

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	11
2. Literaturübersicht	12
2.1 Haut	12
2.2 Hauttumoren beim Pferd	13
2.2.1 Equines Sarkoid	13
2.2.2 Papillom	15
2.2.3 Melanom	15
2.2.4 Plattenepithelkarzinom	16
2.2.5 Fibrosarkom	17
2.3 Erkennen von Neoplasien durch das Immunsystem	18
2.3.1 Tumorantigene	18
2.3.2 Prinzipien der Tumorabwehr	19
2.4 Antigen-präsentierende Zellen (APCs)	20
2.4.1 Makrophagen	20
2.4.2 Dendritische Zellen (DCs)	20
2.4.3 B-Zellen	22
2.5 Antigen-reaktive Zellen	22
2.5.2 T-Lymphozyten	22
2.5.2.1 CD4-positive T-Lymphozyten	23
2.5.2.2 CD8-positive T-Lymphozyten	23
2.5.2.3 NK- (Natural killer-) Zellen	24
2.5.2.4 B-Zellen	24
2.6 Tumor-escape-Mechanismus nach Matzinger	25
2.7 Immunzell-spezifische Antigene	25
2.7.1 CD1-Antigen	26
2.7.2 CD3-Antigen	26
2.7.3 CD68-Antigen	27
2.7.4 CD79a-Antigen	27
2.7.5 S100-Familie	27
3. Eigene Untersuchungen	29
3.1 Material und Methoden	29
3.1.1 Probenmaterial des Instituts für Veterinär-Pathologie	29

Inhaltsverzeichnis

3.1.2 Sammlung von Kontrollproben	29
3.1.3 Einbettung der Gewebeproben für Paraffinschnitte	29
3.1.4 Gefrierproben	29
3.1.4.1 Gefrierschnitte	29
3.1.5 Schnittherstellung	30
3.1.6 Histologie	30
3.1.6.1 Melanin-Entfärbung / -Bleichung	30
3.1.6.2 H&E Auswertung	30
3.1.7 Immunhistochemie	31
3.1.7.1 APAAP	31
3.1.7.2 Pronase E	31
3.1.7.4 Mikrowellenvorbehandlung	31
3.1.7.5 BSA (Biotin-Streptavidin)-Methode	32
3.1.7.6 Kontrollen	33
3.1.8 Molekularpathologischer Ansatz	34
3.1.8.1 Isolierung von equinen mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC)	34
3.1.8.2 Zellaktivierung	35
3.1.8.3 RNA – Extraktion	35
3.1.8.4 Reverse Transkription (RT)	35
3.1.8.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)	36
3.1.8.6 Agarosegelelektrophorese	37
3.1.8.7 Präparative Agarosegelelektrophorese mit DNA Isolierung	37
3.1.8.8 Klonierung	38
3.1.8.8.1 Ligation	38
3.1.8.8.2 Präparation kompetener <i>E. coli</i>	38
3.1.8.9 Transformation	38
3.1.8.10 Blau-Weiß-Selektion	39
3.1.8.11 Plasmid Präparation - Miniprep®	39
3.1.8.12 Restriktionsenzym-Verdau	40
3.1.8.13 Glyceroldauerkulturen	40
3.1.8.14 Sequenzierung und BLAST	40
3.1.9 In-situ Hybridisierung	41
3.1.9.1 Sondenherstellung	41
3.1.9.1.1 Transkription mit ³⁵ S-UTP	41

Inhaltsverzeichnis

3.1.9.1.2 Messung von [³⁵ S] im Szintillationszähler (Beckman® LS5000 TD)	42
3.1.9.2 In-situ-Hybridisierung (Paraffinschnitte)	43
3.1.9.3 Waschung nach Hybridisierung	46
3.1.9.4 Beschichtung der Objekträger mit Fotoemulsion Ilford G 5	46
3.1.9.5 Entwicklung	47
3.1.9.6 Kontrolle der molekularbiologischen Methoden	47
3.1.10 Grading	48
4. Ergebnisse	49
4.1 Häufigkeit equiner Neoplasien im Sektionsbereich	49
4.2 Häufigkeit equiner Neoplasien im Biopstatbereich (1995-2000)	49
4.3 Immunhistochemische Kontrollen	50
4.3.2 Bovines MHCII	51
4.4 Sarkoide	51
4.5 Melanome	53
4.6 Papillome	55
4.7 Plattenepithelkarzinome	57
4.8 Fibrosarkome	59
4.9 Molekularbiologischer Nachweis von equinem CD68 und CD1	61
4.9.1 Equines CD68	61
4.9.1.1 CD68 Sondenherstellung mit ³⁵ S-UTP	64
4.9.1.2 In-situ Hybridisierung	65
4.9.1.2.1 Sarkoid	66
4.9.1.2.2 Melanom	67
4.9.1.2.3 Papillom	67
4.9.1.2.4 Plattenepithelkarzinom	68
4.9.1.2.5 Fibrosarkom	69
4.9.1.2.6 Zusammenfassendes Grading der CD68 RNA-Hybridisierung	69
4.9.2 Equines CD1	70
4.9.2.1 CD1a Sondenherstellung mit ³⁵ S-UTP	75
4.9.2.2 In-situ Hybridisierung	76
5. Diskussion	77
5.1 Häufigkeit von equinen Neoplasien	77
5.1.1 Neoplasien beim Pferd	77
5.1.2 Relative Häufigkeit einzelner Entitäten	77

Inhaltsverzeichnis

5.2 Phänotypisierung equiner Hauttumore	79
5.3 Immunhistochemischer Nachweis von Immunzellpopulationen in equinen Tumoren	79
5.3.1 Methodik der Immunhistochemie	79
5.3.2 Molekularpathologische Methodik	80
5.4 Makrophagen-Nachweis	81
5.4.1 MAC387	82
5.4.2 CD68	82
5.5 CD1	83
5.6 Equine Neoplasien und Immunzellpopulationen	83
5.6.1 Sarkoide	83
5.6.2 Papillome	84
5.6.3 Melanome	84
5.6.4 Plattenepithelkarzinome	84
5.6.5 Fibrosarkome	85
5.7 Beurteilung der Immunzellbefunde	85
5.8 Ausblicke	86
6. Zusammenfassung	88
7. Summary	90
8. Literaturverzeichnis	92
9.1 Anhang I (Lösungen für die Immunhistochemie)	117
9.2 Anhang II Lösungen der RT-PCR	120
9.3 Anhang III Lösungen der in-situ Hybridisierung	122
9.4 Anhang IV - Probenmaterial	128
10. Eigene publizierte Ergebnisse	134
11. Selbständigkeitserklärung	135
12. Danksagung	136
13. Lebenslauf	138