



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Immunzytochemische Untersuchungen an den Rodletzellen bei  
Cyprinidae (Teleostei, Pisces) zur Aufklärung ihrer umstrittenen  
Abwehrfunktion

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

|                                        |                                  |
|----------------------------------------|----------------------------------|
| Verfasserin / Verfasser:               | Simone Lugmayr                   |
| Matrikel-Nummer:                       | 0100305                          |
| Studienrichtung (lt.<br>Studienblatt): | A439, Zoologie                   |
| Betreuerin / Betreuer:                 | Ao. Univ.-Prof. Dr. Edith Bielek |

Wien, am



# Inhaltsverzeichnis

|                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------|-----|
| Abkürzungsliste.....                                          | III |
| Abbildungsliste.....                                          | IV  |
| Tabellenliste .....                                           | VII |
| Zusammenfassung .....                                         | 1   |
| Summary .....                                                 | 3   |
| <br>                                                          |     |
| 1. Einleitung.....                                            | 4   |
| 1.1. Die Rodletzellen der Knochenfische (Teleostei).....      | 4   |
| 1.2. Das endoplasmatisches Retikulum .....                    | 10  |
| 1.2.1. Sekretorische Pfad .....                               | 10  |
| 1.2.2. Proteinfaltung und Protein-Qualitätskontrolle.....     | 11  |
| 1.3. Zytoskelett .....                                        | 15  |
| <br>                                                          |     |
| 2. Material und Methoden.....                                 | 17  |
| 2.1. Verwendete Materialien .....                             | 17  |
| 2.1.1. Verwendete primäre Antikörper .....                    | 17  |
| 2.1.2. Verwendete sekundäre Antikörper .....                  | 19  |
| 2.1.3. Verwendete Kits .....                                  | 19  |
| 2.2. Untersuchungsobjekt, Präparation und Fixierung .....     | 20  |
| 2.3. Histologische Untersuchung.....                          | 20  |
| 2.4. Vorbereitung der Immunzytochemie.....                    | 21  |
| 2.5. Anleitung zur indirekten Immunfluoreszenz (IIF) .....    | 21  |
| 2.6. Anleitung zur fluorchromgekoppelten ABC-Methode .....    | 22  |
| 2.7. Anleitung zur enzymatischen PAP-Methodik .....           | 22  |
| 2.8. Konservierung und Auswertung .....                       | 22  |
| 2.9. Phalloidin – Färbung .....                               | 23  |
| 2.10. Bildbearbeitung .....                                   | 24  |
| <br>                                                          |     |
| 3. Ergebnisse .....                                           | 25  |
| 3.1. Äußere Betrachtung der untersuchten Karpfenartigen ..... | 25  |
| 3.2. Immunzytochemie der Rodletzellen.....                    | 25  |
| 3.2.1. ER Chaperone.....                                      | 25  |
| 3.2.1.1. Grp78/BiP.....                                       | 25  |
| 3.2.1.2. Calreticulin .....                                   | 33  |
| 3.2.1.3. Calnexin.....                                        | 36  |
| 3.2.1.4. ERp57/Grp58.....                                     | 37  |
| 3.2.1.5. Ubiquitin.....                                       | 39  |
| 3.2.2. Zytoskelett Filamente .....                            | 39  |
| 3.2.2.1. $\alpha$ –Tubulin .....                              | 39  |
| 3.2.2.2. Vimentin.....                                        | 41  |
| 3.2.2.3. Aktin .....                                          | 44  |
| 3.2.2.4. Myosin.....                                          | 50  |

|        |                                                      |    |
|--------|------------------------------------------------------|----|
| 3.2.3. | Phalloidin­färbung zum indirekten Aktinnachweis..... | 53 |
| 3.3.   | Histologische Untersuchung .....                     | 57 |
| 3.3.1. | Leber und Gallenblase .....                          | 57 |
| 3.3.2. | Darm .....                                           | 60 |
| 3.3.3. | Kopfnieren und restliche Niere .....                 | 60 |
| 3.3.4. | Milz .....                                           | 63 |
| 3.3.5. | Herz.....                                            | 63 |
| 3.3.6. | Kiemens .....                                        | 64 |
| 4.     | Diskussion.....                                      | 65 |
| 5.     | Literaturverzeichnis .....                           | 74 |
| 6.     | Curriculum vitae .....                               | 80 |
|        | Danksagung .....                                     | 81 |

## Abkürzungsliste

|                     |                                                                   |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Abb.                | Abbildung                                                         |
| ABC                 | Avidin-Biotin-Komplex                                             |
| A. dest.            | destilliertes Wasser                                              |
| A. fluv.            | Leitungswasser                                                    |
| BiP                 | Immunoglobuline-binding protein                                   |
| BSA                 | Bovine serum albumin (Rinderserum Albumin)                        |
| CLN                 | Calnexin                                                          |
| CRT                 | Calreticulin                                                      |
| DNA                 | Desoxyribonucleinsäure                                            |
| Dapi                | 4',6'-Diamidino-2-phenylindoldrichlorid                           |
| EDTA                | Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat            |
| EGC                 | Eosinophilic granular cells                                       |
| EOH                 | Ethanol                                                           |
| ER                  | Endoplasmatisches Retikulum                                       |
| ERp                 | Endoplasmatisches Retikulum Protein                               |
| FITC                | Fluorescein-Isothiocyanat                                         |
| g                   | Gramm                                                             |
| Grp                 | Glucose-regulated protein                                         |
| HC                  | Humid chamber (feuchte Kammer)                                    |
| H.E. Färbung        | Hämatoxylin-Eosin-Färbung                                         |
| hps.                | hauptsächlich                                                     |
| HSP                 | Hitzeschockproteine (Heat-shock-proteins)                         |
| kDa                 | Kilo Dalton                                                       |
| M                   | Molarität                                                         |
| mg                  | Milligramm                                                        |
| MHC I               | Major histocompatibilty complex I                                 |
| min                 | Minute                                                            |
| ml                  | Milliliter                                                        |
| mAb                 | Monoklonaler Antikörper                                           |
| nm                  | Nanometer                                                         |
| ON                  | Over night (über Nacht)                                           |
| pAb                 | Polyklonaler Antikörper                                           |
| PBS                 | Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)     |
| PBT                 | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung + Tween 20                      |
| PBBT                | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung + Tween 20 + Rinderserumalbumin |
| RITC                | Rhodamine B-isothiocyanate                                        |
| RT                  | Raumtemperatur                                                    |
| <i>R. thelohani</i> | <i>Rhabdospira thelohani</i>                                      |
| RZ                  | Rodletzellen                                                      |
| s.                  | siehe                                                             |
| Tab.                | Tabelle                                                           |
| Tris                | Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan                                    |
| TRITC               | Tetramethylrhodamine-isothiocyanate                               |
| µl                  | Mikroliter                                                        |
| u.a.                | unter anderem                                                     |

## Abbildungsliste

- Abb. 1.: Schematische und vereinfachte Darstellungen der Rodletzelle: a Längsschnitt; b Querschnitt in Höhe des basal gelegenen Zellkerns.
- Abb. 2.: Halbschematische Zeichnung eines hochprismatischen Epithels mit Rodletzellen.
- Abb. 3.: Schema der Substratbindungskonkurrenz zwischen molekularen Chaperonen und dem Ubiquitin-Proteasom System.
- Abb. 4: Immunfluoreszenz-Lokalisierung des ER Proteins Grp78/BiP im Darm von *C. auratus*.
- Abb. 5: Immunmarkierung mit dem endoplasmatischen Retikulum Protein Grp78/BiP in einer Rodletzelle im Darm von *C. auratus*.
- Abb. 6: Detailvergrößerung der Abb. 5. Die Rodletzelle zeigt intensiv Anti-Grp78/BiP markierten Rodlets.
- Abb. 7: Mikrofotogramm mit immunhistochemischer Darstellung des Proteins Grp78/BiP in einer Rodletzelle im Stadium der Sekretion mit markierten, nach apikal orientierten Rodlets.
- Abb. 8: Detailvergrößerung der Abb. 7. Die ausgeschleuderten Rodlets zeigen eine Immunmarkierung mit Grp78/BiP. Im basalen Bereich der Zelle sind positiv reagierende filamentöse Verlängerungen der Stäbchen sichtbar.
- Abb. 9: Immunmarkierung mit dem Protein Grp78/BiP im Darm von *C. auratus* bei 400facher Vergrößerung.
- Abb.10: Immunmarkierung nach der PAP-Methode mit dem endoplasmatischen Retikulum Protein Grp78/BiP im Darm von *C. auratus*.
- Abb.11: Mikrofotogramm mit Grp78/BiP Darstellung in zwei Rodletzellen im Darm von *C. auratus*.
- Abb.12: Immunfluoreszenz-Lokalisierung mit Grp78/BiP im Herz von *C. carpio*. Die Rodletzellen zeigen eine zytoplasmatische Reaktion der Rodlets.
- Abb.13: Immunmarkierung mit Grp78/BiP im Herz von *C. carpio*. In der Rodletzelle sind die markierten Rodlets nach lateral orientiert.
- Abb.14: Mikrofotogramm mit enzymatischer Grp78/BiP Darstellung in einem intrahepatischen Gallengang der Leber von *C. carpio*.
- Abb.15: Mikrofotogramm mit immunhistochemischer Darstellung von Calreticulin in einer Rodletzelle im Darm von *C. auratus*.
- Abb.16: Immunmarkierung mit Calreticulin in einer längs angeschnittenen Rodletzelle im Darm von *C. auratus*.
- Abb.17: Immunmarkierung mit Calreticulin in der Gallenblase von *C. auratus* mit einem längs getroffenen Erythrozyten.
- Abb.18: Immunmarkierung mit dem Chaperon Calnexin im Darm von *C. auratus*.
- Abb.19: Mikrofotogramm mit immunhistochemischer Darstellung von ERp57 in den glatten Muskelzellen im Darm von *C. auratus*.
- Abb.20: Immunfluoreszenz Darstellung von ERp57 im Darm von *C. auratus*.
- Abb.21: Positivkontrolle von ERp57 in einem mikroskopischen Präparat vom humanen Magen.
- Abb.22: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von Ubiquitin in der Gallenblase von *C. auratus*.
- Abb.23: Mikrofotogramm mit immunhistochemischer Darstellung von  $\alpha$ -Tubulin in einer Rodletzelle in der Lamina propria von *C. auratus*.
- Abb.24: Positivkontrolle von Vimentin in einem mikroskopischen Humanpräparat des Herzens. Epikardialen Strukturen zeigen eine intensive Antikörpermarkierung.
- Abb.25: Positivkontrolle von Vimentin in einem mikroskopischen Präparat der humanen Epidermis. Zwischen den Keratinozyten zeigen sich intensive Signale.
- Abb.26: Mikrofotogramm mit Immunfluoreszenz-Darstellung von Vimentin im Darm von *C. auratus*. Die beiden in der Darmschleimhaut lokalisierten Rodletzellen weisen ein negatives Markierungsergebnis auf.
- Abb.27: Mikrofotogramm mit Immunfluoreszenz Darstellung von Vimentin in einem intrahepatischen Gallengang von *C. carpio*. Die hochprismatischen Epithelzellen zeigen besonders intensive Signale an den Zellgrenzen zu den eingewanderten Rodletzellen.

- Abb.28: Immunmarkierung mit polyklonalen Aktin im Darm von *C. auratus*. Die beiden in der Darmschleimhaut lokalisierten Rodletzellen weisen schwach-positive Markierungsergebnisse im Zellinneren auf.
- Abb.29: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von polyklonalen Aktin im Darm von *C. auratus*. Im Zellinneren einer Rodletzelle sind schwach-positive Fluoreszenzen zu erkennen. Die Kapsel ist negativ gefärbt.
- Abb.30: Immunmarkierung mit polyklonalen Aktin im Darm von *C. auratus*. Die beiden in der Darmschleimhaut lokalisierten Rodletzellen weisen ein negatives Markierungsergebnis im Zellinneren auf.
- Abb.31: Mikrofotogramm mit Immunmarkierung mit polyklonalen Aktin im Herz von *C. auratus*. Die Herzmuskelzellen zeigen eine quergestreifte Markierung auf.
- Abb.32: Mikrofotogramm mit immunzytochemischer Darstellung von Amöba-Aktin in der Gallenblase von *C. auratus*. Eine Rodletzelle zeigt positive zytoplasmatische Reaktionen.
- Abb.33: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von Amöba-Aktin in der Gallenblase von *C. auratus*. Die im hochprismatischen Epithel platzierte Rodletzelle zeigt eine intensivere Reaktivität am apikalen Zellpol.
- Abb.34: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von Myosin mithilfe eines polyklonalen Antikörpers Anti-Myosin (smooth & skeletal) im Darmepithel von *C. auratus*. Die im hochprismatischen Epithel platzierten Rodletzellen zeigen keine Reaktivität in der Kapselstruktur.
- Abb.35: Positivkontrolle von pAb Myosin in einem mikroskopischen Präparat des Darmes von *C. carpio*.
- Abb.36: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von smooth Myosin im Darmepithel von *C. auratus*. Die im hochprismatischen Epithel platzierte Rodletzelle zeigt keine Reaktivität in der Kapselstruktur. Im Zytoplasma sind Signale deutlich zu erkennen.
- Abb.37: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von smooth Myosin im Darmepithel von *C. auratus*. Strukturen im Zytoplasma der angeschnittenen Rodletzelle zeigen zum apikalen Pol orientierte Fluoreszenzen. Die Kapsel verblieb ungefärbt.
- Abb.38: Positivkontrolle von smooth Myosin in einem mikroskopischen Präparat der Gallenblase von *C. auratus*.
- Abb.39: Phalloidin-Fitc Färbung zur Darstellung von Aktin im Darm von *C. auratus*. Die glatten Muskelzellen der Tunica muscularis zeigen eine zytoplasmatische Färbung. Direkt über dieser Schicht liegende Zellen weisen eine intensive Granulafärbung mit Phalloidin auf.
- Abb.40: Phalloidin-Fitc Färbung zum indirekten Nachweis von Aktin im Darm von *C. auratus*. In der Lamina epithelialis befindet sich eine Rodletzelle mit positiv reagierender Kapsel.
- Abb.41: Färbung mit Phalloidin-Fitc zum indirekten Nachweis von Aktin im Darm von *C. auratus*. Zwei in der Lamina epithelialis gefundene Rodletzellen mit typisch negativ markierter Kapsel.
- Abb.42: Phalloidin-Fitc Färbung zum indirekten Nachweis von Aktin in der Gallenblase von *C. auratus*. Die Muskelschichten der Vesica fellea zeigen eine intensive Markierung mit dem Fluoreszenzstoff. Im hochprismatischen Epithel ist eine nicht gefärbte Rodletzelle zu erkennen.
- Abb.43: Indirekter Aktinnachweis mit Phalloidin-Fitc im Herz von *C. auratus*. Die glatten Herzmyozyten sind markiert.
- Abb.44: Indirekter Aktinnachweis mit Phalloidin-Fitc im Herz von *C. auratus*. Die Rodletzellen zeigen ein schwach- markiertes Zytoplasma und negativ gefärbte Kapseln.
- Abb.45: Phalloidin-Fitc Färbung zur Darstellung des Mikrofilaments Aktin im Herz von *C. auratus*. Die Kapseln der Rodletzellen sind negativ gefärbt. Ihr Zytoplasma zeigt schwach- positive Fluoreszenzen.
- Abb.46: Phalloidin-Fitc Färbung zum indirekten Aktinnachweis im Herz von *C. auratus*. Die Kapseln der Rodletzellen zeigen ein positives Färbeverhalten. Ihr Zytoplasma zeigt schwach-positive Fluoreszenzen. Einige Myozyten sind in gleicher Fluoreszenzstärke markiert.

- Abb.47: Mikrofotogramm der Leber von *C. carpio* mit zum Teil hochgradig degenerierten Hepatozyten.
- Abb.48: Mikrofotogramm der Leber von *C. carpio* mit Hepatozyten und einer großen Venole.
- Abb.49: Mikrofotogramm eines intrahepatischen Gallengangs mit zahlreichen Rodletzellen in der Leber von *C. carpio*.
- Abb.50: Mikrofotogramm von quer getroffenen Darmzotten von *C. auratus*. In der Lamina epithelialis mucosae liegt zwischen Enterozyten und Becherzellen eine Rodletzelle
- Abb.51: Mikrofotogramm der hämatopoetisch tätigen Kopfnieren von *C. carpio* mit mehreren im Grundgewebe oder mit Endothelien assoziierten Rodletzellen.
- Abb.52: Mikrofotogramm der Kopfnieren von *C. carpio* mit einer Rodletzelle, die direkt zwischen die Endothelzellen gelagert ist und das Blutgefäßlumen leicht verengt.
- Abb.53: Mikrofotogramm der Rumpfnieren von *C. carpio* mit dargestellten Tubuli, Glomeruli und retikuloendotheliale Grundgewebe mit zahlreichen eosinophilen Granulozyten und anderen Abwehrzellen. Rodletzellen sind in Gruppen oder einzeln im Grundgewebe angeordnet.
- Abb.54: Mikrofotogramm der Rumpfnieren von *C. carpio* mit zahlreichen Tubuli. In retikuloendothelialen Grundgewebe sind neben eosinophilen Granulozyten auch Rodletzellen zu finden
- Abb.55: Mikrofotogramm der epikardialen Herzscheidewand von *C. carpio* mit mehreren endothelial assoziierten Rodletzellen.
- Abb.56: Mikrofotogramm eines Pigmentmakrophagen-„Nodus“ mit randständigen Rodletzellen und einem eosinophilen Granulozyten in der epikardialen Schicht des Herzens von *C. carpio*.

## Tabellenliste

- Tab.1: Verwendete primäre Antikörper zur Untersuchung des endoplasmatischen Retikulums mit Angaben über Speziesherkunft, Hersteller, optimaler Verdünnung, Inkubationsdauer, Inkubations-temperatur und Detektionsmethodik.
- Tab.2: Verwendete primäre Antikörper zur Untersuchung des Zytoskeletts mit Angaben über Speziesherkunft, Hersteller, optimaler Verdünnung, Inkubationsdauer, Inkubations-temperatur und Detektionsmethodik.
- Tab.3: Verwendete sekundäre Antikörper mit Angaben über Speziesherkunft, Hersteller, optimaler Verdünnung, Inkubationsdauer, Inkubations-temperatur und Detektionsmethodik.
- Tab.4: Auflistung der in dieser Studie untersuchten Individuen mit Angaben über die Artzugehörigkeit, Geschlecht, Größe, Datum der Organentnahme und der Bezeichnung.
- Tab. 5: Auflistung der entnommenen Organe.Tab.6: Auflistung der verwendeten Fluorochrome mit ihren Absorptions- und Emissionsspektren und der gebrauchten Mikroskopfilter.



## Zusammenfassung

Rodletzellen sind Zellen, die exklusiv bei marinen und limnischen Knochenfischen vorkommen und neben einer dicken fibrillären Kapsel charakteristische stäbchenförmige Einschlüsse aufweisen (sog. „rodlets“ bestehend aus umgebendem „sac“ und einer zentraler Verdichtung „core“). Sie sind seit ihrer Entdeckung vor über 100 Jahre noch immer Gegenstand zahlreicher Spekulationen und Diskussionen. Heutzutage wird ihnen oft eine Funktion im piscinen Abwehrsystem zugeschrieben, die aufgrund von histologischen und statistischen Untersuchungen nur teilweise untermauert wird. Bei mehreren Vertretern der Fischfamilie Cyprinidae (*Cyprinus carpio* L., *Carassius auratus* L.) wurde das endoplasmatische Retikulum der Rodletzellen mit immunzytologischen Methoden (indirekte und ABC Immunfluoreszenz, enzymatische Detektion nach PAP-Methodik) untersucht, um so die Zellfunktionen zu studieren. Dazu wurden die Gewebeproben mit Antikörpern für die Chaperone (Calreticulin, Calnexin, Grp78/BiP und ERp57) sowie Ubiquitin behandelt. Die kapselartige Umhüllung wurde mit verschiedenen zytoskeletalen Antikörpern auf das Vorhandensein von Aktin, Myosin, Vimentin und  $\alpha$ -Tubulin untersucht, um so auf die Funktion dieser Zellstruktur schließen zu können.

Die immunzytochemische Färbungen für die ER Chaperone mit anti-Calreticulin und mit anti-Grp78/BiP zeigten intensiv positive Reaktionen in den Einschlusskörperchen. Eine unterschiedliche Reaktivität zwischen Rodletsäckchen und Kern konnte fluoreszenzmikroskopisch nicht aufgelöst werden. Durch die positiven Reaktionen der beiden Chaperon Antikörper lässt sich die Vermutung äußern, dass es sich bei den Rodlets zum Großteil um Produkte des rauen endoplasmatischen Retikulum handelt, die vorwiegend aus Proteinen und nur zu geringen Teil aus Glykoproteinen bestehen. Es kommt zu einer starken Bindung von GRp78/BiP an die Rodlets, die auch für die abgegebenen Zellkörperchen besteht. Die Überexprimierung dieser Faltungsproteine in den Rodletzellen wurde vermutlich durch die Entstehung der Rodlets, die als fehlgefaltene Zellprodukte interpretiert werden, verursacht und soll eine frühzeitige Apoptose der Zellen verhindern. Dies wird als eine positive aberrante Zelldifferenzierung typisch für Rodletzellen gedeutet, die durch exogene oder endogene, im Fischorganismus wirkende Stressoren hervorgerufen wird. Allerdings können die Rodlets und die gebundenen Chaperone Grp78/BiP und CRT im Fischorganismus als Chaperonkine wirken, indem sie ausgeschleudert immunologische Effektorzellen locken. Somit erscheint eine indirekt immunologische Funktion der Rodletzellen möglich.

Sowohl direkte (Immunfluoreszenz) als auch indirekte (Phalloidin Färbung) Nachweise von Aktin führten zu negativen Ergebnissen in der Kapsel. Auch Myosin konnte nicht in dieser für RZ typischen Struktur gefunden werden. Im Zytoplasma deuten positive

Immunreaktionen mit Aktin (anti-Amöba Aktin und polyklonales Aktin) auf eine Funktion als Zellgerüst hin. Eine in der Literatur häufig angenommene kontraktile Funktion der gesamten Zellwand, mit der die Zellaggregate ausgeschleudert werden, konnte nicht nachgewiesen werden.

## Summary

Rodlet cells (RCs) are cells exclusive to marine and freshwater teleosts. The controversy of their function and origin, which has been started since their discovery for over 100 years, still goes on. Nowadays often a function in the piscine defensive system is assumed, which is only partly supported by histological and statistical findings. Immunocytochemical studies (indirect and ABC immunofluorescence, enzymatic detection with PAP-complex) on their typical features, i.e. subplasmalemmar capsule containing thinner and thicker filaments and bipartite rodlets ("sac" and dense, central "core"), were used to test the proposed immunological function of these cells.

The RCs were treated with antibodies for endoplasmic reticulum chaperones like calreticulin, calnexin, Grp78/BiP and ERp57, as well as for ubiquitin. Several cytoskeletal antibodies (actin, myosin, vimentin and  $\alpha$ -tubulin) were used for the identification of the capsular fibrils. Therefore microscopic tissue samples of the digestive tract, liver, gall bladder, and heart from individuals of the genera Cyprinidae (*Cyprinus carpio* L., *Carassius auratus* L.) were taken and prepared for immunofluorescence. Immunocytochemical observations with anti-Grp78/BiP and anti-calreticulin exhibited intense immunoreactive signals in the rodlets. Thus, the rough ER seems to be the main origin of the peculiar club-like inclusions, consisting of numerous proteins and a smaller amount of glycoprotein. The binding reaction of the rodlets to Grp78/BiP seems quite strong, and remains intact through secretion.

The intense staining of the folding proteins CRT and Grp78/BiP point to alterations of cellular homeostasis related to rodlet cells. Exogenous as well as endogenous factors may induce ER stress resulting in accumulation of misfolded proteins and associated with the formation of the rodlets (without distinguishing between core or/and sacs possible in the LM). The aberrant cell differentiation might prevent premature apoptosis. Moreover, the folding proteins may function as chaperokines, the rodlets indirectly acting as defensive, secretory products to attract immunological effective cells.

An active contractile function of the fibrous capsule seems unlikely, because indirect (Phalloidin-staining) and direct (immunofluorescence) tests for actin led to negative results in the capsule. Antibodies for myosin gave also negative results. In the cytoplasm weak staining for actin (amoeba actin and polyclonal actin) emphasized a function as structural elements in rodlet cells. An indication for a general contractile capsule for rodlet secretion could not be found.

## 1. Einleitung

Bei Fischen sind neben immunologischen Tests und Blutanalysen histologische Untersuchungen ein wichtiges Hilfsmittel zur Bewertung von akuten sowie chronischen Krankheitsursachen und Pathogenen (McLeay & Gordon 1977). Durch die zelluläre Betrachtung kann der Einfluss von möglichen Stressoren aufgedeckt und beurteilt werden. Aufgrund der enormen ökonomischen Bedeutung mancher Teleostarten ist die Kenntnis über Zellen, die gegen pathogene Einflüsse und deren mögliche letale Folgen arbeiten, wesentlich. Allerdings gibt es immer noch einige wenige Zelltypen des Knochenfischorganismus, deren Ursprung und/oder Funktion noch weitgehend ungeklärt sind. Dazu zählen die sogenannten Rodletzellen (abgekürzt: RZ), die derzeit trotz ungenügender Beweise als Bestandteile des angeborenen Immunsystems im Fischorganismus gelten. Obwohl ihre Aufgabe weiterhin nicht eindeutig geklärt wurde, sehen viele Forscher sie als eine Art nützlicher Biomarker (Manera & Dezfuli 2002; Dezfuli et al. 2002, 2006, 2007), da sie bei Stressoreneinfluss in Geweben häufiger anzutreffen sind bzw. akkumulieren und dadurch im histologischen Schnitt aufgrund ihres typischen Aussehens leicht auffindbar sind.

### 1.1. Die Rodletzellen der Knochenfische (Teleostei)

Rodletzellen werden in vielen Geweben und Organen von zahlreichen Knochenfischen gefunden. Die typischen Merkmale dieser polaren und oval bis lang gestreckten Zellen sind eine unter dem Plasmalemma liegende Umhüllung, die aus kompakt gelagerten, dickeren und dünneren Mikrofibrillen besteht. Manche Autoren beschreiben eine unregelmäßige, undulierende Kapselperipherie und eine äußere Membran mit nach extern gerichteten Mikrovilli (Mendonça et al. 2005). Im Zytoplasma liegen die namensgebenden Einschlüsse, die stäbchen- oder keulenförmig sein können und Rodlets genannt werden. Diese sind von mehreren Vesikeln und Vakuolen umgeben. Die Inhalte sind zumeist, aber nicht immer zum Apex der Zelle orientiert, wo die fibrilläre Kapsel dünner ist oder sogar ganz fehlt. Ultrastrukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Rodlets aus einem elektronendichten, scharf begrenzten Kern (rodlet core) und einem umgebenden helleren Material (rodlet sac) bestehen, wobei ersterer entweder kristallin oder amorph-granulär strukturiert sein kann (Flood et al. 1975). Der unregelmäßige, zumeist heterochromate Nukleus liegt basal oder lateral.

Während Mitochondrien und andere Organellen im apikalen Bereich der Zelle liegen, ist das endoplasmatische Retikulum basal zu finden (Abb. 1a & 1b).

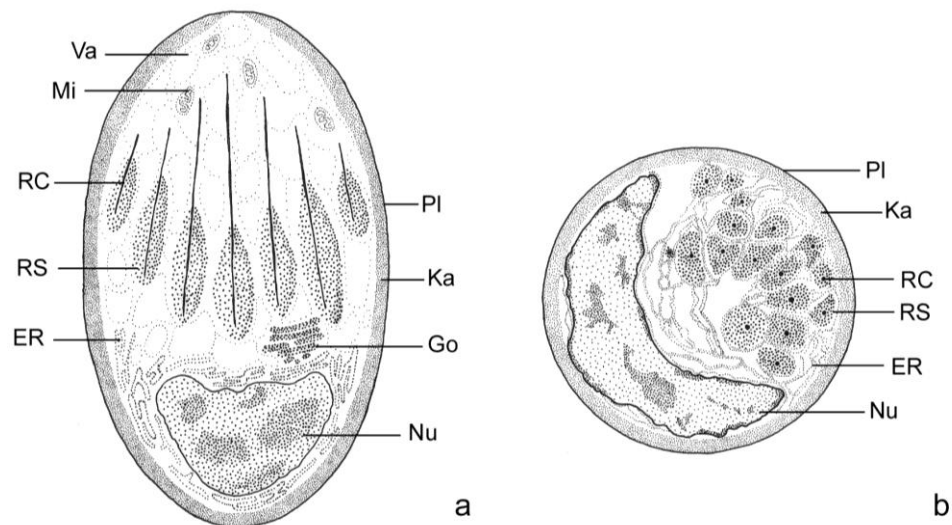


Abb.1.:Schematische und vereinfachte Darstellungen der Rodletzelle: **a** Längsschnitt; **b** Querschnitt in der Höhe des basal gelegenen Zellkern; **ER** endoplasmatisches Retikulum, **Go** Golgi Apparat, **Ka** fibrilläre Kapsel, **Mi** Mitochondrium, **Nu** Nukleus, **PI** Plasmalemma, **RC** Rodlet core, **RS** Rodlet sac, **Va** Vakuole.

Rodletzellen sind zumeist mit Epithelien und Endothelien verschiedenster Organe, wie Epidermis, Verdauungstrakt, Leber und Gallengänge, Kiemen, Herz, Niere, Kopfniere, Milz und Thymus assoziiert, kommen aber in geringerer Anzahl auch in bindegewebigen Interzellularräumen und im Blut vor (Manera & Dezfuli 2004). Sie liegen dabei neben bzw. zwischen epithelialen Zellen oder anderen Zelltypen (Abb. 2) und zeigen mitunter die Ausbildung von Haftkomplexen (junctional complex) oder Desmosomen (Leino 1974; Morrison & Odense 1978; Bielek 2005). Weiters wurden diese rätselhaften Zellen in der Nähe der Neuromasten des Seitenlinienorgans, in der Riechschleimhaut, neben Geschmacksknospen und im Gehirn gefunden (Dezfuli 2007 a & b; Schmachtenberg 2007). Migratorische Eigenschaften werden infolge der verschiedenen Organverteilung vermutet, eine Entwicklung aus Zellen, die sich vom basalen Anteil in die apikale Zone eines Epitheliums verschieben, ist erwiesen. Dort stoßen sie aufgrund eines noch unbekannten Stimulus die typischen Rodlets in das Organlumen oder aber auch in benachbarte Zellen (Bielek 2002; 2005) aus. Danach degenerieren die Zellen und gehen zugrunde. Sekretion soll zumeist durch eine aktive Kontraktion der fibrillären Umhüllung, die gewisse strukturelle Ähnlichkeiten zu glatter Muskulatur aufweist, ermöglicht werden. Andere RZ zerfallen einfach und entlassen so ihre Inhalte (Leino 1974).

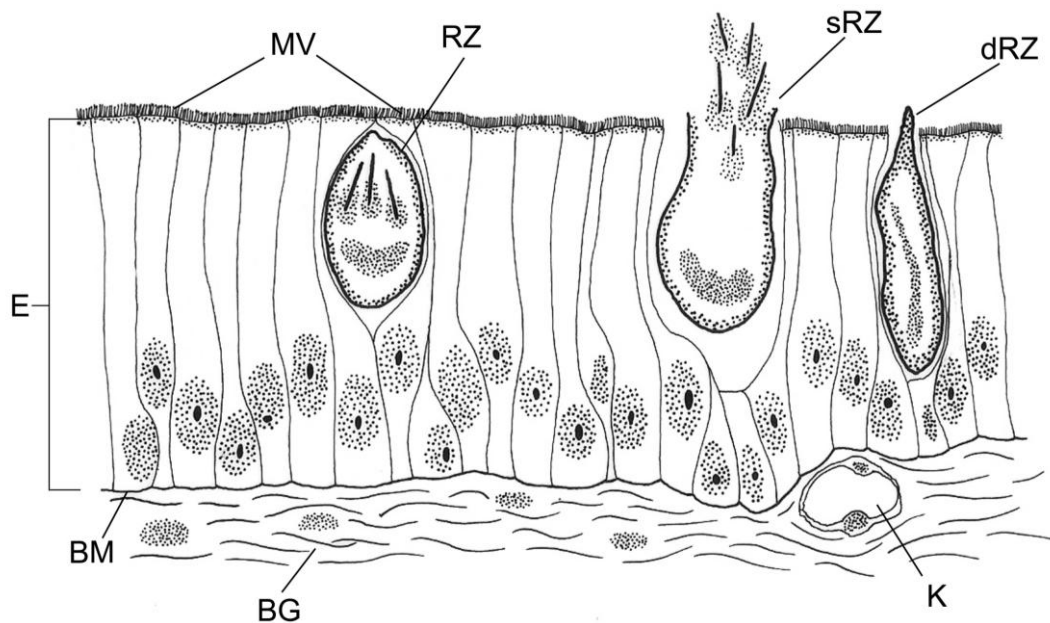


Abb.2.: Halbschematische Zeichnung eines hochprismatischen Epithels mit Rodletzellen. **BG** Bindegewebe, **BL** Basalmembran, **E** hochprismatisches Epithel, **MV** Mikrovillisaum, **K** Kapillare, **RZ** Rodletzelle, **dRZ** degenerierende Rodletzelle, **sRZ** sekretierende Rodletzelle.

Zahlreiche andere Autoren sehen eine idente Funktion der Kapsel (Barber et al. 1979; Matthey et al. 1979). 1995 beschreiben Smith et al., dass hingegen der weitverbreiteten Theorie keine strukturelle Indikation für eine aktive Kontraktion besteht. Ein unspezifischer Test für Aktin ist eine Rhodamine-Phalloidin Färbung, die von Leino (2002) durchgeführt wurde. Er beschrieb eine positive Reaktion der Rodletzellen und vermutet, dass es sich bei den dickeren und dünneren Kapselfilamenten um Aktin und Myosin handle, die eine ähnliche Anordnung wie in glatter Muskulatur zeigen und aktiv ineinander gleiten können. So wird das explosionsartige Ausstoßen der Rodlets ermöglicht. Durch die Isolation von RZ und die dadurch ermöglichte Lebendbeobachtung dieser im Interferenzphasenkontrastmikroskop zeigte sich, dass es konträr des zuvor beschriebenen Mechanismus zu keiner aktiven Kontraktion kommt (Schmachtenberg 2007). Eine andere Möglichkeit der Entleerung wäre der Aufbau eines intrazellulären Druckes (u.a. Bielek 2005), der ab dem Erreichen einer gewissen Höhe zum Ausschleudern der Rodlets führt.

Während ihrer Wanderung zum apikalen Bereich eines Epitheliums zeigen RZ eine Ausreifung, welche sich in der Ausbildung und Verdickung der subplasmalemmar liegenden Kapsel und in dem Aufbau der typischen Rodlets äußert. Obwohl ihr Bildungsort bzw. Ursprung unbekannt ist, wird eine Vorläuferzelle diskutiert. Während Leino (1974) eine Bildungsart ähnlich anderer epithelialer Zellen annimmt, vermutet Smith et al. (1995) einen hämatogenen Ursprung. Mehrere Autoren haben bereits mittels ultrastruktureller Studien

verschiedene Reifestadien dieser mysteriösen Zellen beschrieben (Flood et al. 1975; Barber et al. 1979; Matthey et al. 1979). Das unreife Stadium (immature cell type) zeichnet sich durch das vollständige Fehlen der typischen Merkmale wie fibrilläre Zellwand und Einschlüsse aus. Das raue endoplasmatische Retikulum und freie Ribosomen sind prominent ausgebildet, während Mitochondrien eine elongierte Gestalt zeigen. Der intermediäre unreife Zelltyp (intermediate immature or submature cell type) bildet bereits eine dünne Kapselschicht aus, und auch Einschlüsse sind bereits anzutreffen. Reife Rodletzellen (mature cell type) haben eine dicke fibrilläre Umhüllung. Die Rodlets sind vollständig ausgereift und zeigen die typische zum Zellapex orientierte Anordnung (Barber et al. 1979; Matthey et al. 1979). Im Zytoplasma sehr junger RZ sind viele freie Ribosomen, zahlreiche Mitochondrien, großflächiges raues endoplasmatisches Retikulum und damit assoziierter Golgi Apparat zu finden. All dies deutet auf eine hohe Protein- und Biosyntheseaktivität hin. Rodlets mit dem typischen elektronendichten Kern treten sehr früh auf, erst später bildet sich die fibrilläre Zellumhüllung (Barber et al. 1979). Im reifen Typus zeigt sich eine Verminderung der Golgi Apparate und das raue wird durch Abspaltung der assoziierten Ribosomen zu glatten ER (Barber et al. 1979; Bielek 2005).

Seit ihrer Erstbeschreibung im späten 19. Jahrhundert von Thelohan (1892), waren Rodletzellen Gegenstand zahlreicher Publikationen. Schon bald nach ihrer Entdeckung entfachten sie eine wissenschaftliche Debatte über ihren Ursprung und ihre Funktion, welche bis zum heutigen Zeitpunkt noch besteht. Während diese Zellen von einigen Autoren als protozoische, zu den Coccidien zählende Parasiten bestimmt wurden (Laguesse 1895; Dawe et al. 1964; Bannister 1966; Mourier 1970; Anderson et al. 1976; Barber et al. 1979; Barber & Westerman 1982), wurden sie auf der anderen Seite als endogene Fischzellen beschrieben (Plehn 1906; Klust 1939; Duthie 1939; Al-Hussaini 1949; Catton 1951; Winckler & Portela-Gomez 1962; Bannister & Odense 1966; Wilson & Westerman 1967; Leino 1974, 1986, 1996; Flood et al. 1976; Matthey et al. 1979; Modin 1981; Barber & Westerman 1985; Smith et al. 1993; Iger & Abraham 1997; Dezfuli 1998; Manera & Dezfuli 2004). Schuld an diesem Wissenschaftsstreit sind die eigentümlichen Zellmerkmale, wie fibrilläre Kapsel und die zytoplasmatischen Einschlüsse, die sie unvergleichbar mit anderen Vertebratenzellen machen und somit unterschiedlichste Interpretationen erlauben. Da die Rodlets an Rhoptries, typische zytoplasmatische Einschlüsse in sporozoischen Parasiten, erinnern und die fibrilläre Umhüllung sich mit einer parasitären Zystenwand vergleichen lässt, kann man gut verstehen, warum viele Autoren einen exogenen Ursprung dieser Zellen annahmen. Vor allem durch das Fehlen vergleichbarer Zelltypen in anderen Vertebraten wird die Parasitenhypothese genährt. Im Gegensatz zu sporozoischen Parasiten konnte bei RZ kein Lebens- und Fortpflanzungszyklus entdeckt werden. Auch die Kapsel zeigt ultrastrukturelle Unterschiede: so liegt sie bei den RZ intrazellulär unter dem Plasmalemma, während die Zystenwand die

äußerste, umhüllende Schicht bei Apicomplexa bildet. Die anhaltende Kontroverse wird auch durch die unterschiedlichsten Benennungen dieser Zellen deutlich. Während sie einerseits als *Rhabdospora thelohani* (Laguesse 1895; Dawe et al. 1964; Bannister 1966; Mourier 1970) definiert wurden, waren sie auch als Stäbchendrüsenzellen (Plehn 1906; Flood et al. 1976), „pear-shaped cells“ (Al-Hussaini 1949 a & b); „discharging-coarse granulocytes“ (Duthie 1939; Catton 1951), basophile granulocytes (Winkler & Portela-Gomez 1962), „foliaceous cells“ (Wilson & Westerman 1967) und „striated cells“ (Bishop & Odense 1966) bekannt, bevor Anfang der achtziger Jahre die Bezeichnung Rodletzellen üblich und einheitlich verwendet wurde (u.a. Matthey et al. 1979; Modin 1981; Richards et al. 1994; Smith et al. 1995).

Zahlreiche histochemische und zytochemische Tests zeigten, dass sich die Stäbchen aus einem proteinreichen Kern (core) und einer aus möglicherweise neutralen Glykoproteinen, bestehenden Umhüllung (sac) zusammensetzen (Leino 1982; Bielek & Viehberger 1983; Smith et al. 1995). Enzymatische Versuche mit DNase und RNase weisen darauf hin, dass sich das Core aus genetischem Material (Barber & Westermann 1983; Bielek & Viehberger 1983), vielleicht in einer untypischen Konformation aufbaut (Barber & Westerman 1986). Histochemische DNA Nachweise mittels Feulgen Färbungen führten aber immer zu negativen Ergebnissen (Barber & Westerman 1985; Bielek & Viehberger 1983). Modifizierte Theorien wurden diskutiert, so z.B. dass es sich bei den Einschlüssen um genetisches Material handle, welches von Fischzellen transportiert wird (Viehberger & Bielek 1982, Bielek & Viehberger 1983). 1985 unternahmen Barber & Westermann Mikrodensitometrieversuche mit verschiedenen Fischzellen (Erythrozyten) vergleichend zu RZ. Auf Grund von in-situ-Hybridisierung Versuchen beschrieben sie diese Zellen nach anfänglicher Bevorzugung der exogenen Theorie (1979, 1982) als eigentümliche, endogene Bestandteile des Fischorganismus mit DNA entlang des core. Fishelson & Becker (1999) untersuchten die Zellen in Kopf- und Stammniere von *Cyprinus carpio* und beschrieben sie als eine Art symbiotisch tätiger Zellen, die Leukozyten, möglicherweise Granulozyten ähneln oder sind. Dabei dienen sie als Inkubations- und auch Transportkammern für die parasitären Einschlussstäbchen. Die eigentümliche Struktur, könnte durch einen von ihnen nicht näher klassifizierten Parasiten induziert sein, der die Zellen als Schutz gegen eine Immunantwort des Wirtes benötigt. Eine ähnliche Deutung wurde von Schmachtenberg (2007) formuliert, wonach RZ assimilierte und transformierte Apicomplexa Parasiten darstellen, die nun als endogene Abwehrzellen gegen invasive Elemente im Fischorganismus arbeiten. Aufgrund ausgestoßener Rodlet cores wurde von Bielek (2002) eine pathologische, vielleicht viral induzierte, Zelltransformierung die zu der eigentümlichen Morphologie der Zellen führt, angenommen. Die Zellen zeigen außerdem positive Reaktionen für alkalische Phosphatase und Peroxidase (Iger & Abraham 1997). Dies

weist auf Ähnlichkeiten zu Becherzellen hin und gilt als Bestätigung der Theorie einer sekretorisch tätigen Zelle.

Obwohl Rodletzellen schon in Geweben und Organen vieler Individuen von sowohl marinen als auch limnischen Teleostarten gefunden worden sind, zeigen manche Tiere und auch einzelne Arten einer Gattung ein vollständiges Fehlen derselben (Mayberry et al. 1979; Iger & Abraham 1997; Fishelson & Becker 1999; Reite 2005). Parasitärer (Dezfuli et al. 1998, 2003, 2007 a & b; Reite 2005; Reite & Evensen 2006) oder bakterieller Befall (Sitjà-Bobadilla et al. 2007), hohe Herbizid- (Dezfuli et al. 2006) oder Schwermetallwerte (Giari et al. 2007), osmotische (Giari et al. 2006) oder hormonelle Veränderungen (Manera et al. 2001; Jordanova et al. 2007), aber auch andere Stressoren und Irritationen (Iger & Abraham 1997) sind anscheinend bestimmende Faktoren, welche einen Einfluss auf die Anzahl und/oder das generelle Vorhandensein von RZ haben könnten. Bei Befall mit protozoischen oder metazoischen Parasiten kommt es an der Stelle der Infektion zu einer Anhäufung von RZ, wodurch die Hypothese, dass diese Stäbchenzellen eine Rolle im Fischimmunsystem haben, teilweise unterstützt wird (Mazon et al. 2007). Da sie die namensgebenden Einschlüsse auswerfen, wurde ihnen eine osmoregulatorische (Mattey et al. 1979) oder auch sekretorische (Leino 1974, 1982; Mendonça et al. 2005) Funktion zugeschrieben. Die Art der Sekretion wurde zum holokrinen Typus gezählt (Leino 1974, 2002; Grünberg & Hager 1978). Allerdings konnte von Schmachtenberg (2007) die osmotische Funktion in vitro widerlegt werden. Oft wurden sie als besondere granuläre Leukozyten (Duthie 1939; Catton 1951; Winckler & Portela-Gomez 1962; Fishelson & Becker 1999; Manera et al. 2001) oder als bisher nicht weiter identifizierte Bestandteile des unspezifischen zellulären Abwehrsystems (Iger & Abraham 1997) gesehen. Dadurch wurde ihnen eine verteidigende Funktion im Abwehrsystem, vielleicht sogar mit einer antibiotischen Wirkung vermutet (Leino 1996; Reite 1997).

Da in den letzten zwanzig Jahren Rodletzellen vermehrt als endogene Fischzellen beschrieben wurden, sehen sie viele Autoren als normale Bestandteile des Organismus (Desser & Lester 1975; Mendonça et al. 2005), welche unter anormalen Bedingungen in verschiedensten Organen oder Geweben akkumulieren (Leknes 1985). Bei unterschiedlichsten Stressfaktoren kommt es zu einer signifikanten Zunahme in der RZ Zahl, wodurch Sie von vielen Autoren heute als nützliche Biomarker gesehen werden (Dezfuli et al. 2002, 2006, 2007; Manera & Dezfuli 2004).

## 1.2. Das endoplasmatisches Retikulum

In allen Zellen werden proteinogene Sekrete über den sogenannten sekretorischen Weg produziert. Dieser beginnt an den Ribosomen, verläuft über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi Apparat und endet an der Zelloberfläche (Lodish et al. 2000). Auf die gleiche Weise werden die MHC I Moleküle gebildet. Diese benötigen genau wie die Sekrete eine durch das endoplasmatische Retikulum und den daran beteiligten Chaperonen und Faltungsenzymen stattfindende präzise Qualitätskontrolle (Helenius 1994).

### 1.2.1. Sekretorische Pfad

Das endoplasmatische Retikulum (ER) hat eine Vielzahl von wichtigen Stoffwechselfunktionen einer Zelle inne, wobei die Synthese von Membranproteinen und –lipiden und von Sekreten die wichtigsten sind. Sekretorisch tätige Zellen zeichnen sich durch einen besonders hohen Anteil an proteinsynthetisierenden rauem ER und großem Golgi Komplex aus (z.B.: Hepatozyten, azinöse Pankreaszellen). Bei Speichervorgängen weichen die ER-Membranen auseinander, so dass erweiterte Hohlräume entstehen.

Ungefähr ein Drittel aller zellulären Proteine werden ins ER-Lumen transportiert, um dort posttranslationalen Modifikationen, Faltungen und Oligomerisierungen zu durchlaufen (Kaufman 1999). Der sekretorische Weg dient dazu, die große Klasse der Proteine aufzubauen und zu sortieren. All jene Moleküle beinhalten eine typische Signalsequenz zumeist am N-Terminus, durch welche sie von den Ribosomen erkannt und zu dem rauem ER geleitet werden. Diese Sequenz wird anschließend vom weiter wachsenden Protein abgespalten. Die zwei Schlüsselkomponenten sind zum einen das Signalerkennungspartikel (signal recognition particle, SRP), welches sich kurzfristig an der großen Untereinheit des Ribosoms befindet und zum anderen der ER-Membran ständige SRP-Rezeptor. Diese beiden initiieren den Transfer der weiterwachsenden Aminosäurekette durch die ER-Membran, bevor sie von dem Peptid dissoziieren und dieses an ein Transmembranprotein, ein sog. Translocon weiterleiten. Auf diese Weise ist die Kette niemals der zytosolischen Umgebung ausgesetzt und beginnt sich erst zu falten, wenn sie sich im ER-Lumen befindet. Würde ein neu gebildetes Protein die Möglichkeit haben, sich im Zytosol zu falten, könnte es unter Umständen nicht mehr die Membran des ER durchqueren (Lodish et al. 2000).

Die meisten neu synthetisierten Proteine werden im Lumen oder an der Membran in kleine Vesikel verpackt und fusionieren entweder mit den Strukturen des *cis*-Golgi oder miteinander und bilden das *cis*-Golgi Netzwerk oder Retikulum und in der Folge mit den Golgi Zisternen. Bei der kontinuierlichen Sekretion, wie sie in allen Zelltypen vorkommt, bewegen sich die in

Vesikel verpackten Proteine an die Plasmamembran und verschmelzen mit dieser. Anschließend geben sie ihre Einschlüsse mittels Exozytose frei. Bei der regulierten Sekretion, wie sie in bestimmten Zellen vorkommt, werden die umhüllten Proteine in der Zelle gespeichert, bis sie aufgrund eines Stimulus (neuronal, hormonal, usw.) freigesetzt werden. In den meisten Fällen geht dies mit einem Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegels einher (Lodish et al. 2000).

Nachdem die neu synthetisierten Aminosäureketten in das ER gelangt sind, ist es von großer Bedeutung, dass sie modifiziert werden, wobei die Bildung von Disulfidbrücken, korrekte Faltung, Addition und anschließende Prozessierung von Kohlenhydraten, spezifische proteolytische Abspaltung und der Aufbau in multimerische Peptide die häufigsten Umformungen sind (Lodish et al. 2000). Diese Prozesse verlangen die Fähigkeit nicht, falsche oder nur teilweise gefaltete Proteine erkennen, zurück halten und abbauen zu können (Hammond & Helenius 1995). Das Phänomen der konformationsbedingten Sortierung wird Qualitätskontrolle genannt (Hammond & Helenius 1995).

### 1.2.2. Proteinfaltung und Protein-Qualitätskontrolle

Die meisten Proteine können sich spontan falten. Unter Proteinfaltung wird ein Prozess bezeichnet, bei dem es über Zwischenformen zur Ausbildung der Tertiärstruktur und damit zur Anordnung der Polypeptidkette in ihrer nativen Konformation kommt (Matthew 1993). Da aber in einer Zelle ein hoher Gehalt an dieser Molekülgruppe besteht (bis zu 100mg/ml), neigen sie dazu, sich aufgrund ihrer unpolaren Kettenanteile zu unlöslichen Produkten zusammenzulagern (Kaufman 2002). Hilfs- oder Faltungsproteine, sog. Chaperone (franz. „Anstandsdamen“) sorgen nun dafür, dass es zur richtigen und nativen Konformation kommt, indem sie falsch gefaltete Proteine im rauen ER zurückhalten und unspezifische Aggregationen verhindern (Kelley & Georgopoulos 1993; Hammond & Helenius 1995; Kaufman 2002). Unvollständige oder nur teilweise gefaltete Proteine weisen hydrophobe Aminosäureketten mit vielen Leucin- und Phenylalaninkomponenten (Flynn et al. 1991) an der Oberfläche auf, die sich bei einer nativen Proteinstruktur im Molekülinneren befinden. Diese Bereiche neigen einerseits zu Interaktionen mit anderen zellulären Molekülen und andererseits zur Bildung von Proteinaggregaten, wodurch Zellfunktionen erheblich gestört werden können.

In allen eukaryotischen Zellen wird die Qualitätskontrolle durch die molekularen Chaperone und das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) sicher gestellt. Diese beiden Systeme stehen in direkter Konkurrenz um die Substratbindung. Durch eine zyklische Anlagerung der Proteine an die molekularen Chaperone kann eine Rückfaltung in einen nativen Zustand ermöglicht werden. Nicht, falsch oder zu wenig gefaltete Proteine werden im ER von den

molekularen Chaperonen selektiv zurückgehalten, vom Golgi Netzwerk zu diesem Membranorganell zurückgeleitet und durchlaufen solange Konformationsänderungen bis sie einen nativen Zustand erreicht haben. Misslingt dieser Vorgang, werden die assoziierten Proteine abgespalten und über das Ubiquitin-Proteasom System zu Peptiden degradiert und abgebaut (Lodish et al. 2000). Die korrekt gefalteten Proteine werden durch die Bindung von ATP von den Chaperonen wieder freigesetzt und können über Vesikel in den Golgi Komplex transportiert werden (Abb. 3).

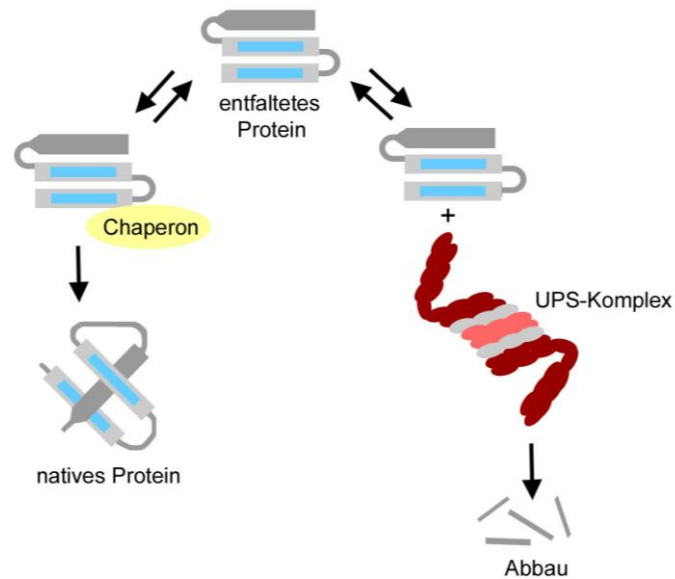


Abb.3.: Schema der Substratbindungskonkurrenz zwischen molekularen Chaperonen und dem Ubiquitin-Proteasom System (UPS). Wird ein ungefaltetes Protein an ein Chaperon gebunden, bleibt die Assoziation so lange bestehen, bis es seine native Konformation erhält. Vermag es allerdings zu keiner korrekten Faltung zu kommen, wird es über den UPS-Komplex in die Peptidbestandteile abgebaut. (nach Esser et al. 2004)

Molekulare Chaperone sind somit nicht nur für die Proteinfaltung, sondern auch als Qualitätskontrolle in Zellen wesentlich. Man kann zwei Chaperonklassen mit unterschiedlichen Faltungsmechanismen unterscheiden. Zum einen gibt es Chaperone wie Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) oder *cis-trans* Prolyl-Isomerase, welche die Proteinfaltung katalysieren und die Umsatzrate erhöhen, ohne die Wege, auf welchen die Proteine ihre endgültige Konformation erhalten, zu verändern. Das sind zumeist unterstützende Enzyme, wie Disulfidisomerasen, die über Thiol-Disulfid-Austausch die Ausbildung der richtigen Disulfidbrücken oder eine *cis-trans* Isomerisierung ermöglichen (Kaufman 1999; Ni & Lee 2007). Die zweite Gruppe besteht aus Chaperonen, die nicht direkt den Faltungsmechanismus katalysieren, sondern die Proteine in einem faltungskompetenten Zustand erhalten. Diese Molekülgruppe unterbindet die Aggregation von Proteinfaltungs-zwischenstufen und stabilisiert energetisch unbeliebte Konformationen von Polypeptiden, um irreversible

Falschfaltungen zu minimieren (Dill & Chan 1997). Die durch Chaperone vermittelten Prozesse benötigen hohe metabolische Energie um die Genauigkeit der Proteinfaltung zu gewährleisten (Kaufman 2002). In der weiteren Unterteilung dieser Chaperonklasse, kann man zu einem Chaperone der Heat-shock-protein (HSP) Familie wie Grp78, von chaperonartigen Lektinen wie Calnexin und Calreticulin unterscheiden.

Die Rolle der ER Chaperone ist auch für Bildung von regulierenden Signalen während ER Stresses wichtig. Da das ER auch ein wichtiges Organell der Signaltransduktion in Zellen darstellt, ist es besonders empfänglich für Alterationen der Zellhomöostase (Kaufman 1999). Vor allem die ungefaltete Proteinantwort (unfolded protein response, UPR) wird für das Zellüberleben bei ER Stress benötigt, welcher durch Störungen der Calcium Homöostase oder des Redoxstatus (Sato et al. 1990), erhöhte Syntheserate von sekretorischen Proteinen, Expression und Akkumulation von falschgefalteten Proteinen, virale Infektionen, Zucker/Glukose Entzug oder veränderte Glykosylierung zustande kommt (Kaufman 2002; Dimcheff et al. 2004).

Calreticulin (CRT) ist ein großes  $\text{Ca}^{2+}$  bindendes Chaperon, dass zumeist im endoplasmatischen Lumen zu finden ist (Michalak 1996; Krause & Michalak 1997; Michalak et al. 1999). Neben seiner wichtigen Funktion der Qualitätskontrolle während der Proteinsynthese und Faltung (Bergeron et al. 1994; Hammond & Helenius 1995; Helenius et al. 1997) hat es auch eine wesentliche Bedeutung für intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase, steroidsensitive Genexpression und Zelladhäsion (Bergeron et al. 1994; Hammond & Helenius 1995). Eine Überexprimierung von CRT führt zu einer erhöhten Sensitivierung der Zelle zu induzierter Apoptose (Nakamura et al. 2000). Außerhalb des ER zeigen UV-Experimente, dass dieses Faltungsprotein sich direkt an Strukturelemente von zellulärer, aber auch viraler RNA bindet (Atreya et al. 1995). Die Lokalisierung von Calreticulin wird durch zwei zielgerichtete Signale ermöglicht, eine N-terminale, hydrophobe Signalsequenz, die die Insertion in das ER überwacht, und die C-terminale KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) Sequenz, wodurch die Retention im ER bewerkstelligt wird (Afshar et al. 2005).

Ein anderes lektinartiges Chaperon neben CRT ist das ER-Membranständige Protein Calnexin (CLN). Zusammen bilden sie das CLN/CRT System, welches wachsende Peptide mit monoglykosylierten N-Glykanen ( $\text{Glc1Man9GlcNAc2}$ ) erkennt (Hammond & Helenius 1995; Helenius et al. 1997; Ni & Lee 2007; Roth et al. 2008). Die Syntheseprodukte werden so lange im Lumen des ER zurückgehalten, bis sich die korrekte Konformation und Faltung des Peptids eingestellt hat. Obwohl beide Lektine eine gemeinsame Ligandenspezifität aufweisen, hat sich gezeigt, dass sie unterschiedliche Polypeptide erfassen. CRT bindet aufgrund seiner Lage vermehrt tiefer im Lumen des ER gelegene Glykane, währenddessen sich CLN an membranproximale Glykane knüpft (Parodi 2000).

Stressfaktoren wie Glukosemangel induzieren in Zellkultur zumeist eine Glucose-regulierte Stressantwort, die ein Teil des generellen zellulären Verteidigungsmechanismus darstellt und die UPR bedingt (Kaufmann 1999). Dies führt im endoplasmatischen Retikulum zu Stressproteinen: Glucose-regulierte Proteine (Glucose-regulated proteins, GRPs) (Lee 1992). Das bekannteste unter ihnen ist neben Grp94 (gp96), Grp78, ein 78 kDa Protein mit einer konservierten ATPase- und einer Peptidbindungsdomäne (Lee 2001). Es wird aufgrund seiner Entdeckung als Immunglobulin bindendes Protein auch BiP (Immunoglobulin-binding protein) genannt und weist eine Strukturhomologie zu dem zytosolischen Hsp70 auf (Lee 2001). Während Grp94 nur bei Vertebraten gefunden werden konnte, scheint Grp78 evolutionär konserviert von der Hefe bis zum Menschen vorzukommen (Lee 2001). Es arbeitet ebenfalls als Chaperon und ist im Lumen des ER zu finden, wo es Proteine mit hydrophoben Resten in ungefalteten Regionen erkennt und bindet (Flynn et al. 1991). Außerdem wird es vermehrt bei viral transformierten Zellen und bei Glucose-Mangel exprimiert (Lee 1987; Hurtley et al. 1989; Dimcheff et al. 2004).

ERp57/Grp58 ist als glykoproteinspezifische Oxidoreduktase ein luminales ER Protein und ein Mitglied der Protein Disulfid Isomerase (PDI) Familie (Kienast et al. 2007). Es formt zusammen mit den Lektinen CRT und CLN Komplexe, welche dann spezifisch Glykoproteine binden und zur Faltung im ER bringt (Oliver et al. 1999; Williams 2006). Wie schon die zweite Benennung aufzeigt, wird es als Glucose regulierendes Protein auch bei verschiedensten zellulären Stresssituationen induziert (Chichiarelli et al. 2007). Die Bindung dieses Faltungsproteins zu CLT wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  beeinflusst (Corbett et al. 1999).

### 1.3. Zytoskelett

Das Zytoplasma eukaryotischer Zellen zeichnet sich durch das Vorhandensein von einem Gerüst aus langen Proteinfilamenten aus, die zusammen das Zytoskelett aufbauen. Aufgrund der unterschiedlichen Durchmesser kann man die Filamente in drei Gruppen einteilen: Mikrofilamente (6-8nm), Intermediärfilamente (ca. 10nm) und Mikrotubuli (ca. 25nm). Alle bestehen allerdings als Polymere aus kleineren Proteinbausteinen, welche durch nicht-kovalente Bindungen verknüpft sind (Lodish et al. 2000).

In Zellen füllen Mikrotubuli und Intermediärfilamente das Zytosol aus, indem sie die Distanz zwischen dem Nukleus und der Zellmembran ausspannen und haben somit die gleiche Verteilung. Obwohl diese zwei Gruppen von Zytoskelettfasern die gleiche Verbreitung haben, unterscheiden sie sich in ihrem Aufbau und somit in ihrer Funktion.

Mikrotubuli und Mikrofilamente sind verantwortlich für zahlreiche Zellbewegungen, wie z.B. Zilien- und Flagellenschlag, Transport von Membranvesikeln im Zytoplasma und Zusammenlagern und Separation von Chromosomen während Mitose und Meiose. Dies wird durch Polymerisierung und Depolymerisierung dieser Fasern oder die Aktivität von Mikrotubuli-eigenen Motorproteinen bewerkstelligt. Dem gegenüber haben intermediäre Filamente nur strukturgebende und stützende Funktionen. Außerdem fügen sie Zellen in das Gewebe ein (Lodish et al. 2000).

Aktin ist das häufigste Protein in eukaryotischen Zellen und zählt zu den Mikrofilamenten. Man kann ein globuläres Monomer (G-Aktin) von einem filamentösen Polymer (F-Aktin) unterscheiden. Jedes Molekül beinhaltet einen  $Mg^{2+}$ -Ionen-Komplex, der entweder ADP oder ATP gebunden hat. Die Addition von  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  oder  $Na^+$  Ionen führt zur Polymerisation des G-Aktins und es formt sich die längere F-Form. Dieser Prozess ist reversibel. G-Aktin trägt ein fest gebundenes ATP, das im F-Aktin langsam zu ADP hydrolysiert wird. Da diese Zusammenlagerung immer in eine Richtung geschieht, zeigt die polymere Form eine bestimmte Polarität. Man bezeichnet die Enden mit (+) und (-). Das (+)-Ende zeigt ein 5-10fach schnelleres Wachstum als das (-)-Ende. Das Polymerisationsverhalten kann Zellbewegungen hervorrufen (Lodish et al. 2000). Aktin zeigt in einer Zelle zumeist zwei verschiedene Bauweisen: In Bündeln oder als Netzwerk. Aber beide Arten haben die gleiche Aufgabe; sie bilden ein Gerüst, welches die Plasmamembran unterstützt, und sind somit sie für die Zellgestalt und -form verantwortlich. Strukturell zeigen Bündel eine andere Organisation wie Netzwerke. In Bündeln sind die Filamente eng parallel gepackt und im Netzwerk überkreuz arrangiert.

Die meisten Zellbewegungen sind allerdings durch die Interaktion von Aktinfilamenten und Myosin, einer ATPase, die sich entlang der Filamente bewegt und

aufgrund der Hydrolyse von ATP zu Konformationsänderungen führt, bedingt. Somit wirkt Myosin als eine Art Motor. Es gibt mehrere Myosin Isoformen, welche spezifische Aktivitäten aufzeigen. Allerdings bestehen all diese Moleküle aus einer oder zwei schweren Ketten und mehreren leichten. Die globuläre Kopfregion, welche Aktin und ATP Bindungsseiten beinhaltet, lässt sich von einer alphahelikalen Nackenregion und einer Schwanzregion unterscheiden. Laut der Gleitfilamenttheorie führt das Ineinanderschieben von Aktin- und Myosinfilamenten zu einer Verkürzung und dadurch kommt es zu einer kontraktile Bewegung.

Vimentin zählt zu den Typ III Intermediärfilamenten, genau wie Desmin, Peripherin und GFAP (glial fibrillary acidic protein). Es wird typischerweise in Leukozyten, endothelialen Zellen von Blutgefäßen, einigen epithelialen und mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten exprimiert. Diese Filamente helfen den Nukleus und andere Organellen an der richtigen Stelle in der Zelle zu halten. Die Bündel verlaufen parallel zu den Mikrotubuli Netzwerken. Da es typisch in mesenchymalen Zellen exprimiert wird, ist es wichtig in der Karzinomdiagnostik (Lodish et al. 2000).

Tubulin gehört zu den Mikrotubuli und ist ebenfalls aus globulären alpha und beta Einheiten polymerisch zu zylindrischen Tuben aufgebaut. Jede Untereinheit ist ungefähr 55 kDa schwer mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 5.2 und 5.8. Zumeist besteht jede tubuläre Struktur aus 13 Protofilamenten. Es kommt in fast allen eukaryotischen Zellen vor, allerdings scheint ein evolutiv verwandtes Protein auch in Prokaryoten vorzukommen (Lodish et al. 2000).

Mithilfe von immunzytochemischen Färbungen soll die umstrittene Abwehrfunktion, die den Rodletzellen zugeschrieben wird, aufgeklärt werden. Dazu werden die Chaperone des endoplasmatischen Retikulums untersucht, die neben ihrer Faltungsfunktion auch eine Rolle im zellulären Stressgeschehen von Zellen übernehmen. Diese Proteine zeigen in vielen Krankheitsgeschehen charakteristische Veränderungen. Außerdem soll eine genaue Charakterisierung des Zytoskeletts unternommen werden, wodurch eine gewisse Katalogisierung des Zelltypus ermöglicht werden soll und zu einer näheren Funktionsklassifizierung dieser Zellen führt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Materialien

#### 2.1.1. Verwendete primäre Antikörper

Tab.1.: Verwendete primäre Antikörper zur Untersuchung des endoplasmatischen Retikulums mit Angaben über Speziesherkunft, Hersteller, optimaler Verdünnung, Inkubationsdauer, Inkubations-temperatur und Detektionsmethodik. **Mo** mouse, **Rb** rabbit, **h** Stunde, **ON** über Nacht, **IIF** indirekte Immunfluoreszenz, **PAP** Peroxidase-Anti Peroxidase Methode, **ABC** Avidin-Biotin-Komplex.

| Antikörper                            | Spezies | Hersteller                                          | Verdünnun-<br>g | Inkubations-<br>zeit (h) | Inkubations-<br>temperatur | Detektions-<br>methode |
|---------------------------------------|---------|-----------------------------------------------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|
| <b>Calreticulin</b><br><br>polyklonal | Rb      | <i>Novus<br/>Biologicals</i><br>Littelton/USA       | 1:200           | 1 ½                      | RT                         | IIF                    |
|                                       |         |                                                     | 1:200           | ON                       | 4°C                        | PAP                    |
| <b>Grp 78</b><br><br>polyklonal       | Rb      | <i>Stressgen<br/>Bioreagents</i><br>Victoria/Canada | 1:200           | 1                        | RT                         | IIF                    |
|                                       |         |                                                     | 1:200           | ON                       | 4°C                        | PAP                    |
| <b>Calnexin</b><br><br>monoklonal     | Mo      | <i>Affinity</i><br>Exeter/UK                        | 1:200           | ON                       | 4°C                        | ABC                    |
|                                       |         |                                                     | 1:100           | ON                       | 4°C                        | IIF                    |
| <b>Erp57/Grp58</b><br><br>monoklonal  | Mo      | <i>Stressgen<br/>Bioreagents</i><br>Victoria/Canada | 1:100           | 1                        | RT                         | IIF                    |
| <b>Ubiquitin</b><br><br>polyklonal    | Rb      | <i>NeoMarkers</i><br>Freemont/<br>USA               | 1:100           | ½<br>+1                  | 37°C<br>+RT                | IIF                    |

Tab.2.: Verwendete primäre Antikörper zur Untersuchung des Zytoskeletts mit Angaben über Speziesherkunft, Hersteller, optimaler Verdünnung, Inkubationsdauer, Inkubationstemperatur und Detektionsmethodik. **Mo** mouse, **Rb** rabbit, **h** Stunde, **ON** über Nacht, **IIF** indirekte Immunfluoreszenz, **ABC** Avidin-Biotin-Komplex.

| Antikörper                         | Spezies | Hersteller                                                   | Verdünnung | Inkubationszeit (h) | Inkubationstemperatur | Detektionsmethode |
|------------------------------------|---------|--------------------------------------------------------------|------------|---------------------|-----------------------|-------------------|
| <b>Vimentin</b>                    |         |                                                              |            |                     |                       |                   |
| monoklonal                         | Mo      | <i>Sigma-Aldrich</i><br>Deutschland                          | 1:150      | 1 ½                 | RT                    | IIF               |
| <b><math>\alpha</math> Tubulin</b> |         |                                                              |            |                     |                       |                   |
| monoklonal                         | Mo      | <i>Sigma-Aldrich</i><br>Deutschland                          | 1:200      | 1                   | RT                    | IIF               |
| <b>Aktin</b>                       |         |                                                              |            |                     |                       |                   |
| polyklonal                         | Rb      | <i>Sigma-Aldrich</i><br>Deutschland                          | 1:100      | ON                  | 4°C                   | ABC               |
|                                    |         |                                                              | 1:100      | ON                  | 4°C                   | IIF               |
| amoeba<br>monoklonal               | Mo      | <i>Sigma-Aldrich</i><br>Deutschland                          | 1:200      | 1 ½                 | RT                    | IIF               |
| smooth<br>muscle<br>monoklonal     | Rb      | <i>NeoMarkers</i><br>Freemont/USA                            | 1:200      | 1                   | RT                    | IIF               |
| <b>Myosin</b>                      |         |                                                              |            |                     |                       |                   |
| polyklonal                         | Rb      | <i>Sigma-Aldrich</i><br>Deutschland                          | 1:200      | 1 ½                 | RT                    | ABC               |
|                                    |         |                                                              | 1:100      | 2                   | RT                    | IIF               |
| smooth<br>muscle<br>monoklonal     | Rb      | <i>Biomedical<br/>Technologies<br/>Inc.</i><br>Stoughton/USA | 1:200      | 1 ½                 | 37°C                  | IIF               |

### 2.1.2. Verwendete sekundäre Antikörper

Tab.3.: Verwendete sekundäre Antikörper mit Angaben über Speziesherkunft, Hersteller, optimaler Verdünnung, Inkubationsdauer, Inkubationstemperatur und Detektionsmethodik. **Mo** mouse, **Rb** rabbit, **h** Stunde, **ON** über Nacht, **IIF** indirekte Immunfluoreszenz, **ABC** Avidin-Biotin-Komplex.

| Antikörper       | Spezies | Hersteller                                  | Verdünnung | Inkubationszeit (h) | Inkubationstemperatur | Detektionsmethode |
|------------------|---------|---------------------------------------------|------------|---------------------|-----------------------|-------------------|
| <b>Rabbit</b>    |         |                                             |            |                     |                       |                   |
| Alexa 488 IgG    | Goat    | <i>Molecular Probes</i><br>Oregon/USA       | 1:1000     | 1½<br><br>ON        | RT<br><br>4°C         | IIF<br><br>IIF    |
| Rhodamin IgG+IgM | Goat    | <i>Southern Biotechn.</i><br>Birmingham/USA | 1:200      | 1½                  | RT                    | IIF               |
| Biotin           | Goat    | <i>Dako</i><br>Glostrup/Dänemark            | 1:300      | ½                   | RT                    | ABC               |
| <b>Mouse</b>     |         |                                             |            |                     |                       |                   |
| Alexa 488 IgG    | Goat    | <i>Molecular Probes</i><br>Oregon/USA       | 1:1000     | 1½<br><br>ON        | RT<br><br>4°C         | IIF<br><br>IIF    |
| Biotin           | Goat    | <i>Sigma-Aldrich</i><br>Deutschland         | 1:200      | ½                   | RT                    | ABC               |
| <b>Avidin</b>    |         |                                             |            |                     |                       |                   |
| DCS FITC         | Biotin  | <i>Vector Lab.Inc.</i><br>Burlingame/USA    | 1:100      | ½                   | RT                    | ABC               |

### 2.1.3. Verwendete Kits

Für die PAP-Methode wurde das Kit UltraVision ONE Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen der Firma Neomarkers (Freemont/USA) verwendet. Bei Anwendung

der ABC Methode wurde zum Blockieren des endogenen Biotins das Biotin/Avidin Blocking Kit von der Firma Vector Lab. Inc. (Burlingame/USA) genommen.

#### 2.1.4. Pufferlösungen

Die verwendeten Pufferlösungen wurden nach Noll & Schaub-Kuhnen (2000) angesetzt und verwendet.

### 2.2. Untersuchungsobjekt, Präparation und Fixierung

Untersucht wurden die inneren Organe von drei Karpfen (Spiegelkarpfen, *Cyprinus carpio* L. 1758) mit einem Gewicht zwischen 1,7 und 2,5 kg und einem Goldfisch (*Carassius auratus* L. 1758) mit einer Körperlänge von ca. 14 cm (siehe Tab. 4). Alle Fische waren kommerziell erworben und stammten von Fisch- bzw. Zoofachgeschäften aus Wien. Sie wurden lebend ins Labor gebracht und nach eingehender Beobachtung des Verhaltens und des äußeren Habitus durch einen Schlag auf den Kopf rasch getötet. Der Bauchraum wurde durch einen Ventralschnitt vom After bis zur Höhe der Brustflosse mit einem Skalpell eröffnet, die inneren Organe konnten so schnell entnommen werden (Tab. 5). Die Organe wurden für die Paraffineinbettung in 7x7x7 mm<sup>3</sup> große Gewebestücke zerteilt und in 4 % gepuffertes Paraformaldehyd für 2 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Die Präparate wurden über eine ansteigende Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet.

Tab. 4.: Auflistung der in dieser Studie untersuchten Individuen mit Angaben über die Artzugehörigkeit, Geschlecht, Größe, Datum der Organentnahme und der Bezeichnung.

| Eigenschaften<br>Cyprinidae                      | Geschlecht | Größe<br>bzw.<br>Länge | Datum<br>Organentnahme | Zugeordnete<br>Nummerierung |
|--------------------------------------------------|------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Spiegelkarpfen<br><i>Cyprinus carpio</i> L. 1758 | Männchen   | 2,5 kg                 | November<br>2006       | 1A                          |
| Spiegelkarpfen<br><i>Cyprinus carpio</i> L. 1758 | Weibchen   | 1,9 kg                 | Dezember<br>2006       | 2A                          |
| Spiegelkarpfen<br><i>Cyprinus carpio</i> L. 1758 | Weibchen   | 2,1 kg                 | Februar<br>2007        | 3A                          |
| Goldfisch<br><i>Carassius auratus</i> L.<br>1758 | Männchen   | 14 cm                  | Juni<br>2007           | 1B                          |

### 2.3. Histologische Untersuchung

Um zu einem ersten Eindruck der Gewebemorphologie zu kommen, wurden von den Präparatblöcken 5µm Schnitte hergestellt. Für die histologische Färbung wurde eine Hämatoxylin (nach Harris) – Eosin – Färbung durchgeführt. Für die mikroskopische Auswertung wurde ein Eclipse E800 Mikroskop (Nikon) verwendet, als Kamera diente eine Nikon Digital Net Camera DN100.

Tab. 5.: Auflistung der entnommenen Organe: + entnommen, - nicht entnommen, n.u. nicht untergliedert in Abschnitte

| Cyprinidae  |            | 1A   | 2A | 3A | 1B |
|-------------|------------|------|----|----|----|
| Organ       |            |      |    |    |    |
| Darm        |            | +    |    |    |    |
|             | Vorderdarm | n.u. | +  | +  | +  |
|             | Mitteldarm | n.u. | +  | +  | +  |
|             | Hinterdarm | n.u. | +  | +  | +  |
| Gallenblase |            | +    | +  | -  | +  |
| Leber       |            | -    | +  | +  | +  |
| Kopfnieren  |            | +    | +  | +  | +  |
| Niere       |            | -    | +  | +  | +  |
| Milz        |            | -    | +  | +  | +  |
| Herz        |            | +    | +  | +  | +  |
| Kiemens     |            | +    | +  | +  | +  |

#### 2.4. Vorbereitung der Immunzytochemie

Mit einem Ultramikrotom (OmU3, Reichert) wurden Semidünnschnitte (1 µm) von Darm-, Leber-, Gallenblase- und Herzgewebeblöcke, in welchen besonders viele RZ festgestellt wurden, gefertigt. Da die Gewebe formalinfixiert waren, wurde zur Antigendemaskierung eine Hitzebehandlung (Dampfkocher Multi Gourmet; Fa. Braun) mit 0,01 M Citratpuffer pH 6,0 oder 0,01 M EDTA-Puffer pH 8,0 für 30 Minuten bei 95 °C durchgeführt. Alternativ wurde eine proteolytische Andauung mit Proteinase K (1 % in 0,01 M Tris Puffer pH 7,8) für 10 Minuten im Humid Chamber (hc) und Wärmeschrank bei 37 °C durchgeführt. Anschließend an die Demaskierungsmethoden wurden mehrere Waschungen mit PBS Puffer durchgeführt.

#### 2.5. Anleitung zur indirekten Immunfluoreszenz (IIF)

Nach den vorbereitenden Schritten musste mit einer 1 % PBBT pH 7,2 - 7,6 für 10 - 20 Minuten inkubiert werden. Dies diente der Minderung der unspezifischen Bindungsreaktionen

des Primärantikörpers an freien reaktiven Gewebsantigenen (vor allem Aldehydgruppen). Der erste Antikörper wurde in unterschiedlichen Verdünnungen (in 0,05 % PBT pH 7,2-7,6) auf die Objektträger (50µl/Schnitt) aufgetragen. Inkubiert wurde ebenfalls in hc für 30 min bei 37 °C im Wärmeschrank, 90 min bei RT oder bei 4 °C ON. Danach mussten die Schnitte 3x 10 min mit 0,05 % PBT pH 7,2 - 7,6 gespült werden. Bevor der Fluorochromkonjugierte Sekundärantikörper aufgetragen werden konnte, wurde erneut für 10 min mit 1 % PBBT pH 7,2 - 7,6 vorinkubiert. Der Sekundärantikörper wurde 1:1000 mit PBBT pH 7,2 - 7,6 verdünnt und 50 µl dieser Lösung pro Schnitt aufgetragen. Die Inkubationsdauer, die in Dunkelheit ablaufen musste, betrug entweder 90min bei RT oder 4 °C ON.

## 2.6. Anleitung zur fluorchromgekoppelten ABC-Methode

Da im Gewebe endogenes Biotin vorhanden ist, musste dieses nach den vorbereitenden Schritten blockiert werden. Dies geschah durch das AvidinBiotinBlocking Kit (Vektor Lab. Inc.). Beide Blockinglösungen mussten je 15 Minuten inkubiert werden. Anschließend wurde, um unspezifische Bindungen zu vermeiden, eine 1 % PBBT – Lösung pH 7,2 - 7,6 für 10 - 20 min bei RT auf die Schnitte aufgetragen. Danach konnte der Primärantikörper in den passenden Verdünnungen inkubiert werden. Nach PBT-Waschungen wurden die Präparate mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 30 min und nach erneuten Waschungen mit dem Avidin-DCS Komplex- Reagenz wieder für 30min bei RT in Dunkelheit inkubiert.

## 2.7. Anleitung zur enzymatischen PAP-Methodik

Da das Kit Ultra Vision ONE Detection System HRp Polymer & DAB Plus Chromogen der Firma Neomarkers verwendet wurde, ist nach der mitgelieferten Anleitung gefärbt worden.

## 2.8. Konservierung und Auswertung

Zur Kernfärbung wurde der Fluoreszenzfarbstoff Dapi (Fa. Merck) verwendet, dazu wurden die Schnitte 5min in eine Küvette mit Dapi Lösung (in PBS pH 7,0) eingestellt. Die Objektträger wurden anschließend mit Citifluor (Glycerin + PBS pH 7,4, 1:1) eingedeckt.

Bei jedem Antikörpertest wurden mit den gleichen Fischgewebeschnitten Substitutionkontrollen als Negativkontrollen mitgeführt. Dabei wurde nur mit Pufferlösungen statt Primärantikörper gearbeitet, um unspezifische Immunreaktionen und Hintergrundfärbungen zu erkennen und somit in den Ergebnissen als negativ werten zu können. Ansonsten wurden die Präparate auf die oben beschriebene Weise behandelt.

Bei Antikörpern für das Zytoskelett mussten außerdem Positivkontrollen mit Schnitten von humanen Geweben (Herz, Magen und Fingerhaut) angefertigt werden.

Für die Auswertung der Immunfluoreszenzversuche wurde mit einem Eclipse E800 Mikroskop (Nikon) mit Fluoreszenzfilter (VFM Epi-Fluorescence Attachment) gearbeitet (siehe Tab.6). Die Fotodokumentation positiver Immunreaktionen erfolgte mit einer Nikon Digital Net Camera DN100.

Tab.6.: Auflistung der verwendeten Fluorochrome mit ihren Absorptions- und Emissionsspektren und der gebrauchten Mikroskopfilter.

| Name Fluorchrom                             | Absorptionsspektrum (nm) | Emissionsspektrum (nm) | Verwendeter Mikroskopfilter   |
|---------------------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------------|
| Alexa 488 (Molecular Probes)                | 495 (Blau)               | 519 (Grün)             | BA-2A<br>EX 450-490<br>BA 520 |
| DAPI (4,6Diamino-2-Phenylindol)             | 372 (UV)                 | 456 (Blau)             | UV-2A<br>EX 330-380<br>BA 420 |
| FITC (Fluorescein-Isothiocyanate)           | 490 (Blau)               | 520 (Grün)             | BA-2A<br>EX 450-490<br>BA 520 |
| Rhodamine B-isothiocyanate (RITC)           | 570 (Grün)               | 595 (Rot)              | G-2A<br>EX 510-560<br>BA 590  |
| TRITC (Tetramethylrhodamine-isothiocyanate) | 541 (Grün)               | 582 (Rot)              | G-2A<br>EX 510-560<br>BA 590  |

## 2.9. Phalloidin – Färbung

1 µm dicke, mit 4 % gepufferten Paraformaldehyd fixierten und in Paraplast gebettete Schnitte von Gallenblase, Herz und Darm von *C. auratus* und *C. carpio* wurden für die Färbung mit Phalloidin-FITC (Merck; freundliche Gabe von Prof. Dr. Bittner) herangezogen.

Als Blocking Reagenz diente eine 1 % BSA Lösung (PBBT pH 7,2) welche bei gleicher Temperatur und Dauer wie die vorangegangene Behandlung einwirken musste. Phalloidin – FITC wurde 1:1000 verdünnt und mithilfe des Vortex in einem Reaktionsgefäß gründlich gemixt. Jeweils 100 µl von dieser Endlösung wurden auf jeden Schnitt aufgetragen und nach 30 min bei 37 °C im Wärmeschrank über Nacht gut abgedunkelt bei 4 °C inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI. Konservierung und Auswertung der Schnitte erfolgte auf die gleiche Weise, wie bereits für die Immunzytochemie genannt.

## 2.10. Bildbearbeitung

Die Bilder wurden mit der Software Adobe Photoshop Elements 2.0 bearbeitet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Äußere Betrachtung der untersuchten Karpfenartigen

Die Karpfen 1A und 2A zeigten ein weitgehend normales Aussehen und geordnete Schwimmmotorik. Karpfen 3A hatte Hautirritationen in Form von weißlichen Flecken auf Kopf und Operkulum. Mitunter zeigte dieses Exemplar Schwimmen in seitlicher Lage und erhöhte Atemfrequenz. Der untersuchte Goldfisch mit der Bezeichnung 1B wies einen minderguten Ernährungszustand auf. Auch seine Schwimmmotorik wirkte schlapp und träge. Die inneren Organe wie Leber, Herz, Kiemen, Milz, beide Nierenanteile (Kopf- und Rumpfnieren), Darm und Gallenblase waren allerdings bei allen untersuchten Individuen unauffällig in Farbe, Konsistenz, Geruch und Größe. Parasitär oder entzündlich bedingte Organveränderungen konnten makroskopisch nicht entdeckt werden.

#### 3.2. Immunzytochemie der Rodletzellen

##### 3.2.1. ER Chaperone

##### 3.2.1.1. Grp78/BiP

Der pAb gegen Grp 78/BiP wurde sowohl für indirekte Immunfluoreszenz als auch die enzymatische Färbung nach der PAP-Methode verwendet. Im Darm zeigten sich bei indirekter Immunfluoreszenz mit Goat anti rabbit Alexa488 Detektion positive Reaktionen im umgrenzten Bereich der basal liegenden Zellkerne von den langgestreckten Enterozyten. Die Signale waren vor allem bei der Auswertung im Fitc/Texas Red Fluoreszenzfilter gut darstellbar, da bei alleiniger Anregung mit 510-560 nm eine intensive Hintergrundfluoreszenz eine Dokumentation und Auswertung erschwerte. Der dichte Enterozytenbürstensaum der Schleimhautoberfläche war schwach grünmarkiert. Die vereinzelt Becherzellen und ihr Ergastoplasma waren durchwegs ungefärbt und ohne Signale (Abb.4). Der große Sekrettropfen dieser intraepithelialer Drüsen erschien als großer optischer leerer Bereich in der Tunica mucosae epithelialis des Darms. Rodletzellen waren aufgrund des unregelmäßig geformten Zellkerns und der dichten Kapsel deutlich von anderen Zelltypen zu unterscheiden. Manchmal erschien der Dapi-gefärbte Nukleus gelappt oder segmentiert. Die Einschlusskörperchen, die Rodlets, wiesen eine intensive Färbung mit dem pAb Grp78/BiP auf (Abb. 4 & 5).

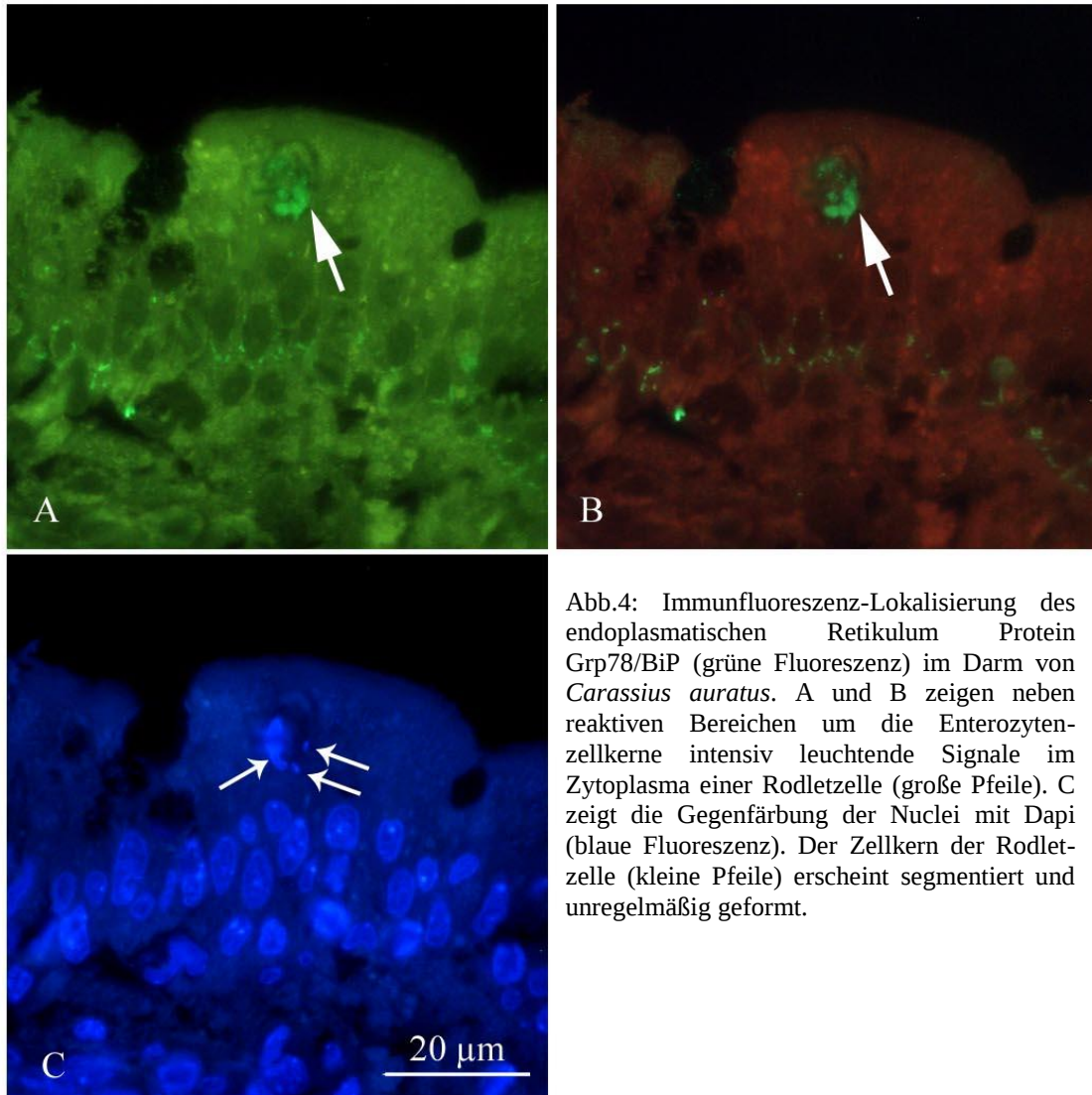


Abb.4: Immunfluoreszenz-Lokalisierung des endoplasmatischen Retikulum Protein Grp78/BiP (grüne Fluoreszenz) im Darm von *Carassius auratus*. A und B zeigen neben reaktiven Bereichen um die Enterozytenzellkerne intensiv leuchtende Signale im Zytoplasma einer Rodletzelle (große Pfeile). C zeigt die Gegenfärbung der Nuclei mit Dapi (blaue Fluoreszenz). Der Zellkern der Rodletzelle (kleine Pfeile) erscheint segmentiert und unregelmäßig geformt.

Waren die Zellen quer getroffen, zeigten sich die Rodlets rund geformt mit intensiver Reaktion des Antikörpers auf der gesamten Fläche dieser Strukturen. Im Längsschnitt waren die Stäbchen keulenförmig und mit gleicher Fluoreszenzintensität markiert. Die Säckchen zeigten bei solchen Anschnitten eine Orientierung nach luminal. Zum einen waren sie nach apikal abgerundet und hatten eine stiftchenartige Verlängerung nach basal (Abb. 7 & 8), zum anderen waren sie nach apikal verlängert und zeigten somit eine gegensätzliche Orientierung (Abb. 5 & 6).

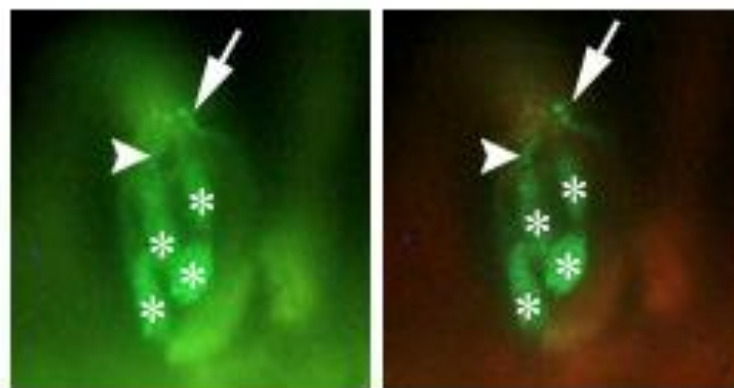
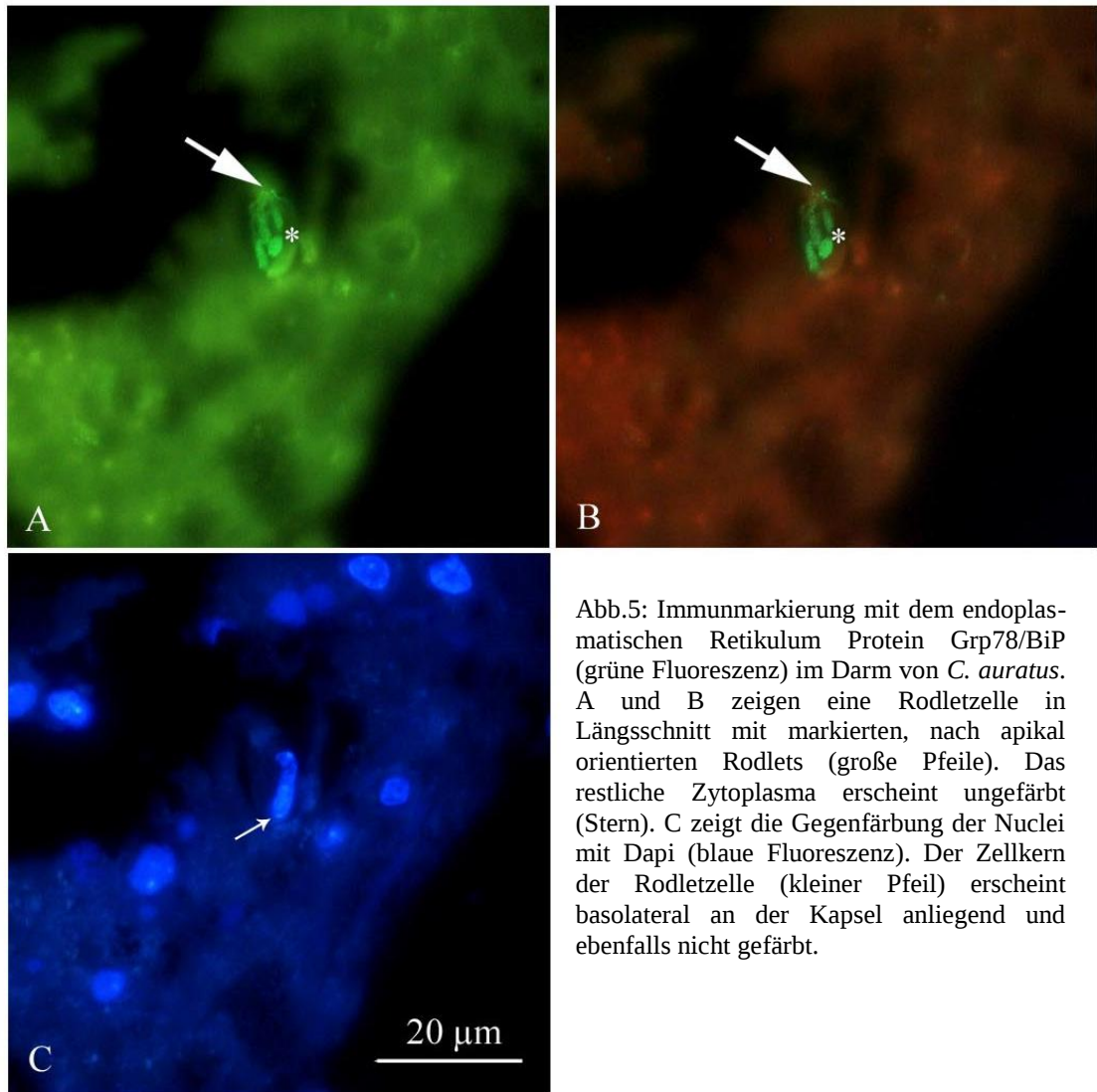


Abb.6: Detailvergrößerung der Abb.5. Die Rodletzelle zeigt intensiv mit Anti-Grp78/BiP Ab (grüne Fluoreszenz) markierte Rodlets (Sterne). Nach apikal erscheint ein Stäbchen verlängert (Pfeilkopf). Am lumennahen Pol sind punktförmige Signale (Pfeil) sichtbar.

Zellen fixiert im Prozess der Sekretion wiesen eine zytoplasmatische Verlängerung nach luminal auf, in der sich feine und reaktionspositive Granula gerichtet zur Epitheloberfläche befanden (Abb. 7 & 8). Die Färbung der Rodlets erfuhr während dieses zellulären Prozesses keine Intensitätsminderung.

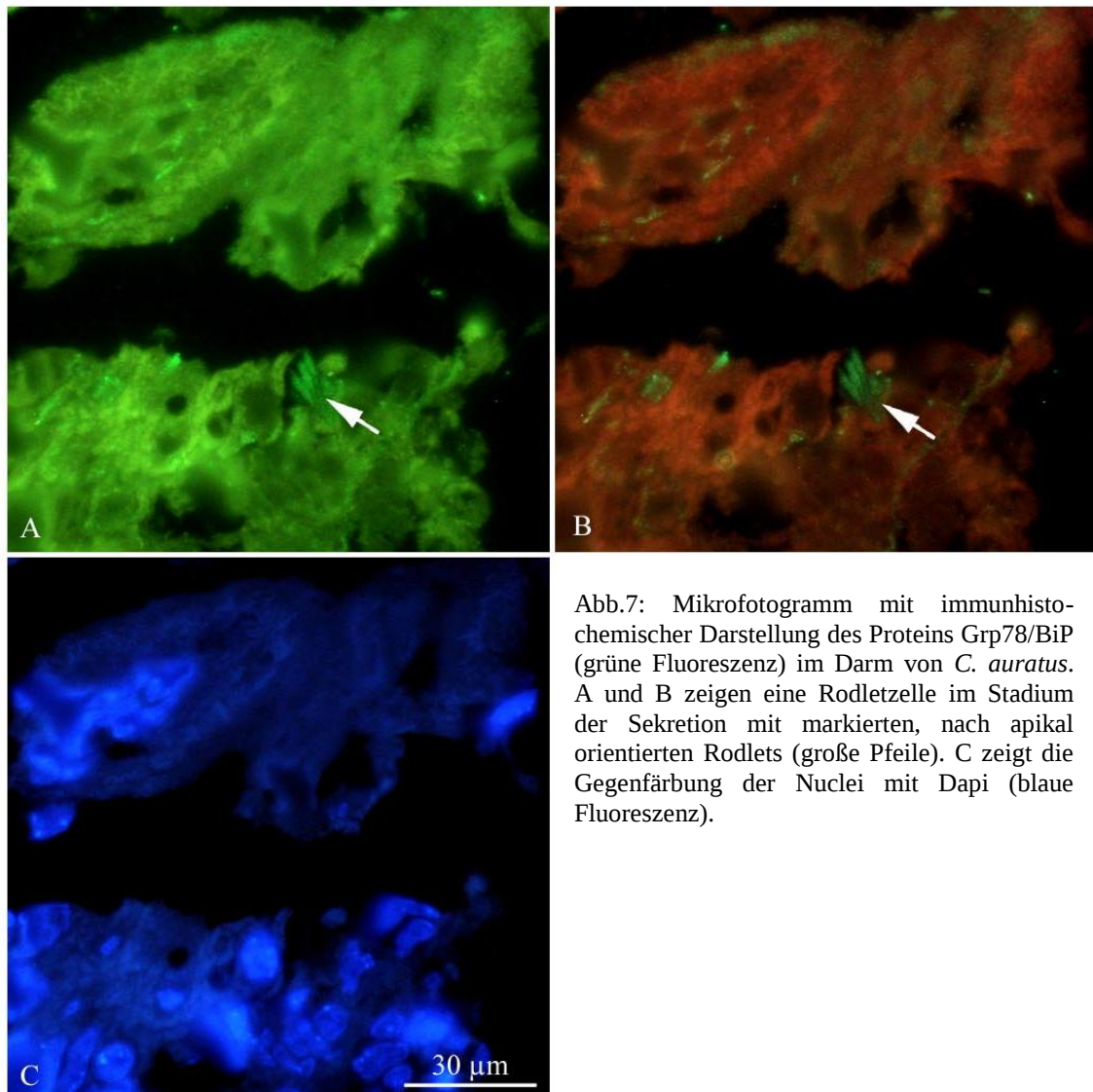


Abb.7: Mikrofotogramm mit immunhistochemischer Darstellung des Proteins Grp78/BiP (grüne Fluoreszenz) im Darm von *C. auratus*. A und B zeigen eine Rodletzelle im Stadium der Sekretion mit markierten, nach apikal orientierten Rodlets (große Pfeile). C zeigt die Gegenfärbung der Nuclei mit Dapi (blaue Fluoreszenz).

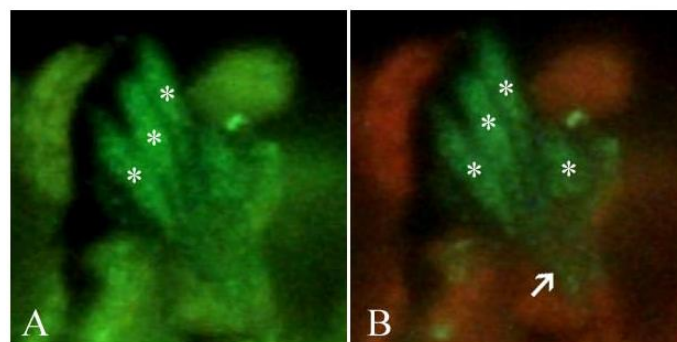


Abb.8: Detailvergrößerung der Abb.7. Die ausgeschleuderten Rodlets (Sterne) zeigen eine Immunmarkierung mit Grp78/BiP. Im basalen Bereich der Zelle sind positiv reagierende filamentöse Verlängerungen (Pfeil) der Stäbchen sichtbar.

Eine unterschiedliche Reaktivität der beiden Rodletanteile, nämlich Kern und Säckchen, war lichtmikroskopisch nicht erkennbar oder möglich. Bei einer geringen Vergrößerung von 200fach war aufgrund der Signalintensität der Rodlets und dem gleichzeitigen Fehlen anderer intensiver Fluoreszenzsignale eine deutliche Markierung der Stäbchenzellen im histologischen Darmschnitt durchführbar (Abb. 9).

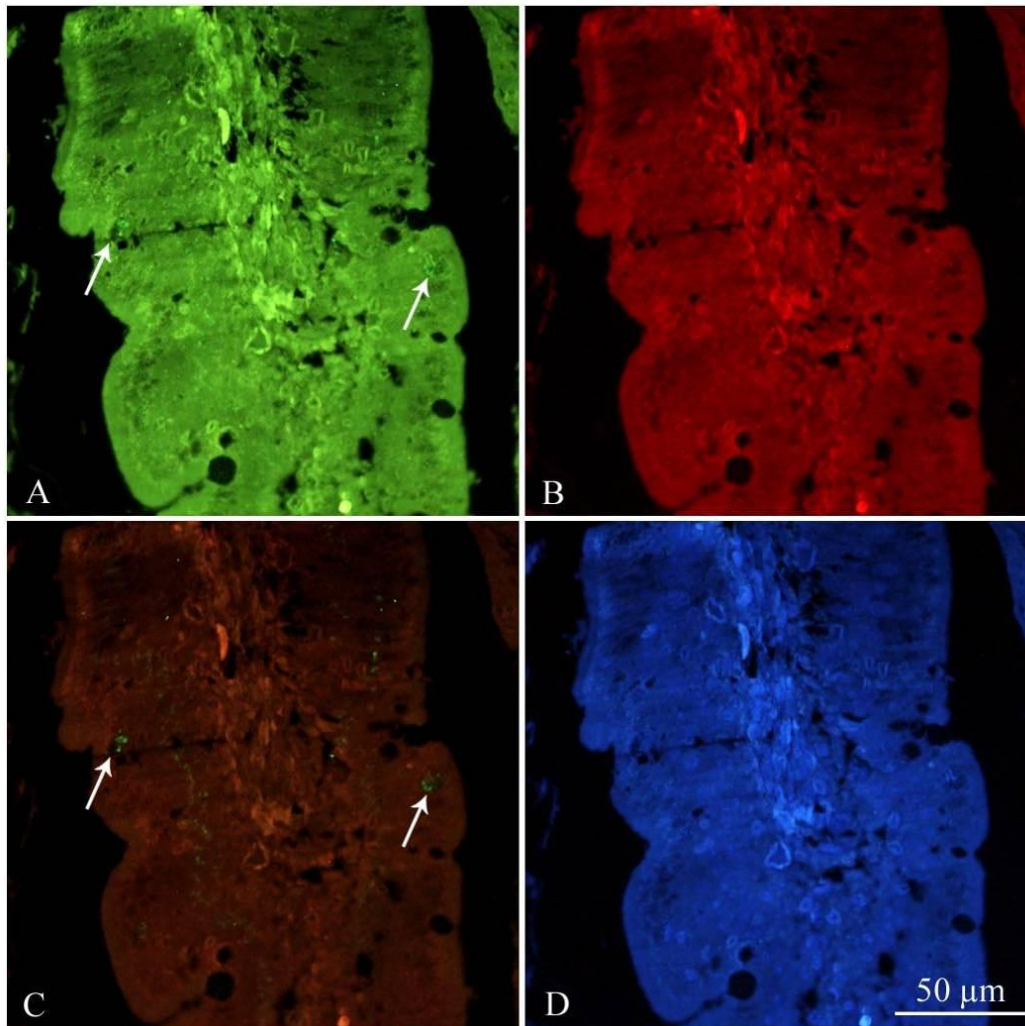


Abb.9: Immunmarkierung mit dem endoplasmatischen Retikulum Protein Grp78/BiP (grüne Fluoreszenz) im Darm von *C. auratus* bei 400facher Vergrößerung. A und C zeigen Rodletzellen in der Lamina epithelialis mit intensiv gefärbten Rodlets (Pfeile). Bei einer Anregung mit 510-560 nm sind keine Signale zu sehen (B). Für die Gegenfärbung der Kerne wurde Dapi verwendet (D).

Bei Immunmarkierung der Paraffinschnitte mit dem pAb Grp78/BiP und Detektion mit DAB nach der PAP-Methode zeigten die Rodletzellen ebenfalls die typische zytoplasmatische Reaktion auf. Das dunkelbraune Farbprodukt detektierte die Anlagerung des Primärantikörpers an die Rodlets. Die Zellkerne waren wie in der Immunfluoreszenz ebenfalls ungefärbt (Abb. 10). Die benachbarten

Enterozyten wiesen auch bei dieser Methode eine Färbung im basalen Bereich unterhalb der Nuklei auf. Der Mikrovillisaum war stärker angefärbt vergleichend zur Immunfluoreszenz. Die Becherzellen waren erneut negativ (Abb. 11).

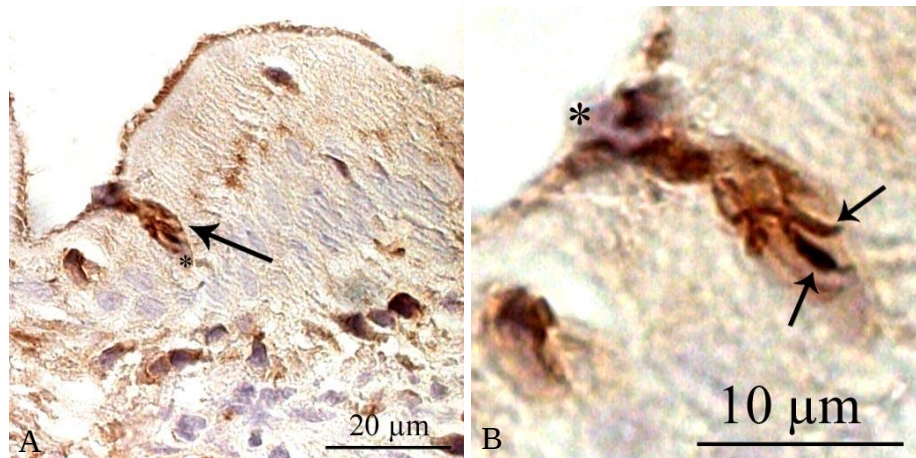


Abb.10: Immunmarkierung mit dem endoplasmatischen Retikulum Protein Grp78/BiP im Darm von *C. auratus*. Die Rodletzelle (Pfeil) befindet sich im Stadium der Sekretion. Die Rodlets weisen eine intensive Braunfärbung auf. In der Detailvergrößerung sind die Stäbchen nach apikal und basal verlängert (Pfeile) und es ist eine basophil gefärbte Struktur am lumennahen Pol der Zelle sichtbar. PAP-Methode, Farbstoff DAB, Gegenfärbung Hämatoxylin.

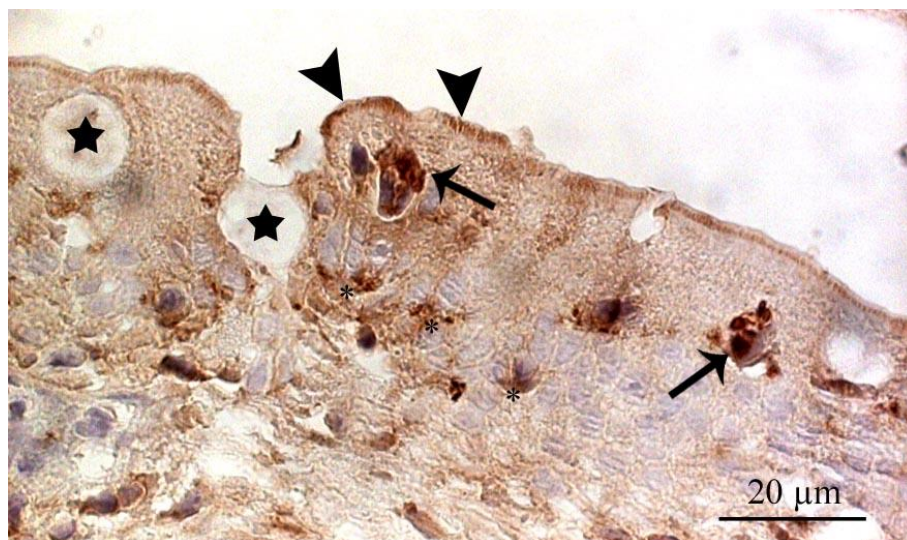


Abb.11: Mikrofotogramm mit Grp78 Darstellung in zwei Rodletzellen (Pfeile) im Darm von *C. auratus*. Neben einer intensiven Markierung des Bürstensaums, zeigen sich die basalen Bereiche der Enterozyten (kleine Sterne) gefärbt. Die großen Sekrettropfen der Becherzellen lieferten negative Ergebnisse (große Sterne). PAP-Methode, Farbstoff DAB, Gegenfärbung Hämatoxylin.

In den mikroskopischen Schnitten des Herzens von *C. auratus* war eine Detektion der Rodletzellen bei Immunfluoreszenz aufgrund der generellen Reaktionsfreudigkeit anderer Strukturen schwerer durchführbar. Zumeist ermöglichte die dichte Kapsel eine Identifizierung dieses Zelltypus. Die Rodlets waren fädige Strukturen im Zytoplasma, die im Gegensatz zu jenen runden, hoch reaktiven in den Darmschnitten, nur schwache Farbsignale aussandten (Abb. 13). Bei der PAP-Methode waren die Rodlets zumeist schwach oder überhaupt nicht gefärbt. Aufgrund der gleichfalls braunen Eigenfärbung der Melanomakrophagen ist bei diesen Zellen eine positive Reaktion nicht feststellbar gewesen (Abb. 12). In der Immunfluoreszenz zeigten sie eine intensive Autofluoreszenz, die ähnlich jener der Erythrozyten auf das gespeicherte Hämoglobin und seine Abbauprodukte zurückzuführen ist.

Die Rodletzellen der Gallenblase und der intrahepatische Gallengänge zeigten ein ähnliches zytoplasmatisches Reaktionsmuster wie jene des Darmes. Die Säckchen der Rodlets waren reaktiv mit dem pAb gegen Grp78/BiP markiert. Sie präsentierten dieselbe rundlich bis kolbenartige Form und auch ihre Lokalisierung innerhalb der Kapsel war ident. Die Zellkerne der RZ waren wieder negativ. Bei der PAP-Methode waren die Rodlets der Stäbchenzellen fädig in ihrem Aufbau und zum Gallengangslumen orientiert. Bei einzelnen RZ zeigte sich um den basalen Zellkern herum ein dunkler gefärbter Bereich. Die DAB Färbung war schwach und nur bei 600 bis 1000facher Vergrößerung sichtbar. Die Sekrete der hochprismatischen Zellen des Gallengangs waren mitunter intensiv braun markiert und wirkten granulär aufgebaut (Abb. 14).

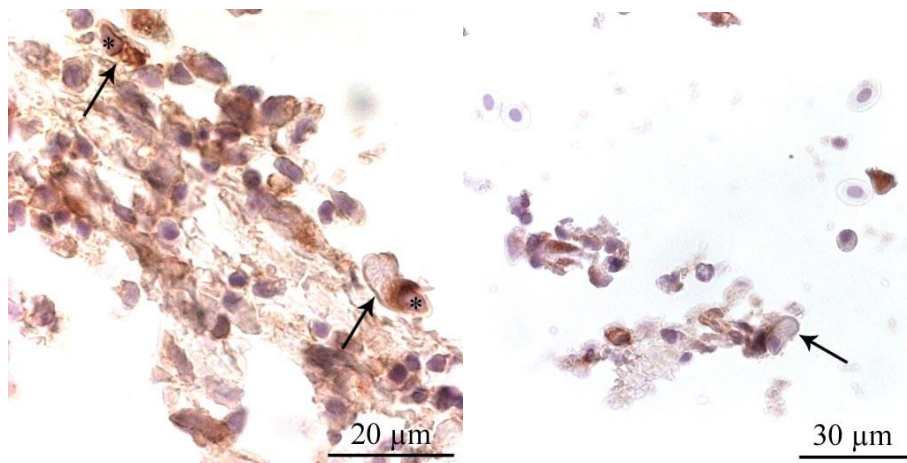


Abb.12: Mikrofotogramm mit Grp78/BiP Darstellung im Herz von *C. carpio*. Die Rodletzellen (Pfeile) zeigen unterschiedliche Reaktivität. In Abbildung A sind Färbungen entweder basal oder im gesamten Zellinneren zu finden. B weist eine nicht markierte Stäbchenzelle (Pfeil) auf. Die Zellkerne (Sterne) liegen basal. PAP-Methode, Farbstoff DAB, Gegenfärbung Hämatoxylin

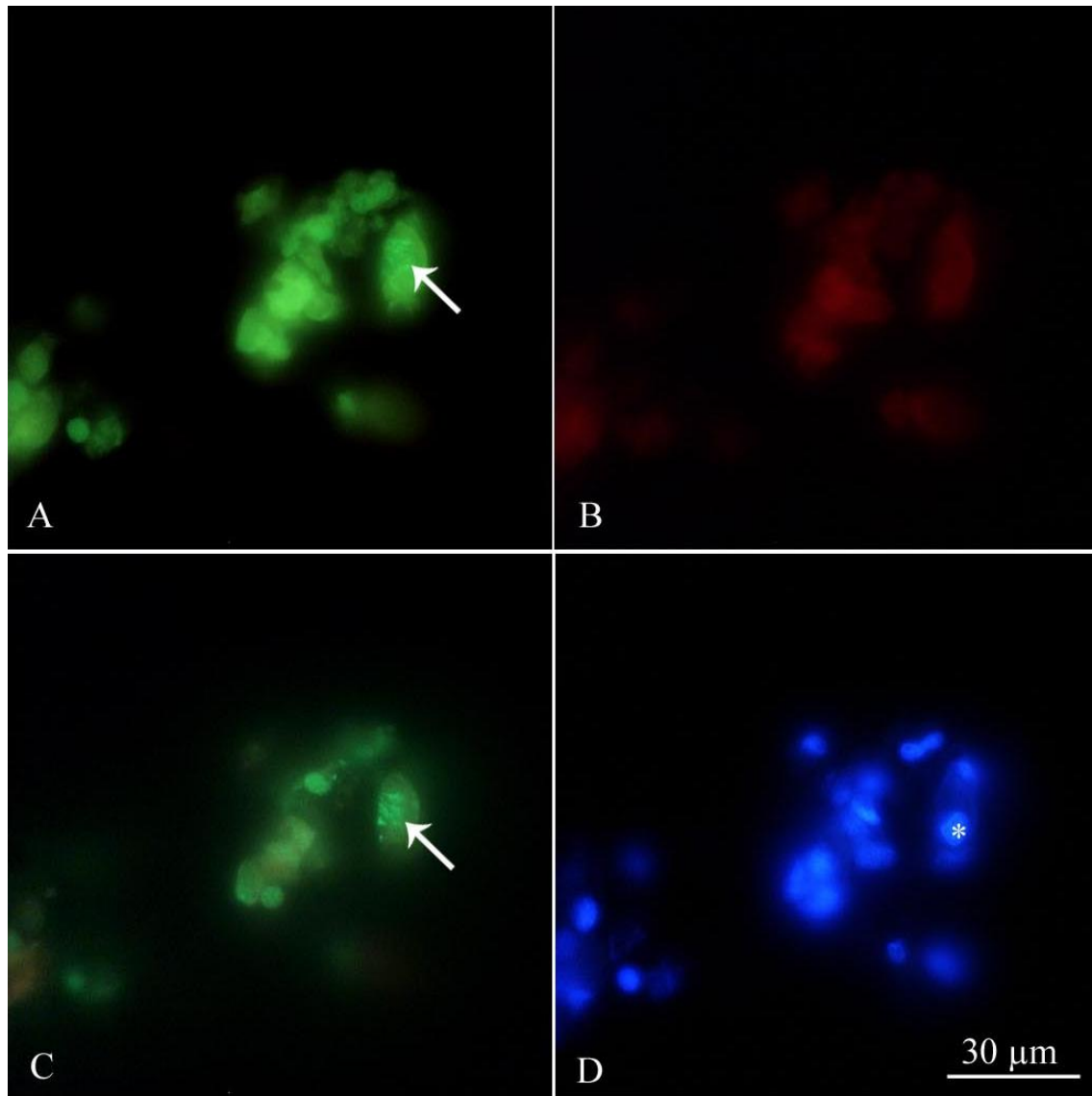


Abb.13: Immunmarkierung mit Grp78BiP im Herz von *C. carpio*. In der Rodletzelle (Pfeile) sind die markierten Rodlets (grüne Fluoreszenz) nach lateral orientiert (A & C). Bei Anregung mit 510-560nm sind keine Signale sichtbar (B, rote Fluoreszenz). D zeigt die Gegenfärbung der Zellkerne mit Dapi (blaue Fluoreszenz). Der Nucleus der Rodletzelle (Stern) liegt basal im Zellinneren.

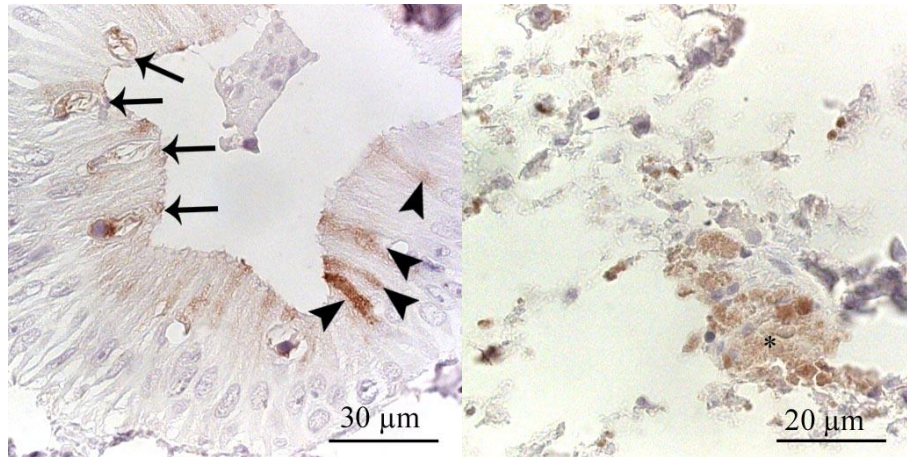


Abb.14: Mikrofotogramm mit Grp78/BiP Darstellung in einem intrahepatischen Gallengang der Leber von *C. carpio*. Die Rodletzellen (Pfeile) zeigen Markierungen der Rodlets im Zellinneren. Die Granula der hochprismatischen Epithelzellen (Pfeilköpfe) sind ebenfalls markiert. In der rechten Abbildung ist eine Ansammlung von Pigmentmakrophagen (Stern) mit unbekannter Reaktivität zu sehen. PAP-Methode, Farbstoff DAB, Gegenfärbung Hämatoxylin

#### 3.2.1.2. Calreticulin

Die Rodletzellen zeigten bei der Immunmarkierung mit dem polyklonalen Antikörper gegen das ER-Lektin Calreticulin positive Reaktionen, die vergleichbar waren mit den Ergebnissen bei den Grp78/BiP Färbungen. Das endoplasmatische Retikulum und Zytoplasma anderer Zellen in der Darmschleimhaut, wie Saum- und Becherzellen, oder weiteren Darmschichten waren nur sehr gering bzw. überhaupt nicht mit dem pAb markiert. Nur der Mikrovillisaum wies eine schwache grüne Fluoreszenz, allerdings geringer als bei Grp78/BiP, auf. Erythrozyten hatten um den Zellkern ringförmige Reaktionen (Abb. 15).

Im Zytoplasma der Stäbchendrüsenzellen konnten intensive grüne Fluoreszenzsignale bei Detektion mit Fluorchrom Alexa 488 gekoppeltem Sekundärantikörper dokumentiert werden. Die Bereiche der Nuklei und auch der fibrillären Zellkapseln blieben ungefärbt. Bei einer erprobten, optimalen Verdünnungsrate von 1/200 kam es zumeist zu rundlich bis elliptischen Signalen an den Rodlets (Abb. 15 & 16). Die Leuchtintensität war vergleichend zu den Ergebnissen der Grp78/BiP Immunmarkierungen geringer.

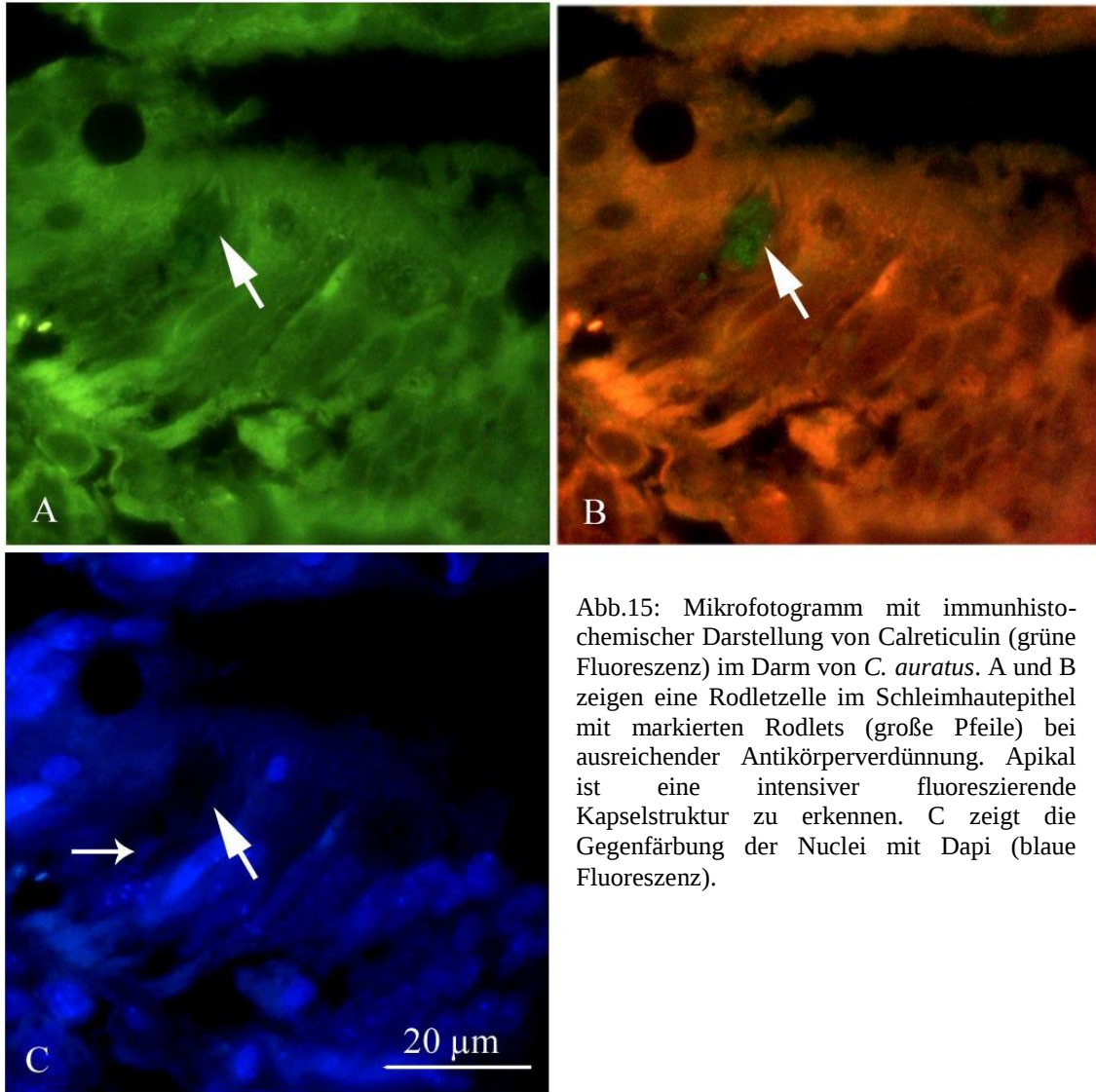


Abb.15: Mikrofotogramm mit immunhistochemischer Darstellung von Calreticulin (grüne Fluoreszenz) im Darm von *C. auratus*. A und B zeigen eine Rodletzelle im Schleimhautepithel mit markierten Rodlets (große Pfeile) bei ausreichender Antikörperversdünnung. Apikal ist eine intensiver fluoreszierende Kapselstruktur zu erkennen. C zeigt die Gegenfärbung der Nuclei mit Dapi (blaue Fluoreszenz).

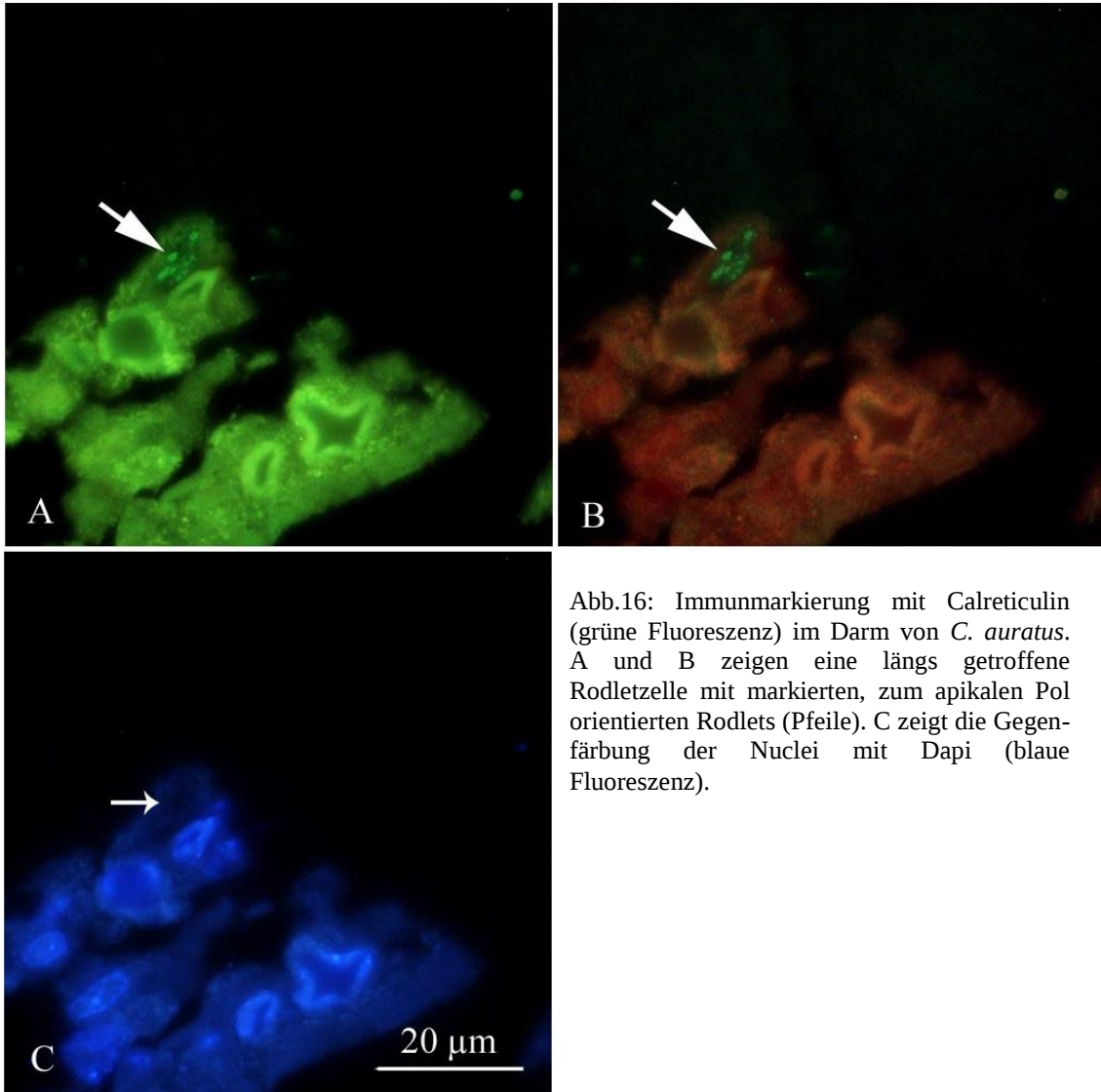
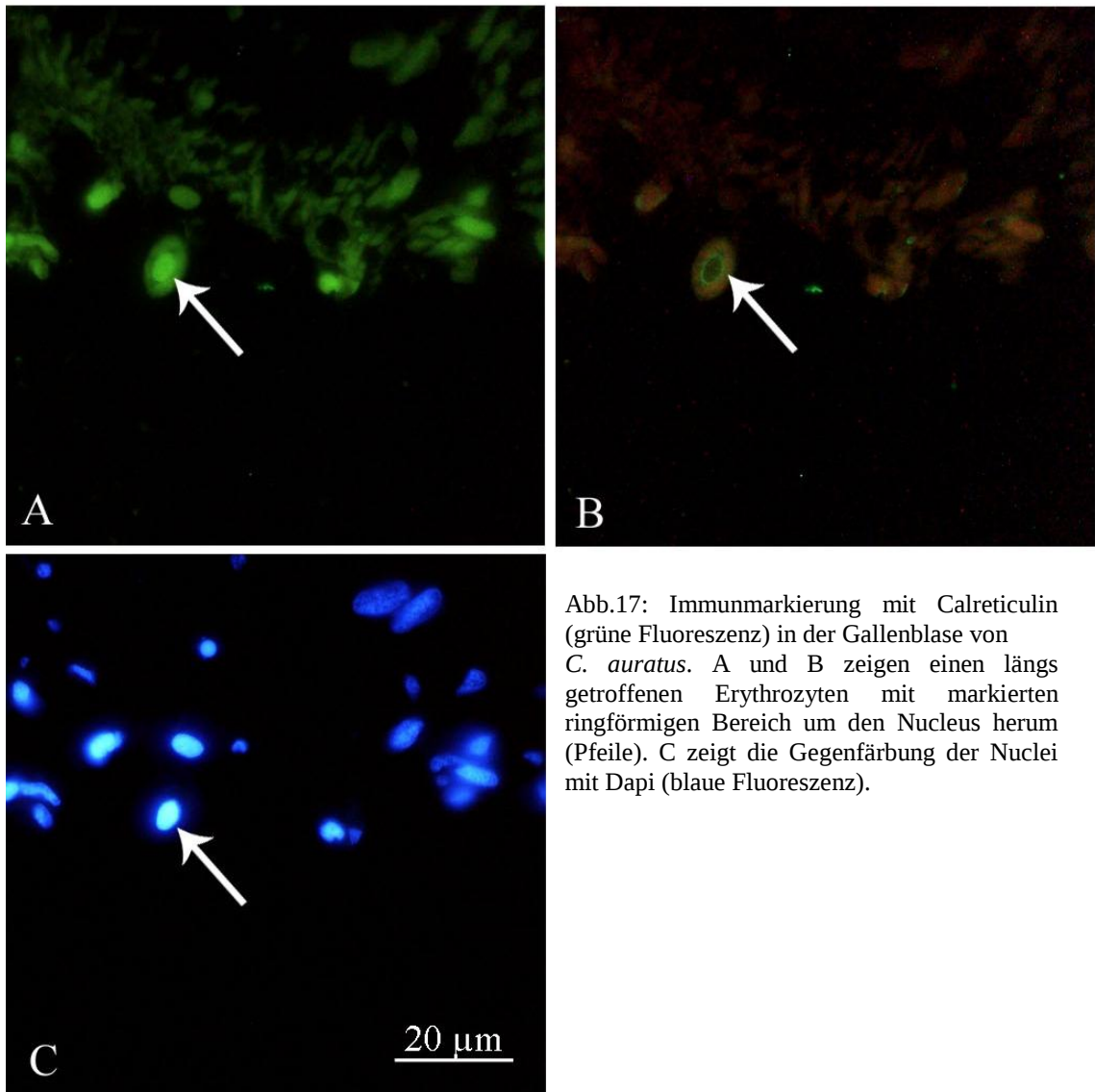


Abb.16: Immunmarkierung mit Calreticulin (grüne Fluoreszenz) im Darm von *C. auratus*. A und B zeigen eine längs getroffene Rodletzelle mit markierten, zum apikalen Pol orientierten Rodlets (Pfeile). C zeigt die Gegenfärbung der Nuclei mit Dapi (blaue Fluoreszenz).



### 3.2.1.3. Calnexin

Immunmarkierungen mit dem mAb gegen Calnexin waren bei indirekter Immunfluoreszenz negativ. Es kam zu keinen Signalen. Bei Anwendung der ABC – Methode zeigten sich Fluoreszenzen im Zellkernbereich, die sich bei Vergleich mit den durchgeführten Negativkontrollen als unspezifische Anlagerung des Sekundärantikörpers und des Avidin DCS Komplexes an die Zellkerne darstellten. Calnexin konnte mit diesem Antikörper im Fischgewebe nicht nachgewiesen werden. Somit waren auch die Rodletzellen negativ (Abb. 18).

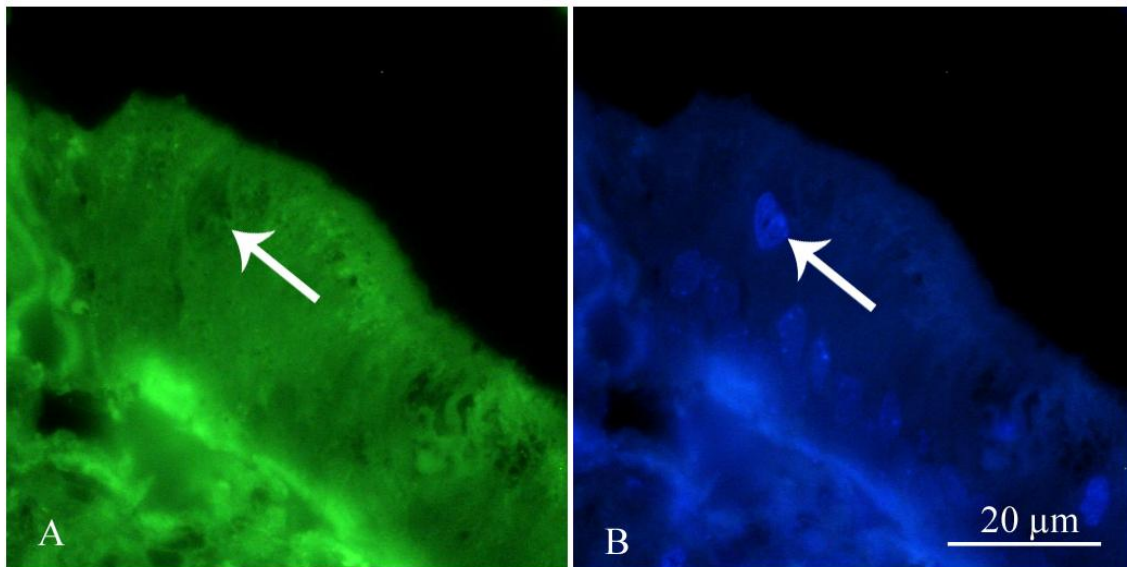


Abb.18: Immunmarkierung mit dem Chaperon Calnexin (grüne Fluoreszenz) im Darm von *C. auratus*. A zeigt eine Rodletzelle ohne Signale (Pfeile). B zeigt die Gegenfärbung der Nuclei der Stäbchenzelle (Pfeil) mit Dapi (blaue Fluoreszenz).

#### 3.2.1.4. ERp57/Grp58

Der Antikörper gegen ERp57 zeigte nur in den glatten Muskelzellen der Tunica muscularis des Darmes eine gewisse Reaktivität. In den Bereichen der Zellkerne zeigten sich schwache, punktförmige Signale, die bei den durchgeführten Negativkontrollen nicht auftraten (Abb. 19). Vergleichend zu anderen ER spezifischen Antikörpern, führten Testläufe mit dem mAb ERp57 nur zu wenigen Signalen sowohl in den untersuchten mikroskopischen Präparaten der Fischgewebe, als auch in fixierten humanen Geweben.

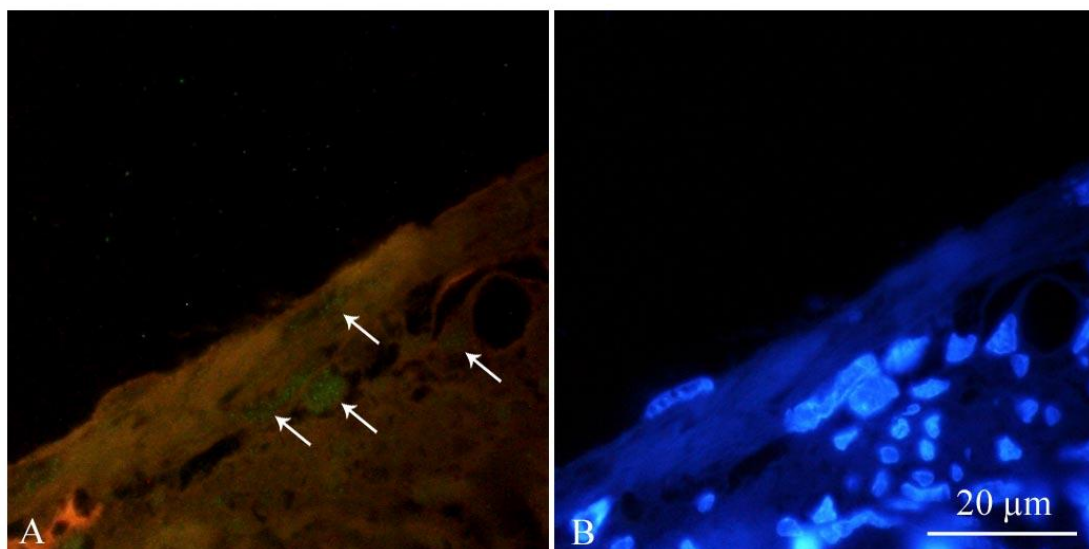


Abb.19: Mikrofotogramm mit immunhistochemischer Darstellung von ERp57 (grüne Fluoreszenz) im Darm von *C. auratus*. Positive Reaktion in den glatten Myozyten (Pfeile) der Darmmuskulatur (A). Zur Gegenfärbung wurde der DNA-Farbstoff Dapi verwendet (B).

Die Tunica mucosae epithelialis mit ihren in dieser Schicht typischen Zellarten blieb signalfrei. In der Lamina propria fielen intensiv grün leuchtende Zellen auf, die ähnlich den Pigmentmakrophagen bei Verwendung des Fitc/Texas Red Filters eine rötliche Autofluoreszenz hatten (Abb. 20). Zellen mit ähnlicher Fluoreszenz konnten auch in der Tela submucosa des humanen Magens gefunden werden (Abb. 21). Alle untersuchten Rodletzellen waren negativ.

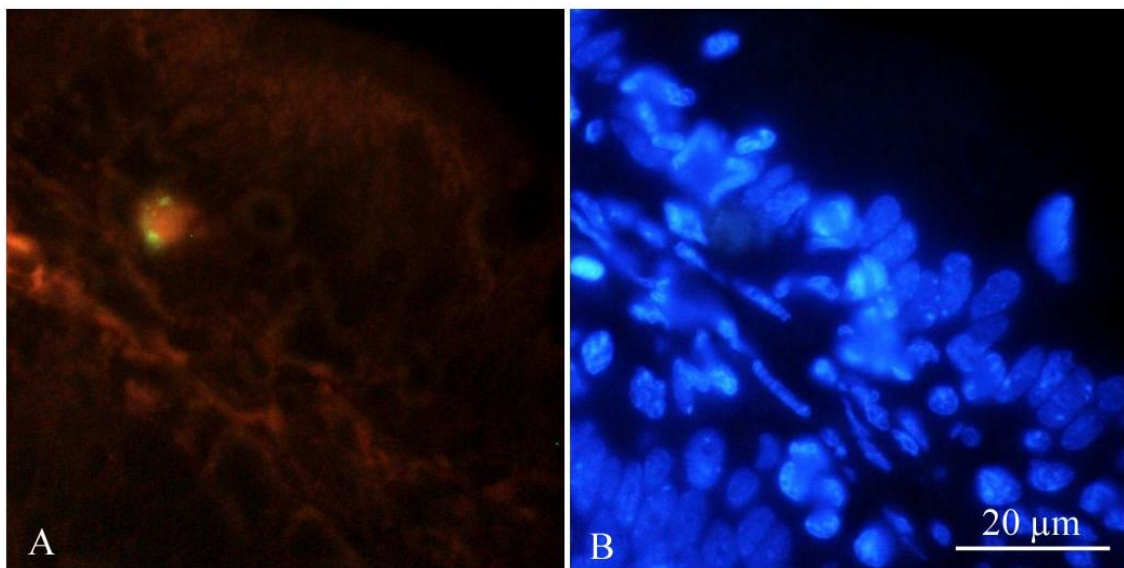


Abb.20: Mikrofotogramm mit immunhistochemischer Darstellung von ERp57 (grüne Fluoreszenz) im Darm von *C. auratus*. Eine Zelle in der Lamina propria wies granuläre Färbungen im Zellinneren auf (A). Zur Gegenfärbung wurde der DNA-Farbstoff Dapi verwendet (B).

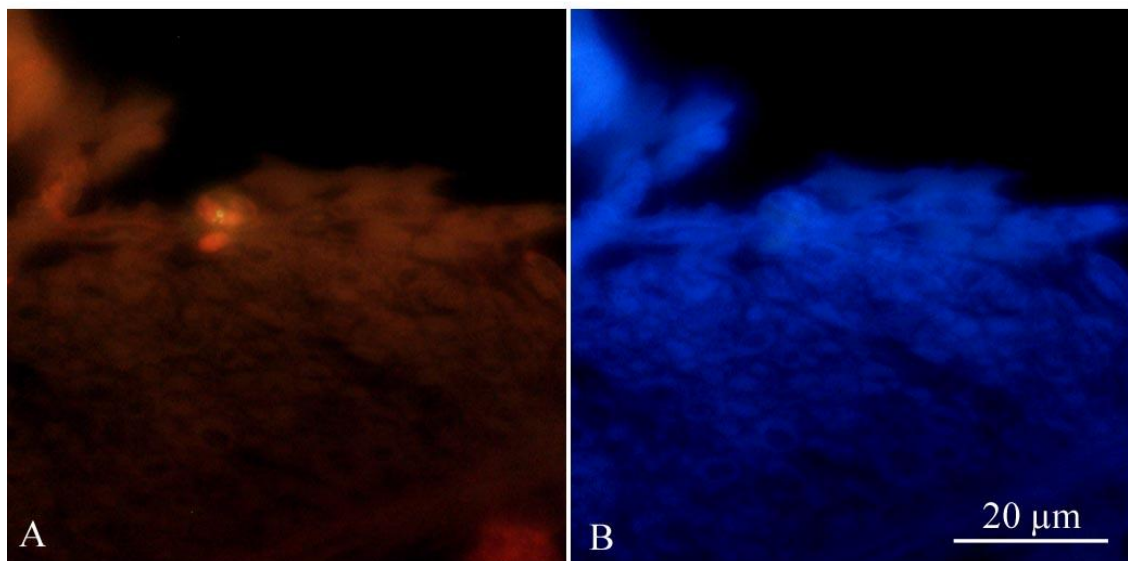


Abb.21: Positivkontrolle von ERp57 (grüne Fluoreszenz) in einem mikroskopischen Präparat vom humanen Magen. Eine Zelle zeigte ähnliche Färbungen im Zellinneren auf, wie dies im Darm von *C. auratus* verzeichnet werden konnte. (A). Zur Gegenfärbung wurde der DNA-Farbstoff Dapi verwendet (B).

### 3.2.1.5. Ubiquitin

Die Färbungen für Ubiquitin waren auf die Bereiche um die Zellkerne der Epithelzellen in der Gallenblase beschränkt. Zumeist waren es punktförmig, aufleuchtende Signale, die nicht in allen Zellen gefunden werden konnten. Rodletzellen lieferten stets negative Ergebnisse (Abb. 22).

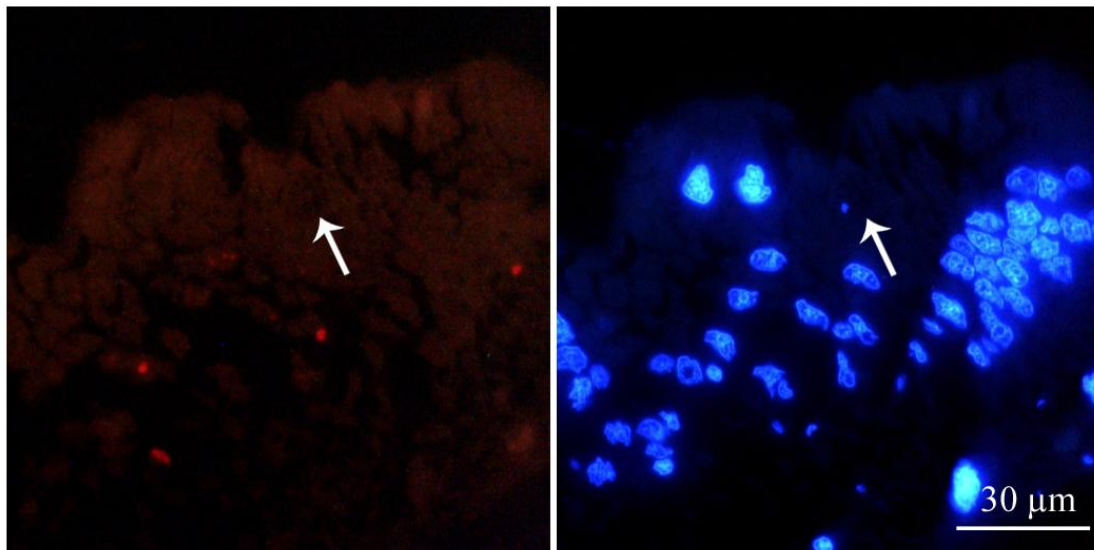


Abb.22: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von Ubiquitin (rote Fluoreszenz) in der Gallenblase von *C. auratus*. Die Rodletzelle im hochprismatischen Epithel zeigt keine Markierung mit dem Antikörper (Pfeil). Einige Signale (rote Fluoreszenz) sind in den Epithelzellen zu erkennen (A). Zur Gegenfärbung wurde der DNA-Farbstoff Dapi verwendet (B).

### 3.2.2. Zytoskelett Filamente

#### 3.2.2.1. $\alpha$ -Tubulin

Zur mikroskopischen Darstellung des intrazellulären Filamentgerüsts in Rodletzellen wurde bei indirekter Immunfluoreszenz ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen den  $\alpha$ -Strang von Tubulin und zur Detektion ein mit Alexa488 gekoppelter Sekundärantikörper herangezogen. Aufgrund der starken Signalintensität wurde auf die Verstärkungsmethode nach dem ABC Prinzip verzichtet.

In der Tunica mucosae epithelialis des Goldfischdarms zeichneten sich im Zytoplasma und zwischen den Zellkernen der Enterozyten faserige Elemente ab, die zwischen der Zellbasis an der Grenze zu Lamina propria und der Schleimhautoberfläche verliefen (Abb. 23).

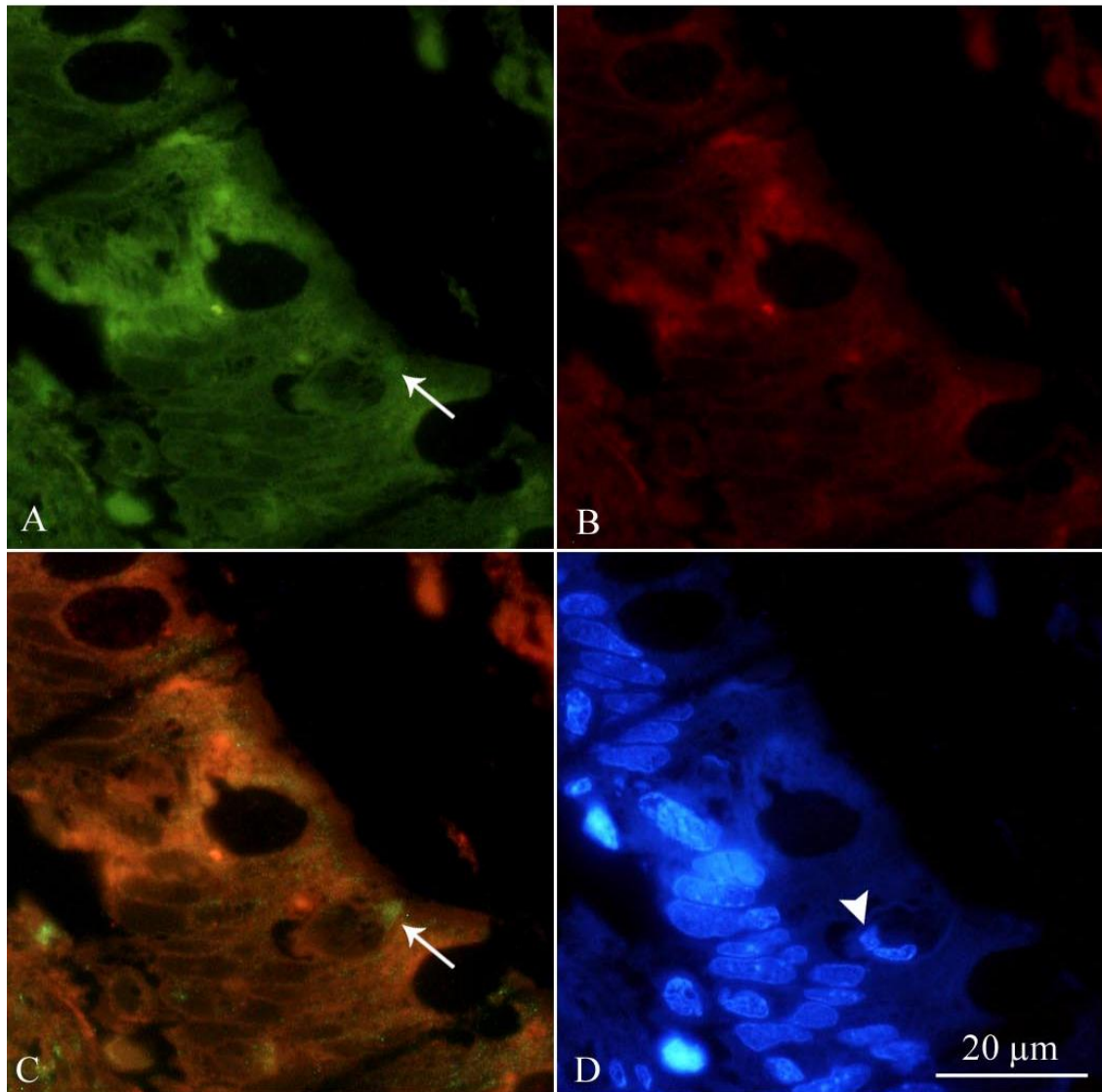


Abb.23: Mikrofotogramm mit immnuhistochemischer Darstellung von  $\alpha$ -Tubulin (grüne Fluoreszenz) im Darm von *C. auratus*. Eine Rodletzelle (Pfeile) in der Lamina epithelialis zeigt Markierungen im Zellinneren. Die reagierenden Filamente ziehen von der Zone des Nucleus zum apikalen Pol, wo es zu einer Verdichtung der Signale kommt (A & C). B zeigt die Anregung bei 510-560nm. Zur Gegenfärbung wurde das DNA-Fluorochrom Dapi verwendet. Der Zellkern der Rodletzelle (Pfeilkopf) liegt basal (D).

Der Bürstensaum der zahlreichen Mikrovilli war negativ. Ebenfalls ungefärbt blieben die Bereiche der Sekrettropfen der Becherzellen. Die Rodletzellen waren positiv. Im Längsschnitt wiesen sie Filamente auf, die sich zwischen dem unregelmäßig geformten Zellkern und dem apikal liegenden Zellpol spannten. In diesem lumennahen Bereich erkennt man ein Zusammenlaufen der Tubulinstränge an den apikalen Punkt der Kapsel (Abb. 23). Die Kapsel blieb immer ungefärbt (Abb. 23).

### 3.2.2.2. Vimentin

Um die fragwürdige Zugehörigkeit der Rodletzellen zu den Leukozyten zu überprüfen, wurden Immunmarkierungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Intermediärfilament Vimentin durchgeführt.

In humanen Herzschnitten zeigte sich eine starke positive Reaktion der endothelialen Zellen der Blutgefäße, aber auch das Endokard war kräftig gefärbt (Abb. 24). Ähnliche Signale konnten auch im Herzen von *C. auratus* vorgefunden werden, die endokardialen Gewebestränge leuchteten intensiv grün bei einer Lichtanregung von 450-490nm. Angelagerte Lymphozyten zeigten um den großen Zellkern ein kranzförmig kräftig markiertes Zytoplasma. In der humanen Haut waren die noch lebenden und differenzierten Keratinozyten des Stratum basale und Stratum spinosum auffällig markiert (Abb. 25).

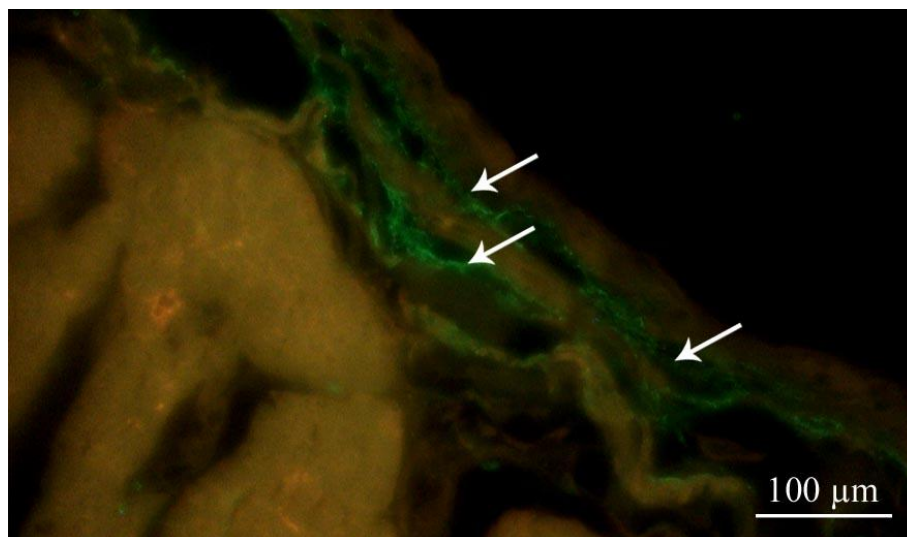


Abb.24: Positivkontrolle von Vimentin (grüne Fluoreszenz) in einem mikroskopischen Humanpräparat des Herzens. Epikardialen Strukturen (Pfeile) zeigen eine intensive Antikörpermarkierung.

Die Bereiche um die Zellkerne und auch der flache und dichtstehende Mikrovillisaum der intrahepatischen Gallengänge in der Fischleber waren leicht gefärbt. Besonders kräftige Signale waren um die in dieses Epithel eingewanderten Rodletzellen sichtbar. Allerdings zeigte sich, dass es sich dabei um Reaktionen der Gallenepithelzellen handelte und die fibrilläre Kapsel der Stäbchenzellen ungefärbt geblieben ist (Abb. 27). Im Darm waren die untersuchten Rodletzellen durchwegs negativ. Es gab diffuse Signale in den Enterozyten der Lamina epithelialis mucosae und vereinzelt kräftig leuchtendes Zytoplasma von Zellen in der Lamina propria. An der Grenze zwischen Submucosa und Muscularis zeigten sich neben wenigen Signalen in den glatten Darmmuskulzellen, Zellen mit sehr reaktiven Granula (Abb. 28).

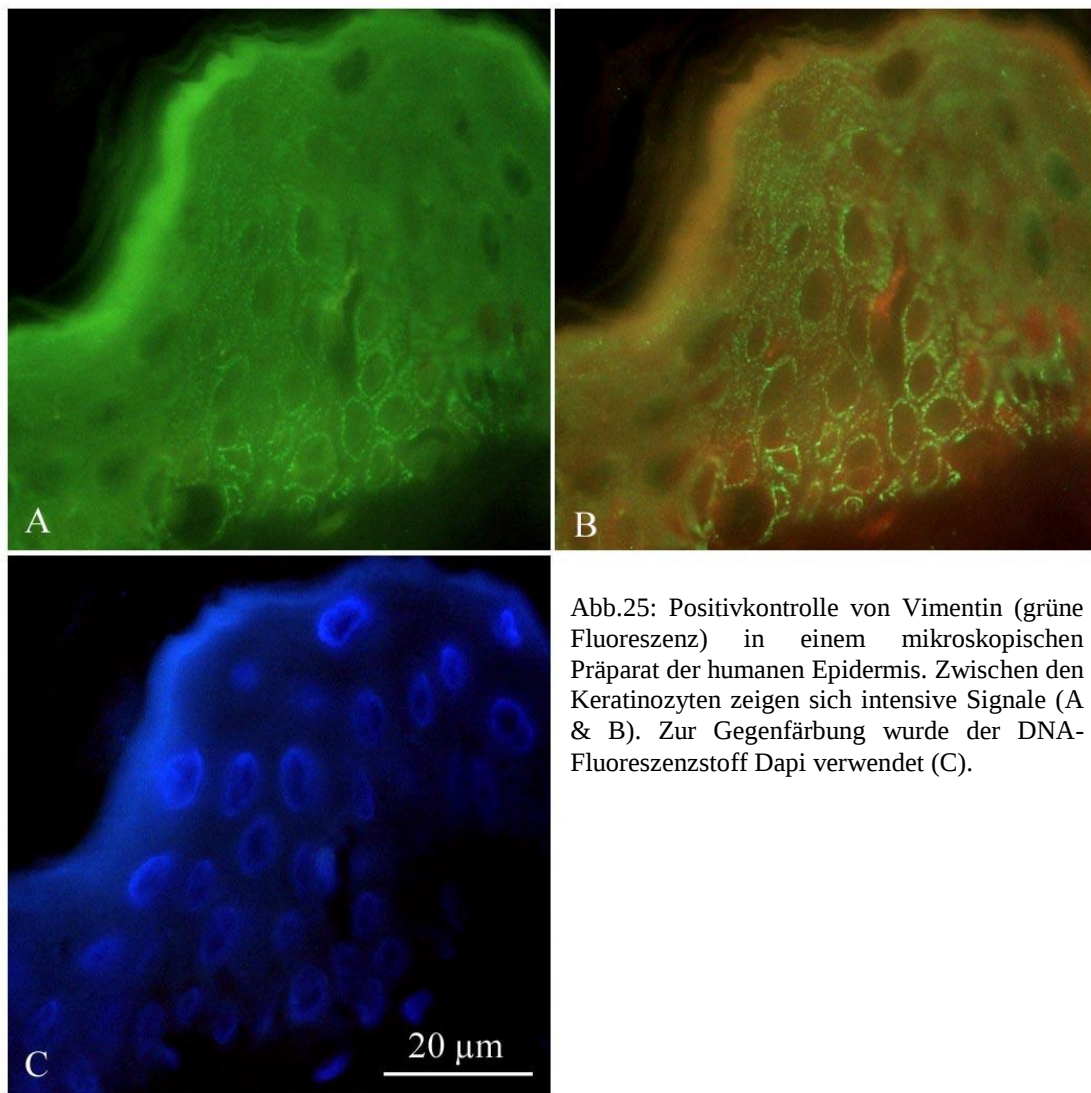


Abb.25: Positivkontrolle von Vimentin (grüne Fluoreszenz) in einem mikroskopischen Präparat der humanen Epidermis. Zwischen den Keratinozyten zeigen sich intensive Signale (A & B). Zur Gegenfärbung wurde der DNA-Fluoreszenzstoff Dapi verwendet (C).

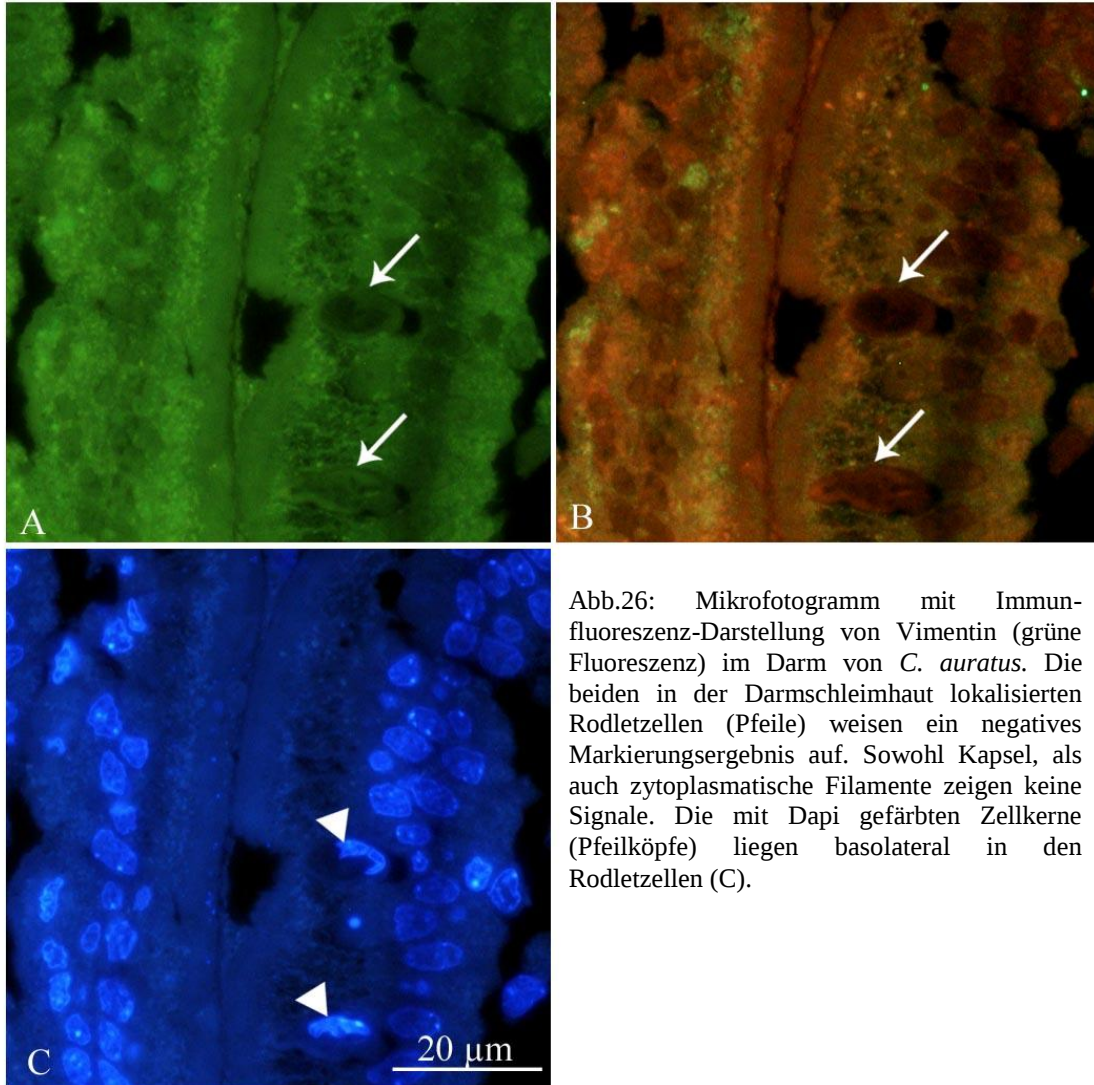


Abb.26: Mikrofotogramm mit Immunfluoreszenz-Darstellung von Vimentin (grüne Fluoreszenz) im Darm von *C. auratus*. Die beiden in der Darmschleimhaut lokalisierten Rodletzellen (Pfeile) weisen ein negatives Markierungsergebnis auf. Sowohl Kapsel, als auch zytoplasmatische Filamente zeigen keine Signale. Die mit Dapi gefärbten Zellkerne (Pfeilköpfe) liegen basolateral in den Rodletzellen (C).

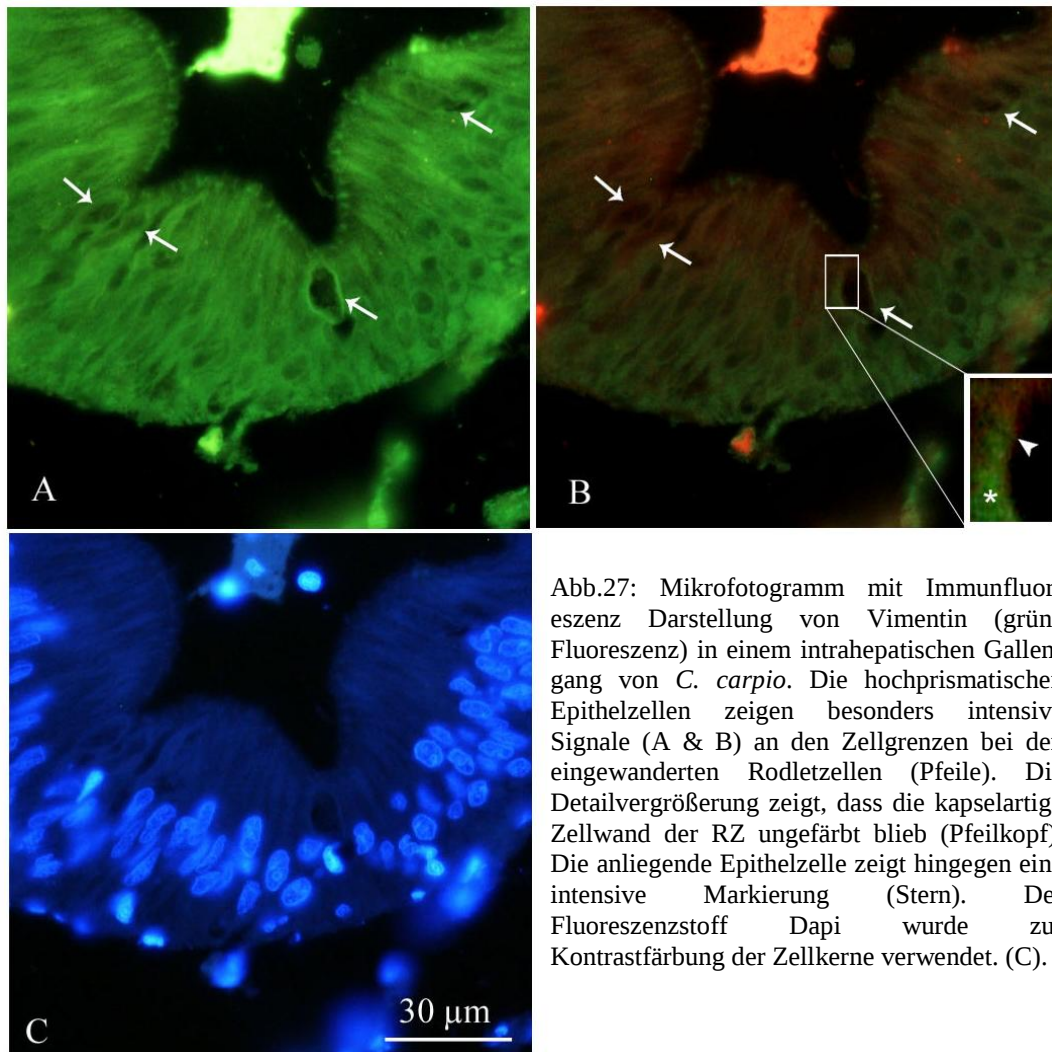


Abb.27: Mikrofotogramm mit Immunfluoreszenz Darstellung von Vimentin (grüne Fluoreszenz) in einem intrahepatischen Gallengang von *C. carpio*. Die hochprismatischen Epithelzellen zeigen besonders intensive Signale (A & B) an den Zellgrenzen bei den eingewanderten Rodletzellen (Pfeile). Die Detailvergrößerung zeigt, dass die kapselartige Zellwand der RZ ungefärbt blieb (Pfeilkopf). Die anliegende Epithelzelle zeigt hingegen eine intensive Markierung (Stern). Der Fluoreszenzstoff Dapi wurde zur Kontrastfärbung der Zellkerne verwendet. (C).

### 3.2.2.3. Aktin

Mehrere Antikörper wurden für den Nachweis des Mikrofilaments Aktin herangezogen. Der polyklonale Antikörper zeigte im humanen Herzpräparat nur geringe Reaktionen der Herzmuskelfasern. Die Querstreifung der Myofibrillen, die durch eine regelmäßige Anordnung von Aktin- und Myosin-Filamente bedingt ist, konnte nicht dargestellt werden.

In den untersuchten Fischgeweben färbten sich Aktinfasern mittels indirekter Immunfluoreszenz nur schwach an. Die Tunica muscularis des Darmes war nur zum Teil markiert. Das Zytoplasma einiger Zellen der Lamina propria war intensiver angefärbt. Saum- und Becherzellen zeigten zumeist ein negatives Färbergebnis (Abb. 28).

Bei unzureichendem Blockieren der unspezifischen und reaktiven Gewebsantigenen, wurden intensive Signale in den Sekrettropfen der Becherzellen dokumentiert, die bei längerer Inkubationsdauer oder höherem Rinderserumgehalt minimiert werden konnten. Der Mikrovillisaum der Enterozyten war sowohl negativ als auch schwach-positiv gefärbt. Die Rodletzellen zeigten nur geringe Reaktivität. In Längsrichtung konnten im Zellplasma nebelhafte Fluoreszenzen unterschiedlicher Leuchtstärke dokumentiert werden, die allerdings nicht in allen Stäbchenzellen auftraten (Abb. 29 & 30).

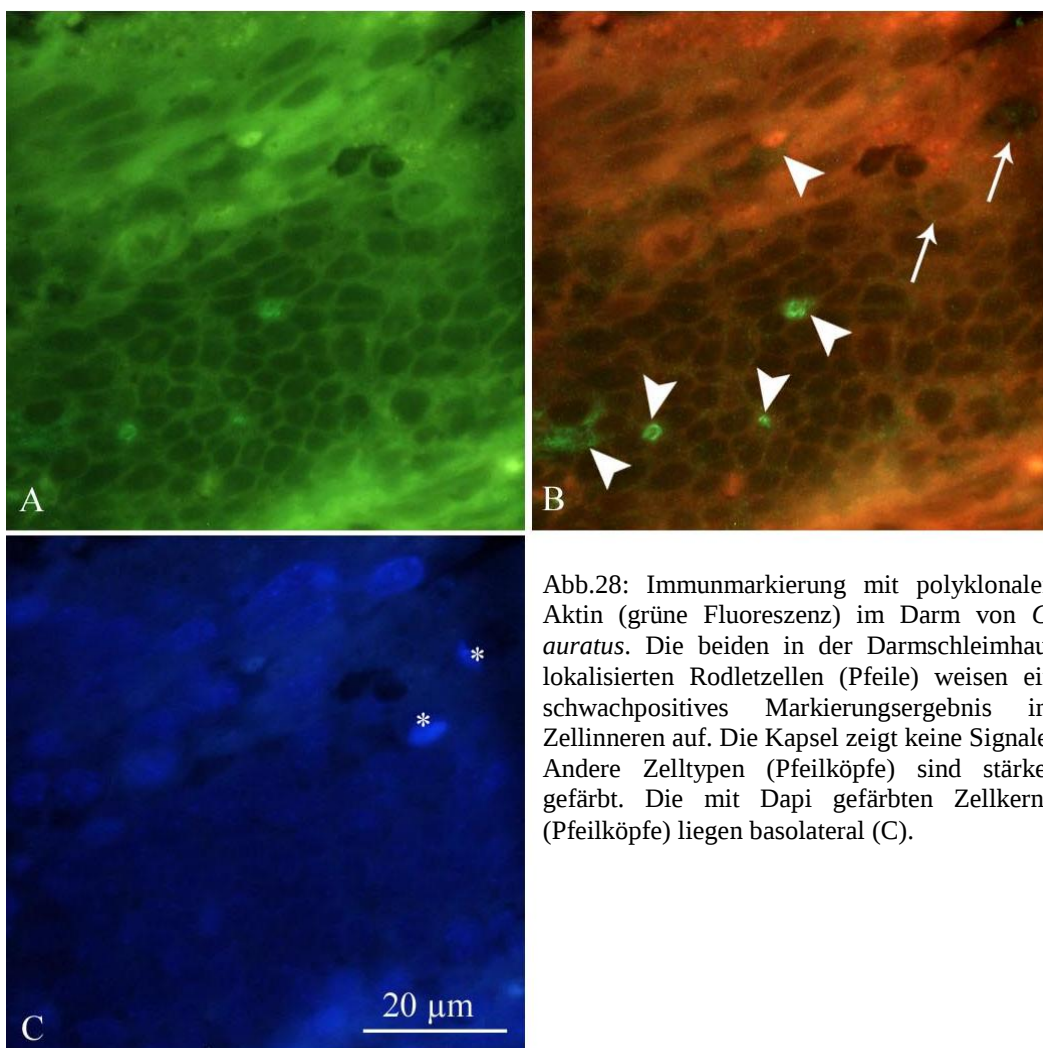


Abb.28: Immunmarkierung mit polyklonales Aktin (grüne Fluoreszenz) im Darm von *C. auratus*. Die beiden in der Darmschleimhaut lokalisierten Rodletzellen (Pfeile) weisen ein schwachpositives Markierungsergebnis im Zellinneren auf. Die Kapsel zeigt keine Signale. Andere Zelltypen (Pfeilköpfe) sind stärker gefärbt. Die mit Dapi gefärbten Zellkerne (Pfeilköpfe) liegen basolateral (C).

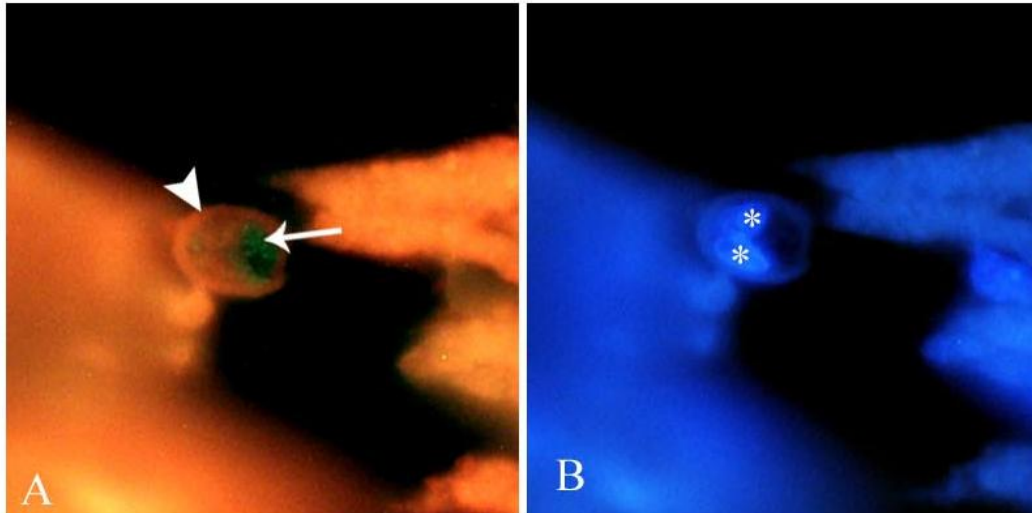


Abb.29: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von polyklonalen Aktin (grüne Fluoreszenz) im Darm von *C. auratus*. Im Zellinneren einer Rodletzelle sind schwach-positive Fluoreszenzen (Pfeil) zu erkennen. Die Kapsel (Pfeilkopf) ist negativ gefärbt (A). Der Zellkern (Sterne) ist segmentiert und liegt basal (B).

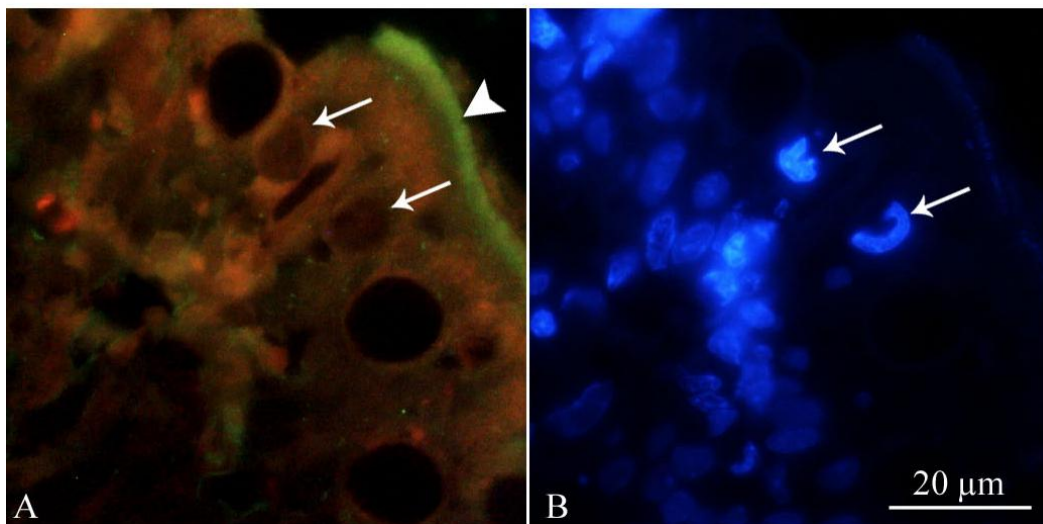


Abb.30: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von polyklonalen Anti-Aktin (grüne Fluoreszenz) im Darm von *C. auratus*. Der Mikrovillisaum (Pfeilköpfe) ist intensiv gefärbt. Die Kapselstruktur und das Zellinnere der Rodletzellen (Pfeil) zeigen negative Markierungsergebnisse (A). Die mit Dapi gefärbten Zellkerne (Pfeile) liegen basolateral (B).

Die Bereiche der Zellkerne waren allerdings immer ungefärbt und somit negativ. Die filamentöse Kapsel zeigte unabhängig jeglicher Vorbehandlung (Antigendemaskierungen) keine Immunmarkierung (Abb. 28, 29, 30 & 31). Keine Intensivierung der Signale konnte mit der ABC-Methode vollbracht werden. Sie führte zu identen Ergebnissen, wie sie bereits für die indirekte Immunfluoreszenz beschrieben wurden.

Im Herz von *C. auratus* konnten intensive Markierungen der Muskelzellen beobachtet werden (Abb. 31).

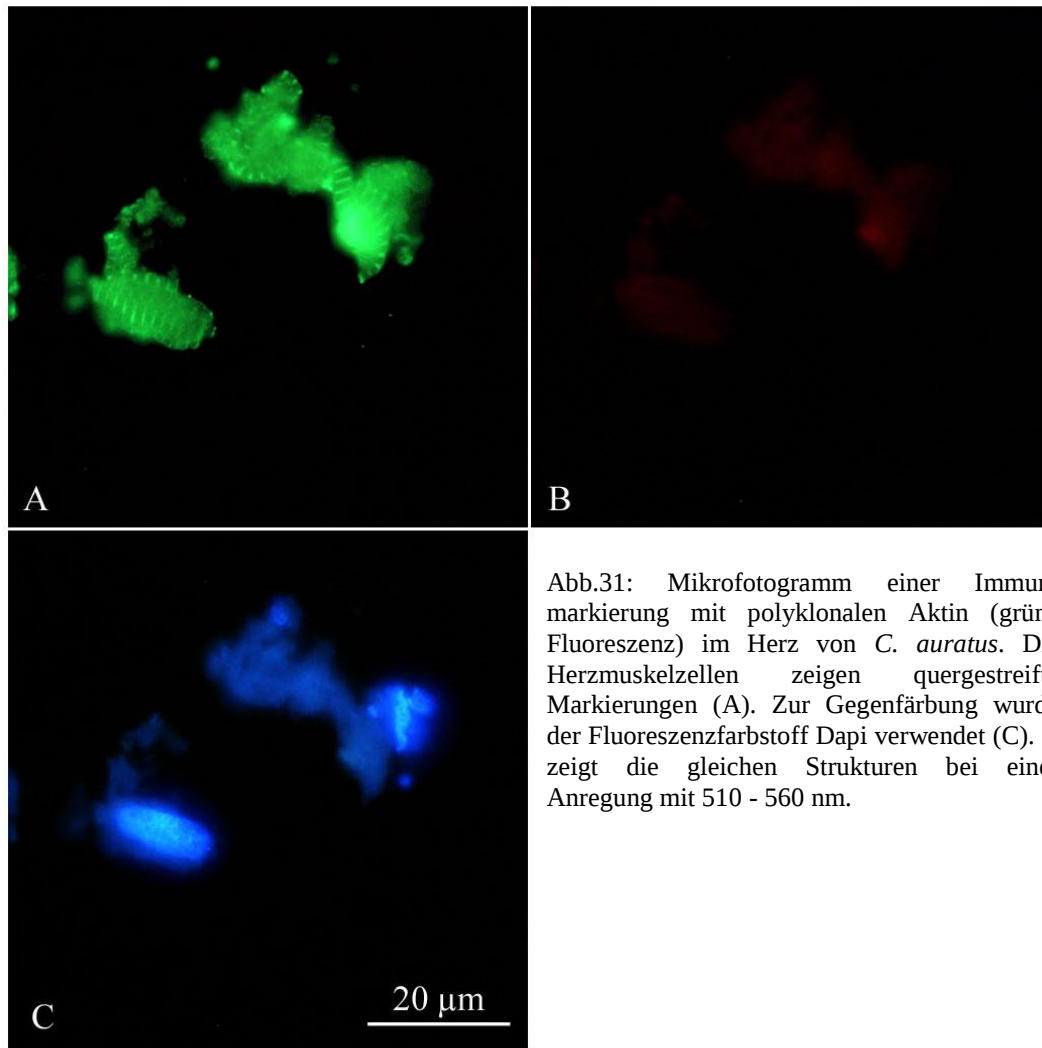


Abb.31: Mikrofotogramm einer Immunmarkierung mit polyklonalen Aktin (grüne Fluoreszenz) im Herz von *C. auratus*. Die Herzmuskelzellen zeigen quergestreifte Markierungen (A). Zur Gegenfärbung wurde der Fluoreszenzfarbstoff Dapi verwendet (C). B zeigt die gleichen Strukturen bei einer Anregung mit 510 - 560 nm.

In der Gallenblase von *C. auratus* waren die Muskelschichten durchdringend grün mit markiert. Das hochprismatische Epithel zeigte sich wie die zwischen diese Epithelzellen migrierten Stäbchenzellen ungefärbt. Auch die für RZ charakterisierenden Strukturen, nämlich die filamentöse, unter dem Plasmalemma liegende Kapsel und die zweiteiligen Rodlets waren ungefärbt. In Herzschnitten konnte anders als bei den untersuchten humanen Präparaten, die Querstreifung der Myozyten deutlich dokumentiert werden. Intensivere Ergebnisse lieferten die indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonal Anti-Aktin (Amöba). Die muskulären Schichten der Gallenblase waren intensiv markiert. Der Antikörper lagerte sich an Filamente im Zytoplasma der glatten Muskelzellen (Abb. 32 & 33).

Im Epithel der Gallenblase waren die Bereiche um die Nuklei der hochprismatischen Schleimhautzellen kräftig grün gefärbt. Mit gleicher Intensität leuchtete der niedrige Bürstensaum. Die zwischen den Epithelzellen positionierten Rodletzellen zeigten eine positive Immunmarkierung. Die Kapsel war, wie bereits für den polyklonalen Anti-Aktin Antikörper beschrieben, nicht gefärbt. Indes zeigte sich das Zytoplasma durch viele Signale markiert, die nur in den Bereichen der Stäbchen und des Zellkerns fehlten (Abb. 32).

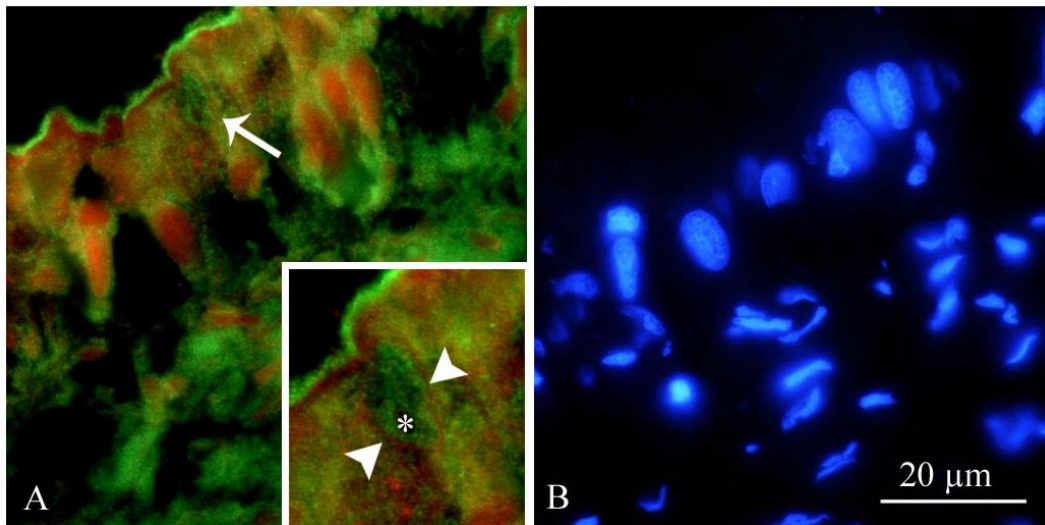


Abb.32: Mikrofotogramm mit immunzytochemischer Darstellung von Amöba-Aktin (grüne Fluoreszenz) in der Gallenblase von *C. auratus*. Eine Rodletzelle (Pfeil) zeigt positive zytoplasmatische Reaktion (A). Zur Gegenfärbung wurde der Fluoreszenzfarbstoff Dapi verwendet (B). C zeigt die Detailvergrößerung der Rodletzelle aus A. Das Zytoplasma ist von dichten Signalen erfüllt. Die Bereiche der Rodlets (Stern) zeigen keine Färbung. Die Kapsel (Pfeilköpfe) reagiert ebenfalls negativ. Der dichte Mikrovillisaum (MV) ist kräftig gefärbt.

Bei Längsschnitten durch die gesamte Zelllänge konnte im apikalen Zellpol eine intensivere Markierung mit Anti-Amöba Aktin festgestellt werden (Abb. 33). Waren die Rodletzellen quer getroffen, waren die Ergebnisse ähnlich: nur die Bereiche der Kapsel, der Zellkörperchen und des Zellkerns waren negativ gefärbt. Das restliche Zytoplasma wiesen intensiv leuchtende Signale auf. In Darmschnitten waren die Signale weniger deutlich von anderen autofluoreszierenden Strukturen abgrenzbar. Allerdings war auch in diesem Organ der Mikrovillisaum fluoreszenzstark markiert. Signale anderer Zellen, z.B.: Saumzellen und Zelltypen der Lamina propria, zeigten nur geringe Färbungen. Rodletzellen führten zu negativen Ergebnissen. Sowohl Filamentkapsel als auch das Zellplasma waren nicht gefärbt.

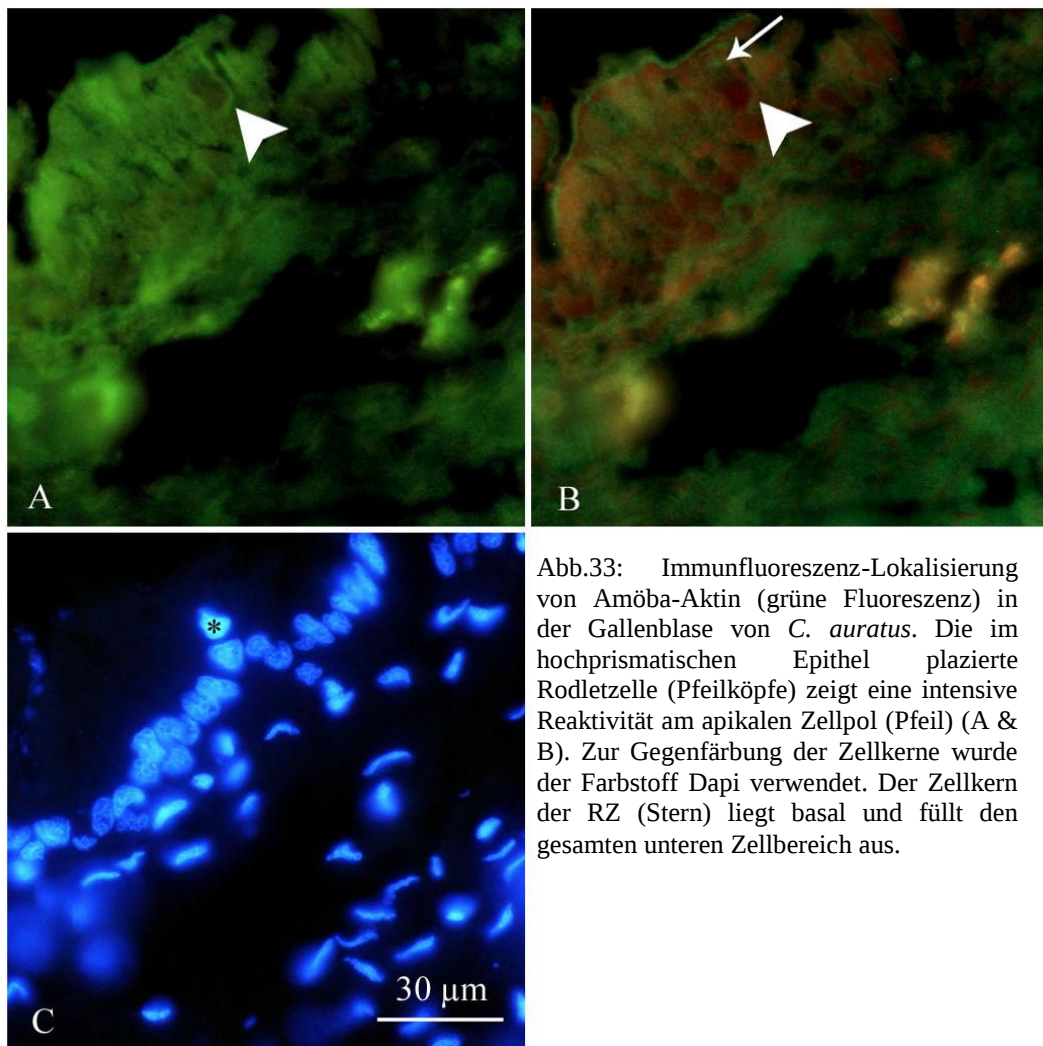


Abb.33: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von Amöba-Aktin (grüne Fluoreszenz) in der Gallenblase von *C. auratus*. Die im hochprismatischen Epithel platzierte Rodletzelle (Pfeilköpfe) zeigt eine intensive Reaktivität am apikalen Zellpol (Pfeil) (A & B). Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde der Farbstoff Dapi verwendet. Der Zellkern der RZ (Stern) liegt basal und füllt den gesamten unteren Zellbereich aus.

Mithilfe des Antikörpers Anti-Smooth Aktin konnten im Fischgewebe keine positiven Signale beobachtet werden, wo hingegen die mitgeführten humanen Proben intensive Fluoreszenzen zeigten.

#### 3.2.2.4. Myosin

Mithilfe von zwei verschiedenen Antikörpern gegen das Mikrofilament Myosin, sollte das Vorkommen dieses Moleküls in der Kapsel von Rodletzellen geprüft werden. Für den pAb Anti Myosin (skeletal & smooth) wurde sowohl die IIF angewandt, als auch nach der ABC-Methode gearbeitet. Erstere Technik führte in Darmschnitten von *C. auratus* zu schwachen Fluoreszenzergebnissen. Die Rodletzellen, die in diesem Organ auftraten, wiesen diffuse Signale im Zellinneren auf (Abb. 34 & 35). Die gewünschte Verstärkung mit der ABC-Methode konnte nicht beobachtet werden.

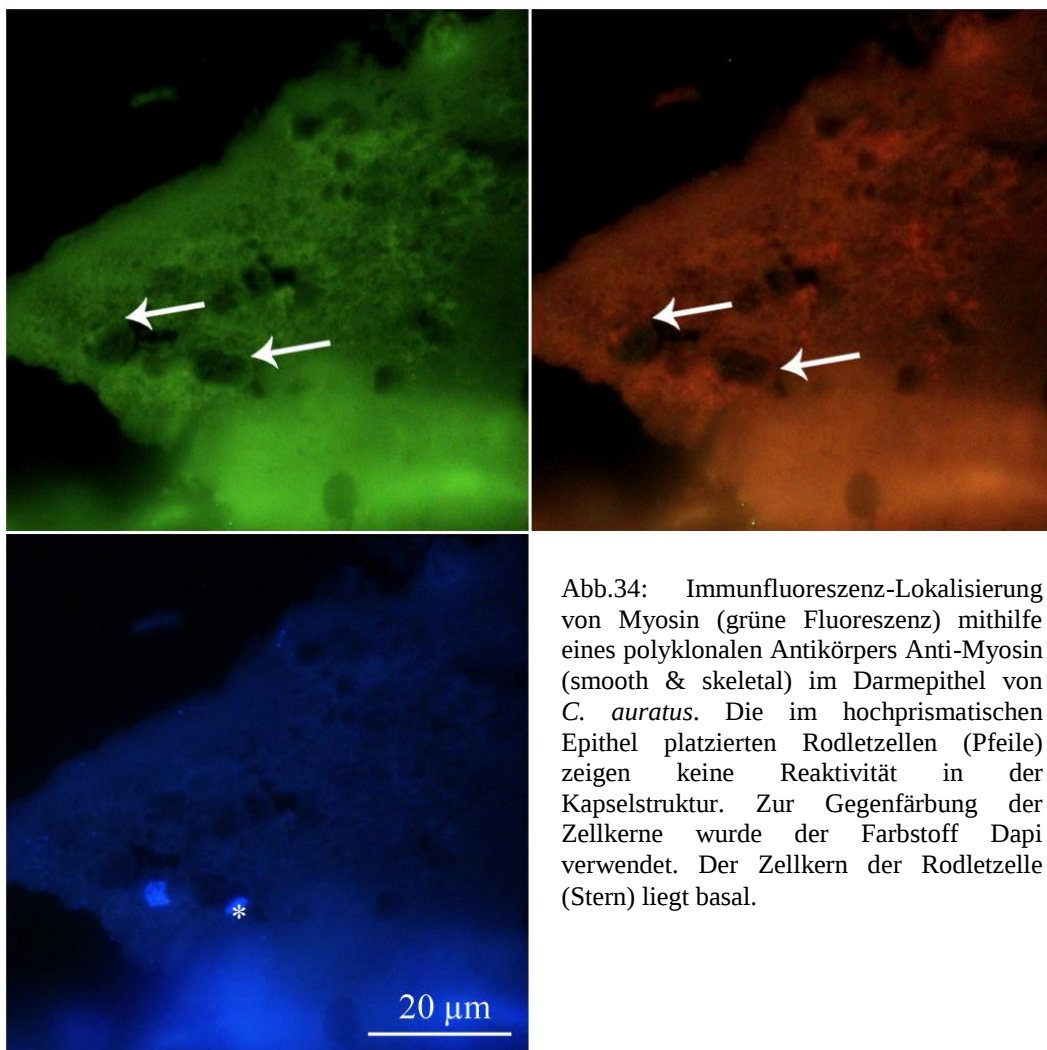


Abb.34: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von Myosin (grüne Fluoreszenz) mithilfe eines polyklonalen Antikörpers Anti-Myosin (smooth & skeletal) im Darmepithel von *C. auratus*. Die im hochprismatischen Epithel platzierten Rodletzellen (Pfeile) zeigen keine Reaktivität in der Kapselstruktur. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde der Farbstoff Dapi verwendet. Der Zellkern der Rodletzelle (Stern) liegt basal.

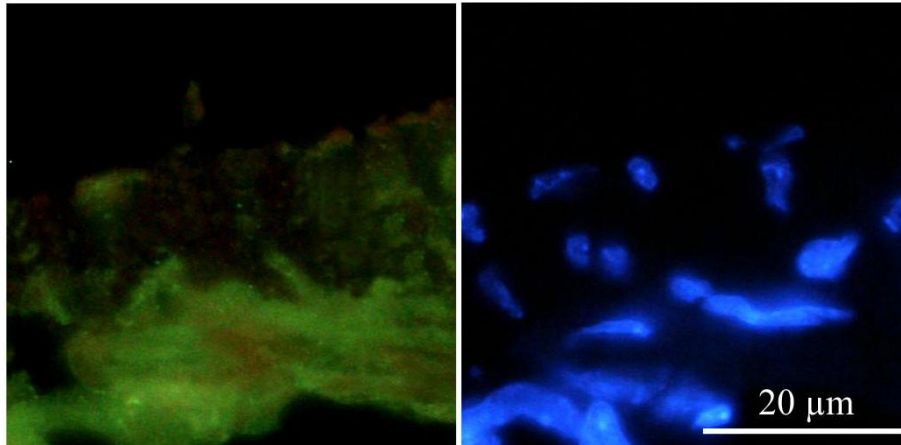


Abb.35: Positivkontrolle von pAb Myosin (grüne Fluoreszenz) in einem mikroskopischen Präparat des Darmes von *C. carpio*. Die rechte Abbildung zeigt die Gegenfärbung der Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Dapi.

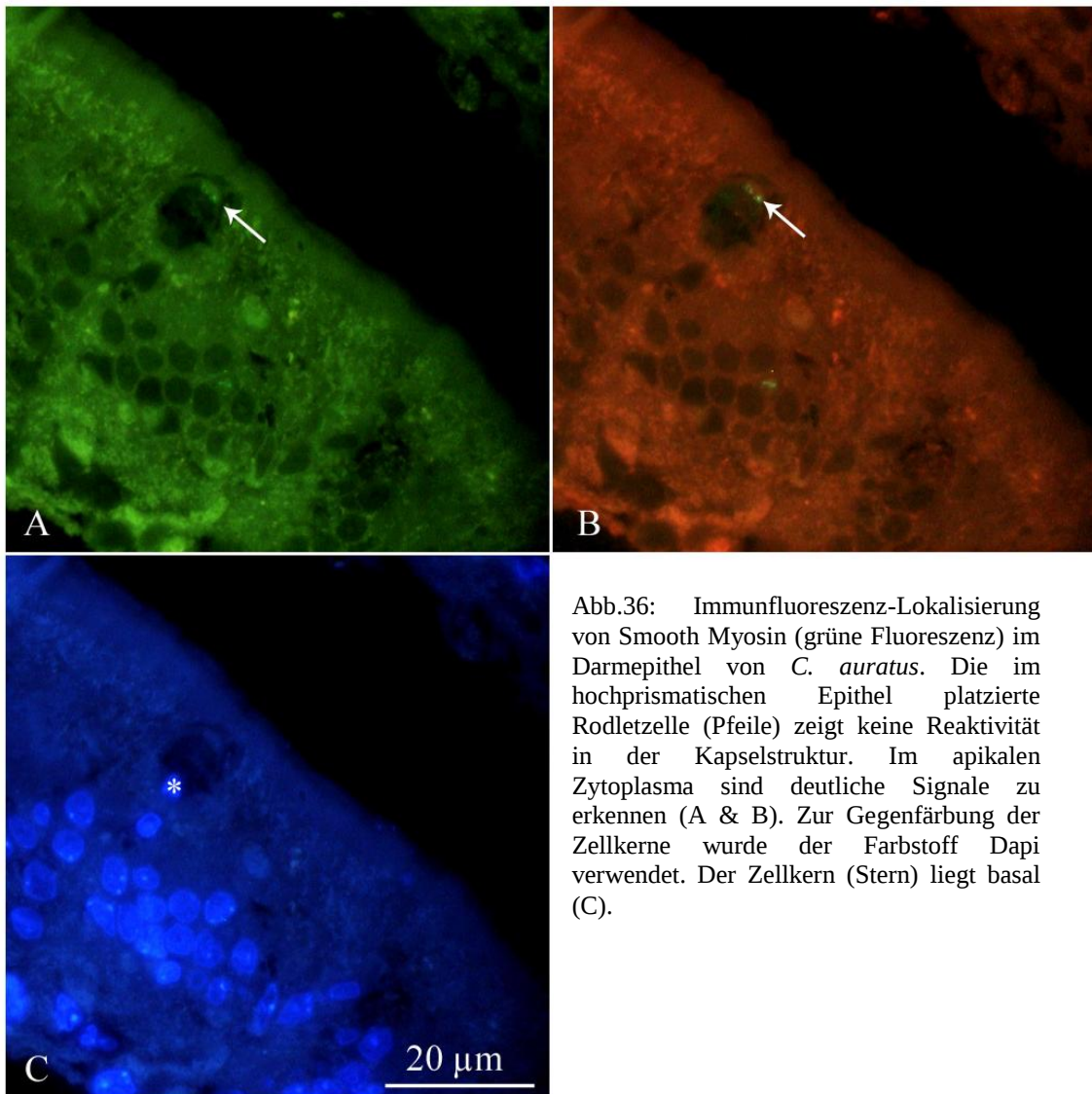


Abb.36: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von Smooth Myosin (grüne Fluoreszenz) im Darmepithel von *C. auratus*. Die im hochprismatischen Epithel platzierte Rodletzelle (Pfeile) zeigt keine Reaktivität in der Kapselstruktur. Im apikalen Zytoplasma sind deutliche Signale zu erkennen (A & B). Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde der Farbstoff Dapi verwendet. Der Zellkern (Stern) liegt basal (C).

Intensivere Fluoreszenzen konnten bei indirekter Immunfluoreszenz mit Anti-Smooth Myosin beobachtet werden. Die Kapselstruktur aller untersuchten Rodletzellen verhielt sich negativ. Nur im Zytoplasma konnten Signale gefunden werden. Diese durchspannten die gesamte Zelle, waren aber zum apikalen Pol konzentriert (Abb. 37 & 38). Zellkerne waren nicht gefärbt.

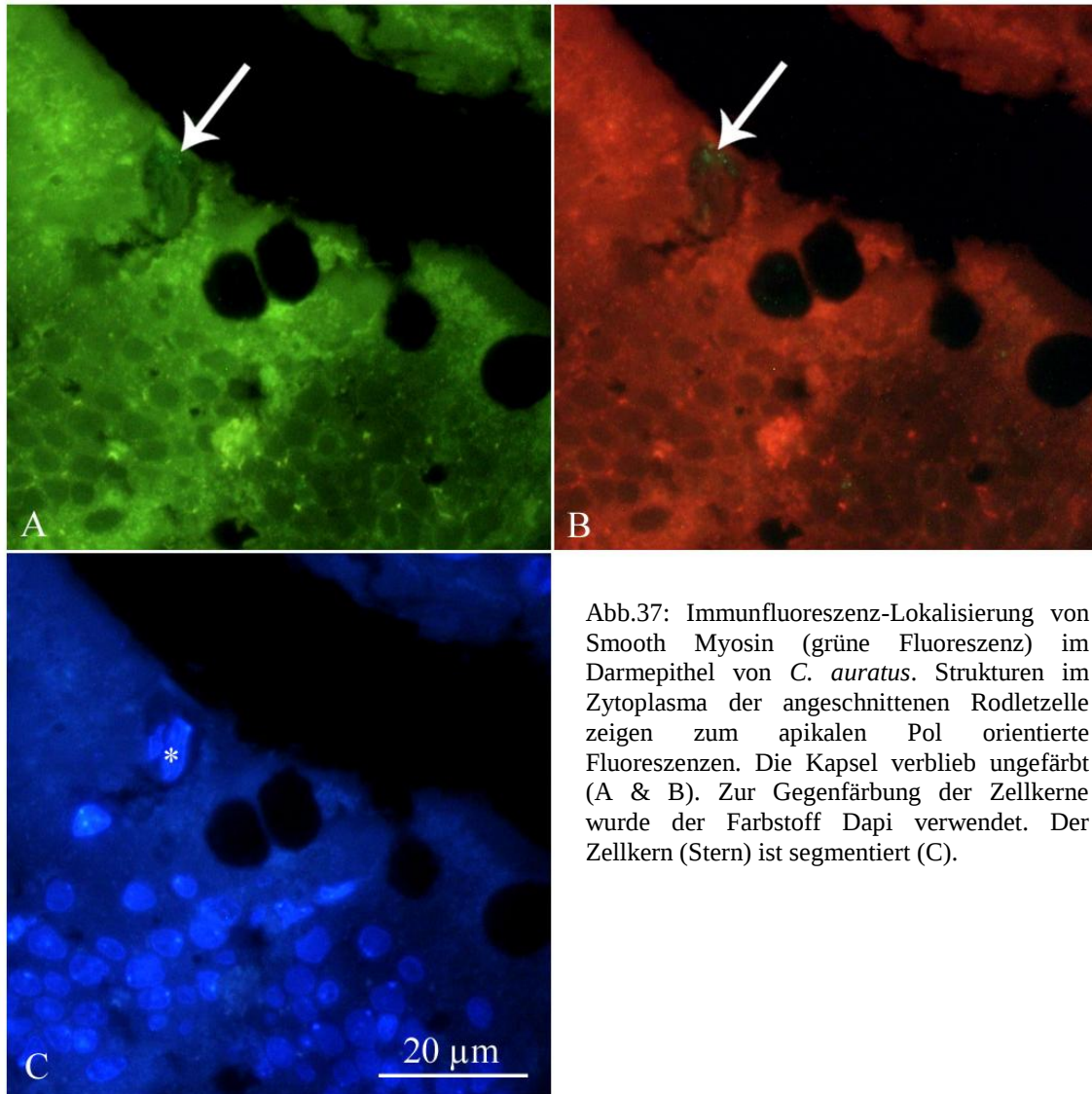


Abb.37: Immunfluoreszenz-Lokalisierung von Smooth Myosin (grüne Fluoreszenz) im Darmepithel von *C. auratus*. Strukturen im Zytoplasma der angeschnittenen Rodletzelle zeigen zum apikalen Pol orientierte Fluoreszenzen. Die Kapsel verblieb ungefärbt (A & B). Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde der Farbstoff Dapi verwendet. Der Zellkern (Stern) ist segmentiert (C).

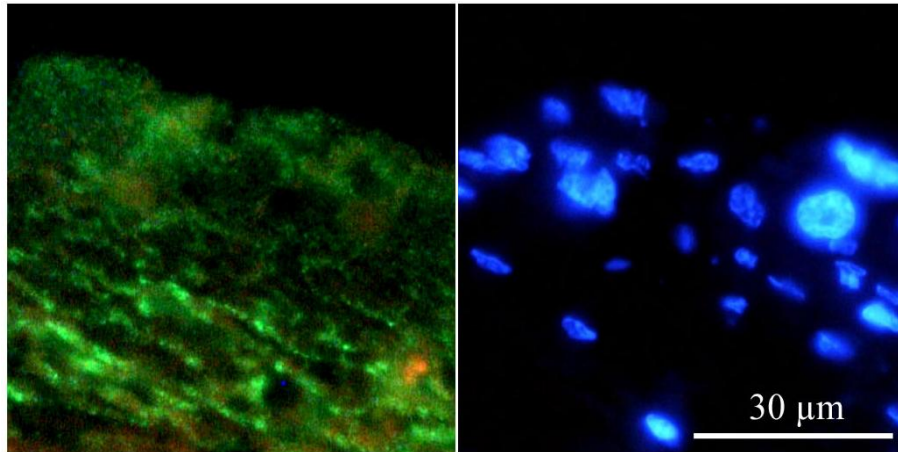


Abb.38: Positivkontrolle von smooth Myosin (grüne Fluoreszenz) in einem mikroskopischen Präparat der Gallenblase von *C. auratus*. Die rechte Abbildung zeigt die Gegenfärbung der Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Dapi.

### 3.2.3. Phalloidininfärbung zum indirekten Aktinnachweis

In Darmschnitten von *C. auratus* führte die Behandlung mit Phalloidin-Fitc zu einem gleichmäßigen Anfärben der spindelförmigen glatten Muskelzellen. In direkter Nachbarschaft konnten Zellen mit intensiv reagierten Granula gefunden werden (Abb. 39).

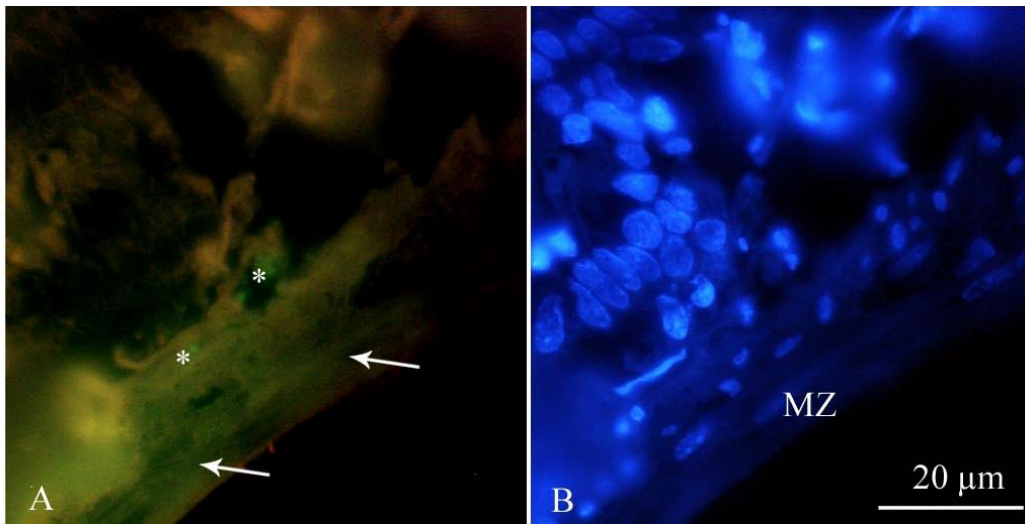


Abb.39: Phalloidin-Fitc Färbung (grüne Fluoreszenz) zur Darstellung von Aktin im Darm von *C. auratus*. Die glatten Muskelzellen (Pfeile) der Tunica muscularis zeigen eine zytoplasmatische Färbung. Direkt über dieser Schicht liegende Zellen (Stern) weisen eine intensive Granulafärbung mit Phalloidin auf (A). Zur Gegenfärbung wurde Dapi verwendet. Die Zellkerne der Myozyten (MZ) sind zigarrenförmig.

Die fibrilläre Umhüllung der Rodletzellen verhielt sich wie alle anderen Zellbestandteile negativ (Abb.41). Nur eine einzige Zelle zeigte eine positive Reaktion der Kapsel (Abb. 40). In der Gallenblase wiesen die Muskelschichten intensive Signale auf, die allerdings nicht bis in die

Schleimhautschichten hinaufreichten. Die Zellstrukturen wie fibrilläre Umhüllung, Rodlets und Zytoplasma der Rodletzellen führten zu negativen Färbeergebnissen (Abb. 42).

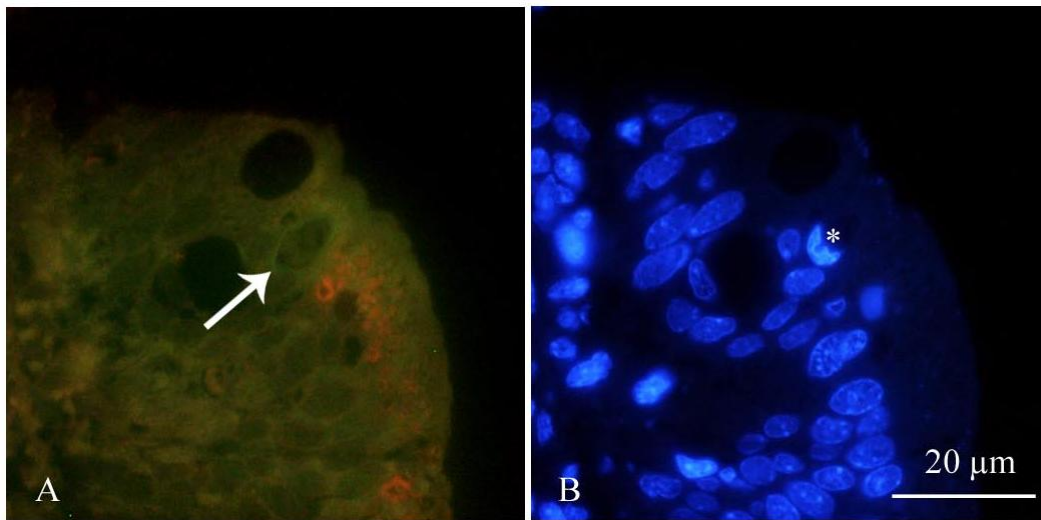


Abb.40: Phalloidin-Fitc Färbung (grüne Fluoreszenz) zum indirekten Nachweis von Aktin im Darm von *C. auratus*. In der Lamina epithelialis platzierte Rodletzelle (Pfeil) mit positiv reagierender Kapsel (A). Der mit Dapi gefärbte, basal liegende Zellkern (Stern) zeigt typische unregelmäßige Form (B).

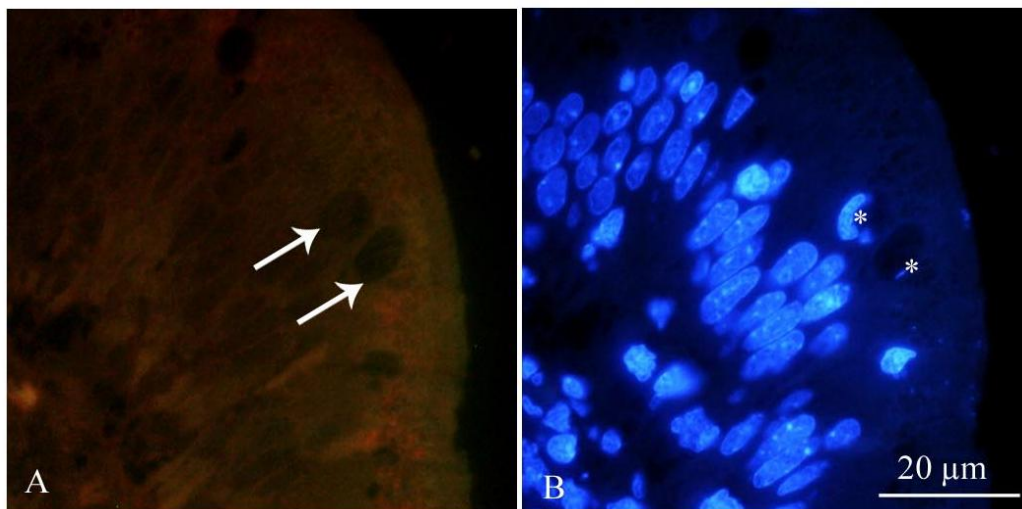


Abb.41: Färbung mit Phalloidin-Fitc (grüne Fluoreszenz) zum indirekten Nachweis von Aktin im Darm von *C. auratus*. Zwei in der Lamina epithelialis gefundene Rodletzellen (Pfeile) mit typisch negativ markierter Kapsel (A). Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Dapi verwendet. Die Nuclei der Rodletzellen (Sterne) liegen basolateral im Zytoplasma (B).

Im Herz waren diese Zellen sehr unterschiedlich gefärbt. Im gleichen mikroskopischen Schnitt konnten Rodletzellen mit sowohl positiv als auch negativ reagierende Filamentkapseln gefunden werden. Manche hatten daneben diffuse Signale im gesamten Zellinneren, wobei auch die Bereiche der Rodlets markiert waren. Andere zeigten im Zytoplasma keine Reaktionen (Abb. 44, 45 & 46). Die Herzmyozyten zeigten filamentöse Immunmarkierungen, die allerdings keine Querstreifung aufwiesen (Abb. 43).

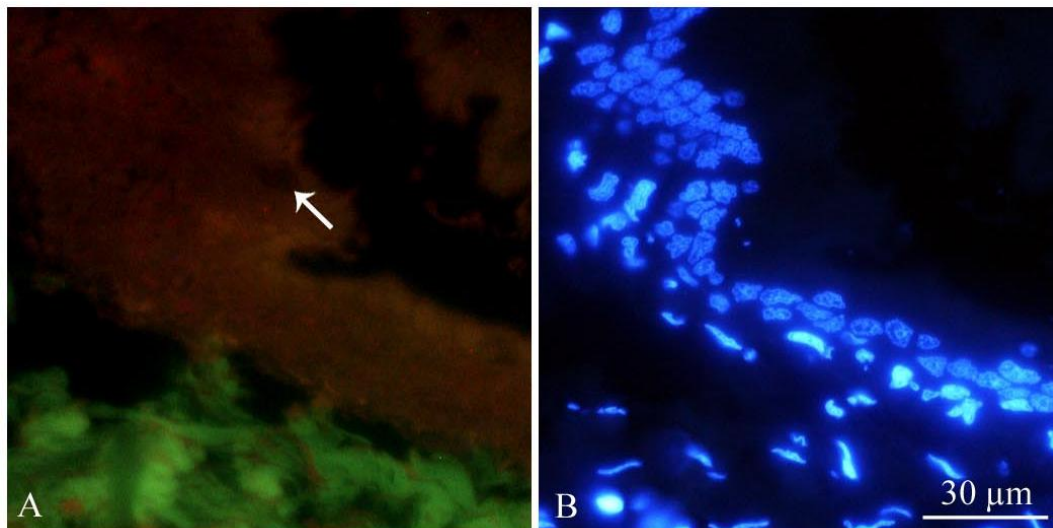


Abb.42: Phalloidin-Fitc Färbung (grüne Fluoreszenz) zum indirekten Nachweis von Aktin in der Gallenblase von *C. auratus*. Die Muskelschichten der Vesica fellea zeigen eine intensive Markierung mit dem Fluoreszenzstoff. Im hochprismatischen Epithel ist eine nicht gefärbte Rodletzelle (Pfeil) zu erkennen (A). Zur Gegenfärbung wurde der DNA-Fluoreszenzstoff Dapi verwendet (B).

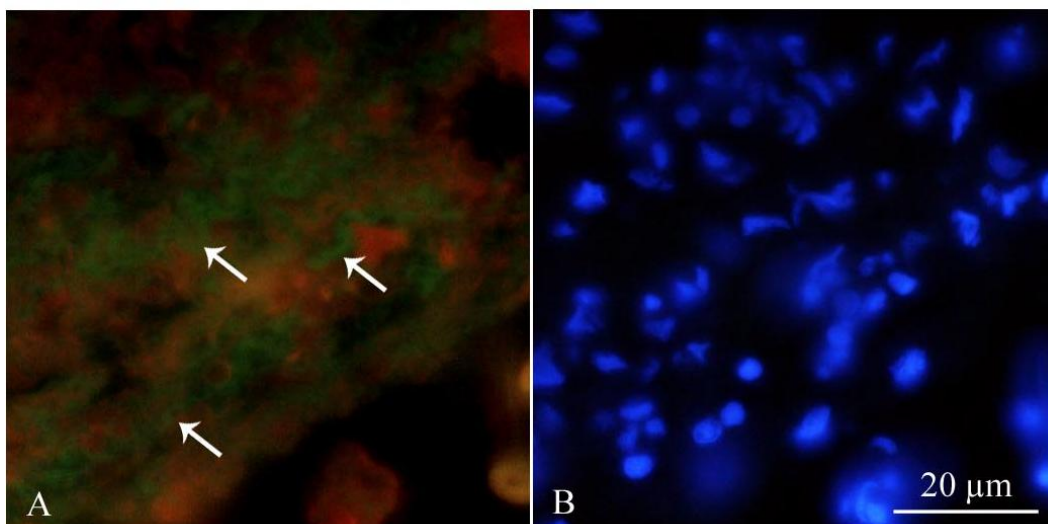


Abb.43: Indirekter Aktinnachweis mit Phalloidin-Fitc (grüne Fluoreszenz) im Herz von *C. auratus*. Die glatten Herzmyozyten (Pfeile) waren markiert (A). Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Dapi verwendet (B).

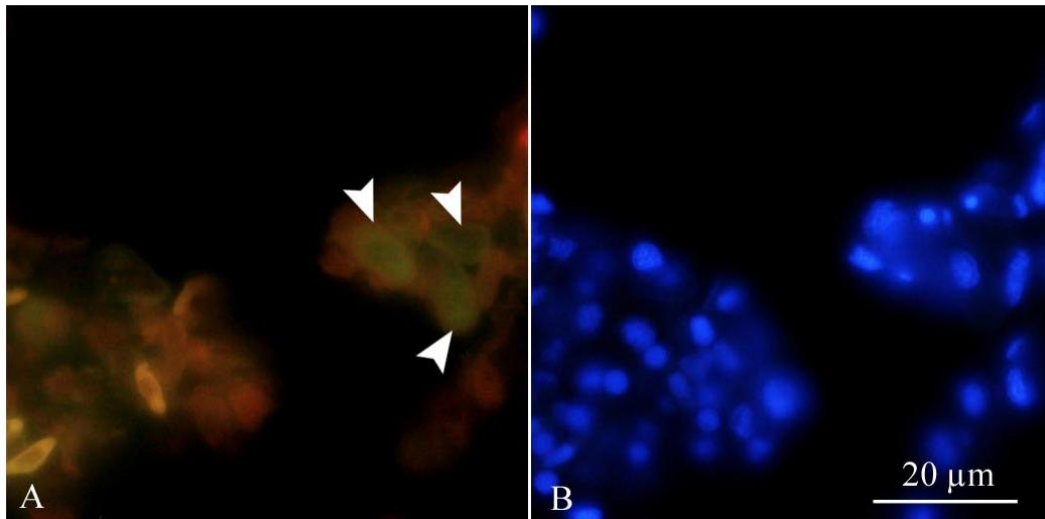


Abb.44: Indirekter Aktinnachweis mit Phalloidin-Fitc (grüne Fluoreszenz) im Herz von *C. auratus*. Die Rodletzellen (Pfeilköpfe) zeigen ein schwach markiertes Zytoplasma und negativ gefärbte Kapseln (A). Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Dapi verwendet (B).

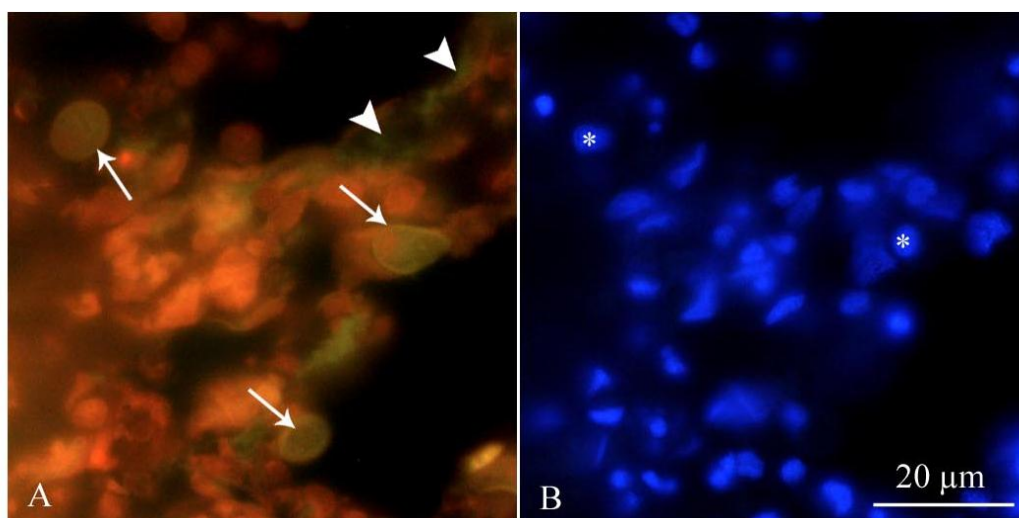


Abb.45: Phalloidin-Fitc Färbung (grüne Fluoreszenz) zur Darstellung des Mikrofilaments Aktin im Herz von *C. auratus*. Die Kapseln der Rodletzellen (Pfeile) sind negativ gefärbt. Ihr Zytoplasma zeigt schwach-positive Fluoreszenzen (A). Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Dapi verwendet. Zwei Zellkerne der Rodletzellen (Sterne) sind sichtbar (B).

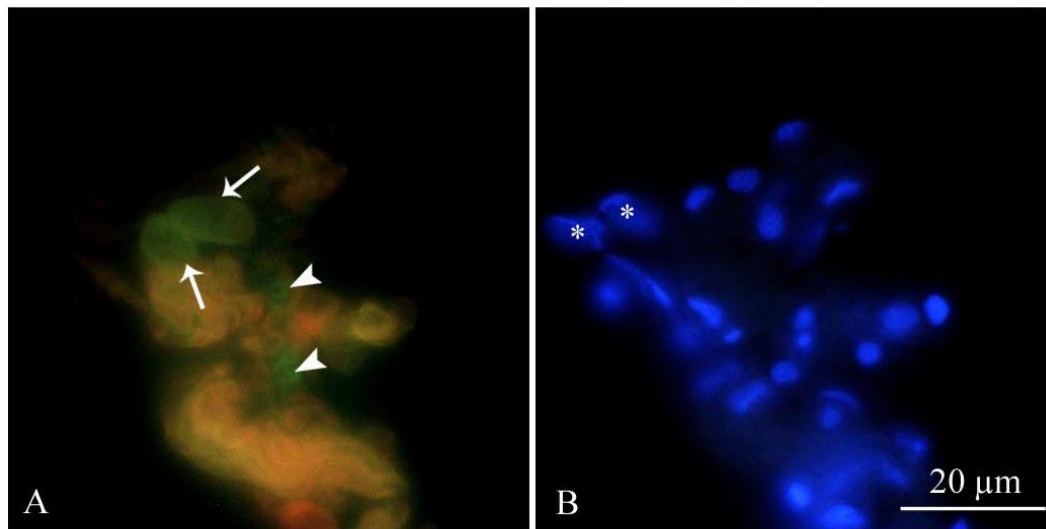


Abb.46: Phalloidin-Fitc Färbung (grüne Fluoreszenz) zum indirekten Aktinnachweis im Herz von *C. auratus*. Die Kapseln der Rodletzellen (Pfeile) zeigen ein positives Färbeverhalten. Ihr Zytoplasma zeigt schwach-positive Fluoreszenzen. Einige Myozyten (Pfeilköpfe) sind in gleicher Fluoreszenzstärke markiert (A). Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Dapi verwendet. Die Zellkerne der Rodletzellen (Sterne) sind sichtbar (B).

### 3.3. Histologische Untersuchung

Die Gewebe und Organe der vier untersuchten Karpfenartigen zeigten große Unterschiede im Hinblick auf die Häufigkeit und das Vorkommen der gesuchten Rodletzellen. Für aussagekräftige Beurteilungen der typischen RZ Verteilungen bei Cyprinidae, wurden zu wenige Exemplare untersucht. Die histologischen Untersuchungen sollen nur Momentaufnahmen einzelner Fischindividuen und deren untersuchten Organe darstellen und auf keinen Fall als ein generelles Zustandsbild angesehen werden.

#### 3.3.1. Leber und Gallenblase

Die Leber wies z.T. eine geringgradige bis mittelgradige Verfettung auf. Die Zellwände und Zellkerne der Hepatozyten zeigten sich in verschiedenen Graden des Untergangs bis hin zur Nekrose (Abb. 47 & 48).

Zwischen Pigmentmakrophagenzentren wurden vereinzelt Rodletzellen gefunden (Abb. 47). Auch um die Endothelien größerer Blutgefäße, die nicht von Pankreasgewebe umhüllt waren, wurden wenige dieser Zellen gefunden (Abb. 48).

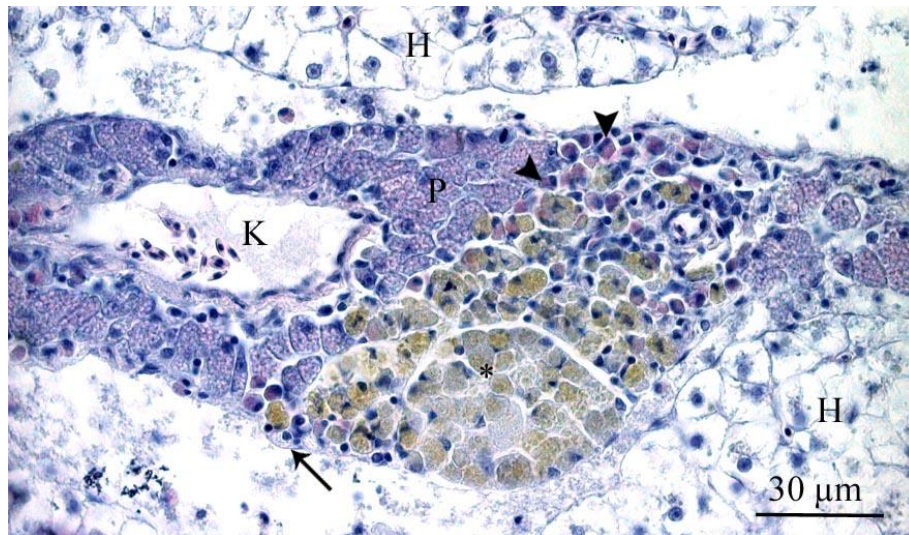


Abb.47: Mikrofotogramm der Leber von *C. carpio* mit zum Teil hochgradig degenerierten Hepatozyten (H). Das intrahepatischem Pankreasgewebe (P) ist um eine Venole (K) mit Erythrozyten angeordnet und von einer großen Ansammlung von Pigmentmakrophagen (Stern) umgeben. Dazwischen liegen einige Lymphozyten und eosinophile Granulazellen (Pfeilköpfe). Direkt zwischen der Pigmentmakrophagen liegen randständig zwei Rodletzellen (Pfeil). Hämatoxylin-Eosin-Färbung

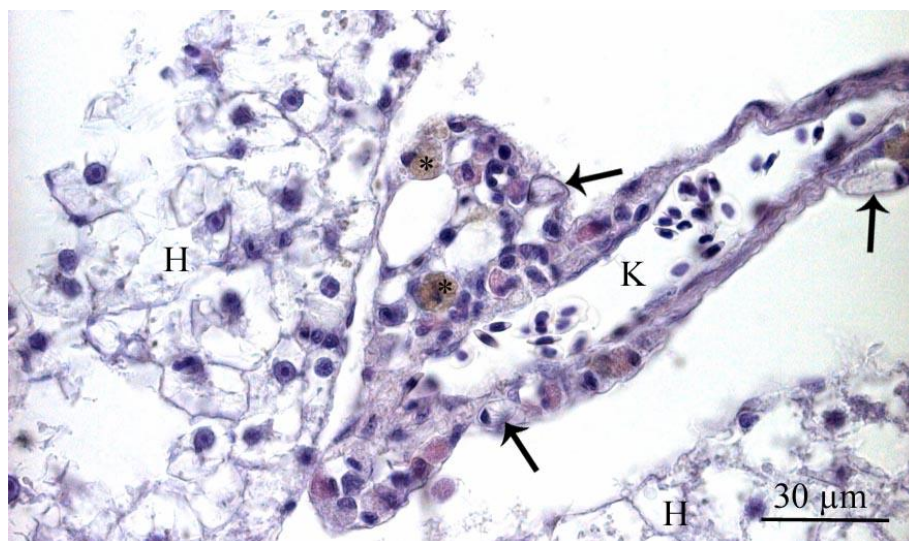


Abb.48: Mikrofotogramm der Leber von *C. carpio* mit Hepatozyten (H) und einer großen Venole (K). Das Blutgefäß ist umgeben von einigen Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und Pigmentmakrophagen (Stern). Zwischen diese Abwehrzellen sind Rodletzellen (Pfeile) zu sehen. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

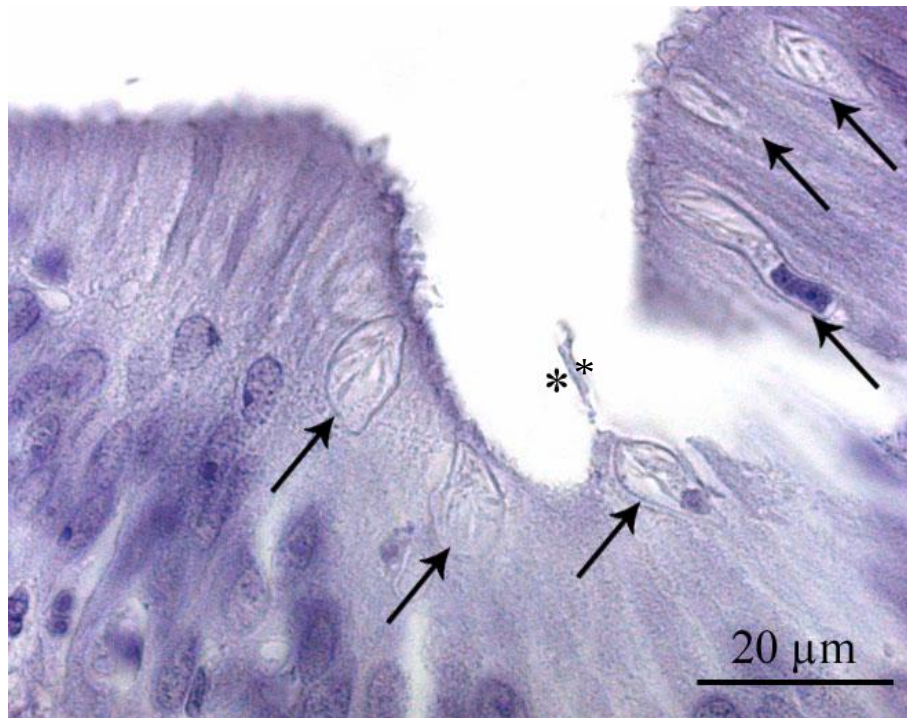


Abb.49: Mikrofotogramm eines intrahepatischen Gallengangs in der Leber von *C. carpio* mit zahlreichen Rodletzellen (Pfeile) im hochprismatischen Schleimhautepithel. Eine dieser Zellen ist im Stadium der Sekretion fixiert. Rodlets (Stern) werden während dieses Vorgangs ins Organlumen abgegeben Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zwischen den hochprismatischen Schleimhautzellen der großen interlobularen Ducti biliferi wurden vor allem bei Karpfen 2A viele der Stäbchenzellen gefunden. Sie waren im mittleren und oberen Drittel des Epithels platziert und zeigten die für sie typische Orientierung: Der Apex der Zelle wies zum Organlumen hin, wohingegen der Zellkern basal lag (Abb. 49). Manche Zellen waren rundlich oval, andere wiederum hatten eine längliche Form und erschienen zwischen zwei oder mehr Gallengangszellen gedrängt. Mitunter waren die Rodletzellen gerade im Stadium der Sekretion. Sie stießen dabei die für sie typischen Zellinhalte in das Lumen des Gallengangs aus (Abb. 49). Alle anderen untersuchten Individuen präsentierten unterschiedliches RZ Vorkommen in der Leber. Mitunter waren diese Zellen sehr selten oder fehlten komplett in diesem Organtypus.

Bei *C. auratus* 1B waren sowohl die Gallengänge als auch die Endothelien der Leber RZ-frei. Dafür wies das hochprismatische Epithel der Gallenblase einen hohen Anteil an diesen Zellen auf. Diese waren in gleicher Weise im Epithel platziert, wie zuvor für die Ducti biliferi beschrieben.

### 3.3.2. Darm

Keine Stäbchendrüsenzellen konnten im Darm bei den untersuchten Individuen 1A, 2A und 3A von *C. carpio* gefunden werden. Einige wenige RZ lagen im intestinalen Epithel von dem *C. auratus* Vertreter 1B. Sie waren manchmal in Agglomerationen gruppiert oder sie waren zwischen den hochprismatischen Enterozyten platziert. Auch in diesem Hohlraumorgan hatten sie zumeist eine typische, zum Organlumen hin orientierte Ausrichtung (Abb. 50). Vereinzelt waren sie im Stadium der Sekretion fixiert. Dabei wurden die Rodletstäbchen abgegeben. Bei manchen Rodletzellen konnte ein leerer Raum zwischen fibrillärer Kapsel und angrenzenden Zellen gefunden werden.

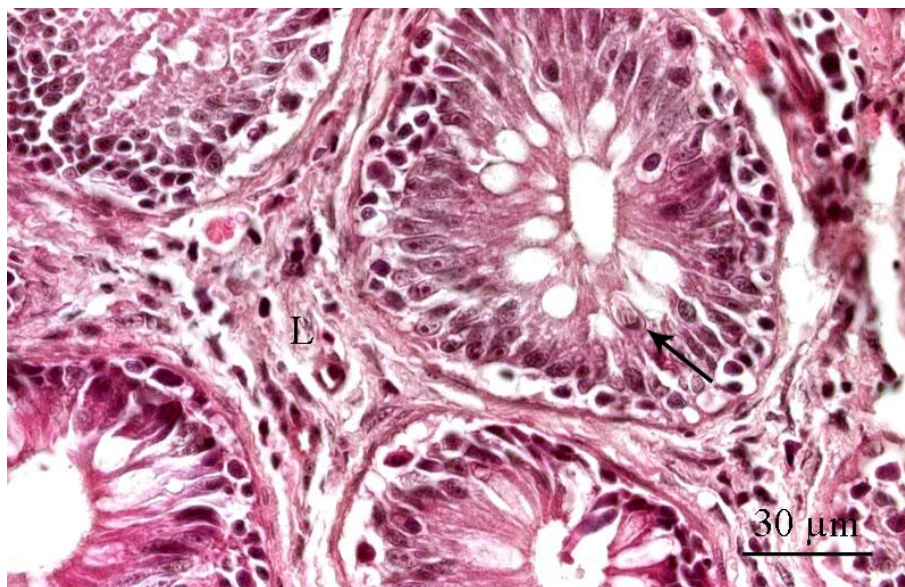


Abb.50: Mikrofotogramm von quer getroffenen Darmkrypten von *C. auratus*. In der Lamina epithelialis mucosae liegt zwischen Enterozyten und Becherzellen eine Rodletzelle (Pfeil). L Lamina propria; Hämatoxylin-Eosin-Färbung

### 3.3.3. Kopfnieren und restliche Niere

Die Rodletzellen waren je nach untersuchtem Fisch verschieden in ihrer Anzahl und in ihrem Vorkommen vertreten. Ein Karpfen (1A) zeigte besonders viele dieser Zellen, welche sowohl direkt in den Endothelien der Blutsinus oder in direkter Nachbarschaft zu diesen gefunden wurden (Abb. 51).

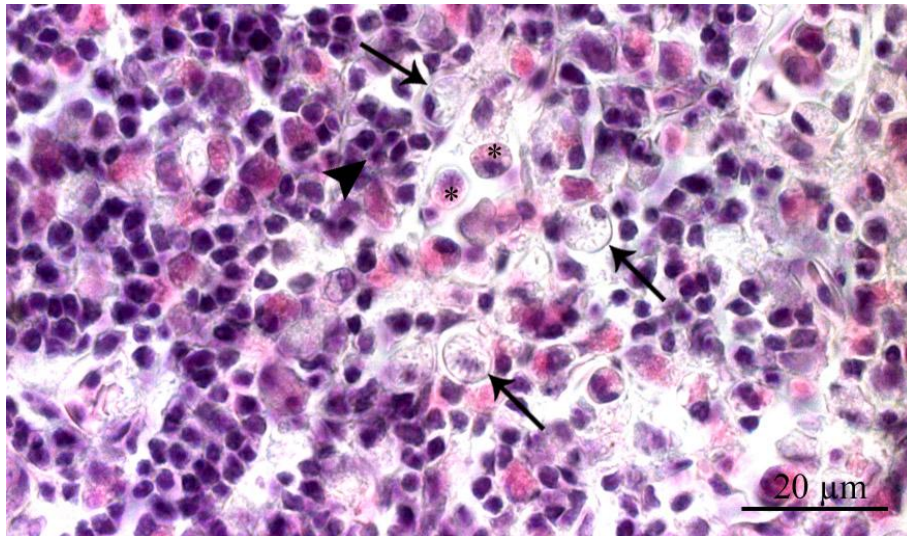


Abb.51: Mikrofotogramm der hämatopoetisch tätigen Kopfniere von *C. carpio* mit mehreren im haemopoetischen Gewebe oder mit Endothelien assoziierten Rodletzellen (Pfeile). Daneben sind eosinophile Granulozyten (Stern) und Lymphozyten unterschiedlicher Größe zu erkennen (Pfeilkopf). Hämatoxylin-Eosin-

Mitunter waren sie so in der Blutgefäßwandung platziert, dass sie diese ausbeulten (Abb. 52). Gelegentlich waren sie im retikuloendothelialen Bindegewebe eingebettet. Allerdings bestand zumeist zwischen benachbarten Immunzellen und der Rodletzelle ein kleiner, freier Raum ähnlich dem im Darm vorgefundenen, sodass es keinen direkten Kontakt zwischen diesen Zelltypen gab. Auch in diesem Organ zeigten sich typische RZ Gruppierungen. Seltener waren sie vereinzelt zu finden.

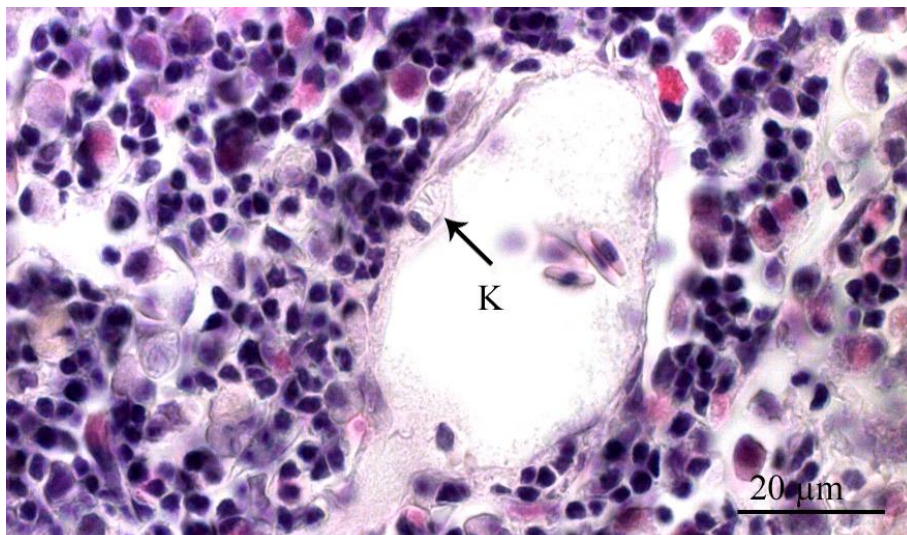


Abb.52: Mikrofotogramm der Kopfniere von *C. carpio* mit einer Rodletzelle (Pfeil), die direkt zwischen die Endothelzellen gelagert ist und das Blutgefäßlumen (K) leicht verengt. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Der exkretorische Anteil der Niere (Rumpfniere) zeigte Querschnitte von Tubuli und auch Glomeruli. Das Bindegewebe war ähnlich dem Pronephros strukturiert. Rodletzellen waren zumeist in Gruppen perivaskulär angeordnet, aber auch ohne direkte Endothelienassoziation im

Grundgewebe anzutreffen. Nie konnten sie in direkter Nähe zu den zahlreichen Pigmentmakrophagenzentren gefunden werden, wie dies in der Leber oder auch im Herz vorlag. In den für den exkretorischen Teil der Niere typischen Organbestandteilen wie Tubuli und Glomeruli konnte kein Vorkommen von Stäbchendrüsenzellen verzeichnet werden (Abb. 53 & 54).

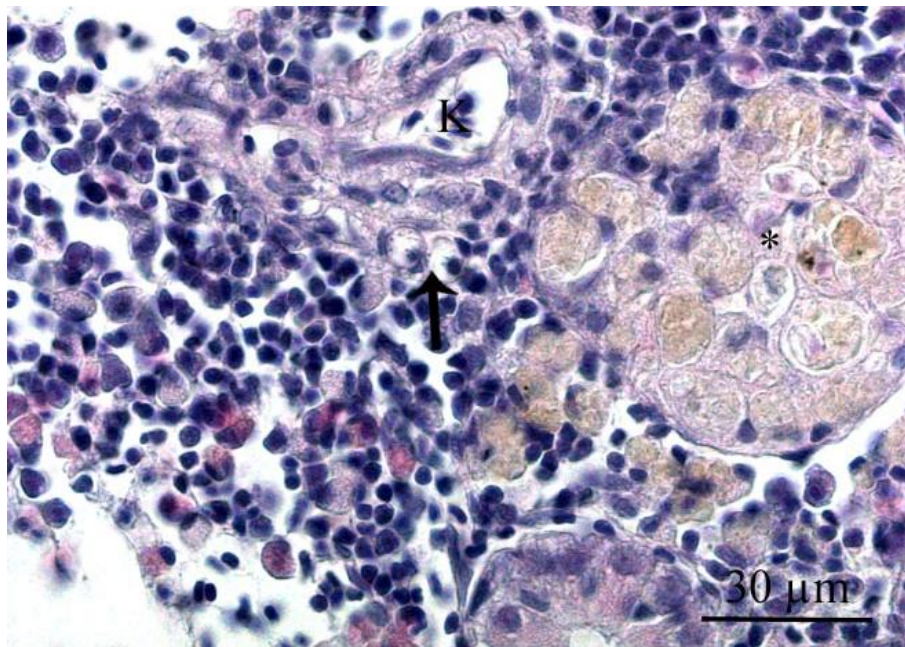


Abb.53: Mikrofotogramm der Rumpfniere von *C. carpio* mit perivaskulär um ein Blutgefäß (K) angeordneten Rodletzellen (Pfeil) und Pigmentmakrophagen-Noduli (Stern). Hämatoxylin-Eosin-Färbung

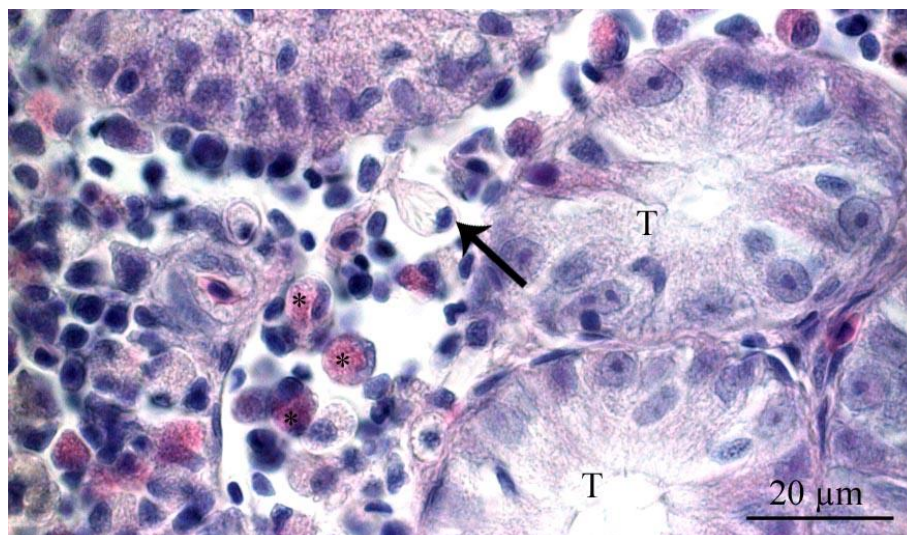


Abb.54: Mikrofotogramm der Rumpfniere von *C. carpio* mit zahlreichen Tubuli (T). Im retikuloendothelialen Grundgewebe und Sinusräumen sind neben eosinophilen Granulozyten (Stern) auch Rodletzellen (Pfeil) zu finden. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

### 3.3.4. Milz

Es konnten keine Rodletzellen sowohl bei untersuchten Individuen von *C. carpio*, als auch von *C. auratus* in diesem Organ gefunden werden.

### 3.3.5. Herz

Bei den drei untersuchten *C. carpio* Exemplaren 1A, 2A und 3A waren bei allen Anschnitten direkt im Bindegewebe des Epikards vereinzelt Rodletzellen in der Nähe von Blutgefäßen zu finden (Abb. 55). Bei einem Vertreter (2A) der Art zeigte sich das viszerale Herzblatt vom Myokard abgehoben. Zahlreiche Abwehrzellen, wie Lymphozyten, Granulozyten und auch Pigmentmakrophagen waren in diesen entstandenen Raum infiltriert. Dazwischen konnte eine extrem hohe Anzahl Rodletzellen gefunden werden (Abb. 56). Dies deutet alles auf eine Entzündungsreaktion hin, die mit einer Perikarditis gleichzusetzen ist. Bei dieser tritt ein vielschichtiges Granulationsgewebe mit starker Vaskularisierung und Bildung von Makrophagenzentren auf (Amlacher 1992), die dem vorgefundenen histologischen Bild entsprach.

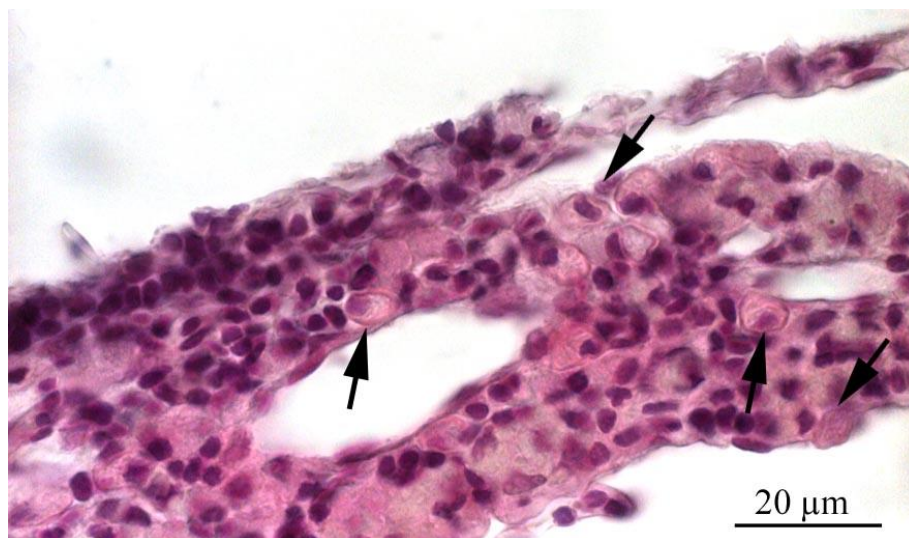


Abb.55: Mikrofotogramm der epikardialen Herzschicht von *C. carpio* mit mehreren mit den Endothelien assoziierten Rodletzellen (Pfeile). Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Melanomakrophagen-, „Noduli“ zeigten sich mit bindegewebiger Umhüllung. Zwischen diesen aktivierten Abwehrzellen befanden sich Stäbchendrüsenzellen. Sie zeigten mitunter eine zum Hohlraum lumen orientierte Ausrichtung. Vereinzelt konnten auch sogenannte eosinophile und neutrophile Granulozyten gefunden werden (Abb. 56).

Bei *C. auratus* (1B) war das Herz ähnlich aufgebaut. Rodletzellen waren allerdings direkt im Myokardgewebe zwischen Myozyten angeordnet. Im Epikard fehlten diese Zellen.

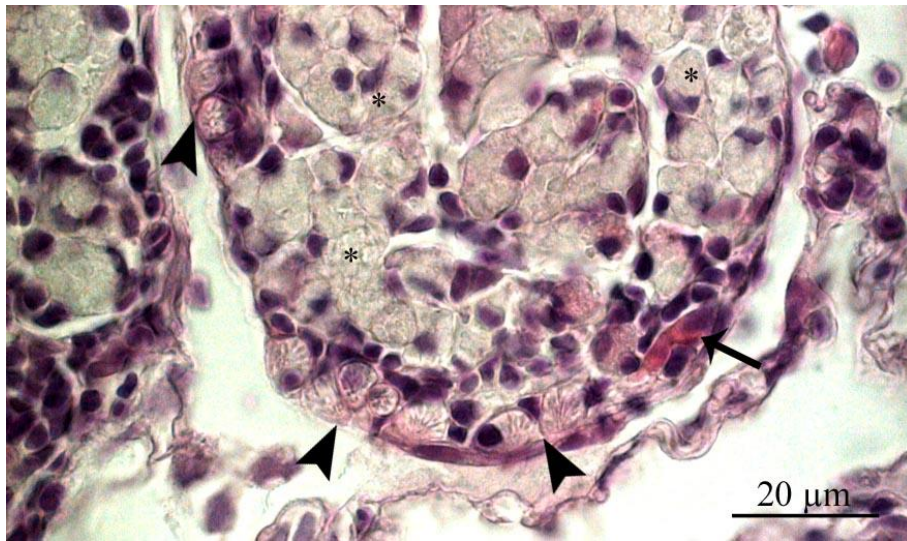


Abb.56: Mikrofotogramm eines Pigmentmakrophagen-„Nodulus“ (Stern) mit randständigen Rodletzellen (Pfeilköpfe) und einem eosinophilen Granulozyten (Pfeil) in der epikardialen Schicht des Herzens von *C. carpio*. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

### 3.3.6. Kiemen

Bei allen vier untersuchten Knochenfischen konnten keine Rodletzellen in den Kiemen gefunden werden.

## 4. Diskussion

Rodletzellen stellen einen einzigartigen, exklusiv in Teleostei vorkommenden Zelltypus dar. Ihr Vorkommen in den verschiedenen Organen der Knochenfische ist ausführlich dokumentiert (zusammengefasst von Manera & Dezfuli 2004). Obwohl sie seit ihrer Entdeckung vor mehr als einhundert Jahren schon Gegenstand zahlreicher Publikationen waren, zeigen sich viele Fragen, die den Ursprung und die Funktion dieser Zellen betreffen, noch unbeantwortet. Allerdings wurden die vielen Hypothesen, die um die RZ gebildet wurden, in den letzten Dekaden auf wenige reduziert: Die exogene Theorie findet in der heutigen Zeit kaum noch Zuspruch, vielmehr werden sie als reguläre Bestandteile des Fischorganismus gesehen, die entweder eine sekretorische (Leino 1982, 1996) oder eine immunologische (Iger & Abraham 1997; Dezfuli et al. 1998, 2000; Reite 2005; Silphaduang et al. 2006) Funktion ausüben. Eine vermutete Abwehrfunktion dieser Zellen gegen verschiedene Pathogenen oder Stressoren wird immer häufiger angenommen und durch statistische Untersuchungen und histopathologische Befunde teilweise untermauert (Dezfuli et al. 1998, 2003, 2006; Leino 1996; Reite 2005; Kramer et al. 2005; Giari et al. 2006). Allerdings lassen die typischen Merkmale, wie Rodlets und Kapsel, einen Vergleich mit anderen bekannten und gut untersuchten Immunzellen kaum zu. In dieser Studie sollten den beiden Strukturen durch immunzytochemische Färbungen genauere Betrachtung geschenkt werden, um dadurch die proklamierte Abwehrfunktion der Rodletzellen zu untersuchen.

Die typischen, kolbenartigen Einschlüsse der Rodletzellen, die Rodlets, galten lange Zeit als Produkte des regulären sekretorischen Pfades, deren Produktion mit einem Anstieg des rauen ER und Golgi Apparates einhergeht. Vor allem durch zytochemische Färbungen mit Silber und Phosphorwolframsäure, womit die Golgi Lamellen, abscheidende Vesikel und entstehende Rodlets gefärbt wurden, scheint die glykoproteinhafte Natur der Rodlets (Mattey et al. 1979; Leino 1982; Bielek & Viehberger 1983) und der sekretorische Weg als Synthesemechanismus unterstützt. Nach elektronenmikroskopischen Beobachtungen erscheinen die ersten sekretorischen Vesikel (u.a. Mattey et al. 1979) oder eventuell auch eine große „condensing vacuole“ an der trans-Golgi Seite und entwickeln sich anschließend zu den Rodlets (Leino 1974; Flood et al. 1975; Barber et al. 1979; Bielek 2002). Ob beide Anteile, nämlich der Kern (core) und die umhüllenden Säckchen (sacs) auf die gleiche Weise entstehen, scheint unklar. Die Herkunft des aus elektronendichten Material bestehenden Kerns gibt noch Rätsel auf (Bielek 2005). Eine direkte Verbindung vom rER zu den Rodlets wurde nur von Flood et al. (1975) vermutet. Kramer & Potter (2002) behaupteten hingegen eine direkte Rodletentstehung im ER, ohne eine Beteiligung des Golgi Apparates zu nennen. Die intensiven Immunmarkierungen der Rodlets mit dem luminalen ER Proteinen Grp78/BiP und CRT, welche als molekulare Chaperone nicht direkt zur Proteinfaltung beitragen, sondern Proteine in einem faltungsbereiten Zustand halten (u.a. Kaufman 1999), geben Hinweise auf eine hohe Beteiligung des

rER an der Entstehung der Rodlets. Allerdings kommt CRT nicht exklusiv im ER Lumen vor. So wurden bereits zytoplasmatische Funktionen wie Antigen Präsentation und Komplement Aktivierung bemerkt (Gao et al. 2002). Dies wird durch die Fähigkeit von CRT ermöglicht, Retrotanslatierungen vom ER zum Zytosol über einen alternativen Weg einzuschlagen (Afshar et al. 2005). Im Falle dieser Studie kann durch eine positive Reaktion von alleinigem CRT wegen seiner Organellspezifität in den Rodlets nicht direkt das ER als das letzte, bearbeitende Organell beschrieben werden.

Grp78/BiP war lange Zeit als Organell-Marker bekannt dafür, sich nur im ER und nicht etwa im *post*-Golgi aufzuhalten (Bole et al. 1989). Es hat genau wie CRT eine C-terminale KDEL Sequenz, welche sich als ER-Retentionssignal für ein exklusives Vorkommen von Grp78/BiP in diesem Membranorganell verantwortlich zeichnet. Allerdings zeigen neuere Studien, dass dieses Chaperon bei Einwirken von ER-Stress durchaus einen alternativen Weg einschlägt und dann in anderen Zellorganellen (wie Mitochondrien), im Zytoplasma, oder sogar extrazellulär anzutreffen ist (u.a. Sun et al. 2006). Somit ist es vorstellbar, dass sich die Chaperone während der Rodlet-Entstehung im ER an diese binden und nicht wieder abgespalten werden, wenn diese über Vesikel zum Golgi transportiert werden. Diese Vermutung wird durch die Entdeckung von ausgestoßenen Rodlets (siehe Abb.7 & 8) gestärkt, die eine gleich starke Immunfluoreszenz mit  $\alpha$ -Grp78/BiP aufweisen wie jene in intakten RZ. Ob beide Anteile dieser intrazellulären Körperchen, nämlich Rodletkern und -säckchen, im endoplasmatischen Retikulum gebildet werden, konnte fluoreszenzmikroskopisch nicht aufgelöst werden.

Frühere Studien beschrieben, dass sich der Rodletkern aus proteinogenen Material zusammensetzt, während die umhüllenden Säckchen aus neutralen Glykoproteinen aufgebaut sind (Desser & Lester 1975; Leino 1974, 1982; Barber et al. 1979; Smith et al. 1995). Die Hauptfunktion von Grp78/BiP besteht in einer Unterstützung der korrekten Proteinfaltung, während Calreticulin monoglykosylierte Glykoproteine im ER-Lumen zurückhält (Helenius 1994; Hammond & Helenius 1995; Helenius et al. 1997; Kaufman 1999). Dadurch lassen die intensiveren Signale mit Grp78/BiP als CRT vermuten, dass die Rodlets hps. aus Proteinen bestehen und der Anteil an Glykoproteinen gering ausfällt. Die untersuchten Chaperone Grp78/BiP und CRT lieferten in den Rodletzellen besonders intensive Signale, die um ein Vielfaches die Signale anderer Zellen, wie Becher- und Saumzellen, überstrahlten. Es kam zu Anlagerung an den Zellprodukten, den Rodlets. Die Hypothese der Rodletzelle als typische sekretierende Zelle, konnte damit nicht bestätigt werden, da die Sekretvakuolen der Becherzellen keine vergleichbaren Signale aussandten. Die einzigen reaktiven Bereiche, die in diesen Zellen gefunden werden konnten, waren direkt um die Nuklei zu finden, wo das ER liegt. Immunreaktionen konnten auch in den hochprismatischen Epithelzellen der Gallengänge gefunden werden. Diese gefundene Reaktivität mag im ersten Moment verwundern, aber Chaperone scheinen im sekretorischen Prozess von Verdauungsenzymen und der Interaktion mit Enterozyten beteiligt zu sein (Bruneau et al. 1999). So lässt sich auch die Färbung des Mikrovillisaums der Saumzellen mittels der PAP Methode erklären: Chaperone (v.a. Grp94), gebunden an

gallensalzabhängige Lipasen werden in das azinöse Lumen des Pankreas abgegeben und über die Darmschleimhaut endozytotisch von Enterozyten aufgenommen. Dadurch finden sie sich nicht nur in endosomalen Kompartimenten, sondern sind auch in den Mikrovilli nachweisbar (Bruneau et al. 2000 a & b). Dies ist nicht der erste Nachweis von Chaperonvorkommen im piscinen Gewebe. Bereits Kales (2007) beschrieb das Vorkommen von Calreticulin bei Salmoniden an der Zelloberfläche von stimulierten Leukozyten von. Allerdings zeigten sich in den RZ die Signale der Chaperone nur im Zytoplasma und niemals an der Zelloberfläche, die aufgrund der deutlichen Kapselstruktur gut identifiziert werden konnte. Somit reagierten Rodletzellen gänzlich anders wie vergleichbare immunreaktive Zellen. Auch Grp78/BiP kommt in Fischzellen vor; so steigt dessen Expression bei viralen Erkrankungen, wie beim atlantischen Seelachs mit ISAV (Infectious salmon anemia virus) Infektion, deutlich an (u.a. Jørgensen et al. 2008).

Beide Chaperone, Grp78/BiP und Calreticulin fungieren allerdings auch als  $\text{Ca}^{2+}$  Bindungsproteine (Corbett et al. 1999; Lee 2001). Von Calreticulin ist bereits bekannt, dass es als  $\text{Ca}^{2+}$  Bindungsprotein die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase moduliert, und diese Ionen spielen auch eine wesentliche Rolle bei der Initiierung von Apoptose in Zellen (Liu et al. 1997; Corbett et al. 1999). Differenzierte Expression von CRT hat einen Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherkapazität des ER und moduliert auch dessen Freisetzung vom ER (Nakamura et al. 2000). Bei Anwesenheit von toxischen Substanzen kann ein Anstieg der Konzentration an intrazellulär freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beobachtet werden, worauf hin eine vermehrte Expressierung von sogenannten  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstress Proteinen erfolgt (Liu et al. 1997). Diese Proteine, die bei ER-Stress gebildet werden, sind die Chaperone der Grp Familie, zu welcher auch Calreticulin, Calnexin und ERp57 zählen (Liu et al. 1997). In RZ wurde bereits ein  $\text{Ca}^{2+}$  bindendes Protein, nämlich das S-100 Protein in der fibrillären Kapsel, dem Zellkern und in den Rodlets nachgewiesen (Vigliano et al. accepted manuscript). Es wurde als eine Art kontraktiles Protein betrachtet, das eine aktive Kontraktion der subplasmalemmaren Kapsel teilweise begünstigt. Durch diese zusätzlichen Funktionen der Chaperone, die durch extrazelluläre oder zelluläre Stressoren ausgelöst werden, lässt der positive Nachweis dieser in den RZ mehrere Interpretationen zu. Sind Schwermetalle oder andere Giftstoffe in der direkten Umgebung vorhanden, könnte es zu einer Anreicherung dieser Stoffe im Fischorganismus kommen. Toxine führen zu ER-Stress in den Rodletzellen, welche vielleicht besonders empfindlich auf diese Substanzen und andere externen Irritationen reagieren, und antworten mit einer Erhöhung der GRp78/BiP und CRT Expression. Dadurch soll eine Verminderung des herrschenden ER-Stresses durch gezielte  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung mittels der Chaperone erzielt werden, um den Zelltod zu verhindern.

Die vorgefundenen intensiven Chaperon-Signale in den Rodlets lassen den Schluss zu, dass es zu einer gezielten ER-Stress-Antwort in diesen Zellen kommt und zu einer erhöhten Expressierung der Faltungsproteine Calreticulin und Grp78 führt. ER-Stress kann entweder durch extrazelluläre oder intrazelluläre Signale, wie zum Beispiel durch falschgefalteten Proteine, die im ER Lumen akkumulieren (Kozutsumi et al. 1988; Bush et al. 1997; Rutishauser & Spiess 2002; Lee 2001),

verursacht werden. Dadurch ist eine weitere Deutung der Rodlets als fehlgefaltete Proteine möglich, die sich in abgeleiteten Zisternen und Vesikeln des ER-Golgi Kompartiments anhäufen. Die eigenartige Erscheinung dieser Zellen könnte durch eine ER-Speichererkrankung (ER storage disease, ERSD) begründet sein. Die Präsenz von veränderten Organellstrukturen kennzeichnen viele ER-Speichererkrankungen, wobei die pathogenen Folgen noch unbekannt sind (Mattioli et al. 2006). So zeigen sich Ähnlichkeiten zwischen dem hypertrophierten endoplasmatischen Retikulum der RZ (Bielek 2005), wo die Rodletbildung vielleicht ihren Ursprung nimmt, und den erweiterten ER-Zisternen, welche die Russelkörperchen der Mottzellen umgeben (Mattioli et al. 2006). Diese Beobachtungen geben weitere Hinweise auf eine aberrante Zelldifferenzierung der Rodletzellen, wie dies bereits von Bielek (2002, 2005) bemerkt wurde. Bei der Fabry Erkrankung, eine weitere Form von ERSD, wird das mutierte Glykoprotein im ER zurückgehalten und bildet Komplexe mit BiP (Roth et al. 2008). Dies könnte auch in den Rodletzellen der Fall sein: die Rodlets, die aufgrund von Fehlfaltung im Bereich zwischen ER und *trans*-Golgi akkumulieren, führen zu ER-Stress, welchem durch erhöhte Chaperon Expression begegnet werden soll, bilden dann Komplexe mit Grp78/BiP und sind durch Antikörperbindungen in der Immunfluoreszenz besonders leucht-intensiv. Ob nun die Rodletentstehung durch extrazelluläre Störungen, wie Pathogene, Parasiteneinwirkung oder andere Stressoren bedingt ist, oder aufgrund von intrazellulären Faktoren, wie Stoffwechselstörungen oder genetische Fehlfunktionen herrührt, bedarf weiteren Untersuchungen.

Bereits bekannt ist, dass falschgefaltete Proteinaggregate direkt die Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems verschlechtern können (Bence et al. 2001). Dies erklärt die fehlende Ubiquitin-Reaktion in den Rodletzellen. ERSD muss nicht mit Apoptose der Zellen enden, Mottzellen bleiben trotz der Russelkörperchen lebensfähig (Weiss et al. 1984; Alanen et al. 1985) und können sich sogar durch Mitose teilen (Valetti et al. 1991). Akkumulierte Aggregate sind unlöslich in Detergenzien (Valetti et al. 1991). Ausgeschleuderte Rodlets von isolierten RZ lösten sich in Zellkulturmedien nicht auf und blieben unverändert (Schmachtenberg 2007). Vielleicht stellt diese Beobachtung eine vergleichbare Unlöslichkeit dar, wie dies für andere ERSD-Aggregate gilt.

Die Anwesenheit des Chaperon Calnexin konnte mit dem in dieser Studie verwendeten Antikörper nicht nachgewiesen werden. Weiterführende Versuche mit anderen Antikörpern für dieses integrale ER-Membranprotein können zusätzliche Hinweise auf die Tätigkeiten der Faltungsproteine in den Rodletzellen liefern. Besonders interessant wäre die Interaktion von Calnexin mit dem eng verwandten Protein Calreticulin, das in dieser Arbeit in den Rodletzellen gefunden wurde. Die beiden Lektine bilden ein Faltungssystem, welches auch von ERp57 unterstützt wird (Ni & Lee 2008). Auch ERp57 konnte in den Rodletzellen nicht nachgewiesen werden. Nur in glatten Muskelzellen war dieses Chaperon auffindbar, allerdings waren die Signale nur schwach positiv. Ein anderes Glucose-reguliertes Protein, nämlich Grp94, wurde in endothelialen und vaskulären Muskelzellen, aber auch in Fibroblasten, Nervenaxonen und Kardiomyozyten bei fetalen und neugeborenen Hasen entdeckt (Vitello et al. 1998). In diesen Zellen übernimmt das Chaperon wichtige  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsfunktionen im

sarkoplasmatischen Retikulum. Da Muskelzellen keine sekretorisch tätigen Zellen darstellen, wird dem Nachweis von ERp57/Grp58 in der Darmmuskulatur eine Bedeutung in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase zugeschrieben. Auch hier für wären weitere Untersuchungen mit anderen Antikörpern sinnvoll. Vielleicht sind die Aufgaben von ERp57 in Rodletzellen von einem strukturdifferenten, aber funktionshomologen Molekül übernommen worden, welches sich nicht mit dem gewählten Antikörper nachweisen ließ.

Interessant sind diese immunzytochemische Ergebnisse im Hinblick auf neuere Studien, die Chaperonen der Hsp Klasse und Calreticulin eine gewisse immunisierende Funktion ähnlich Cytokinen zuschreiben (Basu et al. 1998; Asea et al. 2000; Asea 2003). Diese extrazelluläre Funktion wird unter der Bezeichnung Chaperokin beschrieben. Besonders gut untersucht ist Hsp70, dessen Wirkungsweise bei Säugetieren zumindest teilweise aufgeklärt wurde. Rezente Studien haben gezeigt, dass bei akuten, psychologischen Stress und physikalische Überanstrengung ein markanter Anstieg am Hsp70 im Serum verzeichnet wurde (Asea 2003). Dabei wird angenommen, dass Hsp70 als Chaperokin zur Wirtsverteidigung gegen Pathogene wirkt (Asea 2003). Wie bereits in der Einleitung beschreiben, ist GRp78/BiP diesem Hitze-Shock Protein homolog, allerdings konnten noch keine immunisierende Funktion bei Grp78/BiP entdeckt werden. Hsp-Peptid-Komplexe werden abgegeben und von sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen. Nach intrazellulärer Umwandlung der Peptide werden diese mittels MHC I Moleküle an der Oberfläche der APC gezeigt und stimulieren eine Antigen spezifisches  $\text{CD8}^+$  auf T-Lymphozyten (Basu & Srivastava 1999). Im Falle von CRT ist die Immunogenität mit dem angekoppelten Peptid und nicht mit dem Chaperon per se korreliert (Basu & Srivastava 1999). Natürlich könnten die gefundenen Chaperone Grp78/BiP und CRT der Rodletzellen ähnliche Funktionen inne haben, wie dies für Mammalia bereits untersucht wurde. In den RZ wird aufgrund eines exogenen oder autogenen Stimulus die Homöostase des ER gestört und es kommt zu einer Akkumulierung von proteinogenen Materials (Vorstufe der Rodlets) im Zellinneren. Dadurch wird die Exprimierung von Chaperonen, die als ER Stress Proteine arbeiten, angekurbelt, diese lagern sich an die weiter wachsenden Rodlets, werden dann zusammen ausgeschleudert und anschließend von Immunzellen aufgenommen. Dies würde auch die von Leukozyten, wie Makrophagen, „phagozytierten“ Rodlets (Bielek 2002) erklären. Die Unlöslichkeit von ausgestoßenen Rodlets, wie dies von Schmachtenberg (2007) beschrieben wurde, würde sich ebenfalls so erklären lassen. Extrazelluläre Signalstoffe müssen eine gewisse Haltbarkeit aufweisen, um Zellen anlocken zu können. Somit würden Rodletzellen sowohl sekretorische, als auch indirekt immunologische Arbeitsweisen vereinen.

Obwohl viele Publikationen eine kontraktile Funktion der Kapsel beschreiben (Leino 1974, 2002; Barber et al. 1979; Matthey et al. 1979, Kramer & Potter 2002), wurden keine direkten immunzytochemischen Versuche darüber versucht. Ein positiver, aber indirekter Aktinnachweis mithilfe des Zellgiftes Phalloidin wurde von Leino (2002) unternommen. Der Nachweis wurde in dieser Studie wiederholt, zeigte allerdings sehr heterogene Ergebnisse: Manche Rodletzellen

verblieben ungefärbt, andere hatten Signale im Zytoplasma und/oder in der Kapsel. Phalloidin ist ein fungales Toxin. Es bindet nur an polymerisches und oligomerisches Aktin, wobei es zu einer Komplexbildung zwischen Phalloidin und F-Aktin kommt. Die nur teilweise vorhandene Reaktivität von Phalloidin in der fibrillären Kapsel kann zum einen in dem nicht Vorhandensein von Aktin (poly- und/oder oligomerisch) in der Kapsel begründet sein. Zum anderen könnte ein, der Struktur von Aktin verwandtes Filament ohne kontraktile Funktion, an welches sich Phalloidin nur unter besonderen sterischen Bedingungen anlagern kann, für die positiven Ergebnisse verantwortlich sein.

Die immunzytochemischen Färbungen für verschiedene Aktin- und Myosinarten an Rodletzellen führten zu negativen Ergebnissen in der Kapsel. Allerdings zeigten sich mit smooth Myosin positive Reaktionen im apikalen Bereich der Zellen. Die Signale befinden sich in der Region der Mitochondrien und Vesikel im Zytoplasma. Da die Färbungen von der Zellkapsel zu weit entfernt liegen, scheint eine Funktion als kontraktile Kapselfibrillen oder als Komponenten des apikalen Haftkomplexes unwahrscheinlich. Amöba Aktin und polyklonales Aktin konnten ebenfalls intrazellulär unterhalb der Kapsel nachgewiesen werden. Aktinfilamente ziehen außerdem im Zellinneren zum Apex und verdichten sich dort ähnlich den Tubulinstängen. Die nachgewiesenen Aktinstränge arbeiten in den Rodletzellen somit als eine Art Zellgerüst. Das Ausschleudern der Rodlets mithilfe einer Druckzunahme scheint wahrscheinlicher, wie dies von zahlreichen anderen Autoren bereits vermutet wurde (Bannister 1966; Richards et al. 1994; Smith et al. 1995; Bielek 2005; Schmachtenberg 2007).

$\alpha$ -Tubulin Filamente durchspannen Rodletzellen in ihrer gesamten Längsachse. Sie beginnen nahe am Zellkern und enden an einem Punkt des apikalen Pols, wo es zu einer Verdichtung der Mikrotuben kommt und wo das Centriom liegt (Leino 1974). Im Bereich der Kapsel fehlt  $\alpha$ -Tubulin. Diese Mikrotubuli haben in den RZ die gleichen Aufgaben, wie in anderen Zellen auch. Die Filamente sind für die Formgebung und Transportvorgängen der Vesikel und anderer Zellinhalte verantwortlich.

Vimentin scheint nicht Teil des Zytoskeletts und der Kapsel von Rodletzellen zu sein. Mithilfe dieses Antikörpers sollte ein möglicher mesenchymaler Ursprung dieser Zellen aufgeklärt werden. Vimentin wird als diagnostischer Marker bei Mammalia in der pathologischen Histologie häufig zur Tumordiagnostik eingesetzt und gibt verlässlich Hinweis auf Gewebebezughörigkeit. Beim Huhn senden alle getesteten Leukozyten Vimentinsignale aus (Jeurissen et al. 1999), bei Fischen ist Vimentin nicht so spezifisch und erreicht in der Immunhistochemie keine Markerqualität. Da die Expression von intermediären Filamente bei Teleostei völlig anders abläuft als bei terrestrischen Vertebraten, vor allem in mesenchymalen Geweben und im optischen Nerv (Hermann & Harris 1998), können die negativen Färbeergebnisse somit nicht direkt einen mesenchymalen Ursprung der Rodletzellen entgegen sprechen.

Alle getätigten immunzytochemischen Versuche liefern ein besseres Verständnis über die Funktion und das Wesen der mysteriösen Rodletzellen. Zum einen gaben die ER-Antikörper ein weiteres Indiz für die Bildungsart der Rodlets, wenn dem auch lichtmikroskopisch Grenzen gesetzt

sind. So konnte eine Unterscheidung zwischen dem elektronendichten Kern und den locker strukturierten Säckchen nicht unternommen werden. Inwieweit Calreticulin und Grp78 in beiden Anteilen der Zellkörperchen vorkommen, muss elektronenmikroskopisch betrachtet werden. Allerdings deuten die intensiven Antikörpermarkierungen auf das ER als Bildungsort der Rodlets hin. Eine anschließende Modifizierung und Bearbeitung durch den Golgi Komplex ist ebenfalls möglich. Das ER der Rodletzellen scheint eine Störung in seiner Homöostase aufzuweisen, was durch hohe Konzentrationen an den ER-Stress Proteine Grp78/BiP und Calreticulin gezeigt wird. Ob dies primär durch die Rodletentstehung verursacht wird, um Apoptose abzuwenden oder durch exogene Stimuli erzeugt wird, ist noch unklar. Die Rodlets scheinen allerdings die Ergebnisse einer erhöhten Proteinsynthese zu sein. Somit könnte, wie bereits von Bielek (2005) formuliert, eine aberrante Zelltransformation die eigentliche Natur der Rodletzellen sein. Im Hinblick auf die Funktionen von Chaperonen im Immunsystem (Chaperokine), könnte dies durchaus als eine positive und brauchbare Funktionsstörung gedeutet werden.

Eignen sich Grp78 bzw. Calreticulin als spezifische Marker für die Stäbchenzellen? Beide Antikörper zeichnen sich für klare und leuchtintensive Signale in mikroskopischen Schnitten vom Darm bei Immunfluoreszenz aus. In den anderen für Immunzytochemie verwendeten Organen, wie Leber, Herz und Gallenblase wurden vielfach mehrere Zelltypen intensiv markiert, wodurch eine Schnelldiagnostik des RZ-Vorkommen erschwert wird. Da Rodletzellen sehr große Unterschiede in ihrem Gewebevorkommen zeigen, ist es nicht zulässig, Marker nur in einem Organ zu testen. Dies wird außerdem durch die in dieser Studie geringen Funde im Verdauungstrakt gefestigt. Mithilfe der beiden Antikörper konnten auch nur die reifen oder subreifen Rodletzellen identifiziert werden, da diese Stadien bereits die typischen und reaktiven Rodlets ausgebildet haben. Junge RZ, die sich durch ein Fehlen dieser Zellkörperchen auszeichnen (Barber et al. 1979; Matthey et al. 1979, Flood et al. 1975), können so nicht entdeckt werden. Somit sollten Marker nicht die typischen Zellstrukturen (Kapsel und Rodlets), die sich erst mit zunehmendem Reifegrad bilden, betreffen. Allerdings eignen sich beide Antikörper für elektronenmikroskopische Immunzytochemie, um Entstehungsweise und -organellen der Rodlets genauer zu untersuchen.

Obwohl in dieser Studie zu wenige Individuen für ein generelles Verteilungsmuster der RZ untersucht wurden, wird nun doch als Momentaufnahme das Vorkommen dieser Zellen kurz diskutiert und mit der Literatur verglichen. In der Familie der Cyprinidae, von welcher auch Arten in dieser Studie histologisch untersucht wurden, scheinen sie als beständige Anteile in unterschiedlichen Geweben vorzukommen. Beständig waren diese Zellen nur im Herzen der untersuchten Karpfenartigen anzutreffen, wie dies auch von Reite (2005) beschrieben wurde. Unterschiede gab es allerdings zwischen Karpfen und Goldfisch: Während bei ersteren RZ immer in der epikardialen Schicht lagen, waren sie beim Goldfisch sowohl im äußeren Bindegewebe, aber auch in den tieferen muskulären Schichten, wie Rinden- und Schwammschicht häufig. Dort lagen sie direkt neben den Herzmuskelzellen, also ohne epitheliale oder mesotheliale Assoziation. Die bei einem Karpfen

beobachtete besonders hohe Zahl von Rodletzellen im Herzen war mit anderen immunreaktiven Zellen, wie Pigmentmakrophagen und Lymphozyten assoziiert. Dies lässt auf eine entzündliche Reaktion im Herzen schließen, die von Amlacher (1992) als Perikarditis beschrieben wurde und zu der vermehrten Ansammlung von Stäbchenzellen in diesem Organ führen konnte. Wie bereits erwähnt, zeigten sich Rodletzellen in direkter Nachbarschaft zu Melanomakrophagen. Dies könnte ein weiterer Beweis gegen die exogene Theorie dieser Zellen sein. Auch die geringe Anzahl an eosinophilen Granulazellen, die über vermutete Phagozytoseeigenschaften bei Antigen-Antikörper-Komplexen und parasitären Invasionen verfügen (Ellis et al. 1989), widerspricht der exogenen Hypothese. Aufgrund der enormen Zahl der Makrophagen, die bei Fischen die wichtigsten Zellen zu Eliminierung von eingedrungenen Bakterien darstellen (Secombes 1990), lässt sich eine bakteriell bedingte entzündliche Perikarditis eingrenzen.

Es wurden nur sehr wenige Rodletzellen direkt in der Gallenblase gefunden. Dafür schienen sie als reguläre Elemente im hochprismatischen Epithel der Gallengänge auf, wo sie ihre Rodlets ausschleuderten und anschließend degenerierten. Dieses Verhalten war in einem parasitär-freien oder nicht erkrankten Organ überraschend, da viele Autoren das Freisetzen der Rodlets vor allem bei Anwesenheit von Parasiten beschreiben (Dezfuli 1998, 2003; Leino 1979, 1996). Die durch Parasiten induzierte, vielleicht antibiotisch wirkende Sekretion gilt als Beweis für die propagierte immunologische Funktion der Rodletzelle. Die Zellen konnten auch perivaskulär in der Leber gefunden werden, allerdings nicht in direkter Nachbarschaft zum Pankreas. Ob die teils nekrotisch veränderten und verfetteten Hepatozyten zu der hohen Anzahl an Rodletzellen und der intensiven Sekretion in den Gallengängen geführt haben oder das Vorkommen in diesem Gewebe ein generelles Merkmal der Cyprinidae ist, kann nicht beurteilt werden.

Auffällig in dieser Studie war die geringe Zahl bzw. die vollständige Abwesenheit an Rodletzellen im intestinalen Epithel. Dies könnte im Fehlen von Darmhelminthen oder anderen Verdauungstrakt assoziierten Parasiten begründet sein. Viele Autoren beschreiben hohe RZ Bestände bei pathologischen Veränderungen, wie Parasiten, Schwermetall- und Herbizidbelastung, Salinitätsveränderungen usw. (Dezfuli et al. 1998, 2006; Reite 2005; Giari et al. 2006; Iger & Abraham 1997). Die RZ Dichte scheint durch unterschiedlichste Pathogenarten und exogene Stressoren anzusteigen (Schmachtenberg 2007). Andererseits scheinen diese einzigartigen Zellen regulär in gesunden Individuen auf (Kramer & Potter 2003; Arellano 2000) oder migrieren bei intensiven parasitären Befall nur wenig in das betroffene Organ ein (Alvarez-Pellitero et al. 2007).

Die untersuchten Nieren zeigten einen sehr heterogenen Besatz mit Rodletzellen. Im hämatopoetisch tätigen Pronephros waren sie nur zum Teil regelmäßig perivaskulär oder im retikulären Bindegewebe anzutreffen. Oftmals waren sie sehr spärlich oder fehlten komplett. Dadurch kann die Niere, oder genauer der Pronephros, als Bildungs-, Speicher- und Ausgangsorgan für die Migration ausgeschlossen werden. Diese Unregelmäßigkeiten in Zellzahl und Vorkommen wurden auch von Fishelson & Becker (1999) beobachtet, die sie daraufhin als nicht reguläre Komponenten

von Epithelien ansahen. Im zweiten, histologisch untersuchten lymphatischen Organ, der Milz, konnten sie hingegen nie gefunden werden. Bei Rodletzellen gibt es anscheinend große Unterschiede im Hinblick auf ihre Verteilungen im Fischorganismus und Anzahl, die sich vielleicht auf der Ebene der Fischfamilien oder Gattungen bezieht, und auch individuell schwankt, wie dies bereits von Reite (1997) bemerkt wurde. Auch könnten exogene Parameter, wie Wasserqualität oder Schwermetallbelastung, parasitärer oder bakterieller Infektionsdruck, nutritive oder hormonelle Umstände, oder noch unbekannte Faktoren direkten oder indirekten Einfluss auf die Zahl, Reifegrad, Migrationsaktivität und Organvorkommen von Rodletzellen haben.

In der letzten Zeit werden RZ häufig als brauchbare Biomarker für Fische angesehen (Manera & Dezfuli 2004; Dezfuli et al. 2006, 2007), die ähnlich Melanomakrophagen zum Biomonitoring gebraucht werden können. Allerdings wird durch die noch unzureichend bekannte Funktion und Natur dieser Zellen eine Interpretation statistischer und histopathologischer Ergebnisse erschwert. Sollten RZ wirklich eine immunologische Funktion inne haben, müssten die spezifischen Stimuli, die zu Heranreifen, Migration und Rodletfreisetzung führen, und auch die molekulare Biologie dieser Zellen genau bekannt sein, um auch sinnvolle Erklärungen und Auslegungen der Ergebnisse liefern zu können.

## 5. Literaturverzeichnis

- AFSHAR N, BLACK B.E, PASCHAL B.M. (2005)** Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Molecular and Cellular Biology* **20**:8844-8853
- ALANEN A, PIRA U, LASSILA O, ROTH J, FRANKLIN R.M. (1985)** Mott cells are plasma cells defective in immunoglobulin secretion. *European Journal of Immunology* **15**:235-242
- AL-HUSSAINI A.H. (1949a)** On the functional morphology of alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits: anatomy and histology. *Quarterly Journal of Microscopical Science* **90**: 109-139
- AL-HUSSAINI A.H. (1949b)** On the functional morphology of alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits: cytology and physiology. *Quarterly Journal of Microscopical Science* **90**: 323-354
- ALVAREZ-PELLITERO P, PALENZUELA O, SITJA-BOBADILLA A. (2008)** Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitology International* **57**:110-120
- AMLACHER E. (1992)** Taschenbuch der Fischkrankheiten. Grundlagen der Fischpathologie, 6. überarbeitete Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- ANDERSON, C.D, ROBERTS R.J, MACKENZIE K, MCVICAR A.H. (1976)** The hepato-renal syndrome in cultured turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of Fish Biology* **8**: 331 – 341
- ARELLANO J.M, STORCH V, SARASQUETE C (2002)** Ultrastructural study on the intestine of Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Journal of Applied Ichthyology* **18**:154-158
- ARTEYA C.D, SINGH N.K, NAKHASI H.L. (1995)** The rubella virus RNA binding activity of human calreticulin is localized to the N-terminal domain. *Journal of Virology* **69**: 3848-3851
- ASEA A, KABINGU E, STEVENSON M.A, CALDERWOOD S.K. (2000)** Hsp70 peptide-bearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress & Chaperones* **5**:425-431
- ASEA A. (2003)** Chaperokine-induced signal transduction pathways. *Exercise Immunology Review* **9**:25-33
- BANNISTER L. H. (1966)** Is *Rhabdospora thelohani* (Laguesse) a sporozoan parasite or a tissue cell of lower vertebrates? *Parasitology* **56**: 633-638
- BARBER D.L, MILLS WESTERMANN J.E, JENSEN D.N. (1979)** New observations on the rodlet cell (*Rhabdospora thelohani*) in the white sucker *Catostomus commersoni* (Lacépède): LM and EM studies. *Journal of Fish Biology* **14**: 277 –284
- BARBER D.L, MILLS WESTERMANN J.E. (1983)** Comparison of nuclear DNA content of rodlet cells erythrocytes in some fresh water teleosts. *Journal of Fish Biology* **22**: 477-484
- BARBER D.L, MILLS WESTERMANN J.E. (1985)** Reappraisal of nuclear DNA content of rodlet cells compared to several cell types from some freshwater teleosts, using two methods of microdensitometry. *Journal of Fish Biology* **27**: 817-826
- BARBER D.L, MILLS WESTERMANN J.E. (1986)** The rodlet cell of *Semotilus atromaculatus* and *Catostomus commersoni* (Teleostei): studies on its identity using histochemistry and DNaseI – gold, RNase A – gold, and S1 nuclease – gold labelling techniques. *Canadian Journal of Zoology* **64**:805-813
- BASU S, SRIVASTAVA P.K. (1999)** Calreticulin, a peptide binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *Journal of Experimental Medicine* **189**:797-802
- BENCE N.F, SAMPAT R.M, KOPITO R.R. (2001)** Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* **292**: 1552-1555
- BERGERON J.J.M, BRENNER M.B, THOMAS D.Y, WILLIAMS D.B. (1994)** Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends of Biochemical Science* **19**:124-128
- BIELEK E. (2002)** Rodlet cells in teleosts: new ultrastructural observations on the distribution of the

- cores in the trout (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta* L.). *Journal of Submicroscopical Cytology and Pathology* **34**: 271-278
- BIELEK E. (2005)** Development of the endoplasmatic reticulum in the rodlet cell of two teleost species. *Anatomical Record* **283A**: 239 – 249
- BIELEK E, VIEHBERGER G. (1983)** New aspects on the „rodlet cell“ in teleosts. *Journal of Submicroscopical Cytology* **15**: 681-694
- BISHOP C.M, ODENSE P.H. (1966)** Morphology of the digestive tract of the cod *Gadus morhua*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **23**: 1607-1615
- BOLE D.G, DOWIN R, DORIAUX M, JAMIESON J.D. (1989)** Immunocytochemical localization of BiP to the rough endoplasmic reticulum: evidence for protein sorting by selective retention. *Journal of histochemistry and Cytochemistry* **37**:1817-1823
- BOLE D.G, HENDERSHOT L.M, KEARNEY J.F. (1986)** Posttranslational association of immunoglobuline heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *Journal of Cell Biology* **102**:1558-1566
- BOSI G, SHINN A.P, GIARI L, SIMONI E, PIRONI F, DEZFULI B.S. (2005)** Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum* (Cestoda). *Journal of Fish Disease* **28**, 703-711
- BUNTON T.E, BAKSI S.M. (1988)** Cholangioma in White Perch (*Morone americana*) from the Chesapeake Bay. *Journal of Wildlife Diseases* **24**:137-141
- BURNEAU N, LOMBARDO D, BENDAYAN M. (2000a)** The affinity binding sites of pancreatic bile salt-dependent lipase in pancreatic and intestinal tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **48**:267-276
- BURNEAU N, LOMBARDO D, LEVY E, BENDAYAN M. (2000b)** Roles of molecular chaperones in pancreatic secretion and their involvement in intestinal absorption. *Microscopic Research and Technique* **49**:329-345
- BUSH K.T, GOLDBERG A.L, NIGAM S.K. (1997)** Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 9086-9092
- BYRNE , MAC PHEE , OSTLAND , JOHNSON , FERGUSON . (1998)** Haemorrhagic kidney syndrome of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **21**:81-91
- CATTON M.SC. (1951)** Blood cell formation in certain teleost fish. *Blood* **6**: 39 – 60
- CHICHIARELLI S, FERRARO A, ALTIERI F, EUFEMI M, COPPARI S, GRILLO C, ARCANGELI V, TURANO C. (2007)** The stress protein ERp57/Grp58 binds specific DNA sequences in HeLa Cells. *Journal of Cellular Physiology* **210**: 343-351
- CORBETT E.F, OIKAWA K, FRANCOIS P, TESSIER D.C, KAY C, BERGERON J.J.M, THOMAS D.Y, KRAUSE K-H, MICHALAK M. (1999)** Ca<sup>2+</sup> Regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *Journal of Biological Chemistry* **274**:6203-6211
- DAWE C.J, STANTON M.F, SHWARTZ F.J. (1964)** Hepatic neoplasms in native bottom-feeding fish of deep creek lake, Maryland. *Canadian Research* **24**: 1194 - 1201
- DESSER S.S, LESTER R. (1975)** An ultrastructural study of the enigmatic “rodlet cells” in the white sucker, *Catostomus commersoni* (Lacépède) (Pisces: Catostomidae). *Canadian Journal of Zoology* **53**: 1483-1494
- DEZFULI B.S, CAPUANO S, MANERA M. (1998)** A description of rodlet cells from the alimentary canal of *Anguilla anguilla* and their relationship with parasitic helminths. *Journal of Fish Biology* **53**: 1084-1095
- DEZFULI B.S, GIARI L, KONECNY R, JAEGER P, MANERA M. (2003)** Immunohistochemistry, ultrastructure and pathology of gills of *Abramis brama* from Mondsee, Austria, infected with *Ergasilus sieboldi* (Copepoda). *Disease of Aquatic Organisms* **53**: 257-262
- DEZFULI B.S, SIMONI E, GIARI L, MANERA M. (2006)** Effects of experimental terbuthylazine exposure on the cells of *Dicentrarchus labrax* (L.). *Chemosphere* **64**: 1684-1694
- DEZFULI B.S, CAPUANO S, SIMONI E, GIARI L, SHINN A.P. (2007a)** Histopathological and

- ultrastructural observations of metacercarial infections of *Diplostomum phoxini* (Digenea) in the brain of minnows *Phoxinus phoxinus*. *Diseases of Aquatic Organisms* **75**: 51-59
- DEZFULI B.S, CAPUANO S, SIMONI E, PREVIATI M, GIARI L. (2007b)** Rodlet cells and the sensory systems in zebrafish (*Danio rerio*). *The Anatomical Record* **290**: 367-374
- DEZFULI B.S, GIARI L, SIMONI E, MENEGATTI R, SHINN A.P, MANERA M. (2007c)** Gill histopathology of cultured *Dicentrarchus labrax* (L.) infected with *Diplectanum aequans* (Wagener 1857) Diesing 1958 (Diplectanidae: Monogenea). *Parasitology Research* **100**: 707-713
- DILL K.A, CHAN H.S. (1997)** From levinthal to pathways to funnels. *Nature Structural Biology* **4**:10-19
- DIMICHEFF D.E, FAASSE M.A, MCATEE F.J, PORTIS J.L. (2004)** Endoplasmic reticulum (ER) stress induced by a neurovirulent mouse retrovirus is associated with prolonged BiP binding and retention of a viral protein in the ER. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 33782-33790
- DUTHIE E.S. (1939)** The origin, development and function of the blood cells in certain marine teleosts. *Journal of Anatomy* **73**: 396-384
- ELLIS A.E. (1977)** The leucocytes of fish: A review. *Journal of Fish Biology* **11**:453-491
- ESSER C, ALBERTI S, HOHFELD J. (2004)** Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim. Biophys. Acta, Molecular Cell Research* **1695**: 171-188
- FISHELSON L, BECKER K. (1999)** Rodlet cells in the head and trunk kidney of the domestic carp (*Cyprinus carpio*): Enigmatic gland cells or coccidian parasites. *Naturwissenschaften* **86**: 400-403
- FLYNN G.C, POHL J, FLOCCO M.T, ROTHMAN J.E. (1991)** Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* **353**:726-730
- FLOOD M.T, NIGRELLI R.F, GENNARO J.F. (1975)** Some aspects of the infrastructure of the “Stäbchendrüsenzellen”, a peculiar cell associated with the endothelium of the bulbus arteriosus and with other fish tissues. *Journal of Fish Biology* **7**: 129 – 138
- GIARA L, MANERA M, SIMONI E, DEZFULI B.S. (2007)** Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere* **67**: 1171-1181
- GAO B, ADHIKARI R, HOWATH M, NAKAMURA K, GOLD M.C, HILL A.B, KNEE R, MICHALAK M, ELLIOT T. (2002)** Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity* **16**:99-109
- GRÜNBERG G.W, HAGER G. (1978)** Zur Ultrastruktur der „Stäbchendrüsenzellen“ (rodlet cells, pear-shaped cells) im Bulbus arteriosus des Karpfen, *Cyprinus carpio* L. (Pisces: Cyprinidae). *Anatomischer Anzeiger* **134**: 277-290
- HAMMOND C, HELENIUS A. (1995)** Quality control in the secretory pathway. *Current Opinions of Cell Biology* **7**:523-529
- HELENIUS A. (1994)** How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the cell* **5**:253-265
- HELENIUS A, TROMBETTA E.S, HERBERT D.N, SIMONS J.F. (1997)** Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends in Cell Biology* **7**:193-200
- HERMANN H, HARRIS J.R. (1998)** Intermediate filaments, Subcellular Biochemistry Vol.31, Springer Verlag Plenum Press New York, London
- HIRJI K.N, COURTNEY W.A.M. (1979)** “Pear-shaped” cells in the digestive tract of the perch *Perca fluviatilis* (L.). *Journal of Fish Biology* **15**: 469-472
- HURTLEY S.M, BOLE D.G, HOOVER-LITTY H, HELENIUS H, COPELAND C.S. (1989)** Interactions of misfolded influenza virus Hemagglutinin with Binding Protein (BiP). *Journal of Cell Biology* **108**:2117-2126
- IGER Y, ABRAHAM M. (1997)** Rodlet cells in the epidermis of fish exposed to stressors. *Tissue & Cell* **29**: 431-438
- IMAGAWA , KITAGAWA , UEHARA . (1998)** An association between rodlet cells and the vascular

- endothelial cells in the head kidney of carp, *Cyprinus carpio* L.: ultrastructural observations. *Journal of Fish Diseases* **21**:153-157
- JEURISSEN S.H.M, WAGENHAAR F, MARGA JANSE E. (1999)** Further characterization of M cells in gut-associated lymphoid tissue of the chicken. *Poultry Science* **78**:965-972
- JORDANOVA M, MITEVA N, ROCHA E. (2007)** A quantitative study of the hepatic eosinophilic granule cells and rodlet cells during the breeding cycle of ohrid trout, *Salmo letnica* Kar. (Teleostei, Salmonidae). *Fish & Shellfish Immunology* **23**: 473-478
- JØRGENSEN S.M, AFANSYEV S, KRASNOV A. (2008)** Gene expression analyses in atlantic salmon challenged with infectious salmon anemia virus reveal differences between individuals with early, intermediate and late mortality. *BMC Genomics* **9**:179-195
- KALES S.C, BOLS N.C, DIXON B. (2007)** Calreticulin in rainbow trout: A limited response to endoplasmic reticulum (ER) stress. *Comparative Biochemistry and Physiology* **147**:607-615
- KAUFMAN R.J. (1999)** Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcription and translational controls *Genes Development* **13**: 1211-1233
- KAUFMAN R.J. (2002)** Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *Journal of Clinical Investigation* **110**:1389-1398
- KELLEY W.L, GEORGOPOULOS C. (1993)** Chaperones and protein folding. *Current Opinion in Cell Biology* **4**:984-991
- KIENAST A, PREUSS M, WINKLER M, DICK T.P (2007)** Redox regulation of peptide reciprocity of major histocompatibility complex class I molecules by Erp57 and tapasin. *Nature Immunology* **8**: 864-872
- KOZUTSUMI Y, SEGAL M, NORMINGTON K, GETHING M-J, SAMBROOK J. (1988)** The presence of malformed proteins in endoplasmic reticulum signal the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* **332**:462-464
- KRAMER C.R, POTTER H. (2003)** Rodlet cells in the posterior intestine of embryos and neonates of two poeciliid species. *Journal of Fish Biology* **62**: 1211-1216
- KRAMER C.R, KRAMER A.J, KONOVALOV A. (2005)** Rodlet cell distribution in the gall bladder epithelium of *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Fish Biology* **67**:555-560
- KRAUSE K.-H, MICHALAK M. (1997)** Calreticulin. *Cell* **88**:439-443
- LAGUESSE E. (1895)** Les “Stäbchendrüsenzellen” (M.Plehn) sont des sporozoaires parasites. *Anatomischer Anzeiger* **28**: 414-416
- LEE A.S. (1987)** Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. *Trends in Biochemical Science* **12**: 20-23
- LEE A.S. (1992)** Mammalian Stress Response: induction of glucose-regulated protein family. *Current Opinions in Cell Biology* **4**:267-273
- LEE A.S. (2001)** The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends in Biochemical Science* **26**:504-510
- LEINO R.L. (1974)** Ultrastructure of immature, developing and secretory rodlet cells in fish. *Cell and Tissue Research* **155**: 367-381
- LEINO R.L. (1982)** Rodlet cells in the gill and intestine of *Catostomus commersoni* and *Perca flavescens*: a comparison of their light and electron microscopic cytochemistry with that of mucous and granular cells. *Canadian Journal of Zoology* **60**: 2768-2782
- LEINO R.L. (1996)** Reaction of rodlet cells to a myxosporean infection in kidney of the bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Canadian Journal of Zoology* **74**: 217-225
- LEINO R.L. (2002)** The contractile mechanism and “holocrine” secretion in rodlet cells. 53<sup>rd</sup> Annual Proceeding of the Scandinavian Society for Electron Microscopy, June 12-15, Tampere Finland, pp. 74-76
- LEKNES I.L. (1985)** Fine structure and cytochemistry of the endothelial cells and rodlet cells in the bulbus arteriosus in species of Cichlidae (Teleostei). *Journal of Fish Biology* **28**: 29-36
- LODISH H, BERK A, ZIPURSKY S.L, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL J.E. (2000)** Molecular Cell Biology, 4<sup>th</sup> edition, W.H. Freeman and Company, New York, England

- LIU H, BOWES R.C, VAN DE WATERS B, SILLENCE C, NAGELKERKE J.F, STEVENS J.L. (1997)** Endoplasmic reticulum chaperones Grp78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca<sup>2+</sup> disturbance, and cell death in renal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**:21751-21795
- MICHALAK M, BURNS K, ANDRIN C, MESAELI N, JASS G.H, BUSANN J.L, OPAS M (1996)** Endoplasmic reticulum form of calreticulin modulates glucocorticoid-sensitive gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **271**:29436-29445
- MICHALAK M, CORBETT E.F, MESAELI N, NAKAMURA K, OPAS M. (1999)** Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochemical Journal* **344**:281-292
- MANERA M, SIMONI E, DEZFULI B.S. (2001)** The effect of dexamethasone on the occurrence and ultrastructure of rodlet cells in goldfish. *Journal of Fish Biology* **59**: 1239-1248
- MANERA M, DEZFULI B.S. (2004)** Rodlet cells in teleosts: a new insight into their nature and functions. *Journal of Fish Biology* **65**: 597-619
- MATTEY D.L, MORGAN M, WRIGHT D.E. (1979)** Distribution and development of rodlet cells in the gills and pseudobranch of the bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Biology* **15**: 363-370
- MATTHEW R.C. (1993)** Pathways of protein folding. *Annual Review of Biochemistry* **62**:653-684
- MATTIOLI L, ANELLI T, FAGIOLI C, TACCHETTI C, SITIA R, VALETTI C. (2006)** ER storage diseases: a role for ERGIC-53 in controlling the formation and shape of Russell bodies. *Journal of Cell Science* **119**:2532-2541
- MAZON A.F, HUISING M.O, TAVERNE-THIELE A.J, BASTIAANS J, VERBURG-VAN KEMENADE B.M.L. (2007)** The first appearance of rodlet cells in carp (*Cyprinus carpio* L.) ontogeny and their possible roles during stress and parasite infection. *Fish & Shellfish Immunology* **22**: 27-37
- MCLEAY D.C. & GORDON M.R. (1977)** Leucrit: a simple haematological technique for measuring acute stress in salmonid fish, including stressful concentrations of pulmill effluent. *Journal of Fish Research Board Canadian* **34**:2164-2175
- MENDONÇA I, MATOS E, RODRIGUES G, MATOS P, CASAL G, AZEVEDO C. (2005)** Rodlet cells from the gills and kidneys of two brazilian freshwater fishes: an ultrastructural study. *Brazilian Journal of Morphological Science* **22**(4): 187-192
- MODIN J.C. (1981)** *Microsporidium rhabdophilia* n. sp. from rodlet cells of salmonid fishes. *Journal of Fish Diseases* **4**: 203-211
- MOURIER J.P. (1970)** Structure fine de *rhabdospora thelohani* Henneguy, protiste parasite de *Gasterosteus aculeatus* L. *Parasitology Research* **34**: 198 – 206
- NAKAMURA K, BOSSY-WENZEL E, BURNS K, FADEL M.P, LOZYK M, GOPING I.S, OPAS M, BLEACKLEY C, GREEN D.R, MICHALAK M. (2000)** Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *Journal of Cell Biology* **150**:731-740
- NI M, LEE A.S. (2007)** ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS letters* **581**:3641-3651
- NOLL S, SCHAUB-KUHNEN S. (2000)** Praxis der Immunhistochemie. Urban & Fischer Verlag, München Jena
- OLIVER J.D, RODERICK H.L, LEWELLYN D.H, HIGH S (1999)** ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins Calreticulin and Calnexin. *Molecular Biology of the Cell* **10**:2573-2582
- PARODI, A.J. (2000)** Role of N-linked oligosaccharides endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochemical Journal* **348**: 1-13
- PLEHN M. (1906a)** Über eigentümliche Drüsenzellen im Gefäßsystem und in anderen Organen bei Fischen. *Anatomischer Anzeiger* **28**: 192-203
- PLEHN M. (1906b)** Drüsenzellen oder Parasiten? *Anatomischer Anzeiger* **29**: 152-157
- REITE O.B. (1997)** Mast cells/eosinophilic granule cells of Salmonids: Staining properties and responses to noxious agents. *Fish and Shellfish Immunology* **7**: 567-584
- REITE O.B. (2005)** The rodlet cells of teleostean fish: their potential role in host defence in relation to

- the role of mast cells/eosinophilic granule cells. *Fish & Shellfish Immunology* **19**: 253-267
- REITE O.B, EVENSEN Ø. (2006)** Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish & Shellfish Immunology* **20**: 192-208
- ROBERTS R.J, SCHLOTFELDT H.J. (1985)** Grundlagen der Fischpathologie. Verlag Paul Parey. Berlin. Hamburg.
- ROTH J, HIN-FAI YAM G, FAN J, HIRANO K, GAPLOVSKA-KYSELA K, LE FOURN V, GUHL B, SANTIMARIA R, TOROSI T, ZIAK M, ZUBER C. (2008)** Protein quality control: the who's who, the where's and therapeutic escapes. *Histochemical Cell Biology* **129**:163-177
- RUITSHAUSER J, SPIESS M. (2002)** Endoplasmic reticulum storage diseases. *Swiss Medical Weekly* **132**:211-222
- SATOH T, ROSS C.A, VILLA A, SUPATTAPONE S, POZZAN T, SNYDER S.H, MELDOLESI J. (1990)** The Inositol 1,4,5,-Triphosphate receptor in cerebellar Purkinje cells: Quantitative immunogold labelling reveals concentration in an ER subcompartment. *Journal of Cell Biology* **111**:615-624
- SCHMACHTENBERG O. (2007)** Epithelial sentinels or protozoan parasites? Studies on isolated rodlet cells on the 100<sup>th</sup> anniversary of an enigma. *Revista Chilena de Historia Natural* **80**: 55-62
- SCHUWERACK P.-M.M, LEWIS J.W, HOOLE D, MORLEY N.J. (2001)** Ammonia-induced cellular and immunological changes in juvenile *Cyprinus carpio* infected with the blood fluke *Sanguinicola inermis*. *Parasitology* **122**:339-345
- SILPHADUANG U, COLORNI A, NOGA E.J. (2006)** Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish. *Diseases of Aquatic Organisms* **72**: 241-252
- SMITH S.A, CACECI T, MAREI H.E-S, HABBACK H.A. (1995)** Observation on rodlet cells found in the vascular system and extravascular space of angelfish (*Pterophyllum scalare scalare*). *Journal of Fish Biology* **46**: 241-254
- SUN F.-C, WEI S, LI C.-W, CHAO C.-C, LAI Y.-K. (2006)** Localization of Grp78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochemical Journal* **396**:31-39
- THELOHAN P. (1892)** Sur des sporozoaires indéterminés parasites des poissons. *Journal d' Anatomie et Physiologie Paris* **28**: 163-171
- VIEHBERGER G, BIELEK E. (1982)** Rodlet cells: Gland cell or protozoon? *Experientia* **38**: 1216-1218
- VALETTI C, GROSSI C.E, MILSTEIN C, SITIA R. (1991)** Russell bodies: A general response of secretory cells to synthesis of a mutant immunoglobulin which can neither exit from, nor be degraded in, the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* **115**:983-994
- VIGLIANO F.A, BERMÚDEZ J.M, QUIROGA M.I. (2008)** Development of rodlet cells in the gut of turbot (*Psetta maxima* L.): relationship between their morphology and S100 protein immunoreactivity. *Fish and Shellfish Immunology*, accepted manuscript, doi:10.1016/j.fsi.2008.02.016
- VITADELLO M, COLPO P, GORZA L. (1998)** Rabbit cardiac and skeletal myocytes differ in constitutive and inducible expression of the glucose-regulated proteins Grp94. *Biochemical Journal* **332**:351-359
- WEISS S, BURROWS, P.D, MEYER J, WABL M.R. (1984)** A Mott cell hybridoma. *European Journal of Immunology* **14**:744-748
- WILSON J.A.F, WESTERMAN R.A. (1967)** The fine structure of the olfactory mucosa and nerve in the teleost *Carassius auratus* L. *Zeitschrift für Zellforschung* **83**: 196 - 206
- WILLIAMS D.B. (2006)** Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* **119**:615-623
- WINCKLER G, PORTELA-GOMES F. (1962)** Remarques sur les granulocytes basophiles "en gerbe" chez certain poissons du lac lèman et du neuchatel. *Bulletin de l'Association des Anatomistes XLVIII* : 15-19

## 6. Curriculum vitae

Name **Lugmayr Simone**

Geburtstag,  
Geburtsort 12. April 1983 in Wien

### *Schulbildung*

1989-1993: Volksschule Wittelsbachstrasse 2B  
1993-2001: Wirtschaftskundliches Realgymnasium Kleine Sperlgasse 2c –  
Matura

### *Universitärer Werdegang*

Seit 1. Oktober 2001: Diplomstudium der Biologie mit Schwerpunkt Zoologie an der  
Universität Wien

März 2007 bis Mai 2008: Diplomarbeit „*Immunzytochemische Untersuchungen an den  
Rodletzellen bei Cyprinidae (Teleostei, Pisces) zur Aufklärung  
ihrer umstrittenen Abwehrfunktion*“ am Zentrum für Anatomie  
und Zellbiologie der medizinischen Universität Wien

14. Juni 2007: Teilnahme an der „Summer-Conference“ des Zentrums für  
Anatomie und Zellbiologie; „The rodlet cells of the teleosts:  
Immunofluorescence Observations on the cytoskeleton and on the  
chaperones of the endoplasmic reticulum“

März 2007 bis Februar 2009: Angestellt als Tutorin an der Abteilung für Kern,  
Entwicklungsbiologie und funktioneller Mikroskopie der  
medizinischen Universität Wien

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. Edith Bielek für die Vergabe der Diplomarbeit, für die ausgezeichnete Betreuung und für die vielen unterstützenden Diskussionen während des gesamten Arbeitsprozesses bedanken. Weiters danke ich Fr. Erika Vanyek-Zavadil für die Einführung in die Thematik, ihre technische Hilfe und Unterstützung während der histologischen Probenentnahme und Aufbereitung, Fr. Marianne Fliesser für die Antikörper und die guten Ratschläge in der Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie und Fr. Ing. Marlene Almeder, dass ich jederzeit das Fluoreszenzmikroskop benutzen durfte. Zudem möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. Reginald Bittner für die Bereitstellung des Phalloidins bedanken. Großen Dank schulde ich außerdem meinen Eltern und meiner Schwester für ihre Liebe, ihre Unterstützung und ihren Rückhalt, den ich während meines Studiums erfahren habe.