

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

**Ultrastrukturelle und histochemische
Untersuchungen am Blut der Ziege**

von
Alfons Ulrich Paul Nikolaus
Weißmüller
aus Rosenheim

München 2015

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

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. C. Poulsen
Nautrup

Mitbetreuung durch: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. C. Poulsen Nautrup

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Mansfeld

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Das Blut der Ziege	3
1.1. Zusammensetzung und Aufgaben	3
1.2. Hämatopoese	4
1.3. Besondere Hämatologie der Ziege	5
2. Die Blutzellen der Ziege	8
2.1. Leukozyten	8
2.1.1. Neutrophile Granulozyten	8
2.1.1.1. Struktur	8
2.1.1.2. Aufgaben.....	9
2.1.2. Basophile Granulozyten	9
2.1.2.1. Struktur	9
2.1.2.2. Aufgaben.....	10
2.1.3. Eosinophile Granulozyten	10
2.1.3.1. Struktur	10
2.1.3.2. Aufgaben.....	11
2.1.4. Lymphozyten	12
2.1.4.1. Struktur	12
2.1.4.2. Aufgaben.....	13
2.1.5. Monozyten	14
2.1.5.1. Struktur	14
2.1.5.2. Aufgaben.....	15
2.2. Erythrozyten	16
2.2.1. Struktur.....	16
2.2.2. Aufgaben.....	16
2.3. Thrombozyten	17
2.3.1. Struktur.....	17
2.3.2. Aufgaben.....	17
3. Glykohistochemie.....	19
3.1. Definition des Begriffs „Lektin“	19
3.2. Geschichte der Lektine.....	19
3.3. Struktur der Lektine.....	20
3.4. Funktion der Lektine	22

4. Zytoskelett	23
4.1.1. Definition und Anwendung.....	23
4.1.2. Zusammensetzung.....	23
4.1.3. Technik.....	24
4.1.4. Zytoskelett der Erythrozyten.....	25
4.1.5. Zytoskelett der Thrombozyten	25
4.1.6. Zytoskelett der Leukozyten.....	26
5. Blutgruppen der Ziege	28
III. MATERIAL UND METHODEN	29
1. Untersuchungsmaterial	29
2. Lichtmikroskopie	31
2.1. Diff-Quick-Färbung.....	31
2.2. Giemsa-Färbung	31
2.3. May-Grünwald-Färbung.....	32
2.4. Panoptische Färbung nach Pappenheim	32
2.5. PAS-Färbung	33
2.6. Toluidinblau-Färbung.....	33
2.7. Alcianblau-Färbung.....	34
3. Elektronenmikroskopie	35
4. Glykohistochemie	36
4.1. FITC-markierte Lektine	36
4.2. Biotinylierte Lektine.....	38
4.3. Hemmzucker	40
4.4. Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	40
5. Zytoskelett	41
5.1. Phalloidin-TRITC.....	41
5.2. Myosin.....	42
5.3. Vimentin.....	43
5.4. Panzytokeratin.....	44
5.5. Tubulin	45
6. Auswertungen	45
IV. ERGEBNISSE	46
1. Lichtmikroskopische Untersuchungen	46
1.1. Leukozyten	46

1.1.1.	Neutrophile Granulozyten.....	46
1.1.2.	Basophile Granulozyten.....	47
1.1.3.	Eosinophile Granulozyten.....	49
1.1.4.	Lymphozyten	50
1.1.5.	Monozyten	52
1.2.	Erythrozyten.....	53
1.3.	Thrombozyten	54
2.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	55
2.1.	Leukozyten.....	55
2.1.1.	Neutrophile Granulozyten.....	55
2.1.2.	Basophile Granulozyten.....	58
2.1.3.	Eosinophile Granulozyten.....	59
2.1.4.	Lymphozyten	60
2.1.5.	Monozyten	63
2.2.	Erythrozyten.....	66
2.3.	Thrombozyten	67
3.	Glykohistochemische Untersuchungen.....	71
3.1.	FITC-markierte Lektine	71
3.1.1.	Bindung von Concanavalin Agglutinin (ConA).....	71
3.1.2.	Bindung von Lens culinaris Agglutinin (LCA)	73
3.1.3.	Bindung von Pisum sativum Agglutinin (PSA).....	75
3.1.4.	Bindung von Peanut Agglutinin (PNA).....	77
3.1.5.	Bindung von Ricinus communis Agglutinin (RCA).....	79
3.1.6.	Bindung von Wheat germ Agglutinin (WGA).....	81
3.1.7.	Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs).....	83
3.1.8.	Bindung von Griffonia simplicifolia Agglutinin (GSL-1).....	85
3.1.9.	Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA).....	87
3.1.10.	Bindung von Saphora japonica Agglutinin (SJA).....	88
3.1.11.	Bindung von Soybean Agglutinin (SBA)	91
3.1.12.	Bindung von Ulex europaeus Agglutinin (UEA-1).....	92
3.1.13.	Bindung von Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro (PHA-E)	95
3.1.14.	Bindung von Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuco (PHA-L)	97
3.2.	Biotinylierte Lektine.....	98
3.2.1.	Bindung von Maackia amurensis Agglutinin I (MAA-I).....	98
3.2.2.	Bindung von Sambucus nigra Agglutinin (SNA)	100
3.2.3.	Bindung von Viscum album Agglutinin (VAA).....	102
3.3.	Hemmsucker	103

3.4. Vorbehandlung mit Neuraminidase.....	104
4. Untersuchung des Zytoskeletts.....	105
4.1. Phalloidin-TRITC.....	105
4.2. Myosin.....	107
4.3. Vimentin.....	109
4.4. Panzytokeratin.....	112
4.5. Tubulin.....	112
V. DISKUSSION.....	115
1. Lichtmikroskopie.....	115
2. Elektronenmikroskopie.....	117
3. Glykohistochemie.....	119
4. Zytoskelett.....	121
VI. ZUSAMMENFASSUNG.....	123
VII. SUMMARY.....	125
VIII. LITERATURVERZEICHNIS.....	127
IX. ANHANG.....	130
1. Abbildungsverzeichnis.....	130
2. Tabellenverzeichnis.....	133
3. Verzeichnis der Gebrauchslösungen.....	135
X. DANKSAGUNG.....	139

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AG	Antigen
ABC	Avidin-Biotin-Technik
α G	Alpha-Granula
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
B	Biotin
BG	Basophiler Granulozyt
BPA	Bauhinia purpurea Agglutinin
Ca	Calcium
CD	Cluster of differentiation
CFU-GM	Colony-forming-unit Granulozyten Monozyten
Cl	Chlor
ConA	Concanavalin Agglutinin
CRD	Carbohydrate recognition domain
Cu	Kupfer
DB	Dense bodies
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
Dk	Dakryozyt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTS	Dense tubular system
EB	Erythroblast
EC	Euchromatin
ECA	Erythrina cristagalli Agglutinin
ECP	Eosinophil cationic protein
EDN	Eosinophil derived neurotoxin
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EHC	Enzymhistochemie
EM	Elektronenmikroskopie
EG	Eosinophiler Granulozyt
EPO	Eosinophil peroxidase
eR	Endoplasmatisches Retikulum
Ery	Erythrozyten
F	Filament
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Full length
G- CSF	Granulozyte colony stimulating factor
GALT	Milz und Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe
gG	Große Granula
GHC	Glykohistochemie
Gly	Glykogen
Gm	Granulomer
GM- CSF	Granulozyte-makrophage-colony-stimulating-factor
Gr	Granula
GRAN	Granulozyt
GSL	Griffonia simplicifolia Agglutinin
Hb	Hämoglobin
HbA	Hämoglobin A

HbB	Hämoglobin B
HbE	Embryonales Hämoglobin
HbF	Fetales Hämoglobin
HC	Heterochromatin
HCl	Salzsäure
HPA	Helix pomatia Agglutinin
Htk	Hämatokrit
Hy	Hyalomer
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IZC	Immunzytochemie
kLZ	Kleiner Lymphozyt
kDa	Kilo-Dalton
L	Lektin
LAA	Laburnum alpinum Agglutinin
LB	Lymphoblast
LBA	Lima bean Agglutinin
LCA	Lens culinaris Agglutinin
LEU	Leukozyten
LM	Lichtmikroskopie
LTA	Lotus tetragonolobus Agglutinin
LZ	Lymphozyt
M	Mitochondrien
M- CSF	Makrophagen stimulierender Faktor
MAA	Maakia amurensis Agglutinin
MB	Myeloblast
MBP	Major basic protein
MG	Molekulargewicht
MZ	Monozyten
MPA	Maclura pomifera Agglutinin
MPO	Myeloperoxidase
MPS	Mononukleares phagozytierendes System
My	Myelozyt
N	Nucleolus
NG	Neutrophiler Granulozyt
NK	Natural Killer
NM	Neuraminidase
OCS	Offenes kanalikuläres System
OT	Objektträger
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PAS	Periodic acid schiff
PCV	Zellpackungsvolumen
Pb	Blei
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Proerythroblast
pG	Primäre Granula
PHA- E	Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro
PHA- L	Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuko
PNA	Peanut Agglutinin

POX	Peroxidase
Ps	Pseudopodien
PSA	Pisum sativum Agglutinin
PWM	Pokeweed mitogen
RCA	Ricinus communis Agglutinin
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
SB	Schwarzer Balken
SBA	Soybean Agglutinin
sG	Spezifische Granula
SJA	Sophora japonica Agglutinin
skNG	Segmentkerniger neutrophiler Granulozyt
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
SP	Saure Phosphatase
SRS- A	Slow reacting substance of anaphylaxis
STA	Solanum tuberosum Agglutinin
stNG	Stabkerniger neutrophiler Granulozyt
Strept	Streptavidin
TCR	T-Zell-Rezeptor
TF	Thomsen Friedenreich
Thr	Thrombozyt
TR	Truncated
TRITC	Tetramethylrhodamine B isothiocyanate
UEA	Ulex europaeus Agglutinin
V	Vakuole
VAA	Viscum album Agglutinin
WB	Weißer Balken
WC	Workshop cluster
WGA	Wheat germ Agglutinin
WGAs	Wheat germ Agglutinin succinyliert
ZK	Zellkern
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZP	Zytoplasma
ZSK	Zytoskelett

I. EINLEITUNG

Ziegen sind die ersten Wiederkäuer, die von Menschen domestiziert wurden. Archäologischen Funden zufolge wurden bereits im 8.-7. Jahrtausend vor Christus in Vorderasien Hausziegen gehalten. Die Ziege ist eine klassische Mehrnutzungsrasse, da das Fell, die Milch und das Fleisch der Ziegen seit jeher von großer Bedeutung für den Menschen sind (Willam und Simianer, 2011). In den Industrienationen werden Ziegen heute meist aus Freude am Tier gehalten, doch genießt die Milch wieder wachsende Bedeutung, da sie nicht unter die Quotenregelung fällt. Des Weiteren führt das Interesse der Verbraucher an hochwertigen, aus Ziegenmilch hergestellten Spezialitäten zu einem steigenden Absatzmarkt in Europa. Die meisten Ziegen leben heute in den tropischen Entwicklungsländern, wo sich 93% des Ziegenbestandes der Welt befinden (Gall, 2001). Die dortige Verbreitung verdanken sie ihrer Anpassungsfähigkeit und ihrer Fressgewohnheiten, durch die sie in der Lage sind die spärliche, nährstoffarme Vegetation zu nutzen. Auch ist es Menschen möglich, ohne eigenes Land Ziegen zu halten. Somit sind Ziegen neben dem, im Vergleich zu Rindern deutlich niedrigerem Anschaffungspreis, eine sehr preiswerte Variante der Tierzucht. Auch religiöse Gründe können für die Ziegenhaltung ausschlaggebend sein. So ist im Hinduismus der Genuss von Rindfleisch verboten und die Ziege ein wichtiger Fleischlieferant. In islamisch geprägten Ländern verwerten Ziegen die Haus- und Küchenabfälle und übernehmen somit die Rolle der Schweine in anderen Kulturkreisen.

Trotz der hier genannten Vorzüge, ist das Verhältnis des Menschen zur Ziege seit jeher zwiespältig. Dies beruht nicht nur auf dem beträchtlichen Schaden den Ziegenherden an der Vegetation verursachen können, sondern auch auf mythischen Vorstellungen. Schon im Alten Testament wurden die Sünden einem Bock aufgeladen, der dann in die Wüste gejagt oder gesteinigt wurde. Dies spiegelt sich bis heute in der Bezeichnung „Sündenbock“ wieder. Bis heute ist es auch in Europa keine Seltenheit, dass einzelne Ziegen in Rinderstallungen gehalten werden, um Krankheiten auf sich zu ziehen und so den wertvollen Rinderbestand zu schützen (Gall, 2001).

Die Gattung Ziege gehört in der Familie der Hornträger (Bovidae) zur Unterfamilie der Ziegenartigen (Caprinae), wie auch das Schaf, dessen Verwandtschaft zur Ziege aber nicht so eng ist, wie früher angenommen wurde (Paululat et al., 2011). Es ist jedoch möglich Ziegen mit Schafböcken zu kreuzen, die Hybriden sind jedoch meist unfruchtbar. Zu der Gattung Ziege gehören unter anderem die Wildziege und die, aus ihr domestizierte Hausziege. Obwohl die Wildziege sich durch ihre Robustheit und ihre weite Verbreitung - Unterarten leben auf 3000 Meter über dem Meeresspiegel - vielen Lebensräumen anpassen kann, ist sie durch Bejagung und den Verlust großer Teile ihres Lebensraumes mittlerweile vom Aussterben bedroht und deshalb auf der IUCN Liste geführt (IUCN, 2008).

Das Ziel dieser Arbeit ist die ultrastrukturelle, glykohistochemische und immunzytochemische Untersuchung des Blutes der Ziege. Zunächst wurden, mittels diverser Färbemethoden, die Blutaussstriche der zu untersuchenden Ziegen angefärbt, um die Struktur der einzelnen Blutzellen unter dem Licht- und Elektronenmikroskop darzustellen. Die Kohlenhydratstrukturen der Blutzellen wurden in der glykohistochemischen Untersuchung durch pflanzliche Lektine ermittelt. In immunzytochemischen Verfahren wurde die Struktur des Zytoskeletts untersucht.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das Blut der Ziege

1.1. Zusammensetzung und Aufgaben

Das Blut ist eine Suspension freier zellulärer Elemente in einer elektrolythaltigen Eiweißlösung, dem Blutplasma. Wenn der Blutflüssigkeit die Gerinnungsproteine entzogen sind, spricht man von Serum. Das Blutvolumen der meisten Säugetiere beträgt etwa 7–8% des Körpergewichts. Der Anteil der Blutzellen am Gesamtvolumen umfasst etwa 35–55%; diese Größe wird als Hämatokrit bezeichnet (Hees und Tschudi, 1990). Die Zellen werden in drei Haupttypen unterteilt: Erythrozyten (rote Blutzellen), Leukozyten (weiße Blutzellen) und Thrombozyten (Brown, 1998). Das Blutplasma besteht zu 90% aus Wasser. Sein Gesamteiweißgehalt beträgt 7–8%, wobei über 200 verschiedene Proteinarten unterschieden werden können. Den Hauptanteil der Plasmaproteine bilden Albumine (60%), sowie Fibrinogen, die Vorstufe des Fibrins bei der Blutgerinnung (Sinowatz und Hees, 2000).

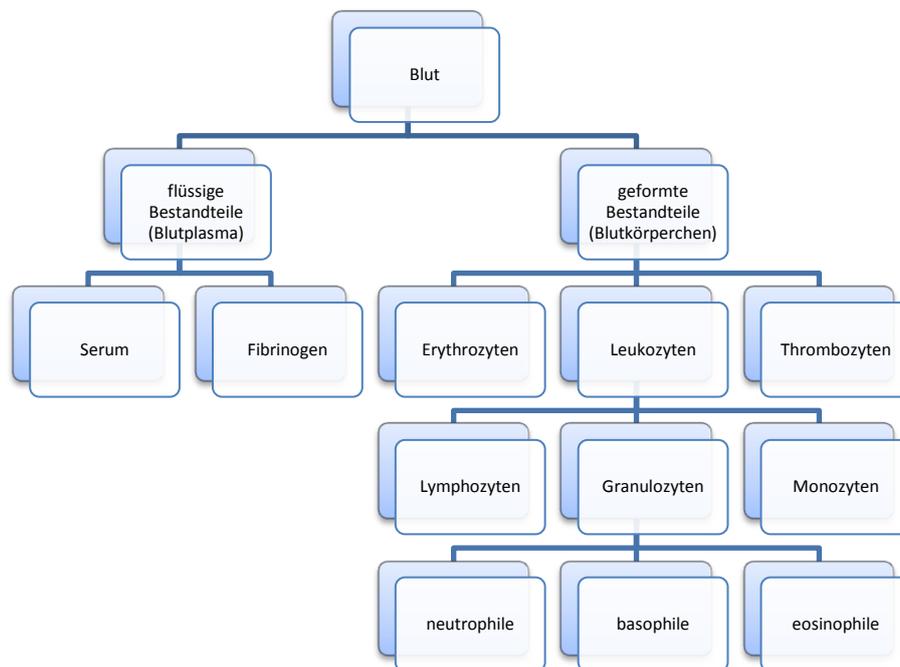


Abbildung 1: Übersicht der Blutzusammensetzung

Die Transportfunktionen des Blutes umfassen einerseits die Aufnahme verschiedener Stoffe aus der Umgebung, dies vor allem im Atmungs- und Magen–Darm–Trakt, sowie die Abgabe dieser Stoffe an entsprechende Zielorgane. Andererseits transportiert Blut Stoffwechselzwischenprodukte zwischen den Organen und Stoffwechselendprodukte zu den ausscheidenden Organen Niere, Leber, Darm, oder auch den Schweißdrüsen. Daneben dient das

Blut dem Transport von Wärme und Hormonen (Engelhardt, 2009). Es dient der Regulation des Ionenhaushaltes und damit der Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts. Durch Abwehrstoffe (Antikörper=Immunglobuline=IgG) und durch die, auf verschiedene Aufgaben spezialisierten Blutzellen ist es an den Abwehrprozessen des Körpers entscheidend beteiligt (Sinowatz und Hees, 2000).

1.2. Hämatopoese

Während der pränatalen Hämatopoese lassen sich folgende Perioden der Blutbildung unterscheiden: megaloblastische Periode, hepatolienale Periode und medulläre Periode (Sinowatz und Hees, 2000). Die ersten Blutkörperchen sind die Hämoytoblasten. Sie werden schon in einem sehr frühen Stadium der megaloblastischen Periode im viszeralem Blatt des lateralen Mesoderms in den Blutinseln der Dottersackwand gebildet (Rüsse und Sinowatz, 1991). Später gewinnen die extraembryonalen Blutgefäße Anschluss an das Blutgefäßsystem des Keimes. Die Erythrozyten sind zu diesem Zeitpunkt noch groß und kernhaltig (Sinowatz und Hees, 2000). In der hepatolienalen Phase sind die Leber, die Milz und etwas später auch in geringem Umfang die Lymphknoten und der Thymus an der Bildung der Blutzellen beteiligt (Sinowatz und Hees, 2000). Die Hämatopoese findet in der Leber ausschließlich extravaskulär statt. Die Stammzellen bilden sich aus dem Mesenchym des Septum transversum. In der Milz ist der Kontakt der hämatopoetischen Stammzellen mit dem retikulären Bindegewebe für die Blutzelldifferenzierung wichtig (Rüsse und Sinowatz, 1991). In der medullären Periode findet die Blutbildung im Knochenmark statt. Auch hier müssen die Stammzellen Kontakt mit retikulärem Bindegewebe haben, um zu Blutzellen zu werden. Aus der Leber, der Milz und dem Knochenmark stammende Erythrozyten werden immer kernlos, im Gegensatz zu den aus dem Dottersack stammenden (Rüsse und Sinowatz, 1991). Die postnatale Blutbildung findet hauptsächlich im Knochenmark flacher Knochen, sowie im lymphatischen System statt (Engelhardt, 2009). Man nimmt an, dass sich alle Blutzellen aus einer totipotenten Stammzelle entwickeln. Aus ihr entstehen pluripotente Vorläuferzellen, die in myeloische und lymphatische Vorläuferzellen unterteilt werden. Während sich aus den myeloischen pluripotenten Vorläuferzellen die erythrozytäre, neutrophile und eosinophile, die monozytäre und thrombozytäre, sowie vermutlich auch die basophile und Mastzellreihe ableiten lassen, entwickeln sich aus der lymphatischen und pluripotenten Vorläuferzelle die lymphozytären Zellen (T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen) (Kraft, 2005).

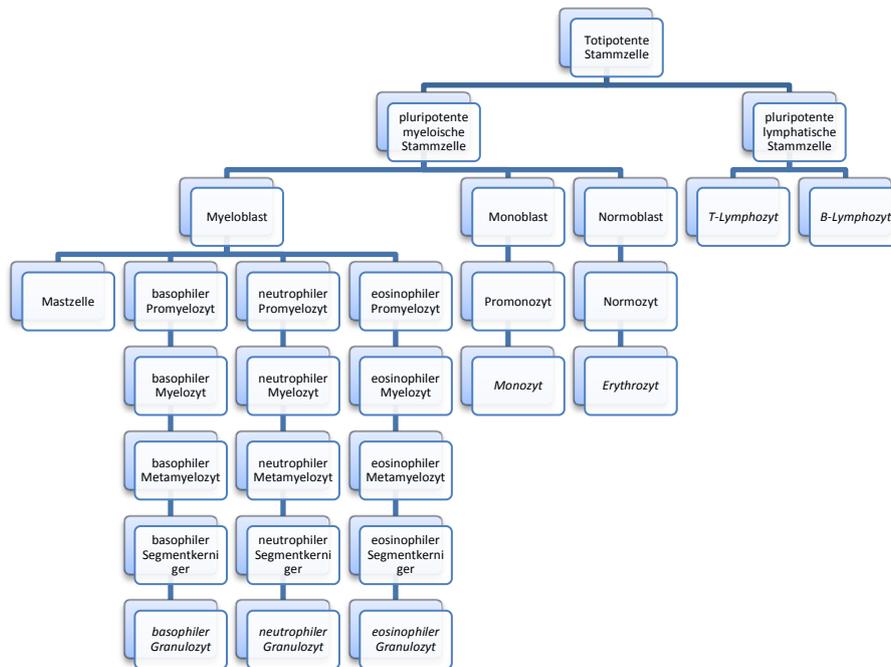


Abbildung 2: Die Abstammung der Blutzellen

1.3. Besondere Hämatologie der Ziege

Wie bei Rind und Schaf zeigt auch die Ziege ein lymphozytäres Blutbild, da die Lymphozyten mehr als 50% der Leukozyten ausmachen (Kraft, 2005). Demgegenüber weisen Mensch, Pferd, Hund und Katze ein granulozytäres Blutbild mit mehr als 50% Granulozyten auf (Engelhardt, 2009). Bei der Ermittlung der Blutparameter der Ziege muss beachtet werden, dass Faktoren wie Training, Gemütszustand, Alter des Tieres, Form der Haltung, Temperatur, Wasserversorgung und Parasitenbefall einen großen Einfluss ausüben (Feldmann et al., 1986). Tiere, die in höheren Lagen leben, haben eine größere Anzahl an Erythrozyten und eine höhere Hämoglobinkonzentration als solche, die sich im Bereich des Meeresspiegels aufhalten (Jain und Kono, 1972). Dies ist bei Ziegen von besonderer Bedeutung, da viele Ziegenrassen ihr natürliches Habitat in gebirgigen Regionen haben. Das Alter hat entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung des Blutes. Schon vor der Geburt zeigt sich eine Besonderheit der Hämatologie; die Ziege entwickelt während der Trächtigkeit und im peripartalen Zeitraum vier verschiedene Hämoglobin Typen, welche die Sauerstoffversorgung der Frucht und des Neugeborenen sicherstellen. Der embryonale Typ HbE wird noch in utero von dem fetalen Typ HbF abgelöst. Während der Geburt wird HbF von HbC ersetzt, das nur im Blut von Schafen und einigen Ziegen physiologisch vorhanden ist. Innerhalb von 60 Tagen post partum wird HbC durch das adulte HbA ausgetauscht. Des Weiteren besitzt HbC und HbA bei Ziegen und einigen Schafen die einzigartige Eigenschaft, durch Erythropoetin, HbC und HbA an- und abschalten zu können (Feldmann et al., 1986). In den ersten Lebenstagen steigt außerdem die absolute Leukozytenzahl und die Lymphozytenzahl an (Kraft, 2005). Zu diesem Zeitpunkt sind die neutrophilen Granulozyten die häufigsten Leukozyten, ab ungefähr zwei Wochen post partum

dominieren jedoch die Lymphozyten das weiße Blutbild. Später liegt das Verhältnis der Neutrophilen zu den Lymphozyten bei 0,6 (Feldmann et al., 1986). Bei jungen Ziegen findet man zudem eine besonders ausgeprägte Anisozytose, was eine Ungleichheit in den Zellabmessungen jenseits der physiologischen Grenzen bedeutet. Außerdem kann man in deren Blutbild Erythrozyten in Form eines Tränentropfens, die Dacrozyten ermitteln (Hees und Tschudi, 1990). Auch die adulten Ziegen weisen bei einigen Rassen, besonders bei der Angoraziege, ungewöhnliche Formen der roten Blutkörperchen auf. Fusozyten entstehen durch Polymerisation des Hämoglobins und stellen sich als spindelförmige Erythrozyten dar (Feldmann et al., 1986, Hees und Tschudi, 1990). Auch in ihrer Größe gibt es Variationen, so gibt es im Blut der Ziege Gigantozyten, die den 1,5- bis 2 fachen Zelldurchmesser normaler Erythrozyten erreichen können (Hees und Tschudi, 1990). Generell besitzt die Ziege, mit einer Größe von im Durchschnitt $3\mu\text{m}$ die kleinsten roten Blutkörperchen aller domestizierten Tiere (Jain, 1993). Der Glukoseverbrauch der Erythrozyten ist mit $1,9\mu\text{mol/hr/ml}$ ungefähr dreimal so hoch wie bei anderen Wiederkäuern. Polychromasie und Retikulozyten kommen physiologisch im Blutbild adulter Rinder, Schafe und Ziegen nicht vor (Feldmann et al., 1986). Eine hämatologische Besonderheit der Leukozyten ist im Vergleich zu vielen anderen Spezies der geringe Vorrat an Granulozyten im Knochenmark. Dies kann bei, durch entzündliche Prozesse hervorgerufener granulopoetischer Antwort, im peripheren Blut als Neutropenie beobachtet werden. In neutrophilen Granulozyten der Ziege können, anders als in vielen anderen domestizierten Tierarten, drei Arten von zytoplasmatischen Granula gefunden werden (Feldmann et al., 1986). Die primären Granula sind azurophil und enthalten lysosomale Enzyme, die sekundären Granula enthalten Phagocytin, einen bakteriziden Stoff (Kolb, 1991). Die tertiären Granula des Rindes sind größer als die beiden anderen Formen und enthalten kationische Proteine und Laktoferrin (Feldmann et al., 1986). Die eosinophilen Granulozyten der Wiederkäuer besitzen die kleinsten Granula aller domestizierten Tiere (Hees und Tschudi, 1990).

Tabelle 1: physiologische Blutparameter der Ziege:

	Einheit	Spannweite	Durchschnitt
<i>Rotes Blutbild</i>			
Erythrozyten	x 10 ⁶ /μl	8,0 – 18,0	13,0
Hämoglobin	g/dl	8,0 – 12,0	10,0
Hämatokrit	l/l	0,28 – 0,4	0,34
PCV	%	22 – 38	28
MCV	fl	16 – 25	19,5
MCH	Pg	5,2 – 8,0	6,5
MCHC	%	30 – 36	33
Erythrozytendurchmesser	μm	3,8 – 4,4	4,1
<i>Weißes Blutbild</i>			
Leukozyten gesamt	/μl	4000 – 13000	9000
Neutrophile	/μl	1200 – 7200	3250
	%	30 – 48	36
Basophile	/μl	0 – 120	50
	%	0 – 1	0,5
Eosinophile	/μl	50 – 650	450
	%	1 – 8	5,0
Lymphozyten	/μl	2000 – 9000	5000
	%	50 – 70	56,0
Monozyten	/μl	0 – 550	250
	%	0 – 4	2,5
Thrombozyten	x10 ³	300 – 600	450

2. Die Blutzellen der Ziege

2.1. Leukozyten

2.1.1. Neutrophile Granulozyten

2.1.1.1. Struktur

Die Neutrophilen sind unter den Granulozyten die am häufigsten vorkommenden Blutzellen. Sie machen circa 40% aus (Engelhardt, 2009). Ihre Anzahl wird mit 1200 bis 7200/ μ l beschrieben (Feldmann et al., 1986). Die Zellen haben einen Durchmesser von 9 bis 12 μ m. Der Kern besteht bei der reifen Form aus 2 bis 5 (meist 3) stark basophil gefärbten Segmenten (Hees und Tschudi, 1990). Aufgrund der starken Kernvariationen wird der neutrophile Granulozyt auch polymorphonuclear (PMN) Granulozyt genannt. Zwischen den einzelnen Kernsegmenten finden sich bei Wiederkäuern feine Chromatinfasern. Je älter ein Neutrophiler ist, desto mehr Segmente lassen sich feststellen (Brown, 1998). Unter physiologischen Verhältnissen kommen, mit ungefähr 1 bis 2% relativ selten, stabkernige Granulozyten vor, die als Jugendform betrachtet werden. Verschiebt sich das Verhältnis der Zahl der segmentkernigen gegenüber den stabkernigen Granulozyten, so spricht man von einer „Links- bzw. Rechtsverschiebung“. Bei infektiösem Geschehen kommt es, aufgrund des erhöhten Bedarfes, zu einer Freisetzung von noch nicht vollständig ausgereiften Granulozyten aus dem Knochenmark. Somit lassen sich im Blutbild vermehrt stabkernige Granulozyten nachweisen und man spricht von einer „Linksverschiebung“ (Sinowatz und Hees, 2000). Die Bildung der Neutrophilen im Knochenmark dauert zwischen 3 und 7 Tagen (Jain, 1993). Der Vorrat an neutrophilen Granulozyten im Knochenmark ist bei Wiederkäuern geringer als bei anderen Spezies. Dies führt in der Frühphase einer Entzündung zu einer Neutropenie im peripheren Blut (Feldmann et al., 1986). In der Blutbahn kann man einen zirkulierenden Pool (40%) und einen Marginalpool (60%) unterscheiden. Letzter umfasst Zellen, die am Endothel von Kapillaren und postkapillären Venulen adhärieren (Sinowatz und Hees, 2000). Im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten befinden sich drei verschiedene Typen von Granula, ein zentraler Golgi-Apparat, kleine endoplasmatische Retikula und einige Mitochondrien. Im Randbereich liegt ein schmaler Streifen, der frei von Zellorganellen ist und Proteine des Zytoskeletts enthält, die aus Mikrotubuli und Mikrofilamenten bestehen (Smith, 1986). Die Granula lassen sich unterteilen in primäre Granula, die azurophil und Peroxidase-positiv sind und sekundäre Granula, die sich weder mit basischem noch mit sauren Farbstoff stärker anfärben lassen und Peroxidase-negativ sind. Letztere, die auch spezifische Granula genannt werden, enthalten Lysozyme, Lactoferrin, Cobalophilin (ein Vitamin B₁₂ bindendes Protein), alkalische Phosphatase, Kollagenase, sowie verschiedene saure Proteine. Den primären Granula entsprechen primäre Lysosomen und sie weisen verschiedene saure Hydrolasen, Elastase, basische Proteine und saure

Glykosaminoglykane auf (Sinowatz und Hees, 2000, Smith, 1986). Die primären Granula sind klein und rund, ihre Zahl nimmt mit fortschreitender Reifung der Granulozyten ab. Somit sind die sekundären Granula, die von eher ovaler Form sind, zahlreicher zu finden (Anosa, 1993). Die in anderen Spezies selten vorkommenden tertiären Granula sind Peroxidase-negativ und im Vergleich zu den beiden Anderen sehr groß und dicht. Sie enthalten ähnlich wie beim Rind Lactoferrin, Bactenecine und beta-Defensine. Sie sind verantwortlich für einen Großteil der antimikrobiellen Aktivität der Granulozyten (Weiss und Wardrob, 2011). Die Form der einzelnen Granula ist bei Ziegen sehr unterschiedlich. Dieser Pleomorphismus zeigt sich in runden, stabförmigen und hantelförmigen Granula, die auch in ihrer Größe stark variierten (Anosa, 1993).

2.1.1.2. Aufgaben

Neutrophile Granulozyten haben eine entscheidende Aufgabe im Abwehrsystem des Körpers. Sie bilden die erste Linie der zellulären Abwehr gegen eindringende Organismen (Smith, 1986). Als Antwort auf eine Infektion bewegen sich die Neutrophilen aus der Blutbahn in das betroffene Gewebe und das Knochenmark wird stimuliert, mehr dieser Zellen zu entsenden (Brown, 1998). Sie sind amöboid beweglich, können die Blutkapillaren und postkapillaren Venolen durchwandern (Diapedese) und so in das Gewebe austreten. Sie können Bakterien und kleine Fremdkörper phagozytieren und sie mittels der Enzyme der Granula abbauen. Sie können aber auch sekretorisch aktiv werden, indem sie ihre Granula nach außen abgeben und phagozytosefähiges Material verdauen (Sinowatz und Hees, 2000). Die Zellen zeigen hohe Phagozytoseaktivität und Beweglichkeit (Kolb, 1991). Neutrophile Granulozyten sind außerdem in der Lage, Fremdkörper wie Pilze, Hefen, Parasiten oder Viren zu zerstören. Neben diesen akuten Prozessen leiten sie auch die Produktion der Zytokine ein, die wiederum die Immunantwort regulieren (Smith, 1986).

2.1.2. Basophile Granulozyten

2.1.2.1. Struktur

Die basophilen Granulozyten kommen am seltensten im Blut vor. Der Zelldurchmesser beträgt 8 bis 11µm. Der Zellkern ist meist 2- bis 3fach segmentiert (Hees und Tschudi, 1990). Bei Ziegen wird ihre Anzahl mit 0 bis 120/µl beschrieben, was einen Anteil von nur 0 bis 1% der Gesamtleukozyten darstellt (Feldmann et al., 1986, Engelhardt, 2009). Ihre Granula haben eine Größe von etwa 1µm, sind dunkelblau bis violett und können den weniger stark gefärbten Zellkern verdecken (Brown, 1998). Aufgrund der großen Granula und der unterschiedlichen Körnung können die basophilen Granulozyten gut von den übrigen Leukozyten unterschieden werden (Anosa, 1993). Bei Ziegen besitzen die Granula einen roten Ring, der dem gesamten Zytoplasma einen Rotstich verleiht (Brown, 1998). Sie können in Größe und Struktur jedoch

stark variieren (Anosa, 1993). In den Granula befindet sich Heparin, welches die Blutgerinnung hemmt und Histamin. Außerdem können auch Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Serotonin und verschiedene chemotaktische Faktoren vorhanden sein (Hees und Tschudi, 1990). Im Zellinneren finden sich selten Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat (Brown, 1998). Basophile Granulozyten besitzen membranständige Rezeptoren für Immunglobulin E (IgE). Ihre Anwesenheit bei allergischen Reaktionen führt, nach Bindung an die IgE-Rezeptoren, zur massiven Freisetzung der Granula. Die Zellen phagozytieren kaum und ihre Verweildauer im Blut ist mit unter 6 Stunden kurz (Hees und Tschudi, 1990). Im Gewebe können sie aber bis zu 2 Wochen überleben (Feldmann et al., 1986). Die amöboide Beweglichkeit ist gering (Kolb, 1991).

2.1.2.2. Aufgaben

Die Hauptaufgabe dürfte die Bereitstellung von Leukotrienen sein. Diese wirken bereits in geringen Konzentrationen als Mediatoren bei Entzündungsprozessen und allergischen Reaktionen. Bei einigen Entzündungsformen, zum Beispiel allergischen Reaktionen der Haut und der Schleimhäute der Atemwege, sind die Basophilen die wichtigste Gruppe unter den Granulozyten (Sinowatz und Hees, 2000). Nach ihrer Aktivierung entleeren die Granula ihren Inhalt an primäre Mediatoren und synthetisieren erneut die sekundären Mediatoren. Dadurch findet die Antwort auf Anaphylaxie prompt statt. Ihre Granula enthalten Heparin, das der Blutgerinnung entgegenwirkt und das gefäßerweiternde Histamin, was sie zu einem Baustein der Hämostase werden lässt (Kolb, 1991). Durch die Sekretion von Heparin wird das Lipoprotein Lipase aktiviert, welches somit die Lipolyse unterstützt. Auch bei Parasitenbefall werden Basophile ausgeschüttet, der Umfang der Reaktion hängt aber stark von der Art des Parasites und der Wirtsspezies ab (Feldmann et al., 1986). Sie scheinen speziell bei der Abwehr gegen Helminthen von großer Bedeutung zu sein (Weiss und Wardrob, 2011).

2.1.3. Eosinophile Granulozyten

2.1.3.1. Struktur

Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten bei der Ziege wird mit 50–650/ μ l beschrieben, was einen Anteil von etwa 0 bis 4% der Gesamtleukozyten ausmacht (Engelhardt, 2009). Ihr Durchmesser beträgt 10 bis 15 μ m und ihre azidophilen Granula haben eine Größe von 0,5 bis 1 μ m. Ihre Lebensdauer im Blut beträgt 3 bis 5 Tage (Brown, 1998). Bei Wiederkäuern ist der Zellkern zweilappig, von Brillen- oder Hantelform und reich an Heterochromatin. Der Kern ist von kleinen, runden Granula umgeben, die eine deutliche Affinität zu sauren Farbstoffen haben und sich mit Eosin orangerot bis rot anfärben lassen (Hees und Tschudi, 1990). Das Zytoplasma zwischen den Granula hat eine hellblaue, blasse Färbung (Jain, 1993). Die Granula der Wiederkäuer sind die kleinsten aller domestizierten Tiere (Feldmann et al., 1986). Im

Elektronenmikroskop erkennt man einen Golgi-Komplex mit runden, abgeflachten Vesikeln und ein undeutliches raues endoplasmatisches Retikulum. Weitere Zellbestandteile sind Mitochondrien, Lipidkörperchen, freie Ribosomen und Glykogen (Weiss und Wardrob, 2011). Des Weiteren lässt sich an den Granula eine homogene Matrix (Externum) von einer kristalloiden Innenstruktur (Internum) unterscheiden. Das Internum enthält eine Esterase und das argininreiche, basische Hauptprotein. Im Externum finden sich Peroxidase, Katalase, die kationischen Eosinophilenproteine und Enzyme des Fettabbaues (Sinowatz und Hees, 2000). Bei den Granula können drei verschiedene Formen differenziert werden. Man unterscheidet die primären, die sekundären oder spezifischen Granula und die kleinen dichten Granula. Die spezifischen Granula beinhalten potente zytotoxische Proteine und machen den Hauptanteil der Granula aus. Sie besitzen einen charakteristischen elektronendichten Kern, der wiederum das Major basic protein (MBP) enthält. Dieses Protein macht mehr als 50% des Gesamtinhaltes der Granula aus. Die membranumschlossenen primären Granula kommen am häufigsten in der Vorläuferzelle Progranulozyt vor, können jedoch in allen Altersstadien gefunden werden. Deren Granula enthalten Charcot-Leyden crystal protein (CLCP), welches die Lysophospholipase-Aktivität besitzt. Der dritte Granula-Typ, die kleinen dichten Granula, enthalten saure Phosphatase, Arylsulfatase, Katalase und Peroxidase (Weiss und Wardrob, 2011). Die Oberfläche der Eosinophilen besitzt nur wenige Mikrovilli, jedoch viele Rezeptoren, welche zum Beispiel die Kommunikation mit Zytokinen ermöglichen. Spezielle Adhäsions-Rezeptoren erlauben es den eosinophilen Granulozyten in das Gewebe einzuwandern, falls sie mit Endothelzellen in Berührung kommen (Feldmann et al., 1986). Beweglichkeit und Phagozytosefähigkeit sind geringer ausgeprägt als bei den neutrophilen Granulozyten (Hees und Tschudi, 1990).

2.1.3.2. Aufgaben

Eosinophile Granulozyten spielen eine aktive Rolle in der Regulation von akuten allergischen- und entzündlichen Reaktionen (Brown, 1998). Ihre Phagozytosefähigkeit ist jedoch gering, sie nehmen bevorzugt Antigen-Antikörper-Komplexe auf. Sie wirken dämpfend auf entzündliche Reaktionen, indem sie die stark entzündlich wirkenden Produkte der Mastzellen, das Histamin und das Leukotrien C enzymatisch inaktivieren. Außerdem hemmen sie mit Prostaglandin E₁ und E₂ die Freisetzung von Mastzell- und Basophilengranula und phagozytieren bereits ausgeschleuste Granula (Sinowatz und Hees, 2000). Neben der Histaminase können die Eosinophilen auch Zink freisetzen, das die Thrombozytenaggregation und die Makrophagenmigration verhindert (Brown, 1998). Durch ihre Fähigkeit, Antigen-Antikörper-Komplexe entfernen zu können, kommt ihnen eine wichtige Aufgabe bei der Zerstörung aufgenommenen Fremdmaterials zu (Kolb, 1991). Bei Anwesenheit von Parasiten im Körper kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der Eosinophilen im Blut (Sinowatz und Hees, 2000). Sie bekämpfen die Larven der Parasiten mit Hilfe von Perforin, welches in den zytotoxischen T-

Zellen gebildet wird. Das Perforin opsoniert mit Hilfe von IgG, IgE, oder dem Komplementsystem, an der Parasitenlarve. Daraufhin entlässt der Granulozyt basische Toxine und hydrolytische Enzyme direkt in das Ziel und wandert unter die beschädigte Haut des Parasiten (Feldmann et al., 1986). Bei allergischen Reaktionen erscheint es möglich, dass die eosinophilen Granulozyten, speziell im späteren Verlauf der Abwehrreaktionen, hauptverantwortlich für Gewebeschäden sein könnten. Das MBP wirkt toxisch auf Epithelien der Atemwege und verursacht bronchiale Hyperaktivität (Weiss und Wardrob, 2011). Auch bei Allergien ist die Anzahl der Eosinophilen deutlich erhöht (Eosinophilie) (Sinowatz und Hees, 2000). Eine weitere noch nicht gänzlich verstandene Eigenschaft ist die von eosinophilen Granulozyten vermittelte Zytotoxizität für Tumorzellen. Bei in vitro Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die aus den Eosinophilen freigesetzten Proteine die Fähigkeit besitzen, Tumorzellen abzutöten.

2.1.4. Lymphozyten

2.1.4.1. Struktur

Unmittelbar post partum besitzen die Wiederkäuer weniger Lymphozyten als Granulozyten. Nach ungefähr drei Monaten jedoch machen die Lymphozyten etwa 70 bis 80% der weißen Blutkörperchen aus (Feldmann et al., 1986). Da der Anteil der Lymphozyten mehr als 50% der Gesamtleukozyten ausmacht, spricht man bei der Ziege von einem Lymphozytärem Blutbild (Engelhardt, 2009). Lymphozyten haben nur geringe amöboide Beweglichkeit und sie phagozytieren nicht (Kolb, 1991). Lichtmikroskopisch können Lymphozyten in drei verschiedenen Größen unterschieden werden: kleine, mittlere und große Lymphozyten. Die kleinen Lymphozyten entstammen dem Thymusgewebe und sind bei jungen Ziegen zweieinhalb mal häufiger als die großen (Smith und Sherman, 2009). Die kleinen Lymphozyten haben einen Durchmesser von 5 bis 10µm und stellen den größten Anteil im zirkulierenden Blut dar (Liebich, 2004). Sie haben einen großen dichten Kern, der von einem dünnen Rand von hellblauem Zytoplasma umgeben ist. Häufig ist am Zellkern eine kleine Einkerbung zu erkennen. Das Zytoplasma enthält zahlreiche Ribosomen und einige Mitochondrien. Selten können azurophile Granula gefunden werden, die sich meist in der Einkerbung des Kerns befinden (Brown, 1998). Ihr runder, chromatinreicher Kern enthält stark kondensiertes Chromatin, das die Nucleolen maskiert (Sinowatz und Hees, 2000). Die mittelgroßen Lymphozyten haben einen Durchmesser von 10 bis 18µm und einen größeren runden bis eingebuchteten Kern, in dem die gleiche Menge Chromatin auf einer größeren Fläche verteilt ist. Das Zytoplasmavolumen ist ebenfalls vergrößert, enthält die gleichen Zellorganellen wie die Kleinen und den exzentrisch gelegenen Zellkern (Liebich, 2004, Feldmann et al., 1986). Die großen Lymphozyten können einen Durchmesser bis zu 25µm erreichen (Liebich, 2004). Sie besitzen das größte Zytoplasmavolumen, den am wenigsten dichten Zellkern und die am

deutlichsten zu erkennenden Granula. Auch deren Golgi-Apparat, Mitochondrien, Nucleoli und Ribosomen sind zahlreicher angelegt als in den beiden anderen Lymphozytenarten (Brown, 1998). Bei der Ziege kommen am häufigsten die kleinen und mittelgroßen Lymphozyten vor. Ihre Granula sind von sehr unterschiedlicher Größe und Form, ihre Farbe ist violett bis blau (Feldmann et al., 1986). Die exakte Unterscheidung der Lymphozyten ist jedoch nur durch immunozytochemische Methoden möglich, mit denen die Oberflächenstrukturen der Zellmembran, vor allem die CD-Antigene bestimmt werden (Sinowatz und Hees, 2000). Somit ergeben sich zwei unterschiedliche Hauptzellpopulationen: T-Lymphozyten und B-Lymphozyten (Hees und Tschudi, 1990). Die T-Lymphozyten sind durch die Expression eines T-Zell-Rezeptors (TCR) definiert, der der Zelle eine einzigartige Antigen-spezifität verleiht. Für die Entstehung des zentralen Anteils eines TCR-Komplexes benutzen die meisten T-Zellen α - und β Ketten. Ein geringer Teil der T-Zellen formt $\gamma\delta$ TCRs. Außerdem exprimieren reife T-Lymphozyten mit CD4 oder CD8 spezifische Oberflächenmoleküle (Feldmann et al., 1986). CD4-T-Zellen wirken funktionell als T-Helferzellen, sie stimulieren die Differenzierung der B-Lymphozyten und erkennen MHC-Klasse-II-Antigene. Dagegen wirken CD8-T-Zellen zytotoxisch und werden daher auch T-Killerzellen genannt. Sie zerstören Zielzellen durch Lyse unter Abgabe von Zytokinen, lytischer Enzyme und Perforin. Des Weiteren übernehmen sie immunregulatorische Funktionen (Liebich, 2004). Die B-Lymphozyten werden über die Expression des auf der Zellmembran sitzenden Immunglobulins (surface membrane immunoglobulin SmIg) definiert, das transmembran mit den signalübertragenden Molekülen Immunglobulin α (Ig α) und Immunglobulin β (Ig β) verbunden ist. Dieser Komplex wird als B-Zell-Rezeptor (BCR) verstanden. Jede B-Zelle exprimieren eine BCR, die für die jeweilige Zelle spezifisch ist (Feldmann et al., 1986). Reife B-Zellen exprimieren IgM, IgG und IgD an ihrer Oberflächenmembran (Jain, 1993). Somit tragen die B-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren (Immunglobuline) für Antigene. Nach Kontamination mit Antikörpern bilden diese einen festen Antigen-Antikörper-Komplex, der durch Mikropinozytose in das Zellinnere geschleust wird. Über Transformation zu Plasmazellen differenziert sich eine solche Zelle zu langlebigen B-Gedächtniszellen (Liebich, 2004).

2.1.4.2. Aufgaben

Die Lymphozyten sind Träger immunologischer Abwehrfunktionen (Hees und Tschudi, 1990). T-Lymphozyten sind verantwortlich für die zellgebundene Immunantwort. Nach dem ersten Antigenkontakt an der Zelloberfläche wandeln sich T-Zellen in Gedächtniszellen oder Effektorzellen (Liebich, 2004). Sie regulieren entweder positive (unterstützende) oder negative (unterdrückende) Signale für andere Leukozyten oder haben zytotoxische Funktionen (Feldmann et al., 1986). Die T-Lymphozyten produzieren einige Faktoren, die Lymphokine genannt werden. Einer davon ist der „migration inhibitor factor“, der die Migration der Makrophagen unterbindet. Ein weiterer dieser Faktoren ist das Lymphotoxin, welches

vielfältige Zielzellen zerstören kann. Die übrigen Substanzen beeinflussen Abläufe wie die Chemotaxis der Makrophagen, die Transformation der Lymphozyten oder rufen Entzündungsreaktionen hervor (Brown, 1998). Die T-Zellen lassen sich funktionell in zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen, T-Unterdrückerzellen, T-Gedächtniszellen und T-Killerzellen unterteilen (Liebich, 2004). Außerdem übernehmen sie die Aufgabe fremdes Gewebe abzustößeln und spielen so bei Transplantationen eine Rolle (Kolb, 1991). Die T-Helfer- und T-Unterdrückerzellen sind für die Bildung der Antikörper verantwortlich und somit entscheidend an Autoimmunerkrankungen beteiligt. Für die zytotoxische Aktivität sind entweder die von Antigenen abhängigen zytotoxischen T-Zellen, oder die von Antikörpern abhängigen T-Killerzellen verantwortlich (Jain, 1993). B-Lymphozyten sind für die humorale Immunantwort verantwortlich. Diese wird bevorzugt durch Fremdproteine, Viren oder Toxine ausgelöst und führt zur Bildung von spezifischen Abwehrstoffen (Immunglobuline, Antikörper). Nach ihrer Transformation zu Plasmazellen, die mittels T-Helferzellen geschieht, sind sie in der Lage spezifische Immunglobuline zu synthetisieren. Außerdem können sie sich zu B-Gedächtniszellen weiterentwickeln und so bei erneutem Antigenkontakt bedeutend schneller reagieren (Liebich, 2004). Eine antigenabhängige Aktivierung der B-Zellen kann aber auch ohne T-Zell Beteiligung erfolgen. Polymere von hohem molekularem Gewicht binden dabei direkt an die Oberflächenrezeptoren der B-Lymphozyten und aktivieren diese. Die Transformation in Plasmazellen ist die Basis der humoralen Antikörperantwort. Initial erfolgt die Bildung der IgM Antikörper, doch im weiteren Verlauf einer Immunantwort, dominiert IgG (Jain, 1993).

2.1.5. Monozyten

2.1.5.1. Struktur

Die Monozyten haben einen Durchmesser von 15 bis 20µm und sind somit die größten aller Leukozyten. Im Blut der Ziege machen sie nur 2,5% der Leukozyten aus (Brown, 1998). Die Zellen kennzeichnen ein runder bis nierenförmig eingezogener Zellkern und ein breites, schwach basophiles Zytoplasma mit zahlreichen Mitochondrien und Golgi-Feldern. Neben einer geringen Anzahl an Ribosomen und einem schwach entwickelten eR ist das Auftreten von dichten, azurophilen Granula charakteristisch (Liebich, 2004). In den Granula lassen sich neben unspezifischen Esterasen besonders Oxidasen und Peroxidasen nachweisen. Der Zellkern liegt häufig exzentrisch und zeigt mitunter eine deutliche Lappung (Hees und Tschudi, 1990). In den Monozyten der Wiederkäuer finden sich häufig Vakuolen im Zytoplasma, die in ihrer Form sehr unterschiedlich sein können (Feldmann et al., 1986). Ihre Zelloberfläche weist unterschiedlich geformte Oberflächenorganellen auf, die als Pseudopodien, fingerförmige Ausstülpungen oder einzelne Mikrovilli morphologisch Ausdruck für die pinozytotische Aktivität dieser Leukozyten sind (Liebich, 2004). Sie bewegen sich in Richtung chemotaktischer Signale von Proteinen des

Zytoskeletts, wie Aktin und Myosin (Feldmann et al., 1986). Nach Verlassen des Knochenmarks zirkulieren Monozyten ein bis zwei Tage im peripheren Kreislauf und wandern dann in das Bindegewebe aus. Monozyten haben eine große Bewegungs- und Phagozytosefähigkeit (Hees und Tschudi, 1990). Im Bindegewebe differenzieren sie sich zu Makrophagen und können mehrere Monate, vielleicht Jahre aktiv bleiben. Monozyten können also als prospektive Makrophagen angesehen werden, die unter Einfluss spezifischer Milieubedingungen in andere Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) transformiert werden können (Sinowatz und Hees, 2000). Aus den Makrophagen wiederum können Histozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Fettzellen, glatte Muskelzellen, ja sogar Osteoblasten hervorgehen (Kolb, 1991). Makrophagen sind üblicher Weise größer als Monozyten, da ihr Zytoplasma ausgedehnter ist (Jain, 1993).

2.1.5.2. Aufgaben

Monozyten weisen ein breites Spektrum funktioneller Aktivitäten auf, sie sind wesentlicher zellulärer Bestandteil des mononukleären Phagozytensystems (MPS). Sie wandeln sich hierbei in Gewebemakrophagen um und erfüllen als solche eine Vielzahl organspezifischer Funktionen. So sind sie in lymphatischen Organen als Sinusendothelzellen, in der Leber als von-Kupffer-Sternzellen, in der Lunge als Alveolarmakrophagen, in Körperhöhlen als Peritonealmakrophagen oder im lockeren Bindegewebe als Histozyten oder als Osteoklasten entscheidend an der Körperabwehr beteiligt. Durch ihre Fähigkeit antigenes Material phagozytieren zu können sind Monozyten an unspezifischen Immunreaktionen beteiligt (Liebich, 2004). Sie zerstören pathogenes Material, welches von den neutrophilen Granulozyten nicht effektiv kontrolliert werden kann. Die Phagozytoseaktivität wird durch spezifische Oponine, wie IgG und unspezifische Oponine, wie C3b, C3bi und Fibronectin gewährleistet. Diese opsonierten Organismen werden von den Makrophagen über Oberflächenrezeptoren erkannt (Jain, 1993). Des Weiteren können Substanzen, wie bakterielle Peptide, Komplement Komponenten wie C3a und C5a, Leukotrien B₄, Kollagen- und Elastinfragmente oder Thrombin das mononukleäre Phagozytensystem aktivieren. Nachdem der Makrophage an eine Zielzelle gebunden ist, sezerniert er zytotoxische Moleküle wie TNF α und Proteasen um die Lyse der Zelle zu erreichen. Andere Faktoren wie der macrophage migration inhibitory factor (MIF), welcher von T-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten produziert wird, verhindern die Migration der Makrophagen. Wird eine neoplastische oder allergene Zelle erkannt, setzen Makrophagen zytostatische Substanzen wie Nitritoxid, Prostaglandine und Zytokine frei um so weitere Zellproliferation zu unterbinden (Feldmann et al., 1986). Somit ist Monozytose, ein Anstieg der Monozyten im Blut, der Ausdruck einer Abwehrreaktion (Kolb, 1991).

2.2. Erythrozyten

2.2.1. Struktur

Die Erythrozyten in ihrer reifen Form sind bei Säugetieren kernlose Zellen, da sie während ihres Reifungsprozesses im Knochenmark ihren Zellkern verlieren (Hees und Tschudi, 1990). Bevor die Erythrozyten in die Blutbahn gelangen, verlieren sie auch den Golgi-Apparat, die Zentriolen und die Mitochondrien (Brown, 1998). Der halbflüssige Zellinhalt ist homogen und feingranulär. Sein Hauptbestandteil bildet das eisenhaltige Hämoglobin, welches Sauerstoff reversibel binden kann und die rote Blutfarbe bedingt. Erythrozyten sind schon durch geringe äußere Kräfte erheblich verformbar, somit ist es ihnen möglich kapillare Gefäße zu passieren, die einen kleineren Durchmesser haben als sie selbst (Hees und Tschudi, 1990). Reife rote Blutkörperchen sind runde Zellen, die bei den meisten Tieren im Querschnitt eine bikonkave Scheibenform aufweisen. Diese Form erlaubt ein sehr großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis, was einen schnellen Gasaustausch durch die Erythrozytenmembran gewährleistet (Engelhardt, 2009). Einige Ziegenrassen, wie die Angora Ziege, haben jedoch nicht die übliche Scheibenform, sondern eine, durch die Polymerisation des Hämoglobins bedingte, Spindelform (Feldmann et al., 1986). Die Anzahl der Erythrozyten kann sehr stark variieren, bedingt durch Rasse-, Geschlechts- und Altersunterschiede. Weiterhin führen Muskelaktivität und reduzierter Sauerstoffdruck im arteriellen Blut in Höhenlagen zu einer Erhöhung der Anzahl der roten Blutkörperchen. Im Durchschnitt besitzt die Ziege 13×10^{12} Erythrozyten pro Liter Blut. Diese, im Vergleich zu anderen Säugetieren sehr große Zahl, ergibt sich aus dem Zusammenhang zwischen Größe und Anzahl der Erythrozyten. Tiere mit kleinen Erythrozyten besitzen eine größere Anzahl dieser Zellen und umgekehrt (Hees und Tschudi, 1990). Die kleinsten roten Blutkörperchen aller Säugetiere besitzt die Ziege, mit einem Durchmesser von $4,1 \mu\text{m}$. In adulten Ziegen findet sich häufig eine Anisozytose und eine extreme Poikilozytose. Außerdem können bei jungen Ziegen häufig tropfenförmige Erythrozyten beobachtet werden, welche als Dakryozyten bezeichnet werden. Somit können die Erythrozyten in ihrer Form und Größe stark variieren (Brown, 1998, Hees und Tschudi, 1990).

2.2.2. Aufgaben

Die Hauptaufgabe der Erythrozyten ist der Transport des Sauerstoffes, der an das Hämoglobin locker gebunden ist (Kraft, 2005). Den Sauerstofftransport in utero übernehmen spezielle Hämoglobintypen. Das embryonale Hämoglobin HbE wird während der pränatalen Entwicklung durch das fetale Hämoglobin HbF ersetzt. Eine Besonderheit bei Ziegen ist das Hämoglobin C (HbC), das bei der Geburt dem HbF folgt. Nach einigen Monaten entwickelt sich aus HbC das adulte Hämoglobin HbA (Feldmann et al., 1986).

2.3. Thrombozyten

2.3.1. Struktur

Thrombozyten werden im Knochenmark gebildet, wo aus der Reihe der myeloiden Stammzellen zunächst die Megakaryocyten heranreifen. Die reifen Megakaryocyten verlassen das Knochenmark und zerfallen während der Passage der Pulmonalarterien in Thrombozyten (Engelhardt, 2009). Ihre Lebensdauer beträgt bei Wiederkäuern zirka zehn Tage (Feldmann et al., 1986). Die Form der Blutplättchen ist rund bis oval und ihr Durchmesser 1,3 bis 4,7µm. Die Dicke der Thrombozyten beträgt etwa 0,5µm. Bei Säugetieren sind die Thrombozyten kernlos (Hees und Tschudi, 1990). Die Anzahl der Thrombozyten schwankt stark in einem Bereich von 378–656G/l (Lewis, 1976). In der lichtmikroskopischen Betrachtung sind zwei Zonen auszumachen. Die äußere Zone erscheint blass blau und schließt sich ringförmig an die Zellmembran an. Sie wird als Hyalomer bezeichnet. Der zentrale, dunkel violette Teil wird Chromomer oder Granulomer genannt und enthält Granula und die Zellorganellen (Hees und Tschudi, 1990). Mit dem Elektronenmikroskop sind drei verschiedene Zonen sichtbar. Die periphere Zone ist zusammengesetzt aus der Zellmembran und zirkulären Mikrofilamenten. Die Sol-Gel Zone enthält einen Komplex aus Mikrotubuli und Mikrofilamenten, die das Zytoskelett bilden, welches ein kontraktiles System darstellt. Das Zytoplasma dieser Zone ist homogen strukturiert. Die Organellen Zone enthält Granula und die Zellorganellen, wie Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen, einige Golgi Zisternen und „Dense bodies“. Diese „Dense bodies“ sind Speicher für sekretorische Produkte der Thrombozyten, wie zum Beispiel ADP, ATP, ATPase, Ca²⁺, Phosphorlipide, Serotonin, Glykoproteine und Catecholamine, die eine wichtige Rolle bei der Koagulation spielen (Brown, 1998). Des Weiteren befinden sich dort die sogenannten α-Granula, die Gerinnungsproteine (Fibrinogen, Fibronectin, und β-Thromboglobulin) enthalten (Sinowatz und Hees, 2000). Das Kanalsystem erstreckt sich ausgehend vom Chromomer durch die Sol-Gel Zone bis zur Zellmembran (Brown, 1998). Diese System „intrazellulärer Canaliculi“ (OCS: open canalicular system) dient der schnellen Freisetzung der endogenen Thrombozyten Produkte. Die Zellmembran ist außen von einer 20 bis 50nm dicken Schicht amorphen Materials bedeckt, die vor allem aus Glykoproteinen besteht und bei der Adhäsion und Aggregation von Bedeutung ist (Hees und Tschudi, 1990).

2.3.2. Aufgaben

Die Thrombozyten dienen der Blutgerinnung. Bei Verletzungen des Endothels stülpen sich Fortsätze (Pseudopodien) aus, haften an dem veränderten Bereich an und agglutinieren (Sinowatz und Hees, 2000). Diese Thrombozytenadhäsion wird durch den von-Willebrand-Faktor vermittelt (Engelhardt, 2009). Der Kontakt eines Thrombozyten mit Kollagen setzt die Gerinnungskaskade in Gang (Kolb, 1991). Nach der Thrombozytenadhäsion sezernieren die „Dense bodies“ und die Granula aus dem Chromomer ihre Produkte in das Kanalsystem der

Blutplättchen (Brown, 1998). Das sich im Gewebe befindende Calcium und andere Gerinnungsfaktoren mobilisieren das im Blut vorhandene Prothrombin zu Thrombin, welches mit dem aus dem Blutplasma stammenden Fibrinogen das Fibrin bildet. Fibrin bildet ein Maschenwerk und bewirkt eine Vernetzung des Thrombozytenaggregats (Kolb, 1991). Zusätzlich werden in das Fibringerinnsel auch Erythrozyten eingelagert (Engelhardt, 2009). Kollagen, ADP und Thrombin bewirken, dass sich weitere Thrombozyten anlagern (Kolb, 1991). Das Serotonin der Thrombozyten wirkt lokal vasokonstriktorisch und unterstützt die Aggregation der Blutplättchen (Sinowatz und Hees, 2000). Schließlich kommt es zu einer Retraktion des Gerinnsels, die durch eine Kontraktion der Mikrofilamente des Thrombozytenzytoskeletts ausgelöst wird. Diese Retraktion bewirkt eine weitere Stabilisierung, eine Annäherung der Gefäßwand und einen Stillstand der Blutung (Engelhardt, 2009).

3. Glykohistochemie

3.1. Definition des Begriffs „Lektin“

Der Begriff „Lektin“, der sich von dem lateinischen Wort „legere“ ableitet und übersetzt auswählen bedeutet, wurde das erste Mal von W. C. Boyd verwendet, als er 1954 pflanzliche Agglutinine beschrieb, die sich in seiner damaligen Sicht wie Antikörper verhielten (Boyd und Shapleigh, 1954). Einer Definition von I. J. Goldstein aus dem Jahre 1980 zufolge sind Lektine zuckerbindende Proteine oder Glykoproteine nichtimmunologischen Ursprungs, die Zellen agglutinieren und/oder Glykokonjugate präzipitieren (Goldstein et al., 1980). Einige Autoren bemängelten an dieser Definition die besondere Hervorhebung der agglutinierenden bzw. präzipitierenden Wirkung. Diese Eigenschaften sind in vivo offenbar nicht sehr wichtig, und auch für die Anwendung von Lektinen in vitro haben Agglutination und Präzipitation an Bedeutung verloren. Außerdem erschwert es diese Definition, zuckerbindende Proteine mit nur einer Bindungsstelle, sei es in Lösung oder auf Zelloberflächen, als Lektine zu verstehen. H. Franz betrachtet es daher als ausreichend, Lektine als zuckerbindende, von Antikörpern und Enzymen unterschiedene Proteine zu bezeichnen (Franz, 1990). Einige Leguminosen enthalten Proteine, die strukturell und evolutionär den Lektinen zuzuordnen sind, jedoch nicht die Fähigkeit besitzen, Kohlenhydrate binden zu können, wie zum Beispiel Phaseolus vulgaris Agglutinin. Diese Erkenntnisse führen dazu, dass eine Definition von Lektinen auf der Anwesenheit einer funktionellen Kohlenhydrat-Bindungsstelle basiert. Somit definiert sich laut van Damme et al. ein Lektin als ein pflanzliches Protein, das mindestens eine Bindungsstelle besitzt, die reversibel spezifische Mono- oder Oligosaccharide binden kann (VanDamme et al., 1998).

3.2. Geschichte der Lektine

Vor etwas mehr als 100 Jahren isolierte Hermann Stillmark im Laboratorium von Rudolf Kobert in Dorpat (heute Tartu) aus Samen von *Ricinus communis* ein Substanzgemisch, das er „Rizin“ nannte. Es gelang ihm nachzuweisen, dass es sich dabei um ein Protein handelte und dass Ricinlösungen Erythrozyten zu agglutinieren vermögen (Franz, 1990). Die Kenntnis der hämagglutinierenden Wirkung des Ricins, führte in den folgenden Jahren zur Entdeckung weiterer nichttoxischer „Phytohämagglutinine“. Letztlich wurde dadurch die Entdeckung der menschlichen ABO-Blutgruppen durch Landsteiner im Jahre 1901 vorbereitet (Franz, 1990). Im Jahre 1919 gelang es James B. Sumner an der Cornell University aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) ein kristallines Protein zu isolieren, welches er Concanavalin A nannte. Es dauerte jedoch fast 20 Jahre bis 1936 J.B. Sumner und S.F. Howell berichteten, dass Concanavalin A, Zellen wie Erythrozyten oder Hefen agglutinieren und Glykogen aus einer Lösung präzipitieren könnte. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass die Hämagglutination von Con A durch Saccharose inhibiert werden konnte und bewiesen so die Zuckerspezifität dieses Lektins

(Sharon und Lis, 2004). W.C. Boyd und K.O. Renkonen fanden in den vierziger Jahren des vorherigen Jahrhunderts pflanzliche Agglutinine, die spezifisch für die menschliche Blutgruppe A waren, und in den darauffolgenden Jahren konnte für jede andere Blutgruppe ein spezifisches Lektin isoliert werden. Die erste Definition der Lektine erfolgte 1954 von W.C. Boyd, der sie als pflanzliche Agglutinine, die sich wie Antikörper verhalten, bezeichnete. Im Jahre 1960 entdeckte P.C. Nowell, dass Lektine mitotisches Potential besitzen, also Lymphozyten zur Mitose stimulieren (Gabius, 2009). Etwa zur selben Zeit kam es zu der Beobachtung von J. Aub, dass WGA die Präferenz aufwies, maligne Zellen zu agglutinieren. Es folgte die Isolation weiterer pflanzlicher Lektine, die durch Affinitätschromatographie vereinfacht wurde, bis Mitte der siebziger Jahre vermehrt auch Lektine aus Säugetieren und Invertebraten isoliert wurden. Etwas später gelang es, von einem Lektin die Aminosäuresequenz zu entschlüsseln und ein dreidimensionales Bild des Lektins zu erstellen. Durch technische Neuerungen wie der Röntgenkristallographie wurde es möglich, die Struktur der Oberfläche genauer zu untersuchen und Sharon kam zu dem Schluss, dass Lektine Zuckermoleküle genauso unterschiedlich wahrnehmen, wie andere Proteine ihre Liganden (Sharon und Lis, 2004). Besonders viele agglutinierende Lektine finden sich unter den Leguminosen. Von den in neueren Zusammenfassungen aufgeführten knapp 50 Agglutininen stammen ca. 60% aus Leguminosen. Der Rest verteilt sich auf andere Pflanzen, Pilze, Bakterien und Tiere (Rüdiger, 1981).

3.3. Struktur der Lektine

Die Lektine lassen sich grob nach ihrer Spezifität in Gruppen unterteilen, abhängig von welchem Monosaccharid oder einfachen Oligosaccharid sich die Agglutination der Erythrozyten, oder die Präzipitation von kohlenhydrathaltigen Polymeren am besten inhibieren lässt (Goldstein et al., 1980). So ergibt sich die Einteilung in Mannose, Galaktose, N-Acetylglukosamine, N-Acetylgalaktosamine, L-Fruktose und N-Acetylneuraminsäure (Sharon und Lis, 1986). Nach Mäkelä lassen sich die Lektine, basierend auf ihre Konfiguration an dem C-3 und C-4-Atom ihres Pyranose Rings in vier weitere Gruppen unterteilen. Lektine die Mannose und Glukose binden gehören zur Gruppe III, Galaktose und N-Acetylglukosamin bindende zur Gruppe II und L-Fruktose bindende Lektine zu Gruppe I (Mäkelä, 1957). Bisher wurde noch kein Lektin isoliert, welches mit Mäkeläs Gruppe IV-Kohlenhydraten (Idose, Gulose, L-Glukose, L-Xylose) reagiert (Goldstein et al., 1986). In Bezug auf die hemmenden Zucker sind die meisten Lektine sehr spezifisch. Sie können nicht nur verschiedene Zucker voneinander unterscheiden, sondern oft auch α - und β -Anomere oder Oligosaccharide verschiedener Kettenlängen (Rüdiger, 1981). Lektine sind di-, tertra-, hexa- und oktamere Proteine, welche aus Polypeptiden mit 4 bis 50 kDa Molekulargewicht aufgebaut sind. Lektine der Leguminosen schwanken zwischen 40 bis 240 kDa, die meisten sind aber Dimere oder Tetramere mit weniger als 150 kDa (Hegnauer und Hegnauer, 1994). Basierend auf der Struktur ihrer Untereinheiten lassen sich Lektine der Leguminosen in Einketten- und Zweiketten-Lektine

unterteilen. Einketten-Lektine sind aus zwei oder vier Untereinheiten aufgebaut und besitzen ein Molekulargewicht von 25-30 kDa. Zweiketten-Lektine setzen sich aus zwei oder vier schweren Untereinheiten (β -Ketten) und einer gleichen Anzahl an leichten Untereinheiten (α -Ketten) zusammen. Diese leichten und schweren Untereinheiten sind proteolytische Spaltprodukte von Vorläufermolekülen mit ungefähr 30 kDa Molekulargewicht, die den Untereinheiten der Einketten-Lektine sehr ähnlich sind (VanDamme et al., 1998). Die zwei verschiedenen Ketten kombinieren sich paarweise zu tetrameren Molekülen (Rüdiger, 1981). Nach neuen Untersuchungen sollen Lektine aber entsprechend der Anzahl ihrer Protomere in dimerer und tetramerer Form unterteilt werden (Richter, 2003). Alle Lektine der Leguminosen enthalten divalente Kationen an ihren spezifischen metallbindenden Seiten. Jede Untereinheit besitzt Mn^{2+} und Ca^{2+} Ionen, die durch Zusammenwirken mit spezifischen Aminosäureresten fixiert und grundlegend für die Kohlenhydratbindung der Lektine sind (VanDamme et al., 1998). Sie können somit auch als Metalloproteine verstanden werden. Die meisten Lektine sind Glykoproteine, die arm an schwefelhaltigen Aminosäuren (Cystein, Methionin) sind (Hegnauer und Hegnauer, 1994). Die hydroxylgruppenhaltigen Aminosäuren Serin und Threonin sind dagegen überdurchschnittlich stark vertreten (Rüdiger, 1978). Kohlenhydrate sind jedoch nicht immer Bestandteil eines Lektins, ein zuckerfreies Lektin ist beispielsweise das Concanavalin-A (Hegnauer und Hegnauer, 1994). Es finden sich Lektine in Vertebraten, Invertebraten, Bakterien und Pflanzen (Sharon und Lis, 1986).

In der folgenden Tabelle sind ausgewählte Lektine bezüglich ihrer Zuckerspezifität zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht der Lektine

Zuckerspezifität	Herkunft	Abk
Glukose/Mannose bindende Lektine	<i>Canavalia ensiformis</i> → Schwertbohne <i>Lens culinaris</i> → Speiselinse <i>Pisum sativum</i> → Erbse	ConA LCA PSA
Galaktose bindende Lektine	<i>Arachis hypogea</i> → Erdnuss <i>Ricinus communis</i> → Rizinusbohne <i>Viscum album</i> → Mistel <i>Erythrina cristagalli</i> → Korallenstrauch	PNA RCA I + II VAA ECA
N-Acetylglukosamin bindende Lektine	<i>Griffonia simplicifolia</i> → afrik. Schwarzbohne <i>Datura stramonium</i> → Stechapfel <i>Triticum vulgare</i> → Weizen	GSL/GSA-II DSA WGA
N-Acetylgalaktosamin bindende Lektine	<i>Dolichos biflorus</i> → Afrik. Pferdebohne <i>Glycine max</i> → Sojabohne <i>Sophora japonica</i> → chin. Schnurbaum <i>Griffonia simplicifolia</i> → afrik. Schwarzbohne <i>Sambucus nigra</i> → schwarzer Holunder	DBA SBA SJA GSL/GSA-I SNA
L-Fukose bindende Lektine	<i>Lotus tetragonolobus</i> → rote Spargelerbse <i>Ulex europaeus</i> → Stechginster	LTA UEA-1
Oligosaccharid bindende Lektine	<i>Maackia amurensis</i> → asiatisches Gelbholz <i>Phaseolus vulgaris</i> → Gartenbohne	MAA PHA-E/L

3.4. Funktion der Lektine

Das auffälligste Merkmal der Lektine ist ihre Fähigkeit, Erythrozyten zu agglutinieren. Agglutinations-Hemmversuche mit Mono- und Oligosacchariden spielen bei der Aufklärung des chemischen Aufbaus der Blutgruppensubstanzen eine wichtige Rolle. Lektine, sogar schon als Samenrohextrakte, lassen sich daher zur Blutgruppenbestimmung verwenden (Rüdiger, 1978). Die meisten Proteine, die frei gelöst im Blutplasma zirkulieren, tragen beträchtliche Anteile an kovalent gebundenen Zuckerresten. Lektine sind daher wirkungsvolle Reagentien, um die Zuckeranteile von Biomolekülen zu charakterisieren und quantitativ zu erfassen. Es lassen sich mit ihrer Hilfe auch Glykoproteine, Membranfraktionen oder ganze Zellen an Hand ihrer Zuckeranteile präparativ trennen (Rüdiger, 1981). Lektine spielen auch im Immungeschehen eine wichtige Rolle. So ist der von Lymphozyten produzierte Makrophagen-Migrationshemmfaktor (MIF) ein L-Frucose spezifisches Lektin. Der Leukozyten-Inhibitionsfaktor (LIF) wird durch N-Acetylglukosamin gehemmt. Eine weitere wichtige Funktion der Lektine ist die Beteiligung an Phagozytose. Darunter wird die lektinvermittelte Bindung von mikrobiellen Krankheitserregern und von Tumorzellen an Phagozyten mit anschließender Phagozytose verstanden. Grundsätzlich kann das entweder durch phagozytäre Oberflächenlektine (Bindung an Zuckerstrukturen der Zielzelle), oder durch Zuckerstrukturen auf der Phagozytenoberfläche geschehen, die mit Lektinen der zu phagozytierenden Zelle reagieren. Auch das „Homing-Phänomen“, die Einwanderung von rezirkulierenden Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe, wird durch Lektine vermittelt, die sich auf dem Epithel der postkapillären Venolen befinden (Franz, 1990). Auf großes wissenschaftliches Interesse stieß in den letzten Jahren auch die Tatsache, dass bestimmte Lektine sich bevorzugt an Lymphozyten binden und dort die Mitose auslösen, andere den Proteinsynthese-Apparat von Eukaryonten hemmen und schließlich weitere Lektine maligne Zellen bevorzugt gegenüber normalen Zellen agglutinieren (Rüdiger, 1978). In Pflanzen erfüllen die Lektine zwei Hauptaufgaben. Zum einen sind sie Mediatoren der Symbiose zwischen Pflanze und Mikroorganismen, und zum anderen sind sie an der Abwehr von Pflanzen gegen phytopathogenen Einfluss beteiligt. Bakterielle Oberflächenlektine spielen eine wichtige Rolle bei dem Auslösen von Entzündungen, indem sie bei der Anheftung der Bakterien an Epithelzellen vermitteln (Sharon und Lis, 1986).

So verschieden diese Wirkungen sein mögen, so liegt ihnen als Primärereignis immer die Wechselwirkung zwischen Zelloberfläche und Lektin zugrunde (Rüdiger, 1978).

4. Zytoskelett

4.1.1. Definition und Anwendung

Eukaryotische Zellen haben viele verschiedene Formen und ein hohes Maß an innerer Organisation. Sie können ihre Form und die Position ihrer Organellen innerhalb der Zelle verändern, häufig sogar Bewegungen durchführen. Diese Funktionen werden durch ein komplexes Netzwerk von Proteinen im Zytoplasma ermöglicht, dem Zytoskelett (Buselmaier, 2007). Dieses Netzwerk von Filamenten und Mikrotubuli ist elektronenmikroskopisch gut zu erkennen und bildet einen interne Stütz- und Bewegungsapparat (Hartmann et al., 2010). Neben der Aufgabe, der Zelle Stabilität zu verleihen, besorgen die Elemente des Zytoskeletts auch wichtige intrazelluläre Transportaufgaben (Heinzeller und Büsing, 2001).

4.1.2. Zusammensetzung

Die drei wichtigsten Typen von Proteinstrukturen des Zytoskeletts sind die Mikrofilamente (Aktinfilamente), die Intermediärfilamente und die Mikrotubuli. Aktinfilamente und Mikrotubuli sind aus globulären Proteinuntereinheiten aufgebaut, die sehr schnell und kurzfristig polymerisieren können. Eine dritte Klasse von Proteinfilamenten, die intermediären Filamente, gibt es ebenfalls in den meisten tierischen Zellen. Sie bestehen aus fibrillären Proteinuntereinheiten und sind viel beständiger als die Aktinfilamente und Mikrotubuli (Buselmaier, 2007). Zusätzlich zu den drei Hauptproteinen enthält das Zytoskelett viele verschiedene zusätzliche Proteine. Sie verbinden entweder Filamente untereinander oder mit anderen Zellkomponenten wie der Plasmamembran oder beeinflussen die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Filamentpolymerisation (Buselmaier, 2007). Diese Begleitproteine sind für jedes Filamentsystem spezifisch (Lüllmann-Rauch, 2009). Mikrofilamente bestehen aus globulären Aktin-Monomeren (G-Aktin), die unter Verbrauch von ATP zu den 7nm dicken Aktinfilamenten (F-Aktin) polymerisieren können. Jedes Aktinfilament hat zwei ungleiche Enden, das (+)-Ende, an dem rasche Polymerisation aber auch ebenso schneller Zerfall stattfinden kann, und ein (-)-Ende, an dem diese Vorgänge langsamer ablaufen. Aktin Begleitproteine regeln den Umbau, den Zerfall, die Stabilität, die geometrische Anordnung und die Befestigung der Aktinfilamente (Lüllmann-Rauch, 2009). Wenn Aktinfilamente mit dem Begleitprotein Myosin assoziiert sind, können sie Kontraktionsvorgänge vermitteln. Sie können einzeln oder in Bündeln durch das gesamte Zytoplasma ziehen und finden sich bei den meisten Zellen als dichtes Netz unter der Zellmembran. Dort bilden sie den Zellkortex, der durch die rasche Umgestaltung der Aktinfilamente für aktive Formveränderungen von Zellen verantwortlich ist. Des Weiteren dienen Aktinfilamente der mechanischen Stützung von Zellfortsätzen, wie z.B. Mikrovilli und Stereozilien (Hartmann et al., 2010). Anders als die Aktinfilamente, die ein Netzwerk bilden, sind die Mikrotubuli zylinderartige Gebilde, die untereinander in der Regel nicht verbunden sind. Sie durchziehen die ganze Zelle und dienen

der Stabilität und dem Transport verschiedener zellulärer Bestandteile, zu Beispiel der Organellen (Horn, 2009). Mikrotubuli sind aus globulären Tubulinmolekülen aufgebaut. Diese Dimere bestehen aus zwei ähnlichen Molekülen, die als α - und β -Tubulin bezeichnet werden. Die Monomere lagern sich unter Bildung von Disulfidbrücken aneinander und bilden so kettenartige Protofilamente. Jeweils 13 dieser Protofilamente lagern sich parallel aneinander, wobei sie über Wasserstoffbrücken verbunden sind. Die Ketten sind immer um ein Monomer versetzt und bilden die Wand eines hohlen, röhrenförmigen Mikrotubulus. Dabei ist jedes Protofilament polar aufgebaut, α -Tubulin befindet sich am Minusende und β -Tubulin am Plus-Ende (Buselmaier, 2007). Die Mikrotubuli haben einen Durchmesser von 25nm. Entlang solcher Röhren werden Substanzen und Organellen transportiert, zum Beispiel sekretorische Bläschen von ihrem Entstehungsort zum Ort ihrer Freisetzung. Dazu treten Motorproteine mit dem Tubulin in Wechselwirkung. Bekannte Motorproteine sind Dynein und Kinesin, die an einem Mikrotubulus in entgegengesetzte Richtungen transportieren (Heinzeller und Büsing, 2001). Bei der Zellteilung sind die Mikrotubuli für den Chromosomentransport verantwortlich. Hierbei ist ihre Fähigkeit zur schnellen Polymerisation und Depolymerisation von entscheidender Bedeutung (Lüllmann-Rauch, 2009). Der Name der Intermediärfilamente leitet sich von ihrem Filamentdurchmesser von 10nm ab, der zwischen dem der Mikrotubuli und jenem der Mikrofilamente liegt. Die Intermediärfilamente sind aus fasrigen Polypeptiden aufgebaut und stellen die stabilste Komponente des Zytoskeletts dar. Sie sind zugfest, kommen häufig in Bündeln vor und sind an den mechanisch besonders beanspruchten Stellen des Zytoplasmas anzutreffen (Hartmann et al., 2010). Obwohl die Bestandteile der Intermediärfilamente sehr heterogen sind, kann man sie dennoch in vier verschiedene Klassen einteilen. Die drei im Zytoplasma vorkommenden Bestandteile sind zum einen die Keratin-Filamente, die typischerweise in Epithelzellen zu finden sind. Sie sorgen nicht nur für den Zusammenhalt einer einzelnen Zelle, sondern auch ganzer Gewebe, da sie an der Verankerung von Zellen an den Desmosomen und Hemidesmosomen beteiligt sind. Der zweite Bestandteil sind die Vimentin-Filamente, die in Zellen mesodermalen Ursprungs vorkommen und dort als Baustein für die Intermediärfilamente von Fibroblasten, Endothelzellen und Leukozyten dienen. In diese Gruppe gehören auch Vimentin-artige Proteine, die in speziellen Geweben anzutreffen sind, wie zu Beispiel Desmin-Filamente in der Muskelzelle oder Glia-Filamente in den Astrozyten. Der dritte Bestandteil dieser Gruppe sind die Neurofilamente, die sich in verschiedenen Nervenzellen, vor allem in Axonen finden. Die vierte Klasse der Intermediärfilamente sind die Lamine in der Kernlamina. Diese befindet sich innen an der Kernmembran und bildet ein Geflecht aus Intermediärfilamenten, an dem die Chromosomen angeheftet sind (Horn, 2009).

4.1.3. Technik

Neben den Nachweismethoden der direkten und indirekten Immunozytochemie können, ähnlich

wie Antikörper auch eine Reihe von Proteinen zur Lokalisation von Zellkomponenten eingesetzt werden. Voraussetzung ist, dass die verwendeten Moleküle mit hoher Affinität und Spezifität an die nachzuweisenden Strukturen binden. Im Falle des Zytoskeletts bindet Phalloidin spezifisch an Aktin. Gekoppelt an ein Fluorochrom kann es direkt zur Lokalisation von F-Aktin verwendet werden (Romeis, 2010).

4.1.4. Zytoskelett der Erythrozyten

Die Erythrozyten besitzen ungewöhnliche biophysikalische Eigenschaften, wie sehr hohe Flexibilität und Elastizität bei gleichzeitiger Rigidität, mit denen sie den hohen Scherbelastungen während der Zirkulation im Gefäßsystem widerstehen können (Jöns, 2001). Dies ist nur durch eine Kombination aus einer weichen Zellmembran und einem relativ starren kortikalen Zytoskelett möglich (Gov und Safran, 2005). Dieses Zytoskelett stellt ein dreidimensionales Netzwerk von elastischen Proteinen dar und ist mit der inneren Oberfläche der Zellmembran verbunden (Gov, 2007). Die Hauptkomponente dieses Netzwerkes sind die fadenförmigen Spektrinmoleküle, die untereinander durch Ankyrin und weitere Verbindungsproteine verknüpft sind (Klinke et al., 2005). Heterodimere aus α - und β -Spektrinketten bilden Tetramere, die an anderen Spektrin-Tetramere binden und so dieses komplizierte Netzwerk entstehen lassen, das mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran über die β -Kette an Ankyrin und das Transmembranprotein 3 verbunden ist (Bain und D., 1997). Neben dem Spektrin stellt Aktin einen weiteren wichtigen Bestandteil des Zytoskeletts der Erythrozyten dar (Püschel et al., 2011). Durchschnittlich sechs Spektrin-Filamente enden in einem zentral gelegenen Aktin-Knoten und bilden so eine Art Netz. Diese Verbindungen durch die Aktin-Knoten bestimmt die Gesamtstruktur des Netzwerkes und ist somit für die physikalischen Eigenschaften der Erythrozyten verantwortlich (Gov, 2007). Es ist bekannt, dass die Membran der Erythrozyten Kinase und Phosphatase besitzt und so fähig ist, mittels Phosphorylierung das Verhalten von Spektrin und anderer Verbindungsproteine zu steuern (Zhang und Brown, 2008). Das Maß der Elastizität der Erythrozyten, wird somit durch Adenosintriphosphat (ATP) gesteuert. Die Form der roten Blutkörperchen wird also durch die mechanischen Eigenschaften des Zytoskeletts und durch die Aktivität von ATP festgelegt (Gov und Safran, 2005).

4.1.5. Zytoskelett der Thrombozyten

Thrombozyten zirkulieren in Form von kleinen, diskoiden Scheiben im Blut. Diese Form wird durch das Zytoskelett und durch einen Ring von Mikrotubuli am Äquator der Thrombozyten aufrechterhalten. Mit der Aktivierung der Blutplättchen wird das Zytoskelett reorganisiert. Die Thrombozyten zentralisieren ihre Organellen und breiten ihr Zytoplasma aus, um somit eine möglichst große Oberfläche abzudecken. In diesem Prozess werden ihre Granula ausgeschüttet, indem sie mit der äußeren Zellmembran verschmelzen und ihre Inhaltsstoffe freigeben (Kiefel,

2010). Die drei wesentlichen zytoskeletalen Komponenten sind submembranäres Spektrin, Filamin-A-verbundene Aktinfilamente und Mikrotubuli. Die Spektrinmoleküle binden direkt an die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran und sind über Adducin an Aktinfilamente gebunden, die als rigides, lockeres Netzwerk das Zytoplasma durchziehen. Ein marginal verlaufender, spiralg aufgerollter einziger Mikrotubulus bildet die dritte formgebende Komponente der Thrombozyten (Pötzsch und Madlener, 2010). Elektronenmikroskopisch kann man die Verbindung der Mikrotubuli mit der Zellmembran erkennen (Steiner, 1983). Neben dem einzelnen Mikrotubulus, auch marginales Mikrotubulusbündel genannt, stellt Aktin, das 11% des Gesamtproteinanteils der Thrombozyten ausmacht und Myosin einen wesentlichen Anteil des Zytoskeletts dar (Junqueira et al., 2003, Zilles und Tillmann, 2010). In den Thrombozyten von Mensch und Schwein konnte das Protein Tubulin gefunden werden (Steiner, 1983, Castle und Crawford, 1975). In Blutplättchen und Megakaryozyten dominiert das β -Tubulin mit seiner Isoform $\beta 1$ und übernimmt Funktionen in der Synthese und Struktur der Thrombozyten. Es ist in den Prothrombozyten und bei reifen Zellen im marginalen Mikrotubulusbündel lokalisiert (Schwer et al., 2001). Ein weiterer Bestandteil des Zytoskeletts sind Mikrofilamente, deren Durchmesser geringer als der der Mikrotubuli ist und die Komponenten eines aktomyosin-ähnlichen kontraktiven Komplexes sind (Castle und Crawford, 1975). Nach der Aktivierung der Thrombozyten durch Strukturen des Subendothels oder löslichen Faktoren aus Endothel- oder Bindegewebszellen, formiert sich in den Thrombozyten ein kontraktiles Gel aus zytoplasmatischen Aktin- und Myosinmolekülen, die im Ruhezustand weitgehend nichtpolymerisiert vorliegen. Die Konstriktion dieses Gels bewirkt die zentrale Zusammenlagerung der Zellorganellen und unterstützt so enge Membrankontakte zwischen den sekretorischen α -Granula und Serotonin granula (Pötzsch und Madlener, 2010). Bedingt durch die Aktivierung der Blutplättchen und der Ausschüttung der Granula verschwindet das Mikrotubulusbündel und die Thrombozyten verlieren ihre diskoide Form (Little et al., 1987). Man nimmt an, dass sich die Mikrotubuli nach der Aktivierung in den Pseudopodien der gesamten Länge nach ausbreiten (Castle und Crawford, 1975).

4.1.6. Zytoskelett der Leukozyten

Die charakteristischen funktionellen Eigenschaften der Leukozyten sind Lokomotion, Adhäsion, Phagozytose und Degranulation. Alle diese Funktionen sind von dem Remodellierungs-Prozeß zwischen dem monomeren globulären Aktin (G) und dem polymeren fibrillären Aktin (F) abhängig (Egger et al., 2001). In einem inaktiven Leukozyt sind etwa 30 bis 50% des Aktins in der polymeren F-Form vorhanden und nur 50% des Tubulins zu Mikrotubuli aufgebaut. Bei einer chemotaktischen Aktivierung vergrößert sich der polymere Anteil in der migrierenden Zelle zu Lasten des niedermolekularen Anteils. Der Aktinumbau ist die Grundlage der amöboiden Fortbewegung des aktivierten Leukozyten. Polymere F-Aktin-Filamente verlängern sich an der Vorderkante des Lamellopodiums durch Anbau oligomerer G-Aktin-Moleküle,

während an der Gegenseite des Aktinfadens Oligomere abgekoppelt werden, so dass das Aktingerüst bei etwa gleichbleibender Ausdehnung in der Bewegungsrichtung der Zelle wandert (treadmilling) (Egger, 2005). Somit bewegen sich die Leukozyten zielgerichtet entlang dem Konzentrationsgradienten der chemokinen Substanzen, da sich das Aktin in Richtung des ansteigenden Gradienten polymerisiert (Sedlacek, 2009). Diese Aktinpolymerisation, also die An- und Ablagerung von G-Aktin am F-Aktin, ist nicht nur die Voraussetzung der Zellbewegung während der Chemotaxis, sondern auch für den Transport intrazellulärer Proteine (Saloga et al., 2006). Durch die Verbindung des Zytoskeletts mit Ionenkanälen und Ionenpumpen trägt es wesentlich zur Volumenregulation der Leukozyten bei. Komponenten von Mikrotubuli und Mikrofilamenten sind bei der Kontrolle des Ionentransportes und bei der Regulation des Zellvolumens beteiligt (Downey et al., 1995). Der Polymerisationsgrad des Aktins im Zytoskelett bestimmt die Viskosität von Zellbezirken und darüber hinaus der gesamten Zelle und ist auch verantwortlich für die Rigidität der Zelle (Egger, 2005, Egger et al., 2001). Des Weiteren ist die Widerstandsfähigkeit der Leukozyten im peripheren Blutkreislauf von Vimentin-Filamenten abhängig (Brown et al., 2001). Bei der Degranulation muss das kortikale Aktin depolymerisiert werden, damit die Granulamembran in Kontakt mit der Zellmembran treten kann (Egger, 2005). Die Mikrotubuli werden vermutlich für die Sekretion von Enzymen benötigt, da sich Granula aus dem Zellzentrum an den Mikrotubuli in die Peripherie der Zelle bewegen können (Ryder et al., 1982). Außerdem sind Mikrotubuli für die Orientierung der Zelle während der Chemotaxis verantwortlich. Im aktivierten Leukozyt nimmt die Dichte der Mikrotubuli im Bereich der Pseudopodien und der phagozytierenden Vakuole zu (Ryder et al., 1982).

5. Blutgruppen der Ziege

Die Bestimmung der Blutgruppen der Ziege hat eine lange Geschichte. Bereits 1900 wurden von Ehrlich und Morgenroth Ziegen mit ihrem eigenen und mit dem Blut anderer Ziegen immunisiert, um neue Erkenntnisse über die Hämolyse und Autoimmunerkrankungen zu gewinnen. Sie erforschten vier verschiedene Blutgruppen A, B, C und D und bestimmten so zum ersten Mal Blutgruppen bei Tieren. Heute ist das Blutgruppensystem der Ziegen weit weniger erforscht als das anderer Tiere. Nguyen beschrieb 1990 sechs verschiedene Blutgruppen: A, B, C, E, F, und R mit deren Blutgruppenfaktoren, die in folgender Tabelle zusammengefasst sind (Schmid et al., 2003).

Tabelle 3: Blutgruppensystem Ziege

BLUTGRUPPENSYSTEM	BLUTGRUPPENFAKTOREN
A	A1, a1
B	B2, B3, B4, B5, B7, B8, B9, B10, B11, B14, B15, B16, B17, B20
C	C12, not-C12
E	E6, E18
F	F19, f19
R	R, r

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von insgesamt 37 Ziegen aus der Vena Jugularis Blutproben entnommen. Das Blut wurde in EDTA Röhrchen aufbewahrt. Die Ziegen waren unterschiedlichen Alters und Rasse. Von jeder Probe wurden 30 Blutausstriche auf SuperFrost® Objektträgern erstellt, die dann je nach ultrastruktureller, immunhistochemischer oder glykohistochemischer Untersuchungsmethode weiterbearbeitet wurden. Das Blut von 3 Ziegen wurde elektronenmikroskopisch untersucht.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht des Untersuchungsmaterials.

Tabelle 4: Untersuchte Ziegen

Nr.	Name	Geschlecht	Alter(in Jahren)
1	Paul	M	2
2	Clara	W	1,5
3	Gais	W	12
4	Wastl	M	6
5	Nina	W	2
6	Haide	W	4
7	Johanna	W	10
8	Pauline	W	2,5
9	Julla	W	1,5
10	Viki	W	1,5
11	Ini	W	3
12	Julia	W	1
13	Hannal	W	1,5
14	Theresa	W	1
15	Sonja	W	1,5
16	Maria	W	2
17	Andrea	W	3

III. Material und Methoden

18	Heidi	W	4
19	Fritzi	M	4
20	Gabi	W	2
21	Burli	M	0,5
22	Martina	W	4
23	Xaver	M	3
24	Josef	M	5
25	Josefa	W	4
26	Gudrun	W	2
27	Heinz	M	3
28	Willy	M	6
29	Maxl	M	2
30	Hilde	W	3
31	Dagmar	W	3
32	Jenny	W	1,5
33	Michaela	W	4
34	Nina	W	1
35	Ulli	W	7
36	Niki	W	2
37	Eva	W	2

2. Lichtmikroskopie

Die Blutausstriche wurden zur histologischen Untersuchung mit sieben verschiedenen lichtmikroskopischen Methoden gefärbt und anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Die Färbungen wurden nach den Protokollen von Romeis (1989) angefertigt.

2.1. Diff-Quick-Färbung

Diese Färbung wird mit einem fertigen Reagenziensatz durchgeführt (Labor + Technik, Berlin). Hierbei färben sich Zellkerne dunkelblau, die Granula der neutrophilen Granulozyten hell rosa, die der basophilen dunkellila bis schwarz und die der eosinophilen orange bis rot. Thrombozyten erscheinen violett. Der Kern der Monozyten färbt sich violett, das Zytoplasma hellblau.

Die Schnellfärbemethode wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 10 Min in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren
- b) 2 Sekunden in Eosin-Lösung
- c) 2 Sekunden in Hämalaun-Lösung
- d) Waschen mit Aqua dest.
- e) Lufttrocknen
- f) Eindeckeln mit Eukitt

2.2. Giemsa-Färbung

Der fertige Reagenziensatz (Merck, Darmstadt) enthält Eosin, Methylenblau, Methylenazur und Methylviolett. Methanol und Glycerin werden als Lösungsmittel verwendet. Für die Färbung muss die Giemsa-Lösung verdünnt werden. In ein mit Aqua dest. gefülltes Becherglas werden 0,3 ml der Lösung gegeben. Bei der Giemsa-Färbung tingieren sich Zellkerne rot-violett, die Granula der neutrophilen Granulozyten rot-violett, die der basophilen blau und die der eosinophilen rot-braun. Thrombozyten erscheinen blau mit violetterm Innenkörper. Das Zytoplasma der Lymphozyten und der Monozyten färbt sich blau und enthält zum Teil feine purpur-rote Azurkörnchen. Die Erythrozyten stellen sich blass rot dar.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 10 Min in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren und Lufttrocknen
- b) Mit verdünnter Giemsa-Lösung (1:20 Verhältnis) 40 Min Objektträger färben
- c) Waschen mit Aqua dest.
- d) Lufttrocknen
- e) Eindeckeln mit Eukitt®

2.3. May-Grünwald-Färbung

Die verwendete Färbelösung setzt sich aus Eosin und Methylenblau zusammen, die in Methanol gelöst werden. Es entsteht eosinsaures Methylenblau. Bei der May-Grünwald-Färbung färben sich Zellkerne blau-violett, die Granula der neutrophilen Granulozyten hell-violett, die der basophilen blau-violett und die der eosinophilen ziegelrot. Thrombozyten erscheinen violett. Das Zytoplasma der Lymphozyten und der Monozyten färbt sich blau. Die Erythrozyten stellen sich rot dar.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 30 Min in Methanol fixieren und Lufttrocknen
- b) Objektträger 3-5 Min mit unverdünnter Färbelösung (Merck, Darmstadt) bedecken
- c) Gleiche Menge Aqua dest. zur Verdünnung auftragen und 10 Min färben. Dies ist die eigentliche Färbung.
- d) Waschen mit Aqua dest.
- e) Lufttrocknen
- f) Eindeckeln mit Eukitt®

2.4. Panoptische Färbung nach Pappenheim

Die panoptische Färbung nach Pappenheim ist eine Kombination aus Giemsa- und May-Grünwald-Färbung. Hierbei färben sich Zellkerne rot-violett, die Granula der neutrophilen Granulozyten rot-braun, die der basophilen violett und die der eosinophilen ziegelrot. Thrombozyten erscheinen blau mit zarten roten Granula. Das Zytoplasma der Lymphozyten und der Monozyten färbt sich blau. Die Erythrozyten stellen sich rosa dar.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger unfixiert 3 Min mit May-Grünwald-Lösung färben
- b) Mit Aqua dest. 1 Min verdünnen
- c) Abgießen der Färbelösung
- d) Mit verdünnter (siehe 2.2.) Giemsa-Lösung 20 Min färben
- e) Waschen mit Aqua dest.
- f) Lufttrocknen
- g) Eindeckeln mit Eukitt®

2.5. PAS-Färbung

Mit der PAS (periodic-acid-Schiff) Reaktion erbringt man den Nachweis von Glykogen, sauren und neutralen Mucopolysacchariden, Mucoproteiden, Glukoproteiden und Lipopolysacchariden im Blut. Für die Färbung wird SO₂-Wasser benötigt, das man wie folgt anfertigt: 600ml Leitungswasser + 100ml Aqua dest. + 3g Natriumdisulfat + 3ml konzentrierte Salzsäure. Außerdem verwendet man Perjodsäurelösung in folgender Zusammensetzung: 200ml 0,5%ige Perjodsäurelösung + 1g Perjodsäurepulver + 200ml Aqua dest. In der Granulozytopenese steigt die Intensität der Reaktion von Promyelozyt bis zu neutrophilem Granulozyt an. Die Granula der neutrophilen Granulozyten zeigen eine starke Reaktion. Die eosinophilen Granulozyten zeigen höchstens im Bereich der zytoplasmatischen Grundsubstanz eine positive Reaktion.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 10 Min in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren und Lufttrocknen
- b) 5 Min in wässrige Perjodsäurelösung
- c) Waschen mit Aqua dest.
- d) 15 Min in Schiff'sches Reagenz (Merck, Darmstadt)
- e) Waschen in SO₂-Wasser in drei Küvetten
- f) 3 Min mit fließendem Wasser waschen
- g) 3-5 Min Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer
- h) 5 Min mit fließendem Wasser waschen
- i) Lufttrocknen
- j) Eindeckeln mit Eukitt

2.6. Toluidinblau-Färbung

Die Toluidinblau-Färbung nach Undritz stellt basophile Granulozyten sowohl im Gewebe als auch im Blut dar. In Folge des starken metachromatischen Effektes der im Heparin veresterten anorganischen Schwefelsäuren ist die Granulation beider Arten rotviolett (Freund und Heckner, 2001).

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 3-5 Min mit Färbelösung (1g Toluidin + 100ml Methanol) beträufeln
- b) Waschen mit Aqua dest.
- c) Lufttrocknen
- d) Eindeckeln mit Eukitt

2.7. Alcianblau-Färbung

Alcianblau ist ein wasserlöslicher Phthalocyaninfarbstoff. Die Färbung wird mit zwei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Hierbei färben sich bei pH-Wert 1 Zellkerne durch Gegenfärbung mit Kernechtrot rosa und sulfatierte Mukosubstanzen blau. Bei pH-Wert 2,5 färben sich die Zellkerne ebenfalls rosa und saure Mukosubstanzen blau.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 10 Min in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren und Lufttrocknen
- b) 5 Min in Alcianblau-Lösung
 - i. pH 1: 5g Alcianblau 8 GX Certistain® (Merck, Darmstadt) + 500ml 0,1 N Salzsäure (Merck, Darmstadt)
 - ii. pH 2,5: 5g Alcianblau 8 GX Certistain® (Merck, Darmstadt) + 500ml 3%ige Essigsäure
- c) 3 Min mit fließendem Wasser waschen
- d) 10 Sek waschen mit Aqua dest.
- e) 10 Min in Kernecht-Lösung
- f) 3 Min mit fließendem Wasser waschen
- g) 10 Sek waschen mit Aqua dest.
- h) Lufttrocknen
- i) Eindeckeln mit Eukitt

3. Elektronenmikroskopie

Das EDTA-Blut von 3 Ziegen wurde nach folgendem Protokoll zur elektronenmikroskopischen Untersuchung vorbereitet:

- a) 15 Minuten bei 2000 U/min zentrifugieren
- b) Abpipettieren des überstehenden Plasmas
- c) Fixieren der Probe mit dem gleichen Volumen an Karnovsky-Fixierungslösung
- d) 1 Stunde Fixierung der Probe bei 4°C
- e) Das so entstandene Zellpellet mit 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,7) spülen, um noch anhaftendes Blut zu entfernen
- f) Zellpellet wird über Nacht noch einmal in Karnovsky-Lösung eingebracht
- g) Zellpellet wird in Blöcke von je 1 mm Seitenlänge geschnitten
- h) Mit Natrium-Cacodylat-Puffer (pH 7,2) dreimal waschen
- i) Mit 1%igem Osmiumtetroxid und 1,5%igem Kaliumferrozyanid für 2 Stunden bei 4°C kontrastieren
- j) Nochmals mit Natrium-Cacodylat-Puffer dreimal je 20 Min waschen
- k) Fixierung der Proben
- l) Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 90% je 30 Minuten, 30 Minuten absolutes Ethanol)
- m) Schrittweise Einbettung in Epon (Propylenoxid (Merck, Darmstadt) zweimal je 15 Minuten, Propylenoxid-Epon-Gemisch 2:1 eine Stunde, Propylenoxid-Epon-Gemisch 1:1 über Nacht, reines Epon eine Stunde)
- n) Anschließend werden die Blöcke in Gelatine kapseln (Plannet, Wetzlar) für 24 Stunden bei 60°C polymerisiert
- o) Mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) werden 1 µm dicke Semidünnschnitte für die erste Übersicht geschnitten und nach Richardson gefärbt
- p) Ultradünnschnitte (60 nm) von ausgewählten Blöcken anfertigen
- q) Diese werden dann auf Kupfer-Grids (200 Mesh) aufgezogen und mit gesättigtem Uranylacetat und einer Bleicitrat-Lösung nach Reynolds (1963) nachkontrastiert.

4. Glykohistochemie

Für die Untersuchung der Proben bezüglich ihrer Kohlenhydratanteile wurden 14 Lektine verwendet, die an den Farbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelt sind und 3 biotinylierte Lektine. Nach dem Färbeprotokoll wurden die Blutausstriche mit einem DAPI enthaltenden Eindeckelmedium eingeschlossen, um so die Zellkerne bei der Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennen zu können.

4.1. FITC-markierte Lektine

Um die Bindungsfähigkeit der Proben zu untersuchen, wurden 14 verschiedene FITC gekoppelte Lektine verwendet.

In der folgenden Tabelle sind die Lektine mit ihrer Zuckerspezifität und Herkunft aufgeführt:

III. Material und Methoden

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten FITC-markierten Pflanzenlektine modifiziert nach (Rüdiger und Gabius, 2009) (Gabius et al., 2011) (Habermann und Sinowatz, 2011))

Name	Abk.	Herkunft	Zucker-spezifität	Potente Oligosaccharide
Concanavalin Agglutinin	ConA	<i>Canavalin ensiformis</i> (Schwertbohne)	Glc, Man	GlcNAc β 2Man α 6(GlcNAc β 2Man α 3)Man β 4GlcNAc
Lens culinaris Agglutinin	LCA	<i>Lens culinaris</i> (Speiselinse)	Glc, Man	N-Glykan-Bindung durch Core-Fucosylierung verstärkt
Pisum sativum Agglutinin	PSA	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)	Glc, Man	Bindung an N-Glykane durch Core-Fucosylierung verstärkt
Peanut Agglutinin	PNA	<i>Arachis hypogea</i> (Erdnuss)	Gal	Gal β 3GalNAc α / β
Ricinus communis Agglutinin	RCA	<i>Ricinus communis</i> (Kastorbohne)	Gal	Gal β 4GlcNAc β 1R
Wheat germ Agglutinin	WGA	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	GlcNAc/ NeuNAc	(GlcNAc β 4) _n , (Man β 4)GlcNAc β 4GlcNAc(1,N-Asn) Geclusterte sialysierte Tn/Tn-Antigene in Muzinen; O-GlcNAcylierung von Proteinen
Wheat germ Agglutinin succinyliert	WGAs	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)	(GlcNAc) ₂ , NeuNAc	a
Griffonia simplicifolia Agglutinin	GSL-1	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afr. Schwarzbohne)	GalNAc	GalNAc α 3Gal; GalNAc α 3GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc
Dolichos biflorus Agglutinin	DBA	<i>Dolichos biflorus</i> (Afr. Pferdebohne)	GalNAc	GalNAc α 3GalNAc α 3Gal β 4Gal β 4Glc > A- Tetrasaccharide
Saphora japonica Agglutinin	SJA	<i>Saphora japonica</i> (Chin. Schnurbaum)	GalNAc	GalNAc β 6Gal; Gal β GalNAc
Soybean Agglutinin	SBA	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	Gal; GalNAc	GalNAc α 3Gal(β 6Glc), Sialidase-vorbehandelte submaxillare Muzine
Ulex europaeus Agglutinin	UEA-1	<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)	Fuc	Fuca2Gal β 4GlcNAc β 6R
Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro	PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	b	Mit β 1 \rightarrow 4 Bindung an zentrale Mannose von komplexen N-Glykanen verknüpfte GlucNAc; Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6(GlcNAc β 2-Man α 3)(GlcNAc β 4)Man β 4GlcNAc
Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuco	PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)	b	„Tetraantennary“ und „triantennary“ N-Glykane mit β 6-Verzweigung

Glc=Glukose; Man=Mannose; Gal=Galaktose; GlcNAc=N-Acetyl-Glukosamin; NeuNAc=N-Acetyl-Neuraminsäure; GalNAc=N-Acetyl-Galaktosamin; Fuc=Fukose.

^a = Succinylierung von WGA (WGAs) reduziert die Sensitivität der Bindung an Neuraminidase in Zellen (Monsigny et al., 1979)

^b = Keine Spezifität für Monosaccharide bekannt.

Durch das Abdichten der Küvetten und Feuchtkammern mit Alufolie wird verhindert, dass das lichtempfindliche FITC exzessiver Lichteinwirkung ausgesetzt ist. Um die Zellkerne der Blutzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennbar zu machen, wurde am Ende der

III. Material und Methoden

Färbereihe die Kernfärbung mit DAPI (4'-6-Diamidin-2'-Phenylindoldihydrochlorid) (ROCHE, Hamburg) vorgenommen. Bis zur Auswertung wurden die Proben lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt. Als Positivkontrolle wird bei jeder Färbung ein Blutausschlag eines adulten Rindes und eines Pferdes mitgefärbt.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 10 Min in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren
- b) 3x5Min in PBS Puffer (pH 7,4 – 7,6)
- c) 10 Min bedecken des Objektträger mit Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg) in Feuchtkammer
- d) Abtropfen

Ab hier ist Lichteinwirkung zu vermeiden!

- e) Mit 100µl der Lektinlösung bedecken
- f) 60Min in Feuchtkammer inkubieren
- g) 3x5Min in PBS Puffer (pH 7,4 – 7,6)
- h) Eindeckeln mit DAPI

4.2. Biotinylierte Lektine

Der Nachweis von verschiedenen Zuckern wurde mit biotinylierten Lektinen mittels der Streptavidin-Biotin-Methode erbracht. Das Protein Streptavidin stammt von Streptomyces avidinii und hat eine hohe Bindungsaffinität zu dem Vitamin Biotin. Das an Biotin gekoppelte Lektin bindet bei diesem Nachweis an seine spezifische Kohlenhydratstruktur. Auch der Fluoreszenzfarbstoff FITC ist an Biotin gekoppelt und bildet mit Streptavidin einen Komplex. Wird das Lektin mit der Streptavidin-FITC-Lösung bedeckt, bindet das Streptavidin mit hoher Affinität an Biotin und die Bindungsstelle wird durch FITC im Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

III. Material und Methoden

In folgender Tabelle sind die verwendeten Lektine mit ihren Eigenschaften aufgeführt:

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten biotinylierten Lektine, modifiziert nach Gabius und Habermann (Gabius et al., 2011) (Habermann und Sinowatz, 2011)

Name	Abk	Herkunft	Zuckerspezifität	Potente Oligosaccharide
Maackia amurensis Agglutinin I (Leukoagglutinin)	MAA-I	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)	a	Neu5Ac/Glc α 3Gal β 4GlcNAc/Glc ^b 3'-Sulfatierung wird toleriert Core-reaktiv bei 3-sulfatiertem LacNAc
Sambucus nigra Agglutinin	SNA	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)	Gal, GalNAc	Neu5Ac α 6Gal/GalNAc ^c , clustered T _n -Antigen, 9'-O-Acetylierung wird toleriert
Viscum album Agglutinin	VAA	<i>Viscum album</i> (Mistel)	Gal	Gal β 2(3); Gal α 3(4)Gal; Fuca2Gal; Gal β 3(4)GlcNAc ohne/mit α 2,6-Sialisierung

^a = Keine Spezifität für Monosaccharide bekannt

^b = Bindungsspezifität für Typ II LacNAc Core

^c = Bindung von Typ I LacNAc Core bevorzugt; 6-Sulfatierung von GlcNAc in α 2,6-sialysierten LacNAc steigert die Affinität

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 10 Min in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren
- b) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)
- c) 10 Min bedecken des Objektträger mit Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg) in Feuchtkammer
- d) Abtropfen

Ab hier muss unnötige Lichteinwirkung vermieden werden!

- e) Mit 100 μ l der Lektinlösung bedecken
- f) 60 Min in Feuchtkammer inkubieren
- g) Mit 300 μ l der Streptavidin-FITC-Lösung bedecken
- h) 30 Min in Feuchtkammer inkubieren
- i) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)
- j) Eindeckeln mit DAPI

4.3. Hemmzucker

Um zu testen, ob die positiven Bindungseigenschaften der Lektine sich durch bestimmte Kohlenhydrate hemmen lassen, wurden die Lektine vor dem, in 4.1. beschriebenen Protokoll, mit dem korrespondierenden Hemmzucker vorinkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein Blutausschlag ohne Hemmzucker gefärbt.

In folgender Tabelle sind die verwendeten Lektine mit ihren entsprechenden Hemmzuckern aufgeführt.

Tabelle 7: Verwendete Hemmzucker

Lektin	Hemmstoff	Konzentration	Inkubationszeit
WGA	Chitin-Hydrolysat (VECTOR, Burlingame, USA)	1:4	30 min
ConA	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y-Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	1 Std
LCA	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	1 Std
PSA	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8 mg/ml	1 Std

4.4. Vorbehandlung mit Neuraminidase

Durch die Vorbehandlung der Blutausschläge mit Neuraminidase wird getestet, ob sich Lektine, die eine negative Bindungseigenschaft besitzen durch die Behandlung mit Strukturen des Blutes binden, oder ob sich die positive Reaktion der Lektine so intensivieren lässt. Durch das Enzym Neuraminidase spaltet sich von Glykoproteinen die endständige Sialinsäure ab, wodurch die Kohlenhydrate zugänglich für die Lektine werden. Die bei der Färbereihe benutzte Neuraminidase *Vibrio cholerae* (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) spaltet bei der Sialinsäure die Verbindungen α (2 \rightarrow 3), α (2 \rightarrow 6) und α (2 \rightarrow 8).

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 10 Min in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren
- b) 3x5Min in Natrium Acetat Puffer pH 5,5
- c) Mit 200 μ l verdünnter Neuraminidase-Lösung bedecken
- d) 60 Min in Feuchtkammer inkubieren
- e) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)

Ab hier muss unnötige Lichteinwirkung vermieden werden!

- f) Mit 100 μ l der Lektinlösung bedecken
- g) 60 Min in Feuchtkammer inkubieren
- h) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 – pH 7,6)
- i) Eindeckeln mit DAPI

5. Zytoskelett

Der Nachweis des Zytoskelett wurde durch fünf verschiedene Färbungen erbracht.

5.1. Phalloidin-TRITC

Der Marker TRITC (Tetramethylrhodamine B Isothiocyanat) ist an Phalloidin gekoppelt. Wenn Phalloidin an F-Aktin spezifisch bindet, wird die Bindung als rote Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Phalloidin ist das Toxin des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 10 Min in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren
- b) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)
- c) 10 Min bedecken des Objektträger mit Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg) in Feuchtkammer
- d) Abtropfen

Ab hier muss unnötige Lichteinwirkung vermieden werden!

- e) Mit 100µl Phalloidin-TRITC-Lösung (SIGMA-ALDRICH, Steinheim) bedecken
- f) 30 Min in Feuchtkammer inkubieren
- g) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)
- h) Eindeckeln mit DAPI

5.2. Myosin

Der Nachweis von Myosin wird durch einen polyklonalen Antikörper gegen „non muscle myosin IIA“ (ABCAM, Cambridge) erbracht. Die Färbung wird mit zwei unterschiedlichen Antikörper-Konzentrationen (1:250/1:500) durchgeführt. Durch Färbung mit einem Sekundärantikörper, welcher mit einem Marker (FITC) gekoppelt ist, sind die Bindungsstellen anhand ihrer grünen Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop gut erkennbar.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 10 Min in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren
- b) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)
- c) 10 Min bedecken des Objektträger mit Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg) in Feuchtkammer
- d) Abtropfen
- e) Mit 100µl Primärantikörper-Lösung (1:250/1:500) (ABCAM, Cambridge) bedecken
- f) Über Nacht im Kühlschrank inkubieren
- g) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)

Ab hier muss unnötige Lichteinwirkung vermieden werden!

- h) Mit 100µl Sekundärantikörper-Lösung Anti-Kaninchen FITC von der Ziege (DAKO, Hamburg) bedecken
- i) 30 Min in Feuchtkammer inkubieren
- j) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)
- k) Eindeckeln mit DAPI

5.3. Vimentin

Vimentin ist ein Intermediärfilament, das einen Teil des Zytoskeletts der Wirbeltiere bildet.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 10 Min in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren
- b) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)
- c) 10 Min bedecken des Objektträger mit Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg) in Feuchtkammer
- d) Abtropfen
- e) Mit 100µl Primärantikörper-Lösung (ABCAM, Cambridge) bedecken
- f) Über Nacht im Kühlschrank inkubieren
- g) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)

Ab hier muss unnötige Lichteinwirkung vermieden werden!

- h) Mit 100µl Sekundärantikörper-Lösung Anti-Maus IgG FITC (DAKO, Hamburg) bedecken
- i) 30 Min in Feuchtkammer inkubieren
- j) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)
- k) Eindeckeln mit DAPI

5.4. Panzytokeratin

Keratine sind eine Gruppe von wasserunlöslichen Proteinen, die sogenannten Tonofilamente (Keratinfilamente) in allen Epithelien bilden. (Weiss et al., 1984).

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 10 Min in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren
- b) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)
- c) 10 Min bedecken des Objektträger mit Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg) in Feuchtkammer
- d) Abtropfen
- e) Mit 100µl Primärantikörper-Lösung (Maus, BIOCARTA, Hamburg) bedecken
- f) Über Nacht im Kühlschrank inkubieren
- g) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)

Ab hier muss unnötige Lichteinwirkung vermieden werden!

- h) Mit 100µl Sekundärantikörper-Lösung Anti-Maus IgG FITC (DAKO, Hamburg) bedecken
- i) 30 Min in Feuchtkammer inkubieren
- j) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)
- k) Eindeckeln mit DAPI

5.5. Tubulin

α - und β - Tubulin sind die Hauptbestandteile der Mikrotubuli.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- a) Objektträger 10 Min in Methanol (Merck, Darmstadt) fixieren
- b) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)
- c) 10 Min bedecken des Objektträger mit Protein Block Serum Free (DAKO, Hamburg) in Feuchtkammer
- d) Abtropfen
- e) Mit 100 μ l Primärantikörper-Lösung (Maus, ABCAM, Cambridge) bedecken
- f) Über Nacht im Kühlschrank inkubieren
- g) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)

Ab hier muss unnötige Lichteinwirkung vermieden werden!

- h) Mit 100 μ l Sekundärantikörper-Lösung Anti-Maus IgG FITC (DAKO, Hamburg) bedecken
- i) 30 Min in Feuchtkammer inkubieren
- j) 3x5 Min in PBS Puffer (pH 7,4 - 7,6)
- k) Eindeckeln mit DAPI

6. Auswertungen

Die Auswertung erfolgte mit dem Lichtmikroskop Aristoplan der Firma Leitz, Wetzlar. Für den Nachweis der Fluoreszenz wurde das Fluoreszenzmikroskop Dialux20 der Firma Leitz, Wetzlar verwendet. Die Photographie der gefärbten Blutausstriche erfolgte durch die Digitalkamera Canon-Powershot A95, welche mit dem Lichtmikroskop mittels Computer verbunden wurde. Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Untersuchung wurde mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM902 der Firma Zeiss, Oberkochen durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit Blutproben von 15 Ziegen auf Objektträgern ausgestrichen und mit sieben verschiedenen Methoden angefärbt.

1.1. Leukozyten

1.1.1. Neutrophile Granulozyten

In den zu untersuchenden Blutaussstrichen waren die neutrophilen Granulozyten mit einem Anteil von bis zu 35% sehr häufig zu finden. Sie machen den größten Anteil der Granulozyten aus. Es sind zwei Formen zu unterscheiden, die reifen, segmentkernigen Granulozyten, deren Zellkern aus 2 bis 5 Segmenten besteht und die Jugendform, die als stabkernige Granulozyten bezeichnet werden, obwohl deren Zellkern oft eine Hufeisenform hat. Der Durchmesser der Zellen beträgt 9 bis 12µm. Die einzelnen Färbeergebnisse werden in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 8: Übersichtsfärbungen neutrophiler Granulozyten

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim	PAS	Toluidinblau	Alcianblau
Zellkern	Dunkelblau	Lila	Blau	Violett	Blau		Hellrosa
Zytoplasma	Hellblau	Rosa	Blassblau	Rötlich	Rosa		Blassblau
Granula	Lila	Braun-rot	Dunkelrosa	Lila	Violett		Hellblau

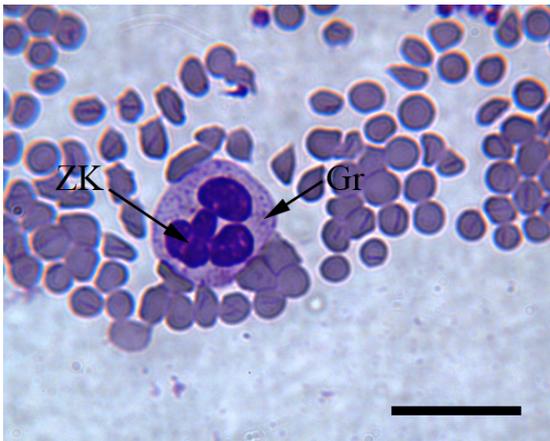


Abbildung 3: Neutrophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung

Der Zellkern (ZK) ist gelappt und im Zytoplasma sind feine Granula (Gr) zu erkennen.
SB = 10µm

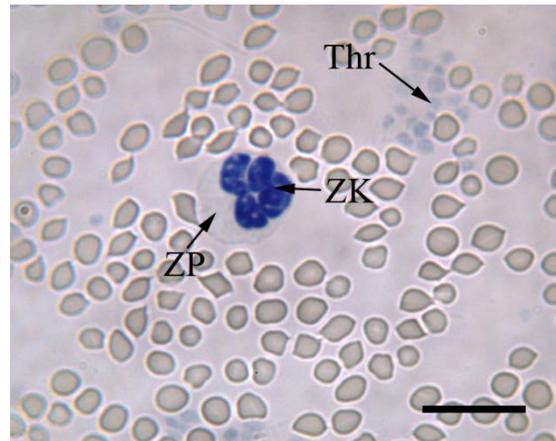


Abbildung 5: Neutrophiler Granulozyt, Toluidinblau-Färbung

Neben dem Zellkern (ZK) und dem Zytoplasma (ZP) des neutrophilen Granulozyten sind Thrombozyten (Thr) zu sehen.
SB = 10µm

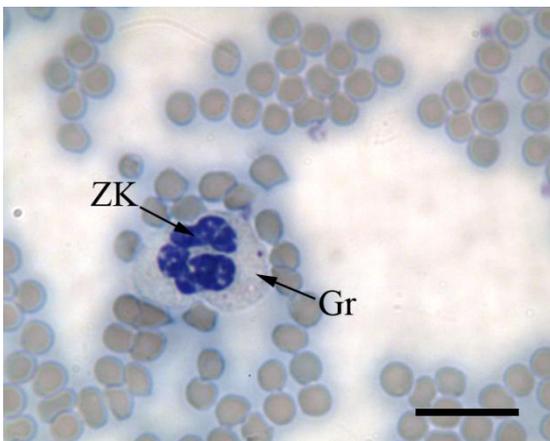


Abbildung 4: Neutrophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung

Der Zellkern (ZK) ist dreifach segmentiert und die Granula (Gr) im Zytoplasma sind zu sehen.
SB = 10µm

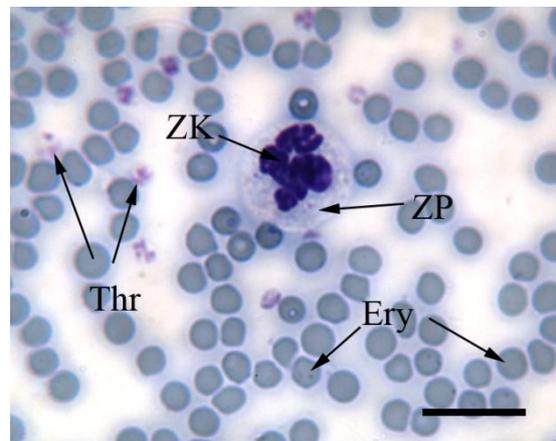


Abbildung 6: Neutrophiler Granulozyt, Giemsa-Färbung

Neben dem Zellkern (ZK) und dem Zytoplasma (ZP) des neutrophilen Granulozyten sind auch Erythrozyten (Ery) und Thrombozyten (Thr) zu beobachten.
SB = 10µm

1.1.2. Basophile Granulozyten

Die basophilen Granulozyten sind mit einem Anteil von bis zu 1% der gesamten Granulozyten im Ziegenblut sehr selten. Sie konnten nicht bei allen Färbemethoden nachgewiesen werden. Der Durchmesser der gesamten Zelle beträgt 9 bis 11µm. Die Granula sind mit 1µm sehr groß und können den helleren Zellkern überlagern. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Untersuchungen aufgeführt.

IV. Ergebnisse

Tabelle 9: Übersichtsfärbungen basophiler Granulozyten

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim	PAS	Toluidinblau	Alcianblau
Zellkern		Violett	Blau	Blau		Blau-lila	
Zytoplasma		Hellblau	Blassblau	Hellblau			
Granula		Dunkellila	Dunkelblau	Dunkelblau		Violett	

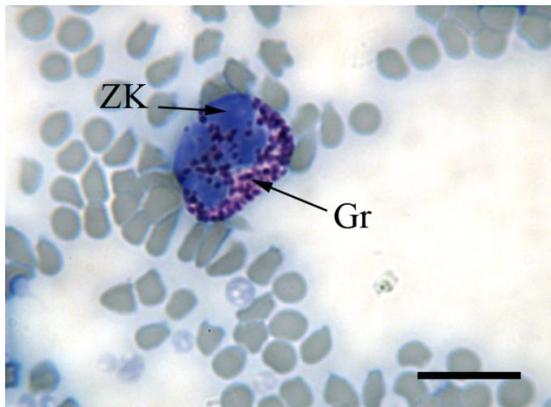


Abbildung 7: Basophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung

Die dunklen Granula (Gr) des basophilen Granulozyten sind neben dem heller blau gefärbten Zellkern (ZK) zu beobachten.
SB = 10µm

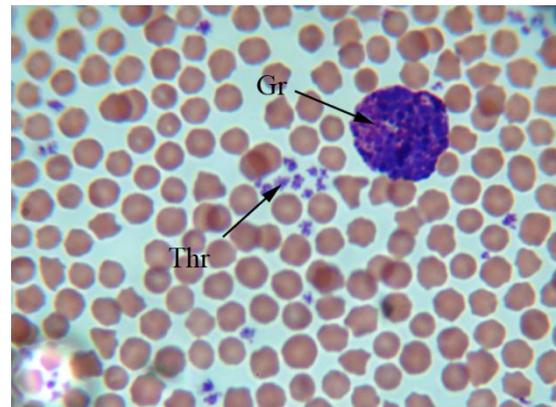


Abbildung 8: Basophiler Granulozyt, Pappenheim-Färbung

Die Granula (Gr) des basophilen Granulozyten überlagern den Zellkern. Des Weiteren sind Thrombozyten (Thr) zu erkennen.
SB = 10µm

IV. Ergebnisse

1.1.3. Eosinophile Granulozyten

Mit einem Durchmesser von 10 bis 15µm gehören die Eosinophilen zu den größten Granulozyten. Der hantel- bis brillenförmige Zellkern ist zweifach gelappt und von kleinen Granula umgeben, die eine deutlich rote Farbe zeigen und den Zellkern überdecken können. Die Granula der Ziege sind nur 0,5 bis 1µm groß. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 10: Übersichtsfärbungen eosinophiler Granulozyten

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim	PAS	Toluidinblau	Alcianblau
Zellkern	Dunkelblau	Violett	Blau	Violett	Blau	Hellblau	
Zytoplasma	Blau	Blassrosa	Hellblau	Grau-blau	Blassrosa	Hellrosa	
Granula	Rot-orange	Rot	Rot	Rot	Hellrot	Blassrot	

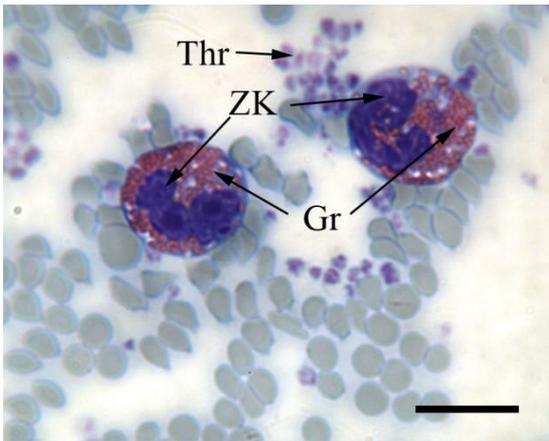


Abbildung 9: Eosinophile Granulozyten, Giemsa-Färbung

Neben den Zellkernen (ZK) und den roten Granula (Gr) der eosinophilen Granulozyten lassen sich noch Thrombozyten (Thr) beobachten.
SB = 10µm

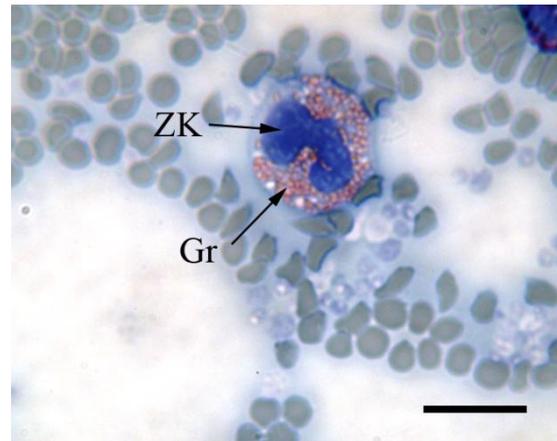


Abbildung 11: Eosinophiler Granulozyt, May-Grünwald-Färbung

Der Zellkern (ZK) des eosinophilen Granulozyten ist typisch brillenförmig und die Granula (Gr) rot gefärbt.
SB = 10µm



Abbildung 10: Eosinophiler Granulozyt, Diff-Quick-Färbung

Der Zellkern (ZK) des eosinophilen Granulozyten besitzt die typische Brillenform; die Granula sind im Zytoplasma (ZP) nur undeutlich zu erkennen.
SB = 10µm

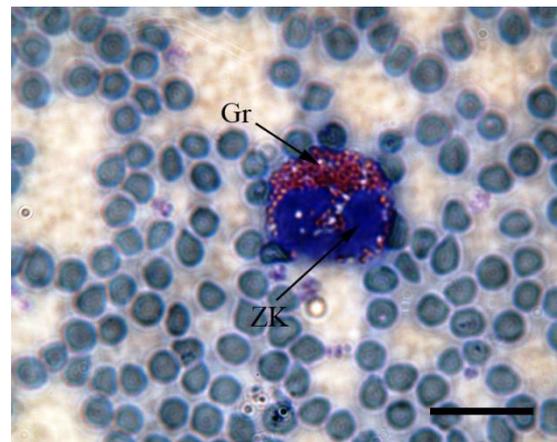


Abbildung 12: Eosinophiler Granulozyt, Papanheim-Färbung

Die roten Granula (Gr) des eosinophilen Granulozyten sind neben dem blauen Zellkern (ZK) deutlich darstellbar.
SB = 10µm

1.1.4. Lymphozyten

Durch das lymphozytäre Blutbild der Ziege finden sich im Blutausstrich mit bis zu 60% viele Lymphozyten. Sie variieren in ihrer Größe sehr stark und können mit einem Durchmesser von 8 µm bis zu 20 µm beobachtet werden. Der große dichte Zellkern ist mit ansteigender Größe von mehr Zytoplasma umgeben, in dem sich zum Teil Granula darstellen lassen. Die Ergebnisse der Färbungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

IV. Ergebnisse

Tabelle 11: Übersichtsfärbungen Lymphozyten

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim	PAS	Toluidinblau	Alcianblau
Zellkern	Violett	Rotviolett	Blau	Lila-blau	Blau	Dunkelblau	
Zytoplasma	Lila	Blau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	

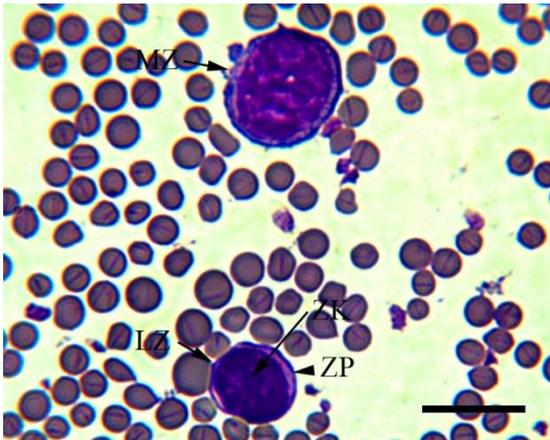


Abbildung 13: Lymphozyt, Diff-Quick-Färbung

Neben dem Monozyt (MZ) ist in dieser Aufnahme ein Lymphozyt (LZ) mit Zellkern (ZK) und Zytoplasma (ZP) zu erkennen.
SB = 10µm

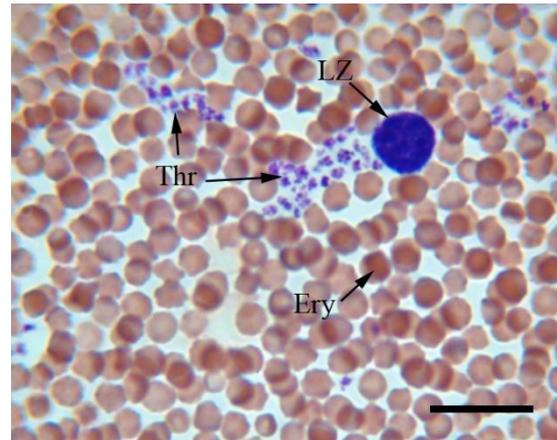


Abbildung 15: Lymphozyt, Pappenheim-Färbung

Der Lymphozyt (LZ) ist von Erythrozyten (Ery) und Thrombozyten (Thr) umgeben.
SB = 10µm

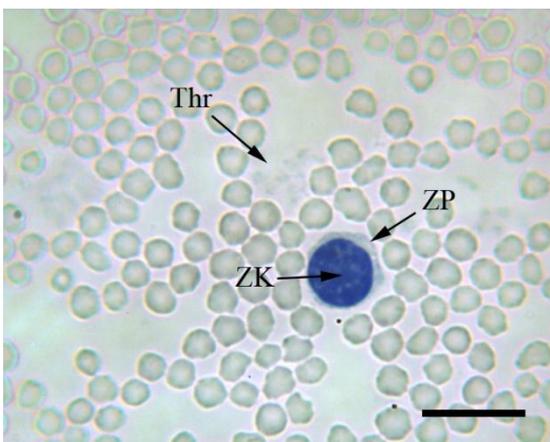


Abbildung 14: Lymphozyt, PAS-Färbung

Der runde Zellkern (ZK) füllt fast die gesamte Zelle aus. Nur ein schmaler Zytoplasmasaum (ZP) verbleibt. Desweiteren sind Thrombozyten (Thr) zu erkennen.
SB = 10µm

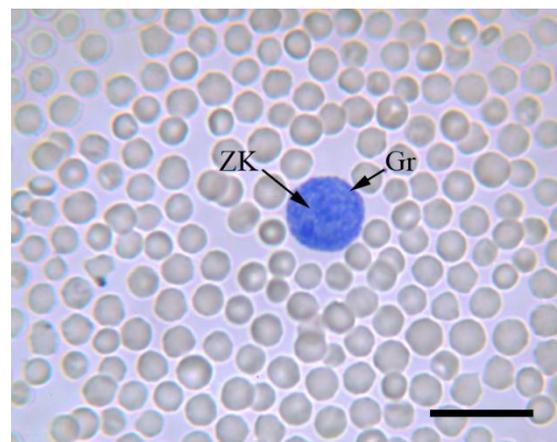


Abbildung 16: Lymphozyt, Toluidinblau-Färbung

Die dunkleren Granula (Gr) im Zytoplasma der Zelle überlagern zum Teil den Zellkern (ZK).
SB = 10µm

1.1.5. Monozyten

Im Blut der Ziege sind die Monozyten mit einem Durchmesser von bis zu 20µm die größten Leukozyten. Der Zellkern ist rund bis nierenförmig und liegt meist exzentrisch im Zytoplasma, in dem sich neben azurophilen Granula bei den Wiederkäuern auch Vakuolen erkennen lassen. Die Färbungen der einzelnen Zellstrukturen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 12: Übersichtsfärbungen Monozyten

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim	PAS	Toluidinblau	Alcianblau
Zellkern	Lila	Violett	Blau	Rotviolett	Hellblau	Blau	
Zytoplasma	Hellblau	Blau	Hellblau	Blau	Blassblau	Hellrosa	

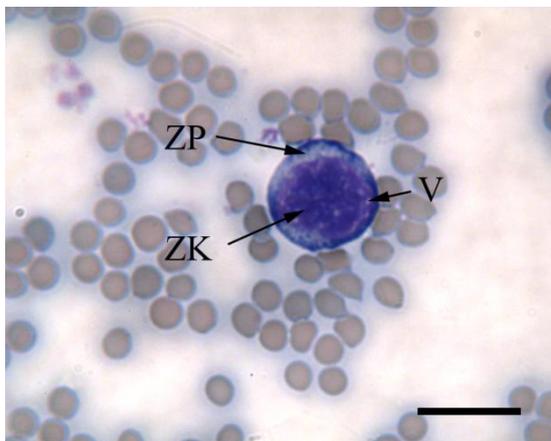


Abbildung 17: Monozyt, May-Grünwald-Färbung

Neben dem dunklen Zellkern (ZK) sieht man die typischen Vakuolen (V) im Zytoplasma (ZP) der Zelle.
SB = 10µm

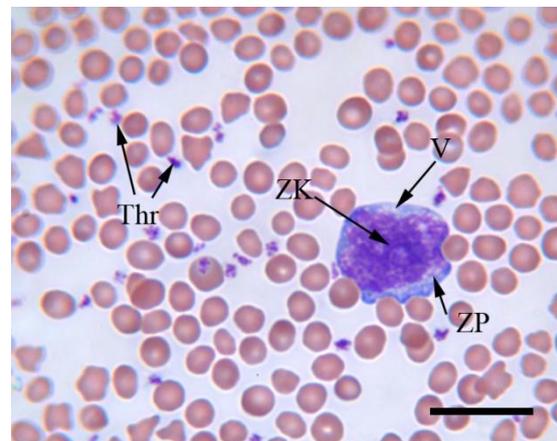


Abbildung 19: Monozyt, Pappenheim-Färbung

Man erkennt den Zellkern (ZK), das Zytoplasma (ZP) und die darin befindlichen Vakuolen (V). Weiter sind Thrombozyten (Thr) zu beobachten.
SB = 10µm

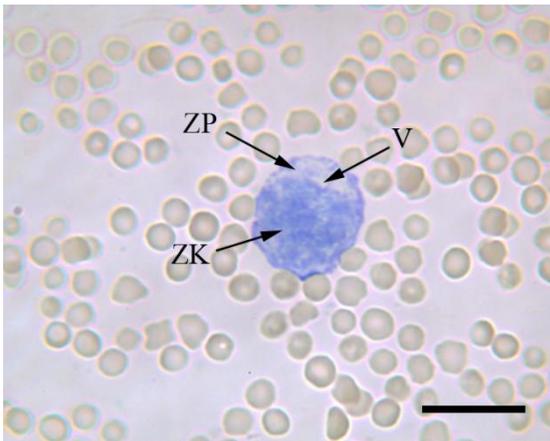


Abbildung 18: Monozyt, Toluidinblau-Färbung

Der Zellkern (ZK) ist von Zytoplasma (ZP) und undeutlichen Vakuolen (V) umgeben. SB = 10µm

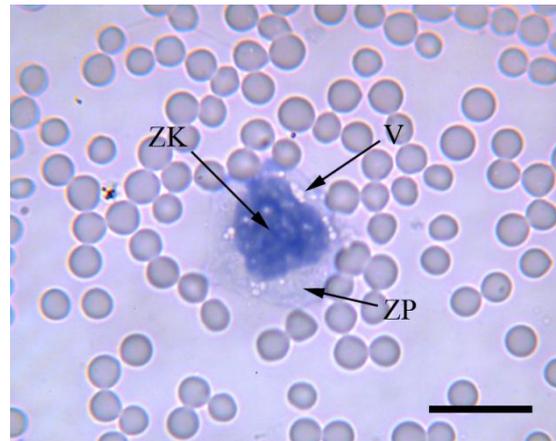


Abbildung 20: Monozyt, PAS-Färbung

Die Vakuolen (V) im Zytoplasma (ZP) sind bei dieser Färbung besonders gut zu sehen. In der Mitte der Zelle liegt der Zellkern (ZK). SB = 10µm

1.2. Erythrozyten

Mit einem Durchmesser von nur 4µm besitzt die Ziege sehr kleine rote Blutkörperchen. Die reifen kernlosen Erythrozyten besitzen eine bikonkave Scheibenform und ihre Zellmembran erscheint glatt. Bei einigen Blutaussstrichen hatten die Zellen eine Stechapfelform, die durch den Trocknungsvorgang beim Anfärben der Ausstriche zu erklären ist. Wie in der folgenden Tabelle zu sehen, variiert die Farbe der Erythrozyten je nach Färbemethode.

Tabelle 13: Übersichtsfärbungen Erythrozyten

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim	PAS	Toluidinblau	Alcianblau
Zytoplasma	Braunrot	Blassrot	Hellrot	Rot	Hellrot	Hellrot	

1.3. Thrombozyten

Die Form der Thrombozyten ist rund bis oval und ihr Durchmesser ist 1,5µm bis 4,5µm. Sie sind kernlos. Bei der mikroskopischen Untersuchung ließen sich zwei Zonen unterscheiden. Die äußere, als Hyalomer bezeichnete Region, ist heller und schließt sich ringförmig der Zellmembran an. Der zentrale und dunklere Teil wird Chromomer oder Granulomer genannt und enthält Granula und Zellorganellen.

Tabelle 14: Übersichtsfärbungen Thrombozyten

	Diff-Quick	Giemsa	May-Grünwald	Pappenheim	PAS	Toluidinblau	Alcianblau
Granulomer	Lila	Lila	Blau	Dunkelblau	Violett		-
Hyalomer	Hellblau	Hellblau	Blassblau	Blassrosa	Hellrosa		-

2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

2.1. Leukozyten

2.1.1. Neutrophile Granulozyten

Neutrophilen Granulozyten können zwischen einer reifen, segmentkernigen Form und einer selteneren, jungen stabkernigen Form unterscheiden werden. In dem Zytoplasma der Blutzellen finden sich neben Mitochondrien, dem endoplasmatisches Retikulum und Vakuolen, zwei verschiedene Formen von Granula. Die primären Granula sind von länglicher Gestalt und die sekundären Granula rundlich. Der Zellkern der jungen Form ist bohnenförmig, also noch nicht segmentiert und die Zellmembran zeigt meist noch keine Ausziehungen. Mit fortschreitendem Alter teilt sich der Kern in meist 2 bis 3 Segmente und es bilden sich deutliche Pseudopodien auf der Zellmembran aus. Der Zellkern beider Altersstufen weist die typische Unterteilung in Euchromatin- und Heterochromatinbereiche auf.

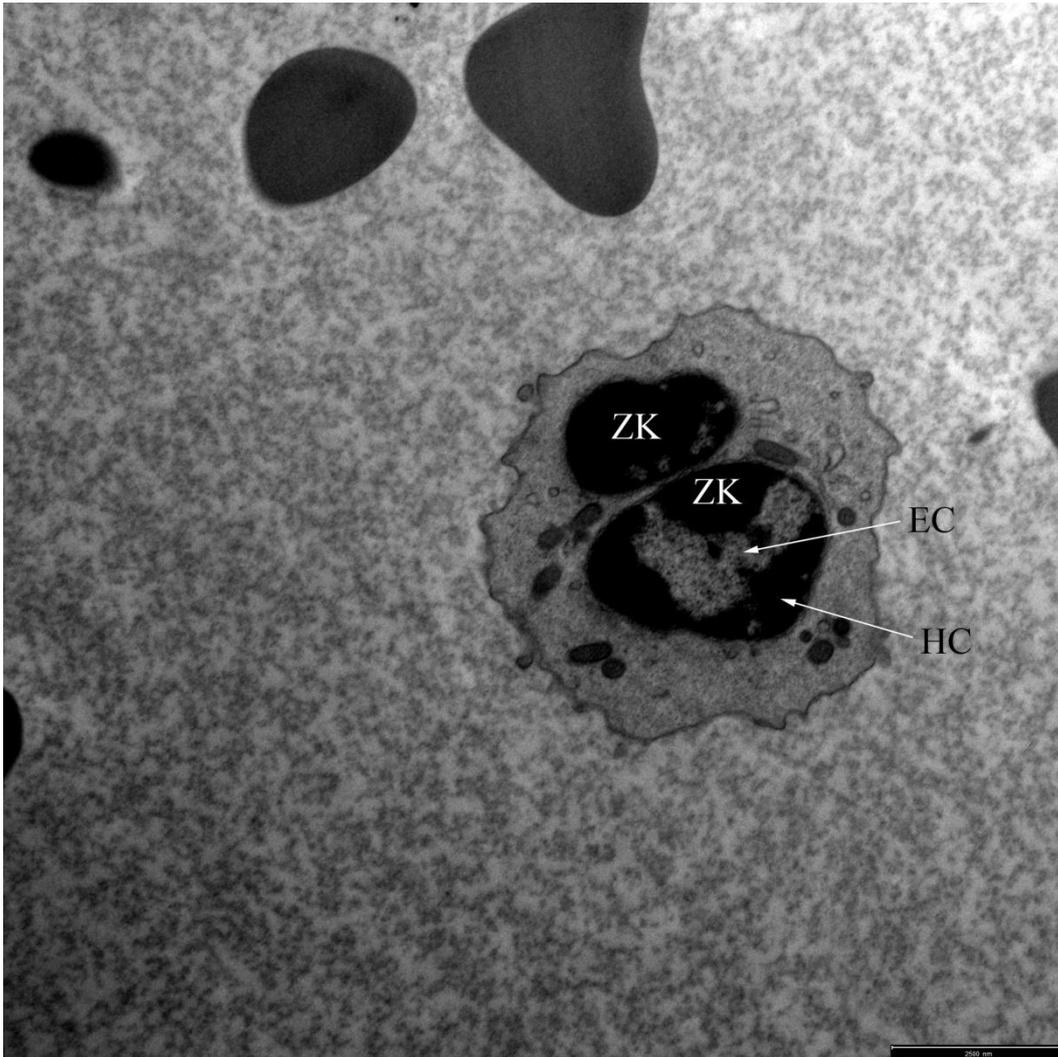


Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Neutrophiler Granulozyt

Der neutrophile Granulozyt besitzt einen segmentierten Zellkern (ZK), bei dem das Euchromatin (EC) zentral und das Heterochromatin peripher gelegen ist.
SB = 2,5µm

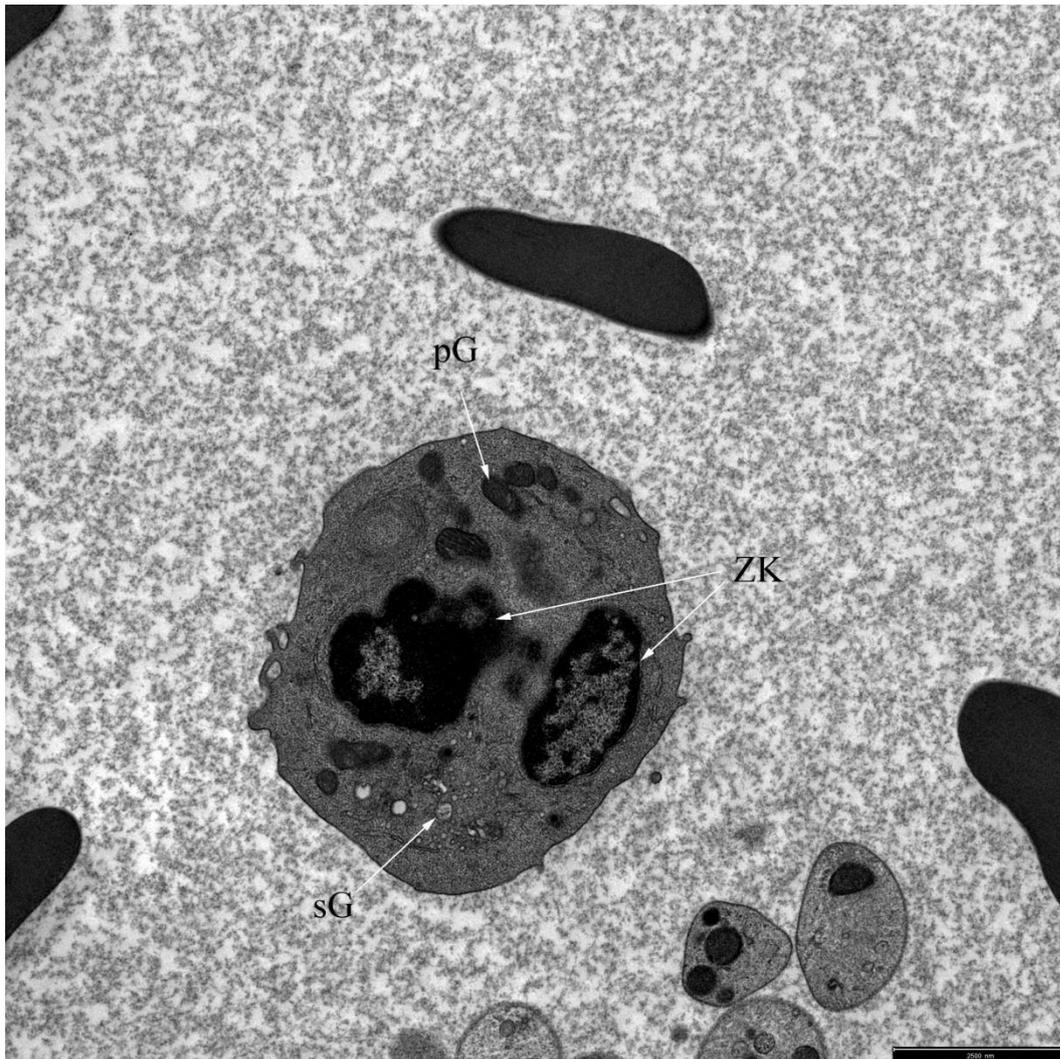


Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Neutrophilen Granulozyten

Neben dem Zellkern (ZK) lassen sich die länglichen primären Granula (pG) und die rundlichen sekundären Granula (sG) beobachten.

SB = 2,5 μ m

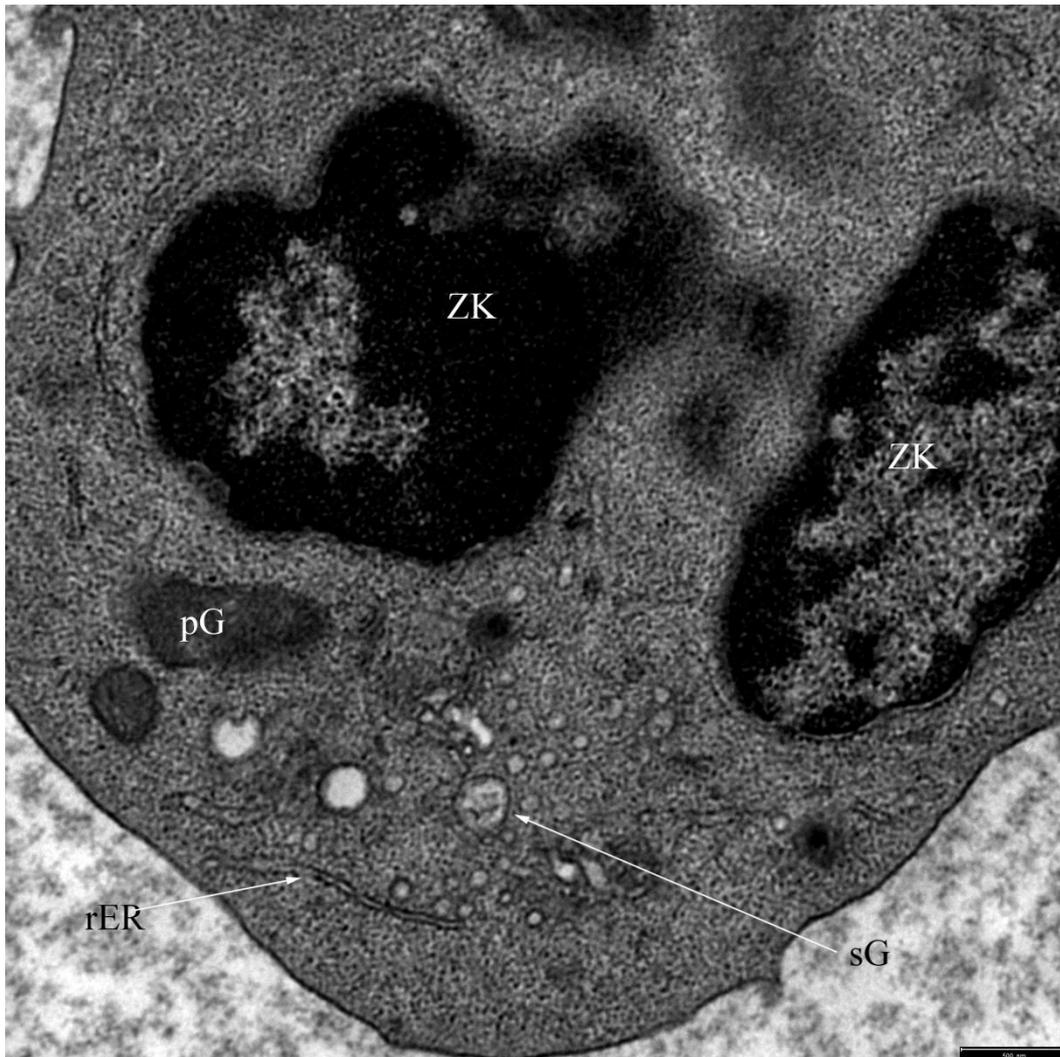


Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Neutrophilen Granulozyten

Der neutrophile Granulozyt besitzt einen segmentierten Zellkern. Außerdem erkennt man die primären (pG) und sekundären Granula (sG). Am Rand der Zelle sind Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) zu beobachten.

SB = 0,5 μ m

2.1.2. Basophile Granulozyten

In den untersuchten elektronenmikroskopischen Proben waren keine basophilen Granulozyten zu finden.

2.1.3. Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten sind große, rundliche Zellen, die an ihrer Zellmembran Pseudopodien ausbilden. Bei der Ziege sind im Zytoplasma viele kleine elektronendichte Granula und wenig Mitochondrien zu erkennen. Der Zellkern ist meist zweifach gelappt.

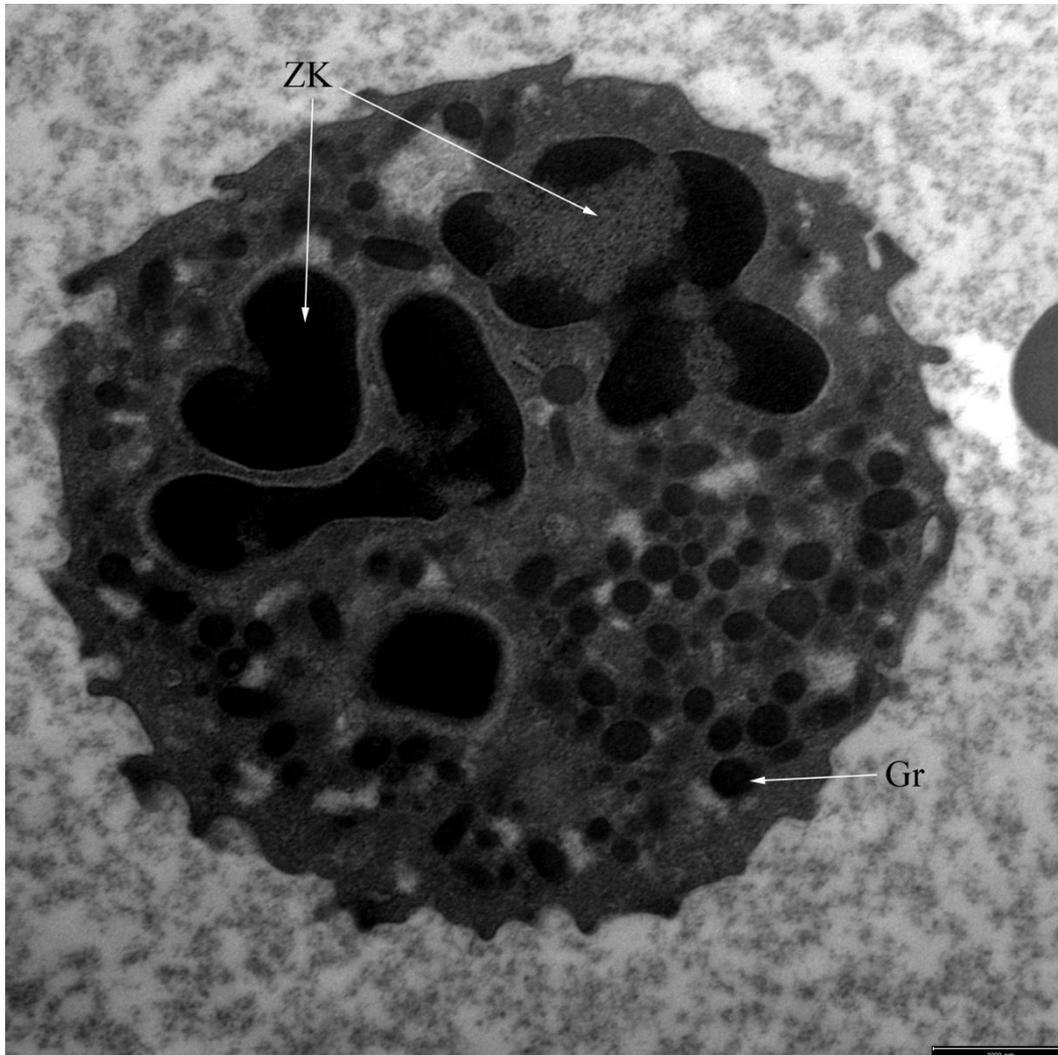


Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Eosinophilen Granulozyten

Der eosinophile Granulozyt besitzt neben dem brillenförmigen Zellkern (ZK) viele elektronendichte Granula (Gr).
SB = 1µm

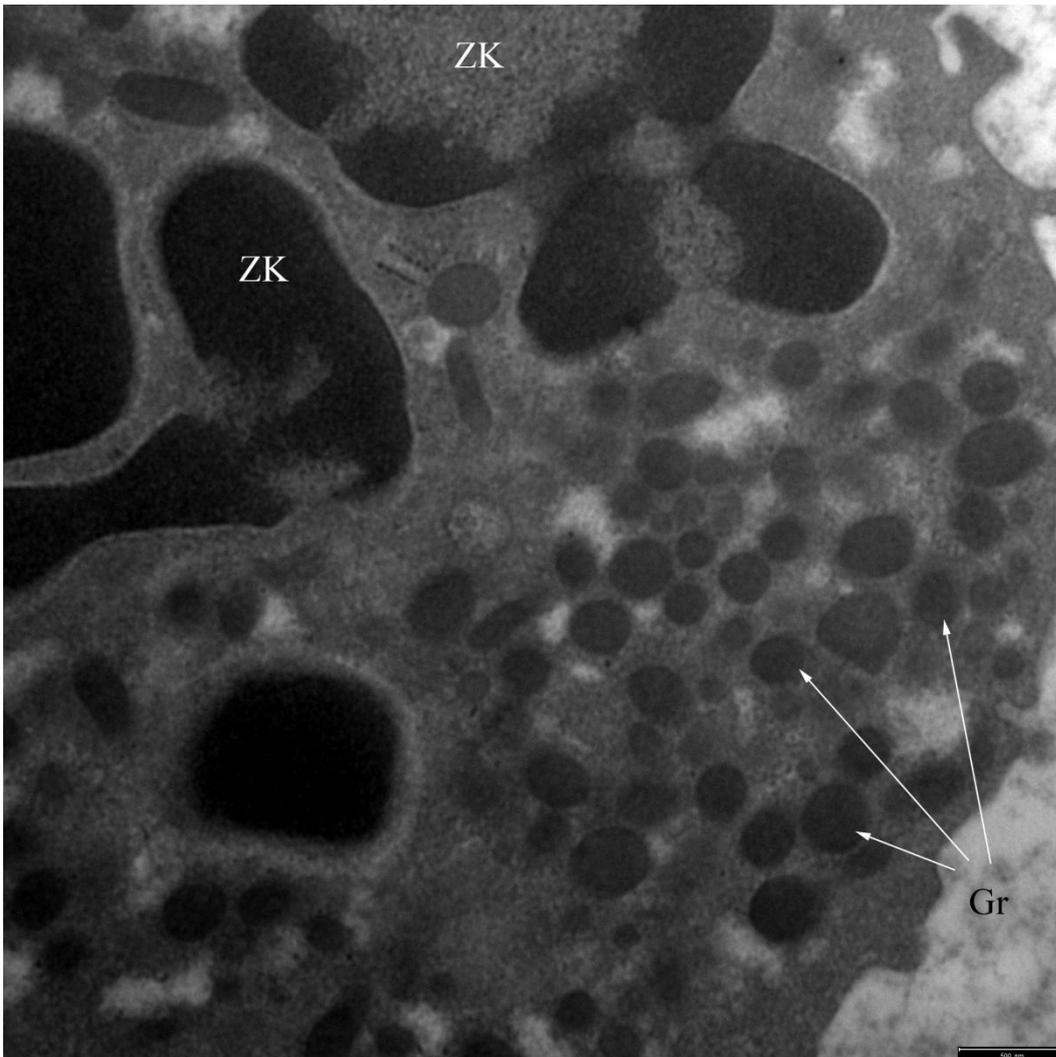


Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Eosinophilen Granulozyten

Neben dem Zellkern (ZK) sind die vielen unterschiedlich großen Granula (Gr) im Zytoplasma der Zelle zu erkennen.
SB = 0,5µm

2.1.4. Lymphozyten

Die Lymphozyten sind in den untersuchten Ausstrichen von rundlicher Gestalt und haben einen großen, runden Zellkern, in dem der helle zentrale Euchromatin- und der dunkle äußere Heterochromatinteil unterschieden werden können. Der große Zellkern nimmt den Großteil des Zytoplasmas ein. Die wenigen Zellorganellen wie Mitochondrien, Vakuolen oder Granula liegen randständig. Meist ist die Zellmembran glatt. Bei einigen Lymphozyten sind auch Pseudopodien zu beobachten.

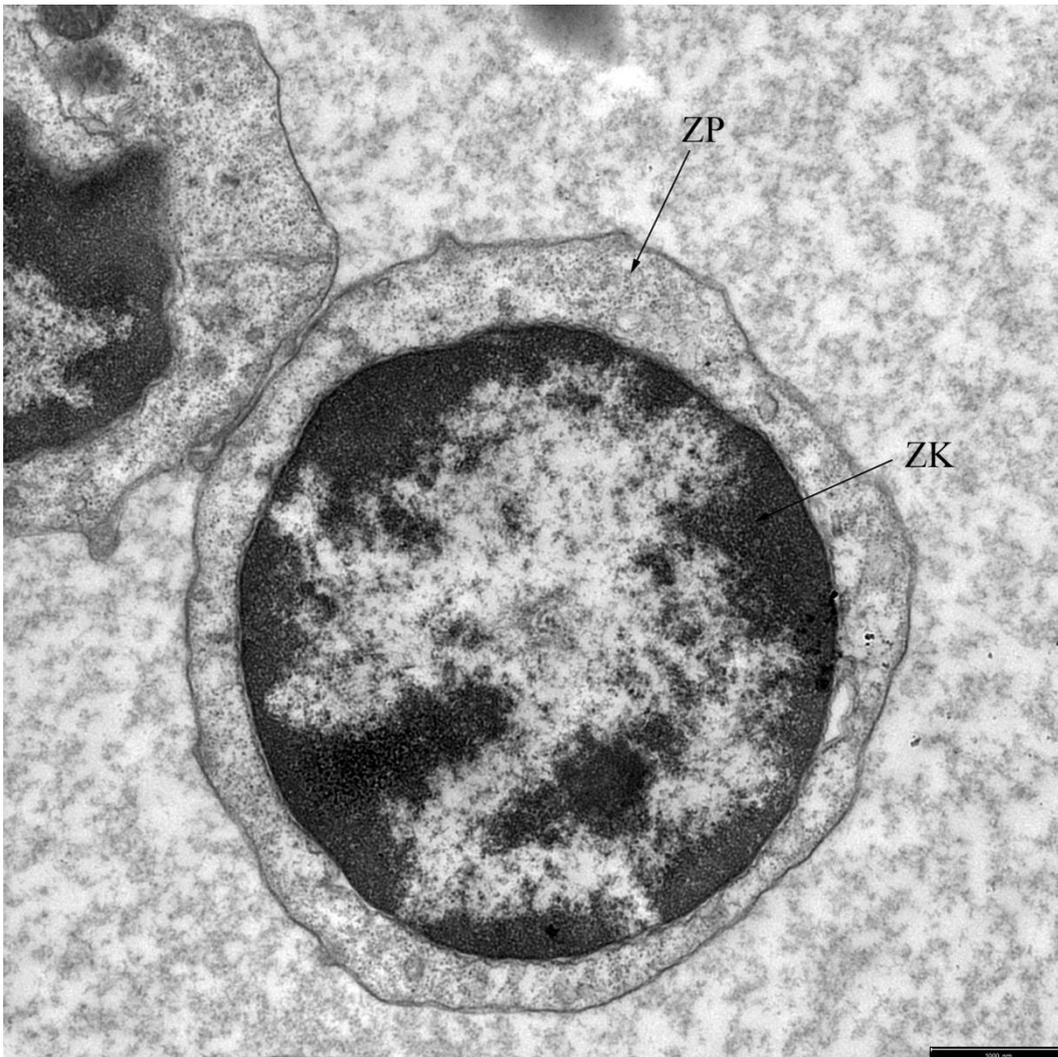


Abbildung 26: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Lymphozyten

Der runde Zellkern (ZK) füllt die Zelle fast ganz aus. Er wird von einem dünnen Zytoplasmasaum (ZP) mit wenigen Zellorganellen (vor allem Ribosomen, einige Mitochondrien) umgeben.
SB = 1µm

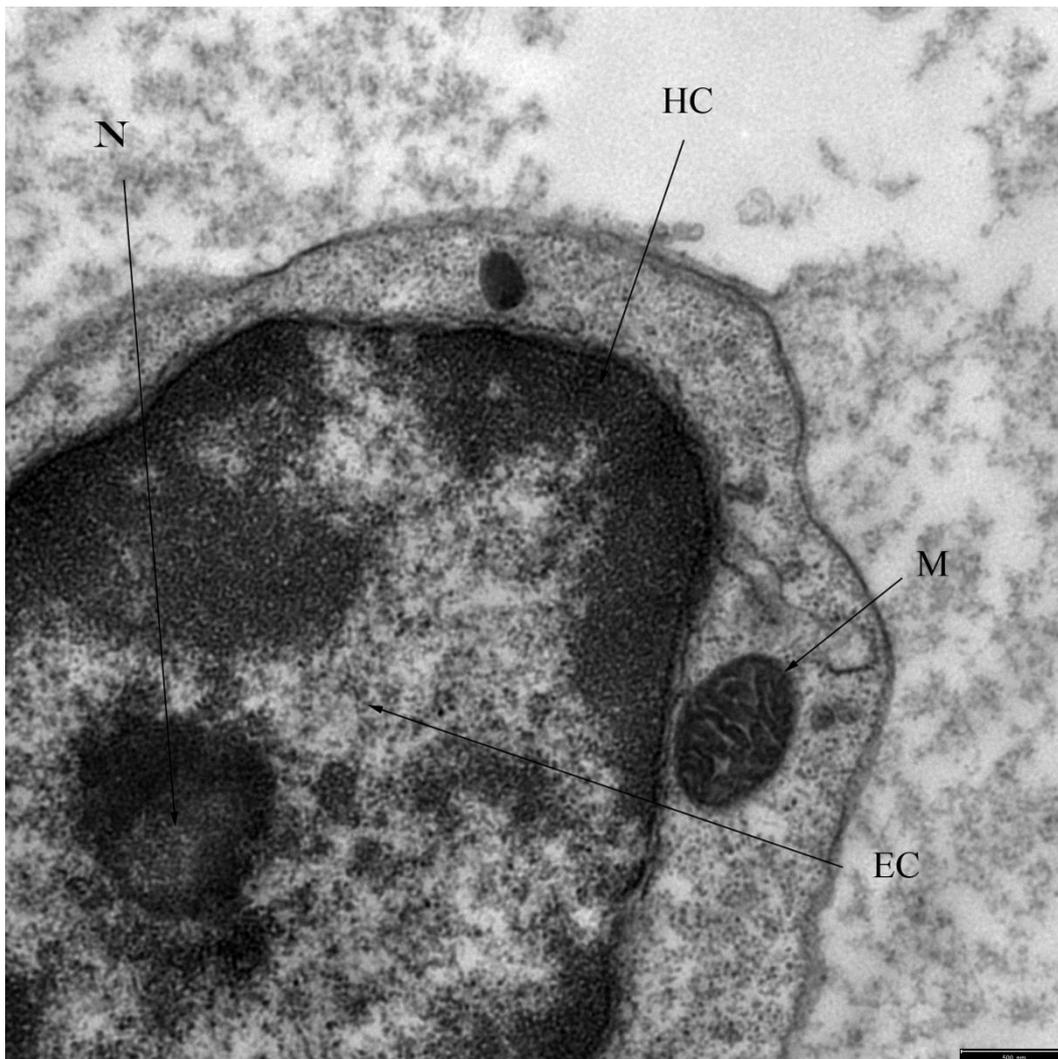


Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Lymphozyten

Im randständigen Zytoplasma der Zelle finden sich vereinzelt Mitochondrien (M). Der Zellkern ist in das zentrale Euchromatin (EC) und das periphere Heterochromatin (HC) unterteilt. Ein deutlicher Nucleolus ist erkennbar (N).
SB = 0,5µm

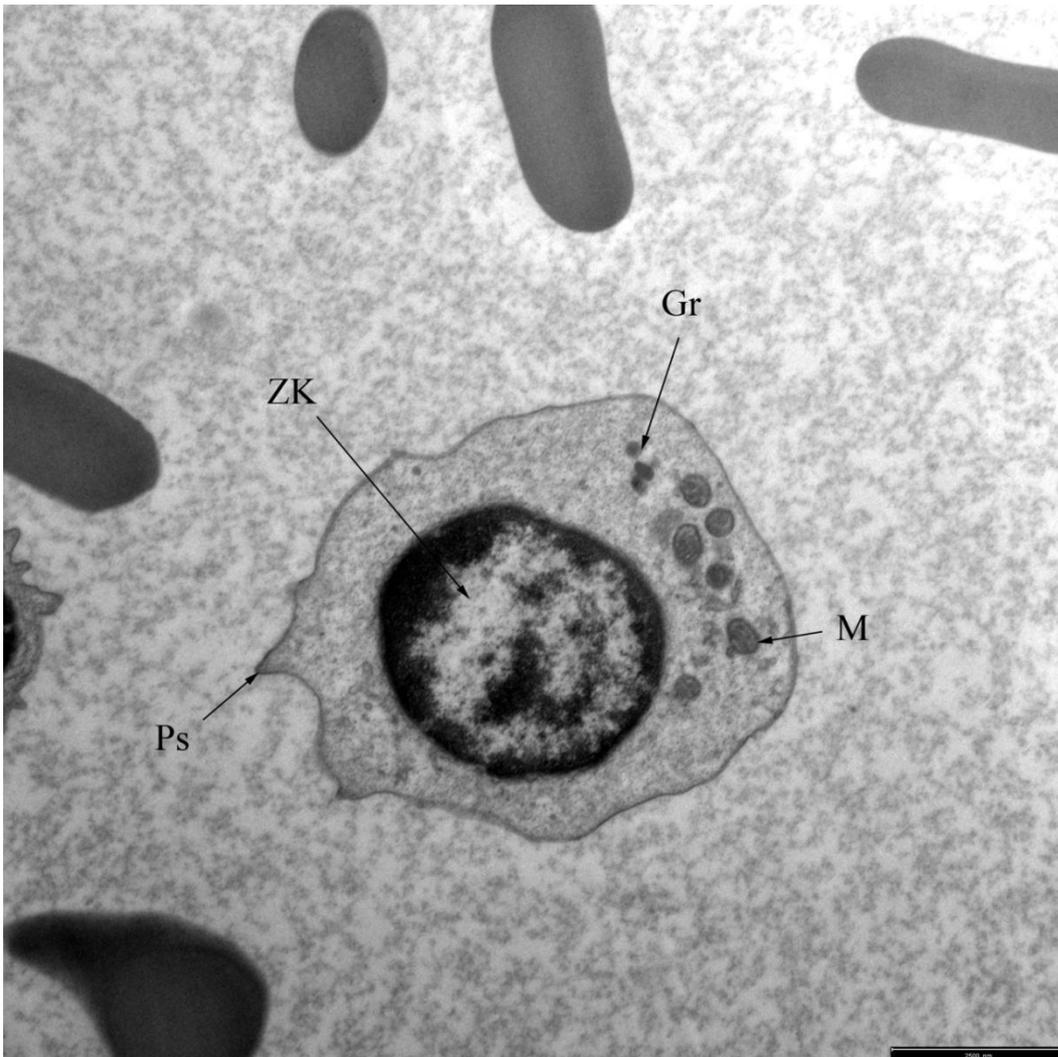


Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Lymphozyten

Neben dem runden Zellkern (ZK) kann man im Zytoplasma sowohl Mitochondrien (M), als auch Granula (G) finden. An der Zellmembran sind Ausziehungen, sogenannte Pseudopodien (Ps) zu sehen, SB = 2,5µm

2.1.5. Monozyten

Monozyten sind mit einem Durchmesser von bis zu 20µm die größten Zellen im Blut der Ziege. Der Zellkern ist nierenförmig und in einen helleren innen gelegenen Euchromatin- und in einen dunklen äußeren Heterochromatinteil unterteilt. Im Zytoplasma finden sich außerdem viele Mitochondrien und elektronendichte Granula. Auf der Zellmembran sind zum Teil deutlich Pseudopodien zu beobachten.

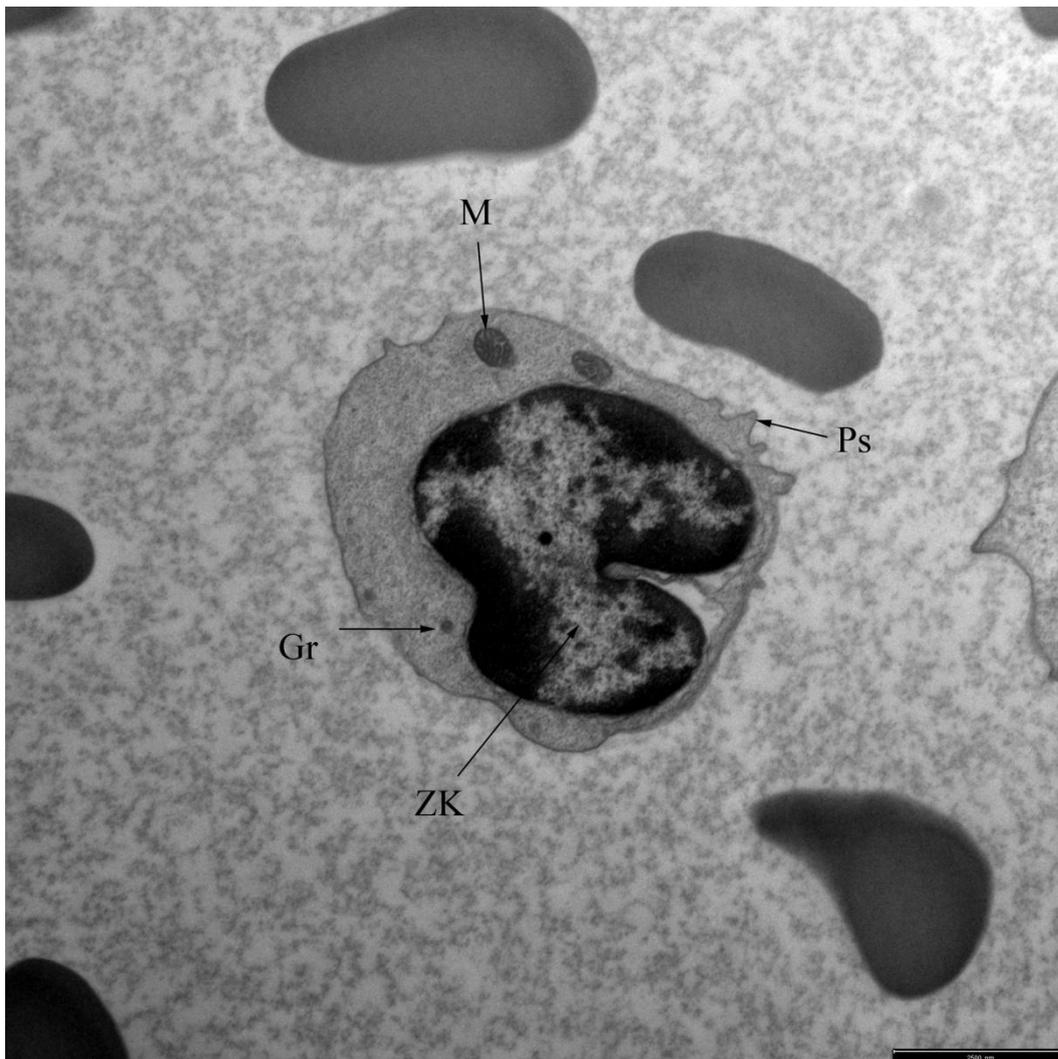


Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Monozyten

Der Monozyt besitzt einen nierenförmigen Zellkern (ZK) und im Zytoplasma finden sich Mitochondrien (M) und wenige Granula (Gr). An der Zellmembran sind Pseudopodien zu erkennen.
SB = 2,5 μ m

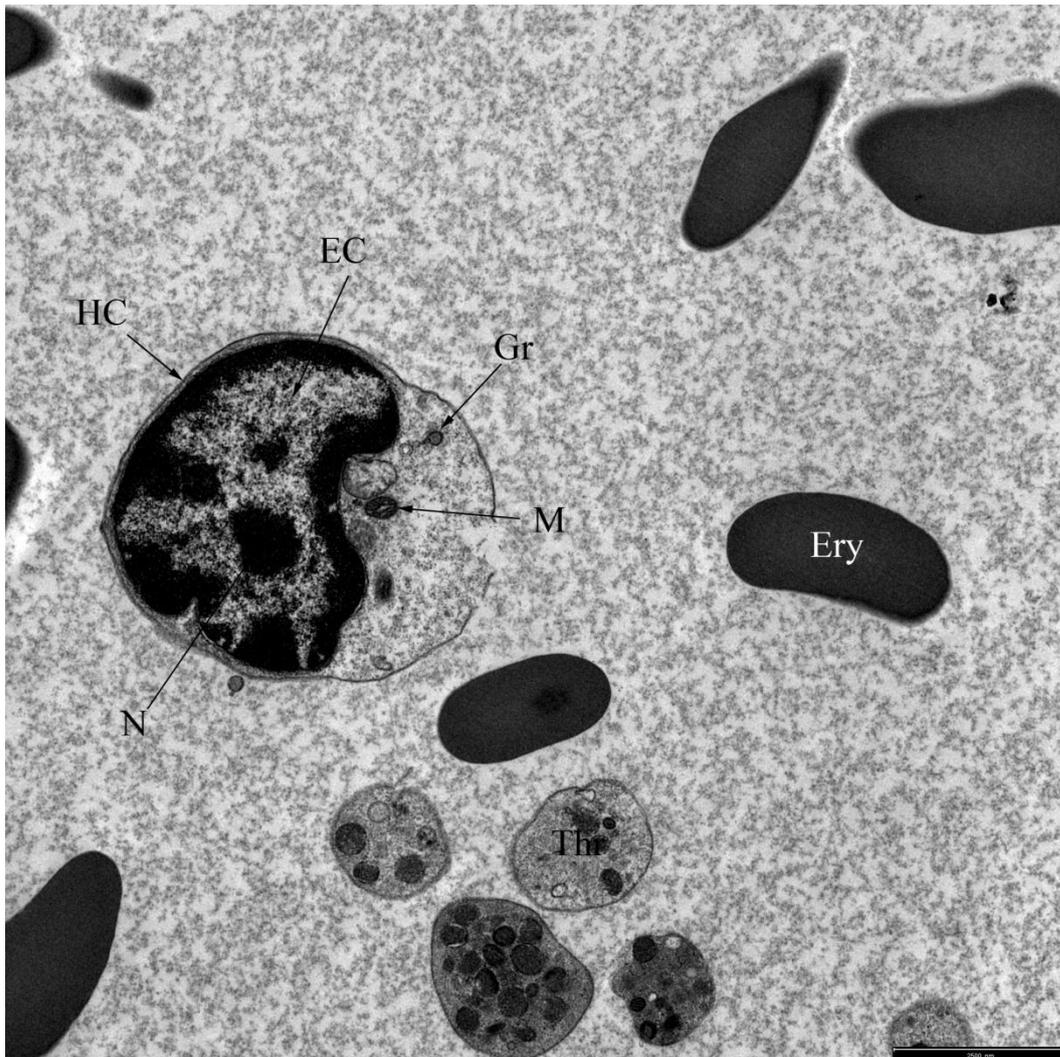


Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Monozyten

Der nierenförmige Zellkern des Monozyten enthält zentral Euchromatin (EC) und randständig Heterochromatin (HC). Ein deutlicher Nucleolus (N) ist gut erkennbar. Im Zytoplasma findet man Mitochondrien (M), endoplasmatisches Reticulum (eR) und Granula (Gr). Des Weiteren sind in dieser Aufnahme Erythrozyten (Ery) und Thrombozyten (Thr) zu sehen.
SB = 2,5µm

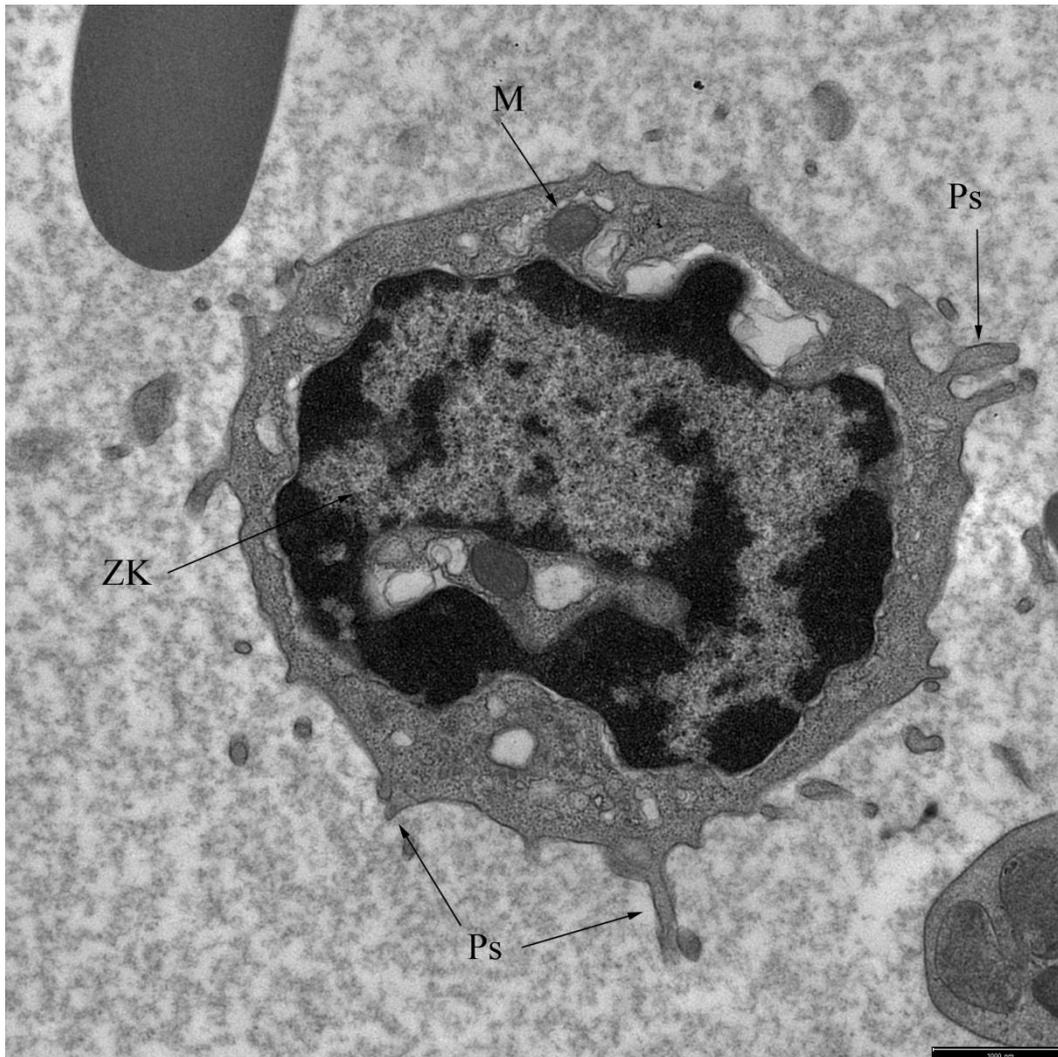


Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Monozyten

Neben dem großen Zellkern (ZK) sind im Zytoplasma der Zelle Mitochondrien (M), endoplasmatisches Reticulum und Golgi-Zisternen zu erkennen.
An der Zellmembran sind einige Pseudopodien zu beobachten.
SB = 1µm

2.2. Erythrozyten

In der elektronenmikroskopischen Untersuchung stellten sich die roten Blutkörperchen als Zellen von unterschiedlicher Gestalt und Größe dar. Der Durchmesser variiert von 1 bis über 4µm. Die Zelloberfläche ist glatt und das Zellinnere ist von homogener Struktur. Zellkern und Zellorganellen fehlen den Erythrozyten.

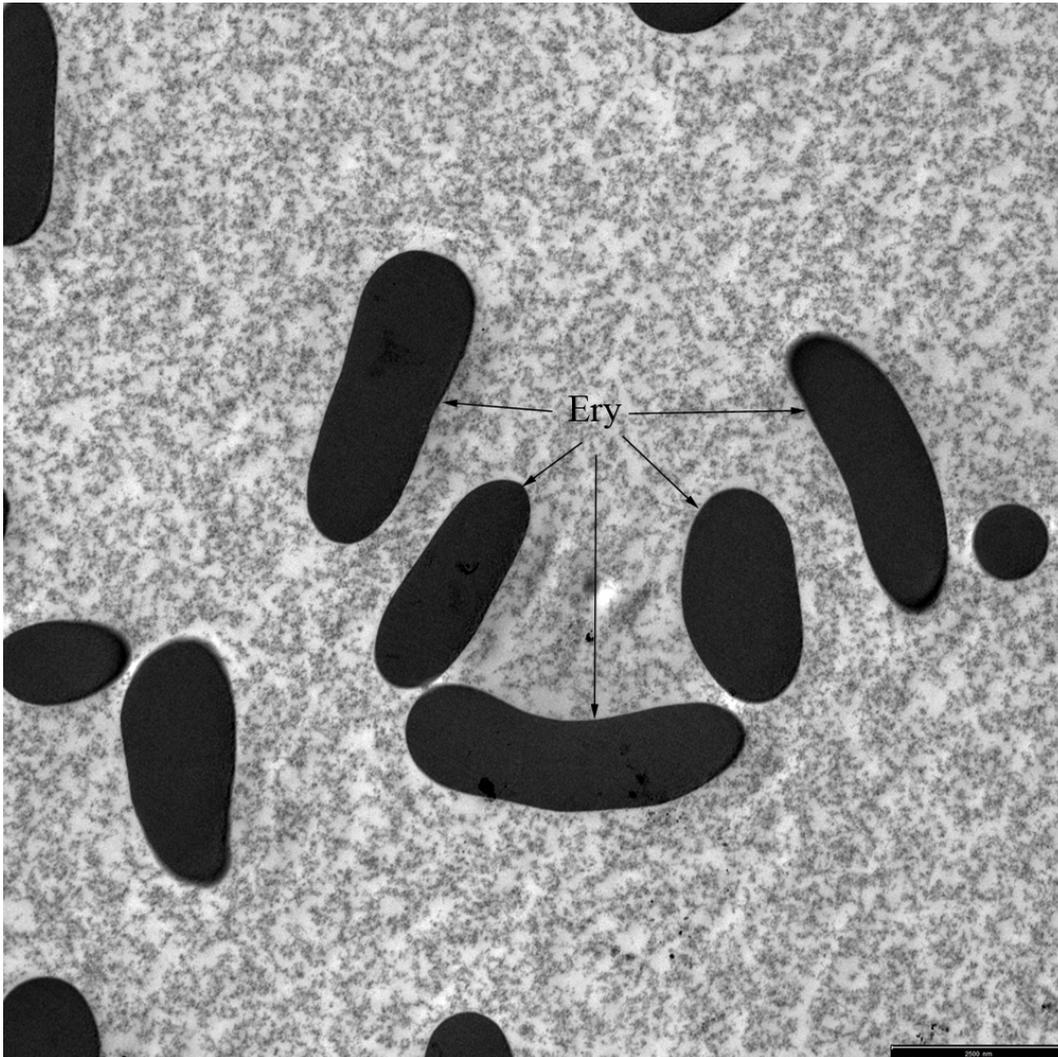


Abbildung 32: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Erythrozyten

Man erkennt das kernlose homogene Zytoplasma der Erythrozyten (Ery).
SB = 2,5 μ m

2.3. Thrombozyten

Thrombozyten finden sich in den Proben meist in Gruppen zusammengelagert. Sie variieren in Größe und Form stark. Meist sind sie bei der Ziege von rund-ovaler Gestalt. Im Zytoplasma finden sich am häufigsten die α -Granula, welche eine elektronendichte Struktur aufweisen. Seltener sich die „dense bodies“ zu beobachten, die durch ihren sehr dunklen exzentrischen Kern leicht zu identifizieren sind. Als ein weiterer Bestandteil des Zytoplasmas der Blutplättchen sind die Vakuolen und Glykogen auszumachen, ein Zellkern fehlt dagegen. Die Zellmembran ist glatt und ohne Ausziehungen.

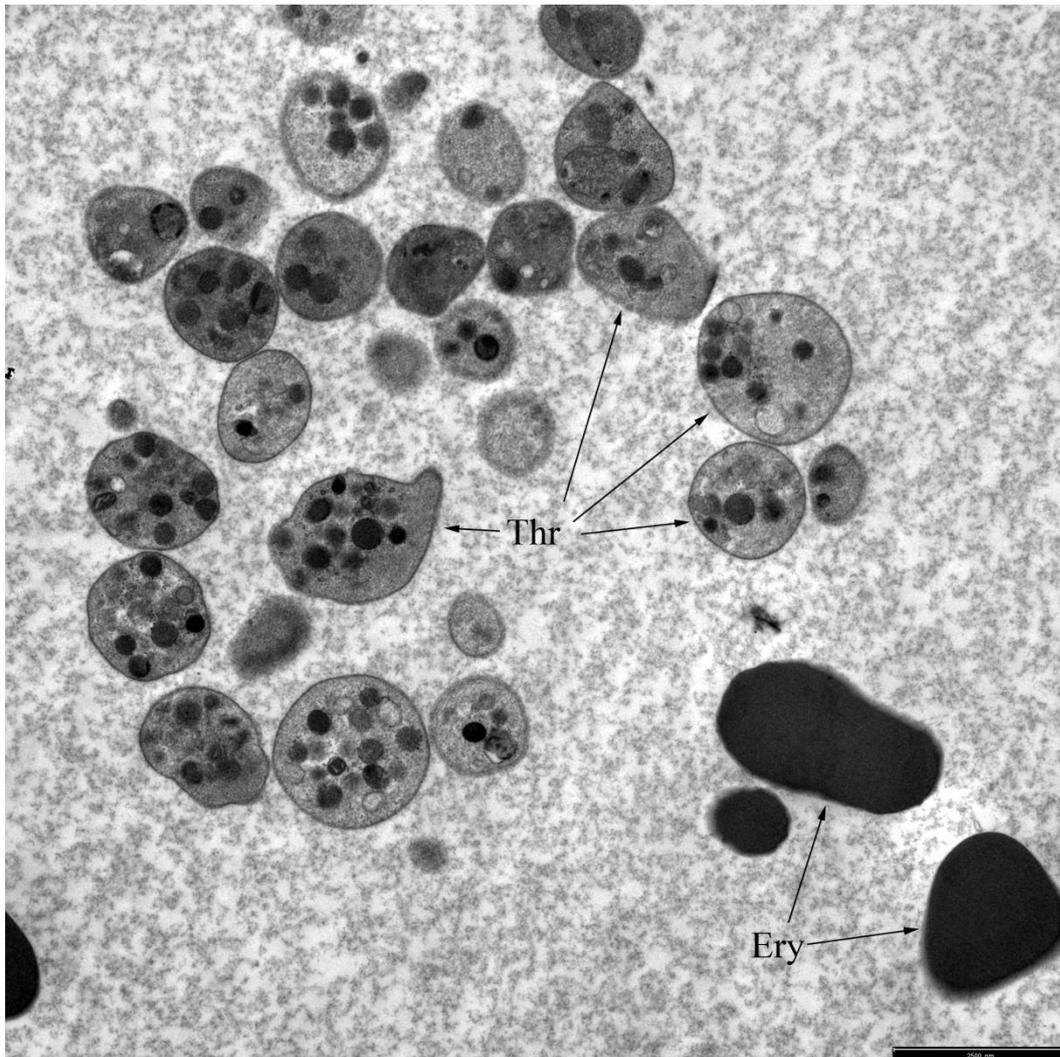


Abbildung 33: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten

Die Thrombozyten (Thr) liegen häufig in Gruppen. Desweiteren sind in dieser Aufnahme Erythrozyten (Ery) zu sehen.

SB = 2,5 μ m

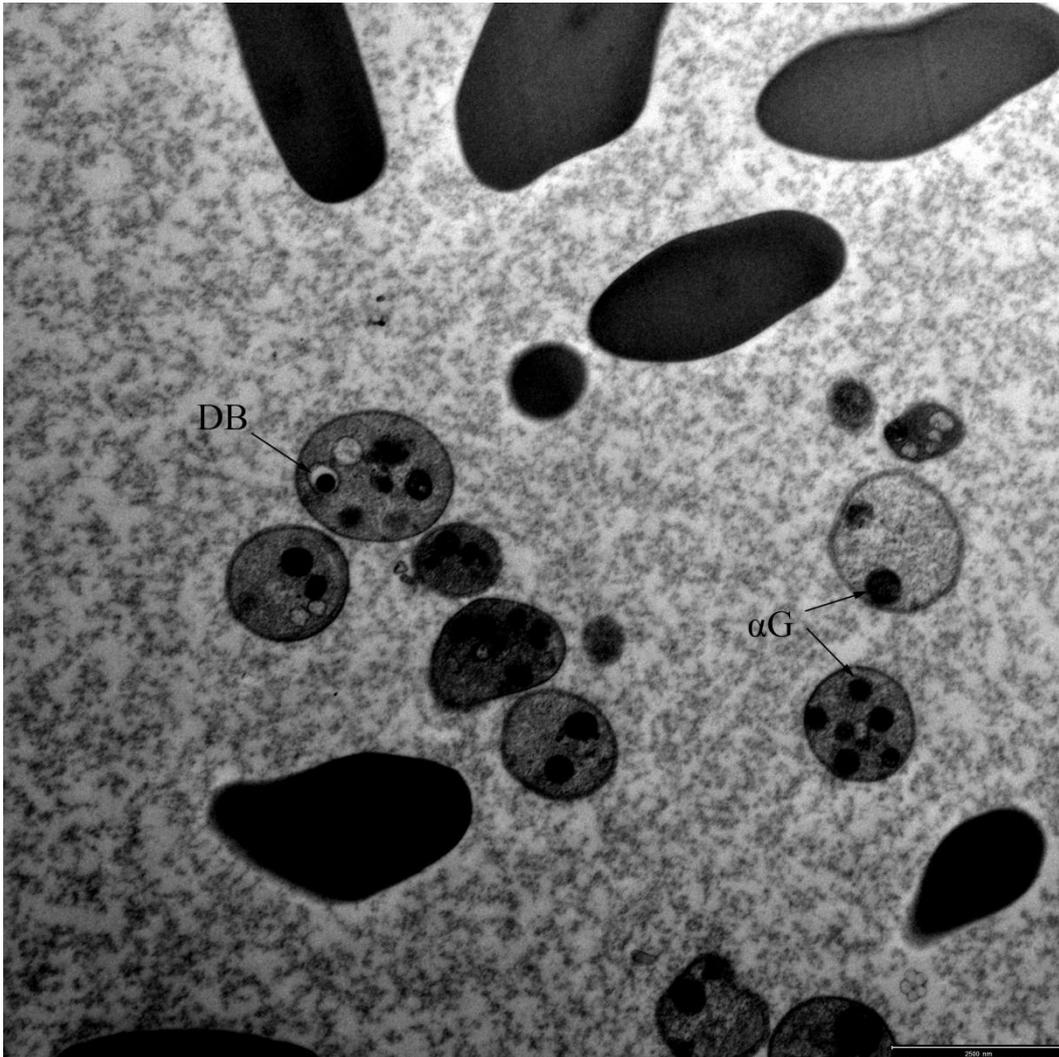


Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten

Im Zytoplasma der Thrombozyten befinden sich „dense bodies“ (DB) und zahlreiche α -Granula (α G).
SB = 2,5 μ m

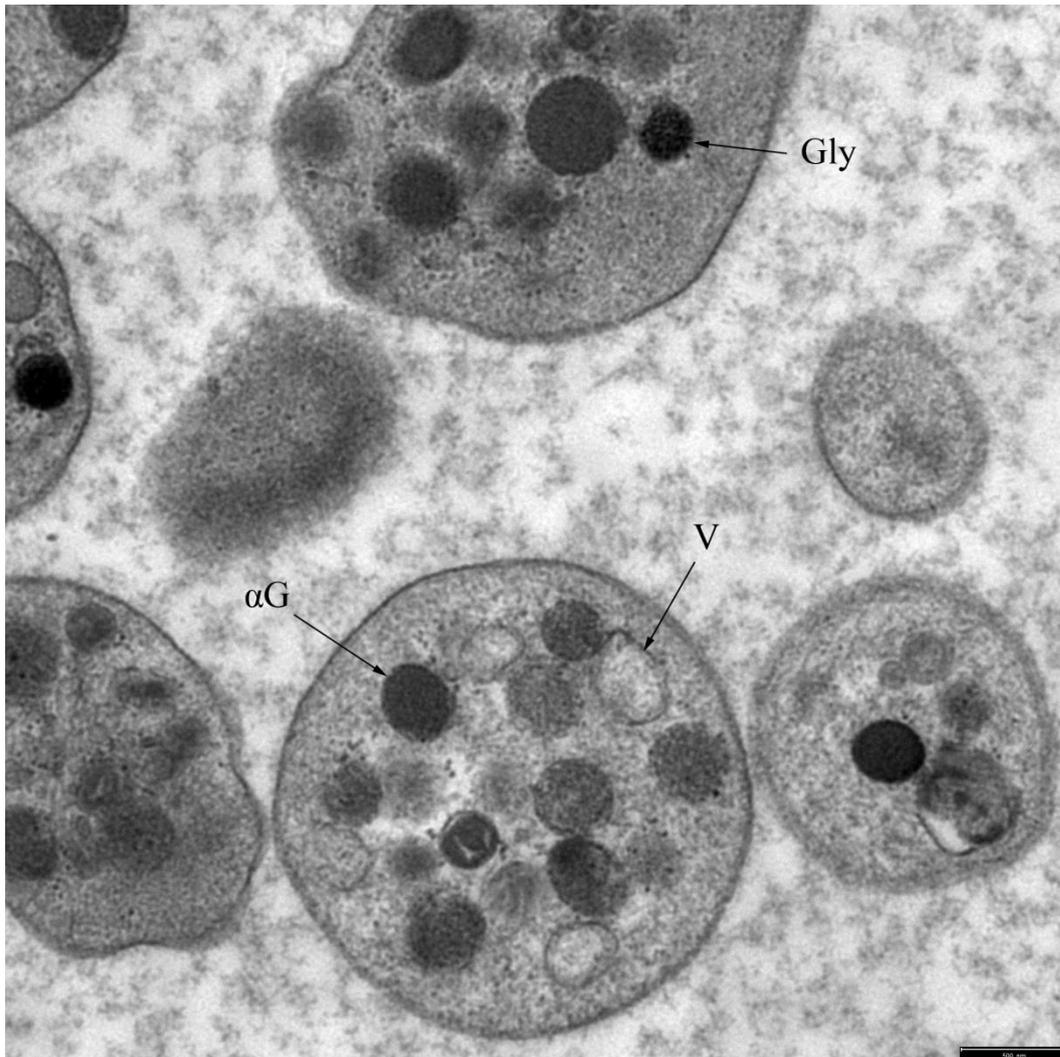


Abbildung 35: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten

Im kernlosen Zytoplasma der Thrombozyten sind neben den α -Granula (α G) auch Vakuolen (V) und Glykogen (Gly) zu beobachten.
SB = 0,5 μ m

3. Glykohistochemische Untersuchungen

Um die Bindungsintensität der unterschiedlichen Lektine zu ermitteln, wurden die Ausstriche von 18 Blutproben der Ziegen mit dem jeweiligen Lektin inkubiert. Zur Identifikation der Blutzellen wurden die Objektträger mit DAPI-haltigem Einschlussmedium eingedeckelt, welches die Zellkerne deutlich blau anfärbt. Bei der Auswertung der Lektin histochemie wurde zwischen einer schwach positiven (+), deutlich positiven (++), stark positiven (+++) und einer negativen (0) Reaktion unterschieden. Die Erythrozyten waren aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz bei jeder Probe, also auch bei negativen Reaktionen sichtbar. Basophile Granulozyten waren nur sehr selten sicher zu identifizieren.

3.1. FITC-markierte Lektine

3.1.1. Bindung von Concanavalin Agglutinin (ConA)

Bei fast allen Ausstrichen konnte eine positive Reaktion mit dem Lektin ConA nachgewiesen werden. Die Erythrozytenmembran reagierte meist stark positiv und auch das Zytoplasma färbte sich deutlich an. Die Zellmembran der Thrombozyten und der Lymphozyten zeigten ebenfalls eine deutlich positive Reaktion, wogegen das Zytoplasma meist nur schwach positiv reagierte. Sowohl bei den neutrophilen Granulozyten, als auch bei den eosinophilen Granulozyten konnte eine starke Bindung des Lektins an die Zellmembran und an die Granula im Zellinneren nachgewiesen werden. Das Zytoplasma ließ sich dagegen nur schwach anfärben. Auch bei den Monozyten war es die Zellmembran, die eine stärkere Reaktion als das Zytoplasma der Zellen hervorrief.

IV. Ergebnisse

Tabelle 15: Bindung von ConA an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	-	3	15
Zytoplasma	-	10	8	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	12	6
Granula	-	18	-	-
Lymphozyten				
Zellmembran	-	8	10	-
Zytoplasma	-	16	2	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	10	8
Granula	-	-	1	17
Zytoplasma	-	17	1	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	7	11
Granula	-	-	3	15
Zytoplasma	-	17	1	-
Monozyten				
Zellmembran	-	7	11	-
Zytoplasma	2	15	1	-

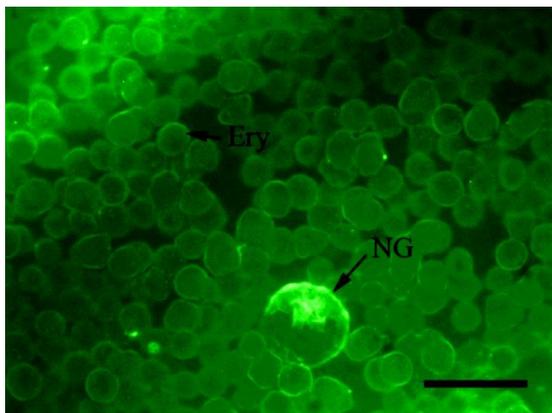


Abbildung 36: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von ConA

Die Membran der Erythrozyten (Ery) zeigt eine deutliche Bindung. ConA-FITC bindet sehr stark an Membran und die Granula der neutrophilen Granulozyten (NG).
SB = 10µm

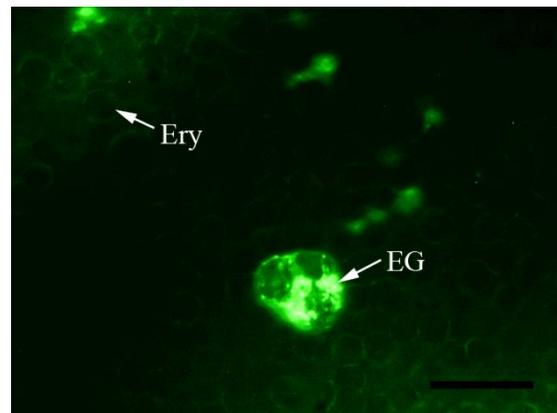


Abbildung 38: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von ConA

Die Membran der Erythrozyten (Ery) zeigt eine schwache Bindung. Die Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) reagieren stark positiv.
SB = 10µm

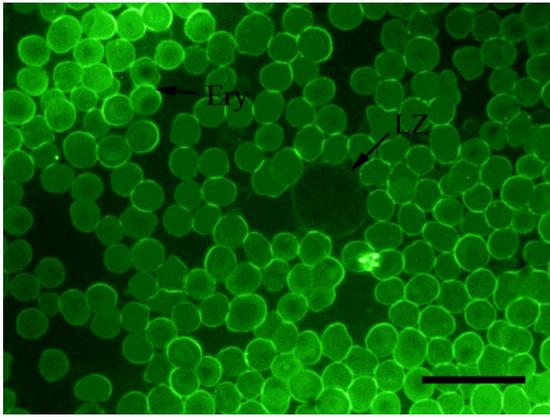


Abbildung 37: Lymphozyt; Bindung von ConA

Die Membran des Lymphozyten (LZ) ist schwach positiv. Das Zytoplasma der Erythrozyten (Ery) reagiert schwach, die Membran deutlich positiv.
SB = 10µm

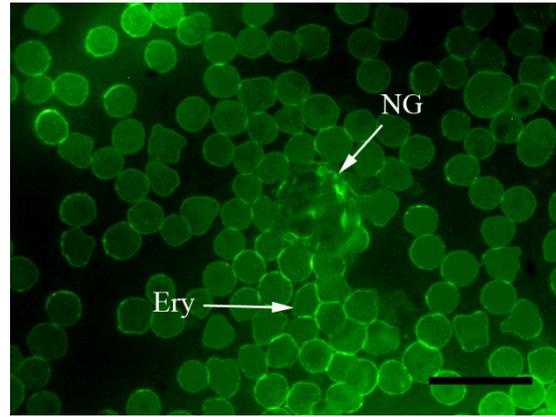


Abbildung 39: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von ConA

ConA-FITC bindet deutlich an die Granula des neutrophilen Granulozyten (NG). Die Erythrozytenmembran (Ery) reagiert ebenfalls deutlich.
SB = 10µm

3.1.2. Bindung von Lens culinaris Agglutinin (LCA)

Die Erythrozyten reagierten mit dem Lektin LCA durchwegs positiv, es konnte nur ein geringer Unterschied in der Intensität der Färbung zwischen Membran und Zytoplasma ausgemacht werden. Auch war bei den Thrombozyten, deren Reaktion schwach bis zum Teil stark war, nur schwer eine Differenzierung der einzelnen Zellbestandteile vorzunehmen. Die Lymphozyten ließen sich nur schwach anfärben, wobei das Zytoplasma deutlicher zu erkennen war als die Zellmembran. Die stärkste Reaktion zeigte sich bei den neutrophilen Granulozyten, deren Granula eine deutliche Fluoreszenz aufwiesen. Eine positive Bindung war auch bei den Granula der eosinophilen Granulozyten ersichtlich.

IV. Ergebnisse

Tabelle 16: Bindung von LCA an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	15	3	-
Zytoplasma	-	12	6	-
Thrombozyten				
Zellmembran	10	4	2	2
Granula	10	2	2	4
Lymphozyten				
Zellmembran	10	8	-	-
Zytoplasma	2	16	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	14	4	-
Granula	-	-	2	16
Zytoplasma	-	12	6	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	7	11	-	-
Granula	-	-	10	8
Zytoplasma	13	5	-	-
Monozyten				
Zellmembran	3	15	-	-
Zytoplasma	3	15	-	-

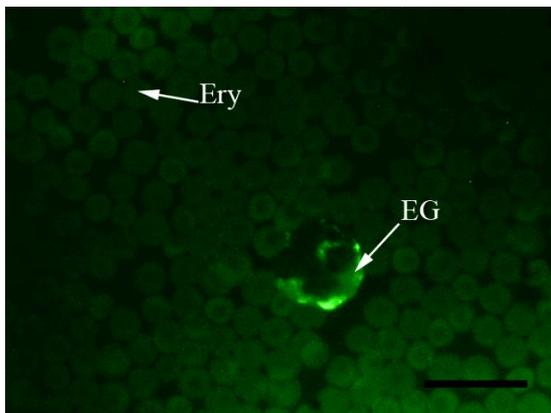


Abbildung 40: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von LCA

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) reagieren sehr stark mit dem Lektin. Das Zytoplasma der Erythrozyten (Ery) bindet dagegen nur schwach.
SB = 10µm

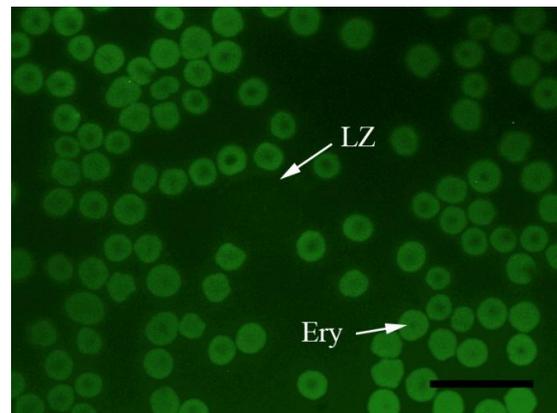


Abbildung 42: Lymphozyt; Bindung von LCA

Das Lektin bindet nur sehr schwach an die Membran des Lymphozyten (LZ). Das Zytoplasma der Erythrozyten (Ery) reagiert positiv.
SB = 10µm

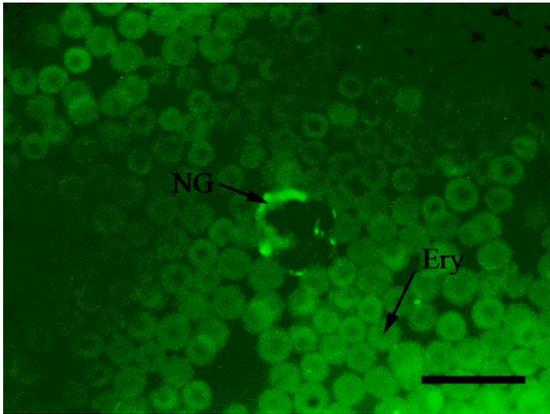


Abbildung 41: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von LCA

Die Granula des neutrophilen Granulozyten (NG) zeigen eine stark positive Reaktion mit dem Lektin. Die Reaktion des Zytoplasmas der Erythrozyten (Ery) ist ebenfalls positiv.
SB = 10µm

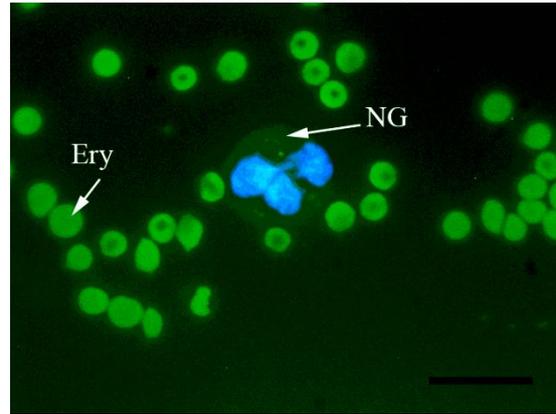


Abbildung 43: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von LCA

Die Reaktion des Zytoplasmas des neutrophilen Granulozyten (NG) ist nur schwach, wenige Granula binden deutlicher mit dem Lektin. Der Zellkern ist mit DAPI gefärbt. Die Erythrozyten (Ery) reagieren positiv.
SB = 10µm

3.1.3. Bindung von *Pisum sativum* Agglutinin (PSA)

Die Erythrozyten färbten sich durchwegs nur sehr schwach an, das Zytoplasma geringfügig deutlicher als die Zellmembran. Sowohl bei den eosinophilen, wie auch bei den neutrophilen Granulozyten war die deutlichste positive Reaktion zu erkennen, wobei die Granula am stärksten mit dem Lektin reagierten. Nur selten konnte eine Bindung an den Lymphozyten gefunden werden, die dann auch nur schwach positiv war. Die untersuchten Monozyten wiesen nur negative Bindungen von LCA-FITC auf.

IV. Ergebnisse

Tabelle 17: Bindung von PSA an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	11	7	-	-
Zytoplasma	-	3	15	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	17	1	-
Granula	-	3	15	-
Lymphozyten				
Zellmembran	12	5	1	-
Zytoplasma	11	7	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	10	8	-	-
Granula	-	4	12	2
Zytoplasma	-	11	7	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	5	2	-	-
Granula	-	5	2	-
Zytoplasma	1	6	-	-
Monozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-

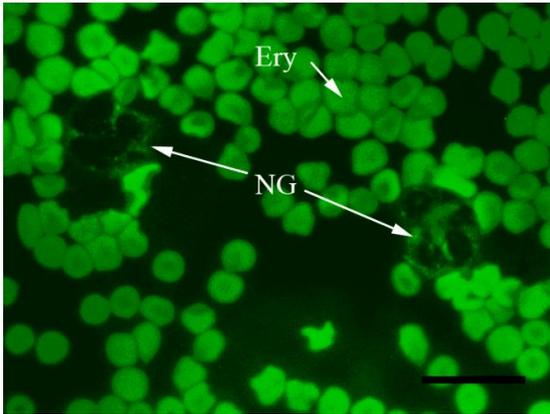


Abbildung 44: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von PSA

Die Granula der neutrophilen Granulozyten (NG) zeigten die deutlichste positive Reaktion. Die Erythrozyten (Ery) banden ebenfalls teils deutlich PSA-FITC.
SB = 10µm

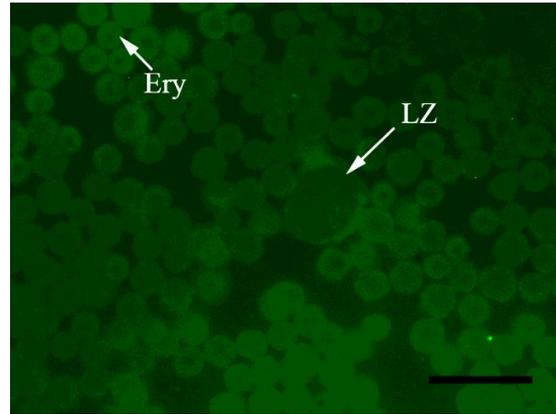


Abbildung 46: Lymphozyt; Bindung von PSA

Das Zytoplasma der Lymphozyten (LZ) reagierte meist nur sehr schwach mit dem Lektin. Etwas stärkere Reaktionen zeigte die Membran dieser Blutzellen. Die Erythrozyten (Ery) färbten sich mit PSA-FITC nur schwach an.
SB = 10µm

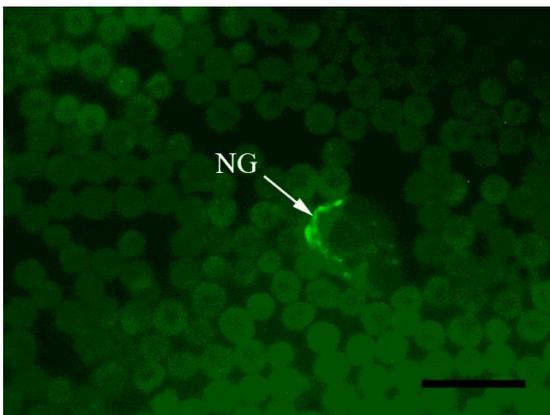


Abbildung 45: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von PSA

Die Granula des neutrophilen Granulozyten (NG) reagieren stark positiv mit dem Lektin. Das Zytoplasma dieser Zellen zeigt eine schwache Reaktion.
SB = 10µm

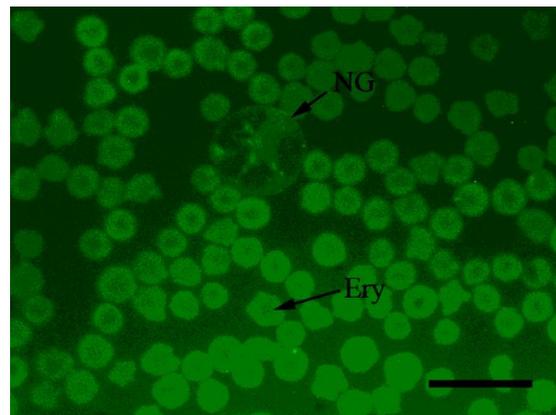


Abbildung 47: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von PSA

Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten (NG) reagiert schwächer positiv als die Granula. Das Zytoplasma der Erythrozyten (Ery) zeigt ebenfalls eine positive Reaktion.
SB = 10µm

3.1.4. Bindung von Peanut Agglutinin (PNA)

In keiner der untersuchten Ausstriche, konnte eine deutlich positive Reaktion nachgewiesen werden. Die Erythrozyten zeigten nur Autofluoreszenz. Vereinzelt ließ sich im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten eine sehr schwache Bindung beobachten.

IV. Ergebnisse

Tabelle 18: Bindung von PNA an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	4	14	-	-
Zytoplasma	4	14	-	-
Thrombozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Granula	18	-	-	-
Lymphozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Zytoplasma	18	-	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Granula	18	-	-	-
Zytoplasma	16	2	-	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	12	-	-	-
Granula	12	-	-	-
Zytoplasma	12	-	-	-
Monozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Zytoplasma	18	-	-	-

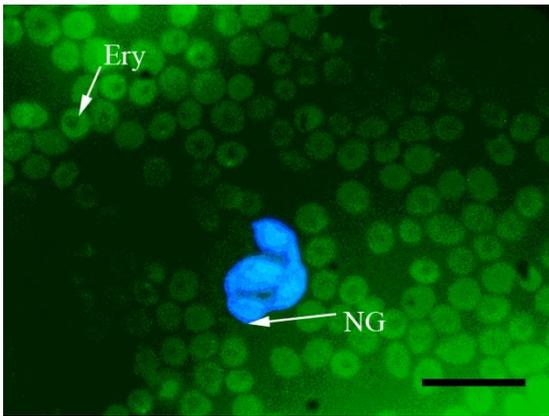


Abbildung 48: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von PNA

Im Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten (NG) lässt sich eine sehr schwache Reaktion mit dem Lektin beobachten. Die Erythrozyten (Ery) reagieren aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz ebenfalls positiv. Der Zellkern ist mit DAPI gefärbt. SB = 10µm

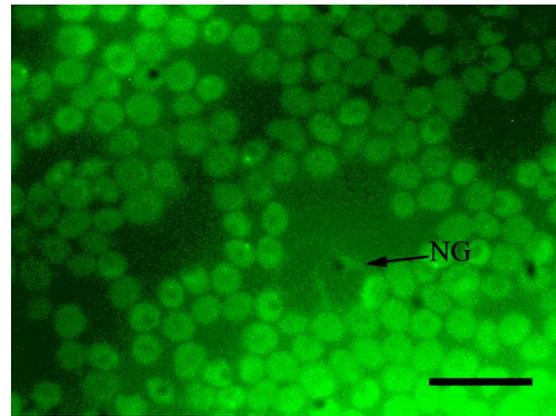


Abbildung 49: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von PNA

Auch hier bindet das Lektin an das Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten (NG) nur sehr schwach. SB = 10µm

3.1.5. Bindung von *Ricinus communis* Agglutinin (RCA)

Bei allen Blutproben konnten positive Reaktionen nachgewiesen werden, die jedoch in ihrer Intensität selten stark ausgeprägt waren. Die stärkste Bindung konnte an den Granulozyten beobachtet werden. Vor allem die Granula der Neutrophilen reagierten deutlich positiv. Die Erythrozyten reagierten mit Membran und Zytoplasma meist nur schwach. Zwischen den roten Blutkörperchen konnte man zum Teil starke Bindungen der Thrombozyten ausmachen. Lymphozyten und Monozyten waren in den untersuchten Proben nicht reaktiv.

IV. Ergebnisse

Tabelle 19: Bindung von RCA an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	7	11	-
Zytoplasma	-	6	12	-
Thrombozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Granula	13	-	4	1
Lymphozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Zytoplasma	18	-	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	16	2	-
Granula	-	4	11	3
Zytoplasma	-	15	3	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	-	18	-	-
Granula	-	15	3	-
Zytoplasma	5	13	-	-
Monozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Zytoplasma	18	-	-	-

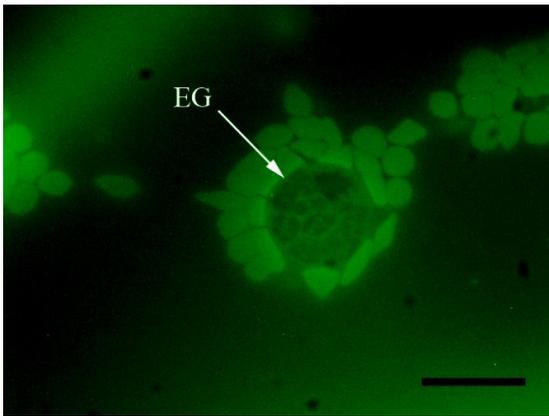


Abbildung 50: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von RCA

Das Zytoplasma und die Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) zeigen eine positive Reaktion mit dem Lektin.
SB = 10µm

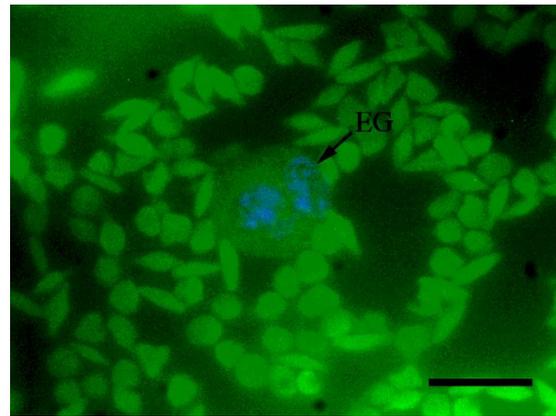


Abbildung 52: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von RCA

Der Zellkern ist mit DAPI gefärbt. Auch hier reagieren Granula und Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (EG) positiv.
SB = 10µm

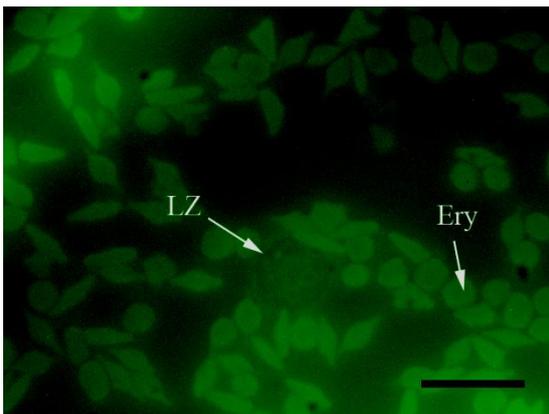


Abbildung 51: Lymphozyt; Bindung von RCA

Die Membran des Lymphozyten (LZ) reagiert stärker positiv mit dem Lektin als dessen Zytoplasma. Die Erythrozyten (Ery) zeigen eine stark positive Reaktion.
SB = 10µm

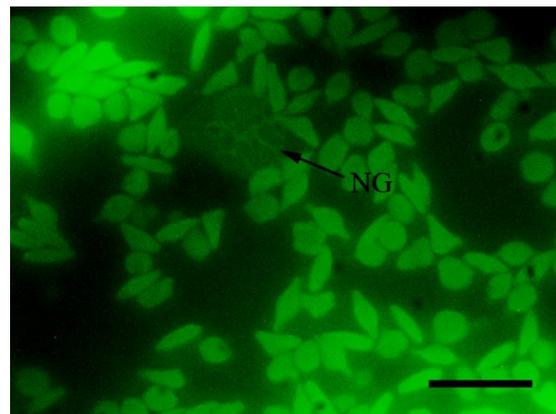


Abbildung 53: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von RCA

Das Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten bindet schwach mit dem Lektin.
SB = 10µm

3.1.6. Bindung von Wheat germ Agglutinin (WGA)

Die Erythrozyten zeigten bei ihrer Beurteilung eine sehr starke Bindung des Lektins an die Zellmembran. Eine weitere sehr deutliche Reaktion zeigten die Granula der Granulozyten, deren Zytoplasma und Membran etwas weniger intensiv reagierten. Bei den Thrombozyten waren es ebenfalls die Granula, die sich am stärksten anfärben ließen. Die Bindungsintensität der Lymphozyten und Monozyten war sehr schwach und zum Teil nicht nachweisbar.

IV. Ergebnisse

Tabelle 20: Bindung von WGA an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	-	14	4
Zytoplasma	-	17	1	-
Thrombozyten				
Zellmembran	13	-	-	-
Granula	-	1	4	8
Lymphozyten				
Zellmembran	11	7	-	-
Zytoplasma	11	7	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	15	3	-
Granula	-	-	2	16
Zytoplasma	-	18	-	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	-	9	-	-
Granula	-	-	1	8
Zytoplasma	-	9	-	-
Monozyten				
Zellmembran	14	1	-	-
Zytoplasma	14	1	-	-

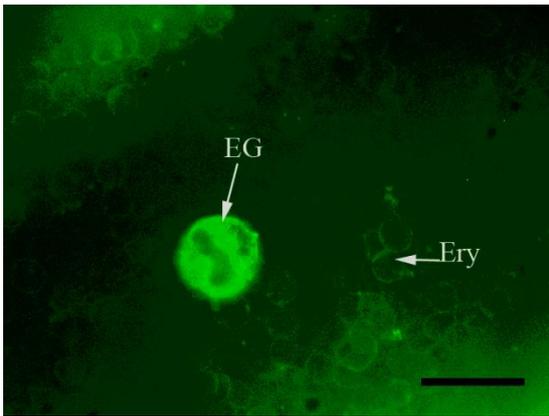


Abbildung 54: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von WGA

Die Granula und das Zytoplasma des eosinophilen Granulozyten (EG) zeigten eine sehr stark positive Reaktion. Auch die Membran der Erythrozyten (Ery) reagiert deutlich mit dem Lektin.
SB = 10µm

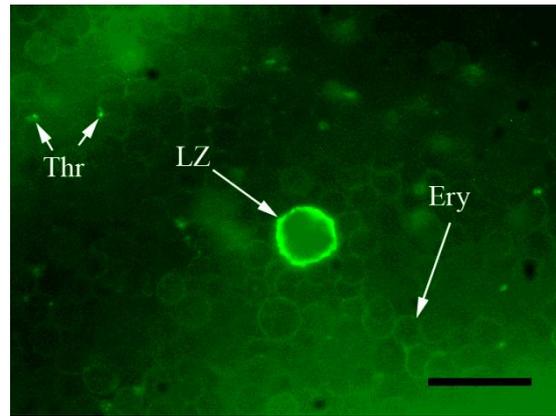


Abbildung 56: Lymphozyt; Bindung von WGA

Die Membran des Lymphozyten (LZ) bindet das Lektin sehr intensiv. Auch die Membran der Erythrozyten (Ery) und die Thrombozyten (Thr) reagieren positiv.
SB = 10µm

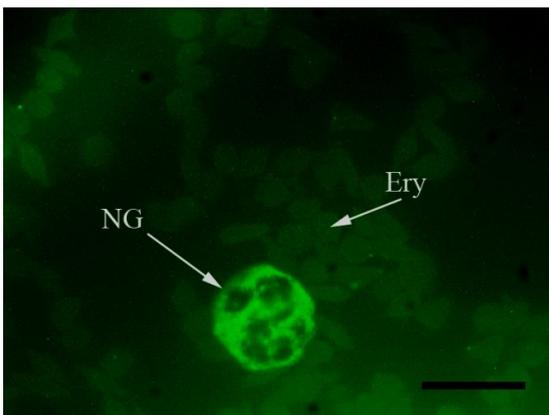


Abbildung 55: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von WGA

Die Reaktion der Granula des neutrophilen Granulozyten (NG) ist deutlich positiv. Die Erythrozyten (Ery) reagieren nur schwach.
SB = 10µm

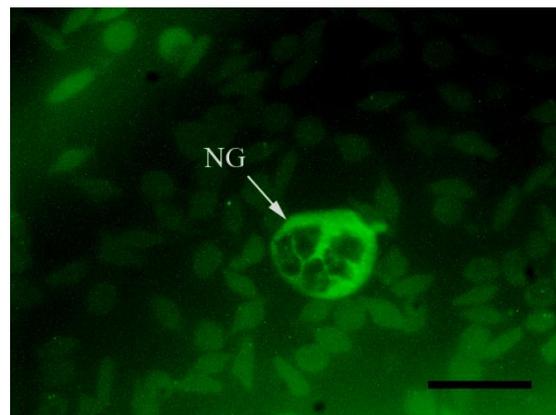


Abbildung 57: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von WGA

Auch dieser neutrophile Granulozyt (NG) zeigt eine stark positive Bindungsreaktion der Granulozyten mit dem Lektin.
SB = 10µm

3.1.7. Bindung von Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs)

Das Lektin zeigte an der Erythrozytenmembran eine starke Bindung, als an dem Zytoplasma der roten Blutkörperchen. Eine schwache Reaktion konnte bei den Lymphozyten und Monozyten beobachtet werden, bei einem großen Teil dieser Blutzellen konnte jedoch keine Bindung nachgewiesen werden. Die deutlichste Intensität der Lektinbindung hatten die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Speziell die Granula reagierten stark positiv. Auch die Thrombozyten waren zum Teil deutlich positiv.

IV. Ergebnisse

Tabelle 21: Bindung von WGAs an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	1	17	-
Zytoplasma	5	8	5	-
Thrombozyten				
Zellmembran	11	7	-	-
Granula	-	4	5	9
Lymphozyten				
Zellmembran	17	1	-	-
Zytoplasma	11	7	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	14	4	-
Granula	-	-	2	16
Zytoplasma	-	1	17	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	2	7	-	-
Granula	-	-	1	8
Zytoplasma	-	4	5	-
Monozyten				
Zellmembran	15	3	-	-
Zytoplasma	15	3	-	-

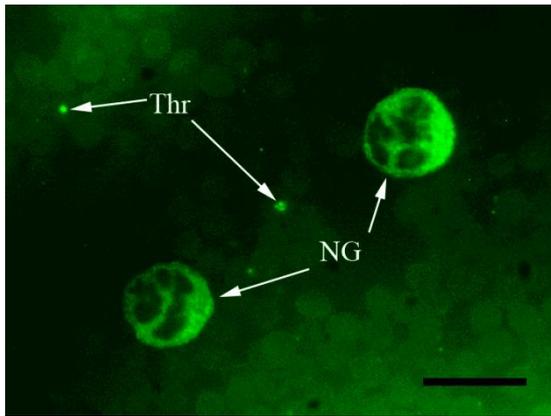


Abbildung 58: Neutrophile Granulozyten; Bindung von WGAs

Die Granula der neutrophilen Granulozyten (NG) reagieren sehr stark mit dem Lektin. Auch die Thrombozyten (Thr) zeigen eine deutlich positive Reaktion.
SB = 10µm

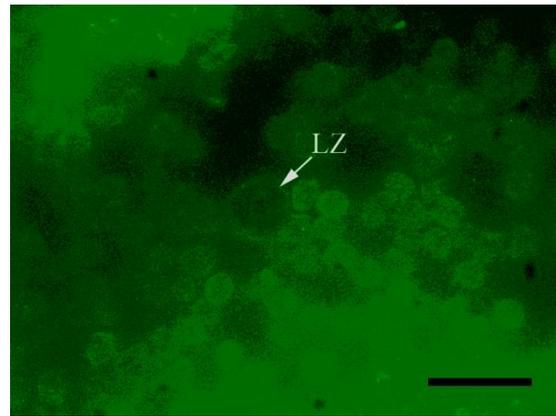


Abbildung 60: Lymphozyt; Bindung von WGAs

Die Membran des Lymphozyten (LZ) bindet deutlich mit dem Lektin. Das Zytoplasma der Zellen reagiert nur sehr schwach.
SB = 10µm

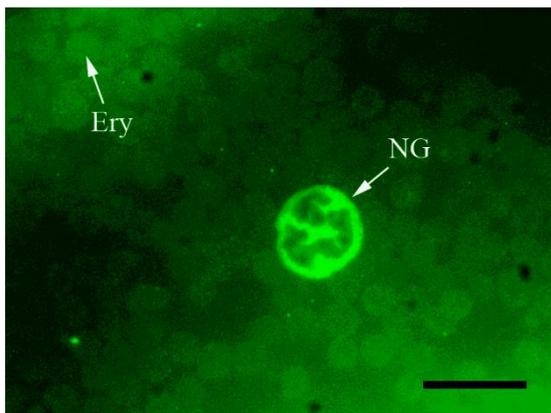


Abbildung 59: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von WGAs

An den Granula des neutrophilen Granulozyten (NG) ist eine stark positive Reaktion zu beobachten. Die Erythrozyten (Ery) reagieren hingegen nur schwach.
SB = 10µm

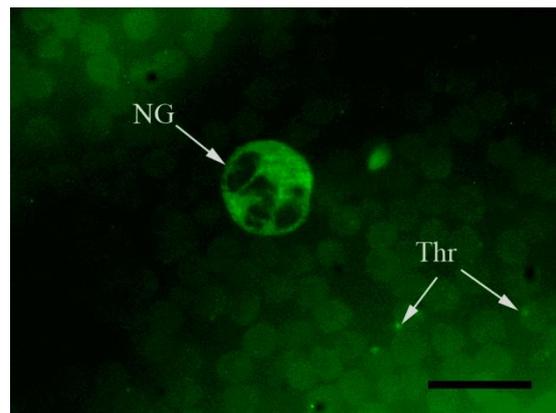


Abbildung 61: Thrombozyten; Bindung von WGAs

Auch hier lässt sich eine starke Bindungsreaktion der Granula der neutrophilen Granulozyten (NG) erkennen. Die Thrombozyten (Thr) reagieren ebenfalls positiv.
SB = 10µm

3.1.8. Bindung von *Griffonia simplicifolia* Agglutinin (GSL-1)

Bei den meisten Blutzellen konnte keine positive Reaktion mit dem Lektin festgestellt werden. Wenn jedoch eine Bindung nachgewiesen werden konnte, so war diese nur schwach positiv. Dieses Ergebnis konnte bei den Erythrozyten und den neutrophilen Granulozyten an Zellmembran und Zytoplasma beobachtet werden. Vereinzelt konnten stark positive Thrombozyten gefunden werden.

IV. Ergebnisse

Tabelle 22: Bindung von GSL-1 an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	9	9	-	-
Zytoplasma	1	17	-	-
Thrombozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Granula	11	-	4	3
Lymphozyten				
Zellmembran	17	1	-	-
Zytoplasma	17	1	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	5	13	-	-
Granula	18	-	-	-
Zytoplasma	4	14	-	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	9	9	-	-
Granula	18	-	-	-
Zytoplasma	9	9	-	-
Monozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Zytoplasma	18	-	-	-

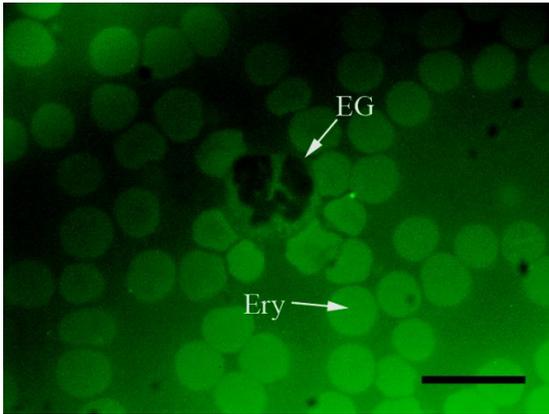


Abbildung 62: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von GSL-1

Das Zytoplasma und die Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) reagierten mit dem Lektin positiv. Auch das Zytoplasma der Erythrozyten (Ery) färbt sich deutlich an.
SB = 10µm

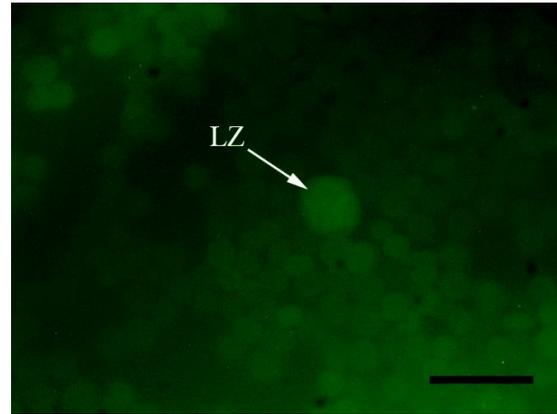


Abbildung 64: Lymphozyt; Bindung von GSL-1

Das Lektin GSL-1 bindet schwach an das Zytoplasma des Lymphozyten (LZ).
SB = 10µm

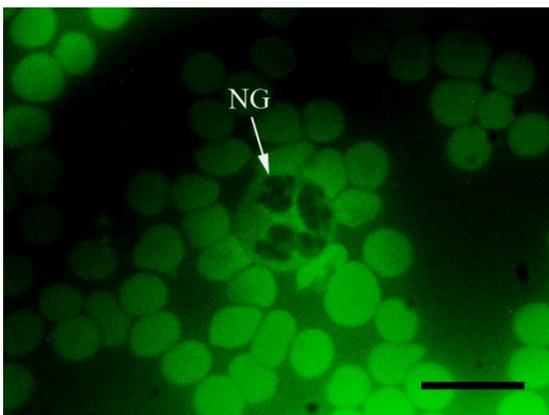


Abbildung 63: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von GSL-1

Das Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten (NG) zeigt eine positive Bindungsreaktion.
SB = 10µm

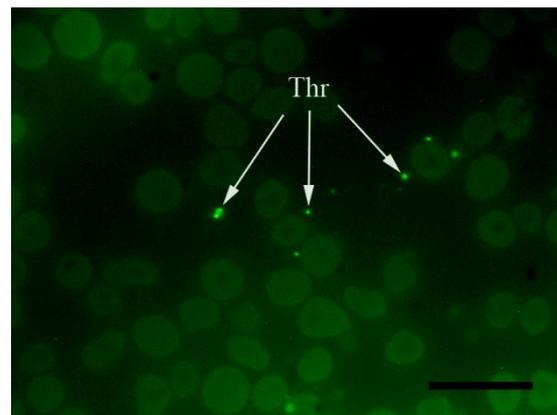


Abbildung 65: Thrombozyten; Bindung von GSL-1

Die Thrombozyten (Thr) reagieren sehr stark mit dem Lektin.
SB = 10µm

3.1.9. Bindung von Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)

Bei den Erythrozyten konnten nur schwach bis mäßig positive Bindungen mit dem Lektin nachgewiesen werden. Aber auch ein Teil der roten Blutkörperchen reagierte negativ. Alle anderen Blutzellen gingen keine Bindung mit DBA ein.

IV. Ergebnisse

Tabelle 23: Bindung von DBA an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	14	4	-	-
Zytoplasma	2	16	-	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Lymphozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Zytoplasma	18	-	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Granula	18	-	-	-
Zytoplasma	18	-	-	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	12	-	-	-
Granula	12	-	-	-
Zytoplasma	12	-	-	-
Monozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Zytoplasma	18	-	-	-

3.1.10. Bindung von *Saphora japonica* Agglutinin (SJA)

Die Erythrozyten reagierten in allen untersuchten Präparaten positiv, wobei das Zytoplasma eine deutlichere Reaktion zeigte als die Zellmembran. Die übrigen Blutzellen reagierten sehr wechselhaft mit dem Lektin. So konnten bei den Granula der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowohl stark positive, als auch sehr schwache Bindungen nachgewiesen werden. Die Membran der Lymphozyten zeigte ebenfalls zum Teil intensive Reaktionen. Bindungen des Lektins an Monozyten oder Thrombozyten konnten keine gefunden werden.

IV. Ergebnisse

Tabelle 24: Bindung von SJA an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	18	-	-
Zytoplasma	-	4	14	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Lymphozyten				
Zellmembran	2	12	3	1
Zytoplasma	10	8	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	5	4	9	-
Granula	-	6	2	10
Zytoplasma	-	14	4	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	-	7	-	-
Granula	-	-	3	4
Zytoplasma	-	7	-	-
Monozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-

IV. Ergebnisse

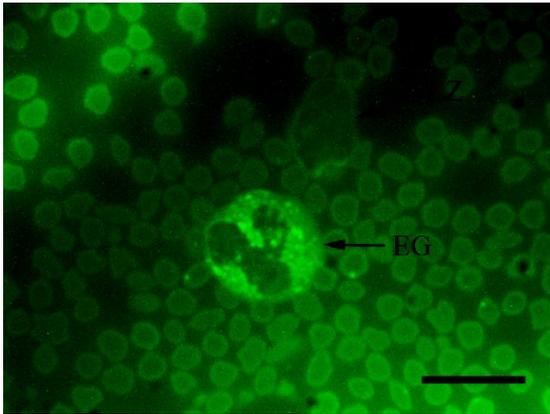


Abbildung 66: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von SJA

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) zeigen eine sehr intensive Reaktion mit dem Lektin. Die Membran des Lymphozyten (LZ) reagiert stärker als das Zytoplasma der Zelle.
SB = 10µm

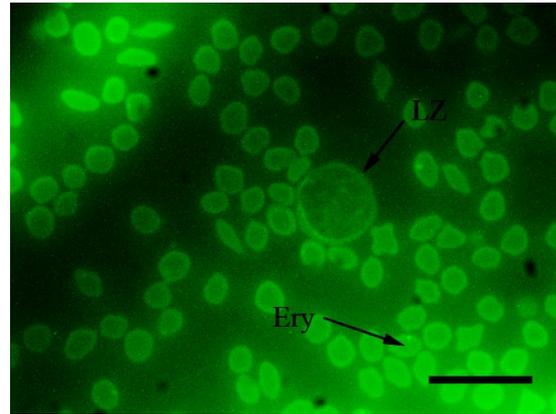


Abbildung 68: Lymphozyt; Bindung von SJA

Auch hier ist eine starke Bindungsreaktion der Zellmembran des Lymphozyten (LZ) zu beobachten. Das Zytoplasma bindet hingegen nur schwach an das Lektin.
SB = 10µm

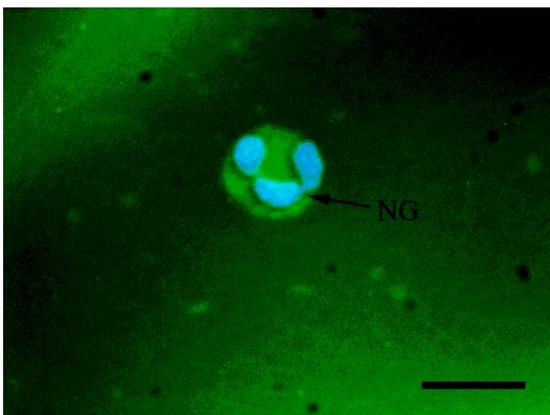


Abbildung 67: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von SJA

Das Zytoplasma und die Granula des neutrophilen Granulozyten (NG) reagieren stark positiv. Der Zellkern färbt sich durch DAPI blau.
SB = 10µm

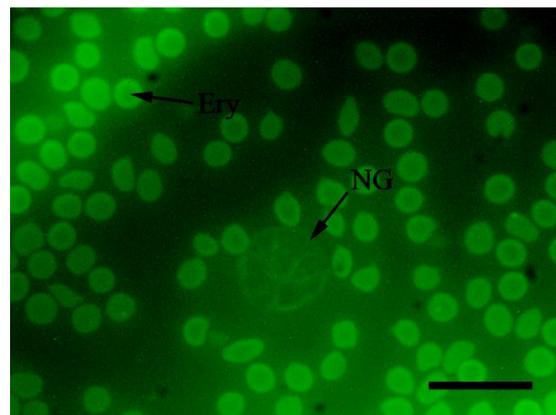


Abbildung 69: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von SJA

Das Zytoplasma und die Zellmembran des neutrophilen Granulozyten (NG) reagieren hier nur sehr schwach mit dem Lektin. Die Erythrozyten (Ery) reagieren deutlich positiv.
SB = 10µm

3.1.11. Bindung von Soybean Agglutinin (SBA)

Die Bindung des Lektins SBA an Erythrozyten konnte, unterschiedlich ausgeprägt, bei jedem Blutausschlag nachgewiesen werden. Sonst waren oftmals nur negative Bindungsreaktionen der übrigen Blutzellen zu beobachten. Nur vereinzelt reagierten die Granula der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, sowie die Zellmembran und das Zytoplasma der Lymphozyten, deutlich mit dem Lektin. Selten zeigten die Granula der Thrombozyten eine positive Reaktion.

Tabelle 25: Bindung von SBA an die Blutzellen der Ziege

	Stärke der Reaktionen			
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	17	-	-
Zytoplasma	-	9	9	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	4	-
Lymphozyten				
Zellmembran	16	1	1	-
Zytoplasma	16	1	1	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	2	-	-
Granula	-	-	2	-
Zytoplasma	-	2	-	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	8	-	-	-
Granula	8	2	-	-
Zytoplasma	8	2	-	-
Monozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-

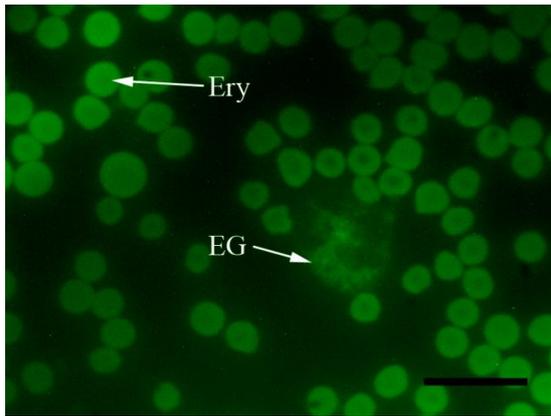


Abbildung 70: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von SBA

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) reagieren deutlich positiv mit dem Lektin. Die Erythrozyten (Ery) zeigen ebenfalls eine positive Reaktion.
SB = 10µm

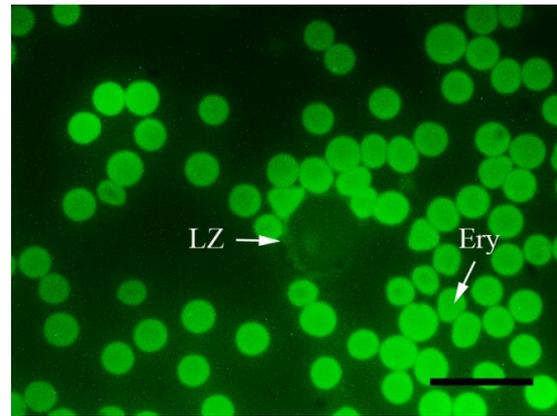


Abbildung 72: Lymphozyt; Bindung von SBA

Die Zellmembran des Lymphozyten (LZ) bindet das Lektin nur sehr schwach. Das Zytoplasma der Erythrozyten reagiert positiv.
SB = 10µm

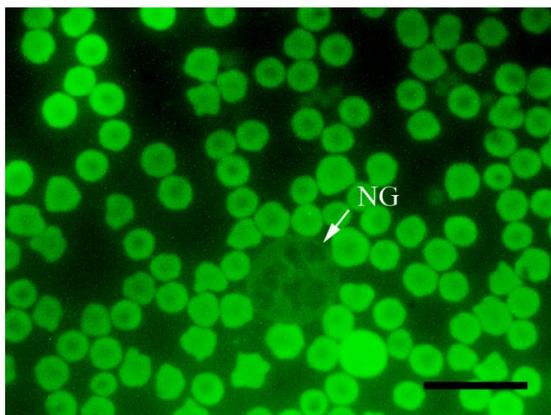


Abbildung 71: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von SBA

Das Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten reagiert deutlich mit dem Lektin.
SB = 10µm

3.1.12. Bindung von *Ulex europaeus* Agglutinin (UEA-1)

Bei fast allen Ausstrichen reagierten die Erythrozyten schwach bis mäßig positiv mit dem Lektin. Die Lymphozyten zeigten nur selten Bindungsstellen an der Zellmembran, an den Monozyten und Thrombozyten konnte keine positive Reaktion nachgewiesen werden. Das Lektin UEA-1 ging nur bei sehr wenigen Blutproben schwache Bindungen mit den Granula der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten ein.

IV. Ergebnisse

Tabelle 26: Bindung von UEA-1 an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	2	15	1	
Zytoplasma	2	15	1	
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Lymphozyten				
Zellmembran	15	1	2	-
Zytoplasma	17	1	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Granula	-	3	-	-
Zytoplasma	18	-	-	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	6	-	-	-
Granula	4	2	-	-
Zytoplasma	6	-	-	-
Monozyten				
Zellmembran	10	-	-	-
Zytoplasma	10	-	-	-

IV. Ergebnisse

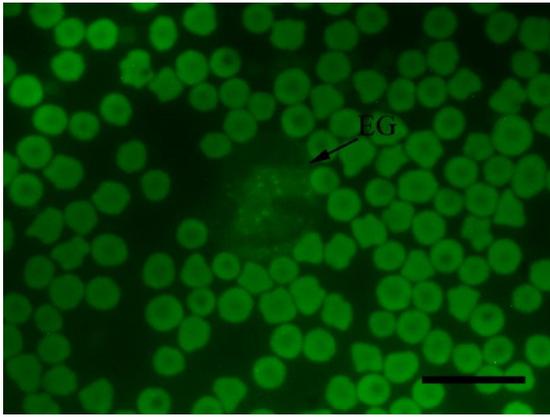


Abbildung 73: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von UEA-1

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) reagieren stark mit dem Lektin. Auch das Zytoplasma der Zelle weist eine deutliche Reaktion auf.
SB = 10µm

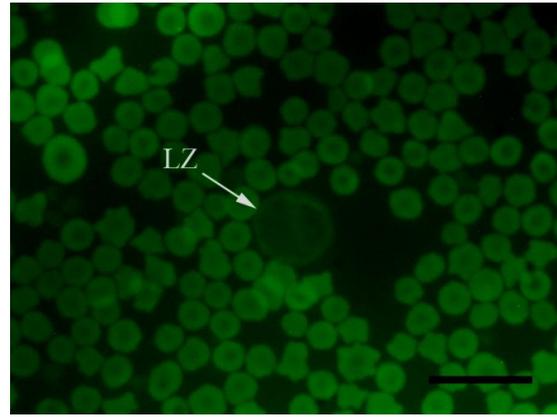


Abbildung 75: Lymphozyt; Bindung von UEA-1

Bei dem Lymphozyt (LZ) ist es vor allem die Zellmembran, die eine Bindung mit dem Lektin eingeht.
SB = 10µm

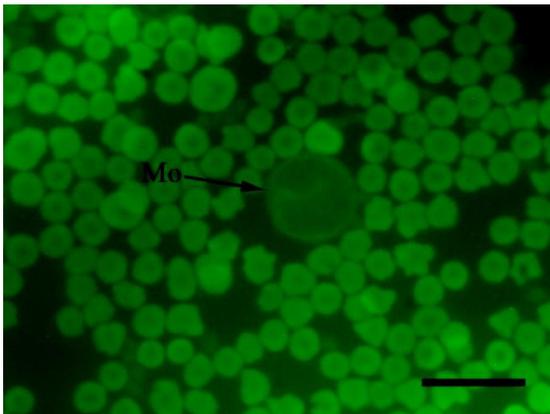


Abbildung 74: Monozyt; Bindung von UEA-1

Die Membran und das Zytoplasma des Monozyten (Mo) zeigen eine positive Reaktion mit dem Lektin.
SB = 10µm

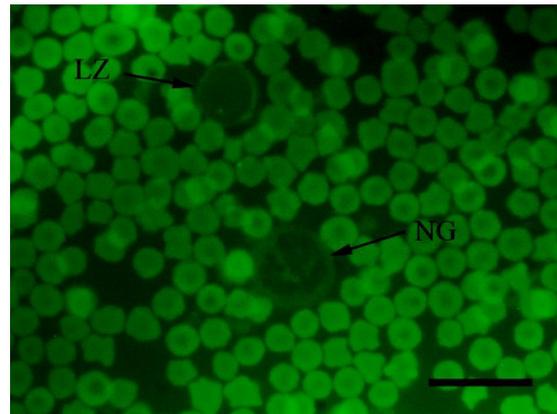


Abbildung 76: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von UEA-1

Sowohl die Zellmembran, als auch das Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten (NG) reagieren positiv. Der Lymphozyt (LZ) bindet vor allem mit der Zellmembran.
SB = 10µm

3.1.13. Bindung von Phaseolus vulgaris Agglutinin Erythro (PHA-E)

Das Zytoplasma der Erythrozyten färbte sich sehr unterschiedlich mit dem Lektin an. Meist war eine sehr schwache, doch selten auch eine deutlich positive Reaktion zu beobachten. Sehr starke Bindungen des Lektins konnte bei den Thrombozyten nachgewiesen werden. An den Monozyten und Lymphozyten konnten keine Bindungsstellen für das Lektin gefunden werden. Bei den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten ließ sich das Zytoplasma meist nur sehr schwach anfärben.

Tabelle 27: Bindung von PHA-E an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Zytoplasma	6	10	2	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	1	4
Lymphozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Zytoplasma	18	-	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Granula	15	3	-	-
Zytoplasma	5	13	-	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	4	-	-	-
Granula	4	-	-	-
Zytoplasma	1	3	-	-
Monozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-

IV. Ergebnisse

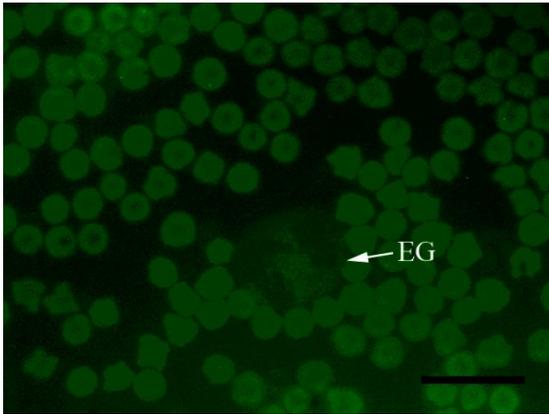


Abbildung 77: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von PHA-E

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) zeigen eine schwach positive Reaktion.
SB = 10µm

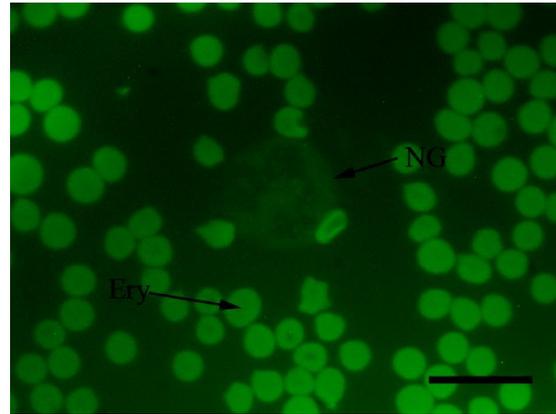


Abbildung 79: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von PHA-E

Das Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten (NG) reagiert schwach mit dem Lektin. Die Granula der Zelle sind deutlicher positiv.
SB = 10µm

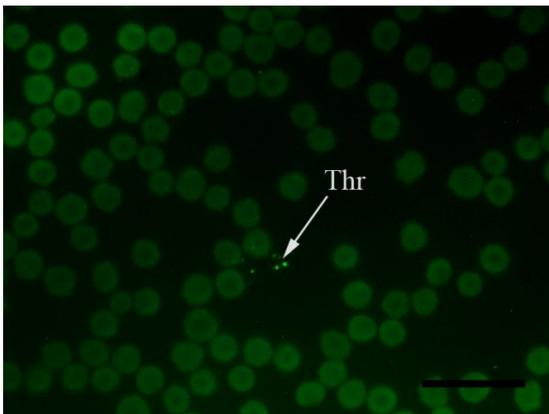


Abbildung 78: Thrombozyten; Bindung von PHA-E

Die Thrombozyten (Thr) reagieren hier stark positiv mit dem Lektin.

IV. Ergebnisse

3.1.14. Bindung von Phaseolus vulgaris Agglutinin Leuco (PHA-L)

Bei der Untersuchung mit diesem Lektin konnte nur eine schwache Eigenfluoreszenz nachgewiesen werden.

Tabelle 28: Bindung von PHA-L an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Lymphozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Monozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-

3.2. Biotinylierte Lektine

3.2.1. Bindung von *Maackia amurensis* Agglutinin I (MAA-I)

Bis auf die schwache Eigenfluoreszenz der Erythrozyten konnte nur bei zwei Tieren eine positive Reaktion der Thrombozyten festgestellt werden. Nur bei einem Blutausstrich reagierten die Lymphozyten mit dem Lektin. Alle anderen Untersuchungen verliefen negativ.

Tabelle 29: Bindung von MAA-I an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	9	9	-	-
Zytoplasma	9	9	-	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	1	1	-
Lymphozyten				
Zellmembran	-	1	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Monozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-

IV. Ergebnisse

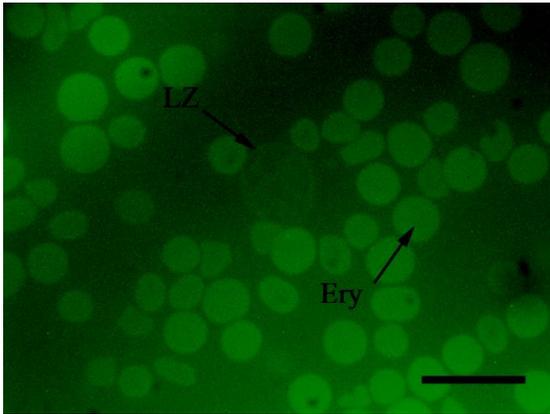


Abbildung 80: Lymphozyt; Bindung von MAA

Die Zellmembran des Lymphozyten (LZ) reagiert schwach mit dem Lektin. Die Erythrozyten (Ery) zeigen ebenfalls eine schwache Bindungsreaktion.
SB = 10µm

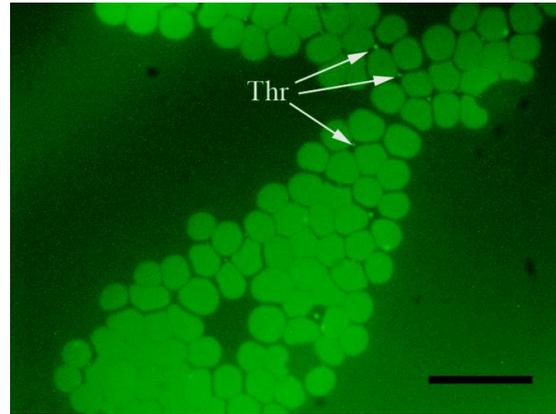


Abbildung 81: Thrombozyten; Bindung von MAA

Die Thrombozyten (Thr) reagieren stark positiv.
SB = 10µm

3.2.2. Bindung von Sambucus nigra Agglutinin (SNA)

An den Erythrozyten fanden sich bei allen untersuchten Proben zahlreiche Bindungsstellen an der Zellmembran und dem Zytoplasma. Die Granula der Thrombozyten reagierten sehr stark mit dem Lektin. Intensive Reaktionen konnten auch an den Lymphozyten beobachtet werden, wobei die Zellmembran mehr positive Ergebnisse erbrachte als das Zytoplasma. Bei den Granulozyten reagierten vor allem die Granula und das Zytoplasma.

Tabelle 30: Bindung von SNA an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	1	17	-
Zytoplasma	-	8	10	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	4	8
Lymphozyten				
Zellmembran	4	7	5	2
Zytoplasma	12	6	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	18	-	-	-
Granula	-	4	14	-
Zytoplasma	5	3	10	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	2	1	-	-
Granula	-	-	3	-
Zytoplasma	-	3	-	-
Monozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-

IV. Ergebnisse

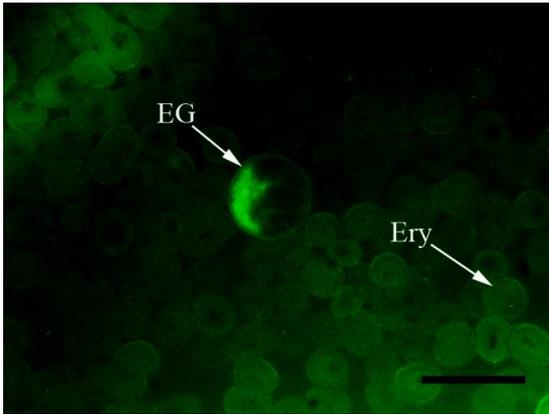


Abbildung 82: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von SNA

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) reagieren sehr stark positiv. Bei den Erythrozyten (Ery) ist die Reaktion der Zellmembran stärker, als die des Zytoplasmas.
SB = 10µm

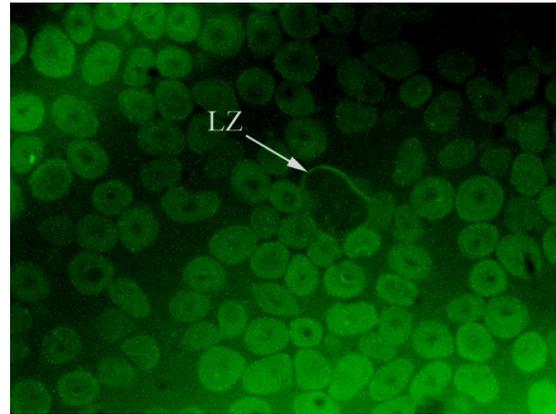


Abbildung 84: Lymphozyt; Bindung von SNA

Die Zellmembran des Lymphozyten (LZ) färbt sich stark durch die Bindung des Lektins.
SB = 10µm

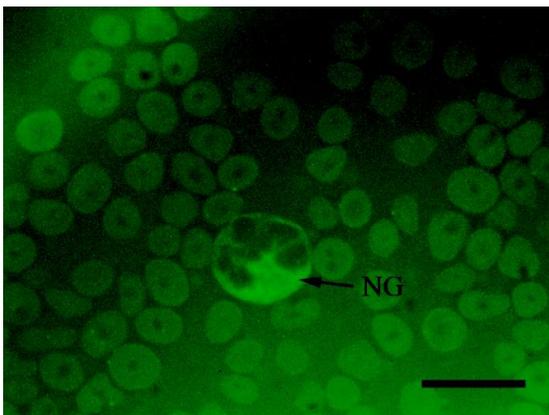


Abbildung 83: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von SNA

Sowohl die Granula, als auch das Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten (NG) weisen eine sehr starke Bindungsreaktion auf.
SB = 10µm

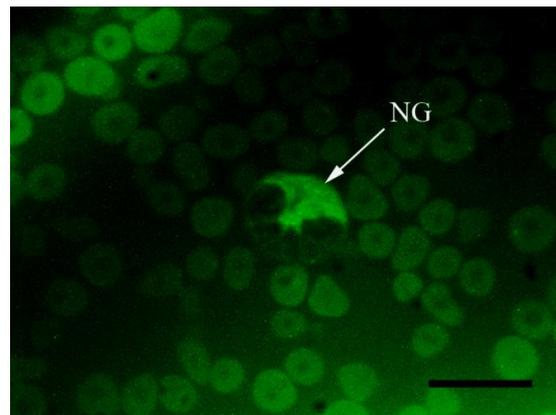


Abbildung 85: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von SNA

Hier reagieren die Granula des neutrophilen Granulozyten (NG) stärker als das Zytoplasma.
SB = 10µm

3.2.3. Bindung von *Viscum album* Agglutinin (VAA)

Das Lektin VAA zeigte nur sehr schwache Bindungen an die Blutzellen. An den Erythrozyten konnte nur unwesentlich mehr als deren Eigenfluoreszenz beobachtet werden. Die stärkste Reaktion zeigten die Lymphozyten, vor allem an deren Zellmembran konnten schwach positive Bindungen nachgewiesen werden. Granulozyten und Monozyten reagierten nur sehr selten deutlich sichtbar.

Tabelle 31: Bindung von VAA an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	15	3	-	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Lymphozyten				
Zellmembran	17	1	-	--
Zytoplasma	14	3	1	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	18	-		-
Granula	15	1	2	-
Zytoplasma	13	3	2	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	1-	4	-
Zytoplasma	-	-	5	-
Monozyten				
Zellmembran	10	-	-	-
Zytoplasma	8	1	1	-

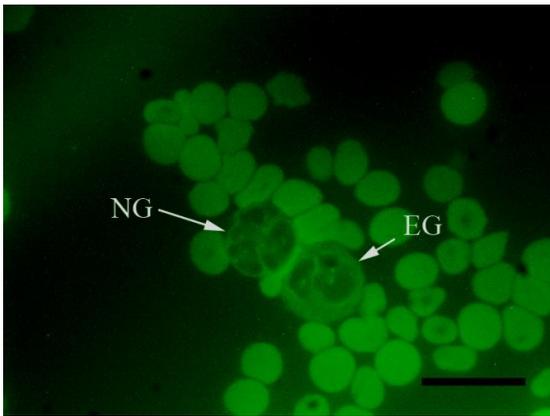


Abbildung 86: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von VAA

Sowohl bei dem eosinophilen Granulozyt (EG), als auch bei dem neutrophilen Granulozyt (NG), ist eine stark positive Reaktion auszumachen. SB = 10µm

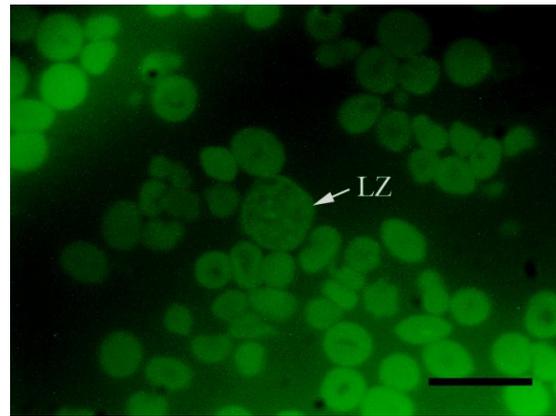


Abbildung 88: Lymphozyt; Bindung von VAA

Das Zytoplasma und die Zellmembran des Lymphozyten (LZ) binden deutlich VAA. SB = 10µm

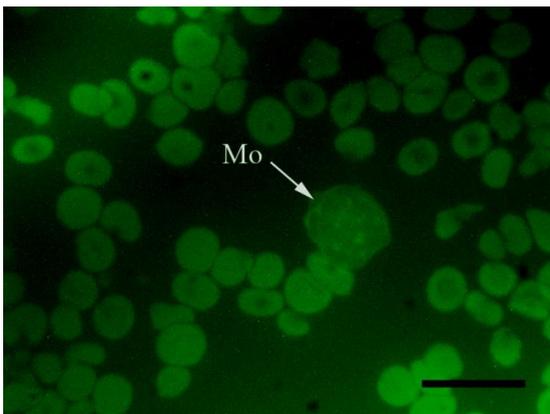


Abbildung 87: Monozyt; Bindung von VAA

Das Lektin bindet deutlich an das Zytoplasma des Monozyten (Mo). Die Zellmembran reagiert auch positiv. SB = 10µm

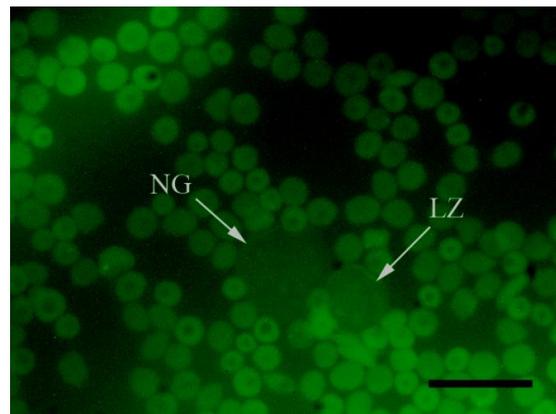


Abbildung 89: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von VAA

Das Zytoplasma des neutrophilen Granulozyten (NG) zeigt eine positive Reaktion. Die Zellmembran des Lymphozyten reagiert noch stärker mit dem Lektin, als das Zytoplasma der Zelle. SB = 10µm

3.3. Hemmzucker

Nach den Untersuchungen wurde versucht, bei Lektinen, denen eine positive Bindungseigenschaft nachgewiesen werden konnte, durch eine Vorbehandlung mit Kohlenhydraten diese Bindung zu verhindern. Durch Vorinkubieren mit den Hemmzuckern, konnte bei den Lektinen ConA, LCA, PSA, WGA und PHA-E nach der eigentlichen Färbung keine Bindung oder nur eine schwache Bindung festgestellt werden.

3.4. Vorbehandlung mit Neuraminidase

Bei Lektinen, die nach den Untersuchungen keine oder nur schwach positive Ergebnisse erbracht haben, wurde durch eine Vorbehandlung mit Neuraminidase versucht, die Bindung an den Blutzellen positiv zu beeinflussen. Bei den Lektinen UEA-1, SJA und RCA konnte jedoch keine Veränderung der vorher erhobenen Ergebnisse erreicht werden.

4. Untersuchung des Zytoskeletts

4.1. Phalloidin-TRITC

F-Aktin ließ sich in fast allen Blutzellen nachweisen. Eine starke, wahrscheinlich unspezifische Bindung war bei den Granula der Eosinophilen zu beobachten. Bei den Neutrophilen hingegen reagierte das Zytoplasma am intensivsten. Die Granula der Thrombozyten reagierten stark positiv. Unterschiedliche Ergebnisse ergaben sich bei der Untersuchung der Lymphozyten. Meist war es in der Peripherie der Zellen unmittelbar unter der Zellmembran, in welcher der höchste Aktiningehalt gefunden werden konnte. Vereinzelt war jedoch auch das Zytoplasma am deutlichsten positiv. Bei den Monozyten reagierte ebenfalls das Zytoplasma am stärksten mit Phalloidin.

Tabelle 32: Bindung von Phalloidin an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	2	16	-
Zytoplasma	-	2	16	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	1
Lymphozyten				
Zellmembran	-	6	10	2
Zytoplasma	-	14	4	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	17	1	-
Granula	-	15	3	-
Zytoplasma	-	4	14	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	-	6	-	-
Granula	-	-	2	4
Zytoplasma	-	5	1	-
Monozyten				
Zellmembran	-	3	-	-
Zytoplasma	-	1	2	-

IV. Ergebnisse

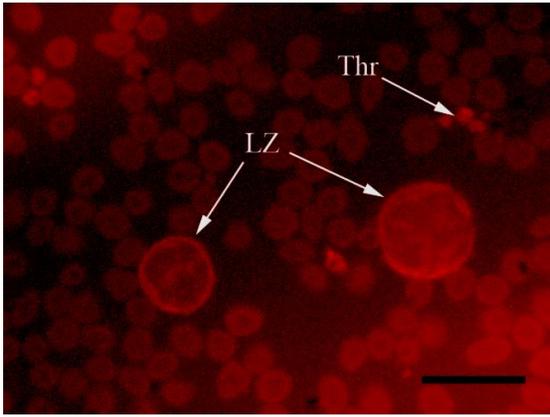


Abbildung 90: Lymphozyt; Bindung von Phalloidin

Bei den Lymphozyten (LZ) konnte vor allem das submembranöse Aktin nachgewiesen werden. Auch die Thrombozyten (Thr) lassen sich stark anfärben.

SB = 10µm

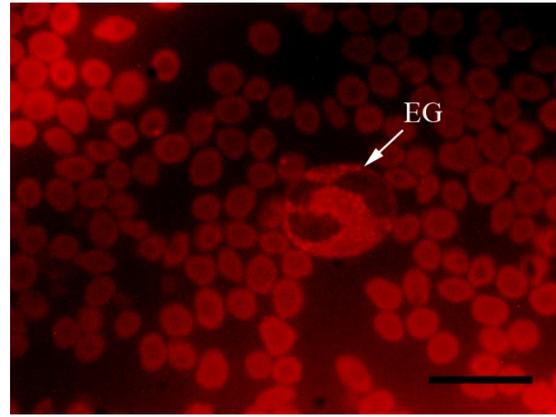


Abbildung 92: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von Phalloidin

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) reagieren stark positiv.

SB = 10µm

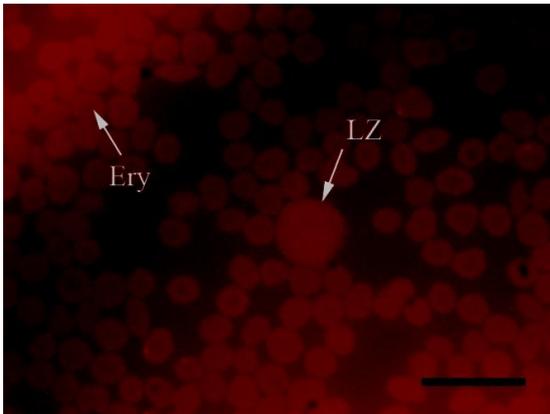


Abbildung 91: Lymphozyt; Bindung von Phalloidin

Das Zytoplasma der Lymphozyten (LZ) und der Erythrozyten (Ery) weist einen hohen Phalloidin Anteil auf.

SB = 10µm

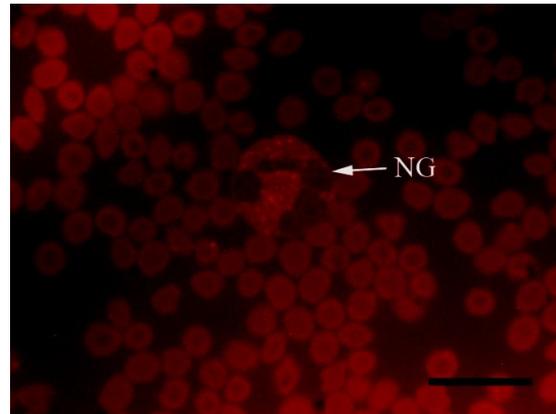


Abbildung 93: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von Phalloidin

Die Granula der neutrophilen Granulozyten (NG) färben sich intensiv an.

SB = 10µm

4.2. Myosin

Die Versuchsreihe mit Myosin wurden in den Konzentrationen 1:250 und 1:500 durchgeführt. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede in den Ergebnissen festgestellt werden, einzig die Intensität der positiven Reaktionen stieg mit der Konzentration an. Die Erythrozyten zeigten zwar durchwegs positive Bindungen mit dem Antikörper gegen Myosin, jedoch zum Teil in schwacher Intensität. Nur in wenigen Proben ließen sich Thrombozyten nachweisen, welche dann aber deutlich sichtbar waren. Bei den Neutrophilen reagierte vor allem die Zellmembran positiv, wogegen bei den Eosinophilen die Granula am deutlichsten zu beobachten waren. In fast allen Ausstrichen färbte sich die Zellmembran der Lymphozyten an. Myosin konnte in den Monozyten sowohl an der Membran, als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden.

Tabelle 33: Bindung von Myosin an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	2	16	-
Zytoplasma	-	2	16	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	3	-
Granula	-	-	1	2
Lymphozyten				
Zellmembran	4	10	4	-
Zytoplasma	4	9	5	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	18	-	-
Granula	11	7	-	-
Zytoplasma	-	3	15	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	-	6	-	-
Granula	-	-	-	6
Zytoplasma	-	-	6	-
Monozyten				
Zellmembran	-	1	3	-
Zytoplasma	-	1	3	-

IV. Ergebnisse

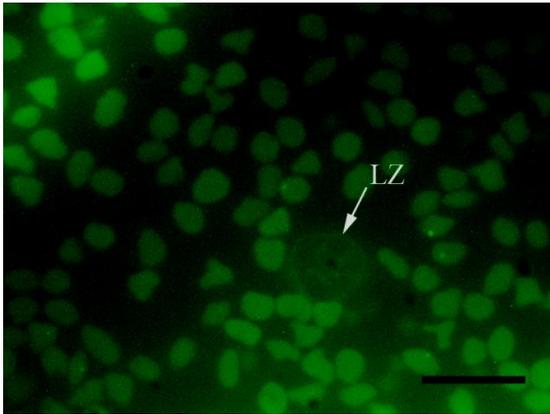


Abbildung 94: Lymphozyt; Bindung von Myosin 1:250

Die Zellmembran des Lymphozyten (LZ) färbt sich nur schwach an.
SB = 10µm

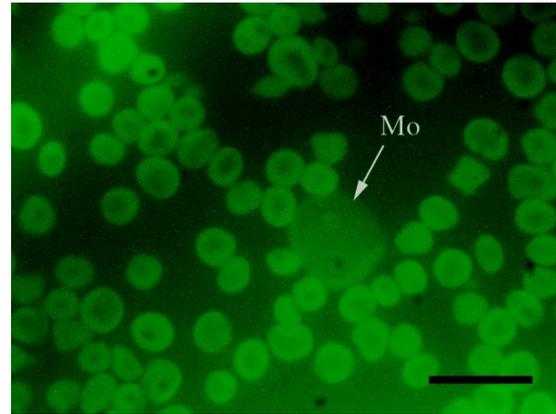


Abbildung 97: Monozyt; Bindung von Myosin 1:250

Im Zytoplasma und der Zellmembran des Monozyten (Mo) konnte Myosin nachgewiesen werden.
SB = 10µm

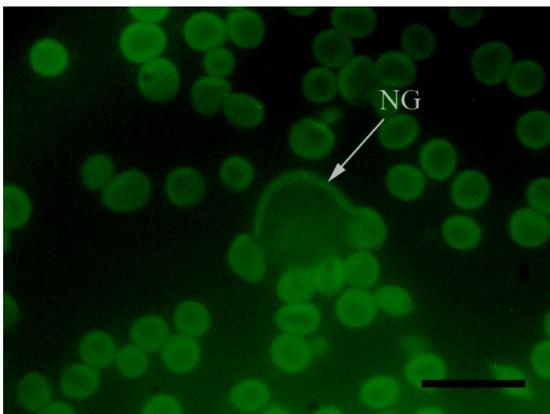


Abbildung 95: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von Myosin 1:250

Bei diesem neutrophilen Granulozyten (NG) weist vor allem die Zellmembran einen hohen Myosinanteil auf.
SB = 10µm

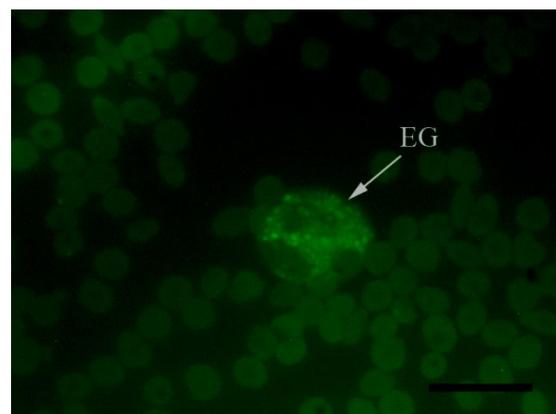


Abbildung 98: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von Myosin 1:500

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) zeigen eine stark positive Reaktion.
SB = µm

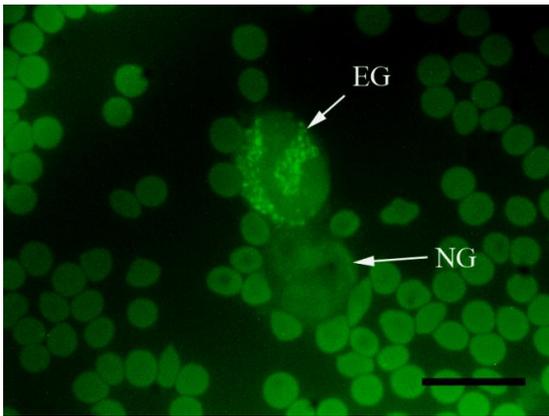


Abbildung 96: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von Myosin 1:500

Auch bei diesem eosinophilen Granulozyten (EG) färben sich die Granula am stärksten an. Der neutrophile Granulozyt (NG) hat im Zytoplasma am deutlichsten Myosinfilamente.
SB = 10µm

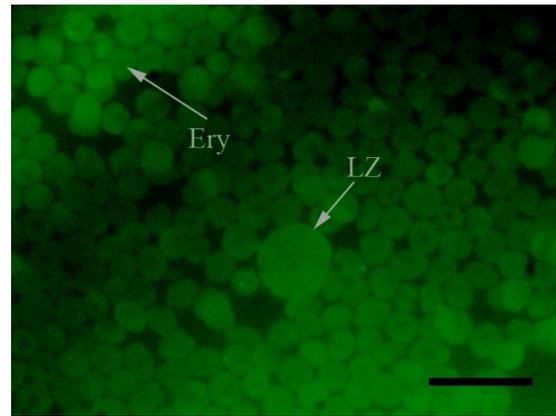


Abbildung 99: Lymphozyt; Bindung von Myosin 1:500

Im Zytoplasma des Lymphozyten (LZ) und der Erythrozyten (Ery) ließ sich am intensivsten Myosin nachweisen.
SB = 10µm

4.3. Vimentin

Die stärkste positive Reaktion dieser Versuchsreihe zeigten die Granula der Neutrophilen und Eosinophilen. In nur zwei Ausstrichen konnten positiv reagierende Thrombozyten gefunden werden, deren Fluoreszenz deutlich sichtbar war. Das Zytoplasma der Lymphozyten reagierte selten und nur schwach mit dem Antikörper. Bei den Monozyten war es vor allem die Zellmembran, in der sich Vimentinstrukturen nachweisen ließen.

IV. Ergebnisse

Tabelle 34: Bindung von Vimentin an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	18	-	-
Zytoplasma	-	18	-	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	2	-
Granula	-	-	-	2
Lymphozyten				
Zellmembran	11	3	4	-
Zytoplasma	11	3	4	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	18	-	-
Granula	-	-	2	16
Zytoplasma	-	18	-	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	-	3	-	-
Granula	-	-	1	2
Zytoplasma	-	3	-	-
Monozyten				
Zellmembran	2	5	-	-
Zytoplasma	4	1	-	-

IV. Ergebnisse

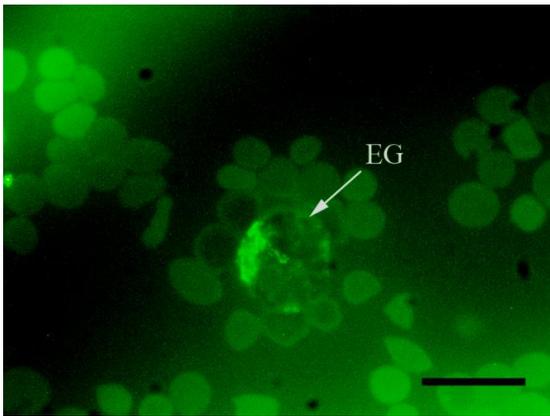


Abbildung 100: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von Vimentin

Die Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) reagieren stark positiv.
SB = 10µm

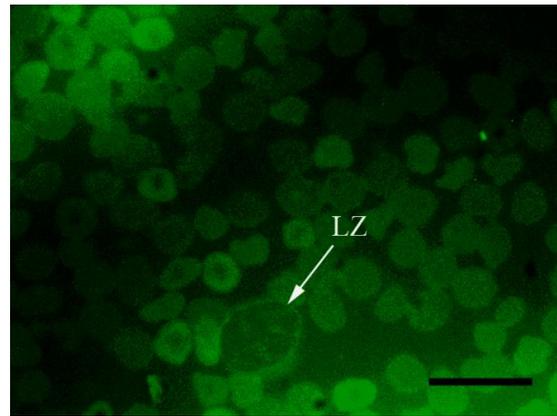


Abbildung 102: Lymphozyt; Bindung von Vimentin

Bei diesem Lymphozyten (LZ) färbt sich vor allem die Zellmembran an.
SB = 10µm

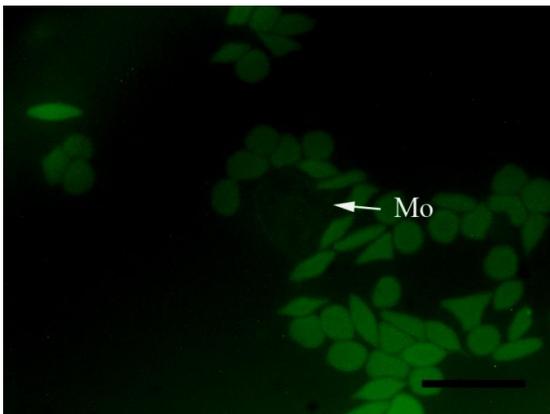


Abbildung 101: Monozyt; Bindung von Vimentin

In der Zellmembran des Monozyten (Mo) konnte ein geringer Anteil an Vimentin festgestellt werden.
SB = 10µm

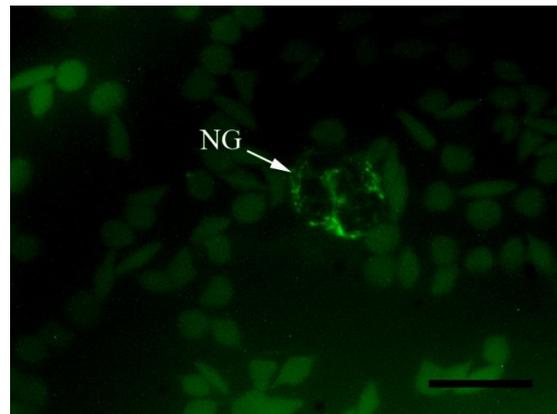


Abbildung 103: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von Vimentin

Die Granula des neutrophilen Granulozyten (NG) zeigen eine deutliche Reaktion.
SB = 10µm

4.4. Panzytokeratin

Bei keinem der untersuchten Ausstriche konnten positive Reaktionen beobachtet werden.

Tabelle 35: Bindung von Panzytokeratin an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Lymphozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Monozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-

4.5. Tubulin

Die Erythrozyten reagierten mit dem Antikörper für Tubulin in jedem Blutaussstrich positiv. In den Neutrophilen konnte das Protein am stärksten in der Zellmembran nachgewiesen werden, wogegen in den Eosinophilen die intensivste Fluoreszenz in den Granula zu beobachten war. Die Reaktion der Monozyten war vor allem auf das Zytoplasma beschränkt, die Lymphozyten reagierten am stärksten an der Zellmembran. Die wenigen Thrombozyten zeigten ebenfalls eine positive Reaktion.

IV. Ergebnisse

Tabelle 36: Bindung von Tubulin an die Blutzellen der Ziege

Stärke der Reaktionen				
	0	+	++	+++
Erythrozyten				
Zellmembran	-	1	17	-
Zytoplasma	-	1	17	-
Thrombozyten				
Zellmembran	-	-	3	-
Granula	-	-	3	-
Lymphozyten				
Zellmembran	-	11	7	-
Zytoplasma	-	16	2	-
Neutrophile Granulozyten				
Zellmembran	-	3	15	-
Granula	-	18	-	-
Zytoplasma	-	10	8	-
Basophile Granulozyten				
Zellmembran	-	-	-	-
Granula	-	-	-	-
Zytoplasma	-	-	-	-
Eosinophile Granulozyten				
Zellmembran	-	4	-	-
Granula	-	-	1	3
Zytoplasma	-	4	-	-
Monozyten				
Zellmembran	-	7	-	-
Zytoplasma	-	5	2	-

IV. Ergebnisse

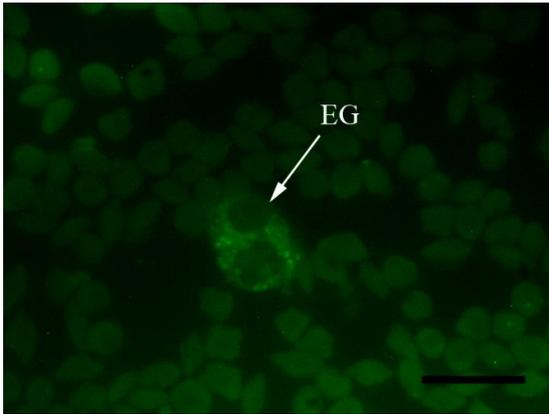


Abbildung 104: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von Tubulin

Ein hoher Anteil von Tubulin war in den Granula des eosinophilen Granulozyten (EG) nachweisbar.
SB = 10µm

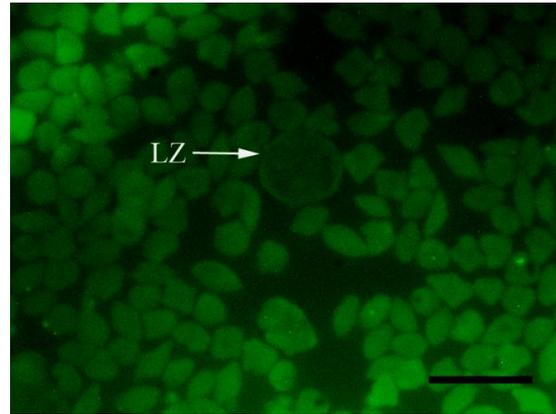


Abbildung 106: Lymphozyt; Bindung von Tubulin

Der Lymphozyt (LZ) reagierte stark an der Zellmembran, auch das Zytoplasma der Zelle färbte sich schwach.
SB = 10µm

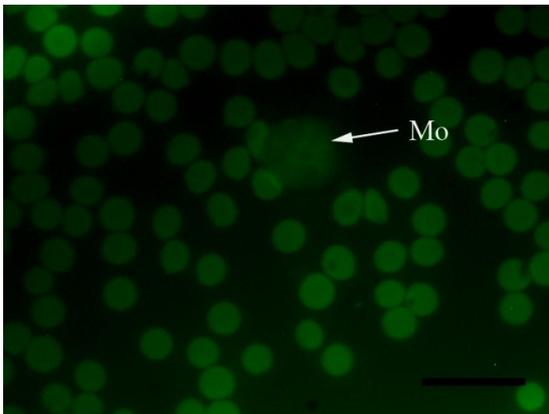


Abbildung 105: Monozyt; Bindung von Tubulin

Das Zytoplasma des Monozyten (Mo) wies den größten Anteil an Tubulin auf.
SB = 10µm

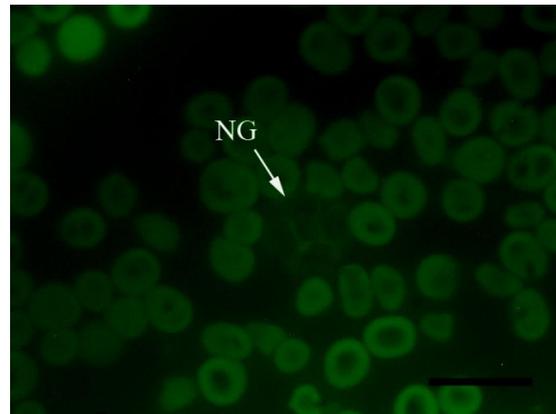


Abbildung 107: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von Tubulin

Auch bei dem neutrophilen Granulozyt (NG) war Tubulin vor allem im Zytoplasma darstellbar.
SB = 10µm

V. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde das Blut der Ziege hinsichtlich ultrastruktureller, glykohistochemischer und immunhistochemischer Eigenschaften untersucht. Mit sieben verschiedenen Übersichtsfärbungen konnte die Struktur der einzelnen Blutzellen unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden. Für die detailgenauere Beurteilung der Morphologie der Blutbestandteile wurden die Blutausstriche zusätzlich mithilfe des Elektronenmikroskops ausgewertet. Die Kohlenhydratstrukturen der Blutzellen wurden durch 17 pflanzliche Lektine ermittelt. Schließlich erfolgte mittels Immunhistochemie die Analyse der Elemente des Zytoskeletts der Blutzellen.

Für die Arbeit wurde von 37 Ziegen Blut aus der Vena Jugularis entnommen, wobei sich die Gruppe aus 28 weiblichen und 9 männlichen Tieren im Alter von einem halben Jahr bis zu 12 Jahren zusammensetzte. Es erfolgte eine Unterteilung in drei Altersgruppen. Die erste Gruppe setzte sich aus Tieren bis zum Alter von 4 Jahren zusammen, es folgten die Ziegen im Alter von 4 bis 8 Jahren und älteren Tiere zwischen 8 und 12 Jahren wurden zusammengefasst. Es konnten jedoch im Verlauf der Untersuchungen keine relevanten Unterschiede bezüglich Größe, Morphologie und Bindungseigenschaften in den verschiedenen Altersgruppen festgestellt werden.

1. Lichtmikroskopie

Im Rahmen der lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden 4 klassische Übersichtsfärbungen für die Untersuchung von Blutproben verwendet. Die Blutausstriche wurden mithilfe der Diff-Quick-Färbung, der Giemsa-Färbung, der May-Grünwald-Färbung und der Panoptischen Färbung nach Pappenheim gefärbt. Außerdem konnten durch die Alcianblau-Färbung Mucine, durch die Toluidin-Färbung neutrophile Granulozyten und mittels der PAS-Färbung Glykogen, Polysaccharide und Glykoproteine dargestellt werden.

Unter den Granulozyten waren die neutrophilen Granulozyten die häufigsten Blutzellen. Ihre Anzahl im Blut betrug 1200 bis 7200/ μ l (Feldmann et al., 1986). Ihr Durchmesser beträgt 9 bis 12 μ m und der Zellkern der reifen Form ist meist 3-fach gelappt (Hees und Tschudi, 1990). Wie in der Literatur beschrieben, war die jugendliche Form der neutrophilen Granulozyten sehr selten zu finden, da die stabkernigen Granulozyten unter physiologischen Bedingungen nur 1 bis 2% der Population ausmachen (Sinowatz und Hees, 2000). Der Reifegrad der Zelle zeigt sich also an der fortschreitenden Anzahl der Kernsegmente (Brown, 1998). Die Struktur des Zellkerns ließ sich besonders gut durch die Färbungen Giemsa, Diff-Quick und May-Grünwald analysieren. Die Granula hingegen konnten am besten in den Färbungen Diff-Quick und May-Grünwald begutachtet werden, hierbei wurde ersichtlich, dass die Struktur der Granula variiert.

Der in der Literatur beschriebene Pleomorphismus, also das Vorhandensein von runden, stabförmigen und hantelförmigen Granula, konnte aufgrund der lichtmikroskopisch nicht ausreichenden Vergrößerung nicht beobachtet werden (Anosa, 1993).

Die basophilen Granulozyten waren in den ausgewerteten Blutproben nur äußerst selten zu finden, da sie bei Ziegen mit einer Anzahl von 0 bis 120/ μ l nur einen Anteil von 0 bis 1% der Leukozyten ausmachen (Feldmann et al., 1986, Engelhardt, 2009). Die 8 bis 11 μ m großen Blutzellen haben mit 1 μ m verhältnismäßig große Granula, die sich besonders durch die May-Grünwald- und die Pappenheim-Färbung violett bis dunkellila anfärben ließen (Brown, 1998). Dadurch waren die Basophilen, wenn auch sehr selten, immer eindeutig zu identifizieren. Die speziell zur Darstellung der basophilen Granulozyten durchgeführte Toluidinblau-Färbung erbrachte jedoch nicht die besten Ergebnisse. Eine Unterscheidung der einzelnen Blutzellen war zwar leicht möglich, doch war die Farbintensität und somit die Differenzierung von Zellkern, Granula und Zellmembran in oben genannten Färbungen besser.

In allen Übersichtsfärbungen waren die eosinophilen Granulozyten aufgrund ihrer roten Granula eindeutig zu identifizieren. Eine weitere charakteristische Eigenschaft ist der brillenförmige zweigeklappte Zellkern (Hees und Tschudi, 1990). Der von Brown (1998) angegebene Durchmesser der Zellen von 10 bis 15 μ m deckt sich mit der ermittelten Größe (Brown, 1998). Mit einem Anteil von 0 bis 4% der Gesamtleukozyten sind die Eosinophilen zwar relativ selten, konnten jedoch in fast allen Ausstrichen gefunden werden (Engelhardt, 2009). Die Ziege besitzt mit einer Größe von zum Teil weniger als 0,5 μ m, wie alle Wiederkäuer die kleinsten eosinophilen Granula aller domestizierten Tiere. Die in der Literatur beschriebene Unterteilung in primäre, sekundäre und kleine dichte Granula war im Rahmen der Übersichtsfärbungen nicht möglich (Feldmann et al., 1986).

Unter den Leukozyten waren in den untersuchten Proben die Lymphozyten die am häufigsten zu findenden Blutzellen. Die Ziege besitzt ein Lymphozytäres Blutbild, da die Lymphozyten einen Anteil von bis zu 80% der weißen Blutkörperchen ausmachen (Engelhardt, 2009). Laut Smith und Sherman erfolgt eine Unterteilung der Lymphozytenpopulation nach ihrer Größe in kleine, mittlere und große Lymphozyten (Smith und Sherman, 2009). Die kleinen haben einen Durchmesser von 5 bis 10 μ m und die Zellkerne messen zwischen 2 und 3 μ m. Sie stellen den größten Teil im zirkulierenden Blut dar (Liebich, 2004). Dies konnte im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden. Die Zellbestandteile der Lymphozyten waren in allen Färbungen gut zu beurteilen. Nur das Zytoplasma der Zellen war kaum zu charakterisieren, da der große runde, teilweise leicht eingezogene Zellkern die Zelle fast vollständig ausfüllt. Selten war nur ein dünner hellblauer Zytoplasmasaum zu sehen, in welchem sich in der Toluidinblau-Färbung, wie von Brown (1998) beschrieben, die azurophilen Granula undeutlich identifizieren ließen (Brown, 1998).

Mit einem Anteil von nur 2,5% der Gesamtleukozyten kommen die Monozyten im Blut der Ziege relativ selten vor (Brown, 1998). Die Identifikation dieser Zellen war in allen Färbungen dennoch gut nachzuvollziehen, da die Monozyten mit einem Durchmesser von 15 bis 20µm die größten Zellen im Blut der Ziege sind. Des Weiteren besitzen sie die für Wiederkäuer charakteristischen Vakuolen im Zytoplasma, die sich besonders gut in der PAS- und Pappenheim-Färbung darstellen ließen (Feldmann et al., 1986). Der Zellkern liegt meist exzentrisch und ist von runder bis nierenförmiger Morphologie und zeigt mitunter eine deutliche Lappung (Hees und Tschudi, 1990).

Die kernlosen Erythrozyten der Ziege machen den größten zellulären Bestandteil des Blutes aus und sind von bikonkaver Scheibenform. Ihre Anzahl ist mit $8,0 - 14,0 \times 10^{12}/L$ bei der Ziege besonders hoch, ihr Durchmesser hingegen ist mit durchschnittlich 4µm im Vergleich zu anderen Tierarten sehr klein (Engelhardt, 2009). Die in der Literatur beschriebene Vielfalt bezüglich der Form und Größe der Erythrozyten konnte häufig beobachtet werden. Die besonders bei adulten Ziegen auftretende Poikilozytose und Anisozytose konnte in fast jedem Blutausschrieb nachgewiesen werden. Des Weiteren waren die bei jungen Ziegen vorkommenden tropfenförmigen Erythrozyten, die als Dakryozyten bezeichnet werden, in den Proben zu finden (Hees und Tschudi, 1990). Die bei anderen Tieren physiologisch auftretende, sogenannte Geldrollenbildung der roten Blutzellen, konnte in dieser Arbeit bei Ziegen nicht festgestellt werden (Jain, 1993).

Die Thrombozyten waren in fast allen Blutausschrieben zu finden. Ihre Form ist rund-oval und ihre Größe beträgt 1,3 bis 4,7µm. Bei Säugetieren sind die Thrombozyten kernlos (Hees und Tschudi, 1990). Die Morphologie der Blutplättchen war jedoch schwer zu beurteilen, da sich die Thrombozyten häufig in Gruppen überlagern. Die Unterscheidung in zwei unterschiedliche Zonen ist am besten in der Giemsa- und Pappenheim-Färbung nachzuvollziehen. Das äußere Hyalomere schließt sich der Zellmembran an und ist von blasser hellblauer Farbe. Der zentrale dunkelblaue Anteil, welcher die Zellorganellen und Granula beinhaltet, wird als Granulomer bezeichnet (Hees und Tschudi, 1990).

2. Elektronenmikroskopie

Die neutrophilen Granulozyten der Ziege konnten aufgrund ihrer Häufigkeit von circa 40% und ihrer charakteristischen Form des Zellkernes relativ leicht unter dem Elektronenmikroskop identifiziert werden. Die dichten Heterochromatinbereiche des Zellkernes waren deutlich zu erkennen. Jedoch konnten die von Brown (1998) beschriebenen Chromatinfäden zwischen den Kernsegmenten in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden (Brown, 1998). Die jugendliche stabkernige Form der Neutrophilen konnte in den hier untersuchten Präparaten nicht vorgefunden werden, da sie mit einem Anteil von nur 1 bis 2% unter physiologischen

Bedingungen sehr selten auftreten (Sinowatz und Hees, 2000). Im Zytoplasma der Blutzellen fanden sich neben Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Vakuolen sowie primäre und sekundäre Granula. Die in der Literatur beschriebenen tertiären Granula konnten nicht beobachtet werden (Smith, 1986). Nach Kolb (1991) weisen die neutrophilen Granulozyten eine hohe Beweglichkeit auf, welche durch die deutlich sichtbaren Pseudopodien nachvollzogen werden kann (Kolb, 1991).

Da die basophilen Granulozyten im Blut der Ziege nur einen Anteil von 0 bis 1% der Gesamtleukozyten ausmachen, konnten diese in den vorliegenden Präparaten nicht ausfindig gemacht werden (Feldmann et al., 1986).

Die eosinophilen Granulozyten waren zwar unter dem Elektronenmikroskop selten finden, jedoch eindeutig zu identifizieren. Die verhältnismäßig grossen runden Blutzellen haben einen zweifach gelappten Zellkern, welcher reich an Heterochromatin ist und von vielen kleinen Granula umgeben wird (Hees und Tschudi, 1990). Beweglichkeit und Phagozytoseaktivität sind laut Hees und Tschudi (1990) zwar geringer ausgeprägt als bei den neutrophilen Granulozyten, jedoch lassen sich deutlich Pseudopodien auf der Zelloberfläche beobachten (Hees und Tschudi, 1990).

Da die Lymphozyten mit einem Anteil von mehr als 50% der Gesamtleukozyten sehr häufig im Blut der Ziege vorkommen, waren auch zahlreiche Lymphozyten in den untersuchten Proben zu finden (Engelhardt, 2009). Durch ihren grossen runden Zellkern, der fast das gesamte Zytoplasma ausfüllt und die wenigen Zellorganellen, wie Mitochondrien und Ribosomen, an den Rand der Zelle drängt, waren sie leicht zu identifizieren. Die laut Literatur nur unter dem Elektronenmikroskop sichtbaren Granula der Lymphozyten konnten in den untersuchten Proben als rund bis ovale Zellbestandteile, die eine Grösse von 0,5µm nicht überschritten, dargestellt werden (Brown, 1998).

Die Monozyten wiesen einen charakteristischen nierenförmigen Zellkern auf, der von einem breiten Zytoplasma umgeben war. Im Zytoplasma fanden sich vor allem Mitochondrien und Granula (Liebich, 2004). Auch die laut Feldmann (1986) für Wiederkäuer typischen Vakuolen konnten beobachtet werden (Feldmann et al., 1986). Auf der Zelloberfläche fanden sich deutliche Pseudopodien die Ausdruck für die pinozytische Aktivität der Monozyten sind (Liebich, 2004).

Bei Ziegen zeigen die Erythrozyten häufig Anisozytose und eine extreme Poikilozytose (Brown, 1998). Dies konnte ich auch in meinen Untersuchungen nachweisen. Die Erythrozyten wiesen eine Grösse von 0,4 bis zu 4,5µm auf und waren von runder bis längsovaler Gestalt. Den Hauptbestandteil des kernlosen Zellinneren bildet das Hämoglobin, das sich unter dem Elektronenmikroskop als homogene Substanz darstellt und aufgrund seines hohen Eisengehaltes elektronendicht ist (Kolb, 1991). Weitere Zellorganellen konnten nicht gefunden werden.

Die Thrombozyten haben eine runde bis ovale Form und eine glatte Oberfläche. Bei Säugetieren sind die Blutplättchen kernlos (Hees und Tschudi, 1990). Im Zytoplasma konnten zahlreiche Zellorganellen ausgemacht werden. Am häufigsten fanden sich die α -Granula, die Gerinnungsproteine enthalten (Sinowatz und Hees, 2000). Des Weiteren waren kernhaltige „dense bodies“, die sekretorische Produkte der Thrombozyten speichern, Vakuolen und Glykogenspeicher zu beobachten, welche auch von Brown (1998) beschrieben wurden (Brown, 1998).

3. Glykohistochemie

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurden 17 Lektine verwendet. 14 der Lektine waren an FITC gekoppelt, nämlich ConA, LCA, PSA, GSL, PNA, RCA, WGA, WGAs, DBA, SJA, SBA, UEA-1, PHA-E und PHA-L. Drei weitere Lektine MAL, SNA und VAA wurden für den Nachweis von verschiedenen Zuckern mittels der Streptavidin-Biotin-Methode verwendet.

Auf die Bindungsfähigkeit der Lektine nehmen verschiedene Faktoren aus den Inkubationsbedingungen Einfluss. Hier zu nennen sind vor allem die Inkubationszeit, die Lektinkonzentration und die Inkubationstemperatur. Die vorliegende Versuchsreihe wurde jedoch in standardisierten Abfolgen durchgeführt, um für jedes Lektin der Untersuchung gleiche Bedingungen zu schaffen.

Bei den neutrophilen Granulozyten waren es vor allem die Granula, die mit den Lektinen ConA, LCA, PSA, RCA, SJA, WGA und WGAs deutlich positiv reagierten. Das Zytoplasma reagierte mit Lektinen GSL-1, SBA, PHE-E, PNA, VAA, UEA-1 und SNA schwach positiv. Die Lektine DBA, PHA-L und MAA zeigten bei den neutrophilen Granulozyten keine positive Reaktion. Daraus lässt sich ableiten, dass N-Acetyl-Neuraminsäure, N-Acetyl-Glukosamin, Glukose, Mannose, Galaktose und komplexeren Kohlenhydratstrukturen in hoher Konzentration in den Blutzellen vorhanden sind. Bei den biotinylierten Lektinen zeigte sich eine negative bis schwach positive Reaktion.

Die Bindungseigenschaften der eosinophilen Granulozyten waren ähnlich wie die der Neutrophilen. Somit waren es besonders die Granula die eine positive Reaktion bei den Lektinen ConA, LCA, RCA, WGA, WGAs, SJA, SNA und VAA aufwiesen. Eine schwache Reaktion konnte bei den Lektinen PSA, GSL-1, SBA, UEA-1 und PHA-E beobachtet werden, wogegen bei den Lektinen PNA, DBA, PHA-L und MAA keine Bindung ausgemacht werden konnte. Das deutet auf ein Vorhandensein der Kohlenhydrate N-Acetyl-Neuraminsäure, N-Acetyl-Glukosamin, Glukose, Mannose, Galaktose in den Granula hin.

Basophile Granulozyten konnten bei den glykohistochemischen Untersuchungen nicht eindeutig

identifiziert werden und somit war eine Auswertung dieser Blutzellen nicht möglich.

Die Lymphozyten zeigten, besonders in der Zellmembran, sehr häufig positive Reaktionen mit den zu untersuchenden Lektinen. Jedoch waren die Reaktionen nicht bei allen Lymphozyten zu beobachten und von sehr unterschiedlicher Intensität. Die deutlichste Fluoreszenz fand sich bei den Lektinen ConA, WGA, SJA, SNA, VAA und VAA, eine geringe bei LCA, PSA, WGAs, GSL-1, SBA, UEA-1 und MAA. Keine Reaktion zeigten die Lektine PNA, RCA, DBA, PHA-E und PHA-L. Dies bedeutet, dass im Rahmen der Untersuchungen N-Acetyl-Neuraminsäure, N-Acetyl-Glukosamin, Glukose, Mannose und Galaktose nachgewiesen werden konnten, es jedoch keinen Hinweis auf Galaktose und komplexere Kohlenhydratstrukturen in den Zellmembranen der Lymphozyten gab.

Da der Anteil der Monozyten im Blut der Ziege nur sehr gering ist, war es nur sehr selten möglich, diese eindeutig als solche zu identifizieren. Zusätzlich weisen sie eine große Ähnlichkeit mit den Lymphozyten auf, was das Untersuchen weiter erschwerte. Eine gesicherte positive Reaktion konnte nur bei den Lektinen ConA, LCA und VAA festgestellt werden, wobei das Ergebnis bei ConA am deutlichsten ausfiel.

Bei der Beurteilung der Erythrozyten muss berücksichtigt werden, dass die Erythrozyten durch das Hämoglobin eine Eigenfluoreszenz aufweisen. Dies bedeutet, dass bei jedem untersuchten Lektin die Erythrozyten eine, wenn auch schwache, unspezifische Reaktion zeigten. Die stärkste spezifische Reaktion konnte bei den Lektinen ConA, LCA, PNA, PSA, WGA, RCA, GSL-1, SJA, SBA und SNA beobachtet werden. Die Lektine ConA, WGA, SJA und SNA gingen vor allem mit der Zellmembran eine Bindung ein, wogegen sich LCA, PNA, PSA, RCA, GSL-1 und SBA an Strukturen des Zytoplasmas banden.

Die Thrombozyten der Ziege zeigten mit den Lektinen ConA, WGA, WGAs, GSL-1, PHA-E und MAA eine deutlich positive Reaktion. Eine schwächere Reaktion konnte bei den Lektinen SBA, PSA, SNA, LCA und UEA-1 beobachtet werden. Keine Reaktion fand bei PNA, DBA, SJA, VAA, RCA und PHA-L statt. Diese Ergebnisse lassen auf eine hohe Konzentration von N-Acetyl-Neuraminsäure, N-Acetyl-Glukosamin, N-Acetyl-Neuraminsäure, Glukose, Mannose und komplexere Kohlenhydratstrukturen in den Thrombozyten schließen.

4. Zytoskelett

Um die einzelnen Komponenten des Zytoskeletts darstellen zu können wurden die Blutaussstriche mit FITC-markierten Antikörpern gegen Myosin, Vimentin, Panzytokeratin und Tubulin inkubiert. F-Aktin wurde mit Phalloidin nachgewiesen, das an ein Fluorochrom gekoppelt war (Romeis, 2010). Panzytokeratin ließ sich erwartungsgemäß in keinen Blutzellen nachweisen.

Bei der Auswertung der Granulozyten konnten nicht ausreichend viele basophile Granulozyten identifiziert werden, um diese mit in die Bewertung aufzunehmen zu können. In den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten konnte sowohl Aktin, als auch Myosin nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Aussagen von Egger et al (2001) und Ryder et al (1982), die in den Granulozyten ein kontraktiles Aktin-Myosin-System beschrieben haben, durch welches Chemotaxis und Phagozytose ermöglicht wird (Ryder et al., 1982) (Egger et al., 2001). Des Weiteren konnten in den Eosinophilen und Neutrophilen mit Vimentin und Tubulin positive Reaktionen beobachtet werden. Tubulin ist für die Beweglichkeit der Zelle unerlässlich, da es für die Ausbildung der Pseudopodien benötigt wird (J. Nath et al., 1982).

Bei den Lymphozyten der Ziege ließen sich alle Komponenten des Zytoskeletts (Mikrotubuli, Mikrofilamente und Intermediärfilamente) nachweisen, was sich mit den Befunden anderer Spezies deckt (Atkins und Anderson, 1982). Das in den Lymphozyten nachgewiesene Vimentin ist neuen Studien zufolge von Bedeutung für Rigidität und gleichzeitige Verformbarkeit der Lymphozyten (Brown et al., 2001).

Bei den Monozyten war einzig das Aktin deutlich nachweisbar, was für das Vorkommen von Mikrofilamenten spricht. Myosin und Tubulin hingegen waren nur in geringer Konzentration vorhanden, Vimentin konnte nicht oder nur sehr schwach nachgewiesen werden.

Neben dem Spektrin, welches die Hauptkomponente des Zytoskeletts der Erythrozyten bildet, stellt Aktin einen weiteren wichtigen Bestandteil dar und findet sich vor allem unter der Zellmembran im Zytoplasma der roten Blutkörperchen (Püschel et al., 2011) (Gov und Safran, 2005). Aktin sorgt für die Elastizität der Erythrozyten, mit der sie der hohen Krafteinwirkung während der Zirkulation im Gefäßsystem entgegenwirken können (Gov, 2007). Laut Bennet (1982) ist die Konzentration von Tubulin im Bereich unter der Zellmembran am höchsten, was mit den Ergebnissen meiner Untersuchungen übereinstimmt (Bennett, 1982). Vimentin ist bei den Erythrozyten ebenfalls vor allem direkt unter der Zellmembran zu finden (Georgatos und Marchesi, 1985). Colin und Schrier (1991) haben nachgewiesen, dass in menschlichen Erythrozyten die Konzentration von Myosin mit steigendem Alter erheblich sinkt (Colin und Schrier, 1991).

Thrombozyten besitzen neben Spektrinmolekülen Aktinfilamente, die als Netzwerk das Zytoplasma der Zelle durchziehen. Ein spiralförmig aufgerollter einzelner Mikrotubulus, welcher in

der Peripherie der Zelle verläuft, bildet die dritte formgebende Komponente der Thrombozyten (Pötzsch und Madlener, 2010). Zusätzlich findet sich Tubulin unter der Zellmembran der Blutplättchen (Steiner, 1983). Wie Castle und Crawford (1975) beschrieben haben, steigt der Anteil von Tubulin in den Pseudopodien der aktivierten Thrombozyten sprunghaft an (Castle und Crawford, 1975). Neben dem einzelnen Mikrotubulus stellen Aktin, das 11% des Gesamtproteinanteils der Thrombozyten ausmacht, und Myosin einen wesentlichen Anteil des Zytoskeletts dar (Junqueira et al., 2003, Zilles und Tillmann, 2010). Dies entspricht auch meinen Ergebnissen bei den Thrombozyten der Ziege. Aktin, Myosin und Tubulin zeigten eine stark positive Reaktion, Vimentin war nur schwach nachweisbar.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe von konventionellen histologischen, histochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen die Morphologie der Blutzellen der Ziege genauer zu charakterisieren. Weiter wurde versucht mit einer Palette von Lektinen nähere Aufschlüsse über die Kohlenhydratstrukturen der Blutzellen bei dieser Spezies zu bekommen. Die Struktur des Zytoskeletts konnte durch Färbungen mit TRITC und FITC markierten Antikörpern dargestellt werden. Hierfür wurde von 37 Ziegen unterschiedlichen Alters und Rasse aus der Vena Jugularis Blutproben entnommen. Von jeder Probe wurden 30 Blutausrichthe auf SuperFrost® Objektträgern ausgestrichen und je nach Untersuchungsmethode weiterbearbeitet.

Als konventionelle histologische Untersuchung wurden sieben verschiedene Färbungen durchgeführt, wobei bei der Ziege Diff-Quick, Giemsa, May-Grünwald, Pappenheim und PAS-Färbung die besten Ergebnisse lieferten und die einzelnen Blutzellen am deutlichsten zu beurteilen waren. Die Alcianblau-Färbung erwies sich dafür nur bedingt brauchbar. Die Toluidinblau-Färbung diente zur Identifikation der basophilen Granulozyten, jedoch liessen sich die dunklen Granula der Basophilen deutlich besser in der May-Grünwald-Färbung ausmachen. Die für die eosinophilen Granulozyten typischen roten Granula sowie die Granula der Neutrophilen konnten am effektivsten durch die Pappenheim- und May-Grünwald-Färbung nachgewiesen werden.

Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung konnten die einzelnen Zellorganellen der Blutzellen detaillierter bestimmt werden. So war es möglich, in den neutrophilen Granulozyten die länglichen primären von den rundlichen sekundären Granula zu unterscheiden. Des Weiteren wurden durch die Vergrößerung die vielen kleinen Granula und der gelappte Zellkern der eosinophilen Granulozyten erkennbar. Bei den Lymphozyten war die Unterteilung des Zellkerns in das zentral gelegene Euchromatin und das periphere Heterochromatin zu beobachten, was sich im Lichtmikroskop nicht nachweisen lässt. Im Zytoplasma der Thrombozyten fanden sich kernhaltige „dense bodies“ und neben zahlreichen α -Granula auch Vakuolen und Glykogenspeicher. Ausserdem war es möglich, die Pseudopodien an der Zellmembran zu beurteilen, die für die Beweglichkeit der Zelle verantwortlich sind.

Für die glykohistochemische Untersuchung wurden die FITC gekoppelten Lektine ConA, LCA, PSA, PNA, RCA, WGA, WGAs, GSL-1, DBA, SJA, SBA, UEA-1, PHA-E, PHA-L und die biotinylierten Lektine MAA, SNA und VAA verwendet. Die am häufigsten positiv reagierenden Blutzellen waren die neutrophilen Granulozyten, bei denen die Lektine ConA, LCA, PSA, RCA, SJA, WGA und WGAs eine deutlich positive Reaktion hervorriefen. Bei den eosinophilen Granulozyten waren es vor allem die Granula, die mit den Lektinen ConA, LCA,

RCA, WGA, WGAs, SJA, SNA und VAA reagierten. Die Fluoreszenz der Lymphozyten war unterschiedlich stark ausgeprägt, doch falls eine Reaktion nachgewiesen werden konnte, war es meist die Zellmembran, an welche die Lektine ConA, WGA, SJA, SNA VAA und VAA banden. Die Monozyten zeigten mit den Lektinen ConA, LCA und VAA eine positive Reaktion. Bei der Beurteilung der Erythrozyten war die Bindung mit ConA, LCA, PNA, PSA, WGA, RCA, GSL-1, SJA, SBA und SNA am intensivsten, wobei die Eigenfluoreszenz der Erythrozyten berücksichtigt werden muss. Die Thrombozyten zeigten die stärksten Reaktionen mit den Lektinen ConA, WGA, WGAs, GSL-1, PHA-E und MAA.

Um das Zytoskelett der Blutzellen beurteilen zu können wurden die Blutausrichungen mit FITC-markierten Antikörpern gegen Myosin, Vimentin, Panzytokeratin und Tubulin mittels einer Färbereihe inkubiert. Aktin wurde mit Hilfe von Phalloidin lokalisiert. Panzytokeratin konnte erwartungsgemäß in keiner Blutzelle nachgewiesen werden. In den Granulozyten und den Lymphozyten konnten sowohl Aktin und Myosin, als auch Vimentin und Tubulin nachgewiesen werden, wobei die Tubulinkonzentration in den Lymphozyten am geringsten war. Bei den Monozyten konnte nur für Aktin eine deutlich positive Reaktion beobachtet werden. In den Erythrozyten war Aktin am häufigsten im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. Die höchste Konzentration der Proteine Myosin, Tubulin und Vimentin war im Zytoplasma direkt unter der Zellmembran zu beobachten. Das Zytoplasma der Thrombozyten beinhaltet vor allem ein Netzwerk aus Aktinfilamenten, wogegen Tubulin besonders subplasmalemmal zu finden war.

VII. SUMMARY

The aim of my thesis was the morphological characterization of blood cells of goats using cytological, histochemical and electron microscopic methods. For this purpose, blood samples were taken from 37 goats of various ages and breeds. From each of these samples, 30 blood specimen were applied on SuperFrost® microscope slides, which it was also attempted to gain more insight on the glycohistochemistry of blood cells in this species using an array of lectins.

The components of the cytoskeleton of the different blood cells (microtubules, microfilaments and intermediate filaments) were evaluated using TRITC and FITC marked antibodies. Those were then further processed according to the test method.

Seven different conventional staining methods were used to examine the goat's blood cells. Diff-Quick-, Giemsa-, May-Grünwald-, Pappenheim- and Periodic acid Schiff (PAS)-staining provided the best results, making individual blood cells most clearly discernable. The Alcianblue-staining was less suitable. The Toluidinblue-staining can used to identify basophil granulocytes, although the dark basophil granules were stained even more intensely using the May-Grünwald staining. The red granules, typical for the eosinophil granulocytes, as well as the granules of the Neutrophils could be detected most effectively with the Pappenheim- and May-Grünwald staining.

The cell organelles could be defined in more detail through the electron microscopic examination. Using TEM it is possible to differentiate within the neutrophil granulocytes the elongated primary granules from the round secondary granules. In lymphocytes the centrally located euchromatic areas could be clearly separated from the peripheral heterochromatin. In the thrombocytes “dense bodies” could be displayed and vacuoles were visible next to numerous α -granules. It is also possible to assess the pseudopodia, which are responsible for the mobility of the cell.

Using a set of labeled lectins a distinct staining pattern could be observed. ConA, WGA, SJA, SNA stained the cell membrane. The monocytes showed a positive reaction with the lectins ConA, LCA und VAA. Erythrocytes showed an intense binding of ConA, LCA, PNA, PSA, WGA, RCA, GSL-1, SJA, SBA and SNA. Thrombocytes showed the strongest reaction with the lectines ConA, WGA, WGAs, GSL-1, PHA-E und MAA.

For the evaluation of the various components of the cytoskeleton FITC-marked antibodies against myosin, vimentin, pancytokeratin und tubulin were used. Actin was localized by means of phalloidin-TRITC. As expected, pancytokeratin could not be detected in any of the blood

cells. Actin and myosin, as well as vimentin and tubulin stained cellular structures in the granulocytes and lymphocytes. In case of the monocytes a clearly positive immunostaining was only be observed for actin, which clearly stained the microfilaments. In the erythrocytes, actin was most often located in the cytoplasm beneath the cell membrane. Also immunostaining for myosin, tubulin and vimentin was detected in the cytoplasm of erythrocytes, directly underneath the cell membrane. The cytoplasm of thrombocytes contains a network of actin filaments.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- ANOSA, V. O. 1993. Ultrastructure of developing and mature caprine leukocytes. *Anat Histol Embryol*, 22, 328-41.
- ATKINS, H. & ANDERSON, P. J. (eds.) 1982. *Actin and tubulin of normal and leukaemic lymphocytes*, Department of Biochemistry, University of Ottawa, Health Sciences Centre, 451 Smyth Road, Ottawa, Ont. K1H8M5, Canada.
- BAIN, B. J. & D., H. (eds.) 1997. *Grundkurs hämatologische Morphologie*, Berlin London: Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- BENNETT, V. 1982. The Molecular Basis for Membrane – Cytoskeleton Association in Human Erythrocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 18, 49-65.
- BOYD, W. C. & SHAPLEIGH, E. 1954. SPECIFIC PRECIPITATING ACTIVITY OF PLANT AGGLUTININS (LECTINS). *Science*, 119, 419-419.
- BROWN, E. M. 1998. Blood and Bone Marrow. In: DELLMANN (ed.) *Textbook of Veterinary Histology*. 3 ed.
- BROWN, M. J., HALLAM, J. A., COLUCCI-GUYON, E. & SHAW, S. 2001. Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *Journal of Immunology*, 166, 6640-6646.
- BUSELMAIER, W. (ed.) 2007. *Biologie für Mediziner*, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- CASTLE, A. G. & CRAWFORD, N. 1975. ISOLATION OF TUBULIN FROM PIG PLATELETS. *Febs Letters*, 51, 195-200.
- COLIN, F. & SCHRIER, S. 1991. *Myosin content and distribution in human neonatal erythrocytes are different from adult erythrocytes*.
- DOWNEY, G. P., GRINSTEIN, S., SUEAQUAN, A., CZABAN, B. & CHAN, C. K. 1995. VOLUME REGULATION IN LEUKOCYTES - REQUIREMENT FOR AN INTACT CYTOSKELETON. *Journal of Cellular Physiology*, 163, 96-104.
- EGGER, G. (ed.) 2005. *Die akute Entzündung*, Wien: Springer-Verlag.
- EGGER, G., BURDA, A. & GLASNER, A. 2001. A simple method for measuring the F-actin content of human polymorphonuclear leukocytes in whole blood. *Virchows Archiv-international Journal of Pathology*, 438, 394-397.
- ENGELHARDT, W. V. (ed.) 2009. *Physiologie der Haustiere*: Enke Verlag.
- FELDMANN, B. F., ZINKL, J. G. & JAIN, N. C. (eds.) 1986. *Schalm's Veterinary Hematology*: Lippincott Williams & Wilkins.
- FRANZ, H. 1990. 100 YEARS OF LECTIN RESEARCH. *Naturwissenschaften*, 77, 103-109.
- GABIUS, H.-J. (ed.) 2009. *The Sugar Code Fundamentals of Glycosciences*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- GALL, C. (ed.) 2001. *Ziegenzucht*: Ulmer Verlag.
- GEORGATOS, S. D. & MARCHESI, V. T. 1985. The binding of vimentin to human erythrocyte membranes: a model system for the study of intermediate filament-membrane interactions (1985)
- GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T. & SHARON, N. 1980. WHAT SHOULD BE CALLED A LECTIN. *Nature*, 285, 66-66.
- GOLDSTEIN, I. J., LIENER, I. E. & SHARON, N. (eds.) 1986. *The Lectins Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*, Orlando San Diego New York Austin London Montreal Sydney Tokyo Toronto: Academic Press, Inc.
- GOV, N. & SAFRAN, S. 2005. Red blood cell shape and fluctuations: Cytoskeleton

- confinement and ATP activity. *Journal of Biological Physics*, 31, 453-464.
- GOV, N. S. 2007. Active elastic network: Cytoskeleton of the red blood cell. *Physical Review E*, 75.
- HARTMANN, M., PABST, M. A. & DOHR, G. (eds.) 2010. *Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie*, Graz: Facultas Verlags- und Buchhandels AG.
- HEES, H. & TSCHUDI, P. 1990. Blut und Knochenmark. In: MOSIMANN, W. & KOHLER, T. (eds.) *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. Verlag Paul Parey.
- HEGNAUER, R. & HEGNAUER, M. 1994. *Chemical Series, Vol. 33. Plant chemotaxonomy, Vol. 11a. Leguminosae*, Birkhaeuser Verlag, P. O. Box 133, CH-4010 Basel, Switzerland; Birkhaeuser Boston, Inc., 175 Fifth Avenue, New York, New York 10010, USA.
- HEINZELLER, T. & BÜSING, C. M. (eds.) 2001. *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg* München: Thieme Verlag.
- HORN, F. (ed.) 2009. *Biochemie des Menschen*, München: Georg Thieme Verlag KG.
- IUCN 2008. *IUCN Red List categories and criteria, version 3.1, second edition*, Gland, Switzerland, Iucn.
- J. NATH, M. FLAVIN & GALLIN, J. I. (eds.) 1982. *Tubulin Tyrosinolation in Human Polymorphonuclear Leukocytes: Studies in Normal Subjects and in Patients with the Chediak-Higashi Syndrome*, Maryland.
- JAIN, N. C. (ed.) 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*.
- JAIN, N. C. & KONO, C. S. 1972. Scanning electron microscopy of erythrocytes of dog, cat, cow, horse, sheep and goat. *Res Vet Sci*, 13, 489-91.
- JÖNS, T. (ed.) 2001. *Zur Bedeutung von Zytoskelett- Membran- Verbindungen für die Gerichtete HCl-Sekretion von Parietalzellen*, Berlin: Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin.
- JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. & GRATZL, M. (eds.) 2003. *Histologie*, Pocos de Caldas-MG Sao Paulo München: Springer Medizin Verlag
- KIEFEL, V. (ed.) 2010. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, Rostock: Springer-Verlag GmbH.
- KLINKE, R., PAPE, H. C., KURTZ, A. & SILBERNAGL, S. (eds.) 2005. *Physiologie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- KOLB, G. M. H. (ed.) 1991. *Vergleichende Histologie: Cytologie und Mikroanatomie der Tiere*, Heidelberg: Springer-Verlag.
- KRAFT, W. 2005. Hämatologie. In: KRAFT & DÜRR (eds.) *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 6 ed.: Schattauer.
- LEWIS, J. H. 1976. COMPARATIVE HEMATOLOGY - STUDIES ON GOATS. *American Journal of Veterinary Research*, 37, 601-605.
- LIEBICH, H. G. (ed.) 2004. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*: Schattauer Verlag.
- LITTLE, M., QUINLAN, R. A., ROHRICHT, C. & DIEZ, J. 1987. STRUCTURAL DIFFERENCES BETWEEN BLOOD-PLATELET TUBULIN AND OTHER MAMMALIAN TUBULINS. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 916, 83-88.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. (ed.) 2009. *Taschenlehrbuch Histologie*, Kiel: Georg Thieme Verlag KG.
- MÄKELÄ, O. 1957. Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. *Ann Med Exp Biol Fenn*, 35, 1-133.
- PAULULAT, A., PURSCHKE, G. & HENTSCHEL, E. J. 2011. *Wörterbuch der Zoologie: Tiernamen, allgemeinbiologische, anatomische, physiologische, ökologische Termini*, Spektrum Akademischer Verlag.
- PÖTZSCH, B. & MADLENER, K. (eds.) 2010. *Hämostaseologie*, Berlin New York: Springer Verlag GmbH.
- PÜSCHEL, G., KÜHN, H., KIETZMANN, T., HÖHNE, W., CHRIST, B., DOENECKE, D. & KOOLMAN, J. (eds.) 2011. *Taschenlehrbuch Biochemie*, Stuttgart: Georg Thieme

- Verlag KG.
- RICHTER, G. 2003. *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken ; 19 Tabellen*, Thieme.
- ROMEIS (ed.) 2010. *Mikroskopische Technik*, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- RÜDIGER, H. 1978. LECTINS, SUGAR BINDING-PROTEINS FROM PLANTS. *Naturwissenschaften*, 65, 239-244.
- RÜDIGER, H. 1981. Time for chemistry in Chemie in Unserer Zeit. *Chemie in Unserer Zeit*, 5, 155 - 162.
- RÜSSE, I. & SINOWATZ, F. (eds.) 1991. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*: Verlag Paul Parey
- RYDER, M. I., NIEDERMAN, R. & TAGGART, E. J. 1982. THE CYTOSKELETON OF HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES - PHAGOCYTOSIS AND DEGRANULATION. *Anatomical Record*, 203, 317-327.
- SALOGA, J., KLIMEK, L., BUHL, R., MANN, W. & KNOP, J. (eds.) 2006. *Allergologie-Handbuch Grundlagen und klinische Praxis*, Stuttgart: Schattauer Verlag GmbH.
- SCHMID, D. O., G., B. H. & C., H. (eds.) 2003. *Blood Groups in Animals*: Pabst Science Publishers, Lengerich.
- SCHWER, H. D., LECINE, P., TIWARI, S., ITALIANO, J. E., HARTWIG, J. H. & SHIVDASANI, R. A. 2001. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Current Biology*, 11, 579-586.
- SEDLACEK, H. H. (ed.) 2009. *Die Immunabwehr des Menschen*, Altendorf: Skript Verlag Kühnel.
- SHARON, N. & LIS, H. 1986. LECTINS AS MOLECULES AND AS TOOLS. *Richardson, C. C.*
- SHARON, N. & LIS, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14, 53R-62R.
- SINOWATZ, F. & HEES, H. (eds.) 2000. *Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*: Deutscher Ärzteverlag.
- SMITH, G. S. (ed.) 1986. *Neutrophils*: Lippincott Williams & Wilkins.
- SMITH, M. C. & SHERMAN, D. M. 2009. *Goat Medicine*, John Wiley & Sons.
- STEINER, M. 1983. MEMBRANE-BOUND TUBULIN IN HUMAN-PLATELETS. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 729, 17-22.
- VANDAMME, J. M., PEUMANS, W. J., PUSZTAI, A. & BARDOCZ, S. (eds.) 1998. *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Application*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- WEISS, D. J. & WARDROB, K. J. (eds.) 2011. *SCHALM'S VETERINARY HEMATOLOGY SIXTH EDITION*: Wiley-Blackwell.
- WILLAM, A. & SIMIANER, H. 2011. *Tierzucht*, UTB GmbH.
- ZHANG, R. & BROWN, F. L. H. 2008. Cytoskeleton mediated effective elastic properties of model red blood cell membranes. *Journal of Chemical Physics*, 129.
- ZILLES, K. & TILLMANN, B. N. (eds.) 2010. *Anatomie*, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Blutzusammensetzung.....	<i>Fehler! Textmarke nicht definiert.</i>
Abbildung 2: Die Abstammung der Blutzellen:.....	<i>Fehler! Textmarke nicht definiert.</i>
Abbildung 3: Neutrophiler Granulozyt,	47
Abbildung 4: Neutrophiler Granulozyt,	47
Abbildung 5: Neutrophiler Granulozyt,	47
Abbildung 6: Neutrophiler Granulozyt,	47
Abbildung 7: Basophiler Granulozyt,	48
Abbildung 8: Basophiler Granulozyt,	48
Abbildung 9: Eosinophile Granulozyten,	50
Abbildung 10: Eosinophiler Granulozyt,	50
Abbildung 11: Eosinophiler Granulozyt,	50
Abbildung 12: Eosinophiler Granulozyt,	50
Abbildung 13: Lymphozyt,.....	51
Abbildung 14: Lymphozyt,.....	51
Abbildung 15: Lymphozyt,.....	51
Abbildung 16: Lymphozyt,.....	51
Abbildung 17: Monozyt,	52
Abbildung 18: Monozyt,	53
Abbildung 19: Monozyt,	52
Abbildung 20: Monozyt,	53
Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Neutrophiler Granulozyt.....	56
Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Neutrophilen Granulozyten	57
Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Neutrophilen Granulozyten	58
Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Eosinophilen Granulozyten	59
Abbildung 25: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Eosinophilen Granulozyten	60
Abbildung 26: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Lymphozyten	61
Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Lymphozyten	62
Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Lymphozyten	63
Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Monozyten.....	64
Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Monozyten.....	65
Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Monozyten.....	66
Abbildung 32: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Erythrozyten.....	67
Abbildung 33: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten.....	68

Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten.....	69
Abbildung 35: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten.....	70
Abbildung 36: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von ConA.....	72
Abbildung 37: Lymphozyt; Bindung von ConA.....	73
Abbildung 38: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von ConA.....	72
Abbildung 39: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von ConA.....	73
Abbildung 40: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von LCA	74
Abbildung 41: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von LCA	75
Abbildung 42: Lymphozyt; Bindung von LCA.....	74
Abbildung 43: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von LCA	75
Abbildung 44: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von PSA.....	77
Abbildung 45: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von PSA.....	77
Abbildung 46: Lymphozyt; Bindung von PSA.....	77
Abbildung 47: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von PSA.....	77
Abbildung 48: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von PNA	79
Abbildung 49: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von PNA	79
Abbildung 50: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von RCA	81
Abbildung 51: Lymphozyt; Bindung von RCA	81
Abbildung 52: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von RCA	81
Abbildung 53: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von RCA	81
Abbildung 54: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von WGA	83
Abbildung 55: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von WGA	83
Abbildung 56: Lymphozyt; Bindung von WGA	83
Abbildung 57: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von WGA	83
Abbildung 58: Neutrophile Granulozyten; Bindung von WGAs	85
Abbildung 59: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von WGAs.....	85
Abbildung 60: Lymphozyt; Bindung von WGAs.....	85
Abbildung 61: Thrombozyten; Bindung von WGAs	85
Abbildung 62: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von GSL-1	87
Abbildung 63: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von GSL-1	87
Abbildung 64: Lymphozyt; Bindung von GSL-1.....	87
Abbildung 65: Thrombozyten; Bindung von GSL-1	87
Abbildung 66: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von SJA	90
Abbildung 67: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von SJA	90
Abbildung 68: Lymphozyt; Bindung von SJA.....	90
Abbildung 69: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von SJA	90
Abbildung 70: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von SBA.....	92
Abbildung 71: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von SBA.....	92

Abbildung 72: Lymphozyt; Bindung von SBA.....	92
Abbildung 73: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von UEA-1.....	94
Abbildung 74: Monozyt; Bindung von UEA-1.....	94
Abbildung 75: Lymphozyt; Bindung von UEA-1.....	94
Abbildung 76: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von UEA-1.....	94
Abbildung 77: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von PHA-E.....	96
Abbildung 78: Thrombozyten; Bindung von PHA-E.....	96
Abbildung 79: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von PHA-E.....	96
Abbildung 80: Lymphozyt; Bindung von MAA.....	99
Abbildung 81: Thrombozyten; Bindung von MAA.....	99
Abbildung 82: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von SNA.....	101
Abbildung 83: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von SNA.....	101
Abbildung 84: Lymphozyt; Bindung von SNA.....	101
Abbildung 85: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von SNA.....	101
Abbildung 86: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von VAA.....	103
Abbildung 87: Monozyt; Bindung von VAA.....	103
Abbildung 88: Lymphozyt; Bindung von VAA.....	103
Abbildung 89: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von VAA.....	103
Abbildung 90: Lymphozyt; Bindung von Phalloidin.....	106
Abbildung 91: Lymphozyt; Bindung von Phalloidin.....	106
Abbildung 92: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von Phalloidin.....	106
Abbildung 93: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von Phalloidin.....	106
Abbildung 94: Lymphozyt; Bindung von Myosin 1:250.....	108
Abbildung 95: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von Myosin 1:250.....	108
Abbildung 96: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von Myosin 1:500.....	109
Abbildung 97: Monozyt; Bindung von Myosin 1:250.....	108
Abbildung 98: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von Myosin 1:500.....	108
Abbildung 99: Lymphozyt; Bindung von Myosin 1:500.....	109
Abbildung 100: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von Vimentin.....	111
Abbildung 101: Monozyt; Bindung von Vimentin.....	111
Abbildung 102: Lymphozyt; Bindung von Vimentin.....	111
Abbildung 103: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von Vimentin.....	111
Abbildung 104: Eosinophiler Granulozyt; Bindung von Tubulin.....	114
Abbildung 105: Monozyt; Bindung von Tubulin.....	114
Abbildung 106: Lymphozyt; Bindung von Tubulin.....	114
Abbildung 107: Neutrophiler Granulozyt; Bindung von Tubulin.....	114

2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: physiologische Blutparameter der Ziege:</i>	7
<i>Tabelle 2: Übersicht der Lektine</i>	21
<i>Tabelle 3: Blutgruppensystem Ziege</i>	28
<i>Tabelle 4: Untersuchte Ziegen</i>	29
<i>Tabelle 5: Übersicht der verwendeten FITC-markierten Pflanzenlektine modifiziert nach (Rüdiger und Gabius, 2009) (Gabius et al., 2011) (Habermann und Sinowatz, 2011))</i>	37
<i>Tabelle 6: Übersicht der verwendeten biotinylierten Lektine, modifiziert nach Gabius und Habermann (Gabius et al., 2011) (Habermann und Sinowatz, 2011)</i>	39
<i>Tabelle 7: Verwendete Hemmzucker</i>	40
<i>Tabelle 8: Übersichtsfärbungen neutrophiler Granulozyten</i>	46
<i>Tabelle 9: Übersichtsfärbungen basophiler Granulozyten</i>	48
<i>Tabelle 10: Übersichtsfärbungen eosinophiler Granulozyten</i>	49
<i>Tabelle 11: Übersichtsfärbungen Lymphozyten</i>	51
<i>Tabelle 12: Übersichtsfärbungen Monozyten</i>	52
<i>Tabelle 13: Übersichtsfärbungen Erythrozyten</i>	53
<i>Tabelle 14: Übersichtsfärbungen Thrombozyten</i>	54
<i>Tabelle 15: Bindung von ConA an die Blutzellen der Ziege</i>	72
<i>Tabelle 16: Bindung von LCA an die Blutzellen der Ziege</i>	74
<i>Tabelle 17: Bindung von PSA an die Blutzellen der Ziege</i>	76
<i>Tabelle 18: Bindung von PNA an die Blutzellen der Ziege</i>	78
<i>Tabelle 19: Bindung von RCA an die Blutzellen der Ziege</i>	80
<i>Tabelle 20: Bindung von WGA an die Blutzellen der Ziege</i>	82
<i>Tabelle 21: Bindung von WGAs an die Blutzellen der Ziege</i>	84
<i>Tabelle 22: Bindung von GSL-1 an die Blutzellen der Ziege</i>	86
<i>Tabelle 23: Bindung von DBA an die Blutzellen der Ziege</i>	88
<i>Tabelle 24: Bindung von SJA an die Blutzellen der Ziege</i>	89
<i>Tabelle 25: Bindung von SBA an die Blutzellen der Ziege</i>	91
<i>Tabelle 26: Bindung von UEA-1 an die Blutzellen der Ziege</i>	93
<i>Tabelle 27: Bindung von PHA-E an die Blutzellen der Ziege</i>	95
<i>Tabelle 28: Bindung von PHA-L an die Blutzellen der Ziege</i>	97
<i>Tabelle 29: Bindung von MAA-I an die Blutzellen der Ziege</i>	98
<i>Tabelle 30: Bindung von SNA an die Blutzellen der Ziege</i>	100
<i>Tabelle 31: Bindung von VAA an die Blutzellen der Ziege</i>	102
<i>Tabelle 32: Bindung von Phalloidin an die Blutzellen der Ziege</i>	105
<i>Tabelle 33: Bindung von Myosin an die Blutzellen der Ziege</i>	107
<i>Tabelle 34: Bindung von Vimentin an die Blutzellen der Ziege</i>	110
<i>Tabelle 35: Bindung von Panzytokerin an die Blutzellen der Ziege</i>	112

Tabelle 36: Bindung von Tubulin an die Blutzellen der Ziege..... 113

3. Verzeichnis der Gebrauchslösungen

LICHTMIKROSKOPIE

Herstellung der verdünnten Giemsa-Lösung:

Es wird eine Verdünnung von 1:20 hergestellt. Hierzu wird 1 ml der Giemsa-Stammlösung in 20 ml Aqua dest. gelöst.

Herstellung der Alcianblau-Färbelösung pH 2,5:

In der angerührten 3%igen Essigsäurelösung werden 5 g Alcianblau 8 GX Certistain[®] (MERCK, Darmstadt) unter Rühren gelöst.

Herstellung der Alcianblau-Färbelösung pH 1:

5 g Alcianblau 8 GX Certistain[®] (MERCK, Darmstadt) wurden in 500 ml 0,1 N Salzsäure gelöst.

Herstellung der Kernechtrotlösung:

10 g Aluminiumsulfat werden in 100 ml Aqua dest. gelöst. Nach Erhitzen der Lösung wurden 0,1 g Kernechtrot Certistain[®] (MERCK, Darmstadt) eingerührt, bis sich der Farbstoff gelöst hat. Nach abkühlen der Lösung wurde sie in eine Küvette filtriert.

Herstellung der Toluidinblau-Färbelösung:

1 g Toluidinblau wird in 100 ml Methanol gelöst.

Herstellung des SO₂ Wassers:

Zuerst werden 3 ml konzentrierte Salzsäure mit 27 ml Aqua dest. vermischt. Danach werden 3 g Natriumdisulfit in 30 ml Aqua dest. gelöst. Die beiden Flüssigkeiten werden vermischt und in 600 ml Leitungswasser gegeben. Das hergestellte SO₂ Wasser wird auf 3 Küvetten aufgeteilt.

Herstellung der wässrigen Perjodsäurelösung:

1 g Perjodsäurepulver wird in 200 ml Aqua dest. gelöst

ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Herstellung der Bleicitratlösung nach Reynolds:

Es wird zuerst Natriumcitrat Stock hergestellt indem man 35,7 g Natriumcitrat $\text{Na}_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2\text{H}_2\text{O}$ (MERCK, Darmstadt) in 100 ml Aqua dest. löst. Dann wird Bleinitrat Stock hergestellt indem man 33,1 g Bleinitrat $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (MERCK, Darmstadt) in 100 ml Aqua dest. löst. Dann werden 3 ml des Natriumcitrat Stock, 2 ml Bleinitrat Stock, 16 ml Aqua dest., 4 ml NaOH (1M) (MERCK, Darmstadt) in 100 ml Aqua dest. gegeben und gemischt.

Herstellung des Cacodylat- Puffer:

8,56 g Cacodylat $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (AGAR SCIENTIFIC LTD, Essex, England) werden in 200 ml Aqua dest. gelöst. Für einen Puffer mit 0,2 M und pH 7,2 werden 50 ml dieser Lösung mit 4,2 ml HCl (0,2 M) (MERCK, Darmstadt) und 100 ml Aqua dest. gemischt. Für 0,1 M und pH 7,2 werden 50 ml des Cacodylat- Puffer 0,2 M mit pH 7,2 und 50 ml Aqua dest. gemischt.

Herstellung des Epon:

16 ml Poly/bed 812 (Polyscience), 10 ml DDSA (Polyscience), 9 ml NMA (Polyscience) und 0,3- 0,5 ml DMP- 30 (Polyscience) werden gemischt. Alle Reagenzien stammen von POLYSCIENCES INC., Warrington, USA.

Herstellung der Fixierlösung nach Karnovsky:

1. 10 g Paraformaldehyd (MERCK, Darmstadt) werden in 100 ml Aqua dest. gelöst und 6 Tropfen NaOH (0,1 M) zugegeben.
2. Die Stammlösung wird hergestellt indem man 20 ml der Lösung 1 mit 50 ml Cacodylat-Puffer (0,2 M) mischt und 0,05 g Kalziumchlorid, wasserfrei (Serva, Heidelberg) zugibt.
3. Die Gebrauchslösung erhält man indem man 10 ml der Stammlösung mit 1037 ml 2,5% igen Glutaraldehyd (AGAR SCIENTIFIC LTD, Essex, England) mischt.

Herstellung der Kontrastierlösung:

Die Osmiumtetroxid-Lösung 2% wird durch Mischen von 2 ml 4%igen Osmiumtetroxid (Polyscience) mit 2 ml Cacodylat- Puffer (0,1 M) hergestellt. Die Kaliumferrocyanid- Lösung 3% wird durch Mischen von 0,3 g Kaliumferrocyanid (SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen) mit 10 ml Cacodylat-Puffer (0,1 M) hergestellt. Anschließend werden jeweils 4 ml der beiden Lösungen gemischt.

GLYKOHISTOCHEMIE

Herstellung des PBS-Puffers:

42,5 g NaCl, 6,35 g Na₂HPO₄ · 2H₂O (Di-Na-hydrogenphosphat-dihydrat) und 1,95 g NaH₂PO₄ · H₂O (Natrium-hydrogenphosphat-monohydrat) werden in 5 Litern Aqua demin. gelöst. Danach wird der pH auf 7,4-7,6 eingestellt.

Herstellung der FITC-markierten Lektinlösung:

In einem schwarzen Eppendorfgefäß werden 1ml PBS und 5 µl Lektin miteinander vermischt. Dabei ist darauf zu achten, dass kein Licht an die Lösung kommt.

Herstellung der Lektin-Hemmstoff-Lösungen:

1. ConA, LCA und PSA: in 1 ml PBS werden 5 µl Lektin und 84,8 g Hemmzucker gelöst
2. WGA: es wird eine Lösung im Verhältnis von Lektinlösung zu Hemmzucker von 1:4 hergestellt
3. PHA-E: Zu 1 ml der hergestellten Lektinlösung werden 24 µl der Essigsäure gegeben

Herstellung des Natrium-Acetatpuffers pH 5,5:

13,6 g des Natrium-Acetats werden in 1l Aqua demin. gelöst. Dann wird der pH-Wert mit 10% iger Essigsäure auf 5,5 eingestellt.

Herstellung des Natrium-Acetatpuffers mit Calciumchlorid pH 5,0:

8,2 g Natrium-Acetat und 0,294 g Calciumchlorid werden in 1l Aqua demin. gelöst. Der pH wird mit 1M HCl auf pH 5,0 eingestellt und alles auf 37°C bis 40°C erhitzt. Später wird zu 1 ml dieser Lösung 3 µl der Neuraminidase gegeben.

Herstellung der Lektinlösung für MAA-1 und SNA:

Die Konzentration der Ausgangslösung beträgt jeweils 10 µg/ml. 5 µl der Lektinlösung werden zu 1 ml PBS in ein weißes Eppendorfgefäß gegeben. Dieses wird gut vermischt.

Herstellung der Lektinlösung für VAA:

Die Konzentration der Ausgangslösung beträgt 2 µg/ml. In 1 ml PBS werden 20 µl der Lektinlösung gelöst.

Herstellung der Streptavidin-FITC-Lösung für Lektine:

In einem schwarzen Eppendorfgefäß werden 3 µl Streptavidin-FITC in 1497 µl PBS gelöst. Wichtig ist hierbei, dass kein Licht an die Lösung kommt.

ZYTOSKELETT

Herstellung der Phalloidin-TRITC-Lösung:

Die Phalloidin-TRITC-DMSO-Lösung ist in einer Konzentration von 500 µg/ml vorhanden. In ein schwarzes Eppendorfgefäß werden 3 µl dieser Lösung zu 1497 µl Antibody Diluent gegeben und gemischt.

Herstellung der Myosin-Lösung mit der Konzentration 1:500 :

3 µl der Myosin-Lösung werden in 1497 µl Antibody-Diluent gelöst.

Herstellung der Myosin-Lösung mit der Konzentration 1:250 :

6 µl der Myosin-Lösung werden in 1494 µl Antibody-Diluent gelöst.

Herstellung des Sekundärantikörpers für Myosin:

5 µl des Anti-Kaninchen-FITC werden in einem schwarzen Eppendorfgefäß in 1495 µl PBS gelöst und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Herstellung des Primär-AK Vimentin:

Es wird eine Verdünnung von 1:500 hergestellt. 3µl der Vimentin-Lösung werden mit 1497 µl Antibody-Diluent gemischt.

Herstellung des Sekundär-AK Vimentin und Tubulin:

Es wird eine Verdünnung von 1:20 hergestellt. 75 µl des Sekundär-AK werden mit 1425 µl PBS gemischt.

Herstellung Primär-AK Panzytokeratin:

15 µl des Primär- AK werden mit 1485 µl Antibody Diluent vermischt

Herstellung Primär-AK Tubulin:

Der Primär AK ist in einer Konzentration von 2 µg/ml vorhanden. 10 µl des Primär-AK werden mit 1000 µl Antibody Diluent vermischt.

X. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz, der mir die Möglichkeit für diese Dissertation gegeben hat und mich jederzeit äußerst freundlich unterstützt hat. Außerdem möchte ich mich ausdrücklich bei Frau Prof. Dr. C. Poulsen Nautrup bedanken, ohne deren Hilfe meine Arbeit nur schwer zu beenden gewesen wäre.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern des Institutes für Tieranatomie II, vor allem Frau C. Neumüller, Frau W. Scholz, Frau M. Settles und Frau Dr. D. Rodler für ihre Hilfsbereitschaft.

Weiterhin danke ich Frau C. Zauter, deren Ehrgeiz und Frohnatur im Doktorandenlabor auf mich stets ansteckend wirkte.

Ein großes Dankeschön an alle Landwirte, die mir die Probenentnahme ermöglichten und mich dabei tatkräftig unterstützten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir die Möglichkeit zu meinem Studium und zu dieser Arbeit gegeben haben und mich immer auf jede erdenkliche Weise unterstützen.