). Weiterhin lassen sich elektronenmikroskopisch Pseudo- und Lobopodien, Mitochondrien und raues endoplasmatisches Retikulum erkennen (Maxwell, 1974). Besonders nahe dem Golgi-Apparat aber auch im restlichen Zytoplasma finden sich kleine Vesikel, die zum Teil osmiophilen Inhalt aufweisen. Darüber hinaus beinhaltet das Zytoplasma konfluierende Vesikel, kondensierte Vakuolen, Endozytose-Vakuolen, Ribosomen (Enbergs, 1975) sowie Lipidtröpfchen (Maxwell und Trejo, 1970). Die Vakuolisierung des Zytoplasmas stellt vermutlich ein Anzeichen der Aktivierung der Monozyten dar (Scope, 2011). Vor allem in der Nähe des Zellkerns sind Bündel von Mikrofilamenten zu erkennen, die in unterschiedliche Richtungen verlaufen (Enbergs, 1975). Diese feinen, gewellten Filamentbündel haben eine Breite von bis zu 0,5 µm (Maxwell, 1974).

#### **2.6.4 Zytoskelett**

Die Monozyten des Menschen enthalten Mikrotubuli. Sie gehen meist vom Zentrosom der Zelle aus und führen strahlenförmig in die Zellperipherie (Cassimeris et al., 1986). Auch Aktin gehört dem Zytoskelett der Säugermonozyten und -makrophagen an. Die Polymerisation von Aktin ist in den Makrophagen von entscheidender Bedeutung für ihre Reaktion auf eine Entzündung. So konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung der Polymerisation, die Bildung von Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid, abnimmt, wodurch die Entzündungsantwort aktivierter Makrophagen vermindert wird (Kim et al., 2010). In den Monozyten der Hühner wurde Vimentin nachgewiesen. Diesem Intermediärfilament kommt bei der Regulation der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen eine wichtige Rolle zu (Beneš et al., 2006). Ferner wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie in den Monozyten des Huhnes Mikrotubuli nachgewiesen (Maxwell und Trejo, 1970). Vor allem in der Nähe des Kerns findet man außerdem in verschiedene

Richtungen verlaufende, variable Bündel von Mikrofilamenten, deren Einzelfilamente quervernetzt sind (Enbergs, 1975).

### **2.6.5 Aufgaben**

Monozyten stellen keine Endzellen dar. Nach ihrer Bildung im Knochenmark wandern sie über das Blut in verschiedene Gewebe aus und differenzieren sich dort zu Gewebsmakrophagen, den Mitgliedern des Systems der mononukleären Phagozyten (MPS) (Gratzl und Wurzinger, 2005; Wurzinger und Zanner, 2005). Sie sind Teil des zellvermittelten, angeborenen Immunsystems (Sharma, 2008; Göbel und Kaspers, 2010). Bei einer Verletzung von Zellen, oder bei Entzündungsprozessen, werden Stoffe frei, die die Makrophagen mit Hilfe von Rezeptoren erkennen können. Ferner sind sie in der Lage auf die Quelle dieser Stoffe zuzuwandern (Chemotaxis) und körperfremdes Material, darunter auch Bakterien, zu phagozytieren (Gratzl und Wurzinger, 2005). Das Fremdmaterial wird zunächst in eine intrazelluläre Vakuole, das Phagosom, aufgenommen (Göbel und Kaspers, 2010). Auch Makrophagen enthalten Lysosomen, in denen sich neben hydrolytischen Enzymen Lysozym befindet, die dem Abbau des Fremdmaterials dienen (Gratzl und Wurzinger, 2005). Nach Verschmelzen des Phagosoms mit dem Lysosom zum Phagolysosom, wird das aufgenommene Material mit Hilfe der Inhaltsstoffe der Lysosomen abgebaut (Göbel und Kaspers, 2010). Außerdem befinden sich in den Makrophagen noch Peroxidasen, die Sauerstoffradikale zur Inaktivierung der Fremdstoffe bilden (Gratzl und Wurzinger, 2005). Darüber hinaus stellen Makrophagen antigenpräsentierende Zellen dar, da sie auf ihrer Oberfläche MHC-II-Moleküle tragen. Diese werden zunächst intrazellulär in Vesikeln der Makrophagen gespeichert. Nach der Phagozytose von Fremdmaterial verschmelzen diese Vesikel mit den Phagolysosomen und die MHC-II-Moleküle binden Peptide aus dem Abbau von Antigenen, wandern an die Zelloberfläche und stimulieren dort die CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zur Einleitung einer zellvermittelten oder humoralen Immunantwort (Göbel und Kaspers, 2010).

Aviare Monozyten ähneln denen der Säuger (Bounous und Stedman, 2000). So enthalten auch sie Peroxidasen (Caxton-Martins und Daimon, 1976) und sind in der Lage aktiv zu phagozytieren (Weiss und Fawcett, 1953). Bei Untersuchungen

an Monozyten von Hühnern und Puten stellte sich heraus, dass die Phagozytoseaktivität der Monozyten jedoch geringer ist als die der heterophilen Granulozyten (Stabler et al., 1994). Ferner differenzieren sich auch aviäre Monozyten zu Makrophagen (Weiss und Fawcett, 1953).

## **2.7 Lymphozyten**

### **2.7.1 Allgemeines**

Bei der Pute stellen die Lymphozyten den Hauptanteil der weißen Blutkörperchen dar (Bounous und Stedman, 2000; Moreira dos Santos Schmidt et al., 2009). Sie können bis zu 75 % der Leukozyten ausmachen (Waibl und Sinowatz, 2004). Generell werden sie in kleine, mittlere und große Lymphozyten eingeteilt, wobei manche Autoren auch nur zwischen kleinen und großen Lymphozyten unterscheiden. Mit einem Anteil von circa 60 bis 70 % aller Lymphozyten kommen die kleinen Lymphozyten am häufigsten im aviären Blut vor (Scope, 2011). Die großen Lymphozyten sind vermutlich unreife Vorstufen (Waibl und Sinowatz, 2004), wohingegen die kleinen und mittleren Lymphozyten reife funktionsfähige Zellen darstellen (Hodges, 1974). Nur ein kleiner Teil aller im Körper vorkommenden Lymphozyten befindet sich im peripheren Blut, der größere Anteil ist in den lymphatischen Organen zu finden (Gylstorff und Grimm, 1998).

### **2.7.2 Lymphopoese**

Vermutlich stammen die Vorläuferzellen der aviären Lymphozyten ebenso wie die der Säuger von pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark ab (Jain, 1993). So differenzieren sich pluripotente Hämoytoblasten zu lymphatischen Stammzellen, die sich dann weiter zu Lymphoblasten entwickeln (Wurzinger und Peschl, 2005). Letztere weisen reichlich tief basophiles Zytoplasma, einen großen Kern mit feinem Chromatin und ein oder zwei prominente Nukleoli auf. Die nächste Vorstufe, der Prolymphozyt, hat gröberes Chromatin und keine Nukleoli (Campbell, 2006). In den lymphatischen Organen findet schließlich die weitere Entwicklung zu immunkompetenten Lymphozyten statt (Wurzinger und Peschl, 2005), B-Lymphozyten differenzieren sich in der Bursa Fabricii, T-Lymphozyten

im Thymus (Campbell, 2006). Erstere besiedeln dann andere lymphatische Organe wie Milz, Lymphknoten und intramurale Lymphfollikel. T-Lymphozyten siedeln sich ebenfalls in den lymphatischen Organen an und zirkulieren zwischen ihnen und dem Blut (Waibl und Sinowatz, 2004).

### 2.7.3 Zahl und Morphologie der aviären Lymphozyten

Während der postnatalen Entwicklung vom Schlupf bis zur adulten Pute nimmt die Anzahl der Lymphozyten im peripheren Blut zu (Venkataratnam und Clarkson, 1962). Für adulte Wildputen liegt der Referenzbereich ungefähr zwischen 4150 und 31 100 (Bounous und Stedman, 2000) bzw. zwischen 4200 und 34 200 Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut (Bounous et al., 2000). Sowohl Größe als auch Form der Lymphozyten unterliegen großen Variationen (Sturkie und Griminger, 1976). So liegt der Durchmesser großer, aviärer Lymphozyten zwischen 12 bis 15  $\mu\text{m}$ , bei mittleren zwischen 8 bis 10  $\mu\text{m}$  und kleine Lymphozyten haben einen Durchmesser von nur 4 bis 6  $\mu\text{m}$  (Waibl und Sinowatz, 2004).

Die Form aviärer Lymphozyten kann rund oder unregelmäßig sein (Campbell und Coles, 1986). Durch die enge Aggregation mit Erythrozyten sehen Vogellymphozyten in gefärbten Blutausstrichen oft deformiert aus (Hawkey und Dennett, 1990). Im Allgemeinen ist das Zytoplasma homogen und schwach basophil (Hodges, 1977). Selten finden sich eosinophile (azurophile) Granula (Bounous und Stedman, 2000). Der runde Zellkern liegt zentral oder leicht exzentrisch in der Zelle und weist gelegentlich eine kleine Einbuchtung auf (Campbell und Ellis, 2007). Je nach Ausdehnung dieser Einbuchtung kann der Kern so gelappt oder segmentiert aussehen (Enbergs, 1975). Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten Pseudo- und Lobopodien, Nukleoli, Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, pinozytotische Vesikel, Vakuolen, Granula (Maxwell, 1974) und Mikrotubuli in den Lymphozyten nachgewiesen werden (Maxwell und Trejo, 1970). Die Granula haben eine homogen-elektronendichte, granulär oder unregelmäßig lamelläre Matrix, die Cores enthalten kann. Vermutlich entsprechen sie den lichtmikroskopisch nachweisbaren azurophilen Granula (Enbergs, 1975). Ihre Bedeutung ist bis heute unbekannt (Bounous und Stedman, 2000).

Kleine Lymphozyten sind runde Zellen mit rundem Kern und einem hohen Kern-

Zytoplasma-Verhältnis (Bounous und Stedman, 2000). Das Zytoplasma ist als nur schmaler Saum vorhanden und das Chromatin ist stark kondensiert (Waibl und Sinowatz, 2004). Elektronenmikroskopisch fallen Lipidtröpfchen sowie kleine, homogene Granula mit einem Durchmesser von bis zu 0,5 µm auf (Enbergs, 1975). Die Unterscheidung der kleinen Lymphozyten von den Thrombozyten ist anhand der zytoplasmatischen Merkmale möglich. So ist das Zytoplasma der Thrombozyten farblos und klar, häufig vakuolisiert und enthält spezifische Granula (Campbell und Ellis, 2007).

Die mittleren Lymphozyten sind rund bis oval und haben ebenfalls ein großes Kern-Zytoplasma-Verhältnis (Maxwell, 1974). Das Zytoplasma umgibt den Zellkern als breites Band (Hodges, 1977) und das Chromatin ist lockerer verteilt als in den kleinen Lymphozyten (Waibl und Sinowatz, 2004). Im Gegensatz zu den anderen Leukozyten weist der mittlere Lymphozyt nur wenige Zellorganellen auf. Neben den oben beschriebenen Organellen finden sich unter dem Elektronenmikroskop auch Granula. Diese haben einen Durchmesser von 0,1 bis 1 µm (Maxwell, 1974).

Die großen Lymphozyten werden bei gesunden Vögeln nur selten im Blut gefunden (Campbell und Coles, 1986). Sie enthalten reichlich Zytoplasma und ihr Kern färbt sich nur schwach an (Campbell und Ellis, 2007). Gelegentlich finden sich ein paar azurophile Granula (Jain, 1993). Sowohl mittlere als auch große Lymphozyten können Monozyten ähneln und müssen daher von letzteren unterschieden werden. Monozyten haben etwas mehr basophiles Zytoplasma in dem manchmal eosinophile Granula vorkommen (Bounous und Stedman, 2000).

Anormal erscheinende Lymphozyten sind entweder reaktive, oder zu Blasten transformierte, Lymphozyten. Die reaktive Form entwickelt sich nach Antigen-Stimulation und erscheint als kleiner bis mittelgroßer Lymphozyt mit tief basophilem Zytoplasma und stark geklumptem Chromatin. Während in Blutaussstrichen gesunder Vögel gelegentlich ein reaktiver Lymphozyt zu finden ist, lässt die Anwesenheit vieler reaktiver Lymphozyten auf eine Infektion schließen (Campbell und Ellis, 2007). Die Vakuolisierung des Zytoplasmas stellt eine weitere Anomalie dar (Campbell und Coles, 1986). Zu Blasten transformierte Lymphozyten sind große Zellen mit basophilem Zytoplasma, das eine klare, perinukleare Zone (Golgi-Zone) aufweisen kann. Ihr Chromatin ist fein verteilt

und der Kern kann Nukleoli beinhalten. Solche Lymphozyten können neoplastisch sein oder aufgrund einer Immunstimulation entstehen (Campbell und Ellis, 2007). Außerdem finden sich im aviären Blut selten auch Plasmazellen (Bounous und Stedman, 2000). Ihr Kern liegt exzentrisch in der Zelle, das reichlich vorhandene Zytoplasma ist tief basophil und sie weisen eine ausgeprägte Golgi-Zone auf (Campbell und Ellis, 2007).

#### **2.7.4 Zytoskelett**

In humanen Lymphozyten konnten Aktin, Tubulin und Vimentin nachgewiesen werden. Dabei sind die Aktin-Mikrofilamente überall in den submembranösen Bereichen der Zelle zu finden, vermehrt treten sie aber vor allem in der Peripherie, zum Beispiel in Mikrovilli, auf. Mikrotubuli strahlen vom Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC) in die Zelle aus. Vimentin Intermediärfilamente bilden ein Netzwerk, das im gesamten Zytoplasma der Lymphozyten verteilt ist. Das Zytoskelett dient der Stabilität der Lymphozyten und schützt sie vor Deformationen. Dabei hängt die Zellstabilität vor allem vom Vorhandensein intakter Vimentinfilamente ab. Die Mikrotubuli hingegen scheinen zur Wahrung der Zellstabilität die anderen zytoskelettalen Elemente zu benötigen (Brown et al., 2001). Nach Aktivierung der Lymphozyten können in Effektor-T-Zellen weiterhin Vimentinfilamente nachgewiesen werden, wohingegen Plasmazellen nur noch wenige bis keine Vimentinfilamente mehr beinhalten (Dellagi et al., 1983). In den T-Lymphozyten unterliegen die Aktinfilamente dynamischen Polymerisations- und Depolymerisationsvorgängen. Die daraus resultierende Plastizität des Aktinzytoskeletts ist von entscheidender Bedeutung für die Migration und Antigen-spezifische Aktivierung der T-Lymphozyten (Samstag et al., 2003).

#### **2.7.5 Aufgaben**

Das Immunsystem der Vögel lässt sich mit dem der Säuger vergleichen (Sharma, 2008). Die Lymphozyten können aufgrund ihrer unterschiedlichen Entwicklung und immunologischen Funktion in B- und T-Lymphozyten eingeteilt werden (Waibl und Sinowatz, 2004; Liebich, 2010). Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort (Liebich, 2010). Das Immunsystem dient der Abwehr von Erregern wie Bakterien, Pilzen, Viren oder Parasiten. Dabei sind an der Immunantwort zwei eng miteinander vernetzte Einheiten beteiligt, das angeborene

und das erworbene Immunsystem. Die angeborene Abwehr bekämpft fremde Pathogene unmittelbar und aktiviert weiter erworbene Abwehrmechanismen, denen die Bekämpfung erst nach ein paar Tagen möglich ist. Dabei stellen das Komplementsystem und die verschiedenen Fresszellen Effektoren der angeborenen Abwehr dar. Die Lymphozyten sind Träger des erworbenen Immunsystems. Sie besitzen hochvariable Rezeptoren mit denen sie Antigene erkennen können. Trifft ein Lymphozyt auf ein für ihn passendes Antigen folgen Aktivierung, Vermehrung und Reifung der antigenspezifischen Lymphozyten in den peripheren lymphatischen Organen. So entstehen neben Effektorzellen, die sich nach ihrer Reifung direkt zum Infektionsort begeben, auch Gedächtniszellen. Letztere leben lange und dienen bei erneut auftretendem Kontakt mit dem Antigen der sofortigen Abwehr (Göbel und Kaspers, 2010).

B-Lymphozyten sind die ausführenden Zellen der humoralen Immunität (Göbel und Kaspers, 2010; Liebich, 2010). Sie erkennen Antigene ohne Hilfe von antigenpräsentierenden Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen. So dienen Immunglobuline auf ihrer Zelloberfläche der Erkennung von Antigenen, mit denen sie nach Kontakt einen Antigen-Antikörper-Komplex formen. Mit der Unterstützung von T-Helferzellen entwickeln sich die B-Lymphozyten dann zu Immunoblasten, die sich anschließend mehrmals teilen und letztendlich zu Plasmazellen transformieren. Diese bilden spezifische Antikörper (Immunglobuline) (Liebich, 2010) und stellen die Effektorzellen der B-Lymphozyten dar (Göbel und Kaspers, 2010). Als B-Gedächtniszellen tragen sie keine Antikörper auf ihrer Zelloberfläche und sind bei wiederholtem Kontakt zum Antigen in der Lage schneller zu agieren (Liebich, 2010). Dem ersten Zusammentreffen von B-Lymphozyt und Antigen folgt zunächst die Bildung von IgM-Antikörpern. Ein erneuter Kontakt zum Antigen hat einen sogenannten Immunglobulin-Klassenwechsel zu Folge. Nun werden Antikörper des IgG-, IgA- oder IgE-Typs synthetisiert (Göbel und Kaspers, 2010). Da IgG beim Vogel größer ist als beim Säuger, wird es beim Huhn häufig auch als IgY bezeichnet (Warr et al., 1995; Sharma, 2008). Im Allgemeinen nutzen Antikörper drei Mechanismen zur Bekämpfung von Pathogenen. Durch das Neutralisieren spezifischer Pathogene, vor allem von Viren, können letztere nicht mehr an Oberflächenrezeptoren von Zielzellen binden und werden so an der Replikation

gehindert. Bakterielle Pathogene werden oberflächlich besetzt (Opsonisierung), wodurch sie leichter von Phagozyten aufgenommen und zerstört werden können. Des Weiteren sind Antikörper, die an der Oberfläche von Pathogenen gebunden sind, zur Aktivierung des Komplementsystems fähig. Die Bildung von Komplement-spezifischen Proteinen führt wiederum zur Aktivierung von Phagozyten (Sharma, 2008).

Die T-Lymphozyten sind die Effektoren der zellgebundenen Immunantwort bzw. der zellulären Immunität (Liebich, 2010). Aufgrund unterschiedlicher Oberflächenmoleküle lassen sie sich in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen einteilen (Sharma, 2008). CD steht dabei für „cluster of differentiation“ (Wurzinger und Zanner, 2005). Das Verhältnis zirkulierender CD4<sup>+</sup>- zu CD8<sup>+</sup>-Zellen variiert abhängig von der Tierart (Sharma, 2008). CD4<sup>+</sup>- Lymphozyten binden an „major histocompatibility complex“ (MHC)-Moleküle der Klasse II, welche auf antigenpräsentierenden Zellen, wie zum Beispiel auf Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Lymphozyten, vorkommen. MHC-II-Moleküle präsentieren Peptide auf der Zelloberfläche, die beim Abbau von durch Endo- oder Phagozytose aufgenommenen Antigenen entstehen, wodurch die CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten stimuliert werden (Göbel und Kaspers, 2010). Abhängig von der Herkunft des stimulierenden Antigens erfolgt die weitere Differenzierung in TH1- oder TH2-Zellen. Vermittelt wird diese Differenzierung durch Zytokine (Sharma, 2008). Intrazelluläre Antigene und das von Makrophagen und dendritischen Zellen gebildete Zytokin IL-12 stimulieren die Bildung von TH1-Zellen (Sharma, 2008; Göbel und Kaspers, 2010). Extrazelluläre Antigene wiederum führen zur Bildung von TH2-Zellen, deren Aktivität durch das von Makrophagen und anderen Zellen gebildete IL-1 gefördert wird (Sharma, 2008). TH1-Helferzellen sezernieren Interferon- $\gamma$ , welches Makrophagen, CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten und NK-Zellen aktiviert (Göbel und Kaspers, 2010). Die auch als T-Helferzellen bezeichneten TH2-Zellen aktivieren B-Lymphozyten, welche sich dadurch in Plasmazellen umwandeln (Liebich, 2010). Anschließend unterstützen sie diese bei der Produktion von antigenspezifischen Immunglobulinen (Sharma, 2008). Als T-Suppressorzellen wirken sie ferner auf andere T-Zellen ein und verringern oder stoppen so immunologische Reaktionen (Liebich, 2010). CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten binden an MHC-I-Moleküle. Treffen sie dort auf fremde Peptide, wirken sie zytotoxisch und

töten die entsprechende Zelle ab (Göbel und Kaspers, 2010). Daher werden sie auch als Killerzellen bezeichnet (Liebich, 2010). Eine ihrer wichtigsten Funktionen ist die Zerstörung von Virus-infizierten Zellen (Sharma, 2008).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) stellen Lymphozyten dar, die weder T- noch B-spezifische Oberflächenmoleküle tragen und dem angeborenen Immunsystem angehören (Wurzinger und Zanner, 2005). Sie erkennen und zerstören MHC-I-negative Zellen, bei denen die Bildung von MHC-I-Molekülen durch virale Proteine verhindert wird (Göbel und Kaspers, 2010). Neben Virus-infizierten Zellen töten sie auch Tumorzellen ab (Sharma, 2008). Ebenso wie die zytotoxischen T-Zellen zerstören sie Zellen mit Hilfe der Substanzen ihrer Granula oder durch Zell-Zell-Interaktionen (Göbel und Kaspers, 2010).

### **3 Glykohistochemie**

#### **3.1 Definition, Vorkommen und Aufbau der Lektine**

Lektine stellen kohlenhydratbindende Proteine dar, die ihren Bindungspartnern gegenüber keine enzymatische Aktivität aufweisen und von Antikörpern und Sensor- bzw. Transportproteinen für freie Mono- oder Oligosaccharide unterschieden werden müssen. Lektine mit der Eigenschaft zur Zellagglutination werden auch als Agglutinine bezeichnet. Dabei agglutinieren Hämagglutinine Erythrozyten und Phytohämagglutinine stellen Lektine pflanzlichen Ursprungs dar (Gabijs et al., 2011).

Das Vorkommen der Lektine erstreckt sich auf Pflanzen, Pilze, Mikroorganismen, (Roth, 2011) Tiere und Menschen (Gabijs, 2009a). Über die Hälfte aller beschriebenen Pflanzenlektine entstammt der Familie der Leguminosen. Innerhalb einer Pflanze kommen die Lektine vor allem in den Samen, aber auch in anderen speichernden Pflanzenteilen, wie zum Beispiel der Rinde oder den Knollen vor. Intrazellulär sind sie in sogenannten „protein-bodies“ zu finden (Rüdiger und Gabijs, 2009b). Im Allgemeinen sind die meisten Lektine aus Proteinaminosäuren und Kohlenhydraten aufgebaut und stellen so Glykoproteine dar (Rüdiger, 1978). Ihr Kohlenhydratanteil beträgt zwischen 2 und 50 %. Die

Lektine Concanavalin A (ConA) und WGA sind hingegen kohlenhydratfrei (Rüdiger, 1982).

### 3.2 Einteilung der Pflanzenlektine

Unter Berücksichtigung ihrer nominalen Zuckerspezifität ist es möglich, die Lektine in Gruppen einzuteilen (Roth, 2011). Der Bestimmung dieser Spezifität liegt dabei das Monosaccharid zugrunde, das die Agglutination bzw. Präzipitation am stärksten zu hemmen vermag (Lis und Sharon, 1986). Die folgende Tabelle 1 zeigt eine Einteilung ausgewählter Pflanzenlektine nach ihrer Kohlenhydratspezifität.

Tabelle 1: Zuckerbindungsspezifität und Herkunft ausgewählter Lektine

Zuckerbindungs-spezifität des Lektins	Name des Lektins	Abk. des Lektins	Herkunft des Lektins
Mannose/ Glukose	Concanavalin Agglutinin	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i> (Schwertbohne)
	Pisum sativum Agglutinin	PSA	<i>Pisum sativum</i> (Gartenerbse)
	Lens culinaris Agglutinin	LCA	<i>Lens culinaris</i> (Linse)
Galaktose	Peanut Agglutinin	PNA	<i>Arachis hypogaea</i> (Erdnuss)
	Viscum album Agglutinin	VAA	<i>Viscum album</i> (Mistel)
	Ricinus communis Agglutinin	RCA	<i>Ricinus communis</i> (Rizinusbohne)
N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure	Wheat germ Agglutinin	WGA	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)
N-Acetyl-Galaktosamin	Dolichos biflorus Agglutinin	DBA	<i>Dolichos biflorus</i> (Afrik. Pferdebohne)

	Saphora japonica Agglutinin	SJA	<i>Sophora japonica</i> (Chin. Schnurbaum)
	Griffonia simplicifolia Agglutinin-I	GSL-I	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrik. Schwarzbohne)
	Soybean Agglutinin	SBA	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)
N-Acetyl-Galaktosamin und Galaktose	Sambucus nigra Agglutinin	SNA	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)
L-Fukose	Ulex europaeus Agglutinin-I	UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)
In dieser Gruppe ist kein Monosaccharid als Bindungspartner bekannt; Oligosaccharid-bindend	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin	PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)
	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin	PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)
	Maackia amurensis Agglutinin-I	MAA-I	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)

Abk.= Abkürzung; Afrik.= Afrikanisch; Chin.= Chinesisch

Tabelle modifiziert nach Rüdiger, Gabius, Mulisch und Welsch sowie Habermann (Rüdiger, 1978; Rüdiger, 1981; Gabius et al., 2004; Rüdiger und Gabius, 2009b; Mulisch und Welsch, 2010; Habermann et al., 2011).

### 3.3 Anwendung von Lektinen und Lektinhistochemie

Zu Beginn ihrer Erforschung wurden die Lektine vor allem in der Blutgruppendiagnostik eingesetzt (Franz, 1990). Heute stellen die Pflanzenlektine etablierte Hilfsmittel der Zyto- und Histochemie dar (Rüdiger und Gabius, 2001), die aufgrund ihrer Stabilität bevorzugt verwendet werden. Sie dienen dem Aufzeigen kohlenhydratspezifischen Bindens an Zellen oder an Gewebe. Anhand

ihrer Zuckerspezifität ist eine strukturelle Analyse von Glykanen und Glykokonjugaten möglich. So können krankheitsbedingte Veränderungen des Glykophänotyps einer Zelle entdeckt werden (Rüdiger und Gabius, 2009b). Ferner ermöglichen sie ein Auftrennen von Glykoproteinen, Membranfraktionen oder ganzer Zellen (Rüdiger, 1981). Die Tatsache, dass Pflanzenlektine in der Lage sind, Lymphozyten zur Mitose anzuregen (Rüdiger und Gabius, 2009b), macht sie darüber hinaus zu wertvollen Hilfsmitteln bei der Untersuchung des Immunsystems von Mensch und Tier (Rüdiger, 1982). Des Weiteren finden sie Anwendung in der Biochemie, Zellbiologie, Medizin (Rüdiger und Gabius, 2009b) und Virologie (Malkinson et al., 1986).

Ähnlich wie Antikörper, können Lektine mit verschiedenen Markern für den histochemischen Nachweis versehen werden (Franz, 1990). Als außerordentlich wertvolles Hilfsmittel werden sie zur licht- und elektronenmikroskopischen Detektion von Glykanen in Zellen und Geweben herangezogen. So sind eine ganze Reihe gegen definierte Zucker oder Oligosaccharide gerichtete Lektine bereits erhältlich (Roth, 2011). Nachgewiesen wird die Bindung an Zucker oder Oligosaccharide auf Zellen oder in Geweben zum Beispiel mit Hilfe von markierten Lektinen, wobei Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme als Marker genutzt werden. Auch die Verwendung von an Biotin gekoppelter (biotinylierter) Lektine ist möglich. Diese binden dann an Avidin (Streptavidin), welches wiederum mit einem Marker versehen ist (Mulisch und Welsch, 2010).

### **3.4 Zuckerstrukturen und Lektinbindungsstellen aviärer Blutzellen**

Eukaryotische Zellen und Bakterien tragen auf ihrer Zelloberfläche eine Schicht aus Polysacchariden, die als Glykokalix bezeichnet wird (Bennett, 1963; Gabius et al., 2011). Diese Polysaccharide sind an membranständige Proteine und Lipide gebunden (Liebich, 2010) und enthalten Glukose, Mannose, Galaktose, Fukose, N-Acetyl-Glukosamin, N-Acetyl-Galaktosamin sowie N-Acetyl-Neuraminsäure (Horn, 2009). Der Glykokalix kommt bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen eine wichtige Bedeutung zu (Jörns et al., 2003).

Bei ihren Untersuchungen der Erythrozytenmembran der Pute fand Anne Caldwell (1976) drei Glykoproteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten (90 000, 41 000 und 26 000), die sie mit Hilfe des Lektins Concanavalin A weiter

differenzierte. Die Glykoproteine mit den Molekulargewichten von 41 000 und 90 000 gingen eine Bindung mit dem Lektin ein, die sich durch Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside hemmen ließ. Caldwell konnte so zeigen, dass diese Glykoproteinkomponenten  $\alpha$ -D-Glukose- oder  $\alpha$ -D-Mannosereste enthalten. Ferner scheinen die Glykoproteine der Erythrozytenmembran der Pute im Vergleich zu denen des Menschen weniger stark sialysiert zu sein (Caldwell, 1976). Auch die Erythrozyten des Huhnes binden ConA an ihrer Zell- und Kernmembran (Moraes und Mello, 2006).

Wie bereits erwähnt, haben einige Pflanzenlektine die Fähigkeit die Lymphozyten zur Mitose anzuregen (Rüdiger und Gabius, 2009b). Durch ihr Binden an Kohlenhydratreste oberflächlicher Glykoproteine der Lymphozyten, werden letztere zur Proliferation veranlasst. ConA stellt ein T-Zell-Mitogen dar (Toivanen und Toivanen, 1973; Loa et al., 2001), wohingegen PHA (Phytohämagglutinin) vor allem T-Lymphozyten stimuliert, aber auch eine geringe Wirkung auf die B-Zellen hat (Loa et al., 2001). Einige Autoren untersuchten die Wirkung von ConA auf die T-Lymphozyten der Pute unter verschiedenen Testbedingungen. Je nach Untersuchungsbedingung konnte in allen Studien eine unterschiedlich starke Wirkung von ConA auf die T-Lymphozyten und damit eine Bindung des Lektins an diese Zellen der Pute festgestellt werden (Maheswaran et al., 1975; Sharma und Belzer, 1992; Dhinakar Raj et al., 1997; Loa et al., 2001). Phytohämagglutinin hat eine mitogene Wirkung auf die T-Lymphozyten des Huhnes (Greaves et al., 1968). Ferner binden Hühnerlymphozyten ConA, WGA und RCA II, nicht aber UEA und GSL-I (Flower und Wilcox, 1981). Jörns und Mitarbeiter (2003) konnten ebenfalls keine Bindung von UEA-I an die Lymphozyten des Huhnes feststellen (Jörns et al., 2003). Schauenstein et al. (1983) fanden heraus, dass ein Großteil der Lymphozyten des Huhnes das Lektin PNA aus der Erdnuss bindet. Nicht an PNA bindende Lymphozyten zeigten nach der Behandlung mit dem Enzym Neuraminidase ebenfalls eine positive Reaktion. Eine Unterscheidung zwischen B- und T-Lymphozyten scheint anhand der Bindung des Lektins jedoch nicht möglich zu sein (Schauenstein et al., 1983). Auch bei der Ente konnte die Bindung von PNA an die Lymphozyten durch eine vorherige Behandlung mit dem Enzym Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* deutlich verstärkt werden (Higgins und Chung, 1986). Die Thrombozyten von

Hühnern binden die Lektine UEA-I und PNA. So wurden auf ihrer Zelloberfläche Fukose- und  $\beta$ -Galaktosereste nachgewiesen (DaMatta et al., 1998).

McCorkle et al. (1980) stellten bei ihren histologischen Untersuchungen des Kehllappens vom Huhn fest, dass die Injektion von PHA zu einer erhöhten Anzahl der Monozyten und Heterophilen im Gewebe führte. 24 Stunden nach der Injektion nahm auch die Zahl der eosinophilen und basophilen Granulozyten im Gewebe zu. Aufgrund ihrer Ergebnisse stellten die Autoren die Vermutung auf, dass PHA neben seiner mitogenen Wirkung auf die T-Lymphozyten vielleicht auch einen solchen Effekt auf die Granulozyten haben könnte (McCorkle et al., 1980).

## **4 Immunzytochemie**

### **4.1 Definition und Anwendung**

Die Immunzytochemie bzw. die Immunhistochemie dient dem Aufzeigen antigener Strukturen auf oder in Zellen und Geweben unter Zuhilfenahme von Antikörpern (Pschyrembel, 2004). So können Makromoleküle wie Nukleinsäuren, Lipide, Polysaccharide und Proteine im Gewebsschnitt nachgewiesen werden. Eingesetzt wird diese Methode heute zum Beispiel in der medizinischen Forschung, Pathologie und Tumordiagnostik (Mulisch und Welsch, 2010).

### **4.2 Technik**

Zur licht- oder elektronenmikroskopischen Darstellung antigener Substanzen in Zellen oder Geweben müssen die bindenden Antikörper sichtbar gemacht werden. Dazu werden sie vor ihrer Verwendung an einen Marker gekoppelt. Als Markierungssubstanzen eignen sich Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe wie Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) (Sinowatz und Hees, 2006) oder auch kolloidale Goldpartikel. Aufgrund ihres einfachen und schnell durchzuführenden Nachweises ist die Verwendung von an Fluoreszenzfarbstoffe gebundenen Antikörpern besonders beliebt. Auch enzymgekoppelte Antikörper werden häufig verwendet. Ihre Bindung zeigt sich erst nach der enzymatischen Umsetzung eines passenden Substrats mit Bildung eines farbigen Endprodukts. Als Marker werden

zum Beispiel die Meerrettich-Peroxidase oder die Alkalische Phosphatase eingesetzt (Mulisch und Welsch, 2010).

Im Allgemeinen lassen sich zwei immunhistochemische Verfahrensweisen unterscheiden. Bei der direkten Methode bindet der Antikörper, der an eine Markersubstanz gekoppelt ist, direkt an das Antigen. Bei der indirekten Methode, die häufiger angewendet wird, verbinden sich unmarkierte Primärantikörper in einem ersten Schritt mit den Antigenen. Die Präparate werden anschließend gespült und so überschüssige Antikörper ausgewaschen. Im nächsten Schritt werden markierte Antikörper hinzugefügt, die gegen die Primärantikörper gerichtet sind (Sinowatz und Hees, 2006). Da sich mehrere Moleküle des Sekundärantikörpers mit einem Primärantikörper verbinden können, wird bei der indirekten Methode eine Signalverstärkung erreicht (Mulisch und Welsch, 2010).

Auch die (Strept-)Avidin-Biotin-(ABC-)Technik führt zu einer Verstärkung des Signals. Dieses Verfahren ist sehr sensitiv. So lassen sich sogar kleine Mengen des gesuchten Antigens darstellen und Antikörperkonzentrationen reduzieren. Sowohl das verwendete Streptavidin, ein Protein aus *Streptomyces avidinii*, als auch das Hühnereiweißprotein Avidin, haben eine hohe Affinität für Biotin. Nach ihrer Kopplung an einen biotinylierten Marker, entsteht ein (Strept-)Avidin-Biotin-Enzymkomplex. Durch die Verwendung biotinylierter Antikörper, an die dieser Komplex anschließend bindet, kann das Antigen sichtbar gemacht werden (Mulisch und Welsch, 2010).

### 4.3 Immunhämatologische Differenzierung der Lymphozyten

Gegenstand der Immunhämatologie sind die antigenen Strukturen auf den Blutzellen sowie Erkrankungen des Blutes, die durch Antigen-Antikörper-Reaktionen entstehen können (Jain, 1993).

T-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche einen T-Zell-Rezeptor (TCR), der ihnen ihre Antigen-Spezifität verleiht (Day, 2000). Wie beim Säuger, gibt es auch beim Vogel zwei T-Zell-Rezeptoren: TCR  $\alpha\beta$  und TCR  $\gamma\delta$  (Sowder et al., 1988; Sharma, 2008). Des Weiteren befindet sich auf allen T-Lymphozyten ein CD3-Molekül, das eine enge Verbindung zu jedem der beiden T-Zell-Rezeptoren aufweist und der Zelle den Antigenkontakt signalisiert (Chen et al., 1994; Sharma,

2008). Auf den B-Lymphozyten bilden membrangebundene Immunglobuline den B-Zell Rezeptor (BCR) (Day, 2000; Göbel und Kaspers, 2010).

Sowohl B- als auch T-Lymphozyten lassen sich in Untergruppen einteilen, deren Differenzierung anhand bestimmter Zelloberflächen-Antigene, sogenannter „cluster of differentiation“- (CD-) Antigene, möglich ist (Jain, 1993). Zur Unterscheidung dieser antigenen Strukturen werden monoklonale Antikörper angewandt (Jain, 1993; Ratcliffe et al., 1993; Pschyrembel, 2004). Wie bereits in Kapitel 2.7.5 erwähnt, ist eine Aufteilung der T-Lymphozyten anhand der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 möglich. Ersteres wird dabei von T-Helferzellen und Letzteres von zytotoxischen T-Zellen exprimiert (Sharma, 2008). Chan und Mitarbeiter (1988) untersuchten die T-Lymphozyten von Hühnern unter der Verwendung monoklonaler Antikörper aus Mäusen. Sie fanden heraus, dass die Hühner-T-Zellen auch CD4- und CD8-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen, deren Struktur denen der Säuger sehr ähnlich ist (Chan et al., 1988). Solche monoklonalen Maus-Antikörper verwendeten auch Suresh und Mitarbeiter (1993) in ihren Studien an den Lymphozytenpopulationen der Pute. Die Untersuchungen zeigten, dass die T-Lymphozyten der Pute ebenfalls diese Oberflächenantigene besitzen (Suresh et al., 1993). Darüber hinaus kommt das CD8-Molekül, wie auch beim Menschen (Moebius et al., 1991), auf den T-Lymphozyten des Huhnes entweder als  $\alpha\alpha$ -Homodimer oder als Heterodimer, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, vor (Tregaskes et al., 1995; Luhtala, 1998). Nach verschiedenen Tagungen (Montreal, Budapest, Tours) über die aviäre CD-Nomenklatur haben Ratcliffe und weitere Autoren (1993) die Ergebnisse in einem Bericht zusammengefasst. Die Tagungen dienten dem Vergleich und der Benennung bisher beschriebener antigener Strukturen auf den B- und T-Lymphozyten sowie derer anderer Leukozyten. Nur wenige Antigene wiesen eine Ähnlichkeit zu den CD-Antigenen der Säuger auf. In denen im Folgenden genannten Bezeichnungen steht das „ch“ dabei für Antigene der Leukozyten des Huhnes, das „T“ für Antigene, die vor allem auf T-Zellen und das „B“ für solche, die hauptsächlich auf den B-Lymphozyten zu finden sind. „w“ bezeichnet unveröffentlichte Antigene (Ratcliffe et al., 1993). Neben den bereits genannten Antigenen konnten auf den T-Lymphozyten auch CD3 (Chen et al., 1986; Ratcliffe et al., 1993), CD28 (Vainio et al., 1991; Ratcliffe et al., 1993), chT1 (Chen et al., 1984;

Ratcliffe et al., 1993), chT6 (Schauenstein et al., 1988; Ratcliffe et al., 1993), chT7 (Lee und Tempelis, 1992; Ratcliffe et al., 1993), chT11 (Haury et al., 1993; Ratcliffe et al., 1993), chTw5, chTw9 und chTw10 nachgewiesen werden (Ratcliffe et al., 1993). Auf den B-Lymphozyten des Huhns fanden Chen und Cooper (1987) die Antigene chB1, chB2, chB4 und chB5 (Chen und Cooper, 1987; Ratcliffe et al., 1993). Olson und Ewert (1990) konnten darüber hinaus chB7, chB8, chB9, chB10 und chB11 auf den B-Zellen nachweisen (Olson und Ewert, 1990; Ratcliffe et al., 1993). Außerdem kommen auch chB3 (Pickel et al., 1990; Ratcliffe et al., 1993), chB6.1 (Pink und Rijnbeek, 1983; Veromaa et al., 1988; Ratcliffe et al., 1993), chB6.2 (Veromaa et al., 1988; Ratcliffe et al., 1993) und chB12 auf den B-Lymphozyten des Huhns vor (Huffnagle et al., 1989; Ratcliffe et al., 1993). Sowohl B- als auch T-Lymphozyten tragen ferner das Antigen CD57 (Peault et al., 1987; Ratcliffe et al., 1993) sowie CD45 (Paramithiotis et al., 1991; Ratcliffe et al., 1993). Außerdem sind weitere, auch auf anderen Leukozyten vorkommende, Antigene für die aviären Lymphozyten beschrieben (Ratcliffe et al., 1993).

## **5 Zytoskelett**

### **5.1 Allgemeines**

Das Zytoskelett stellt ein feines Netzwerk aus Mikrofilamenten, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli dar, das alle eukaryotischen Zellen durchzieht. Funktionell ist es von Bedeutung bei der Teilung sowie bei Bewegungsvorgängen der Zelle und bei Transportprozessen innerhalb des Zytoplasmas. Außerdem spielt es bei der Aufrechterhaltung der Zellform eine wichtige Rolle (Sinowatz und Hees, 2006). Generell können drei Elemente bzw. drei Typen von Proteinstrukturen, die in ihrer Gesamtheit das Zytoskelett formen, unterschieden werden: Mikrotubuli, Aktinfilamente (Mikrofilamente) und Intermediärfilamente (Liebich, 2010).

## 5.2 Mikrotubuli

Die Mikrotubuli stellen kleine Röhren mit einem Durchmesser von 25 nm dar (De Brabander, 1982). Ihre Wand besteht aus 13 längs verlaufenden Protofilamenten (De Brabander, 1982; Liebich, 2010), die aus dem Polypeptid Tubulin aufgebaut sind. Letzteres setzt sich wiederum aus zwei Untereinheiten, dem  $\alpha$ - und dem  $\beta$ -Tubulin, zusammen. Innerhalb der Tubulinprotofilamente sind diese Untereinheiten abwechselnd angeordnet (Liebich, 2010). Die Mikrotubuli gehen in der Zelle vom Zentrosom aus und verlaufen in alle Richtungen durch das Zytoplasma in die Zellperipherie. Das Zentrosom stellt das Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC) dar und setzt sich aus zwei orthogonal angeordneten Zentriolen zusammen (De Brabander, 1982). Von diesem Organisationszentrum geht die Neubildung der Mikrotubuli aus (Frankel, 1976). Mikrotubuli sind von herausragender Bedeutung bei der Anordnung der Zellorganellen im Zytoplasma sowie deren Bewegung, zum Beispiel die Migration der sekretorischen Vesikel vom Golgi Apparat zur Plasmamembran. Dabei erfolgt die Bewegung zellgebundener Organellen entlang der Mikrotubuli. Ferner interagieren sie direkt oder indirekt mit Oberflächenrezeptoren der Zelle und beeinflussen so das Zusammenspiel der Zelle mit ihrer Umwelt. Auch kontrolliert das System aus Mikrotubuli die Zellpolarität, Zellform und die Zellbewegung (De Brabander, 1982). Darüber hinaus spielen sie bei der Zellteilung eine wichtige Rolle (Unger et al., 1992). In den Erythrozyten und Thrombozyten verschiedener Vogelarten formen die Mikrotubuli ein marginales Band, das direkt unterhalb der Plasmamembran verläuft (Behnke, 1970).

## 5.3 Aktinfilamente (Mikrofilamente)

Die Aktinfilamente unterliegen ständigen Veränderungen. Abhängig von der Zellfunktion werden Aktinfilamente an einer Stelle der Zelle auf- und an einer anderen gleichzeitig abgebaut (Samstag et al., 2003). Im Allgemeinen führt die Polymerisation von G-Aktinproteinen (globuläres Aktin) zu F-Aktin (filamentäres Aktin) zur Bildung der Mikrofilamente (Horn, 2009). In vielen Zellarten befindet sich ein Netzwerk bestehend aus Aktinfilamenten direkt unterhalb der Zellmembran. Die Aktinfilamente sind zu einzelnen Bündeln zusammengefügt, die schräg zur Längsachse der Zelle verlaufen (De Brabander, 1982). Aktin

kommt darüber hinaus auch verteilt im Zytoplasma, um den Zellkern herum und im Bereich von Unebenheiten der Zellmembran vor (Lazarides, 1975). Die Aufgaben der Aktinfilamente umfassen die Beteiligung bei Formveränderungen der Zellen als auch bei der Zellfortbewegung (Sheterline et al., 1992). In Zellen mit der Fähigkeit zur Migration stellt die Polymerisation bestimmter Aktinstrukturen, innerhalb von Zellausläufern, die treibende Kraft der Zellbewegung dar (Vicente-Manzanares et al., 2009). Des Weiteren bilden die Aktinfilamente das Grundgerüst für Mikrovilli und spielen eine wichtige Rolle bei der Kernteilung, sowie bei Endo- und Exozytosen (Liebich, 2010). In nicht-Muskelzellen wird das Aktin-Zytoskelett durch das Protein nicht-Muskel Myosin II reguliert (Vicente-Manzanares et al., 2009).

### 5.3.1 Nicht-Muskel Myosin

Anhand von Sequenz- und Strukturunterschieden der Kopf- und Enddomänen, können Myosine in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Berg et al., 2001). Der Klasse II werden die meisten Myosine zugeordnet. So gehört auch das Myosin der Muskelzellen dieser Klasse an. Nicht-Muskel Myosine der Klasse II finden sich darüber hinaus in allen eukaryotischen nicht-Muskelzellen (Vicente-Manzanares et al., 2009). Sie stellen Hauptproteine des Zytoskeletts dar, die mit Aktin interagieren (Ubukawa et al., 2012). So ist Nicht-Muskel Myosin II von Bedeutung für die Zelladhäsion, Zellbewegung und Zellteilung. Durch seine Bindung an Aktinfilamente und deren anschließende Fähigkeit zur Kontraktion kann Myosin das Aktin-Zytoskelett regulieren, wodurch zum Beispiel die Zelldifferenzierung, die Zellbewegung sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen kontrolliert werden (Vicente-Manzanares et al., 2009). Myosin konnte in den Leukozyten der Säuger (Tatsumi et al., 1973; Takeuchi et al., 1975; Crawford et al., 1980) und den humanen Erythrozyten nachgewiesen werden (Pasternack und Racusen, 1989; Colin und Schrier, 1991). Als Motorprotein der Mikrofilamente ist es auch in den Leukozyten, durch seine Vernetzung mit Aktin, für die Polarisierung und Bewegung der Zellen von Bedeutung. Ferner sind Myosine verschiedener Klassen an der Phagozytose der Leukozyten beteiligt (Vicente-Manzanares et al., 2009). In den Erythrozyten, die nur geringe Mengen an Myosin enthalten (Colin und Schrier, 1991), bilden die Myosinmoleküle bipolare Filamente, deren Kopf Aktin und vermutlich auch das Protein 4.1 binden

kann (Pasternack und Racusen, 1989; Colin und Schrier, 1991). So könnte Myosin auch in den Erythrozyten an Veränderungen der Zellform beteiligt sein (Pasternack und Racusen, 1989). In den Erythroblasten spielt es eine wichtige Rolle bei der Enukleation (Ubukawa et al., 2012).

#### **5.4 Intermediärfilamente**

In einer Zelle bilden die Intermediärfilamente ein feinfaseriges System (Lazarides, 1980), das sich über das gesamte Zytoplasma ausdehnt (Houseweart und Cleveland, 1998). Entweder in Form kleiner Bündel oder einzelner Fasern verlaufen die Intermediärfilamente im Zytoplasma, wobei sie sich oft an den Mikrotubuli orientieren (De Brabander, 1982). Sie setzen sich aus chemisch heterogenen Untereinheiten zusammen. Anhand der Struktur dieser Untereinheiten, können fünf Klassen von Intermediärfilamenten unterschieden werden: Vimentin kann in der Regel in Zellen mesenchymalen Ursprungs, gelegentlich aber auch in Zellen nicht-mesenchymalen Ursprungs nachgewiesen werden; Desmin kommt hauptsächlich in Muskelzellen vor; Keratin findet sich in Zellen epithelialen Ursprungs; Neurofilamente kommen in Nervenzellen und Gliafilamente in Gliazellen vor. Dabei können in einer Zelle zwei Klassen zusammen auftreten (Lazarides, 1980). Aufgrund der geringeren Löslichkeit von Intermediärfilamenten im Vergleich zu anderen Elementen des Zytoskeletts, nimmt man an, dass sie in der Zelle andere Aufgaben wahrnehmen, als die Mikrotubuli und Aktinfilamente (Steinert et al., 1984). Ihre Funktion ist dem jeweiligen Differenzierungsgrad einer Zelle angepasst (Lazarides, 1982). Intermediärfilamente interagieren sowohl mit den Aktinfilamenten als auch mit den Mikrotubuli (Chou et al., 1997). Durch reversibles Verbinden der Plasmamembran mit anderen Elementen des Zytoskeletts haben sie Einfluss auf die Zellform und schützen die Zelle vor mechanischem Stress. Ferner sollen sie während der Zellteilung an der strukturellen Reorganisation einer Zelle beteiligt sein (Houseweart und Cleveland, 1998). Die Intermediärfilamente sind außerdem von Bedeutung bei Verbindungen von Zellen zur extrazellulären Matrix sowie dem Kontakt von Zellen miteinander (Liebich, 2010).

## III. Material und Methoden

### 1 Untersuchungsmaterial

Zur Durchführung der Untersuchungen wurde Blut von insgesamt 34 Puten der Rasse B.U.T. 6, darunter 25 weiblichen und neun männlichen Tieren, im Alter von 18 bis 24 Wochen, verwendet. Gewonnen wurde es bei der Schlachtung der Tiere auf dem Hof der Familie Schuster in Biburg, Landkreis Fürstentfeldbruck (Bayern). Das Blut wurde jeweils in Lithium-Heparin-Röhrchen der Firma Synlab.vet Augsburg gesammelt. Nach der Probennahme wurden von jedem Tier ungefähr 60 Blutausrichthe auf SuperFrost® Objektträgern (ROTH, Karlsruhe) angefertigt. Ferner wurde von jeder Pute ein kleines Blutbild im Labor der Firma Synlab.vet Augsburg erstellt. Die Ausstriche wurden anschließend bei Raumtemperatur trocken gelagert.

In der folgenden Tabelle 2 sind die Tiere unter Berücksichtigung von Geschlecht und Alter sowie Angabe der durchgeführten Untersuchungen aufgeführt.

Tabelle 2: Übersicht über die, für die Untersuchungen verwendeten, Puten

Nummer der Pute	Geschlecht	Alter	LM	EM	GHC	IHC
1	weiblich	24 W				X
2	weiblich	24 W				X
3	weiblich	24 W				X
4	männlich	24 W				X
5	männlich	24 W				X
6	weiblich	20 W	X			X
7	weiblich	20 W	X			X
8	weiblich	20 W	X			X
9	weiblich	20 W	X			X
10	weiblich	20 W	X			X
11	weiblich	20 W	X			X

12	männlich	20 W	X			X
13	männlich	20 W	X			X
14	weiblich	20 W	X		X	X
15	weiblich	20 W	X			X
16	männlich	22 W	X		X	
17	weiblich	22 W	X		X	
18	weiblich	22 W	X		X	
19	männlich	22 W	X		X	
20	weiblich	22 W	X		X	
21	männlich	22 W	X		X	
22	weiblich	22 W	X		X	
23	männlich	22 W	X		X	
24	weiblich	22 W	X		X	
25	weiblich	22 W		X	X	
26	weiblich	22 W		X	X	
27	weiblich	22 W		X	X	
28	männlich	22 W		X	X	
29	weiblich	22 W		X	X	
30	weiblich	18 W			X	
31	weiblich	18 W			X	
32	weiblich	18 W			X	
33	weiblich	18 W			X	
34	weiblich	18 W			X	

EM=Elektronenmikroskopie;      GHC=Glykohistochemie;      IHC=Immunhistochemie;  
 LM=Lichtmikroskopie; W=Wochen

## 2 Lichtmikroskopie

Von zehn Tieren wurden Blutausrichre mit zehn verschiedenen lichtmikroskopischen Färbungen behandelt. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Protokolle nach Mulisch und Welsch (2010) modifiziert. Die anschließende Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop Leitz Aristoplan (LEITZ,

Wetzlar). Alle Fotoaufnahmen wurden mit der Kamera Lumenera USB Camera Release 3.8 (LUMENERA CORPORATION, Ottawa, Canada) gemacht.

## **2.1 Übersichtsfärbungen**

### **2.1.1 Hemacolor® Schnellfärbung**

Zur Durchführung dieser Schnellfärbe-Methode bietet die Firma Merck, Darmstadt, ein Set aus drei gebrauchsfertigen Reagenzien an. Dieses besteht aus einer Fixierlösung, einem „Farbreagenz rot“ sowie einem „Farbreagenz blau“. Das verwendete Protokoll wurde nach der Gebrauchsanweisung der Hemacolor® Schnellfärbung von Blutaussstrichen (MERCK, Darmstadt) modifiziert.

#### Vorgehensweise:

1. Die Objektträger in die Fixierlösung eintauchen
2. Objektträger kurz abtropfen lassen und anschließend für einige Sekunden in das Farbreagenz rot eintauchen
3. Nach kurzem Abtropfen die Blutaussstriche für einige Sekunden in das Farbreagenz blau eintauchen
4. Waschen der Objektträger in Aqua dest.
5. Lufttrocknen der Objektträger
6. Eindecken der Ausstriche mit Eukitt® (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) und Deckglas

#### Ergebnis:

Die Zellkerne färben sich rot bis violett an. Die Erythrozyten zeigen eine rötliche, die Thrombozyten eine violette Färbung. Das Zytoplasma der Lymphozyten stellt sich hellgrau dar, ihre Granula purpurrot. Monozyten zeigen ein überwiegend taubenblaues Zytoplasma. Die Granula der Neutrophilen stellen sich hellviolett dar, die der Eosinophilen ziegelrot bis rotbraun. Basophile Granulozyten enthalten dunkelviolett bis schwarze Granula (Angaben aus der Gebrauchsanweisung der Hemacolor® Schnellfärbung von Blutaussstrichen, MERCK, Darmstadt, 2008).

### 2.1.2 Hämalaun-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Diese einfach anzuwendende Färbung liefert gute Übersichtsbilder und kann auch für zytologische Präparate herangezogen werden. Sie dient der Differenzierung von Zytoplasma und Zellkern. Dabei stellt Hämalaun den Kernfarbstoff dar, wohingegen Eosin das Zytoplasma anfärbt (Mulisch und Welsch, 2010).

#### Vorgehensweise:

1. Fixieren der Ausstriche in Methanol  $\geq 99,9\%$  (ROTH, Karlsruhe) für zehn Minuten, anschließend lufttrocknen
2. Eintauchen der Ausstriche für 20 Minuten in saures Hämalaun nach Mayer
3. Ein- bis zweimal kurz in Aqua dest. eintauchen
4. Die Objektträger 20 Minuten in fließendem Leitungswasser spülen („Bläuen“)
5. Eintauchen der Ausstriche für zehn Minuten in die Eosin-Färbelösung
6. Spülen der Blutausstriche in Aqua dest.
7. Eindecken der Objektträger mit Eukitt® (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) und Deckglas

#### Ergebnis:

Die Zellkerne färben sich blau an, das Zytoplasma rot (Mulisch und Welsch, 2010).

### 2.1.3 Giemsa-Färbung

Die im Handel als fertiges Produkt erhältliche Giemsa-Lösung enthält neben Eosin noch Methylenblau, Azur A und Azur B. Diese basischen Farbstoffe bilden Salze mit dem Eosin. Auf die so entstehenden Azur-Eosinate begründet sich die rötlich-violette Anfärbung des Kernchromatins (Giemsa-Effekt), die für diese Färbung typisch ist (Mulisch und Welsch, 2010).

Vorgehensweise:

1. Blutausstriche in Methanol  $\geq 99,9\%$  (ROTH, Karlsruhe) für zehn Minuten fixieren und lufttrocknen
2. Aufgießen der verdünnten (1:20) Giemsa-Lösung
3. Färben der Ausstriche für 50 Minuten
4. Spülen der Objektträger mit Aqua dest.
5. Nach Lufttrocknen eindecken mit Eukitt® (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) und Deckglas

Ergebnis:

Die Zellkerne färben sich rötlich-violett an. Eosinophile Granula erscheinen rot bis rötlich-braun, basophile dunkelviolett und die Granula der Neutrophilen hellviolett. Das Zytoplasma der Lymphozyten färbt sich blau an, das der Monozyten graublau, eventuell mit feinen purpurroten Azurkörperchen. Die Erythrozyten zeigen sich rötlich, die Thrombozyten dagegen blau mit violetter Innenkörper (Mulisch und Welsch, 2010).

**2.1.4 Färbung nach May-Grünwald**

Die Färbelösung enthält Eosin und Methylenblau, die das Salz Methyleneosinat bilden. Da dieses, ebenso wie Methylenblau, schlecht in Wasser löslich ist, wird zur Herstellung der Färbelösung Methanol eingesetzt. Die im Handel erhältlichen Lösungen können allerdings unverdünnt verwendet werden (Mulisch und Welsch, 2010).

Vorgehensweise:

1. Fixieren der Blutausstriche in Methanol  $\geq 99,9\%$  (ROTH, Karlsruhe) für zehn Minuten und lufttrocknen
2. May-Grünwald-Färbelösung (MERCK, Darmstadt) auf die Ausstriche auftropfen
3. Färben der Blutausstriche für drei bis fünf Minuten

4. Die gleiche Menge Aqua dest. zur Färbelösung auf die Ausstriche aufbringen
5. Färben der Ausstriche für weitere zehn Minuten
6. Abtropfen und die Objektträger in Aqua dest. spülen
7. Lufttrocknen der Ausstriche und eindecken mit Eukitt® (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) und Deckglas

#### Ergebnis:

Das Zytoplasma der Erythrozyten stellt sich rötlich dar, das der Lymphozyten blau und das Zytoplasma der Monozyten taubenblau. Die Zellkerne erscheinen blau-violett (rötlich). Eosinophile Granula färben sich ziegelrot, basophile Granula kräftig blau-violett und neutrophile Granula färben sich hellviolett (rötlich) an. Thrombozyten zeigen eine violette Anfärbung (Mulisch und Welsch, 2010).

#### **2.1.5 Panoptische Färbung nach Pappenheim**

Diese Kombination aus May-Grünwald- und Giemsa-Färbung wird in der hämatologischen Morphologie standardmäßig bei allen Blutausstrichen angewendet (Mulisch und Welsch, 2010).

#### Vorgehensweise:

1. Fixieren der Blutausstriche in Methanol  $\geq 99,9\%$  (ROTH, Karlsruhe) für zehn Minuten und lufttrocknen
2. Pro Ausstrich 1 ml der May-Grünwald-Färbelösung (MERCK, Darmstadt) auftropfen und für fünf Minuten färben
3. 1 ml Aqua dest. pro Blutausstrich hinzufügen und eine Minute färben
4. Abgießen des Färbelösung-Aqua dest.-Gemisches
5. Die Ausstriche mit 1:20 verdünnter Giemsa-Lösung für 15 bis 20 Minuten beschichten
6. Abtropfen der Färbelösung und Abspülen der Objektträger in Aqua dest.

7. Nach Lufttrocknen Eindecken mit Eukitt® (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) und Deckglas

#### Ergebnis:

Die Zellkerne färben sich rötlich-violett (blau) an. Das Zytoplasma der Erythrozyten stellt sich rosa dar, das der Lymphozyten hellblau. Das Zytoplasma der Monozyten färbt sich graublau an. Eosinophile Granula erscheinen ziegelrot bis orange, basophile Granula dunkelviolet und neutrophile Granula hellviolett (Mulisch und Welsch, 2010).

#### **2.1.6 Sirius Red-Färbung**

Die Färbemethode dient der selektiven Darstellung der eosinophilen Granulozyten (Wehrend et al., 2004). Das angewandte Protokoll wurde nach Reibiger und Spänel-Borowski (2000) sowie nach Wehrend und Mitarbeitern (2004) modifiziert.

#### Vorgehensweise:

1. Fixieren der Blutausstriche in Methanol  $\geq 99,9\%$  (ROTH, Karlsruhe) für zehn Minuten und lufttrocknen
2. Eintauchen der Objektträger für zehn Minuten in saures Hämalaun nach Mayer
3. Die Ausstriche in fließendem Leitungswasser 15 Minuten lang spülen
4. Eintauchen in die Sirius Red-Färbelösung, wobei die Objektträger unterschiedlich lange gefärbt wurden:

Tabelle 3: Färbezeiten der Objektträger: Sirius Red

Tier	1 h	1 h 30 min	1 h 45 min	2 h
Pute 6	X			
Pute 7	X			
Pute 8	X			
Pute 9		X		
Pute 10		X		
Pute 11		X		X
Pute 12		X		
Pute 13			X	X
Pute 14			X	X
Pute 15			X	
Huhn		X		X
Strauß		X		X

h= Stunde; min= Minute

5. Spülen mit Aqua dest.

6. Lufttrocknen und eindecken mit Eukitt® (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) und Deckglas

### Ergebnis:

Die Granula der eosinophilen Granulozyten färben sich leuchtend rot an (Wehrend et al., 2004).

### **2.1.7 Toluidinblau-Färbung**

Diese Färbung wird zur Darstellung der basophilen Granulozyten angewendet. Das Toluidinblau reagiert mit sauren Mukopolysacchariden. So entsteht ein metachromatischer Komplex, der sich rot-violett darstellt (Raskin und Valenciano, 2000). Das Protokoll wurde modifiziert nach Stobbe (1970).

Vorgehensweise:

1. Nach Lufttrocknen die Blutausstriche fünf Minuten in PBS-Puffer (pH: 7,4 – 7,6) spülen
2. Die Ausstriche für 15 Minuten in die Toluidinblau-Lösung einstellen
3. Abspülen mit Aqua dest.
4. Lufttrocknen und eindecken mit Eukitt® (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) und Deckglas

Ergebnis:

Durch die Metachromasie zeigen die Granula der Basophilen eine leuchtend rotviolette Farbe. Die anderen Zellen färben sich graublau an (Stobbe, 1970).

## **2.2 Substrathistochemische Färbungen**

### **2.2.1 Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS)**

Die PAS-Reaktion dient dem allgemeinen Nachweis von Kohlenhydraten (Polysaccharide, Glykoproteine). So zeigen die Glykoproteine der Glykokalix typischerweise eine positive PAS-Reaktion. Das Prinzip stellt die Perjodsäurebedingte Oxidation unsubstituierter 1,2-Glykole zu Aldehyden dar, die anschließend mit dem Schiff'schen Reagenz (fuchsin-schwefelige Säure) reagieren, wodurch der Farbstoff Fuchsin frei wird. Dieser wiederum bedingt eine leuchtend rote bis magentafarbene Anfärbung (Mulisch und Welsch, 2010).

Vorgehensweise:

1. Die luftgetrockneten Blutausstriche fünf Minuten in Formoldampf (ROTH, Karlsruhe) fixieren
2. Spülen mit Leitungswasser
3. Einstellen in Perjodsäure-Lösung für fünf Minuten unter Lichtabschluss
4. Spülen mit Aqua dest.
5. Einstellen in Schiff's Reagenz (ROTH, Karlsruhe) für 15 Minuten unter

Lichtabschluss

6. Spülen in SO<sub>2</sub>-Wasser (zwei verschiedene Küvetten) zweimal für je zwei Minuten
7. Waschen in fließendem Leitungswasser für drei Minuten
8. Fünf Minuten färben mit saurem Hämalaun nach Mayer
9. Leitungswasser fließend für acht Minuten
10. Lufttrocknen und eindecken mit Eukitt® (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) und Deckglas

Ergebnis:

PAS-positive Substanzen (Glykogen, neutrale Muzine, Glykolipide, Basalmembran) färben sich leuchtend rot (magenta, pink, hellviolett) an. Die Zellkerne stellen sich blau dar (Mulisch und Welsch, 2010).

#### **2.2.1.1 PAS-Reaktion mit Amylase-Vorbehandlung**

Glykogen stellt eine PAS-positive Substanz dar (Mulisch und Welsch, 2010), die durch das Enzym  $\alpha$ -Amylase, welches der Kohlenhydratverdauung dient, gespalten wird (Horn, 2009). Durch Vorbehandlung mit dem Enzym kann herausgefunden werden, ob es sich bei den im Präparat angefärbten Substanzen um Glykogen handelt (Sinowatz und Hees, 2006).

Durchführung:

Die Objektträger werden in eine feuchte Kammer gelegt, mit je 100  $\mu$ l der Amylase-Lösung beschichtet und anschließend für zehn Minuten bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Danach werden sie kurz in Aqua dest. gespült und es wird mit Punkt 1. des PAS-Protokolls fortgefahren.

Ergebnis:

Durch die Vorverdauung mit dem Enzym  $\alpha$ -Amylase fällt die PAS-Reaktion für Glykogen negativ aus (Leblond et al., 1957; Gahrton, 1964).

### 2.2.2 Alcianblau-Färbung

Alcianblau 8GS ist ein wasserlöslicher Phthalocyaninfarbstoff zur selektiven Färbung von Muzinen. Bei einem pH-Wert von 2,5 werden saure Glykoproteine, zum Beispiel Muzine, angefärbt, wobei eine Unterscheidung von Sulfat- und Carboxylgruppen nicht möglich ist. Zur Differenzierung wird eine Alcianblau-Färbelösung mit einem pH-Wert von 1,0 herangezogen. Diese dient der Darstellung stark sulfatierter Muzine. Da Zellkerne von Alcianblau nicht angefärbt werden, ist eine Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat sinnvoll (Mulisch und Welsch, 2010).

#### Vorgehensweise:

1. Fixieren der Blutausrichthe für zehn Minuten in Methanol  $\geq 99,9\%$  (ROTH, Karlsruhe)
2. Objektträger für 15 Minuten in die Alcianblau-Lösung einstellen
3. Die Ausstriche drei Minuten lang mit fließendem Leitungswasser spülen
4. Kurzes Spülen mit Aqua dest.
5. Die Ausstriche in die Kernechtrot-Lösung einbringen und für zehn Minuten färben
6. Die Ausstriche drei Minuten lang mit fließendem Leitungswasser spülen
7. Kurzes Spülen mit Aqua dest.
8. Lufttrocknen und eindecken mit Eukitt® (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) und Deckglas

#### Ergebnis:

Bei einem pH-Wert von 2,5 färben sich saure Muzine und Glykosaminoglykane türkisblau an. Stark sulfatierte Muzine stellen sich bei der Alcianblau-Färbung mit pH 1,0 leuchtend blau dar. Die Zellkerne färben sich hellrot, der Hintergrund zartrosa an (Mulisch und Welsch, 2010).

### **3 Elektronenmikroskopie**

Zur Durchführung wurden Blutproben von fünf Puten, darunter vier weiblichen und einem männlichen Tier, in Zentrifugenröhren gewonnen. Anschließend wurden sie umgehend für 20 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Nach der Entfernung des überstehenden Plasmas wurde der Leukozytensaum in kleine Stücke zerteilt, die dann mit Karnovsky-Pufferlösung für eine Stunde bei 4°C fixiert wurden. Danach erfolgte ein Wechsel des Karnovsky-Puffers, in dem die Proben schließlich über Nacht ebenfalls bei 4°C verblieben. Anschließend wurden sie dreimal in 0,1M Natriumcacodylatlösung (ph: 7,2) gewaschen. Die folgende Vorkontrastierung für zwei Stunden bei 4°C erfolgte mit 1%-igem Osmiumtetroxid (POLYSCIENCES, Warrington, USA) und 1,5%-igem Kaliumferrocyanid (SIGMA-ALDRICH, Steinheim), die in einem Verhältnis von 3:2 gemischt wurden. Es schloss sich ein dreimaliges Waschen mit Natriumcacodylatpuffer an drei aufeinanderfolgenden Tagen an. Bis zur Kunststoffeinbettung erfolgten alle weiteren Schritte nun auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Zunächst wurden die Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe (in 30 % und 50 % je 20 Minuten, dann in 70 %, 90 % und dreimal absolutem Alkohol jeweils 30 Minuten) entwässert. Danach wurden sie zweimal für 15 Minuten in Propylenoxid (POLYSCIENCES, Warrington, USA), dann eine Stunde in ein Propylenoxid-Polyembed-Gemisch im Verhältnis von 2:1 gewechselt. Über Nacht erfolgte danach das Schütteln der Proben in einem Propylenoxid-Polyembed-Gemisch (1:1) und am darauffolgenden Tag schließlich die Inkubation in reinem Polyembed (POLYSCIENCES, Warrington, USA) für eine Stunde. Die Proben wurden anschließend in flache Silikon-Einbettförmchen (PLANO, Wetzlar) verbracht und für circa 48 Stunden bei 60°C polymerisiert. Die danach am Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) angefertigten Semidünnschnitte wurden nach Richardson gefärbt. Nach Auswahl einer repräsentativen Stelle erfolgte die Anfertigung von Ultradünnschnitten, die dann auf Kupfernetze (Grids) (POLYSCIENCES, Warrington, USA) aufgefangen wurden. Anschließend wurden sie 20 Minuten mit Uranylacetat (AGAR SCIENTIFIC, Essex, UK) und dann drei bis fünf Minuten mit Bleicitrat nach Reynolds nachkontrastiert. Die Auswertung erfolgte am Elektronenmikroskop Zeiss EM 902 (ZEISS, Oberkochen).

## 4 Glykohistochemie

Für die Untersuchungen wurden sowohl FITC-markierte als auch biotinylierte (an Biotin gekoppelte) Lektine herangezogen. Pro Lektin wurden die Ausstriche von zehn, bei PHA-E und PHA-L jeweils von 14 Tieren auf ihre Bindungseigenschaften untersucht. Als Vergleich dienten bei jedem Lektin ein Blutausstrich vom Huhn sowie meist auch ein Ausstrich vom Strauß. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe wurden alle Objektträger anschließend in abgedunkelten Boxen bei einer Temperatur von ungefähr 7°C im Kühlschrank aufbewahrt. Alle Vorgehensweisen stellen modifizierte Protokolle des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie der Ludwig-Maximilians-Universität München dar. Ausgewertet wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop Leitz Dialux 20 EB (LEITZ, Wetzlar). Die Fotoaufnahmen wurden mit der Kamera ProgRes®CF cool (JENOPTIK, Jena) angefertigt.

### 4.1 FITC-markierte Lektine

Blutausstriche von vier männlichen und sechs (ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, WGA, WGAs, GSL-I, DBA, SBA und UEA-I) bzw. zehn (PHA-E und PHA-L) weiblichen Tieren wurden auf das Binden von 13, an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelten, Pflanzenlektinen (VECTOR, Burlingame) untersucht. Ferner wurde bei jedem Lektin ein Blutausstrich nur mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) (VECTOR, Burlingame) behandelt, um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu beurteilen. Die folgende Tabelle 4 zeigt die verwendeten Lektine unter Angabe ihrer Zuckerspezifität und Herkunft.

Tabelle 4: Verwendete, an FITC gekoppelte Pflanzenlektine

Name	Abk.	Herkunft	Spezifität für Monosaccharide
Concanavalin Agglutinin	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i> (Schwertbohne)	Man/Glc
Lens culinaris Agglutinin	LCA	<i>Lens culinaris</i> (Linse)	Man/Glc

Pisum sativum Agglutinin	PSA	<i>Pisum sativum</i> (Gartenerbse)	Man/Glc
Peanut Agglutinin	PNA	<i>Arachis hypogaea</i> (Erdnuss)	Gal
Ricinus communis Agglutinin	RCA	<i>Ricinus communis</i> (Rizinusbohne)	Gal
Wheat germ Agglutinin	WGA	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	GlcNAc/Neu5Ac
Wheat germ Agglutinin, succinyliert	WGAs	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	GlcNAc a)
Griffonia simplicifolia Agglutinin-I	GSL-I	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrik. Schwarz- bohne)	GalNAc
Dolichos biflorus Agglutinin	DBA	<i>Dolichos biflorus</i> (Afrik. Pferde- bohne)	GalNAc
Soybean Agglutinin	SBA	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	GalNAc
Ulex europaeus Agglutinin-I	UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)	Fuc
Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin	PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	Kein Monosaccharid als Bindungspartner bekannt
Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin	PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	Kein Monosaccharid als Bindungspartner bekannt

Abk. =Abkürzung; Fuc = L-Fukose; Gal = Galaktose; GalNAc = N-Acetyl-Galaktosamin; Glc = Glukose; GlcNAc = N-Acetyl-Glukosamin; Man = Mannose; Neu5Ac = 5-N-Acetyl- $\alpha$ -Neuraminsäure. a) Succinyliertes WGA (WGAs) bindet nicht an N-Acetyl-Neuraminsäuren zelloberflächlicher Glykokonjugate (Monsigny et al., 1980).

Tabelle modifiziert nach Monsigny, Rüdiger, Gabius, Mulisch und Welsch sowie Habermann (Monsigny et al., 1980; Rüdiger, 1981; Rüdiger und Gabius, 2001; Rüdiger und Gabius, 2009a; Rüdiger und Gabius, 2009b; Mulisch und Welsch, 2010; Gabius et al., 2011; Habermann et al., 2011).

Vorgehensweise:

1. Fixieren der Blutausstriche in Methanol  $\geq 99,9\%$  (ROTH, Karlsruhe) für zehn Minuten, anschließend lufttrocknen lassen
2. Spülen jedes Objektträgers in PBS-Puffer (ph: 7,4) dreimal für je fünf Minuten
3. 100  $\mu$ l Lektin-PBS-Lösung (10 $\mu$ g/ml) auf jeden Ausstrich auftragen
4. 60-minütige Inkubation in einer Feuchtkammer unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur
5. Dreimaliges Spülen in PBS-Puffer (ph: 7,4) für je fünf Minuten
6. Kernfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) und fixieren des Deckglases mit klarem Nagellack

**4.1.1 Vorbehandlung mit Hemmzuckern**

Die Spezifität der deutlich positiv reagierenden Lektine ConA, LCA, PSA, WGA und WGAs wurde anhand der Hemmzucker-Vorbehandlung getestet. Die Lektine wurden deshalb mit einem jeweils für sie spezifischen Kohlenhydrat vorinkubiert, um herauszufinden, ob die Bindung an die Zuckerstrukturen der Zellen dadurch vermindert oder sogar gehemmt werden konnte. Die Hemmzucker wurden hierfür zunächst in der in Tabelle 5 beschriebenen Konzentration zu den in PBS-Puffer (ph: 7,4) gelösten Lektinen gegeben und je nach Lektin 30 Minuten (WGA und WGAs) bzw. eine Stunde (ConA, LCA und PSA) inkubiert. Das weitere Protokoll entspricht dem bereits unter Punkt 4.1 Beschriebenen. Anstatt des Lektin-PBS-Gemisches wurde jedoch die Hemmzucker-Lektin-Lösung auf die Blutausstriche aufgebracht. Zum Vergleich wurde jeweils ein Blutausstrich vom Huhn ebenfalls mit der Hemmzucker-Lektin-Lösung behandelt und als Kontrolle auf einen Ausstrich nur das Lektin aufgebracht. Tabelle 5 beschreibt verwendete Inhibitoren, deren Konzentrationen und die jeweilige Inkubationszeit.

Tabelle 5: Verwendete Hemmzucker

Lektin	Hemmstoff	Konzentration	Inkubationszeit
ConA	Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside (E.Y LABS, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	1 Stunde
LCA	Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside (E.Y LABS, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	1 Stunde
PSA	Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside (E.Y LABS, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	1 Stunde
WGA	Chitin-Hydrolysat (VECTOR, Burlingame, USA)	1:4	30 Minuten
WGAs	Chitin-Hydrolysat (VECTOR, Burlingame, USA)	1:4	30 Minuten

#### 4.2 Biotinylierte Lektine

Die Blutausrichthe von sechs weiblichen und vier männlichen Tieren wurden auf das Binden der biotinylierten Lektine SNA und MAA-I (BIOZOL, Eching) untersucht. Zur Überprüfung einer Reaktion der Blutzellen mit den biotinylierten Lektinen SJA (VECTOR, Burlingame) und VAA (Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München) dienten die Ausrichthe von sieben weiblichen und drei männlichen Tieren. Hierbei fand jeweils die Streptavidin-Biotin-Methode Anwendung. Die direkt an das B-Vitamin Biotin gekoppelten Lektine (Brooks et al., 1997) wurden zunächst auf die Blutausrichthe aufgebracht. In einem nächsten Schritt erfolgte dann das Auftragen von Streptavidin/FITC (DAKO, Hamburg). Das Binden von Streptavidin an Biotin wurde durch den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) sichtbar gemacht. Als Negativkontrollen dienten Ausrichthe, die nur mit Streptavidin/FITC und VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) behandelt wurden. In folgender Tabelle 6 sind die verwendeten biotinylierten Lektine aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete biotinylierte Lektine

Name	Abk.	Herkunft	Zuckerspezifität
Maackia amurensis Agglutinin-I	MAA-I	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)	Kein Monosaccharid als Bindungspartner bekannt
Saphora japonica Agglutinin	SJA	<i>Saphora japonica</i> (Chin. Schnurbaum)	GalNAc
Sambucus nigra Agglutinin	SNA	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)	Gal/GalNAc
Viscum album Agglutinin	VAA	<i>Viscum album</i> (Mistel)	Gal

Abk. =Abkürzung; Chin.= Chinesisch; Gal = Galaktose; GalNAc = N-Acetyl-Galaktosamin.

Tabelle modifiziert nach Rüdiger, Gabius, Mulisch und Welsch sowie Habermann (Rüdiger und Gabius, 2009a; Rüdiger und Gabius, 2009b; Mulisch und Welsch, 2010; Gabius et al., 2011; Habermann et al., 2011).

#### Vorgehensweise :

1. Die Blutausrüche in Methanol  $\geq 99,9\%$  (ROTH, Karlsruhe) zehn Minuten lang fixieren, anschließend lufttrocknen lassen
2. Spülen der Objektträger in PBS-Puffer (ph: 7,4) dreimal für je fünf Minuten
3. Pro Objektträger 100  $\mu$ l Lektin-PBS-Lösung (MAA-I, SJA und SNA: 10 $\mu$ g/ml; VAA: 2  $\mu$ g/ml) aufbringen
4. 60-minütige Inkubation in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur
5. Die Objektträger dreimal in PBS-Puffer (ph: 7,4) für je fünf Minuten spülen
6. 300  $\mu$ l Streptavidin/FITC-PBS-Lösung pro Objektträger auftragen
7. 30-minütige Inkubation in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss

8. Die Blutausstriche dreimal fünf Minuten spülen in PBS-Puffer (ph: 7,4)
9. Kernfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) und fixieren des Deckglases mit klarem Nagellack

### 4.3 Vorbehandlung mit Neuraminidase

Das Enzym Neuraminidase katalysiert die Abspaltung terminaler Sialinsäurereste von Glykoproteinen (Gabijs, 2009b; Ledeen und Wu, 2009). Anhand der Vorbehandlung der Ausstriche mit diesem Enzym sollte geprüft werden, ob die zuvor negativ reagierenden Lektine DBA, GSL-I, PNA, SBA und VAA anschließend in der Lage sind an die so frei werdenden Zuckerstrukturen der Zellen zu binden. In dieser Arbeit wurde die Neuraminidase von *Vibrio cholerae* (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) verwendet. Pro Lektin wurden drei Blutausstriche sowie zum Vergleich je ein Ausstrich vom Huhn mit Neuraminidase vorbehandelt. Ein Blutausstrich wurde ohne Vorbehandlung, nur mit dem jeweiligen Lektin, nach bereits beschriebenem Lektin-Protokoll (4.1 bzw. 4.2) bedeckt.

#### Vorgehensweise für die Lektine DBA, GSL-I, PNA, SBA:

1. Fixieren der Ausstriche in Methanol  $\geq 99,9\%$  (ROTH, Karlsruhe) für zehn Minuten, anschließend lufttrocknen lassen
2. Waschen der Blutausstriche in Natrium-Acetat-Puffer (ph: 5,5) dreimal für je fünf Minuten
3. Pro Objektträger je 200  $\mu\text{l}$  verdünnte Neuraminidase aufpipettieren
4. 60-minütige Inkubation in einer Feuchtkammer bei 37°C unter Lichtabschluss
5. Spülen der Objektträger in PBS-Puffer (ph: 7,4) dreimal für je fünf Minuten
6. 100  $\mu\text{l}$  Lektin-PBS-Lösung (Konzentration: 10  $\mu\text{g/ml}$ ) pro Ausstrich aufbringen

7. 60-minütige Inkubation in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss
8. Spülen der Objektträger in PBS-Puffer (ph: 7,4) dreimal für je fünf Minuten
9. Kernfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) und fixieren des Deckglases mit klarem Nagellack

Vorgehensweise für das Lektin VAA:

1. Fixieren der Ausstriche in Methanol  $\geq 99,9\%$  (ROTH, Karlsruhe) für zehn Minuten, anschließend lufttrocknen lassen
2. Waschen der Blutausstriche in Natrium-Acetat-Puffer (ph: 5,5) dreimal für je fünf Minuten
3. Pro Objektträger je 200  $\mu$ l verdünnte Neuraminidase aufpipettieren
4. 60-minütige Inkubation in einer Feuchtkammer bei 37°C unter Lichtabschluss
5. Spülen der Objektträger in PBS-Puffer (ph: 7,4) dreimal für je fünf Minuten
6. 100  $\mu$ l Lektin-PBS-Lösung (Konzentration: 2  $\mu$ g/ml) pro Ausstrich aufbringen
7. 60-minütige Inkubation in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss
8. Spülen der Objektträger in PBS-Puffer (ph: 7,4) dreimal für je fünf Minuten
9. 300  $\mu$ l Streptavidin/FITC-PBS-Lösung pro Objektträger auftragen
10. 30-minütige Inkubation in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss
11. Die Blutausstriche dreimal je fünf Minuten spülen in PBS-Puffer (ph: 7,4)

12. Kernfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) und fixieren des Deckglases mit klarem Nagellack

## 5 Immunzytochemie

Alle verwendeten Protokolle wurden nach den Färbeprotokollen des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie der Ludwig-Maximilians-Universität München modifiziert. Die Auswertung wurde am Fluoreszenzmikroskop Leitz Dialux 20 EB (LEITZ, Wetzlar) durchgeführt. Alle Fotoaufnahmen wurden mit der Kamera ProgRes®CF cool (JENOPTIK, Jena) angefertigt.

### 5.1 Immunzytochemischer Nachweis der Lymphozyten-Antigene

Die Blutausstriche von zehn Tieren, darunter acht weiblichen und zwei männlichen, wurden auf das Binden von direkt an FITC gekoppelten Antikörpern an CD4- und CD8-Antigene der Lymphozyten untersucht. Die jeweilige Antikörper-Konzentration wurde anhand von Verdünnungsreihen an den Ausstrichen von je vier Tieren ermittelt. Pro Antikörper wurden als Positivkontrollen je zwei Ausstriche vom Huhn verwendet. Je ein Ausstrich der Pute wurde nur der Kernfärbung unterzogen, um die Eigenfluoreszenz der Zellen beurteilen zu können. Bis zur Auswertung wurden die Blutausstriche bei einer Temperatur von 7°C im Kühlschrank im Dunkeln aufbewahrt. Folgende Tabelle 7 zeigt die verwendeten Antikörper mit dazugehöriger Zielzelle und der jeweiligen Konzentration.

Tabelle 7: In der Arbeit verwendete Antikörper

Zielzelle	Antikörper	Konzentration
CD8 <sup>+</sup> - Lymphozyten	Mouse monoclonal Antibody to CD8 alpha (FITC) (ABCAM, Cambridge)	1:200
CD4 <sup>+</sup> - Lymphozyten	Mouse monoclonal Antibody to CD4 (FITC) (ABCAM, Cambridge)	1:50

Vorgehensweise:

1. Nach Lufttrocknen der Blutausstriche werden sie dreimal für je fünf Minuten in PBS-Puffer (ph: 7,4) gewaschen
2. Pro Objektträger einen Tropfen Dako Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg) aufbringen
3. Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur, danach den Tropfen abgießen
4. Auf jeden Ausstrich 200 µl der verdünnten Antikörper-Lösung (Konzentration siehe Tabelle 7) aufpipettieren
5. 60-minütige Inkubation in abgedunkelter Feuchtkammer bei Raumtemperatur
6. Dreimaliges Waschen in PBS-Puffer (ph: 7,4) für jeweils fünf Minuten
7. Kernfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) und fixieren des Deckglases mit klarem Nagellack

**5.2 Immunzytochemischer Nachweis von Eosinophil major basic protein**

Zum Nachweis von Embp (Eosinophil major basic protein) wurde eine indirekte immunhistochemische Methode mit an FITC gekoppelten Sekundär-Antikörpern angewendet. Es wurden zwei Blutausstriche von je fünf Tieren, darunter drei weiblichen und zwei männlichen, herangezogen. Ein Ausstrich jedes Tieres wurde vor Punkt 1. des angewendeten Protokolls in Methanol  $\geq 99,9\%$  (ROTH, Karlsruhe) fixiert, der andere wurde unfixiert dem Protokoll unterzogen. Als Negativkontrolle diente ein unfixierter Ausstrich, bei dem nur die Kernfärbung durchgeführt wurde, um die Eigenfluoreszenz der Zellen beurteilen zu können. Zum Vergleich wurde ein fixierter Blutausstrich vom Strauß ebenfalls nach dem Protokoll behandelt.

Vorgehensweise:

1. Waschen der Ausstriche dreimal in PBS-Puffer (ph: 7,4) für jeweils fünf Minuten
2. Pro Ausstrich einen Tropfen Dako Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg) aufbringen
3. Inkubation bei Raumtemperatur für zehn Minuten
4. Abgießen des Tropfens
5. 100 µl Primär-Antikörper-Lösung (Konzentration 1:100) auf jeden Ausstrich aufpipettieren
6. Inkubation in einer Feuchtkammer über Nacht im Kühlschrank
7. Am darauffolgenden Tag dreimaliges Waschen der Objektträger in PBS-Puffer (ph: 7,4) für je fünf Minuten
8. 100 µl Sekundär-Antikörper-Lösung (Konzentration 1:20) pro Ausstrich aufpipettieren
9. 30-minütige Inkubation in einer lichtundurchlässigen Feuchtkammer bei Raumtemperatur
10. Spülen der Ausstriche dreimal in PBS-Puffer (ph: 7,4) für jeweils fünf Minuten
11. Kernfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) und fixieren des Deckglases mit klarem Nagellack

## 6 Zytoskelett

Von fünf Tieren (drei weiblichen und zwei männlichen) wurden je ein vor Beginn des Protokolls in Methanol  $\geq 99,9\%$  (ROTH, Karlsruhe) fixierter und ein unfixierter Ausstrich untersucht. Zum Nachweis von Vimentin, Tubulin, Nicht-Muskel Myosin und Panzytokeratin wurde die indirekte histochemische Methode, unter Verwendung von unmarkierten Primär- und FITC-markierten Sekundär-Antikörpern, angewendet. Aktin hingegen wurde mit dem an TRITC (Tetramethylrhodamineisothiocyanat) gekoppelten Giftes Phalloidin nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurde immer ein Ausstrich nur mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) angefärbt. Bis zur Auswertung wurden die Blutausstriche bei 7°C im Kühlschrank im Dunkeln aufbewahrt. Ausgewertet wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop Leitz Dialux 20 EB (LEITZ, Wetzlar). Alle Fotoaufnahmen wurden mit der Kamera ProgRes®CF cool (JENOPTIK, Jena) angefertigt. Die Protokolle wurden nach den Färbeprotokollen des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie der Ludwig-Maximilians-Universität München modifiziert. Die Tabelle 8 zeigt die Zytoskelett-Bestandteile, genutzte Reagenzien bzw. Antikörper und die jeweiligen Konzentrationen.

Tabelle 8: Untersuchung des Zytoskeletts

	<b>Reagenz</b>	<b>Konz.</b>		
<b>Aktin</b>	Phalloidin- TRITC-DMSO (SIGMA- ALDRICH Steinheim)	1:500		
	<b>Primär- AK</b>	<b>Konz.</b>	<b>Sekundär- AK</b>	<b>Konz.</b>
<b>Vimentin</b>	Monoclonal Mouse Anti- Vimentin Clone Vim 3B4 (DAKO, Hamburg)	1:500	Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins / FITC (DAKO, Hamburg)	1:20

<b>Tubulin</b>	Mouse monoclonal (DM1A + DM1B) to Tubulin (0,2 mg/ml) (ABCAM, Cambridge)	1-2µl/ml	Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins / FITC (DAKO, Hamburg)	1:20
<b>Myosin</b>	Rabbit polyclonal to non-muscle myosin IIA (ABCAM, Cambridge)	1:250	Fluorescein-Anti-Rabbit IgG (H+L) (E.Y LABS, San Mateo, USA)	1:300
<b>Panzyto-keratin</b>	Panzyto-keratin plus (BIOCARTA, Hamburg)	1:100	Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins / FITC (DAKO, Hamburg)	1:20

AK = Antikörper; DMSO = Dimethylsulfoxid; FITC = Fluoreszeinisothiocyanat; Konz. = Konzentration; TRITC = Tetramethylrhodamineisothiocyanat

### 6.1 Nachweis von Aktin

Phalloidin, das Gift aus dem Pilz *Amanita phalloides*, bindet an F-Aktin (Wehland et al., 1977) und kann so zu dessen Detektion herangezogen werden (Mulisch und Welsch, 2010). Als Positivkontrolle diente ein unfixierter Ausstrich vom Huhn.

#### Vorgehensweise:

1. Die Objektträger dreimal in PBS-Puffer (ph: 7,4) spülen für je fünf Minuten
2. Pro Ausstrich einen Tropfen Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg) aufbringen und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
3. 100 µl der verdünnten Phalloidin-Lösung (Konzentration siehe Tabelle 8) auf jeden Blutausrich aufpipettieren
4. 45-minütige Inkubation in einer lichtundurchlässigen Feuchtkammer bei

Raumtemperatur

5. Spülen der Objektträger in PBS-Puffer (ph: 7,4) dreimal für je fünf Minuten
6. Kernfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) und fixieren des Deckglases mit klarem Nagellack

## **6.2 Immunzytochemischer Nachweis von Vimentin, Tubulin, Nicht-Muskel Myosin und Panzytokeratin**

Als Positivkontrolle diente bei Vimentin ein fixierter Blutausstrich vom Huhn, bei Tubulin ein unfixierter Ausstrich vom Strauß und ein fixierter vom Huhn. Für Panzytokeratin wurden zum Vergleich ein fixierter Blutausstrich vom Huhn und einer vom Strauß auch nach dem Protokoll behandelt. Bei Nicht-Muskel Myosin bestanden die Vergleichsausstriche in einem fixierten Ausstrich vom Strauß und einem unfixierten vom Huhn.

### Vorgehensweise:

1. Spülen der Ausstriche dreimal in PBS-Puffer (ph: 7,4) für jeweils fünf Minuten
2. Pro Ausstrich einen Tropfen Dako Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg) aufbringen
3. Inkubation bei Raumtemperatur für zehn Minuten, danach Tropfen abgießen
4. 100 µl der jeweiligen Primär-Antikörper-Lösung (Konzentration siehe Tabelle 8) auf jeden Ausstrich aufpipettieren
5. Inkubation in einer Feuchtkammer über Nacht im Kühlschrank
6. Am darauffolgenden Tag dreimaliges Spülen der Objektträger in PBS-Puffer (ph: 7,4) für je fünf Minuten
7. 100 µl Sekundär-Antikörper-Lösung (Konzentration siehe Tabelle 8) pro

Ausstrich aufpipettieren

8. 30-minütige Inkubation in einer lichtundurchlässigen Feuchtkammer bei Raumtemperatur
9. Spülen der Ausstriche dreimal in PBS-Puffer (ph: 7,4) für jeweils fünf Minuten
10. Kernfärbung mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame) und fixieren des Deckglases mit klarem Nagellack

## IV. Ergebnisse

### 1 Blutbilder

Im Labor der Firma Synlab.vet Augsburg wurde anhand einer Blutprobe jedes Tieres je ein kleines Blutbild angefertigt. Dabei wurde die Anzahl der Erythrozyten und Leukozyten sowie der Hämatokrit gemessen. Die folgende Tabelle 9 zeigt die gemessenen Werte aller Puten.

Tabelle 9: Blutbilder der für diese Arbeit verwendeten Puten

Pute	ERY (T/L)	LEU (G/L)	Hkt (%)	Geschlecht	Alter
1	2,25	6,5	36,0	weiblich	24 Wochen
2	2,11	11,0	35,0	weiblich	24 Wochen
3	2,45	17,3	37,0	weiblich	24 Wochen
4	2,65	13,0	45,0	männlich	24 Wochen
5	3,21	4,3	45,0	männlich	24 Wochen
6	1,64	16,0	37,0	weiblich	20 Wochen
7	2,00	15,8	40,0	weiblich	20 Wochen
8	1,91	13,3	39,0	weiblich	20 Wochen
9	2,18	14,5	40,0	weiblich	20 Wochen
10	2,53	17,8	45,0	weiblich	20 Wochen
11	3,17	21,0	46,0	weiblich	20 Wochen
12	2,09	19,0	38,0	männlich	20 Wochen
13	1,96	9,3	39,0	männlich	20 Wochen
14	1,94	17,5	39,0	weiblich	20 Wochen
15	2,01	18,8	40,0	weiblich	20 Wochen
16	2,84	14,0	43,0	männlich	22 Wochen
17	2,31	30,0	41,0	weiblich	22 Wochen
18	2,62	27,0	40,0	weiblich	22 Wochen
19	2,25	29,0	43,0	männlich	22 Wochen
20	2,51	43,8	40,0	weiblich	22 Wochen
21	2,49	40,3	41,0	männlich	22 Wochen
22	2,41	41,0	42,0	weiblich	22 Wochen
23	1,92	21,0	43,0	männlich	22 Wochen

24	2,92	17,8	38,0	weiblich	22 Wochen
25	2,33	11,3	38,0	weiblich	22 Wochen
26	2,62	10,0	45,0	weiblich	22 Wochen
27	1,99	12,0	41,0	weiblich	22 Wochen
28	1,77	10,8	48,0	männlich	22 Wochen
29	2,28	12,8	46,0	weiblich	22 Wochen
30	1,93	9,8	40,0	weiblich	18 Wochen
31	1,61	12,5	37,0	weiblich	18 Wochen
32	1,59	6,0	43,0	weiblich	18 Wochen
33	1,26	5,5	36,0	weiblich	18 Wochen
34	1,38	9,0	40,0	weiblich	18 Wochen

ERY= Erythrozyten; Hkt= Hämatokrit; LEU= Leukozyten

Referenzbereiche (Quelle: Synlab.vet Augsburg):

Erythrozyten: 1,74 – 3,70 T/L

Leukozyten: 16,0 – 25,5 G/L

Hämatokrit: 30,4 – 45,6 %

Die Beurteilung der Blutbilder erfolgt unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht der Tiere. Die durchschnittliche Erythrozytenkonzentration der 18 Wochen alten Puten liegt bei 1,55 T/L, die der 20 Wochen alten Tiere bei 2,14 T/L. Für die 22 Wochen alten Puten ergibt sich ein Wert von 2,78 T/L. Die Tiere mit einem Alter von 24 Wochen haben eine durchschnittliche Erythrozytenkonzentration von 2,53 T/L. So nehmen die Erythrozytenzahlen mit dem Alter der Puten zu. Durchschnittliche Leukozytenzahlen liegen für die 18 Wochen alten Tieren bei einem Wert von 8,56 G/L und steigen auf 16,3 G/L (20 Wochen), bzw. weiter auf einen durchschnittlichen Wert von 22 G/L der 22 Wochen alten Puten an. Bei den 24 Wochen alten Tieren errechnet sich ein Durchschnittswert von nur noch 10,42 G/L. In Abhängigkeit vom Alter zeigt der Hämatokrit keine starken Schwankungen. Er ist bei den männlichen Tieren mit einem Mittelwert von 42,77 % jedoch geringgradig höher, als bei den weiblichen Puten, deren durchschnittlicher Hämatokrit bei 40,04 % liegt. Des Weiteren zeigen männliche Puten sowohl höhere Leukozyten- als auch Erythrozytenzahlen.

Im Schnitt liegt die Konzentration der Leukozyten untersuchter männlicher Tiere bei 17,85 G/L, die der Erythrozyten bei 2,35 T/L. Im Vergleich dazu haben weibliche Tiere mittlere Leukozytenwerte von 16,72 G/L. Die durchschnittliche Anzahl roter Blutkörperchen beträgt 2,16 T/L.

## **2 Lichtmikroskopische Untersuchungen**

### **2.1 Übersichtsfärbungen**

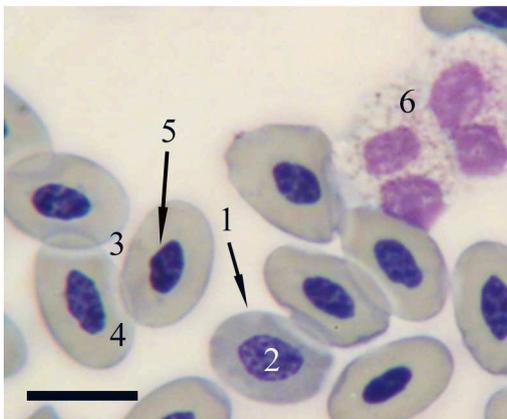
Zur Darstellung und Beurteilung der Morphologie sowie zur Unterscheidung der Blutzellen wurden an den Ausstrichen von zehn Tieren sieben verschiedene Übersichtsfärbungen durchgeführt.

#### **2.1.1 Erythrozyten**

Die Erythrozyten der Pute stellen sich als kernhaltige, ovale Zellen mit glatter Zelloberfläche und homogenem Zytoplasma dar. Der Kern weist eine runde bis ovale Form auf und liegt zentral in der Zelle. Er ist uneben begrenzt und enthält dichtes Chromatin. Unreife Erythrozyten stellen sich größer und runder dar als reife rote Blutzellen. Ferner weist ihr Zellkern eine rundlichere Form auf und zeigt lockereres Chromatin (vgl. Abb. 1, 2). Deshalb beobachtet man in vielen Ausstrichen eine Anisozytose. Auch eine Poikilozytose kann in wenigen Präparaten gesehen werden. In keinem der Ausstriche finden sich Erythrozyten ohne Zellkern oder solche mit zwei Zellkernen. Je nach angewandeter Färbemethode zeigen Erythrozyten eine unterschiedliche Anfärbung, die in Tabelle 10 beschrieben ist.

Tabelle 10: Darstellung der Erythrozyten

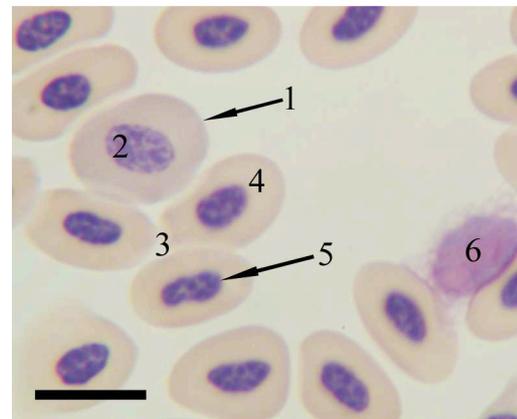
Übersichtsfärbung	Zytoplasma	Zellkern
Hemacolor®	rosa bis hellgrün	dunkellila bis blau
Hämalaun-Eosin	rosarot	blau-violett
Giemsa	rosa bis rosarot	violett
May-Grünwald	rosarot	blau-violett
Pappenheim	rosa	violett
Sirius Red	beige bis grau	dunkelblau
Toluidinblau	hellbeige bis blassrosa	blau



**Abbildung 1:** Erythrozyten, Hemacolor® Schnellfärbung.

Pute 8, weiblich, 20 Wochen.

Unreifer Erythrozyt (1) und reife Erythrozyten (3). Der Kern des unreifen Erythrozyten (2) enthält locker strukturiertes Chromatin. Im grünlichen Zytoplasma der reifen Erythrozyten (4) befindet sich ein stark kondensierter Zellkern (5). Heterophile Granulozyten (6).  
SB = 10 µm



**Abbildung 2:** Erythrozyten, Giemsa-Färbung.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

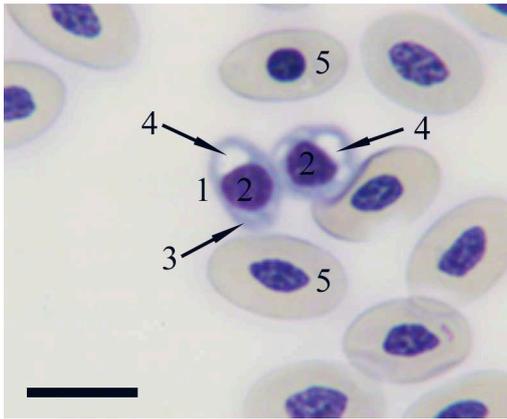
Der unreife Erythrozyt (1) enthält einen locker strukturierten Kern (2) und ist größer und runder als die ihn umgebenden reifen Erythrozyten (3). Das homogene Zytoplasma der reifen roten Blutkörperchen (4) weist zentral einen meist ovalen, uneben begrenzten Zellkern (5) auf. Basophiler Granulozyt (6). SB = 10 µm

### 2.1.2 Thrombozyten

Die kernhaltigen Thrombozyten der Pute liegen in den Blutaussstrichen vereinzelt, meist aber in Gruppen zusammengelagert vor. Ihre Form ist rund, oval oder auch unregelmäßig und nicht selten finden sich Pseudopodien (vgl. Abb. 5). Die Zellen weisen ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis auf. Der rundlich bis ovale Zellkern liegt zentral in der Zelle und enthält dichtes Chromatin (vgl. Abb. 4). Im Zytoplasma können häufig Vakuolen und Granula beobachtet werden (vgl. Abb. 5, 6, 7). Tabelle 11 zeigt die unterschiedliche Anfärbung der Thrombozyten unterteilt nach Färbemethode.

Tabelle 11: Darstellung der Thrombozyten

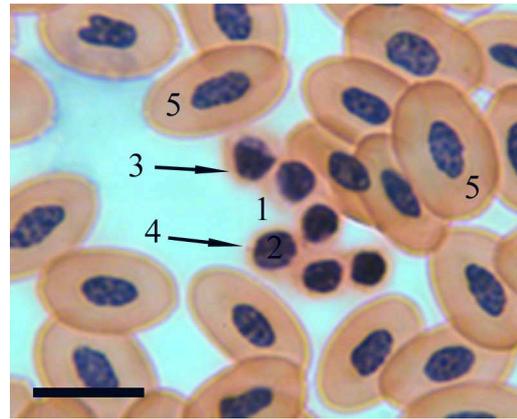
<b>Übersichtsfärbung</b>	<b>Zytoplasma</b>	<b>Zellkern</b>	<b>Granula</b>
Hemacolor®	hellblau bis mittelblau	dunkelviolet	pink
Hämalaun-Eosin	orange-rosa bis rosarot	dunkelviolet	pink
Giemsa	hellblau	violet	pink
May-Grünwald	graublau	violet	pink
Pappenheim	hellblau	dunkelviolet	pink
Sirius Red	blauschwarz	hellblau	-
Toluidinblau	hellgrau bis farblos	blau	-



**Abbildung 3:** Thrombozyten, Hemacolor® Schnellfärbung.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

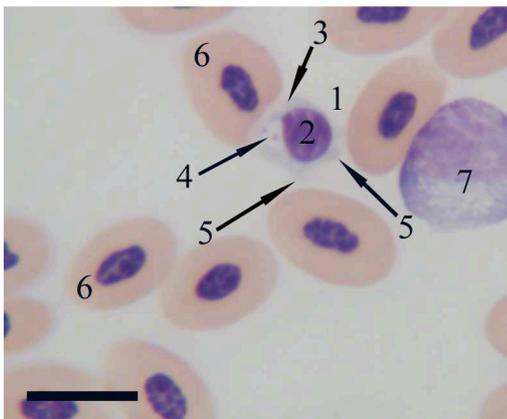
Thrombozyten (1) und Erythrozyten (5). Im Zytoplasma (3) der Thrombozyten befinden sich Vakuolen (4). Ihr zentral liegender Kern (2) enthält dichtes Chromatin. SB = 10 µm



**Abbildung 4:** Thrombozyten, H.-E.-Färbung.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

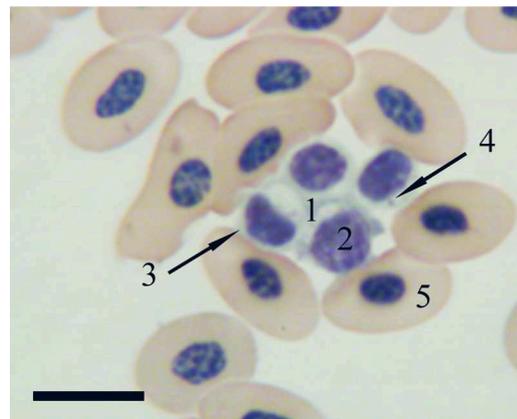
Thrombozytenaggregat (1). Im rosarot angefärbten Zytoplasma (3) können vereinzelt pinke Granula (4) beobachtet werden. Der Kern (2) liegt zentral in den Zellen. Erythrozyten (5). SB = 10 µm



**Abbildung 5:** Thrombozyt, Giemsa-Färbung.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

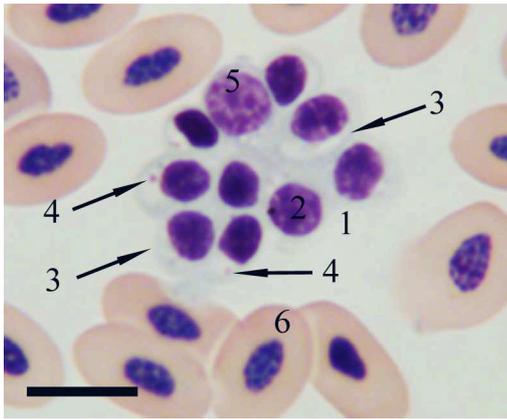
Im hellblau angefärbten, vakuolisierten Zytoplasma (3) des Thrombozyten (1) befinden sich Granula (4). Die Zelloberfläche weist zytoplasmatische Ausläufer auf (5). Zellkern (2). Erythrozyten (6) und Monozyt (7). SB = 10 µm



**Abbildung 6:** Thrombozyten, May-Grünwald-Färbung.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

Thrombozytenaggregat (1) umgeben von Erythrozyten (5). Zentral befindlicher Kern (2). Im Zytoplasma (3) sind pink angefärbte Granula (4) zu sehen. SB = 10 µm



**Abbildung 7:** Thrombozyten, Pappenheim-Färbung.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

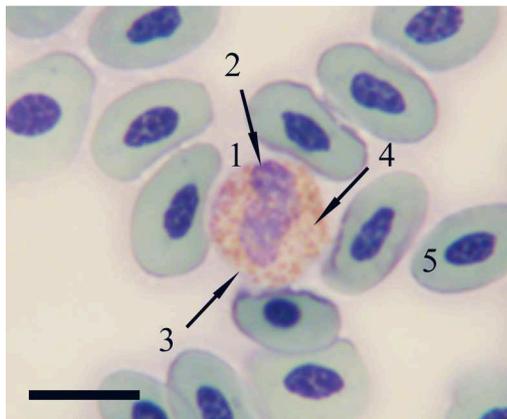
Zusammenlagerung von Thrombozyten (1) und einem Lymphozyten (5). Das zumeist vakuolisierte Zytoplasma (3) der Thrombozyten enthält pinke Granula (4). Zellkern (2). Erythrozyten (6). SB = 10  $\mu\text{m}$

### 2.1.3 Heterophile Granulozyten

Die runden bis unregelmäßig geformten heterophilen Granulozyten der Pute können in den Blutaussstrichen häufig gesehen werden. Ihr Zytoplasma wird meist fast ausschließlich von den länglichen Granula ausgefüllt. In der Hemacolor®- und Giemsa-Färbung erscheinen die Granula meist nur schwach angefärbt bis farblos und enthalten einen runden, stärker angefärbten Bereich (vgl. Abb. 8,10). Die Granula bedecken außerdem nicht selten Teile des Zellkerns. Dieser zeigt sich meist zweifach, manchmal auch dreifach gelappt, wobei die Kernsegmente eine sowohl unterschiedliche Form als auch Größe aufweisen können. Aufgrund des mäßig dichten Chromatins färbt er sich meist eher hell an (vgl. Abb. 10, 11). Jedoch können auch Bereiche beobachtet werden in denen das Chromatin verdichtet erscheint. Folgende Tabelle 12 fasst die Anfärbbarkeit der heterophilen Granulozyten zusammen.

Tabelle 12: Darstellung der heterophilen Granulozyten

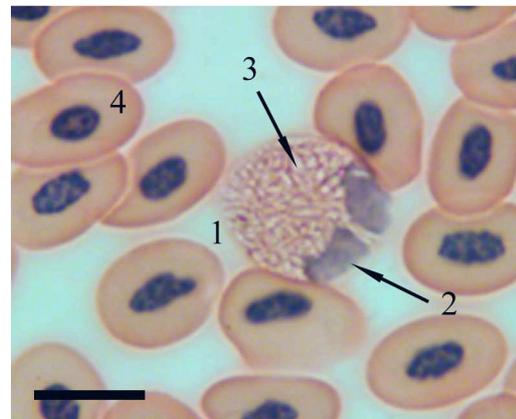
Übersichtsfärbung	Zytoplasma	Zellkern	Granula
Hemacolor®	farblos	lila bis hellblau	orange bis pink oder farblos
Hämalaun-Eosin	farblos bis blassrosa	dunkelviolet	orange bis violett oder farblos
Giemsa	grau bis hellrosa	hell- bis mittelblau	orange bis ziegelrot oder farblos
May-Grünwald	farblos	hellblau	orange bis pink
Pappenheim	farblos	hellviolett	orange bis ziegelrot
Sirius Red	farblos bis grau	hell- bis mittelblau	rosa bis pink
Toluidinblau	farblos bis blassrosa	blassblau	farblos



**Abbildung 8:** Heterophiler Granulozyt, Hemacolor® Schnellfärbung.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

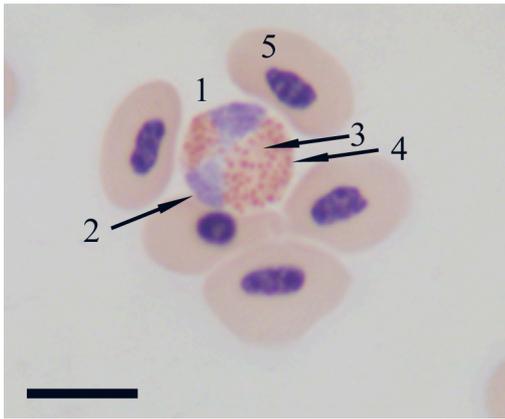
Das farblose Zytoplasma (3) des Heterophilen (1) enthält zahlreiche schwach angefarbte Granula, die einen pinkfarbigen, runden Bereich (4) aufweisen. Unsegmentierter Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10 µm



**Abbildung 9:** Heterophiler Granulozyt, H.-E.-Färbung.

Pute 9, weiblich, 20 Wochen.

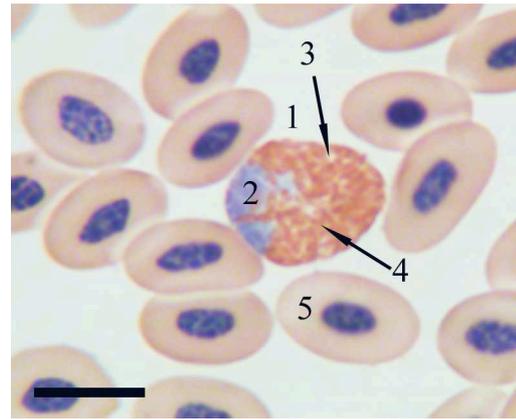
Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (4). Die Granula (3) des Heterophilen stellen sich zum großen Teil farblos dar. Der dunkelviolet angefarbte Zellkern ist zweifach gelappt (2). SB = 10 µm



**Abbildung 10:** Heterophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

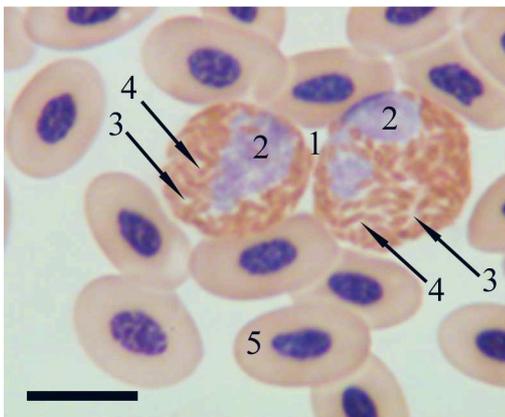
Heterophiler Granulozyt (1) umgeben von Erythrozyten (5). Das Zytoplasma (3) des Heterophilen ist hellrosa angefärbt. In den farblosen Granula können runde, pinke Strukturen (4) beobachtet werden. Der mäßig kondensierte Zellkern ist zweifach gelappt (2). SB = 10 µm



**Abbildung 11:** Heterophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

Im farblosen Zytoplasma (3) des Heterophilen (1) befinden sich zahlreiche, längliche Granula (4). Der mäßig dichte Zellkern ist zweifach gelappt (2). Erythrozyten (5). SB = 10 µm



**Abbildung 12:** Heterophile Granulozyten, Pappenheim-Färbung.

Pute 10, weiblich, 20 Wochen.

Heterophile Granulozyten (1) und Erythrozyten (5). Das Zytoplasma (3) der Heterophilen enthält viele, meist ziegelrot angefärbte, längliche Granula (4). Zellkerne (2). SB = 10 µm



**Abbildung 13:** Heterophiler Granulozyt, Sirius Red-Färbung.

Pute 15, weiblich, 20 Wochen.

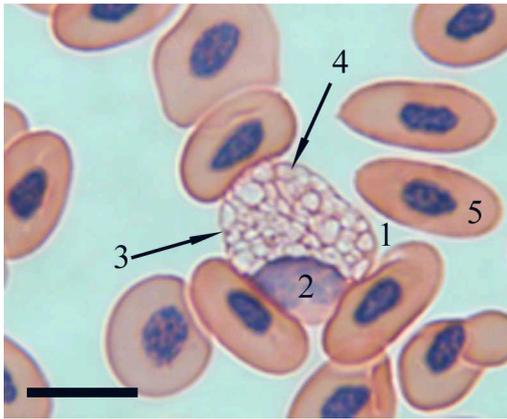
Die Granula (4) des heterophilen Granulozyten (1) stellen sich pink dar. Das Zytoplasma ist farblos (3). Zweifach gelappter Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10 µm

### 2.1.4 Eosinophile Granulozyten

Der eosinophile Granulozyt stellt den am seltensten beobachteten Granulozyten bei der Pute dar. Seine Form ist meist unregelmäßig, manchmal auch rund. Der exzentrisch in der Zelle liegende Kern beinhaltet mäßig dichtes bis dicht gepacktes Chromatin. Er ist in der Regel unsegmentiert und unregelmäßig geformt. Jedoch können auch zweifach gelappte Zellkerne beobachtet werden. Das Zytoplasma wird meist komplett von den unterschiedlich großen, runden Granula ausgefüllt, die häufig auch Teile des Zellkerns bedecken (vgl. Abb. 16). Besonders gut stellen sich die Granula mit der May-Grünwald-Färbung dar (vgl. Abb. 16, 17). Mit der Toluidinblau-Färbung können die Eosinophilen der Pute nicht identifiziert werden. Die Tabelle 13 zeigt die unterschiedliche Darstellung der eosinophilen Granulozyten.

Tabelle 13: Darstellung der eosinophilen Granulozyten

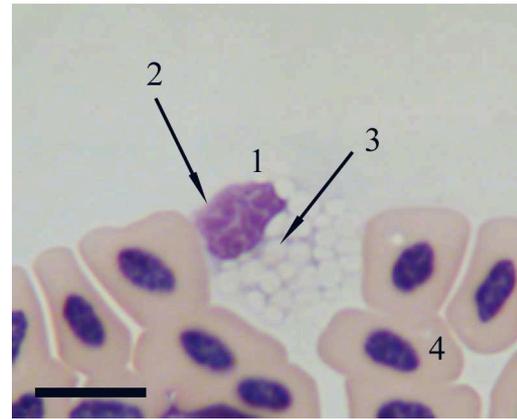
Übersichtsfärbung	Zytoplasma	Zellkern	Granula
Hemacolor®	hellviolett	dunkelviolett	blassrosa bis farblos
Hämalaun-Eosin	rosa bis violett	dunkelviolett	hellrosa bis farblos
Giemsa	hellviolett	violett	hellrosa bis farblos
May-Grünwald	grau	mittelblau bis lila	orange bis ziegelrot
Pappenheim	blass-basophil	violett	rosa
Sirius Red	farblos bis rosa	hellviolett bis blau	rosarot bis farblos
Toluidinblau	-	-	-



**Abbildung 14:** Eosinophiler Granulozyt, H.-E.-Färbung.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

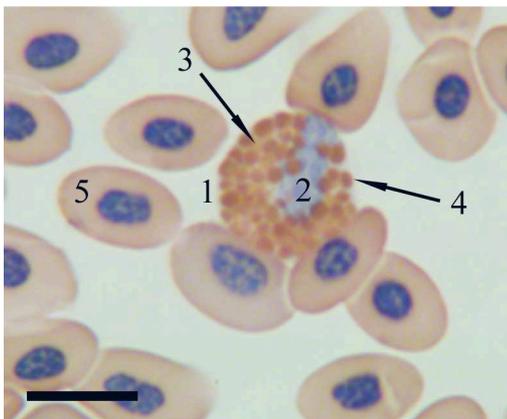
Eosinophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (5). Die Granula (4) des Eosinophilen färben sich hellrosa an. Das Zytoplasma stellt sich zum Teil violett dar (3). Unsegmentierter Zellkern (2). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 15:** Eosinophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung.

Pute 9, weiblich, 20 Wochen.

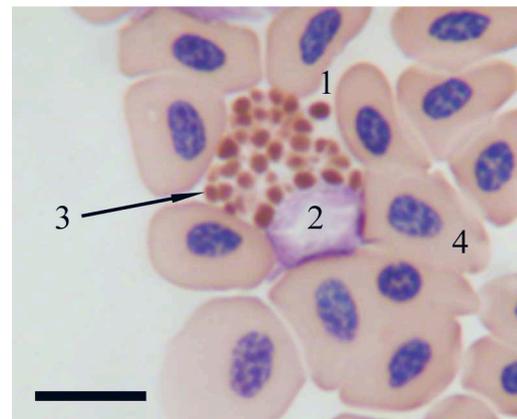
Einige zytoplasmatische Granula (3) des Eosinophilen (1) nehmen eine hellrosa Farbe an. Der unsegmentierte Zellkern enthält mäßig dichtes Chromatin (2). Erythrozyten (4). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 16:** Eosinophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

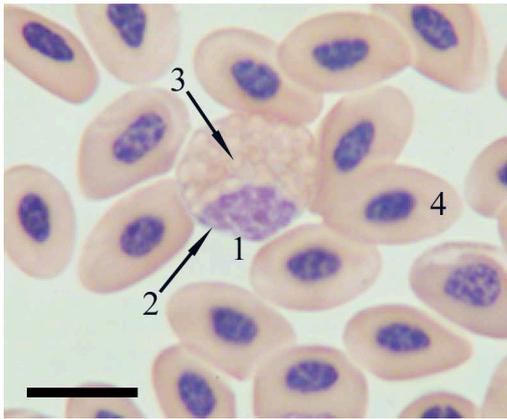
Die orange (3) oder rötlich angefärbten Granula (4) des eosinophilen Granulozyten (1) überdecken Teile des Zellkerns (2). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 17:** Eosinophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung.

Pute 10, weiblich, 20 Wochen.

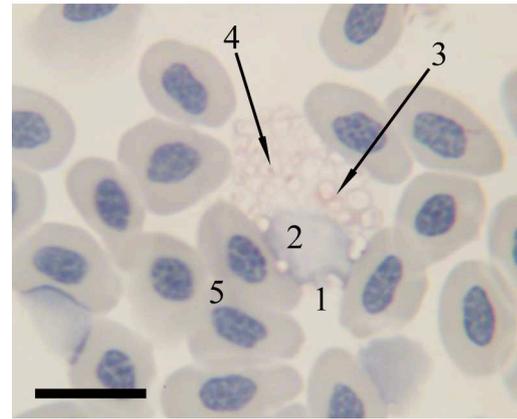
Eosinophiler Granulozyt (1) umgeben von Erythrozyten (4). Der exzentrisch liegende, unsegmentierte Zellkern des Eosinophilen färbt sich lila an (2). Die ziegelroten, rundlichen Granula sind von unterschiedlicher Größe (3). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 18:** Eosinophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

Der eosinophile Granulozyt (1) enthält rosa Granula (3) sowie einen unsegmentierten, mäßig kondensierten Zellkern (2). Erythrozyten (4).  
SB = 10 µm



**Abbildung 19:** Eosinophiler Granulozyt, Sirius Red-Färbung.

Pute 14, weiblich, 20 Wochen.

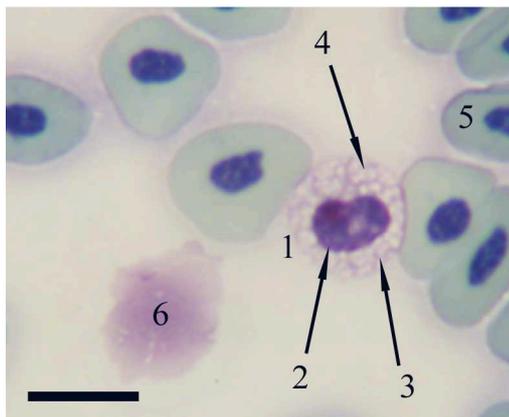
Der Eosinophile (1) zeigt eine rosa Anfärbung des Zytoplasmas (3). Auch Bereiche weniger Granula reagieren mit dem Farbstoff und stellen sich rosarot dar (4). Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10 µm

### 2.1.5 Basophile Granulozyten

Die runden bis unregelmäßig geformten basophilen Granulozyten der Pute weisen meist eine glatte Zelloberfläche auf. Der zentral oder exzentrisch in der Zelle liegende, unsegmentierte Kern ist ebenso rund bis unregelmäßig geformt und präsentiert sich manchmal bohnen- bis leicht herzförmig (vgl. Abb. 21). Er enthält mäßig dichtes Chromatin und wird sehr häufig zum Teil von den zytoplasmatischen Granula überdeckt (vgl. Abb. 23, 24). Diese sind über das gesamte Zytoplasma verteilt zu finden, stellen sich unterschiedlich groß dar und haben eine runde Form. Meist erscheinen sie farblos (vgl. Abb. 20, 21, 22, 25). Mit Hilfe der Toluidinblau-Färbung stellen sich die Granula der Basophilen jedoch besonders gut dar und färben sich in unterschiedlich starken Violetttönen an (vgl. Abb. 26, 27). In der folgenden Tabelle 14 ist die Anfärbbarkeit der basophilen Granulozyten zusammengefasst.

Tabelle 14: Darstellung der basophilen Granulozyten

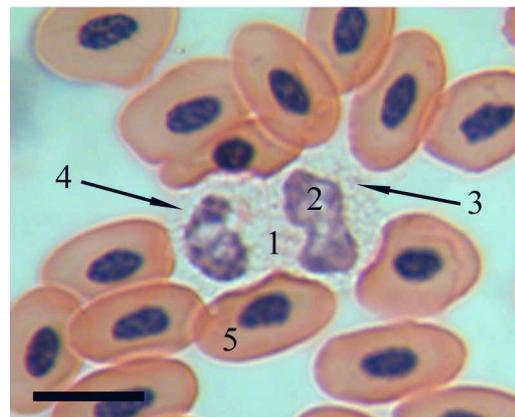
Übersichtsfärbung	Zytoplasma	Zellkern	Granula
Hemacolor®	hellviolett	hellviolett bis violett	farblos
Hämalaun-Eosin	rosa	dunkelviolett	farblos
Giensa	hellviolett	lila	purpurrot bis meist farblos
May-Grünwald	grau	lila	dunkelviolett bis farblos
Pappenheim	hellviolett	violett	rosa bis violett
Sirius Red	grau bis hellrosa	hellviolett	farblos
Toluidinblau	farblos	hellblau	violett bis dunkelviolett



**Abbildung 20:** Basophiler Granulozyt, Hemacolor® Schnellfärbung.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

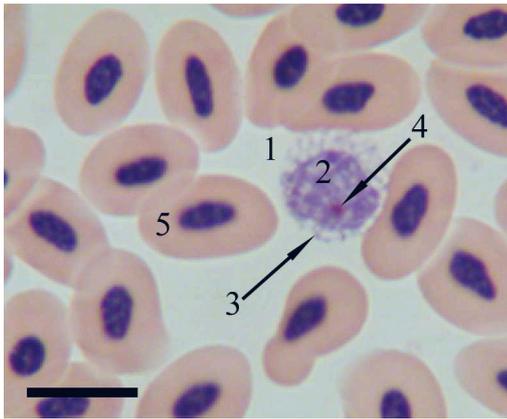
Der basophile Granulozyt (1) enthält einen zentral liegenden, leicht herzförmigen Zellkern (2). Im hellviolett angefärbten Zytoplasma (3) befinden sich zahlreiche farblose Granula (4). Erythrozyten (5). Artefakt (6). SB = 10 µm



**Abbildung 21:** Basophile Granulozyten, H.-E.-Färbung.

Pute 10, weiblich, 20 Wochen.

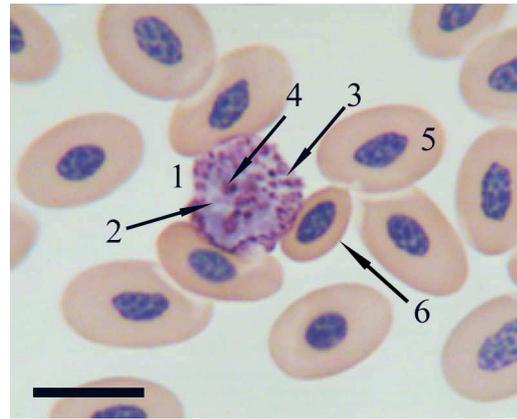
Basophile Granulozyten (1) und Erythrozyten (5). Auch in dieser Färbung stellen sich die Granula stets farblos dar (4). Das Zytoplasma nimmt eine rosa Farbe an (3). Bohnenförmiger, mäßig kondensierter Zellkern (2). SB = 10 µm



**Abbildung 22:** Basophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung.

Pute 13, männlich, 20 Wochen.

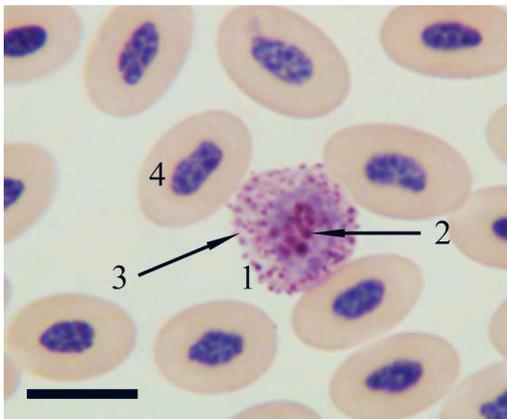
Die Granula dieses runden basophilen Granulozyten (1) erscheinen hauptsächlich farblos (3). Wenige, purpurrot angefärbte Granula (4) bedecken den Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10 µm



**Abbildung 23:** Basophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

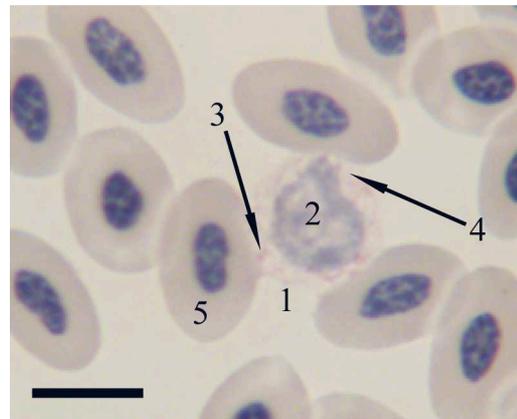
Der lila Zellkern (2) des Basophilen (1) wird von einigen dunkelvioletten Granula (4) bedeckt, die auch das Zytoplasma (3) zum großen Teil ausfüllen. Erythrozyten (5) und mikrozytärer Erythrozyt (6). SB = 10 µm



**Abbildung 24:** Basophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

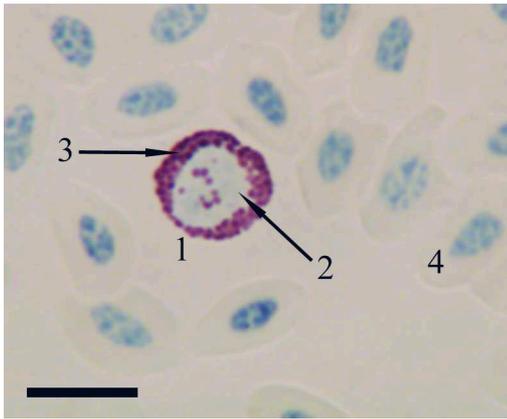
Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (4). Durch die nur teilweise, violette Anfärbung der Granula, die auch Bereiche des Zellkerns bedecken (2), wird das hellviolette Zytoplasma sichtbar (3). SB = 10 µm



**Abbildung 25:** Basophiler Granulozyt, Sirius Red-Färbung.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

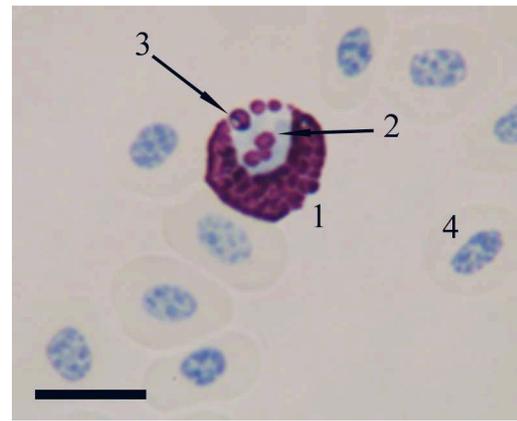
Der basophile Granulozyt (1) zeigt eine leichte, hellrosa Anfärbung des Zytoplasmas (3). Die Granula sind farblos (4). Unregelmäßig geformter Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10 µm



**Abbildung 26:** Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung.

Pute 8, weiblich, 20 Wochen.

Die zytoplasmatischen Granula des Basophilen (1) nehmen in dieser Färbung eine violette Farbe an (3). Der zentral liegende Kern stellt sich hellblau dar (2). Erythrozyten (4). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 27:** Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung.

Pute 9, weiblich, 20 Wochen.

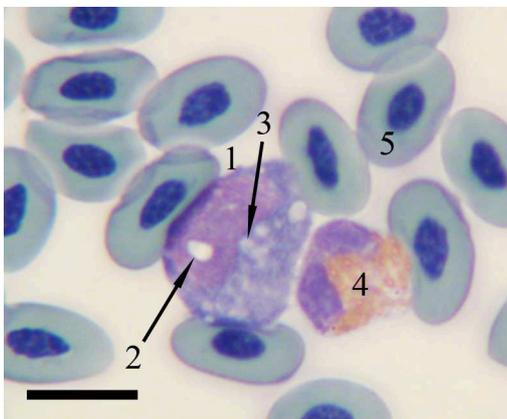
Die unterschiedlich großen, dunkelvioletten Granula (3) des basophilen Granulozyten (1) bedecken zum Teil den Zellkern (2). Erythrozyten (4). SB = 10  $\mu\text{m}$

### 2.1.6 Monozyten

Die Monozyten der Pute stellen unregelmäßig geformte Zellen dar. Sie weisen eine große Menge inhomogenes, wabenartig geformtes Zytoplasma auf, welches meist mehrere bis zahlreiche Vakuolen von unterschiedlicher Größe enthält. Diese sind im Zytoplasma unregelmäßig verteilt und kommen auch im Bereich der Kerninvagination vor (vgl. Abb. 28). Der ovale, nierenförmige oder unregelmäßig geformte Zellkern liegt exzentrisch in der Zelle. Durch sein locker strukturiertes Chromatin färbt er sich meist hell an. In keinem der Ausstriche konnten zytoplasmatische Granula beobachtet werden. Die folgende Tabelle 15 beschreibt die Anfärbarkeit der Monozyten.

Tabelle 15: Darstellung der Monozyten

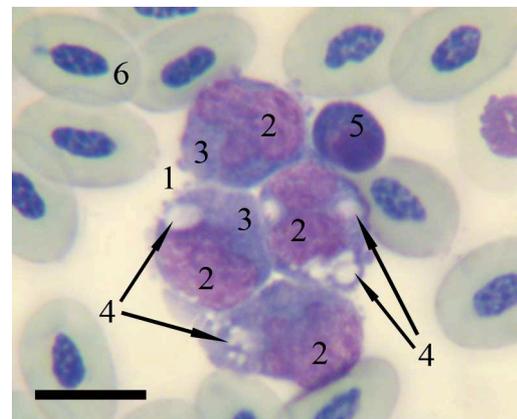
Übersichtsfärbung	Zytoplasma	Zellkern	Granula
Hemacolor®	dunkelviolet bis dunkelblau	lila	-
Hämalaun-Eosin	hellrosa bis rosa	hellviolett	-
Giemsa	hellblau bis blau	lila	-
May-Grünwald	hellblau bis blau	lila	-
Pappenheim	hellblau bis blau	lila	-
Sirius Red	blassblau	hellviolett	-
Toluidinblau	blassgrau	blassblau	-



**Abbildung 28:** Monozyt, Hemacolor® Schnellfärbung.

Pute 12, männlich, 20 Wochen.

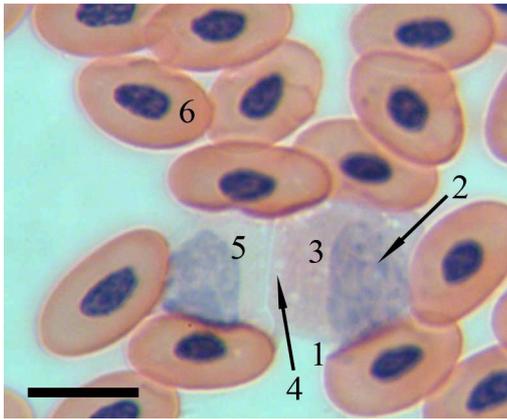
Monozyt (1), heterophiler Granulozyt (4) und Erythrozyten (5). Der Bereich der Kerninvagination des Monozyten erscheint vakuolisiert (3). Artefakt (2) sichtbar im nierenförmigen, mäßig kondensierten Zellkern. SB = 10 µm



**Abbildung 29:** Monozyten, Hemacolor® Schnellfärbung.

Pute 13, männlich, 20 Wochen.

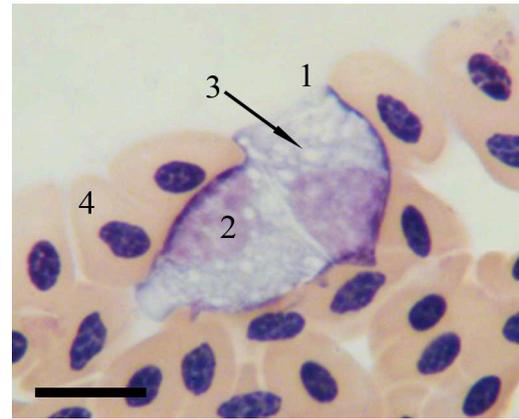
Das inhomogene Zytoplasma (3) der Monozyten (1) beinhaltet zahlreiche, unterschiedlich große Vakuolen (4). Die unregelmäßig geformten Zellkerne zeigen eine lila Anfärbung (2). Lymphozyt (5) und Erythrozyten (6). SB = 10 µm



**Abbildung 30:** Monozyt, H.-E.-Färbung.

Pute 10, weiblich, 20 Wochen.

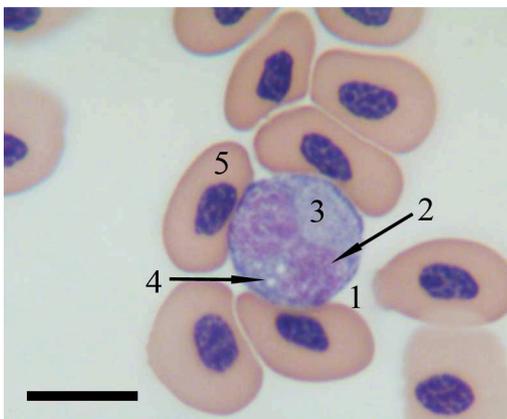
Monozyt (1), Lymphozyt (5) und Erythrozyten (6). Der exzentrisch liegende Zellkern (2) des Monozyten enthält locker strukturiertes Chromatin. Im Zytoplasma (3) können einige Vakuolen (4) beobachtet werden. SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 31:** Monozyten, Giemsa-Färbung.

Pute 10, weiblich, 20 Wochen.

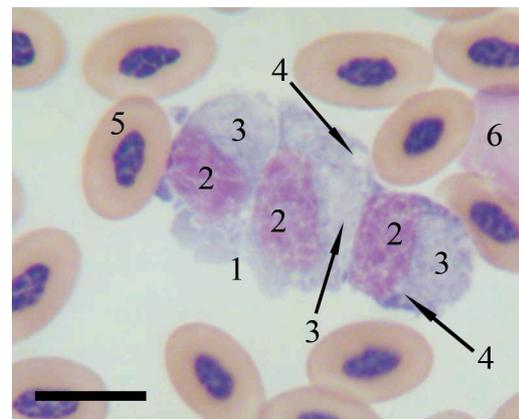
Das Zytoplasma (3) dieser Monozyten (1) erscheint deutlich wabenartig. Der Zellkern färbt sich lila an (2). Erythrozyten (4). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 32:** Monozyt, May-Grünwald-Färbung.

Pute 14, weiblich, 20 Wochen.

Der runde Monozyt (1) enthält einen hantelförmigen Zellkern (2) sowie einige Vakuolen (4). Inhomogenes Zytoplasma (3). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 33:** Monozyten, Pappenheim-Färbung.

Pute 9, weiblich, 20 Wochen.

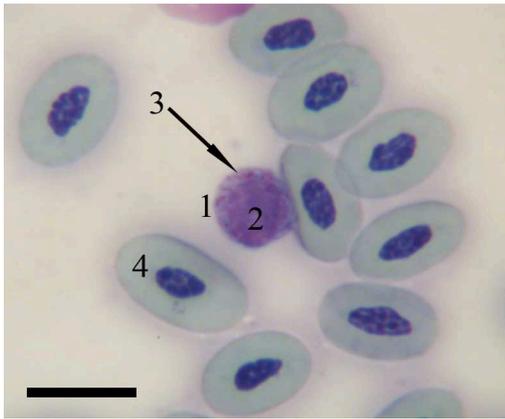
Monozyten (1) und Erythrozyten (5). Im wabenartigen, hellblau angefärbten Zytoplasma (3) befinden sich Vakuolen (4). Die Kerne liegen exzentrisch in den Zellen (2). Artefakt (6). SB = 10  $\mu$ m

### 2.1.7 Lymphozyten

Die Präparate weisen vor allem kleine, aber auch mittlere Lymphozyten auf. Große Lymphozyten können nur selten beobachtet werden. Während sich die kleinen Vertreter meist rund präsentieren, zeigen die mittleren Lymphozyten eine runde bis ovale, die großen eine runde bis unregelmäßige Form. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis der kleinen Lymphozyten ist hoch, sie weisen einen nur schmalen Saum inhomogenes Zytoplasma auf. Bei den mittleren und großen Lymphozyten nimmt die Menge an Zytoplasma dagegen zu (vgl. Abb. 35, 36). Der Zellkern liegt in den kleinen Lymphozyten zentral, in den mittleren auch exzentrisch in der Zelle. Er ist rund bis leicht oval und beinhaltet dichtes Chromatin. Die großen Vertreter enthalten einen runden bis unregelmäßig geformten Zellkern, der meist exzentrisch in der Zelle zu finden ist und etwas lockerer strukturiertes Chromatin aufweist. Die Lymphozyten weisen manchmal Pseudopodien auf (vgl. Abb. 35, 36, 37). Lediglich in der Hemacolor® Schnellfärbung können zytoplasmatische Granula beobachtet werden (vgl. Abb. 34). Tabelle 16 zeigt die Anfärbbarkeit der Lymphozyten in Abhängigkeit von der jeweils verwendeten Färbemethode.

Tabelle 16: Darstellung der Lymphozyten

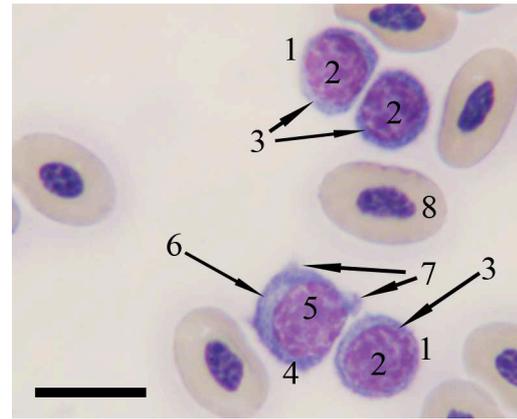
Übersichtsfärbung	Zytoplasma	Zellkern	Granula
Hemacolor®	blau bis dunkelblau	violett	lila
Hämalaun-Eosin	rosa-grau bis dunkelrosa	violett	-
Giemsa	blau	lila	-
May-Grünwald	blau	violett	-
Pappenheim	blau	violett	-
Sirius Red	blauschwarz	blau	-
Toluidinblau	blauschwarz bis blauschwarz	hellblau	-



**Abbildung 34:** Lymphozyt, Hemacolor® Schnellfärbung.

Pute 13, männlich, 20 Wochen.

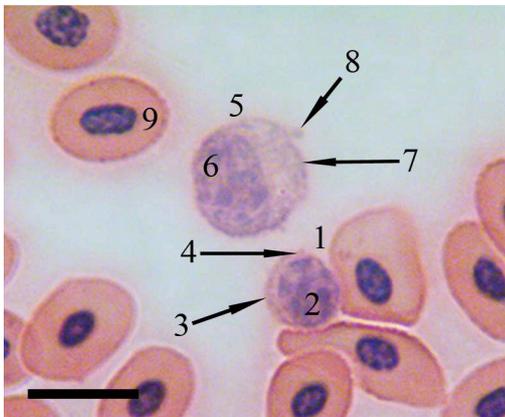
Der Lymphozyt (1) enthält einige lila angefärbte Granula (3). Der stark kondensierte Zellkern (2) liegt zentral in der Zelle. Erythrozyten (4).  
SB = 10 µm



**Abbildung 35:** Lymphozyten, Hemacolor® Schnellfärbung.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

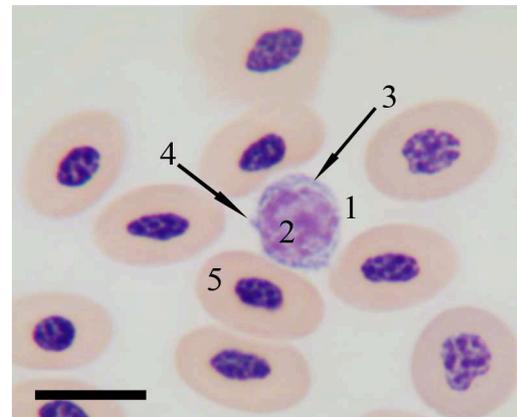
In den kleinen Lymphozyten (1) wird der Zellkern (2) von einem schmalen Zytoplasmasaum (3) umgeben. Der mittlere Lymphozyt (4) weist mehr Zytoplasma (6) und Pseudopodien (7) auf. Kern (5). Erythrozyten (8).  
SB = 10 µm



**Abbildung 36:** Lymphozyten, H.-E.-Färbung.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

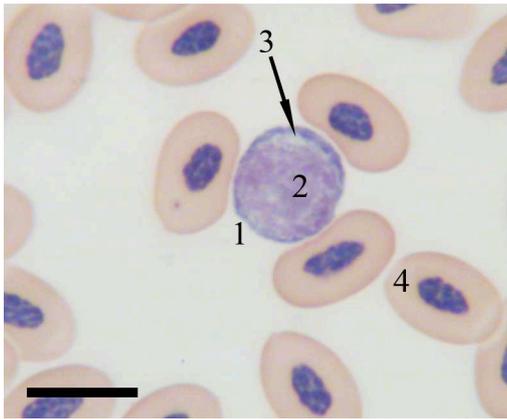
Nur wenig Zytoplasma (3) umgibt im kleinen Lymphozyten (1) den Kern (2). Zytoplasmatischer Ausläufer (4). Der große Lymphozyt (5) weist mehr Zytoplasma (7) auf. Zytoplasmatischer Ausläufer (8) und Zellkern (6). Erythrozyten (9). SB = 10 µm



**Abbildung 37:** Lymphozyt, Giemsa-Färbung.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

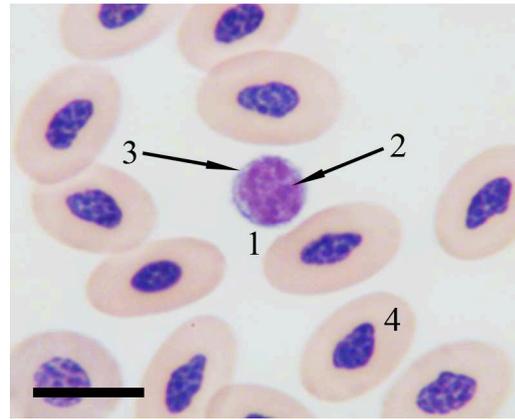
Mittelgroßer Lymphozyt (1) und Erythrozyten (5). Der Lymphozyt enthält inhomogenes Zytoplasma (3) und weist einen zytoplasmatischen Ausläufer auf (4). Lila angefärbter Zellkern (2). SB = 10 µm



**Abbildung 38:** Lymphozyt, May-Grünwald-Färbung.

Pute 9, weiblich, 20 Wochen.

Der große Lymphozyt (1) enthält etwas mehr Zytoplasma (3) als die kleinen und mittleren Vertreter und einen lockerer strukturierten Zellkern (2). Erythrozyten (4). SB = 10 µm



**Abbildung 39:** Lymphozyt, Pappenheim-Färbung.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

Der kleine runde Lymphozyt (1) weist ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis auf. Nur wenig Zytoplasma (3) umgibt den stark kondensierten Kern (2). Erythrozyten (4). SB = 10 µm

## 2.2 Substrathistochemische Färbungen

Sowohl die PAS- als auch die Alcianblau-Färbung wurden anhand der Ausstriche von je zehn Tieren durchgeführt. Je vier weitere Blutausstriche wurden der Amylase-Vorbehandlung zur PAS-Reaktion unterzogen. Dabei ist die jeweilige Stärke der Reaktion unterteilt in (-) negativ, (+) schwach positiv, (++) deutlich positiv und (+++) stark positiv.

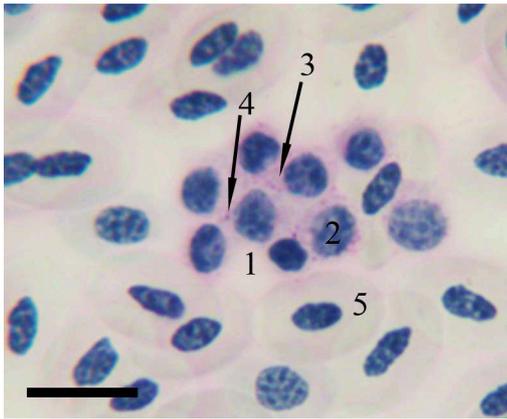
### 2.2.1 Periodic-Acid-Schiff-Reaktion (PAS)

Die Erythrozyten der Pute zeigen keine Reaktion. Stark positiv ist dagegen die Reaktion der Thrombozyten, deren Zytoplasma eine diffuse, rosarote Anfärbung aufweist. Zudem können unterschiedlich große, runde, pinke Strukturen vor allem im Bereich der Zellmembran, ungleichmäßig verteilt im Zytoplasma der Thrombozyten beobachtet werden (vgl. Abb. 40). Die heterophilen Granulozyten reagieren ebenso positiv und zeigen eine diffus intergranuläre, meist lila Anfärbung des Zytoplasmas. Auch die Zellmembran stellt sich häufig lila dar und weist manchmal runde, pinke Strukturen von ungleichmäßiger Verteilung auf. Die Granula zeigen keine Reaktion (vgl. Abb. 41). Eosinophile Granulozyten weisen

eine nur schwache Reaktion mit diffus intergranulärer, rosa Anfärbung des Zytoplasmas auf. Ihre Granula reagieren in keinem der Präparate und zeigen sich farblos (vgl. Abb. 42). Deutlich positiv bis stark positiv reagieren die basophilen Granulozyten, deren Zytoplasma kleine, rundliche, purpurrote Strukturen enthält. Die Granula erscheinen farblos (vgl. Abb. 43). Sowohl Monozyten als auch Lymphozyten reagieren deutlich positiv. Die Monozyten zeigen ein violette Zytoplasma, das ungleich große, pink angefärbte Bereiche beinhaltet, die unregelmäßig verteilt sind (vgl. Abb. 44). Die Lymphozyten weisen ein lila Zytoplasma auf, in dem sich manchmal purpurrote, rundliche Strukturen befinden (vgl. Abb. 45). Folgende Tabelle 17 beschreibt die Reaktionen der Blutzellen auf die PAS-Färbung.

Tabelle 17: Periodic-Acid-Schiff-Reaktion

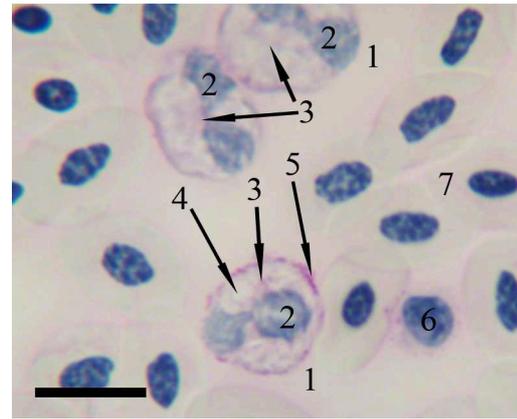
<b>Zellen</b>	<b>Stärke der Reaktion</b>	<b>Farbe der Reaktion</b>	<b>Lokalisation</b>
Erythrozyten	-	-	-
Thrombozyten	+++	rosarot bis pink-violett	Zytoplasma (diffus; granulär)
Heterophile Granulozyten	+ - +++	purpurrot bis lila	Zellmembran; Zytoplasma (diffus)
Eosinophile Granulozyten	+	rosa	Zytoplasma (diffus)
Basophile Granulozyten	++ - +++	purpurrot	Zytoplasma (granulär)
Monozyten	++	pink-violett	Zytoplasma (diffus)
Lymphozyten	++	purpurrot bis lila	Zytoplasma (diffus; granulär)



**Abbildung 40:** Thrombozyten, PAS-Reaktion.

Pute 16, männlich, 22 Wochen.

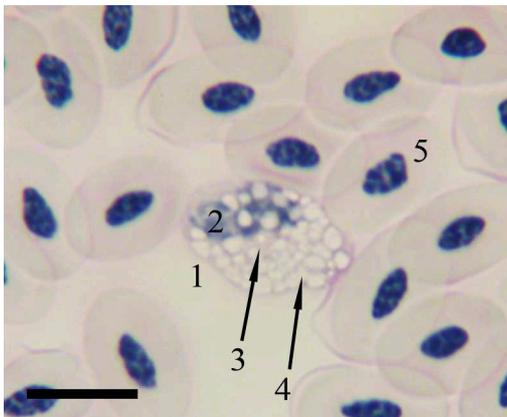
Die Thrombozyten (1) zeigen eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas (3) sowie über dieses verteilte, stärkere, granuläre Reaktionen (4). Zellkern (2). Die Erythrozyten (5) reagieren negativ. SB = 10 µm



**Abbildung 41:** Heterophile Granulozyten, PAS-Reaktion.

Pute 21, männlich, 22 Wochen.

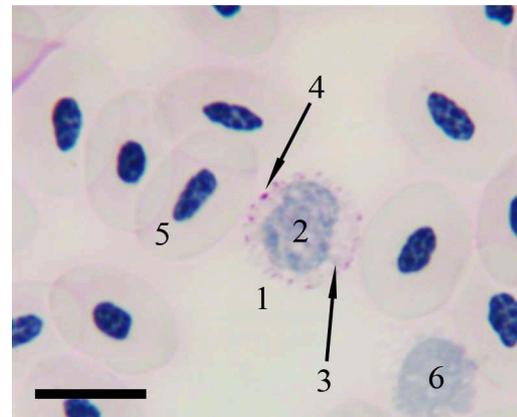
Das Zytoplasma (3) der Heterophilen (1) weist eine lila Anfärbung auf. Im Bereich der Zellmembran kann eine starke Reaktion beobachtet werden (5). Die Granula reagieren nicht (4). Zellkerne (2). Lymphozyt (6) und Erythrozyten (7). SB = 10 µm



**Abbildung 42:** Eosinophiler Granulozyt, PAS-Reaktion.

Pute 17, weiblich, 22 Wochen.

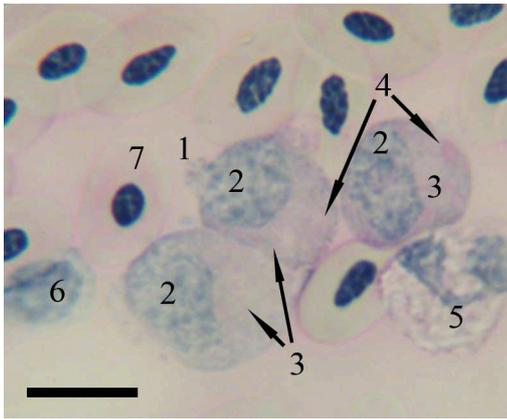
Das Zytoplasma (3) des eosinophilen Granulozyten (1) zeigt eine schwache Reaktion und färbt sich rosa an. Die Granula stellen sich stets farblos dar (4). Unsegmentierter Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10 µm



**Abbildung 43:** Basophiler Granulozyt, PAS-Reaktion.

Pute 17, weiblich, 22 Wochen.

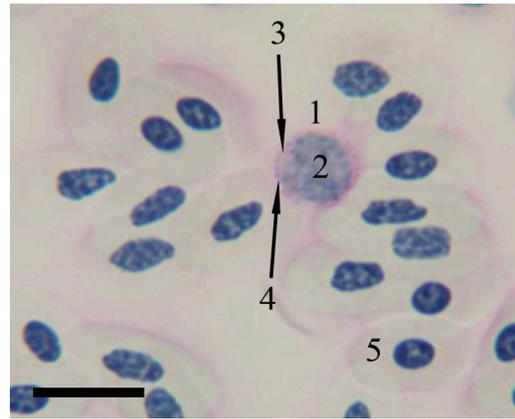
Der basophile Granulozyt (1) beinhaltet runde, purpurrote Strukturen (4). Die zytoplasmatischen Granula zeigen keine Reaktion (3). Zentral liegender Kern (2). Erythrozyten (5). Artefakt (6). SB = 10 µm



**Abbildung 44:** Monozyten, PAS-Reaktion.

Pute 23, männlich, 22 Wochen.

Monozyten (1), heterophiler Granulozyt (5), Lymphozyt (6) und Erythrozyten (7). Das Zytoplasma (3) der Monozyten ist lila angefärbt und enthält pinke Bereiche (4). Unregelmäßig geformte Zellkerne (2). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 45:** Lymphozyt, PAS-Reaktion.

Pute 23, männlich, 22 Wochen.

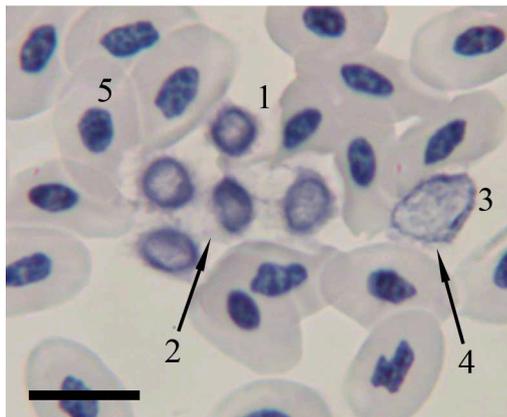
Dieser Lymphozyt (1) zeigt eine diffuse Reaktion des Zytoplasmas (3), in dem zudem purpurrote, runde Strukturen zu sehen sind (4). Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu\text{m}$

### 2.2.1.1 PAS mit Amylase-Vorbehandlung

Manche Lymphozyten reagieren schwach positiv und präsentieren diffus verteilte, rosarote Bereiche im hellvioletten Zytoplasma (vgl. Abb. 49). Andere stellen sich dagegen negativ dar (vgl. Abb. 46). Die restlichen Blutzellen der Pute reagieren stets negativ (vgl. Abb. 46, 47, 48). Die Tabelle 18 zeigt die Reaktion der Blutzellen auf die PAS-Färbung mit vorheriger Amylase-Behandlung.

Tabelle 18: PAS mit Amylase-Vorbehandlung

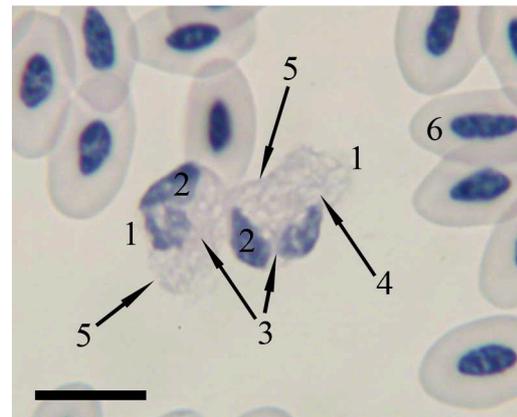
Zellen	Stärke der Reaktion	Farbe der Reaktion	Lokalisation
Erythrozyten	-	-	-
Thrombozyten	-	-	-
Heterophile Granulozyten	-	-	-
Eosinophile Granulozyten	-	-	-
Basophile Granulozyten	-	-	-
Monozyten	-	-	-
Lymphozyten	+	hellrosa	Zytoplasma (granulär)



**Abbildung 46:** Thrombozyten und Lymphozyt, PAS-Reaktion nach Amylase-Vorbehandlung.

Pute 24, weiblich, 22 Wochen.

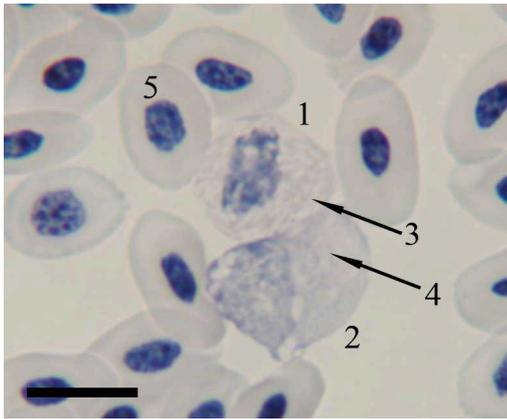
Die Thrombozyten (1) zeigen nach Amylase-Vorbehandlung keine Reaktion im Zytoplasma (2). Auch der Lymphozyt (3) reagiert negativ (4). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 47:** Heterophile Granulozyten, PAS-Reaktion nach Amylase-Vorbehandlung.

Pute 18, weiblich, 22 Wochen.

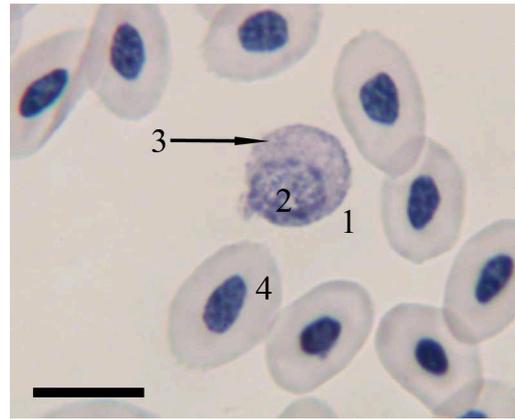
Das Zytoplasma (3) der heterophilen Granulozyten (1) sowie der Membran-Bereich (5) reagieren negativ. Die Granula stellen sich farblos dar (4). Zellkerne (2). Erythrozyten (6). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 48:** Heterophiler Granulozyt und Monozyt, PAS-Reaktion nach Amylase-Vorbehandlung.

Pute 24, weiblich, 22 Wochen.

Ebenso wie der heterophile Granulozyt (1), dessen Zytoplasma grau erscheint (3), zeigt auch der Monozyt (2) keine Reaktion mehr (4). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 49:** Lymphozyt, PAS-Reaktion nach Amylase-Vorbehandlung.

Pute 24, weiblich, 22 Wochen.

Dieser Lymphozyt (1) reagiert schwach positiv und enthält runde, rosarote Bereiche (3). Exzentrisch liegender Kern (2). Erythrozyten (4). SB = 10  $\mu$ m

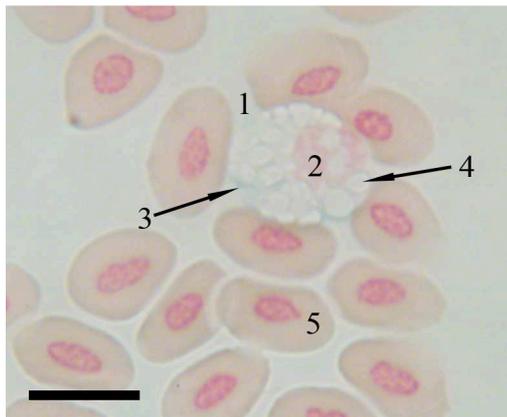
## 2.2.2 Alcianblau-Färbung

### 2.2.2.1 Alcianblau-Färbung pH 1

Die Granula der basophilen Granulozyten zeigen stets eine deutlich positive bis stark positive Reaktion und färben sich türkisblau bis dunkelblau an (vgl. Abb. 51, 52, 53). In einem der zehn Ausstriche kann zudem eine schwach positive Reaktion der eosinophilen Granulozyten beobachtet werden. Das Zytoplasma stellt sich hier blassblau zwischen den ausgewaschenen, farblosen Granula dar (vgl. Abb. 50). Alle anderen Zellen der Pute reagieren stets negativ. In folgender Tabelle 19 ist die Reaktion der Blutzellen der Pute auf die Alcianblau-Färbung bei einem pH-Wert von 1 zusammengefasst.

Tabelle 19: Alcianblau-Färbung pH 1

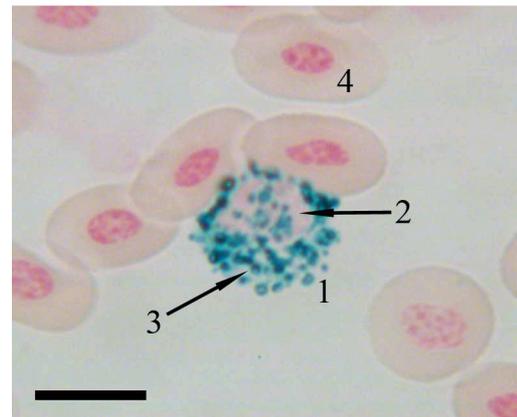
Zellen	Stärke der Reaktion	Farbe der Reaktion	Lokalisation
Erythrozyten	-	-	-
Thrombozyten	-	-	-
Heterophile Granulozyten	-	-	-
Eosinophile Granulozyten	+	blassblau	Zytoplasma (diffus)
Basophile Granulozyten	++ - +++	türkisblau bis dunkelblau	Granula
Monozyten	-	-	-
Lymphozyten	-	-	-



**Abbildung 50:** Eosinophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 1.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

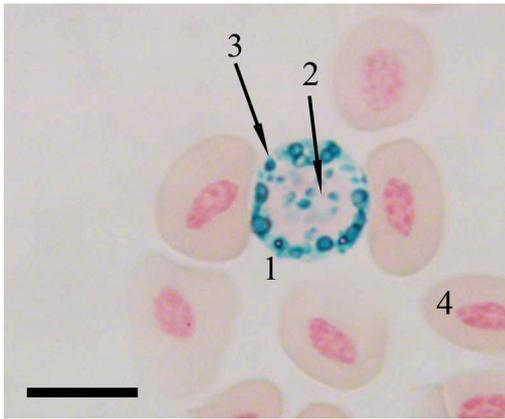
Der eosinophile Granulozyt (1) zeigt eine schwache Reaktion des Zytoplasmas (3). Die Granula stellen sich farblos dar (4). Zellkern (2). Die Erythrozyten zeigen keine Reaktion (5). SB = 10 µm



**Abbildung 51:** Basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 1.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

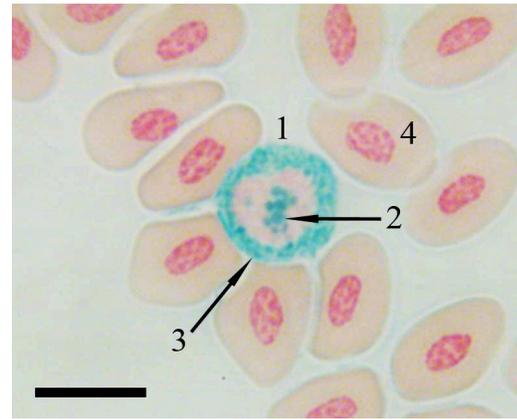
Der basophile Granulozyt (1) enthält zahlreiche positiv reagierende, dunkelblaue Granula (3), die auch den Zellkern bedecken (2). Erythrozyten (4). SB = 10 µm



**Abbildung 52:** Basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 1.

Pute 8, weiblich, 20 Wochen.

Auch dieser basophile Granulozyt (1), präsentiert unterschiedlich große, meist dunkelblaue Granula (3). Der Zellkern ist rosa angefärbt (2). Erythrozyten (4). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 53:** Basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 1.

Pute 10, weiblich, 20 Wochen.

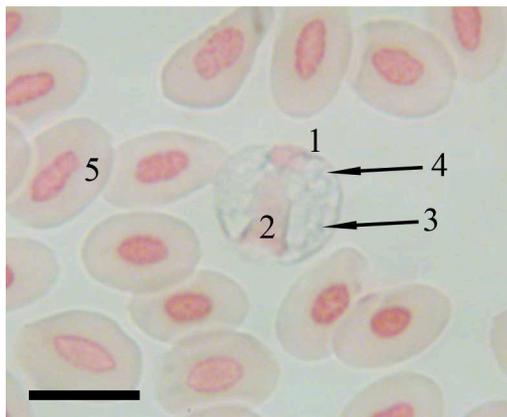
Die Granula (3) des Basophilen (1) färben sich türkisblau an und bedecken zum Teil den zentral liegenden Kern (2). Erythrozyten (4). SB = 10  $\mu$ m

### 2.2.2.2 Alcianblau-Färbung pH 2,5

Die basophilen Granulozyten zeigen intergranulär fast immer eine stark positive Reaktion. Dabei fällt meist ein türkis- bis dunkelblau angefärbtes, diffus im Zytoplasma verteiltes Netzwerk fadenartiger Strukturen auf, das manchmal auch ringförmig um den Zellkern angeordnet ist, diesen aber ebenso überlagern kann (vgl. Abb. 56). Bei anderen basophilen Granulozyten sind dagegen nur die Granula angefärbt. Diese präsentieren sich dann stark positiv in einer meist türkisblauen und seltener auch dunkelblauen Farbe. Auch beide Strukturen können in manchen Basophilen beobachtet werden (vgl. Abb. 55). Die heterophilen Granulozyten erscheinen oftmals schwach positiv mit einer blass- bis hellblauen Anfärbung, die diffus intergranulär auftritt (vgl. Abb. 54). Andere Heterophile stellen sich dagegen negativ dar. Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, Lymphozyten und eosinophile Granulozyten zeigen stets eine negative Reaktion. Die Tabelle 20 zeigt die Reaktion der Blutzellen auf die Alcianblau-Färbung bei einem pH-Wert von 2,5.

Tabelle 20: Alcianblau-Färbung pH 2,5

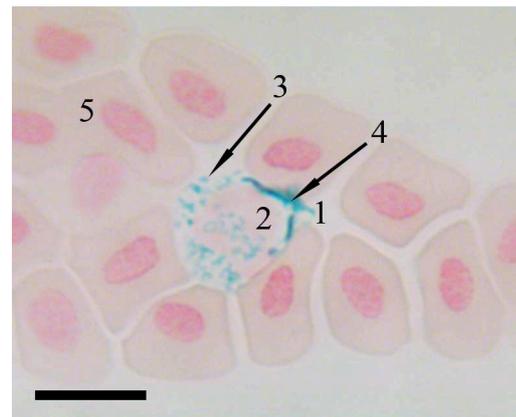
Zellen	Stärke der Reaktion	Farbe der Reaktion	Lokalisation
Erythrozyten	-	-	-
Thrombozyten	-	-	-
Heterophile Granulozyten	+	blassblau bis hellblau	Zytoplasma (diffus)
Eosinophile Granulozyten	-	-	-
Basophile Granulozyten	+++	türkisblau bis dunkelblau	Zytoplasma (diffus); Granula
Monozyten	-	-	-
Lymphozyten	-	-	-



**Abbildung 54:** Heterophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

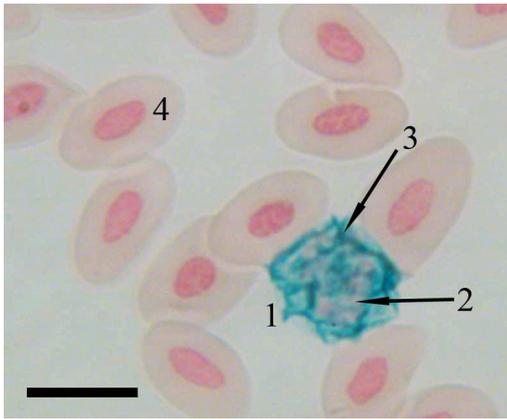
Der heterophile Granulozyt (1) zeigt eine diffus intergranulär auftretende, schwache Anfärbung des Zytoplasmas (3). Die Granula reagieren negativ (4). Zweifach gelappter Zellkern (2). Die Erythrozyten zeigen keine Reaktion (5). SB = 10 µm



**Abbildung 55:** Basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

Die Granula (3) des Basophilen (1) reagieren positiv und färben sich türkisblau an. Darüber hinaus kann eine fadenartige Reaktion des Zytoplasmas (4) beobachtet werden. Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10 µm



**Abbildung 56:** Basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5.

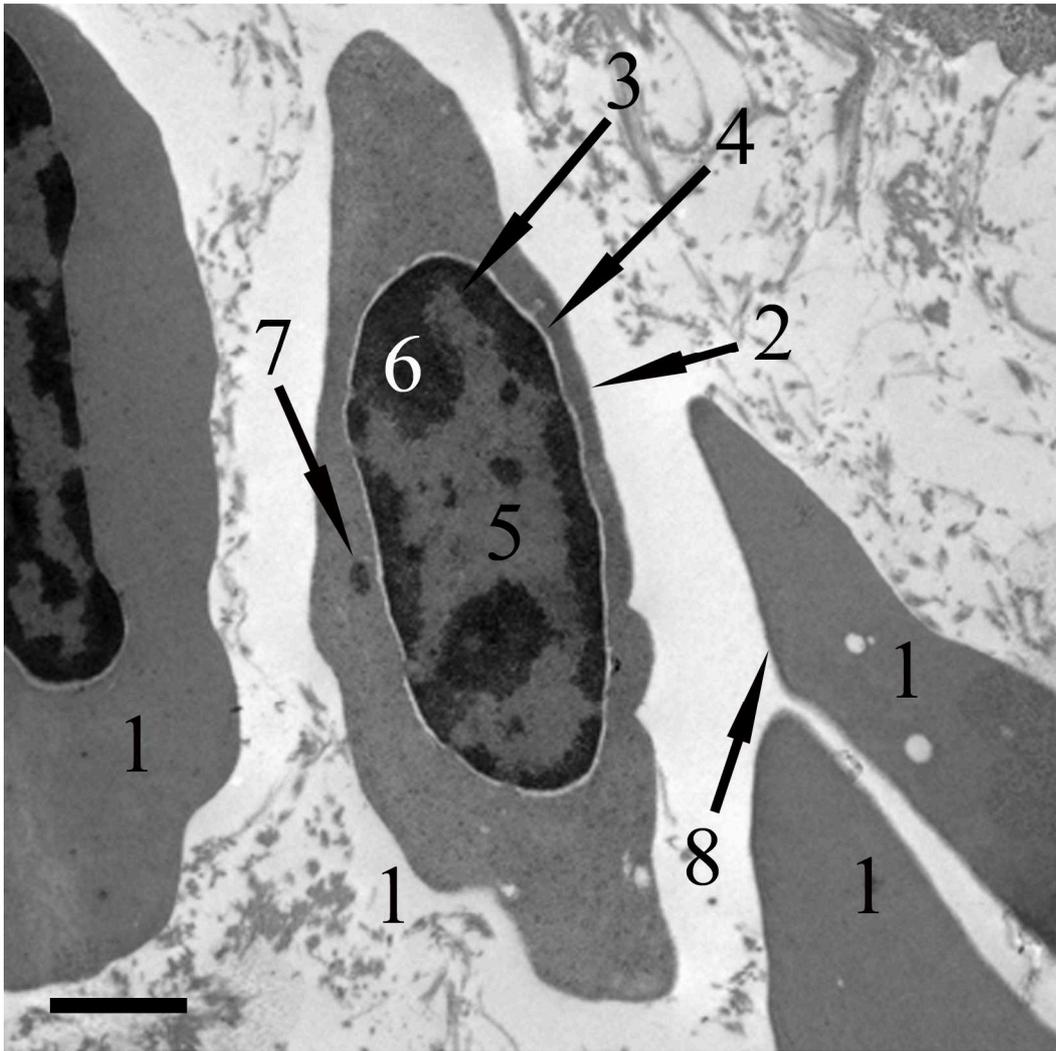
Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

Dieser basophile Granulozyt (1) enthält ein dunkelblau angefärbtes Netzwerk fadenartiger Strukturen (3), das den Zellkern (2) umgibt und überlagert. Erythrozyten (4).  
SB = 10  $\mu\text{m}$

### 3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

#### 3.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten der Pute stellen sich elektronenmikroskopisch als unregelmäßig länglich geformte Zellen mit glatter Zelloberfläche dar. Ihr rundlicher bis ovaler Kern ist zentral positioniert und wird nicht immer von einem meist schmalen perinukleären Spalt umgeben. Selten stellt sich dieser Spalt weit dar. Im meist homogenen Zytoplasma können Anschnitte von Mitochondrien beobachtet werden. Manchmal ist auch das marginale Band aus Mikrotubuli im Bereich der Zellmembran zu sehen.



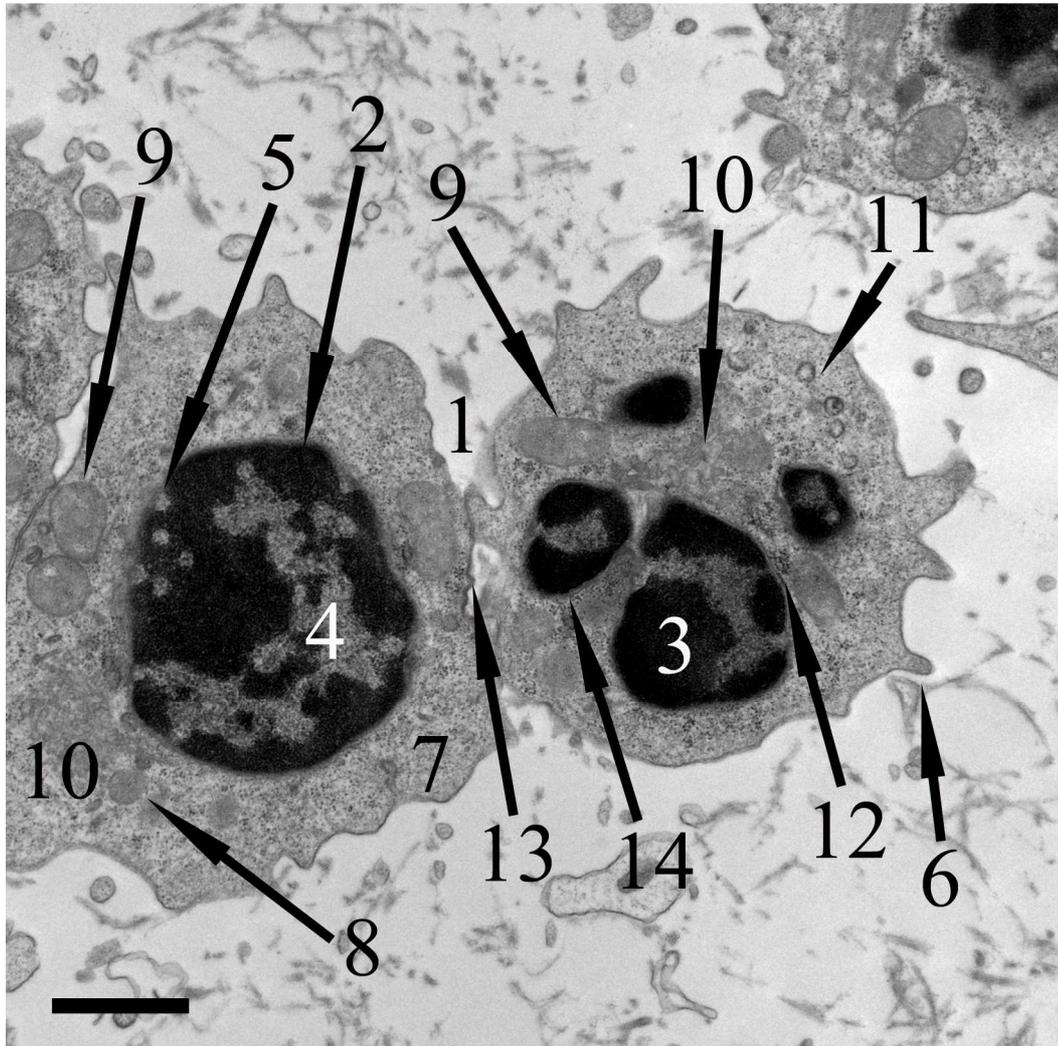
**Abbildung 57:** Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Erythrozyten.

Die Erythrozyten (1) haben eine längliche Form. Ihre glatte Zellmembran (2) trägt keine Pseudopodien. Der ovale Zellkern (3) wird von einem schmalen perinukleären Spalt (4) umgeben und enthält neben Euchromatin (5) vor allem peripher gelagertes Heterochromatin (6). Im Zytoplasma befinden sich Anschnitte von Mitochondrien (7). Nur manchmal erkennt man Teile des marginalen Bands aus Mikrotubuli (8). SB = 1  $\mu\text{m}$

### 3.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten der Pute sind rund bis leicht oval. Auf ihrer Zelloberfläche finden sich zahlreiche Pseudopodien. Der mittig gelegene Zellkern weist eine rundliche bis ovale Form auf. Im zumeist randständig gelegenen Heterochromatin können manchmal ein bis mehrere elektronenlichte Bereiche beobachtet werden. Das Zytoplasma enthält Granula, die ebenso rundlich bis oval sind. Ihre Größe

beträgt ungefähr 0,2 bis 0,3  $\mu\text{m}$ . Darüber hinaus beinhaltet das Zytoplasma Mitochondrien, Anschnitte endoplasmatischen Retikulums, Golgi-Apparat, Glykogengranula und Vakuolen. Perinukleär und im Bereich der Zellmembran können außerdem parallel verlaufende Mikrotubuli gesehen werden.

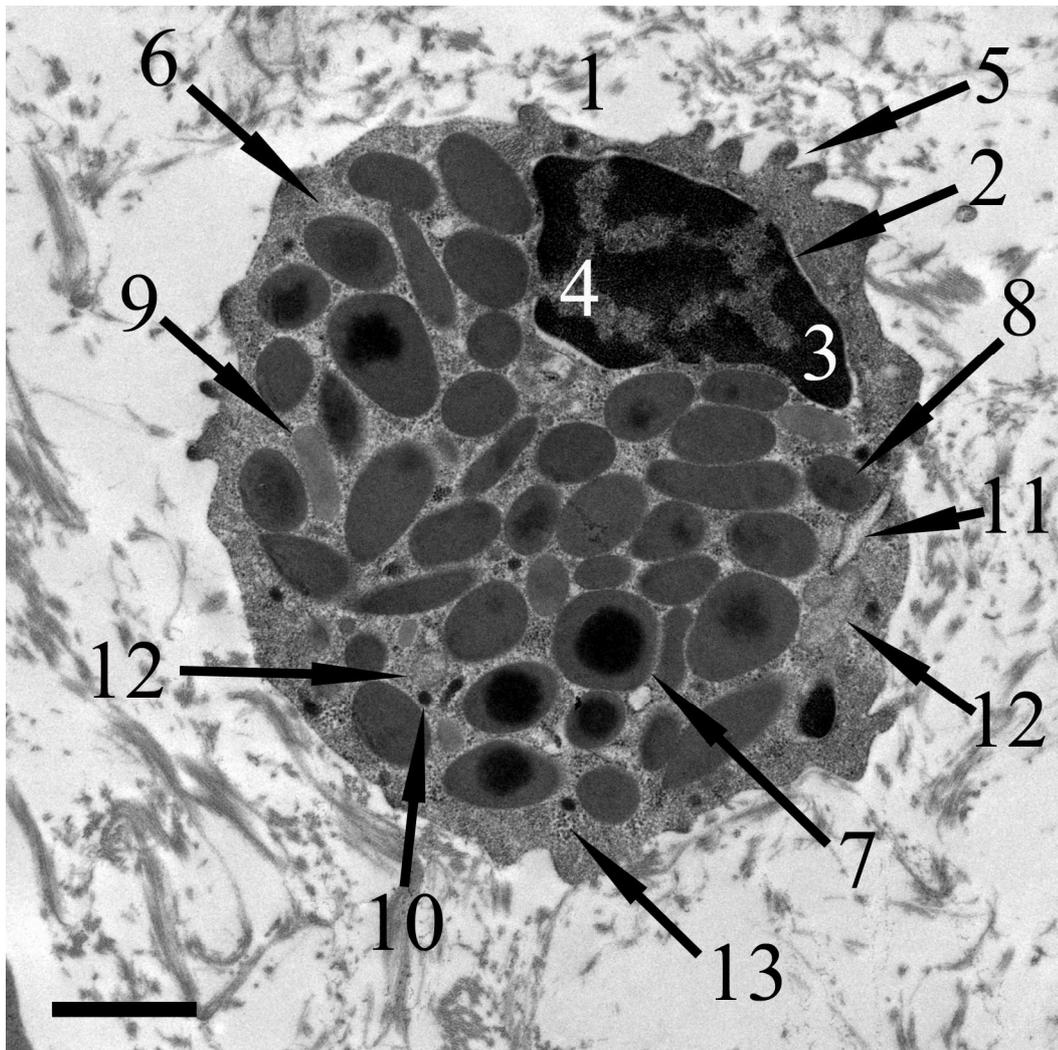


**Abbildung 58:** Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Thrombozyten.

In den runden Thrombozyten (1) weist der zentral gelegene Zellkern (2) mehr Heterochromatin (3) als Euchromatin (4) auf. Das vor allem peripher befindliche Heterochromatin beinhaltet kleine, runde, hellere Bereiche (5). Die Zellmembran zeigt zahlreiche Pseudopodien (6). Im Zytoplasma (7) befinden sich wenige Granula (8), viele Mitochondrien (9), Golgi-Apparat (10), Vakuolen (11) und Glykogengranula (12). Im Bereich der Zellmembran (13) sowie perinukleär (14) verlaufen Mikrotubuli. SB = 1  $\mu\text{m}$

### 3.3 Heterophile Granulozyten

Unter dem Elektronenmikroskop erscheinen die heterophilen Granulozyten als runde, ovale oder unregelmäßig länglich geformte Zellen, die an ihrer Zelloberfläche häufig zytoplasmatische Ausläufer tragen. Der einfach angeschnittene oder zweifach gelappte Kern liegt exzentrisch in der Zelle und enthält neben reichlich vorkommendem Heterochromatin auch einen geringeren Anteil an Euchromatin. Im Zytoplasma befinden sich drei Arten von Granula in unterschiedlicher Größe und Form. Die am Häufigsten vorkommenden ovalen oder länglichen Granula, die im Querschnitt rund erscheinen, weisen elektronendichten Inhalt auf und sind ca. 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$  lang, sowie 0,2 bis 0,7  $\mu\text{m}$  breit. In ihrem Inneren befinden sich zudem meist ein bis mehrere, rundliche, elektronendichtere Bereiche. In geringerer Anzahl finden sich außerdem ca. 0,2 bis 0,7  $\mu\text{m}$  lange und 0,16 bis 0,2  $\mu\text{m}$  breite, weniger elektronendichte Granula, deren Form von oval bis länglich variiert. Die dritte Art von Granula stellen ungefähr 0,1  $\mu\text{m}$  große, runde, elektronendichte Granula dar. Des Weiteren befinden sich im Zytoplasma der Heterophilen auch Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, Vakuolen und Glykogengranula.

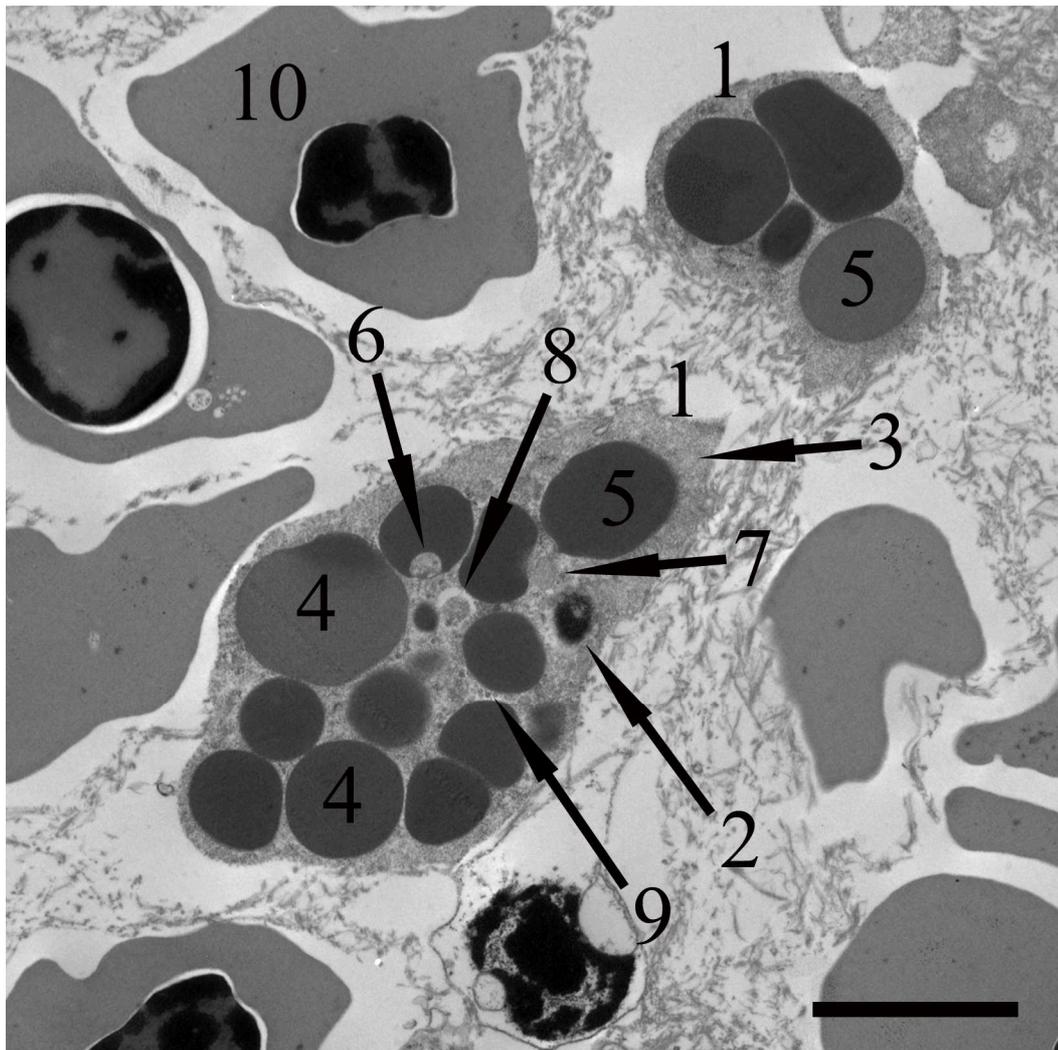


**Abbildung 59:** Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung eines heterophilen Granulozyten.

Im heterophilen Granulozyten (1) liegt der einfach angeschnittene Zellkern (2), der reichlich Heterochromatin (3) und deutlich weniger Euchromatin (4) enthält, exzentrisch. Die Zellmembran zeichnet sich durch eine Vielzahl von Pseudopodien (5) aus. Das Zytoplasma (6) wird nahezu vollständig von verschiedenen Granula ausgefüllt. Die oval bis länglichen Granula haben im Querschnitt eine runde Form (7) und enthalten einen (7) oder zwei (8) dunklere Bereiche. Daneben kommen hellere, längliche (9) und kleine, runde elektronendichte (10) Granula vor. Im Zytoplasma befinden sich außerdem Anschnitte rauhen endoplasmatischen Retikulums (11), Mitochondrien (12) und Glykogengranula (13). SB = 1  $\mu$ m

### 3.4 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten sind oval oder länglich geformte Zellen mit glatter Oberfläche, auf der sich selten Pseudopodien und Einbuchtungen befinden. Besonders auffallend erscheinen die zytoplasmatischen Granula, die eine meist runde, aber auch ovale oder längliche Form haben können. Der Durchmesser der runden Granula beträgt in etwa 1 bis 1,4  $\mu\text{m}$ . Ovale oder längliche Granula sind ungefähr 1,2 bis 2,2  $\mu\text{m}$  lang und 0,65 bis 1,8  $\mu\text{m}$  breit. Ihr stets homogener Inhalt weist immer in etwa die gleiche Dichte auf und kann kleine, runde, hellere Bereiche enthalten. Außerdem werden auch Einschnürungen der Granulumhülle beobachtet. Vom Zellkern ist nur ein unsegmentierter, kleiner Anschnitt sichtbar. Das Zytoplasma beinhaltet darüber hinaus Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, Lipidtröpfchen und kleine elektronendichte Vesikel.



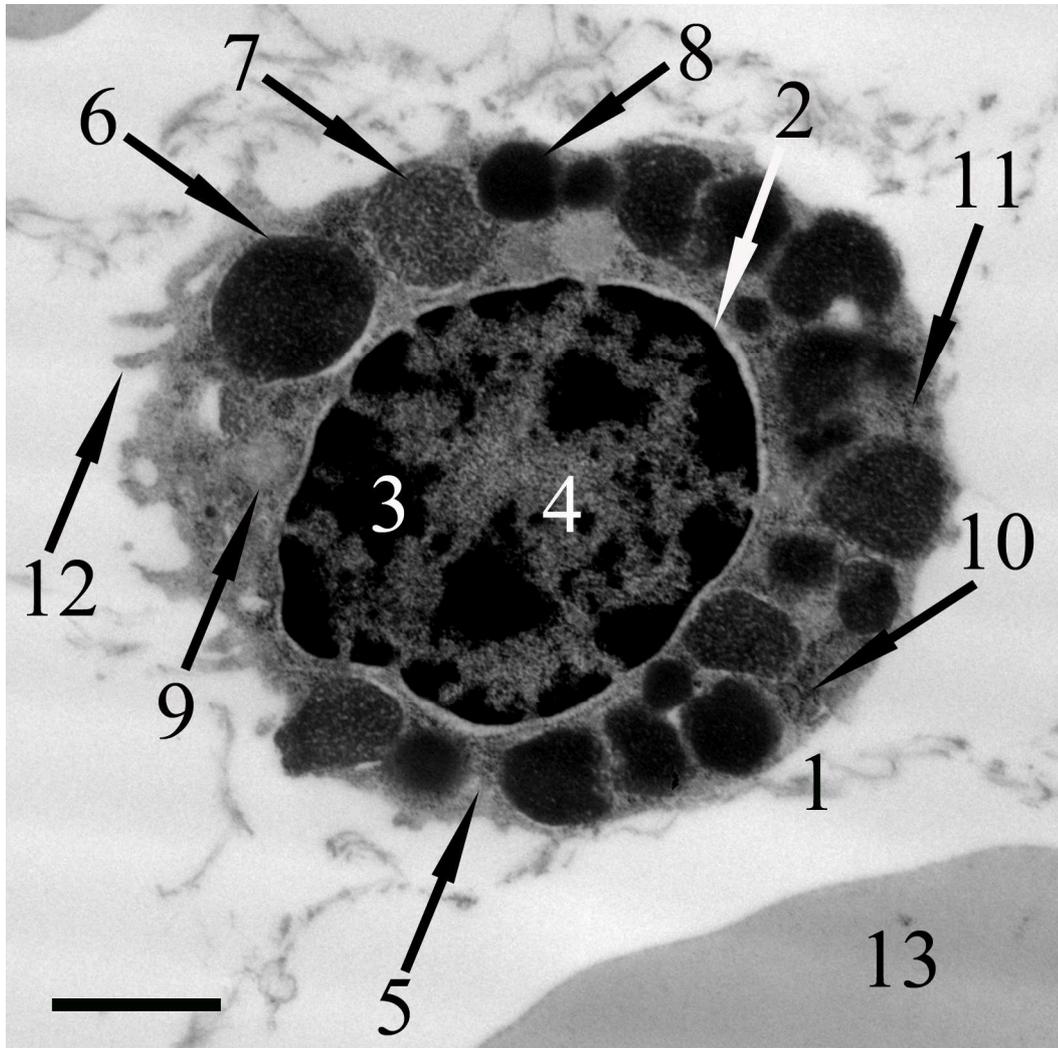
**Abbildung 60:** Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der eosinophilen Granulozyten.

Der eosinophile Granulozyt (1) hat eine längliche Form. Vom Zellkern (2) ist hier nur ein kleiner Abschnitt sichtbar. Das Zytoplasma (3) enthält eine Vielzahl unterschiedlich großer Granula mit runder (4) oder ovaler Form (5), deren Hülle Einschnürungen (6) aufweisen kann. Im Zytoplasma befinden sich des Weiteren Mitochondrien (7), endoplasmatisches Retikulum (8) und kleine, elektronendichte Vesikel (9). Erythrozyt (10). SB = 2,5  $\mu\text{m}$

### 3.5 Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten präsentieren sich elektronenmikroskopisch als rund oder oval geformte Zellen mit vielen Pseudopodien. Der zentral befindliche Kern ist ebenso rund oder oval. Die, um diesen angeordneten, rund bis unregelmäßig geformten, zytoplasmatischen Granula sind ca. 0,45 bis 1  $\mu\text{m}$  lang und 0,4 bis 0,9  $\mu\text{m}$  breit. Runde Granula haben einen ungefähren Durchmesser von 0,2 bis 0,5

$\mu\text{m}$ . Sie weisen unterschiedlich elektronendichten Inhalt von variierender Homogenität auf. Im Zytoplasma können des Weiteren Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum und Glykogengranula beobachtet werden.

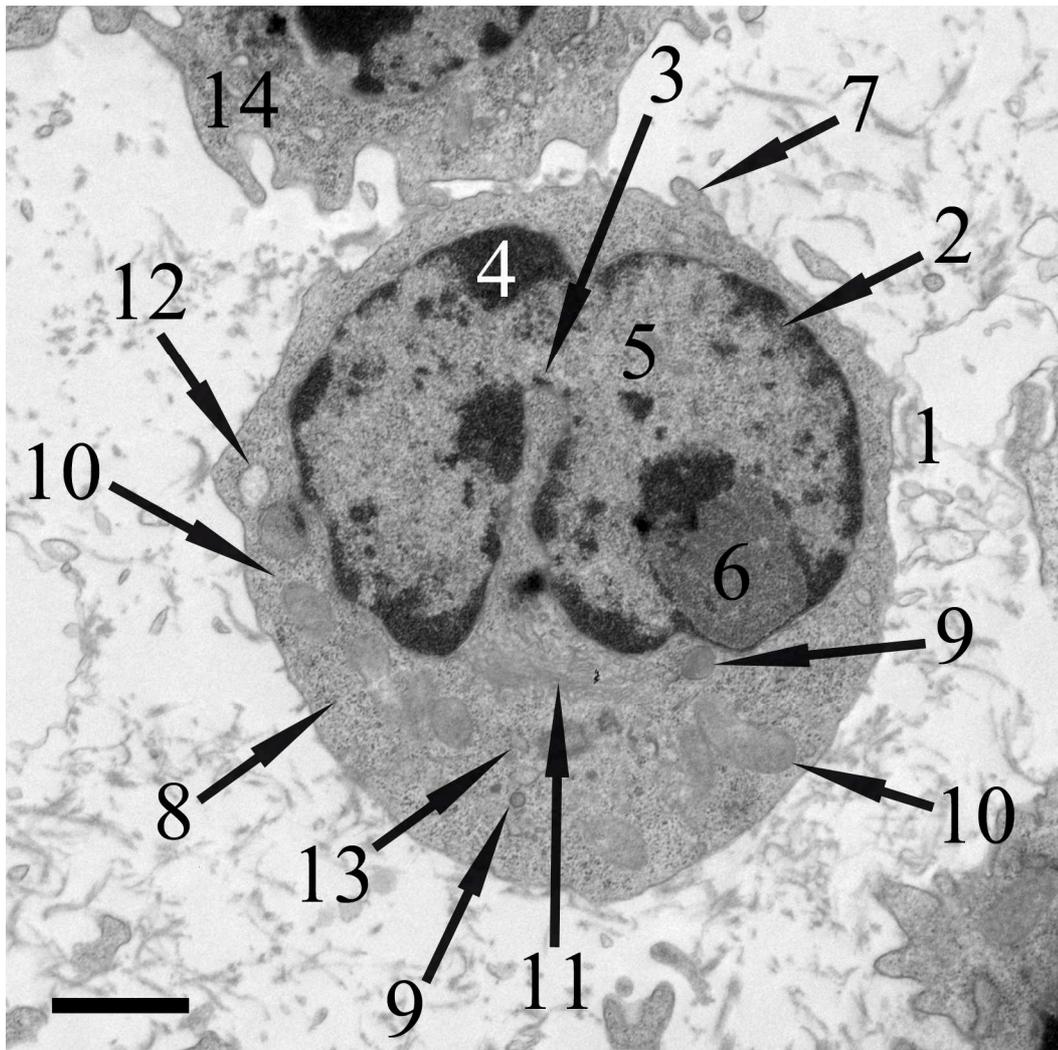


**Abbildung 61:** Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung eines basophilen Granulozyten.

Der runde basophile Granulozyt (1) enthält einen zentral gelegenen Kern (2), der weniger, vor allem randständig befindliches, Heterochromatin (3) als Euchromatin (4) aufweist. Das Zytoplasma (5) beinhaltet um den Kern angeordnete, unterschiedlich große Granula, die entweder inhomogen elektronendichten (6), strichförmigen (7) oder homogen elektronendichten Inhalt (8) zeigen. Zudem enthält es Mitochondrien (9), raues endoplasmatisches Retikulum (10) und Glykogengranula (11). Auf der Zellmembran befinden sich Pseudopodien (12). Anschnitt eines Erythrozyten (13). SB = 1  $\mu\text{m}$

### 3.6 Monozyten

Die Monozyten der Pute sind runde, zuweilen leicht unregelmäßig geformte Zellen. Ihre Oberfläche trägt wenige bis zahlreiche zytoplasmatische Ausläufer. Der unsegmentierte oder zweifach gelappte Kern liegt exzentrisch in der Zelle. Nicht gelappte Zellkerne weisen häufig eine Einbuchtung von variierender Tiefe auf. Der Nukleus enthält nur wenig, vor allem peripher gelegenes, Heterochromatin und reichlich Euchromatin. Im Zytoplasma können eine große Menge an diffus verteilten Zellorganellen beobachtet werden: darunter Granula von unterschiedlicher Größe, einige Mitochondrien mit zum Teil deutlich ausgeprägten Cristae, zahlreiche Anschnitte rauhen endoplasmatischen Retikulums, Vakuolen und Golgi-Apparat.

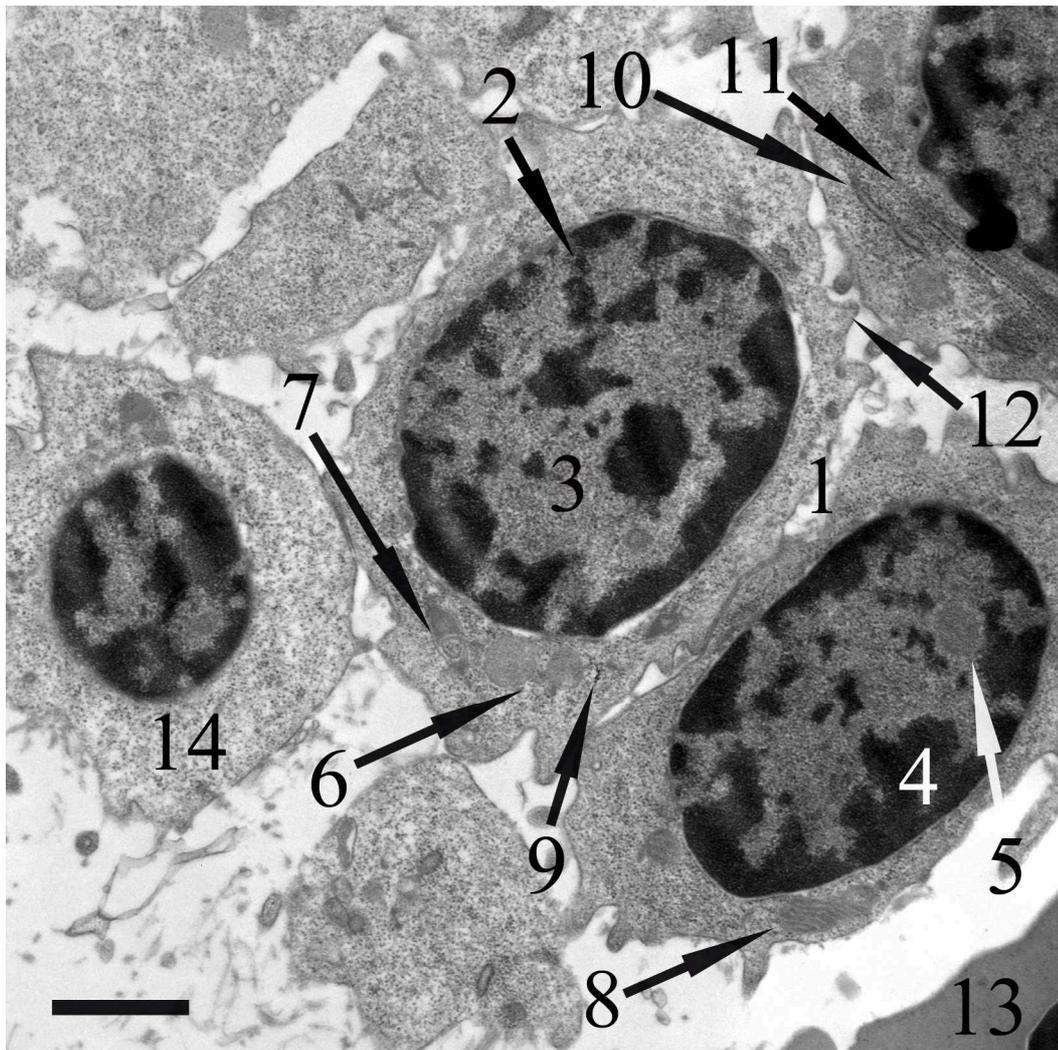


**Abbildung 62:** Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung eines Monozyten.

Der Monozyt (1) enthält einen exzentrisch gelegenen Zellkern (2) mit starker Invagination (3). Das peripher gelagerte Heterochromatin (4) liegt in deutlich geringerer Menge vor als das Euchromatin (5). Im Zellkern ist außerdem ein Nukleolus-Anschnitt (6) zu erkennen. Die Zellmembran trägt einige Pseudopodien (7). Im reichlich vorkommenden Zytoplasma (8) befinden sich mäßig elektronendichte, unterschiedlich große, runde Granula (9), zahlreiche Mitochondrien (10), Golgi-Apparat (11), Vakuolen (12) und viele Anschnitte rauen endoplasmatischen Retikulums (13). Anschnitt eines Thrombozyten (14). SB = 1  $\mu$ m

### 3.7 Lymphozyten

Elektronenmikroskopisch erscheinen die Lymphozyten der Pute als ovale bis leicht unregelmäßig geformte Zellen, deren Oberfläche zytoplasmatische Ausläufer aufweist. Im zentral in der Zelle liegenden, meist ovalen Zellkern befindet sich in der Regel mehr Eu- als Heterochromatin. Die rundlichen zytoplasmatischen Granula sind ungefähr 0,2 bis 0,3  $\mu\text{m}$  groß. Des Weiteren finden sich im Zytoplasmasaum Einschlüsse mit lamellärem Inhalt, Mitochondrien mit zum Teil deutlich ausgeprägten Cristae, Glykogengranula, endoplasmatisches Retikulum und parallel angeordnete, lange Reihen runder Strukturen.



**Abbildung 63:** Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Lymphozyten.

Lymphozyten (1) und Anschnitt eines Erythrozyten (13) sowie eines Thrombozyten (14). Der Kern (2) liegt zentral in den Lymphozyten und enthält eine größere Menge Euchromatin (3) als Heterochromatin (4). In einem Zellkern ist der Anschnitt eines Nukleolus (5) zu sehen. Das Zytoplasma enthält Granula mit mäßig elektronendichtem Inhalt (6) sowie längliche Einschlüsse mit lamellärem Inhalt (7). Außerdem befinden sich im Zytoplasmasaum auch Mitochondrien (8), Glykogengranula (9), endoplasmatisches Retikulum (10) und lange Anordnungen runder Strukturen (11). Die Zelloberfläche der Lymphozyten weist zahlreiche zytoplasmatische Ausläufer (12) auf. SB = 1  $\mu$ m

## 4 Glykohistochemische Untersuchungen

Bei den FITC-markierten Lektinen PHA-E und PHA-L wurden 14 Ausstriche, bei allen anderen FITC-markierten als auch den biotinylierten Pflanzenlektinen je zehn Blutausstriche auf das jeweilige Binden geprüft. Die, für jedes bindende Lektin, aufgeführte Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Bindungsreaktion. Die „Stärke der Reaktion“, die in keine (0), eine schwach positive (+), deutlich positive (++) und stark positive Reaktion (+++) unterteilt ist, beschreibt dabei den jeweiligen prozentualen Anteil der auswertbaren Präparate, die diese Bindungsstärke zeigen. Die „Anzahl der positiven Präparate“ führt den prozentualen Anteil der auswertbaren Blutausstriche auf, bei denen ein Binden des Lektins an den jeweiligen Zellbestandteil nachgewiesen werden kann. Manche Blutausstriche zeigten qualitative Mängel, waren zum Beispiel stark überfärbt, und konnten so nicht ausgewertet werden. Dadurch lassen sich die unterschiedliche Anzahl der auswertbaren und damit auch die der positiven Präparate erklären.

### 4.1 Für Glukose/Mannose spezifische Lektine

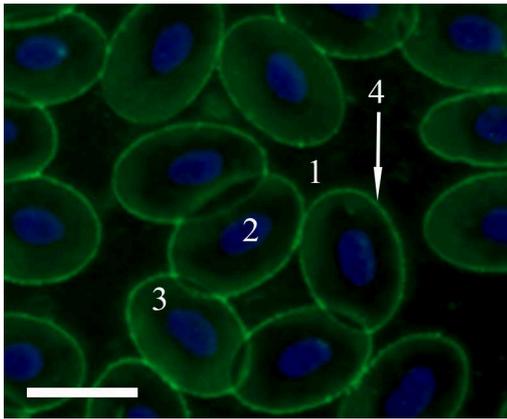
#### 4.1.1 Bindung von Concanavalin Agglutinin (ConA-FITC)

In allen Präparaten kann stets eine Bindung von ConA an die Erythrozyten der Pute nachgewiesen werden. Die Zellmembran reagiert dabei meist deutlich oder stark positiv, die Reaktion des Zytoplasmas ist dagegen meist schwach, seltener deutlich positiv (vgl. Abb. 64). Die Membran der Thrombozyten zeigt eine schwach bis deutlich positive, selten auch stark positive Fluoreszenz. Das Zytoplasma reagiert entweder schwach oder deutlich positiv. Granula der Thrombozyten stellen sich meist negativ dar, nur selten werden sie deutlich oder stark positiv fluoreszierend beobachtet (vgl. Abb. 65). Die Zellmembran der heterophilen Granulozyten bindet das Lektin in nur wenigen Präparaten schwach, häufig stellt sie sich negativ dar. Das Zytoplasma reagiert schwach bis deutlich positiv mit dem Lektin und zeigt oftmals eine stärkere, punktförmige Fluoreszenz mit diffuser Verteilung (vgl. Abb. 66). Nicht immer binden die Granula ConA. Positiv reagierende Granula leuchten deutlich bis stark (vgl. Abb. 67). Die

Membran der Eosinophilen bindet das Lektin schwach bis deutlich, häufig allerdings fehlt eine Bindung. Das Zytoplasma reagiert meist schwach positiv und die Granula stellen sich bei der Hälfte der Tiere stark positiv dar. Dabei zeigt häufig vor allem ihre Randzone eine starke Fluoreszenz (vgl. Abb. 68). Die Zellmembran der basophilen Granulozyten hat eine nur geringe Bindungsneigung zu ConA. Selten reagiert sie schwach positiv, meist negativ. Das Zytoplasma weist in manchen Ausstrichen eine schwach positive Reaktion auf und die Granula zeigen bei wenigen Tieren eine deutlich bis starke Fluoreszenz (vgl. Abb. 69). Monozyten binden das Lektin selten an ihrer Zellmembran und auch das Zytoplasma weist meist eine nur schwach positive Reaktion auf. Auffallend sind jedoch die zytoplasmatischen Granula, die sich deutlich bis stark positiv darstellen und diffus über das gesamte Zytoplasma verteilt sind (vgl. Abb. 70). Die Membran der Lymphozyten bindet das Lektin mit unterschiedlicher Affinität, das Zytoplasma jedoch meist schwach, selten deutlich. Zytoplasmatische Granula der Lymphozyten stellen sich stets negativ dar (vgl. Abb. 71). Die Tabelle 21 fasst die Ergebnisse der ConA-Bindung zusammen.

Tabelle 21: Ergebnis der Auswertung: ConA-FITC

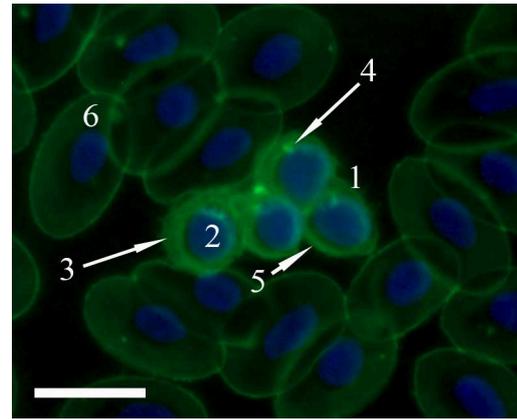
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	0%	10%	50%	40%	100%
Zytoplasma	0%	80%	20%	0%	100%
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	0%	40%	50%	10%	100%
Zytoplasma	0%	50%	50%	0%	100%
Granula	80%	0%	10%	10%	20%
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	60%	40%	0%	0%	40%
Zytoplasma	0%	40%	30%	30%	100%
Granula	30%	0%	30%	40%	70%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	70%	10%	20%	0%	30%
Zytoplasma	40%	60%	0%	0%	60%
Granula	40%	0%	10%	50%	60%
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	90%	10%	0%	0%	10%
Zytoplasma	60%	40%	0%	0%	40%
Granula	70%	0%	20%	10%	30%
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	80%	10%	10%	0%	20%
Zytoplasma	0%	80%	20%	0%	100%
Granula	0%	0%	40%	60%	100%
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	0%	30%	70%	0%	100%
Zytoplasma	10%	80%	10%	0%	90%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%



**Abbildung 64:** Erythrozyten, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 17, weiblich, 22 Wochen.

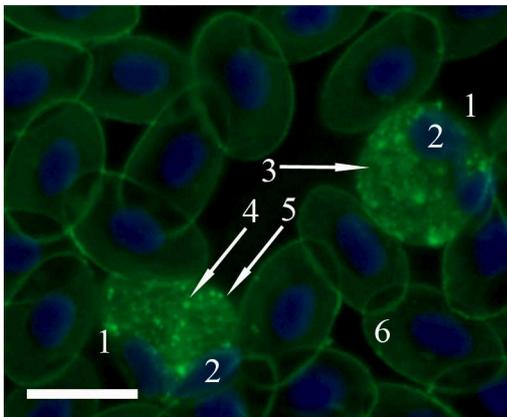
Die Erythrozyten (1) binden das Lektin mit starker Affinität an ihrer Zellmembran (4). Das Zytoplasma zeigt hier eine deutliche Reaktion (3). Blaue Fluoreszenz des Zellkerns (2). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 65:** Thrombozyten, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 22, weiblich, 22 Wochen.

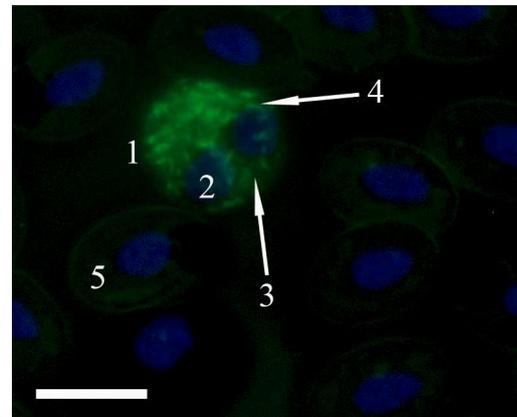
Die Zellmembran (5) der Thrombozyten (1) zeigt eine deutliche Affinität zu ConA. Das ebenso deutlich fluoreszierende Zytoplasma (3) enthält stark leuchtende Granula (4). Zellkern (2). Erythrozyten (6). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 66:** Heterophile Granulozyten, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 20, weiblich, 22 Wochen.

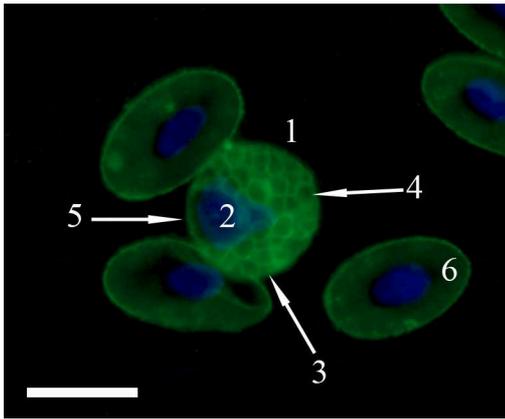
Im Zytoplasma (3) der Heterophilen Granulozyten (1) fällt eine punktförmige Fluoreszenz auf (4). Die Zellmembran stellt sich hier negativ dar (5). Zellkern (2). Erythrozyten (6). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 67:** Heterophiler Granulozyt, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 14, weiblich, 20 Wochen.

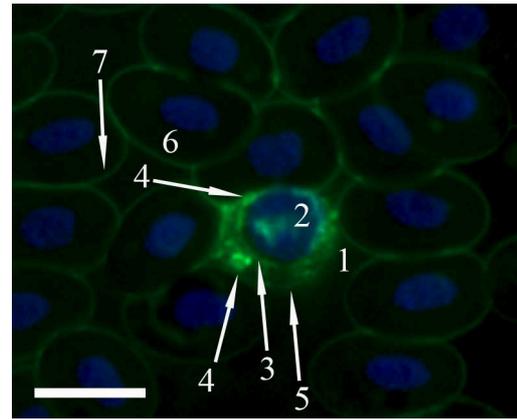
Das schwach reagierende Zytoplasma (3) des Heterophilen (1) enthält zahlreiche, stark fluoreszierende Granula (4). Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 68:** Eosinophiler Granulozyt, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 22, weiblich, 22 Wochen.

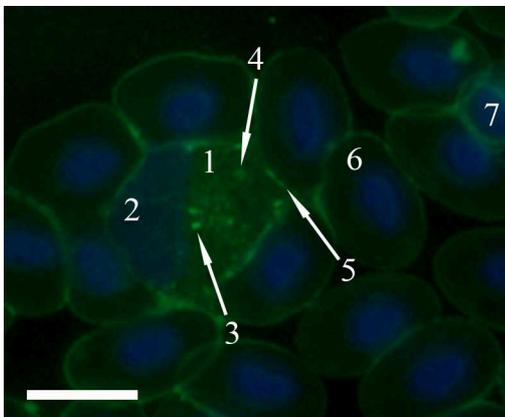
Das Zytoplasma (3) des Eosinophilen (1) geht eine schwache Bindung mit ConA ein, die Zellmembran reagiert deutlich (5). Deutlich bis starke Bindung der Granulumhülle (4) an ConA. Zellkern (2). Erythrozyten (6). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 69:** Basophiler Granulozyt, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 14, weiblich, 20 Wochen.

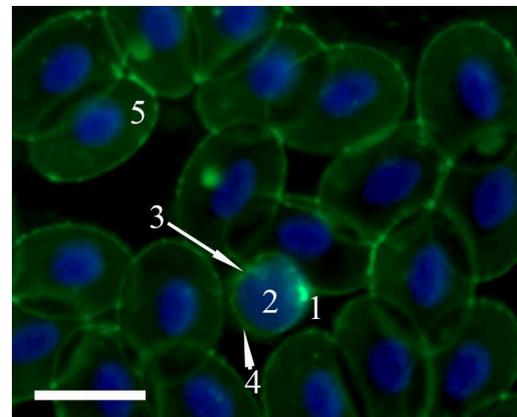
Der basophile Granulozyt (1) zeigt eine schwache Reaktion des Zytoplasmas (3) und der Zellmembran (5). Die Granula binden ConA mit starker Affinität (4). Zellkern (2). Deutliche Reaktion der Membran (7) der Erythrozyten (6). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 70:** Monozyt, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 17, weiblich, 22 Wochen.

Monozyt (1), Erythrozyten (6) und Lymphozyt (7). Schwache Bindung von ConA an das Zytoplasma (4) der Monozyten. Die Zellmembran reagiert deutlich (5), die Granula (3) stark mit dem Lektin. Zellkern (2). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 71:** Lymphozyt, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 17, weiblich, 22 Wochen.

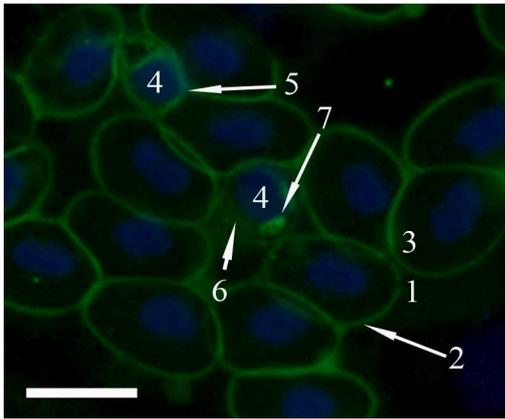
Zytoplasma (3) und Membran (4) des Lymphozyten (1) zeigen eine deutliche Bindungsneigung zu ConA. Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m

#### 4.1.2 Bindung von *Lens culinaris* Agglutinin (LCA-FITC)

In über der Hälfte aller acht auswertbaren Ausstriche kann eine Bindung des Lektins an die Zellmembran der Erythrozyten nachgewiesen werden. Ihr Zytoplasma stellt sich dagegen meist negativ, selten schwach positiv dar (vgl. Abb. 72). Selten bindet das Lektin an die Membran der Thrombozyten. In einem Ausstrich fällt aber eine deutlich positive Fluoreszenz auf. Das Zytoplasma reagiert fast immer schwach positiv mit leichter Verstärkung im Bereich der zytoplasmatischen Vakuole. Die Granula stellen sich nur selten positiv dar (vgl. Abb. 72). Die Zellmembran der heterophilen Granulozyten bindet das Lektin meist mit variierender Intensität. Ihr Zytoplasma ist stets schwach bis deutlich positiv und auch die Granula erscheinen meist deutlich positiv (vgl. Abb. 73, 74). Eine Reaktion der eosinophilen Granulozyten kann in nur einem Blutaussstrich gesehen werden. Dabei reagieren ihre Zellmembran negativ, das Zytoplasma schwach und die Granula deutlich positiv (vgl. Abb. 75). Auch die Basophilen zeigen in nur wenigen Ausstrichen eine Reaktion. Die Zellmembran und das Zytoplasma weisen nur selten eine geringe Affinität zu LCA auf. Die Granula hingegen erscheinen deutlich bis stark fluoreszierend (vgl. Abb. 76). Monozyten binden das Lektin nur selten an ihrer Zellmembran, meist fällt die Reaktion negativ aus. Ihr Zytoplasma ist immer schwach positiv. Besonders schön stellen sich die unterschiedlich großen, länglich bis runden, zytoplasmatischen Granula dar, die diffus über das Zytoplasma verteilt sind. Ihre Reaktion kann stets als deutlich positiv eingestuft werden (vgl. Abb. 77). Lymphozyten binden LCA bei über der Hälfte der auswertbaren Präparate an ihrer Zellmembran. Die Granula reagieren stets positiv (vgl. Abb. 78). Folgende Tabelle 22 zeigt die Bindung von LCA an die Blutzellen der Pute.

Tabelle 22: Ergebnis der Auswertung: LCA-FITC

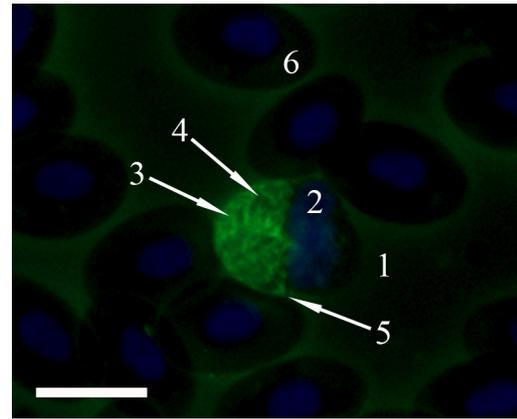
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	25%	50%	12,5%	12,5%	75%
Zytoplasma	87,5%	12,5%	0%	0%	12,5%
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	87,5%	0%	12,5%	0%	12,5%
Zytoplasma	37,5%	62,5%	0%	0%	62,5%
Granula	87,5%	0%	12,5%	0%	12,5%
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	37,5%	12,5%	37,5%	12,5%	62,5%
Zytoplasma	0%	62,5%	37,5%	0%	100%
Granula	12,5%	0%	87,5%	0%	87,5%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	87,5%	12,5%	0%	0%	12,5%
Granula	87,5%	0%	12,5%	0%	12,5%
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	87,5%	12,5%	0%	0%	12,5%
Zytoplasma	75%	25%	0%	0%	25%
Granula	50%	0%	25%	25%	50%
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	87,5%	12,5%	0%	0%	12,5%
Zytoplasma	0%	100%	0%	0%	100%
Granula	0%	0%	100%	0%	100%
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	25%	0%	75%	0%	75%
Zytoplasma	25%	50%	25%	0%	75%
Granula	0%	0%	50%	50%	100%



**Abbildung 72:** Erythrozyten und Thrombozyten, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 30, weiblich, 18 Wochen.

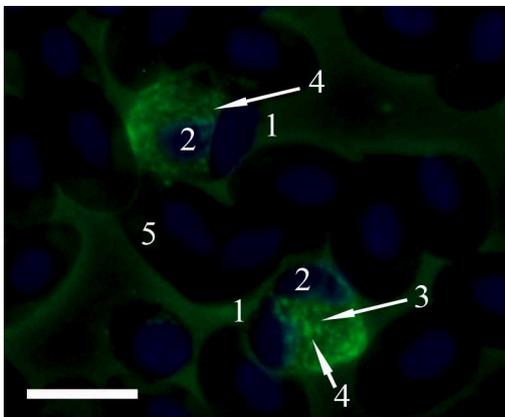
Die Erythrozyten (1) binden LCA an der Zellmembran (2). Ihr Zytoplasma leuchtet schwach positiv (3). Die Membran (5) der Thrombozyten (4) reagiert deutlich, das Zytoplasma (6) dagegen schwach. Deutliche granuläre Reaktion (7). SB = 10 µm



**Abbildung 73:** Heterophiler Granulozyt, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 19, männlich, 22 Wochen.

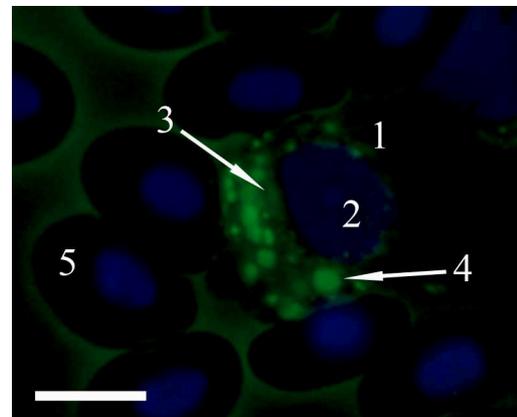
Die Zellmembran (5) und das Zytoplasma (3) des Heterophilen (1) reagieren deutlich mit LCA. Die Granula erscheinen hier zum Teil negativ (4). Zellkern (2). Erythrozyten (6). SB = 10 µm



**Abbildung 74:** Heterophile Granulozyten, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 19, männlich, 22 Wochen.

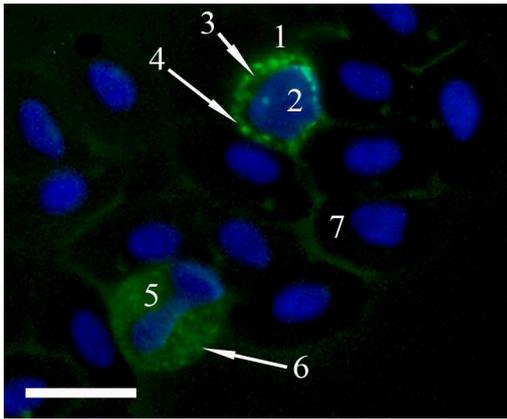
Die zytoplasmatischen Granula (4) dieser Heterophilen (1) binden das Lektin deutlich. Das Zytoplasma ist schwach positiv (3). Zellkerne (2). Erythrozyten (5). SB = 10 µm



**Abbildung 75:** Eosinophiler Granulozyt, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 17, weiblich, 22 Wochen.

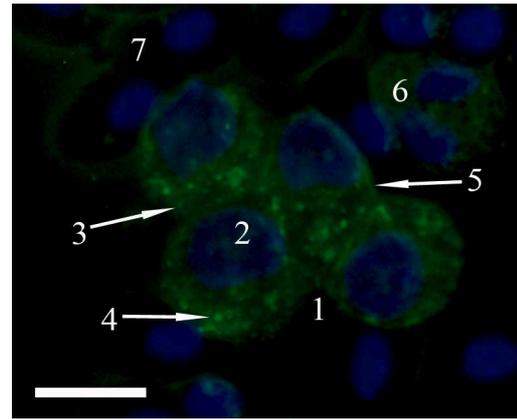
Deutlich positive Reaktion der Granula (4) des Eosinophilen (1). Das Zytoplasma bindet LCA mit schwacher Affinität (3). Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10 µm



**Abbildung 76:** Basophiler Granulozyt, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 22, weiblich, 22 Wochen.

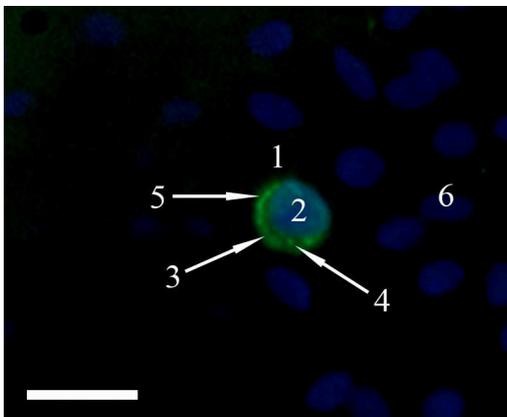
Der Basophile (1) zeigt stark fluoreszierende Granula (4). Das Zytoplasma (3) reagiert nur schwach mit dem Lektin. Die Granula (6) des Heterophilen (5) zeigen eine Bindung an LCA. Zellkern (2). Erythrozyten (7). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 77:** Monozyten, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 22, weiblich, 22 Wochen.

Monozyten (1), Heterophiler (6) und Erythrozyten (7). Die Zellmembran (5) dieses Monozyten bindet schwach an das Lektin. Schwache Reaktion des Zytoplasmas (3). Die Granula zeigen eine deutliche Affinität zu LCA (4). Zellkern (2). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 78:** Lymphozyt, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 18, weiblich, 22 Wochen.

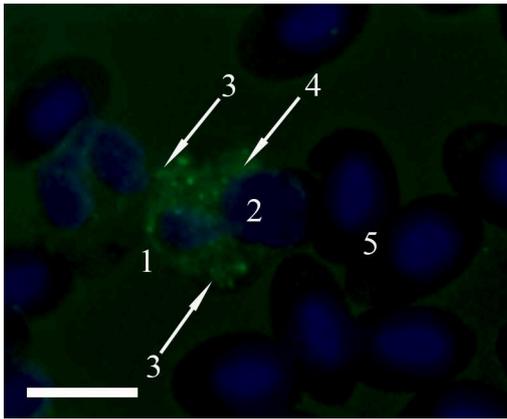
Der Lymphozyt (1) bindet LCA im Zytoplasma (3) und an der Membran (5) mit deutlicher Affinität. Auch die Granula (4) reagieren mit dem Lektin. Zellkern (2). Erythrozyten (6). SB = 10  $\mu$ m

### 4.1.3 Bindung von *Pisum sativum* Agglutinin (PSA-FITC)

Die Reaktion der roten Blutkörperchen ist in allen acht auswertbaren Präparaten stets negativ. Thrombozyten binden das Lektin selten schwach im Zytoplasma, meist sind sie dagegen auch PSA-negativ. Die Zellmembran der heterophilen Granulozyten zeigt nur selten eine Reaktion, ihr Zytoplasma fluoresziert dagegen häufig schwach bis deutlich positiv. Die zytoplasmatischen Granula stellen sich selten schwach bis deutlich positiv dar, meist jedoch negativ (vgl. Abb. 79). Eine Reaktion der Eosinophilen kann in nur einem Ausstrich beobachtet werden. Sie binden das Lektin mit deutlich positiver Intensität an den zytoplasmatischen Granula. Das Zytoplasma weist eine schwach positive Reaktion auf, die Zellmembran ist hingegen negativ (vgl. Abb. 80). In nur zwei Ausstrichen kann eine Reaktion der Granula der Basophilen festgestellt werden (vgl. Abb. 81). Die Monozyten erscheinen auch hier besonders schön mit Bindung an das Zytoplasma und meist deutlich positiver Reaktion der Granula, die diffus im Zytoplasma verteilt sind. Die Membran ist dagegen meist negativ (vgl. Abb. 82). Lymphozyten binden das Lektin nur selten an die Zellmembran (vgl. Abb. 81). Tabelle 23 beschreibt die Bindung von PSA an die Blutzellen der Pute.

Tabelle 23: Ergebnis der Auswertung: PSA-FITC

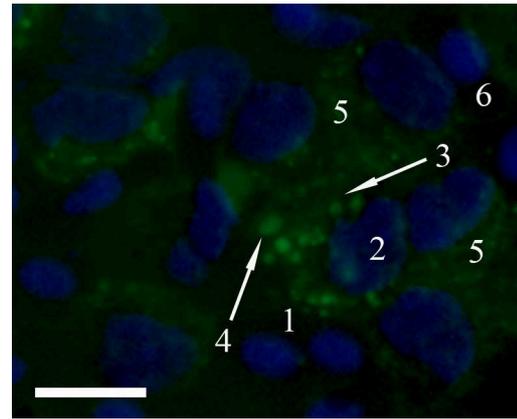
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	62,5%	37,5%	0%	0%	37,5%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	87,5%	12,5%	0%	0%	12,5%
Zytoplasma	37,5%	50%	12,5%	0%	62,5%
Granula	62,5%	25%	12,5%	0%	37,5%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	87,5%	12,5%	0%	0%	12,5%
Granula	87,5%	0%	12,5%	0%	12,5%
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	75%	12,5%	12,5%	0%	25%
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	87,5%	12,5%	0%	0%	12,5%
Zytoplasma	0%	50%	50%	0%	100%
Granula	0%	0%	87,5%	12,5%	100%
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	75%	12,5%	12,5%	0%	25%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%



**Abbildung 79:** Heterophile Granulozyten, PSA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 16, männlich, 22 Wochen.

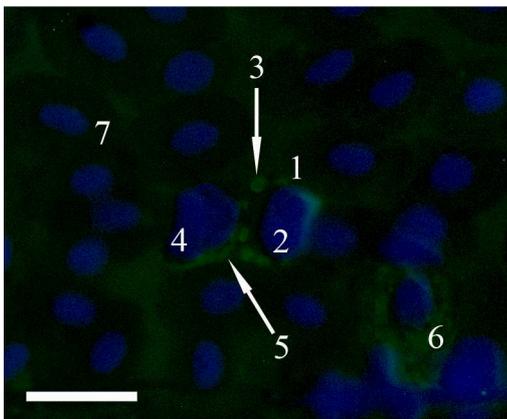
Dieser Heterophile (1) zeigt eine deutliche Reaktion der Granula (3) und des Zytoplasmas (4). Zellkern (2). Die Erythrozyten reagieren nicht mit PSA (5). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 80:** Eosinophiler Granulozyt, PSA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 16, männlich, 22 Wochen.

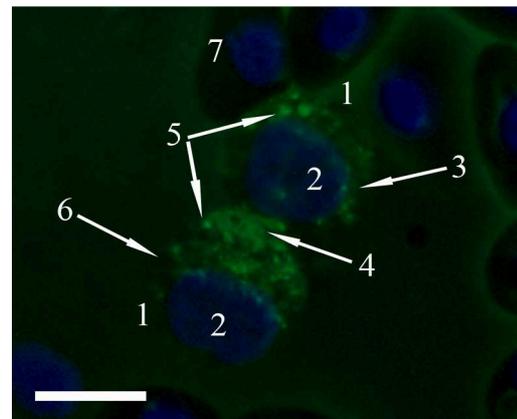
Eosinophiler Granulozyt (1), Monozyten (5) und Erythrozyten (6). Das Zytoplasma (3) und die Granula (4) des Eosinophilen stellen sich PSA-positiv dar. Zellkern (2). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 81:** Basophiler Granulozyt und Lymphozyt, PSA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 19, männlich, 22 Wochen.

Der Basophile (1) bindet das Lektin an den Granula (3). Zellkern (2). Die Zellmembran (5) des Lymphozyten (4) zeigt eine schwache Reaktion mit PSA. Heterophiler Granulozyt (6). Erythrozyten (7). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 82:** Monozyten, PSA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 23, männlich, 22 Wochen.

Die Monozyten (1) binden PSA mit schwacher (3) bis deutlicher Affinität (4) an das Zytoplasma. Deutliche Reaktion der Granula (5). Die Zellmembran stellt sich negativ dar (6). Zellkerne (2). Erythrozyten (7). SB = 10  $\mu\text{m}$

## **4.2 Für Galaktose spezifische Lektine**

### **4.2.1 Bindung von Peanut Agglutinin (PNA-FITC)**

In keinem der Blutaussstriche kann eine Reaktion von PNA-FITC mit den Blutzellen der Pute festgestellt werden.

### **4.2.2 Bindung von Ricinus communis Agglutinin (RCA-FITC)**

In keinem der Blutaussstriche kann eine Reaktion von RCA-FITC mit den Blutzellen der Pute festgestellt werden.

### **4.2.3 Bindung von Viscum album Agglutinin (VAA-Biotin-Streptavidin/FITC)**

In keinem der Blutaussstriche kann eine Reaktion von VAA-Biotin-Streptavidin/FITC mit den Blutzellen der Pute festgestellt werden.

## **4.3 Für N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure spezifische Lektine**

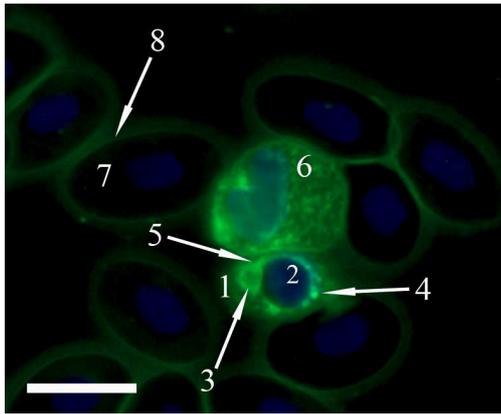
### **4.3.1 Bindung von Wheat germ Agglutinin (WGA-FITC)**

In allen neun auswertbaren Präparaten lässt sich eine Bindung des Lektins an die Zellmembran und meist auch an das Zytoplasma der Erythrozyten beobachten (vgl. Abb. 86). Die Thrombozyten weisen eine hohe Bindungsneigung zu WGA auf. Ihre Zellmembran stellt sich meist stark positiv dar, das Zytoplasma reagiert immer stark positiv. Es zeigt eine unregelmäßige Verteilung unterschiedlich stark leuchtender Anteile mit Verstärkung im Bereich um die zytoplasmatischen Vakuolen. Die Granula fluoreszieren stets stark positiv (vgl. Abb. 83). Die Affinität der Zellmembran der heterophilen Granulozyten zu WGA ist meist deutlich positiv. Ihr Zytoplasma reagiert intergranulär meist schwach positiv, seltener stark positiv. Heterophile Granula können stets mit variierender Intensität beobachtet werden. Häufig erscheint auch nur die Hülle der Granula stark fluoreszierend, wohingegen ihr Inhalt eine nur schwache bis keine Reaktion zeigt (vgl. Abb. 84). Eine Reaktion der eosinophilen Granulozyten wird oft beobachtet. Ihre Zellmembran geht meist eine Bindung mit dem Lektin ein, das Zytoplasma

hingegen nie. Die Hülle der Granula stellt sich in der Regel stark positiv dar, ihr Inhalt fluoresziert dagegen schwächer (vgl. Abb. 85). Die Membran der Basophilen ist in über der Hälfte der auswertbaren Präparate negativ. Dagegen zeigt das Zytoplasma zu 100 % eine schwach positive Reaktion. Granula der Basophilen fluoreszieren auch vor allem im Randbereich stark, das Innere leuchtet meist schwächer (vgl. Abb. 86, 87). Monozyten und Lymphozyten gehen stets eine Bindung mit WGA-FITC ein. Vor allem die, diffus im Zytoplasma der Monozyten unregelmäßig verteilten, Granula leuchten stark positiv (vgl. Abb. 88). Auch die Granula der Lymphozyten reagieren bei über der Hälfte der Tiere stark positiv. Andere zeigen keine Reaktion. Die Zellmembran der Lymphozyten bindet WGA stets mit starker Affinität (vgl. Abb. 89). In der folgenden Tabelle 24 sind die Bindungseigenschaften der Blutzellen der Pute aufgelistet.

Tabelle 24: Ergebnis der Auswertung: WGA-FITC

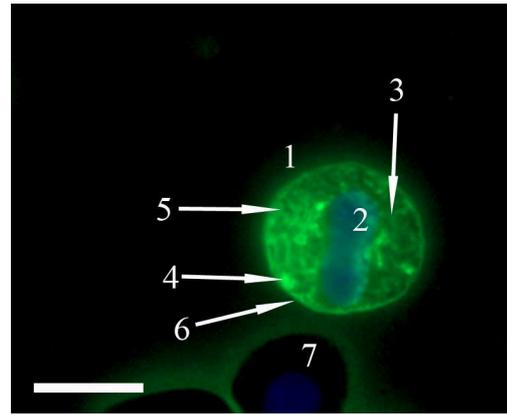
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	0%	0%	100%	0%	100%
Zytoplasma	33,3%	66,7%	0%	0%	66,7%
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	0%	11,1%	0%	88,9%	100%
Zytoplasma	0%	0%	0%	100%	100%
Granula	0%	0%	0%	100%	100%
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0%	0%	88,9%	11,1%	100%
Zytoplasma	0%	66,7%	0%	33,3%	100%
Granula	0%	33,3%	44,5%	22,2%	100%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	22,2%	22,2%	55,6%	0%	77,8%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	11,1%	0%	22,2%	66,7%	88,9%
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	55,6%	33,3%	11,1%	0%	44,4%
Zytoplasma	0%	100%	0%	0%	100%
Granula	0%	0%	11,1%	88,9%	100%
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	0%	22,2%	44,5%	33,3%	100%
Zytoplasma	0%	30%	40%	30%	100%
Granula	0%	0%	0%	100%	100%
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	0%	0%	0%	100%	100%
Zytoplasma	22,2%	44,5%	0%	33,3%	77,8%
Granula	33,3%	0%	11,1%	55,6%	66,7%



**Abbildung 83:** Erythrozyten und Thrombozyt, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 20, weiblich, 22 Wochen.

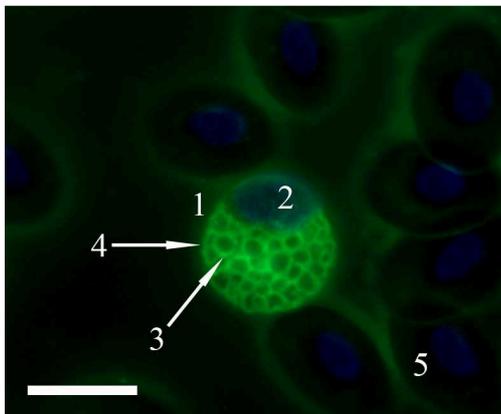
Der Thrombozyt (1) bindet WGA stark an Zellmembran (5), Zytoplasma (3) und den Granula (4). Zellkern (2). Deutliche Reaktion der Membran (8) der Erythrozyten (7). Heterophiler Granulozyt (6). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 84:** Heterophiler Granulozyt, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 20, weiblich, 22 Wochen.

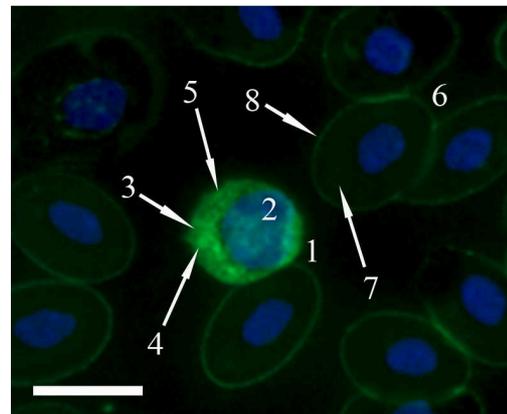
Der Heterophile (1) bindet WGA an der Membran (6) und mit schwacher (3) oder starker Affinität (4) im Zytoplasma. Granula reagieren im Bereich ihrer Hülle (5). Zellkern (2). Erythrozyten (7). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 85:** Eosinophiler Granulozyt, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 24, weiblich, 22 Wochen.

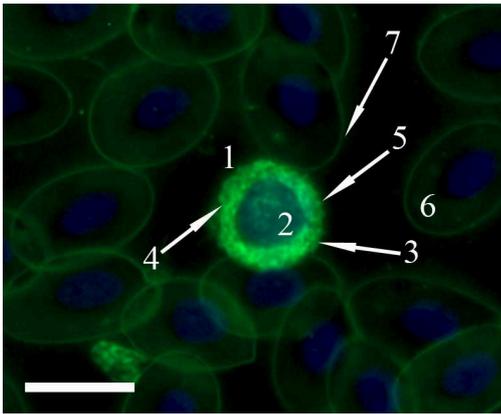
Der Eosinophile (1) bindet WGA-FITC an der Zellmembran (4). Starke Reaktion der Hülle der Granula (3). Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 86:** Basophiler Granulozyt, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 14, weiblich, 20 Wochen.

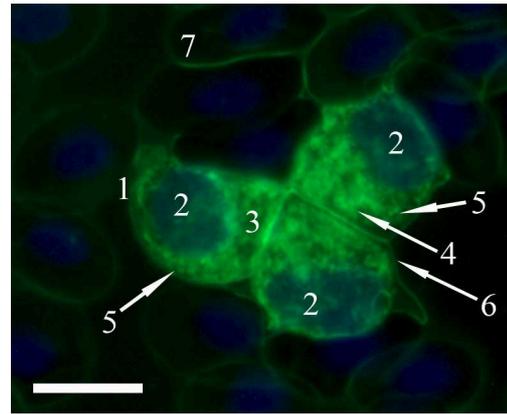
Zytoplasma (3) und Granula (4) des Basophilen (1) binden WGA, nicht so die Membran (5). Zellkern (2). Positive Reaktion der Membran (8) und des Zytoplasmas (7) der Erythrozyten (6). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 87:** Basophiler Granulozyt, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 19, männlich, 22 Wochen.

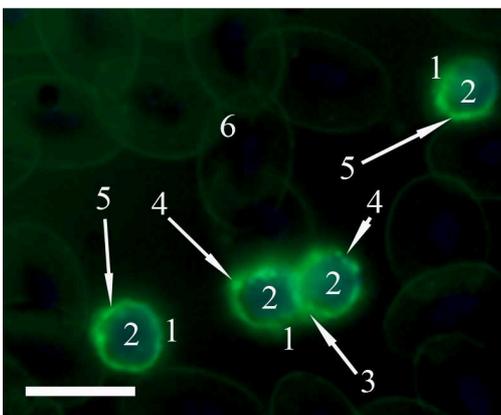
Basophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (6). Starke Reaktion der Hülle der Granula (4) des Basophilen. Das Zytoplasma reagiert schwach positiv (3), die Zellmembran stellt sich negativ dar (5). Zellkern (2). Die Membran (7) der Erythrozyten bindet WGA-FITC. SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 88:** Monozyten, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 20, weiblich, 22 Wochen.

Die Monozyten (1) binden das Lektin schwach (3) bis stark (4) im Zytoplasma. Die Granula stellen sich stark positiv dar (5). Auch die Zellmembran reagiert mit WGA (6). Zellkerne (2). Erythrozyten (7). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 89:** Lymphozyten, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 16, männlich, 22 Wochen.

Starke Bindung von WGA-FITC an das Zytoplasma (3), die Granula (4) und die Membran (5), der Lymphozyten (1). Zellkerne (2). Erythrozyten (6). SB = 10  $\mu\text{m}$

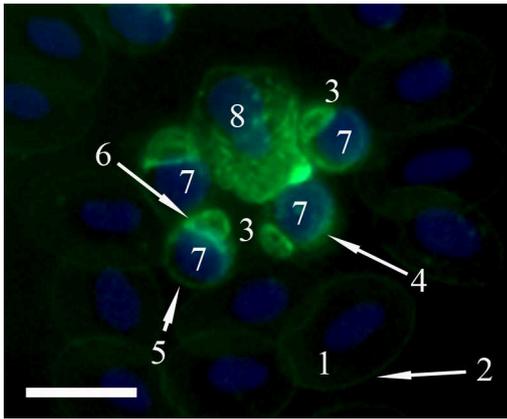
#### 4.4 Für N-Acetyl-Glukosamin spezifische Lektine

##### 4.4.1 Bindung von succinyliertem Wheat germ Agglutinin (WGAs-FITC)

In über der Hälfte der Ausstriche weist die Zellmembran der Erythrozyten eine schwach positive Reaktion mit dem Lektin auf, seltener reagiert sie negativ. Das Zytoplasma bindet WGAs in keinem Präparat (vgl. Abb. 90). Die Thrombozyten reagieren stets positiv. Dabei fluoresziert vor allem die Zellmembran deutlich bis stark, das Zytoplasma hingegen in variierender Intensität. Auffallend ist die Bindung ihrer zytoplasmatischen Vakuolen und Granula (vgl. Abb. 90). Seltener sind die Granula nicht zu sehen. In 100 % der Fälle geht die Membran der heterophilen Granulozyten eine deutliche oder starke Bindung zu WGAs ein. Ihr Zytoplasma ist ebenso stets positiv und reagiert intergranulär mit unterschiedlich starker Bindungsneigung zu WGAs. Nicht selten fallen hier einzelne, deutlich bis stark leuchtende Bereiche auf. Auch die Granula binden das Lektin (vgl. Abb. 91). Die Zellmembran der Eosinophilen reagiert immer mit dem Lektin, ebenso die Granula. Letztere fluoreszieren hauptsächlich im Bereich der Hülle, das Innere der Granula reagiert meist deutlich schwächer (vgl. Abb. 92). Basophile Granulozyten binden das Lektin selten an ihrer Zellmembran, das Zytoplasma weist dagegen häufig eine schwach positive Reaktion auf. Granula können in der Hälfte der Ausstriche beobachtet werden. Dabei stellt sich ihre Hülle meist stark positiv, der Granuluminhalt dagegen schwächer dar (vgl. Abb. 93). Die Membran der Monozyten ist stets WGAs-positiv, ebenso ihr Zytoplasma. Auch die Granula stellen sich meist stark positiv dar (vgl. Abb. 94). Die Zellmembran der Lymphozyten weist eine hohe Bindungsneigung zu WGAs auf (vgl. Abb. 96), das Zytoplasma ist bei über der Hälfte der Tiere ebenso positiv (vgl. Abb. 95). Zytoplasmatische Granula reagieren meist nicht mit dem Lektin, andere dagegen deutlich positiv (vgl. Abb. 95, 96). Tabelle 25 enthält eine Zusammenfassung der Bindungsneigung der Blutzellen der Pute zu WGAs.

Tabelle 25: Ergebnis der Auswertung: WGAs-FITC

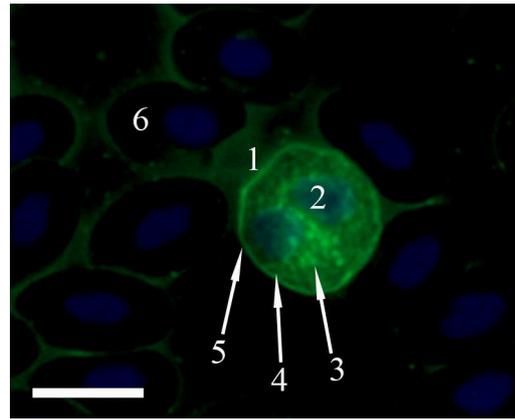
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	30%	60%	10%	0%	70%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	0%	0%	40%	60%	100%
Zytoplasma	0%	60%	20%	20%	100%
Granula	20%	0%	0%	80%	80%
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0%	0%	50%	50%	100%
Zytoplasma	0%	40%	50%	10%	100%
Granula	30%	40%	30%	0%	70%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	0%	0%	40%	60%	100%
Zytoplasma	60%	40%	0%	0%	40%
Granula	0%	0%	40%	60%	100%
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	80%	20%	0%	0%	20%
Zytoplasma	40%	60%	0%	0%	60%
Granula	50%	0%	20%	30%	50%
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	0%	30%	20%	50%	100%
Zytoplasma	0%	50%	0%	50%	100%
Granula	0%	0%	20%	80%	100%
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	10%	0%	30%	60%	90%
Zytoplasma	40%	50%	10%	0%	60%
Granula	70%	0%	30%	0%	30%



**Abbildung 90:** Erythrozyten und Thrombozyten, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 16, männlich, 22 Wochen.

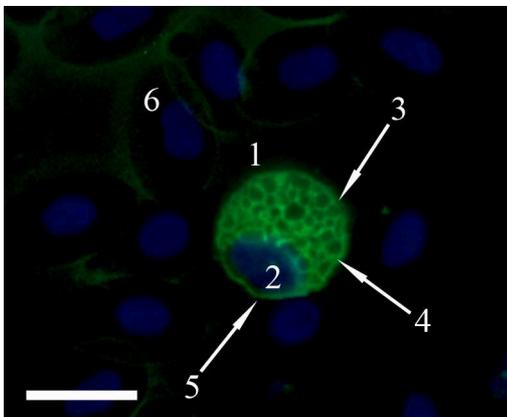
Die Erythrozyten (1) binden WGAs-FITC an ihrer Membran (2). Die Thrombozyten (3) zeigen eine Reaktion von Zytoplasma (4) und Zellmembran (5). Starke granuläre Reaktion (6). Zellkerne (7). Heterophiler (8). SB = 10 µm



**Abbildung 91:** Heterophiler Granulozyt, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 18, weiblich, 22 Wochen.

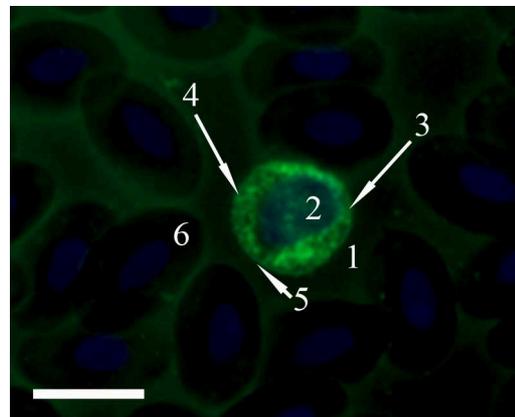
Die Zellmembran (5) des Heterophilen (1) zeigt eine deutliche Affinität zu WGAs, das Zytoplasma reagiert zum Teil stark (3). Die Granula binden WGAs deutlich an ihrer Hülle und schwach im Inneren (4). Zellkern (2). Erythrozyten (6). SB = 10 µm



**Abbildung 92:** Eosinophiler Granulozyt, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 23, männlich, 22 Wochen.

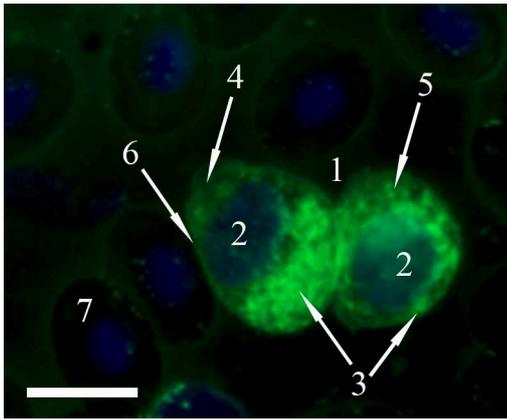
Zytoplasma (3) sowie Membran (5) des Eosinophilen (1) reagieren positiv. Starke Lektinbindung im Bereich der Hülle der Granula (4). Zellkern (2). Erythrozyten (6). SB = 10 µm



**Abbildung 93:** Basophiler Granulozyt, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 18, weiblich, 22 Wochen.

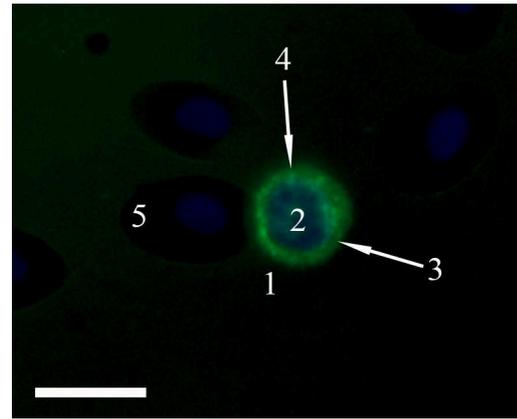
Schwache Reaktion von Zytoplasma (3) und Membran (5) des Basophilen (1). Die Granula binden WGAs vor allem an ihrer Hülle (4). Zellkern (2). Erythrozyten (6). SB = 10 µm



**Abbildung 94:** Monozyten, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 17, weiblich, 22 Wochen.

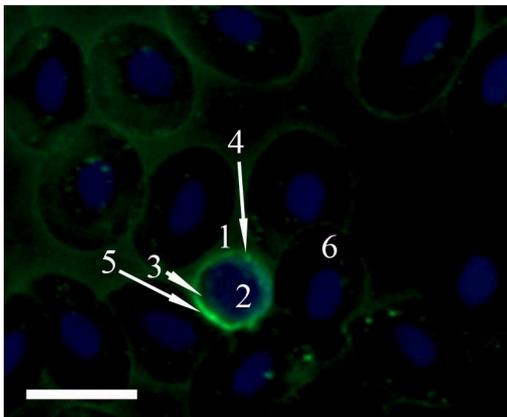
Schwache (4) oder starke (3) Reaktion des Zytoplasmas der Monozyten (1). Die Granula (5) gehen eine starke Bindung mit WGAs-FITC ein. Die Zellmembran reagiert schwach positiv (6). Zellkerne (2). Erythrozyten (7). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 95:** Lymphozyt, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 20, weiblich, 22 Wochen.

Der Lymphozyt (1) zeigt eine schwache Reaktion des Zytoplasmas (3), welches deutlich fluoreszierende Granula (4) enthält. Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 96:** Lymphozyt, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 17, weiblich, 22 Wochen.

Dieser Lymphozyt (1) weist eine stark reagierende Zellmembran (5) auf. Das Zytoplasma (3) bindet WGAs-FITC nicht. Deutlich positive granuläre Reaktion (4). Zellkern (2). Erythrozyten (6). SB = 10  $\mu\text{m}$

## **4.5 Für N-Acetyl-Galaktosamin spezifische Lektine**

### **4.5.1 Bindung von Griffonia simplicifolia Agglutinin-I (GSL-I-FITC)**

In keinem der Blutausrichthe kann eine Reaktion von GSL-I-FITC mit den Blutzellen der Pute festgestellt werden.

### **4.5.2 Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA-FITC)**

In keinem der Blutausrichthe kann eine Reaktion von DBA-FITC mit den Blutzellen der Pute festgestellt werden.

### **4.5.3 Bindung von Soybean Agglutinin (SBA-FITC)**

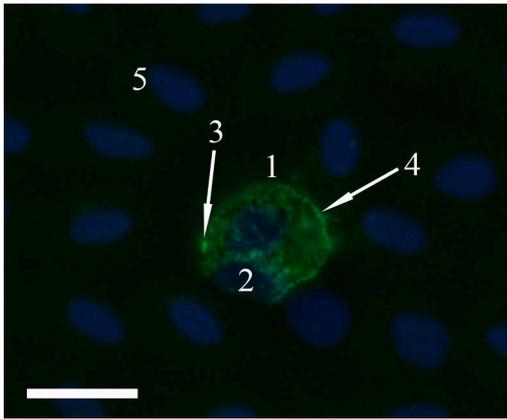
In keinem der Blutausrichthe kann eine Reaktion von SBA-FITC mit den Blutzellen der Pute festgestellt werden.

### **4.5.4 Bindung von Saphora japonica Agglutinin (SJA-Biotin-Streptavidin/FITC)**

In allen sieben auswertbaren Präparaten kann eine Bindung der heterophilen Granulozyten an SJA nachgewiesen werden. Ihre Zellmembran reagiert manchmal stark positiv (vgl. Abb. 97), stellt sich aber auch negativ dar. Die Reaktion des Zytoplasmas variiert, meist ist sie stark positiv und kann als punktförmige Fluoreszenz mit diffuser, ungleichmäßiger Verteilung im gesamten Zytoplasma beobachtet werden (vgl. Abb. 97, 98). Zytoplasmatische Granula binden nicht an SJA. Alle anderen Blutzellen der Pute stellen sich ausnahmslos negativ dar. Folgende Tabelle 26 fasst die Bindungsneigung der Blutzellen der Pute zu SJA zusammen.

Tabelle 26: Ergebnis der Auswertung: SJA-Biotin-Streptavidin/FITC

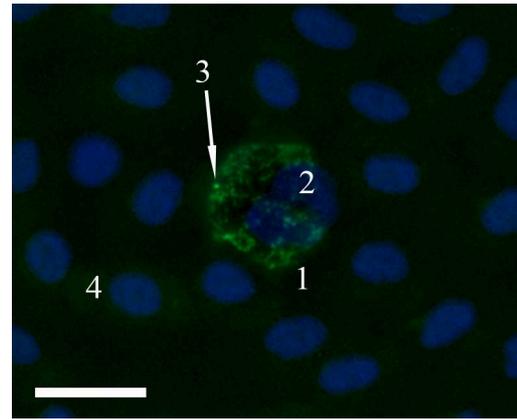
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	57,1%	0%	0%	42,9%	42,9%
Zytoplasma	0%	14,3%	14,3%	71,4%	100%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%



**Abbildung 97:** Heterophiler Granulozyt, SJA-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 28, männlich, 22 Wochen.

Der heterophile Granulozyt (1) zeigt eine stark positive Reaktion der Zellmembran (4). Das Zytoplasma weist eine punktförmige Fluoreszenz auf (3). Zellkern (2). Die Erythrozyten reagieren nicht mit SJA (5).  
SB = 10 µm



**Abbildung 98:** Heterophiler Granulozyt, SJA-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 29, weiblich, 22 Wochen.

Heterophiler Granulozyt (1) und Erythrozyten (4). Das Zytoplasma (3) des Heterophilen stellt sich SJA-positiv dar. Zellkern (2). SB = 10 µm

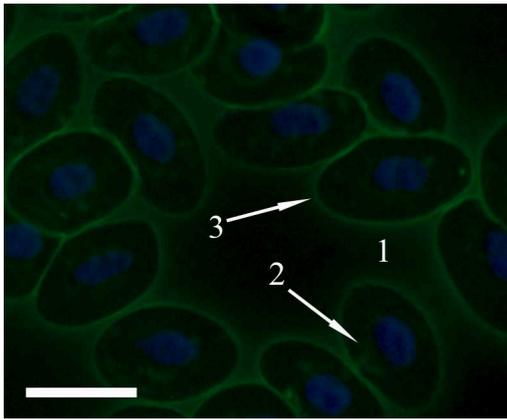
#### 4.6 Für Galaktose und N-Acetyl-Galaktosamin spezifische Lektine

##### 4.6.1 Bindung von Sambucus nigra Agglutinin (SNA-Biotin-Streptavidin/FITC)

Die Erythrozyten binden SNA in fast allen neun auswertbaren Ausstrichen mit unterschiedlich positiver Intensität an der Zellmembran. Das Zytoplasma reagiert negativ bis schwach positiv (vgl. Abb. 99). Auch manche Heterophile weisen eine Bindungsneigung zu SNA auf. Schwach bis deutlich positiv binden sie das Lektin an ihrer Zellmembran (vgl. Abb. 100), die Granula und das Zytoplasma reagieren schwach positiv (vgl. Abb. 101). Andere Heterophile stellen sich negativ dar. Auch die Lymphozyten zeigen in wenigen Präparaten eine positive Reaktion. Dabei fällt vor allem die stark fluoreszierende Zellmembran auf (vgl. Abb. 102). Die meisten Lymphozyten gehen jedoch keine Bindung mit dem Lektin ein. In keinem der Ausstriche kann eine Reaktion der anderen Blutzellen mit SNA nachgewiesen werden. Tabelle 27 zeigt die Reaktion der Blutzellen der Pute.

Tabelle 27: Ergebnis der Auswertung: SNA-Biotin-Streptavidin/FITC

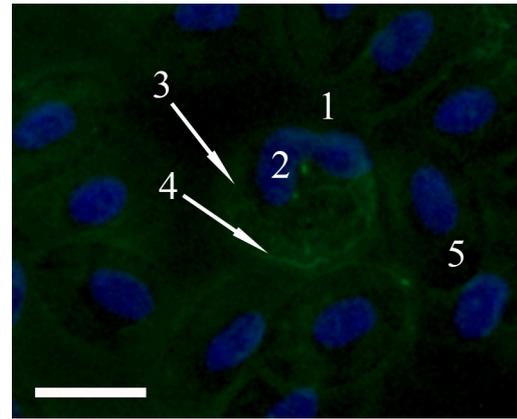
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	11,1%	33,3%	33,3%	22,2%	88,9%
Zytoplasma	44,4%	55,6%	0%	0%	55,6%
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	66,7%	11,1%	22,2%	0%	33,3%
Zytoplasma	88,9%	11,1%	0%	0%	11,1%
Granula	66,7%	33,3%	0%	0%	33,3%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	55,6%	0%	11,1%	33,3%	44,4%
Zytoplasma	88,9%	11,1%	0%	0%	11,1%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%



**Abbildung 99:** Erythrozyten, SNA-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 20, weiblich, 22 Wochen.

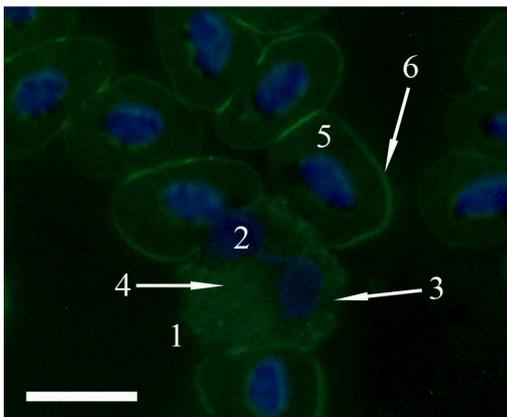
Die Erythrozyten (1) binden das Lektin an ihrer Zellmembran (3) und schwach im Zytoplasma (2).  
SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 100:** Heterophiler Granulozyt, SNA-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 20, weiblich, 22 Wochen.

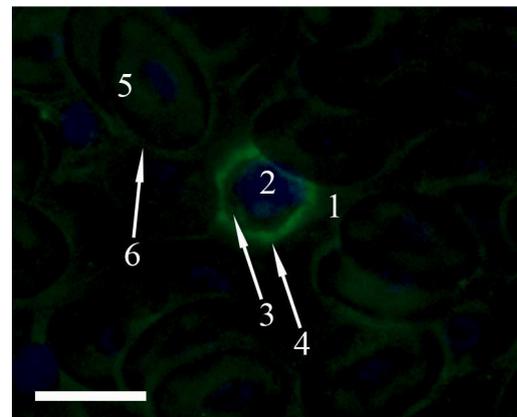
Die Membran (4) und das Zytoplasma (3) des Heterophilen (1) reagieren mit SNA. Zellkern (2). Erythrozyten (5).  
SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 101:** Heterophiler Granulozyt, SNA-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 21, männlich, 22 Wochen.

Dieser Heterophile (1) zeigt eine schwache Lektinbindung an die Granula (4) und das Zytoplasma (3). Zellkern (2). Positive Reaktion der Erythrozytenmembran (6) und des Zytoplasmas (5). SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 102:** Lymphozyt, SNA-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 19, männlich, 22 Wochen.

Die Membran (4) des Lymphozyten (1) zeigt eine starke Reaktion mit dem Lektin. Das Zytoplasma (3) fluoresziert schwach positiv. Zellkern (2). Erythrozyten (5) mit Reaktion der Zellmembran (6). SB = 10  $\mu\text{m}$

## **4.7 Für L-Fukose spezifische Lektine**

### **4.7.1 Bindung von *Ulex europaeus* Agglutinin-I (UEA-I-FITC)**

In keinem der Blutaussstriche kann eine Reaktion von UEA-I-FITC mit den Blutzellen der Pute festgestellt werden.

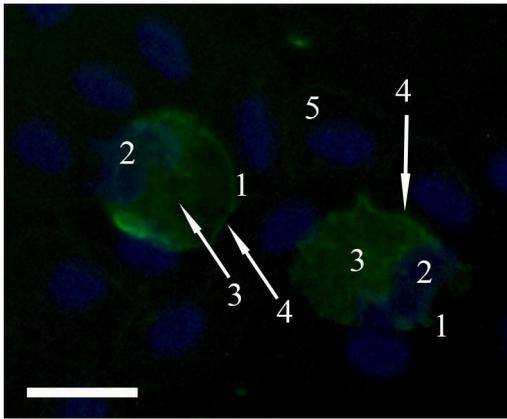
## **4.8 Oligosaccharid-bindende Lektine**

### **4.8.1 Bindung von *Phaseolus vulgaris* Erythroagglutinin (PHA-E-FITC)**

Nur sechs der 14 angefertigten Blutaussstriche weisen eine positive Reaktion auf. Dabei kann in einem Präparat eine schwache Bindung an die Zellmembran und das Zytoplasma der Erythrozyten beobachtet werden (vgl. Abb. 106). In allen anderen Ausstrichen stellen sich die roten Blutzellen negativ dar (vgl. Abb. 103, 104, 105). In der Hälfte der positiven Präparate hat die Membran der heterophilen Granulozyten eine schwache bis deutliche Affinität zu PHA-E, das Zytoplasma reagiert selten schwach positiv (vgl. Abb. 103). Die Granula binden das Lektin oftmals auch nur teilweise mit schwacher bis deutlicher Affinität (vgl. Abb. 104). In nur einem Ausstrich wird eine deutliche Lektinbindung an die Hülle und eine schwächere Reaktion des Inneren der Granula der Eosinophilen beobachtet. Das Zytoplasma bindet schwach, die Zellmembran nicht an PHA-E (vgl. Abb. 105). Auch die Lymphozyten reagieren mit dem Lektin. Dabei fluoresziert die Zellmembran deutlich, das Zytoplasma nur schwach positiv. Granula können nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 106). Die Thrombozyten, basophilen Granulozyten und Monozyten zeigen keine Reaktion. Tabelle 28 enthält eine Zusammenfassung der Bindungseigenschaften der Blutzellen der Pute.

Tabelle 28: Ergebnis der Auswertung: PHA-E-FITC

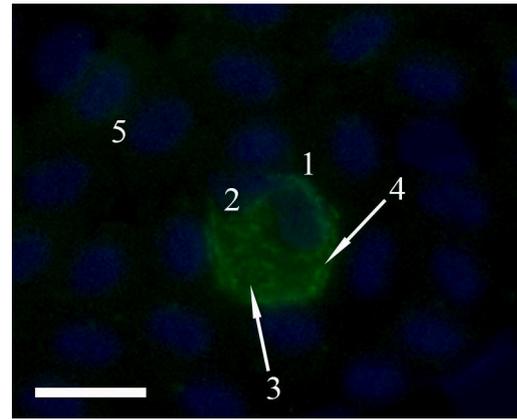
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	92,9%	7,1%	0%	0%	7,1%
Zytoplasma	92,9%	7,1%	0%	0%	7,1%
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	78,6%	7,1%	14,3%	0%	21,4%
Zytoplasma	85,7%	14,3%	0%	0%	14,3%
Granula	64,3%	21,4%	14,3%	0%	35,7%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	92,9%	7,1%	0%	0%	7,1%
Granula	92,9%	0%	7,1%	0%	7,1%
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	85,7%	0%	14,3%	0%	14,3%
Zytoplasma	92,9%	7,1%	0%	0%	7,1%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%



**Abbildung 103:** Heterophile Granulozyten, PHA-E-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 31, weiblich, 18 Wochen.

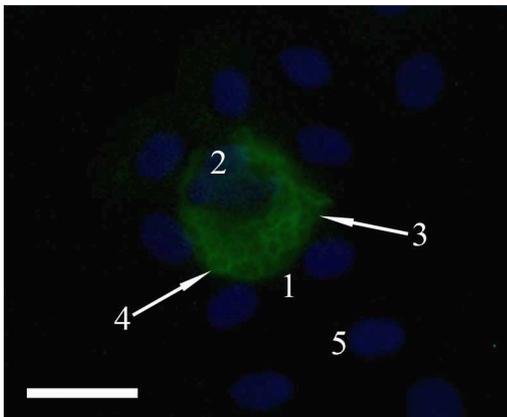
Die Heterophilen (1) zeigen eine schwache Bindung des Lektins im Zytoplasma (3) sowie eine deutliche Fluoreszenz der Membran (4). Zellkerne (2). Die Erythrozyten stellen sich negativ dar (5). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 104:** Heterophiler Granulozyt, PHA-E-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 32, weiblich, 18 Wochen.

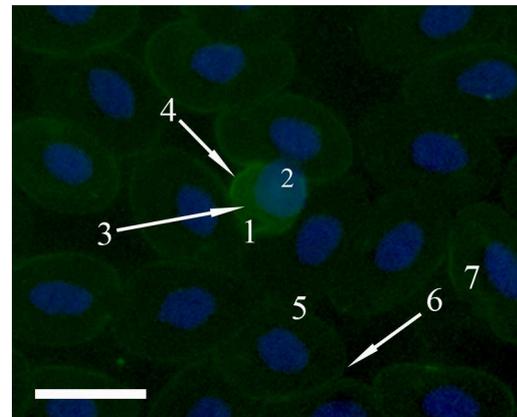
Im schwach positiven Zytoplasma (3) dieses Heterophilen (1) können deutlich reagierende Granula (4) beobachtet werden. Zellkern (2). PHA-E-FITC-negative Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 105:** Eosinophiler Granulozyt, PHA-E-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 32, weiblich, 18 Wochen.

Der Eosinophile (1) bindet PHA-E-FITC mit deutlicher Affinität an die Hülle und schwächer an das Innere der Granula (4). Schwache Reaktion des Zytoplasmas (3). Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 106:** Lymphozyt und Erythrozyten, PHA-E-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 32, weiblich, 18 Wochen.

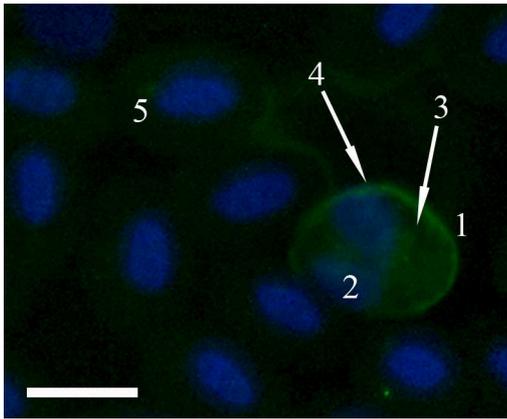
Die Membran (4) des Lymphozyten (1) reagiert deutlich, das Zytoplasma (3) schwach mit dem Lektin. Zellkern (2). PHA-E-FITC bindet an die Zellmembran (6) und das Zytoplasma (7) der Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m

#### **4.8.2 Bindung von Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L-FITC)**

Von den 14 angefertigten Ausstrichen konnten in nur fünf positive Reaktionen festgestellt werden. Lediglich die heterophilen und eosinophilen Granulozyten binden das Lektin. Dabei stellt sich die Zellmembran der Heterophilen deutlich positiv dar (vgl. Abb. 107). Die Granula zeigen eine schwache Affinität zu PHA-L. Die Reaktion der Eosinophilen betrifft vor allem die zytoplasmatischen Granula, die das Lektin mit deutlicher bis starker Intensität binden (vgl. Abb. 108, 109). Andere stellen sich negativ dar. Das Zytoplasma fluoresziert mit schwacher oder deutlich positiver Intensität (vgl. Abb. 108, 109). Die Zellmembran reagiert selten deutlich positiv. Tabelle 29 fasst die Bindungseigenschaften der Blutzellen der Pute zusammen.

Tabelle 29: Ergebnis der Auswertung: PHA-L-FITC

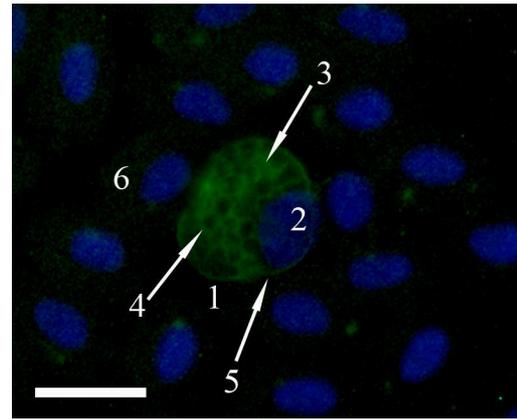
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	85,7%	0%	14,3%	0%	14,3%
Zytoplasma	85,7%	14,3%	0%	0%	14,3%
Granula	85,7%	14,3%	0%	0%	14,3%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	92,9%	0%	7,1%	0%	7,1%
Zytoplasma	78,6%	14,3%	7,1%	0%	21,4%
Granula	78,6%	0%	7,1%	14,3%	21,4%
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%



**Abbildung 107:** Heterophiler Granulozyt, PHA-L-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 31, weiblich, 18 Wochen.

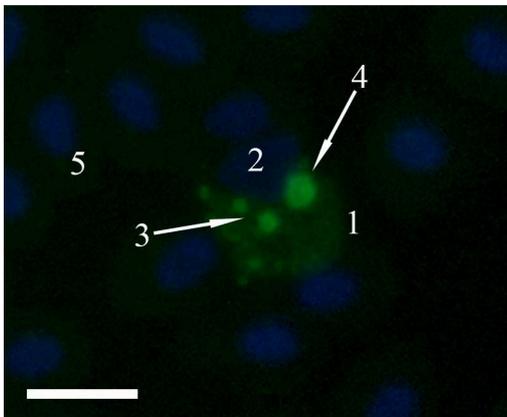
Der Heterophile (1) zeigt eine deutliche Fluoreszenz der Membran (4). Das Zytoplasma (3) stellt sich schwach positiv dar. Zellkern (2). Die Erythrozyten reagieren nicht mit PHA-L-FITC (5). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 108:** Eosinophiler Granulozyt, PHA-L-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 30, weiblich, 18 Wochen.

Der Eosinophile (1) enthält Granula mit deutlich fluoreszierender Hülle (4). Positive Reaktion des Zytoplasmas (3) und der Zellmembran (5). Zellkern (2). Erythrozyten (6). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 109:** Eosinophiler Granulozyt, PHA-L-FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 31, weiblich, 18 Wochen.

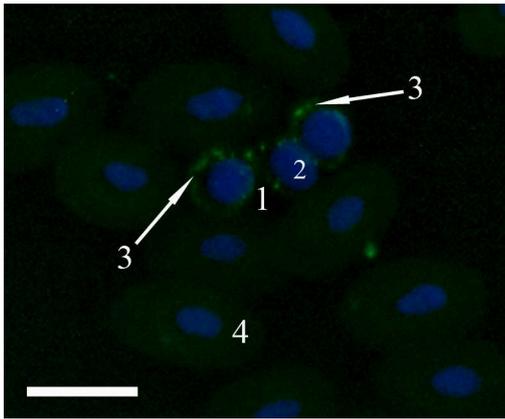
Dieser Eosinophile (1) zeigt eine Bindung des Lektins im gesamten Granulum (4). Schwache Reaktion des Zytoplasmas (3). Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m

### **4.8.3 Bindung von *Maackia amurensis* Agglutinin-I (MAA-I-Biotin-Streptavidin/FITC)**

In den sechs auswertbaren Präparaten gehen die Granula der Thrombozyten häufig eine deutliche Bindung mit dem Lektin ein, das Zytoplasma und die Zellmembran zeigen dagegen keine Reaktion (vgl. Abb. 110). Das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten weist eine schwache bis deutliche Affinität zu MAA-I auf (vgl. Abb. 111). Die Zellmembran und zytoplasmatischen Granula reagieren dagegen immer negativ. Auch die Lymphozyten binden das Lektin am Zytoplasma und den Granula (vgl. Abb. 112). Andere Lymphozyten stellen sich negativ dar. Tabelle 30 zeigt die Reaktion der Blutzellen der Pute.

Tabelle 30: Ergebnis der Auswertung: MAA-I-Biotin-Streptavidin/FITC

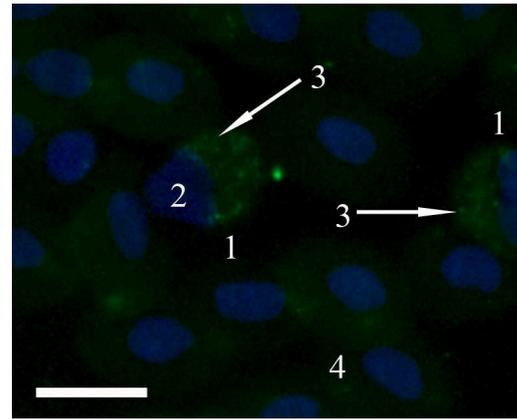
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Thrombozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	16,7%	0%	83,3%	0%	83,3%
<b>Heterophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	33,3%	50%	16,7%	0%	66,7%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Basophile Granulozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Monozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	100%	0%	0%	0%	0%
Granula	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Lymphozyten</b>					
Zellmembran	100%	0%	0%	0%	0%
Zytoplasma	50%	50%	0%	0%	50%
Granula	50%	33,3%	16,7%	0%	50%



**Abbildung 110:** Thrombozyten, MAA-I-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 25, weiblich, 22 Wochen.

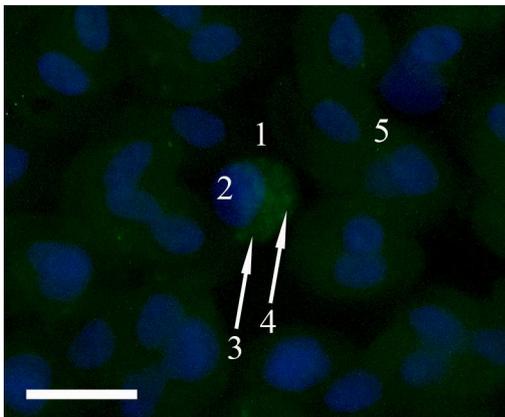
Die Granula (3) der Thrombozyten (1) gehen eine deutliche Bindung mit dem Lektin ein. Zellkern (2). Die Erythrozyten reagieren nicht mit MAA-I (4). SB = 10 µm



**Abbildung 111:** Heterophile Granulozyten, MAA-I-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 24, weiblich, 22 Wochen.

Positive Reaktion des Zytoplasmas (3) der Heterophilen (1). Exzentrisch gelagerter Zellkern (2). Erythrozyten (4). SB = 10 µm



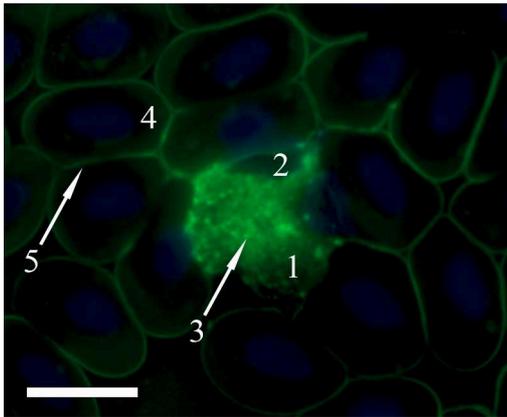
**Abbildung 112:** Lymphozyt, MAA-I-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 21, männlich, 22 Wochen.

Der Lymphozyt (1) zeigt eine Bindung des Lektins im Zytoplasma (3). Positiv reagierende Granula (4). Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10 µm

#### 4.9 Ergebnisse der Hemmzucker-Vorbehandlung

Nach Vorbehandlung mit den für sie spezifischen Hemmzuckern, kann für die Lektine ConA (vgl. Abb. 113, 114), LCA, WGA (vgl. Abb. 115, 116) und WGAs eine deutlich schwächere Bindung als in den gleichzeitig angefertigten Positivkontrollen festgestellt werden. PSA reagiert im Gegensatz zum Kontrollausstrich nach Hemmzucker-Vorbehandlung nicht mit den Blutzellen der Pute.

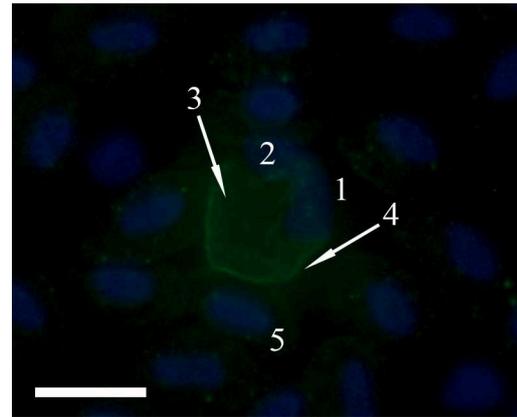


**Abbildung 113:** Heterophiler Granulozyt und Erythrozyten, ConA-FITC ohne Hemmzucker-Vorbehandlung, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 27, weiblich, 22 Wochen.

Das Zytoplasma (3) des Heterophilen (1) zeigt eine stark positive Reaktion. Zellkern (2). Die Zellmembran (5) der Erythrozyten (4) bindet das Lektin mit deutlich bis starker Affinität.

SB = 10  $\mu$ m

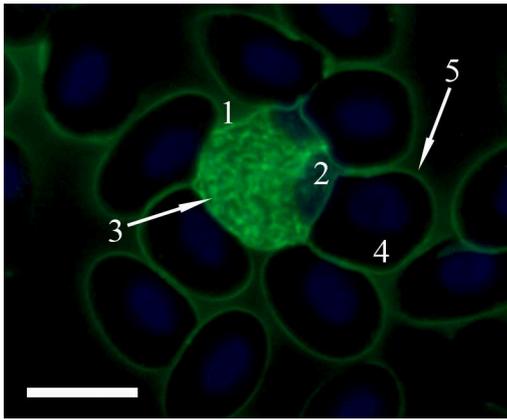


**Abbildung 114:** Heterophiler Granulozyt und Erythrozyten, ConA-FITC mit Hemmzucker-Vorbehandlung, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 28, männlich, 22 Wochen.

Der Heterophile Granulozyt (1) weist nur noch eine schwache Reaktion des Zytoplasmas (3) auf. Die Zellmembran reagiert noch deutlich (4). Zellkern (2). Die Erythrozyten binden das Lektin teilweise noch schwach im Zytoplasma (5).

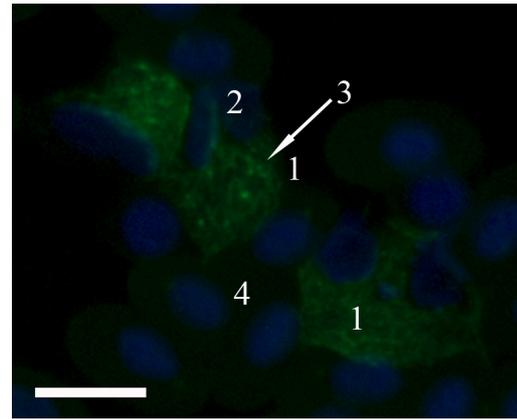
SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 115:** Heterophiler Granulozyt und Erythrozyten, WGA-FITC ohne Hemmzucker-Vorbehandlung, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 29, weiblich, 22 Wochen.

Der Heterophile (1) zeigt eine starke Reaktion der zytoplasmatischen Granula (3). Zellkern (2). Die Membran (5) der Erythrozyten (4) bindet WGA-FITC mit deutlicher Affinität. SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 116:** Heterophile Granulozyten und Erythrozyten, WGA-FITC mit Hemmzucker-Vorbehandlung, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 25, weiblich, 22 Wochen.

Die Reaktion der Granula (3) des Heterophilen (1) kann nur noch als schwach bis deutlich eingestuft werden. Die Erythrozyten (4) zeigen keine Bindung mehr an WGA-FITC. SB = 10  $\mu$ m

#### 4.10 Ergebnisse der Neuraminidase-Vorbehandlung

Die Bindungseigenschaften der bereits als negativ eingestuften Lektine DBA, GSL-I, PNA, SBA und VAA wurden an mit Neuraminidase vorbehandelten Blutaussstrichen getestet. Keines der Lektine zeigt nach Vorbehandlung mit dem Enzym eine Reaktion mit den Blutzellen der Pute.

## 5 Immunzytochemische Untersuchungen

### 5.1 Immunzytochemischer Nachweis der T-Lymphozyten-Antigene

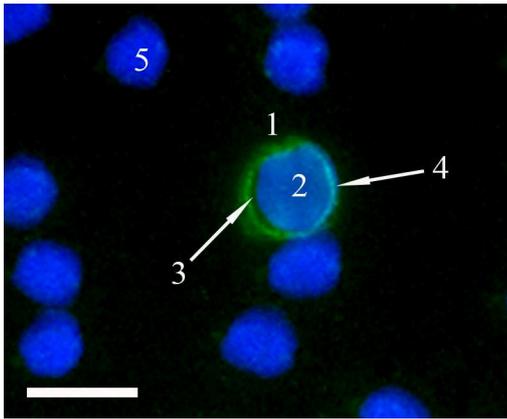
Zum Nachweis dienten pro Antigen die Ausstriche von je zehn Tieren. Die Reaktion wird in Tabellen zusammengefasst und die jeweilige „Stärke der Reaktion“ in (0) für keine, (+) für eine schwach positive, (++) für eine deutlich positive und (+++) für eine stark positive Reaktion unterteilt.

#### 5.1.1 Bindung des CD8 $\alpha$ -Antikörpers

In allen zehn Blutausstrichen kann eine Bindung des Antikörpers an die T-Lymphozyten festgestellt werden. Dabei stellt sich ihre Membran häufig stark positiv dar (vgl. Abb. 117). Andere Lymphozyten scheinen den Antikörper auch im Bereich des Zytoplasmas zu binden, welches sich entweder diffus schwach positiv anfärbt (vgl. Abb. 118) oder deutlich bis stark positive, punktförmig fluoreszierende Reaktionen aufweist (vgl. Abb. 119). Daneben kommen auch Lymphozyten vor, deren Zellmembran negativ, das Zytoplasma dagegen positiv reagiert. Die folgende Tabelle 31 beschreibt das Reaktionsverhalten der Lymphozyten.

Tabelle 31: Auswertung der T-Lymphozyten-Antigene: CD8 $\alpha$

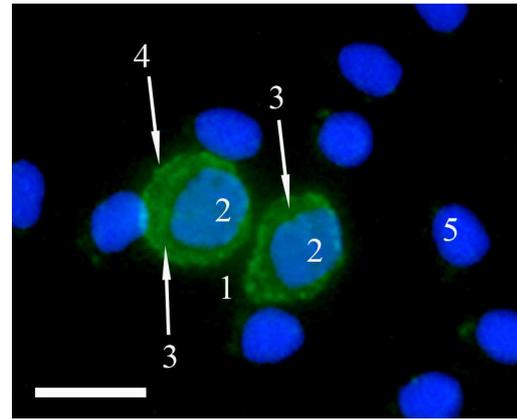
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>T-Lymphozyten</b>	0%	15%	15%	70%	100%



**Abbildung 117:** Lymphozyt, Anti-CD8 $\alpha$  (FITC), Kernfärbung mit DAPI.

Pute 7, weiblich, 20 Wochen.

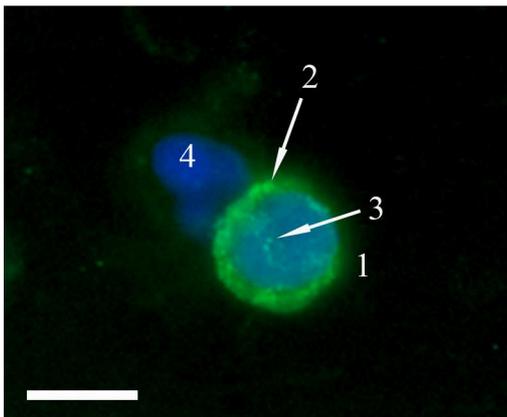
Der Lymphozyt (1) zeigt eine starke Reaktion der Zellmembran (4). Das Zytoplasma bindet den Antikörper nicht (3). Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 118:** Lymphozyten, Anti-CD8 $\alpha$  (FITC), Kernfärbung mit DAPI.

Pute 12, männlich, 20 Wochen.

Diese Lymphozyten (1) binden den Antikörper schwach im Zytoplasma (3). Die Membran zeigt ebenso eine Reaktion (4). Zellkerne (2). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 119:** Lymphozyt, Anti-CD8 $\alpha$  (FITC), Kernfärbung mit DAPI.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

Der Lymphozyt (1) bindet Anti-CD8 $\alpha$  im Zytoplasma (2). Punktförmige Fluoreszenz, die zum Teil den Zellkern bedeckt (3). Erythrozyt (4). SB = 10  $\mu$ m

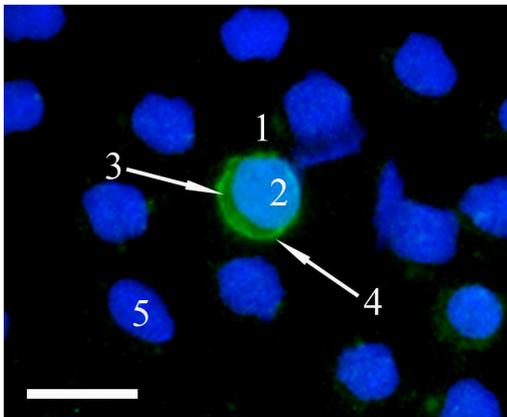
### 5.1.2 Bindung des CD4-Antikörpers

Nicht alle Blutausstriche reagierten positiv mit dem CD4-Antikörper. Außerdem zeigte sich eine starke Beeinflussung vom Zeitpunkt der Anfertigung der Blutausstriche. Es konnten nur ganz frische Ausstriche verwendet werden.

Die Lymphozyten zeigen eine schwache bis starke Reaktion ihrer Zellmembran und auch das Zytoplasma scheint eine schwache Bindung mit dem Antikörper einzugehen (vgl. Abb. 120). Selten können punktförmig fluoreszierende Strukturen beobachtet werden, die manchmal den Zellkern überlagern (vgl. Abb. 121). Tabelle 32 fasst das Bindungsverhalten der Lymphozyten zusammen.

Tabelle 32: Auswertung der T-Lymphozyten-Antigene: CD4

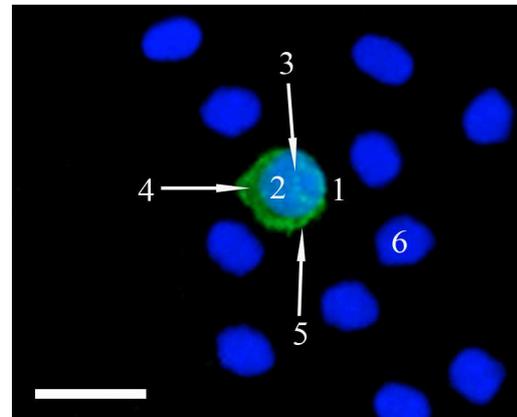
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>T-Lymphozyten</b>	50%	20%	10%	20%	50%



**Abbildung 120:** Lymphozyt, Anti-CD4 (FITC), Kernfärbung mit DAPI.

Pute 6, weiblich, 20 Wochen.

Das Zytoplasma (3) und die Membran (4) des Lymphozyten (1) gehen eine Bindung mit dem Antikörper ein. Zellkern (2). Erythrozyten (5).  
SB = 10 µm



**Abbildung 121:** Lymphozyt, Anti-CD4 (FITC), Kernfärbung mit DAPI.

Pute 8, weiblich, 20 Wochen.

Dieser Lymphozyt (1) zeigt punktförmige Reaktionen (3), die den Zellkern (2) überlagern. Das Zytoplasma (4) und die Zellmembran (5) gehen eine Bindung mit Anti-CD4-FITC ein. Erythrozyten (6).  
SB = 10 µm

## 5.2 Immunzytochemischer Nachweis von Eosinophil major basic protein

In keinem der Blutausstriche kann eine Bindung des Antikörpers an die eosinophilen Granulozyten der Pute festgestellt werden. Auch alle anderen Zellen reagieren negativ.

## 6 Zytoskelett

Das Zytoskelett der Blutzellen wurde anhand von je zwei Blutausstrichen von fünf Tieren untersucht. Bindungsreaktionen sind in Tabellen zusammengefasst. Die „Stärke der Reaktion“ wird in keine (0), eine schwach positive (+), deutlich positive (++) und stark positive Reaktion (+++) unterteilt und beschreibt den prozentualen Anteil der auswertbaren Präparate, die diese Bindungsstärke zeigen. Die „Anzahl der positiven Präparate“ führt den prozentualen Anteil der auswertbaren Blutausstriche auf, bei denen ein Binden von Phalloidin-TRITC bzw. der Antikörper an die jeweilige Zelle nachgewiesen werden kann.

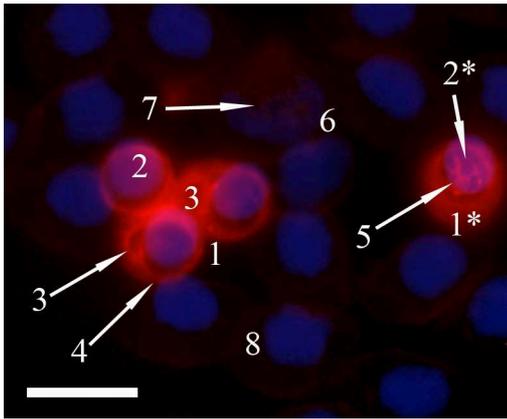
### 6.1 Aktin

Die zuvor in Methanol fixierten Blutausstriche stellen sich ausnahmslos negativ dar. Dagegen fallen bei Betrachtung der unfixierten Ausstriche positive Reaktionen der Zellen auf. Der Bereich der Zellmembran der Erythrozyten reagiert nur schwach und nicht immer mit Phalloidin-TRITC (vgl. Abb. 123, 125). Die Thrombozyten zeigen häufig eine deutliche Affinität mit Bindung im Bereich der Zellmembran und im Zytoplasma, welches oftmals von fädigen Strukturen durchzogen wird, die den Zellkern überlagern. Aktinfilamente scheinen auch die zytoplasmatischen Vakuolen zu umgeben (vgl. Abb. 122). In allen Präparaten kann eine Bindung von Phalloidin an die heterophilen Granulozyten nachgewiesen werden, deren Zytoplasma ein wabenartiges Muster aufweisen kann (vgl. Abb. 123). Manchmal finden sich darin auch punktförmige Strukturen stärkerer Fluoreszenz (vgl. Abb. 124). Nicht immer reagiert der Zellmembran-Bereich der Heterophilen. Eine Reaktion der basophilen Granulozyten kann nicht in allen Ausstrichen beobachtet werden. Dabei fällt im Zytoplasma ein

netzförmiges Muster auf, das auch den Zellkern überlagert (vgl. Abb. 125). Lymphozyten binden Phalloidin stets mit netzwerkartiger Verteilung im Zytoplasma. Zudem wird ihr Zellkern manchmal von punktförmigen bis fädigen Strukturen überlagert und auch der Bereich der Zellmembran zeigt eine Reaktion mit Phalloidin-TRITC (vgl. Abb. 125). Das Zytoplasma der Monozyten reagiert nur schwach (vgl. Abb. 122). Meist stellt es sich jedoch negativ dar. Die eosinophilen Granulozyten reagieren nicht mit Phalloidin-TRITC. In der Tabelle 33 sind die Bindungseigenschaften der Blutzellen der Pute zusammengefasst.

Tabelle 33: Auswertung Zytoskelett: Aktin (unfixiert)

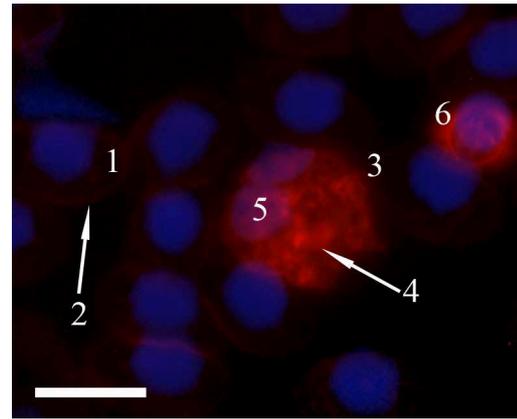
	<b>Stärke der Reaktion</b>				<b>Anzahl der positiven Präparate</b>
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>	40%	60%	0%	0%	60%
<b>Thrombozyten</b>	60%	0%	0%	40%	40%
<b>Heterophile Granulozyten</b>	0%	0%	50%	50%	100%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Basophile Granulozyten</b>	60%	20%	20%	0%	40%
<b>Monozyten</b>	80%	20%	0%	0%	20%
<b>Lymphozyten</b>	0%	0%	0%	100%	100%



**Abbildung 122:** Thrombozyten und Monozyt, Phalloidin-TRITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 5, männlich, 24 Wochen.

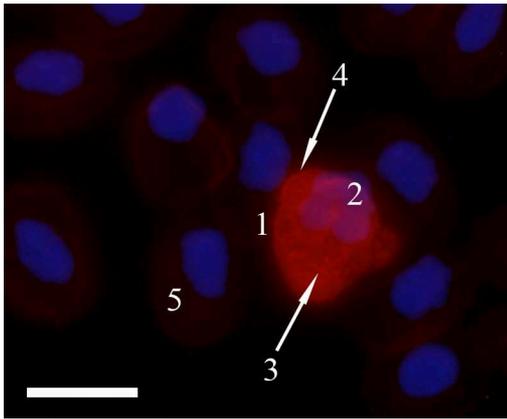
Die Thrombozyten (1) reagieren im Bereich der zytoplasmatischen Vakuolen (3) und der Membran (4). Zellkern (2). Das Zytoplasma eines Thrombozyten (1\*) wird von Aktinfilamenten durchzogen (5), die den Kern (2\*) überlagern. Schwache Reaktion des Zytoplasmas (7) des Monozyten (6). Erythrozyten (8).  
SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 123:** Heterophiler Granulozyt und Erythrozyten, Phalloidin-TRITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 5, männlich, 24 Wochen.

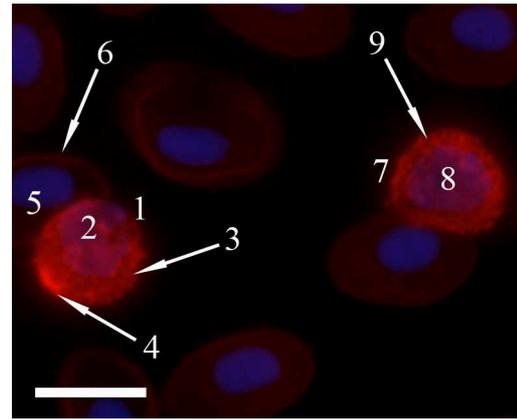
Schwache Reaktion der Membran (2) der Erythrozyten (1). Der Heterophile (3) weist ein wabenartiges Reaktionsmuster im Zytoplasma auf (4). Zellkern (5). Thrombozyt (6).  
SB = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 124:** Heterophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 2, weiblich, 24 Wochen.

Punktförmige Fluoreszenz im Zytoplasma (3) des Heterophilen (1). Aktinfilamente verlaufen auch im Membran-Bereich (4). Zellkern (2). Erythrozyten (5). SB = 10 µm



**Abbildung 125:** Lymphozyt und basophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC, Kernfärbung mit DAPI.

Pute 2, weiblich, 24 Wochen.

Der Lymphozyt (1) bindet Phalloidin-TRITC im Zytoplasma (3) und im Bereich der Zellmembran (4). Zellkern (2). Der Erythrozyt (5) zeigt eine Bindung des Antikörpers im Membran-Bereich (6). Netzförmiges Reaktionsmuster im Zytoplasma (9) des Basophilen (7), das auch den Zellkern bedeckt (8). SB = 10 µm

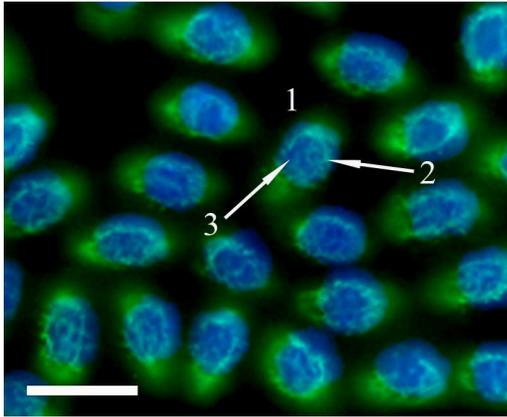
## 6.2 Vimentin

Die unfixierten Blutausstriche stellen sich deutlich positiv dar. So binden die Erythrozyten den Antikörper im Zytoplasma, welches stark leuchtende, punkt- oder fadenförmige Strukturen in meist ovaler Anordnung um den Zellkern, oder diesen überlagernd, enthält (vgl. Abb. 127, 129, 130). Diese fadenförmigen Strukturen treten auch in netzartiger Anordnung in Erscheinung (vgl. Abb. 126). In 80 % der fixierten Ausstriche stellen sich die Erythrozyten dagegen negativ dar (vgl. Abb. 128). Selten kann aber eine leichte Fluoreszenz ihrer Zellmembran beobachtet werden. Heterophile zeigen stets eine schwache bis deutliche, diffus verteilte, punktiert bis fadenförmige Reaktion im Zytoplasma (vgl. Abb. 127). Manchmal präsentieren eosinophile Granulozyten ein netzartiges Reaktionsmuster des Zytoplasmas. Ferner scheint die Hülle der Granula den Antikörper zu binden, wodurch deren Umrisse sichtbar werden. Auch perinukleär ist eine Reaktion

erkennbar (vgl. Abb. 127). Andere Eosinophile stellen sich dagegen negativ dar. Basophile Granulozyten weisen ein Netzwerk aus fadenförmigen Strukturen auf, welches das Zytoplasma durchzieht und zum Teil auch den Zellkern überlagert (vgl. Abb. 128). Das wabenartig erscheinende Zytoplasma der Monozyten reagiert positiv und auch der Bereich der Zellmembran bindet den Antikörper mit deutlicher bis starker Affinität (vgl. Abb. 129). Lymphozyten zeigen ebenso eine positive Reaktion des Zytoplasmas, in dem sich ein Netzwerk fädiger Strukturen präsentiert (vgl. Abb. 130), und auch in Membrannähe können positive Reaktionen beobachtet werden. Thrombozyten reagieren nicht mit dem Vimentin-Antikörper. Die zuvor in Methanol fixierten Blutausstriche zeigen neben den in der Regel negativen Erythrozyten meist auch schwächere Reaktionen der anderen Zellen. In folgender Tabelle 34 werden deshalb die Reaktionen der Putenblutzellen der unfixierten Blutausstriche zusammengefasst.

Tabelle 34: Auswertung Zytoskelett: Vimentin

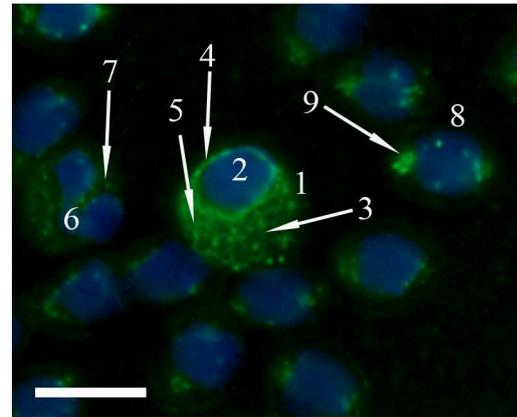
	<b>Stärke der Reaktion</b>				<b>Anzahl der positiven Präparate</b>
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>	0%	0%	0%	100%	100%
<b>Thrombozyten</b>	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Heterophile Granulozyten</b>	0%	40%	60%	0%	100%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>	80%	0%	0%	20%	20%
<b>Basophile Granulozyten</b>	60%	0%	0%	40%	40%
<b>Monozyten</b>	40%	0%	40%	20%	60%
<b>Lymphozyten</b>	20%	0%	20%	60%	80%



**Abbildung 126:** Erythrozyten, Anti-Vimentin (FITC), Kernfärbung mit DAPI, unfixiert.

Pute 5, männlich, 24 Wochen.

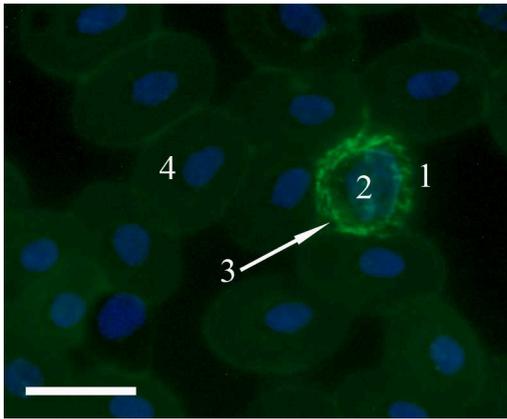
Die Erythrozyten (1) zeigen stark positive, fadenförmige Reaktionen (2), die den Zellkern (3) überlagern.  
SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 127:** Heterophiler und eosinophiler Granulozyt, Anti-Vimentin (FITC), Kernfärbung mit DAPI, unfixiert.

Pute 2, weiblich, 24 Wochen.

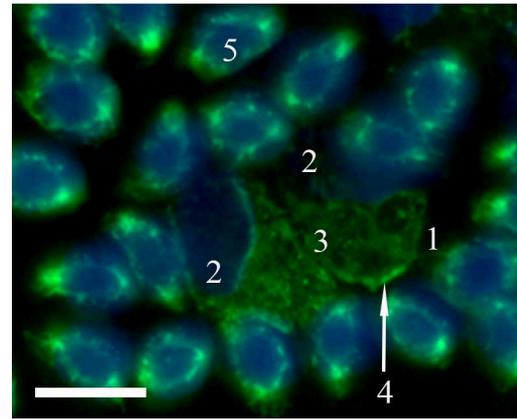
Der Eosinophile (1) bindet den Antikörper im Zytoplasma (3) und perinukleär (4). Auch die Hülle der Granula zeigt eine Reaktion (5). Zellkern (2). Das Zytoplasma (7) des Heterophilen (6) geht eine Bindung mit dem Antikörper ein. Punktförmige Fluoreszenz (9) der Erythrozyten (8).  
SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 128:** Basophiler Granulozyt, Anti-Vimentin (FITC), Kernfärbung mit DAPI, Methanol-Fixierung.

Pute 5, männlich, 24 Wochen.

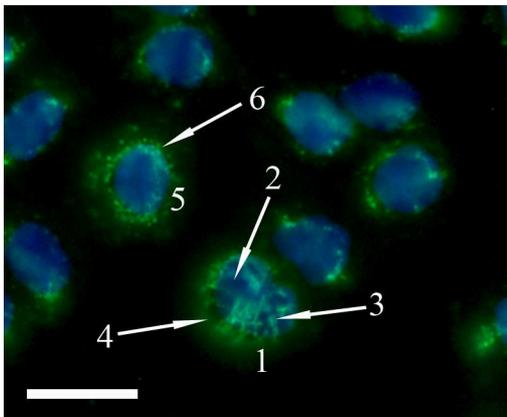
Deutlich bis starke, netzwerkartige, zytoplasmatische Reaktion (3) des Basophilen (1). Zellkern (2). Negative Reaktion der Erythrozyten (4).  
SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 129:** Monozyten, Anti-Vimentin (FITC), Kernfärbung mit DAPI, unfixiert.

Pute 5, männlich, 24 Wochen.

Wabenartiges zytoplasmatisches Bindungsmuster (3) sowie Reaktion im Bereich der Membran (4) des Monozyten (1). Zellkerne (2). Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m



**Abbildung 130:** Lymphozyt, Anti-Vimentin (FITC), Kernfärbung mit DAPI, unfixiert.

Pute 1, weiblich, 24 Wochen.

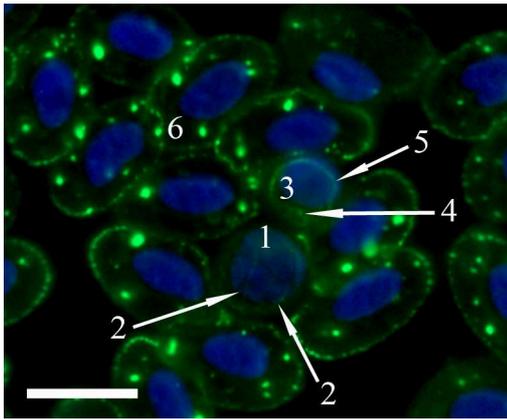
Das Zytoplasma (4) des Lymphozyten (1) enthält netzwerkartig angeordnete, den Kern (2) überlagernde, Vimentinfilamente (3). Punktförmige Fluoreszenz (6) eines Erythrozyten (5). SB = 10  $\mu$ m

### 6.3 Tubulin

Im Gegensatz zu den stets negativ reagierenden, in Methanol fixierten, Blutausstrichen, zeigen Ausstriche, die nicht fixiert wurden, durchwegs positive Reaktionen mit dem Tubulin-Antikörper. Auffallend erscheinen die Erythrozyten, deren Zellmembran-Bereich deutlich bis stark fluoresziert (vgl. Abb. 132, 134) und dabei manchmal eine rosenkranzähnliche Struktur aufweist (vgl. Abb. 133). Im Zytoplasma kann häufig eine stark fluoreszierende, punktförmige Reaktion beobachtet werden (vgl. Abb. 133). Thrombozyten binden den Antikörper in den meisten Ausstrichen schwach bis deutlich im Bereich der Zellmembran und im Zytoplasma (vgl. Abb. 131). In den Lymphozyten fällt ein deutlich bis stark fluoreszierender Bezirk auf, von dem aus fadenförmige Strukturen in das Zytoplasma ausstrahlen (vgl. Abb. 133, 134). Alle anderen Zellen der Pute gehen keine Bindung mit dem Tubulin-Antikörper ein. Tabelle 35 enthält eine Zusammenfassung der Reaktion der Blutzellen mit dem Antikörper.

Tabelle 35: Auswertung Zytoskelett: Tubulin (unfixiert)

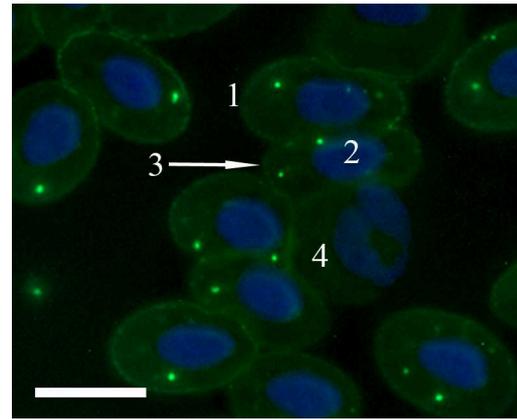
	Stärke der Reaktion				Anzahl der positiven Präparate
	0	+	++	+++	
<b>Erythrozyten</b>	0%	0%	40%	60%	100%
<b>Thrombozyten</b>	20%	60%	20%	0%	80%
<b>Heterophile Granulozyten</b>	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Eosinophile Granulozyten</b>	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Basophile Granulozyten</b>	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Monozyten</b>	100%	0%	0%	0%	0%
<b>Lymphozyten</b>	0%	50%	25%	25%	100%



**Abbildung 131:** Thrombozyt und Lymphozyt, Anti-Tubulin (FITC), Kernfärbung mit DAPI..

Pute 2, weiblich, 24 Wochen.

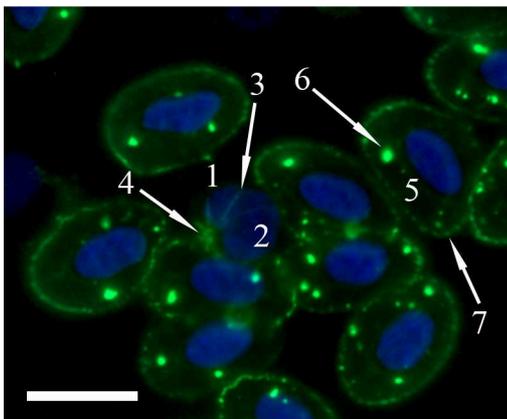
Der Lymphozyt (1) enthält feine Tubulinfilamente (2). Reaktion des Zytoplasmas (4) und des Membranbereichs (5) des Thrombozyten (3). Erythrozyten (6). SB = 10 µm



**Abbildung 132:** Erythrozyten, Anti-Tubulin (FITC), Kernfärbung mit DAPI.

Pute 4, männlich, 24 Wochen.

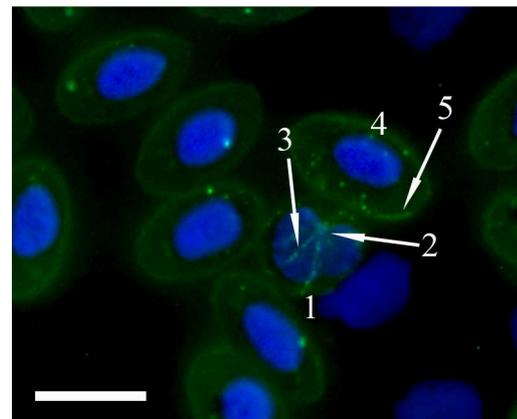
Die Erythrozyten (1) binden den Antikörper deutlich bis stark im Bereich der Zellmembran (3). Der Heterophile reagiert nicht mit Anti-Tubulin (4). SB = 10 µm



**Abbildung 133:** Lymphozyt, Anti-Tubulin (FITC), Kernfärbung mit DAPI.

Pute 2, weiblich, 24 Wochen.

Stark positiver Bereich (4) des Lymphozyten (1), von dem Filamente (3) ausstrahlen. Zellkern (2). Punktförmige, zytoplasmatische Reaktion (6) und rosenkranzähnliche Fluoreszenz im Bereich der Membran (7) der Erythrozyten (5). SB = 10 µm



**Abbildung 134:** Lymphozyt, Anti-Tubulin (FITC), Kernfärbung mit DAPI.

Pute 1, weiblich, 24 Wochen.

Auch dieser Lymphozyt (1) weist fadenartige Strukturen (3) auf, die von einem positiv reagierenden Bereich (2) ausstrahlen. Randständige Reaktion (5) der Erythrozyten (4). SB = 10 µm

#### **6.4 Nicht-Muskel Myosin**

In keinem der Blutausstriche kann eine Bindung des Nicht-Muskel Myosin-Antikörpers an die Blutzellen der Pute nachgewiesen werden.

#### **6.5 Panzytokeratin**

Keines der angefertigten Präparate zeigt eine Reaktion mit dem Panzytokeratin-Antikörper.

## V. Diskussion

### 1 Blutproben

Von allen 34, in dieser Arbeit untersuchten, Puten wurde ein kleines Blutbild angefertigt. Auffallend war, dass jüngere Tiere durchschnittlich niedrigere Erythrozytenzahlen aufwiesen, die mit zunehmendem Alter der Puten anstiegen. Ähnliche Beobachtungen machten auch Howlett und Mitarbeiter bei Studien an verschiedenen Trappenarten (Howlett et al., 2002). Die Zahl der Leukozyten unterlag deutlichen Schwankungen. So nahm sie mit steigendem Alter der Tiere zu und sank ab einem Alter von ca. 24 Wochen wieder. Darüber hinaus zeigten männliche Puten höhere Leukozytenzahlen als weibliche. Auch Scholz (2012) beobachtete bei den männlichen Straußen höhere Leukozytenwerte als bei den weiblichen (Scholz, 2012). Die Zahl der weißen Blutzellen wird durch eine ganze Reihe von Faktoren, wie zum Beispiel Stress, Fütterung, Geschlecht, Umwelteinflüsse, Krankheiten, Haltung, Wachstumsrate, soziale Interaktionen der Tiere sowie das Einfangen durch den Menschen beeinflusst (Howlett et al., 2002). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Gantert (2013) beim Huhn (Gantert, 2013), war der Hämatokrit männlicher Tiere auch bei der Pute höher als der der weiblichen Tiere. Die männlichen Puten zeigten darüber hinaus auch höhere Erythrozytenzahlen als die weiblichen. Dies steht im Einklang mit den Befunden von Scholz (2012) bei ihren Untersuchungen des Straußenblutes (Scholz, 2012) sowie von Gantert (2013) bei Blutuntersuchungen des Huhnes (Gantert, 2013). Auch Venkataratnam und Clarkson (1962) beobachteten eine höhere Zahl der Erythrozyten bei den männlichen Puten (Venkataratnam und Clarkson, 1962). Ursächlich für die Unterschiede sind die Geschlechtshormone Testosteron und Östrogen. Ersteres führt aufgrund seines erythropoetischen Effekts zu einer Erhöhung der Zahl der roten Blutzellen (Sturkie und Griminger, 1976), wohingegen Östrogen durch seine Wirkung auf das Knochenmark die Zahl der Erythrozyten senkt (Taber et al., 1943).

## 2 Lichtmikroskopie

Die Darstellung und Beurteilung der Morphologie sowie die Differenzierung der Blutzellen der Pute erfolgte anhand von sieben verschiedenen Übersichtsfärbungen (Hemacolor®, H.-E.-, Giemsa-, May-Grünwald-, Pappenheim-, Sirius Red- und Toluidinblau-Färbung). Zur substrathistochemischen Untersuchung fanden die PAS- und die Alcianblau-Färbung (pH: 1 und pH: 2,5) Anwendung. Anhand der lichtmikroskopischen Untersuchungen konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit vom Alter oder Geschlecht der Puten festgestellt werden.

Ähnlich wie beim Huhn (Gantert, 2013) und Strauß (Scholz, 2012), stellten sich die Erythrozyten der Pute als ovale Zellen mit zentral positioniertem Kern dar. Sie waren in jedem der Ausstriche zahlreich vorhanden und mit allen Färbungen gut zu erkennen. Gantert (2013) beobachtete im Zytoplasma der Hühnererythrozyten nach Diff-Quick- und Toluidinblau-Färbung basophile Einschlüsse (Gantert, 2013). Diese konnte ich mit keiner Färbung nachweisen. Das Zytoplasma war durchwegs homogen, was auch Bounous und Stedman (2000) für die roten Blutzellen der Pute beschrieben haben (Bounous und Stedman, 2000). Je nach Methode erschien es meist in rosa oder rosaroter Anfärbung. In manchen mit Hemacolor® Schnellfärbung behandelten Ausstrichen nahm es zuweilen auch eine gelbliche bis grünliche Farbe an. Der runde bis ovale Zellkern zeigte sich in unterschiedlichen Violett- oder Blautönen. Seine Oberfläche war uneben begrenzt, was sich mit den Beobachtungen von Scholz (2012) deckt, die beim Strauß ebenso eine unebene Oberfläche des Erythrozytenkerns beobachtete (Scholz, 2012). Wie bei Huhn (Gantert, 2013) und Strauß (Scholz, 2012), konnte ich auch bei der Pute unreife Erythrozyten in den Präparaten finden. Im Blut gesunder Vögel machen sie weniger als 10 % der Gesamterythrozyten aus (Scope, 2011). Sie waren etwas größer und runder als die reifen roten Blutzellen und enthielten einen rundlichen, locker strukturierten Kern. Eine geringgradige Anisozytose ist beim Vogel physiologisch (Campbell und Ellis, 2007). Unregelmäßig geformte Erythrozyten waren selten zu sehen. In geringem Maße ist auch eine Poikilozytose beim Vogel normal (Campbell, 2006). Bei den beobachteten Abweichungen von der ovalen Zellform handelte es sich jedoch vermutlich um Artefakte. Die PAS-

Färbung dient dem Nachweis von Kohlenhydraten. Mit Hilfe von Alcianblau können Muzine selektiv angefärbt werden (Mulisch und Welsch, 2010). Die Erythrozyten der Pute zeigten weder in der PAS- noch in der Alcianblau-Färbung eine positive Reaktion. Auch Gantert (2013) kam bei ihren Untersuchungen der Hühnererythrozyten zu ähnlichen Ergebnissen (Gantert, 2013). Eine negative PAS-Reaktion aviärer Erythrozyten wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (Atwal und McFarland, 1966; Caxton-Martins und Daimon, 1976).

Die Thrombozyten der Pute zeigten sich unter dem Lichtmikroskop als runde, ovale oder manchmal auch leicht unregelmäßig geformte Zellen. Dies stimmt zum Teil mit den Angaben von Bounous und Stedman (2000) überein, die die Thrombozyten der Pute als runde bis leicht ovale Zellen beschrieben (Bounous und Stedman, 2000). Eine unregelmäßige Form zeigte sich häufig bei aggregierten Thrombozyten und hängt vermutlich mit der dadurch bedingten Deformation der Zellen zusammen. Wie bereits von Gantert (2013) für das Huhn beschrieben (Gantert, 2013), fanden sich auch in den Blutaussstrichen der Pute sowohl einzelne Zellen als auch Aggregate mehrerer Thrombozyten. Abgesehen von der Toluidinblau-Färbung, in der sich das Zytoplasma oftmals farblos darstellte, waren die Thrombozyten stets gut zu erkennen. Je nach Färbung erschien das Zytoplasma in verschiedenen Blautönen bis hin zu Rosarot. Der zentral liegende Kern färbte sich hellblau bis dunkelviolet an und wies, gemäß den Angaben von Campbell und Ellis (Campbell und Ellis, 2007), eine runde bis ovale Form auf. Die Zelloberfläche mancher Thrombozyten trug Pseudopodien, was sich mit den Befunden von Scholz (2012) und Gantert (2013) deckt, die auf den aviären Thrombozyten ebenfalls zytoplasmatische Ausläufer nachweisen konnten (Scholz, 2012; Gantert, 2013). Darüber hinaus präsentierte sich das Zytoplasma häufig vakuolisiert und enthielt eosinophile Granula, die vermutlich den von Campbell und Ellis (2007) beobachteten eosinophilen spezifischen Granula entsprechen (Campbell und Ellis, 2007). Die Ausbildung von Pseudopodien sowie die Vakuolisierung des Zytoplasmas stellen Anzeichen einer Aktivierung der Thrombozyten dar (Campbell, 2006). Übereinstimmend mit den Angaben von Bounous und Stedman (Bounous und Stedman, 2000), zeigten die Thrombozyten der Pute eine positive PAS-Reaktion. Nach der Vorbehandlung mit dem Enzym Amylase fiel diese jedoch negativ aus. Da dieses Enzym Glykogen spaltet (Horn,

2009), deuten die Ergebnisse meiner Untersuchungen auf das Vorhandensein von Glykogen in den Thrombozyten der Pute hin. Gantert (2013) konnte in den Thrombozyten der Hühner ebenfalls Glykogen nachweisen (Gantert, 2013). Anders verhielten sich dagegen die Thrombozyten beim Strauß. Hier blieb die positive PAS-Reaktion der Thrombozyten nach Amylase-Vorbehandlung erhalten. Scholz (2012) führte dies auf das Vorhandensein von Glykoproteinen in den Thrombozyten des Straußes zurück (Scholz, 2012).

Wie bereits Bounous und Stedman (2000) für die Pute beschrieben haben (Bounous und Stedman, 2000), stellten die heterophilen Granulozyten auch in meinen Ausstrichen die am häufigsten vorkommenden Granulozyten dar. Ähnlich den Heterophilen des Straußes (Scholz, 2012), erschienen sie als runde bis unregelmäßig geformte Zellen. Das Zytoplasma nahm je nach Methode eine graue bis blassrosa Farbe an, meist war es jedoch farblos. Der in verschiedenen Violett- bis Blautönen angefärbte Zellkern zeigte sich in der Regel zweifach gelappt und enthielt mäßig dichtes Chromatin. Gemäß den Angaben in der Literatur (Clark et al., 2009) wurde er häufig zum Teil von den länglichen Granula verdeckt. Diese zeigten sich in verschiedenen Rottönen und füllten, wie schon von anderen Autoren für aviäre Heterophile festgestellt (Hawkey und Dennett, 1990; Clark et al., 2009; Scholz, 2012), das Zytoplasma fast vollständig aus. In den mit Hemacolor®- oder Giemsa-Färbung behandelten Ausstrichen zeigten die Heterophilen oftmals nur schwach angefärbte oder farblose Granula, die vermutlich Reste ausgewaschener Granula darstellten. Sie enthielten stärker farbige, runde Bereiche, die den „central bodies“ der elektronendichten Granula entsprechen könnten, die Maxwell (1973) bei ultrastrukturellen Untersuchungen aviärer Heterophiler beobachtete (Maxwell, 1973). Diese runden bis ovoiden Strukturen stellen sich manchmal deutlicher dar, als die sie umgebende Matrix der Granula (Clark et al., 2009). Auch Gantert (2013) konnte diese runden Strukturen in den Granula der Heterophilen des Huhnes nachweisen (Gantert, 2013). Besonders schön präsentierten sich die länglichen Granula in der May-Grünwald-, Pappenheim- und der Sirius Red-Färbung. Letztere wird beim Säuger zur selektiven Darstellung der eosinophilen Granulozyten genutzt (Wehrend et al., 2004) und dient dem Nachweis basischer Polyaminosäuren (Nielsen et al., 1998; Santos et al., 2003). Meine Ergebnisse stehen im Einklang mit den Befunden

anderer Autoren, die ebenfalls eine Anfärbung der Granula aviärer heterophiler Granulozyten mit Sirius Red beobachteten (Santos et al., 2003; Scholz, 2012). Des Weiteren zeigte das Zytoplasma der Heterophilen der Pute, wie beim Huhn (Gantert, 2013) und Strauß (Scholz, 2012), eine positive PAS-Reaktion. Nach Vorbehandlung mit dem Enzym Amylase konnte ich jedoch keine Anfärbung mehr beobachten, was darauf hindeutet, dass es sich bei den PAS-positiven Strukturen bei der Pute um Glykogen handelt. Auch der Nachweis carboxylierter saurer Glykoproteine anhand der Alcianblau-Färbung (pH: 2,5) (Mulisch und Welsch, 2010) fiel in den Heterophilen der Pute geringgradig positiv aus. Dabei konnte eine leichte Anfärbung des Zytoplasmas beobachtet werden. Die Alcianblau-Färbung mit einem pH-Wert von 1,0 rief hingegen keine positive Reaktion hervor. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Gantert (2013) für das Huhn (Gantert, 2013).

Im Vergleich zu den anderen Granulozyten konnte ich die Eosinophilen in den Blutausstrichen der Pute nur selten beobachten. Sie sind meist in nur geringer Anzahl im aviären Blut vorhanden (Waibl und Sinowatz, 2004). Ihre Form war, wie schon von Bounous und Stedman (2000) beschrieben (Bounous und Stedman, 2000), rund bis unregelmäßig. Im Einklang mit den Ergebnissen von Maxwell und Siller (Maxwell und Siller, 1972) enthielten sie meist einen unsegmentierten Zellkern. Gelegentlich war dieser jedoch auch zweifach gelappt. Das Chromatin war stärker kondensiert als das der heterophilen Granulozyten, wodurch sich der Kern der Eosinophilen im Vergleich meist dunkler anfärbte. Dies deckt sich mit den Angaben anderer Autoren (Campbell, 2006; Clark et al., 2009). Er stellte sich in unterschiedlichen Violett- bis Blautönen dar. Das Zytoplasma erschien in rosa bis blass-basophiler Farbe und war meist vollständig von den runden Granula ausgefüllt, die auch den Zellkern teilweise verdeckten. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Scholz (2012) für den Strauß (Scholz, 2012), stellten sich die Granula in der May-Grünwald-Färbung besonders gut dar. In der Hemacolor®- und Giemsa-Färbung waren sie meist, in der H.-E.-Färbung dagegen immer farblos. Auch Campbell (2006) beschrieb das mögliche Vorkommen farbloser Granula in den aviären Eosinophilen (Campbell, 2006). Vermutlich wurden die Granula aber auch im Rahmen der Färbeschritte ausgewaschen. Anhand gemachter Positivkontrollen von Huhn und Strauß sowie im Vergleich zu den

Ergebnissen von Gantert (2013) für das Huhn (Gantert, 2013) und Scholz (2012) für den Strauß (Scholz, 2012), fällt die beachtliche Größe der Puten-Granula auf. Maxwell und Siller (1972) hoben, basierend auf ultrastrukturellen Untersuchungen der Eosinophilen verschiedener Vogelarten, bereits die intra- und interspezifischen morphologischen Unterschiede der zytoplasmatischen Granula hervor (Maxwell und Siller, 1972). In der Sirius Red-Färbung, die beim Säuger zur Darstellung der eosinophilen Granulozyten herangezogen wird (Wehrend et al., 2004), färbten sich die Granula der Puteneosinophilen nur selten und partiell an, meist erschienen sie jedoch farblos. Auch das Zytoplasma zeigte manchmal eine leichte Reaktion mit dem Farbstoff. Dies stellt einen Unterschied zu den Ergebnissen anderer Autoren bei anderen Vogelarten dar, die eine deutliche Anfärbung der eosinophilen Granula nachweisen konnten (Santos et al., 2003; Scholz, 2012; Gantert, 2013). Wahrscheinlich wurde der Inhalt der Granula im Zuge des Färbeprozesses häufig bereits ausgewaschen. Eine positive Reaktion mit Sirius Red deutet auf das Vorhandensein basischer Polyaminosäuren hin (Nielsen et al., 1998; Santos et al., 2003). Auch die PAS-Reaktion fiel bei den eosinophilen Granulozyten positiv aus. So zeigten sie eine schwache Anfärbung des Zytoplasmas, die nach der Vorbehandlung mit dem Enzym Amylase nicht mehr zu sehen war. Diese Reaktion lässt das Vorkommen von Glykogen in den Eosinophilen der Pute vermuten. In der Alcianblau-Färbung mit einem pH-Wert von 1,0 konnte selten eine leichte Reaktion im Bereich des Zytoplasmas beobachtet werden. Dies ist auf das Vorkommen stark sulfatierter Muzine zurückzuführen (Mulisch und Welsch, 2010).

Die basophilen Granulozyten der Pute erschienen als zumeist runde Zellen mit zentral oder exzentrisch positioniertem, unsegmentiertem Kern. Dieser war oft ebenfalls rund, seltener aber auch bohnen- oder herzförmig und stellte sich in verschiedenen Violetttönen bis Hellblau dar. Das Zytoplasma präsentierte sich in grauer über rosa bis hellvioletter Farbe. Wie bereits von anderen Autoren für die aviären Basophilen beschrieben (Bounous und Stedman, 2000; Clark et al., 2009; Scope, 2011; Scholz, 2012; Gantert, 2013), wurde der Zellkern häufig von den zytoplasmatischen Granula bedeckt. Letztere waren nach Toluidinblau-Färbung, die der selektiven Darstellung der basophilen Granulozyten dient (Raskin und Valenciano, 2000), besonders gut zu erkennen. Ähnliche Beobachtungen machten

auch Scholz (2012) beim Strauß (Scholz, 2012) und Gantert (2013) beim Huhn (Gantert, 2013). In der May-Grünwald- und Pappenheim-Färbung waren die Granula meist nur teilweise angefärbt, in allen anderen durchgeführten Färbungen waren sie dagegen ausgewaschen und als runde, helle Vakuolen sichtbar. Ursächlich hierfür ist ihre Wasserlöslichkeit (Waibl und Sinowatz, 2004). Die Morphologie dieser ausgewaschenen Granula deckt sich mit den Angaben anderer Autoren (Clark et al., 2009; Scholz, 2012; Gantert, 2013). Auch Gantert (2013) beobachtete nach H.E.- und Giemsa-Färbung ausgewaschene Granula in den Basophilen des Huhnes (Gantert, 2013). In seltenen Fällen konnte ich, im Unterschied zu den Ergebnissen von Scholz (2012) für die Basophilen des Straußes (Scholz, 2012) und denen von Gantert (2013) für jene des Huhnes (Gantert, 2013), eine Anfärbung des Zytoplasmas mit Sirius Red feststellen. Andere Basophile zeigten sich dagegen farblos. Die PAS-Reaktion fiel stets positiv aus. So wies das Zytoplasma mehrere rundliche, purpurrote Strukturen auf. Nach Amylase-Vorbehandlung konnten sie jedoch nicht mehr beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die Strukturen Glykogen darstellen. Diese Befunde stehen im Einklang mit denen von Scholz (2012) für den Strauß (Scholz, 2012). Die Granula der Basophilen stellten sich in beiden Alcianblau-Färbungen in türkis- bis dunkelblauer Farbe dar. Diese Ergebnisse belegen das Vorhandensein sulfatierter und carboxylierter saurer Glykoproteine (Mulisch und Welsch, 2010) in den Granula der Basophilen der Pute. Bei einem pH-Wert von 2,5 beobachtete ich außerdem auch blau angefärbte, fadenartige Strukturen im Zytoplasma, die manchmal netzwerkartig verbunden waren. Diese stellen carboxylgruppenreiche Glykoproteine dar (Mulisch und Welsch, 2010).

Wie die Monozyten des Straußes (Scholz, 2012), sind auch die Monozyten der Pute unregelmäßig geformte Zellen. Ihr reichlich vorhandenes, wabenartig geformtes Zytoplasma färbte sich in verschiedenen Blau- bis Rosatönen an. Meist beinhaltete es mehrere Vakuolen, was auch von anderen Autoren für andere aviäre Monozyten beschrieben wurde (Campbell, 2006; Clark et al., 2009; Scope, 2011; Scholz, 2012; Gantert, 2013) und vermutlich auf eine Aktivierung dieser Zellen hindeutet (Scope, 2011). Der Zellkern war oval, nierenförmig oder unregelmäßig geformt und lag, gemäß den Angaben von Scope (Scope, 2011), exzentrisch in der Zelle. Er enthielt locker strukturiertes Chromatin und färbte sich je nach Methode

blassblau bis lila an. Auch im Bereich der Kerninvagination konnten manchmal zytoplasmatische Vakuolen beobachtet werden. Dieses Areal entspricht vermutlich dem von Hodges (1974) beschriebenen Hof, der außerdem orangefarbene Bezirke enthalten soll (Hodges, 1974), welche ich bei der Pute nicht feststellen konnte. Auch die von einigen Autoren erwähnten eosinophilen Granula (Bounous und Stedman, 2000; Campbell, 2006; Clark et al., 2009), konnte ich in den Monozyten der Pute nicht nachweisen. Dies deckt sich mit den Angaben von Gantert (2013), die in den Monozyten des Huhnes ebenfalls keine zytoplasmatischen eosinophilen Granula beobachten konnte (Gantert, 2013). Das Zytoplasma der Putenmonozyten enthielt PAS-positive Strukturen, die nach der Vorbehandlung mit dem Enzym Amylase nicht mehr zu sehen waren. Demnach handelt es sich dabei, ebenso wie beim Huhn beschrieben (Gantert, 2013), um Glykogen. Auch Caxton-Martins und Daimon (1976) stellten das Vorkommen von PAS-positiven Strukturen in den Monozyten der Hühner fest (Caxton-Martins und Daimon, 1976).

Den Großteil der beobachteten Lymphozyten stellten die kleinen und mittleren Vertreter dar. Die großen Lymphozyten waren in nur geringer Zahl in den Präparaten zu sehen. Sie können bei gesunden Vögeln selten im Blut gefunden werden (Campbell und Coles, 1986). Wie bereits von Bounous und Stedman (2000) beschrieben (Bounous und Stedman, 2000), stellten sich die kleinen Lymphozyten auch in vorliegender Arbeit als runde Zellen mit hohem Kern-Zytoplasma-Verhältnis dar. Sie hatten im Mittel eine ungefähre Größe von 6 – 7  $\mu\text{m}$ . Die im Durchschnitt 8 – 8,6  $\mu\text{m}$  großen, mittleren Vertreter waren rund bis oval, was sich mit den Angaben von Maxwell (1974) deckt (Maxwell, 1974). Große Lymphozyten hatten eine runde bis unregelmäßige Form und eine Größe von circa 11 – 11,5  $\mu\text{m}$ . Das Zytoplasma, welches in den kleinen Lymphozyten als nur schmaler Saum zu sehen war, nahm mit der Größe der Zellen zu und färbte sich in verschiedenen Blautönen bis dunkelrosa an. Die von einigen Autoren erwähnten, zytoplasmatischen Granula (Bounous und Stedman, 2000; Clark et al., 2009; Scholz, 2012; Gantert, 2013) konnten in dieser Arbeit nur mit der Hemacolor® Schnellfärbung beobachtet werden. Laut Bounous und Stedman (2000) kommen sie im Zytoplasma der Lymphozyten nur selten vor und haben eine bis heute unbekannte Bedeutung (Bounous und Stedman, 2000). Der Zellkern

erschien in lila, violetter oder blauer Farbe und zeigte mit zunehmender Größe der Lymphozyten eine Auflockerung des Chromatins. Entgegen den Angaben von Gantert (2013) für das Huhn (Gantert, 2013) konnte ich bei der Pute keine Einbuchtung des Zellkerns beobachten. Die Putenlymphozyten wiesen manchmal zytoplasmatische Ausläufer auf, was sich mit den Befunden von Scholz (2012) für die Lymphozyten des Straußes (Scholz, 2012) und Gantert (2013) für jene des Huhnes deckt (Gantert, 2013). Auch reaktive Lymphozyten, mit tief basophilem Zytoplasma und stark geklumpstem Chromatin (Campbell und Ellis, 2007), waren gelegentlich in den Ausstrichen der Pute zu finden. Sie können bei gesunden Vögeln nur ab und zu, bei solchen mit einer Infektion dagegen in erhöhter Anzahl im Blutausstrich gesehen werden (Campbell und Ellis, 2007). Das Zytoplasma der Putenlymphozyten zeigte eine positive PAS-Reaktion. Neben seiner diffusen Anfärbung fielen rundliche, purpurrote Strukturen auf. Nach Amylase-Vorbehandlung konnte nur noch in manchen Zellen eine schwache Reaktion nachgewiesen werden. Die Untersuchungen lassen darauf schließen, dass es sich bei den PAS-positiven Strukturen hauptsächlich um Glykogen handelt. Daneben kommen vermutlich jedoch auch andere PAS-positive Kohlenhydrate in den Lymphozyten der Pute vor. Zu anderen Ergebnissen kam hingegen Gantert (2013) beim Huhn, die nach Vorbehandlung mit dem Enzym Amylase eine negative Reaktion der Hühnerlymphozyten beschrieb (Gantert, 2013).

### **3 Elektronenmikroskopie**

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben keine Unterschiede in Bezug auf das Geschlecht der untersuchten Puten.

Die Erythrozyten der Pute stellten sich elektronenmikroskopisch als längliche Zellen mit glatter Zellmembran ohne Pseudopodien dar. Der runde bis ovale Zellkern wurde manchmal von einem meist schmalen perinukleären Spalt umgeben, der sich nur selten weit darstellte. Oftmals war er nicht zu sehen. Dies deckt sich nur zum Teil mit den Befunden von Gantert (2013) beim Huhn, die in den Erythrozyten des Huhnes häufig einen weiten perinukleären Spalt nachweisen konnte. Wie bereits von Gantert vermutet, stellt dieser Spalt möglicherweise ein

fixierungsbedingtes Artefakt dar (Gantert, 2013). Bis auf wenige Mitochondrien enthielt das homogene Zytoplasma der Putenerythrozyten keine anderen Zellorganellen. Dagegen beobachteten Beam und Mitarbeiter (1979) neben einzelnen Mitochondrien auch Reste endoplasmatischen Retikulums und wenige Polysomen in den Erythrozyten der Pute (Beam et al., 1979). Meine Ergebnisse decken sich mit denen von Scholz (2012) beim Strauß und Gantert (2013) beim Huhn. Beide konnten in den roten Blutzellen ebenso lediglich vereinzelte Anschnitte von Mitochondrien nachweisen (Scholz, 2012; Gantert, 2013). Vermutlich werden andere Zellorganellen durch das Hämoglobin verdeckt (Hodges, 1977). Das, von einigen Autoren beschriebene, marginale Band aus Mikrotubuli (Fawcett, 1959; Barrett und Dawson, 1974; Goniakowska-Witalińska und Witaliński, 1976; Sloboda und Dickersin, 1980; Scholz, 2012) konnte ich auch in den Erythrozyten der Pute beobachten.

Die runden bis leicht ovoiden Thrombozyten der Pute trugen auf ihrer Zelloberfläche einige Pseudopodien. Ihr zentral positionierter Kern enthielt verhältnismäßig mehr Hetero- als Euchromatin, was sich mit den Befunden von Maxwell (1974) deckt, der ebenfalls ein Überwiegen von Heterochromatin im Zellkern der Thrombozyten verschiedener Vogelarten beschrieb (Maxwell, 1974). Darüber hinaus beobachtete ich im Heterochromatin kleine, runde, hellere Bereiche in unterschiedlicher Anzahl, die Gantert (2013) auch beim Huhn nachweisen konnte (Gantert, 2013). Sie entstehen durch den Anschnitt von Euchromatinkanälen und stellen ein wichtiges Identifikationsmerkmal der Thrombozyten dar (Enbergs, 1975). Im Zytoplasma befanden sich nur vereinzelt Granula in einer Größe von 0,2 bis 0,3  $\mu\text{m}$ , die homogenen Inhalt aufwiesen. Diese entsprechen vermutlich den von Simpson (1968) beschriebenen, homogenen, osmiophilen Granula der Putenthrombozyten. Außerdem beobachtete er Granula, die dicht gewundene Membranen oder, in einem Zustand der Degeneration, Vakuolen und kleine, osmiophile Granula enthielten (Simpson, 1968). Auch Sweeny und Carlson (1968) sowie Gantert (2013) beschrieben das Vorkommen von Zytoplasmainschlüssen mit zum Teil vakuolisiertem Inhalt in den Thrombozyten des Huhnes (Sweeny und Carlson, 1968; Gantert, 2013). Sie entstehen manchmal durch das Verschmelzen kleinerer Granula (Enbergs, 1975). Diese konnte ich jedoch in meinen Untersuchungen nicht beobachten. Im

Allgemeinen weist der Inhalt der Granula große strukturelle Variationen auf (Enbergs, 1975). Durch die Zusammenlagerung mehrerer Granula entstehen außerdem die lichtmikroskopisch sichtbaren eosinophilen Granula (Campbell, 2006). Wie auch von Scholz (2012) beim Strauß beschrieben (Scholz, 2012), befanden sich im Zytoplasma weiterhin einige Mitochondrien. Daneben kamen zudem Vakuolen, Golgi-Apparat, Anschnitte endoplasmatischen Retikulums und Glykogengranula vor. Laut Behnke (1970) sowie Daimon und Uchida (1982) verläuft in den Hühnerthrombozyten ein Bündel aus Mikrotubuli direkt unterhalb der Plasmamembran (Behnke, 1970; Daimon und Uchida, 1982). Scholz (2012) beschrieb ein solches Band auch in den Thrombozyten des Straußes (Scholz, 2012). Enbergs (1975) konnte zudem perinukleär verlaufende Mikrotubuli in den Thrombozyten von Pute, Huhn, Gans und Ente nachweisen (Enbergs, 1975). Diese Befunde stimmen mit meinen Ergebnissen überein.

Die heterophilen Granulozyten der Pute hatten eine rundliche bis ovale oder langgestreckte Form. Auf ihrer Zelloberfläche fanden sich, wie bereits von Enbergs (Enbergs, 1975) berichtet, einige Pseudopodien. Der exzentrisch positionierte Kern erschien einfach angeschnitten oder zweifach gelappt. Er enthielt mehr Hetero- als Euchromatin, was mit den Befunden von Maxwell (1973) übereinstimmt, der bezüglich der Heterophilen von Pute, Perlhuhn, Gans, Ente und Taube ebenfalls zu diesem Ergebnis kam (Maxwell, 1973). Das Zytoplasma wurde fast vollständig von den Granula ausgefüllt. Wie bereits durch einige Autoren bekannt (Ericsson und Nair, 1973; Daimon und Caxton-Martins, 1977; Robertson und Maxwell, 1991), konnten drei verschiedene Typen von Granula unterschieden werden. Am häufigsten kamen die ca. 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$  langen und 0,2 bis 0,7  $\mu\text{m}$  breiten, oval bis länglich geformten Granula vor. Ihr Inhalt stellte sich elektronendicht dar und enthielt oftmals einen bis sechs dunklere, runde oder längliche Bereiche. Letztere können den von Maxwell (1973) beschriebenen „central bodies“ der elektronendichten Granula zugeordnet werden, von denen dieser allerdings nur bis zu drei bei der Pute nachweisen konnte (Maxwell, 1973). Gantert (2013) fand beim Huhn lediglich einen dieser Einschlüsse in den elektronendichten Granula (Gantert, 2013). Des Weiteren enthielt das Zytoplasma ca. 0,2 bis 0,7  $\mu\text{m}$  lange und 0,16 bis 0,2  $\mu\text{m}$  breite, hellere Granula, die in geringerer Anzahl zu finden waren und homogenen Inhalt

aufwiesen. Maxwell (1973) konnte ebenso keine Einschlüsse in den elektronenlichten Granula der Pute nachweisen (Maxwell, 1973). Den dritten Typ Granulum stellten ungefähr 0,1  $\mu\text{m}$  große, runde, homogen elektronendichte Granula dar. Auch Gantert (2013) beschrieb drei verschiedene Granula in den Heterophilen des Huhnes (Gantert, 2013). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Enbergs (Enbergs, 1975), kamen im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten der Pute zudem Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, Vakuolen und Glykogengranula vor.

Die eosinophilen Granulozyten der Pute zeigten sich elektronenmikroskopisch als ovale bis längliche Zellen. Der Kern war nur als einfach angetroffener, kleiner Anschnitt zu sehen. Dies stimmt mit den Befunden von Maxwell und Siller (1972) sowie Enbergs (1975) überein, die bei ihren ultrastrukturellen Untersuchungen der Eosinophilen der Pute ebenfalls meist einen nur einfach angeschnittenen Zellkern nachweisen konnten (Maxwell und Siller, 1972; Enbergs, 1975). Die zytoplasmatischen Granula stellten sich mit einer ungefähren Länge von 1,2 bis 2,2  $\mu\text{m}$  sowie einer Breite von ca. 0,65 bis 1,8  $\mu\text{m}$ , bzw. einem Durchmesser von 1 bis 1,4  $\mu\text{m}$ , auffallend groß dar. Auch Enbergs (1975) betonte die Größe der Granula der Puteneosinophilen (Enbergs, 1975). Damit waren sie deutlich größer als die von Gantert (2013) beschriebenen eosinophilen Granula des Huhnes mit 0,3 bis 1  $\mu\text{m}$  (Gantert, 2013), was bereits lichtmikroskopisch auffiel (siehe Punkt V. 2). Sie enthielten stets annähernd gleich elektronendichten, homogenen Inhalt. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von Maxwell und Siller (1972), die ebenfalls nur einen Typ Granulum in den Eosinophilen der Pute beobachteten (Maxwell und Siller, 1972). Auch die eosinophilen Granulozyten des Huhnes beinhalten nur einen Typ von Granula (Enbergs, 1975; Daimon und Caxton-Martins, 1977; Gantert, 2013). Wie bereits von Maxwell und Trejo (1970) sowie von Enbergs (1975) beschrieben, fielen neben Einschnürungen der Hülle der Granula auch kleine, runde, helle Bereiche in ihrem Inneren auf (Maxwell und Trejo, 1970; Enbergs, 1975). Laut Enbergs (1975) repräsentieren sie möglicherweise unterschiedliche Stadien einer Pseudopodienbildung, verbunden mit der aktiven Bewegung und Sekretion der Granula. Er fand außerdem Granula mit weniger dichtem Inhalt, die unterschiedliche Strukturen enthielten (Enbergs, 1975). Dies konnte ich mit meinen Befunden jedoch nicht bestätigen. Im

Zytoplasma der Eosinophilen kamen außerdem Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, Lipidtröpfchen und Vesikel vor.

Gemäß den Angaben in der Literatur (Enbergs, 1975) erschienen die basophilen Granulozyten als runde bis ovale Zellen, die auf ihrer Oberfläche zahlreiche Pseudopodien ausbildeten. Der Kern lag zentral in der Zelle und beinhaltete, wie bereits von Enbergs (Enbergs, 1975) beschrieben, mehr Eu- als Heterochromatin. Er stellte sich außerdem unsegmentiert dar, wodurch sich eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Maxwell (1973) ergibt, der in den Basophilen verschiedener Vogelarten ebenfalls stets einen ungelappten Zellkern vorfand (Maxwell, 1973). Die zytoplasmatischen Granula, welche den Zellkern umrandeten, waren in etwa 0,45 bis 1  $\mu\text{m}$  lang, sowie 0,4 bis 0,9  $\mu\text{m}$  breit. Runde Granula hatten einen Durchmesser von ca. 0,2 bis 0,5  $\mu\text{m}$ . Ihr Inhalt variierte bezüglich Dichte und Homogenität und stellte sich entweder homogen oder inhomogen elektronendicht, sowie gestrichelt dar. Auch Maxwell (1973) konnte in seinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen der basophilen Granulozyten von Ente, Gans, Perlhuhn, Pute, Taube und Wachtel drei Gruppen von Granula nachweisen. Er unterschied solche mit elektronendichtem, gestricheltem und wabenartigem Inhalt (Maxwell, 1973). Letztere waren in meinen Präparaten jedoch nicht auffindbar. Scholz (2012) konnte in den Basophilen des Straußes lediglich homogen elektronendichte Granula nachweisen (Scholz, 2012). Die Unterschiede in Struktur und Dichte des Granuluminhalts sind entweder auf das Vorhandensein unterschiedlicher Granulapopulationen zurückzuführen oder stellen die verschiedenen Reifestadien der Granula dar. Möglicherweise treten sie aber auch fixierungsbedingt auf (Maxwell, 1973). Übereinstimmend mit den Ergebnissen beim Strauß (Scholz, 2012), enthielt das Zytoplasma des Weiteren Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum und Glykogengranula.

Die Monozyten der Pute stellten sich elektronenmikroskopisch als runde bis unregelmäßig geformte Zellen dar. Im Einklang mit den Angaben von Maxwell (Maxwell, 1974) fiel das reichlich vorhandene Zytoplasma auf, in dem viele Zellorganellen beobachtet werden konnten. Diese waren, wie durch Maxwell (1974) in ultrastrukturellen Untersuchungen bereits festgestellt (Maxwell, 1974), häufig in der Nähe der Kerninvagination zu finden. Neben Mitochondrien, einem

gut sichtbaren Golgi-Apparat und Vakuolen, fielen vor allem die zahlreichen Anschnitte rauen endoplasmatischen Retikulums auf, die schon von anderen Autoren beschrieben wurden (Maxwell und Trejo, 1970; Enbergs, 1975). Beim Huhn beobachtete Gantert (2013) diese Anschnitte als zum Teil stark dilatiert (Gantert, 2013), was ich auch bei der Pute feststellen konnte. Zudem zeigten sich, entgegen den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Untersuchungen (siehe Punkt V. 2), elektronenmikroskopisch runde, zytoplasmatische Granula mit stets mäßig elektronendichtem Inhalt. Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen von Gantert (2013), die in den Monozyten des Huhnes Granula von unterschiedlicher Elektronendichte nachweisen konnte (Gantert, 2013). Scholz (2012) fand in den Monozyten des Straußes viele zytoplasmatische Granula (Scholz, 2012), wohingegen ich bei der Pute durchschnittlich nur ein oder zwei Granula pro Zelle beobachten konnte. Laut Enbergs (1975) variiert die Anzahl der zytoplasmatischen Granula (Enbergs, 1975). Diese stellen Lysosomen dar (Maxwell und Trejo, 1970; Dieterlen-Lièvre, 1988). Der exzentrisch positionierte Zellkern lag einfach angeschnitten oder zweifach segmentiert vor und wies nur wenig, peripher gelagertes Heterochromatin sowie häufig einen Nukleolus auf, was bereits von Enbergs (1975) für die aviären Monozyten beschrieben wurde. Entgegen seiner Ergebnisse, wonach der Kern der Monozyten stets nur eine flache Einbuchtung aufwies (Enbergs, 1975), zeigten die Zellkerne bei der Pute jedoch unterschiedlich tiefe Invaginationen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Scholz (2012) beim Strauß (Scholz, 2012), fanden sich auf der Zelloberfläche der Monozyten der Pute ebenso zytoplasmatische Ausläufer.

Elektronenmikroskopisch betrachtet traten die Lymphozyten der Pute als ovale bis leicht unregelmäßig geformte Zellen in Erscheinung. Ebenso wie beim Strauß (Scholz, 2012) und Huhn beschrieben (Gantert, 2013), wies ihre Zelloberfläche Pseudopodien auf. Entgegen den Lymphozyten des Straußes, die Eu- und Heterochromatin zu ungefähr gleichen enthielten (Scholz, 2012), zeigte der zentral liegende Kern der Putenlymphozyten mehr Euchromatin. Maxwell und Trejo (1970) konnten in ihren ultrastrukturellen Untersuchungen aviärer Lymphozyten ebenso nachweisen, dass in einigen Zellkernen eine größere Menge Eu- als Heterochromatin vorhanden war (Maxwell und Trejo, 1970). Das Zytoplasma enthielt ca. 0,2 bis 0,3  $\mu\text{m}$  große, rundliche Granula mit mäßig

elektronendichtem Inhalt. Dies steht im Einklang mit den Befunden von Gantert (2013), die beim Huhn ebenfalls ungefähr 0,3 µm große Granula mit mäßig elektronendichtem Inneren beobachten konnte (Gantert, 2013). Vermutlich stellen sie die lichtmikroskopisch nachweisbaren, azurophilen Granula dar (Enbergs, 1975). Bis heute ist ihre Bedeutung jedoch unklar (Enbergs, 1975; Bounous und Stedman, 2000). Die nur selten beobachteten zytoplasmatischen Einschlüsse mit lamellärem Inhalt entsprechen wahrscheinlich den von Enbergs (1975) beschriebenen Zytolysosomen, die vermutlich sekundäre Lysosomen darstellen (Enbergs, 1975). Vielleicht kann man sie aber auch den zytoplasmatischen Granula zuordnen. Enbergs (1975) beschrieb den Inhalt der Granula als zuweilen unregelmäßig-lamellär oder mit elektronenlichten Cores (Enbergs, 1975). Gemäß den Angaben von Gantert beim Huhn (Gantert, 2013) enthielt auch das Zytoplasma der Putenlymphozyten nur wenige Organellen, darunter Glykogengranula, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum. Die langen Reihen parallel angeordneter, runder Strukturen entsprechen vermutlich den von einigen Autoren bereits beschriebenen „tyre-tracks“ (Campbell und Woode, 1970; Maxwell, 1974). Entgegen den Ergebnissen von Maxwell (Maxwell, 1974) konnte ich diese Strukturen jedoch auch in den Lymphozyten der Pute nachweisen. Campbell und Woode (1970) beschrieben sie in kultivierten Lymphozyten von an Marek erkrankten Hühnern. Die Autoren diskutierten die Möglichkeit, dass diese „tyre-track“-Strukturen eine tubuläre Form des Herpesvirus darstellen könnten (Campbell und Woode, 1970). Maxwell (1974) fand sie jedoch auch in den Lymphozyten gesunder Enten, Gänse, Perlhühner, Tauben und Wachteln (Maxwell, 1974). Auch Kriesten und Enbergs (1970) beobachteten ähnliche Strukturen in den Lymphozyten klinisch gesunder Hühner. Sie stellen möglicherweise Membranen mit Ribosomen dar (Kriesten und Enbergs, 1970).

## 4 Glykohistochemie

Die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen zeigten keine Unterschiede in Bezug auf das Alter oder das Geschlecht der Tiere.

In vorliegender Arbeit wurde eine Bindung der Lektine ConA, LCA, WGA, WGAs, SNA und PHA-E an die Erythrozyten der Pute nachgewiesen. So reagierte ConA überwiegend deutlich bis stark mit der Zellmembran. Damit konnten die Ergebnisse von Caldwell (1976) bestätigt werden, welche ebenfalls eine Bindung von ConA an die Erythrozytenmembran der Pute beschrieb (Caldwell, 1976). Auch Gantert (2013) beobachtete eine Bindung des Lektins an die Zellmembran der Hühnererythrozyten (Gantert, 2013). Außerdem zeigte das Zytoplasma der roten Blutkörperchen der Pute eine meist schwache Reaktion mit ConA, was sich zum Teil mit den Ergebnissen von Scholz (2012) deckt, die beim Strauß jedoch nur selten eine schwache Bindung des Lektins im Erythrozytenzytoplasma beobachtete (Scholz, 2012). Nicht in allen Blutaussstrichen war eine Bindungsneigung der Erythrozyten zu LCA festzustellen. Positiv reagierte dann vor allem die Zellmembran, seltener auch das Zytoplasma. Scholz (2012) konnte in einem Blutaussstrich des Straußes ebenso eine positive Reaktion der Erythrozyten mit LCA nachweisen (Scholz, 2012) und auch beim Schaf reagierte das Lektin mit der Membran und dem Zytoplasma der roten Blutzellen (Riegler, 2012). Obwohl sich ConA und LCA in die Gruppe der Mannose/Glukose-spezifischen Lektine einteilen lassen (Roth, 2011), zeigten sie ein unterschiedliches Reaktionsverhalten gegenüber den Erythrozyten der Pute. Lektine mit gleicher Monosaccharid-Spezifität reagieren mit Oligosaccharidketten, die den für sie spezifischen Zucker tragen, mit unterschiedlicher Affinität, da sowohl die Art der Bindung als auch subterminale Zuckerreste die Reaktion beeinflussen (Wu et al., 2009). So zeigt LCA die stärkste Bindung an Mannose-tragende Strukturen, die einen Fukoserest in  $\alpha$ -1,6-Bindung an N-Acetyl-Glukosamin von N-Glykanen aufweisen (Roth, 2011). WGA wurde stets mit deutlicher Affinität von der Zellmembran und häufig auch schwach im Zytoplasma der Erythrozyten gebunden, wohingegen WGAs in den meisten Ausstrichen eine nur schwache Bindung an die Membran zeigte und nicht mit dem Zytoplasma reagierte. Succinyliertes WGA (WGAs) bindet im Gegensatz

zu WGA nicht an N-Acetyl-Neuraminsäuren (Monsigny et al., 1980). Diese, verglichen mit WGA, abgeschwächte Bindung von WGAs an die Zellmembran der roten Blutkörperchen beschrieb auch Gantert (2013) beim Huhn (Gantert, 2013). Sasmal und Mitarbeitern (2002) gelang es ebenfalls, die Bindung eines für N-Acetyl-D-Glukosamin-spezifischen Lektins an die Erythrozytenmembran der Hühner nachzuweisen (Sasmal et al., 2002). Eine weitere Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Gantert (2013) stellt die Reaktion der Erythrozyten mit dem Lektin SNA dar (Gantert, 2013). So konnte auch bei der Pute eine Bindung an die Membran und das Zytoplasma beobachtet werden. Außerdem reagierten die Zellmembran und das Zytoplasma schwach und in nur einem Ausstrich mit dem Lektin PHA-E. Weder die Erythrozyten des Straußes (Scholz, 2012) noch die des Huhnes zeigten eine positive Reaktion mit PHA-E (Gantert, 2013). Dagegen beschrieb Bitzmann (2009) eine Bindung des Lektins an die roten Blutzellen des Rindes (Bitzmann, 2009). PSA, PNA, RCA, VAA, GSL-I, DBA, SBA, SJA, UEA-I, PHA-L und MAA-I reagierten nicht mit den Erythrozyten der Pute. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass die Kohlenhydratketten der Glykokalix der Putenerythrozyten Mannose, Glukose, Galaktose, N-Acetyl-Neuraminsäure, N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Galaktosamin enthalten. Berücksichtigt man zudem die konstante Bindung von WGA, im Vergleich zur teilweise fehlenden Bindung von WGAs, an die Zellmembran, so kann davon ausgegangen werden, dass die Menge an N-Acetyl-Neuraminsäure jene von N-Acetyl-Glukosamin übersteigt. Mit Ausnahme von N-Acetyl-Glukosamin kommen alle genannten Kohlenhydrate in geringerer Menge auch im Zytoplasma der Erythrozyten vor. Das Vorhandensein von wenigen PHA-E-spezifischen Oligosacchariden konnte sowohl für das Zytoplasma als auch die Glykokalix der Putenerythrozyten nachgewiesen werden.

Die Thrombozyten der Pute gingen eine Bindung mit den Lektinen ConA, LCA, PSA, WGA, WGAs und MAA-I ein. Dabei reagierten ConA, WGA und WGAs mit der Membran, dem Zytoplasma und den Granula der Thrombozyten. Eine Bindung von LCA konnte vor allem im Zytoplasma und nur selten an der Zellmembran oder den Granula beobachtet werden. In nur wenigen Ausstrichen fiel außerdem eine positive Reaktion von PSA im Zytoplasma der Thrombozyten auf. Das Lektin MAA-I reagierte ausschließlich mit den zytoplasmatischen

Granula. Dagegen wiesen die Thrombozyten keine Affinität zu den Lektinen PNA, RCA, GSL-I, DBA, SBA, UEA-I, PHA-E, PHA-L, SJA, SNA und VAA auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in der Glykokalix sowie im Zytoplasma und den Granula der Putenthrombozyten Mannose-, Glukose-, N-Acetyl-Glukosamin- und N-Acetyl-Neuraminsäure-haltige Kohlenhydrate vorkommen. In den Granula finden sich zudem noch für MAA-I spezifische Oligosaccharide. Damit stimmen meine Ergebnisse nur zum Teil mit denen von Gantert (2013) überein. So gingen die Lektine ConA, LCA, WGA und WGAs hingegen beim Huhn keine Bindung mit der Zellmembran der Thrombozyten ein. Die beschriebene Reaktion von SNA, PHA-E und RCA mit den Thrombozyten des Huhnes (Gantert, 2013) konnte ich bei der Pute ferner nicht beobachten. Auch Scholz (2012) beschrieb eine Bindung von RCA und PHA-E an die Thrombozyten des Straußes (Scholz, 2012). Anders als bei der Pute reagierten zudem auch PNA und PHA-L. Die Affinität der Straußenthrombozyten zu ConA, LCA, WGA, WGAs und PSA (Scholz, 2012) deckt sich hingegen mit meinen Ergebnissen. DaMatta et al. (1998) beschrieben eine Bindung von UEA-I und PNA an kultivierte Thrombozyten von Hühnern (DaMatta et al., 1998), die ich anhand meiner Arbeit nicht nachweisen konnte. Diese fehlende Übereinstimmung beschrieb auch Gantert (2013) beim Huhn (Gantert, 2013). DaMatta und Mitarbeiter (1998) untersuchten die Thrombozyten jedoch in Zellkulturen und beschrieben ferner im Rahmen der Kultivierung auftretende, morphologische Veränderungen der Zellen (DaMatta et al., 1998). In vorliegender Arbeit wurde das Bindungsverhalten der Lektine hingegen an fixierten Blutausstrichen getestet. So scheint die Methodik einen wesentlichen Einfluss auf die Bindung der Lektine zu haben.

Heterophile Granulozyten reagierten stets mit den Lektinen ConA, LCA, WGA, WGAs und SJA sowie häufig mit PSA und MAA-I. Eine Reaktion mit SNA, PHA-E und PHA-L war in nur wenigen Ausstrichen zu beobachten. Alle genannten Lektine zeigten eine Bindung im Zytoplasma und, mit Ausnahme von MAA-I, auch an die Zellmembran der Heterophilen. Die Granula gingen eine Bindung mit ConA, LCA, PSA, WGA, WGAs, SNA, PHA-E und PHA-L ein. Bei der Reaktion mit ConA konnte in einigen heterophilen Granulozyten eine punktförmige Fluoreszenz des Zytoplasmas beobachtet werden. Andere

Heterophile wiesen dagegen fluoreszierende Granula auf. Möglicherweise stellen die fluoreszierenden Punkte auch positiv reagierende Anteile der Granula dar. WGA führte oftmals zur Anfärbung der Granulohülle, wohingegen ihr Inneres eine wesentlich schwächere bis keine Reaktion aufwies. Bei WGAs war die Unterscheidung zwischen Hülle und Innerem der Granula seltener zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die Granula der Heterophilen der Pute vor allem in ihrer Hülle N-Acetyl-Neuraminsäure enthalten. Darüber hinaus beinhalten die Granula auch reichlich Mannose, Glukose und N-Acetyl-Glukosamin, geringere Mengen an Galaktose und N-Acetyl-Galaktosamin sowie die für die Lektine PHA-E und PHA-L spezifischen Oligosaccharide. Die Glykokalix und das Zytoplasma enthalten Mannose-, Glukose-, N-Acetyl-Glukosamin-, N-Acetyl-Neuraminsäure-, Galaktose- und N-Acetyl-Galaktosamin-haltige Glykokonjugate, sowie die für PHA-E und PHA-L spezifischen Oligosaccharide. Im Zytoplasma der Heterophilen finden sich außerdem noch moderate Mengen der an MAA-I bindenden Oligosaccharide. Die Lektine PNA, RCA, GSL-I, DBA, SBA, UEA-I und VAA zeigten keine Bindung an die heterophilen Granulozyten der Pute. Auch beim Strauß konnte eine Bindung der Lektine ConA, LCA, PSA, WGA, WGAs, SNA, PHA-E, PHA-L und MAA-I an die heterophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Außerdem zeigten auch die Lektine UEA-I, PNA, RCA und DBA eine positive Reaktion (Scholz, 2012), was ich bei der Pute nicht beobachten konnte. Im Gegensatz zum Strauß (Scholz, 2012) war bei der Pute eine Bindung von SJA an die Heterophilen zu beobachten. Die Ergebnisse der glykohistochemischen Untersuchungen der Pute unterscheiden sich ferner auch von denen des Huhnes. So beschrieb Gantert (2013) auch eine Bindung der Lektine ConA, LCA, PSA, SNA, WGA, WGAs, PHA-E und PHA-L, jedoch nicht von SJA und MAA-I an die Heterophilen (Gantert, 2013). Im Unterschied zur Pute reagierten beim Huhn außerdem PNA, RCA, VAA und DBA (Gantert, 2013).

Die eosinophilen Granulozyten der Pute wiesen eine Affinität zu den Lektinen ConA, LCA, PSA, WGA, WGAs, PHA-E und PHA-L auf. WGAs reagierte stets, ConA und WGA häufig mit den Eosinophilen. Eine Reaktion mit PHA-L konnte in nur wenigen Ausstrichen, eine mit den Lektinen LCA, PSA und PHA-E in jeweils nur einem Ausstrich beobachtet werden. Die eosinophilen Granulozyten

der Pute reagierten dagegen nicht mit PNA, RCA, GSL-I, DBA, SBA, UEA-I, MAA-I, SJA, SNA und VAA. Auch Gantert (2013) konnte beim Huhn eine Reaktion der Eosinophilen mit den Lektinen ConA, LCA, PSA, WGA und WGAs nachweisen (Gantert, 2013). Die Eosinophilen der Pute reagierten nicht, wie für das Huhn beschrieben (Gantert, 2013), mit den Lektinen PNA und SNA. Umgekehrt wiesen die Eosinophilen des Huhnes keine Bindungsstellen für PHA-E und PHA-L auf (Gantert, 2013). Letzteres trifft ebenso für die eosinophilen Granulozyten des Straußes zu. Ferner konnte Scholz (2012) beim Strauß eine Bindung der Lektine SNA und MAA-I beobachten (Scholz, 2012). Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Das, auf die zellulären Strukturen der eosinophilen Granulozyten bezogene, Kohlenhydrat-Verteilungsmuster unterschied sich außerdem zum Teil deutlich von dem des Straußes (Scholz, 2012) und des Huhnes (Gantert, 2013). Die zytoplasmatischen Granula zeigten eine Bindung aller positiv reagierenden Lektine. Bei der Reaktion mit ConA, WGA, WGAs und PHA-E fiel ferner auf, dass meist die Hülle stärker fluoreszierte als das Granuluminnere. Dies konnte hingegen seltener bei PHA-L und nicht bei den Lektinen LCA und PSA beobachtet werden, wodurch keine Unterscheidung von Hülle und Inhalt der Granula möglich war. Somit lässt sich folgern, dass in der Hülle der Granula mehr N-Acetyl-Glukosamin, N-Acetyl-Neuraminsäure und PHA-E-spezifische Oligosaccharide vorkommen als in ihrem Inneren. Zudem enthalten die Granula reichlich Mannose- und Glukose-haltige Kohlenhydrate und einige PHA-L-spezifische Oligosaccharide. Das Zytoplasma wies eine Bindung an die Lektine ConA, LCA, PSA, WGAs, PHA-E und PHA-L auf, deren Intensität meist als schwach einzustufen war. WGA reagierte hingegen nicht mit dem Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Zytoplasma der Puteneosinophilen geringe Mengen an Mannose, Glukose, N-Acetyl-Glukosamin, PHA-E- und PHA-L-spezifischen Oligosacchariden beinhaltet. Die Glykokalix trägt außerdem wenige Mannose- und Glukose-haltige Kohlenhydrate, sowie moderate Mengen an N-Acetyl-Neuraminsäure und reichlich N-Acetyl-Glukosamin. Außerdem kommen auch für PHA-L spezifische Oligosaccharide in der Glykokalix der Eosinophilen der Pute vor. So reagierte die Zellmembran mit den Lektinen ConA, WGA, WGAs und PHA-L, jedoch nicht mit LCA, PSA und PHA-E.

Die basophilen Granulozyten zeigten eine Bindung an die Lektine ConA, LCA, PSA, WGA und WGAs. PNA, RCA, GSL-I, DBA, SBA, UEA-I, SJA, SNA, PHA-E, PHA-L, VAA und MAA-I reagierten hingegen nicht mit den Basophilen der Pute. Die Zellmembran wies eine nicht immer zu beobachtende und nur schwache Bindung an ConA, LCA und WGAs auf. WGA wurde hingegen mit schwacher bis deutlicher Affinität und zudem häufiger gebunden. Die Membran reagierte jedoch nicht mit PSA. Das Bindungsmuster weist darauf hin, dass die Glykokalix der Putenbasophilen geringe Mengen an Mannose-, Glukose- und N-Acetyl-Glukosamin-haltigen Kohlenhydraten sowie eine größere Menge N-Acetyl-Neuraminsäure enthält. Auch im Zytoplasma konnte, mit Ausnahme von PSA, eine schwache Bindung der genannten Lektine nachgewiesen werden, die jedoch im Vergleich zur Membran häufiger zu beobachten war. So kommen im Zytoplasma der Basophilen moderate Mengen an Glukose, Mannose, N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure vor. Die Granula zeigten zu PSA eine schwache bis deutliche, zu allen anderen positiv reagierenden Lektinen hingegen eine deutliche bis starke Bindung und enthalten demnach eine größere Menge aller, für das Zytoplasma und die Zellmembran genannten, Monosaccharide. Auffallend war, dass WGA und WGAs vor allem an die Hülle der Granula zu binden schienen und das Innere schwächer reagierte. So kommen in der Hülle vermutlich größere Mengen N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure vor als im Granuluminneren. Scholz (2012) beobachtete in ihren glykohistochemischen Untersuchungen der basophilen Granulozyten des Straußes hingegen nie eine Reaktion der zytoplasmatischen Granula (Scholz, 2012). Übereinstimmend mit meinen Ergebnissen, zeigte sich jedoch auch beim Strauß eine Bindung von ConA, LCA, WGA und WGAs an das Zytoplasma und die Zellmembran der Basophilen (Scholz, 2012). Beim Huhn konnte Gantert (2013) ebenfalls das Binden von ConA, WGA und WGAs an die Membran, sowie eine Reaktion von ConA, LCA, WGA und WGAs mit dem Zytoplasma und den Granula der Basophilen nachweisen (Gantert, 2013). Entgegen den Ergebnissen bei der Pute, reagierte neben den Granula auch das Zytoplasma der Basophilen des Huhnes mit dem Lektin PSA. Außerdem zeigten auch RCA, SNA, PNA, PHA-E, PHA-L und MAA-I eine Bindung an die basophilen Granulozyten des Huhnes (Gantert, 2013), die ich bei der Pute nicht beobachten konnte. Auch Sorrell (1988) wies in seinen ultrastrukturellen Untersuchungen die Bindung von

PNA an die basophilen Granulozyten im Knochenmark von Hühnerembryonen nach (Sorrell, 1988) und Scholz (2012) beschrieb eine schwache Bindung des Lektins beim Strauß (Scholz, 2012). Diese Beobachtungen decken sich jedoch nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. So besitzen die Basophilen der Pute keine Bindungsstellen für PNA.

Die Monozyten der Pute gingen eine Bindung mit ConA, LCA, PSA, WGA und WGAs ein. Keine Reaktion konnte hingegen bei den Lektinen PNA, RCA, GSL-I, DBA, SBA, UEA-I, PHA-E, PHA-L, MAA-I, SJA, SNA und VAA nachgewiesen werden. Scholz (2012) und Gantert (2013) beobachteten ebenso eine Bindung der genannten Lektine an die aviären Monozyten (Scholz, 2012; Gantert, 2013). Entgegen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte beim Strauß jedoch zusätzlich eine Reaktion mit den Lektinen PNA, RCA und PHA-E nachgewiesen werden (Scholz, 2012). Ferner beschrieb Gantert (2013) eine Bindung des Lektins SNA an die Monozyten des Huhnes (Gantert, 2013), die ich bei der Pute nicht beobachten konnte. Die Zellmembran der Putenmonozyten hatte stets eine hohe Affinität zu den Lektinen WGA und WGAs, was auf das Vorhandensein von reichlich N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure in der Glykokalix hinweist. Zudem enthält sie noch geringe Mengen Mannose und Glukose, da die Lektine ConA, LCA und PSA nur selten eine meist schwache Reaktion mit der Zellmembran zeigten. Ihre Bindung im Zytoplasma war dagegen stets mit meist schwacher, bei PSA auch häufig mit deutlicher Intensität zu beobachten. WGA und WGAs zeigten zum Teil sogar eine starke Bindung im Zytoplasma. Dies lässt auf moderate Mengen an Mannose- und Glukose-haltigen Glykokonjugaten sowie reichlich N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure im Zytoplasma der Monozyten schließen. Die stärkste Bindung der positiv reagierenden Lektine zeigte sich an den zytoplasmatischen Granula der Putenmonozyten und deutet darauf hin, dass sie größere Mengen der genannten Monosaccharide beinhalten.

Mit den Lymphozyten der Pute reagierten die Lektine ConA, LCA, PSA, WGA, WGAs, SNA, PHA-E und MAA-I. Mit Ausnahme von MAA-I, wurde für alle positiv reagierenden Lektine eine Bindung an die Zellmembran nachgewiesen. Dabei zeigten LCA, WGA und WGAs die stärkste Bindung und auch das Lektin ConA eine meist deutliche Reaktion. Nicht immer wies die Lymphozytenmembran jedoch eine Affinität zu PSA, SNA und PHA-E auf. Das

Lektinbindungsmuster belegt, dass in der Glykokalix der Putenlymphozyten reichlich Mannose, Glukose, N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure vorkommen. Zudem enthält sie noch moderate Mengen an Galaktose und N-Acetyl-Galaktosamin, sowie wenige für PHA-E spezifische Oligosaccharide. Das Zytoplasma der Putenlymphozyten wies überwiegend eine Bindung von ConA, LCA, WGA und WGAs auf. MAA-I reagierte hingegen gelegentlich, die Lektine SNA und PHA-E zeigten sogar nur selten eine Bindung im Zytoplasma. Diese Befunde weisen darauf hin, dass im Zytoplasma der Lymphozyten der Pute große Mengen Mannose-, Glukose-, N-Acetyl-Glukosamin- und N-Acetyl-Neuraminsäure-haltige Glykokonjugate, sowie geringe Mengen Galaktose- und N-Acetyl-Galaktosamin-haltige Kohlenhydrate vorhanden sind. Außerdem kommen auch wenige MAA-I- und PHA-E-spezifische Oligosaccharide vor. Die Granula hatten die höchste Affinität zu LCA und enthalten demnach reichlich Mannose und Glukose. WGA zeigte eine überwiegend starke Bindung an die Granula, eine Reaktion mit WGAs und MAA-I war dagegen seltener zu beobachten. Für ConA, PSA, SNA und PHA-E fiel die Reaktion negativ aus. So beinhalten die Granula der Lymphozyten außerdem auch N-Acetyl-Glukosamin, N-Acetyl-Neuraminsäure und für MAA-I spezifische Oligosaccharide. Die Lymphozyten der Pute reagierten nicht mit den Lektinen PNA, RCA, GSL-I, DBA, SBA, UEA-I, PHA-L, SJA und VAA. Übereinstimmend sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen von Maheswaran et al. (1975), Sharma und Belzer (1992) sowie von Loa und Mitarbeitern (2001), die ebenfalls eine Bindung von ConA an die Lymphozyten der Pute nachweisen konnten (Maheswaran et al., 1975; Sharma und Belzer, 1992; Loa et al., 2001). Beim Strauß beobachtete Scholz (2012) auch eine Bindung der Lektine ConA, LCA, PSA, WGA, WGAs, SNA und PHA-E an die Lymphozyten (Scholz, 2012). Entgegen meinen Ergebnissen zeigten zudem RCA und PNA eine Reaktion (Scholz, 2012). Die Lymphozyten des Huhnes hatten ebenfalls eine Affinität zu ConA, LCA, PSA, WGA, WGAs und SNA. Die positive Reaktion mit RCA (Gantert, 2013) deckt sich jedoch nicht mit meinen Befunden. Auch Flower und Wilcox (1981) beschrieben eine Bindung des Lektins WGA an die Lymphozyten des Huhnes (Flower und Wilcox, 1981). Entgegen den Ergebnissen bei der Pute stellten Schauenstein und Mitarbeiter (1983) fest, dass PNA an die Lymphozyten von Hühnern bindet. Durch eine Vorbehandlung mit dem Enzym Neuraminidase,

welche zelloberflächliche Sialinsäure abspaltet, wurden weitere Galaktosereste frei und zuvor PNA-negative Zellen gingen nun auch eine Bindung mit dem Lektin ein (Schauenstein et al., 1983). Higgins und Chung (1986) kamen bei ihren Untersuchungen der Lymphozyten von Enten zu ähnlichen Ergebnissen (Higgins und Chung, 1986). Auch nach der Neuraminidase-Vorbehandlung fiel die Reaktion der Lymphozyten der Pute negativ aus. So scheint die Glykokalix der Putenlymphozyten keine an Sialinsäure gebundene Galaktose zu tragen.

Die Vorbehandlung mit dem Enzym Neuraminidase wurde bei den Lektinen DBA, GSL-I, PNA, SBA und VAA durchgeführt. Dieses Enzym dient der Abspaltung terminaler Sialinsäure von Oligosacchariden (Gabijs, 2009b). Keines der Lektine zeigte nach der Vorbehandlung eine Reaktion mit den Blutzellen der Pute. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in den Blutzellen der Pute sowie in ihrer jeweiligen Glykokalix keine von Sialinsäure maskierten Galaktose- und N-Acetyl-Galaktosaminreste vorkommen. Entgegen meinen Befunden konnte Scholz (2012) jedoch nach Neuraminidase-Vorbehandlung beim Strauß eine positive Reaktion der heterophilen Granulozyten mit SBA und GSL-I nachweisen. Auch PNA zeigte anschließend eine verstärkte Bindung an die Heterophilen und eine schwache Reaktion mit den Erythrozyten (Scholz, 2012). Ferner beschrieb Gantert (2013) beim Huhn sialysierte N-Acetyl-Galaktosaminreste in den Granula der heterophilen Granulozyten (Gantert, 2013), was sich ebenfalls nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deckt.

ConA, LCA, PSA, WGA und WGAs zeigten eine deutliche Bindung an die Blutzellen der Pute. Ihre Spezifität für bestimmte Monosaccharide wurde mit Hilfe einer Hemmzucker-Vorbehandlung getestet. Anschließend konnte eine wesentlich schwächere Bindung der Lektine ConA, LCA, WGA und WGAs an die Blutzellen beobachtet werden und die Reaktion von PSA fiel negativ aus. Diese Befunde belegen eine Spezifität der Lektine für die jeweils verwendeten Hemmzucker (siehe Tabelle 5).

Laut Angaben in der Literatur kommt es in Bezug auf die Bindung von Lektinen mit gleicher Monosaccharid-Spezifität zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen (Brooks et al., 1997). Dies kann durch vorliegende Arbeit bestätigt werden. So fiel auf, dass die meisten für Galaktose- und N-Acetyl-Galaktosamin-spezifischen Lektine keine Bindung mit den Blutzellen der Pute eingingen, wohingegen SJA

und SNA eine Reaktion zeigten. Neben der Interaktion mit dem Glykan wird die Bindungsspezifität eines Lektins auch durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen beeinflusst (Brooks et al., 1997; Roth, 2011). Außerdem wirken sich auch Färbe- und Fixierungsvorgänge auf die Lektinbindung aus (Brooks et al., 1997). Wie bereits erwähnt, gilt eine Gruppeneinteilung der Lektine anhand ihrer nominalen Zuckerspezifität ferner als zu stark vereinfacht (Brooks et al., 1997; Roth, 2011). Die eigentlichen Bindungspartner der Lektine stellen komplexe dreidimensionale Strukturen dar (Brooks et al., 1997). Ferner besitzen viele Pflanzenlektine zusätzlich zu den Bindungsstellen für Kohlenhydrate auch solche, die nicht gegen Zuckerstrukturen gerichtet sind (Rüdiger, 1998). Zum Beispiel ist ConA in der Lage an  $\beta$ -Indolessigsäure und Tryptophan zu binden (Edelman und Wang, 1978; Rüdiger, 1998). Beim Vergleich der Ergebnisse der Pute mit denen des Straußes (Scholz, 2012) und des Huhnes (Gantert, 2013) fanden sich neben einigen Übereinstimmungen auch zum Teil deutliche Unterschiede in Bezug auf das Lektinbindungsmuster der einzelnen Blutzellen (Scholz, 2012; Gantert, 2013). Diese Ergebnisse lassen eine speziesspezifische Kohlenhydratausstattung aviärer Blutzellen vermuten.

## 5 Immunzytochemie

### 5.1 T-Lymphozyten-Antigene

Die Lymphozyten der Pute wurden auf die Bindung von FITC-markierten CD8 $\alpha$ - und CD4-Antikörpern untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen der T-Lymphozyten der Pute zeigten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede.

In vorliegender Arbeit konnte stets eine Bindung des CD8 $\alpha$ -Antikörpers (3-298; ABCAM, Cambridge) an die Lymphozyten nachgewiesen werden. Damit stimmen meine Ergebnisse mit denen von Li und Mitarbeitern (1999) überein, die ebenfalls den Antikörper der Klon-Nummer 3-298 in ihren Untersuchungen verwendeten und seine Bindung an die Blutlymphozyten der Pute beschrieben (Li et al., 1999). Entgegen den Befunden von Gantert (2013) beim Huhn (Gantert, 2013), war bei der Pute jedoch meist eine starke Reaktion im Bereich der Zellmembran zu erkennen. Auch das Zytoplasma zeigte sich manchmal diffus

schwach leuchtend und enthielt oftmals auch stärker fluoreszierende, punktförmige Strukturen. Dies deckt sich wiederum mit den Befunden von Gantert (2013), die ein Binden des CD8 $\alpha$ -Antikörpers an das Zytoplasma und die Granula der Lymphozyten des Huhnes beschrieb (Gantert, 2013). Nicht in allen Blutaussstrichen war eine Reaktion des CD4-Antikörpers mit den Lymphozyten nachzuweisen und mit dem Alter der Ausstriche nahm die Stärke der Reaktion zudem merklich ab. Der CD4-Antikörper zeigte, im Gegensatz zum Huhn (Gantert, 2013), ebenso eine Bindung an die Zellmembran der Lymphozyten der Pute. Er reagierte ferner mit ihrem Zytoplasma. Manchmal wiesen die Zellen außerdem ein granuläres Reaktionsmuster auf, was auch von Gantert (2013) für die Lymphozyten des Huhnes beschrieben ist (Gantert, 2013). Anhand vorliegender Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass sowohl das CD8 $\alpha$ - als auch das CD4-Molekül auf der Zellmembran, im Zytoplasma und auch in den Granula der Lymphozyten der Pute vorkommen. Andere Blutzellen reagierten mit keinem der beiden Antikörper.

Laut Suresh und Mitarbeitern (1993) befinden sich im Blut der Pute im Durchschnitt mehr CD4<sup>+</sup>- als CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten (Suresh et al., 1993), was ich mit meinen Ergebnissen nicht bestätigen konnte. Tendenziell beobachtete ich in den Blutaussstrichen mehr CD8<sup>+</sup>- als CD4<sup>+</sup>-Zellen. Dies hängt möglicherweise aber auch mit der vergleichbar geringeren Reaktionsbereitschaft des CD4-Antikörpers bei der Pute zusammen.

## 5.2 Eosinophil major basic protein

Ein, zur Detektion des Major basic proteins der eosinophilen Granulozyten des Menschen, geeigneter Antikörper wurde auf seine Kreuzreaktivität gegenüber den Eosinophilen der Pute untersucht. Das Major basic protein stellt ein kationisches Protein dar, das in den Granula der Säugereosinophilen zu finden ist. Es kommt ferner auch in den basophilen Granulozyten vor (Young, 2000). In keinem der untersuchten Blutaussstriche konnte eine Bindung des Antikörpers an die eosinophilen Granulozyten der Pute beobachtet werden. Auch Gantert (2013) konnte in ihren Untersuchungen nur vereinzelt schwache, unspezifische Reaktionen der Granula der Eosinophilen des Huhnes nachweisen (Gantert, 2013). Ferner zeigten auch alle anderen Blutzellen der Pute eine negative

Reaktion. Wie beim Huhn (Gantert, 2013) stellt der verwendete Antikörper demzufolge kein geeignetes Hilfsmittel zum Nachweis des Major basic proteins bei der Pute dar.

## 6 Zytoskelett

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Zytoskeletts ergaben keine Unterschiede in Bezug auf das Geschlecht der Puten.

Die Erythrozyten der Pute zeigten eine schwache Bindung von Phalloidin im Bereich der Zellmembran. In den aviären Erythrozyten befindet sich ein Netzwerk aus Aktin und Spektrin unterhalb der Zellmembran (Branton et al., 1981; Granger et al., 1982; Repasky et al., 1982; Lazarides, 1984). Dieses Netzwerk stellt das Membranskelett der Erythrozyten dar (Cohen, 1991). Meine Untersuchungen deuten darauf hin, dass auch in den Erythrozyten der Pute Aktinfilamente unterhalb der Membran verlaufen. Scholz (2012) und Gantert (2013) beschrieben ebenso das Vorkommen von Aktinfilamenten unterhalb der Zellmembran der aviären Erythrozyten (Scholz, 2012; Gantert, 2013). Der Nachweis von Vimentin fiel in den Putenerythrozyten auch positiv aus. Im Zytoplasma konnten zahlreiche stark leuchtende, punkt- oder fadenförmige Reaktionen beobachtet werden, die zum Teil eine netzartige Anordnung aufwiesen. Auch Scholz (2012) konnte Vimentin im Zytoplasma der roten Blutzellen des Straußes nachweisen (Scholz, 2012). Beim Huhn fiel die Reaktion hingegen negativ aus (Gantert, 2013). Vimentin und Synemin bilden die Intermediärfilamente aviärer Erythrozyten (Granger et al., 1982), die als dreidimensionales Netzwerk den Zellkern mit der Plasmamembran verbinden. Dabei stellt Vimentin den Hauptbestandteil der Filamente dar (Granger und Lazarides, 1982). Auch Granger und Mitarbeiter (1982) zeigten das Vorkommen von Vimentin in den Erythrozyten der Pute (Granger et al., 1982). Durch vorliegende Arbeit konnte zudem die netzartige Anordnung von Vimentin auch für die roten Blutzellen der Pute bestätigt werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Scholz (2012) für den Strauß (Scholz, 2012), konnte ich ein Binden des Tubulin-Antikörpers im Bereich der Zellmembran und im Zytoplasma der roten Blutzellen der Pute nachweisen. In

den Vogelerythrozyten liegen die Mikrotubuli als marginales Bündel direkt unterhalb der Plasmamembran (Behnke, 1970). Laut Cohen (1991) können wenige Mikrotubuli auch in anderen Bereichen der Zelle gefunden werden (Cohen, 1991). Das Zytoplasma enthält gelöste Tubulin-Moleküle, die beim Ab- und Wiederaufbau der Mikrotubuli dem Austausch dienen (Alberts et al., 1986).

In den Thrombozyten der Pute fiel der Nachweis von Aktin positiv aus. So reagierten die Zellen stark im Bereich der Zellmembran und zeigten oftmals ein Netzwerk fädiger Strukturen im Zytoplasma, welches auch Scholz (2012) und Gantert (2013) in den aviären Thrombozyten beobachteten (Scholz, 2012; Gantert, 2013). Auch Lee und Mitarbeiter (2004) konnten in den kernhaltigen Thrombozyten des Katzenhais ein Band aus F-Aktin nachweisen, welches unterhalb der Zellmembran verlief. Die Zellen enthielten zudem ein kortikales Netzwerk aus Aktinfilamenten. Ferner beschrieben die Autoren eine aktivierungsbedingte Umverteilung und anschließende fadenförmige Ausbreitung von F-Aktin über die gesamte Zelle (Lee et al., 2004). So stellt das Netzwerk aus Aktinfilamenten im Zytoplasma der Putenthrombozyten vermutlich ein Anzeichen der Zellaktivierung dar. Entgegen den Angaben für Strauß (Scholz, 2012) und Huhn (Gantert, 2013) reagierte der Vimentin-Antikörper nicht mit den Thrombozyten der Pute. In den Blutplättchen von Mensch und Rind sollen die Vimentinfilamente als Verbindung zwischen den Mikrotubuli und der Plasmamembran für die Scheibenform der Zellen verantwortlich sein (Tablin und Taube, 1987). In den aviären Thrombozyten dient vermutlich das marginale Band aus Mikrotubuli der Wahrung der Zellform. Dieses verläuft direkt unterhalb der Zellmembran (Behnke, 1970). In vorliegender Arbeit konnte ich in den meisten Blutaussstrichen eine schwache bis deutliche Reaktion im Bereich der Zellmembran beobachten, was darauf schließen lässt, dass auch in den Putenthrombozyten Mikrotubuli unterhalb der Zellmembran verlaufen. Zudem ließ sich das marginale Band aus Mikrotubuli elektronenmikroskopisch darstellen (siehe Punkt IV. 3.2 und V. 3). Auch im Zytoplasma der Thrombozyten war eine Reaktion mit dem Tubulin-Antikörper vor allem in der Nähe des Zellkerns zu beobachten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Scholz (2012) für den Strauß und Gantert (2013) für das Huhn, die neben dem marginalen Band auch im Zytoplasma der Thrombozyten Mikrotubuli beschrieben (Scholz, 2012; Gantert,

2013). In den kernhaltigen Thrombozyten führt eine Aktivierung zur Formveränderung des marginalen Bands. Dieses biegt sich und umgibt so anschließend den Zellkern (Lee et al., 2004).

Heterophile Granulozyten zeigten eine deutliche bis starke Bindung von Phalloidin-TRITC im Zytoplasma sowie meist auch im Bereich der Zellmembran. Terashima und Mitarbeiter konnten Aktin bereits in den Heterophilen von Hühnern nachweisen (Terashima et al., 1992). Meine Ergebnisse stimmen mit denen von Scholz (2012) beim Strauß und Gantert (2013) beim Huhn überein, die ebenso eine Bindung von Phalloidin an das Zytoplasma und den Bereich der Zellmembran der heterophilen Granulozyten beschrieben (Scholz, 2012; Gantert, 2013). So scheinen die Aktinfilamente in den Heterophilen der Pute, wie auch in den Neutrophilen der Säuger (Oliver et al., 1978), unterhalb der Zellmembran zu verlaufen. Zudem befindet sich Aktin auch wabenartig oder punktförmig angeordnet im gesamten Zytoplasma der heterophilen Granulozyten. Der Nachweis von Vimentin fiel ebenso positiv aus. Dabei ließ sich eine diffus verteilte, punkt- bis selten fadenförmige Reaktion im Zytoplasma nachweisen. Ähnliche Beobachtungen machten auch Scholz (2012) und Gantert (2013). Sie beschrieben ein punktförmiges Bindungsmuster des Vimentin-Antikörpers im Zytoplasma der aviären Heterophilen (Scholz, 2012; Gantert, 2013). Während die Reaktion beim Huhn vor allem in der Nähe des Kerns zu sehen war (Gantert, 2013), zeigte sich bei der Pute eine diffuse Verteilung von Vimentin im gesamten Zytoplasma. Die beim Strauß zudem beschriebene netzförmige Anordnung von Vimentin (Scholz, 2012), konnte ich bei der Pute nicht beobachten. Der Tubulin-Antikörper zeigte keine Reaktion mit den heterophilen Granulozyten der Pute, was einen Unterschied zu den Ergebnissen bei anderen Vogelarten darstellt (Scholz, 2012; Gantert, 2013).

In vorliegender Arbeit konnte keine Reaktion der eosinophilen Granulozyten mit dem Aktin- oder Tubulin-Antikörper nachgewiesen werden. Dies ist ein Unterschied zum Strauß (Scholz, 2012) und dem Huhn (Gantert, 2013). Der Nachweis von Vimentin fiel in den Eosinophilen der Pute hingegen selten positiv aus. So wies das Zytoplasma ein netzartiges Reaktionsmuster auf und auch die Hülle der Granula reagierte zum Teil mit dem Antikörper. Weitere Vimentinfilamente verliefen zudem perinukleär. Auch andere Autoren konnten

Vimentin in den aviären Eosinophilen nachweisen (Scholz, 2012; Gantert, 2013).

Basophile Granulozyten der Pute enthielten Aktin, welches in Form eines Netzwerks im Zytoplasma angeordnet war, die Granula umgab und auch den Zellkern überlagerte. Die von Scholz (2012) beschriebene Reaktion im Bereich der Zellmembran der Basophilen des Straußes (Scholz, 2012), konnte ich bei der Pute nicht beobachten. Ferner befand sich Aktin beim Strauß auch im Zytoplasma der Basophilen (Scholz, 2012), was sowohl mit den Ergebnissen für das Huhn (Gantert, 2013) als auch mit meinen Befunden übereinstimmt. Auch Enbergs (1975) beschrieb Mikrofilamente, besonders im Bereich der spezifischen Granula der aviären Basophilen (Enbergs, 1975). In den basophilen Granulozyten des Menschen konnte neben Aktin auch Tubulin nachgewiesen werden. Beiden kommt vermutlich eine Rolle bei der Freisetzung von Histamin zu (Nielsen et al., 2004). Die Basophilen der Pute zeigten hingegen, wie bereits für das Huhn beschrieben (Gantert, 2013), keine Reaktion mit dem Tubulin-Antikörper. Beim Strauß konnte Scholz (2012) jedoch eine positive Reaktion beobachten (Scholz, 2012) und auch Enbergs (1975) beschrieb das Vorkommen von Mikrotubuli in den basophilen Granulozyten des Hausgeflügels (Enbergs, 1975). Vimentinfilamente lagen in den Putenbasophilen als zytoplasmatisches Netzwerk vor. Dies deckt sich mit den Ergebnissen beim Strauß (Scholz, 2012).

Die Monozyten der Pute zeigten eine schwache Reaktion des Zytoplasmas mit Phalloidin-TRITC, die hauptsächlich in Zellkernnähe lokalisiert war. Demnach lassen meine Ergebnisse auf das Vorhandensein von Aktin in den Monozyten der Pute schließen. Auch Enbergs (1975) beschrieb, vor allem in der Nähe des Zellkerns verlaufende, variable Bündel von Mikrofilamenten in den Monozyten des Hausgeflügels (Enbergs, 1975). Scholz (2012) und Gantert (2013) beobachteten hingegen eine starke Reaktion von Phalloidin-TRITC im gesamten Zytoplasma der aviären Monozyten (Scholz, 2012; Gantert, 2013). Wie bereits von anderen Autoren für die Monozyten des Vogels beschrieben (Beneš et al., 2006; Scholz, 2012; Gantert, 2013), stellt Vimentin auch bei der Pute einen Bestandteil des monozytären Zytoskeletts dar. So konnte ich neben einer deutlichen, wabenartigen Reaktion des gesamten Zytoplasmas auch teilweise ein Binden des Antikörpers an Zellmembran-Bereiche nachweisen. Vimentin spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Differenzierung von Monozyten zu

Makrophagen (Beneš et al., 2006). Ebenso wie die Monozyten des Straußes (Scholz, 2012), enthalten auch die des Huhnes Mikrotubuli (Maxwell und Trejo, 1970; Gantert, 2013). Bei der Pute fiel der Nachweis von Tubulin in den Monozyten dagegen negativ aus.

Als Bestandteile des Zytoskeletts konnten in den Lymphozyten der Pute Aktin, Vimentin und Tubulin identifiziert werden. So befand sich Aktin im Membranbereich, als auch netzartig über das gesamte Zytoplasma verteilt in den Putenlymphozyten. Gantert (2013) beschrieb eine ähnliche Anordnung der Aktinfilamente in den Lymphozyten des Huhnes (Gantert, 2013). Auch beim Strauß kommen Aktinfilamente sowohl membrannah verlaufend als auch im Zytoplasma der Zellen vor (Scholz, 2012). In den humanen Lymphozyten befindet sich Aktin dagegen vor allem im submembranösen Bereich und in den Mikrovilli (Brown et al., 2001). Vimentinfilamente können netzwerkartig angeordnet im Zytoplasma und in Membrannähe beobachtet werden. Andere Autoren beschrieben ebenfalls den Nachweis von Vimentin in den aviären Lymphozyten (Scholz, 2012; Gantert, 2013). Die Lymphozyten des Menschen enthalten ein Netzwerk aus Vimentinfilamenten, das über das gesamte Zytoplasma verteilt ist (Brown et al., 2001). Die Mikrotubuli präsentierten sich als fadenförmige Strukturen, die das Zytoplasma durchzogen und häufig gemeinsam von einem deutlich oder stark fluoreszierenden Bereich ausstrahlten, welcher vermutlich das Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC) darstellt, das auch für die Lymphozyten des Menschen beschrieben wurde (Brown et al., 2001). Auch diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Gantert (2013) für das Huhn (Gantert, 2013).

Zur Detektion der zytoskelettalen Bestandteile Aktin, Vimentin, Tubulin, Myosin und Panzytokeratin wurden sowohl in Methanol fixierte als auch unfixierte Blutaussstriche verwendet. Wie für das Huhn beschrieben (Gantert, 2013), konnte Aktin auch bei der Pute ausschließlich in nicht-fixierten Ausstrichen nachgewiesen werden, wohingegen das Vorkommen von Tubulin bei der Pute nur in unfixierten, beim Huhn hingegen nur in fixierten Ausstrichen gezeigt werden konnte (Gantert, 2013). Die Reaktion der Putenblutzellen mit dem Vimentin-Antikörper wurde durch eine vorherige Methanol-Fixierung meist abgeschwächt. Nicht-Muskel Myosin und Panzytokeratin konnten weder in fixierten noch in

---

unfixierten Blutausstrichen nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Gantert (2013) für das Huhn überein (Gantert, 2013).

## VI. Zusammenfassung

Zur näheren Charakterisierung der Blutzellen der Pute (*Meleagris gallopavo var. domesticus*) wurden in vorliegender Doktorarbeit verschiedene lichtmikroskopische Färbungen sowie die Elektronenmikroskopie angewandt. Ferner dienten glykohistochemische Techniken der Untersuchung der zellulären Kohlenhydratstrukturen und mit Hilfe histochemischer Methoden konnten außerdem bestimmte Antigene der T-Lymphozyten und das Zytoskelett aller Blutzellen analysiert werden. Die Blutproben stammten von insgesamt 34 Puten verschiedenen Alters und Geschlechts der Rasse B.U.T. 6. In meinen Untersuchungen konnte ich keine geschlechts- oder altersbedingten Unterschiede im Blut der Pute feststellen.

Die lichtmikroskopischen und substrathistochemischen Untersuchungen der Putenblutzellen erfolgten anhand der Hemacolor®-, H.-E.-, Giemsa-, May-Grünwald-, Pappenheim-, Sirius Red-, Toluidinblau-, PAS- und Alcianblau-Färbung. Die Erythrozyten konnten in allen Färbungen gut identifiziert werden. Die Granula der Thrombozyten waren vor allem nach Hemacolor®, H.-E.-, Giemsa-, May-Grünwald- und Pappenheim-Färbung zu beobachten. Heterophile Granula stellten sich mit Hilfe der May-Grünwald-, Pappenheim- und Sirius Red-Färbung besonders schön dar, wohingegen sich die Granula der Eosinophilen nur nach May-Grünwald-Färbung deutlich angefärbt präsentierten. Zur Beurteilung der Granula der Basophilen eignete sich vor allem die Toluidinblau-Färbung. Monozyten waren im Blutaussstrich stets gut zu erkennen und stellten sich nach Hemacolor®- und May-Grünwald-Färbung besonders klar dar. Granula der Lymphozyten konnten nur mit Hilfe der Hemacolor® Schnellfärbung beobachtet werden. Mit Ausnahme der Erythrozyten fiel der Nachweis von Glykogen in allen Blutzellen der Pute bei der PAS-Reaktion positiv aus. Nach Amylase-Vorbehandlung war nur noch in den Lymphozyten eine schwache Reaktion zu erkennen. Die basophilen Granulozyten reagierten nach Alcianblau-Färbung bei beiden pH-Werten positiv. Zudem konnte bei einem pH-Wert von 1,0 auch in den eosinophilen Granulozyten und bei pH 2,5 in den Heterophilen eine positive Reaktion beobachtet werden.

Bei den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen fiel in den Erythrozyten der Pute das marginale Band aus Mikrotubuli auf. Auch in den Thrombozyten konnten Mikrotubuli nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den drei verschiedenen Typen von Granula in den Heterophilen, konnte in den Eosinophilen der Pute nur eine Art Granulum von beachtlicher Größe beobachtet werden. Die Granula der Basophilen wiesen Inhalt von unterschiedlicher Dichte und Homogenität auf. Monozyten präsentierten reichlich Zytoplasma, in dem sich zahlreiche Zellorganellen, darunter auch Granula, befanden. Bei der ultrastrukturellen Untersuchung der Lymphozyten fielen sowohl die zytoplasmatischen Einschlüsse als auch die langen Reihen parallel angeordneter, runder Strukturen im Zytoplasma auf.

Zum Nachweis verschiedener Kohlenhydratstrukturen der Putenblutzellen dienten die FITC-markierten Lektine ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, WGA, WGAs, GSL-I, DBA, SBA, UEA-I, PHA-E und PHA-L sowie die biotinylierten Lektine MAA-I, SJA, SNA und VAA. Die stärkste Reaktion aller Zellen konnte dabei mit den Lektinen ConA, WGA und WGAs beobachtet werden. Die Lektine PNA, RCA, GSL-I, DBA, SBA, UEA-I und VAA zeigten keine Reaktion mit den Blutzellen der Pute. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es sich bei den, am häufigsten in den Blutzellen der Pute vorkommenden, Zuckerstrukturen um Mannose, Glukose, N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure handelt. Galaktose und N-Acetyl-Galaktosamin konnten lediglich in den Erythrozyten, heterophilen Granulozyten und Lymphozyten der Pute nachgewiesen werden.

Der immunzytochemische Nachweis der CD4- und CD8 $\alpha$ -Antigene der Lymphozyten der Pute fiel positiv aus. Sowohl die Zellmembran als auch das Zytoplasma der Lymphozyten zeigten eine Bindung beider Antikörper.

Zur Untersuchung des Zytoskeletts der Putenblutzellen dienten FITC-markierte Antikörper gegen Vimentin, Tubulin, Nicht-Muskel Myosin und Panzytokeratin sowie Phalloidin-TRITC zum Nachweis von F-Aktin. Letzteres konnte, mit Ausnahme der eosinophilen Granulozyten, in allen Blutzellen der Pute nachgewiesen werden. Für Vimentin fiel der Nachweis in den Thrombozyten negativ aus, alle anderen Zellen stellten sich positiv dar. Der Tubulin-Antikörper reagierte nur mit den Erythrozyten, Thrombozyten und Lymphozyten der Pute. Eine vorherige Fixierung der Blutausrichungen mit Methanol hatte eine negative

Reaktion des Tubulin-Antikörpers sowie von Phalloidin-TRITC, und eine abgeschwächte Reaktion des Vimentin-Antikörpers mit den Blutzellen der Pute zur Folge. Unfixierte Blutaussstriche zeigten dagegen deutlich positive Reaktionen. Die Blutzellen der Pute enthielten weder Nicht-Muskel Myosin noch Panzytokeratin.

## VII. Summary

### Ultrastructural, glycohistochemical and immunohistochemical studies of turkey blood cells

In my thesis I used different light microscopical staining methods as well as transmission electron microscopy to study the functional morphology of blood cells of the turkey (*Meleagris gallopavo var. domesticus*). Furthermore, carbohydrate structures were examined using glycohistochemical techniques and the cytoskeleton of all blood cells as well as the antigens of the T lymphocytes were studied with histochemical methods. Blood samples were taken from 34 B. U. T. 6 female (25) and male (9) turkeys of different age and gender. My results did not demonstrate any age- or sex-related differences of the morphology of turkey blood cells.

The following conventional staining methods and substrate-histochemical techniques were used: Hemacolor®, H.-E., Giemsa, May-Grünwald, Pappenheim, Sirius Red, Toluidin blue, PAS and Alcian blue staining. Erythrocytes could be identified well by all staining techniques. The granules of the thrombocytes were especially well observed with Hemacolor®, H.-E., Giemsa, May-Grünwald and Pappenheim staining. Heterophil granules stained intensely with May-Grünwald, Pappenheim and Sirius Red staining, whereas the granules of the eosinophils were only clearly seen with May-Grünwald staining. The granules of basophilic granulocytes were best seen with Toluidin blue staining. Monocytes could always be clearly identified and showed an especially good staining with Hemacolor® and May-Grünwald staining. Granules of the lymphocytes were only visible using the Hemacolor® method. With exception of the erythrocytes, all blood cells showed a positive reaction for glycogen using PAS staining. Prior treatment with amylase nearly completely abolished PAS-staining within the lymphocytes. Basophils reacted positively with Alcian blue staining pH 1 and 2,5. Eosinophils showed a positive reaction with Alcian blue pH 1 and heterophils after Alcian blue staining at pH 2,5.

In the electron microscope examinations the marginal band of microtubules was a striking feature of the turkey erythrocytes. Microtubules could also be detected

within the thrombocytes. In contrast to three types of cytoplasmic granules in the heterophils, the eosinophils contained only one type of granules, which were of remarkable size. The basophil granules showed central cores of different density and homogeneity. The abundant cytoplasm of the monocytes contained many organelles, including granules of different size. For the lymphocytes cytoplasmic inclusions and long rows of parallel arranged round structures were characteristic.

To characterize the different carbohydrate structures of the turkey blood cells, the FITC-labeled lectins ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, WGA, WGAs, GSL-I, DBA, SBA, UEA-I, PHA-E and PHA-L as well as the biotinylated lectins MAA-I, SJA, SNA and VAA were applied. The strongest binding was generally observed using the lectins ConA, WGA and WGAs. The lectins PNA, RCA, GSL-I, DBA, SBA, UEA-I and VAA showed no reaction with any of the turkey blood cells. My results demonstrate that the sugars occurring in turkeys' blood cells are mannose, glucose, N-acetylglucosamine and N-acetyl-neuraminic acid. Galactose and N-acetylgalactosamine could only be detected in the erythrocytes, heterophils and lymphocytes of the turkey.

The existence of the CD4 and CD8 $\alpha$  antigens could be demonstrated in the turkey lymphocytes. The cell membrane as well as the cytoplasm of the lymphocytes bound both antibodies, when no previous fixation was used.

To analyse the cytoskeleton of turkey blood cells FITC-labeled antibodies against vimentin, tubulin, non-muscle myosin and pancytokeratin, and the TRITC labelled toxin phalloidin (for detection of f-actin) were used. Actin was found in all blood cells except the eosinophils. Vimentin could not be detected in the thrombocytes, whereas all the other cells showed a positive immunostaining. The antibody against tubulin only reacted with erythrocytes, thrombocytes and lymphocytes. A prior fixation of the blood smears with methanol resulted in a negative reaction of the cells with the antibody against tubulin and the toxin phalloidin-TRITC. The reaction with the antibody against Vimentin also appeared reduced. Unfixed blood smears were, in contrast, clearly positive. The turkey blood cells contained neither non-muscle myosin nor pancytokeratin.

## VIII. Anhang

### 1 Verzeichnis der Gebrauchslösungen

#### Lichtmikroskopie

##### Allgemeines

Methanol  $\geq 99,9$  % (ROTH, Karlsruhe)

Eukitt® (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Hemacolor® Schnellfärbung von Blutaussstrichen (MERCK, Darmstadt)

##### H.E.-Färbung

###### **Saures Hämalaun nach Mayer:**

Hämatoxylin (MERCK, Darmstadt)	2 g
Aqua dest.	2000 ml
Natriumjodat (MERCK, Darmstadt)	0,4 g
Kalialaun (Aluminiumkaliumsulfat) (MERCK, Darmstadt)	100 g
Chloralhydrat (MERCK, Darmstadt)	100 g
Zitronensäure-Monohydrat (MERCK, Darmstadt)	2 g

Das Hämatoxylin wird in Aqua dest. gelöst. Diesem Gemisch anschließend auf dem Magnetrührer die restlichen Reagenzien zugeben. Die entstandene rotviolette Lösung ist in einer dunklen Flasche für lange Zeit haltbar und sollte vor Gebrauch stets filtriert werden.

###### **Eosin-Stammlösung:**

Eosin gelblich (MERCK, Darmstadt)	2 g
Aqua dest.	198 ml

Einige Tropfen Formol (ROTH, Karlsruhe) zur Haltbarmachung zugeben.

**Eosin-Färbelösung:**

Eosin-Stammlösung 10 ml

Aqua dest. 100 ml

Pro 100 ml gebrauchsfertiger Lösung 1 – 5 Tropfen Eisessig (ROTH, Karlsruhe) zugeben.

**Giemsa-Färbung****Verdünnte Giemsa-Lösung:**

Die Giemsa-Stammlösung (MERCK, Darmstadt) im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnen.

Giemsa-Stammlösung (MERCK, Darmstadt) 1 ml

Aqua dest. 20 ml

**Färbung nach May-Grünwald**

May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung modifiziert (MERCK, Darmstadt)

**Panoptische Färbung nach Pappenheim**

May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung modifiziert (MERCK, Darmstadt)

**Verdünnte Giemsa-Lösung:**

Siehe unter Giemsa-Färbung.

**Sirius Red-Färbung****Saures Hämalaun nach Mayer:**

Siehe unter H.E.-Färbung.

**NaOH-Lösung 1%ig:**

Natriumhydroxid (MERCK, Darmstadt) 1 g

Aqua dest. 100 ml

**NaCl-Lösung 20%ig:**

Natriumchlorid (MERCK, Darmstadt) 20 g

Aqua dest. 100 ml

**Sirius Red-Färbelösung:**

Sirius Rot (WALDECK, Münster) 500 mg

Ethanol absolut (MERCK, Darmstadt) 50 ml

Aqua dest. 45 ml

NaCl-Lösung 20 %ig 4 ml

NaOH-Lösung 1 %ig 1 ml

500 mg Sirius Rot in 50 ml Ethanol absolut und 45 ml Aqua dest. lösen. Danach 4 ml 20%ige NaCl-Lösung und 1 ml 1%ige NaOH-Lösung dazugeben und filtrieren.

**Toluidinblau-Färbung****PBS-Puffer ph 7,4 – 7,6:**

Natriumchlorid, NaCl (MERCK, Darmstadt) 42,5 g

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6,35 g

(MERCK, Darmstadt)

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,95 g

(MERCK, Darmstadt)

Aqua dest. ad 5 L

Der ph-Wert wird mit 1 N NaOH (ROTH, Karlsruhe) und 1 N HCl (ROTH, Karlsruhe) eingestellt.

**Toluidinblau-Färbelösung:**

Toluidinblau (ROTH, Karlsruhe) 1 g

Methanol  $\geq 99,9$  % (ROTH, Karlsruhe) 100 ml

**PAS-Färbung**

Formaldehyd  $\geq 37\%$  (ROTH, Karlsruhe)

Schiffs Reagenz (ROTH, Karlsruhe)

**Perjodsäure-Lösung:**

Perjodsäure (ROTH, Karlsruhe)	1 g
Aqua dest.	200 ml

Die Lösung sollte immer frisch angesetzt werden.

**n-Salzsäure:**

Konzentrierte Salzsäure (ROTH, Karlsruhe)	3 ml
Aqua dest.	27 ml

**Natriumdisulfit-Lösung 10%ig:**

Natriumdisulfit (MERCK, Darmstadt)	3,003 g
Aqua dest.	30 ml

**Sulfit-(SO<sub>2</sub>-)Wasser:**

n-Salzsäure	30 ml
Natriumdisulfit-Lösung 10 %	30 ml
Leitungswasser	600 ml

Das Sulfit-Wasser immer frisch ansetzen.

**Saures Hämalaun nach Mayer:**

Siehe unter H.E.-Färbung.

**Amylase-Lösung 5%ig:**

$\alpha$ -Amylase (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)	10 mg
Aqua dest.	2 ml

**Alcianblau-Färbung****Alcianblau-Färbelösung ph 1:**

Alcianblau 8GS (ROTH, Karlsruhe)	1 g
0,1 N Salzsäure (ROTH, Karlsruhe)	100 ml

**Essigsäure-Lösung 3% ig:**

Essigsäure 100 % (ROTH, Karlsruhe)	3 ml
Aqua dest.	97 ml

**Alcianblau-Färbelösung ph 2,5:**

Alcianblau 8GS (ROTH, Karlsruhe)	1 g
Essigsäure-Lösung 3 %	100 ml

**Kernechtrot-Lösung:**

Aluminiumsulfat (MERCK, Darmstadt)	5 g
Aqua dest.	100 ml
Kernechtrot Certistain® (MERCK, Darmstadt)	0,1 g

Aluminiumsulfat in Aqua dest. lösen, danach die Lösung erhitzen und Kernechtrot einrühren. Lösung nach dem Erkalten filtrieren.

**Elektronenmikroskopie****Bleicitrat nach Reynolds**

Bleinitrat ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)	1,33 g
Natriumcitrat ( $\text{Na}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)	1,76 g
Aqua dest.	30 ml
1N NaOH (ROTH, Karlsruhe)	ca. 8 ml

Die entstandene Lösung für eine Minute lang stark schütteln, anschließend wird sie 30 Minuten noch ab und zu geschüttelt. 1N NaOH wird dazu getropft bis sich

die Lösung schließlich durchsichtig darstellt (pH~12). Bei 4°C ist das Bleicitrat im Plasteröhrchen etwa 3 Monate haltbar und muss vor Gebrauch bei 11 400 U/Min abzentrifugiert werden.

### **Epon**

Poly/Bed 812	20 ml
Dodeceny succinic anhydride (DDSA)	16 ml
Nadic methyl anhydride (NMA)	10 ml
Benzyl dimethyl amine (BDMA)	1,4 ml

Alle Reagenzien stammen von der Firma Polysciences aus Warrington, USA.

Das Homogenisieren der Reagenzien erfolgt auf dem elektrischen Magnetprüher. Zunächst vermischt man Poly/Bed 812 mit DDSA und gibt dann NMA dazu. Die Zugabe von BDMA erfolgt zuerst unter Verrühren mit dem Glasstab, anschließend wird alles zum Homogenisieren wieder auf den elektrischen Magnetprüher gegeben.

### **Färbung nach Richardson**

Methylenblau 1 % (MERCK, Darmstadt)	100 ml
Natriumtetraboratdecahydrat p.A. ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ) (SERVA, Heidelberg)	100 ml

Das Mischen erfolgt in einem Verhältnis von 1:1. Danach wird das so entstandene Gemisch im Verhältnis 1:1 mit Azur II 1 % (WALDECK, Münster) gemischt.

### **Fixierlösung nach Karnovsky**

#### **Paraformaldehyd (PFA)-Lösung 10 %:**

Paraformaldehyd (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)	10 g
Aqua dest.	100 ml

Das Lösen erfolgt bei 60 – 70°C auf dem Magnetprüher. Anschließend vorsichtig 1 – 2 Tropfen 1N NaOH (ROTH, Karlsruhe) dazu geben, wodurch die Lösung klar wird, danach die Lösung abkühlen lassen. Die PFA-Lösung ist bei 4°C 1 – 2

Monate haltbar.

**Karnovsky-Stock-Solution:**

10 % ige PFA-Lösung	20 ml
0,2 M Cacodylat-Puffer	50 ml
Calciumchlorid wasserfrei (CaCl <sub>2</sub> ) (SERVA, Heidelberg)	0,05 g

**Karnovsky-Gebrauchslösung:**

Karnovsky-Stock-Solution	10 ml
Glutaraldehyd 25 % (AGAR SCIENTIFIC, Essex, UK)	1,37 ml

**Natriumcacodylatpuffer**

**Stocklösung:**

Natrium-Cacodylat-Sodium-Salt (Na(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO <sub>2</sub> ) (MP BIOMEDICALS, Eschwege)	18,256 g
Aqua dest.	200 ml

**0,2 M-Lösung (pH: 7,2):**

Zu 50 ml Stocklösung werden 0,2 M HCl (ROTH, Karlsruhe) tropfenweise dazu gegeben bis ein pH-Wert von 7,2 erreicht ist. Dann mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen.

**0,1 M-Lösung (pH: 7,2):**

Die 0,2 M-Lösung 1:1 mit Aqua dest. verdünnen.

**Vorkontrastier-Lösung**

**Kaliumferrocyanid-Stammlösung 3 %:**

Kaliumferrocyanid K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] (SIGMA-ALDRICH, Steinheim)	0,3 g
0,1 M Natriumcacodylatpuffer	10 ml

Die Lösung ist erst nach einem Tag brauchbar.

**Osmiumtetroxid-Stammlösung 2 %:**

Osmiumtetroxid 4 % (POLYSCIENCES, Warrington, USA) 2 ml

0,1 M Natriumcacodylatpuffer 2 ml

Gleiche Volumina beider Stammlösungen werden anschließend gemischt, wodurch sich ein Verdünnungsverhältnis von 3:2 bzw. 1,5:1 ( $K_4[Fe(CN)_6]:OsO_4$ ) ergibt.

**Glykohistochemie****Allgemeines**

Methanol  $\geq 99,9$  % (ROTH, Karlsruhe)

DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) (VECTOR, Burlingame)

**PBS-Puffer:**

Siehe unter Toluidinblau-Färbung.

**FITC-markierte Lektine**

Alle FITC-markierten Lektine stammen von der Firma Vector aus Burlingame, USA.

**Lektin-Lösung (für 15 Objektträger):**

Gelöstes Lektin ( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 7,5  $\mu\text{l}$

PBS-Puffer (pH: 7,4) 1,5 ml

Das Mischen erfolgt in einem abgedunkelten Gefäß. Die so entstandene Lösung hat eine Konzentration von 10  $\mu\text{g}$  Lektin pro ml PBS-Puffer.

**Vorbehandlung mit Hemmzuckern****Hemmzucker-Lektin-Lösung:**

Für die Lektine ConA, LCA und PSA werden pro ml Lektin-Lösung 84,8 mg Methyl- $\alpha$ -Mannopyranoside (E.Y LABS, San Mateo, USA) gelöst.

Der Hemmstoff Chitin-Hydrolysat (VECTOR, Burlingame, USA) wird für die

Lektine WGA und WGAs in einer Konzentration von 1:4 mit der Lektin-Lösung vermischt.

### **Biotinylierte Lektine**

MAA-I und SNA wurden von der Firma Biozol aus Eching, Deutschland, SJA von der Firma Vector aus Burlingame, USA bezogen. VAA stammt vom Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

#### **Lektin-Lösung der Lektine MAA-I, SJA und SNA (für 15 Objektträger):**

Gelöstes Lektin (2µg/µl)	7,5 µl
--------------------------	--------

PBS-Puffer (pH: 7,4)	1,5 ml
----------------------	--------

Die so entstandene Lösung hat eine Konzentration von 10 µg Lektin pro ml PBS-Puffer.

#### **Lektin-Lösung des Lektins VAA (für 15 Objektträger):**

Gelöstes Lektin (1µg/µl)	3 µl
--------------------------	------

PBS-Puffer (pH: 7,4)	1,5 ml
----------------------	--------

Die so entstandene Lösung hat eine Konzentration von 2 µg Lektin pro ml PBS-Puffer.

#### **Streptavidin/FITC-Lösung:**

Das Streptavidin/FITC (DAKO, Hamburg) in einer Konzentration von 1:500 mit PBS-Puffer (pH: 7,4) mischen.

Streptavidin/FITC (DAKO, Hamburg)	3 µl
-----------------------------------	------

PBS-Puffer (pH: 7,4)	1497 µl
----------------------	---------

Für 15 Objektträger wird die Lösung dreimal in je drei abgedunkelten Gefäßen angesetzt.

### **Vorbehandlung mit Neuraminidase**

#### **Natrium-Acetat-Puffer 1 (pH: 5,5):**

Natrium-Acetat wasserfrei (MERCK, Darmstadt)	13,6 g
--	--------

Wasser demineralisiert 1 L

Den pH-Wert von 5,5 anschließend mit 10%iger Essigsäure (ROTH, Karlsruhe) einstellen.

**Natrium-Acetat-Puffer 2 (pH: 5,0):**

Natrium-Acetat wasserfrei (MERCK, Darmstadt) 8,2 g

Wasser demineralisiert 1 L

Calciumchlorid (MERCK, Darmstadt) 0,294 g

Alle Schritte werden auf der Wärmeplatte bei 37°C durchgeführt. Dabei muss die Temperatur immer über 37°C liegen, sie darf aber nie über 40°C betragen. Zunächst das Natrium-Acetat mit dem Wasser vermischen, dann das Calciumchlorid zugeben. Der pH-Wert wird anschließend mit 1 M HCL (ROTH, Karlsruhe) auf 5,0 eingestellt.

**Verdünnte Neuraminidase:**

Natrium-Acetat-Puffer 2 (pH: 5,0; 37°C) 1 ml

Neuraminidase-Lösung (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) 3 µl

Beides soll ohne Temperaturabfall vermischt werden.

**Immunzytochemie**

**Allgemeines**

Methanol  $\geq$  99,9 % (ROTH, Karlsruhe)

DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) (VECTOR, Burlingame)

Dako Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg)

**PBS-Puffer:**

Siehe unter Toluidinblau-Färbung.

Die folgenden Lösungen wurden für jeweils 15 Objektträger hergestellt:

### **T-Lymphozyten-Antigene**

Die Antikörper-Lösung zu CD4-Antigenen wird im Verhältnis von 1:50 mit Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Hamburg) verdünnt. Bei jenen zu CD8 $\alpha$ -Antigenen erfolgt eine Verdünnung mit genanntem Antibody Diluent im Verhältnis von 1:200.

#### **Antikörper-Lösung zu CD4-Antigenen:**

Mouse monoclonal Antibody to CD4 (FITC) (0,5 mg/ml) (ABCAM, Cambridge)	60 $\mu$ l
Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Hamburg)	2940 $\mu$ l

#### **Antikörper-Lösung zu CD8 $\alpha$ -Antigenen:**

Mouse monoclonal Antibody to CD8 alpha (FITC) (0,5 mg/ml) (ABCAM, Cambridge)	15 $\mu$ l
Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Hamburg)	2985 $\mu$ l

Die Antikörper-Lösungen werden in abgedunkelten Gefäßen hergestellt.

### **Eosinophil major basic protein**

#### **Primär-Antikörper-Lösung:**

Mouse Anti-Human Eosinophil Major Basic Protein (AbD, SEROTEC, Düsseldorf) in einer Konzentration von 1:100 mit Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Hamburg) verdünnen.

Mouse Anti-Human Eosinophil Major Basic Protein (AbD, SEROTEC, Düsseldorf)	15 $\mu$ l
Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Hamburg)	1485 $\mu$ l

**Sekundär-Antikörper-Lösung:**

Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/FITC (DAKO, Hamburg) in einer Konzentration von 1:20 mit PBS-Puffer (ph: 7,4) verdünnen.

Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/FITC 75 µl

(DAKO, Hamburg)

PBS-Puffer (pH: 7,4) 1425 µl

Die Sekundär-Antikörper-Lösung wird in einem abgedunkelten Gefäß hergestellt.

**Zytoskelett****Allgemeines**

Methanol  $\geq$  99,9 % (ROTH, Karlsruhe)

DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) (VECTOR, Burlingame)

Dako Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg)

**PBS-Puffer:**

Siehe unter Toluidinblau-Färbung.

**Phalloidin-TRITC-Lösung:**

Phalloidin-TRITC-DMSO (500 µl Phalloidin-TRITC/ml DMSO) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) wird in einer Konzentration von 1:500 mit Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Hamburg) verdünnt.

Phalloidin-TRITC-DMSO (500 µl/ml) 3 µl

(SIGMA-ALDRICH, Steinheim)

Antibody Diluent with Background Reducing Components 1497 µl

(DAKO, Hamburg)

**Primär-Antikörper-Lösung zu Vimentin:**

Monoclonal Mouse Anti-Vimentin Clone Vim 3B4 (DAKO, Hamburg)	3 µl
Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Hamburg)	1497 µl

**Primär-Antikörper-Lösung zu Tubulin:**

Mouse monoclonal (DM1A + DM1B) to Tubulin (0,2 mg/ml) (ABCAM, Cambridge)	15 µl
Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Hamburg)	1,5 ml

**Primär-Antikörper-Lösung zu Panzytokeratin:**

Pancytokeratin plus (BIOCARTA, Hamburg)	15 µl
Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Hamburg)	1485 µl

**Sekundär-Antikörper-Lösung zu Vimentin, Tubulin und Panzytokeratin:**

Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/ FITC (DAKO, Hamburg)	75 µl
PBS-Puffer (pH: 7,4)	1425 µl

Alle Sekundär-Antikörper-Lösungen werden in abgedunkelten Gefäßen hergestellt.

**Primär-Antikörper-Lösung zu Nicht-Muskel Myosin:**

Rabbit polyclonal to non-muscle myosin IIA (ABCAM, Cambridge)	6 µl
Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Hamburg)	1485 µl

**Sekundär-Antikörper-Lösung zu Nicht-Muskel Myosin:**

Fluorescein-Anti-Rabbit IgG (H+L) (E.Y LABS, San Mateo, USA) 5 µl

PBS-Puffer (pH: 7,4) 1495 µl

Die Sekundär-Antikörper-Lösung wird in einem abgedunkelten Gefäß hergestellt.

## 2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Erythrozyten, Hemacolor® Schnellfärbung. ....	89
<b>Abbildung 2:</b> Erythrozyten, Giemsa-Färbung. ....	89
<b>Abbildung 3:</b> Thrombozyten, Hemacolor® Schnellfärbung. ....	91
<b>Abbildung 4:</b> Thrombozyten, H.-E.-Färbung. ....	91
<b>Abbildung 5:</b> Thrombozyt, Giemsa-Färbung. ....	91
<b>Abbildung 6:</b> Thrombozyten, May-Grünwald-Färbung. ....	91
<b>Abbildung 7:</b> Thrombozyten, Pappenheim-Färbung. ....	92
<b>Abbildung 8:</b> Heterophiler Granulozyt, Hemacolor® Schnellfärbung.....	93
<b>Abbildung 9:</b> Heterophiler Granulozyt, H.-E.-Färbung.....	93
<b>Abbildung 10:</b> Heterophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung. ....	94
<b>Abbildung 11:</b> Heterophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung.....	94
<b>Abbildung 12:</b> Heterophile Granulozyten, Pappenheim-Färbung.....	94
<b>Abbildung 13:</b> Heterophiler Granulozyt, Sirius Red-Färbung.....	94
<b>Abbildung 14:</b> Eosinophiler Granulozyt, H.-E.-Färbung. ....	96
<b>Abbildung 15:</b> Eosinophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung.....	96
<b>Abbildung 16:</b> Eosinophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung. ....	96
<b>Abbildung 17:</b> Eosinophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung. ....	96
<b>Abbildung 18:</b> Eosinophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung. ....	97
<b>Abbildung 19:</b> Eosinophiler Granulozyt, Sirius Red-Färbung. ....	97
<b>Abbildung 20:</b> Basophiler Granulozyt, Hemacolor® Schnellfärbung.....	98
<b>Abbildung 21:</b> Basophile Granulozyten, H.-E.-Färbung.....	98
<b>Abbildung 22:</b> Basophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung. ....	99
<b>Abbildung 23:</b> Basophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung. ....	99
<b>Abbildung 24:</b> Basophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung. ....	99
<b>Abbildung 25:</b> Basophiler Granulozyt, Sirius Red-Färbung. ....	99
<b>Abbildung 26:</b> Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung. ....	100
<b>Abbildung 27:</b> Basophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung. ....	100
<b>Abbildung 28:</b> Monozyt, Hemacolor® Schnellfärbung. ....	101
<b>Abbildung 29:</b> Monozyten, Hemacolor® Schnellfärbung.....	101
<b>Abbildung 30:</b> Monozyt, H.-E.-Färbung. ....	102
<b>Abbildung 31:</b> Monozyten, Giemsa-Färbung. ....	102

<b>Abbildung 32:</b> Monozyt, May-Grünwald-Färbung. ....	102
<b>Abbildung 33:</b> Monozyten, Pappenheim-Färbung.....	102
<b>Abbildung 34:</b> Lymphozyt, Hemacolor® Schnellfärbung. ....	104
<b>Abbildung 35:</b> Lymphozyten, Hemacolor® Schnellfärbung.....	104
<b>Abbildung 36:</b> Lymphozyten, H.-E.-Färbung.....	104
<b>Abbildung 37:</b> Lymphozyt, Giemsa-Färbung.....	104
<b>Abbildung 38:</b> Lymphozyt, May-Grünwald-Färbung. ....	105
<b>Abbildung 39:</b> Lymphozyt, Pappenheim-Färbung. ....	105
<b>Abbildung 40:</b> Thrombozyten, PAS-Reaktion.....	107
<b>Abbildung 41:</b> Heterophile Granulozyten, PAS-Reaktion. ....	107
<b>Abbildung 42:</b> Eosinophiler Granulozyt, PAS-Reaktion.....	107
<b>Abbildung 43:</b> Basophiler Granulozyt, PAS-Reaktion.....	107
<b>Abbildung 44:</b> Monozyten, PAS-Reaktion. ....	108
<b>Abbildung 45:</b> Lymphozyt, PAS-Reaktion.....	108
<b>Abbildung 46:</b> Thrombozyten und Lymphozyt, PAS-Reaktion nach Amylase- Vorbehandlung.....	109
<b>Abbildung 47:</b> Heterophile Granulozyten, PAS-Reaktion nach Amylase- Vorbehandlung.....	109
<b>Abbildung 48:</b> Heterophiler Granulozyt und Monozyt, PAS-Reaktion nach Amylase-Vorbehandlung. ....	110
<b>Abbildung 49:</b> Lymphozyt, PAS-Reaktion nach Amylase-Vorbehandlung.....	110
<b>Abbildung 50:</b> Eosinophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 1.....	111
<b>Abbildung 51:</b> Basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 1.....	111
<b>Abbildung 52:</b> Basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 1.....	112
<b>Abbildung 53:</b> Basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 1.....	112
<b>Abbildung 54:</b> Heterophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5.....	113
<b>Abbildung 55:</b> Basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5.....	113
<b>Abbildung 56:</b> Basophiler Granulozyt, Alcianblau-Färbung pH 2,5.....	114
<b>Abbildung 57:</b> Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Erythrozyten.....	115
<b>Abbildung 58:</b> Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Thrombozyten. ....	116
<b>Abbildung 59:</b> Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung eines heterophilen Granulozyten. ....	118

<b>Abbildung 60:</b> Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der eosinophilen Granulozyten.....	120
<b>Abbildung 61:</b> Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung eines basophilen Granulozyten.....	121
<b>Abbildung 62:</b> Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung eines Monozyten. ....	123
<b>Abbildung 63:</b> Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Lymphozyten.....	125
<b>Abbildung 64:</b> Erythrozyten, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.....	129
<b>Abbildung 65:</b> Thrombozyten, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.....	129
<b>Abbildung 66:</b> Heterophile Granulozyten, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	129
<b>Abbildung 67:</b> Heterophiler Granulozyt, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	129
<b>Abbildung 68:</b> Eosinophiler Granulozyt, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	130
<b>Abbildung 69:</b> Basophiler Granulozyt, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. .	130
<b>Abbildung 70:</b> Monozyt, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	130
<b>Abbildung 71:</b> Lymphozyt, ConA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	130
<b>Abbildung 72:</b> Erythrozyten und Thrombozyten, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	133
<b>Abbildung 73:</b> Heterophiler Granulozyt, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.	133
<b>Abbildung 74:</b> Heterophile Granulozyten, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	133
<b>Abbildung 75:</b> Eosinophiler Granulozyt, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.	133
<b>Abbildung 76:</b> Basophiler Granulozyt, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI..	134
<b>Abbildung 77:</b> Monozyten, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.....	134
<b>Abbildung 78:</b> Lymphozyt, LCA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.....	134
<b>Abbildung 79:</b> Heterophile Granulozyten, PSA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	137
<b>Abbildung 80:</b> Eosinophiler Granulozyt, PSA-FITC, Kernfärbung mit DAPI.	137
<b>Abbildung 81:</b> Basophiler Granulozyt und Lymphozyt, PSA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	137
<b>Abbildung 82:</b> Monozyten, PSA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	137

<b>Abbildung 83:</b> Erythrozyten und Thrombozyt, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	141
<b>Abbildung 84:</b> Heterophiler Granulozyt, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	141
<b>Abbildung 85:</b> Eosinophiler Granulozyt, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	141
<b>Abbildung 86:</b> Basophiler Granulozyt, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. .	141
<b>Abbildung 87:</b> Basophiler Granulozyt, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. .	142
<b>Abbildung 88:</b> Monozyten, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	142
<b>Abbildung 89:</b> Lymphozyten, WGA-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	142
<b>Abbildung 90:</b> Erythrozyten und Thrombozyten, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	145
<b>Abbildung 91:</b> Heterophiler Granulozyt, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	145
<b>Abbildung 92:</b> Eosinophiler Granulozyt, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	145
<b>Abbildung 93:</b> Basophiler Granulozyt, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI.	145
<b>Abbildung 94:</b> Monozyten, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI.....	146
<b>Abbildung 95:</b> Lymphozyt, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI.....	146
<b>Abbildung 96:</b> Lymphozyt, WGAs-FITC, Kernfärbung mit DAPI.....	146
<b>Abbildung 97:</b> Heterophiler Granulozyt, SJA-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.....	149
<b>Abbildung 98:</b> Heterophiler Granulozyt, SJA-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.....	149
<b>Abbildung 99:</b> Erythrozyten, SNA-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	151
<b>Abbildung 100:</b> Heterophiler Granulozyt, SNA-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.....	151
<b>Abbildung 101:</b> Heterophiler Granulozyt, SNA-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.....	151
<b>Abbildung 102:</b> Lymphozyt, SNA-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	151
<b>Abbildung 103:</b> Heterophile Granulozyten, PHA-E-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	154

<b>Abbildung 104:</b> Heterophiler Granulozyt, PHA-E-FITC, Kernfärbung mit DAPI. .....	154
<b>Abbildung 105:</b> Eosinophiler Granulozyt, PHA-E-FITC, Kernfärbung mit DAPI. .....	154
<b>Abbildung 106:</b> Lymphozyt und Erythrozyten, PHA-E-FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	154
<b>Abbildung 107:</b> Heterophiler Granulozyt, PHA-L-FITC, Kernfärbung mit DAPI. .....	157
<b>Abbildung 108:</b> Eosinophiler Granulozyt, PHA-L-FITC, Kernfärbung mit DAPI. .....	157
<b>Abbildung 109:</b> Eosinophiler Granulozyt, PHA-L-FITC, Kernfärbung mit DAPI. .....	157
<b>Abbildung 110:</b> Thrombozyten, MAA-I-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	160
<b>Abbildung 111:</b> Heterophile Granulozyten, MAA-I-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI.....	160
<b>Abbildung 112:</b> Lymphozyt, MAA-I-Biotin-Streptavidin/FITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	160
<b>Abbildung 113:</b> Heterophiler Granulozyt und Erythrozyten, ConA-FITC ohne Hemmzucker-Vorbehandlung, Kernfärbung mit DAPI.....	161
<b>Abbildung 114:</b> Heterophiler Granulozyt und Erythrozyten, ConA-FITC mit Hemmzucker-Vorbehandlung, Kernfärbung mit DAPI.....	161
<b>Abbildung 115:</b> Heterophiler Granulozyt und Erythrozyten, WGA-FITC ohne Hemmzucker-Vorbehandlung, Kernfärbung mit DAPI.....	162
<b>Abbildung 116:</b> Heterophile Granulozyten und Erythrozyten, WGA-FITC mit Hemmzucker-Vorbehandlung, Kernfärbung mit DAPI.....	162
<b>Abbildung 117:</b> Lymphozyt, Anti-CD8 $\alpha$ (FITC), Kernfärbung mit DAPI. ....	164
<b>Abbildung 118:</b> Lymphozyten, Anti-CD8 $\alpha$ (FITC), Kernfärbung mit DAPI. ..	164
<b>Abbildung 119:</b> Lymphozyt, Anti-CD8 $\alpha$ (FITC), Kernfärbung mit DAPI. ....	164
<b>Abbildung 120:</b> Lymphozyt, Anti-CD4 (FITC), Kernfärbung mit DAPI. ....	165
<b>Abbildung 121:</b> Lymphozyt, Anti-CD4 (FITC), Kernfärbung mit DAPI. ....	165
<b>Abbildung 122:</b> Thrombozyten und Monozyt, Phalloidin-TRITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	168

<b>Abbildung 123:</b> Heterophiler Granulozyt und Erythrozyten, Phalloidin-TRITC, Kernfärbung mit DAPI.....	168
<b>Abbildung 124:</b> Heterophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC, Kernfärbung mit DAPI. ....	169
<b>Abbildung 125:</b> Lymphozyt und basophiler Granulozyt, Phalloidin-TRITC, Kernfärbung mit DAPI.....	169
<b>Abbildung 126:</b> Erythrozyten, Anti-Vimentin (FITC), Kernfärbung mit DAPI, unfixiert.....	171
<b>Abbildung 127:</b> Heterophiler und eosinophiler Granulozyt, Anti-Vimentin (FITC), Kernfärbung mit DAPI, unfixiert. ....	171
<b>Abbildung 128:</b> Basophiler Granulozyt, Anti-Vimentin (FITC), Kernfärbung mit DAPI, Methanol-Fixierung. ....	172
<b>Abbildung 129:</b> Monozyten, Anti-Vimentin (FITC), Kernfärbung mit DAPI, unfixiert.....	172
<b>Abbildung 130:</b> Lymphozyt, Anti-Vimentin (FITC), Kernfärbung mit DAPI, unfixiert.....	172
<b>Abbildung 131:</b> Thrombozyt und Lymphozyt, Anti-Tubulin (FITC), Kernfärbung mit DAPI.....	174
<b>Abbildung 132:</b> Erythrozyten, Anti-Tubulin (FITC), Kernfärbung mit DAPI..	174
<b>Abbildung 133:</b> Lymphozyt, Anti-Tubulin (FITC), Kernfärbung mit DAPI. ...	174
<b>Abbildung 134:</b> Lymphozyt, Anti-Tubulin (FITC), Kernfärbung mit DAPI. ...	174

### 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zuckerbindungsspezifität und Herkunft ausgewählter Lektine .....	49
Tabelle 2: Übersicht über die, für die Untersuchungen verwendeten, Puten.....	60
Tabelle 3: Färbezeiten der Objektträger: Sirius Red.....	67
Tabelle 4: Verwendete, an FITC gekoppelte Pflanzenlektine .....	72
Tabelle 5: Verwendete Hemmzucker.....	75
Tabelle 6: Verwendete biotinylierte Lektine.....	76
Tabelle 7: In der Arbeit verwendete Antikörper .....	79
Tabelle 8: Untersuchung des Zytoskeletts .....	82
Tabelle 9: Blutbilder der für diese Arbeit verwendeten Puten.....	86
Tabelle 10: Darstellung der Erythrozyten .....	89
Tabelle 11: Darstellung der Thrombozyten .....	90
Tabelle 12: Darstellung der heterophilen Granulozyten .....	93
Tabelle 13: Darstellung der eosinophilen Granulozyten.....	95
Tabelle 14: Darstellung der basophilen Granulozyten.....	98
Tabelle 15: Darstellung der Monozyten.....	101
Tabelle 16: Darstellung der Lymphozyten.....	103
Tabelle 17: Periodic-Acid-Schiff-Reaktion .....	106
Tabelle 18: PAS mit Amylase-Vorbehandlung.....	109
Tabelle 19: Alcianblau-Färbung pH 1.....	111
Tabelle 20: Alcianblau-Färbung pH 2,5.....	113
Tabelle 21: Ergebnis der Auswertung: ConA-FITC .....	128
Tabelle 22: Ergebnis der Auswertung: LCA-FITC.....	132
Tabelle 23: Ergebnis der Auswertung: PSA-FITC .....	136
Tabelle 24: Ergebnis der Auswertung: WGA-FITC .....	140
Tabelle 25: Ergebnis der Auswertung: WGAs-FITC .....	144
Tabelle 26: Ergebnis der Auswertung: SJA-Biotin-Streptavidin/FITC.....	148
Tabelle 27: Ergebnis der Auswertung: SNA-Biotin-Streptavidin/FITC.....	150
Tabelle 28: Ergebnis der Auswertung: PHA-E-FITC.....	153
Tabelle 29: Ergebnis der Auswertung: PHA-L-FITC.....	156
Tabelle 30: Ergebnis der Auswertung: MAA-I-Biotin-Streptavidin/FITC.....	159
Tabelle 31: Auswertung der T-Lymphozyten-Antigene: CD8 $\alpha$ .....	163

---

Tabelle 32: Auswertung der T-Lymphozyten-Antigene: CD4 .....	165
Tabelle 33: Auswertung Zytoskelett: Aktin (unfixiert) .....	167
Tabelle 34: Auswertung Zytoskelett: Vimentin.....	170
Tabelle 35: Auswertung Zytoskelett: Tubulin (unfixiert).....	173

## 4 Literaturverzeichnis

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. und WARTSON, J. D., 1986. *Molekularbiologie der Zelle*, Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft.
- ARCHER, R. K., 1971. Blood coagulation. In: BELL, D. J. und FREEMAN, B. M. (Hrsg.): *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. 2.Auflage, London, Academic Press Inc.
- ATWAL, O. S. und MCFARLAND, L. Z., 1966. A morphologic and cytochemical study of erythrocytes and leukocytes of *Coturnix coturnix japonica*. *American Journal of Veterinary Research*, 27, S.1059-1065.
- BARRETT, L. A. und DAWSON, R. B., 1974. Avian erythrocyte development : microtubules and formation of the disk shape. *Developmental Biology*, 36, S.72-81.
- BAYYARI, G. R., HUFF, W. E., RATH, N. C., BALOG, J. M., NEWBERRY, L. A., VILLINES, J. D., SKEELES, J. K., ANTHONY, N. B. und NESTOR, K. E., 1997. Effect of the genetic selection of turkeys for increased body weight and egg production on immune and physiological responses. *Poultry Science*, 76, S.289-296.
- BEAM, K. G., ALPER, S. L., PALADE, G. E. und GREENGARD, P., 1979. Hormonally regulated phosphoprotein of turkey erythrocytes: localization to plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 83, S.1-15.
- BEAUPAIN, D., MARTIN, C. und DIETERLEN-LIÈVRE, F., 1979. Are developmental hemoglobin changes related to the origin of stem cells and site of erythropoiesis? *Blood*, 53, S.212-225.
- BEHNKE, O., 1970. A comparative study of microtubules of disk-shaped blood cells. *Journal of Ultrastructure Research*, 31, S.61-75.
- BELAMARICH, F. A., SHEPRO, D. und KIEN, M., 1968. ADP is not involved in thrombin-induced aggregation of thrombocytes of a non-mammalian vertebrate. *Nature*, 220, S.509-510.
- BELLEVILLE, J., CORNILLON, B., PAUL, J., BAGUET, J., CLENDINNEN, G. und ELOY, R., 1982. Haemostasis, blood coagulation and fibrinolysis in the Japanese quail. *Comparative Biochemistry and Physiology. A. Comparative Physiology*, 71, S.219-230.
- BENEŠ, P., MACEČKOVÁ, V., ZDRÁHAL, Z., KONEČNÁ, H., ZAHRADNÍČKOVÁ, E., MUŽÍK, J. und ŠMARDA, J., 2006. Role of vimentin in regulation of monocyte/macrophage differentiation. *Differentiation*, 74, S.265-276.

- BENNETT, H. S., 1963. Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 11, S.14-23.
- BENNETT, V. und STENBUCK, P. J., 1979a. Identification and partial purification of ankyrin, the high affinity membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. *Journal of Biological Chemistry*, 254, S.2533-2541.
- BENNETT, V. und STENBUCK, P. J., 1979b. The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes. *Nature*, 280, S.468-473.
- BERG, J. S., POWELL, B. C. und CHENEY, R. E., 2001. A millennial myosin census. *Molecular Biology of the Cell*, 12, S.780-794.
- BEZZEL, E., 1977. *Ornithologie*, Stuttgart, Eugen Ulmer Verlag.
- BIENZLE, D., PARE, J. A. und SMITH, D. A., 1997. Leukocyte changes in diseased non-domestic birds. *Veterinary Clinical Pathology*, 26, S.76-84.
- BIENZLE, D. und SMITH, D. A., 1999. Heterophilic leucocytosis and granulocytic hyperplasia associated with infection in a cockatoo. *Comparative Haematology International*, 9, S.193-197.
- BITZMANN, D., 2009. Ultrastrukturelle, immunzytochemische und glykohistochemische Untersuchungen am Blut des Rindes (*Bos tauris*). *Dissertation*, LMU München.
- BOUNOUS, D. I. und STEDMAN, N. L., 2000. Normal avian hematology: chicken and turkey. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*. 5.Auflage, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- BOUNOUS, D. I., WYATT, R. D., GIBBS, P. S., KILBURN, J. V. und QUIST, C. F., 2000. Normal hematologic and serum biochemical reference intervals for juvenile wild turkeys. *Journal of Wildlife Diseases*, 36, S.393-396.
- BRANTON, D., COHEN, C. M. und TYLER, J., 1981. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell*, 24, S.24-32.
- BROOKS, R. L., BOUNOUS, D. I. und ANDREASEN, C. B., 1996. Functional comparison of avian heterophils with human and canine neutrophils. *Comparative Haematology International*, 6, S.153-159.
- BROOKS, S. A., LEATHEM, A. J. C. und SCHUMACHER, U., 1997. *Lectin Histochemistry: A Concise Practical Handbook*, Oxford, BIOS Scientific Publishers Limited.
- BROWN, M. J., HALLAM, J. A., COLUCCI-GUYON, E. und SHAW, S., 2001. Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *Journal of Immunology*, 166, S.6640-6646.

- BRUNE, K., LEFFELL, M. S. und SPITZNAGEL, J. K., 1972. Microbicidal activity of peroxidaseless chicken heterophile leukocytes. *Infection and Immunity*, 5, S.283-287.
- BUCKLAND, K. F., WILLIAMS, T. J. und CONROY, D. M., 2003. Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H-4 receptor. *British Journal of Pharmacology*, 140, S.1117-1127.
- BURTON, A. L. und HIGGINBOTHAM, R. D., 1966. Response of blood basophils to Rous sarcoma virus infection in chicks and its significance. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 3, S.314-326.
- CALDWELL, A. B., 1976. Proteins of the turkey erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 15, S.2711-2718.
- CAMPBELL, F., 1967. Fine structure of the bone marrow of chicken and pigeon. *Journal of Morphology*, 123, S.405-439.
- CAMPBELL, J. G. und WOODS, G. N., 1970. Demonstration of a herpes-type virus in short-term cultured blood lymphocytes associated with Marek's disease. *Journal of Medical Microbiology*, 3, S.463-473.
- CAMPBELL, T. W., 2006. Hematology of birds. In: THRALL, M. A. (Hrsg.) *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Iowa, Blackwell Publishing Professional.
- CAMPBELL, T. W. und COLES, E. H., 1986. Avian clinical pathology. In: COLES, E. H. (Hrsg.) *Veterinary Clinical Pathology*. 4.Auflage, Philadelphia, W.B. Saunders Company.
- CAMPBELL, T. W. und ELLIS, C. K., 2007. *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*, 3.Auflage, Iowa, Blackwell Publishing Professional.
- CASSIMERIS, L. U., WADSWORTH, P. und SALMON, E. D., 1986. Dynamics of microtubule depolymerization in monocytes. *Journal of Cell Biology*, 102, S.2023-2032.
- CAXTON-MARTINS, A. E. und DAIMON, T., 1976. Histochemical observations on chicken blood and bone marrow cells. *Journal of Anatomy*, 122, S.553-558.
- CHAN, M. M., CHEN, C. L. H., AGER, L. L. und COOPER, M. D., 1988. Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *Journal of Immunology*, 140, S.2133-2138.
- CHAND, N. und EYRE, P., 1978a. Immunological release of histamine and slow-reacting substance in domestic fowl. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 42, S.519-524.
- CHAND, N. und EYRE, P., 1978b. Rapid method for basophil count in domestic fowl. *Avian Diseases*, 22, S.639-645.

- CHEN, C.-L. H. und COOPER, M. D., 1987. Identification of cell surface molecules on chicken lymphocytes with monoclonal antibodies *In: TOIVANEN, A. und TOIVANEN, P. (Hrsg.): Avian Immunology: Basis and Practice*. 1.Auflage, Boca Raton Florida, CRC Press.
- CHEN, C. H., GOBEL, T. W. F., KUBOTA, T. und COOPER, M. D., 1994. T cell development in the chicken. *Poultry Science*, 73, S.1012-1018.
- CHEN, C. L. H., AGER, L. L., GARTLAND, G. L. und COOPER, M. D., 1986. Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. *Journal of Experimental Medicine*, 164, S.375-380.
- CHEN, C. L. H., CHANH, T. C. und COOPER, M. D., 1984. Chicken thymocyte-specific antigen identified by monoclonal antibodies: ontogeny, tissue distribution and biochemical characterization. *European Journal of Immunology*, 14, S.385-391.
- CHOU, Y. H., SKALLI, O. und GOLDMAN, R. D., 1997. Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 9, S.49-53.
- CHRISTENSEN, E. H. und DILL, D. B., 1935. Oxygen dissociation curves of bird blood. *Journal of Biological Chemistry*, 109, S.443-448.
- CLARK, P., BOARDMAN, W. und RAIDAL, S., 2009. *Atlas of Clinical Avian Hematology*, West Sussex, Wiley-Blackwell.
- COHEN, C. M., TYLER, J. M. und BRANTON, D., 1980. Spectrin-actin associations studies by electron-microscopy of shadowed preparations. *Cell*, 21, S.875-883.
- COHEN, W. D., 1991. The cytoskeletal system of nucleated erythrocytes. *International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology*, 130, S.37-84.
- COHEN, W. D., BARTELT, D., JAEGER, R., LANGFORD, G. und NEMHAUSER, I., 1982. The cytoskeletal system of nucleated erythrocytes.1. Composition and function of major elements. *Journal of Cell Biology*, 93, S.828-838.
- COLIN, F. C. und SCHRIER, S. L., 1991. Myosin content and distribution in human neonatal erythrocytes are different from adult erythrocytes. *Blood*, 78, S.3052-3055.
- CRAWFORD, N., CHAHAL, H. und JACKSON, P., 1980. The isolation and characterisation of guinea-pig polymorphonuclear leucocyte actin and myosin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 626, S.218-233.
- DAIMON, T. und CAXTON-MARTINS, A., 1977. Electron microscopic and enzyme cytochemical studies on granules of mature chicken granular leucocytes. *Journal of Anatomy*, 123, S.553-562.

- DAIMON, T. und UCHIDA, K., 1978. Electron microscopic and cytochemical observations on the membrane systems of the chicken thrombocyte. *Journal of Anatomy*, 125, S.11-21.
- DAIMON, T. und UCHIDA, K., 1982. Cytochemical demonstration of the amine-storing vacuoles and lysosomes in the chicken thrombocytes. *Histochemistry*, 75, S.309-317.
- DAIMON, T. und UCHIDA, K., 1985. Ultrastructural evidence of the existence of the surface connected canalicular system in the thrombocyte of the shark (*Triakis scyllia*). *Journal of Anatomy*, 141, S.193-200.
- DAIMON, T., UCHIDA, K. und MIZUHIRA, V., 1977. Ultrastructural localization of acid protein polysaccharides and calcium in the vacuoles of the chicken thrombocyte. *Histochemistry*, 52, S.25-32.
- DAMATTA, R. A., MANHÃES, L., SEABRA, S. H. und DE SOUZA, W., 1998. Coculture of chicken thrombocytes and monocytes: morphological changes and lectin binding. *Biocell*, 22, S.45-52.
- DAY, M. J., 2000. Biology of lymphocytes and plasma cells. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*. 5.Auflage, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- DE BRABANDER, M., 1982. Microtubules, central elements of cellular organization. *Endeavour*, 6, S.124-134.
- DEL CACHO, E., GALLEGO, M. und BASCUAS, J. A., 1991. Granulopoiesis in the pineal gland of chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 52, S.449-452.
- DELLAGI, K., VAINCHENKER, W., VINCI, G., PAULIN, D. und BROUET, J. C., 1983. Alteration of vimentin intermediate filament expression during differentiation of human hemopoietic cells. *Embo Journal*, 2, S.1509-1514.
- DELLON, E. S., CHEN, X., MILLER, C. R., WOOSLEY, J. T. und SHAHEEN, N. J., 2012. Diagnostic utility of major basic protein, eotaxin-3, and leukotriene enzyme staining in eosinophilic esophagitis. *American Journal of Gastroenterology*, 107, S.1503-1511.
- DHINAKAR RAJ, G., JONES, R. C. und SAVAGE, C. E., 1997. Effect of storage of chicken and turkey blood on the lymphocyte responses to concanavalin A and pokeweed mitogen. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 56, S.353-362.
- DHINGRA, L. D., PARRISH, W. B. und VENZKE, W. G., 1969. Electron microscopy of granular leucocytes of chicken (*Gallus domesticus*). *American Journal of Veterinary Research*, 30, S.637-642.
- DHODAPKAR, B. S., VEGAD, J. L. und KOLTE, G. N., 1982. Demonstration of the phagocytic activity of chicken basophils in the reversed Arthus reaction using colloidal carbon. *Research in Veterinary Science*, 33, S.377-379.

- DIDISHEIM, P., HATTORI, K. und LEWIS, J. H., 1959. Hematologic and coagulation studies in various animal species. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 53, S.866-875.
- DIETERLEN-LIÈVRE, F., 1987. Hemopoietic cell progenitors in the avian embryo: origin and migrations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 511, S.77-87.
- DIETERLEN-LIÈVRE, F., 1988. Birds. In: ROWLEY, A. F. und RATCLIFFE, N. A. (Hrsg.): *Vertebrate Blood Cells*. Cambridge, University Press.
- DIETERLEN-LIEVRE, F., GODIN, I. und PARDANAUD, L., 1996. Ontogeny of hematopoiesis in the avian embryo: A general paradigm. In: VAINIO, O. und IMHOF, B. A. (Hrsg.): *Immunology and Developmental Biology of the Chicken*. Berlin, Springer-Verlag.
- DIETERLEN-LIÈVRE, F. und MARTIN, C., 1981. Diffuse intraembryonic hematopoiesis in normal and chimeric avian development. *Developmental Biology*, 88, S.180-191.
- DING, M., ROBINSON, J. M., BEHRENS, B. C. und VANDRÉ, D. D., 1995. The microtubule cytoskeleton in human phagocytic leucocytes is a highly dynamic structure. *European Journal of Cell Biology*, 66, S.234-245.
- DOERR, J. A. und HAMILTON, P. B., 1981. New evidence for intrinsic blood coagulation in chickens. *Poultry Science*, 60, S.237-242.
- DRI, P., BISIACCHI, B., CRAMER, R., BELLAVITE, P., NICOLA, G. D. und PATRIARCA, P., 1978. Oxidative metabolism of chicken polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 22, S.159-166.
- DU PLESSIS, L. und VAN WILPE, E., 2009. Thrombocyte morphology and morphometric observations in two vulture species. *Veterinary Clinical Pathology*, 38, S.316-320.
- EDELMAN, G. M. und WANG, J. L., 1978. Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 253, S.3016-3022.
- ENBERGS, H., 1975. Die Feinstruktur der Leukozyten des Hausgeflügels. *Fortschritte der Veterinärmedizin, Beihefte zum Zentralblatt für Veterinärmedizin*, 22, S.1-100.
- ERICSSON, J. L. und NAIR, M. K., 1973. Electron microscopic demonstration of acid phosphatase activity in developing and mature heterophils of the chicken. *Histochemie*, 37, S.97-105.
- ESPADA, Y., 2000. Avian hemostasis. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*. 5.Auflage, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

- EVANS, E. W., BEACH, G. G., WUNDERLICH, J. und HARMON, B. G., 1994. Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 56, S.661-665.
- FAWCETT, D. W., 1959. Electron microscopic observations on the marginal band of nucleated erythrocytes. *Anatomical Record*, 133, S.379.
- FERNANDEZ, F. R. und GRINDEM, C. B., 2000. Reticulocyte response. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm`s Veterinary Hematology*. 5.Auflage, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- FERRIS, M. und BACHA, W. J., 1986. Response of leukocytes in chickens infected with the avian schistosome *Austroilharzia variglandis* (Trematoda). *Avian Diseases*, 30, S.683-686.
- FEY, F., 1966. Vergleichende Hämozytologie niederer Vertebraten. II. Thrombozyten. *Folia Haematologica*, 85, S.205-217.
- FLOWER, R. L. P. und WILCOX, G. E., 1981. Identification of a subpopulation of chicken B lymphocytes by the lectin from lotus tetragonolobus. *Journal of Immunological Methods*, 46, S.347-352.
- FRANKEL, F. R., 1976. Organization and energy-dependent growth of microtubules in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73, S.2798-2802.
- FRANZ, H., 1990. 100 years of lectin research-a balance. *Naturwissenschaften*, 77, S.103-109.
- FREEMAN, B. M., 1971. The corpuscles and the physical characteristics of blood. In: BELL, D. J. und FREEMAN, B. M. (Hrsg.): *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. 2.Auflage, London, Academic Press Inc.
- FUDGE, A. M., 2000a. Avian complete blood count. In: FUDGE, A. M. (Hrsg.) *Laboratory Medicine. Avian and Exotic Pets*. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
- FUDGE, A. M., 2000b. Avian cytodagnosis. In: FUDGE, A. M. (Hrsg.) *Laboratory Medicine. Avian and Exotic Pets*. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
- FUDGE, A. M. und JOSEPH, V., 2000. Disorders of avian leukocytes. In: FUDGE, A. M. (Hrsg.) *Laboratory Medicine. Avian and Exotic Pets*. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
- GABIUS, H.-J., 2009a. Animal and human lectins. In: GABIUS, H.-J. (Hrsg.) *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag.
- GABIUS, H.-J. (Hrsg.) 2009b. *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*, Weinheim, WILEY-VCH Verlag.

- GABIUS, H.-J., ANDRÉ, S., JIMÉNEZ-BARBERO, J., ROMERO, A. und SOLÍS, D., 2011. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends in Biochemical Sciences*, 36, S.298-313.
- GABIUS, H.-J., SIEBERT, H. C., ANDRÉ, S., JIMÉNEZ-BARBERO, J. und RÜDIGER, H., 2004. Chemical biology of the sugar code. *Chembiochem*, 5, S.740-764.
- GAHRTON, G., 1964. Mirospectrophotometric quantitation of the periodic acid-Schiff (PAS) reaction in human neutrophil leucocytes based on a model system of glycogen microdroplets. *Experimental Cell Research*, 34, S.488-506.
- GANTERT, H., 2013. Ultrastrukturelle, glykohistochemische und immunhistochemische Untersuchungen am Blut des Haushuhnes (*Gallus gallus domesticus*). *Dissertation*, LMU München.
- GASSMANN, M. und LUTZ, T. A., 2010a. Flüssige Bestandteile des Blutes. In: VON ENGELHARDT, W. und BREVES, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. 3.Auflage, Stuttgart, Enke Verlag.
- GASSMANN, M. und LUTZ, T. A., 2010b. Funktionen des Blutes. In: VON ENGELHARDT, W. und BREVES, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. 3.Auflage, Stuttgart, Enke Verlag.
- GASSMANN, M. und LUTZ, T. A., 2010c. Zelluläre Bestandteile. In: VON ENGELHARDT, W. und BREVES, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. 3.Auflage, Stuttgart, Enke Verlag.
- GEERTS, W. J. C., LAMERS, W. H. und MOORMAN, A. F. M., 1993. Differences in erythropoiesis in normal chicken and quail embryos. *Histochemical Journal*, 25, S.280-290.
- GEORGATOS, S. D. und BLOBEL, G., 1987. Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes: a basis for a vectorial assembly of intermediate filaments. *Journal of Cell Biology*, 105, S.105-115.
- GLEICH, G. J., LOEGERIN, D. A., KUEPPERS, F., BAJAJ, S. P. und MANN, K. G., 1974. Physiochemical and biological properties of major basic protein from guinea pig eosinophil granules. *Journal of Experimental Medicine*, 140, S.313-332.
- GLEICH, G. J., LOEGERIN, D. A. und MALDONAD, J. E., 1973. Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. *Journal of Experimental Medicine*, 137, S.1459-1471.
- GÖBEL, T. und KASPERS, B., 2010. Immunabwehr. In: VON ENGELHARDT, W. und BREVES, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. 3.Auflage, Stuttgart, Enke Verlag.

- GONIAKOWSKA-WITALIŃSKA, L. und WITALIŃSKI, W., 1976. Evidence for a correlation between the number of marginal band microtubules and the size of vertebrate erythrocytes. *Journal of Cell Science*, 22, S.397-401.
- GRANGER, B. L. und LAZARIDES, E., 1982. Structural associations of synemin and vimentin filaments in avian erythrocytes revealed by immunoelectron microscopy. *Cell*, 30, S.263-275.
- GRANGER, B. L., REPASKY, E. A. und LAZARIDES, E., 1982. Synemin and vimentin are components of intermediate filaments in avian erythrocytes. *Journal of Cell Biology*, 92, S.299-312.
- GRANT, R. A. und ZUCKER, M. B., 1973. Avian thrombocyte aggregation and shape change in-vitro. *American Journal of Physiology*, 225, S.340-343.
- GRATZL, M. und WURZINGER, L. J., 2005. Bindegewebe. In: JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. und GRATZL, M. (Hrsg.): *Histologie*. 6.Auflage, Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- GREAVES, M. F., ROITT, I. M. und ROSE, M. E., 1968. Effect of bursectomy and thymectomy on the responses of chicken peripheral blood lymphocytes to phytohaemagglutinin. *Nature*, 220, S.293-295.
- GRECCHI, R., SALIBA, A. M. und MARIANO, M., 1980. Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mono-nuclear phagocytes and thrombocytes *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Pathology*, 130, S.23-31.
- GYLSTORFF, I. und GRIMM, F., 1998. Allgemeiner Teil. In: LOEFFLER, K. und STRAUCH, D. (Hrsg.): *Vogelkrankheiten*. 2.Auflage, Stuttgart-Hohenheim, Eugen Ulmer Verlag.
- HABERMANN, F. A., ANDRÉ, S., KALTNER, H., KUEBLER, D., SINOWATZ, F. und GABIUS, H.-J., 2011. Galectins as tools for glycan mapping in histology: comparison of their binding profiles to the bovine zona pellucida by confocal laser scanning microscopy. *Histochemistry and Cell Biology*, 135, S.539-552.
- HARRIS, J. R. und BROWN, J. N., 1971. Fractionation of the avian erythrocyte: an ultrastructural study. *Journal of Ultrastructure Research*, 36, S.8-23.
- HARTMAN, F. A. und LESSLER, M. A., 1963. Erythrocyte measurements in birds. *The Auk*, 80, S.467-473.
- HAURY, M., KASAHARA, Y., SCHAAL, S., BUCY, R. P. und COOPER, M. D., 1993. Intestinal T lymphocytes in the chicken express an integrin-like antigen. *European Journal of Immunology*, 23, S.313-319.
- HAWKEY, C. M. und DENNETT, T. B., 1990. *Farbatlas der Hämatologie: Säugetiere, Vögel und Reptilien*, Hannover, Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei.

- HEBERT, R., NANNEY, J., SPANO, J. S., PEDERSOLI, W. M. und KRISTA, L. M., 1989. Erythrocyte distribution in ducks. *American Journal of Veterinary Research*, 50, S.958-960.
- HIGGINS, D. A. und CHUNG, S. H., 1986. Duck lymphocytes .1. Purification and preliminary observations on surface markers. *Journal of Immunological Methods*, 86, S.231-238.
- HODGES, R. D., 1974. *The Histology of the Fowl*, London, Academic Press Inc.
- HODGES, R. D., 1977. Normal avian (poultry) haematology. In: ARCHER, R. K. und JEFFCOTT, L. B. (Hrsg.): *Comparative Clinical Haematology*. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- HOFFSTEIN, S. und WEISSMANN, G., 1978. Microfilaments and microtubules in calcium ionophore-induced secretion of lysosomal enzymes from human polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Cell Biology*, 78, S.769-781.
- HORN, F., 2009. *Biochemie des Menschen*, 4.Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- HOUSEWEART, M. K. und CLEVELAND, D. W., 1998. Intermediate filaments and their associated proteins: multiple dynamic personalities. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, S.93-101.
- HOWLETT, J. C., BAILEY, T. A., SAMOUR, J. H., NALDO, J. L. und D'ALLOIA, M. A., 2002. Age-related hematologic changes in captive-reared houbara, white-bellied, and rufous-crested bustards. *Journal of Wildlife Diseases*, 38, S.804-816.
- HUFFNAGLE, G. B., RATCLIFFE, M. J. H. und HUMPHRIES, E. H., 1989. Bu-2, a novel avian cell surface antigen on B cells and a population of non-lymphoid cells, is expressed homogeneously in germinal centers. *Hybridoma*, 8, S.589-604.
- HUMMEL, G., 2000. *Anatomie und Physiologie der Vögel*, Stuttgart, Eugen Ulmer Verlag.
- ISAACKS, R., GOLDMAN, P. und KIM, C., 1986. Studies on avian erythrocyte metabolism. XIV. Effect of CO<sub>2</sub> and ph on P<sub>50</sub> in the chicken. *American Journal of Physiology*, 250, S.R260-R266.
- ISAACKS, R. E. und HARKNESS, D. R., 1980. Erythrocyte organic phosphates and hemoglobin function in birds, reptiles, and fishes. *American Zoologist*, 20, S.115-129.
- JAIN, N. C., 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*, Philadelphia, Lea & Febiger.
- JONES, A. W., 1973. Granulopoiesis in the embryonic chick lung: a histological study. *Poultry Science*, 52, S.1600-1605.

- JÖRNS, J., MANGOLD, U., NEUMANN, U., VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., PFUELLER, U. und SCHUMACHER, U., 2003. Lectin histochemistry of the lymphoid organs of the chicken. *Anatomy and Embryology*, 207, S.85-94.
- KIM, J. Y., LEE, Y. G., KIM, M.-Y., BYEON, S. E., RHEE, M. H., PARK, J., KATZ, D. R., CHAIN, B. M. und CHO, J. Y., 2010. Src-mediated regulation of inflammatory responses by actin polymerization. *Biochemical Pharmacology*, 79, S.431-443.
- KRAFT, W., DÜRR, U. M., FÜLL, M., BOSTEDT, H. und HEINRITZI, K., 2005. Hämatologie. In: KRAFT, W. und DÜRR, U. M. (Hrsg.): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 6.Auflage, Stuttgart, Schattauer Verlag.
- KRIESTEN, K. und ENBERGS, H., 1970. Zur Ultrastruktur der Lymphozyten des Haushuhns. *Blut*, 20, S.229-233.
- KUNICKI, T. J. und NEWMAN, P. J., 1985. Synthesis of analogs of human platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex by chicken peripheral blood thrombocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, S.7319-7323.
- KURUMA, I., OKADA, T., KATAOKA, K. und SORIMACH, M., 1970. Ultrastructural observation of 5-hydroxytryptamine-storing granules in the domestic fowl thrombocytes. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 108, S.268-281.
- LAM, K. M., 1997. Activation, adhesion, migration and death of chicken thrombocytes. *Comparative Haematology International*, 7, S.81-87.
- LAM, K. M., KABBUR, M. B. und EISERICH, J. P., 1996. Newcastle disease virus-induced functional impairments and biochemical changes in chicken heterophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 53, S.313-327.
- LASSILA, O., MARTIN, C., TOIVANEN, P. und DIETERLEN-LIÈVRE, F., 1982. Erythropoiesis and lymphopoiesis in the chick yolk-sac-embryo chimeras: contribution of yolk sac and intraembryonic stem cells. *Blood*, 59, S.377-381.
- LATIMER, K. S. und BIENZLE, D., 2000. Determination and interpretation of the avian leukogram. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*. 5.Auflage, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- LAZARIDES, E., 1975. Immunofluorescence studies on the structure of actin filaments in tissue culture cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 23, S.507-528.
- LAZARIDES, E., 1980. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*, 283, S.249-256.

- LAZARIDES, E., 1982. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 51, S.219-250.
- LAZARIDES, E., 1984. Assembly and morphogenesis of the avian erythrocyte cytoskeleton. In: BORISY, G. G., CLEVELAND, D. W. und MURPHY, D. B. (Hrsg.): *Molecular Biology of the Cytoskeleton; Meeting*. New York, Cold spring harbor.
- LEBLOND, C. P., GLEGG, R. E. und EIDINGER, D., 1957. Presence of carbohydrates with free 1,2-glycol groups in sites stained by the periodic acid-Schiff technique. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 5, S.445-458.
- LEDEEN, R. W. und WU, G., 2009. Neurobiology meets glycosciences. In: GABIUS, H.-J. (Hrsg.) *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag.
- LEE, K. G., MILLER, T., ANASTASSOV, I. und COHEN, W. D., 2004. Shape transformation and cytoskeletal reorganization in activated non-mammalian thrombocytes. *Cell Biology International*, 28, S.299-310.
- LEE, T. H. und TEMPELIS, C. H., 1992. A possible 110-kDa receptor for interleukin-2 in the chicken. *Developmental and Comparative Immunology*, 16, S.463-472.
- LEWIS, D. M., LEWIS, J. C., LOEGERING, D. A. und GLEICH, G. J., 1978. Localization of the guinea pig eosinophil major basic protein to the core of the granule. *Journal of Cell Biology*, 77, S.702-713.
- LI, Z., NESTOR, K. E., SAIF, Y. M., FAN, Z., LUHTALA, M. und VAINIO, O., 1999. Cross-reactive anti-chicken CD4 and CD8 monoclonal antibodies suggest polymorphism of the turkey CD8 alpha molecule. *Poultry Science*, 78, S.1526-1531.
- LIEBICH, H.-G., 2010. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*, 5.Auflage, Stuttgart, Schattauer Verlag
- LINHARTOVÁ, I., NOVOTNÁ, B., SULIMENKO, V., DRÁBEROVÁ, E. und DRÁBER, P., 2002. Gamma-tubulin in chicken erythrocytes: Changes in localization during cell differentiation and characterization of cytoplasmic complexes. *Developmental Dynamics*, 223, S.229-240.
- LIS, H. und SHARON, N., 1986. Lectins as molecules and as tools. *Annual Review of Biochemistry*, 55, S.35-67.
- LOA, C. C., LIN, T. L. und WU, C. C., 2001. Factors affecting mitogenic response of turkey lymphocytes. *Acta Veterinaria Brno*, 70, S.433-442.
- LUCAS, A. und JAMROZ, C., 1961. *Atlas of Avian Hematology*, 1.Auflage, Washington DC, Agriculture monograph 25. United States Department of Agriculture.

- LUHTALA, M., 1998. Chicken CD4, CD8 alpha beta, and CD8 alpha alpha T cell co-receptor molecules. *Poultry Science*, 77, S.1858-1873.
- MAHESWARAN, S. K., THIES, E. S. und GREIMANN, C., 1975. A micromethod for evaluating turkey lymphocyte responses to phytomitogens. *American Journal of Veterinary Research*, 36, S.1397-1400.
- MALECH, H. L., ROOT, R. K. und GALLIN, J. I., 1977. Structural analysis of human neutrophil migration. Centriole, microtubule and microfilament orientation and function during chemotaxis. *Journal of Cell Biology*, 75, S.666-693.
- MALKINSON, M., ORGAD, U. und BECKER, Y., 1986. Use of lectins to detect and differentiate subtypes of Marek's disease virus and turkey herpesvirus glycoproteins in tissue culture. *Journal of Virological Methods*, 13, S.129-133.
- MAXWELL, M. H., 1973. Comparison of heterophil and basophil ultrastructure in six species of domestic birds. *Journal of Anatomy*, 115, S.187-202.
- MAXWELL, M. H., 1974. An ultrastructural comparison of the mononuclear leucocytes and thrombocytes in six species of domestic bird. *Journal of Anatomy*, 117, S.69-80.
- MAXWELL, M. H., 1978a. Electron cytochemistry of developing and mature eosinophils in the bone marrow of the fowl and the duck. *Histochemical Journal*, 10, S.63-77.
- MAXWELL, M. H., 1978b. The fine structure of granules in eosinophil leucocytes from aquatic and terrestrial birds. *Tissue & Cell*, 10, S.303-317.
- MAXWELL, M. H., 1984. The distribution and localisation of acid trimetaphosphatase in developing heterophils and eosinophils in the bone marrow of the fowl and the duck. *Cell and Tissue Research*, 235, S.171-176.
- MAXWELL, M. H. und BURNS, R. B., 1986. Experimental stimulation of eosinophil production in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). *Research in Veterinary Science*, 41, S.114-123.
- MAXWELL, M. H. und SILLER, W. G., 1972. The ultrastructural characteristics of the eosinophil granules in six species of domestic bird. *Journal of Anatomy*, 112, S.289-303.
- MAXWELL, M. H. und TREJO, F., 1970. The ultrastructure of white blood cells and thrombocytes of the domestic fowl. *British Veterinary Journal*, 126, S.583-592.
- MCCORKLE, F., OLAH, I. und GLICK, B., 1980. The morphology of the phytohemagglutinin-induced cell response in the chicken's wattle. *Poultry Science*, 59, S.616-623.

- MESEGUER, J., ESTEBAN, M. A. und RODRÍGUEZ, A., 2002. Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microscopy Research and Technique*, 57, S.491-497.
- MOEBIUS, U., KOBER, G., GRISCELLI, A. L., HERCEND, T. und MEUER, S. C., 1991. Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations. *European Journal of Immunology*, 21, S.1793-1800.
- MONSIGNY, M., ROCHE, A. C., SENE, C., MAGETDANA, R. und DELMOTTE, F., 1980. Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? *European Journal of Biochemistry*, 104, S.147-153.
- MOON, R. T. und LAZARIDES, E., 1983. Synthesis and post-translational assembly of intermediate filaments in avian erythroid cells: vimentin assembly limits the rate of synemin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 80, S.5495-5499.
- MORAES, A. S. und MELLO, M. L. S., 2006. The Con-A-peroxidase method for tissue localization of glucosyl and mannosyl groups applied to mouse hepatocytes and chicken erythrocytes. *Acta Histochemica*, 108, S.475-479.
- MOREIRA DOS SANTOS SCHMIDT, E., PAULILLO, A. C., VIEIRA MARTINS, G. R., MOURA LAPERA, I., PEREIRA TESTI, A. J., NARDI JUNIOR, L., DENADAI, J. und JURANDIR FAGLIARI, J., 2009. Hematology of the Bronze Turkey (*Meleagris gallopavo*): Variations with age and gender. *International Journal of Poultry Science*, 8, S.752-754.
- MULISCH, M. und WELSCH, U. (Hrsg.) 2010. *Romeis Mikroskopische Technik*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- MURPHY, D. B. und WALLIS, K. T., 1983. Isolation of the microtubule protein from chicken erythrocytes and determination of the critical concentration for tubulin polymerization invitro and invivo. *Journal of Biological Chemistry*, 258, S.8357-8364.
- NIELSEN, H. V., JOHNSEN, A. H. und SCHIØTZ, P. O., 2004. Expression of actin and tubulins in purified human basophil leukocytes upon stimulation with IL-3. *International Archives of Allergy and Immunology*, 133, S.340-347.
- NIELSEN, L. F., MOE, D., KIRKEBY, S. und GARBARSCHE, C., 1998. Sirius red and acid fuchsin staining mechanisms. *Biotechnic & Histochemistry*, 73, S.71-77.
- O'TOOLE, E. T., HANTGAN, R. R. und LEWIS, J. C., 1994. Localization of fibrinogen during aggregation of avian thrombocytes. *Experimental and Molecular Pathology*, 61, S.175-190.
- OLIVER, J. M., KRAWIEC, J. A. und BECKER, E. L., 1978. The distribution of actin during chemotaxis in rabbit neutrophils. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 24, S.697-704.

- OLSON, W. C. und EWERT, D. L., 1990. Markers of B lymphocyte differentiation in the chicken. *Hybridoma*, 9, S.331-350.
- PARAMITHIOTIS, E., TKALEC, L. und RATCLIFFE, M. J. H., 1991. High levels of CD45 are coordinately expressed with CD4 and CD8 on avian thymocytes. *Journal of Immunology*, 147, S.3710-3717.
- PARYSEK, L. M. und ECKERT, B. S., 1984. Vimentin filaments in sreading, randomly locomoting and f-met-leu-phe-treated neutrophils. *Cell and Tissue Research*, 235, S.575-581.
- PASTERNAK, G. R. und RACUSEN, R. H., 1989. Erythrocyte protein 4.1 binds and regulates myosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, S.9712-9716.
- PEAULT, B., CHEN, C. L. H., COOPER, M. D., BARBU, M., LIPINSKI, M. und LEDOUARIN, N. M., 1987. Phylogenetically conserved antigen on nerve cells and lymphocytes resembles myelin-associated glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, S.814-818.
- PHELPS, P. V., EDENS, F. W. und CHRISTENSEN, V. L., 1987. The posthatch physiology of the turkey poult II. Hematology. *Comparative Biochemistry and Physiology. A. Comparative Physiology*, 86, S.745-750.
- PICKEL, J. M., CHEN, C. L. H. und COOPER, M. D., 1990. An avian B-lymphocyte protein associated with beta 2-microglobulin. *Immunogenetics*, 32, S.1-7.
- PINK, J. R. und RIJNBEEK, A. M., 1983. Monoclonal antibodies against chicken lymphocyte surface antigens. *Hybridoma*, 2, S.287-296.
- PSCHYREMBEL, 2004. *Klinisches Wörterbuch*, 260.Auflage, Berlin, de Gruyter Verlag.
- RASKIN, R. E. und VALENCIANO, A., 2000. Cytochemistry of normal leucocytes. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*. 5.Auflage, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- RATCLIFFE, M. J. H., BOYD, R., CHEN, C. L. und VAINIO, O., 1993. Avian CD nomenclature workshops, Montreal, june 1991, Budapest, august 1992 and Tours, september 1992. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 38, S.375-386.
- RAUSCH, P. G. und MOORE, T. G., 1975. Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: a phylogenetic comparison. *Blood*, 46, S.913-919.
- REIBIGER, I. und SPANEL-BOROWSKI, K., 2000. Difference in localization of eosinophils and mast cells in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118, S.243-249.

- REPASKY, E. A., GRANGER, B. L. und LAZARIDES, E., 1982. Widespread occurrence of avian spectrin in nonerythroid cells. *Cell*, 29, S.821-833.
- RIEGLER, S., 2012. Ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen am Blut des Schafes (*Ovis aries*). *Dissertation*, LMU München.
- ROBERTSON, G. W. und MAXWELL, M. H., 1991. Fine structure of secondary granule inclusions in fowl heterophils after ruthenium tetroxide fixation. *Research in Veterinary Science*, 50, S.121-122.
- ROSSE, W. F. und WALDMANN, T. A., 1966. Factors controlling erythropoiesis in birds. *Blood-The Journal of Hematology*, 27, S.654-661.
- ROTH, J., 2011. Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochemistry and Cell Biology*, 136, S.117-130.
- ROTHENBERG, M. E. und HOGAN, S. P., 2006. The eosinophil. *Annual Review of Immunology*, 24, S.147-174.
- RÜDIGER, H., 1978. Lectins, sugar-binding plant proteins. *Naturwissenschaften*, 65, S.239-244.
- RÜDIGER, H., 1981. Lektine: Vorkommen, Anwendung und Funktion. *Chemie in Unserer Zeit*, 15, S.155-162.
- RÜDIGER, H., 1982. Phythemagglutinins. *Planta Medica*, 46, S.3-9.
- RÜDIGER, H., 1998. Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anatomica*, 161, S.130-152.
- RÜDIGER, H. und GABIUS, H.-J., 2001. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18, S.589-613.
- RÜDIGER, H. und GABIUS, H.-J., 2009a. The biochemical basis and coding capacity of the sugar code. In: GABIUS, H.-J. (Hrsg.) *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag.
- RÜDIGER, H. und GABIUS, H.-J., 2009b. Plant lectins. In: GABIUS, H.-J. (Hrsg.) *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag.
- RÜSSE, I. und SINOWATZ, F., 2008. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*, 3.Auflage, München, Eigenverlag.
- RYDER, M. I., NIEDERMAN, R. und TAGGART, E. J., 1982. The cytoskeleton of human polymorphonuclear leucocytes: phagocytosis and degranulation. *Anatomical Record*, 203, S.317-327.
- SAITO, H., GOLDSMIT.G und RATNOFF, O. D., 1974. Fletcher factor activity in plasmas of various species. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 147, S.519-523.

- SAITO, H., GOLDSMITH, G. und WALDMANN, R., 1976. Fitzgerald factor (high molecular weight kininogen) clotting activity in human plasma in health and disease in various animal plasmas. *Blood*, 48, S.941-947.
- SAMSTAG, Y., EIBERT, S. M., KLEMKE, M. und WABNITZ, G. H., 2003. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *Journal of Leukocyte Biology*, 73, S.30-48.
- SANTOS, A. A., DA SILVA, A. M. J., SILVA, M. R. R., SEGRETO, H. R. C. und EGAMI, M. I., 2003. Structural, cytochemical, immunocytochemical and ultrastructural characterization of blood granulocytes of the roadside hawk *Buteo magnirostris* (Gmelin, 1788) (Avian, Falconiform). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 35, S.351-357.
- SASMAL, D., GUHATHAKURTA, B., BHATTACHARYA, S. K., PAL, C. R. und DATTA, A., 2002. N-acetyl-D-glucosamine specific hemagglutinin receptor of *Vibrio cholerae* O1 in chicken erythrocyte membranes. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 32, S.187-189.
- SCHAUENSTEIN, K., GLOBERSON, A., ROSENBERG, M., SHARON, N. und WICK, G., 1983. Characterization of chicken lymphocyte subsets separated by peanut agglutinin. *Cellular Immunology*, 80, S.288-300.
- SCHAUENSTEIN, K., KROMER, G., HÁLA, K., BOCK, G. und WICK, G., 1988. Chicken-activated-T-lymphocyte-antigen (CATLA) recognized by monoclonal antibody INN-CH 16 represents the IL-2 receptor. *Developmental and Comparative Immunology*, 12, S.823-831.
- SCHEPELMANN, K., 1990. Erythropoietic bone-marrow in the pigeon: development of its distribution volume during growth and pneumatization of bones. *Journal of Morphology*, 203, S.21-34.
- SCHOLZ, J., 2012. Ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen der Blutzellen des Straußes (*Struthio camelus*). *Dissertation*, LMU München.
- SCOPE, A., 2011. Untersuchung des Blutes. In: KALETA, E. F. und KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E. (Hrsg.): *Kompendium der Ziervogelkrankheiten*. 4.Auflage, Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG.
- SELL, J. L. und NATHANAEL, A. S., 1978. Hemoglobin levels of turkeys from 1 to 28 days of age. *Poultry Science*, 57, S.1764-1765.
- SHARMA, J. M., 2008. Avian immune system. In: SAIF, Y. M. (Hrsg.) *Diseases of Poultry*. 12.Auflage, Iowa, Blackwell Publishing Professional.
- SHARMA, J. M. und BELZER, S. W., 1992. Blastogenic response of whole blood cells of turkeys to a T-cell mitogen. *Developmental and Comparative Immunology*, 16, S.77-84.

- SHETERLINE, P., HANDEL, S. E., MOLLOY, C. und HENDRY, K. A. K., 1992. The nature and regulation of actin filament turnover in cells. *Acta Histochemica, Suppl.-Band XLI*, S.303-309.
- SIMPSON, C. F., 1968. Ultrastructural features of the turkey thrombocyte and lymphocyte. *Poultry Science*, 47, S.848-850.
- SIMPSON, C. F., 1971. The ultrastructure of Heinz bodies in horse, dog, and turkey erythrocytes. *Cornell Veterinarian*, 61, S.228-238.
- SINOWATZ, F. und HEES, H., 2006. *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*, 4.Auflage, München, Eigenverlag.
- SLOBODA, R. D. und DICKERSIN, K., 1980. Structure and composition of the cytoskeleton of nucleated erythrocytes.1. The presence of microtubule-associated protein 2 in the marginal band. *Journal of Cell Biology*, 87, S.170-179.
- SMITH, F. M., WEST, N. H. und JONES, D. R., 2000. The cardiovascular system. In: CAUSEY WHITTOW, G. (Hrsg.) *Sturkie`s Avian Physiology*. 5.Auflage, San Diego, Academic Press.
- SORRELL, J. M., 1988. Ultrastructural localization of peanut lectin binding to extravascular white blood cells in the bone marrow of embryonic chicks. *Cell and Tissue Research*, 251, S.301-305.
- SORRELL, J. M. und WEISS, L., 1982. Intercellular junctions in the hematopoietic compartments of embryonic chick bone marrow. *American Journal of Anatomy*, 164, S.57-66.
- SOWDER, J. T., CHEN, C. L. H., AGER, L. L., CHAN, M. M. und COOPER, M. D., 1988. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 167, S.315-322.
- SPURLING, N. W., 1981. Comparative physiology of blood clotting. *Comparative Biochemistry and Physiology. A. Comparative Physiology*, 68, S.541-548.
- STABLER, J. G., MCCORMICK, T. W., POWELL, K. C. und KOGUT, M. H., 1994. Avian heterophils and monocytes: phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*. *Veterinary Microbiology*, 38, S.293-305.
- STEINERT, P. M., JONES, J. C. R. und GOLDMAN, R. D., 1984. Intermediate filaments. *Journal of Cell Biology*, 99, S.22s-27s.
- STILLER, R. A., BELAMARICH, F. A. und SHEPRO, D., 1975. Aggregation and release in thrombocytes of the duck. *American Journal of Physiology*, 229, S.206-210.
- STOBBE, H., 1970. *Hämatologischer Atlas*, 3.Auflage, Berlin, Akademie Verlag.

- STRAKOVÁ, E., SUCHÝ, P., KÁBELOVÁ, R., VITULA, F. und HERZIG, I., 2010. Values of selected haematological indicators in six species of feathered game. *Acta Veterinaria Brno*, 79, S.3-8.
- STURKIE, P. D., 1965. *Avian Physiology*, 2.Auflage, New York, Cornell University Press.
- STURKIE, P. D. und GRIMINGER, P., 1976. Blood: Physical characteristics, formed elements, hemoglobin, and coagulation. *In: STURKIE, P. D. (Hrsg.) Avian Physiology*. 3.Auflage, New York, Springer-Verlag.
- SURESH, M., SHARMA, J. M. und BELZER, S. W., 1993. Studies on lymphocyte subpopulations and the effect of age on immune competence in turkeys. *Developmental and Comparative Immunology*, 17, S.525-535.
- SWEENEY, P. R. und CARLSON, H. C., 1968. Electron microscopy and histochemical demonstration of lysosomal structures in chicken thrombocytes. *Avian Diseases*, 12, S.636-644.
- TABER, E., DAVIS, D. E. und DOMM, L. V., 1943. Effect of sex hormones on the erythrocyte number in the blood of the domestic fowl. *American Journal of Physiology*, 138, S.479-487.
- TABLIN, F. und TAUBE, D., 1987. Platelet intermediate filaments: detection of a vimentinlike protein in human and bovine platelets. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 8, S.61-67.
- TAKEUCHI, K., SHIBATA, N. und SENDA, N., 1975. ATPase activity and filament formation of partially purified myosin from leucocytes *Journal of Biochemistry*, 78, S.93-103.
- TATSUMI, N., SHIBATA, N., OKAMURA, Y., TAKEUCHI, K. und SENDA, N., 1973. Actin and myosin A from leucocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 305, S.433-444.
- TERASHIMA, M., MISHIMA, K., YAMADA, K., TSUCHIYA, M., WAKUTANI, T. und SHIMOYAMA, M., 1992. ADP-ribosylation of actins by arginine-specific ADP-ribosyltransferase purified from chicken heterophils. *European Journal of Biochemistry*, 204, S.305-311.
- TIZARD, I., 1992. *Veterinary Immunology: An Introduction*, 4.Auflage, Philadelphia, W.B. Saunders Company.
- TOIVANEN, P. und TOIVANEN, A., 1973. Selective activation of chicken T lymphocytes by concanavalin A. *Journal of Immunology*, 111, S.1602-1603.
- TOPP, R. C. und CARLSON, H. C., 1972a. Studies on avian heterophils. II. Histochemistry. *Avian Diseases*, 16, S.369-373.
- TOPP, R. C. und CARLSON, H. C., 1972b. Studies on avian heterophils. III. Phagocytic properties. *Avian Diseases*, 16, S.374-380.

- TREGASKES, C. A., KONG, F. K., PARAMITHIOTIS, E., CHEN, C. L. H., RATCLIFFE, M. J. H., DAVISON, T. F. und YOUNG, J. R., 1995. Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma-delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Journal of Immunology*, 154, S.4485-4494.
- UBUKAWA, K., GUO, Y.-M., TAKAHASHI, M., HIROKAWA, M., MICHISHITA, Y., NARA, M., TAGAWA, H., TAKAHASHI, N., KOMATSUDA, A., NUNOMURA, W., TAKAKUWA, Y. und SAWADA, K., 2012. Eucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. *Blood*, 119, S.1036-1044.
- UNGER, E., HÄDRICH, H., RUBINO, S., CAPPUCCINELLI, P., MÜHLIG, P. und JELKE, E., 1992. The microtubule system and the reduplication of microtubule organizing centres in *Dictyostelium discoideum*. *Acta Histochemica, Suppl.-Band XXI*, S.19-28.
- USAMI, S., MAGAZINOVIC, V., CHIEN, S. und GREGERSEN, M. I., 1970. Viscosity of turkey blood: rheology of nucleated erythrocytes. *Microvascular Research*, 2, S.489-499.
- VAINIO, O., RIWAR, B., BROWN, M. H. und LASSILA, O., 1991. Characterization of the putative avian CD2 homologue. *Journal of Immunology*, 147, S.1593-1599.
- VALERIUS, N. H., STENDAHL, O., HARTWIG, J. H. und STOSSEL, T. P., 1981. Distribution of actin-binding protein and myosin in polymorphonuclear leucocytes during locomotion and phagocytosis. *Cell*, 24, S.195-202.
- VENKATARATNAM, A. und CLARKSON, M. J., 1962. The blood cells of the turkey. *Research in Veterinary Science*, 3, S.455-459.
- VEROMAA, T., VAINIO, O., EEROLA, E. und TOIVANEN, P., 1988. Monoclonal antibodies against chicken Bu-1a and Bu-1b alloantigens. *Hybridoma*, 7, S.41-48.
- VICENTE-MANZANARES, M., MA, X., ADELSTEIN, R. S. und HORWITZ, A. R., 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, S.778-790.
- VICENTE-MANZANARES, M. und SÁNCHEZ-MADRID, F., 2004. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature Reviews Immunology*, 4, S.110-122.
- WAIBL, H. und SINOWATZ, F., 2004. Kreislaufapparat und Lymphatisches System. In: VOLLMERHAUS, B. (Hrsg.) *Richard Nickel, August Schummer, Eugen Seiferle: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band V: Anatomie der Vögel*. 3.Auflage, Stuttgart, Parey Verlag.
- WARR, G. W., MAGOR, K. E. und HIGGINS, D. A., 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*, 16, S.392-398.

- WEDEL, A., 2004. *Ziervögel. Erkrankungen, Haltung, Fütterung*, 2.Auflage, Stuttgart, Parey Verlag.
- WEHLAND, J., OSBORN, M. und WEBER, K., 1977. Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, S.5613-5617.
- WEHREND, A., HETZEL, U., HUCHZERMEYER, S., KLEIN, C. und BOSTEDT, H., 2004. Sirius red is able to selectively stain eosinophil granulocytes in bovine, ovine and equine cervical tissue. *Anatomia Histologia Embryologia-Journal of Veterinary Medicine Series C*, 33, S.180-182.
- WEISS, D. und TVEDTEN, H., 2006. Veränderungen des roten Blutbilds. In: WILLARD, M. D. und TVEDTEN, H. (Hrsg.): *Labordiagnostik in der Kleintierpraxis*. München, Urban & Fischer Verlag.
- WEISS, L. P. und FAWCETT, D. W., 1953. Cytochemical observations on chicken monocytes, macrophages and giant cells in tissue culture. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1, S.47-65.
- WIESNER, E. und RIBBECK, R. (Hrsg.) 2000. *Lexikon der Veterinärmedizin*, Stuttgart, Enke im Hippokrates Verlag GmbH.
- WIGLEY, P., HULME, S. D. und BARROW, P. A., 1999. Phagocytic and oxidative burst activity of chicken thrombocytes to Salmonella, Escherichia coli and other bacteria. *Avian Pathology*, 28, S.567-572.
- WU, A. M., LISOWSKA, E., DUK, M. und YANG, Z., 2009. Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconjugate Journal*, 26, S.899-913.
- WURZINGER, L. J. und PESCHL, C., 2005. Blutbildung. In: JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. und GRATZL, M. (Hrsg.): *Histologie*. 6.Auflage, Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- WURZINGER, L. J. und ZANNER, R., 2005. Blut. In: JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. und GRATZL, M. (Hrsg.): *Histologie*. 6.Auflage, Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- YOUNG, K. M., 2000. Eosinophils. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G. und JAIN, N. C. (Hrsg.): *Schalm's Veterinary Hematology*. 5.Auflage, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

## 5 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit anfertigen zu dürfen, für das Korrekturlesen sowie für das Anfertigen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Außerdem möchte ich mich auch für die stets freundliche und unterstützende Beratung sehr bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Angestellten des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU München. Im Speziellen danke ich Frau Wiebke Scholz für die Bearbeitung der Blutproben für die Elektronenmikroskopie und die Anfertigung der Schnitte sowie für ihre sehr liebenswerte Unterstützung. Ein großer Dank gilt auch Gabi Russmeier, Monika Settles, Dr. Felix Habermann und Yilmaz Gök für die stets hilfsbereite Beratung.

Ganz besonders möchte ich mich zudem bei Frau Maria Schuster und Herrn Josef Schuster bedanken, die es mir ermöglichten das Blut für meine Untersuchungen zu gewinnen und mich bei der Probennahme stets sehr freundlich und tatkräftig unterstützten.

Ich bedanke mich bei Heike Gantert und Julia Scholz für die Bereitstellung der Vergleichsausstriche. Bei beiden sowie Andrea Kügel und Stephanie Riegler bedanke ich mich außerdem für die große Hilfe und Unterstützung im Labor.

Bei Camilla Wolf, Caroline Lischka und Stefanie D`Orto möchte ich mich ferner für die stets hilfsbereite Beratung und Unterstützung bedanken. Ein herzlichster Dank gilt auch Melanie Thes für die große technische Hilfe sowie Medea Seyder, Kim Reising und der Rechnerbetriebsgruppe der Tierärztlichen Fakultät der LMU München für die tolle Beratung und Hilfe bei technischen Problemen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, die mir schon mein ganzes Leben lang in allen Lebenslagen eine große Hilfe und Unterstützung ist. Vielen Dank auch an meine Schwestern Nicole und Denise.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinem Lebensgefährten Sascha für sein Verständnis bedanken und dafür, dass er immer für mich da ist und mich stets unterstützt. Danke auch an Dagmar und Rainer Tullius für die Unterstützung.