

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Ultrastrukturelle, glykohistochemische und
immunhistochemische
Untersuchungen der Blutzellen des Königspinguins
(*Aptenodytes patagonicus*)

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

Von

Ruth Franziska Bitai-Balyko

Aus

Münster

München 2013

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Sinowatz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Joachim Gabius

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Literaturübersicht.....	2
1.	Allgemeines zum Königspinguin.....	2
2.	Allgemeines zum aviären Blut.....	6
3.	Das Blut des Königspinguins	8
3.1	Allgemeines zum Blut des Königspinguins	8
3.2	Beschreibung der einzelnen Blutzellen	11
3.2.1	Erythrozyten.....	11
3.2.2	Thrombozyten	14
3.2.3	Leukozyten	15
3.2.3.1	Heterophile Granulozyten.....	16
3.2.3.2	Eosinophile Granulozyten	17
3.2.3.3	Basophile Granulozyten	18
3.2.3.4	Lymphozyten	19
3.2.3.5	Monozyten	20
3.3	Glykohistochemie.....	21
3.4	Immunhistochemie	25
III.	Material und Methoden	26
1.	Untersuchungsmaterial	26
2.	Lichtmikroskopische Untersuchungen.....	28
2.1.1	Diff-Quick Haema-Schnellfärbung.....	29
2.1.2	May-Grünwald-Färbung	29

2.1.3	May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai.....	30
2.1.4	Giemsa-Färbung	30
2.1.5	Panoptische Färbung nach Pappenheim.....	31
2.1.6	Sirius-Red-Färbung	31
2.1.7	Toluidinblau-Färbung	32
2.1.8	Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)	32
2.1.9	Alcianblau-Färbung	33
3.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	34
4.	Glykohistochemische Untersuchungen	35
4.1	FITC markierte Lektine	36
4.2	Biotinylierte Lektine	38
4.3	Vorbehandlung mit Hemmzuckern	39
5.	Immunhistochemische Untersuchungen	40
5.1	T-Lymphozyten spezifische Antigene, CD4 und CD8.....	41
5.2	Untersuchung des Zytoskeletts.....	42
5.2.1	Nachweis von Aktin mit Phalloidin-TRITC Markierung.....	42
5.2.2	Nachweis von Vimentin, Tubulin, Myosin und Zytokeratin	43
5.3	Eosinophil Major Basic Protein (EMBP).....	44
IV.	Ergebnisse	45
1.	Blutbilder der untersuchten Königspinguine	45
2.	Lichtmikroskopische Ergebnisse.....	47
2.1	Erythrozyten.....	48
2.2	Thrombozyten	51

2.3	Leukozyten	56
2.3.1	Heterophile Granulozyten.....	57
2.3.2	Eosinophile Granulozyten	63
2.3.3	Basophile Granulozyten	67
2.3.4	Lymphozyten	73
2.3.5	Monozyten	78
2.4	Verschiedene Zelltypen zum Vergleich	83
3.	Elektronenmikroskopische Ergebnisse	91
3.1	Erythrozyten.....	92
3.2	Thrombozyten	93
3.3	Leukozyten	95
3.3.1	Heterophile Granulozyten.....	96
3.3.2	Basophiler Granulozyten.....	98
3.3.3	Eosinophiler Granulozyten.....	99
3.3.4	Lymphozyten	100
3.3.5	Monozyten	101
4.	Glykohistochemische Ergebnisse	102
4.1	Auswertung Concanavalin Agglutinin (ConA)	103
4.2	Auswertung Pisum sativum Agglutinin (PSA).....	106
4.3	Auswertung Lens culinaris Agglutinin (LCA).....	109
4.4	Auswertung Ricinus communis Agglutinin (RCA).....	112
4.5	Auswertung Peanut Agglutinin (PNA)	113
4.6	Auswertung Viscum album Agglutinin (VAA).....	116

4.7	Auswertung Sophora japonica Agglutinin (SJA)	119
4.8	Auswertung Soybean Agglutinin (SBA)	122
4.9	Auswertung Griffonia simplicifolia Agglutinin 1 (GSL-1)	123
4.10	Auswertung Dolichos biflorus Agglutinin (DBA).....	125
4.11	Auswertung Sambucus nigra Agglutinin (SNA)	126
4.12	Auswertung Wheat germ Agglutinin (WGA)	127
4.13	Auswertung Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs)	130
4.14	Auswertung Ulex europaeus Agglutinin 1 (UEA-1)	133
4.15	Auswertung Phaseolus vulgaris Leukoagglutininoagglutinin (PHA-L).....	134
4.16	Auswertung Maackia amurensis Agglutinin 1-Leukoagglutinin (MAI)	135
4.17	Auswertung Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)	137
4.18	Auswertung Hemmzuckertest.....	139
5.	Immunhistochemische Ergebnisse	140
5.1	Auswertung T-Lymphozyten spezifisches Antigen CD4	141
5.2	Auswertung T-Lymphozyten spezifisches Antigen CD8	143
5.3	Auswertung Aktin	145
5.4	Auswertung Vimentin	149
5.5	Auswertung Tubulin	151
5.6	Auswertung Myosin	152
5.7	Auswertung Panzytokeratin	154
5.8	Auswertung Eosinophil Major Basic Protein (EMBP)	155
V.	Diskussion	156
VI.	Zusammenfassung.....	170

VII. Summary	172
VIII. Literaturverzeichnis	174
IX. Anhang	181
1. Abkürzungsverzeichnis	181
2. Gebrauchslösungsverzeichnis	184
2.1 Lichtmikroskopie	184
2.2 Elektronenmikroskopie	186
2.3 Glykohistochemie.....	188
2.4 Immunhistochemie	189
3. Tabellenverzeichnis	190
4. Abbildungsverzeichnis	192
5. Untersuchungsbogen Pinguin (exemplarisch)	197
6. Wetterdaten	198
X. Curriculum vitae	207
XI. Danksagung	208

I. Einleitung

Wenn etwas sehr spannend ist, dann scheint „das Blut in den Adern zu gefrieren“.

Allerdings passiert dies bei lebenden, homoiothermen Tieren natürlich niemals, selbst dann nicht, wenn sie, wie der Königspinguin (*Aptenodytes patagonicus*), extrem kalten Lebensbedingungen ausgesetzt sind. So muss dieser an Land Schnee, Eis und Wind bei Temperaturen von bis zu -30°C trotzen, und findet seine Nahrung in über 300 Metern Tiefe im Antarktischen Meer in Dunkelheit und Kälte, bei bis zu -2°C Wassertemperatur, während bis zu 8min dauernden Tauchgängen. An der Wärmeregulation ist das Blut entscheidend beteiligt. Wie sieht nun das Blut eines solchen Vogels aus?

Aufgrund seiner erstaunlichen physiologischen Anpassungen an das Tauchen und die unwirtlichen Wetterbedingungen beschäftigen sich immer mehr Studien mit dem Königspinguin. Auch als beliebte Zootiere haben sich Königspinguine etabliert. Wie beispielsweise im Loro Parque auf der Insel Teneriffa, einem bekannten Zoologischen Garten, in welchem 64 Königspinguine leben und woher die Proben für diese Arbeit stammen. Bisher gibt es in der Literatur keine umfassende morphologische Beschreibung, oder eine weitergehende ultrastrukturelle, glykohistochemische und immunhistochemische Charakterisierung der Blutzellen des Königspinguins. Meine Arbeit soll einen Überblick über die funktionelle Morphologie der Zellen des Blutes des Königspinguins geben und bedient sich verschiedener Methoden, um dies zu gewährleisten. So wurden Blutausstriche von gesunden Vögeln angefertigt, unterschiedlichen konventionellen, substrathistochemischen und immunhistochemischen Färbungen unterzogen und lichtmikroskopisch, fluoreszenzmikroskopisch und elektronenmikroskopisch ausgewertet. Die Blutzellen wurden dabei unter anderem mit fluoreszenzmarkierten Lektinen inkubiert, um deren Zuckerstruktur zu charakterisieren. Auch das Zytoskelett wurde eingehend betrachtet.

Viele Krankheiten zeigen sich in einer charakteristischen Veränderung der Blutparameter und der Morphologie der Zellen des Blutes. In der Tiermedizin stellt die Blutuntersuchung beim Vogel ein unverzichtbares diagnostisches Hilfsmittel dar, da mit relativ geringem Aufwand und vertretbarer Belastung der Vögel entscheidende Erkenntnisse über den Zustand eines Tieres gewonnen werden können.

In meiner Arbeit werde ich versuchen, einen detaillierten Überblick über die funktionelle Morphologie der Blutzellen gesunder Königspinguine zu geben. Dies soll dazu beitragen, Blutproben dieser Vogelspezies genauer beurteilen zu können.

II. Literaturübersicht

1. Allgemeines zum Königspinguin

Der Königspinguin (*Aptenodytes patagonicus*) (Bild 1) gehört zur Klasse der Vögel (*Aves*), der Unterklasse der Neukiefervögel (*Neognathae*), zur Ordnung der Pinguine (*Sphenisciformes*), zur Familie der Pinguine (*Spheniscidae*) und hier gemeinsam mit dem Kaiserpinguin (*Aptenodytes forsteri*) zur Gattung der Großpinguine (*Aptenodytes*). Er wird 85-100 cm groß, wiegt zwischen 12 und 20 kg und die Spezies gilt in freier Wildbahn wegen leicht ansteigender Populationszahlen als „nicht gefährdet“ (Cranfield, 2003; IUCN, 2012). Pinguine sind pelagische Vögel mit besonderen anatomischen Adaptionen an das Leben im Wasser und an fordernde Habitats. Alle 18 Pinguinarten sind flugunfähig und haben einen für Vögel ungewöhnlich aufrechten Gang. Zur Brut und Jungenaufzucht sowie für die Mauser kommen sie an Land. Sie zeigen ein ausgeprägtes Sozialverhalten und leben oft in großen Kolonien mit mehreren tausend Individuen zusammen (Williams, 1995; Ahne, 2000; Cranfield, 2003).

Im Folgenden wird aufgezeigt, weshalb dieser Vogel in den Focus der Wissenschaft gerückt ist und es wird erläutert, weshalb das Blut dieses Tieres genauer untersucht worden ist.

Der Königspinguin hat sich den extremen Bedingungen seines natürlichen Lebensraumes, den subantarktischen Inseln zwischen dem 45° und 55° Breitengrad, wo sich Kolonien auf den Kerguelen, der Macquarie-Insel und der Heard-Insel, den Prinz-Edward-Inseln und Crozetinseln sowie Südgeorgien und den Falklandinseln finden, perfekt angepasst (Williams, 1995). In diesen Breitengraden herrscht raues Klima mit Höchsttemperaturen von max. 10°C im Sommer (September bis Mai) und bis zu -30°C im Winter (Juni-August). Die sog. Roaring Forties und Furious Fifties des Westwinddrifts sorgen an Land für stürmische Winde und reichlich Niederschlag sowie Schneestürme und ausgedehnte Nebelperioden zu jeder Jahreszeit (Klimadaten siehe Anhang) (DWD). Pinguine haben im Vergleich zu allen anderen Vögeln den am besten an das Leben in einem kalten, flüssigen Medium angepassten Körperbau (Tamburrini et al., 1994). So weisen Königspinguine einen extrem stromlinienförmig gebauten Körper auf, der es ihnen erlaubt, nahezu ohne Strömungswiderstand und Verwirbelungen mit bis zu 8,6km/h Durchschnittsgeschwindigkeit durchs Wasser zu gleiten (Bannasch, 1986, Bannasch, 1987, Bannasch, 1995; Culik et al., 1996; Fish, 2000). Pinguine im Allgemeinen haben keine pneumatisierten Knochen, sind nahezu neutral im Auftrieb, sie besitzen eine subkutane Fettschicht und ein

wasserdichtes Federkleid, was sie zu idealen Tauchern bei geringstmöglichem Energieaufwand macht. Schnabelform, Schwanz und Füße sorgen für eine herausragende Manövrierfähigkeit (Butler, 2000).

Das Aufrechterhalten der Körperkerntemperatur, die beim Königspinguin 37,8°C bis 38,9°C beträgt, ist bei tauchenden Spezies essenziell, haben sie es doch im Medium Wasser mit einer 25fach höheren Wärmeleitfähigkeit zu tun als in Luft (Schmidt et al., 2006). Isolation wird durch das spezielle Federkleid erreicht und die besagte subkutane Fettschicht. Den Großteil des Körpers bedecken überlappende, mit Daunen am Federschaft besetzte Federn. Zusätzlich dazu gewährt der Blutkreislauf und besondere Bindungseigenschaften des Hämoglobins des Königspinguins eine ideale Wärmeregulation (Cranfield, 2003; Patrick J Butler, 2004; Schmidt et al., 2006). Unterkühlung zu vermeiden hat oberste Priorität bei Pinguinen, weshalb Vögel, welche bei einer Ölkatastrophe verschmutzt wurden, erst dann wieder in die freie Wildbahn entlassen werden, wenn ihr Federkleid keine undichte Stelle mehr aufweist, die größer als ein 50 Cent Stück ist (van der Merwe, 2001; Cranfield, 2003).

Ihre Beute, vor allem Laternenfische (*Myctophidae*) der Gattungen *Electrona carlsbergii*, *Frefftichtys andersonni* und *Protomyctophum tsoni*, finden Königspinguine im Antarktischen Meer bei ca. -2°C Grad Wassertemperatur in Tauchgängen bis 300m Tiefe, die bis zu 8 Minuten dauern können. Sie absolvieren ca. 150 Tauchgänge pro Tag, mehr als die Hälfte davon in Tiefen von über 50m (DWD; Kooyman et al., 1982; Howland und Sivak, 1984; Cherel und Ridoux, 1992; Kooyman et al., 1992; Pütz, 1993; Kooyman, 2012).

Durch eine spezielle Abflachung der Linse der Augen und eine bei Kontraktion viereckige Pupille sind Königspinguine in der Lage, an Land und im Wasser, auch bei schlechten Lichtverhältnissen scharf zu sehen (Sivak und Millodot, 1977).

Um den extremen Salzgehalt in Nahrung und Meerwasser zu kompensieren, besitzen Pinguine spezielle Salzdrüsen in der Gesichtsregion, die histologisch Nierengewebe gleichen. Diese Drüsen, die nur bei salzhaltiger Diät und Trinkwasser ihre Funktionalität behalten, helfen beim Ausgleich des Salzhaushaltes (Cranfield, 2003).

Königspinguine legen 280-300g schwere Eier, welche sie 52-57 Tage lang stehend, in einer Hautfalte auf den Füßen ausbrüten (Groscolas, 1990). Pinguine besitzen einen besonders effektiven Gegenstromapparat aus Blutgefäßen, um die Temperaturdifferenz zwischen den Füßen, die extremer Kälte ausgesetzt sind, und dem Körperinneren auszugleichen. Zudem greift auch hier der erweiterte Bohr-Effekt ihres Hämoglobins (vgl. Kapitel 3.1), welcher die

Sauerstoffversorgung auch in diesen stark unterkühlten Geweben gewährleistet (Clementi et al., 1994; Clementi et al., 2003).

Tabelle 1: Lufttemperatur in °C (Mittleres Tagesmittel) an Standorten der Königspinguinkolonien (mit Deutschland als Vergleich) (DWD)

Region	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jahr
Alfred-Faure, Crozet-Inseln	6,6	7,6	7,5	6	5,3	4,6	3,3	3,3	3,1	3,5	4,7	5,6	5,1
Port-aux-Francais, Kerguelen	7,2	7,5	7	5,6	3,7	2,4	2	2	2,2	3,3	4,7	6,3	4,5
Bouvet-Insel	1,6	1,5	1,5	0,3	-0,5	-1,1	-2,7	-2,5	-2,7	-1,7	-0,6	0,7	-0,6
Marion Eiland	7,2	7,7	7,4	6,2	5,1	4,7	4,1	3,7	3,8	4,5	5,3	6,3	5,5
Stanley / Falkland-Inseln	8,8	9,1	8,1	6	3,8	2,6	2,1	2,5	3,4	5	6,9	7,9	5,6
Grytviken / Süd-Georgien	4,9	5,6	4,8	2,5	0,1	-0,5	-1,2	-1,2	0,1	1,9	3,3	3,7	2
Campbell Island	9,3	9,4	8,8	7,7	6,3	5,6	5,3	5,6	5,8	6,4	7,1	8,6	7,2
Heard Island	6	4,8	4,9	4	2,9	0,8	0,7	0,1	0	1,2	1,9	3,6	2,4
Macquarie Island	7,1	7,1	6,5	5,3	4,4	3,4	3,4	3,5	3,6	3,9	4,6	6,1	4,9
Deutschland	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9

Tabelle 2: Wassertemperatur in °C (Mittelwert) in Gewässern nahe der Standorte der Königspinguinkolonien (DWD)

Region	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jahr
Marion Eiland	5,5	6	5,9	5,5	4,9	4,5	4,2	4,1	4	4,2	4,7	5,1	4,9
Ushuaia/ Insel Feuerl.	7	7	6	6	5	5	4	4	4	5	5	6	5
Süd-Orkney-Inseln	-0,4	-0,1	-0,2	-0,9	-1,5	-1,7	-1,8	-1,8	-1,7	-1,7	-1,4	-0,9	-1,2



Bild 1: Königspinguine (*Aptenodytes patagonicus*) (Foto: Matthias Zepper)

Königspinguine haben einen schwarzen Kopf und eine schwarze Kehle. Adulte Tiere weisen gelborangene Flecken an den hinteren Kopfseiten auf, die sich um den Hals bis zur Vorderbrust ziehen. Die Rückenseite ist von kleinen, harten, silbrig graublauen Federn bedeckt. Ein schwarzer Streifen läuft von der Kehle bis zu den zu Flossen umfunktionierten Flügeln, deren Unterseite bis auf die schwarze Spitze weiß gefärbt ist. Unterhalb der orangegelben Brustpartie geht das Gefieder in weiß über. Der schmale Schnabel hat eine Länge von 11,4-13,7cm. Im Gegensatz zum schwarzen Oberschnabel ist am Unterschnabel eine elliptische, leuchtend orange oder gelbe Fläche zu sehen, die dem Königspinguin das typische Aussehen verleiht. Die Füße und Beine sind schwarzgrau (Woods und Woods, 1997).

2. Allgemeines zum aviären Blut

Blut besteht aus Plasma und den darin befindlichen korpuskulären Elementen. Durch das Blut wird der Austausch von Atemgasen in den Körperzellen gewährleistet, es werden Wasser, Elektrolyte und Hormone transportiert sowie der Wärme- und der Säure/Basen-Haushalt im Gleichgewicht gehalten. Es trägt entscheidend zur Immunabwehr des Körpers bei und beinhaltet die Gerinnungsfaktoren (Sinowatz und Hees, 2006).

Die herausragendsten Unterschiede von Vogel- zu Säugerblut sind die kernhaltigen Erythrozyten und Thrombozyten sowie die heterophilen Granulozyten, welche die Aufgaben der neutrophilen Granulozyten von Säugetieren übernehmen. Insgesamt ist die Hämatopoese bei Vogel und Säuger in ihrem Ablauf jedoch größtenteils ähnlich (Bild 2) (Prinzinger et al., 2012). Der zelluläre Anteil des Blutes setzt sich beim Vogel folglich aus kernhaltigen Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten zusammen, die sich in Monozyten, Lymphozyten sowie heterophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilen lassen (Prinzinger et al., 2012). Im Plasma, welches zu 90% aus Wasser besteht, sind Proteine, hauptsächlich Gerinnungsfaktoren und Immunglobuline sowie Kohlenhydrate, Lipide und Fettsäuren, Hormone und Enzyme, stickstoffhaltige Nichtproteine, anorganische Bestandteile und Elektrolyte gelöst (Hazelwood, 1999; König et al., 2001; Sinowatz und Hees, 2006; O'Malley, 2008). Der zirkulierende Blutanteil macht beim Vogel ca. 3-13% der Körpermasse aus, ähnlich wie beim Säuger. Der mittlere Hämatokrit der Vögel liegt bei $45 \pm 7,1\%$ und variiert, wie andere Blutparameter auch, je nach Geschlecht, Gesundheitszustand, Körpergröße, Alter, Lebensbedingungen, Jahres- und Tageszeit, Lichtintensität (Lux-Wert) sowie proportional zur Stoffwechselaktivität (Jain, 1993; Prinzinger et al., 2012). Bei Wasservögeln sind sowohl Blutvolumen als auch Plasmavolumen, Erythrozytenvolumen und Hämoglobinkonzentration im Vergleich zu Nichtwasservögeln erhöht (Bond und Gilbert, 1958).

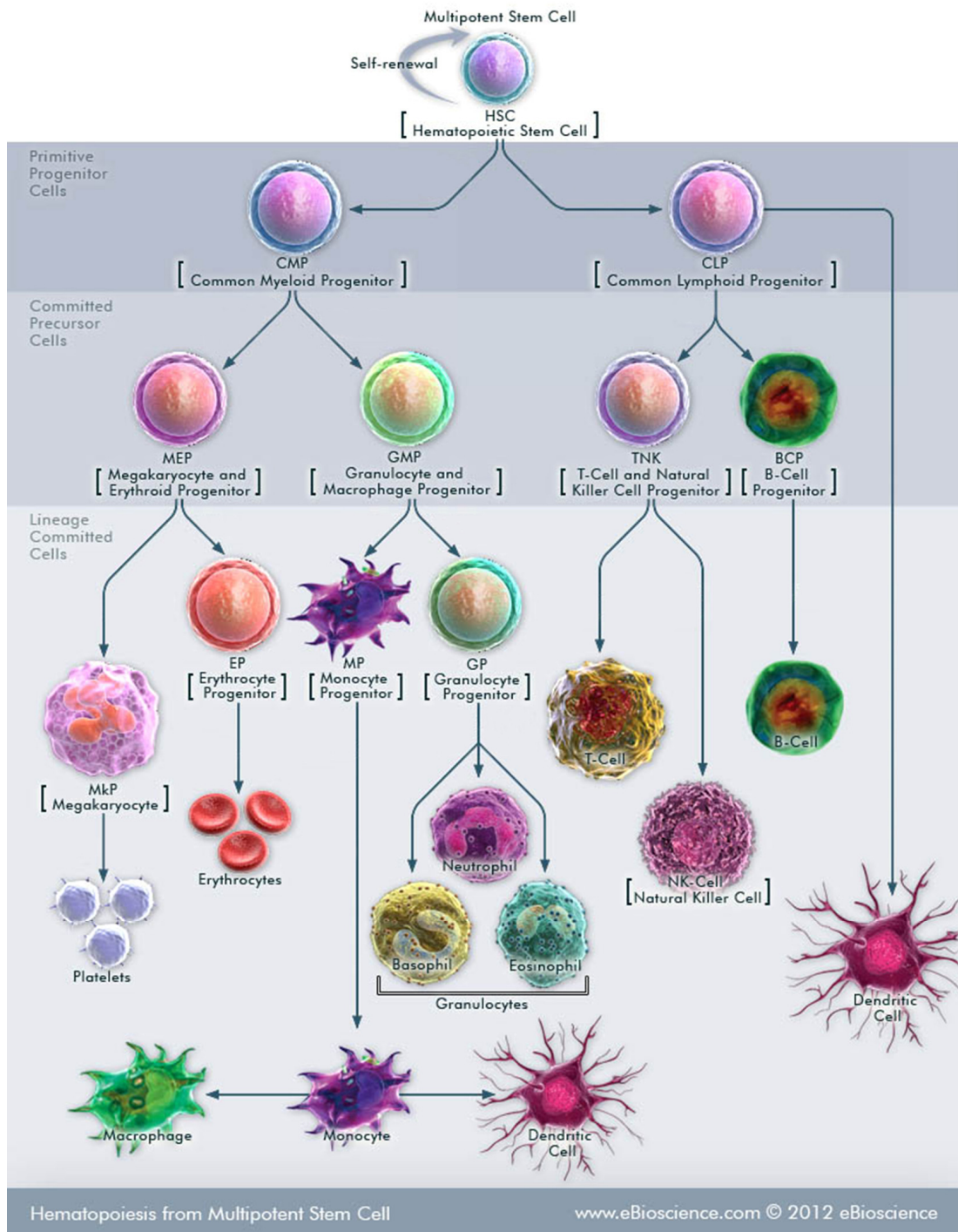


Bild 2: Hämatopoese (Grafik: „eBioscience, an Affymetrix company“)

Die Hämatopoese verläuft beim Vogel und beim Säugetier weitestgehend ähnlich. In der Grafik ist die Bildung der Blutzellen des Menschen aus blutzellbildenden Stammzellen (leicht vereinfacht) dargestellt.

3. Das Blut des Königspinguins

Aufgrund der extremen Lebensumstände der Pinguine im Allgemeinen und des Königspinguins im Speziellen, weisen deren Blutzellen verschiedene Anpassungen auf. Zunächst werden hier grundlegende Besonderheiten des Blut- und Kreislaufsystems aufgezeigt, dann wird auf die einzelnen Zellen eingegangen.

3.1 Allgemeines zum Blut des Königspinguins

Das Blut des Königspinguins (Bild 3) muss den Sauerstofftransport unter extremsten Temperatur-, Druck- und pH-Wert-Schwankungen gewährleisten, was angesichts der Bedingungen des subarktischen Lebensraumes und des charakteristischen Tauchverhaltens besondere Adaptionen bedingt (Clementi et al., 1994; Tamburrini et al., 1994).

Die Hämoglobinkonzentration im Blut hängt stets vom Sauerstoffbedarf eines Vogels ab. So sind die Werte, welche eng mit den Hämatokrit-Werten verknüpft sind bei Arten, die viel oder hoch fliegen, wie zum Beispiel Kolibris oder Tauben, oder solchen, die in großen Höhen leben, höher als bei anderen Spezies (Prinzinger et al., 2012). Pinguine haben einen höheren Hämatokrit als nichttauchende Spezies, wenn auch der Unterschied zu Nicht-Wasservögeln weniger deutlich ist, als von tauchenden zu nicht-tauchenden Säugetieren (C Lenfant, 1969; Nicol et al., 1988).

Das Hämoglobin (Hb) dieser Vögel weist eine besondere Struktur auf. So exprimieren Pinguine nur HB-A, im Gegensatz zu anderen Vögeln, in deren Blut sich auch HB-B bis HB-D sowie weitere Grundtypen von Hämoglobin nachweisen lässt (Prinzinger et al., 2012). Pinguinhämoglobin hat eine außergewöhnliche, an die Erforderlichkeiten des Gasaustausches bei langen Tauchgängen angepasste Sauerstoffbindungskurve. Das beim Tauchen anfallende Lactat und der daraus resultierende niedrige pH-Wert beeinflussen den Sauerstofftransport im Pinguinblut so gut wie gar nicht. Dieser ausgeprägte und breitgefächerte Bohr-Effekt verhindert eine unkontrollierte, rapide Abgabe von Sauerstoff an den Hämoglobinmolekülen auch unter Randbedingungen (Clementi et al., 1994; Tamburrini et al., 1994; Prinzinger et al., 2012).

Königspinguine tauchen länger als 7min und über 300 Meter tief (Kooyman et al., 1982; Kooyman et al., 1992). Es wird angenommen, dass während dieser Tauchgänge ein sogenanntes Aerobic Dive Limit (ADL) erreicht wird, also der Zeitpunkt, an dem der gesamte

Sauerstoff im Gewebe und im Blut aufgebraucht ist, und der Stoffwechsel von aerob auf anaerob umgestellt wird. Wenn man diesen Zeitpunkt vorausberechnet, spricht man vom „errechneten“ Tauchlimit, oder englisch „calculated dive limit“, also vom cADL (Castellini et al., 1992; Williams et al., 2011). Ob Pinguine allerdings wirklich auf anaeroben Stoffwechsel umstellen, ist weiterhin umstritten und es wird nach anderen physiologischen Effekten geforscht, um die über das cADL hinausgehenden Tauchgänge, deren Anteil zwischen 45% und 30% beträgt, zu erklären (Culik et al., 1996). Es wird zudem angenommen, dass teilweise bestimmte Muskelgruppen, Organe oder Körperregionen wie Flossen oder Füße durch einen Shunt teilweise vorübergehend von der Blutzirkulation abgetrennt werden, um bei besonders langen Tauchgängen erhöhte Lactatkonzentration, Stickstoff oder zu kaltes Blut von den lebenswichtigen Organen wie Hirn und Herz fernzuhalten und dass die Königspinguine ihre Herzfrequenz teilweise verlangsamen (Fahlman et al., 2005; Schmidt et al., 2006; Knight, 2008).

Die nutzbaren O₂-Reserven sind beim Königspinguin, ähnlich wie bei anderen tieftauchenden Tieren, zwischen 70-95% in Blut und Muskeln, vor allem im großen Brustmuskel, und nur zu 20-30% im respiratorischen System. Der Sauerstoff wird also größtenteils im Myoglobin (Mb) gespeichert (Butler, 1982, Butler, 2001; Patrick J Butler, 2004).

Während der Mauser, bei der sich die neuen Federn unter den alten bilden und diese regelrecht herauschieben, um den größtmöglichen Schutz vor Unterkühlung zu gewährleisten, sinkt der Calciumspiegel (Ca) im Blut des Pinguins um 30% und der Eisengehalt (Fe) um 70-80%. Der Hämoglobingehalt sinkt um 20%. Der Gehalt an PO₄³⁻ (Phosphat-Anion) sinkt durch das zwangsläufige Fasten während dieser Zeit um bis zu 75%. Königspinguine sind wahre „Fastenkünstler“ (Cranfield, 2003; Prinzinger et al., 2012).



Bild 3: Königspinguin (*Aptenodytes patagonicus*) (Foto: Matthias Zepper)

3.2 Beschreibung der einzelnen Blutzellen

Nach den allgemeinen Anpassungen des Blut- und Kreislaufsystems des Königspinguins wird nun im Folgenden eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Zelltypen vorgenommen.

3.2.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten der Vögel sind scheibenförmige, ovale Zellen mit einem zentralen, ebenfalls ovalen Kern (Bild 4) mit dichtem, grob gekörntem Chromatin. Der Zellkern ist bikonvex und ist unter dem Rasterelektronenmikroskop auch ohne Anschnitt zu erkennen (Bild 5) (Clark et al., 2009; Prinzing et al., 2012).

Durch den Zellkern ist der Stoffwechsel der Erythrozyten des Vogels etwa doppelt so hoch wie der der Erythrozyten von Säugetieren. Das bedeutet, dass auch aerob Glykolyse betrieben werden kann und Zucker, Proteine und Fette nicht nur anaerob verstoffwechselt werden können. Dies führt aber auch zu einer kürzeren Lebensdauer dieses Blutzellentyps, nämlich nur 20-25 Tage, verglichen mit Säugererythrozyten, welche mehrere Monate, bis zu 120 Tage überdauern können (Hazelwood, 1999; Prinzing et al., 2012).

Das Verhältnis von Erythrozyten zu Leukozyten liegt bei 300:1 im aviären Blut (Prinzing et al., 2012). Unreife Erythrozyten, sog. Proerythrozyten oder Retikulozyten machen ca. 1-5% der Erythrozyten aus. Diese sind geringfügig größer, ihr Zytoplasma färbt sich leicht basophiler an und das Chromatin des Zellkerns ist noch etwas lockerer gepackt als das der reifen Nachfolgezellen (Sinowatz und Hees, 2006; Clark et al., 2009).

Königspinguine besitzen weniger, aber dafür größere Erythrozyten als andere Vögel, deren durchschnittliche Erythrozytengröße bei $12,5 \pm 1,3 \times 6,8 \pm 0,9 \mu\text{m}$ liegt (Nicol et al., 1988; Prinzing et al., 2012). Fayolle gibt in einer der wenigen Studien über das Blut dieses Vogels die Erythrozytenzahl mit 2×10^6 Zellen/ μl im Vollblut und die Größe mit $14,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ Länge und $9,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ Breite an (Fayolle et al., 2000). Pinguine im Allgemeinen, wie auch andere Wasservögel, wie z.B. Enten, haben weniger, nämlich $1,97 \pm 0,22 \times 10^6$ Zellen/ μl , und 10% längere und 5% breitere Erythrozyten. Diese Zellen weisen mit $15,0 \pm 2,3\%$ einen im Vergleich zu anderen Vogelarten ähnlichen Hämoglobingehalt auf (Prinzing et al., 2012).

In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass auch Datenmaterial zum Hämatokritwert, oder das im Englischen sogenannte „packed cell Volume - PCV“ hier berücksichtigt wurden. Das ist damit zu begründen, dass der Hämatokritwert sich zum überwiegenden Prozentsatz aus Erythrozyten zusammensetzt und häufig bestimmt wird.

Demzufolge liegen mehr Daten vor und Schwankungen aufgrund physiologischer Adaptionen können direkt mit der Erythrozytenzahl verknüpft werden (Prinzinger et al., 2012). Der Hämatokrit liegt laut Fayolle beim Königspinguin zwischen 43% und 48% bzw. bei $47,8 \pm 5,3\%$ laut Cranfield (Fayolle et al., 2000; Cranfield, 2003). Bei Jungtieren ist der Hämatokritwert mit $43,2 \pm 1,0\%$ niedriger, bei adulten Tieren in der Mauser leicht höher, bei $48,2 \pm 1,4\%$. Im Vergleich hierzu liegt der Hämatokrit beim Haushuhn (*Gallus gallus*) durchschnittlich bei 40,8% bei männlichen und 25,5% bei weiblichen Tieren. Für den Königspinguin liegen nur wenige Daten zu einem theoretischen, aber bislang nicht weiter verifizierten Geschlechtsdimorphismus vor (Prinzinger et al., 2012).

Erythrozyten des Königspinguins weisen einen außergewöhnlich hohen Gehalt an Cardiolipin und langkettigen N-3 Fettsäuren auf. Es wird angenommen, dass dies zur Effektivität der Blutzirkulation und einer Verbesserung des Sauerstofftransportes beitragen könnte (Fayolle et al., 2000). Hämoglobin stellt 60-90% der Trockensubstanz der Erythrozyten, weniger als 1% des Gesamthämoglobins befindet sich im Zellkern. Es ist im Wesentlichen wie beim Säuger aufgebaut, jedoch exprimieren Pinguine wie oben erwähnt nur einen speziellen Grundtyp, nämlich Hämoglobin A (Prinzinger et al., 2012). Das Hämoglobin der Kaiserpinguine (*Aptenodytes forsteri*) besteht aus 141 α -Hämoglobinketten und 146 β -Hämoglobinketten (Monier et al., 1973; Tamburrini et al., 1994). Es ist anzunehmen, dass das des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) ähnlich aufgebaut ist, da selbst zum nicht so nahe verwandten Huhn (*Gallus gallus*) eine hohe Sequenzgleichheit besteht (Di Prisco et al., 2000).

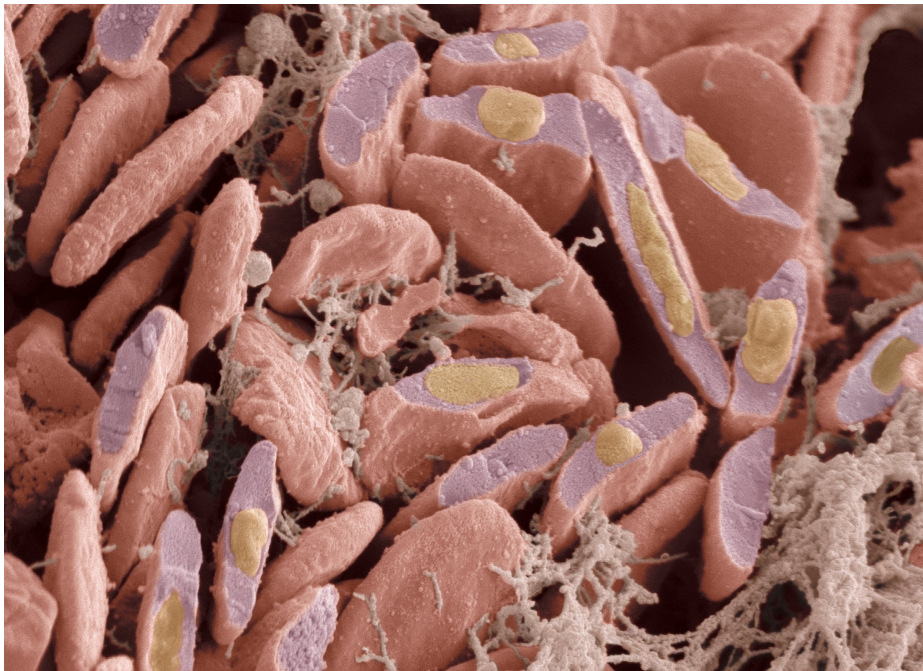


Bild 4: Aviäre Erythrozyten eines Sperlings (*Passeridae*), teils angeschnitten, unter dem Rasterelektronenmikroskop (Science Photo Library / Agentur Focus)

Die Zellkerne der aviären Erythrozyten sind deutlich zu erkennen.



Bild 5: Aviäre Blutzellen eines Sperlings (*Passeridae*) unter dem Rasterelektronenmikroskop in Draufsicht (Science Photo Library / Agentur Focus)

Die bikonvexen Zellkerne sind in den Erythrozyten zu erkennen.

3.2.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten der Vögel sind kernhaltige Zellen, auch Spindelzellen genannt, und wie die Thrombozyten der Säuger, verantwortlich für die Hämostase (Lucas und Jamroz, 1961). Zudem können sie phagozytieren (Gylstorff et al., 1998). Die Hämostase setzt beim Vogel bereits zehn Sekunden nach der Läsion ein, also wesentlich schneller als beim Säugetier (Djojogito et al., 1968; Prinzing et al., 2012).

Thrombozyten sind oval bis rundlich und der hier ebenfalls ovale Kern aus dicht gepacktem Chromatin füllt fast das gesamte Zellvolumen aus. Ihre Größe ist mit 3-5 x 7-10µm angegeben und somit größer als die Blutplättchen der Säuger. Im Blutaussstrich sind sie sowohl einzeln als auch aggregiert zu finden (Jain, 1993; Prinzing et al., 2012). Das Zytoplasma der Thrombozyten färbt sich in den gängigen Übersichtsfärbungen blass bis basophil an. Bei aktivierten Zellen sind Pseudopodien des Zytoplasmas und Vakuolen zu erkennen (Clark et al., 2009).

Mit 32% im Durchschnitt sind Thrombozyten die zweithäufigsten Blutzellen (Prinzing et al., 2012). Beim Königspinguin sind es 18000 Zellen/µl mit einer Größe von 7,1±0,1µm Länge und 5,9±0,2µm Breite (Fayolle et al., 2000).

3.2.3 Leukozyten

Leukozyten sind die sogenannten „weißen“ (griech. *leukos* = weiß) Blutkörperchen. Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, letztere unterteilt in heterophile, eosinophile und basophile Granulozyten, gehören zu dieser Gruppe.

Leukozyten kommen mit einer Häufigkeit von $9-32 \times 10^3/\mu\text{l}$ beim Vogel vor (Marion, 2013). Wird Blut zentrifugiert, um den Hämatokritwert zu bestimmen, der den zellulären Anteil des Blutes anzeigt, erhält man zwischen dem Plasma und den Erythrozyten eine dünne Schicht, in der sich die Leukozyten ablagern, den sogenannten „buffy coat“. Er macht 1-1.5% des Gesamtblutvolumens aus. Darin sind Lymphozyten mit einer Häufigkeit von ca. 50%, heterophile Granulozyten mit ca. 40%, eosinophile Granulozyten mit ca. 4%, basophile Granulozyten mit ca. 2,2% und Monozyten mit ca. 3,8% vertreten (Prinzinger et al., 2012). Für den Königspinguin gibt Cranfield die Lymphozyten mit ca.49%, also $6,766 \pm 5,487 \times 10^3/\mu\text{l}$, die Heterophilen mit ca. 40%, also $5,455 \pm 3,811 \times 10^3/\mu\text{l}$, die Eosionophilen mit ca. 2%, also $0,226 \pm 0,17 \times 10^3/\mu\text{l}$, die Basophilen mit ca. 5,4%, also $0,746 \pm 0,565 \times 10^3/\mu\text{l}$ und die Monozyten mit ca. 4,57%, also $0,632 \pm 0,587 \times 10^3/\mu\text{l}$ an (Cranfield, 2003).

Leukozyten sind für die Immunabwehr verantwortlich. Sie sorgen für die Beseitigung von Krankheitserregern, Parasiten und Fremdstoffen. Auch körpereigenes Gewebe, wie z.B. Zelltrümmer, kann von ihnen phagozytiert werden (Prinzinger et al., 2012). Im Wesentlichen läuft die zelluläre und die humorale Immunantwort ähnlich wie beim Säuger ab, mit dem bereits erwähnten Unterschied der heterophilen Granulozyten, welche die Aufgaben der neutrophilen Granulozyten übernehmen (Prinzinger et al., 2012). Granulozyten und Monozyten phagozytieren unspezifisch auf zellulärer Ebene, weshalb sie ausgezeichnete amöboide Eigenbeweglichkeit aufweisen, während die Lymphozyten, unterteilt in T- und B-Lymphozyten, den spezifischen Teil der Abwehr mit membranständigen Antikörpern abdecken. Zur Diagnostik einer vermuteten Erkrankung kann deshalb ein Differentialblutbild zu Rate gezogen werden, da zuerst die heterophilen Granulozyten ansteigen, während der „heterophilen Kampfphase“, anschließend die Monozyten in der „monozytären Überwindungsphase“ und wenn die Symptome bereits im Abklingen begriffen sind, steigt schließlich die Lymphozytenzahl (Prinzinger et al., 2012).

Im Folgenden werden die einzelnen weißen Blutzelltypen genauer betrachtet, mit besonderem Augenmerk auf die Leukozyten des Königspinguins.

3.2.3.1 Heterophile Granulozyten

Heterophile Granulozyten sind die bei den meisten Vogelarten am häufigsten vertretenen Granulozyten im Blut ($40\pm 17\%$). Sie übernehmen die Funktion der neutrophilen Granulozyten der Säugetiere (Santos et al., 2003; Clark et al., 2009; Prinzing et al., 2012). Die differierende Bezeichnung begründet sich im unterschiedlichen Anfärbungsverhalten der beiden Zellgruppen (Weiss und Schalm, 2010).

Heterophile Granulozyten sind unregelmäßig geformte Zellen, die rund, oval, länglich oder anders ausgebreitet erscheinen können und im Mittel zwischen 10 und 15 μm groß sind. Im farblosen Zytoplasma sind zahlreiche Granula vorhanden, die meist länglich, aber auch rund oder stäbchenförmig, spindelförmig sowie selten tropfenförmig erscheinen. In Romanowsky-Färbungen zeigen sich die Granula eosinophil, rot bis rotorange. Die Größe der Granula variiert zwischen den Spezies. Der Zellkern besteht aus grobkörnigem Chromatin und ist meist stark segmentiert (Lucas und Jamroz, 1961; Maxwell, 1974; Clark et al., 2009; Prinzing et al., 2012). Im ARNETH-INDEX, der ein Maß für die durchschnittliche Lappenzahl bei Zellkernen darstellt, liegt der polymorphe Kern der heterophilen Granulozyten beim Huhn (*Gallus gallus*) bei 2,44 (Prinzing et al., 2012). Die Unterscheidung von echten eosinophilen Granulozyten unter dem Lichtmikroskop ist mitunter sehr schwierig (Hawkey et al., 1989).

Die Anzahl der heterophilen Granulozyten variiert, wie andere Blutparameter auch (siehe Kapitel II.2. Allgemeines zum aviären Blut), aufgrund zahlreicher Faktoren, unter anderem bei Stress. Dies ist nach intensivem Handling eines Vogelpatienten bei der Beurteilung des Blutbildes zu beachten (Prinzing et al., 2012). Heterophile Granulozyten sind, wie oben bereits erwähnt, maßgeblich an der unspezifischen, zellulären Immunantwort beteiligt, sowohl in der Blutbahn, als auch durch aktives Einwandern in die Gewebe (Lösch et al., 2000). Dabei sind sie effektiver als aviäre Monozyten, aber nicht so effektiv wie humane oder canine neutrophile Granulozyten (Stabler et al., 1994; Brooks et al., 1996).

Für den Galápagos-Pinguin (*Spheniscus mendiculus*) gibt Travis den Anteil der Heterophilen mit 57,6% der weißen Blutzellen an (Travis et al., 2006). Für den Königspinguin im Speziellen gibt es nur sehr spärliche Angaben. Cranfield zählt, wie bereits angegeben, die heterophilen Granulozyten mit $5,455\pm 3,811 \times 10^3/\mu\text{l}$, was ca. 40% entspricht (Cranfield, 2003). Über die heterophilen Granulozyten des Königspinguins gibt es bisher so gut wie keine genaue Beschreibung der Morphologie (Clark et al., 2009).

3.2.3.2 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind die bei den meisten Vogelarten am zweithäufigsten vorkommende Granulozytenart (Clark et al., 2009). So stellen die eosinophilen Granulozyten $4,0 \pm 6,0\%$ der Gesamtleukozyten (Prinzinger et al., 2012), beim Königspinguin sind es 2% , $0,226 \pm 0,17 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Cranfield, 2003).

Diese haben eine sehr hohe Ähnlichkeit zu den heterophilen Granulozyten. Es handelt sich dabei um unregelmäßig geformte Zellen, die rund, oval, länglich oder anders ausgebreitet erscheinen können und im Mittel ebenfalls zwischen 10 und $15\mu\text{m}$ groß sind. Im ebenfalls farblos erscheinenden Zytoplasma sind zahlreiche runde Granula in unterschiedlicher Größe vorhanden. In Romanowsky Färbungen zeigen sich die Granula eosinophil (vgl. Kapitel IV.2.3.2). Der Zellkern besteht ebenfalls aus grobkörnigem Chromatin, ist aber nur schwach segmentiert und färbt sich oft dunkler an als der der Heterophilen (Lucas und Jamroz, 1961; Clark et al., 2009; Prinzinger et al., 2012). Der ARNETH-INDEX für den Kern der eosinophilen Granulozyten beim Huhn (*Gallus gallus*) ist mit durchschnittlich 1,97 Kernlappen angegeben (Lucas und Jamroz, 1961; Clark et al., 2008; Prinzinger et al., 2012).

Verschiedene Autoren weisen auf die schwere Unterscheidbarkeit zwischen eosinophilen und heterophilen Granulozyten hin (Clark et al., 2009; Prinzinger et al., 2012).

Über die eosinophilen Granulozyten des Königspinguins gibt es kaum morphologische Beschreibungen. Einzig Maxwell stellt in einer elektronenmikroskopischen Untersuchung fest, dass die im Durchschnitt 23 Granula pro Anschnittebene dieser Zellen von *Aptenodytes patagonicus* rund sind und keine kristallinen oder anders gearteten Einschlüsse oder zentrale Areale aufweisen, und somit als homogen zu werten sind. Sie können vakuolisiert oder eingekerbt sein (Maxwell, 1978).

3.2.3.3 Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten sind die bei den meisten Vogelarten am seltensten vorkommende Granulozytenart, mit ca. $2,2 \pm 2,9\%$ (Clark et al., 2009; Prinzing et al., 2012). Ca. $5,4\%$, also $0,746 \pm 0,565 \times 10^3/\mu\text{l}$ sind es beim Königspinguin (Cranfield, 2003).

Die basophilen Granulozyten der Vögel sind $10\text{-}15\mu\text{m}$ groß, annähernd rund und haben einen nur schwach gelappten, runden bis ovalen Nukleus, dessen ARNETH-INDEX -Zahl mit $1,01$ angegeben ist (Clark et al., 2009; Prinzing et al., 2012). Die Granula dieser Zellen, die sich von Spezies zu Spezies in Form, Dichte und Größe unterscheiden können, färben sich meist basophil an. Teilweise geschieht dies jedoch aufgrund des Färbevorgangs nicht und die Granula erscheinen wie Vakuolen oder Blasen, als kreisrunde, nicht angefärbte Stellen um den blassen oder dunklen Zellkern innerhalb der Zellmembran (Clark et al., 2008). Entspeicherte basophile Granulozyten zeigen ebenfalls dieses spezielle Färbeverhalten (Sinowatz und Hees, 2006).

Es wird angenommen, dass basophile Granulozyten eine wichtige Rolle etwa bei von *Aspergillus* spp. verursachten, chronischen Atemwegserkrankungen spielen, da ihre Zahl im Blutbild bei Tieren mit dieser Verdachtsdiagnose ansteigt (Prinzing et al., 2012). Man vermutet aufgrund des Histamingehalts in den Granula, dass sie ähnliche Funktionen erfüllen wie die noch selteneren basophilen Granulozyten beim Säuger (Doneley, 2007). Außerdem befinden sich Heparin, zinkhaltige Proteine und zu einem geringen Anteil saure Phosphatase in den zytoplasmatischen Granula, jedoch keine Peroxidase oder alkalische Phosphatase (Sinowatz und Hees, 2006). Die genauen Aufgaben dieser Leukozyten beim Vogel sind noch nicht vollständig bekannt.

Morphologische oder andere weiterführende Beschreibungen der basophilen Granulozyten des Königspinguins liegen nicht vor.

3.2.3.4 Lymphozyten

Lymphozyten sind die am häufigsten im Vogelblut vorkommenden Leukozyten und werden mit $50\pm 17\%$ der weißen Blutzellen angegeben (Prinzinger et al., 2012). Cranfield zählt $6,766\pm 5,487 \times 10^3/\mu\text{l}$ Lymphozyten beim Königspinguin (Cranfield, 2003), was ca. 49% entspricht.

Kleine Lymphozyten sind 4-10 μm groß, große 11-15 μm , annähernd rund und mononukleär, mit einem zentral oder leicht exzentrisch gelegenen, runden, eingekerbten oder abgeflachten Zellkern mit hohem Nukleus/Zytoplasma-Verhältnis (1:1,12) (Prinzinger et al., 2012). Das Zytoplasma färbt sich basophil, der Kern aus unterschiedlich dicht gepacktem Chromatin, färbt sich etwas heller an. Die Form der Lymphozyten kann bei einem Individuum stark variieren, aber zwischen Spezies konnten bisher keine auffälligen Unterschiede festgestellt werden. Teilweise sind sich deutlich basophil anfärbende Granula im Zytoplasma zu finden (Clark et al., 2009). Große Lymphozyten sind im Blutausschlag nur schwer von Monozyten zu unterscheiden (Sinowatz und Hees, 2006).

Funktionell unterscheiden sich Vogel- und Säugerlymphozyten nicht (Prinzinger et al., 2012). Es werden T- und B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen unterschieden (Sinowatz und Hees, 2006). Die mit membranständigen Antikörpern gegen bestimmte Antigene versehenen B-Lymphozyten übernehmen nach Aktivierung als Plasmazellen die Produktion der spezifischen humoralen Antikörper gegen die unerwünschten Strukturen (Lösch et al., 2000). Die CD-4 positiven T-Helferzellen und die CD-8 positiven zytotoxischen T-Zellen, wobei CD für „Cluster of Differentiation“ steht, sorgen für die Stimulation der B-Zellen und deren Aktivierung und sind Teil der zellulären Immunantwort. T-Suppressorzellen, ebenfalls CD-8 positiv, sorgen dafür, überschießende Immunreaktionen zu vermeiden. Natürliche Killerzellen sind Teil des unspezifischen zellulären Abwehrsystems. Einige T- und B-Zellklone dienen als Gedächtniszellen für zukünftige Immunereignisse (Sinowatz und Hees, 2006).

Lymphozytenzahlen unterliegen starken Schwankungen aufgrund verschiedenster Faktoren. Junge Vögel haben höhere Lymphozytenwerte als ältere Tiere (Lösch et al., 2000; Doneley, 2007).

Über die Lymphozyten des Königspinguins im Speziellen gibt es nahezu keine weiterführenden morphologischen oder anderen Beschreibungen.

3.2.3.5 Monozyten

Monozyten machen $3,8 \pm 5,9\%$ der Leukozyten im Vogelblut aus (Prinzinger et al., 2012). Das sind beim Königspinguin $0,632 \pm 0,587 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Cranfield, 2003), entspricht ca. 2,57%.

Mit ca. $15\mu\text{m}$ sind Monozyten üblicherweise die größten im Blutausschlag des Vogels zu erwartenden Zellen. Sie sind unregelmäßig, annähernd oval bis gestreckt oder anders ausgebreitet geformt mit einem blassen, aus mäßig dicht gepacktem Chromatin bestehenden, ebenfalls sehr formvariablen Nucleus und mit leicht geringerem Kern/Zytoplasma-Verhältnis (1:0,47) als bei Lymphozyten (Prinzinger et al., 2012). Das blass blaugrau anfärbbare Zytoplasma erscheint aufgrund zahlreicher Vakuolen bei Aktivierung regelrecht schaumig. Die Zelloberfläche ist nicht glatt und bildet häufig Pseudopodien aus (Sinowatz und Hees, 2006).

Monozyten weisen ein weniger dichtes Zytokeratingerüst auf als Lymphozyten und erreichen eine exzellente amöboide Beweglichkeit. Sie sind Teil der unspezifischen zellulären Immunantwort und wandern auch in umliegende Gewebe aus, wo sie Fremdstoffe phagozytieren, sich zu Makrophagen differenzieren und wachsen (Sinowatz und Hees, 2006; Prinzinger et al., 2012). Weitere Aufgaben sind das Expressieren und Präsentieren der phagozytierten Antigene und die Sekretion von Prostaglandinen und Zytokinen (Lösch et al., 2000).

Verschiedene Autoren beschreiben, dass die Monozyten des Königspinguins noch unzureichend untersucht und beschrieben worden sind (Clark et al., 2009; Prinzinger et al., 2012).

3.3 Glykohistochemie

Definition und Herkunft der Lektine werden im folgenden Abschnitt kurz erläutert. Des Weiteren wird darauf eingegangen, welche Lektine für diese Arbeit verwendet wurden.

Lektine (vom lateinischen Wort *legere* = auswählen abgeleitet) sind Proteine, die bestimmte Kohlenhydrate spezifisch binden (Boyd und Shapleigh, 1954). Dabei weisen sie keine enzymatische Aktivität am Liganden auf und sind nicht mit Antikörpern oder Transportproteinen für Mono- oder Oligosaccharide gleichzusetzen (Gabijs, 2011; Roth, 2011). Sie werden auch als Agglutinine, im Falle von Erythrozytenbindung auch Hämagglutinine, oder bei pflanzlicher Herkunft und Erythrozytenbindung, auch als Phytohämagglutinine bezeichnet (Gabijs et al., 2011).

Lektine sind in Pflanzen, Pilzen, Tieren, Menschen und Mikroorganismen vorkommende Glykoproteine mit einem 2-50%igen Kohlenhydratanteil, wobei einige, wie ConA und WGA, keinen Zuckeranteil enthalten, während STA (*Solanum tuberosum* Agglutinin) hingegen beispielsweise zur Hälfte aus Kohlenhydrat besteht (Rüdiger und Gabijs, 2001). Zu über 50% stammen die bekannten Pflanzenlektine aus Hülsenfrüchten (*Leguminosen*), am zweithäufigsten aus Aronstabgewächsen (*Araceae*), gefolgt von Kürbisgewächsen (*Curcubitaceae*) und Liliengewächsen (*Liliaceae*) (Rüdiger und Gabijs, 2001). Hier sind sie vor allem in Samen, Wurzeln oder anderen Speicherorganen wie Zwiebeln oder Rinde lokalisiert (Gabijs, 2011). Gemeinsam mit Enzymen und Phytinsäure liegen die Lektine in den sogenannten „protein bodies“ membranumhüllt in Speicherorganellen vor (Gabijs, 2011).

Lektine dienen dort hauptsächlich als Schutz gegen Insekten, Pilze und Fraß durch Herbivoren und haben an der für spezielle Pflanzen typischen Symbiose mit Bakterien teil (externe Funktion). Des Weiteren erfüllen Pflanzenlektine sogenannte interne Funktionen, indem sie bei Keimprozessen, Enzymregulation und der Organisation der „protein bodies“ eine wichtige Rolle spielen (Rüdiger und Gabijs, 2001; Gabijs, 2011).

Lektine weisen individuell verschiedene Zuckerspezifität und variierendes Reaktionsvermögen mit Glykanen, Glykolipiden und Glykoproteinen auf (Roth, 2011). Die Bindung erfolgt auf unterschiedlichen Wegen mittels hydrophoben, elektrostatischen und auf Glykaninteraktion basierten Wechselwirkungen (Roth, 2011). Bindungsart und Zuckerrestabfolge im gebundenen Oligosaccharid variieren ebenfalls und beeinflussen die Affinität und Spezifität von scheinbar monosaccharidspezifischen Lektinen (Roth, 2011).

Lektine können aufgrund ihrer Zuckerspezifität in Gruppen eingeordnet werden, wobei die Einteilung stark vereinfacht aufgrund von Agglutinationsversuchen mit Hemmzuckern erfolgt (Roth, 2011).

In der Biochemie, der Medizin und sogar in der Chip-Technologie sind Lektine in Anwendung. Das ist bedingt durch ihre problemlose Konjugierbarkeit und Stabilität sowie ihre verhältnismäßig einfache Koppelbarkeit mit den unterschiedlichsten Markersubstanzen, ohne dass ihre Bindungseigenschaften beeinflusst werden (Gabijs, 2011). So können gebundene Fluochrome, Enzyme oder Goldpartikel unter verschiedenen Mikroskopen für den direkten Nachweis sichtbar gemacht werden, oder die Lektine indirekt mit Biotin gekoppelt und anschließend durch markiertes Streptavidin zur Fluoreszenz gebracht werden (Roth, 2011). Auch zur Sichtbarmachung von Zuckergerüsten in Geweben oder dem Nachweis von Glykanen können Lektine eingesetzt werden (Roth, 2011). Therapeutische Anwendungsgebiete werden beispielsweise in der Tumorforschung und der Immunologie untersucht und aufgezeigt (Gabijs, 2011).

Neben Nukleinsäuren und Proteinen werden auch in Oligosacchariden biologische Informationen kodiert. Die Letzteren eignen sich wegen ihrer hohen Variabilität aufgrund von Ringgröße, anomerscher Position sowie der Ausbildung von Kettenverzweigungen und Verknüpfungspunkten (erste und zweite Dimension des Zuckercodes) außerordentlich gut für diesen Zweck (André et al., 2006; Gabijs, 2011). Lektine wiederum „lesen“ diese Informationsspeicher und Strukturinformationen aus (André et al., 2006). Die Glykokalyx, die mitverantwortlich für Zell-Zell und Zell-Matrix-Wechselwirkungen zeichnet, kann anhand ihrer Kohlenhydratreste mit Lektinen markiert und identifiziert werden (Gabijs et al., 2011).

Über Zuckerstrukturen auf und in den Blutzellen des Königspinguins liegen keine Untersuchungen vor.

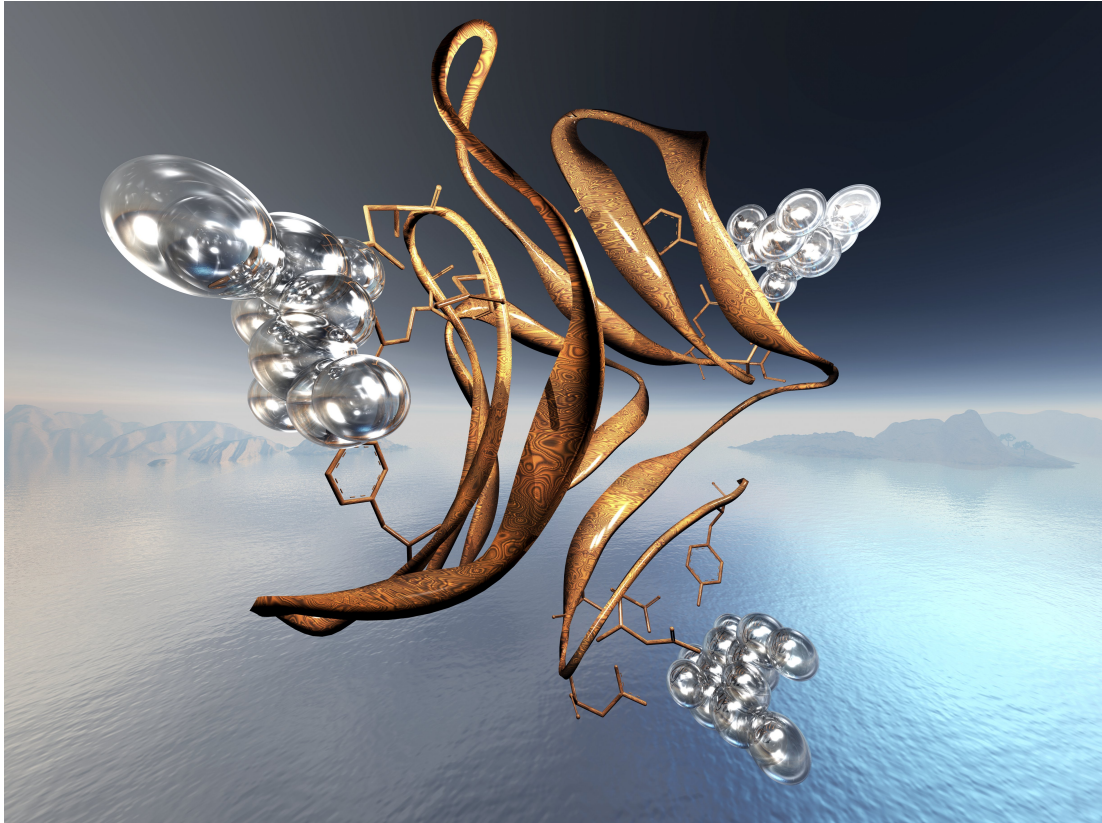


Bild 6: Lektin grafisch dargestellt (Science Photo Library / Agentur Focus)

Computergrafik eines Lektinmoleküls aus der Aloe Pflanze, an Zucker gebunden (silbern dargestellt). Die Molekularstruktur der Lektinbindungsstelle ist angedeutet.

Tabelle 3: Eine Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Pflanzenlektine in nach Goldstein, Poretz, Rüdiger und Gabius modifizierter Einteilung (Liener et al., 1986; Gabius, 2011).

Lektin-Name	Abk.	Zuckerspezifität	Herkunft
Concanavalin Agglutinin	ConA	D-Man und D-Glc	<i>Canavalia ensiformis</i> (Schwertbohne)
Pisum sativum Agglutinin	PSA	D-Man und D-Glc	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)
Lens culinaris Agglutinin	LCA	D-Man und D-Glc	<i>Lens culinaris</i> (Speiselinse)
Ricinus communis Agglutinin	RCA	D-Gal	<i>Ricinus communis</i> (Rizinusbohne)
Peanut Agglutinin	PNA	D-Gal	<i>Arachis hypogaea</i> (Erdnuss)
Viscum album Agglutinin	VAA	D-Gal	Viscum Album (Mistel)
Sophora japonica Agglutinin	SJA	N-Acetyl-D-Galaktosamin	<i>Sophora japonica</i> (Chinesischer Schnurbaum)
Soybean Agglutinin	SBA	N-Acetyl-D-Galaktosamin	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)
Griffonia simplicifolia Agglutinin 1	GSL-1	N-Acetyl-D-Galaktosamin	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrikanische Schwarzbohne)
Dolichos biflorus Agglutinin	DBA	N-Acetyl-D-Galaktosamin	<i>Dolichos biflorus</i> (Afrikanische Pferdebohne)
Sambucus nigra Agglutinin	SNA	D-Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)
Wheat germ Agglutinin	WGA	N-Acetyl-D-Glucosamin und N-Acetyl-D-Neuraminsäure	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)
Wheat germ Agglutinin succinyliert	WGAs	N-Acetyl-D-Glucosamin	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)
Ulex europaeus Agglutinin 1	UEA 1	L-Fukose	<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)
Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin	PHA-L	N-acetyl-Galaktosamin	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)
Maackia amurensis Agglutinin 1-Leukoagglutinin	MAI	Neu5Ac/Gc- α 2-3-Gal- β 1-4-GlcNAc	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)
Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin	PHA-E	Gal, N-Acetyl-Glucosamin, Mannose	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)

3.4 Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie werden spezifische Antigene und Makromoleküle in Zellen und Geweben nachgewiesen (Sinowatz und Hees, 2006). Man unterscheidet zwischen der direkten und indirekten Immunmarkierung. Während bei der ersten Methode ein direkter Antigen-/markierter Antikörper-Komplex gebildet wird, bedient man sich bei der zweiten Methode eines markierten Sekundärantikörpers, der an einen Primärantikörper-/Antigen-Komplex bindet (Sinowatz und Hees, 2006; Romeis et al., 2010; Roth, 2011). Markiert wird hier z.B. mit Fluoreszenzfarbstoff wie Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) oder auch über Chemolumineszenz mittels Enzymen, wie beispielweise mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase - HPR), um gesuchte Strukturen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen (Sinowatz und Hees, 2006; Romeis et al., 2010; Roth, 2011). Es werden ähnliche Techniken wie bei der Lektinmarkierung angewendet (Roth, 2011).

Das Zytoskelett bei Vogelblutzellen dient der Formstabilität, der Formausbildung und der Reversibilität von Zelldeformationen sowie der amöboiden Fortbewegung und Motilität der Zelle. Zudem spielt es eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung von lebensnotwendigen Transportvorgängen in den Zellen. Das Zytoskelett besteht aus Proteinröhrchen und -filamenten, nämlich den Intermediärfilamenten, z.B. Vimentinfilamenten, den Mikrotubuli aus α - und β -Tubulin, die dynamisch auf- und abgebaut werden können, und den Aktinfilamenten. Welches dieser Zellstrukturproteine überwiegt, hängt vom Zelltyp und Zellalter ab (Liebich, 2010).

III. Material und Methoden

1. Untersuchungsmaterial

Die für die Untersuchungen benötigten Blutproben von 17 Königspinguinen wurden im Loro Parque Teneriffa mit freundlicher Genehmigung der Loro Parque Fundación gewonnen. Die Tiere wurden mit Nummern von 1-17 bezeichnet (Tabelle 4).

Das Blut wurde aus der Vena jugularis der Königspinguine entnommen und in Lithium Heparin Röhrchen verbracht. Direkt im Anschluss wurden von 14 Tieren je 92 Ausstriche auf unbeschichtete Super Frost®-Objektträger (ROTH, Karlsruhe) angefertigt und Differentialblutbilder erstellt. Jeweils 45 Ausstriche wurden sofort nach dem Ausstreichen und Lufttrocknen in Methanol fixiert. Alle Ausstriche wurden bis zur Verarbeitung unter Lichtausschluss und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Proben von 3 Tieren wurden in Röhrchen ohne Gerinnungshemmer entnommen und unverzüglich zentrifugiert, gekühlt und zur elektronenmikroskopischen Untersuchung vorbereitet.

Tabelle 4: Übersicht über die untersuchten Königspinguine

Nr.	Loro Parque Teneriffa-Nr.	m/w	Gewicht [g]	Geburtsdatum	Geburtsort
1	85	m	23586	02.02.2001	LP
2	46	m	13164	23.04.1998	LP
3	39	m	13706	22.04.1998	LP
4	70	w	14076	09.05.1998	LP
5	69	m	14320	06.05.1998	LP
6	31	w	13386	19.04.1998	LP
7	99	w	14640	23.02.2009	LP
8	17	m	15100	11.04.1998	LP
9	04	m	13990	04.04.1998	LP
10	97	m	16230	21.10.2007	LP
11	34	w	13354	12.04.1998	LP
12	12	m	14516	07.04.1998	LP
13	15	m	15832	11.04.1998	LP
14	80	m	20220	05.01.1997	SW
15	96	w	20522	29.03.2007	LP
16	101	m	16222	05.03.2009	LP
17	106	m	15070	23.03.2010	LP

m männlich, w weiblich, LP Loro Parque, SW Sea World

Tabelle 5: Auflistung der Proben nach Tiernummer pro Untersuchungsmethode

Meth.	Untersuchung	Tier-Nr. (fixiert/unfixiert)	NK	PK
LM	Diff-Quick	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,15,16,17 unfix.	-	-
LM	Giemsa	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 fix.	-	-
LM	May-Grünwald	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15,16 fix.	-	-
LM	Pappenheim	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 fix.	-	-
LM	May-Grünwald mod. n. Bitai	3x15,3x16,2x17 fix.	-	-
LM	Toluidinblau	15,16,17 fix. / 15,16,17 unfix.	-	-
LM	PAS	4x5 unfix., 4x6 unfix.	-	-
LM	PAS acetyliert	7,8 fix. / 7,8 unfix.	-	-
LM	PAS methyliert	9,10 fix. / 9,10 unfix.	-	-
LM	PAS Amylase	3,4 fix. / 3,4 unfix.	-	-
LM	Alcianblau pH1	1,2,3,4,5,6,7,8,10 fix.	-	-
LM	Alcianblau pH2,5	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 fix.	-	-
LM	Sirius-Red	2x15,2x16,2x17 fix.	-	-
EM	Fixierung nach Karnovsky	12,13,14 direkt	-	-
GHC	ConA	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 fix.	x	x
GHC	PSA	1,3,4,5,6,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	LCA	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	RCA	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	PNA	1,2,3,4,5,6,7,8,9,11 fix.	x	x
GHC	VAA	1,2,3,5,6,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	SJA	1,2,4,5,6,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	SBA	1,2,3,4,5,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	GSL-1	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	DBA	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	SNA	1,2,3,4,5,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	WGA	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 fix.	x	x
GHC	WGAs	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	UEA-1	1,3,4,5,6,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	PHA-L	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 fix.	x	x
GHC	MA I	1,2,4,5,6,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	PHA-E	1,2,3,4,5,7,8,9,10,11 fix.	x	x
GHC	Hemmszucker	ConA, PSA, LCA, WGA, WGAs, PHA-E	x	x
ICH	CD4	1,2,3,4,5,7,8,9,10,11unfix.	x	x
ICH	CD8	1,2,3,4,5,7,8,9,10,11,15,16,17unfix/3x15,3x16,4x17fix.	x	x
ICH	Aktin (n. m.)	1,2,3,4,5 fix./7,8,9,10,11 unfix.	x	x
ICH	Vimentin	1,2,3,4 fix./7,8,9,10,11 unfix.	x	x
ICH	Tubulin	15,2x16,17 fix./15,16,2x17 unfix.	x	x
ICH	Myosin	1,2,3,4,5 fix./7,8,9,10,11 unfix.	x	x
ICH	Panzytokeratin	3,4,5,7,8, fix./1,2,9,10,11 fix.	x	x
ICH	EMBP	2x15, 3x16 fix./3x16,2x17 unfix.	x	x

2. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Es wurden 13 verschiedene lichtmikroskopische Färbungen von je 14 Königspinguinen angefertigt.

Die Übersichtsfärbungen Diff-Quick Haema-Schnellfärbung, die Giemsa-Färbung, die May-Grünwald-Färbung, die panoptische Färbung nach Pappenheim und die von mir während dieser Arbeit entwickelte, nach Bitai modifizierte Färbemethode nach May-Grünwald kamen zum Einsatz. Die substrathistochemischen Färbungen mit Toluidinblau, Alcianblau bei pH1 und Alcianblau bei pH2,5, die Sirius-Red Färbung sowie die Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion) nach vorausgehender Acetylierung der Ausstriche, nach vorausgehender Methylierung der Ausstriche und mit Amylase Vorbehandlung wurden angewendet. Nach der Färbung wurden die Ausstriche luftgetrocknet, mit Hilfe von Eukitt® mit einem Deckglas bedeckt und stets dunkel gelagert.

Zur Bestimmung der Größe der einzelnen Blutzellen und Strukturen in den Zellen wurden pro Wert je 700 Messungen vorgenommen.

Auswertung und Fotografie erfolgten mit dem LEICA DB5000 Mikroskop, der Lichtquelle LEICA CTR5000 und der Kamera DFC420C unter Verwendung der Leica Application Suite Software Version 3.7.0 mit freundlicher Genehmigung des Lehrstuhls für Bakteriologie, Mykologie und Virologie des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität-München.

2.1.1 Diff-Quick Haema-Schnellfärbung

Bei dieser Haema-Schnellfärbemethode, mit Xanthen- und Thiazin-Farbstoff, einer Variante der Romanowsky-Färbung, zur Übersichtsfärbung von Blutausstrichen nehmen die Zellkerne eine dunkelblau-violette Farbe an. Die Erythrozyten färben sich rötlich an, die Thrombozyten violett. Die Granula der heterophilen Granulozyten färben sich dabei rosa, die der eosinophilen Granulozyten färben sich orange-rot, jene der basophilen Granulozyten färben sich dunkelviolettschwarz. Das Zytoplasma der Monozyten ist hellblau, das der Lymphozyten weist einen hellvioletten Farbton auf (Romeis et al., 2010; Prinzing et al., 2012).

Tabelle 6: Diff-Quick Haema-Schnellfärbung

Arbeitsschritte	Dauer
1. Eintauchen der OT in Fixierlösung	5x1 Sekunde
2. Eintauchen der OT in Färbelösung I (rot)	5x1 Sekunde
3. Eintauchen der OT in Färbelösung II (blau)	5x1 Sekunde
4. Spülen mit Aqua dest.	
5. Lufttrocknen	

2.1.2 May-Grünwald-Färbung

Diese Färbemethode ist eine einfache Differentialfärbung mit Eosin-Methylenblau-Farbstoff. Die Zellkerne färben sich hier blau-violett. Die eosinophilen Granula weisen einen ziegelroten Farbton auf, die heterophilen Granula werden hellviolett bis rötlich angefärbt. Dagegen sind die basophilen Granula blau-violett. Die Thrombozyten werden violett, das Zytoplasma der Erythrozyten wird rötlich, das der Lymphozyten wird dagegen blau gefärbt (Romeis et al., 2010; Sinowatz und Rodler, 2011).

Tabelle 7: May-Grünwald-Färbung

Arbeitsschritte	Dauer
1. Fixieren der Blutausstriche in Methanol	10min
2. Bedecken der OT mit May-Grünwald-Lösung	4min
3. Auftropfen der gleichen Menge Aqua dest.	10min
4. Spülen mit Aqua dest.	
5. Lufttrocknen	

2.1.3 May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai

Diese Färbung wurde während dieser Arbeit entwickelt. Sie bietet eine detaillierte Übersicht über den Blutaussstrich. Die Zellkerne färben sich blau an, die der Thrombozyten und Erythrozyten leicht dunkler als die Zellkerne der anderen Zelltypen. Das Zytoplasma der Erythrozyten färbt sich blaugrau, das der Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten hellblau in Abstufungen. Die Granula der heterophilen und eosinophilen Granulozyten färben sich intensiv rot, die der basophilen Granulozyten stark violett.

Tabelle 8: May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai

Arbeitsschritte	Dauer
1. Fixieren der Blutaussstriche in Methanol	10min
2. Bedecken der OT mit May-Grünwald-Lösung (unverdünnt)	8min
3. Auftropfen der gleichen Menge Aqua dest.	8min
4. Spülen mit PBS-Puffer	
5. Spülen mit Aqua dest.	
6. Spülen mit Alkohol (70%)	
7. Lufttrocknen	

2.1.4 Giemsa-Färbung

Es handelt sich um eine Differentialfärbung, bestehend aus Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid stabilisiert in Methanol mit Glycerin. Dabei wird das Zytoplasma der Monozyten grau-blau angefärbt. Allerdings können sich darin teilweise purpurfarbene Azurkörnchen befinden. Das Zytoplasma der Erythrozyten zeigt sich rot, jenes der Lymphozyten blau. Die heterophilen Granula weisen einen hell-violetten, die basophilen Granula einen kräftig dunkel-violetten Farbton auf. Die eosinophilen Granula sind rot bis rotbraun und die Thrombozyten färben sich blau an (Sinowatz und Rodler, 2011; Prinzinger et al., 2012).

Tabelle 9: Giemsa-Färbung

Arbeitsschritte	Dauer
1. Fixieren der Ausstriche in Methanol	10min
2. Bedecken der OT mit 1:20 verdünnter Giemsa-Lösung	45min
3. Spülen mit Aqua dest.	
4. Lufttrocknen	

2.1.5 Panoptische Färbung nach Pappenheim

Die panoptische Färbung nach Pappenheim ist eine Kombinationsmethode aus der Giemsa- und der May-Grünwald-Färbung, mit Methylenblau, Brillantkresylblau, Eosin und Säurefuchsin. Basophile, neutrophile und eosinophile Strukturen werden angefärbt. Hierbei zeigen sich die Zellkerne rötlich-violett bis blau, das Zytoplasma der Erythrozyten weist einen rosa Farbton auf, das der Lymphozyten erscheint in einem hellen Blau. Orange hingegen sind die Granula der eosinophilen Granulozyten, die der neutrophilen Granulozyten sind hellviolett. Jene der basophilen Granulozyten färben sich dunkel-violett. Im graublauen Zytoplasma der Monozyten sind feine, purpurfarbene Azurkörnchen zu sehen (Romeis et al., 2010; Sinowatz und Rodler, 2011).

Tabelle 10: Panoptische Färbung nach Pappenheim

Arbeitsschritte	Dauer
1. Fixieren der Ausstriche in Methanol	10min
2. Bedecken der OT mit May-Grünwald-Färbelösung	20min
3. Auftropfen der gleichen Menge Aqua dest.	1min
4. Abgießen der Färbelösung	
5. Bedecken der OT mit 1:20 verdünnter Giemsa-Lösung	20min
6. Spülen mit Aqua dest.	
7. Lufttrocknen	

2.1.6 Sirius-Red-Färbung

Durch die Sirius-Red-Färbung sollen eosinophile Granulozyten in Blut und Gewebe gezielt angefärbt werden (vgl. Kapitel IV.2.3.2). Die Granula dieser Zellen weisen einen intensiven Rot-Ton auf, während die restlichen Zellen und Zellkerne sich in unterschiedlichen Blauabstufungen zeigen (Wehrend et al., 2004).

Tabelle 11: Sirius-Red-Färbung

Arbeitsschritte	Dauer
1. Fixieren der Präparate in Methanol	10min
2. Einstellen der OT in saures Hämalaun nach Mayer	10min
3. „Bläuen“ in fließendem Leitungswasser	15min
4. Einstellen der OT in Sirius-Red-Färbelösung	90min
5. Spülen mit Aqua dest.	
6. Lufttrocknen	

2.1.7 Toluidinblau-Färbung

Durch die Färbung mit Toluidinblau, einem Antidot bei Vergiftungen mit Methämoglobinbildnern, können basophile Granulozyten gezielt dargestellt werden. Basophile Strukturen nehmen eine blaue Farbe an. Allerdings können auch violette, rotviolette und rote Strukturen als basophil eingestuft werden. Andere nicht basophile Strukturen erscheinen graublau (Romeis et al., 2010).

Tabelle 12: Toluidinblau-Färbung

Arbeitsschritte	Dauer
1. Bedecken der OT mit Toluidinblau-Färbelösung	5min
2. Spülen mit Aqua dest.	
3. Lufttrocknen	

2.1.8 Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)

Durch diese Färbemethode können komplexe Kohlenhydrate nachgewiesen werden. Hierfür werden Periodsäure, Schiffs Reagenz mit fuchsin-schwefeliger Säure und Sulfit sowie Hämalan zum bläuen der Kerne verwendet. Leuchtend rot sind hierbei PAS-positive Substanzen, teils auch magenta, pink oder hellviolett. Der Zellkern dagegen erscheint blau. Um Glykogen gezielt darzustellen ist es nötig, die Blutausrüche mit Amylase vorzubehandeln. Dadurch wird Glykogen abgebaut, die PAS Reaktion fällt somit schwächer aus (Romeis et al., 2010; Sinowatz und Rodler, 2011).

Tabelle 13: Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)

Arbeitsschritte	Dauer
0,5% α -Amylase auf OT auftropfen, 37°C	10min
1. Fixieren der Ausstriche in Formoldampf	5min
2. Spülen mit Leitungswasser	
3. 0,5% wässrige Perjodsäurelösung unter Lichtausschluss	5min
4. Spülen mit Aqua dest.	
5. Einstellen in Schiffs-Reagenz unter Lichtausschluss	15min
6. Spülen in SO ₂ -Wasser	2 x 2min
7. Spülen in fließendem Leitungswasser	3min
8. Einstellen der OT in saures Hämalan nach Mayer	5min
9. Bläuen in fließendem Leitungswasser	8min
10. Lufttrocknen	

2.1.9 Alcianblau-Färbung

Mit dem wasserlöslichen Phthalocyaninfarbstoff Alcianblau können Carboxyl- und Sulfatgruppen nachgewiesen werden. Dies ist bei einem pH-Wert von 2,5 der Fall. Bei einem pH-Wert von 1 färben sich dagegen hauptsächlich sulfatierte Mukosubstanzen. Diese färben sich leuchtend türkisblau. Nach der Gegenfärbung mit Kernechtrot sind die Zellkerne rot (Romeis et al., 2010; Sinowatz und Rodler, 2011).

Tabelle 14: Alcianblau-Färbung

Arbeitsschritte	Dauer
1. Fixieren der Ausstriche in Methanol	10min
2. Einstellen der OT in Alcianblau-Lösung pH1,0 ODER pH2,5	10min
3. Spülen mit Aqua dest.	
5. Einstellen der OT in Kernechtrot-Lösung	10min
6. Spülen in fließendem Leitungswasser	3min
7. Spülen mit Aqua dest.	
8. Lufttrocknen	

3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die untersuchten Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden in Zentrifugenröhrchen ohne Gerinnungshemmer entnommen und bei 2000 rpm 20 Minuten zentrifugiert. Nach mindestens zweistündiger Kühlung bei 4°C, wurde die weiße, filmdünne Schicht zwischen Plasma und Erythrozyten entfernt, mit einer Rasierklinge zerkleinert und wie unten angegeben weiterbehandelt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Elektronenmikroskop Zeiss EM 902 (ZEISS, Oberkochen).

Tabelle 15: Protokoll zur elektronenmikroskopischen Untersuchung

Arbeitsschritte
1. Fixieren der Probe in Karnovsky-Gebrauchslösung 1 Std. bei 4°C
2. Wechseln der Probe in Karnovsky-Gebrauchslösung über Nacht bei 4°C
3. Waschen in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) 3x je 1 Std. bei 4°C
4. Vorkontrastieren mit 1,5% Kaliumferrocyanid + 1% Osmiumtetroxid in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) für 2 Std. bei 4°C
5. Wechseln in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) 3x je 20min bei 4°C
6. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe auf dem Schüttler bei RT: Je 20min in Ethanol 30% und 50%, dann je 30min in Ethanol 70% und 90%, dann Ethanol absolut 3x je 30min
7. Propylenoxid 2x je 15min auf dem Schüttler bei RT
8. Schrittweise Einbetten in Epon auf dem Schüttler bei RT: Epon-Propylenoxid-Gemisch (Verhältnis 1:2) für 1 Std., dann Epon-Propylenoxid-Gemisch (Verhältnis 1:1) über Nacht, dann reines Epon für 1 Std..
9. Proben in Einbettformen aus Silikon (PLANO, Wetzlar) gießen
10. Polymerisation ca. 48 Std. bei 60°C
11. Anfertigung von Semidünnschnitten (Dicke 1µm) mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, REICHERT-JUNG, Wien)
12. Färbung der Semidünnschnitte mit Färbelösung nach Richardson und Auswahl geeigneter Bereiche unter dem Lichtmikroskop (Aristoplan, LEITZ, Wetzlar)
13. Anfertigen von Ultradünnschnitten (Dicke: 60nm) mit dem Ultramikrotom (Ultracut E, REICHERT-JUNG, Wien)
14. Schnitte auf Kupfernetze (Grids hexagonal Cooper 150 Mesh, POLYSCIENCES, Warrington, USA) auffangen
15. Nachkontrastieren mit 80-100µl Uranylacetat je Grid 20min, dann 3x waschen in Aqua dest., anschließend 80-100µl Bleicitrat nach Reynolds an die Grids tropfen und 3-5min kontrastieren, dann wieder 3x waschen in Aqua dest. Und Trocknen der Grids

4. Glykohistochemische Untersuchungen

Die glykohistochemischen Untersuchungen wurden mittels 14 direkt mit FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) markierten Lektinen und drei biotinylierten Lektinen durchgeführt. Pro Lektin wurden je 10 Ausstriche behandelt. Zudem wurde jeweils eine nicht methanolfixierte Negativkontrolle mitbearbeitet. Als Positivkontrolle dienten Blutausstriche von Huhn, Pferd, Pute oder Schwein. Die angefertigten Präparate wurden mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI bedeckt und die Ränder des Deckglases (ROTH, Karlsruhe) mit klarem Nagellack mit dem Super Frost®-Objektträger (ROTH, Karlsruhe) verbunden. Anschließend wurden die Ausstriche unter Lichtausschluss bei 4°C aufbewahrt.

Auswertung und Fotografie erfolgten mit dem LEICA DB5000 Mikroskop, der Lichtquelle LEICA CTR5000 und LEICA EL6000 und der Kamera DFC420C unter Verwendung der Leica Application Suite Software Version 3.7.0 mit freundlicher Genehmigung des Lehrstuhls für Bakteriologie, Mykologie und Virologie des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität-München.

4.1 FITC markierte Lektine

Die verwendeten FITC markierten Lektine sind in der folgenden Tabelle aufgeführt und mit Namen, üblicher Abkürzung, Zuckerspezifität und Herkunft aufgelistet.

Tabelle 16: Verwendete FITC markierte Lektine in nach Goldstein, Poretz, Rüdiger und Gabius modifizierter Einteilung (Liener et al., 1986; Gabius, 2011)

Lektin-Name	Abk.	Zuckerspezifität	Herkunft
Concanavalin Agglutinin	ConA	D-Man und D-Glc	<i>Canavalia ensiformis</i> (Schwertbohne)
Pisum sativum Agglutinin	PSA	D-Man und D-Glc	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)
Lens culinaris Agglutinin	LCA	D-Man und D-Glc	<i>Lens culinaris</i> (Speiselinse)
Ricinus communis Agglutinin	RCA	D-Gal	<i>Ricinus communis</i> (Rizinusbohne)
Peanut Agglutinin	PNA	D-Gal	<i>Arachis hypogaea</i> (Erdnuss)
Sophora japonica Agglutinin	SJA	N-Acetyl-D-Galaktosamin	<i>Sophora japonica</i> (Chinesischer Schnurbaum)
Soybean Agglutinin	SBA	N-Acetyl-D-Galaktosamin	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)
Griffonia simplicifolia Agglutinin 1	GSL-1	N-Acetyl-D-Galaktosamin	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Afrikanische Schwarzbohne)
Dolichos biflorus Agglutinin	DBA	N-Acetyl-D-Galaktosamin	<i>Dolichos biflorus</i> (Afrikanische Pferdebohne)
Wheat germ Agglutinin	WGA	N-Acetyl-D-Glukosamin und N-Acetyl-D-Neuraminsäure	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)
Wheat germ Agglutinin succinyliert	WGAs	N-Acetyl-D-Glukosamin	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)
Ulex europaeus Agglutinin 1	UEA 1	L-Fukose	<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)
Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin	PHA-L	Oligosaccharide	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)
Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin	PHA-E	Oligosaccharide	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)

Die Blutausstriche wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

Tabelle 17: Protokoll FITC markierte Lektine

Arbeitsschritte	Dauer
1. Fixieren der Blutausstriche in Methanol	10min
2. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5min
3. 100µl des in PBS-Puffer verdünnten Lektins (10µg/ml) auftragen	
4. Inkubieren in Feuchtkammer unter Lichtausschluss	60min
5. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4), dunkel	3x5min
6. Kernfärbung: Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit klarem Nagellack, dunkel	

4.2 Biotinylierte Lektine

Für die Untersuchung mittels biotinylierter Lektine wurden die Ausstriche mit der Streptavidin-Biotin-Methode behandelt, um eine indirekte Fluoreszenzmarkierung der gebundenen Lektine zu erzielen.

Tabelle 18: Verwendete biotinylierte Lektine in nach Goldstein, Poretz, Rüdiger und Gabius modifizierter Einteilung (Liener et al., 1986; Gabius, 2011)

Lektin-Name	Abk.	Zuckerspezifität	Herkunft
Viscum album Agglutinin	VAA	D-Gal	<i>Viscum Album</i> (Mistel)
Sambucus nigra Agglutinin	SNA	D-Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)
Maackia-amurensis Agglutinin 1 - Leukoagglutinin	MAI	Oligosaccharide	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)

Die Blutausstriche wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

Tabelle 19: Protokoll biotinylierte Lektine

Arbeitsschritte	Dauer
1. Fixieren der Blutausstriche in Methanol	10min
2. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5min
3. Protein Block Serum-Free auftragen	
4. Inkubieren in Feuchtkammer	10min
5. Abgießen des Protein Block Serum-Free	
6. 100µl des mit PBS-Puffer verdünnten Lektins (10µg/ml) auftragen	
7. Inkubieren in Feuchtkammer	60min
8. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5min
9. 200µl des mit PBS-Puffer verdünnten Streptavidin-FITC (Konzentration 1:500)	
10. Inkubieren in Feuchtkammer unter Lichtausschluss	30min
11. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4), dunkel	3x5min
12. Kernfärbung: Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit Nagellack, dunkel	

4.3 Vorbehandlung mit Hemmzuckern

In PBS-Puffer gelöste Hemmzucker wurden zur Überprüfung der Spezifität von stark positiv reagierenden Lektinen verwendet.

Hierbei wurde das Hemmzucker-PBS-Gemisch 1:1 mit dem Lektin-PBS-Gemisch für den in **Tabelle 20** angegebenen Zeitraum vorinkubiert. Anschließend wurde gemäß dem oben für die Lektine beschriebenen Protokolls verfahren, wobei anstelle der angegebenen Lektinmischung das Hemmzucker-Lektin-Vorinkubat, je 100µl pro Ausstrich, verwendet wurde.

Sowohl Negativ- als auch Positivkontrollen wurden mit angefertigt.

Tabelle 20: Hemmzucker Übersicht

Lektin	FLUO	Hemmzucker	Konz.	Dauer
ConA	+++	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8µg/ml	60min
LCA	++	Methyl- α -Mannopyranoside (E-Y Labs, San Mateo, USA)	84,8µg/ml	60min
WGA	++	N-Acetyl-Glukosamin (Sigma Aldrich, Deisenhofen)	36,67µg/ml	30min
WGAs	++	N-Acetyl-Glukosamin (Sigma Aldrich, Deisenhofen)	36,67µg/ml	30min
PHA-E	++	Essigsäure (Roth, Karlsruhe)	24µl/ml	60min
PHA-L	-	Essigsäure (Roth, Karlsruhe)	24µl/ml	60min

5. Immunhistochemische Untersuchungen

Zur Differenzierung der T-Lymphozyten spezifischen Antigene CD4 und CD8, der eosinophilen Granulozyten und der unterschiedlichen zytoskelettalen Bestandteile wurden die in den nachfolgenden Ausführungen beschriebenen Untersuchungen durchgeführt.

Sowohl Negativ- als auch Positivkontrollen wurden mit angefertigt.

Auswertung und Fotografie erfolgten mit dem LEICA DB5000 Mikroskop, der Lichtquelle LEICA CTR5000 und LEICA EL6000 und der Kamera DFC420C unter Verwendung der Leica Application Suite Software Version 3.7.0 mit freundlicher Genehmigung des Lehrstuhls für Bakteriologie, Mykologie und Virologie des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität-München.

5.1 T-Lymphozyten spezifische Antigene, CD4 und CD8

Zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der T-Lymphozyten spezifischen Antigene CD4 und CD8 wurden an FITC gekoppelte Antikörper mit Antibody-Diluent verdünnt und auf die Ausstriche aufgebracht.

Tabelle 21: Antikörper zum Nachweis von CD4- und CD8-Lymphozyten (vgl. Anhang IX.2.4)

Zielzelle	Antikörper	Wirt	Reaktivität	Konz.
CD4-Lymphozyten	CD4-Antikörper (FITC)	Maus	Huhn, Vogel	1:50
CD8-Lymphozyten	CD8 α -Antikörper (FITC)	Maus	Huhn, Pute	1:200

Die Blutausstriche wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

Tabelle 22: Protokoll CD4 und CD8

Arbeitsschritte	Dauer
1. Die Hälfte der Blutausstriche 10min in Methanol fixieren, die andere Hälfte nur lufttrocknen	
2. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5min
3. Protein Block Serum-Free auftropfen	
4. Inkubieren in Feuchtkammer	10min
5. Abgießen des Protein Block Serum-Free	
6. 100 μ l Antikörperlösung pro Objektträger auftragen	
7. Inkubieren in Feuchtkammer bei Raumtemperatur, dunkel	60min
8. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5min
9. Kernfärbung: Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit klarem Nagellack, dunkel	

5.2 Untersuchung des Zytoskeletts

Die Zytoskelettbestandteile Aktin, Vimentin, Tubulin, Myosin und Zytokeratin wurden in dieser Arbeit untersucht.

Sowohl Negativ- als auch Positivkontrollen wurden mit angefertigt.

5.2.1 Nachweis von Aktin mit Phalloidin-TRITC Markierung

Für den Nachweis nicht muskulären Aktins wurde an TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) gekoppeltes Phalloidin in Antibody-Diluent verdünnt und auf die Blutausstriche aufgebracht. Phalloidin ist eines der Toxine des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*)(Reichl, 2008).

Tabelle 23: Nachweis von F-Aktin non muscular (non muscular)

Zytoskelettaler Bestandteil	F-Aktin bindendes Reagenz	Konzentration
F-Aktin	Phalloidin-TRITC	1:500

Die Blutausstriche wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

Tabelle 24: Protokoll Nachweis von F-Aktin mit Phalloidin-TRITC

Arbeitsschritte	Dauer
1. Die Hälfte der Blutausstriche 10min in Methanol fixieren, die andere Hälfte nur lufttrocknen	
2. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5min
3. Protein Block Serum-Free auftropfen	
4. Inkubieren in Feuchtkammer	10min
5. Abgießen des Protein Block Serum-Free	
6. 100µl Phalloidin-TRITC (in Antibody-Diluent, 1:500) auftragen	
7. Inkubieren in Feuchtkammer, dunkel, Raumtemperatur	45min
8. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4), dunkel	3x5min
9. Kernfärbung: Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit klarem Nagellack, dunkel	

5.2.2 Nachweis von Vimentin, Tubulin, Myosin und Zytokeratin

Für den Nachweis von Vimentin, Tubulin, Myosin und Zytokeratin wurden indirekt mit FITC markierte und in Antibody-Diluent verdünnte Primär- und Sekundär-Antikörper verwendet.

Tabelle 25: Antikörper zur Untersuchung des Zytoskeletts

Zytoskelettaler Bestandteil	Primärantikörper	Konz.	Sekundärantikörper	Konz.
Vimentin	Mouse anti-vimentin	1:500	Rabbit anti-mouse-IgG-FITC	1:20
Tubulin	Mouse anti-tubulin	2µg/ml	Rabbit anti-mouse-IgG-FITC	1:20
Myosin	Rabbit anti-non muscle myosin	1:500	FITC anti-rabbit IgG (made in goat)	1:300
Zytokeratin	Pancytokeratin plus	1:100	Rabbit anti-mouse-IgG-FITC	1:20

Die Blutausstriche wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

Tabelle 26: Protokoll Nachweis von Vimentin, Tubulin, Myosin und Zytokeratin

Arbeitsschritte	Dauer
1. Die Hälfte der Blutausstriche 10min in Methanol fixieren, die andere Hälfte nur lufttrocknen	
2. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5min
3. Protein Block Serum-Free auftropfen	
4. Inkubieren in Feuchtkammer	10min
5. Abgießen des Protein Block Serum-Free	
6. 100µl der Primär-Antikörperlösung auftragen	
7. Inkubieren in Feuchtkammer, 7°C	über Nacht
8. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5min
9. 100µl der Sekundär-Antikörperlösung auftragen	
10. Inkubieren in Feuchtkammer unter Lichtausschluss	30min
11. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4), dunkel	3x5min
12. Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit klarem Nagellack, dunkel	

5.3 Eosinophil Major Basic Protein (EMBP)

Für den Nachweis von eosinophilspezifischem Major Basic Protein wurden in Antibody Diluent verdünnte Primär- und Sekundärantikörper auf die Ausstriche aufgebracht.

Tabelle 27: Antikörper zum Nachweis des Eosinophil Major Basic Protein

Zielzelle	Primärantikörper	Konz.	Sekundärantikörper	Konz.
Eosinophile Granulozyten	Mouse anti-human Eosinophil Major Basic Protein (EMBP)	1:100	Rabbit anti-mouse-IgG-FITC	1:20

Die Blutausstriche wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

Tabelle 28: Protokoll für EMBP

Arbeitsschritte	Dauer
1. Die Hälfte der Blutausstriche 10min in Methanol fixieren, die andere Hälfte nur lufttrocknen lassen	
2. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5min
3. Protein Block Serum-Free auftropfen	
4. Inkubieren in Feuchtkammer	10min
5. Abgießen des Protein Block Serum-Free	
6. 100µl der Primärkörperlösung auftragen	
7. Inkubieren in Feuchtkammer bei 5°C	über Nacht
8. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4)	3x5min
9. 200µl der Sekundärantikörperlösung auftragen	
10. Inkubieren in Feuchtkammer, Raumtemperatur, dunkel	30min
11. Waschen in PBS-Puffer (pH 7,4), dunkel	3x5min
12. Kernfärbung: Eindecken der Objektträger mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI und Verschließen des Deckglases mit klarem Nagellack, dunkel	

IV. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben eine detaillierte Beschreibung der verschiedenen Blutzellen des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*), die lichtmikroskopisch, elektronenmikroskopisch sowie glykohochemisch und immunhistochemisch per Fluoreszenzmikroskop untersucht, ausgewertet und fotografiert wurden. Zudem wurde im Zuge dieser Arbeit eine verbesserte Färbung zur Darstellung der unterschiedlichen Zelltypen entwickelt, die nach Bitai modifizierte May-Grünwald-Färbung. Des Weiteren wurde die Größe der Zellen im Mikroskop bestimmt.

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse in Form von Fotos, Tabellen und kurzen Beschreibungen aufgeführt.

1. Blutbilder der untersuchten Königspinguine

Von allen für diese Arbeit untersuchten Königspinguinen wurde vor Ort eine umfassende hämatologische Untersuchung und Allgemeinuntersuchung durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind einige Werte aufgelistet. Zusätzlich wurde ein exemplarischer Untersuchungsbogen im Anhang angefügt. Zunächst wurde durch das Klinikteam der Veterinäre des Loro Parque die Gesundheit der Tiere überprüft, um für diese Arbeit „Normalwerte“ von gesunden Tieren zu erhalten. Die Blutproben, die für die Elektronenmikroskopie ausgewählt wurden, konnten aufgrund des unverzüglichen Zentrifugierens für die weitere Bearbeitung nicht vorher anderweitig hämatologisch untersucht werden. Die Allgemeinuntersuchung dieser Königspinguine zeigte jedoch keine Auffälligkeiten.

Der EWBC, der Estimated White Blood Cell Count, wird bei 40facher Vergrößerung im LM durch Auszählung der Leukozytenanzahl in 10 sog. High Power Fields, geteilt durch die Anzahl der Felder (10) mal 2000 bestimmt. Maschinelle Auszählung ist wegen der kernhaltigen Erythrozyten und Thrombozyten sowie der großen Variabilität der Morphologie der Leukozyten zwischen den verschiedenen Spezies der Vögel als fraglich zu bewerten.

Die Erythrozytenzahl wurde nicht ausgezählt und dafür der Hämatokrit als Richtlinie für die roten Blutzellen angegeben.

Tabelle 29: Blutbilder der Königspinguine

Nr.	EWBC	HKT% (PCV)	Hb g/dl via HKT	pH	TP g/dl	Alter	w/m
1	9800	54	18,4	7,328	6,9	10	m
2	7400	46	15,6	7,388	5,7	11	m
3	6900	47	16,0	7,348	5,9	12	m
4	7300	46	15,6	7,278	5,7	13	w
5	9100	45	15,3	7,249	6,0	12	m
6	8100	47	16,0	7,314	5,8	12	w
7	7800	43	14,6	7,284	4,4	02	w
8	8400	45	15,3	7,306	5,3	12	m
9	8600	41	13,9	7,138	5,2	12	m
10	9000	46	15,6	7,315	5,2	04	m
11	9200	47	15,2	7,283	6,0	13	w
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-
15	7600	46	15,3	7,311	6,3	05	w
16	7800	45	15,5	7,321	5,6	03	m
17	8400	46	15,1	7,335	5,4	02	m

2. Lichtmikroskopische Ergebnisse

In der Literatur sind nur sehr wenige Beschreibungen zu den einzelnen Blutzellen des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) zu finden. Nachfolgend sind nun die verschiedenen Zelltypen in unterschiedlicher Färbung abgebildet und beschrieben. Es wurden Messungen zur Zellgröße und einigen Zellstrukturen (pro Wert je 700 Messungen) durchgeführt und repräsentative Wertetabellen in diese Arbeit eingefügt.

Die Erythrozyten des Königspinguins sind größer als bisher in der Literatur beschrieben. Dies gilt ebenso für die Thrombozyten. Es kann zudem festgestellt werden, dass sich bei Königspinguinen die eosinophilen Granulozyten nur äußerst gering von den heterophilen Granulozyten unterscheiden und beide selbst bei genauester Betrachtung nur schwer auseinanderzuhalten sind. In allen angewandten Färbemethoden konnte kein deutlicher Anfärbungsunterschied ausgemacht werden. Bei den basophilen Granulozyten wurden häufig die erwähnten entfärbten Granula oder entspeicherte Granula beobachtet, sodass auch hier eine Unterscheidung zu aktiven Thrombozyten oder Lymphozyten als schwierig einzustufen ist. Mono- und Lymphozyten bilden sich wie erwartet ab.

Um eine schnellere Unterscheidbarkeit und eine bessere Übersicht über den Blutausstrich zu erzielen, wurde das Färbeprotokoll der May-Grünwald-Färbung von mir in einer Reihe von Vorversuchen modifiziert. Die Ergebnisse der nach Bitai modifizierten May-Grünwald-Färbung werden im Folgenden vergleichend zu anderen Färbemethoden betrachtet. Zudem wurden Zellgruppen zur Gesamtbeurteilung von Färbung und Zelltypen abgebildet.

Neben und in den Abbildungen wurden die verschiedenen Zelltypen bezeichnet. Ergänzende Beschreibungen wurden unter den Abbildungen hinzugefügt.

2.1 Erythrozyten

Pinguinerythrozyten sind längliche, ovale Zellen, die einen zentral sitzenden ovalen Zellkern haben und eine glatte Zellmembran aufweisen. Selten finden sich im ansonsten homogenen Zytoplasma kleine granuläre Einschlüsse. Im Blutausstrich können außerdem in physiologischer Menge Proerythrozyten (unreife Erythrozyten) nachgewiesen werden. Diese haben einen leicht rundlicheren Kern und das Chromatin ist weniger dicht gepackt.

Die Größe der Erythrozyten wurde vermessen und beträgt $21,15 \pm 1,07 \mu\text{m}$ in der Länge und $14,05 \pm 0,73 \mu\text{m}$ in der Breite. Die Kerne sind $8,19 \pm 0,53 \mu\text{m}$ lang und $3,78 \pm 0,52 \mu\text{m}$ breit. Sie zeigen sich damit größer als bisher in der Literatur beschrieben.

Am besten zur Darstellung der Erythrozyten sind die Diff-Quick, die nach Bitai modifizierte May-Grünwald- und die Toluidinblau-Färbung zu werten.

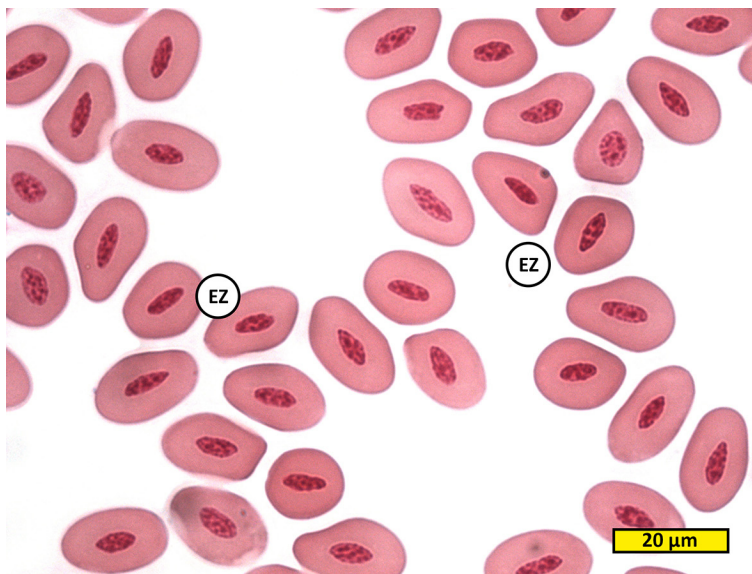
Wie sich die einzelnen Strukturen exakt anfärben ist unter den jeweiligen Abbildungen, auch in den Kapiteln zu den anderen Zelltypen, beschrieben.

Tabelle 30: Repräsentative Messung der Erythrozytengröße des Königspinguins

Messungen	Länge (μm)	Breite (μm)
1	23,06	13,86
2	21,42	14,14
3	22,03	13,97
4	20,91	13,69
5	20,65	13,61
6	21,46	15,36
7	21,03	12,13
8	20,52	14,05
9	21,19	14,76
10	21,64	14,80
11	19,31	14,38
12	22,66	14,07
13	19,21	13,88
14	21,00	14,05
Mittelwert	21,15	14,05
SD	1,07	0,73

Tabelle 31: Repräsentative Messung der Erythrozyten-Kerngröße des Königspinguins

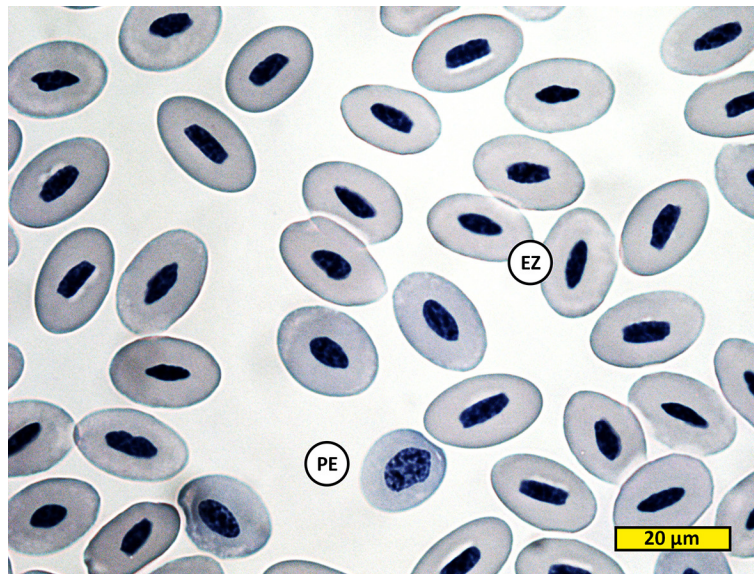
Messungen	Länge (μm)	Breite (μm)
1	8,51	4,49
2	7,89	3,35
3	7,78	2,76
4	8,37	4,09
5	7,53	3,73
6	8,58	3,89
7	8,60	3,79
8	8,89	3,27
9	7,33	3,61
10	7,93	3,75
11	8,10	3,89
12	8,67	4,73
13	7,52	4,34
14	8,94	3,27
Mittelwert	8,19	3,78
SD	0,53	0,52

Abbildungen Erythrozyten:

EZ Erythrozyt

**Bild 7: Erythrozyten Alcianblau-Färbung pH1
Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, scale bar: 20 μm**

Das rosafarbene Zytoplasma der Erythrozyten wird homogen angefärbt. Der Zellkern ist rot bis dunkelrot und mäßig kondensiert. Die Zellen sind oval, teilweise leicht durch den Ausstrich verformt.



EZ Erythrozyt

PE Proerythrozyt

Bild 8: Erythrozyten Toluidinblau-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.3, scale bar: 20μm

Das Zytoplasma färbt sich homogen blass graublau an. Der Zellkern ist tiefblau, die dicht kondensierten Bereiche sind schwarzblau. Der Zellkern des Proerythrozyten, eines unreifen Erythrozyten, ist deutlich runder und mäßig kondensiert.

2.2 Thrombozyten

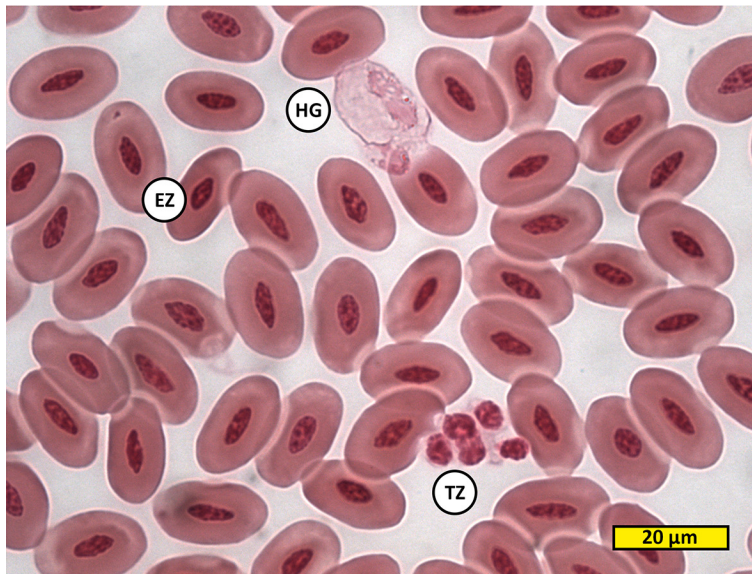
Im Lichtmikroskop sind Thrombozyten als runde bis ovale Zellen zu sehen, die über ein teils vakuolisiertes Zytoplasma und einen ovalen bis runden Zellkern verfügen. Vereinzelt lassen sich zytoplasmatische Ausläufer, sog. Pseudopodien ausmachen. Teils sind Granula zu erkennen. Häufig liegen sie in Aggregaten zusammen, sie können in Ausstrichen aber auch einzeln gelagert vorkommen, wobei unreife Thrombozyten in Ausstrichen nicht auszumachen sind. Die Größe der Thrombozyten beträgt $6,54 \pm 2,00 \mu\text{m}$ in der Länge und $5,97 \pm 1,53 \mu\text{m}$ in der Breite.

Am besten zur Darstellung der Thrombozyten sind die Diff-Quick und die nach Bitai modifizierte May-Grünwald-Färbung zu werten. Die Anfärbbarkeit der einzelnen Zellstrukturen der Thrombozyten ist unter den Abbildungen beschrieben.

Tabelle 32: Repräsentative Messungen der Thrombozytengröße des Königspinguins

Messungen	Länge (μm)	Breite (μm)
1	11,02	8,50
2	9,91	9,91
3	10,25	7,69
4	9,91	8,02
5	7,43	6,14
6	7,20	7,20
7	4,15	4,15
8	6,48	6,48
9	6,26	5,14
10	5,23	6,30
11	5,52	5,52
12	6,38	6,38
13	5,61	5,61
14	5,93	5,93
15	6,52	6,52
16	5,64	5,64
17	4,23	4,23
18	3,48	3,48
19	4,68	4,68
20	5,45	5,45
21	6,70	4,37
22	5,56	5,02
23	6,84	4,86
Mittelwert	6,54	5,97
SD	2,00	1,53

Abbildungen Thrombozyten:

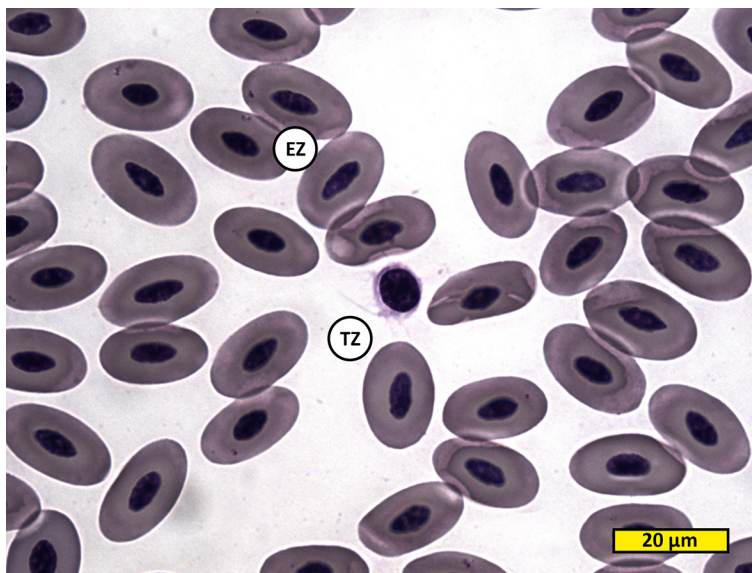


TZ Thrombozyt

EZ Erythrozyt
HG Heterophiler
Granulozyt

Bild 9: Thrombozyten Alcianblau-Färbung pH1
Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, scale bar: 20µm

Das Zytoplasma der Thrombozyten färbt sich blassrosa an. Die Zellkerne der Thrombozyten nehmen einen ähnlichen, nur leicht dunkleren Rot-Ton an, als die der Erythrozyten. Die Granula des heterophilen Granulozyten sind nicht deutlich im ebenfalls hellrosafarbenen Zytoplasma zu erkennen. Auf und um den dunkler rosa gefärbten Kern sind granuläre Einschlüsse zu erkennen.

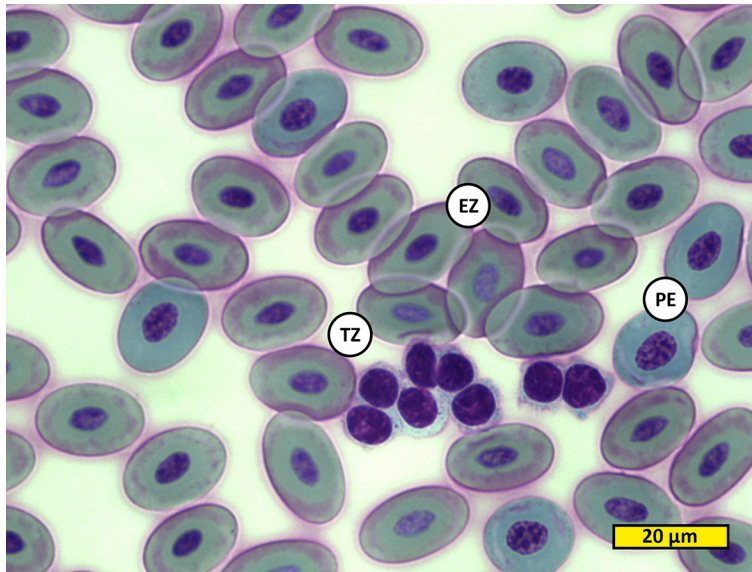


TZ Thrombozyt

EZ Erythrozyt

Bild 10: Thrombozyten Diff-Quick Haema-Schnellfärbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.10, scale bar: 20µm

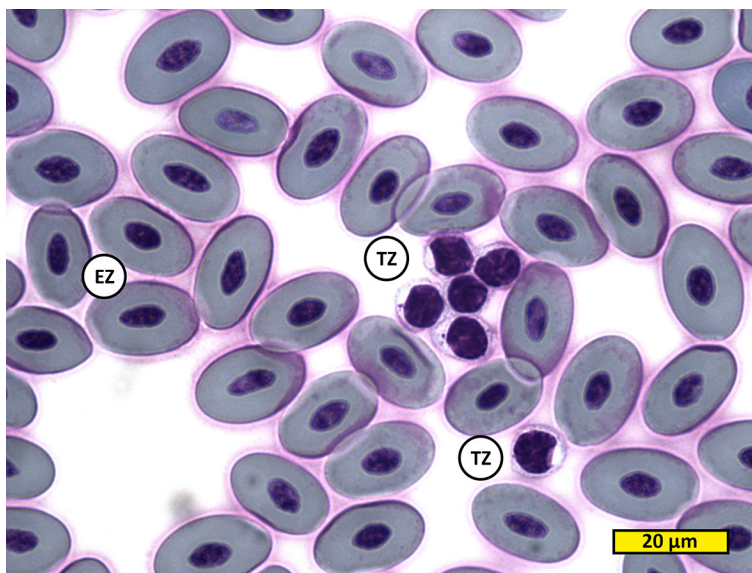
In der Diff-Quick Färbung nehmen die Erythrozyten eine grauviolette bis violette Farbe an. Ihr Kern ist dunkelblau. Der Thrombozyt in der Mitte, mit hellvioletterem Zytoplasma und dunklem Zellkern, weist deutliche zytoplasmatische Ausläufer auf, sog. Pseudopodien.



TZ Thrombozyt
 EZ Erythrozyt
 PE Proerythrozyt

Bild 11: Thrombozyten Giemsa-Färbung
 Blutausstrich, Königspinguin Nr.8, scale bar: 20µm

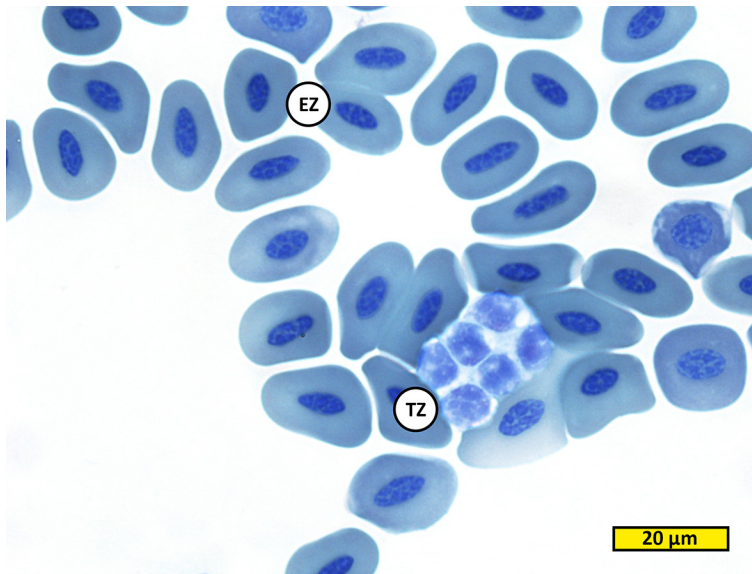
Es ist deutlich ein Thrombozytenaggregat zu erkennen. Das Zytoplasma dieser Zellen ist hellblau, der Kern dunkelviolet. Im Zytoplasma sind violette, granuläre Einschlüsse zu sehen. Das Zytoplasma der Erythrozyten färbt sich in unterschiedlichen Blauabstufungen an, das der Proerythrozyten weist ein kräftigeres Blau auf als die reifen Erythrozyten. Der Kern der unreifen Zellen ist locker kondensiert. Im Zytoplasma ist ein leichter Farbausfall als Färbeartefakt zu erkennen.



TZ Thrombozyt
 EZ Erythrozyt

Bild 12: Thrombozyten Giemsa-Färbung
 Blutausstrich, Königspinguin Nr.8, scale bar: 20µm

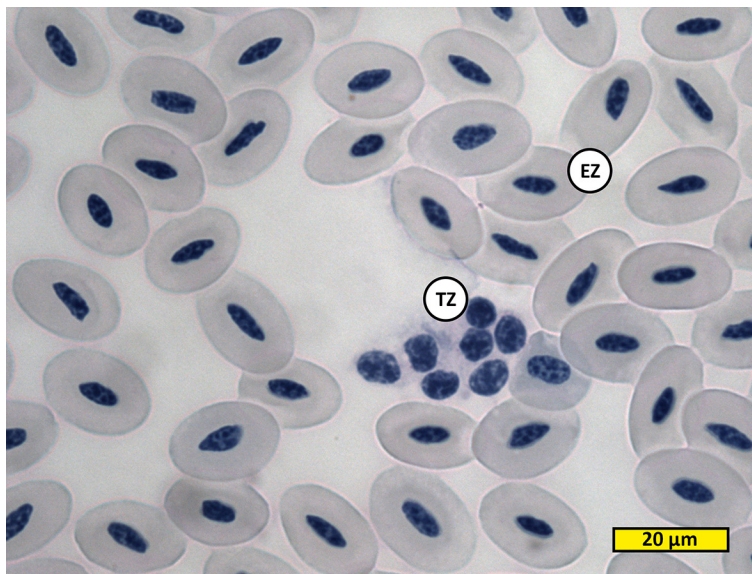
Ein Thrombozytenaggregat und ein einzelner Thrombozyt sind zwischen Erythrozyten zu sehen. Deutlich sind Vakuolen im Zytoplasma der Thrombozyten auszumachen. Im Zytoplasma der Erythrozyten ist ein leichter Farbausfall als Färbeartefakt zu erkennen.



TZ Thrombozyt
EZ Erythrozyt

**Bild 13: Thrombozyten Färbung May-Grünwald modifiziert nach Bitai
Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 20µm**

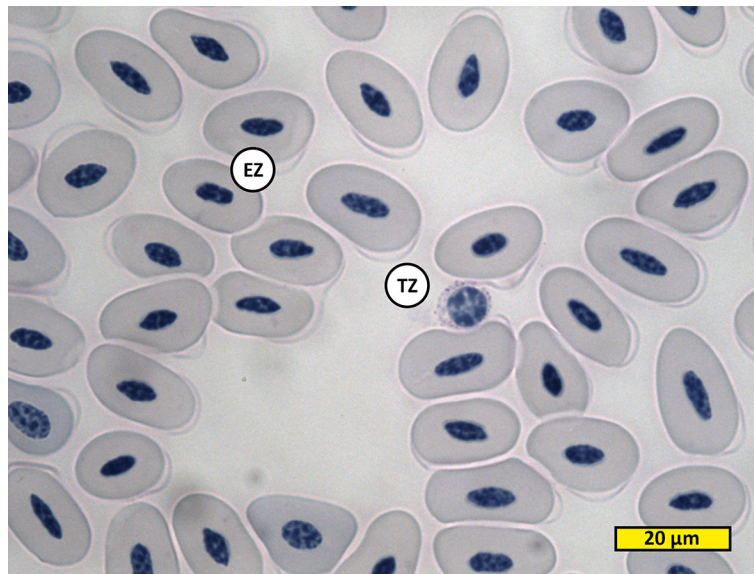
Thrombozytenaggregat. Das Zytoplasma stellt sich hellblau, die Kerne dunkler dar. Die Erythrozyten nehmen einen satten blauen Farbton an, die Kerne sind dunkelblau und dicht kondensiert.



TZ Thrombozyt
EZ Erythrozyt

**Bild 14: Thrombozyten PAS-Reaktion mit Amylase Vorbehandlung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.3, scale bar: 20µm**

Die Erythrozyten färben sich graublau an und der Kern dunkelblau mit schwarzblauen, dichtkondensierten Stellen. Das Zytoplasma der aggregiert vorliegenden Thrombozyten ist blau, die Kerne dunkelblau mit noch dunkleren Stellen.



TZ Thrombozyt

EZ Erythrozyt

Bild 15: Thrombozyten PAS Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, scale bar: 20μm

Das Zytoplasma der Erythrozyten ist graublau und die Kerne färben dunkelblau an, um die Zellen ist ein Hof zu sehen, der als Färbeartefakt einzustufen ist. Der Thrombozyt in der Mitte hat kleine PAS-positive rötliche Einschlüsse im ansonsten hellblauen Zytoplasma. Der Kern ist mäßig kondensiert und blau zu erkennen.

2.3 Leukozyten

Die Leukozyten sind für die Beurteilung des Blutbildes entscheidende Zellen. Die Darstellung dieser Zellgruppe stellt demnach eine besondere Herausforderung dar. Verschiedene Färbemethoden wurden angewandt, um die bestmögliche Abbildung der Zellstrukturen zu erreichen. Zudem wurden Zellen und Granula vermessen.

In den folgenden Kapiteln wird ein detaillierter Überblick über die Leukozyten des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) gegeben.

2.3.1 Heterophile Granulozyten

Heterophile Granulozyten des Königspinguins sind im Lichtmikroskop als unregelmäßig geformte Zellen, die rund, oval, länglich oder anders ausgebreitet erscheinen, aufzufinden. Im ansonsten farblos erscheinenden Zytoplasma sind zahlreiche Granula vorhanden, rund und teilweise lanzettförmig. Der Zellkern besteht aus grobkörnigem Chromatin und ist gelappt.

Die Größe der heterophilen Granulozyten beträgt $21,33 \pm 2,87 \mu\text{m}$ in Länge und $12,32 \pm 2,09 \mu\text{m}$ in Breite. Die Granula sind $1,56 \pm 0,42 \mu\text{m}$ lang und $0,83 \pm 0,20 \mu\text{m}$ breit.

Am besten zur Darstellung der heterophilen Granulozyten ist die nach Bitai modifizierte May-Grünwald-Färbung zu werten.

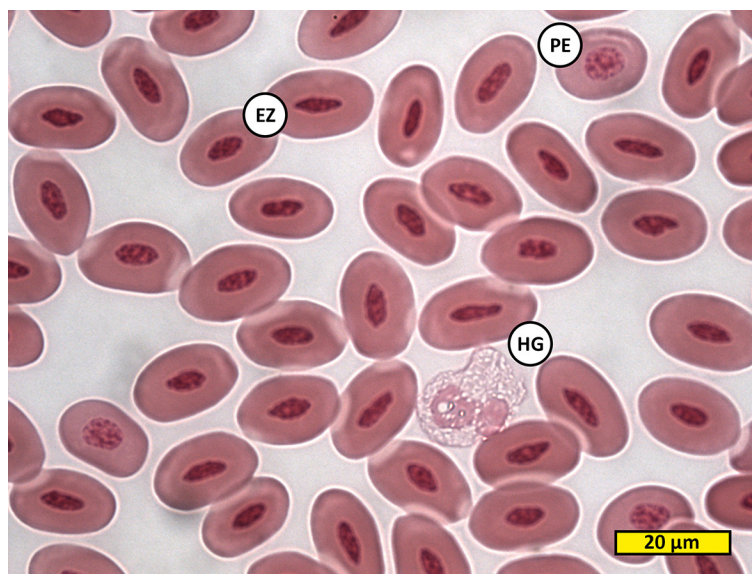
Wie sich die einzelnen Strukturen exakt anfärben ist unter den jeweiligen Abbildungen beschrieben.

Tabelle 33: Repräsentative Messungen der heterophilen Granulozytengröße des Königspinguins

Messungen	Länge (μm)	Breite (μm)
1	20,83	9,51
2	17,84	12,50
3	19,08	14,32
4	20,43	14,84
5	22,37	11,51
6	21,89	14,29
7	16,05	15,26
8	21,65	10,69
9	25,23	14,14
10	24,29	10,49
11	24,48	9,89
12	24,48	9,89
13	18,61	12,83
Mittelwert	21,33	12,32
SD	2,87	2,09

Tabelle 34: Repräsentative Messungen der heterophilen Granulozyten Granula-Größe des Königspinguins

Messungen	Länge (μm)	Breite (μm)
1	1,90	1,10
2	2,16	0,90
3	1,17	1,17
4	0,75	0,75
5	1,75	0,87
6	1,00	1,00
7	1,35	0,71
8	1,68	0,87
9	1,70	0,92
10	1,75	0,50
11	1,71	0,75
12	2,09	0,81
13	1,23	0,46
Mittelwert	1,56	0,83
SD	0,42	0,20



HG Heterophiler
Granulozyt

EZ Erythrozyt
PE Proerythrozyt

Bild 16: Heterophiler Granulozyt Alcianblau-Färbung bei pH1 Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, scale bar: 20 μm

Die Granula des heterophilen Granulozyten sind als lanzettförmige Aussparungen im ansonsten hellrosa angefärbten Zytoplasma und auf dem rosanen Zellkern zu erkennen. Der Zellkern enthält eine Vakuole. Die Erythrozyten färben sich lachsfarben mit dunkelrotem Kern an. Der Kern des deutlich runderen Proerythrozyten ist weniger dicht kondensiert als das der reifen Erythrozyten.

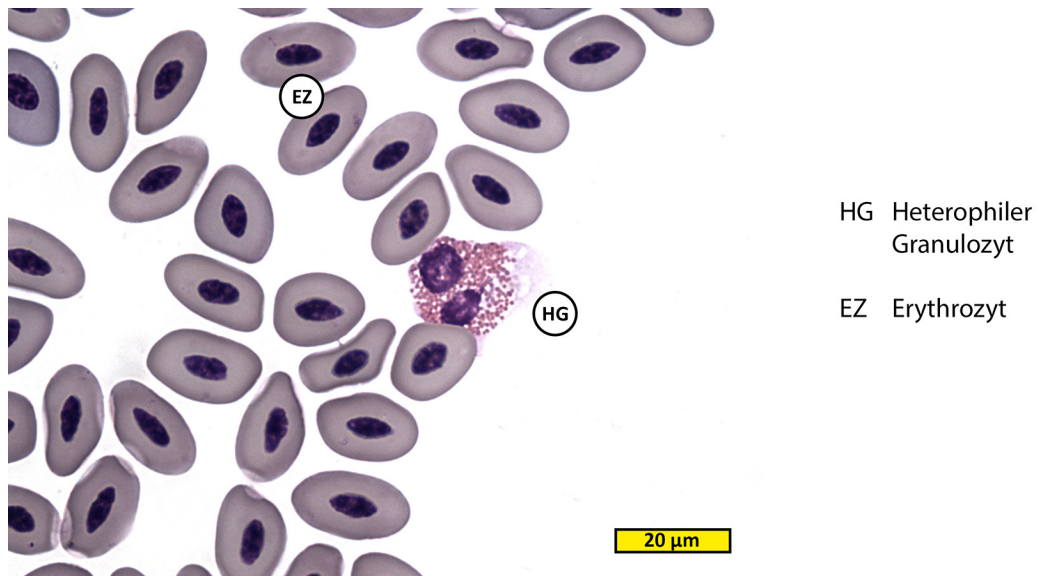


Bild 17: Heterophiler Granulozyt Diff-Quick Haema-Schnellfärbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.10, scale bar: 20µm

Der violette Zellkern der heterophilen Granulozyten ist umgeben von rosa bis violett angefärbten, runden bis lanzettförmigen Granula im ansonsten farblos erscheinenden Zytoplasma. Das Zytoplasma der Erythrozyten färbt sich graublau bis hellviolett, die Kerne dunkelviolett bis dunkelblau.

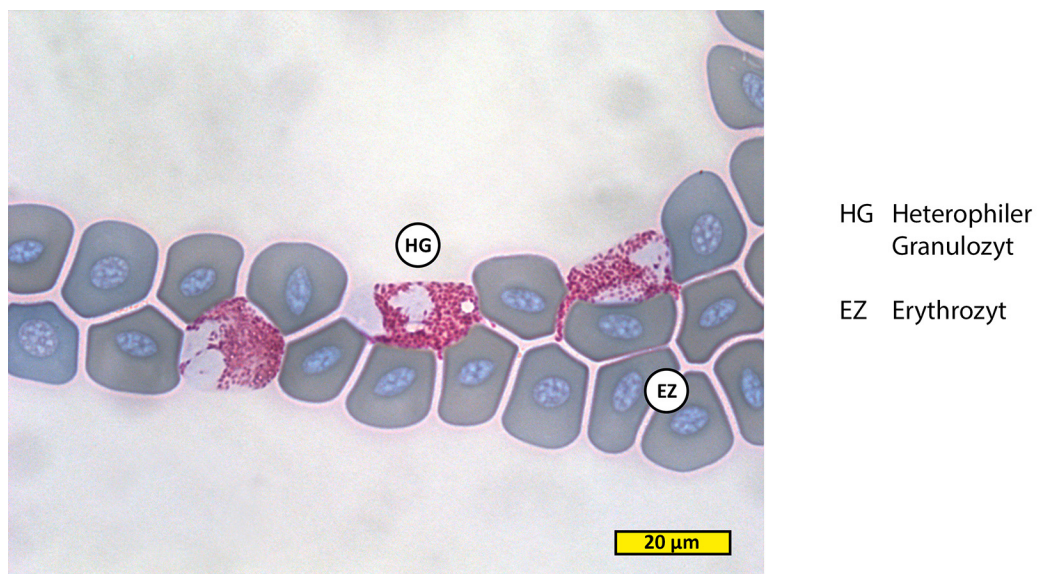
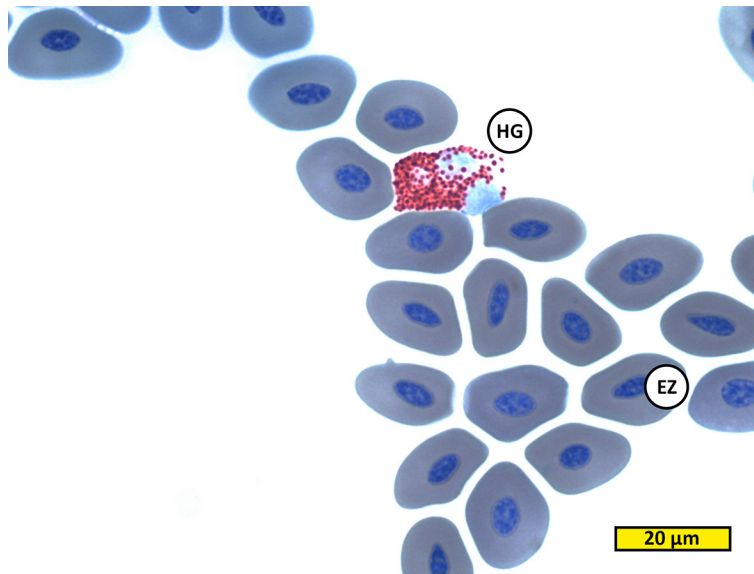


Bild 18: Heterophile Granulozyten May-Grünwald-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20µm

In der May-Grünwald-Färbung sind die Erythrozyten mit hellblauen Zellkernen und graublauem Zytoplasma zu sehen. Die heterophilen Granulozyten zeigen basophil und eosinophil angefärbte, runde und längliche Granula im farblosen Zytoplasma um einen blass hellblauen Zellkern.

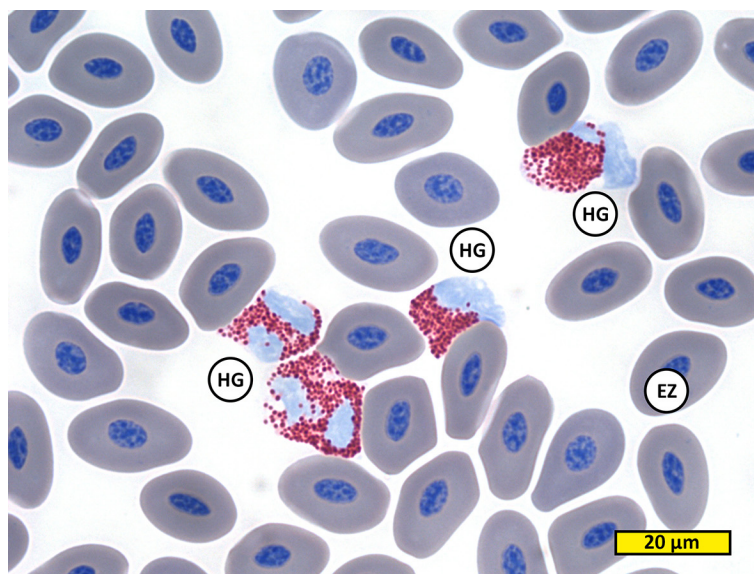


HG Heterophiler
Granulozyt

EZ Erythrozyt

Bild 19: Heterophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 20µm

Sehr deutlich zeichnen sich die blaugrauen Erythrozyten mit blauem Kern in der nach Bitai modifizierten Färbung ab. Die heterophilen Granulozyten haben einen hellblauen Zellkern mit leicht dunkleren, dichter kondensierten Bereichen und zweifarbig (basophil und eosinophil) angefärbte Granula.



HG Heterophiler
Granulozyt

EZ Erythrozyt

Bild 20: Heterophile Granulozyten May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20µm

Die Heterophilen Granulozyten haben deutlich zweifarbige (basophile und eosinophile) Granula und hellblaue, strukturierte und gelappte Kerne. Die Erythrozyten zeigen graublaues Zytoplasma und blaue kondensierte Kerne.

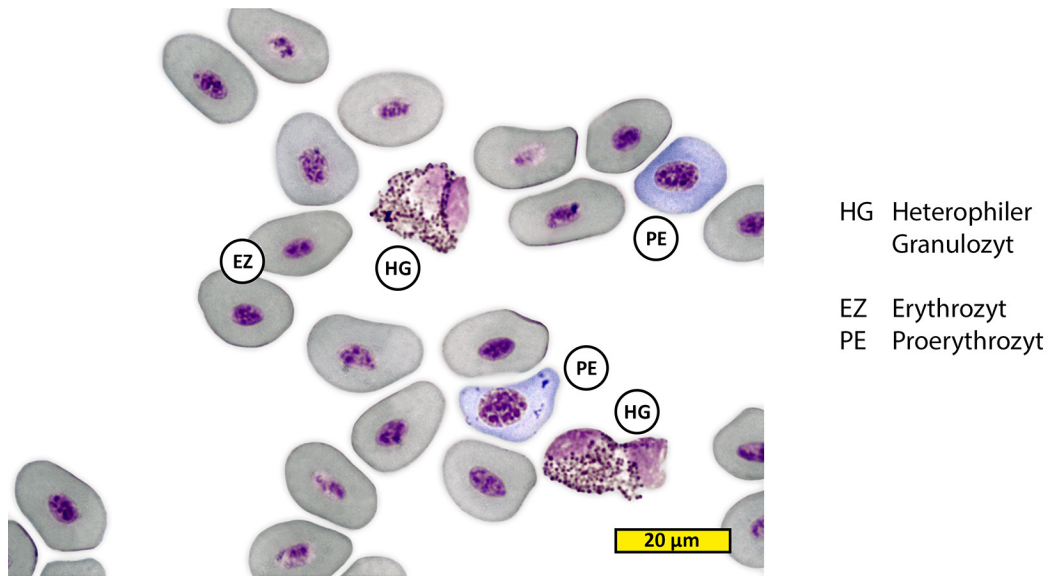


Bild 21: Heterophiler Granulozyt Papanheim-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, scale bar: 20µm

In der Papanheimfärbung stellen sich die Erythrozyten mit grauem Zytoplasma, die Proerythrozyten mit blauem und die heterophilen Granulozyten mit farblosem Zytoplasma dar. Die Zellkerne aller Zellen färben sich violett an und sind unterschiedlich dicht kondensiert. Die Granula der Heterophilen färben sich violett und dunkelviolet an.

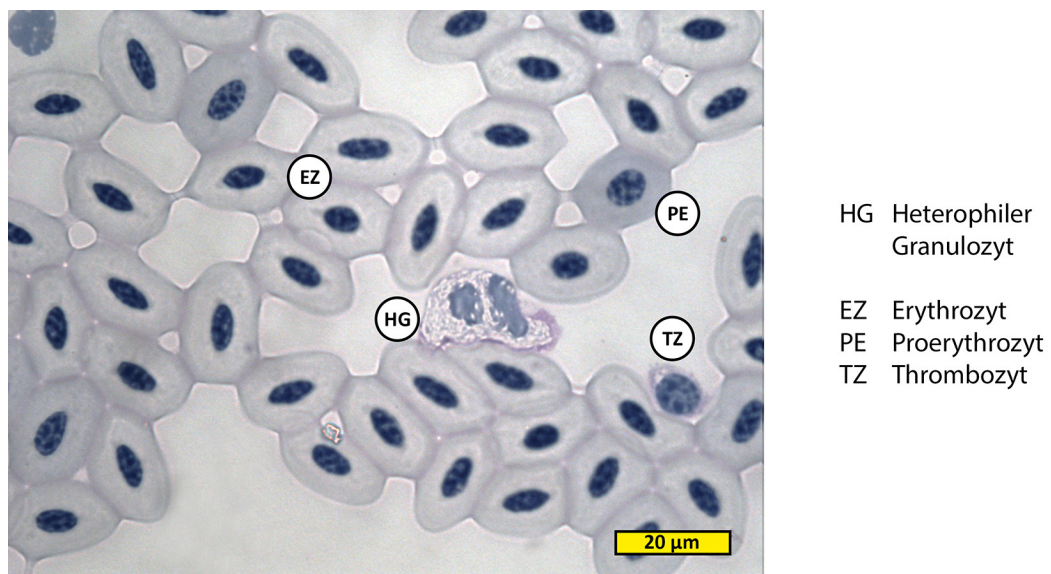
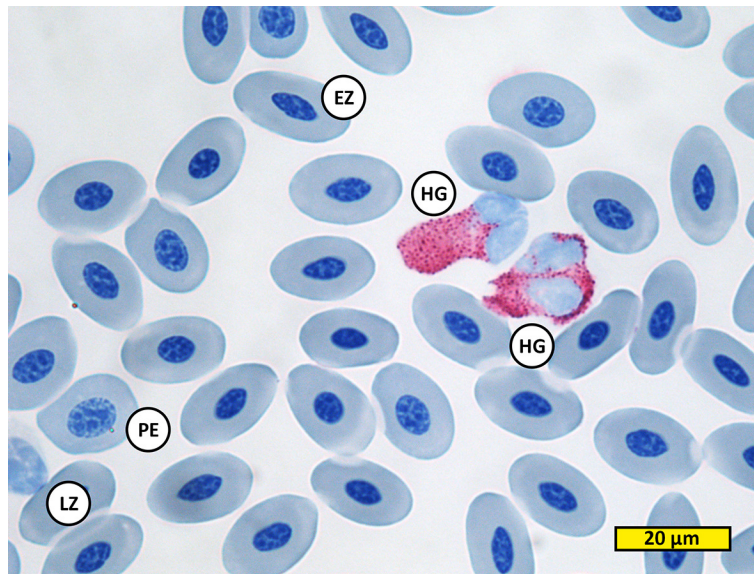


Bild 22: Heterophiler Granulozyt PAS methyliert Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.10, scale bar: 20µm

Die Granula des heterophilen Granulozyten sind als lanzettförmige Aussparungen im leicht PAS-positiven, blassrosafarbenen Zytoplasma und auf dem graublauen, segmentierten Zellkern zu erkennen. Die Erythrozyten sind hellblau bis farblos mit dunkelblauen Kernen. Proerythrozyten weisen eine stärkere Anfärbbarkeit des Zytoplasmas auf.



HG Heterophiler
Granulozyt

EZ Erythrozyt
PE Proerythrozyt
LZ Lymphozyt

**Bild 23: Heterophile Granulozyten Sirius-Red Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20μm**

In der Sirius-Red Färbung stellen sich die heterophilen Granulozyten mit hellblauen Kernen und deutlich rosa und dunkelrot angefärbten Granula dar. Im Gegensatz dazu erscheinen die Erythrozyten mit blauem Zytoplasma und dunkelblauem Kern. Die Kerne der Proerythrozyten sind weniger dicht kondensiert und wirken dadurch heller angefärbt.

2.3.2 Eosinophile Granulozyten

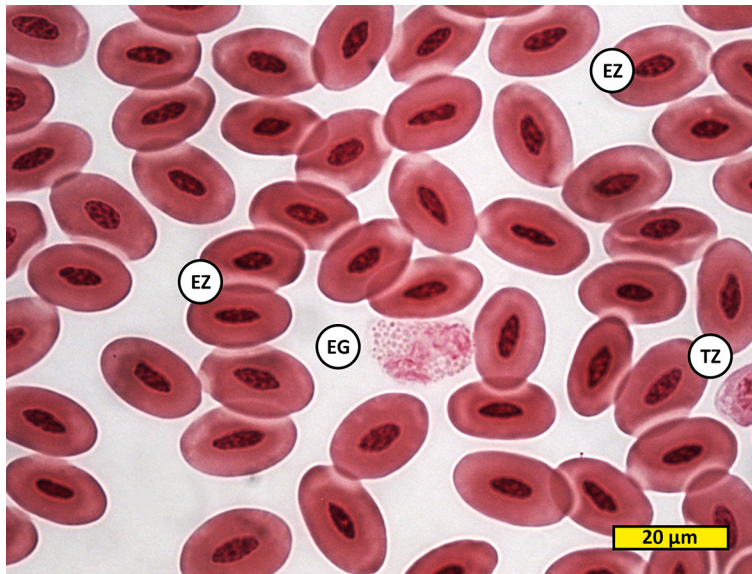
Die eosinophilen Granulozyten des Königspinguins sind, wie die eosinophilen Granulozyten, im Lichtmikroskop als unregelmäßig geformte Zellen, die rund, oval, länglich oder anders ausgebreitet erscheinen, zu sehen. Im ansonsten ebenfalls farblos erscheinenden Zytoplasma sind zahlreiche Granula vorhanden. Die Granula sind im Gegensatz zu denen der heterophilen Granulozyten nur rund, haben aber beinahe dieselbe Größe wie die der Heterophilen. Auch in der Anfärbbarkeit sind, wenn überhaupt, nur minimale Unterschiede auszumachen. Der Zellkern besteht auch hier aus grobkörnigem Chromatin und ist gelappt. Die Zellen anhand des ARNETH-INDEX zu identifizieren ist ebenfalls nicht möglich, da die Kernlappenanzahl bei diesen beiden Zelltypen oft identisch ist. Da die Größe im Vergleich zu den heterophilen Granulozyten nicht erkennbar variiert, konnte keine getrennte Messung der Größe der eosinophilen Granulozyten durchgeführt werden. Die Größe ist folglich als identisch mit der von Heterophilen zu werten und beträgt $21,33 \pm 2,87 \mu\text{m}$ in Länge und $12,32 \pm 2,09 \mu\text{m}$ in Breite.

Es konnte keine bevorzugte Färbung für die Darstellung der eosinophilen Granulozyten des Königspinguins ausgemacht werden. Auch bei der in der Literatur zur Identifikation der Eosinophilen angegebenen Sirius-Red-Färbung (Wehrend et al., 2004) konnte kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. In der nach Bitai modifizierten May-Grünwald-Färbung war eventuell der deutlichste Unterschied zu den heterophilen Granulozyten zu erkennen. Im Folgenden sind nun die Zellen abgebildet, die am wahrscheinlichsten als eosinophile Granulozyten identifiziert wurden. Wie sich welche Strukturen der Eosinophilen im Einzelnen färben lassen, ist unter den Abbildungen beschrieben.

Tabelle 35: Repräsentative Messungen der eosinophilen Granulozyten Granula-Größe des Königspinguins

Messungen	Länge (μm)	Breite (μm)
1	0,95	0,95
2	0,92	0,92
3	0,59	0,59
4	0,66	0,66
5	0,54	0,54
6	0,86	0,86
7	0,71	0,71
8	0,74	0,74
9	0,74	0,74
10	0,62	0,62
11	0,56	0,56
12	0,59	0,59
13	0,60	0,60
14	0,55	0,55
15	0,54	0,54
16	0,65	0,65
Mittelwert	0,68	0,68
STD	0,13	0,13

Abbildungen der eosinophilen Granulozyten:

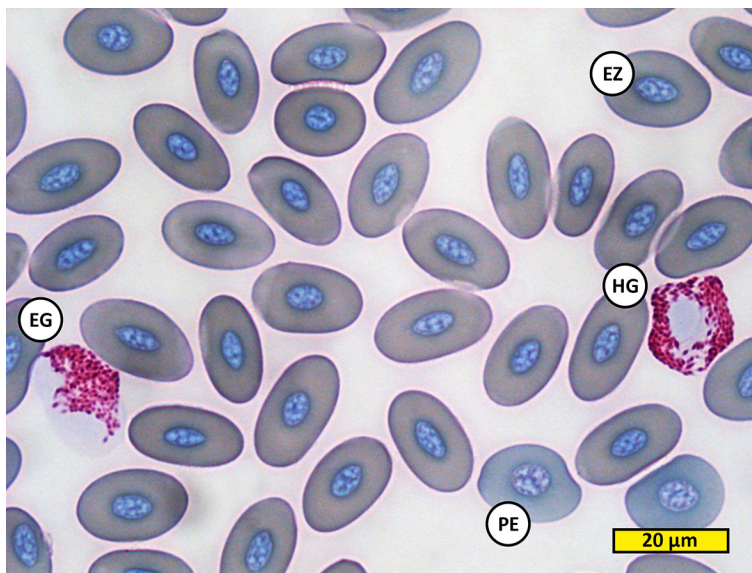


EG Eosinophiler
Granulozyt

EZ Erythrozyt
TZ Thrombozyt

**Bild 24: Eosinophiler Granulozyt Alcianblau-Färbung bei pH2,5
Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, scale bar: 20µm**

Diese Zelle wurde, wegen ihrer deutlich runden und nicht nur als Aussparungen erkennbaren Granula (anders als bei einem heterophilen Granulozyt in dieser Färbung), die noch dazu in geringerer Anzahl vorliegen, als eosinophiler Granulozyt identifiziert. Der Zellkern ist mäßig kondensiert, gelappt und färbt sich leicht dunkler rosa an als die Granula im farblosen Zytoplasma.

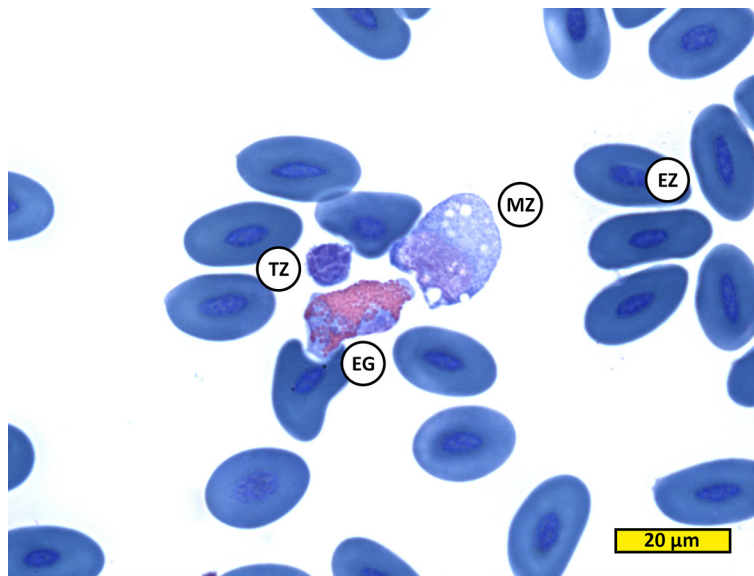


EG Eosinophiler
Granulozyt
HG Heterophiler
Granulozyt

EZ Erythrozyt
PE Proerythrozyt

**Bild 25: Eosinophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20µm**

Hier zwei Granulozyten im Vergleich. Der linke wurde aufgrund der runderen Granula als eosinophiler Granulozyt identifiziert. Bei beiden Zellen färben sich die Granula zweifarbig (basophil und eosinophil) an.

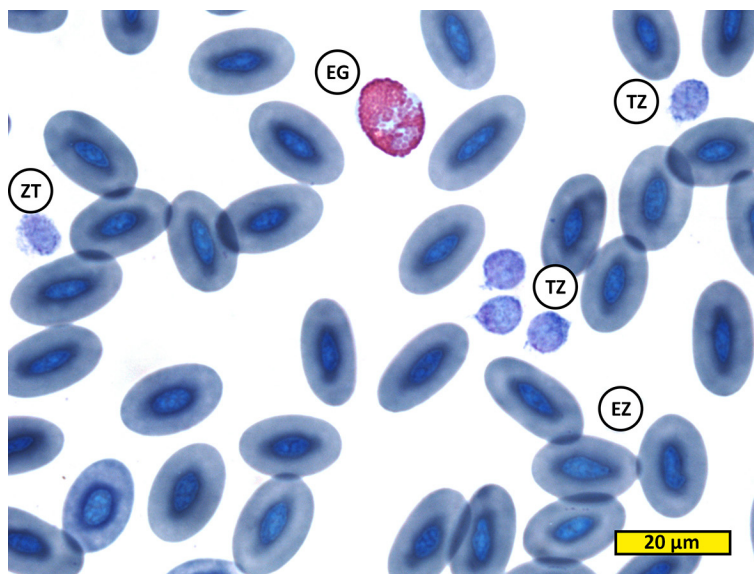


EG Eosinophiler
Granulozyt

EZ Erythrozyt
TZ Thrombozyt
MZ Monozyt

Bild 26: Eosinophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 20µm

Bei dieser als eosinophiler Granulozyt identifizierten Zelle fallen die runden, einfarbigen Granula in rosa auf. Der Zellkern ist hellblau und teils von den deutlich erkennbaren Granula überlagert. Darüber ist ein fast Zytosplasma-freier Thrombozyt zu sehen und rechts davon ein Monozyt mit dem typischen vakuoligen Zytosplasma.



EG Eosinophiler
Granulozyt

EZ Erythrozyt
TZ Thrombozyt
ZT Zelltrümmer

Bild 27: Eosinophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 20µm

Auch hier sind die runden, einfarbig rosanen, eosinophilen Granula auf einem hellblauen Zellkern zu erkennen.

2.3.3 Basophile Granulozyten

Die basophilen Granulozyten des Königspinguins sind rund und haben einen nur selten gelappten, ebenfalls runden bis ovalen Nukleus. Die runden bis leicht unregelmäßigen Granula dieser Zellen sollten sich basophil anfärben. Es wurden jedoch häufig entfärbte oder entspeicherte Granula beobachtet, die wie Vakuolen oder Blasen als kreisrunde, nicht angefärbte Stellen um den blassen oder teils dunklen Zellkern innerhalb der Zellmembran liegen. Die Größe der runden basophilen Granulozyten beträgt $12,51 \pm 1,56 \mu\text{m}$. Die Granula sind $1,56 \pm 0,23 \mu\text{m}$ groß.

In der nach Bitai modifizierten May-Grünwald-Färbung zeigten sich die Granula am deutlichsten basophil, die Granulozyten konnten eindeutig und zuverlässig identifiziert werden.

Die Beschreibung der Färbung der verschiedenen Zellstrukturen ist unter den jeweiligen Abbildungen zu finden.

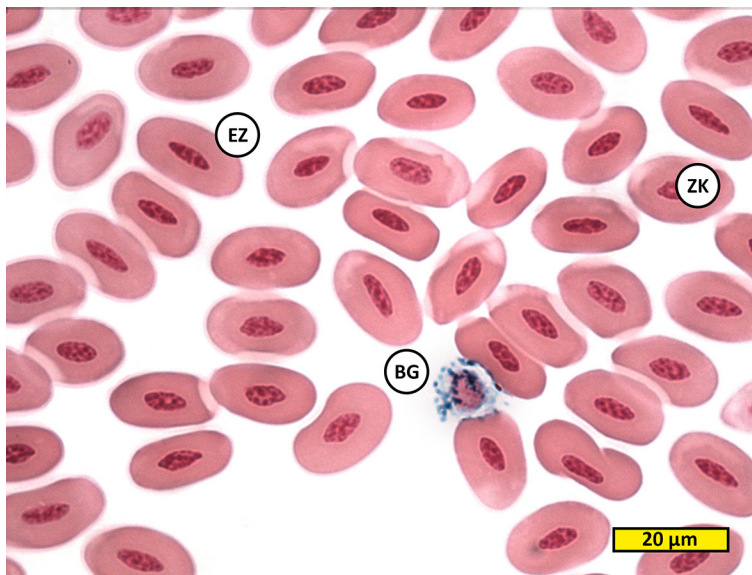
Tabelle 36: Repräsentative Messungen der basophilen Granulozytengröße des Königspinguins

Messungen	Länge (μm)	Breite (μm)
1	12,12	12,12
2	11,56	11,56
3	10,93	10,93
4	13,17	13,17
5	10,32	10,32
6	11,90	11,90
7	11,06	11,06
8	13,57	13,57
9	11,18	11,18
10	12,71	12,71
11	14,18	14,18
12	14,52	14,52
13	15,42	15,42
Mittelwert	12,51	12,51
SD	1,56	1,56

Tabelle 37: Repräsentative Messungen der basophilen Granulozyten Granula-Größe des Königspinguins

Messungen	Länge (μm)	Breite (μm)
1	1,74	1,74
2	1,83	1,83
3	1,40	1,40
4	1,24	1,24
5	1,40	1,40
6	1,46	1,46
7	1,74	1,74
8	1,49	1,49
9	1,54	1,54
10	1,92	1,92
11	1,83	1,83
12	1,24	1,24
13	1,40	1,40
Mittelwert	1,56	1,56
STD	0,23	0,23

Abbildungen der basophilen Granulozyten:

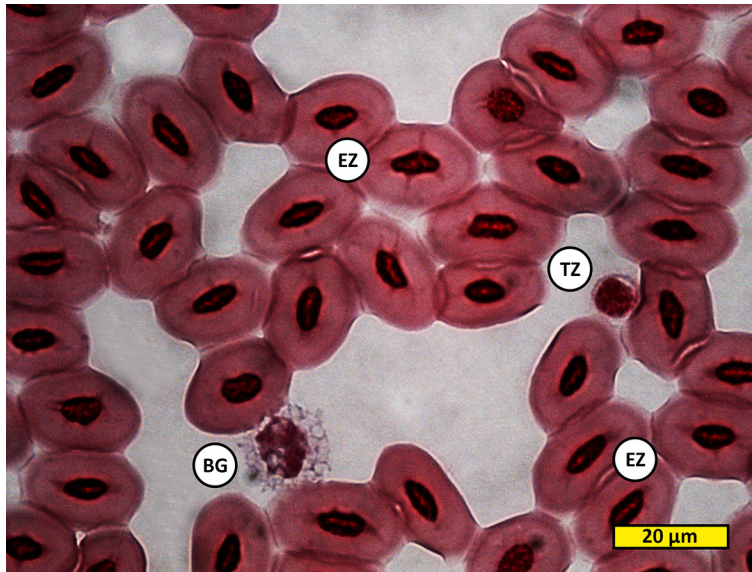


BG Basophiler
Granulozyt

EZ Erythrozyt
ZK Zellkern

**Bild 28: Basophiler Granulozyt Alcianblau-Färbung bei pH1
Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, scale bar: 20 μm**

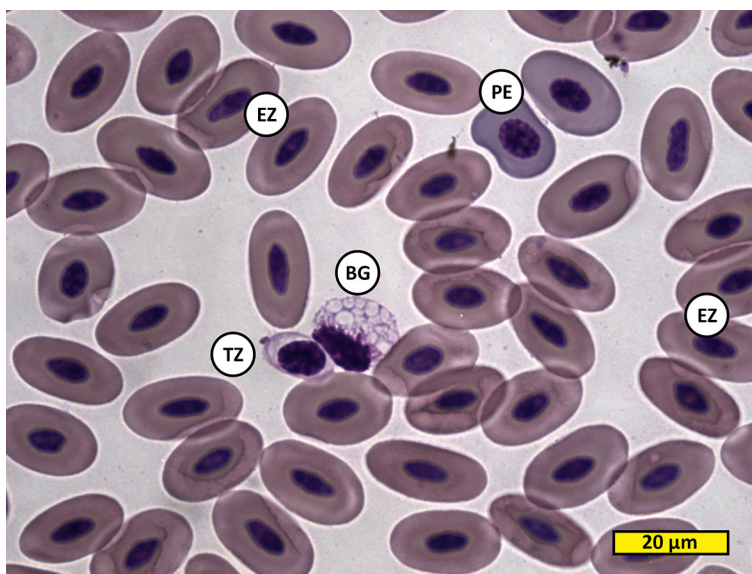
Einige Granula des Basophilen haben sich blau angefärbt und sind im ansonsten farblosen Zytoplasma als Kontrast zum rosanen Zellkern zu sehen. Die restlichen Granula erscheinen nur sehr schwach basophil oder teils gar nicht angefärbt.



- BG Basophiler
Granulozyt
- EZ Erythrozyt
TZ Thrombozyt

**Bild 29: Basophiler Granulozyt Alcianblau-Färbung bei pH2,5
Blutausstrich, Königspinguin Nr.8, scale bar: 20μm**

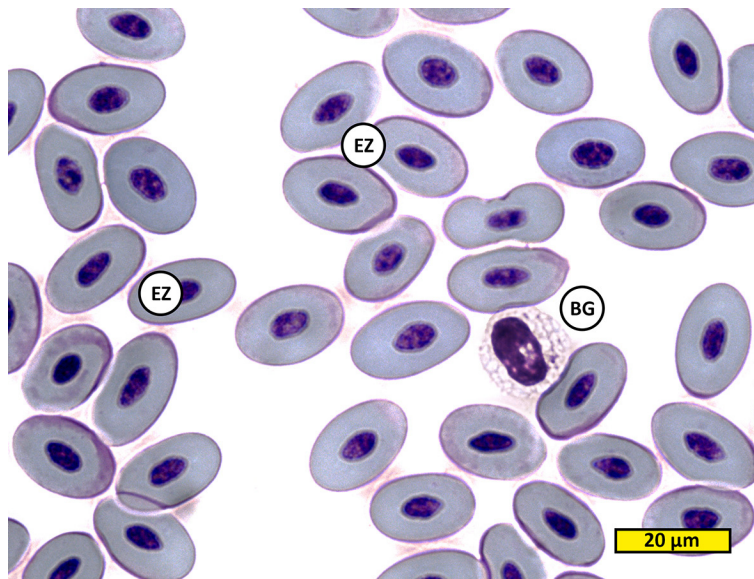
Die Granula des basophilen Granulozyten erscheinen entspeichert oder ungefärbt. Sie sind als blasige Strukturen um den dunkelrosanen Zellkern auszumachen. Es ist außerdem zu erkennen, dass die Zelloberfläche nicht glatt ist, sondern dass die Granula Zellausläufer bilden.



- BG Basophiler
Granulozyt
- EZ Erythrozyt
PE Proerythrozyt
TZ Thrombozyt

**Bild 30: Basophiler Granulozyt Diff-Quick Haema-Schnellfärbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.10, scale bar: 20μm**

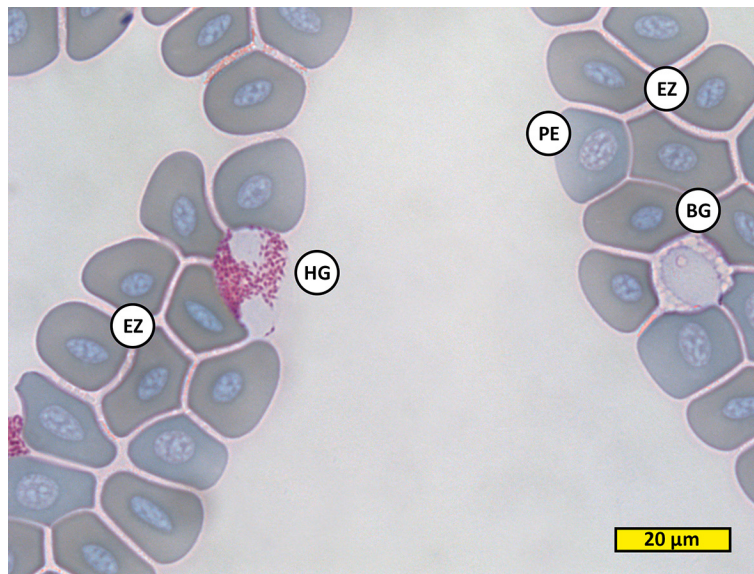
Die nicht gefärbten Granula des basophilen Granulozyten zeichnen sich im leicht basophilen Zytoplasma der Zelle als Vakuolen ab. Der Exzentrische Zellkern ist dunkelviolet angefärbt. Deutlich ist auch die unterschiedliche Anfärbbarkeit des Zytoplasmas der Proerythrozyten und Erythrozyten auszumachen.



BG Basophiler
Granulozyt
EZ Erythrozyt

**Bild 31: Basophiler Granulozyt Giemsa-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.8, scale bar: 20μm**

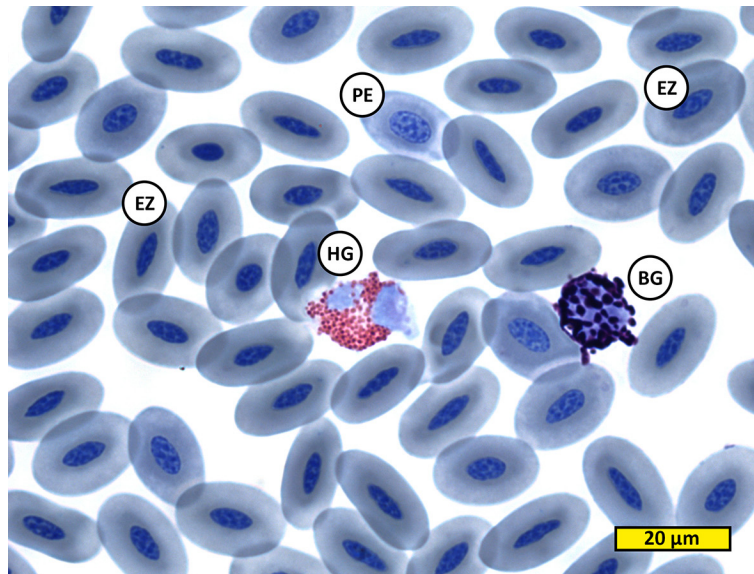
Die Granula des entspeicherten basophilen Granulozyten sind nur als blasige Struktur um den dunkelvioletten Zellkern zu erkennen.



BG Basophiler
Granulozyt
HG Heterophiler
Granulozyt
EZ Erythrozyt
PE Proerythrozyt

**Bild 32: Basophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20μm**

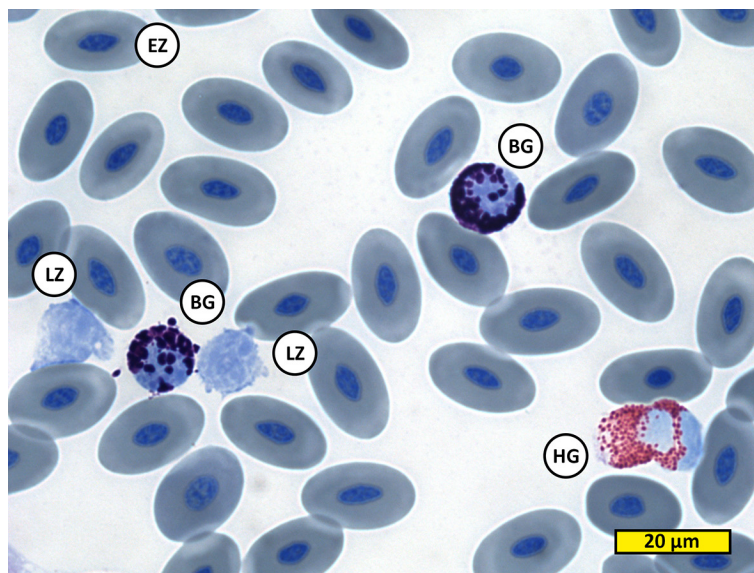
Gegenüberliegende Granulozyten. Links ein Heterophiler mit deutlich rosa und dunkler rosa angefärbten Granula um einen gelappten blassblaugrauen Zellkern, rechts ein Basophiler mit nicht angefärbten Granula im leicht grauen Zytoplasma um pastellblauen runden Kern.



- BG Basophiler Granulozyt
- HG Heterophiler Granulozyt
- EZ Erythrozyt
- PE Proerythrozyt

Bild 33: Basophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20µm

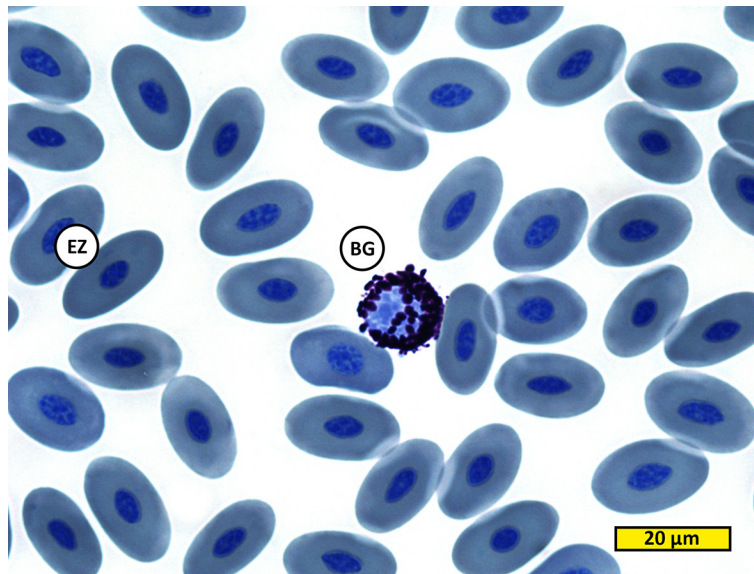
Hier zwei Granulozyten in der modifizierten Färbung im Vergleich. Links ein heterophiler Granulozyt mit zweifarbigen Granula um einen hellblauen Zellkern und rechts ein basophiler Granulozyt mit tief basophilen, dunkelviolett angefärbten Granula um einen runden, ebenfalls hellblauen Zellkern. Deutlich ist die raue Zelloberfläche zu sehen. In den basophilen Granula durch leichte Farbnuancen Struktur zu erkennen.



- BG Basophiler Granulozyt
- HG Heterophiler Granulozyt
- EZ Erythrozyt
- LZ Lymphozyt

Bild 34: Basophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 20µm

Nochmal basophile Granulozyten mit deutlich strukturierten, tief basophil angefärbten Granula, die ohne Mühe vom Hintergrund und den umliegenden Zellen differenziert werden können.



BG Basophiler
Granulozyt
EZ Erythrozyt

**Bild 35: Basophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai
Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20μm**

Deutlich sind die Zellausläufer bildenden Granula in dunkelviolet zu erkennen. Der basophile Granulozyt hat einen kreisrunden, hellblauen, strukturierten Zellkern.

2.3.4 Lymphozyten

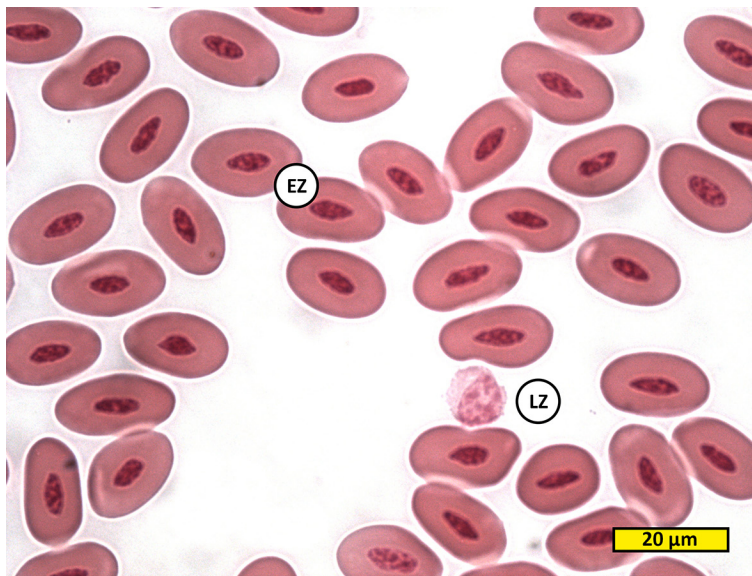
Lymphozyten sind annähernd runde Zellen mit einem zentral oder leicht exzentrisch gelegenen, runden, eingekerbten oder abgeflachten Zellkern mit hohem Nukleus/Zytoplasma-Verhältnis. Das Zytoplasma färbt sich basophil, der Kern aus unterschiedlich dicht gepacktem Chromatin, färbt sich leicht heller blau an. Die Form der Lymphozyten variiert stark, von klein und rundlich bis größer und unregelmäßig ausgebreitet. Oft sind granuläre Strukturen im Zytoplasma zu erkennen. Große Lymphozyten sind im Blutausstrich nur schwer von Monozyten zu unterscheiden. Die Größe der Lymphozyten beträgt $14,80 \pm 3,12 \mu\text{m}$ in Länge und $12,08 \pm 1,78 \mu\text{m}$ in Breite.

Am besten zur Darstellung der Lymphozyten ist die Diff-Quick Haema-Schnellfärbung und die nach Bitai modifizierte May-Grünwald-Färbung zu werten. Die Anfärbbarkeit der Strukturen ist unter den jeweiligen Abbildungen beschrieben.

Tabelle 38: Repräsentative Messungen Lymphozytengröße des Königspinguins

Messungen	Länge (μm)	Breite (μm)
1	16,06	9,55
2	15,93	11,45
3	11,92	10,39
4	23,99	13,40
5	11,63	11,63
6	11,92	11,23
7	13,11	11,25
8	15,94	13,48
9	14,82	14,82
10	11,64	11,64
11	13,11	11,25
12	15,94	13,48
13	15,91	14,65
14	16,25	9,03
15	13,91	13,91
Mittelwert	14,80	12,08
SD	3,12	1,78

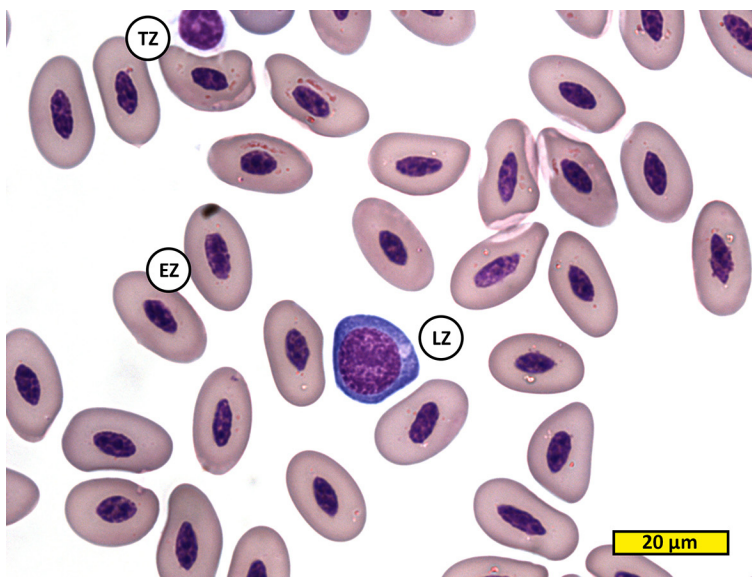
Abbildungen der Lymphozyten:



LZ Lymphozyt
EZ Erythrozyt

**Bild 36: Lymphozyt Alcianblau-Färbung bei pH1
Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, scale bar: 20µm**

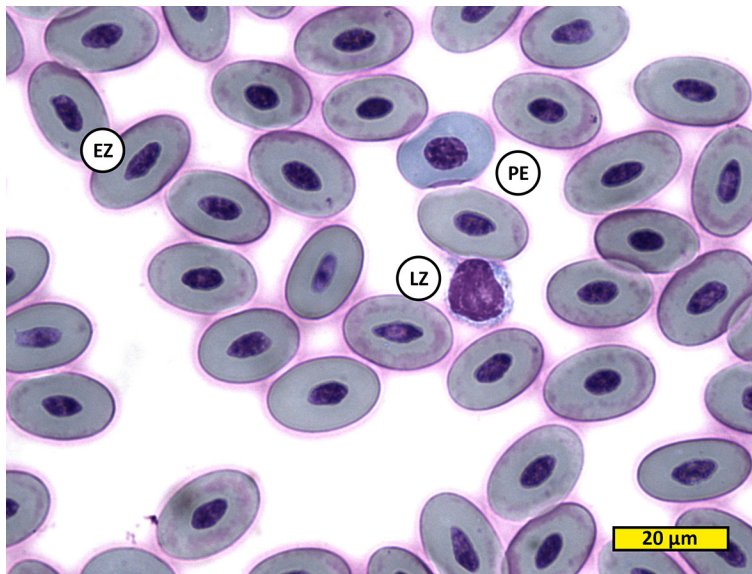
Der Lymphozyt in der Mitte weist wenig hellrosanes Zytoplasma und einen mäßig kondensierten, leicht dunkleren Kern auf. Der Kern ist dezentral und einseitig abgeflacht.



LZ Lymphozyt
EZ Erythrozyt
TZ Thrombozyt

**Bild 37: Lymphozyt Diff-Quick Haema-Schnellfärbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.10, scale bar: 20µm**

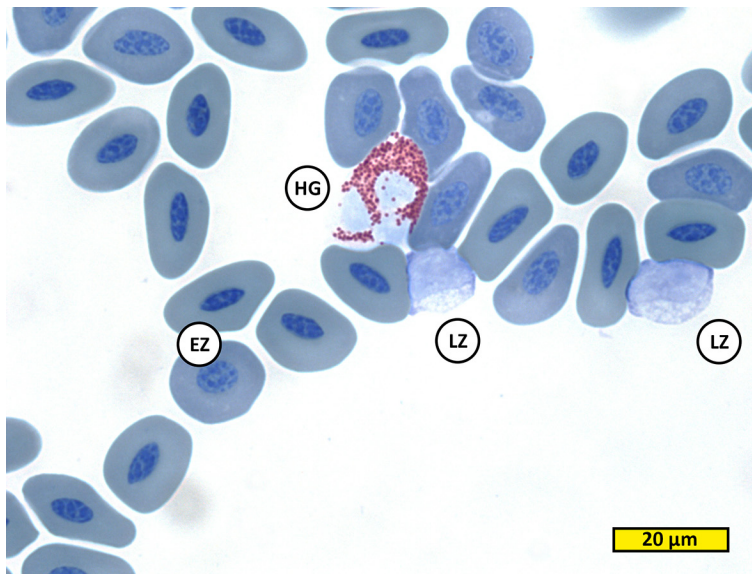
Diese als sehr großer Lymphozyt zu wertende Zelle hat einen violetten großen Kern und tiefblaues Zytoplasma. Im Zytoplasma ist eine hellere runde Stelle auszumachen. Der Kern ist dicht kondensiert und zeigt grobkörnige Struktur. Das Zytoplasma der Erythrozyten ist hellviolett angefärbt und zeigt kleine rote, granuläre Einschlüsse. Der Zellkern ist violett.



- LZ Lymphozyt
- EZ Erythrozyt
- PE Proerythrozyt

Bild 38: Lymphozyt Giemsa-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.8, scale bar: 20µm

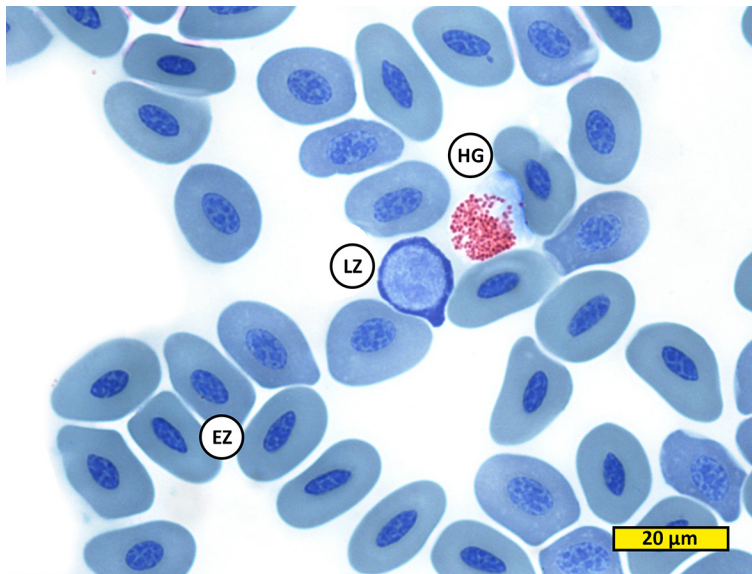
Bei diesem Lymphozyt nimmt der Kern fast das ganze Zellvolumen ein. Das Zytoplasma zeigt sich hellblau, der Zellkern violett. Im Zytoplasma der Erythrozyten ist ein leichter Farbausfall als Färbeartefakt zu erkennen.



- LZ Lymphozyt
- EZ Erythrozyt
- HG Heterophiler Granulozyt

Bild 39: Lymphozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai
Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 20µm

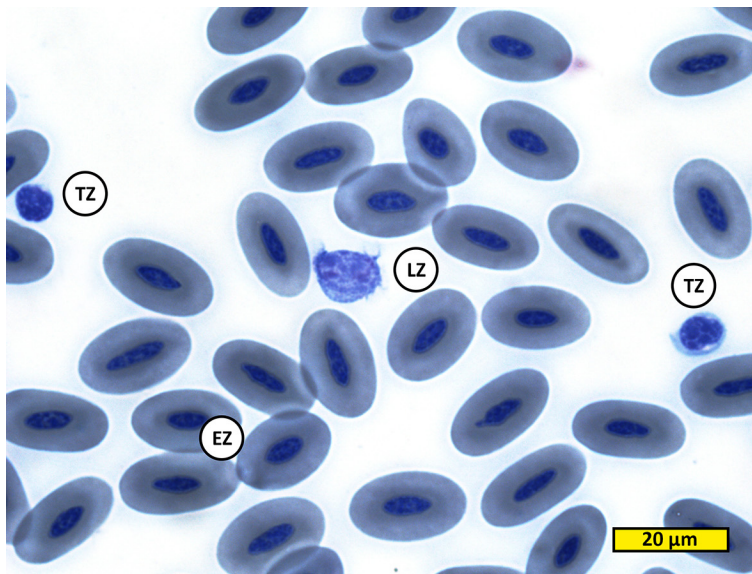
Der Zellkern der Lymphozyten stellt sich in der nach Bitai modifizierten Färbung blau bis leicht violett dar. Das Zytoplasma ist hellblau.



- LZ Lymphozyt
- EZ Erythrozyt
- HG Heterophiler Granulozyt

Bild 40: Lymphozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20µm

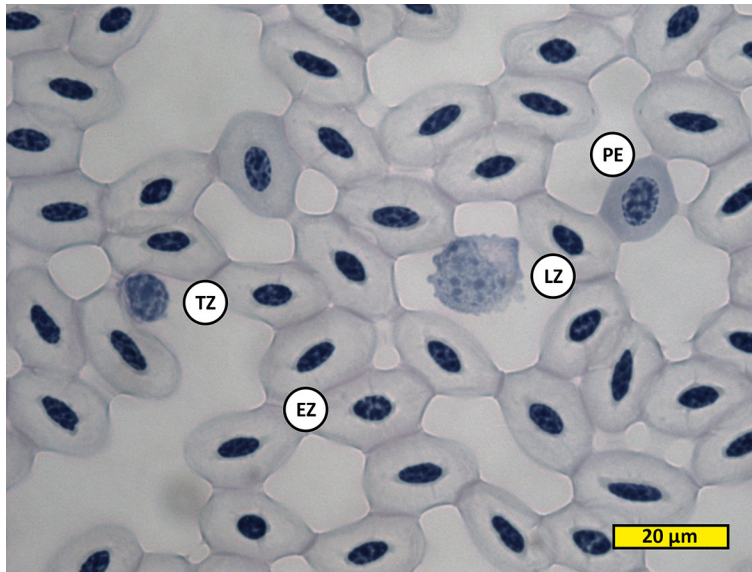
Bei diesem großen Lymphozyten füllt der kreisrunde Zellkern beinahe das gesamte Zellvolumen aus. Das Zytoplasma ist deutlich dunkler blau angefärbt.



- LZ Lymphozyt
- EZ Erythrozyt
- TZ Thrombozyt

Bild 41: Lymphozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 20µm

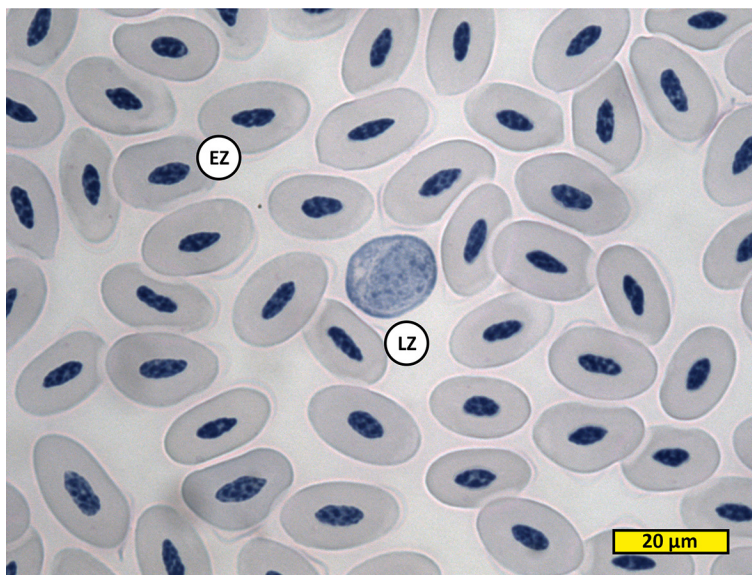
Der Lymphozyt mit dem dezentralen, einseitig abgeflachten Zellkern in blau bis leicht violett bildet hier zytoplasmatische, hellblaue Zellausläufer, sog. Pseudopodien aus.



- LZ Lymphozyt
- EZ Erythrozyt
- PE Proerythrozyt
- TZ Thrombozyt

Bild 42: Lymphozyt PAS methyliert Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.10, scale bar: 20μm

Im großen dezentralen Zellkern des Lymphozyten sind dunkle blaue Strukturen im ansonsten graublauen Kernplasma zu erkennen. Das Zytoplasma färbt sich heller an und bildet Zellfortsätze aus.



- LZ Lymphozyt
- EZ Erythrozyt

Bild 43: Lymphozyt Toluidinblau-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, scale bar: 20μm

Im Zellkern des großen Lymphozyten sind granuläre, dunkelblaue Strukturen auszumachen. Das Zytoplasma ist nur geringfügig heller als der Kern und weist einen dunkleren peripheren Ring auf. Unterschiedlich helle Strukturen sind im Zellplasma erkennbar.

2.3.5 Monozyten

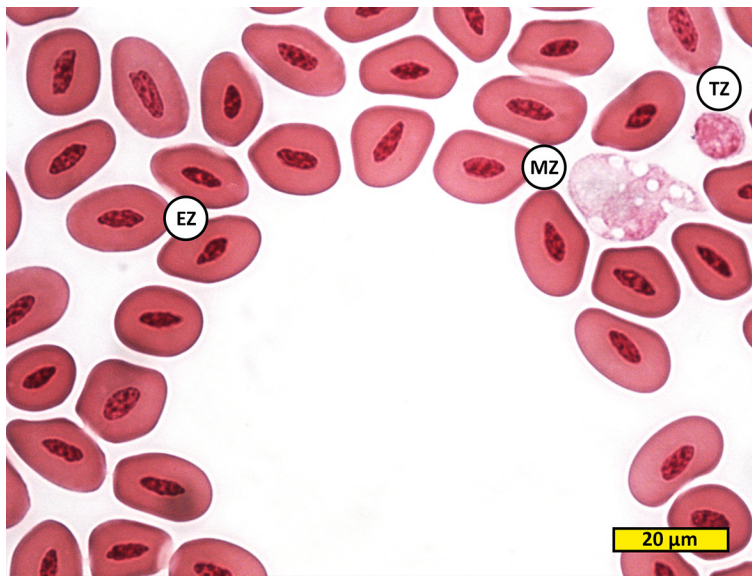
Monozyten sind unregelmäßig, annähernd oval bis gestreckt oder anders ausgebreitete Zellen mit blassem oder dunklem, aus mäßig dicht gepacktem Chromatin bestehenden, ebenfalls sehr formvariablen Kern. Das Zytoplasma erscheint aufgrund zahlreicher Vakuolen bei Aktivierung regelrecht schaumig. Die Zelloberfläche ist nicht glatt und bildet häufig Pseudopodien aus. Die Größe der Monozyten beträgt $20,72 \pm 3,61 \mu\text{m}$ in Länge und $15,67 \pm 3,90 \mu\text{m}$ in Breite. Selten sind Monozyten von ca. $30 \mu\text{m}$ Länge zu finden.

Am besten zur Darstellung der Monozyten ist die Diff-Quick Färbung zu werten. Die Anfärbbarkeit des Zytoplasma, des Kerns, der Membran und der restlichen Zellstrukturen ist im Folgenden beschrieben.

Tabelle 39: Repräsentative Messungen der Monozytengröße des Königspingvins

Messungen	Länge (μm)	Breite (μm)
1	18,61	12,83
2	25,10	14,49
3	22,59	16,89
4	15,28	18,40
5	26,02	19,78
6	26,46	17,41
7	21,65	10,69
8	25,23	14,14
9	18,30	13,72
10	19,82	16,25
11	17,55	17,55
12	17,55	17,55
13	15,38	15,38
14	20,83	9,51
15	19,67	18,55
16	21,51	17,58
Mittelwert	20,72	15,67
SD	3,61	2,90

Abbildungen der Monozyten:



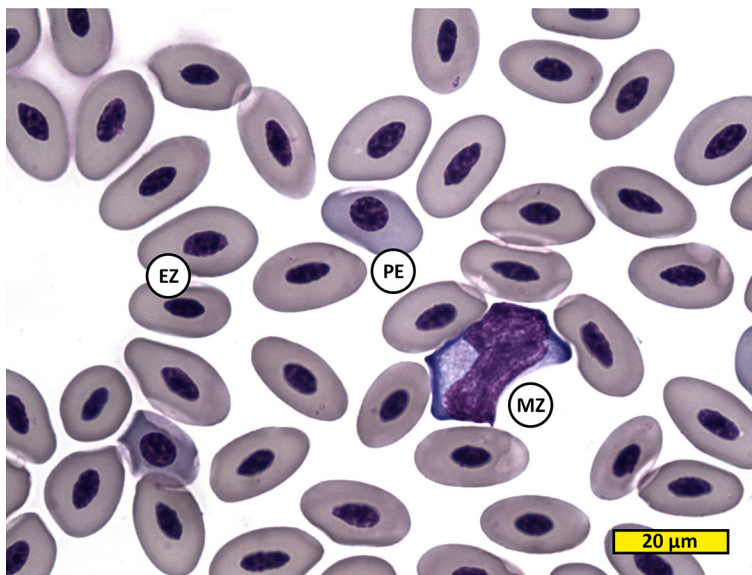
MZ Monozyt

EZ Erythrozyt

TZ Thrombozyt

**Bild 44: Monozyt Alcianblau-Färbung bei pH2,5
Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, scale bar: 20µm**

Sowohl der dunkler rosa angefärbte Kern als auch das hellrosane Zytoplasma zeigen die für Monozyten typischen Vakuolen. Die Zelle ist unregelmäßig ausgebreitet und bildet Zellfortsätze aus.



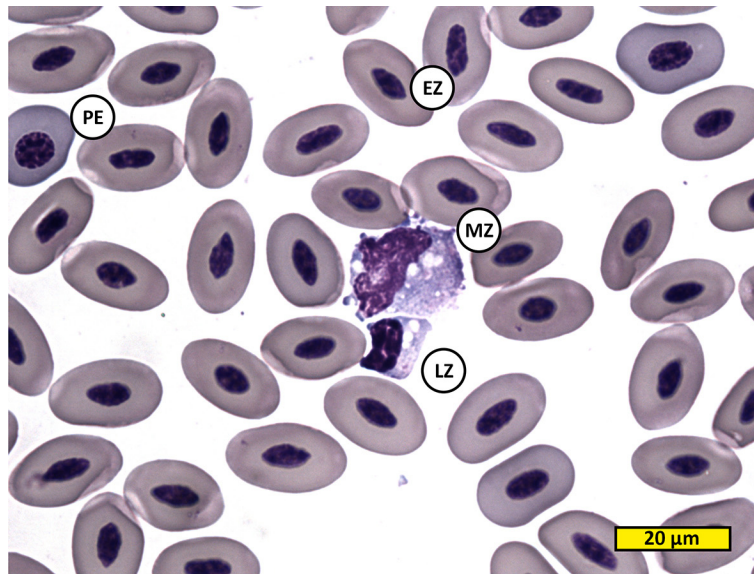
MZ Monozyt

EZ Erythrozyt

PE Proerythrozyt

**Bild 45: Monozyt Diff-Quick Haema-Schnellfärbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.10, scale bar: 20µm**

In der besonders gut zur Darstellung von Monozyten geeigneten Diff-Quick Färbung nimmt der Zellkern eine dunkelviolette Farbe an, in deutlichem Kontrast zum blauen Zytoplasma. Das Zytoplasma zeigt ein dunkelblaues, peripheres Randareal.



MZ Monozyt

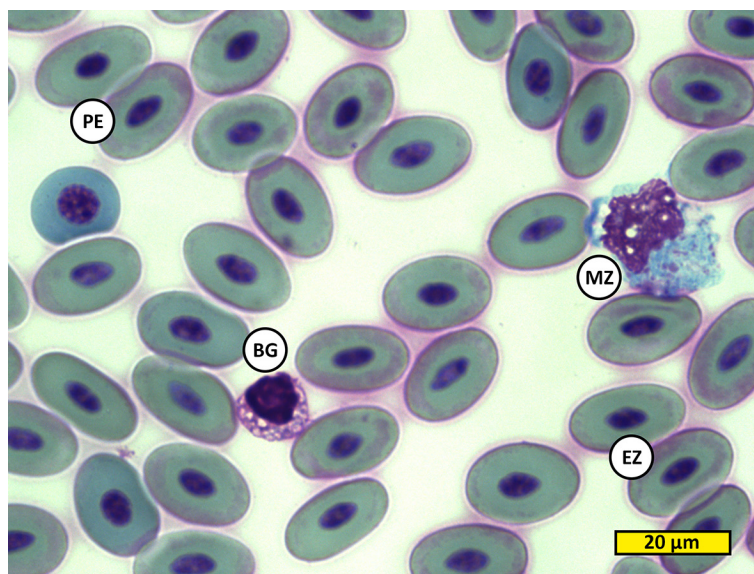
EZ Erythrozyt

PE Proerythrozyt

LZ Lymphozyt

Bild 46: Monozyt Diff-Quick Haema-Schnellfärbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.10, scale bar: 20µm

Nochmals ein in Diff-Quick gefärbter Monozyt neben einem Lymphozyt. Die Zellkerne färben sich unterschiedlich violett an. Das Zytoplasma des Monozyten wirkt leicht eosinophiler als das des Lymphozyten. In beiden sind Vakuolen zu sehen. Der Monozyt hat deutliche Pseudopodien ausgebildet.



MZ Monozyt

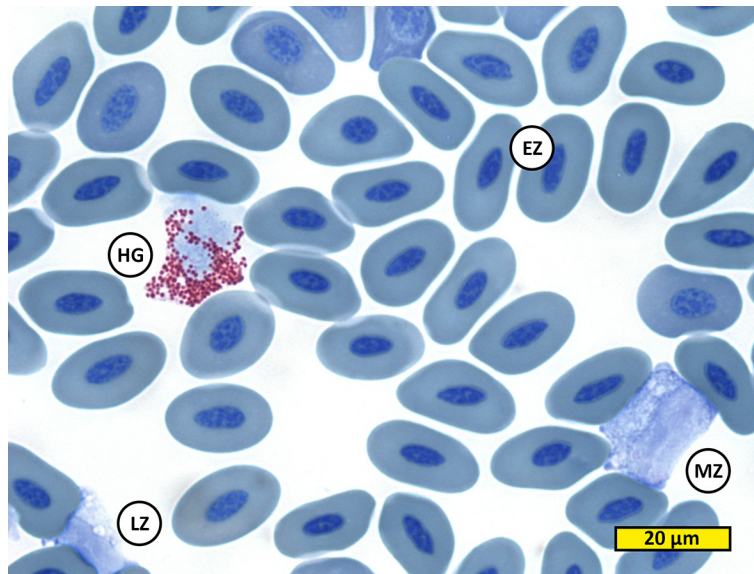
EZ Erythrozyt

PE Proerythrozyt

BG Basophiler
Granulozyt

Bild 47: Monozyt Giemsa-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.8, scale bar: 20µm

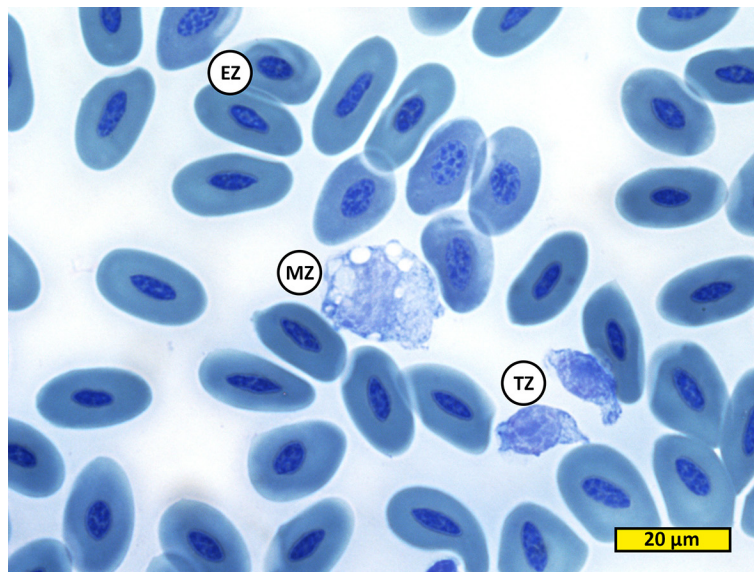
In dieser Färbung zeigt sich das Zytoplasma des Monozyten hellblau mit violetten granulären Einschlüssen. Die typischen Vakuolen sowie zytoplasmatische Zellfortsätze sind ebenfalls zu erkennen. Links ein basophiler Granulozyt mit violetterm Zellplasma und entspeicherten Granula sowie ein gut am blauerem Zellplasma erkennbarer Proerythrozyt.



- MZ Monozyt
- EZ Erythrozyt
- LZ Lymphozyt
- HG Heterophiler Granulozyt

Bild 48: Monozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 20µm

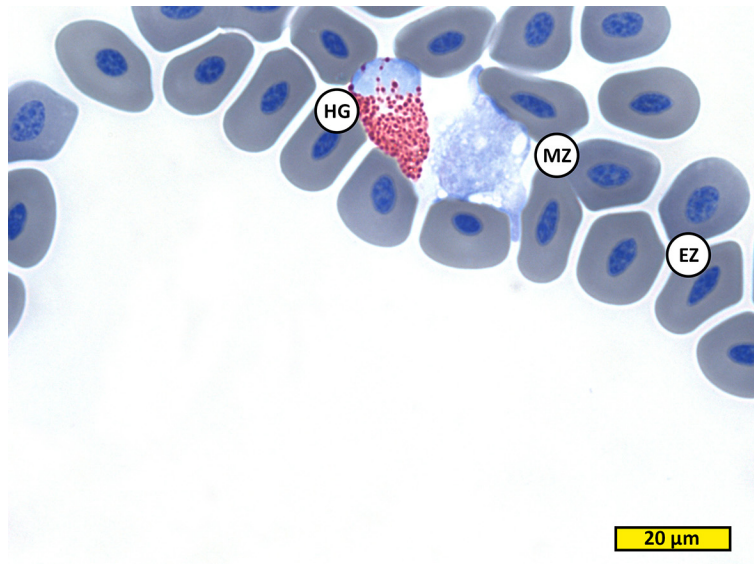
Der unregelmäßig ausgebreitete Monozyt zeigt leicht heller angefärbtes Zytoplasma als den dunkleren Kern. Im Zytoplasma sind helle Strukturen auszumachen.



- MZ Monozyt
- EZ Erythrozyt
- TZ Thrombozyt

Bild 49: Monozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 20µm

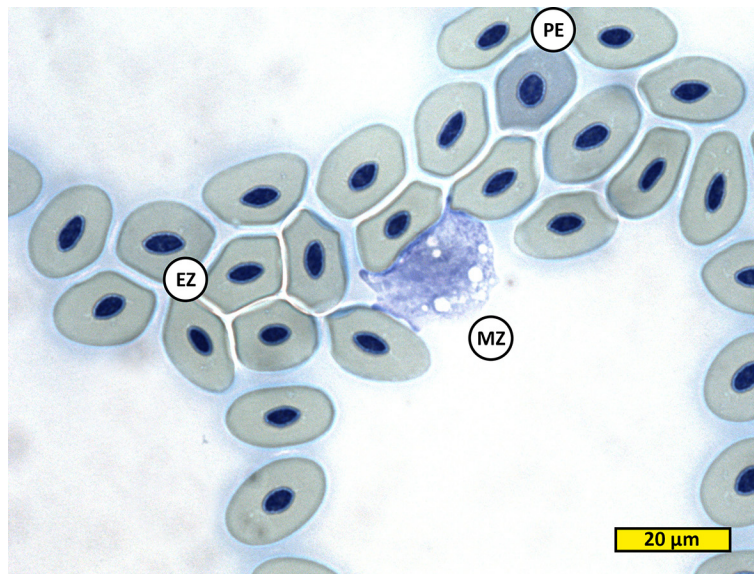
Der Kern des Monozyten färbt sich unterscheidbar in dunklerem blau an, als das hellere Zytoplasma. Die raue Zelloberfläche und die Vakuolen verleihen ihm das typische Aussehen. Daneben sind Thrombozyten, beim Vogel auch Spindelzellen genannt, zu erkennen.



MZ Monozyt
 EZ Erythrozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt

**Bild 50: Monozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai
 Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 20μm**

Der Monozyt zeigt deutliche Pseudopodien und Vakuolen. Der Kern ist dunkler blau als das Zytoplasma.



MZ Monozyt
 EZ Erythrozyt
 PE Proerythrozyt

**Bild 51: Monozyt Toluidin-Färbung
 Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20μm**

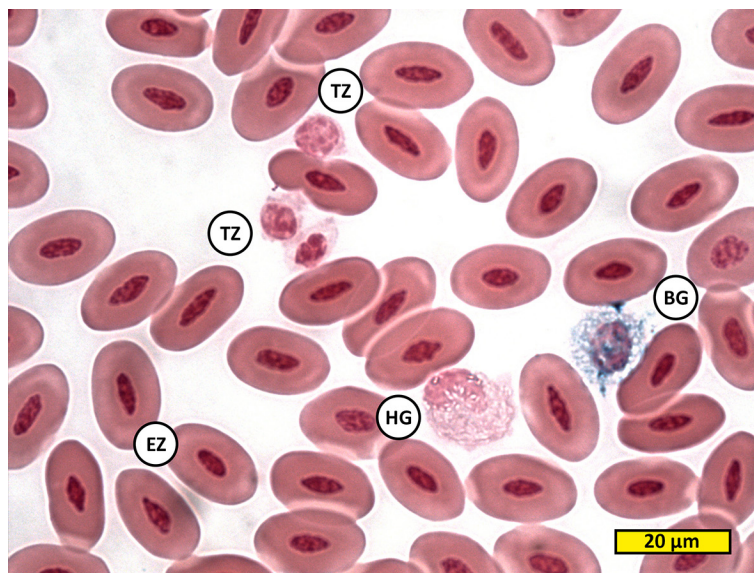
Der leicht violette Zellkern und das blaue Zytoplasma des Monozyten weisen Vakuolen und granuläre Einschlüsse auf.

2.4 Verschiedene Zelltypen zum Vergleich

Im Folgenden Kapitel sind nun verschiedene Zellgruppen in verschiedenen Färbungen zum direkten Vergleich sowohl der Zelltypen als auch der Färbemethoden abgebildet.

Es gibt bislang keine Färbung die zur sicheren Identifikation aller Zelltypen gleich gut geeignet ist. Meist müssen die Zellen allein anhand der Kerne unterschieden werden, oder das Augenmerk muss auf einen bestimmten Zelltyp gelegt werden. Mit der Modifikation der May-Grünwald-Färbung nach Bitai ist hier das Schließen einer Lücke gelungen, da diese neue Färbevariante es erlaubt, zumindest das Gros der Zellen bereits in einer kursorischen Übersicht, auch bei kleiner Vergrößerung, klar zu identifizieren.

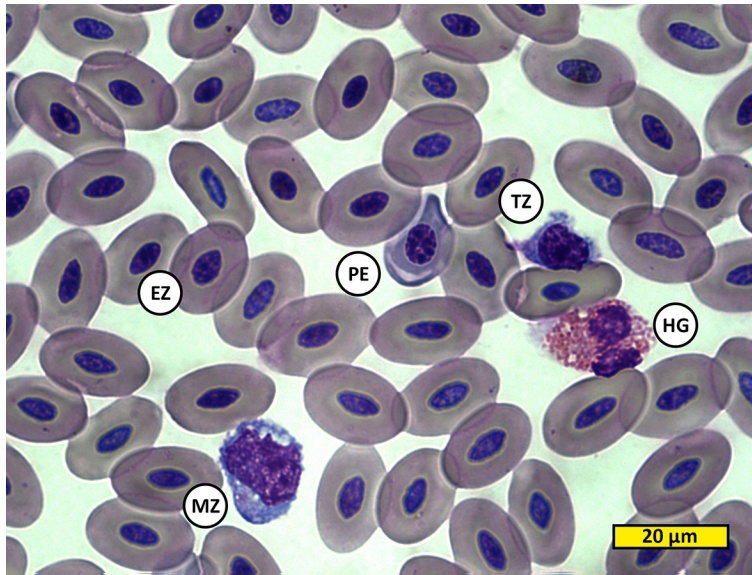
Abbildungen:



- EZ Erythrozyt
- TZ Thrombozyt
- HG Heterophiler
Granulozyt
- BG Basophiler
Granulozyt

Bild 52: Alcianblau-Färbung bei pH1
Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, scale bar: 20μm

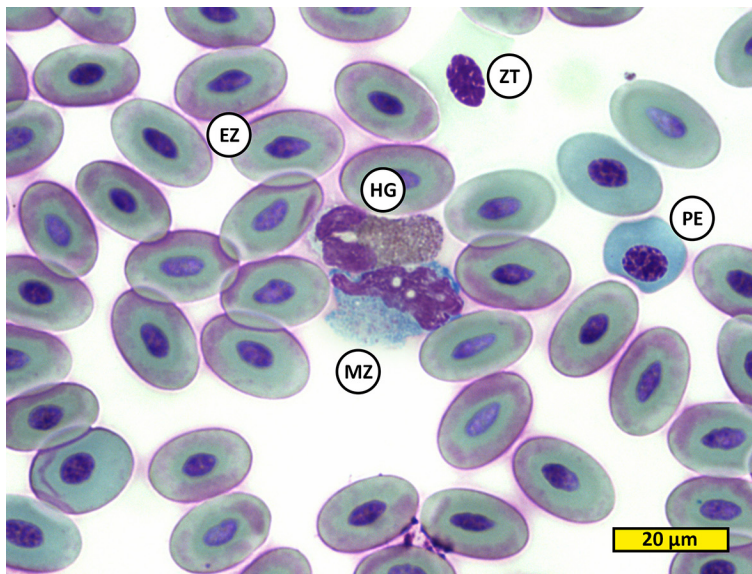
Das blauangefärbte Zytoplasma zeigt die nichtangefärbten Granula des basophilen Granulozyten um den rosanen Zellkern. Die Granula des heterophilen Granulozyten sind ebenfalls nicht angefärbt und zeigen sich als Aussparungen im ansonsten rosa gefärbten Zytoplasma um einen dunkler rosa gefärbten Kern. Die Thrombozyten zeigen fast kein Zytoplasma und mäßig kondensierte, strukturierte Kerne.



- EZ Erythrozyt
- PE Proerythrozyt
- TZ Thrombozyt
- MZ Monozyt
- HG Heterophiler
Granulozyt

Bild 53: Diff-Quick Haema-Schnellfärbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.10, scale bar: 20µm

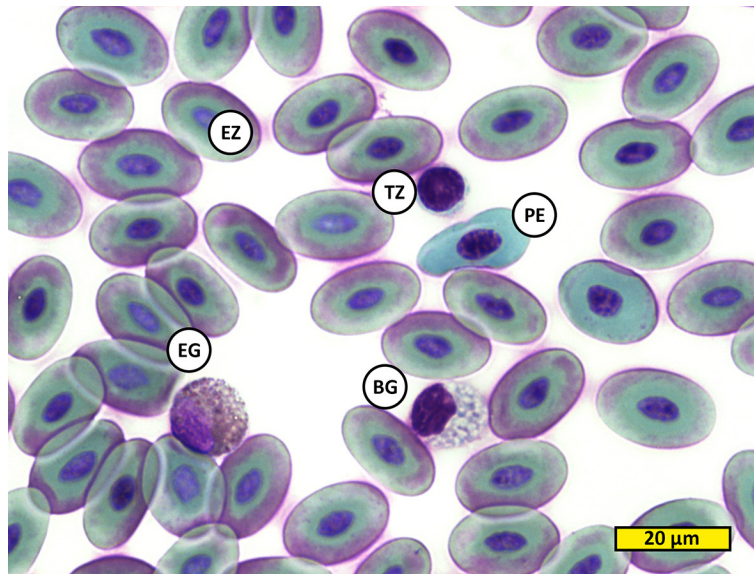
Die Diff-Quick Methode bietet eine bessere Übersicht hinsichtlich der Zelltypen. Die Granula und das Zytoplasma des Heterophilen sind angefärbt, Monozyt, Thrombozyt und Erythrozyten, auch in unreifen Stadien, sind deutlich auseinanderzuhalten.



- EZ Erythrozyt
- PE Proerythrozyt
- MZ Monozyt
- HG Heterophiler
Granulozyt
- ZT Zelltrümmer

Bild 54: Giemsa-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.8, scale bar: 20µm

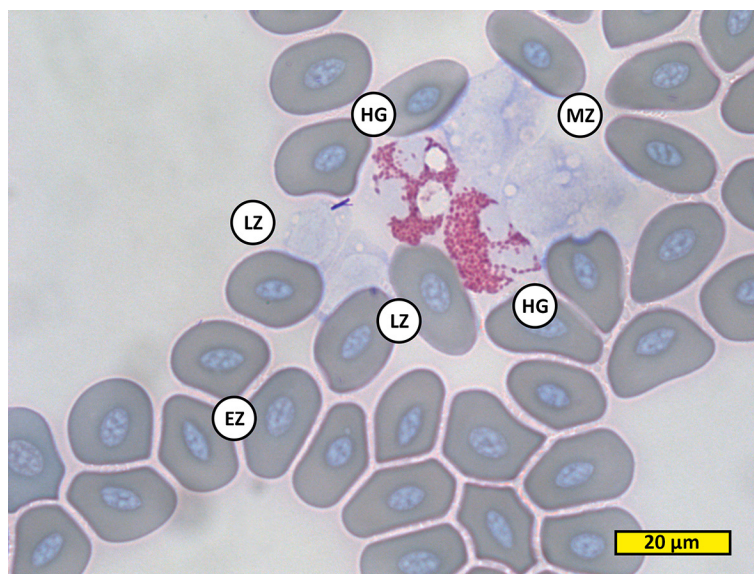
In der Giemsa-Färbung zeigen sich die heterophilen Granulozyten rötlich braun angefärbt. Das Zytoplasma des Monozyten und Proerythrozyten zeigt eine deutliche Hellblaufärbung. Die Zellkerne aller Zellen sind violett.



- EZ Erythrozyt
- PE Proerythrozyt
- TZ Thrombozyt
- BG Basophiler Granulozyt
- EG Eosinophiler Granulozyt

Bild 55: Giemsa-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.8, scale bar: 20µm

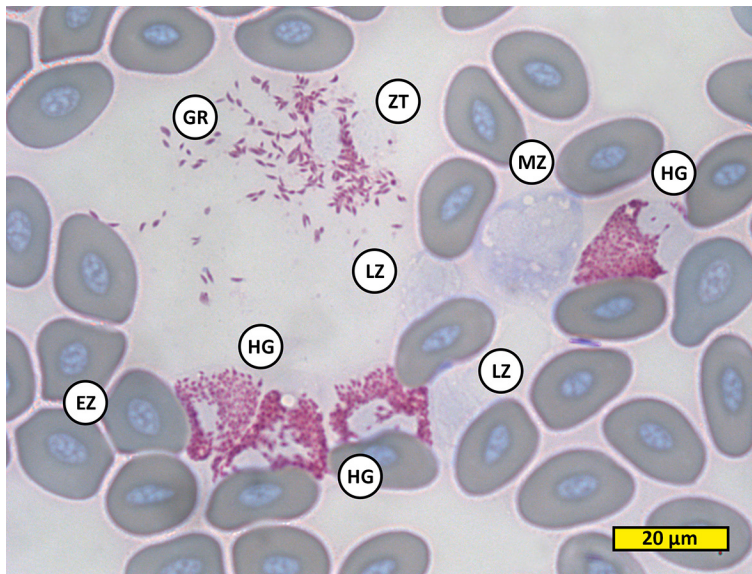
Die eosinophilen Granulozyten zeigen sich rötlich braun angefärbt. Das hellblaue Zytoplasma des entspeicherten Basophilen zeigt die entfärbten Granula als vakuolige Strukturen. Auch das Zytoplasma des unreifen Erythrozyten sowie des Thrombozyten erscheinen in hellem Blau.



- EZ Erythrozyt
- MZ Monozyt
- LZ Lymphozyt
- HG Heterophiler Granulozyt

Bild 56: May-Grünwald-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20µm

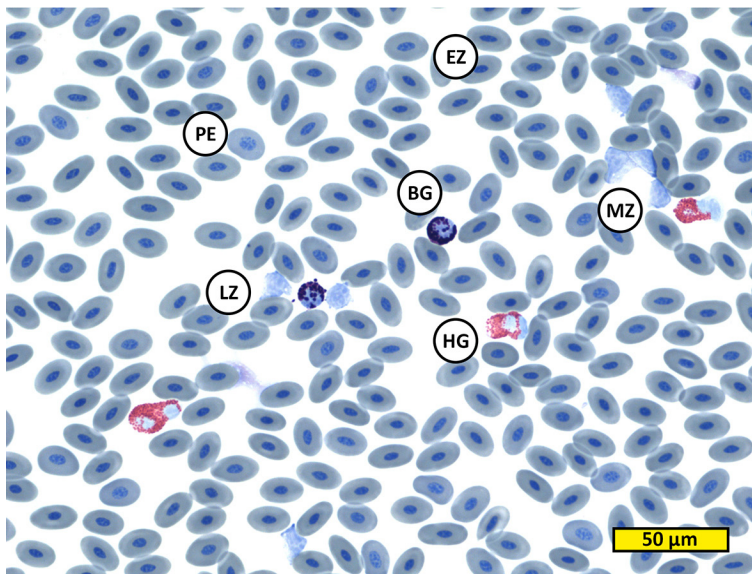
Die blauschwarzen Monozyten sind anhand der Größe und der typisch schaumigen Optik zu erkennen. Die kleineren Lymphozyten sind noch heller blau angefärbt. Die heterophilen Granulozyten sind deutlich an pink und rosa angefärbten Granula und den hellblauen Zellkernen zu erkennen. Auch hier sind Vakuolen auszumachen.



- EZ Erythrozyt
- MZ Monozyt
- LZ Lymphozyt
- HG Heterophiler Granulozyt
- GR Granula, frei
- ZT Zelltrümmer

Bild 57: May-Grünwald-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20µm

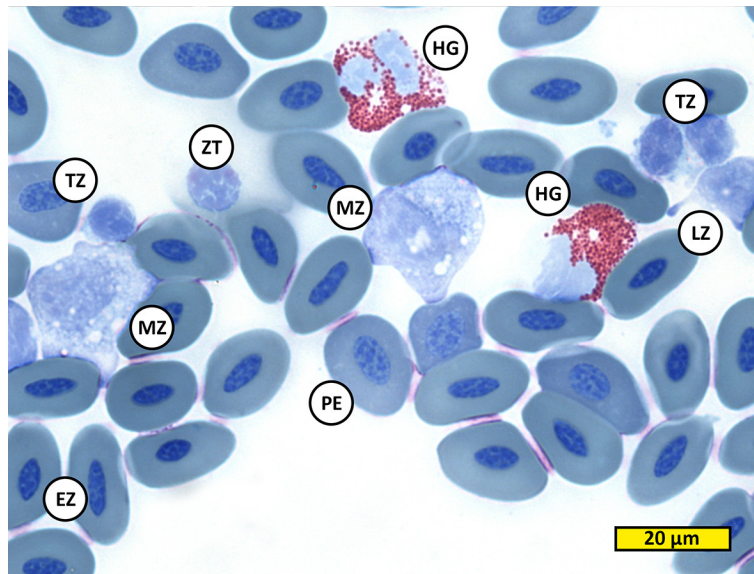
Zerstörter heterophiler Granulozyt. Deutlich erkennbar die freigewordenen, lanzettförmigen Granula.



- EZ Erythrozyt
- PE Proerythrozyt
- MZ Monozyt
- LZ Lymphozyt
- HG Heterophiler Granulozyt
- BG Basophiler Granulozyt

Bild 58: May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai
Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 50µm

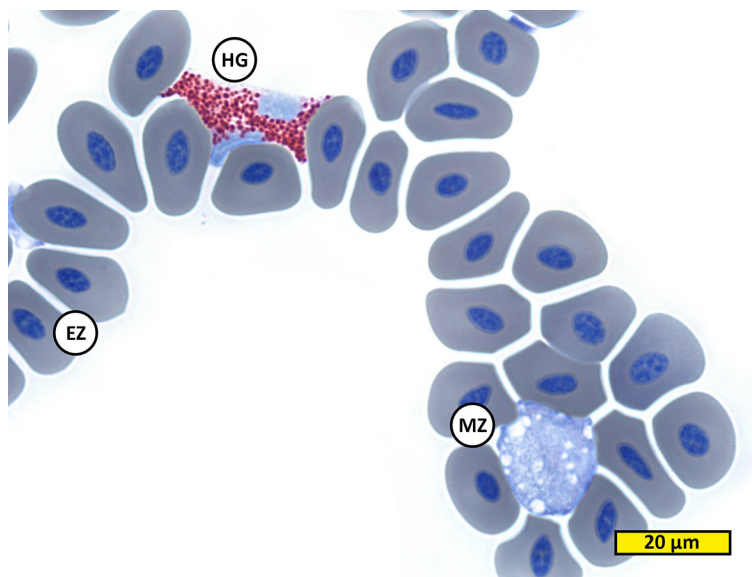
Selbst in kleiner Vergrößerung sind bei der nach Bitai modifizierten Färbevariante die Zelltypen zu differenzieren.



- EZ Erythrozyt
- PE Proerythrozyt
- MZ Monozyt
- LZ Lymphozyt
- TZ Thrombozyt
- HG Heterophiler Granulozyt
- ZT Zelltrümmer

**Bild 59: May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai
Blutausstrich, Königspinguin N.16, scale bar: 20µm**

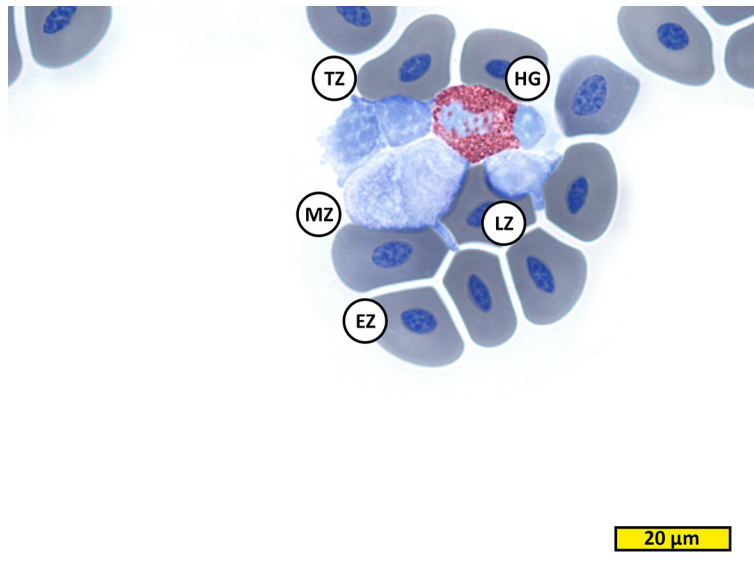
Monozyten, Thrombozyten und Lymphozyten sind anhand ihrer Größe und Kernfärbung zu differenzieren. Die unterschiedlich kondensierten Erythrozytenkerne sind klar zu erkennen. Die heterophilen Granulozyten zeigen zwischen den heterophil angefärbten Granula kleine Vakuolen im Zytoplasma.



- EZ Erythrozyt
- MZ Monozyt
- HG Heterophiler Granulozyt

**Bild 60: May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai
Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 20µm**

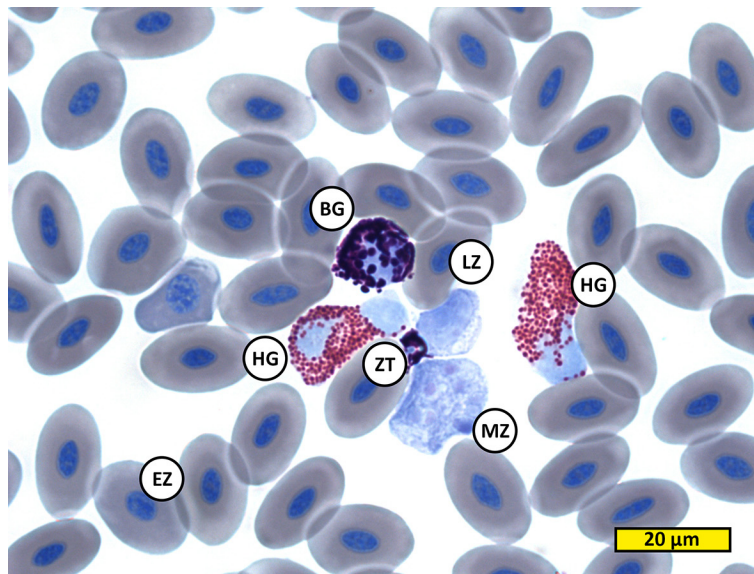
Ein Beispiel für die Formvariabilität der heterophilen Granulozyten.



- EZ Erythrozyt
- MZ Monozyt
- LZ Lymphozyt
- TZ Thrombozyt
- HG Heterophiler Granulozyt

**Bild 61: May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai
Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, scale bar: 20µm**

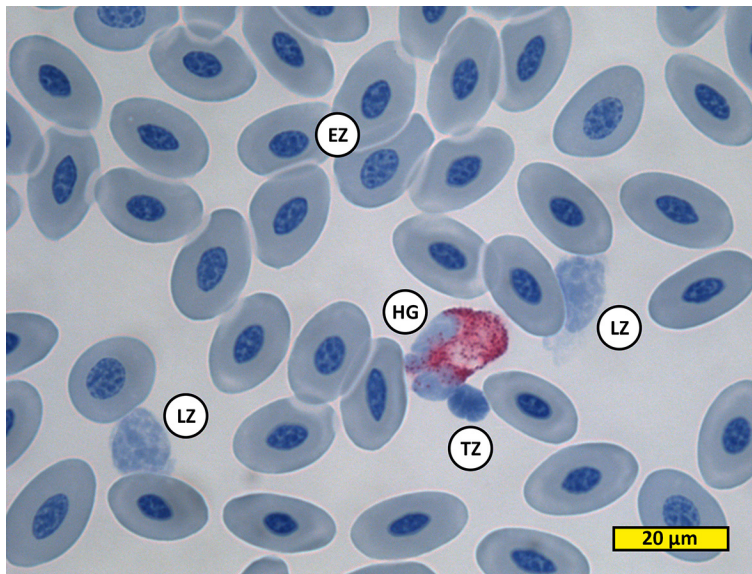
In Blauabstufungen gut zu erkennende Feinstruktur in Zellkernen und Zytoplasma des Monozyten, der Thrombozyten und des Lymphozyten.



- EZ Erythrozyt
- MZ Monozyt
- LZ Lymphozyt
- HG Heterophiler Granulozyt
- BG Basophiler Granulozyt
- ZT Zelltrümmer

**Bild 62: May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai
Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20µm**

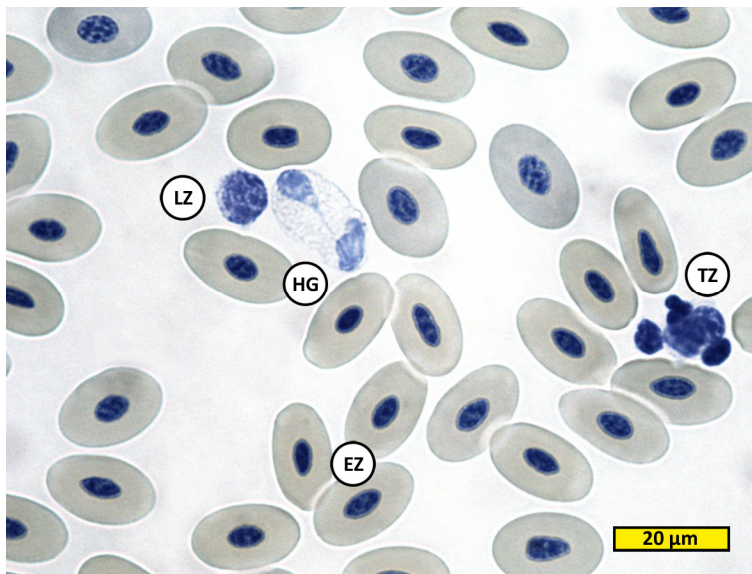
Gute Differenzierbarkeit der einzelnen Zelltypen. In den basophilen Granula ist angefärbte Struktur, von violett bis hellviolett, zu erkennen.



- EZ Erythrozyt
- LZ Lymphozyt
- TZ Thombozyt
- HG Heterophiler Granulozyt

Bild 63: Sirius Red Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20μm

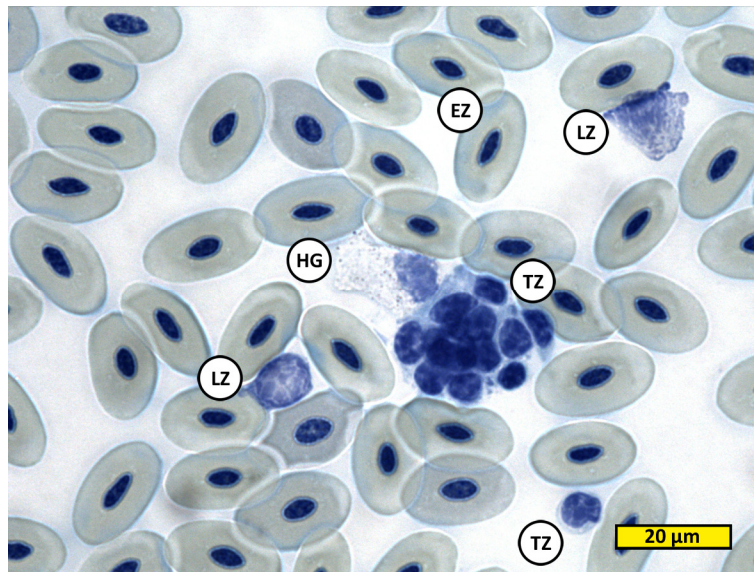
Heterophiler Granulozyt neben Thombozyt. Lymphozyten sind anhand ihres locker kondensierten Kerns und der Form und Größe zu identifizieren.



- EZ Erythrozyt
- LZ Lymphozyt
- TZ Thombozyt
- HG Heterophiler Granulozyt

Bild 64: Toluidinblau-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20μm

In der Toluidinblau-Färbung zeigen sich die Granula des Heterophilen als Aussparungen im ansonsten hellblauen Zytoplasma. Die Zellkerne der Thombozyten sind deutlich dunkler blau angefärbt, als die der Lymphozyten.



EZ Erythrozyt
LZ Lymphozyt
TZ Thrombozyt
HG Heterophiler
Granulozyt

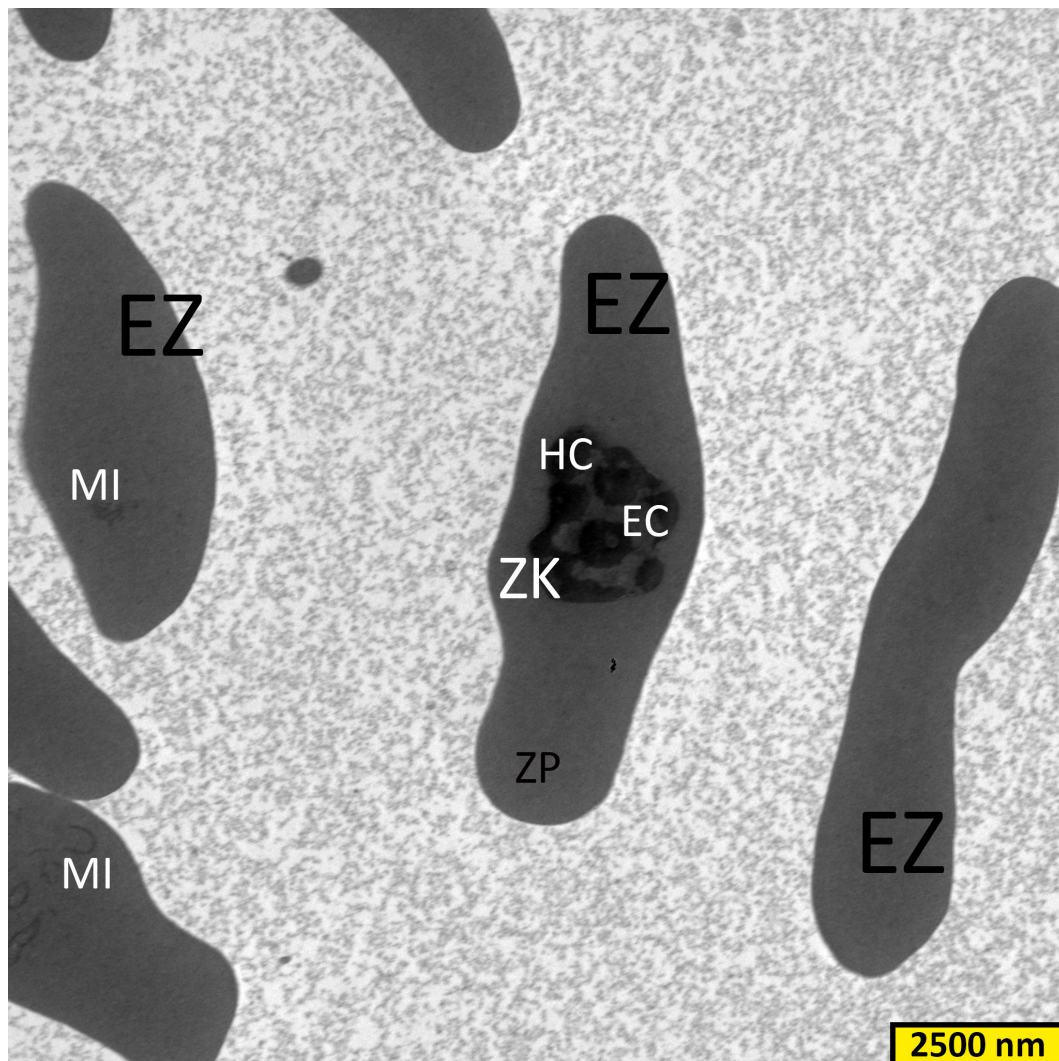
Bild 65: Toluidinblau-Färbung
Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, scale bar: 20μm

Im Zytoplasma des Heterophilen sind zwischen den Granula basophile granuläre Einschlüsse zu erkennen. Thrombozyten liegen größtenteils aggregiert vor.

3. Elektronenmikroskopische Ergebnisse

Die Ultrastruktur der Blutzellen des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Im Folgenden sind die Abbildungen der einzelnen Zellen dargestellt und mit Beschreibungen versehen. Die Zellstrukturen wurden ebenfalls jeweils unter den Abbildungen bezeichnet.

3.1 Erythrozyten



EZ Erythrozyt
MI Mitochondrium

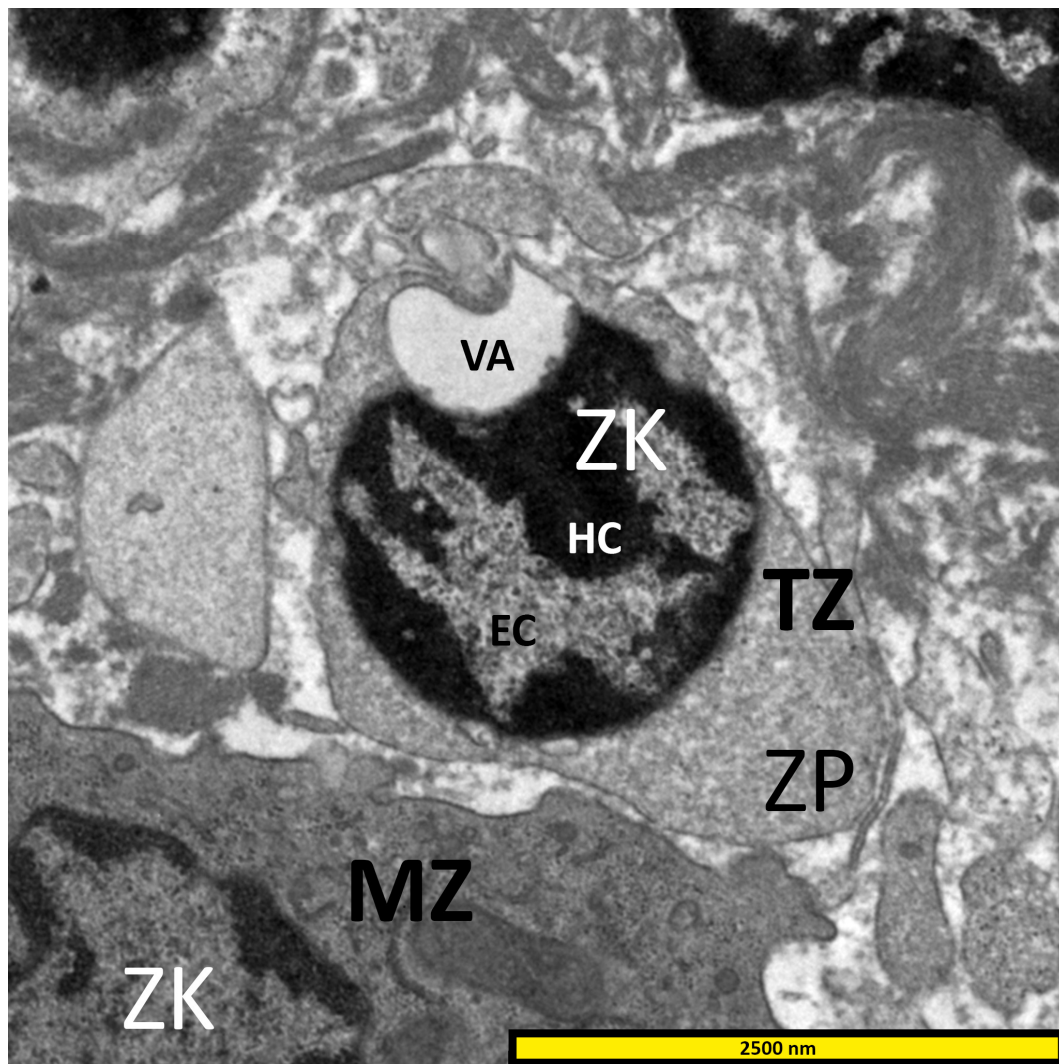
ZK Zellkern
ZP Zytoplasma

HC Heterochromatin
EC Euchromatin

Bild 66: EM-Aufnahme Erythrozyten, Blut, Königspinguin, scale bar: 2500nm

Ein reifer Erythrozyt stellt sich als längliche Zelle mit einem zentral gelegenen heterochromatischen Kern dar. Die Erythrozyten des Königspinguins sind ca. 20µm lang und 10µm breit. Vereinzelt sind im ansonsten homogenen Zytoplasma Anschnitte von Mitochondrien zu erkennen. Diese sind meist in der Nähe des Zellkerns zu finden.

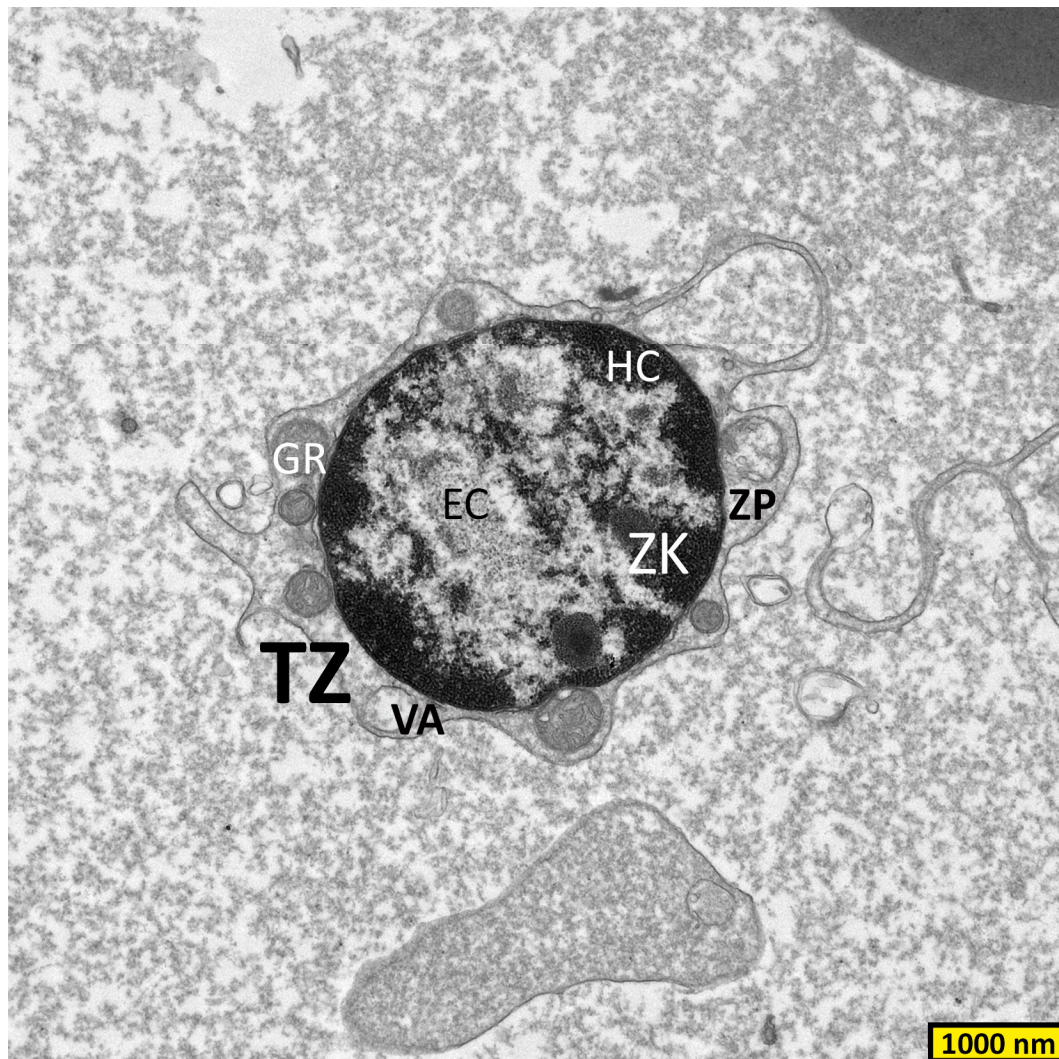
3.2 Thrombozyten



ZK Zellkern	TZ Thrombozyt	EC Euchromatin
ZP Zytoplasma	VA Vakuole	HC Heterochromatin
MZ Monozyt		

Bild 67: EM-Aufnahme Thrombozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 2500nm

Der Thrombozyt des Königspinguins ist eine ca. 6µm große, rundliche Zelle, deren heterochromatischer Zellkern fast das gesamte Zellvolumen ausfüllt. Der Nukleus weist außerdem euchromatische Bereiche auf. Im Zytoplasma ist eine große Vakuole auszumachen. Das restliche sichtbare Zytoplasma ist geringfügig elektronendurchlässiger als die hellen Teile des Nukleus.



TZ	Thrombozyt	ZK	Zellkern	HC	Heterochromatin
ZP	Zytoplasma	VA	Vakuole	EC	Euchromatin
GR	Granuläre Einschlüsse				

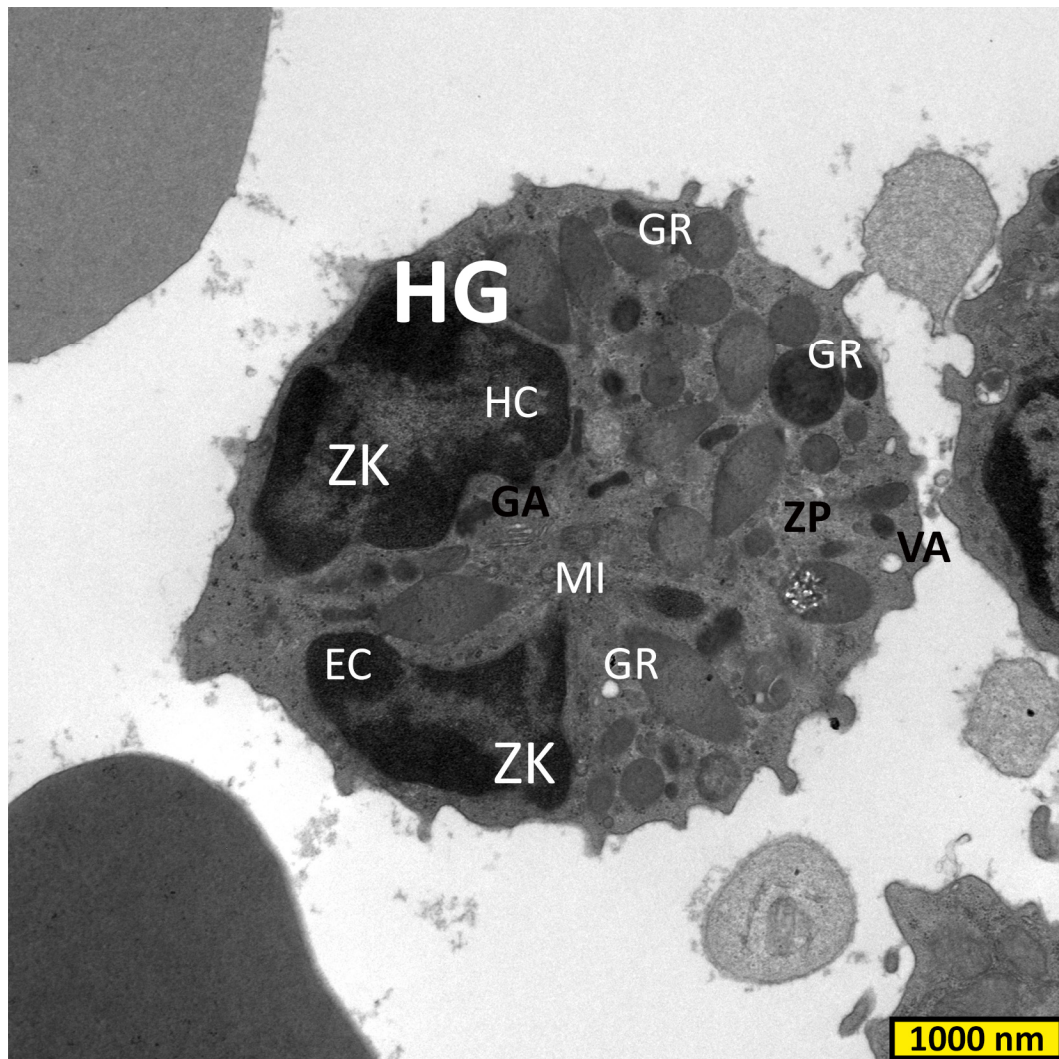
Bild 68: EM-Aufnahme Thrombozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 1000nm

Aktivierter Thrombozyt. Der Zellkern weist einen peripheren Randbereich aus Heterochromatin um ein vorwiegend euchromatisches Zentrum auf. Im Zytoplasma ist deutliche „Schleifenbildung“ zu erkennen. Große Vakuolen und granuläre, elektronendichte Einschlüsse sind im Zytoplasma zu erkennen.

3.3 Leukozyten

Die Leukozyten des Königspinguins stellen sich unter dem Transmissionselektronenmikroskop als unregelmäßige Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern und rauher Zelloberfläche dar. Verschiedene Zellorganellen können im Zytoplasma ausgemacht werden. Granula weisen verschiedene Längen und Größen auf und unterscheiden sich in Elektronendichte, Form und Häufigkeit. Manche Granula zeigen ein Zentralareal von geringerer oder stärkerer Elektronendichte. Die Zellkerne sind stark segmentiert und multilobulär.

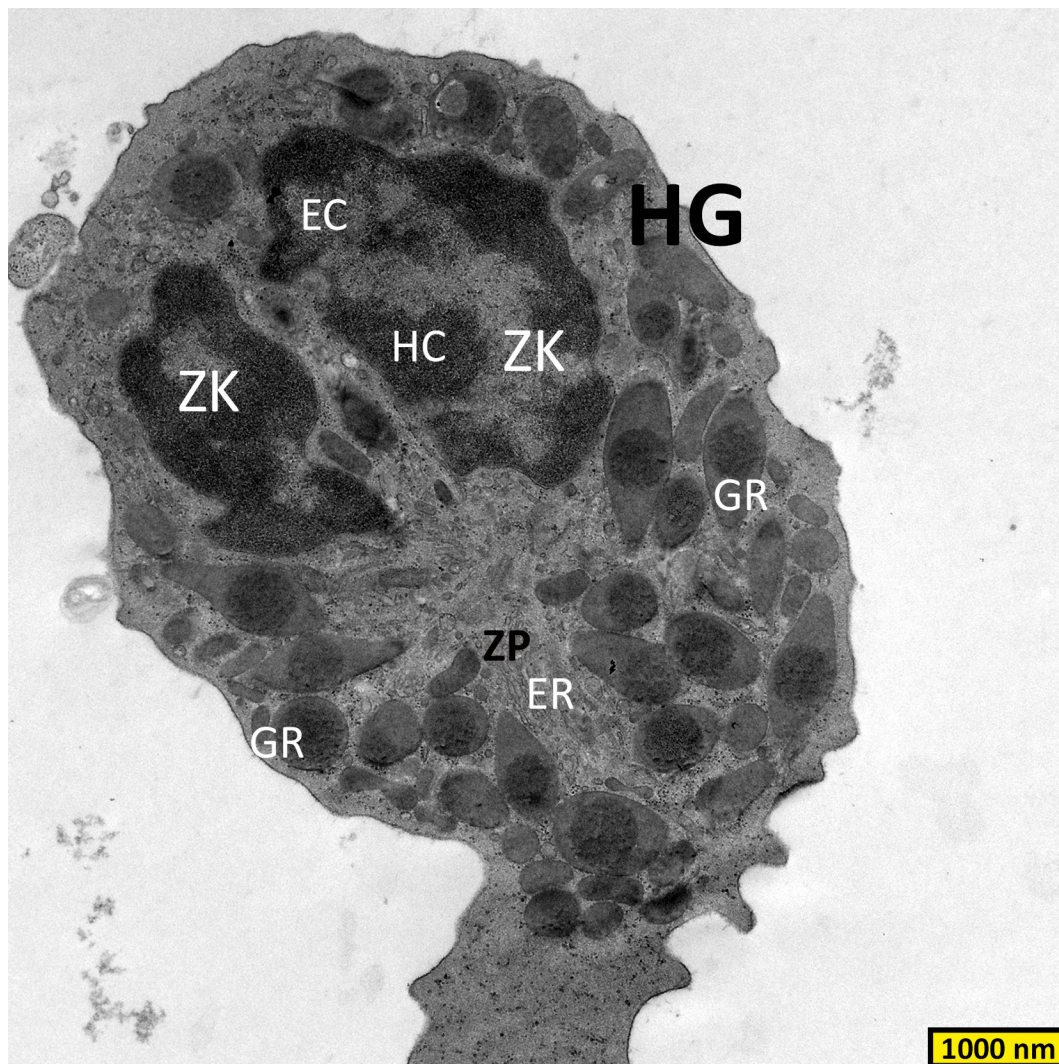
3.3.1 Heterophile Granulozyten



HG Heterophiler Granulozyt	ZK Zellkern	HC Heterochromatin
GA Golgi Apparat	ZP Zytoplasma	EC Euchromatin
VA Vakuole	GR Granula	

Bild 69: EM-Aufnahme Heterophiler Granulozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 1000nm

Heterophile Granulozyten sind rundliche oder gestreckte Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern. Sie sind insgesamt ca. 22µm groß. Der gelappte Zellkern weist unterschiedlich elektronendichte Stellen auf. Es sind drei unterschiedliche Granulatypen zu erkennen. Die einen sind ca.1µm groß und 0,5µm breit, länglich, oval bis spindel- oder tropfenförmig und weisen ein kreisrundes, weniger elektronendichtes, zentrales Areal auf, während die anderen rund und kleiner sind. Letztere sind ca. 0,7µm groß. Die dritte Granula-Art ist deutlich elektronendichter und ebenfalls rund. Des Weiteren sind Teile des Golgi-Apparates zu sehen, dunkle zytoplasmatische Einschlüsse sowie kleine Vakuolen.

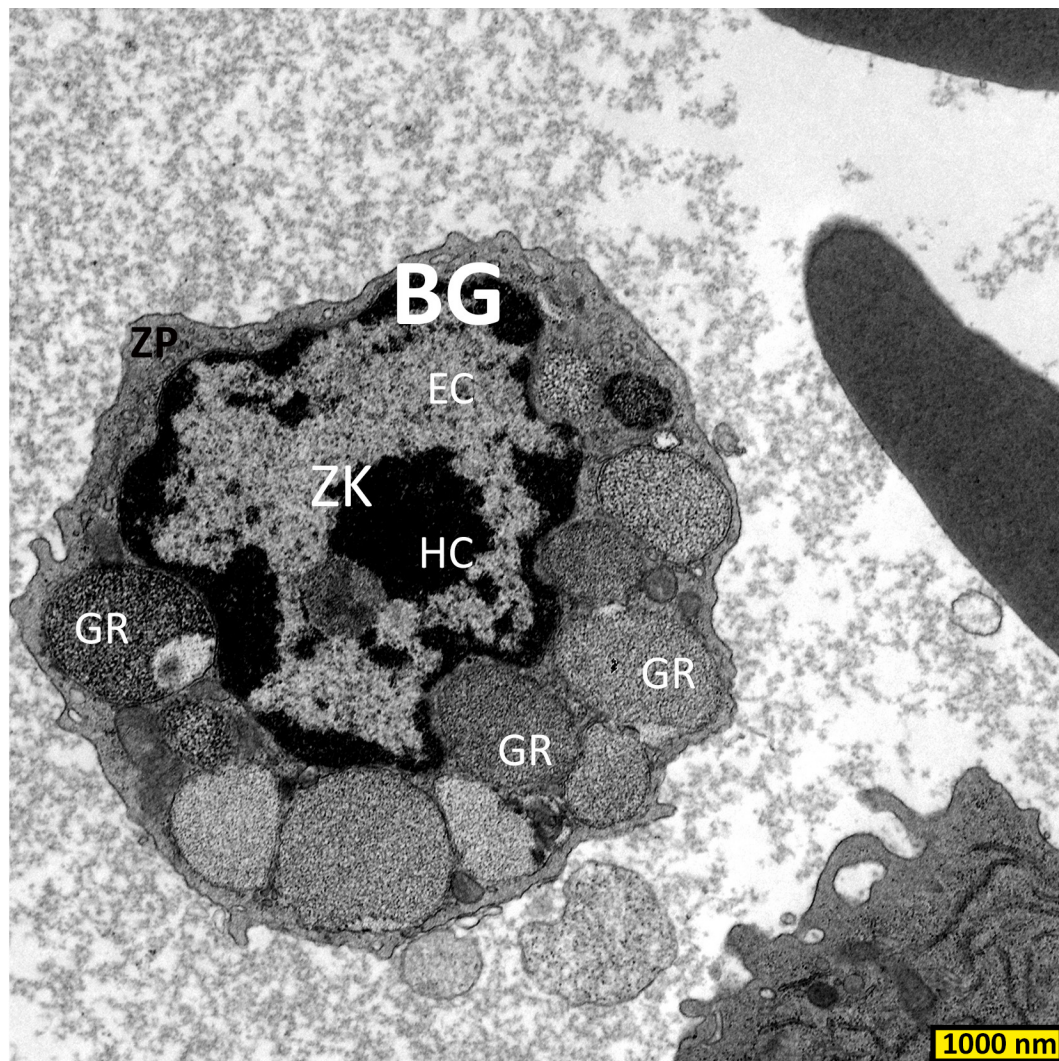


HG	Heterophiler Granulozyt	ZK	Zellkern	HC	Heterochromatin
ZP	Zytoplasma	GR	Granula	EC	Euchromatin
ER	Endoplasmatisches Reticulum				

Bild 70: EM-Aufnahme Heterophiler Granulozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 1000nm

Heterophiler Granulozyt, mit rauer Oberfläche aufgrund zytoplasmatischer Ausläufer. Der segmentierte Zellkern weist heterochromatische und euchromatische Bereiche auf. Es sind sich unterscheidende Granulatypen auszumachen. Die typische „Spiegeleiform“ der Granula ist deutlich zu erkennen, ein elektronendichtes Zentralareal liegt in homogenem, weniger elektronendichtem Granulaplasma.

3.3.2 Basophiler Granulozyten



BG Basophiler Granulozyt
ZP Zytoplasma

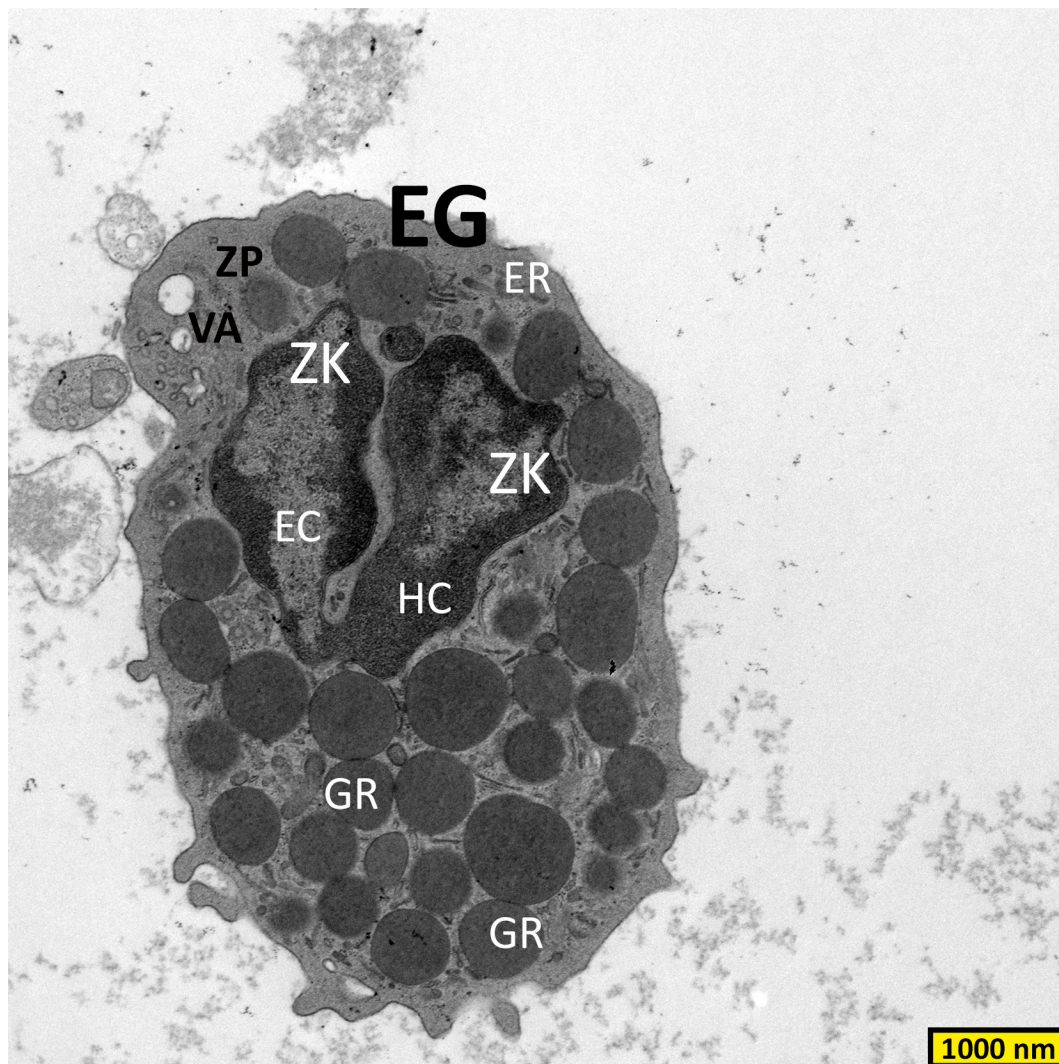
ZK Zellkern
GR Granula

HC Heterochromatin
EC Euchromatin

Bild 71: EM-Aufnahme Basophiler Granulozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 1000nm

Basophile Granulozyten des Königspinguins zeigen sich als runde, ca. 13µm große Zellen. Im Zytoplasma liegen verhältnismäßig große (ca. 1,5µm), homogene Granula von variierender Elektronendichte, welche, neben dem Nukleus, fast das gesamte Lumen der Zelle ausfüllen. Der Zellkern weist Hetero- und Euchromatin auf.

3.3.3 Eosinophiler Granulozyten

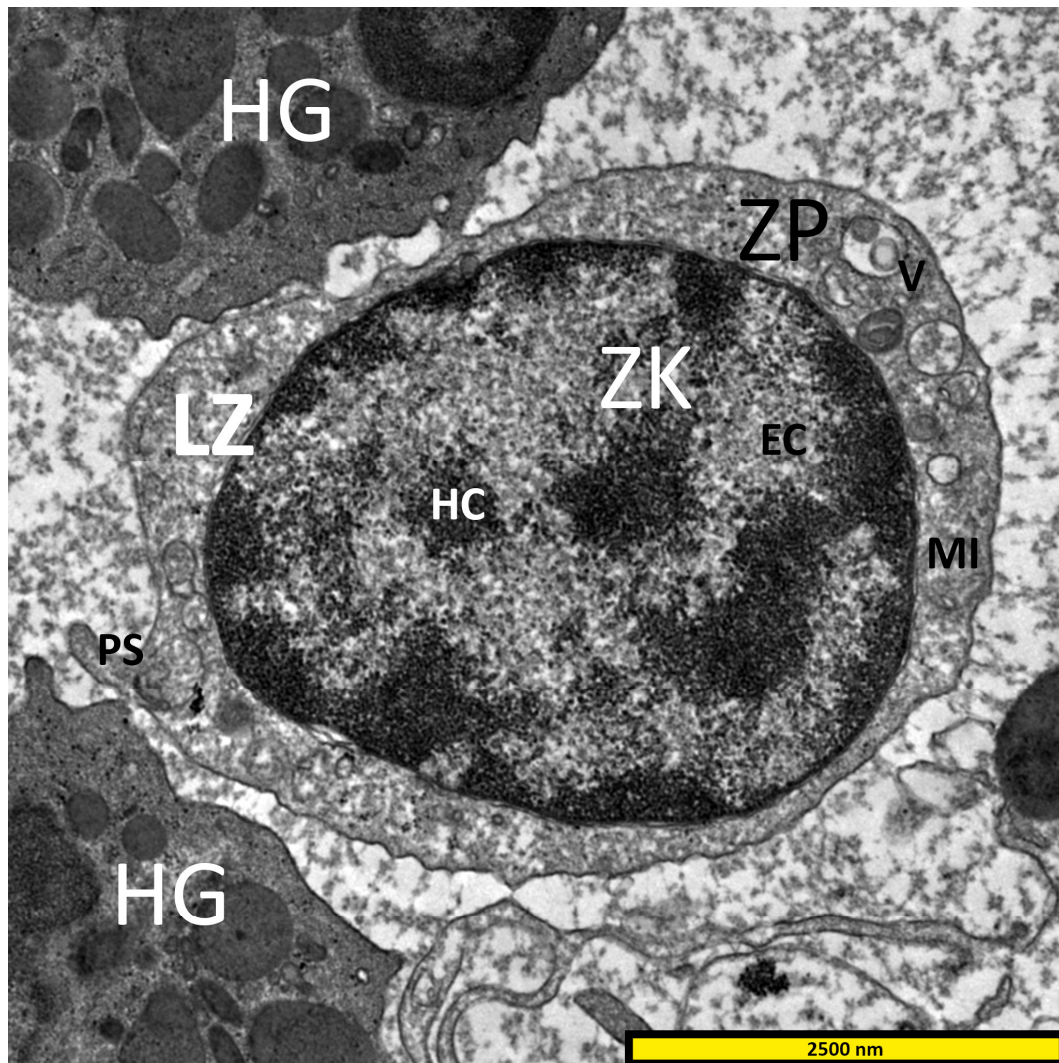


EG Eosinophiler Granulozyt	ZK Zellkern	HC Heterochromatin
ZP Zytoplasma	GR Granula	EC Euchromatin
VA Vakuole	ER Endoplasmatisches Reticulum	

Bild 72: EM-Aufnahme Eosinophiler Granulozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 1000nm

Eosinophile Granulozyten des Königspinguins sind annähernd runde, längliche bis unregelmäßig ausgebreitete Zellen. Im Zytoplasma liegen homogene, runde Granula von mittlerer Elektronendichte und ca. 20-90nm Größe. Der multilobuläre Zellkern weist periphere heterochromatische und zentral euchromatische Bereiche auf. Im Zytoplasma sind Vakuolen und Zellorganellen auszumachen.

3.3.4 Lymphozyten

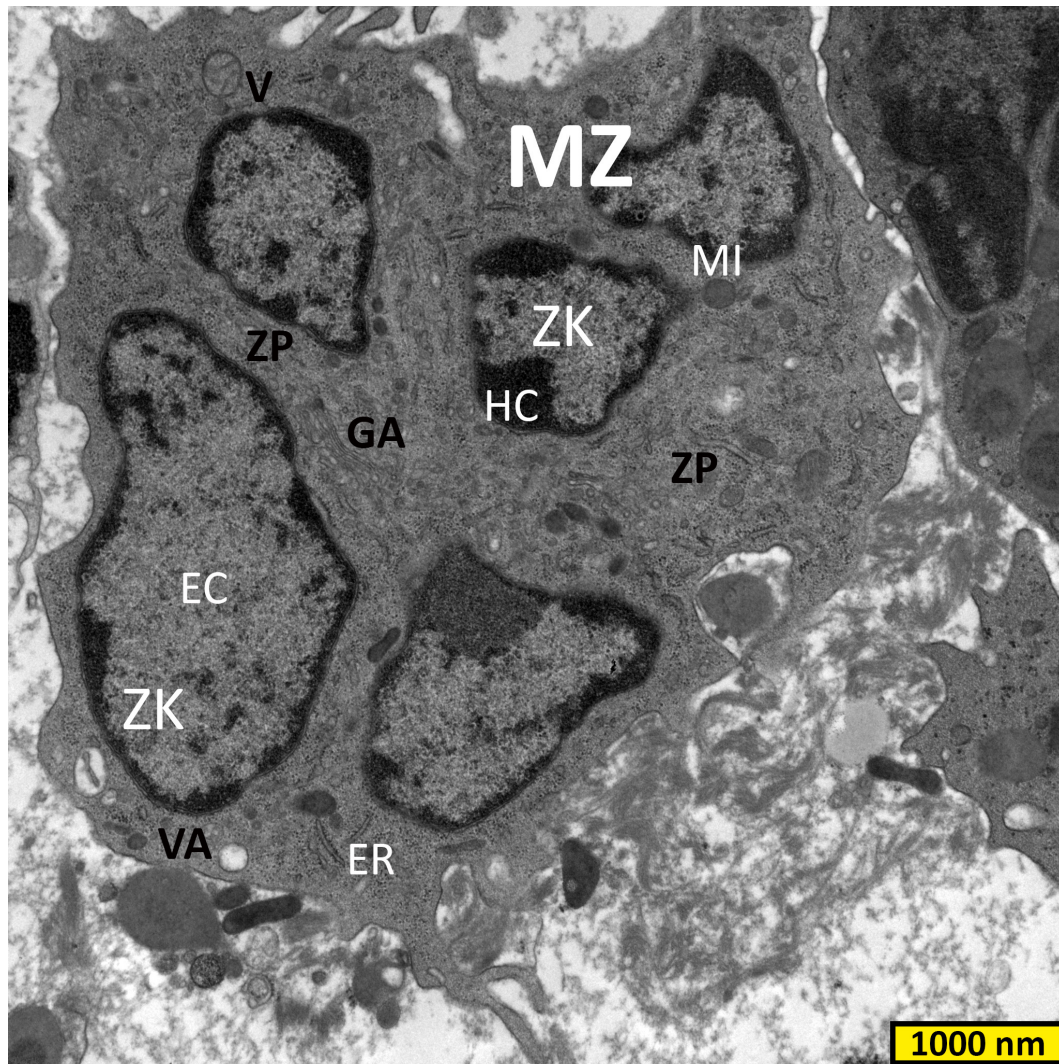


ZK Zellkern	LZ Lymphozyt	EC Euchromatin
ZP Zytoplasma	HG Heterophiler Granulozyt	HC Heterochromatin
MI Mitochondrium	PS Pseudopodium	V Vesikel

Bild 73: EM-Aufnahme Lymphozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 2500nm

Lymphozyten sind teilweise rundliche bis ovale, teilweise unregelmäßig geformte Zellen, ca. 4-15 µm groß, mit großem Nukleus. Oft sind Pseudopodien als zytoplasmatische Ausläufer zu finden. Der Zellkern weist meist periphere heterochromatische Bereiche auf, während zentral in der Mehrzahl hellere, euchromatische Flächen zu sehen sind. Er ist zentral oder exzentrisch gelegen und oft an einer Seite abgeflacht oder verformt. Zellorganellen, wie Mitochondrien, vereinzelt Granula mit elektronendichtem Inhalt oder Vakuolen sind im Zytoplasma zu erkennen.

3.3.5 Monozyten



MZ Monozyt	ZK Zellkern	HC Heterochromatin
MI Mitochondrium	ZP Zytoplasma	EC Euchromatin
GA Golgi Apparat	V Vesikel	ER Endoplasmatisches Reticulum
VA Vakuole		

Bild 74: EM-Aufnahme Monozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 1000nm

Monozyten des Königspinguins (*Aptenodytes Patagonicus*) sind ca.15-23 μ m groß, je nach Anschnitt, weisen einen vielgelappten Kern und reichlich Zytoplasma auf. Ihre Form ist grob rundlich, teilweise auch beliebig und unregelmäßig ausgedehnt. Verschiedenste Zellorganellen sind zu sehen: Raues Endoplasmatisches Reticulum, typische Vakuolen, Vesikel mit elektronendichtem Inhalt, Glykogenpartikel sowie Mitochondrien.

4. Glykohistochemische Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln sind die glykohistochemischen Ergebnisse aufgeführt. Es wurden, wie bereits beschrieben, mit Fluoreszenzmarkern direkt oder indirekt markierte Lektine auf die Ausstriche aufgebracht.

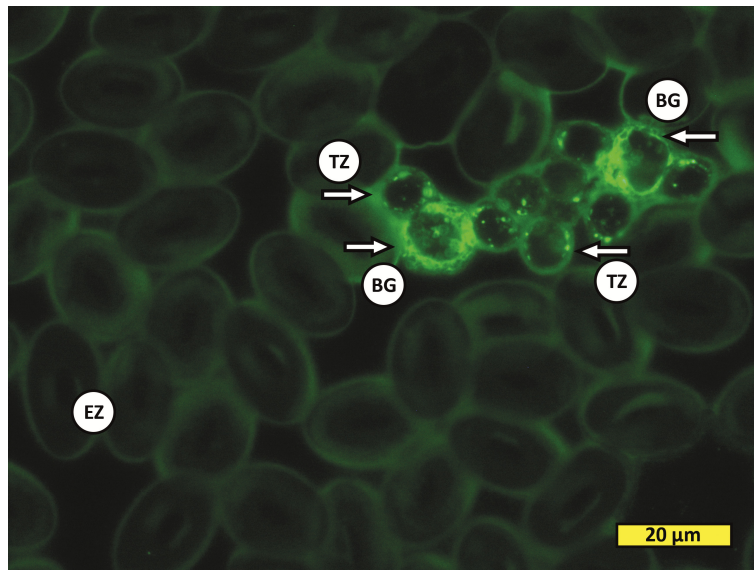
Die Auswertung erfolgte anhand der unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Fluoreszenz der verschiedenen Zellen. Dabei wurde der Grad der Fluoreszenz in keine (-), sehr schwach (+/-), schwach (+) mittel (++) und stark (+++) eingeteilt. Die Eigenfluoreszenz der Zellen wurde bei den lektinhistochemischen Untersuchungen berücksichtigt. So waren die leuchtenden, granulären Strukturen im Zytoplasma der Erythrozyten auch in den Negativkontrollen zu sehen. Um die Untersuchung auf ein bestimmtes Lektin generell als positiv zu werten, wurden mindestens 1 schwach positiver (+) oder mindestens 2 sehr schwach positive (+/-) Ausstriche vorausgesetzt. Um als negativ gewertet zu werden, musste dieser Schwellenwert von 1 schwach positiven (+) oder 2 sehr schwach positiven (+/-) Ausstrichen unterschritten werden. Entsprechend der Fluoreszenz ungefähr der in den Kontrollen, so wurde der Ausstrich ebenfalls als negativ gewertet. Für die Auswertung konnten zudem meist nur die vor der Lektinbehandlung in Methanol fixierten Ausstriche herangezogen werden, da die Zellen unfixiert dem Färbeprozess in der Regel nicht standhielten. Bis auf wenige Ausnahmen war die Qualität der unfixierten Ausstriche mangelhaft. Auch wurden nicht in jedem positiven Ausstrich alle Zelltypen aufgefunden oder waren nicht eindeutig identifizierbar. In diesem Fall wurde dies in der tabellarischen Übersicht mit nicht beurteilbar (n. b.) angegeben. Die Blutzellen wurden mit Hilfe der VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI Kernfärbung identifiziert und differenziert.

In den Abbildungen wurde meist nur die FITC-Filterebene eingeblendet, um das Hauptaugenmerk auf die Fluoreszenz zu lenken. Die DAPI-Kern-Filterebene und die Leerfilterebene, ohne jegliche Färbung der Zellen, wurden exemplarisch eingeblendet, um den Identifizierungsprozess der Zelltypen zu verdeutlichen (vgl. Bild 79, Bild 82, Bild 87.). Die Zelltypen wurden jeweils in und neben den Abbildungen bezeichnet und unter den Abbildungen wurden ergänzende Beschreibungen hinzugefügt.

4.1 Auswertung Concanavalin Agglutinin (ConA)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 10/10fix.	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
ZM	++
ZP	+
Thrombozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	++
GR	+++
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	+
GRP	++
Eosinophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	+
GR	++
Basophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	+
GR	++
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	+
ZP	++
Monozyten	
ZK	-
ZM	+
ZP	++
GR	+

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

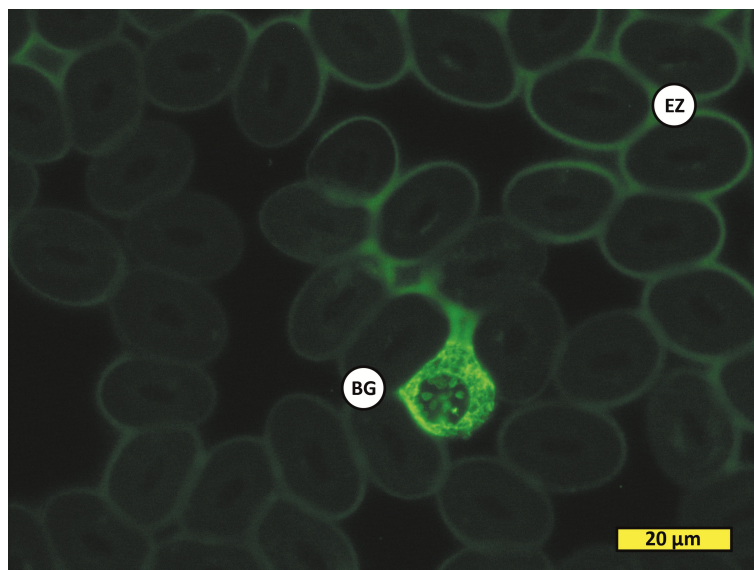


TZ Thrombozyt
 BG Basophiler
 Granulozyt
 EZ Erythrozyt

Bild 75: ConA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.3, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Ein Aggregat aus Thrombozyten und basophilen Granulozyten. Deutlich ist die Fluoreszenz der Granula und der granulären Strukturen in diesen beiden Zelltypen zu erkennen. Die Erythrozyten zeigen eine ConA-FITC Bindung an der Zellmembran und im Zytoplasma.

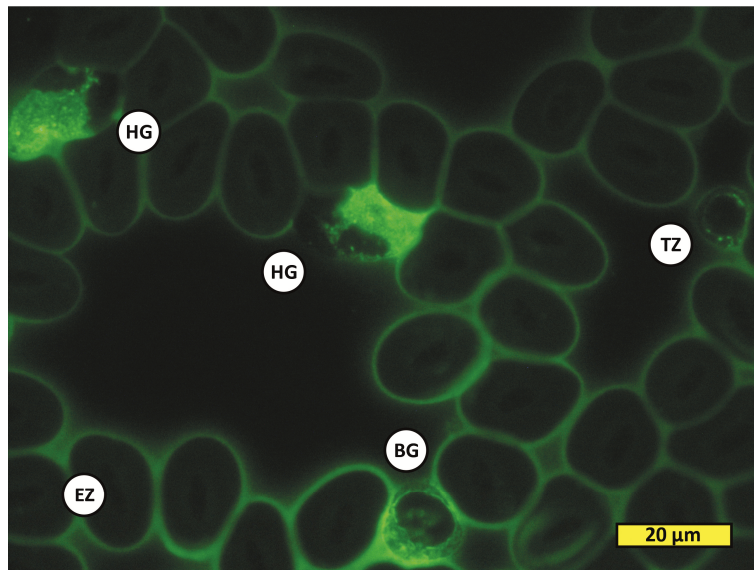


BG Basophiler
 Granulozyt
 EZ Erythrozyt

Bild 76: ConA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.3, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Basophiler Granulozyt mit ConA-FITC positiven Granula umgeben von Erythrozyten, die schwache Membranfluoreszenz zeigen.



TZ Thrombozyt
HG Heterophiler
Granulozyt
BG Basophiler
Granulozyt
EZ Erythrozyt

Bild 77: ConA-FITC

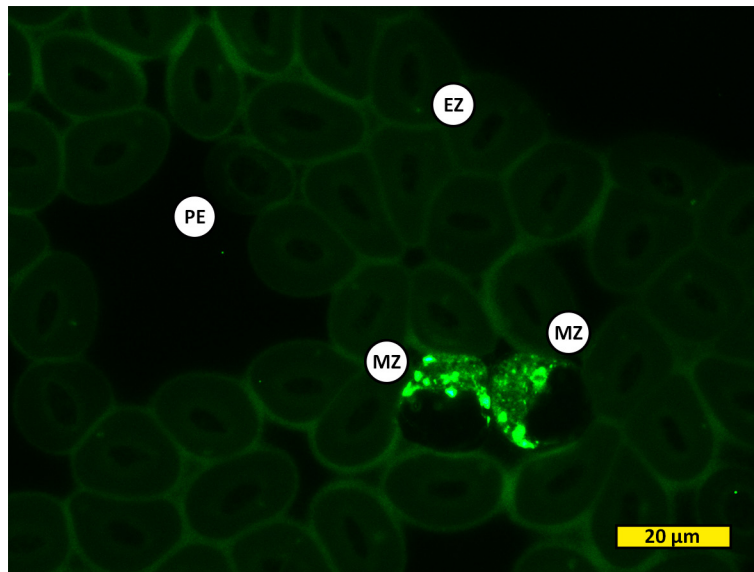
Blutausstrich, Königspinguin Nr.3, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Heterophile Granulozyten, Thrombozyt und basophiler Granulozyt haben ConA-FITC positive Bereiche. Deutlich zu erkennen ist die Membranfluoreszenz der Erythrozyten.

4.2 Auswertung Pisum sativum Agglutinin (PSA)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 10/10fix.	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
KM	++
ZM	+
ZP	+/-
Thrombozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	+
GR	++
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	+++
ZP	+
Eosinophile Granulozyten	
	n. b.
Basophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	+++
ZP	+
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	+++
ZP	+
Monozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	+++
ZP	+

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

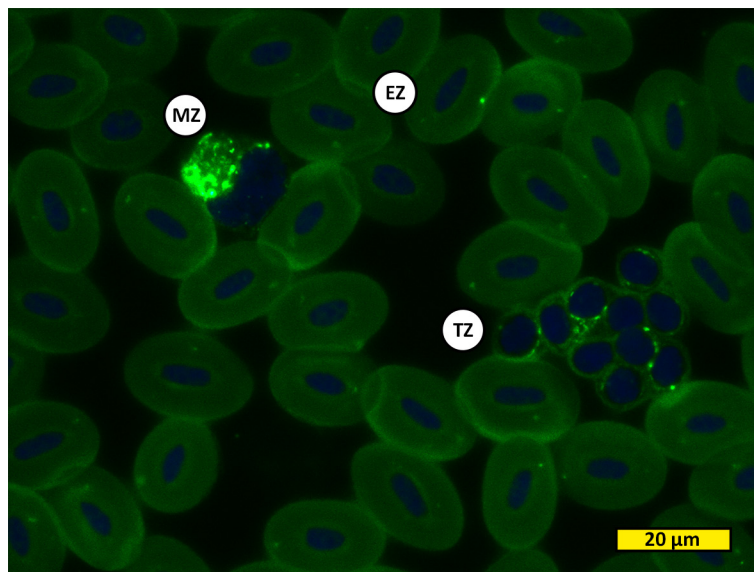


EZ Erythrozyt
PE Proerythrozyt
MZ Monozyt

Bild 78: PSA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.4, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

In den Monozyten sind deutlich PSA-FITC positive, granuläre Strukturen zu erkennen. Die Erythrozyten zeigen im Areal um die Kernmembran und außen an der Zellmembran Fluoreszenz. Das Zytoplasma ist sehr schwach positiv zu werten. Die Kerne sind als schwarze Aussparungen in den Zellen zu erkennen (vgl. Bild 79).

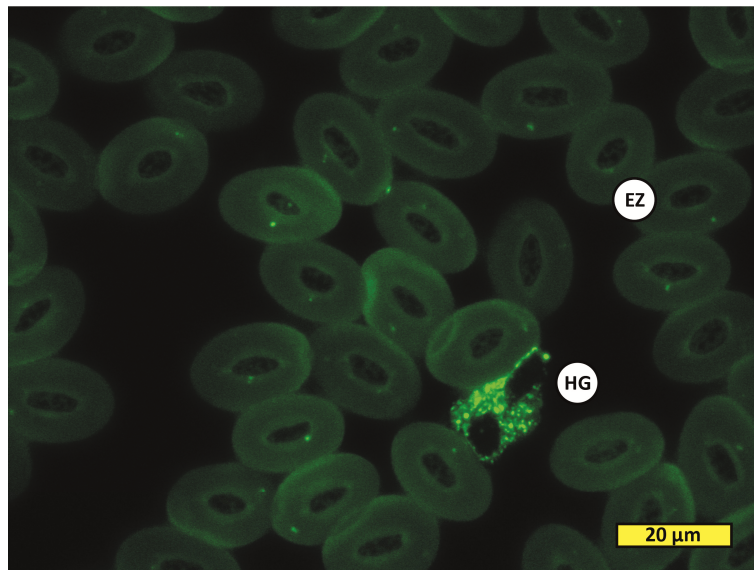


EZ Erythrozyt
TZ Thrombozyt
MZ Monozyt

Bild 79: PSA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.4, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter und DAPI-Filter

In den aggregierten Thrombozyten sowie im Zytoplasma der Monozyten sind starkfluoreszierende, folglich PSA-FITC bindende, granuläre Strukturen zu erkennen. Die Zellen sind an den Kernen zu differenzieren. Hier wurde exemplarisch die DAPI-Filterebene im Foto eingblendet, um den Identifizierungsprozess zu verdeutlichen (vgl. Bild 78).



EZ Erythrozyt
HG Heterophiler
Granulozyt

Bild 80: PSA-FITC

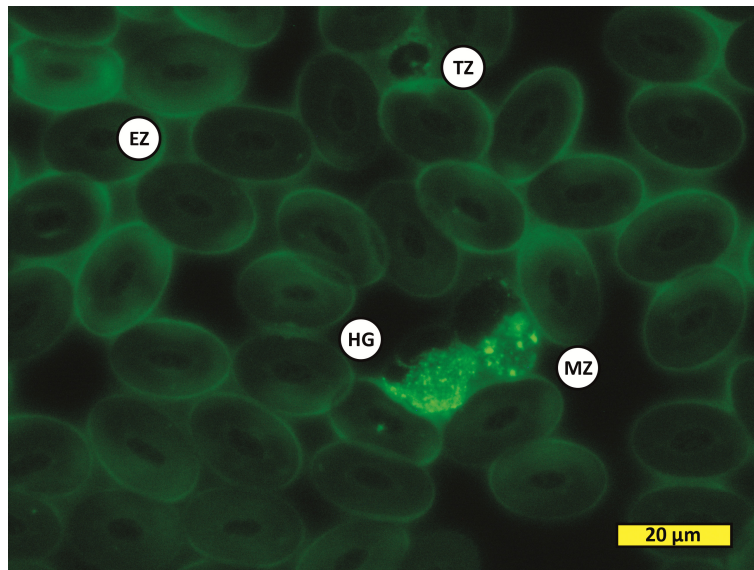
Blutausstrich, Königspinguin Nr.4, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Die Granula des Heterophilen sind als sehr stark positiv zu werten. Das Zytoplasma des Granulozyten zeigt schwache PSA-FITC-Bindung.

4.3 Auswertung Lens culinaris Agglutinin (LCA)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 9/10fix.	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	++
ZP	+/-
Thrombozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	++
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	+++
ZP	++
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	n. b.
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	++
ZP	+
Monozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	++
ZP	+

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

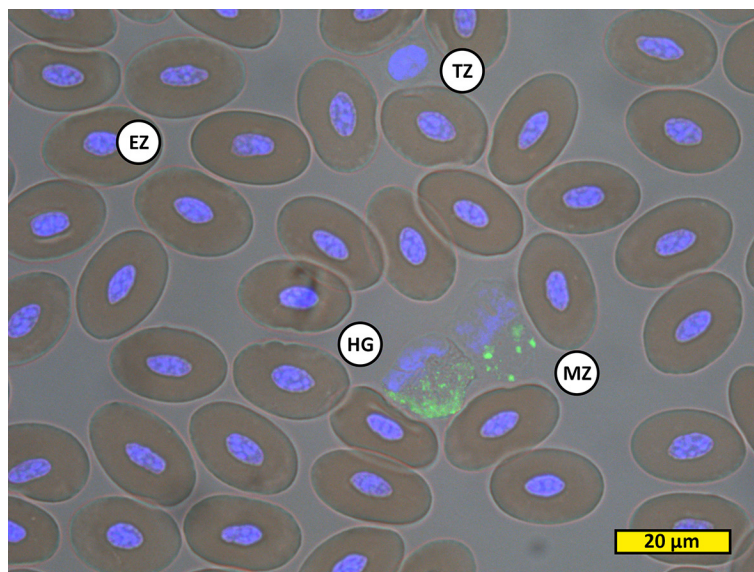


TZ Thrombozyt
 MZ Monozyt
 EZ Erythrozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt

Bild 81: LCA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.9, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Granula im heterophilen Granulozyten und granuläre Strukturen im Monozyt zeigen starke Fluoreszenz. Die Erythrozyten binden LCA-FITC an der Zellmembran, sehr schwach im Zytoplasma und schwach im Areal um die Kernmembran.

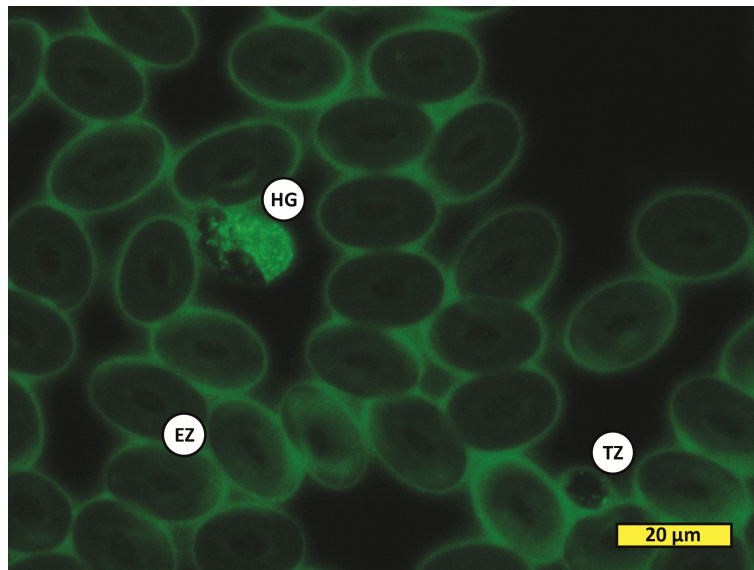


TZ Thrombozyt
 MZ Monozyt
 EZ Erythrozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt

Bild 82: LCA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.9, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter, Leerfilter und DAPI-Filter

In dieser Abbildung wurden die Fluoreszenzebene (vgl. Bild 81), die Ebene der Kernfärbung mit DAPI und die Leerfilterebene (ohne jegliche Färbung der Zellen) übereinandergelegt. Anhand der Kerne sind die Zelltypen zu differenzieren.

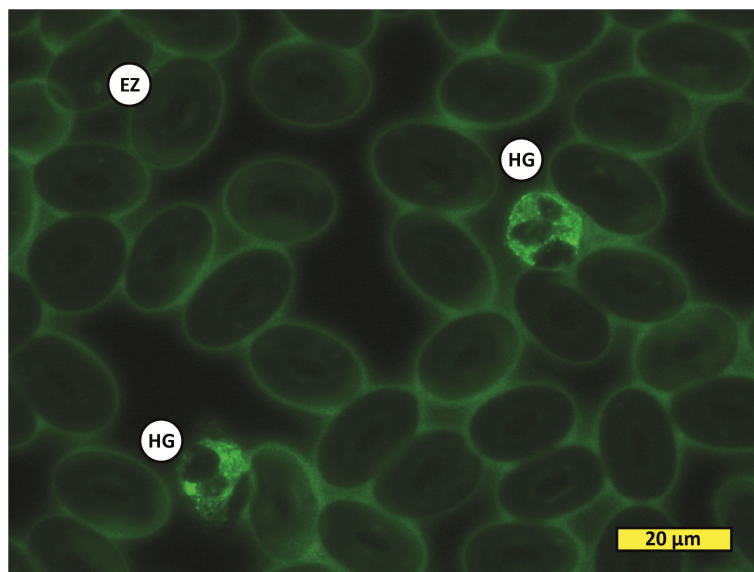


TZ Thrombozyt
 EZ Erythrozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt

Bild 83: LCA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.9, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Der Thrombozyt weist wenig fluoreszierendes Zytoplasma auf. Der heterophile Granulozyt bindet LCA-FITC in Granula und im Zytoplasma.



EZ Erythrozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt

Bild 84: LCA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.9, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Die Kerne der Zellen zeigen keine Fluoreszenz und sind deutlich zwischen den leuchtenden Strukturen als schwarze Aussparungen zu erkennen.

4.4 Auswertung Ricinus communis Agglutinin (RCA)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 1/10fix.	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	++
ZP	+
Thrombozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	+
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GRM	++
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	n. b.
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	++
Monozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	++

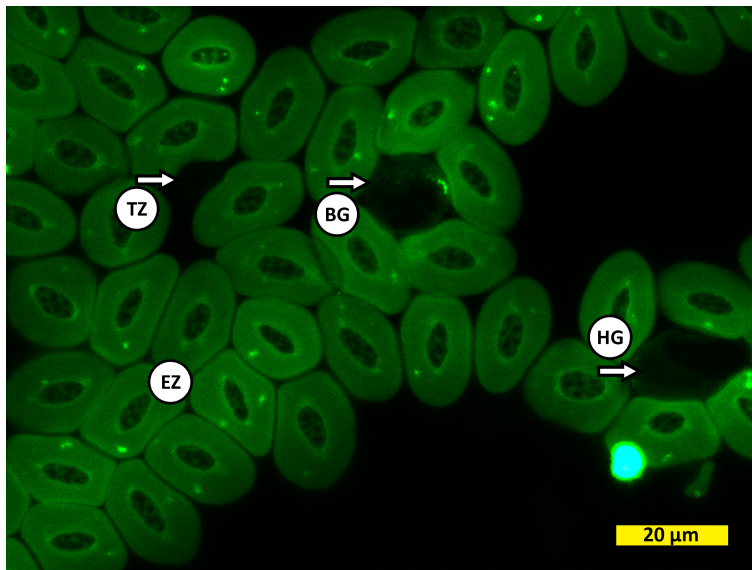
ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

Aufgrund der Lichtempfindlichkeit und Sensibilität der Fluoreszenz unter dem FITC-Filter des Fluoreszenzmikroskops konnten keine guten Fotografien von RCA-FITC markierten Ausstrichen angefertigt werden.

4.5 Auswertung Peanut Agglutinin (PNA)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 3/10fix	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	+
KM	++
ZM	-
ZP	++
Thrombozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	-
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	+/-
Eosinophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	-
Basophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	-
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	-
Monozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	-

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

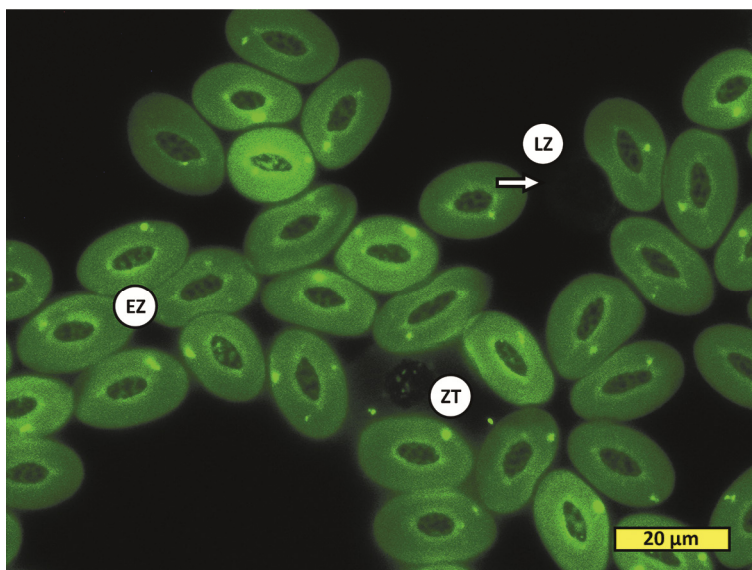


EZ Erythrozyt
 TZ Thrombozyt
 BG Basophiler
 Granulozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt

Bild 85: PNA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Die Leukozyten verbinden sich nicht oder nur sehr schwach mit PNA-FITC. Sie sind nur aufgrund der Erythrozyten als dunkle Aussparungen zu erkennen.

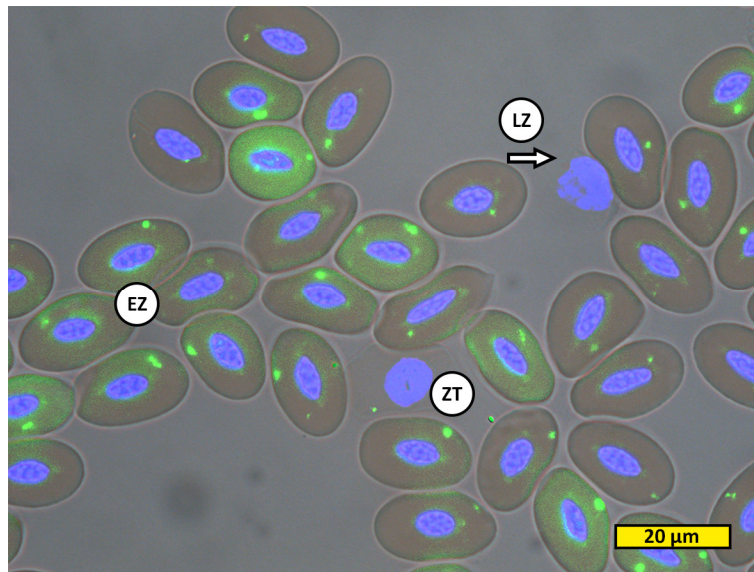


EZ Erythrozyt
 LZ Lymphozyt
 ZT Zelltrümmer

Bild 86: PNA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Die Erythrozyten binden PNA im Areal um die Zellkernmembran und im Zytoplasma. Die stark fluoreszierenden granulären Strukturen sind auch in den Negativkontrollen zu sehen. Der PNA-FITC negative, folglich nicht fluoreszierende Lymphozyt ist kaum auszumachen (vgl. Bild 87).



EZ Erythrozyt
LZ Lymphozyt
ZT Zelltrümmer

Bild 87: PNA-FITC

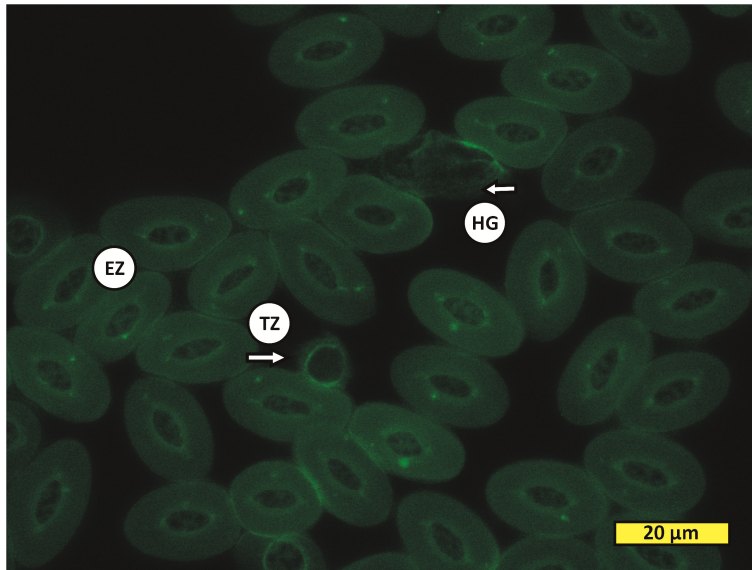
Blutausstrich, Königspinguin Nr.5, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter, Leerfilter und DAPI-Filter

In dieser Abbildung wurden die Fluoreszenzebene (vgl. Bild 86), die Ebene der Kernfärbung mit DAPI und die Leerfilterebene (ohne jegliche Färbung der Zellen) übereinandergelegt, um auch den nichtfluoreszierenden, PNA-FITC negativen Lymphozyten sicher zu identifizieren.

4.6 Auswertung Viscum album Agglutinin (VAA)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 10/10fix.	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	++
ZM	-
ZP	+
Thrombozyten	
ZK	-
KM	++
ZM	-
ZP	++
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	+
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	n. b.
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	++
Monozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	++

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

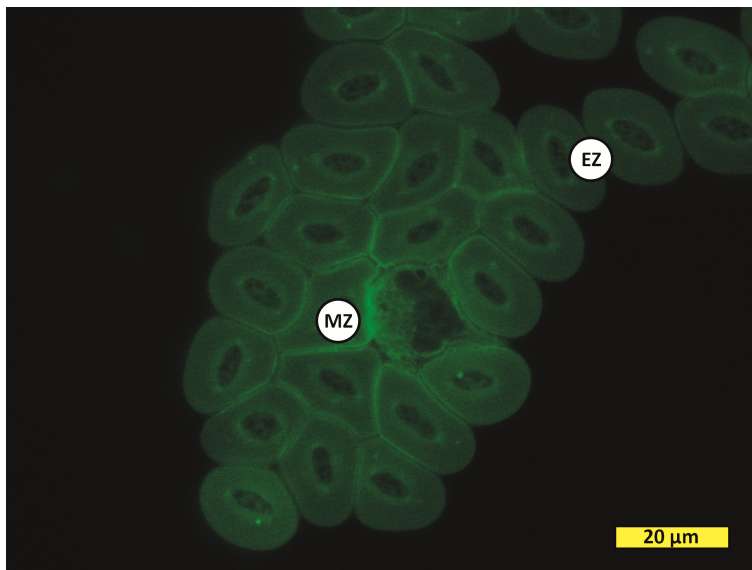


EZ Erythrozyt
 TZ Thrombozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt

Bild 88: VAA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.3, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Die Kernmembranareale und das Zytoplasma der Erythrozyten und Thrombozyten binden VAA-FITC. Das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten zeigt schwache Bindung.

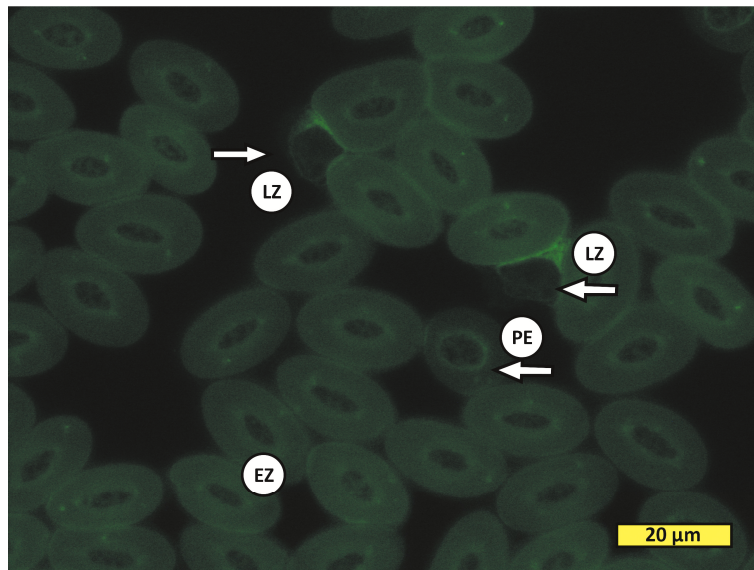


EZ Erythrozyt
 MZ Monozyt

Bild 89: VAA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.3, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Im fluoreszierenden Zytoplasma des Monozyten sind Vakuolen auszumachen.



EZ Erythrozyt
PE Proerythrozyt
LZ Lymphozyt

Bild 90: VAA-FITC

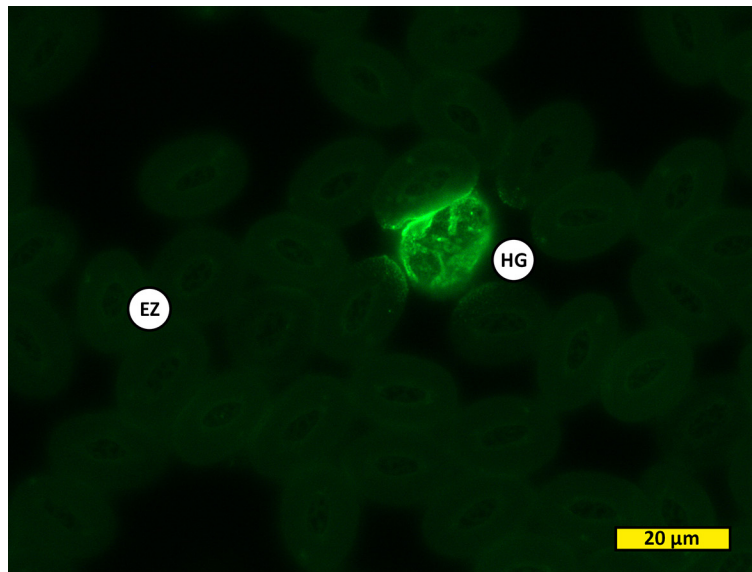
Blutausstrich, Königspinguin Nr.3, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Lymphozyten weisen wenig, jedoch deutlich fluoreszierendes Zytoplasma auf.

4.7 Auswertung Sophora japonica Agglutinin (SJA)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 10/10fix.	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
ZP	+/-
Thrombozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
ZP	+/-
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	+++
ZP	+
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	n. b.
Lymphozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
GR	-
Monozyten	n. b.
ZK	
ZM	
GR	

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

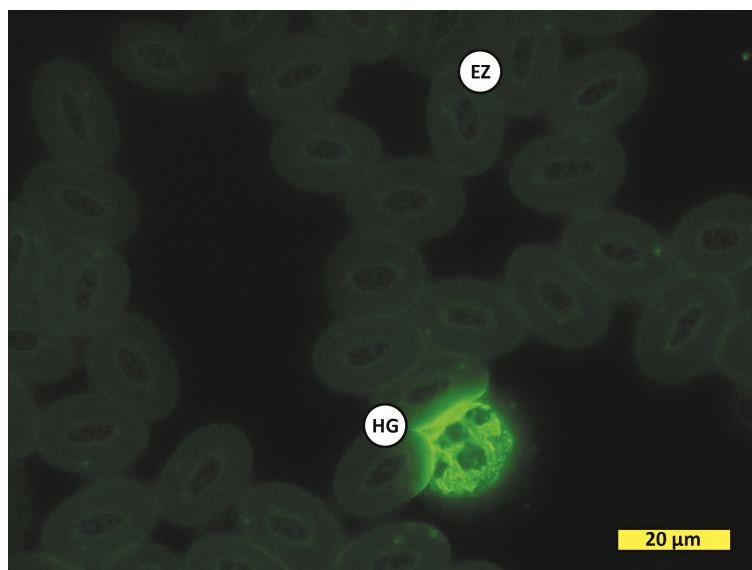


EZ Erythrozyt
HG Heterophiler
Granulozyt

Bild 91: SJA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.2, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

SJA-FITC bindet sehr stark an den Granula und dem Zytoplasma der heterophilen Granulozyten. Die Erythrozyten fluoreszieren schwach im Areal um die Kernmembran und sehr schwach im Zytoplasma.

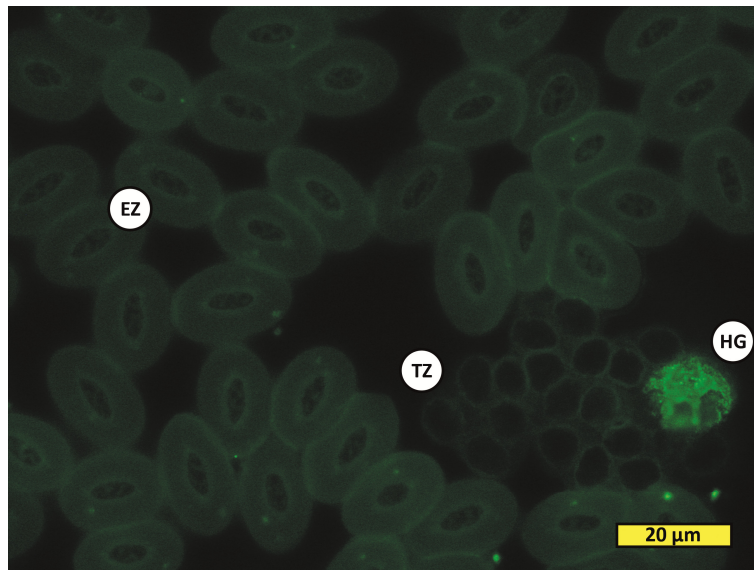


EZ Erythrozyt
HG Heterophiler
Granulozyt

Bild 92: SJA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.2, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Sehr starke Fluoreszenz des heterophilen Granulozyten an Granula und Zytoplasma.

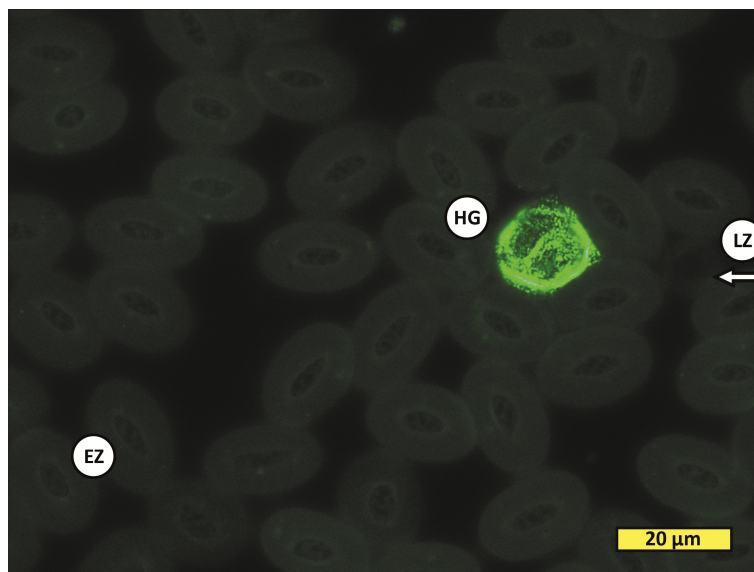


EZ Erythrozyt
 TZ Thrombozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt

Bild 93: SJA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.2, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Die im Aggregat vorliegenden Thrombozyten zeigen schwach fluoreszierendes Zytoplasma. Sehr starke Fluoreszenz am Zytoplasma und den Granula der heterophilen Granulozyten.



EZ Erythrozyt
 LZ Lymphozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt

Bild 94: SJA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.2, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Heterophiler, sehr stark fluoreszierender Granulozyt zwischen schwach fluoreszierenden Erythrozyten. Schwache Fluoreszenz im Lymphozytenplasma zu erkennen.

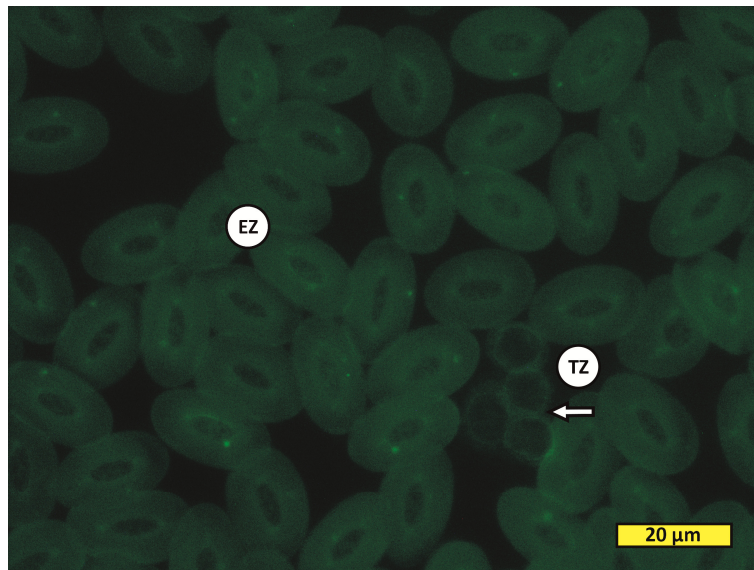
4.8 Auswertung Soybean Agglutinin (SBA)

Der Schwellenwert von 1 schwach positiven (+) oder 2 sehr schwach positiven (+/-) Ausstrichen, um als positiv gewertet zu werden, wurde nicht überschritten. Die Fluoreszenz war zu schwach oder entsprach in etwa der in den Kontrollen. Die Untersuchung auf SBA wurde somit als negativ gewertet.

4.9 Auswertung Griffonia simplicifolia Agglutinin 1 (GSL-1)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 2/10fix.	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	++
ZM	+
ZP	+
Thrombozyten	
ZK	-
KM	++
ZM	-
ZP	+
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	+
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	n. b.
Lymphozyten	
ZK	-
KM	++
ZP	+
Monozyten	
ZK	+
ZM	+
ZP	+

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar



TZ Thrombozyt

EZ Erythrozyt

Bild 95: GSL-1-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.10, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

GSL-1-FITC bindet am Zytoplasma sowie der Kernmembran der Erythrozyten und Thrombozyten. Unter der Zellmembran der Erythrozyten ist ein fluoreszierender Bereich auszumachen.

4.10 Auswertung Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 2/10	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach), + (schwach), ++ (mittel), +++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	+
ZP	+
Thrombozyten	
ZK	-
ZM	+
ZP	+
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	++
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	++
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	+
Monozyten	
ZK	-
ZM	+
ZP	+

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

Es konnten aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenz keine guten Fotografien von DBA-FITC markierten Ausstrichen erstellt werden.

4.11 Auswertung Sambucus nigra Agglutinin (SNA)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 2/10	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach), + (schwach), ++ (mittel), +++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	++
ZM	++
ZP	+
Thrombozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	+
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	++
ZP	+
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	n. b.
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	+
Monozyten	n. b.

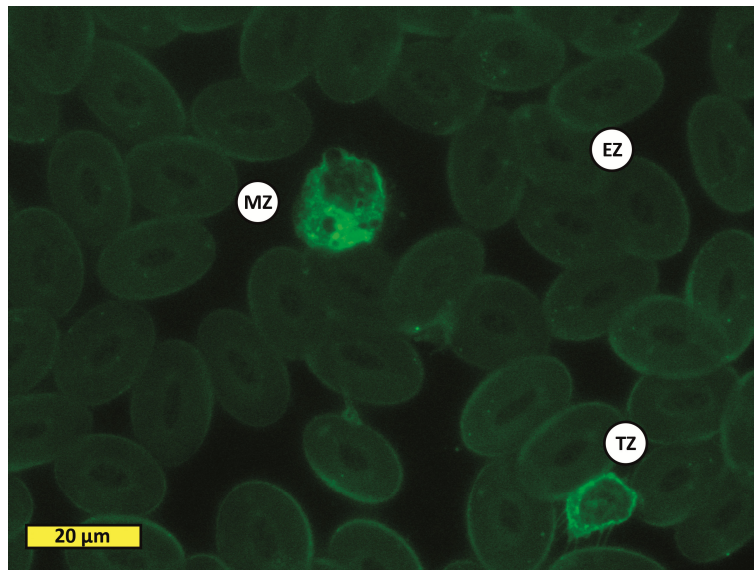
ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

Es konnten wegen der hohen Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenz keine guten Fotografien von SNA-FITC markierten Zellen erstellt werden.

4.12 Auswertung Wheat germ Agglutinin (WGA)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 10/10	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach), + (schwach), ++ (mittel), +++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
ZM	++
ZP	+
Thrombozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	++
ZP	+
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	++
ZP	+
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	++
GR	++
GRM	+++
ZP	++
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	+
ZP	+++
Monozyten	
ZK	-
ZM	++
GR	++

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

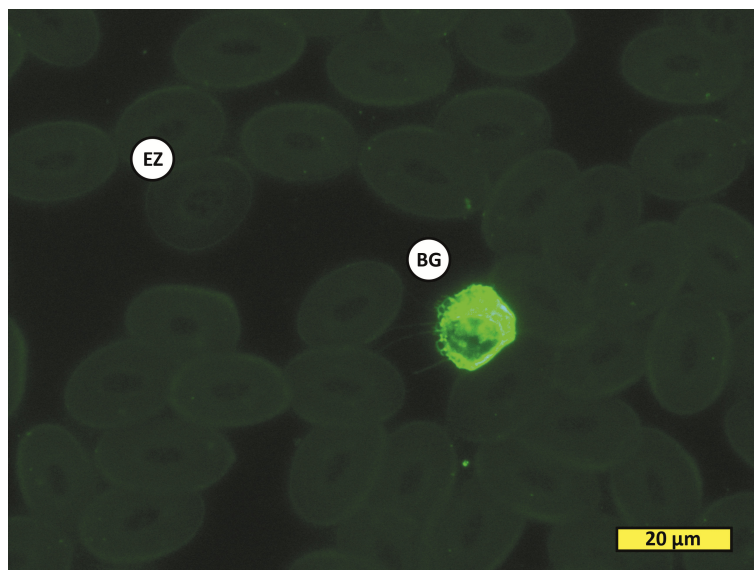


EZ Erythrozyt
MZ Monozyt
TZ Thrombozyt

Bild 96: WGA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.3, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Der Thrombozyt rechts hat deutlich WGA-FITC positive Pseudopodien ausgebildet. Im stark fluoreszierenden Zytoplasma des Monozyten sind Vakuolen zu erkennen. Auch die Erythrozyten zeigen fluoreszierende Bereiche.

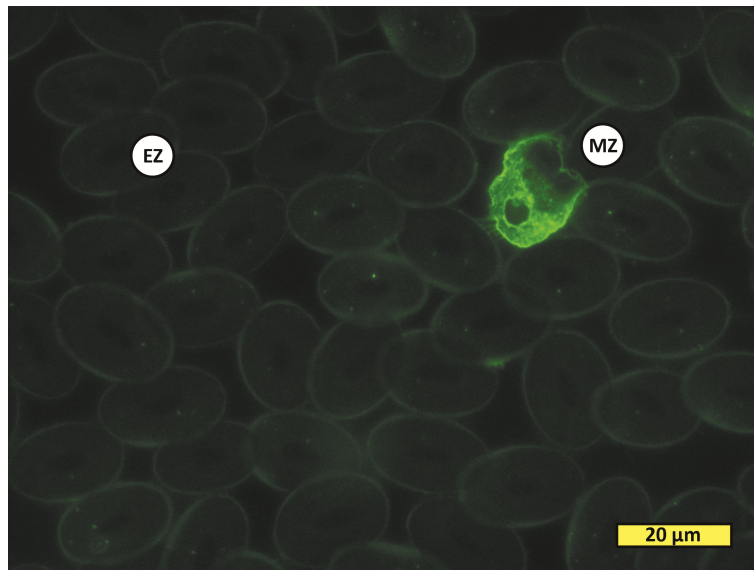


EZ Erythrozyt
BG Basophiler Granulozyt

Bild 97: WGA-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.3, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Besonders stark bindet WGA-FITC an die Granula, die Granulamembran und das Zytoplasma der basophilen Granulozyten. Auch hier sind deutlich Pseudopodien, zytoplasmatische Ausläufer zu erkennen.



EZ Erythrozyt

MZ Monozyt

Bild 98: WGA-FITC

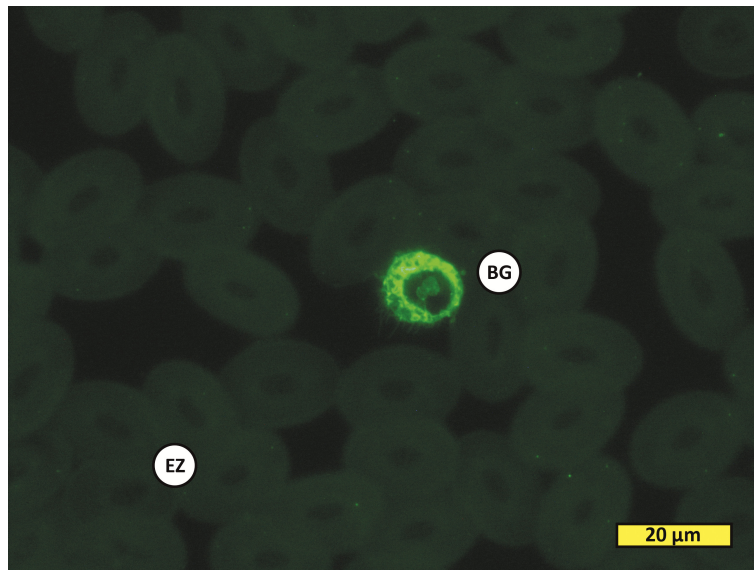
Blutausstrich, Königspinguin Nr.3, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Auch Monozyten bilden WGA-FITC positive Pseudopodien aus.

4.13 Auswertung Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 10/10	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach), + (schwach), ++ (mittel), +++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
ZP	+
Thrombozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
ZP	++
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	++
GR	+
ZP	++
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	+
GR	+++
GRM	+
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	+++
Monozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
ZP	++

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar



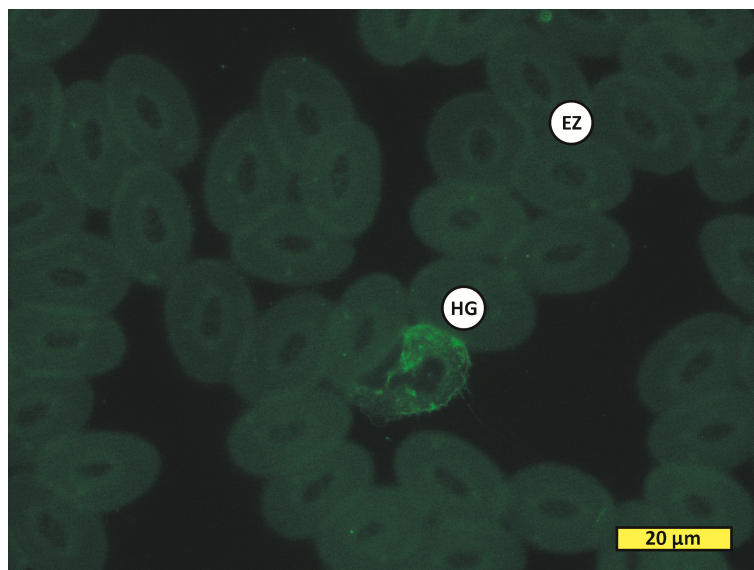
EZ Erythrozyt

BG Basophiler
Granulozyt

Bild 99: WGAs-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.2, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Der stark fluoreszierende basophile Granulozyt bildet ebenfalls WGAs-FITC positive Pseudopodien aus.



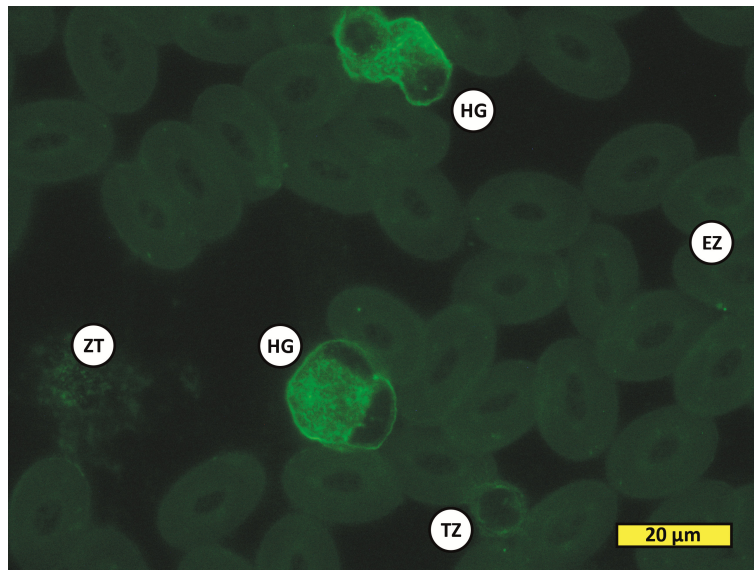
EZ Erythrozyt

HG Heterophiler
Granulozyt

Bild 100: WGAs-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.2, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

Die WGAs-FITC positiven Pseudopodien des heterophilen Granulozyten sind über 20μm lang und klar zu erkennen.

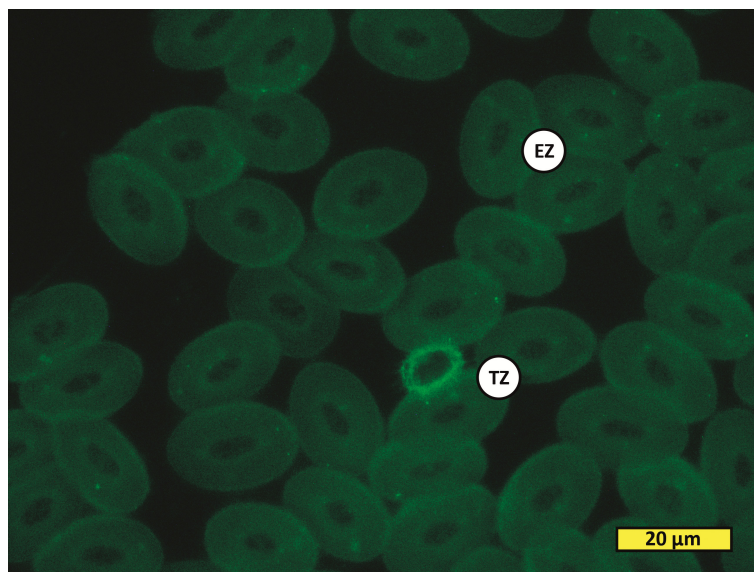


- EZ Erythrozyt
- TZ Thrombozyt
- HG Heterophiler Granulozyt
- ZT Zelltrümmer

Bild 101: WGAs-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.2, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Die Membran, die Granula und das Zytoplasma des heterophilen Granulozyten zeigt deutliche bis mittlere Fluoreszenz.



- EZ Erythrozyt
- TZ Thrombozyt

Bild 102: WGAs-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.2, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Thrombozyt mit stark leuchtendem Zytoplasma und ausgeprägten Pseudopodien.

4.14 Auswertung Ulex europaeus Agglutinin 1 (UEA-1)

Der Schwellenwert von 1 schwach positiven (+) oder 2 sehr schwach positiven (+/-) Ausstrichen, um als positiv gewertet zu werden, wurde nicht überschritten. Die Fluoreszenz war zu schwach oder entsprach in etwa der in den Kontrollen. Die Untersuchung auf UEA-1 wurde daher als negativ gewertet.

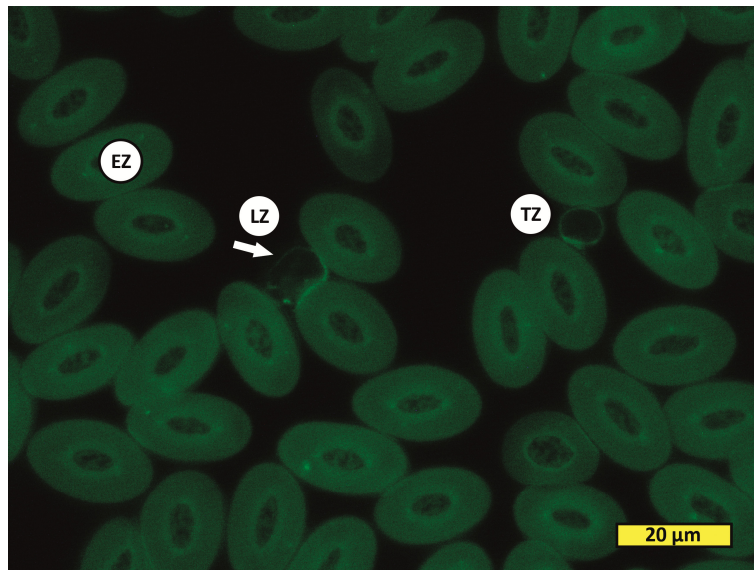
4.15 Auswertung Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L)

Der Schwellenwert von 1 schwach positiven (+) oder 2 sehr schwach positiven (+/-) Ausstrichen, um als positiv gewertet zu werden, wurde nicht überschritten. Die Fluoreszenz war zu schwach oder entsprach in etwa der in den Kontrollen. Die Untersuchung auf PHA-L wurde somit als negativ gewertet.

4.16 Auswertung *Maackia amurensis* Agglutinin 1-Leukoagglutinin (MAI)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 10/10	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach), + (schwach), ++ (mittel), +++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
ZP	++
Thrombozyten	
ZK	-
ZM	++
ZP	+
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	++
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	n. b.
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	++
ZP	++
Monozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	-

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar



EZ Erythrozyt
TZ Thrombozyt
LZ Lymphozyt

Bild 103: MAI-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.11, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert mit FITC-Filter

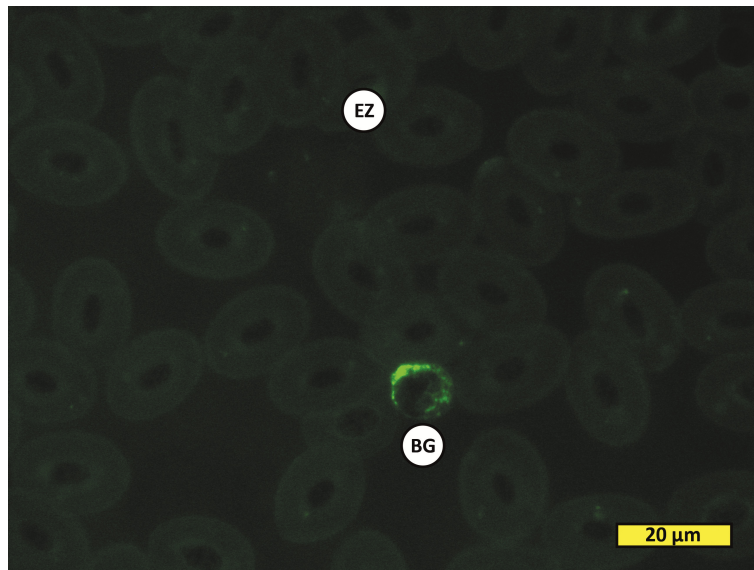
Die Erythrozyten zeigen um die Kernmembran ein heller fluoreszierendes Areal als das restliche, ebenfalls schwach MAI-FITC positive Zytoplasma.

Das Zytoplasma und die Membran der Lymphozyten und Thrombozyten zeigen deutliche Fluoreszenz.

4.17 Auswertung Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 9/10	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach), + (schwach), ++ (mittel), +++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
ZP	+
Thrombozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
ZP	+
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	++
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	+++
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	+
Monozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	++

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

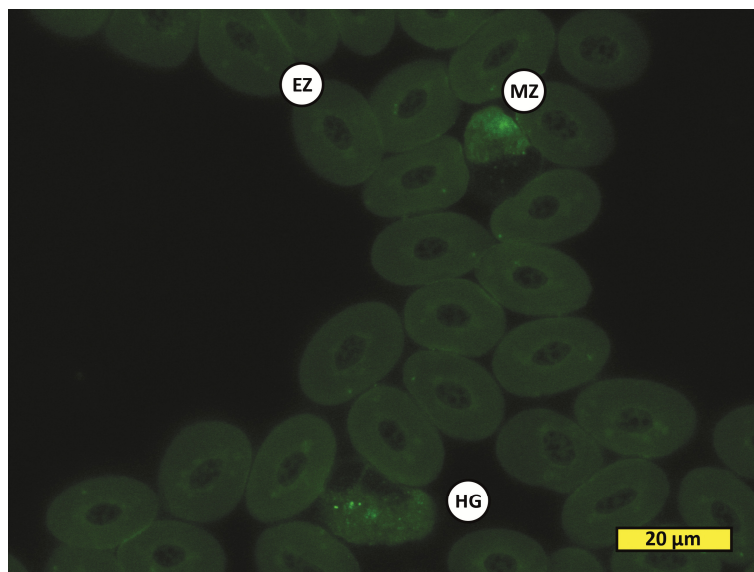


BG Basophiler
Granulozyt
EZ Erythrozyt

Bild 104: PHA-E-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.1, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Die Zell- und die Kernmembran der Erythrozyten binden PHA-E-FITC. Das Zytoplasma des basophilen Granulozyten nimmt starke Fluoreszenz an.



HG Heterophiler
Granulozyt
EZ Erythrozyt
MZ Monozyt

Bild 105: PHA-E-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.1, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Im fluoreszierenden Zytoplasma des heterophilen Granulozyten und des Monozyten sind stark leuchtende, folglich PHA-E positive, granuläre Strukturen auszumachen.

4.18 Auswertung Hemmzuckertest

Besonders stark positiv reagierende Lektine wurden vor dem Auftragen des FITC-markierten Lektins mit ihren jeweiligen Hemmzuckern inkubiert. Für ConA, PHA-E, PSA, LCA, WGA, WGA_s wurde dieser Test durchgeführt. Der Test zeigte bei den Blutzellen des Königspinguins keine signifikanten Ergebnisse. Die Lektine banden weiterhin ähnlich stark mit den Strukturen der Zielzellen wie ohne vorherige Hemmzuckerinkubation.

5. Immunhistochemische Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln sind die immunhistochemischen Ergebnisse aufgeführt.

Es wurden, wie bereits beschrieben, mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markierte Primär- oder Sekundärantikörper benutzt. Für den Aktin-Nachweis wurde Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRICT) markiertes Phalloidin auf die Ausstriche aufgebracht. Die Auswertung erfolgte anhand der unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Fluoreszenz der verschiedenen Zellen. Dabei wurde der Grad der Fluoreszenz in keine (-), sehr schwach (+/-), schwach (+) mittel (++) und stark (+++) eingeteilt.

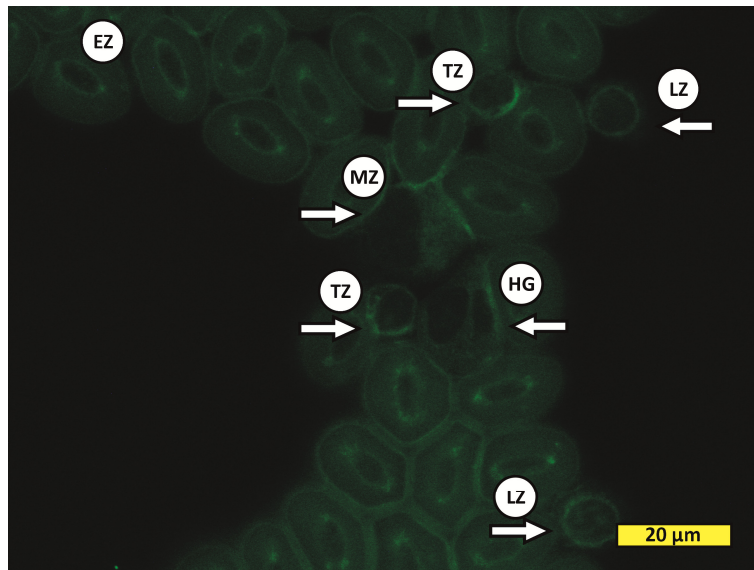
Um die Untersuchung auf einen bestimmten Bestandteil des Zytoskeletts generell als positiv zu werten, wurden, wie bei den Lektinen, mindestens 1 schwach positiver (+) oder mindestens 2 sehr schwach positive (+/-) Ausstriche vorausgesetzt. Um als negativ gewertet zu werden, musste dieser Schwellenwert von 1 schwach positiven (+) oder 2 sehr schwach positiven (+/-) Ausstrichen unterschritten werden. Entsprechend der Fluoreszenz ungefähr der in den Kontrollen, so wurde der Ausstrich ebenfalls als negativ gewertet. Für die Auswertung wurden in der Regel nur fixierte Ausstriche herangezogen, da die Blutzellen unfixiert oft den zahlreichen Schritten der immunhistochemischen Färbungen nicht standhielten. Bis auf wenige Ausnahmen war die Qualität der unfixierten Ausstriche daher mangelhaft. Auch wurden nicht in jedem positiven Ausstrich alle Zelltypen aufgefunden oder waren nicht eindeutig identifizierbar. In diesem Fall wurde dies in der tabellarischen Übersicht angegeben. Die Identifikation und Differenzierung der Blutzellen erfolgte mittels Gegenfärbung der Kerne mit VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI.

In den Abbildungen wurde nur die FITC-Filterebene oder, im Falle des Aktin-Nachweises, die TRICT-Filterebene eingeblendet, um das Hauptaugenmerk auf die Fluoreszenz der markierten Antikörper oder das markierte Phalloidin zu lenken. Auch hier wurden die verschiedenen Zelltypen jeweils in und neben den Abbildungen bezeichnet. Unter den Abbildungen wurden ergänzende Beschreibungen und Bemerkungen hinzugefügt. Die DAPI-Kern-Filterebene und die Leerfilterebene, ohne jegliche Färbung der Zellen, wurden exemplarisch bei den glykohistochemischen Untersuchungen eingeblendet, um den Identifizierungsprozess der Zelltypen zu verdeutlichen (vgl. Bild 79, Bild 82, Bild 87.).

5.1 Auswertung T-Lymphozyten spezifisches Antigen CD4

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 2/10unfix.	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	++
ZM	+
ZP	+
Thrombozyten	
ZK	-
KM	++
ZM	-
ZP	+
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GRM	+/-
ZP	+
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
GRM	++
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	++
Monozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	+

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

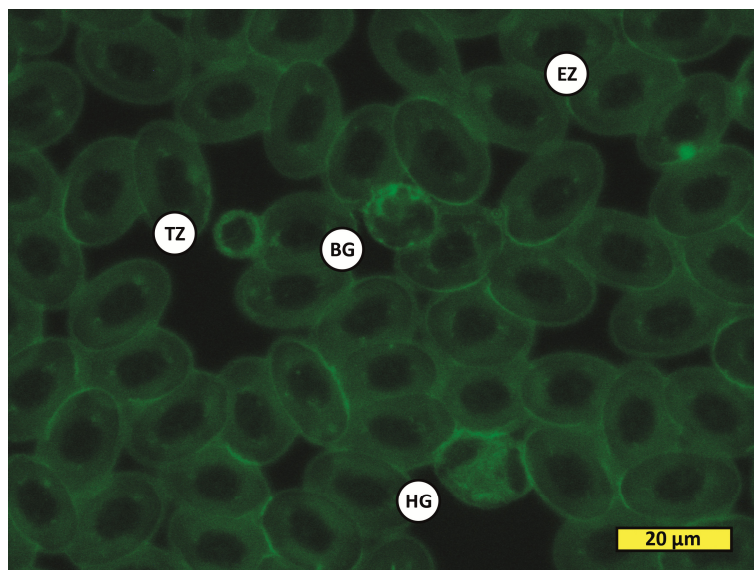


TZ Thrombozyt
 LZ Lymphozyt
 MZ Monozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt
 EZ Erythrozyt

Bild 106: CD4-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.9, immunhistochemischer Nachweis von CD4, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Membran und Kernareal sowie das Zytoplasma der Erythrozyten zeigen sich CD4-FITC positiv. Die Thrombozyten binden im Bereich der Kernmembran und des Zytoplasmas. Das Zytoplasma der Monozyten und Granulozyten geht ebenfalls die Bindung mit dem Antikörper gegen CD4 ein.



TZ Thrombozyt
 BG Basophiler
 Granulozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt
 EZ Erythrozyt

Bild 107: CD4-FITC

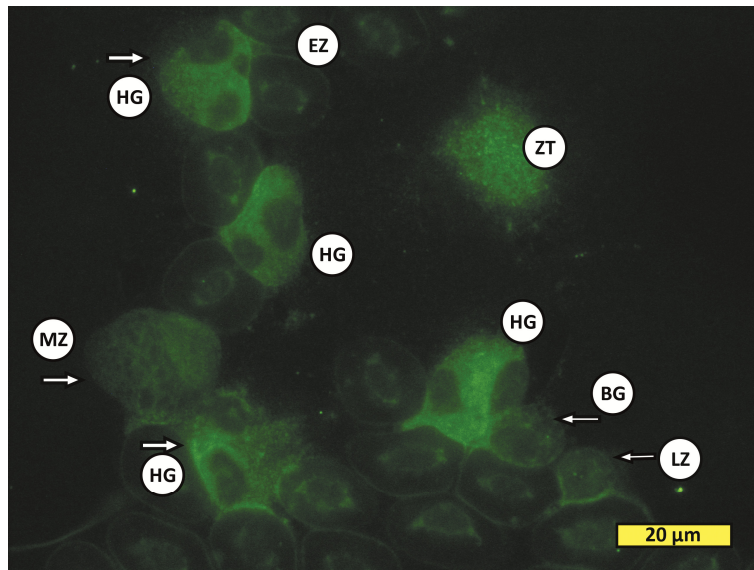
Blutausstrich, Königspinguin Nr.4, immunhistochemischer Nachweis von CD4, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Die Granulamembran der basophilen Granula reagiert positiv mit dem Antikörper gegen CD4.

5.2 Auswertung T-Lymphozyten spezifisches Antigen CD8

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 3/13unfix., 0/10	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	+
KM	++
ZM	++
ZP	-
Thrombozyten	
ZK	+
KM	++
ZM	-
ZP	-
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	+/-
GRM	++
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	n. b.
Lymphozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
ZP	++
Monozyten	
ZK	+
ZM	-
ZP	++

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar



TZ Thrombozyt
LZ Lymphozyt
MZ Monozyt
HG Heterophiler
Granulozyt
BG Basophiler
Granulozyt

EZ Erythrozyt
ZT Zelltrümmer

Bild 108: CD8-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.17, immunhistochemischer Nachweis von CD8, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

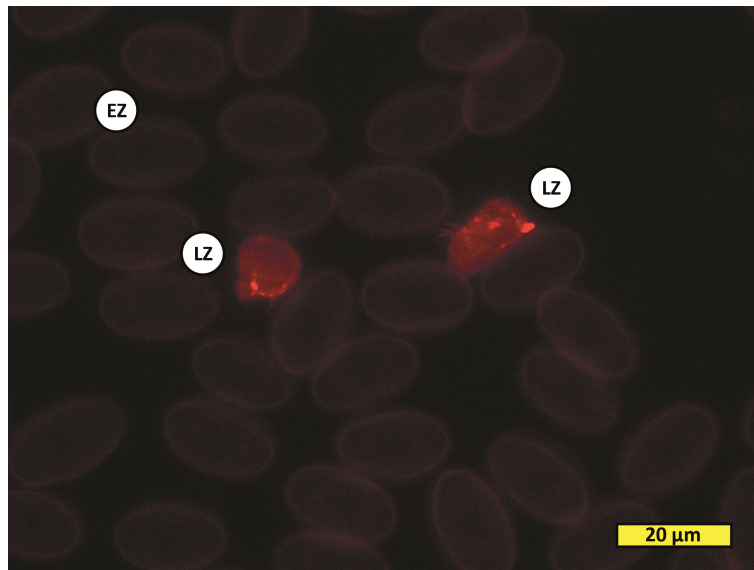
Deutlich positiv auf CD8 reagiert das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten. Schwächer, trotzdem deutlich, fluoreszieren die Monozyten und Lymphozyten. Erythrozyten binden im Kernmembranareal und an der Zellmembran den FITC markierten Antikörper gegen CD8.

5.3 Auswertung Aktin

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 5/5 unfix., 0/5fix.	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
ZM	++
ZP	-
Thrombozyten	
ZK	-
ZM	+
ZP	++
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	++
GR	+++
GRM	-
Eosinophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	+
GR	+
GRM	-
Basophile Granulozyten	n. b.
Lymphozyten	
ZK	-
KM	++
ZM	+
ZP	-
Monozyten	
ZK	++
ZM	-
ZP	+++

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

Phalloidin-TRICT bindet an Aktin, welches als Netz aus Mikrofilamenten direkt unter der Membran der Zellen liegt.



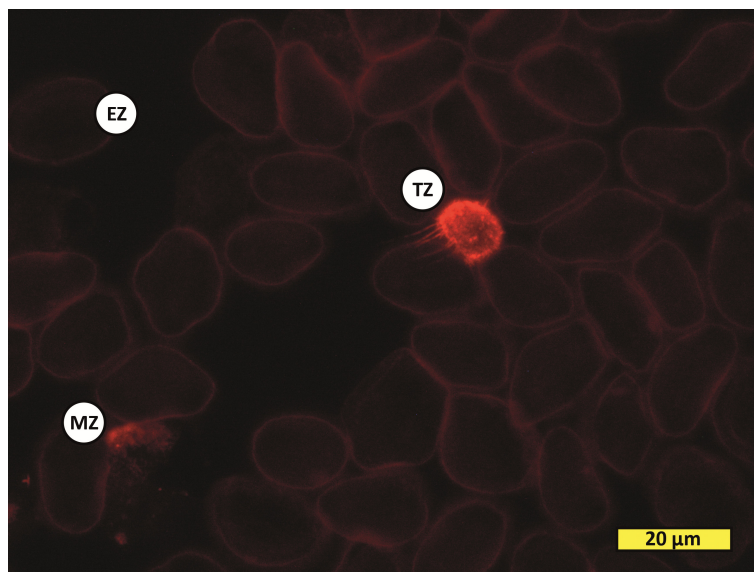
LZ Lymphozyt

EZ Erythrozyt

Bild 109: Aktin-TRICT

Blutausstrich, Königspinguin Nr.8, immunhistochemischer Nachweis von Aktin, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert im TRICT-Filter

Deutlich fluoreszierende Lymphozyten bilden Zellfortsätze aus. Das Aktinnetz fluoresziert aufgrund der Bindung von Phalloidin-TRICT in den Erythrozyten.



TZ Thrombozyt

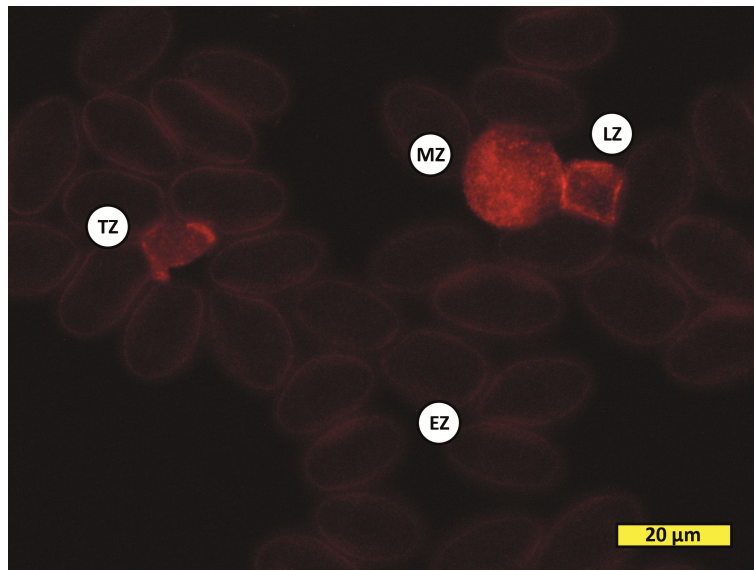
MZ Monozyt

EZ Erythrozyt

Bild 110: Aktin-TRICT

Blutausstrich, Königspinguin Nr.7, immunhistochemischer Nachweis von Aktin, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert im TRICT-Filter

Der Thrombozyt zeigt ca. 10µm lange, fluoreszierende Pseudopodien. Die Erythrozyten fluoreszieren gut erkennbar unmittelbar unter der Zellmembran. Der große Monozyt ist nur undeutlich zu erkennen, weil dieser die Phalloidin-TRICT Markierung in diesem Fall nur schwach angenommen hat.

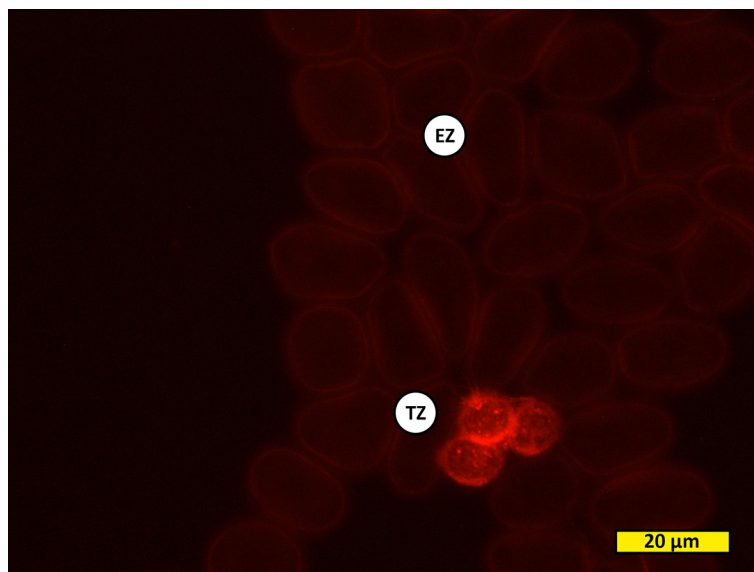


TZ Thrombozyt
 MZ Monozyt
 LZ Lymphozyt
 EZ Erythrozyt

Bild 111: Aktin-TRICT

Blutausstrich, Königspinguin Nr.8, immunhistochemischer Nachweis von Aktin, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert im TRICT-Filter

Das fluoreszierende Aktinnetz ist in den Zellen deutlich zu erkennen. Der Thrombozyt ist länglicher und kleiner als der Lymphozyt. Der Monozyt ist deutlich größer als die restlichen Zellen.

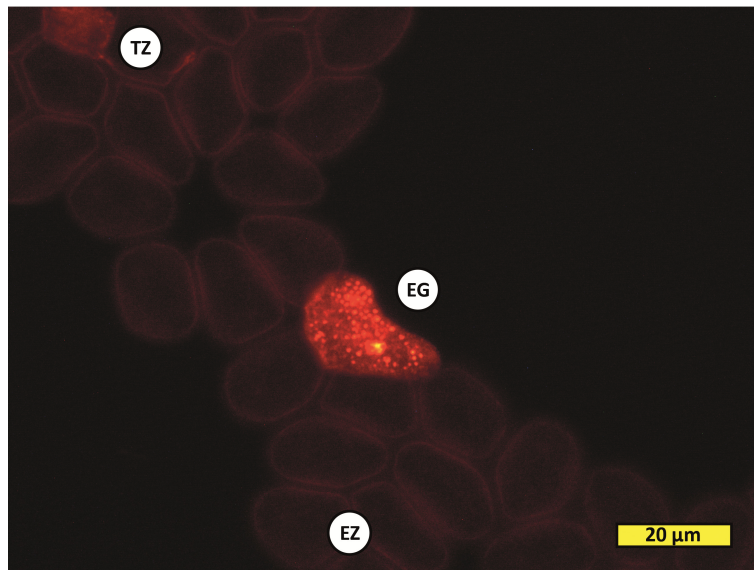


TZ Thrombozyt
 EZ Erythrozyt

Bild 112: Aktin-TRICT

Blutausstrich, Königspinguin Nr.7, immunhistochemischer Nachweis von Aktin, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert im TRICT-Filter

Thrombozytenaggregat mit deutlich sichtbaren Pseudopodien. Erythrozyten fluoreszieren direkt unter der Zellmembran.



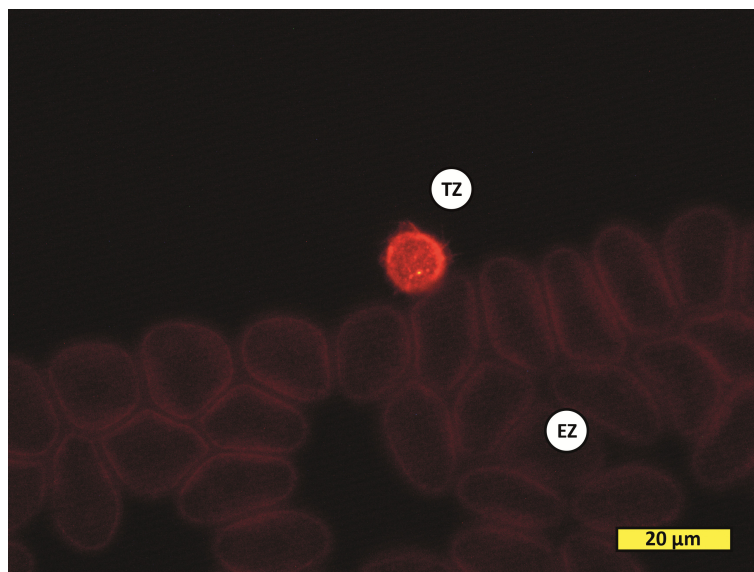
EG Eosinophiler
Granulozyt

TZ Thrombozyt
EZ Erythrozyt

Bild 113: Aktin-TRICT

Blutausstrich, Königspinguin Nr.8, immunhistochemischer Nachweis von Aktin, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert im TRICT-Filter

Die Granula des eosinophilen Granulozyten sind kreisrund und binden sehr stark TRICT markiertes Phalloidin. Das Zytoplasma zeigt ebenfalls schwache Fluoreszenz.



TZ Thrombozyt

EZ Erythrozyt

Bild 114: Aktin-TRICT

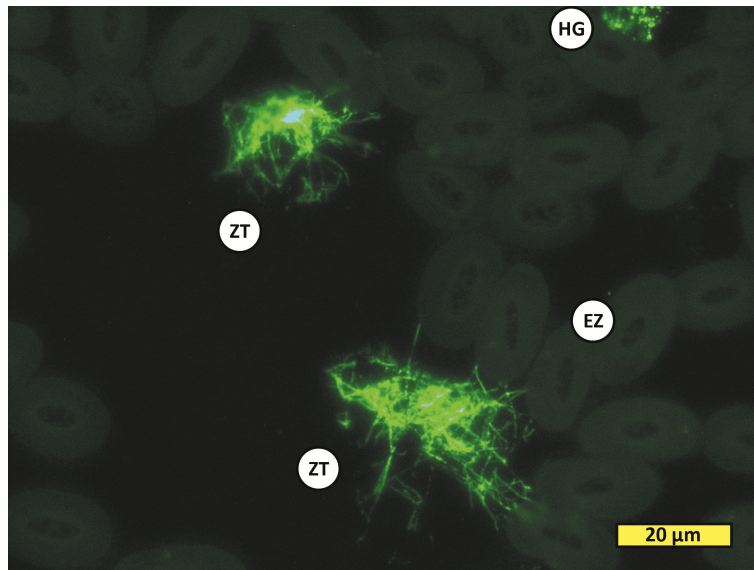
Blutausstrich, Königspinguin Nr.8, immunhistochemischer Nachweis von Aktin, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20μm, fotografiert im TRICT-Filter

Thrombozyt mit deutlich sichtbaren Pseudopodien. In den Erythrozyten ist die submembranöse Fluoreszenz des, an Aktin gebundenen, TRICT markierten Phalloidin zu erkennen.

5.4 Auswertung Vimentin

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 2/5fix., 2/5unfix.	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
ZP	+
Thrombozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	-
GR	+
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	-
ZP	++
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	n. b.
Lymphozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	+
Monozyten	n. b.

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

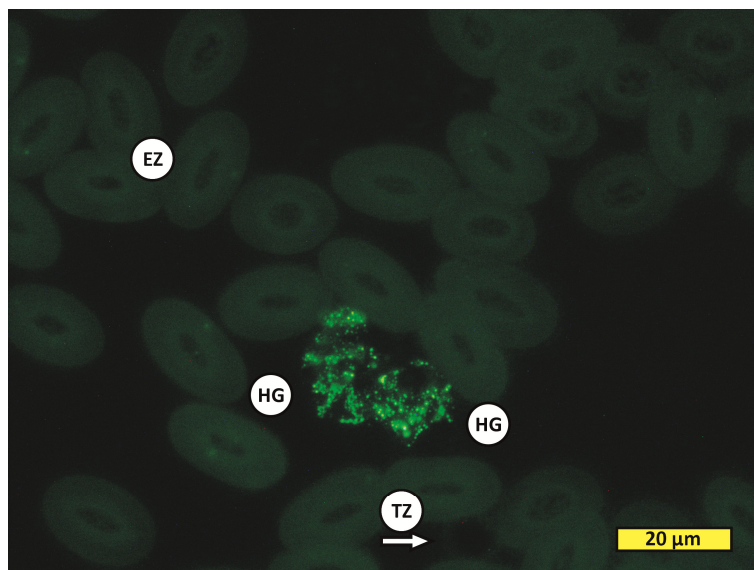


EZ Erythrozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt
 ZT Zelltrümmer

Bild 115: Vimentin-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Das durch Zerstörung von Zellen freigewordene Vimentin bindet den markierten Antikörper und erzeugt freie fluoreszierende Strukturen. Die Erythrozyten zeigen schwache Fluoreszenz um den Zellkern und im Zytoplasma.



EZ Erythrozyt
 HG Heterophiler
 Granulozyt
 TZ Thrombozyt

Bild 116: Vimentin-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.16, immunhistochemischer Nachweis von Vimentin, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Im Zytoplasma der heterophilen Granulozyten sind grobkörnige, fluoreszierende Strukturen zu erkennen. Sehr schwach fluoreszieren Strukturen im Zytoplasma des Thrombozyten.

5.5 Auswertung Tubulin

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 4/5unfix.,0/5	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	+
ZP	-
Thrombozyten	
ZK	-
KM	++
ZM	-
ZP	+
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	+
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	n. b.
Lymphozyten	
ZK	-
KM	++
ZM	-
ZP	+
Monozyten	n. b.

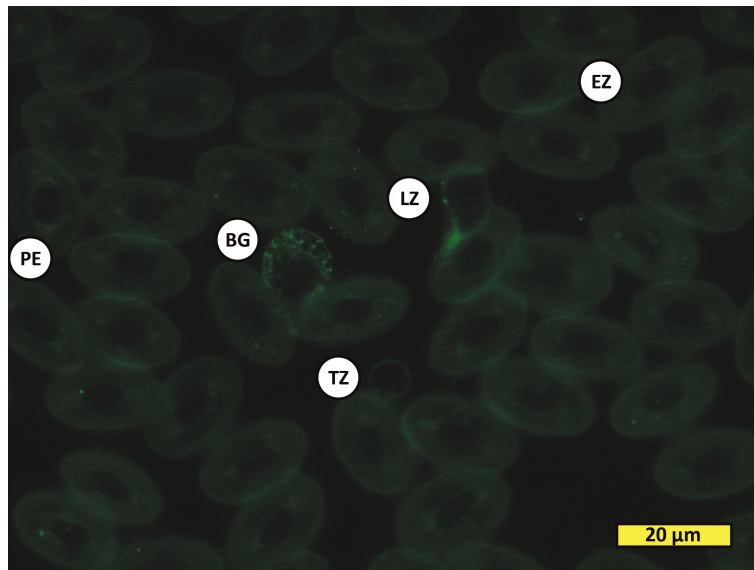
ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

Die unfixierten Zellen haben durch die immunhistochemischen Untersuchungen stark gelitten, weshalb keine guten Photographien angefertigt werden konnten.

5.6 Auswertung Myosin

ANZAHL POSITIV/GESAMTANZAHL: 1/5unfix.,0/5fix.	
Zellen	Stärke der positiven Reaktion
	- (keine), +/- (sehr schwach),+ (schwach),++ (mittel),+++ (stark)
Erythrozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	++
ZP	+/-
Thrombozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
ZP	+
Heterophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	+/-
Eosinophile Granulozyten	n. b.
Basophile Granulozyten	
ZK	-
ZM	-
GR	-
GRM	+
Lymphozyten	
ZK	-
KM	+
ZM	-
ZP	+
Monozyten	
ZK	-
ZM	-
ZP	+

ZK Zellkern, ZM Zellmembran, ZP Zytoplasma, KM Kernmembran, GR Granula, GRM Granulamembran, GRP Granulaplasma, n.b. nicht beurteilbar

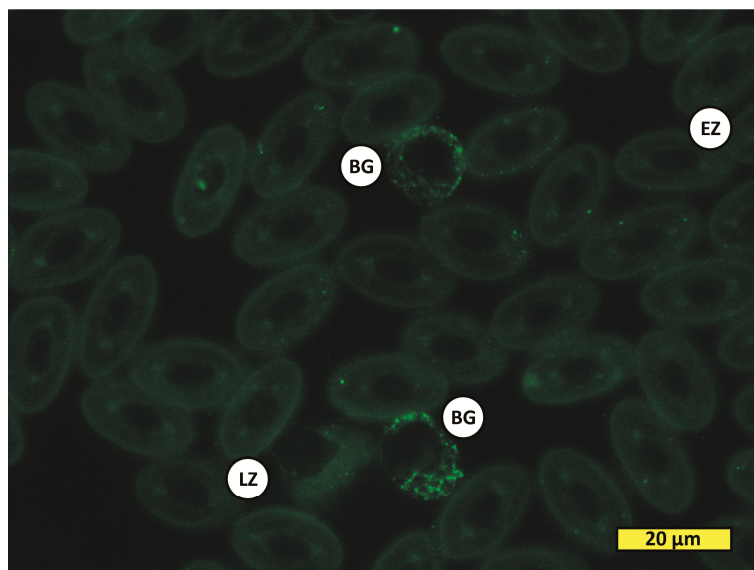


EZ Erythrozyt
 PE Proerythrozyt
 TZ Thrombozyt
 LZ Lymphozyt
 BG Basophiler
 Granulozyt

Bild 117: Myosin-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.9, immunhistochemischer Nachweis von Myosin, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Myosin zeigt sich in der Granulamembran der basophilen Granulozyten, im Zytoplasma der Thrombozyten, Lymphozyten, Erythrozyten sowie in Umgebung der Erythrozytenkerne und der Zellmembran der roten Blutzellen. Die Kernmembran der Lymphozyten reagiert ebenfalls positiv.



EZ Erythrozyt
 LZ Lymphozyt
 BG Basophiler
 Granulozyt

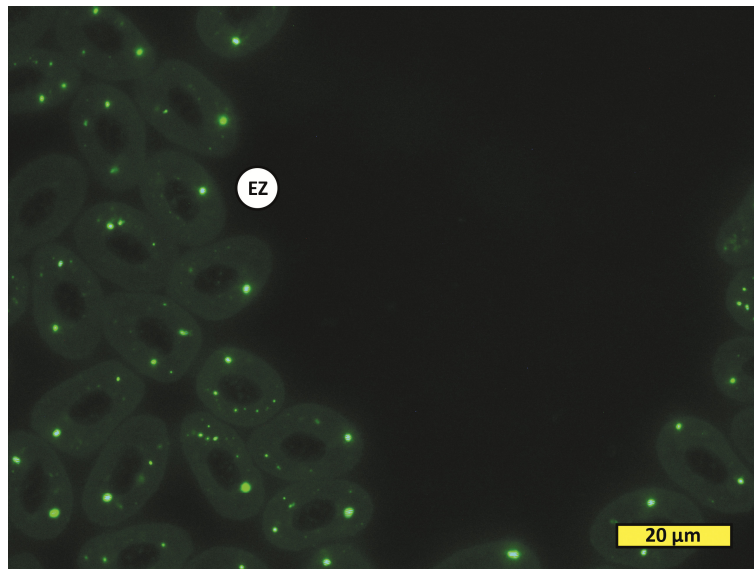
Bild 118: Myosin-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.9, immunhistochemischer Nachweis von Myosin, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Die basophilen Granulozyten zeigen eine starke Affinität zu Myosin-FITC im Bereich der Granulamembran. Die Erythrozyten binden Myosin-FITC im Bereich um die Zellkerne sowie im Zytoplasma und an der Zellmembran. Das Zytoplasma und die Kernmembran der Lymphozyten reagieren positiv.

5.7 Auswertung Panzytokeratin

Der Schwellenwert von 1 schwach positiven (+) oder 2 sehr schwach positiven (+/-) Ausstrichen, um als positiv gewertet zu werden, wurde nicht überschritten. Die Fluoreszenz war zu schwach oder entsprach in etwa der in den Kontrollen. Die Untersuchung auf Panzytokeratin wurde somit als negativ gewertet.



EZ Erythrozyt

Bild 119: Panzytokeratin-FITC

Blutausstrich, Königspinguin Nr.1, Gegenfärbung mit DAPI, scale bar: 20µm, fotografiert mit FITC-Filter

Die stark fluoreszierenden, granulären Strukturen in den Erythrozyten sind als Artefakte zu werten. Die Fluoreszenz des Erythrozytenplasmas entspricht den Kontrollen und wird als Eigenfluoreszenz gewertet.

5.8 Auswertung Eosinophil Major Basic Protein (EMBP)

Der Schwellenwert von 1 schwach positiven (+) oder 2 sehr schwach positiven (+/-) Ausstrichen, um als positiv gewertet zu werden, wurde nicht überschritten. Die Fluoreszenz war zu schwach oder entsprach in etwa der in den Kontrollen. Die Untersuchung auf Eosinophil Major Basic Protein (EMBP) wurde folglich als negativ gewertet.

Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper Mouse anti-human Eosinophil Major Basic Protein (EMBP) (AbD SEROTEC, Kidlington) reagierte nicht mit den Blutzellen des Königspinguins.

V. Diskussion

In meiner Arbeit wurden zum ersten Mal die Blutzellen des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) mittels lichtmikroskopischer, elektronenmikroskopischer, glykohistochemischer und immunhistochemischer Untersuchungen genau charakterisiert. Die Ergebnisse werden durch detaillierte Aufnahmen der verschiedenen Blutzellen verdeutlicht. Des Weiteren wurde im Zuge dieser Arbeit eine modifizierte Färbung zur besseren Darstellung der unterschiedlichen Zelltypen beim Vogel entwickelt, nämlich die nach Bitai modifizierte May-Grünwald-Färbung. Ferner wurde die Größe der Zellen im Mikroskop ermittelt. Damit kann diese Arbeit als solider Grundstock für weitere funktionelle und klinische Untersuchungen des Pinguinblutes fungieren. In meiner Arbeit werden die Blutzellen des Königspinguins ausführlich beschrieben und abgebildet. Anhand von ca. 1300 Ausstrichen von 14 Tieren wird die Morphologie der Zellen des Königspinguins charakterisiert. Dabei haben sich für die einzelnen Blutzellen jeweils typische Details gezeigt, die licht- und fluoreszenzmikroskopisch festgehalten wurden. Die Abbildungen in dieser Arbeit können folglich als Referenz für zukünftige Arbeiten bei Fragen zur Identifikation, Differenzierung und Morphologie der Blutzellen beim Königspinguin (*Aptenodytes patagonicus*) herangezogen werden. In den folgenden Ausführungen werden meine Ergebnisse kritisch betrachtet und in den Forschungskontext eingeordnet. Weiter wird dabei ein Ausblick auf mögliche weiterführende Studien am Pinguinblut gegeben.

Die Blutproben für meine Untersuchungen wurden im Loro Parque Teneriffa mit freundlicher Genehmigung der Loro Parque Fundación von 17 Königspinguinen (*Aptenodytes patagonicus*) entnommen. Alle Werte der Blutproben befanden sich innerhalb des von Cranfield in „Zoo and Wild Animal Medicine“ angegebenen Referenzbereichs (Cranfield, 2003). Die maschinelle Auszählung und automatisierte Zählverfahren des Blutbildes des Königspinguins sind als fraglich bis ungeeignet zu bewerten, da die einzelnen Blutzellen, selbst im Ausstrich unter dem Lichtmikroskop, kaum voneinander zu unterscheiden sind. Eine automatisierte Auszählung der Blutzellen ist beim Vogel aufgrund der Tatsache schwierig, dass alle Zellen kernhaltig sind. Beim Königspinguin wirkt zudem erschwerend, dass sich die heterophilen Granulozyten kaum von den eosinophilen Granulozyten unterscheiden lassen und die basophilen Granulozyten sich nur mäßig gut in den gängigen Färbungen anfärben lassen.

Für die lichtmikroskopische Differenzierung der Blutzellen des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) wurden 13 verschiedene Färbeverfahren herangezogen: Fünf

Übersichtsfärbungen (Diff-Quick Haema-Schnellfärbung, Giemsa-Färbung, May-Grünwald-Färbung, Pappenheim-Färbung und die während dieser Arbeit nach Bitai modifizierte May-Grünwald-Färbung) sowie acht substrathistochemische Färbungen (Toluidinblau-Färbung, Periodic acid Schiff-Reaktion - PAS, PAS acetyliert, PAS methyliert, PAS mit Amylase Vorbehandlung, Alcianblau bei pH1, Alcianblau bei pH2,5 und Sirius-Red-Färbung).

Keine der bisher verwendeten Färbungen war beim Vogel uneingeschränkt zur Differenzierung aller Zelltypen im Blut geeignet. Entweder mussten die Zellen allein anhand der Kerne unterschieden werden, oder das Augenmerk konzentrierte sich auf die selektive Anfärbung der Granula der verschiedenen Blutzellen. Mit der Modifikation der May-Grünwald-Färbung nach Bitai ist es gelungen eine neue Färbevariante zu etablieren, mit der alle Zelltypen bereits bei Übersichtsvergrößerung klar identifiziert werden können. Bei den basophilen Granulozyten wurden in den gängigen Färbungen häufig entspeicherte Granula beobachtet, sodass hier eine Unterscheidung zu aktiven Thrombozyten oder Lymphozyten oft als schwierig einzustufen war. Die Differenzierbarkeit anhand eindeutiger Farbunterschiede zwischen heterophilen und basophilen Granulozyten ist eine deutliche Verbesserung zu den bisherigen Färbungen von Blutausstrichen des Vogels. Da meine Färbung simpel und schnell durchzuführen ist, könnte die nach Bitai modifizierte May-Grünwald-Färbung die Basis für eine sichere, automatisierte, maschinelle Auswertung des Vogelblutes liefern.

Die Erythrozyten des Königspinguins zeigen sich größer als bisher in der Literatur beschrieben (Nicol et al., 1988; Fayolle et al., 2000; Clark et al., 2009; Prinzinger et al., 2012). Es sind längliche, ovale Zellen mit zentralem, ovalem Zellkern, homogenem Zytoplasma und glatter Zelloberfläche. Im Blutausstrich können zudem in physiologischer Menge Proerythrozyten (unreife Erythrozyten), mit geringfügig rundlicherem Kern und lockerer gepacktem Chromatin, nachgewiesen werden. Die Größe der Erythrozyten wird mit $14,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ Länge und $9,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ Breite angegeben (Fayolle et al., 2000). In meinen Untersuchungen wurden für die roten Blutzellen eine Länge von $21,15 \pm 1,07 \mu\text{m}$ und eine Breite von $14,05 \pm 0,73 \mu\text{m}$ gemessen. Die Kerne sind $8,19 \pm 0,53 \mu\text{m}$ lang und $3,78 \pm 0,52 \mu\text{m}$ breit gemessen worden. Das ist deutlich größer als bisher beschrieben. In der Literatur wird angegeben, dass Tauchvögel im Mittel 10% längere und 5% breitere Erythrozyten aufweisen als andere Vögel (Prinzinger et al., 2012). Ich konnte in meinen Untersuchungen zeigen, dass die Erythrozyten des Königspinguins sogar ca. 69% länger und ca. 21% breiter sind als der angegebene Durchschnitt für Vogelerythrozyten ($12,5 \pm 1,3 \mu\text{m}$ Länge und $6,8 \pm 0,9 \mu\text{m}$ Breite) (Nicol et al., 1988). Selbst für Tauchvögel ist dies sehr groß und mag als

eine weitere physiologische Anpassung des Königspinguins an sein typisches Tauchverhalten angesehen werden. Der experimentelle Beweis, dass die übergroßen Zellen auch außergewöhnlich viel Hämoglobin zum verbesserten Sauerstofftransport enthalten, steht allerdings noch aus.

Die Thrombozyten des Königspinguins zeigen sich, wie auch in der Literatur bei anderen Spezies beschrieben, als meist im Aggregat vorliegende, runde bis ovale Zellen, von $6,54 \pm 2,00 \mu\text{m}$ Länge und $5,97 \pm 1,53 \mu\text{m}$ Breite, mit einem ovalen bis runden Zellkern. Häufig sind Pseudopodien und granuläre Einschlüsse sowie Vakuolen im Zytoplasma zu erkennen. Etwaige unreife Thrombozyten sind in Ausstrichen nicht auszumachen. Beim Huhn konnten in den Thrombozyten eosinophile Granula an den Zellpolen nachgewiesen werden (Doneley, 2007; Gantert, 2013), beim Königspinguin konnten diese nicht beobachtet werden.

Heterophile Granulozyten des Königspinguins sind unregelmäßig geformte, längliche, annähernd ovale oder gestreckte Zellen mit unterschiedlichen Granula, welche rund, lanzett- oder tropfenförmig im farblosen Zytoplasma liegen. Der multilobuläre, hypersegmentierte Zellkern besteht aus grobkörnigem Chromatin. Die Größe der heterophilen Granulozyten beträgt $21,33 \pm 2,87 \mu\text{m}$ in Länge und $12,32 \pm 2,09 \mu\text{m}$ in Breite. Die Granula sind $1,56 \pm 0,42 \mu\text{m}$ lang und $0,83 \pm 0,20 \mu\text{m}$ breit. Wie beispielsweise beim Huhn, sind auch beim Königspinguin dies die am häufigsten vorkommenden Granulozyten (Prinzinger et al., 2012; Gantert, 2013).

Bei den eosinophilen Granulozyten des Königspinguins handelt es sich ebenfalls um unregelmäßig geformte Zellen, die rund, oval, länglich oder anders ausgebreitet erscheinen. Die Granula im ebenfalls farblos erscheinenden Zytoplasma sind nur rund, haben aber beinahe dieselbe Größe wie die der Heterophilen. Der Zellkern besteht auch hier aus grobkörnigem Chromatin und ist gelappt. Die Größe differiert zu den heterophilen Granulozyten nicht erkennbar und beträgt $21,33 \pm 2,87 \mu\text{m}$ in Länge und $12,32 \pm 2,09 \mu\text{m}$ in Breite. Mit keiner Färbemethode kann eine selektive Darstellung der eosinophilen Granulozyten des Königspinguins erreicht werden. Die eosinophilen Granulozyten unterscheiden sich nur derart geringfügig von den heterophilen Granulozyten, dass diese selbst bei genauester Betrachtung kaum von diesen zu differenzieren sind. Bei allen angewandten Färbemethoden konnte kein deutlicher Unterschied ausgemacht werden. Bei der in der Literatur zur Identifikation der Eosinophilen im Säugerblut angegebenen Sirius-Red-Färbung (Wehrend et al., 2004), zeigen sich auch die Heterophilen rosarot angefärbt,

weshalb keine eindeutige Unterscheidung von den heterophilen Granulozyten erreicht werden konnte. Diese Problematik konnte auch beim Huhn beobachtet werden (Gantert, 2013). Die nach Bitai modifizierte May-Grünwald-Färbung erlaubt noch am ehesten die Differenzierung dieser beiden Zelltypen.

Die basophilen Granulozyten des Königspinguins sind kleiner und rund. Sie haben einen nur selten gelappten, ebenfalls runden bis ovalen Nukleus. Die Größe der basophilen Granulozyten beträgt $12,51 \pm 1,56 \mu\text{m}$. Die Granula sind $1,56 \pm 0,23 \mu\text{m}$ groß und nehmen neben dem Kern den Großteil des Lumens der Zelle ein. Die Granula dieser Zellen färbten sich, wie bereits erwähnt, in den gängigen Färbungen häufig nicht wie gewünscht basophil an. Es zeigten sich entfärbte oder entspeicherte Granula, die sich vakuolenähnlich als kreisrunde, nicht angefärbte Stellen um den blassen oder teils dunklen Zellkern innerhalb der Zellmembran darstellten. Dieses spezielle Anfärbeverhalten wurde in der Literatur bei Säugern und Vögeln bereits beschrieben (Sinowatz und Hees, 2006; Doneley, 2007; Clark et al., 2009) und scheint bei Königspinguinen besonders ausgeprägt zu sein, was eine Unterscheidung zu aktivierten Lymphozyten oder Thrombozyten besonders schwierig macht. Dies konnte ebenfalls beim Huhn beobachtet werden (Gantert, 2013). Die nach Bitai modifizierte Färbung zeigt hier eine deutliche Verbesserung der Differenzierbarkeit dieses Zelltyps.

Die Lymphozyten des Königspinguins sind $14,80 \pm 3,12 \mu\text{m}$ lange und $12,08 \pm 1,78 \mu\text{m}$ breite, annähernd runde Zellen mit einem exzentrisch oder zentral gelegenen, runden, abgeflachten oder eingekerbten Zellkern mit hohem Nukleus/Zytoplasma-Verhältnis. Der Kern zeigt dicht gepacktes Chromatin. Lymphozyten variieren stark in Form und Größe, von klein und rundlich bis größer und unregelmäßig strukturiert. Das basophil anfärbbare Zytoplasma weist oft granuläre Einschlüsse und Pseudopodien auf. Große Lymphozyten sind im Blutausrich nur schwer von Monozyten zu unterscheiden, wie auch in der Literatur beschrieben (Sinowatz und Hees, 2006). Die Lymphozyten werden auch in kleine, mittlere und große Lymphozyten eingeteilt, wobei die großen als selten vorkommend beschrieben werden (Prinzinger et al., 2012). Diese Einteilung konnte so nicht nachvollzogen werden, da die Größen der Lymphozyten eher ein Kontinuum darstellen und daher keine klaren Gruppen abgrenzbar waren.

Die Monozyten des Königspinguins sind unregelmäßige, annähernd oval bis gestreckt oder anders ausgebreitete Zellen mit einem blassen, mäßig dicht kondensierten, ebenfalls sehr formvariablen Nukleus. Sie sind $20,72 \pm 3,61 \mu\text{m}$ lang und $15,67 \pm 3,90 \mu\text{m}$ breit, selten sogar

30µm lang. Wie erwartet, sind sie die größten im Blutausschlag zu findenden Zellen (Prinzinger et al., 2012). Bei Aktivierung erscheint das Zytoplasma aufgrund zahlreicher Vakuolen regelrecht schaumig. Die Zelloberfläche ist nicht glatt und bildet häufig Pseudopodien aus, wie schon mehrfach in der Literatur beschrieben. Die Zellen bildeten sich wie erwartet ab (Maxwell, 1974; Sinowatz und Hees, 2006; Doneley, 2007; Scholz, 2012).

Die Ultrastruktur der Blutzellen des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) wurde mittels Transmissionselektronenmikroskops ermittelt. In dieser Arbeit werden alle Zelltypen des Königspinguins ultrastrukturell beschrieben. 3 Tieren wurde hierfür Blut entnommen und bearbeitet. Außer den Ergebnissen von Maxwell (1978), der die eosinophilen Granulozyten des Königspinguins untersuchte, gibt es bisher keine elektronenmikroskopische Untersuchung der Blutzellen dieses Vogels (Maxwell, 1978).

Ein reifer Erythrozyt des Königspinguins stellt sich als längliche, ca. 20µm lange und 10µm breite Zelle mit einem zentral gelegenen, heterochromatischen Kern dar. Vereinzelt sind im ansonsten homogenen Zytoplasma Anschnitte von Mitochondrien zu erkennen, welche meist in Kernnähe lokalisiert sind. Dies deckt sich mit den Ergebnissen beim Huhn (*Gallus gallus*) und beim Strauß (*Struthio camelus*). Der perinukleäre Raum, der beim Huhn beschrieben wird, ist beim Königspinguin nicht auszumachen (Scholz, 2012; Gantert, 2013).

Die Thrombozyten des Königspinguins sind 3,5-6,5µm große, rundliche Zellen, deren heterochromatischer Zellkern fast das gesamte Zellvolumen ausfüllt. Der Nukleus weist außerdem euchromatische Bereiche auf. Das Zytoplasma bildet Pseudopodien und häufig relativ große Vakuolen aus. Bei Aktivierung ist im Zytoplasma eine deutliche „Schleifenbildung“, also die Bildung sehr großer Vakuolen zu erkennen. Elektronendichte granuläre Einschlüsse zeigen sich ebenfalls im Zytoplasma, ähnlich wie beim Huhn und beim Strauß (Scholz, 2012; Gantert, 2013). Die Thrombozyten des Königspinguins ähneln generell denen anderer Spezies, was auch schon Maxwell (1974) beschrieben hat (Maxwell, 1974).

Die Leukozyten des Königspinguins stellen sich unter dem Transmissionselektronenmikroskop als unregelmäßige Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern und nicht glatter Zelloberfläche dar. Die Granula weisen verschiedene Längen und Größen auf und unterscheiden sich in Elektronendichte, Form und Häufigkeit. Manche Granula zeigen ein Zentralareal von geringerer und stärkerer Elektronendichte. Die Zellkerne sind stark segmentiert und multilobulär. Verschiedene Zellorganellen können im Zytoplasma ausgemacht werden. Die Monozyten und Lymphozyten des Königspinguins

unterscheiden sich nicht oder nur sehr geringfügig von denen anderer Spezies, wobei der Unterschied lediglich in der Größe liegt. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Maxwell (1974) überein (Maxwell, 1974).

Heterophile Granulozyten stellen sich als langgestreckte Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern dar. Ihre Größe beträgt ca. 22µm. Der segmentierte Zellkern weist eu- und heterochromatische Areale auf. Drei unterschiedliche Granulatypen sind zu erkennen. Typ 1 ist ca. 1µm groß und 0,5µm breit, länglich, oval bis lanzett- oder tropfenförmig und weist ein kreisrundes, weniger oder mehr elektronendichtes, zentrales Areal auf. Durch das elektronendichte Zentralareal in der homogenen, weniger elektronendichten Matrix der Granula ergibt sich die typische „Spiegeleiform“. Das Zentralareal entspricht den in der Literatur beschriebenen „circular central bodies“. Typ 2 ist kleiner, ca. 0,7µm groß und rund. Die dritte Granula-Art ist deutlich elektronendichter als Typ 1 und 2 und ebenfalls rund. Des Weiteren sind im Zytoplasma Teile des Golgi-Apparates zu sehen, dunkle zytoplasmatische Einschlüsse sowie kleine Vakuolen. Wie beim Huhn sind im Falle des Königspinguins alle 3 Typen von Granula nachweisbar. Vorhandensein und Beschaffenheit dieser Granula entspricht den Beobachtungen von Gantert (2013) (Gantert, 2013). Der Strauß hingegen hat nur zwei Typen Granula und zeigt keine „circular central bodies“ (Scholz, 2012).

Basophile Granulozyten des Königspinguins sind runde, durchschnittlich 13µm große Zellen. Verhältnismäßig große (ca. 1,5µm), homogene Granula von variierender Elektronendichte, füllen, neben dem Zellkern, nahezu das gesamte Lumen der Zelle. Der Nukleus besteht aus Hetero- und Euchromatin. Beim Strauß sind diese Zellen mit 8µm kleiner, und weisen kleinere Granula auf (Scholz, 2012). Beim Huhn sind zwei verschiedene Granulatypen bei basophilen Granulozyten beschrieben (Daimon und Caxton-Martins, 1977). Eine solche Unterscheidung ließ sich beim Pinguin nicht nachweisen.

Eosinophile Granulozyten des Königspinguins zeigen sich als annähernd runde, länglich bis unregelmäßig ausgebreitete Zellen. Im Zytoplasma liegen homogene, runde Granula von mittlerer Elektronendichte und ca. 20-90nm Größe. Der multilobuläre Zellkern weist periphere heterochromatische und zentral euchromatische Bereiche auf. Im Zytoplasma sind Vakuolen und Zellorganellen auszumachen. Maxwell (1978) beschreibt in seiner Untersuchung von eosinophilen Granulozyten verschiedener Spezies 3 Gruppen von Granulatypen: mit kristallinen Einschlüssen, mit nicht-kristallinen Einschlüssen und mit homogener Matrix. Königspinguine gehören, wie das Huhn und die Taube, zur dritten

Gruppe, was auch in dieser Arbeit festgestellt werden konnte (Maxwell, 1978; Gantert, 2013).

Lymphozyten sind rundliche bis ovale, teils unregelmäßig geformte Zellen, ca. 4-15µm groß, mit großem Nucleus. Der Zellkern weist teilweise peripher gelegene heterochromatische Bereiche auf, während zentral meist euchromatische Areale zu finden sind. Der Nucleus liegt zentral oder exzentrisch und ist oft abgeflacht, verformt oder eingekerbt. Oft sind Pseudopodien als zytoplasmatische Ausläufer zu finden. Zellorganellen wie Mitochondrien, vereinzelte Granula mit elektronendichtem Inhalt oder Vakuolen sind im Zytoplasma zu finden. Diese Beobachtungen decken sich mit denen von Maxwell (1974) bei verschiedenen Spezies und von Gantert (2013) beim Huhn (Maxwell, 1974; Gantert, 2013).

Monozyten des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) sind durchschnittlich 15-23µm groß, je nach Anschnitt und zeigen einen hypersegmentierten Nucleus und reichlich Zytoplasma. Ihre Form ist grob rundlich, teilweise auch beliebig und unregelmäßig ausgedehnt. Verschiedenste Zellorganellen wie raues Endoplasmatisches Reticulum, Vesikel mit elektronendichtem Inhalt, Glykogenpartikel sowie Mitochondrien sind zu finden. Zahlreiche Vakuolen verleihen das typische „schaumige“ Aussehen. Die Morphologie dieser Zellen ist denen des Straußes und des Huhnes sehr ähnlich (Scholz, 2012; Gantert, 2013). Vereinzelt konnten jedoch beim Königspinguin Monozyten von bis zu 30µm Größe nachgewiesen werden.

Es wurden mittels einer Palette von Lektinen glykohistochemische Untersuchungen an den Blutzellen des Königspinguins durchgeführt. Dazu wurden die FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) markierten Lektine ConA, PSA, LCA, RCA, PNA, VAA, SJA, SBA, GSL-1, DBA, SNA, WGA, WGAs, UEA 1, PHA-L, MAI und PHA-E verwendet.

Meine Ergebnisse zeigen, dass Färbeprotokolle von Blutausrichen beim Vogel, die unfixierte, nicht mit Methanol behandelte Blutausriche verwenden, kaum auswertbar sind, da die Blutzellen dabei stark in Mitleidenschaft gezogen werden, sodass eine sichere Beurteilung nahezu unmöglich ist. Für die Auswertung konnten meist nur die vor der Lektinbehandlung in Methanol fixierten Ausriche herangezogen werden, da die Zellen, wie bereits erwähnt, unfixiert zumeist den zahlreichen Schritten des Färbeproganges nicht standhielten. Bis auf wenige Ausnahmen war die Qualität der unfixierten Ausriche mangelhaft. Verbessert werden könnte diese Methodik durch die Verwendung spezieller, angerauter Objektträger, weniger Spülungen mit PBS-Puffer sowie schonenderen Fixierungsmethoden.

Da die Bewertung der Lektine auch von der subjektiven Einschätzung der Fluoreszenzstärke abhängt, wurden dieser Arbeit Abbildungen zum Vergleich von Ergebnis und Bild beigelegt.

Wie in Kapitel IV.4 erläutert, waren die Untersuchungen zu einem Teil positiv, zeigten also eine erkennbare Fluoreszenz, während andere als negativ, also ohne, oder ohne sich von den Kontrollen unterscheidende Fluoreszenz, zu werten waren. Die Eigenfluoreszenz der Zellen wurde berücksichtigt. Eine Untersuchung wurde als positiv gewertet, wenn mindestens 1 schwach positiver (+) oder mindestens 2 sehr schwach positive (+/-) Ausstriche vorhanden waren. Negativ gewertet wurden jene Untersuchungen, bei denen der Schwellenwert von 1 schwach positiven (+) oder 2 sehr schwach positiven (+/-) Ausstrichen unterschritten wurde. Auch bei den Negativkontrollen entsprechender Fluoreszenz wurde der Ausstrich als negativ gewertet.

Nach diesen Kriterien waren die Lektine ConA, PSA, LCA, VAA, SJA, WGA, WGAs, MAI und PHA-E als stark, durchgehend und deutlich positiv, RCA, PNA, GSL-1, DBA und SNA als erkennbar positiv, SBA, UEA 1, und PHA-L als negativ einzustufen. Die Bindung an die einzelnen Zellen und Strukturen ist den Ergebnissen von Kapitel IV.4.1 bis IV.4.17 zu entnehmen und wird an dieser Stelle noch einmal kurz beschrieben. Durch Vorbehandlung mit den korrespondierenden Hemmzuckern konnte die Lektinbindung nicht wesentlich vermindert werden. Bei den am deutlichsten positiven Lektinen ConA, PHA-E, PSA, LCA, WGA und WGAs wurde diese Vorinkubation durchgeführt. Auch eine 10-fach höhere als in der Literatur (Roth, 2011) beschriebene Konzentration brachte nicht den erwarteten Effekt, die Lektinbindung ließ sich nicht abschwächen oder verhindern. Die Lektine banden weiterhin ähnlich stark an die Zielzellen. Es wird empfohlen, für eine Wiederholung des Tests evtl. den Hemmzucker eines anderen Herstellers zu wählen. Vergleichend dazu sind für die Blutzellen des Huhns (*Gallus gallus*) GSL-1, VAA, SBA, DBA und SJA allgemein negativ (Gantert, 2013). Die Vorinkubation mit Hemmzuckern zeigte für ConA, LCA, PSA, WGA und WGAs beim Huhn eine deutliche Abschwächung der Bindung zum jeweiligen Lektin (Gantert, 2013).

Die Lektine lassen sich nach ihrer Zuckerspezifität in Gruppen einordnen. ConA, PSA, LCA sind D-Mannose und D-Glukose spezifisch, RCA, PNA, VAA sind spezifisch für D-Galaktose, SJA, SBA, GSL-1, DBA für N-Acetyl-D-Galaktosamin, SNA spezifisch für D-Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin, WGA spezifisch für N-Acetyl-D-Glucosamin und N-Acetyl-D-Neuraminsäure, WGAs ist spezifisch für N-Acetyl-D-Glucosamin, UEA-1 für L-Fukose und PHA-E, PHA-L und MAI sind spezifisch für Oligosaccharide (Rüdiger und Gabius, 2001;

Gabius, 2011; Roth, 2011). Diese Einordnung wurde aufgrund von Agglutinationsversuchen mit Hemmzuckern (Monosacchariden) getroffen und gilt als stark vereinfacht (Rüdiger und Gabius, 2001; Gabius, 2011; Roth, 2011). Diese Klassifikation lässt bei Lektinbindung an den einzelnen Zelltypen und Strukturen einen Rückschluss auf dort vorhandene Zuckerstrukturen zu, oder, im Falle von Membranbindung, auf eine Glykokalyx mit Beteiligung der jeweiligen Zucker. Zu beachten ist, dass Lektine in ihrer Bindung durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen am Glykan beeinflusst werden sowie durch alternierende Zuckerendungen an den Oligosaccharidketten (Roth, 2011). So reagieren beispielsweise ConA und LCA, trotz gleicher nominaler Zuckerspezifität für Mannose und Glukose, bei verschiedenen Folgezuckern unterschiedlich (Roth, 2011). Auch sich unterscheidende Oligosaccharide mit für ein Lektin spezifischem Zuckerrest können unterschiedliche Bindungsaffinität hervorrufen (Roth, 2011).

Die Erythrozyten des Königspinguins binden an der Membran deutlich ConA, LCA, RCA und WGA, schwach PHA-E und sehr schwach PSA. Die roten Blutzellen zeigen im Zytoplasma eine deutliche Reaktion mit MAI und PNA sowie eine schwache Reaktion mit ConA, LCA, PSA, DBA, RCA, SJA, SNA, VAA, PHA-E, WGA und WGAs. Im Falle von GSL-1, PNA, PSA, SNA, VAA zeigt sich eine deutliche Reaktion um die Kernmembran und eine schwache Reaktion um den Kern bei DBA, MAI, RCA, PNA, SJA, WGAs und PHA-E. Bei Untersuchung auf GSL-1 kommt es zu starker Bindung an die granulären Strukturen im Zytoplasma der Erythrozyten. Auch PSA und RCA binden an globuläre Strukturen im Zytoplasma. Bei diesen Strukturen könnte es sich um die im Elektronenmikroskop nachgewiesenen Mitochondrien handeln. Der Kern selbst ist stets negativ. Im Vergleich dazu binden beim Huhn (*Gallus gallus*) an der Erythrozytenmembran ConA, SNA, WGA und WGAs schwach und selten. Im Zytoplasma ist mit schwach positiver Reaktion SNA beim Huhn nachzuweisen (Gantert, 2013). Beim Strauß (*Struthio camelus*) bindet die Erythrozytenmembran LCA und RCA bei wenigen Präparaten, ConA und WGA binden schwach. Im Plasma zeigt ConA, WGA und WGAs eine schwache Reaktion (Scholz, 2012).

Die Thrombozyten des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) binden an der Membran deutlich MAI, WGA und schwach DBA und zeigen im Zytoplasma eine deutliche Reaktion mit ConA, LCA, VAA, PSA. PSA und ConA binden zudem deutlich an granuläre Einschlüsse im Zytoplasma der Thrombozyten. Schwach binden GSL-1, DBA, MAI, PHA-E, SJA, RCA, WGA und WGAs im Zytoplasma. Eine deutliche Reaktion mit der Kernmembran zeigt sich bei GSL-1. Schwach im Bereich der Kernmembran binden SJA, VAA, PHA-E, WGA und WGAs. Der Kern selbst ist stets negativ. Beim Huhn zeigt sich im Plasma eine Reaktion um den

Zellkern mit ConA, LCA, PSA, SNA, WGA, WGAs und PHA-E. Die Thrombozytenmembran reagiert in wenigen Fällen schwach positiv mit SNA (Gantert, 2013). Beim Strauß reagiert im Vergleich hierzu die Membran der Thrombozyten mit ConA, LCA, WGA, WGAs, PSA, PNA, PHA-L und PHA-E sowie schwach mit RCA (Scholz, 2012).

Heterophile Granulozyten des Königspinguins binden an der Membran deutlich WGA. Schwach fluoresziert ConA-FITC und WGAs-FITC. Im Zytoplasma zeigt sich eine deutliche Reaktion mit ConA, DBA, WGAs, stark bindet PHA-E. Schwach im Zytoplasma fluoreszieren die FITC markierten Lektine PSA, SJA, SNA, VAA und WGA. Die heterophilen Granula binden sehr stark SJA und das Plasma der Granula reagiert sehr stark mit LCA. Eine deutliche Bindung zeigt sich bei MAI, SNA. Die Membran der Granula reagiert deutlich mit RCA. Schwach reagieren die Granula mit GSL-1 und WGAs. Der Kern der heterophilen Granulozyten selbst zeigt keine Fluoreszenz. Vergleichend hierzu bindet beim Huhn ConA, PNA, WGA, und WGAs, die Membran bindet PHA-L, schwach VAA, DBA und PHA-E. Die Lektine RCA, LCA, PSA, WGA, WGAs, PHA-L und ConA zeigen sich im Zytoplasma der Hühner Granulozyten. Die Granula der heterophilen Granulozyten binden schwach bis deutlich ConA, LCA, PNS, PSA, WGA und SNA. Außen um die Granula zeigt sich zudem selten eine Reaktion mit WGAs.

Basophile Granulozyten des Königspinguins binden an der Membran deutlich mit WGA und schwach mit ConA und WGAs. Im Zytoplasma ist eine sehr starke Reaktion mit PHA-E und eine deutliche Reaktion mit DBA auszumachen. Die basophilen Granula reagieren sehr stark mit PSA, die Granulamembran sehr stark mit WGA. Zudem reagieren die Granula deutlich mit ConA und WGAs. Der Kern der basophilen Granula selbst ist stets negativ. Die Blutzellen des Huhns zeigen Membranbindung mit ConA, WGA, WGAs, Zytoplasmabindung mit ConA, LCA, PSA, WGA, WGAs und PHA-E. Die basophilen Granula des Huhnes reagieren stark mit ConA, LCA, PSA, SNA, WGA, WGAs, PHA-E und schwach mit RCA (Gantert, 2013).

Eosinophile des Königspinguins sind, wie oben erwähnt, nicht deutlich von den heterophilen Granulozyten zu unterscheiden, weshalb eine sichere Auswertung der Fluoreszenz dieses Zelltyps nicht vorgenommen werden konnte.

Die Lymphozyten des Königspinguins binden deutlich an der Membran MAI sowie schwach ConA und WGA. Im Zytoplasma zeigt sich eine sehr starke Reaktion mit WGA und WGAs. Deutlich bindet MAI, RCA, VAA und ConA im Zytoplasma der Lymphozyten. Schwach bindet dort auch GSL-1, PSA, SNA, PHA-E und LCA. Im Falle von GSL-1 ist eine deutliche Reaktion mit der Kernmembran zu beobachten. Die Kernmembran bindet zudem schwach SJA.

Granuläre, nicht näher identifizierte Strukturen im Zytoplasma der Lymphozyten binden sehr stark PSA und deutlich LCA. Der Kern selbst ist stets negativ. Beim Huhn zeigt sich die Membran SNA positiv. Das Zytoplasma reagiert mit ConA, LCA, PSA, SNA, RCA und WGAs schwach sowie mit WGA deutlich und stark. Granula in den Lymphozyten reagieren mit ConA, PSA, RCA, WGAs und WGA stark (Gantert, 2013).

Monozyten des Königspinguins binden deutlich WGA im Bereich der Membran. Schwach bindet dort ConA und DBA. RCA, VAA, PHA-E, ConA, WGA und WGAs zeigen im Zytoplasma eine deutliche Reaktion. Schwach zeigen sich im Zytoplasma GSL-1, PSA, LCA und DBA. Granuläre, nicht näher identifizierte Einschlüsse im Zytoplasma der Monozyten reagieren sehr stark mit PSA, deutlich mit LCA und schwach mit ConA. Der Kern zeigt bei GSL-1 schwache Fluoreszenz. Die Kernmembran reagiert schwach mit WGAs. Beim Huhn zeigt im Vergleich dazu die Membran der Monozyten positive Reaktionen mit SNA, WGA und WGAs. Das Zytoplasma fluoresziert bei der Bindung an die FITC markierten Lektine WGA, WGAs, LCA, PSA und SNA. Granuläre Strukturen in den Monozyten des Huhns zeigen sich ConA, LCA, PSA, SNA, WGA und WGAs positiv (Gantert, 2013).

Durch immunhistochemische Untersuchungen wurden T-Lymphozyten spezifische Antigene, eosinophilspezifische Antigene sowie zytoskelettale Anteile, im Speziellen Aktin, Vimentin, Tubulin, Myosin und Panzytokeratin der Blutzellen des Königspinguins untersucht.

Hier konnten ebenfalls meist nur die vor der Untersuchung fixierten Ausstriche ausgewertet werden, da die Zellen in den unfixierten Ausstrichen während der zahlreichen Schritte der immunhistochemischen Färbungen zu stark geschädigt wurden.

Nach den oben und in Kapitel IV.5 beschriebenen Kriterien waren die Untersuchungen auf CD4 und CD8 als positiv, wenn auch nicht T-Lymphozytenspezifisch zu werten.

Aktin zeigte sich deutlich, stark und durchgängig positiv in den unfixierten Präparaten. Die fixierten Ausstriche zeigten keine Fluoreszenz, so dass eine Fixierung mit Methanol vor der immunhistochemischen Untersuchung auf Aktin dementsprechend ungeeignet ist. Vimentin war mit jeweils 2/5, also 40% der fixierten und unfixierten Präparate als positiv zu werten. Tubulin reagierte mit 4/5, also 80% der unfixierten Ausstriche positiv, während Myosin nur bei 1/5, also 20% der unfixierten Ausstriche schwache Fluoreszenz erkennen ließ. Panzytokeratin ließ sich erwartungsgemäß nicht im Blut des Königspinguins nachweisen. Vergleichend hierzu reagierte beim Huhn (*Gallus gallus*) Aktin auch in den

unfixierten Präparaten. Vimentin und Tubulin reagierten in den fixierten Präparaten. Myosin und Zytokeratin konnten von Gantert (2013) beim Huhn nicht nachgewiesen werden (Gantert, 2013).

Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper Mouse anti-human Eosinophil Major Basic Protein (EMBP) (AbD SEROTEC, Kidlington), mit welchem sich bei Säugetieren die eosinophilen Granulozyten spezifisch darstellen lassen, reagierte nicht mit den Granula der eosinophilen Granulozyten des Königspinguins.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen für die einzelnen Zelltypen und Zellstrukturen sind Kapitel IV.5.1 bis IV.5.8 zu entnehmen und nachfolgend hier noch einmal kurz erwähnt.

CD4 zeigt sich beim Königspinguin schwach auf der Erythrozytenmembran und im Zytoplasma der Erythrozyten sowie deutlich an der Kernmembran. Thrombozyten zeigen schwache Bindung an den Antikörper gegen CD4 im Zytoplasma und deutliche Bindung an der Kernmembran. Die heterophilen Granulozyten reagieren schwach positiv im Zytoplasma und sehr schwach an der Granulamembran. Eosinophile Granulozyten konnten aufgrund mangelnder Differenzierbarkeit nicht beurteilt werden. Basophile Granulozyten zeigten deutliche Fluoreszenz an der Granulamembran und schwache an der Kernmembran. Die Lymphozyten schließlich reagierten deutlich im Zytoplasma mit dem markierten Antikörper gegen CD4. Auch die Monozyten des Königspinguins reagierten schwach positiv im Zytoplasma. Zum Vergleich hierzu reagierte der Antikörper zu CD4 beim Huhn tatsächlich fast ausschließlich lymphozytenspezifisch, wenn auch schwach mit Granula im Zytoplasma der Lymphozyten. Die Untersuchung auf CD4 zeigte sich bei den anderen Blutzellen in fixierten Ausstrichen negativ. Unfixiert reagierten alle Blutzellen des Huhns schwach positiv. In unfixierten Ausstrichen zeigte sich teilweise auch das Zytoplasma der heterophilen Granulozyten positiv, was auch beim Menschen bei neutrophilen Granulozyten bei 12% der Proben nachgewiesen werden konnte (Biswas et al., 2003). Zudem zeigt sich auch beim Menschen CD4 auf Monozyten, Lymphozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten (Biswas et al., 2003).

Der FITC markierte Antikörper gegen CD8 bindet sich beim Königspinguin deutlich an der Membran der Erythrozyten und an deren Kernmembran. Es hat auch den Anschein, dass der Kern selbst schwach positiv reagiert. Thrombozyten zeigen deutliche Positivreaktion an der Kernmembran, schwache am Kern und im Zytoplasma. Die heterophilen Granulozyten sind deutlich positiv an der Granulamembran sowie sehr schwach an der Zellmembran.

Eosinophile Granulozyten konnten aufgrund mangelnder Differenzierbarkeit nicht beurteilt werden. Die basophilen Granulozyten sind deutlich positiv im Zytoplasma auf CD8 getestet worden und schwach positiv an der Zellmembran sowie im Kern. Die Lymphozyten zeigen deutliche Fluoreszenz im Zytoplasma und schwache an der Kernmembran. Monozyten sind deutlich positiv im Zytoplasma und schwach positiv am Kern. Vergleichend hierzu reagierte der Antikörper für CD8 (alpha) beim Huhn negativ (Gantert, 2013).

Die Erythrozyten des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) zeigen Aktin direkt unterhalb der Membran, in Form von deutlicher Fluoreszenz aufgrund der Bindung an TRICT (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) markiertes Phalloidin. Das fluoreszierende Areal ist direkt unterhalb der Zellmembran auszumachen. Myosin ist deutlich an der Membran nachweisbar. Tubulin zeigt sich im Nachweis schwach an der Membran. Im Zytoplasma erfolgt eine schwache Reaktion mit Vimentin und Myosin. Die Kernmembran der Erythrozyten zeigt sich schwach positiv für Myosin sowie Tubulin. Der Kern selbst ist stets negativ. Beim Huhn (*Gallus gallus*) zeigt sich Aktin in den Erythrozyten ähnlich wie bei beim Königspinguin. Vimentin und Tubulin konnten beim Haushuhn von Gantert (2013) nicht nachgewiesen werden (Gantert, 2013).

Die Thrombozyten zeigten Aktin in Form von schwacher, submembranöser Fluoreszenz nach Bindung an Phalloidin-TRICT und deutlicher in zytoplasmatischen Ausläufern. Myosin- und Tubulin-Nachweise zeigten schwache Floreszenz. Vereinzelt waren nicht näher identifizierte Strukturen Vimentin positiv. Die Kernmembran zeigte im Tubulin-Nachweis deutliche positive Reaktion. Bis auf das in Hühnerblutzellen nicht nachweisbare Myosin ähnelten die Thrombozyten des Huhns denen des Königspinguins (Gantert, 2013).

Bei heterophilen Granulozyten kann Aktin mit Phalloidin-TRITC ebenfalls submembranös, deutlich sowie schwach im Zytoplasma lokalisiert werden. Myosin kann schwach positiv im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die Granula binden sehr stark Phalloidin-TRICT. Vimentin und Tubulin zeigen sich schwach an den Granula, während eine nur sehr schwache Reaktion mit dem Antikörper gegen Myosin feststellbar ist. Beim Huhn kommt Tubulin punktförmig im Zytoplasma, evtl. als Teil der Zentriolen vor (Gantert, 2013).

Bei den eosinophilen Granulozyten des Königspinguins lässt sich Aktin histochemisch schwach unter der Zellmembran nachweisen sowie schwach bis deutlich an den Granula. Auch beim Huhn konnte Aktin in den Granula und im submembranösen Bereich gezeigt werden (Gantert, 2013). Maxwell (1978) widerspricht diesem Punkt bei der Spezies *Gallus gallus*, konnte dies aber bei anderen Vogelarten durchaus nachweisen (Maxwell, 1978).

Außer beim Aktin-Nachweis konnten die eosinophilen Granulozyten des Königspinguins nicht beurteilt werden, aufgrund mangelnder Differenzierbarkeit.

Bei den basophilen Granulozyten des Königspinguins zeigt sich Aktin deutlich im Zytoplasma, Myosin nur schwach an der Granulamembran. Beim Huhn ist Aktin ebenfalls im Zytoplasma nachweisbar (Gantert, 2013). In den basophilen Granulozyten des Menschen konnte gezeigt werden, dass Tubulin und Aktin eine Rolle bei der Histaminfreisetzung spielen (Nielsen et al., 2004). Beim Vogel ist dies höchstwahrscheinlich sehr ähnlich. Ob diese Vermutung tatsächlich zutrifft, bleibt eine Frage für zukünftige Forschungen.

Aktin ist schwach an der Membran der Lymphozyten des Königspinguins erkennbar. Das Zytoplasma zeigt für den Antikörper gegen Myosin und Tubulin eine schwach positive Reaktion. Der Antikörper gegen Vimentin bindet an granulären Strukturen schwach. Die Kernmembran zeigt deutliche Fluoreszenz für Aktin und Tubulin sowie eine schwache Reaktion mit Anti-Myosin. Vergleichend hierzu zeigen sich beim Huhn Aktin und Vimentin im Lymphozytenplasma, Tubulin liegt, ähnlich wie beim Menschen, strahlenförmig im Zytoplasma vor (Brown et al., 2001; Gantert, 2013).

Die Monozyten des Königspinguins zeigen im Zytoplasma sehr starke Bindung von Phalloidin TRICT. Anti-Myosin zeigt schwache Bindung im Zytoplasma. Der Zellkern der Monozyten fluoresziert deutlich beim Aktin-Nachweis. Beim Huhn konnte Aktin teilweise ebenfalls bis in die Pseudopodien der Monozyten nachgewiesen werden (Gantert, 2013), wie auch beim Menschen (Meloni et al., 2011).

Bei der Auswertung der Untersuchungen gilt es zu beachten, dass die einzelnen Strukturen des Zytoskeletts, vor allem die Mikrotubuli und das Aktinnetzwerk, aber auch einige der Intermediärfilament-Klassen sich in ständigem Auf- und Abbau befinden und es sich deshalb bei den Beobachtungen in dieser Arbeit um Momentaufnahmen der Zellen handelt (Sinowatz und Hees, 2006; Liebich, 2010).

Die Blutzellen des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) sind in meiner Arbeit umfassend untersucht, abgebildet und charakterisiert worden. Sie soll eine solide Grundlage für weiterführende Forschungen an diesem bemerkenswerten Vogel und dessen physiologischen und hämatologischen Adaptationen an seinen extremen Lebensraum liefern. Dieser detaillierte Überblick über die Hämatologie gesunder Königspinguine soll zudem helfen, in der freien Wildbahn oder in zoologischen Gärten gewonnene Blutproben dieser Vogelspezies zu beurteilen.

VI. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden die Blutzellen des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) lichtmikroskopisch, ultrastrukturell, glykohistochemisch und immunhistochemisch untersucht und die Größe der einzelnen Blutzelltypen bestimmt. Zudem wurde während dieser Arbeit eine modifizierte Färbemethode zur besseren Differenzierung der einzelnen Blutzellen unter dem Lichtmikroskop, nämlich die nach Bitai modifizierte May-Grünwald-Färbung, entwickelt. Zunächst wurden 17 Königspinguinen im Loro Parque Teneriffa Blutproben entnommen und Blutbilder angefertigt sowie von 14 Tieren je 92 Ausstriche zur weiteren Bearbeitung erstellt. Die Proben von 3 Tieren wurden zur elektronenmikroskopischen Untersuchung vorbereitet.

Für die lichtmikroskopische Differenzierung der Blutzellen des Königspinguins (*Aptenodytes patagonicus*) wurden 13 verschiedene Färbungen herangezogen, die fünf konventionellen Übersichtsfärbungen (Diff-Quick Haema-Schnellfärbung, Giemsa-, May-Grünwald-, Pappenheim-Färbung sowie die während dieser Arbeit nach Bitai modifizierte May-Grünwald-Färbung) und acht substrathistochemische Färbungen (Toluidinblau-Färbung, Sirius-Red-Färbung, Alcianblau-Färbung bei pH1, Alcianblau-Färbung bei pH2,5 und die Periodic-acid-Schiff-Reaktion - PAS, mit vorheriger Acetylierung, Methylierung und Amylase Vorbehandlung der Zellen). Zur schnellen und detaillierten Darstellung der Blutzellen des Königspinguins erscheint die nach Bitai modifizierte May-Grünwald-Färbung und die Diff-Quick Haema-Schnellfärbung am geeignetsten.

Die Ultrastruktur der verschiedenen Blutzellen des Königspinguins wurde mit Hilfe eines Zeiss EM 902 Transmissionselektronenmikroskops untersucht und abgebildet. In dieser Arbeit konnten erstmals alle Blutzelltypen des Königspinguins charakterisiert werden.

Die Zuckerstruktur auf den Blutzellen des Königspinguins wurde glykohistochemisch mittels einer Palette von Lektinen untersucht. Die an Fluoreszenzmarker gekoppelten Lektine Concanavalin Agglutinin (ConA), Pisum sativum Agglutinin (PSA), Lens culinaris Agglutinin (LCA), Ricinus communis Agglutinin (RCA), Peanut Agglutinin (PNA), Viscum album Agglutinin (VAA), Sophora japonica Agglutinin (SJA), Soybean Agglutinin (SBA), Griffonia simplicifolia Agglutinin 1 (GSL-1), Dolichos biflorus Agglutinin (DBA), Sambucus nigra Agglutinin (SNA), Wheat germ Agglutinin (WGA), Wheat germ Agglutinin succinyliert (WGAs), Ulex europaeus Agglutinin 1 (UEA-1), Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L), Maackia amurensis Agglutinin 1 -Leukoagglutinin (MAI), Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E) wurden hierfür verwendet. Die Lektine

ConA, PSA, LCA, VAA, SJA, WGA, WGAs, MAI, und PHA-E waren als stark, durchgehend und deutlich positiv, RCA, PNA, GSL-1, DBA und SNA als erkennbar positiv, SBA, UEA 1 und PHA-L als negativ einzustufen.

Ferner wurden auch immunhistochemische Untersuchungen an den Blutzellen des Königspinguins durchgeführt. Die T-Lymphozyten spezifischen Antigene CD4 und CD8 konnten in den Zellen nachgewiesen werden. Das Zytoskelett wurde mit Hilfe von TRITC markiertem Phalloidin, im Falle des Aktin-Nachweises sowie fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu Vimentin, Tubulin, Myosin und Zytokeratin studiert. Aktin, Vimentin, Tubulin und Myosin waren in den Zellen nachweisbar. Panzytokeratin ließ sich in dieser Arbeit nicht nachweisen. Der Antikörper zum eosinophilen spezifischen Major Basic Protein (EMBP), welcher in dieser Arbeit verwendet wurde und der beim Säugetier spezifisch für die Granula der eosinophilen Granulozyten ist, zeigte keine deutliche Reaktion mit den Granula der eosinophilen Granulozyten des Königspinguins.

In meiner Arbeit wurden alle Zelltypen im Blut des Königspinguins umfassend charakterisiert. Sie kann damit als solider Grundstock für weitere funktionelle und klinische Untersuchungen des Pinguinblutes fungieren.

VII. Summary

The aim of my thesis was to study the blood cells of the king penguin (*Aptenodytes patagonicus*) using light microscopic, ultrastructural, glycohistochemical and immunohistochemical methods. During my studies a new efficient staining technique for avian blood cells, which is a modification of May-Grünwald-staining, has been developed. Blood samples were taken from 17 king penguins at Loro Parque Tenerife, Haemograms were prepared and 92 smears from 14 animals each, were prepared for further investigation. Samples from three animals were used for ultrastructural studies. The following staining techniques were applied: Diff-Quick Haema-fast staining, Giemsa-, May-Grünwald-, Pappenheim- and May-Grünwald modified by Bitai-, Toluidinblue-, PAS- (Periodic-acid-Schiff-Reaction), Alcianblue-and Sirius-Red stain.

The staining technique developed by Bitai during this study and the Diff-Quick Haema-fast staining appeared to give the best staining results for the king penguin blood.

The ultrastructure of the blood cells of the king penguin was studied using a Zeiss EM 902 electron microscope. For the first time, all the cell types of the king penguin blood were ultrastructurally characterized.

For the glycohistochemical characterization of the blood cells the following fluorescence marked lectins were used: Concanavalin Agglutinin (ConA), Pisum sativum Agglutinin (PSA), Lens culinaris Agglutinin (LCA), Ricinus communis Agglutinin (RCA), Peanut Agglutinin (PNA), Viscum album Agglutinin (VAA), Sophora japonica Agglutinin (SJA), Soybean Agglutinin (SBA), Griffonia simplicifolia Agglutinin 1 (GSL-1), Dolichos biflorus Agglutinin (DBA), Sambucus nigra Agglutinin (SNA), Wheat germ Agglutinin (WGA), Wheat germ Agglutinin succinylated (WGAs), Ulex europaeus Agglutinin 1 (UEA-1), Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (PHA-L), Maackia amurensis Agglutinin 1 -Leukoagglutinin (MAI) and Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E). The lectins ConA, PSA, LCA, VAA, SJA, WGA, WGAs, MAI, and PHA-E could be verified as strongly and sustainably positive RCA, PNA, GSL-1, DBA and SNA were positive, SBA, UEA 1, and PHA-L could be shown as negative in cells.

The immunohistochemical investigation shows the presence of the CD4- and CD8-antigens in cells. The cytoskeleton was observed using 172luefin172in-TRITC (for demonstration of actin) and indirectly FITC-labeled antibodies to vimentin, tubulin, myosin und cytokeratin.

Actin, vimentin, tubulin and myosin, excluding pancytokeratin, could be shown to be present in cells.

Antibodies to Eosinophilic Major Basic Protein (EMBP), which positively stains the granules of mammalian eosinophilic granulocytes, did not react with the granules of eosinophilic granulocytes of the king penguin.

All the blood cells of the king penguin have been characterized in this dissertation. The results can therefore be used as a basis for further studies.

VIII. Literaturverzeichnis

- AHNE, W. (2000): Zoologie. Lehrbuch für Studierende der Veterinärmedizin und Agrarwissenschaften. Schattauer, Stuttgart [u.a.].
- ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; KOPITZ, J.; SIEBERT, H.-C. (2006): Wie der Zuckerkode entschlüsselt wird. *Biospektrum* (12): S. 706-710.
- BANNASCH, R. (1986): Morphologico-functional study of the locomotor system of penguins as a principle of the general motor model of "underwater flight." II. *Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch*. 132 (6): S. 757-817.
- BANNASCH, R. (1987): Morphologico-functional study of the locomotor system of penguins as a principle of the general motor model of "underwater flight." III. *Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch*. 133 (1): S. 39-59.
- BANNASCH, R. (1995): The penguins. Ecology and management. In: Dann, P.; Norman, I.; Reilly, P.N. (Hrsg.): *The penguins. Ecology and management*. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, NSW.
- BISWAS, P.; MANTELLI, B.; SICA, A.; MALNATI, M.; PANZERI, C.; SACCANI, A.; HASSON, H.; VECCHI, A.; SANIABADI, A.; LUSSO, P.; LAZZARIN, A.; BERETTA, A. (2003): Expression of CD4 on human peripheral blood neutrophils. *Blood*. 101 (11): S. 4452-4456.
- BOND, C.F.; GILBERT, P.W. (1958): Comparative study of blood volume in representative aquatic and nonaquatic birds. *The American Journal of Physiology*. 194 (3): S. 519-521.
- BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. (1954): Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science (New York)* 119 (3091): S. 419.
- BROOKS, R.L.; BOUNOUS, D.I.; ANDREASEN, C.B. (1996): Functional comparison of avian heterophils with human and canine neutrophils. *Comparative Haematology International*. 6 (3): S. 153-159.
- BROWN, M.J.; HALLAM, J.A.; COLUCCI-GUYON, E.; SHAW, S. (2001): Rigidity of Circulating Lymphocytes Is Primarily Conferred by Vimentin Intermediate Filaments. *The Journal of Immunology*. 166 (11): S. 6640-6646.
- BUTLER, P.J. (1982): Respiratory and cardiovascular control during diving in birds and mammals. *The Journal of Experimental Biology*. 100: S. 195-221.
- BUTLER, P.J. (2000): Energetic costs of surface swimming and diving of birds. *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ*. 73 (6): S. 699-705.

- BUTLER, P.J. (2001): Diving beyond the limits. News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society. 16: S. 222-227.
- C LENFANT, G.L.K.E.M.D. (1969): Respiratory function of blood of the Adélie penguin *Pygoscelis adeliae*. The American Journal of Physiology. 216 (6): S. 1598-1600.
- CASTELLINI, M.A.; KOOYMAN, G.L.; PONGANIS, P.J. (1992): Metabolic rates of freely diving Weddell seals: correlations with oxygen stores, swim velocity and diving duration. Journal of Experimental Biology. 165: S. 181-194.
- CHEREL, Y.; RIDOUX, V. (1992): Prey species and nutritive value of food fed during summer to King Penguin *Aptenodytes patagonica* chicks at Possession Island, Crozet Archipelago. Ibis. 134 (2): S. 118-127.
- CLARK, P.; BOARDMAN, W.; RAIDAL, S.R. (2009): Atlas of Clinical Avian Hematology. Wiley-Blackwell, Oxford, Ames, Iowa.
- CLARK, T.; SEYMOUR, R.; WELLS, R.; FRAPPELL, P. (2008): Thermal effects on the blood respiratory properties of southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 150 (2): S. 239-246.
- CLEMENTI, M.E.; CONDO, S.G.; CASTAGNOLA, M.; GIARDINA, B. (1994): Hemoglobin function under extreme life conditions. European Journal of Biochemistry / FEBS. 223 (2): S. 309-317.
- CLEMENTI, M.E.; PETRUZZELLI, R.; FILIPPUCCI, M.G.; CAPO, C.; MISITI, F.; GIARDINA, B. (2003): Molecular adaptation to hibernation: the hemoglobin of *Dryomys nitedula*. Pflugers Archiv: European Journal of Physiology. 446 (1): S. 46-51.
- CRANFIELD, M.R. (2003): Zoo and Wild Animal Medicine. In: Fowler, M.E.; Miller, R.E. (Hrsg.): Zoo and Wild Animal Medicine. 5. Aufl. Saunders, St. Louis, Mo.
- CULIK, B.M.; PÜTZ, K.; WILSON, R.P.; ALLERS, D.; LAGE, J.; BOST, C.-A.; LE MAHO, Y. (1996): Diving energetics in king penguins (*Aptenodytes patagonicus*). The Journal of Experimental Biology. 199 (Pt 4): S. 973-983.
- DAIMON, T.; CAXTON-MARTINS, A.E. (1977): Electron microscopic and enzyme cytochemical studies on granules of mature chicken granular leucocytes. Journal of Anatomy. 123 (Pt 3): S. 553-562.

- DI PRISCO, G.; CARRATORE, V.; COCCA, E.; RICCIO, A.; TAMBURRINI, M. (2000): Molecular structure and functional adaptations of hemoglobins from Antarctic marine organisms. *Italian Journal of Zoology*. 67 (sup1): S. 37-46.
- DJOJOSUGITO, A.M.; FOLKOW, B.; KOVÁČH, A.G.B. (1968): The Mechanisms behind the Rapid Blood Volume Restoration after Hemorrhage in Birds. *Acta Physiologica Scandinavica*. 74 (1-2): S. 114-122.
- DONELEY, B. (2007): Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology 3rd edition - by Campbell TW, Ellis CK. *Australian Veterinary Journal*. 85 (7): S. 270.
- DWD: Klimadaten. Deutscher Wetterdienst/Seewetteramt Hamburg
- FAHLMAN, A.; SCHMIDT, A.; HANDRICH, Y.; WOAKES, A.J.; BUTLER, P.J. (2005): Metabolism and thermoregulation during fasting in king penguins, *Aptenodytes patagonicus*, in air and water. *American Journal of Physiology*. 289 (3): S. R670-9.
- FAYOLLE, C.; LERAY, C.; OHLMANN, P.; GUTBIER, G.; CAZENAVE, J.P.; GACHET, C.; GROSCOLAS, R. (2000): Lipid composition of erythrocytes and thrombocytes of a subantarctic seabird, the king penguin. *Lipids*. 35 (4): S. 453-459.
- FISH, F.E. (2000): Biomechanics and energetics in aquatic and semiaquatic mammals: platypus to whale. *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ*. 73 (6): S. 683-698.
- GABIUS, H.-J.; ANDRÉ, S.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; SOLÍS, D. (2011): From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends in Biochemical Sciences*. 36 (6): S. 298-313.
- GABIUS, H.-J. (Hrsg.) (2011): *The Sugar Code: Fundamentals of Glycosciences*. Wiley-Blackwell, Oxford , Ames, Iowa.
- GANTERT, H. (2013): Ultrastrukturelle, glykohistochemische und immunhistochemische Untersuchungen der Blutzellen des Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*), Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- GROSCOLAS, R. (1990): Penguin biology. In: Davis, L.S.; Darby, J.T. (Hrsg.): *Penguin Biology*. Academic Press, San Diego.
- GYLSTORFF, I.; GRIMM, F.; GERBERMANN, H. (1998): *Vogelkrankheiten*. 2. Aufl. Ulmer, Stuttgart.

- HAWKEY, C.M.; DENNETT, T.B.; PEIRCE, M.A. (1989): Color atlas of comparative veterinary hematology. Normal and abnormal blood cells in mammals, birds and reptiles. 1. Aufl. Iowa State University Press, Ames [Iowa].
- HAZELWOOD, R.L. (1999): Sturkie's avian physiology. In: Whittow, G.C. (Hrsg.): Sturkie's avian physiology. 5. Aufl. Academic Press, San Diego.
- HOWLAND, H.C.; SIVAK, J.G. (1984): Penguin vision in air and water. *Vision Research*. 24 (12): S. 1905-1909.
- IUCN (2012): IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. BirdLife International. Version 2012.2
- JAIN, N.C. (1993): Essentials of Veterinary Hematology. Lea & Febinger, Philadelphia.
- KNIGHT, K. (2008): Penguins shunt blood to stock up on O₂. *Journal of Experimental Biology*. 212 (2): S. iii.
- KÖNIG, H.E.; KORBEL, R.; LIEBICH, H.-G. (2001): Klinische Anatomie und Propädeutik des Geflügels. Lehrbuch und Farbatlas. 2. Aufl. Schattauer, Stuttgart.
- KOOYMAN, G.L.; CHEREL, Y.; LE MAHO, Y.; CROXALL, J.P.; THORSON, P.H.; RIDOUX, V.; KOOYMAN, C.A. (1992): Diving Behavior and Energetics During Foraging Cycles in King Penguins. *Ecological Monographs*. 62 (1): S. 143-163.
- KOOYMAN, G.L.; DAVIS, R.W.; CROXALL, J.P.; COSTA, D.P. (1982): Diving depths and energy requirements of king penguins. *Science (New York)* 217 (4561): S. 726-727.
- KOOYMAN, G.L. (2012): Diverse Divers. *Physiology and Behavior*. Springer, [S.I.].
- LIEBICH, H.-G. (2010): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 5. Aufl. Schattauer, Stuttgart.
- LIENER, I.E., SHARON, N., GOLDSTEIN, I.J. (Hrsg.) (1986): The Lectins. Properties, functions, and applications in biology and medicine. Academic Press, Orlando [etc.].
- LÖSCH, U.; CIHAK, J.; ERHARD, M.; KASPERS, B. (2000): Blut und Abwehr. In: Engelhardt, W.v. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. Enke, Stuttgart.
- LUCAS, A.M.; JAMROZ, C. (1961): Atlas of Avian Hematology. United States Department of Agriculture.
- MARION, C.J. (2013): Exotic Animal Formulary. 4. Aufl. Elsevier, St. Louis, Mo.

- MAXWELL, M.H. (1974): An ultrastructural comparison of the mononuclear leucocytes and thrombocytes in six species of domestic bird. *Journal of Anatomy*. 117 (Pt 1): S. 69-80.
- MAXWELL, M.H. (1978): The fine structure of granules in eosinophil leucocytes from aquatic and terrestrial birds. *Tissue & cell*. 10 (2): S. 303-317.
- MELONI, M.A.; GALLERI, G.; PANI, G.; SABA, A.; PIPPIA, P.; COGOLI-GREUTER, M. (2011): Space flight affects motility and cytoskeletal structures in human monocyte cell line J-111. *Cytoskeleton*. 68 (2): S. 125-137.
- MONIER, C.; SCHNEK, A.G.; DIRKX, J.; LEONIS, J. (1973): Penguin hemoglobin (*Aptenodytes forsteri*). A 45 residue N-terminal sequence. *FEBS letters*. 36 (1): S. 93-95.
- NICOL, S.C.; MELROSE, W.; STAHEL, C.D. (1988): Haematology and metabolism of the blood of the little penguin, *Eudyptula minor*. *Comparative biochemistry and physiology*. 89 (3): S. 383-386.
- NIELSEN, H.V.; JOHNSEN, A.H.; SCHIÖSLASH; TZ, P.O. (2004): Expression of Actin and Tubulins in Purified Human Basophil Leukocytes upon Stimulation with IL-3. *International Archives of Allergy and Immunology*. 133 (4): S. 340-347.
- O'MALLEY, B. (2008): *Klinische Anatomie und Physiologie bei kleinen Heimtieren, Vögeln, Reptilien und Amphibien*. 1. Aufl. Elsevier, Urban & Fischer, München, Jena.
- PATRICK J BUTLER (2004): Metabolic regulation in diving birds and mammals. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 141 (3): S. 297-315.
- PRINZINGER, R.; MISOVIC, A.; NAGEL, B. (2012): *Aviäre Hämatologie. Das Vogelblut: Struktur, Funktion, Diagnose und Parasiten*. Cuvillier, Göttingen.
- PÜTZ, K. (1993): Untersuchungen zur Ernährungsökologie von Kaiserpinguinen (*Aptenodytes forsteri*) und Königspinguinen (*Aptenodytes patagonicus*): Aspects of the feeding ecology of Emperor Penguins (*Aptenodytes forsteri*) and King Penguins (*Aptenodytes patagonicus*). Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung.
- REICHL, F.-X. (2008): *Taschenatlas der Toxikologie. Substanzen, Wirkungen, Umwelt*. 2. Aufl. Nikol, Hamburg.
- ROMEIS, B.; AESCHT, E.; MULISCH, M. (2010): *Romeis Mikroskopische Technik*. 18. Aufl. Spektrum Akad. Verl, Heidelberg.
- ROTH, J. (2011): Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochemistry and Cell Biology*. 136 (2): S. 117-130.

- RÜDIGER, H.; GABIUS, H.-J. (2001): Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*. 18 (8): S. 589-613.
- SANTOS, A.A.; DA SILVA, A.M.J.; SILVA, M.R.R.; SEGRETO, H.R.C.; EGAMI, M.I. (2003): Structural, cytochemical, immunocytochemical and ultrastructural characterization of blood granulocytes of the roadside hawk *Buteo magnirostris*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*. 35 (4): S. 351-357.
- SCHMIDT, A.; ALARD, F.; HANDRICH, Y. (2006): Changes in body temperature in king penguins at sea: the result of fine adjustments in peripheral heat loss? *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 291 (3): S. R608-18.
- SCHOLZ, J. (2012): Ultrastrukturelle und histochemische Untersuchungen der Blutzellen des Straußes (*Struthio camelus*), Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- SINOWATZ, F.; HEES, H. (2006): Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. 4. Aufl. Selbstverl., München.
- SINOWATZ, F.; RODLER, D. (2011): Histologie Kurs. 1. Aufl. Eigenverl., München.
- SIVAK, J.G.; MILLODOT, M. (1977): Optical performance of the penguin eye in air and water. *Journal of Comparative Physiology*. 119 (3): S. 241-247.
- STABLER, J.G.; MCCORMICK, T.W.; POWELL, K.C.; KOGUT, M.H. (1994): Avian heterophils and monocytes: phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*. *Veterinary Microbiology*. 38 (4): S. 293-305.
- TAMBURRINI, M.; CONDO, S.G.; DI PRISCO, G.; GIARDINA, B. (1994): Adaptation to extreme environments: structure-function relationships in Emperor penguin haemoglobin. *Journal of Molecular Biology*. 237 (5): S. 615-621.
- TRAVIS, E.K.; VARGAS, F.H.; MERKEL, J.; GOTTDENKER, N.; MILLER, R.E.; PARKER, P.G. (2006): Hematology, serum chemistry, and serology of Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) in the Galapagos Islands, Ecuador. *Journal of Wildlife Diseases*. 42 (3): S. 625-632.
- VAN DER MERWE, E: SANCCOB Standart Operating Procedures, Capetown, South Africa (2001).
- WEHREND, A.; HETZEL, U.; HUCHZERMEYER, S.; KLEIN, C.; BOSTEDT, H. (2004): Sirius Red is able to Selectively Stain Eosinophil Granulocytes in Bovine, Ovine and Equine Cervical Tissue. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 33 (3): S. 180-182.

WEISS, D.J., SCHALM, O.W. (Hrsg.) (2010): Schalm's Veterinary Hematology. 6. Aufl. Wiley-Blackwell, Oxford, Ames, Iowa.

WILLIAMS, C.L.; MEIR, J.U.; PONGANIS, P.J. (2011): What triggers the aerobic dive limit? Patterns of muscle oxygen depletion during dives of emperor penguins. *The Journal of Experimental Biology*. 214 (Pt 11): S. 1802-1812.

WILLIAMS, T.D. (1995): The penguins. *Spheniscidae*. Oxford Univ. Press, Oxford.

WOODS, R.W.; WOODS, A. (1997): Atlas of Breeding Birds of the Falkland Islands. Anthony Nelson, Oswestry.

IX. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Abkürzung
°C	Grad Celsius
Abk.	Abkürzung
ADL	Aerobic Dive Limit
Aqua dem.	Aqua demineralisata
Aqua dest.	Aqua destillata
BCR	B cell receptor
BG	Basophiler Granulozyt
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cADL	calculated Dive Limit
CD	Cluster of differentiation
ConA	Concanavalin Agglutinin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DBA	Dolichos biflorus Agglutinin
DWD	Deutscher Wetterdienst
EG	Eosinophiler Granulozyt
EC	Euchromatin
EM	Elektronenmikroskop
EMBP	Eosinophil Major Basic Protein
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERY	Erythrozyt
et al.	Lat. <i>Et alii, et aliae</i> - und andere
EWBC	Estimated White Blood Cell Count
EZ	Erythrozyt
F-Aktin	filamentöses Aktin
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fuc	Fukose
g	Gramm
g/dl	Gramm pro Deziliter
G/l	Giga pro Liter
G-Aktin	globuläres Aktin
GA	Golgi Apparat
Gal	Galaktose
GalNAc	N-acetylgalactosamine
GHC	Glykohistochemie
Glc	glucose
GlcNAc	N-acetylglucosamine
GP	Glykoprotein
GR	Granula

GRM	Granulamembran
GRP	Granulaplasma
GSL-1	Griffonia simplicifolia Agglutinin 1
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
Hb	Hämoglobin
HC	Heterochromatin
HG	Heterophiler Granulozyt
HKT	Hämatokrit
ICH	Immunhistochemie
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KM	Kernmembran
Km/h	Kilometer pro Stunde
Konz.	Konzentration
krist.	kristallin
lat.	lateinisch
LCA	Lens culinaris Agglutinin
LEU	Leukozyt
LM	Lichtmikroskop
LP	Loro Parque Teneriffa
LZ	Lymphozyt
m	männlich
M	Molar
MAA I	Maackia amurensis Agglutinin I
Man	Mannose
max.	maximal
Mb	Myoglobin
Meth.	Methode
MI	Mitochondrium
min	Minuten
Min	Minute
MZ	Monozyt
n. b.	nicht beurteilt
n. m.	Non muscular
Neu5Ac	N-acetylneuraminic acid
OT	Objektträger
PAS	Periodic acid Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PCV	Packed Cell Volume
PE	Proerythrozyt
PHA-E	Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin
PNA	Peanut Agglutinin
PSA	Pisum sativum Agglutinin
RCA	Ricinus communis Agglutinin

rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SB	scale bar
SBA	Soybean Agglutinin
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SJA	Sophora japonica Agglutinin
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
sog.	Sogenannte
STA	Solanum tuberosum agglutinin
Std.	Stunde
SW	Sea World
TCR	T cell receptor
TP	Total Protein
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TZ	Thrombozyt
U/Min	Umdrehungen pro Minute
UEA-1	Ulex europaeus Agglutinin 1
V	Vesikel
VA	Vakuole
VAA	Viscum album Agglutinin
w	weiblich
WGA	Wheat germ Agglutinin
WGAs	Wheat germ Agglutinin succinyliert
ZK	Zellkern
ZM	Zellmembran
ZP	Zytoplasma

2. Gebrauchslösungsverzeichnis

2.1 Lichtmikroskopie

α-Amylase 0,5%	
α-Amylase(MERCK, Darmstadt)	10 mg
Aqua dest.	2 ml

Alcianblaulösung pH1,0/ pH2,5	
pH1,0	
Alcianblau 8GX (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)	5 g
0,1N Salzsäure (MERCK, Darmstadt)	500 ml
pH2,5	
Alcianblau 8GX (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)	5 g
3% Essigsäure	500 ml
Essigsäure 100% (MERCK, Darmstadt)	15 ml
Aqua dest.	485 ml

Deckglas (ROTH, Karlsruhe)

Eukitt quick-hardening mounting medium (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)

Eosin-Gebrauchslösung:	
Eosin-Stammlösung	1 Teil
mit Aqua dest. vermischen	10 Teile
mit Essigsäure 100% (MERCK, Darmstadt)	5 Tropfen/100ml Lösung
Eosin-Stammlösung:	
Eosin gelblich (MERCK, Darmstadt)	1g
in Aqua dest. lösen	99ml
mit Formaldehyd 37% (ROTH, Karlsruhe)	2 Tropfen
Giemsa Stammlösung (MERCK, Darmstadt)	

Haema Schnellfärbesatz (LABOR +TECHNIK, Berlin)
--

Kernechtrotlösung	
Aluminiumsulfat (MERCK, Darmstadt)	5 g
in Aqua dest. lösen und Lösung erhitzen	100 ml
Kernechtrot (MERCK, Darmstadt) einrühren	0,1 g

May-Grünwald-Lösung (MERCK, Darmstadt)

Methanol (MERCK, Darmstadt)	
Saures Hämalaun nach Mayer	
Hämatoxylin krist. (MERCK, Darmstadt)	
in Aqua dest. lösen	
mit Natriumjodat (MERCK, Darmstadt)	
mit Kaliumaluminiumsulfat/Kalialaun (MERCK, Darmstadt)	
mit Chloralhydrat (MERCK, Darmstadt)	
mit Zitronensäure (MERCK, Darmstadt)	
Schiffs Reagenz	
Schiffs Reagenz (ROTH, Karlsruhe)	
Sirius-Red-Färbelösung	
Siriusrot F3B (WALDECK, Münster)	500 mg
in Aqua dest.	45 ml
mit Ethanol absolut (MERCK, Darmstadt) lösen	50 ml
mit NaOH (1%)	1 ml
mit NaCl (20%)	4 ml
SO₂-Wasser (Sulfitwasser)	
N-Salzsäure	30 ml
Salzsäure konz. (MERCK, Darmstadt)	3 ml
Aqua dest.	27 ml
10% wässrige Natriumdisulfitlösung	30 ml
Natriumdisulfit (MERCK, Darmstadt)	3 g
Aqua dest.	30 ml
Leitungswasser	600 ml
Toluidinblau-Färbelösung	
Toluidinblau O (ROTH, Karlsruhe)	1 g
Methanol (ROTH, Karlsruhe)	100 ml
wässrige Perjodsäurelösung 0,5%	
Perjodsäure (MERCK, Darmstadt)	1 g
Aqua dest.	200 ml

2.2 Elektronenmikroskopie

0,1M Natriumcacodylatpuffer (pH7,2)	
0,2M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2)	50 ml
Aqua dest.	50 ml

0,2M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2)	
Stammlösung:	
Natriumcacodylat (POLYSCIENCES, Warrington, USA)	18,26 g
in Aqua dest. lösen	200 ml
0,2M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2):	
Stammlösung	50 ml
0,2M Salzsäure (MERCK, Darmstadt)	pH 7,2 einstellen
Aqua dest.	auf 100ml auffüllen

Bleicitrat nach Reynolds	
Bleinitrat (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)	1,33 g
Natriumcitrat (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)	1,76 g
Aqua dest.	30 ml
30min regelmäßig schütteln, bis eine milchige Lösung entsteht	
NaOH-Plättchen (MERCK, Darmstadt)	
einzeln nacheinander lösen, bis zum Erreichen einer klaren Lösung	
Aqua dest.	auf 50 ml auffüllen

Epon	
Poly/Bed® 812-BDMA Embedding Kit (POLYSCIENCES, Warrington, USA)	
Poly/Bed® 812	10 ml
DDSA	8 ml
NMA	5 ml
BDMA	0,7 ml

Ethanol (MERCK, Darmstadt)	
-----------------------------------	--

Färbelösung nach Richardson	
1% Methylenblau:	100 ml
Methylenblau (MERCK, Darmstadt)	1 g
Aqua dest.	100 ml
1% Borax:	100 ml
Natriumtetraboratdecahydrat	1 g
Aqua dest.	100 ml
Methylenblau-Borax-Lösung 1:1 mit Azurlösung mischen	
1% Azur II:	200 ml
Azur II (WALDECK, Münster)	1 g
Aqua dest.	100 ml

Paraformaldehydlösung

Paraformaldehyd (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)	10 g
in Aqua dest. bei 60-70°C lösen	100 ml
und 1N NaOH (ROTH, Karlsruhe) zugeben	1-2 Tropfen

Propylenoxid (POLYSCIENCES, Warrington, USA)**Karnovsky-Gebrauchslösung**

Karnovsky-Stammlösung	10 ml
Glutaraldehyd 25% (POLYSCIENCES, Warrington, USA)	1,37 ml
erst kurz vor Gebrauch anmischen	

Karnovsky-Stammlösung

10% Paraformaldehydlösung	20 ml
0,2M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2)	50 ml
Calciumchlorid wasserfrei (SERVA, Heidelberg)	0,05 g

Uranylacetat (AGAR SCIENTIFIC LTD, Essex, England)**Vorkontrastierungslösung**

3% Kaliumferrocyanid-Stammlösung:	
Kaliumferrocyanid (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)	0,3 g
0,1M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2)	10 ml
2% Osmiumtetroxid-Stammlösung:	
4% Osmiumtetroxid (POLYSCIENCES, Warrington, USA)	2 ml
0,1M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2)	2 ml
1,5% Kaliumferrocyanid + 1% Osmiumtetroxid	
in 0,1M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2):	
Kaliumferrocyanid-Stammlösung	4 ml
Osmiumtetroxid-Stammlösung	4 ml

2.3 Glykohistochemie

FITC markierte Lektine (VECTOR, Burlingame, USA)

MAI, SNA, VAA (Lehrstuhl für physiologische Chemie, Veterinärmedizinisches Department, LMU München)

Natrium-Acetat-Calcium-Chlorid-Puffer (pH 5,0):

Natrium-Acetat wasserfrei (MERCK, Darmstadt)	8,2 g
in Aqua dem. lösen	1 Liter
Calcium-Chlorid (MERCK, Darmstadt)	0,294 g
pH 5,0 mit 1M HCl (ROTH, Karlsruhe) einstellen	
Auf Wärmeplatte auf 37°C bis 40°C erwärmen	

Natrium-Acetatpuffer (pH 5,5):

Natrium-Acetat wasserfrei (MERCK, Darmstadt)	13,6 g
in Aqua dem. lösen	1 Liter
pH 5,5 mit 10% Essigsäure (ROTH, Karlsruhe) einstellen	

PBS-Puffer (pH 7,4)

Natriumchlorid (MERCK, Darmstadt)	42,5 g
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (MERCK, Darmstadt)	6,35 g
Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat (MERCK, Darmstadt)	1,95 g
in Aqua dem. lösen	5 Liter

Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg)

Streptavidin-FITC (DAKO, Hamburg)

VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame, USA)

2.4 Immunhistochemie

Antibody-Diluent (DAKO, Hamburg)

CD4-Antikörper: Ms mAb to CD4 (CT-4) (FITC) (ABCAM, Cambridge)

CD8 α -Antikörper: Ms mAb to CD8 alpha (FITC) (ABCAM, Cambridge)

EMBP: Mouse anti-human Eosinophil Major Basic Protein (EMBP) (AbD SEROTEC, Kidlington)

Fluorescein Anti-Rabbit IgG (Made in Goat) (VECTOR, Burlingame)

Methanol (MERCK, Darmstadt)

Mouse anti-tubulin (ABCAM, Cambridge)

Mouse anti-vimentin (DAKO, Hamburg)

Panztyokeratin plus (BIOCARTA, Hamburg)

PBS-Puffer (pH 7,4): siehe Kapitel Glykohistochemie

Phalloidin-TRITC (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim)

Protein Block Serum-Free (DAKO, Hamburg)

Rabbit anti- non muscle myosin (ABCAM, Cambridge)

Rabbit anti-mouse-IgG-FITC (DAKO, Hamburg)

VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR, Burlingame,USA)

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lufttemperatur in °C (Mittleres Tagesmittel) an Standorten der Königspinguinkolonien (mit Deutschland als Vergleich) (DWD).....	4
Tabelle 2: Wassertemperatur in °C (Mittelwert) in Gewässern nahe der Standorte der Königspinguinkolonien (DWD).....	4
Tabelle 3: Eine Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Pflanzenlektine in nach Goldstein, Poretz, Rüdiger und Gabius modifizierter Einteilung (Liener et al., 1986; Gabius, 2011).....	24
Tabelle 4: Übersicht über die untersuchten Königspinguine.....	26
Tabelle 5: Auflistung der Proben nach Tiernummer pro Untersuchungsmethode	27
Tabelle 6: Diff-Quick Haema-Schnellfärbung.....	29
Tabelle 7: May-Grünwald-Färbung.....	29
Tabelle 8: May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai.....	30
Tabelle 9: Giemsa-Färbung	30
Tabelle 10: Panoptische Färbung nach Pappenheim.....	31
Tabelle 11: Sirius-Red-Färbung	31
Tabelle 12: Toluidinblau-Färbung	32
Tabelle 13: Periodic-acid-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion).....	32
Tabelle 14: Alcianblau-Färbung	33
Tabelle 15: Protokoll zur elektronenmikroskopischen Untersuchung	34
Tabelle 16: Verwendete FITC markierte Lektine in nach Goldstein, Poretz, Rüdiger und Gabius modifizierter Einteilung (Liener et al., 1986; Gabius, 2011).....	36
Tabelle 17: Protokoll FITC markierte Lektine.....	37
Tabelle 18: Verwendete biotinylierte Lektine in nach Goldstein, Poretz, Rüdiger und Gabius modifizierter Einteilung (Liener et al., 1986; Gabius, 2011).....	38
Tabelle 19: Protokoll biotinylierte Lektine.....	38
Tabelle 20: Hemmzucker Übersicht.....	39
Tabelle 21: Antikörper zum Nachweis von CD4- und CD8-Lymphozyten (vgl. Anhang VIII.2.4)	41
Tabelle 22: Protokoll CD4 und CD8.....	41
Tabelle 23: Nachweis von F-Aktin non muscular (non muscular).....	42
Tabelle 24: Protokoll Nachweis von F-Aktin mit Phalloidin-TRITC.....	42

Tabelle 25: Antikörper zur Untersuchung des Zytoskeletts.....	43
Tabelle 26: Protokoll Nachweis von Vimentin, Tubulin, Myosin und Zytokeratin.....	43
Tabelle 27: Antikörper zum Nachweis des Eosinophil Major Basic Protein	44
Tabelle 28: Protokoll für EMBP	44
Tabelle 29: Blutbilder der Königspinguine	46
Tabelle 30: Repräsentative Messung der Erythrozytengröße des Königspinguins.....	48
Tabelle 31: Repräsentative Messung der Erythrozyten-Kerngröße des Königspinguins	49
Tabelle 32: Repräsentative Messungen der Thrombozytengröße des Königspinguins.....	51
Tabelle 33: Repräsentative Messungen der heterophilen Granulozytengröße des Königspinguins	57
Tabelle 34: Repräsentative Messungen der heterophilen Granulozyten Granula-Größe des Königspinguins	58
Tabelle 35: Repräsentative Messungen der eosinophilen Granulozyten Granula-Größe des Königspinguins	64
Tabelle 36: Repräsentative Messungen der basophilen Granulozytengröße des Königspinguins	67
Tabelle 37: Repräsentative Messungen der basophilen Granulozyten Granula-Größe des Königspinguins	68
Tabelle 38: Repräsentative Messungen Lymphozytengröße des Königspinguins	73
Tabelle 39: Repräsentative Messungen der Monozytengröße des Königspinguins	78

4. Abbildungsverzeichnis

Die Genehmigungen zur Verwendung sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten Abbildungen liegen der Autorin in schriftlicher Form vor.

Bild 1: Königspinguine (<i>Aptenodytes patagonicus</i>) (Foto: Matthias Zepper)	5
Bild 2: Hämatopoese (Grafik: „eBioscience, an Affymetrix company“).....	7
Bild 3: Königspinguin (<i>Aptenodytes patagonicus</i>) (Foto: Matthias Zepper)	10
Bild 4: Aviäre Erythrozyten eines Sperlings (<i>Passeridae</i>), teils angeschnitten, unter dem Rasterelektronenmikroskop (Science Photo Library / Agentur Focus).....	13
Bild 5: Aviäre Blutzellen eines Sperlings (<i>Passeridae</i>) unter dem Rasterelektronenmikroskop in Draufsicht (Science Photo Library / Agentur Focus)	13
Bild 6: Lektin grafisch dargestellt (Science Photo Library / Agentur Focus)	23
Bild 7: Erythrozyten Alcianblau-Färbung pH1	49
Bild 8: Erythrozyten Toluidinblau-Färbung	50
Bild 9: Thrombozyten Alcianblau-Färbung pH1	52
Bild 10: Thrombozyten Diff-Quick Haema-Schnellfärbung	52
Bild 11: Thrombozyten Giemsa-Färbung	53
Bild 12: Thrombozyten Giemsa-Färbung	53
Bild 13: Thrombozyten Färbung May-Grünwald modifiziert nach Bitai	54
Bild 14: Thrombozyten PAS-Reaktion mit Amylase Vorbehandlung	54
Bild 15: Thrombozyten PAS Färbung	55
Bild 16: Heterophiler Granulozyt Alcianblau-Färbung bei pH1	58
Bild 17: Heterophiler Granulozyt Diff-Quick Haema-Schnellfärbung	59
Bild 18: Heterophile Granulozyten May-Grünwald-Färbung.....	59
Bild 19: Heterophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	60
Bild 20: Heterophile Granulozyten May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	60
Bild 21: Heterophiler Granulozyt Pappenheim-Färbung	61
Bild 22: Heterophiler Granulozyt PAS methyliert Färbung	61
Bild 23: Heterophile Granulozyten Sirius-Red Färbung	62
Bild 24: Eosinophiler Granulozyt Alcianblau-Färbung bei pH2,5	65
Bild 25: Eosinophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung	65

Bild 26: Eosinophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	66
Bild 27: Eosinophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	66
Bild 28: Basophiler Granulozyt Alcianblau-Färbung bei pH1	68
Bild 29: Basophiler Granulozyt Alcianblau-Färbung bei pH2,5	69
Bild 30: Basophiler Granulozyt Diff-Quick Haema-Schnellfärbung	69
Bild 31: Basophiler Granulozyt Giemsa-Färbung	70
Bild 32: Basophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung	70
Bild 33: Basophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	71
Bild 34: Basophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	71
Bild 35: Basophiler Granulozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	72
Bild 36: Lymphozyt Alcianblau-Färbung bei pH1	74
Bild 37: Lymphozyt Diff-Quick Haema-Schnellfärbung	74
Bild 38: Lymphozyt Giemsa-Färbung	75
Bild 39: Lymphozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	75
Bild 40: Lymphozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	76
Bild 41: Lymphozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	76
Bild 42: Lymphozyt PAS methyliert Färbung	77
Bild 43: Lymphozyt Toluidinblau-Färbung	77
Bild 44: Monozyt Alcianblau-Färbung bei pH2,5	79
Bild 45: Monozyt Diff-Quick Haema-Schnellfärbung	79
Bild 46: Monozyt Diff-Quick Haema-Schnellfärbung	80
Bild 47: Monozyt Giemsa-Färbung	80
Bild 48: Monozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	81
Bild 49: Monozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	81
Bild 50: Monozyt May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	82
Bild 51: Monozyt Toluidin-Färbung	82
Bild 52: Alcianblau-Färbung bei pH1	83
Bild 53: Diff-Quick Haema-Schnellfärbung	84
Bild 54: Giemsa-Färbung	84
Bild 55: Giemsa-Färbung	85

Bild 56: May-Grünwald-Färbung.....	85
Bild 57: May-Grünwald-Färbung.....	86
Bild 58: May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	86
Bild 59: May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	87
Bild 60: May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	87
Bild 61: May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	88
Bild 62: May-Grünwald-Färbung modifiziert nach Bitai	88
Bild 63: Sirius Red Färbung	89
Bild 64:Toluidinblau-Färbung.....	89
Bild 65:Toluidinblau-Färbung.....	90
Bild 66: EM-Aufnahme Erythrozyten, Blut, Königspinguin, scale bar: 2500nm.....	92
Bild 67: EM-Aufnahme Thrombozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 2500nm.....	93
Bild 68: EM-Aufnahme Thrombozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 1000nm.....	94
Bild 69: EM-Aufnahme Heterophiler Granulozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 1000nm ..	96
Bild 70: EM-Aufnahme Heterophiler Granulozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 1000nm ..	97
Bild 71: EM-Aufnahme Basophiler Granulozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 1000nm.....	98
Bild 72: EM-Aufnahme Eosinophiler Granulozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 1000nm...	99
Bild 73: EM-Aufnahme Lymphozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 2500nm.....	100
Bild 74: EM-Aufnahme Monozyt, Blut, Königspinguin, scale bar: 1000nm	101
Bild 75: ConA-FITC.....	104
Bild 76: ConA-FITC.....	104
Bild 77: ConA-FITC.....	105
Bild 78: PSA-FITC	107
Bild 79: PSA-FITC	107
Bild 80: PSA-FITC	108
Bild 81: LCA-FITC	110
Bild 82: LCA-FITC	110
Bild 83: LCA-FITC	111
Bild 84: LCA-FITC	111
Bild 85: PNA-FITC	114

Bild 86: PNA-FITC	114
Bild 87: PNA-FITC	115
Bild 88: VAA-FITC	117
Bild 89: VAA-FITC	117
Bild 90: VAA-FITC	118
Bild 91: SJA-FITC	120
Bild 92: SJA-FITC	120
Bild 93: SJA-FITC	121
Bild 94: SJA-FITC	121
Bild 95: GSL-1-FITC	124
Bild 96: WGA-FITC	128
Bild 97: WGA-FITC	128
Bild 98: WGA-FITC	129
Bild 99: WGAs-FITC	131
Bild 100: WGAs-FITC	131
Bild 101: WGAs-FITC	132
Bild 102: WGAs-FITC	132
Bild 103: MAI-FITC.....	136
Bild 104: PHA-E-FITC	138
Bild 105: PHA-E-FITC	138
Bild 106: CD4-FITC.....	142
Bild 107: CD4-FITC.....	142
Bild 108: CD8-FITC.....	144
Bild 109: Aktin-TRICT.....	146
Bild 110: Aktin-TRICT.....	146
Bild 111: Aktin-TRICT.....	147
Bild 112: Aktin-TRICT.....	147
Bild 113: Aktin-TRICT.....	148
Bild 114: Aktin-TRICT.....	148
Bild 115: Vimentin-FITC.....	150

Bild 116: Vimentin-FITC.....	150
Bild 117: Myosin-FITC	153
Bild 118: Myosin-FITC	153
Bild 119: Panzytokeratin-FITC.....	154

5. Untersuchungsbogen Pinguin (exemplarisch)

PENGUIN EXAMINATION FORM

Date : 6 / 9 / 2011 Species : KA

Nº : 85 = 1 Weight : 23,586 ♂



ANAMNESIS

10 years

BACTERIOLOGY / MYCOLOGY

	Date	Date
Cloaca		
Choana		

HEMATOLOGY

Parameter	Date <u>6.9</u>	Date
Htc %		
TP g/dL		
EWBC /µl	<u>9800</u>	
Heterophils %	<u>59</u>	
Lymphocytes %	<u>27</u>	
Monocytes %	<u>4</u>	
Eosinophils %		
Basophils %		

i-STAT EC8+
 Pt: 223
 Pt Name: _____
 Na 163 mmol/L
 K <2.0 mmol/L
 Cl 113 mmol/L
 TCO2 32 mmol/L
 BUN <3 mg/dL
 Glu 177 mg/dL
 Hct 54 %PCV
 pH 7.328
 PCO2 56.9 mmHg
 HCO3 29.8 mmol/L
 BEecf 4 mmol/L
 AnGap < mmol/L
 Hb* 18.4 g/dL
 *via Hct
 CPB: No
 17:00 06SEP11
 Operator ID: 223
 Physician: _____
 Serial: 702094
 Version: JAH5130E
 CLEW: A22
 Custom: DEFAULT6

Avian vs2
 Avian/Reptilian Profile Plus
 06 Sep 2011 14:21
 Probenart: Sonstige
 Patienten-ID: 213
 Geschlecht: Unbekannt
 Alter: 6 Jahre
 Bediener-ID: 1
 Rotor-Losnr.: 1043ER2
 Seriennr.: 0000V05706
 AST 151 U/L
 BA < 35 * umol/L
 CK 242 U/L
 UA 6.5 mg/dL
 GLU 208 mg/dL
 CA 12.4 mg/dL
 PHOS 1.9 mg/dL
 TP 6.9 g/dL
 ALB 3.4 g/dL
 GLOB 3.5 g/dL
 K+ < 1.5 * mmol/L
 NR+ 157 mmol/L

QUALITÄTSKONTROLLE OK
 HEM 1+ LIP 0 ICT 0

ASPERGILLOSIS

	Date	Date
Result		

CHLAMYDOPHILA

	Date	Date	Date
Result			

ELECTROFORESIS

	Date	Date	Date

COMMENT

6. Wetterdaten

Mit freundlicher Genehmigung des Seewetteramtes Hamburg, DWD-Deutscher Wetterdienst

Deutscher Wetterdienst															
<u>Klimatafel von Alfred-Faure, Crozet-Inseln / Indischer Ozean / Frankreich</u>															
Koordinaten: geographische Breite: 46° 26' S, geographische Länge: 5 Stationshöhe: 143 m über NN Stationsnummer: 619970															
	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jahr	Periode	Zahl d. Jahre
LUFTTEMPERATUR															
Absolutes Maximum (°C)	22,8	22,2	21,1	19,0	18,0	17,0	18,0	16,1	18,0	20,0	18,5	19,0	22,8	1976 - 1994	18-19
Mittl. tägl. Maximum (°C)	9,2	10,0	9,5	8,3	6,7	5,6	5,2	4,9	5,0	5,7	6,8	8,1	7,1	1976 - 1994	18-19
Mittl. Tagesmittel (°C)	6,6	7,6	7,5	6,0	5,3	4,6	3,3	3,3	3,1	3,5	4,7	5,6	5,1	1975 - 1989	4-10
Mittl. tägl. Minimum (°C)	5,3	6,1	5,9	4,9	3,6	2,6	2,2	1,6	1,5	2,0	3,0	4,1	3,5	1976 - 1994	18-19
Absolutes Minimum (°C)	0,0	1,0	1,0	-1,0	-1,5	-2,5	-3,0	-4,0	-4,5	-3,0	-2,8	-1,7	-4,5	1976 - 1994	18-19
NIEDERSCHLAG															
Mittl. Monats-/Jahressumme (mm)	176,0	186,0	231,0	268,0	216,0	263,0	221,0	218,0	228,0	211,0	191,0	187,0	2.596,0	1975 - 1989	4-9
Zahl der Tage mit $\geq 0,1$ mm Niederschlag	20,0	16,0	20,0	21,0	23,0	23,0	22,0	24,0	22,0	22,0	20,0	21,0	254,0	1974 - 1994	13-17
Zahl der Tage mit $\geq 1,0$ mm Niederschlag	19,0	16,0	20,0	21,0	21,0	20,0	22,0	21,0	20,0	17,0	17,0	19,0	233,0	1975 - 1989	4-10
LUFTDRUCK in NN															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	1.005,8	1.012,7	1.011,8	1.010,2	1.010,1	1.008,7	1.008,7	1.010,6	1.007,0	1.008,1	1.007,5	1.008,5	1.009,1	1975 - 1989	4-10
RELATIVE LUFTFEUCHTE															
Mittl. Tagesmittel (%)	83,0	84,0	85,0	86,0	85,0	86,0	85,0	85,0	84,0	82,0	82,0	83,0	84,0	1974 - 1994	11-15
Mittel zur Ortszeit 06 Uhr (%)	86,0	87,0	86,0	87,0	86,0	87,0	87,0	86,0	85,0	85,0	85,0	85,0	86,0	1974 - 1994	11-12
Mittel zur Ortszeit 15 Uhr (%)	78,0	80,0	82,0	83,0	84,0	85,0	83,0	83,0	81,0	79,0	77,0	79,0	81,0	1974 - 1994	13
DAMPFDRUCK															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	8,3	9,1	8,8	8,3	8,0	7,1	6,8	6,7	6,4	6,8	7,4	7,7	7,6	1975 - 1989	4-10
SONNENSCHEN															
Mittl. Tagessumme (Std.)	5,6	5,1	3,4	2,4	1,7	1,8	1,9	2,3	3,3	3,6	3,9	5,6	3,4	1978 - 1989	3-7
WINDRICHTUNG															
Vorherrsch. Richtung (Grad)	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	1976 - 1994	18-19
Vorherrsch. Richtung / Anteil in %	31,2	25,2	27,7	29,6	30,8	35,2	35,4	36,4	35,6	30,1	31,1	31,3	31,7	1976 - 1994	18-19
WINDGESCHWINDIGKEIT															
Mittl. Tagesmittel (m/s)	9,5	9,4	9,5	9,7	10,5	11,5	11,6	11,2	11,5	10,5	10,0	10,0	10,4	1976 - 1994	18-19
Mittl. Häufigkeit von Windstille (%)	1,7	2,2	1,5	3,7	2,1	2,3	2,3	1,8	1,7	2,0	1,4	1,4	2,0	1976 - 1994	18-19

Deutscher Wetterdienst															
Klimatafel von Port-aux-Francais, Kerguelen / Indischer Ozean / Frankreich															
Koordinaten: geographische Breite: 49° 21' S, geographische Länge Stationshöhe: 29 m über NN Stationsnummer: 619980															
	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jahr	Periode	Zahl d. Jahre
LUFTTEMPERATUR															
Absolutes Maximum (°C)	23,0	21,5	20,5	18,5	16,2	13,5	13,2	15,0	13,9	16,8	19,9	22,1	23,0	1951 - 1973	23
Mittl. monatl./jährl. Maximum (°C)	17,1	17,5	16,8	15,0	13,1	11,1	10,8	11,3	10,6	13,7	14,9	16,7	19,2	1951 - 1970	18
Mittl. tägl. Maximum (°C)	11,2	11,5	10,7	8,8	6,6	5,0	4,8	5,0	5,3	6,8	8,4	10,2	7,9	1961 - 1990	30
Mittl. Tagesmittel (°C)	7,2	7,5	7,0	5,6	3,7	2,4	2,0	2,0	2,2	3,3	4,7	6,3	4,5	1961 - 1990	30
Mittl. tägl. Minimum (°C)	4,1	4,3	3,7	2,6	0,9	-0,3	-0,8	-0,7	0,4	1,6	3,1	1,5	1,5	1961 - 1990	30
Mittl. monatl./jährl. Minimum (°C)	0,2	0,3	0,0	-1,3	-3,5	-5,5	-5,8	-5,3	-4,5	-3,7	-2,2	-0,4	-7,1	1951 - 1970	18
Absolutes Minimum (°C)	-0,8	-1,0	-1,6	-4,4	-7,2	-9,4	-8,9	-8,4	-6,3	-5,1	-4,4	-3,3	-9,4	1951 - 1973	20
Zahl der Frosttage (Min. < 0°C)	0,5	0,4	0,8	4,4	13,3	19,2	20,9	20,7	20,2	15,5	8,8	0,9	125,6	1954 - 1973	20
NIEDERSCHLAG															
Mittl. Monats-/Jahressumme (mm)	48,9	45,5	59,4	67,0	69,0	56,2	65,1	66,7	65,3	54,6	52,6	57,6	708,1	1961 - 1990	30
Maximale Tagessumme (mm)	40,0	36,0	34,0	54,0	101,0	47,0	42,0	47,0	53,0	32,0	44,0	41,0	101,0	1951 - 1970	20
Zahl der Tage mit >= 0,1 mm Niederschlag	23,0	19,7	21,7	22,1	25,2	24,9	25,3	26,0	25,7	25,0	24,3	23,7	286,7	1954 - 1973	20
Zahl der Tage mit >= 1,0 mm Niederschlag	8,8	7,8	8,5	10,0	11,9	11,1	11,6	13,4	12,3	11,0	8,8	9,8	125,2	1954 - 1973	20
LUFTDRUCK in Stationshöhe															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	997,5	1.001,4	1.003,1	1.001,3	997,9	995,7	997,2	998,4	997,5	997,7	994,9	994,8	998,1	1951 - 1970	20
LUFTDRUCK in NN															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	1.000,8	1.005,2	1.006,4	1.004,8	1.001,0	999,6	1.000,7	1.001,2	1.000,5	1.001,3	998,8	998,2	1.001,6	1954 - 1973	20
RELATIVELUFTFEUCHTE															
Mittl. tägl. Maximum (%)	90,0	90,0	91,0	92,0	92,0	92,0	92,0	92,0	92,0	91,0	91,0	91,0	91,0	1961 - 1990	30
Mittl. Tagesmittel (%)	72,0	72,0	73,0	76,0	78,0	79,0	78,0	77,0	75,0	73,0	72,0	72,0	75,0	1954 - 1973	20
Mittl. tägl. Minimum (%)	53,0	56,0	58,0	61,0	63,0	65,0	62,0	60,0	58,0	55,0	53,0	53,0	58,0	1961 - 1990	30
DAMPFDRUCK															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	7,2	7,4	7,4	7,3	6,4	5,7	5,5	5,6	5,3	5,7	6,1	6,8	6,4	1951 - 1970	20
SONNENSCHEN															
Mittl. Monats-/Jahressumme (Std.)	188,0	159,0	147,0	114,0	94,0	71,0	84,0	105,0	126,0	151,0	175,0	186,0	1.600,0	1961 - 1990	30
Mittl. Tagessumme (Std.)	6,1	5,6	4,7	3,8	3,0	2,4	2,7	3,4	4,2	4,9	5,8	6,0	4,4	1961 - 1990	30
in Prozent der möglichen Dauer	38,0	41,0	41,0	38,0	34,0	29,0	34,0	36,0	36,0	38,0	39,0	38,0	36,0	1951 - 1990	25-30
Zahl der Tage ohne Sonne	1,7	1,4	1,7	2,3	4,3	5,0	4,2	3,3	2,6	2,1	1,5	2,0	31,7	1954 - 1973	20
BEWÖLKUNG															
Mittl. Tagesmittel (%)	76,0	75,0	73,0	72,0	70,0	72,0	70,0	71,0	74,0	75,0	78,0	77,0	74,0	1951 - 1970	20
Zahl der Tage mit wolkenlosem Himmel	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	0,5	0,2	0,3	0,1	0,1	2,6	1954 - 1973	20
WINDRICHTUNG															
Vorherrsch. Richtung (Grad)	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	1951 - 1994	42
Vorherrsch. Richtung / Anteil in %	34,0	33,0	39,0	37,0	33,0	40,0	44,0	40,0	40,0	36,0	33,0	32,0	37,0	1951 - 1970	20
WINDGESCHWINDIGKEIT															
Mittl. Tagesmittel (m/s)	9,3	9,0	9,4	9,4	9,5	9,6	10,3	10,8	11,0	10,5	10,0	9,5	9,9	1951 - 1970	20
Zahl der Tage mit >= 15,0 m/s	24,0	21,0	25,0	24,0	24,0	25,0	26,0	27,0	26,0	26,0	24,0	25,0	296,0	1954 - 1973	20
Windspitze in Böen (m/s)	59,0	50,0	62,0	59,0	70,0	65,0	67,0	80,0	70,0	70,0	60,0	61,0	80,0	1951 - 1973	23
Maximales 10-Minutenmittel (m/s)	29,0	31,0	30,0	28,0	31,0	33,0	30,0	32,0	30,0	34,0	31,0	34,0	34,0	1973 - 1994	22
SICHTWEITE															
Zahl der Tage mit Nebel	0,6	0,4	0,3	0,6	0,3	0,7	0,4	0,4	0,1	0,3	0,4	0,1	4,6	1954 - 1973	20
SCHNEEFALL															
Zahl der Tage mit Schneefall >= 0,1 cm	3,7	2,3	3,8	6,6	11,7	15,0	17,1	16,9	16,6	14,8	11,8	6,0	126,7	1954 - 1973	20
SCHNEEDECKE															
Zahl der Tage mit >= 0 cm	0,2	0,1	<0	1,5	7,0	12,4	13,6	11,3	9,2	5,0	2,4	0,6	63,5	1954 - 1973	20
GLOBALSTRAHLUNG															
Mittl. Tagessumme (J/qcm)	2.094,0	1.687,0	1.340,0	726,0	454,0	327,0	405,0	642,0	1.072,0	1.428,0	1.886,0	2.146,0	1.184,0	1954 - 1973	20
EREIGNISTAGE															
Zahl der Tage mit Gewitter	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3	1961 - 1970	10

Deutscher Wetterdienst															
<u>Klimatafel von Marion Eiland / Indischer Ozean / Südafrika</u>															
Koordinaten: geographische Breite: 46° 53' S, geographische Länge: 3 Stationshöhe: 22 m über NN													Stationsnummer: 689940		
	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jahr	Periode	Zahl d. Jahre
LUFTTEMPERATUR															
Absolutes Maximum (°C)	23,8	22,9	21,8	18,4	18,4	14,8	13,5	16,2	15,9	17,7	21,4	20,0	23,8	1951 - 1990	40
Mittl. monatl./jährl. Maximum (°C)	16,4	16,6	17,1	14,7	13,3	12,3	11,1	11,3	11,9	13,2	15,0	15,5	19,1	1961 - 1990	30
Mittl. tägl. Maximum (°C)	10,6	10,9	10,6	9,2	7,9	7,3	6,6	6,3	6,6	7,7	8,8	9,8	8,5	1961 - 1990	30
Mittl. Tagesmittel (°C)	7,2	7,7	7,4	6,2	5,1	4,7	4,1	3,7	3,8	4,5	5,3	6,3	5,5	1961 - 1990	30
Mittl. tägl. Minimum (°C)	4,8	5,3	5,0	3,8	2,8	2,2	1,7	1,2	1,4	2,0	2,8	3,8	3,1	1961 - 1990	30
Mittl. monatl./jährl. Minimum (°C)	1,1	0,9	1,0	-0,2	-1,1	-2,3	-2,9	-3,3	-3,3	-2,2	-1,2	-0,1	-4,3	1961 - 1990	30
Absolutes Minimum (°C)	-1,4	-1,4	-1,1	-2,2	-3,0	-6,0	-6,0	-5,5	-6,8	-4,7	-3,1	-1,5	-6,8	1951 - 1990	40
Zahl der Frosttage (Min. < 0°C)	0,2	0,2	0,2	1,1	3,6	6,2	9,4	10,2	9,4	5,4	2,6	0,6	49,1	1951 - 1984	34
NIEDERSCHLAG															
Mittl. Monats-/Jahressumme (mm)	219,0	195,0	216,0	219,0	232,0	204,0	194,0	187,0	183,0	171,0	176,0	203,0	2.399,0	1961 - 1990	30
Max. Monats-/Jahressumme (mm)	350,0	333,0	402,0	363,0	428,0	461,0	319,0	250,0	360,0	288,0	316,0	302,0	2.993,0	1951 - 1990	40
Min. Monats-/Jahressumme (mm)	90,0	73,0	52,0	101,0	100,0	104,0	60,0	87,0	113,0	75,0	48,0	106,0	1.867,0	1951 - 1990	40
Maximale Tagessumme (mm)	88,0	87,0	63,0	103,0	81,0	149,0	71,0	56,0	110,0	79,0	79,0	68,0	149,0	1951 - 1984	34
Zahl der Tage mit >= 0,1 mm Niederschlag	26,0	22,0	24,0	25,0	27,0	27,0	28,0	27,0	26,0	25,0	25,0	26,0	308,0	1951 - 1984	34
Zahl der Tage mit >= 1,0 mm Niederschlag	21,0	18,0	19,0	20,0	22,0	23,0	23,0	22,0	21,0	19,0	19,0	20,0	247,0	1961 - 1990	30
Zahl der Tage mit >= 10,0 mm Niederschlag	8,0	7,0	7,0	8,0	8,0	8,0	7,0	6,0	6,0	5,0	6,0	7,0	83,0	1951 - 1984	34
LUFTDRUCK in NN															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	1.004,2	1.008,1	1.009,2	1.008,5	1.007,2	1.008,6	1.007,9	1.009,0	1.008,0	1.008,7	1.005,6	1.003,4	1.007,4	1961 - 1990	30
RELATIVE LUFTFEUCHTHEIT															
Mittl. Tagesmittel (%)	83,0	84,0	84,0	84,0	85,0	86,0	85,0	84,0	83,0	82,0	82,0	83,0	84,0	1961 - 1990	30
Mittel zur Ortszeit 08 Uhr (%)	82,0	84,0	84,0	84,0	85,0	87,0	85,0	84,0	83,0	82,0	81,0	82,0	84,0	1951 - 1984	34
Mittel zur Ortszeit 14 Uhr (%)	79,0	81,0	80,0	82,0	83,0	85,0	84,0	82,0	81,0	80,0	78,0	79,0	81,0	1951 - 1984	34
DAMPFDRUCK															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	8,4	8,8	8,6	8,0	7,5	7,3	7,0	6,7	6,6	6,9	7,3	7,9	7,6	1961 - 1990	30
SONNENSCHIN															
Mittl. Monats-/Jahressumme (Std.)	160,4	134,7	114,2	90,8	82,1	57,5	65,9	91,7	103,9	137,7	159,1	159,9	1.357,9	1961 - 1990	30
Mittl. Tagessumme (Std.)	5,2	4,8	3,7	3,0	2,6	1,9	2,1	3,0	3,5	4,4	5,3	5,2	3,7	1961 - 1990	30
Zahl der Tage ohne Sonne	4,0	4,0	6,0	8,0	9,0	10,0	10,0	8,0	7,0	4,0	3,0	4,0	77,0	1951 - 1970	19
BEWÖLKUNG															
Mittl. Tagesmittel (%)	77,0	76,0	75,0	75,0	74,0	77,0	76,0	75,0	77,0	75,0	77,0	78,0	75,0	1951 - 1984	34
WINDRICHTUNG															
Vorherrsch. Richtung (Grad)	315,0	315,0	315,0	315,0	315,0	315,0	292,5	315,0	315,0	315,0	315,0	315,0	315,0	1951 - 1977	27
WINDGESCHWINDIGKEIT															
Mittl. Tagesmittel (m/s)	7,2	6,8	6,7	7,2	7,2	7,7	7,9	7,8	7,6	7,6	7,6	7,5	7,4	1951 - 1977	27
Maximale (undefiniert) (m/s)	34,5	39,1	44,2	46,3	48,9	42,7	41,2	36,0	32,4	46,3	46,3	47,8	48,9	1973 - 1990	18
SICHTWEITE															
Zahl der Tage mit Nebel	3,5	4,4	4,8	4,5	4,0	3,9	4,0	3,2	2,2	2,5	3,0	3,4	43,4	1951 - 1984	25
WASSERTEMPERATUR															
Mittel (°C)	5,5	6,0	5,9	5,5	4,9	4,5	4,2	4,1	4,0	4,2	4,7	5,1	4,9	1950 - 1977	28
SCHNEEFALL															
Zahl der Tage mit Schneefall >= 0,1 cm	2,7	1,7	2,4	4,4	6,9	8,2	10,9	12,0	11,8	8,5	7,4	5,2	82,1	1951 - 1984	32
EREIGNISTAGE															
Zahl der Tage mit Gewitter	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3	0,4	0,7	0,8	0,4	0,1	0,3	0,1	4,2	1951 - 1984	27

Deutscher Wetterdienst															
<u>Klimatafel von Stanley / Falkland-Inseln / Großbritannien</u>															
Koordinaten: geographische Breite: 51° 42' S, geographische Länge: Stationshöhe: 51 m über NN Stationsnummer: 888900															
	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jahr	Periode	Zahl d. Jahre
LUFTTEMPERATUR															
Absolutes Maximum (°C)	24,4	25,0	22,2	17,8	14,4	10,6	10,0	11,7	15,0	19,4	21,7	21,7	25,0	1905 - 1961	
Mittl. monatl./jährl. Maximum (°C)	19,4	18,3	17,2	13,9	10,6	8,0	7,5	8,9	11,7	14,4	17,2	18,3	20,6	1905 - 1941	25
Mittl. tägl. Maximum (°C)	12,9	13,5	11,9	8,8	6,2	4,3	4,2	4,8	6,2	9,3	11,1	12,6	8,8	1951 - 1964	
Mittl. Tagesmittel (°C)	8,8	9,1	8,1	6,0	3,8	2,6	2,1	2,5	3,4	5,0	6,9	7,9	5,6	1949 - 1982	21-26
Mittl. tägl. Minimum (°C)	5,4	5,6	4,5	2,8	1,3	0,0	0,0	0,0	0,6	1,8	3,3	4,4	2,5	1951 - 1964	
Mittl. monatl./jährl. Minimum (°C)	1,3	0,8	0,0	-1,7	-3,3	-5,3	-5,8	-5,0	-3,3	-2,2	-1,1	0,6	-7,8	1905 - 1941	25
Absolutes Minimum (°C)	-1,1	-1,1	-2,8	-6,1	-7,2	-11,1	-8,9	-11,1	-10,6	-5,6	-3,3	-1,7	-11,1	1905 - 1961	
NIEDERSCHLAG															
Mittl. Monats-/Jahressumme (mm)	73,0	57,0	56,0	57,0	60,0	52,0	48,0	47,0	39,0	38,0	46,0	70,0	643,0	1904 - 1982	58-62
Max. Monats-/Jahressumme (mm)	133,0	116,0	115,0	150,0	145,0	84,0	125,0	104,0	88,0	78,0	91,0	148,0	936,0	1904 - 1982	58-62
Min. Monats-/Jahressumme (mm)	26,0	17,0	18,0	21,0	22,0	20,0	20,0	12,0	3,0	2,0	13,0	14,0	492,0	1904 - 1982	58-62
Maximale Tagessumme (mm)	30,0	43,0	28,0	25,0	38,0	28,0	30,0	25,0	13,0	20,0	36,0	41,0	43,0	1904 - 1941	
Zahl der Tage mit >= 0,1 mm Niederschlag	22,0	19,0	18,0	19,0	23,0	22,0	22,0	20,0	18,0	15,0	16,0	21,0	235,0	1951 - 1961	
Zahl der Tage mit >= 1,0 mm Niederschlag	16,0	11,0	15,0	13,0	14,0	12,0	12,0	12,0	11,0	11,0	11,0	15,0	154,0	1874 - 1982	19-23
LUFTDRUCK in NN															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	999,8	1.000,8	1.000,8	1.000,5	1.001,0	1.000,5	1.001,6	1.001,3	1.001,0	1.000,8	1.000,2	1.000,0	1.000,7	1949 - 1982	20-24
RELATIVE LUFTFEUCHTE															
Mittl. Tagesmittel (%)	80,0	81,0	84,0	85,0	86,0	89,0	88,0	87,0	85,0	81,0	79,0	80,0	84,0	1905 - 1967	21-28
Mittel zur Ortszeit 05 Uhr (%)	91,0	90,0	90,0	90,0	89,0	90,0	89,0	91,0	91,0	90,0	90,0	91,0	90,0	1947 - 1967	
Mittel zur Ortszeit 14 Uhr (%)	73,0	73,0	73,0	80,0	83,0	86,0	86,0	83,0	78,0	70,0	70,0	72,0	77,0	1951 - 1961	
DAMPFDRUCK															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	9,5	9,1	8,8	8,2	7,2	6,7	6,6	6,8	7,0	7,5	7,9	8,7	7,9	1905 - 1982	16-19
SONNENSCHEN															
Mittl. Monats-/Jahressumme (Std.)	181,0	161,0	149,0	101,0	70,0	60,0	67,0	88,0	117,0	180,0	195,0	180,0	1.549,0	1944 - 1981	21-23
Mittl. Tagessumme (Std.)	5,8	5,7	4,8	3,4	2,3	2,0	2,2	2,8	3,9	5,8	6,5	5,8	4,3	1944 - 1981	21-23
in Prozent der möglichen Dauer	36,0	40,0	38,0	32,0	26,0	25,0	26,0	29,0	33,0	43,0	42,0	35,0	35,0	1944 - 1981	21-23
BEWÖLKUNG															
Mittl. Tagesmittel (%)	71,0	70,0	69,0	70,0	72,0	73,0	73,0	70,0	69,0	70,0	70,0	73,0	71,0	1905 - 1915	11
WINDRICHTUNG															
Vorherrsch. Richtung (Grad)	270,0	270,0	292,5	292,5	292,5	292,5	292,5	292,5	292,5	292,5	270,0	270,0	292,5		
WINDGESCHWINDIGKEIT															
Mittl. Tagesmittel (m/s)	7,5	7,5	7,5	7,0	7,0	7,1	7,3	8,0	7,6	8,0	8,3	7,4	7,5		
Zahl der Tage mit >= 17,2 m/s (8 Bft)	5,0	4,0	5,0	4,0	5,0	4,0	5,0	5,0	4,0	5,0	5,0	4,0	5,0		
SICHTWEITE															
Zahl der Tage mit Nebel	6,0	3,0	5,0	4,0	3,0	5,0	6,0	4,0	5,0	5,0	3,0	5,0	54,0	1905 - 1915	11
SCHNEEFALL															
Zahl der Tage mit Schneefall >= 0,1 cm	2,0	1,0	3,0	3,0	13,0	6,0	11,0	10,0	7,0	5,0	6,0	4,0	71,0		
TAUPUNKTTEMPERATUR															
Mittl. Tagesmittel (°C)	5,6	5,8	5,3	4,1	2,0	0,4	0,2	0,3	1,3	2,0	3,2	4,3	2,9		
EREIGNISTAGE															
Zahl der Tage mit Gewitter	0,9	0,6	0,5	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,4	1,0	3,8	1905 - 1915	11
Zahl der Tage mit Graupel/Hagel	2,0	2,0	2,0	4,0	3,0	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	4,0	3,0	31,0	1905 - 1915	11

Deutscher Wetterdienst																
<u>Klimatafel von Grvtviken / Süd-Georgien / Großbritannien</u>																
Koordinaten: geographische Breite: 54° 16' S, geographische Länge: 36° 30' W Stationshöhe: 2 m über NN																
Stationsnummer: 889030																
	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jahr	Periode	Zahl d. Jahre	
LUFTTEMPERATUR																
Absolutes Maximum (°C)	24,5	26,5	28,8	22,2	17,5	14,0	17,2	16,1	20,0	20,0	22,5	22,0	28,8	1905 - 1993	57	
Mittl. monatl./jährl. Maximum (°C)	17,4	17,6	15,7	12,3	9,0	7,7	8,6	9,1	12,0	10,8	12,1	15,1	20,5	1973 - 1993	17-19	
Mittl. tägl. Maximum (°C)	8,4	9,1	8,4	5,6	2,9	0,9	1,2	1,5	3,5	5,4	6,5	7,5	5,1	1905 - 1947	40	
Mittl. Tagesmittel (°C)	4,9	5,6	4,8	2,5	0,1	-0,5	-1,2	-1,2	0,1	1,9	3,3	3,7	2,0	1949 - 1982	20-26	
Mittl. tägl. Minimum (°C)	1,4	1,7	1,0	-0,8	-3,1	-4,6	-4,7	-4,9	-3,3	-1,8	-0,5	0,4	-1,6	1905 - 1947	40	
Mittl. monatl./jährl. Minimum (°C)	-0,5	0,2	-0,9	-3,1	-6,7	-7,1	-8,7	-8,7	-7,3	-5,5	-2,9	-1,3	-11,5	1973 - 1993	17-19	
Absolutes Minimum (°C)	-5,6	-3,9	-8,9	-9,8	-11,4	-14,6	-15,2	-19,2	-18,4	-11,0	-7,2	-7,2	-19,2	1905 - 1993	57	
Zahl der Frosttage (Min. < 0°C)	2,0	1,0	3,0	12,0	22,0	25,0	26,0	24,0	21,0	18,0	10,0	5,0	170,0	1972 - 1993	17	
NIEDERSCHLAG																
Mittl. Monats-/Jahressumme (mm)	97,0	127,0	142,0	145,0	152,0	137,0	145,0	140,0	109,0	94,0	94,0	86,0	468,0	1906 - 1982	64-66	
Max. Monats-/Jahressumme (mm)	305,0	284,0	295,0	353,0	534,0	318,0	389,0	315,0	354,0	357,0	194,0	188,0	624,0	1906 - 1982	64-66	
Min. Monats-/Jahressumme (mm)	30,0	20,0	25,0	31,0	37,0	27,0	39,0	24,0	11,0	16,0	23,0	15,0	890,0	1906 - 1982	64-66	
Maximale Tagessumme (mm)	97,0	89,0	102,0	112,0	56,0	127,0	94,0	97,0	81,0	64,0	64,0	66,0	127,0			
Zahl der Tage mit $\geq 0,1$ mm Niederschlag	20,0	18,0	22,0	22,0	21,0	20,0	19,0	19,0	18,0	19,0	20,0	19,0	237,0	1951 - 1993	25	
Zahl der Tage mit $\geq 1,0$ mm Niederschlag	14,0	15,0	15,0	15,0	15,0	13,0	14,0	12,0	10,0	13,0	13,0	14,0	163,0	1944 - 1982	20-28	
Zahl der Tage mit Regen	15,0	15,0	17,0	14,0	8,0	6,0	6,0	5,0	7,0	9,0	10,0	11,0	125,0	1944 - 1993	31	
LUFTDRUCK in NN																
Mittl. Tagesmittel (hPa)	995,2	997,5	995,9	995,9	997,9	995,8	998,9	998,6	999,8	997,2	994,5	995,3	996,9	1972 - 1993	14	
RELATIVE LUFTFEUCHTE																
Mittl. Tagesmittel (%)	76,0	74,0	75,0	76,0	75,0	78,0	76,0	76,0	76,0	74,0	72,0	76,0	75,0			
Mittel zur Ortszeit 07 Uhr (%)	77,0	78,0	78,0	78,0	79,0	78,0	77,0	77,0	77,0	76,0	75,0	76,0	77,0	1944 - 1960	17	
Mittel zur Ortszeit 13 Uhr (%)	67,0	68,0	70,0	73,0	77,0	76,0	74,0	73,0	71,0	70,0	67,0	67,0	71,0	1944 - 1960	17	
DAMPDRUCK																
Mittl. Tagesmittel (hPa)	6,4	6,5	6,3	5,6	4,6	4,2	4,1	4,1	4,6	5,1	5,4	6,1	5,2			
SONNENSCHEN																
Mittl. Monats-/Jahressumme (Std.)	152,0	161,0	127,0	66,0	34,0	12,0	22,0	74,0	123,0	171,0	174,0	167,0	283,0	1951 - 1964		
Mittl. Tagessumme (Std.)	4,9	5,7	4,1	2,2	1,1	0,4	0,7	2,4	4,1	5,5	5,8	5,4	3,5	1951 - 1964		
in Prozent der möglichen Dauer	30,0	39,0	33,0	22,0	13,0	6,0	9,0	25,0	36,0	39,0	37,0	32,0	29,0	1951 - 1964		
BEWÖLKUNG																
Mittl. Tagesmittel (%)	78,0	74,0	71,0	70,0	67,0	68,0	66,0	67,0	65,0	68,0	74,0	76,0	70,0			
WINDRICHTUNG																
Vorherrsch. Richtung (Grad)	360,0	337,5	337,5	315,0	315,0	292,5	292,5	292,5	315,0	337,5	337,5	337,5	315,0			
WINDGESCHWINDIGKEIT																
Mittl. Tagesmittel (m/s)	3,9	4,4	4,4	4,2	3,9	3,9	4,2	4,2	4,7	4,4	4,4	3,9	4,2			
Windspitze in Böen (m/s)	24,0	26,0	34,0	21,0	36,0	21,0	28,0	31,0	26,0	36,0	27,0	23,0	36,0	1972 - 1993	21	
SICHTWEITE																
Zahl der Tage mit Nebel	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0	1,0	2,0	25,0			
SCHNEEFALL																
Zahl der Tage mit Schneefall $\geq 0,1$ cm	10,0	7,0	8,0	13,0	16,0	18,0	17,0	18,0	15,0	15,0	14,0	12,0	161,0	1944 - 1993	31	
TAUPUNKTTEMPERATUR																
Mittl. Tagesmittel (°C)	0,7	0,9	0,5	-1,4	-3,8	-4,8	-5,2	-5,3	-3,8	-2,4	-1,7	-0,1	-2,2			

Deutscher Wetterdienst															
<u>Klimatafel von Campbell Island / Südpazifik / Neuseeland</u>															
Koordinaten: geographische Breite: 52° 33' S, geographische Länge: 169° 7' E Stationshöhe: 15 m über NN Stationsnummer: 939440															
	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jahr	Periode	Zahl d. Jahre
LUFTTEMPERATUR															
Absolutes Maximum (°C)	20,8	19,1	17,3	16,6	16,5	12,8	11,6	12,9	12,7	13,9	16,1	18,9	20,8	1941 - 1970	26
Mittl. monatl./jährl. Maximum (°C)	15,8	15,4	15,2	12,7	11,3	9,8	9,8	9,9	10,5	11,6	13,3	15,0	17,3	1941 - 1970	26
Mittl. tägl. Maximum (°C)	11,9	11,7	10,8	9,3	8,1	6,8	6,7	7,1	7,8	8,6	9,8	11,3	9,2	1941 - 1970	26
Mittl. Tagesmittel (°C)	9,3	9,4	8,8	7,7	6,3	5,6	5,3	5,6	5,8	6,4	7,1	8,6	7,2	1961 - 1990	28-30
Mittl. tägl. Minimum (°C)	6,7	6,7	6,1	4,9	4,0	2,7	2,5	2,8	3,1	3,7	4,5	5,8	4,5	1941 - 1970	26
Mittl. monatl./jährl. Minimum (°C)	2,0	1,9	1,1	0,1	-1,2	-2,4	-2,9	-2,1	-2,5	-1,5	-0,4	0,7	-4,3	1941 - 1970	26
Absolutes Minimum (°C)	-1,0	-0,2	-2,6	-2,8	-3,9	-6,7	-6,3	-5,1	-5,3	-4,3	-3,6	-1,8	-6,7	1941 - 1970	26
Zahl der Frosttage (Min. < 0°C)	0,1	<0	0,1	0,8	1,9	4,8	5,9	4,8	3,9	2,2	1,6	0,7	26,8	1941 - 1957	17
NIEDERSCHLAG															
Mittl. Monats-/Jahressumme (mm)	122,0	104,0	124,0	119,0	132,0	116,0	104,0	104,0	111,0	109,0	111,0	105,0	1.361,0	1951 - 1990	40
Max Monats-/Jahressumme (mm)	235,0	179,0	198,0	213,0	253,0	218,0	198,0	200,0	235,0	187,0	418,0	279,0	1.755,0	1941 - 1990	49-50
Min. Monats-/Jahressumme (mm)	42,0	63,0	39,0	67,0	51,0	57,0	28,0	41,0	31,0	54,0	39,0	37,0	1.083,0	1941 - 1990	49-50
Maximale Tagessumme (mm)	53,0	59,0	39,0	54,0	53,0	49,0	59,0	56,0	50,0	42,0	51,0	61,0	61,0	1941 - 1970	29-30
Zahl der Tage mit >= 0,0 mm Niederschlag	28,0	24,0	28,0	28,0	28,0	28,0	29,0	28,0	27,0	28,0	27,0	27,0	330,0	1973 - 1990	17-18
Zahl der Tage mit >= 0,1 mm Niederschlag	26,0	24,0	28,0	27,0	28,0	28,0	28,0	28,0	27,0	28,0	26,0	26,0	324,0	1941 - 1957	16-17
Zahl der Tage mit >= 1,0 mm Niederschlag	20,0	18,0	21,0	21,0	23,0	23,0	23,0	22,0	20,0	22,0	20,0	19,0	252,0	1941 - 1970	29-30
LUFTDRUCK in NN															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	1.003,8	1.005,6	1.006,3	1.005,2	1.005,2	1.006,7	1.006,6	1.002,4	1.001,5	1.001,7	1.004,0	1.004,5		1961 - 1990	28-30
RELATIVE LUFTFEUCHTE															
Mittl. Tagesmittel (%)	86,0	86,0	85,0	84,0	84,0	85,0	85,0	84,0	83,0	82,0	84,0	84,0		1973 - 1990	11-12
Mittel zur Ortszeit 06 Uhr (%)	89,0	88,0	87,0	86,0	85,0	85,0	86,0	87,0	86,0	86,0	87,0	86,0		1973 - 1990	12
Mittel zur Ortszeit 15 Uhr (%)	81,0	80,0	82,0	82,0	83,0	84,0	83,0	82,0	80,0	79,0	80,0	79,0		1973 - 1990	11
DAMPFDRUCK															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	10,2	10,0	9,6	9,0	8,3	8,0	7,7	7,9	7,8	8,0	8,5	9,1	8,7	1968 - 1990	20-23
SONNENSCHEN															
Mittl. Monats-/Jahressumme (Std.)	99,0	79,0	57,0	35,0	17,0	7,0	12,0	25,0	51,0	69,0	90,0	96,0	638,0	1951 - 1990	39-40
Mittl. Tagessumme (Std.)	3,2	2,8	1,8	1,2	0,6	0,2	0,4	0,8	1,7	2,2	3,0	3,1	1,7	1951 - 1990	39-40
in Prozent der möglichen Dauer	20,0	20,0	15,0	11,0	6,0	3,0	5,0	8,0	15,0	16,0	19,0	19,0	14,0	1951 - 1990	39-40
BEWÖLKUNG															
Zahl der heiteren Tage	0,7	0,9	0,9	0,8	1,0	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8	0,9	0,8	9,8	1973 - 1990	10-14
Zahl der trüben Tage	19,9	17,8	19,4	16,6	18,7	18,2	18,7	19,3	18,5	18,8	18,6	18,9	223,3	1973 - 1990	10-14
WINDRICHTUNG															
Vorherrsch. Richtung (Grad)	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0		1973 - 1990	10
WINDGESCHWINDIGKEIT															
Mittl. Tagesmittel (m/s)	8,7	8,7	9,0	9,4	9,3	9,3	8,4	8,1	8,8	9,3	8,8	8,2	8,9	1973 - 1990	10
Mittl. Häufigkeit von Windstille (%)	2,0	2,0	3,0	3,0	4,0	5,0	5,0	4,0	3,0	2,0	2,0	3,0	3,0	1973 - 1990	10
Windspitze in Böen (m/s)	28,0	24,0	27,0	26,0	25,0	25,0	25,0	26,0	27,0	27,0	26,0	27,0	28,0	1973 - 1990	10
SICHTWEITE															
Zahl der Tage mit Nebel	1,7	1,8	2,1	1,6	0,6	0,6	0,8	0,1	0,8	0,6	0,6	1,3	12,6	1941 - 1957	17
ERDBODENTEMPERATUR															
Mittl. tägl. Minimum (°C)	5,5	5,4	4,9	3,7	2,7	1,0	1,0	1,6	1,7	2,6	3,5	4,8	3,2	1941 - 1970	
SCHNEEFALL															
Zahl der Tage mit Schneefall >= 0,1 cm	0,0	0,4	0,6	2,3	4,6	7,1	5,5	5,4	5,4	5,1	3,4	1,1	40,9	1957 - 1970	
EREIGNISSTAGE															
Zahl der Tage mit Gewitter	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	<0	0,2	0,2	0,2	-0,1	0,1	1,9	1941 - 1970	30
Zahl der Tage mit Graupel/Hagel	2,5	3,2	5,2	5,8	6,0	8,3	6,1	6,5	7,2	7,9	5,5	3,3	67,4	1941 - 1970	30

Deutscher Wetterdienst															
<u>Klimatafel von Heard Island / Indischer Ozean / Australien</u>															
Koordinaten: geographische Breite: 53° 1' S, geographische Länge: 73° 23' E												Stationshöhe: 5 m über NN		Stationsnummer: 949970	
	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jahr	Periode	Zahl d. Jahre
LUFTTEMPERATUR															
Absolutes Maximum (°C)	14,2	16,8	16,2	15,7	14,7	11,2	13,3	14,2	14,7	13,7	13,0	16,5	16,8	1948 - 2010	20
Mittl. monatl./jährl. Maximum (°C)	9,7	9,5	10,0	9,8	7,6	5,7	6,1	6,7	3,9	5,1	5,2	8,2	12,4	1948 - 1954	7
Mittl. tägl. Maximum (°C)	6,1	6,4	6,4	5,6	4,3	2,0	2,1	1,6	1,4	2,6	3,2	5,0	3,8	1997 - 2009	13
Mittl. Tagesmittel (°C)	6,0	4,8	4,9	4,0	2,9	0,8	0,7	0,1	0,0	1,2	1,9	3,6	2,4	1997 - 2009	13
Mittl. tägl. Minimum (°C)	3,0	3,2	3,3	2,3	1,4	-0,3	-0,7	-1,4	-1,5	-0,2	0,5	2,2	0,9	1997 - 2009	13
Mittl. monatl./jährl. Minimum (°C)	-0,2	-0,3	-0,9	-2,3	-4,2	-6,4	-6,5	-7,4	-7,1	-6,3	-3,1	-1,2	-7,9	1948 - 1954	7
Absolutes Minimum (°C)	-0,9	-1,3	-1,9	-4,4	-5,5	-8,5	-9,1	-10,6	-8,9	-8,6	-6,2	-1,8	-10,6	1948 - 2010	20
NIEDERSCHLAG															
Mittl. Monats-/Jahressumme (mm)	139,0	148,0	143,0	161,0	157,0	98,0	97,0	63,0	67,0	104,0	104,0	135,0	416,0	1948 - 1954	7
Maximale Tagessumme (mm)	37,0	45,0	34,0	39,0	41,0	28,0	31,0	23,0	25,0	26,0	45,0	33,0	45,0	1948 - 1954	7
Zahl der Tage mit >= 0,1 mm Niederschlag	27,0	25,0	27,0	27,0	25,0	23,0	21,0	21,0	20,0	20,0	21,0	24,0	281,0	1948 - 1954	7
LUFTDRUCK in Stationshöhe															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	994,7	999,7	1001,4	997,8	995,1	989,3	993,0	995,9	991,8	993,3	991,7	993,7	994,8	1948 - 1954	7
RELATIVE LUFTFEUCHTE															
Mittl. Tagesmittel (%)	87,0	86,0	88,0	88,0	84,0	84,0	85,0	84,0	83,0	84,0	85,0	87,0	85,0	1948 - 1954	7
DAMPFDRUCK															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	6,7	6,8	6,7	6,5	5,7	5,0	5,0	5,0	4,7	5,1	5,5	6,3	5,7	1948 - 1954	7
SONNENSCHEN															
Zahl der Tage ohne Sonne	9,0	10,0	12,0	11,0	13,0	13,0	14,0	13,0	10,0	11,0	10,0	11,0	137,0	1948 - 1954	5
BEWÖLKUNG															
Mittl. Tagesmittel (%)	77,0	75,0	75,0	73,0	73,0	71,0	71,0	72,0	71,0	71,0	75,0	77,0	73,0	1948 - 1954	7
WINDRICHTUNG															
Vorherrsch. Richtung (Grad)	225,0	225,0	225,0	225,0	225,0	225,0	225,0	225,0	225,0	225,0	225,0	225,0	225,0	1948 - 1954	5
WINDGESCHWINDIGKEIT															
Mittl. Tagesmittel (m/s)	7,2	7,6	7,6	8,1	8,4	8,3	8,8	9,3	9,3	8,5	8,9	7,2	8,3	1948 - 1954	7
Mittl. Häufigkeit von Windstille (%)	4,0	4,0	4,0	5,0	5,0	4,0	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	4,0	3,0	1948 - 1954	5
Windspitze in Böen (m/s)	44,0	44,0	46,0	44,0	43,0	48,0	42,0	56,0	49,0	46,0	53,0	54,0	56,0	1948 - 1954	7
SICHTWEITE															
Zahl der Tage mit Nebel	4,3	3,0	2,0	1,5	1,0	1,0	0,7	0,5	0,3	1,2	0,8	3,7	20,0	1948 - 1954	7
EREIGNISTAGE															
Zahl der Tage mit Gewitter	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1948 - 1954	7

Deutscher Wetterdienst															
Klimatafel von Macquarie Island / Südpazifik / Australien															
Koordinaten: geographische Breite: 54° 30' S, geographische Länge: 158° 57' E Stationshöhe: 6 m über NN Stationsnummer: 949980															
	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jahr	Periode	Zahl d. Jahre
LUFTTEMPERATUR															
Absolutes Maximum (°C)	13,6	12,3	12,6	12,2	9,6	8,7	8,3	8,5	8,6	10,3	10,7	14,4	14,4	1948 - 2004	38
Mittl. monatl./jährl. Maximum (°C)	10,7	10,3	9,8	8,9	8,1	7,5	6,9	7,1	7,2	7,8	8,7	10,2	11,3	1948 - 1991	41-42
Mittl. tägl. Maximum (°C)	8,8	8,6	8,0	6,9	5,8	5,0	4,9	5,1	5,4	5,8	6,5	7,9	6,6	1948 - 2004	55
Mittl. Tagesmittel (°C)	7,1	7,1	6,5	5,3	4,4	3,4	3,4	3,5	3,6	3,9	4,6	6,1	4,9	1961 - 1990	27-30
Mittl. tägl. Minimum (°C)	5,3	5,3	4,7	3,6	2,4	1,5	1,6	1,6	1,6	2,0	2,7	4,2	3,0	1948 - 2004	55
Mittl. monatl./jährl. Minimum (°C)	2,5	2,6	1,3	-0,6	-2,1	-3,5	-3,4	-3,6	-3,7	-2,1	-1,4	1,2	-5,6	1948 - 1991	41-42
Absolutes Minimum (°C)	0,6	-0,6	-2,3	-4,5	-6,8	-7,0	-9,4	-8,9	-8,7	-4,6	-3,3	-1,7	-9,4	1948 - 2004	56
Mittl. Tagesschwankung (°C)	3,5	3,3	3,3	3,3	3,4	3,5	3,3	3,5	3,8	3,8	3,8	3,7	3,6	1948 - 2004	55
Zahl der Frosttage (Min. < 0°C)	0,0	0,0	0,4	1,5	4,9	8,2	7,6	7,6	7,4	5,5	2,9	0,2	46,1	1948 - 2004	55
NIEDERSCHLAG															
Mittl. Monats-/Jahressumme (mm)	83,7	85,1	99,1	93,0	82,4	75,5	70,9	69,7	71,2	75,5	69,1	77,5	952,6	1948 - 2004	
Max. Monats-/Jahressumme (mm)	153,7	136,6	181,4	136,7	144,0	155,4	126,2	156,0	134,2	135,4	137,8	123,2	0,0	1948 - 2004	56
Min. Monats-/Jahressumme (mm)	32,6	40,4	30,0	50,0	46,5	29,6	22,1	27,4	25,0	41,9	32,1	16,0	0,0	1948 - 2004	56
Maximale Tagessumme (mm)	34,0	41,0	52,8	32,4	33,6	35,0	37,1	26,7	22,8	29,0	21,0	34,4	52,8	1948 - 2004	38
Zahl der Tage mit ≥ 0,0 mm Niederschlag	29,0	27,0	30,0	29,0	30,0	29,0	30,0	30,0	29,0	30,0	28,0	29,0	350,0	1948 - 1991	42
Zahl der Tage mit ≥ 0,1 mm Niederschlag	25,0	23,0	26,0	27,0	28,0	26,0	27,0	25,0	25,0	25,0	24,0	24,0	307,0	1961 - 1990	30
Zahl der Tage mit ≥ 0,3 mm Niederschlag	25,4	24,5	26,8	27,0	27,9	26,8	26,9	26,8	25,8	25,8	24,8	24,3	312,8	1948 - 2004	38
Zahl der Tage mit ≥ 1,0 mm Niederschlag	19,0	18,0	19,0	20,0	19,0	18,0	17,0	17,0	18,0	18,0	17,0	16,0	216,0	1968 - 1990	20-23
LUFTDRUCK in NN															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	999,0	1.000,6	1.001,6	1.000,2	1.001,2	1.002,6	1.003,1	1.002,2	996,3	996,3	997,6	998,9	1.000,1	1948 - 1991	23-31
RELATIVE LUFTFEUCHTHEIT															
Mittl. Tagesmittel (%)	88,0	88,0	88,0	88,0	88,0	88,0	88,0	88,0	86,0	85,0	86,0	87,0	87,0	1948 - 1990	26-27
Mittel zur Ortszeit 06 Uhr (%)	89,0	89,0	89,0	89,0	89,0	88,0	88,0	88,0	87,0	86,0	86,0	89,0	88,0	1948 - 1991	26
Mittel zur Ortszeit 15 Uhr (%)	86,0	86,0	86,0	88,0	88,0	87,0	89,0	87,0	85,0	84,0	84,0	86,0	87,0	1948 - 1991	27
DAMPFDRUCK															
Mittl. Tagesmittel (hPa)	8,9	9,0	8,7	8,0	7,5	6,9	7,0	7,0	6,8	6,9	7,3	8,2	7,7	1968 - 1990	19-23
SONNENSCHEN															
Mittl. Monats-/Jahressumme (Std.)	99,2	95,2	80,6	54,0	31,0	18,0	24,8	43,4	63,0	89,9	102,0	105,4	806,5	1961 - 1990	30
Mittl. Tagessumme (Std.)	3,5	3,6	2,7	1,8	1,0	0,6	0,8	1,5	2,3	3,0	3,5	3,5	2,3	1948 - 2004	44
in Prozent der möglichen Dauer	19,0	23,0	21,0	17,0	12,0	8,0	10,0	14,0	18,0	21,0	22,0	20,0	18,0	1961 - 1990	30
BEWÖLKUNG															
Mittl. Tagesmittel (%)	84,0	80,0	81,0	83,0	81,0	81,0	81,0	81,0	80,0	81,0	84,0	85,0	82,0	1948 - 1978	30
Zahl der heiteren Tage	0,3	0,5	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4	3,6	1948 - 2004	55
Zahl der trübten Tage	25,5	22,2	23,8	24,3	25,1	24,4	25,4	25,1	23,6	24,8	24,3	24,6	293,2	1948 - 2004	55
WINDRICHTUNG															
Vorherrsch. Richtung (Grad)	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	270,0	1948 - 1991	24
WINDGESCHWINDIGKEIT															
Mittl. Tagessmittel (m/s)	10,3	9,8	10,3	9,8	8,7	9,8	9,3	9,3	10,3	9,8	8,2	8,2	9,3	1948 - 1970	15
Zahl der Tage mit ≥ 17,2 m/s (8 Bft)	4,0	4,0	5,0	4,0	3,0	5,0	5,0	6,0	7,0	4,0	2,0	2,0	51,0	1948 - 1970	15
Windspitze in Boen (m/s)	46,8	40,2	49,9	47,4	47,4	46,8	49,4	43,8	51,5	44,8	39,1	44,3	51,5	1948 - 2004	55
SICHTWEITE															
Zahl der Tage mit Nebel	6,5	5,4	5,5	5,8	6,0	5,1	6,1	5,3	3,4	4,0	5,3	5,7	64,1	1967 - 1978	12
SCHNEEFALL															
Zahl der Tage mit Schneefall ≥ 0,0 cm	2,0	3,0	6,0	8,0	11,0	12,0	12,0	12,0	14,0	13,0	10,0	5,0	108,0	1948 - 1991	42
EREIGNISTAGE															
Zahl der Tage mit Gewitter	0,2	0,2	0,4	0,2	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,2	0,0	0,0	1,8	1968 - 1976	9

Deutscher Wetterdienst															
Klimadaten weltweit															
LUFTTEMPERATUR: Mittl. Tagesmittel °C															
	Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jahr		
619970 Alfred-Faure, Crozet-Inseln / Indischer Ozean	6,6	7,6	7,5	6	5,3	4,6	3,3	3,3	3,1	3,5	4,7	5,6	5,1		
619980 Port-aux-Francais, Kerguelen / Indischer Ozean	7,2	7,5	7	5,6	3,7	2,4	2	2	2,2	3,3	4,7	6,3	4,5		
689920 Bouvet-Insel / Süd-Atlantik	1,6	1,5	1,5	0,3	-0,5	-1,1	-2,7	-2,5	-2,7	-1,7	-0,6	0,7	-0,6		
689940 Marion Eiland / Indischer Ozean	7,2	7,7	7,4	6,2	5,1	4,7	4,1	3,7	3,8	4,5	5,3	6,3	5,5		
888900 Stanley / Falkland-Inseln	8,8	9,1	8,1	6	3,8	2,6	2,1	2,5	3,4	5	6,9	7,9	5,6		
889030 Grytviken / Süd-Georgien	4,9	5,6	4,8	2,5	0,1	-0,5	-1,2	-1,2	0,1	1,9	3,3	3,7	2		
939440 Campbell Island / Südpazifik	9,3	9,4	8,8	7,7	6,3	5,6	5,3	5,6	5,8	6,4	7,1	8,6	7,2		
949970 Heard Island / Indischer Ozean	6	4,8	4,9	4	2,9	0,8	0,7	0,1	0	1,2	1,9	3,6	2,4		
949980 Macquarie Island / Südpazifik	7,1	7,1	6,5	5,3	4,4	3,4	3,4	3,5	3,6	3,9	4,6	6,1	4,9		

Deutscher Wetterdienst		Klimadaten weltweit													
		WASSERTEMPERATUR: Mittel °C													
		Jan	Feb	Mrz	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	Jahr	
689940	Marion Eiland / Indischer Ozean	5,5	6	5,9	5,5	4,9	4,5	4,2	4,1	4	4,2	4,7	5,1	4,9	
879380	Ushuaia / Insel Feuerland, Prov. Tierra del Fuego	7	7	6	6	5	5	4	4	4	5	5	6	5	
889680	Orcadas del Sur / Süd-Orkney-Inseln	-0,4	-0,1	-0,2	-0,9	-1,5	-1,7	-1,8	-1,8	-1,7	-1,7	-1,4	-0,9	-1,2	

XI. Danksagung

Zuallererst vielen herzlichen Dank an Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz für die Möglichkeit ein so außergewöhnliches Thema wählen zu dürfen und für die geduldige und nette, manchmal auch witzige Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit. Danke auch für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und für das stets offene Ohr für Fragen jeglicher Art.

Mein Dank geht auch an die Mitarbeiter des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie. Dabei ganz besonders an Frau W. Scholz, Frau Servatius und Herrn Gök, die stets hilfsbereit, nett und kompetent waren, besonders bei der Vorbereitung der elektronenmikroskopischen Proben.

Danke auch an meine Mitdoktoranden H. Gantert, P. Dallmeyer und alle anderen für eine schöne Zeit und unschätzbare Unterstützung.

Besonderer Dank geht an die Loro Parque Fundación auf Teneriffa, die mir ermöglichte, die Grundlage für meine Arbeit zu erhalten, die Blutproben der Königspinguine. Dort wurde ich tatkräftig unterstützt, mir wurden Fragen beantwortet sowie Gerätschaften und Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt. Danke an Dr. Kirstin Oberhäuser, David Perpiñan, Andrea Cadiz und vor allem an Cristine Jo Dreisörner und an die anderen Klinikmitarbeiter. Danke an das „Pinguineam“ Almudena Gonzales, Martin Leber, Luis Borgeo, Jose Quintero und Daniel Bello, die jeden Tag auf einer Sonneninsel in Winterklamotten frieren für das Wohl der Pinguine.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Kollegen der Virologie Dr. Viktor Dyachenko und Jinyong Wang, die mich trotz eigener Arbeit ihr Fluoreszenzmikroskop, ihre Kamera und ihren Computer benutzen ließen. Es war immer ein netter Ausflug.

Danke an Matthias Zepper, der mir freundlicherweise erlaubt hat einige seiner wunderschönen Fotos von Königspinguinen hier zu verwenden und der mit seiner Seite www.penguin.net die Freude und das Interesse an diesen einzigartigen Vögeln fördert und der breiten Öffentlichkeit fundiert zugänglich macht.

Danke an „eBioscience, an Affymetrix company“ für das schöne Bild zur Hämatopoese, welches ich freundlicherweise verwenden durfte.

Dank geht auch an Herrn Krasniqi, meinen „Oberkellner“ bei meinem Nebenjob, der mir meine Schichten stets so legte, dass ich genug Zeit hatte, diese Dissertation anzufertigen und danke meinen netten Kollegen, die die Arbeit zur willkommenen Abwechslung machten.

Danke an meine Freunde Hilmar, Constantin, Ulrich, Matthis, Ulrike, Philipp, Lukas, Marlene, Julie, Patrick, Alex und all die anderen, die mich seelisch, moralisch und tatkräftig unterstützen und mir stets zur Seite stehen. Danke Euch. Andere Leute haben Geschwister, ich habe Euch.

Und zu guter Letzt danke ich denen, die alles möglich gemacht haben. Meinen Eltern. Sie ermöglichten mir mit Liebe und Freude die zu werden, die ich heute bin. Danke Euch von Herzen für alles.