

Methode zur simultanen Visualisierung von alkalischer Phosphatase und Peroxidase mittels Energiefilter-Transmissions- Elektronenmikroskopie

Von Dipl.-Ing. Christoph Radcke

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
-Dr.-Ing.-

an der Fakultät III -Prozesswissenschaften-
der Technischen Universität Berlin

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Dr. e.h. F. Meuser

Gutachter: Prof. Dr. med. Rüdiger W. Veh

Gutachter: Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 24. September 2002

Berlin 2002
D 83

I. Einleitung:

I. 1.	Immunzytochemische Mehrfachmarkierungen auf ultrastruktureller Ebene	1
I. 2.	Alkalische Phosphatase als mögliches neues Markerenzym	4
2.1.	Lichtmikroskopische immunenzymatische Doppelmarkierung mit alkalischer Phosphatase und Peroxidase	4
2.2.	Die Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik für alkalische Phosphatase	4
2.3.	Immunenzymatische Doppelmarkierung mit der modifizierten Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik für alkalische Phosphatase und dem Peroxidase-DAB-System	6
I. 3.	Energiefiltertransmissionselektronenmikroskopie (EFTEM)	7
3.1.	Theoretische Überlegungen zu EFTEM	7
3.2.	Zusätzliche potenzielle Marker für immunzytochemische Untersuchungen mit EFTEM	12
I. 4.	Das Modellsystem Bulbus olfaktorius	13
I. 5.	Ziel der Arbeit	15

II. Material und Methoden: 16

II. 1.	Allgemeines	16
1.1.	Chemikalien und Pufferlösungen	16
1.2.	Wasserqualität	16
II. 2.	Gewebe	17
2.1.	Tiere, Perfusion und Lagerung des Gewebematerials	17
2.2.	Modellgewebe Superose-Kir6.2.His-Tag-Antigen-Beads in Agarose	18
2.2.1.	Beladen der Superosebeads mit Kir6.2.His-Tag-Antigen	18
2.2.2.	Violette Superose-Referenzbeads mit Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)	19
2.2.3.	Superose-Kir6.2.His-Tag-Antigen-Beads in Agarose	19

II. 3.	Lichtmikroskopie	20
3.1.	Kryostatschnitte	20
3.2.	Objektträgerbeschichtung	20
3.3.	Histochemische Färbungen	21
3.3.1.	Kresylviolett	21
3.3.2.	Toluidinblau	21
3.4.	Enzymzytochemische Färbungen endogener alkalischer Phosphatase	22
3.4.1.	Endogene alkalische Phosphatase mit BCIP/NBT	22
3.4.2.	Endogene alkalische Phosphatase mit Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Methode nach Halbhuber	23
3.5.	Immunzytochemie	24
3.5.1.	Antikörperinkubation	24
3.5.2.	Streptavidin-markierte alkalische Phosphatase aus dem Kalbsdarm	25
3.5.3.	ABC-Peroxidase-Komplex	26
3.5.4.	Färbungen	27
3.5.4.1.	BCIP/NBT-Technik für alkalische Phosphatase	27
3.5.4.2.	Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ - Methode für alkalische Phosphatase nach Halbhuber	27
3.5.4.3.	Optimierung der Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Methode für alkalische Phosphatase für die Immunzytochemie	27
3.5.4.3.1.	Biochemische Untersuchungen	27
3.5.4.3.2.	Immunzytochemische Optimierung der Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Methode	29
3.5.4.4.	Das optimierte Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Protokoll für alkalische Phosphatase in der Lichtmikroskopie	31
3.5.4.5.	Färbung des Peroxidase-ABC-Komplexes für die Lichtmikroskopie	33
3.5.4.6.	Simultane Doppelmarkierung von Peroxidase und alkalischer Phosphatase auf lichtmikroskopischem Niveau	34
3.6.	Lichtmikroskopische Auswertung	35

II. 4.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	36
4.1.	Vibratonschnitte	36
4.2.	Pre-Embedding-Immunzytochemie	36
4.2.1.	Antikörperinkubation	36
4.2.2.	Streptavidin-markierte alkalische Phosphatase aus dem Kalbsdarm	38
4.2.3.	ABC-Peroxidase-Komplex	38
4.2.4.	Färbungen der Markersysteme für die Elektronenmikroskopie	39
4.2.4.1.	Optimierte Cer-Phosphat--H ₂ O ₂ -Methode für alkalische Phosphatase in der Elektronenmikroskopie	39
4.2.4.2.	Färbung des Peroxidase-ABC-Komplexes für die Elektronenmikroskopie	40
4.2.4.3.	Simultane immunenzymatische Doppelmarkierung von Peroxidase und alkalischer Phosphatase für die Elektronenmikroskopie	41
4.2.4.4.	Silberverstärkte Nano-Gold-markierte Zweitantikörper	43
4.2.5.	Aufarbeitung für die Elektronenmikroskopie	44
4.2.5.1.	Osmiumfixierung, Entwässerung und Einbettung	44
4.2.5.2.	Ultradünnschnitte, Grids und Kontrastierung	45
4.3.	Post-Embedding-Immunzytochemie	46
4.3.1.	Blockeinbettung in Araldit	46
4.3.2.	Ultradünnschnitte	47
4.3.3.	Post-Embedding-Markersysteme	48
4.3.3.1.	Silberverstärkte Nano-Gold-markierte Zweitantikörper	48
4.3.3.2.	Ferritin-Protein-A-Markierung	49
4.4.	Weitere mögliche getestete Marker	50
4.4.1.	Dextran-umhülltes Eisenoxid (USPIO)	50
4.4.2.	Markierung der Superose-Kir6.2.His-Tag-Antigen-Beads mit Nickel(II)-Nitrilotriacetylsäure-Glutathion-Gold-Kolloiden (Ni(II)-NTA-GSH-Gold)	51
4.5.	Elektronenmikroskopische Auswertung	52

III. Ergebnisse:	53
III. 1. Lichtmikroskopie	53
1.1. Konventionelle Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik für die Enzymzytochemie von endogener alkalischer Phosphatase	53
1.2. Immunenzymatische Einfachmarkierung von alkalischer Phosphatase	55
1.2.1. Konventionelle Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik in der Immunzytochemie	55
1.2.2. Optimierung der konventionellen Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik für die Immunzytochemie	58
1.2.2.1. Puffersysteme und Substrate	58
1.2.2.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen	63
1.2.2.3. Lichtmikroskopische Kontrastverstärkung	68
1.2.2.4. Vergleich der konventionellen mit der modifizierten Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik für alkalische Phosphatase auf lichtmikroskopischer Ebene	68
1.3. Simultane immunenzymatische Doppelmarkierung von Tyrosinhydroxylase und Serotonin auf lichtmikroskopischer Ebene mittels optimierter Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik und ABC-DAB-Methode	72
1.3.1. Das entwickelte Doppelmarkierungsprotokoll	72
1.3.2. Simultane Doppelmarkierung mit der modifizierten Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik und der ABC-DAB-Methode für die Lichtmikroskopie	74
III. 2. Elektronenmikroskopie	76
2.1. Modifizierte Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik für die Elektronenmikroskopie	76
2.2. Simultane immunenzymatische Doppelmarkierung von Tyrosinhydroxylase und Serotonin auf ultrastruktureller Ebene mittels optimierter Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik und ABC-DAB-Methode	80
2.3. Andere getestete Marker für weiterführende immunzytochemische Mehrfachmarkierungen auf ultrastruktureller Ebene mittels EFTEM	84
2.3.1. Silberverstärkte Nano-Gold markierte Zweitantikörper	84
2.3.2. Ferritin-markiertes Protein A	86
2.3.3. Dextran-umhülltes superparamagnetisches Eisenoxid (USPIO)	88
2.3.4. Nickel(II)-Nitrilotriacetylsäure-Glutathion-Gold-Kolloide (Ni(II)-NTA-GSH-Gold)	90
III. 3. Weitere Anwendungsmöglichkeiten der modifizierten Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik	92

<u>V. Diskussion:</u>	93
IV. 1. Die simultane Mehrfachmarkierung auf elektronenmikroskopischem Niveau ist limitiert	94
1.1. Post-Embedding	94
1.2. Pre-Embedding	95
IV. 2. Energiefilternde Transmissionselektronenmikroskopie (EFTEM)	97
2.1. Identifizierung und Lokalisation des Cer-Präzipitates der alkalischen Phosphatase-Reaktion mittels EFTEM	97
2.2. Cer, ein optimales Element für die immunzytochemische Visualisierung von alkalischer Phosphatase mit EFTEM	100
2.3. Modifizierung der Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik für die Immunzytochemie	102
2.4. Eine Antigenquantifizierung mit der Cer-Phosphat-H ₂ O ₂ -Technik scheint möglich	105
2.5. Weitere mögliche Marker für eine auf EFTEM basierende Visualisierung	105
IV. 3. Simultane immunenzymatische Visualisierung von Tyrosinhydroxylase und Serotonin im Bulbus olfaktorius der Ratte	106
3.1. Immunenzymatische Doppelmarkierung	106
3.2. Immunenzymatische Doppelmarkierung des Modellsystems Bulbus olfaktorius	107
IV. 4. Ausblick	109
<u>V. Zusammenfassung:</u>	111
<u>VI. Anhang:</u>	113
VI. 1. Literaturverzeichnis	113
VI. 2. Abbildungsverzeichnis	123
VI. 3. Abkürzungsverzeichnis	126
VI. 4. Publikationen zum Thema der Arbeit	130
4.1. Veröffentlichung zum Thema der Arbeit	130
4.2. Posterbeitrag zum Thema der Arbeit	130
VI. 5. Lebenslauf	131
VI. 6. Danksagung	132
VI. 7. Erklärungen an Eides statt	133

I. Einleitung

1. Immunzytochemische Mehrfachmarkierungen auf ultrastruktureller Ebene

Für ein detailliertes Verständnis der molekularen und funktionellen Anatomie neuronaler Erregungskreise ist es notwendig, die ultrastrukturelle Lokalisation und die räumliche Beziehung unterschiedlicher Moleküle der Signaltransduktion zueinander zu untersuchen. Um dieses Ziel zu erreichen, ist die simultane Visualisierung verschiedener Antigene wie z. B. Neurotransmitter, Rezeptoren, Transporter und Ionenkanäle im Gewebe notwendig. In der Immunzytochemie werden Antikörper gegen diese Antigene mit dem Gewebsschnitt inkubiert. Die Sichtbarmachung der entsprechenden Erstantikörper wird dann über markierte Zweitantikörper vollzogen (schematisch für Enzymmarkierung in Abb. 1 A).

Mit klassischen Methoden der immunzytochemischen Elektronenmikroskopie ist es sehr schwer, eine Färbung mit mehr als zwei verschiedenen Markern zu etablieren. Dies gilt besonders für Pre-Embedding-Techniken, wobei fast ausschließlich die Peroxidase-Diaminobenzidin(DAB)/Osmium-Technik als immunenzymatische Färbemethode zur Verfügung steht. Das hierfür eingesetzte Enzym Meerrettichperoxidase oxidiert in Verbindung mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat (Diaminobenzidin, DAB), das am Ort der Oxidation niederschlägt und dadurch eine Markierung bewirkt (Su-Ming et al, 1981; Straus, 1982; Trojanowski et al, 1983; Kosaka et al, 1986; Levy et al, 1986; Grumbach und Veh, 1995). Immunenzymatische Färbetechniken haben den Vorteil einer möglichst großen Verstärkung des Signals und somit einer höheren Sensitivität. Zum einen kann dies durch die Verstärkung mit Hilfe von Avidin-Biotin-Systemen (Avidin-Biotin-Complex, ABC; Abb. 1 B, C; Su-Ming et al, 1981; Grumbach und Veh, 1995) geschehen, und zum anderen kann die Aktivität des Enzyms über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten und so die Menge an Präzipitat über die Zeit variiert werden.

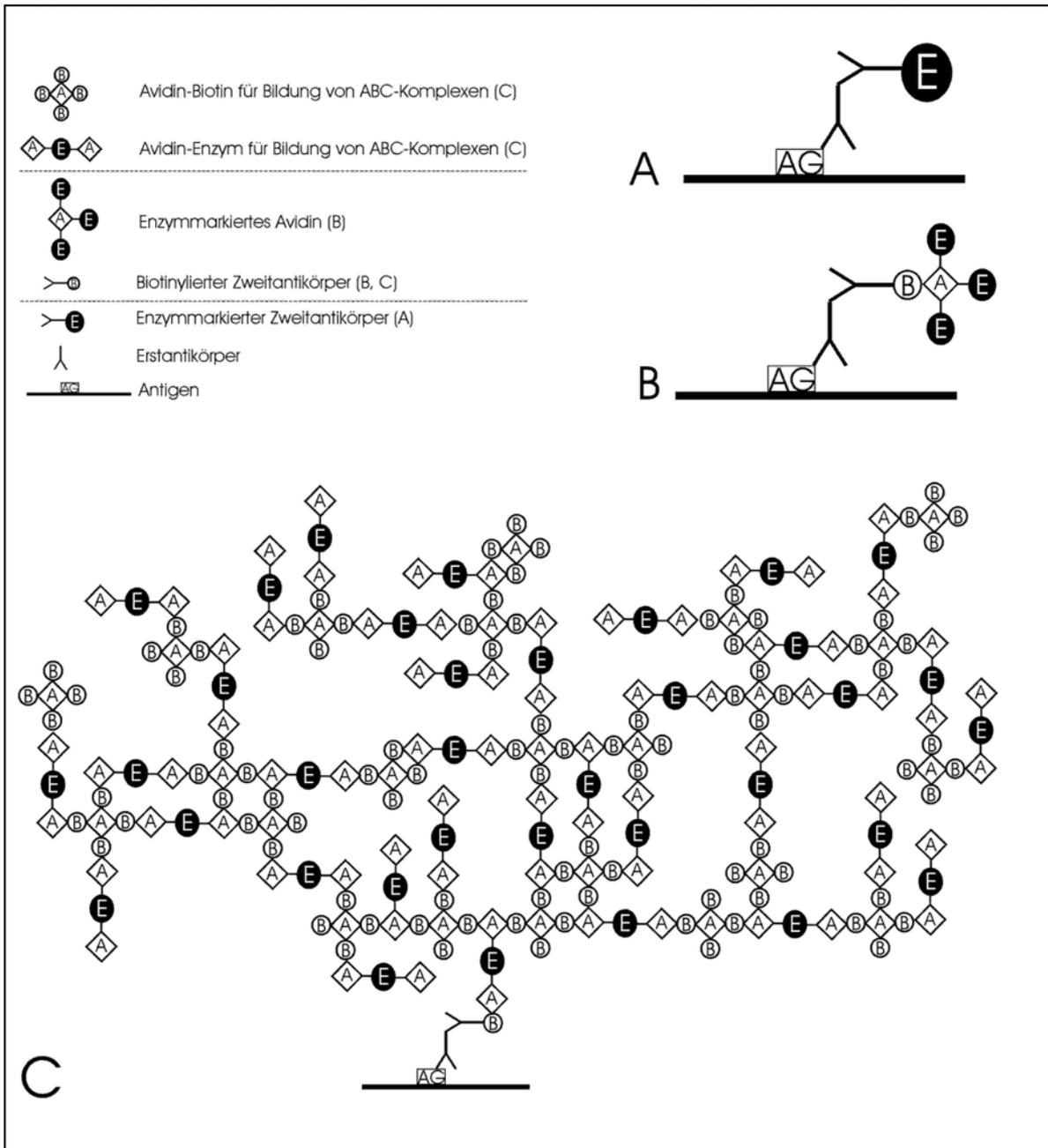


Abbildung 1: Schematische Darstellung immunzytochemischer Markierungen.

Eine immunzytochemische Einfachmarkierung über eine Antigen-Antikörper-Reaktion und einer zweiten Antigen-Antikörper-Reaktion ist schematisch in A dargestellt, wobei der Zweitantikörper einen Marker trägt. Eine Verstärkung ist über einen biotinylierten Zweitantikörper und einem gelabelten Avidinderivat möglich (B). Eine Markierung des biotinylierten Zweitantikörpers über den ABC-Komplex bietet die Möglichkeit einer noch größeren Verstärkung der Markierung (C). (E - Markerenzym, A - Avidin, B - Biotin, AG - Antigen)

Die Möglichkeit einer elektronenmikroskopischen Doppelmarkierung bietet die Peroxidase-DAB/Osmium-Technik als immunenzymatische Färbung in Kombination mit der Silberverstärkung von Nano-Gold-markierten Sekundärantikörpern als zweite Markierung (Burry et al, 1992; Martone et al, 1992; Laube et al, 1996; Erhard et al, 1996). Hierbei werden über ein Entwicklungsreagenz Silberionen an die Oberfläche des Nano-Gold-Partikels angelagert.

Eine weitere Möglichkeit der Doppelmarkierung bietet die Post-Embedding-Technik mit Zweitantikörpern, welche mit Goldkolloidpartikeln unterschiedlicher Größe markiert sind (Wenzel HJ et al, 1997; Wenzel HJ et al, 2000). Im Fall einer Post-Embedding-Markierung wird das Gewebe nach der Resineinbettung und dem Ultradünnschneiden mit den entsprechenden Antikörperlösungen inkubiert. Diese Methode kann auch zur Dreifachmarkierung eines zuvor im Pre-Embedding-Verfahren zweifachgefärbten Schnittes eingesetzt werden. Sehr viele Antigene besitzen jedoch Epitope, die sensitiv gegenüber einer Resineinbettung sind. Diese Epitope werden während der Einbettung zerstört oder maskiert und stehen somit der immunzytochemischen Untersuchung mit Post-Embedding-Techniken nicht mehr zur Verfügung. Aus diesem Grund sind die Möglichkeiten der immunzytochemischen Mehrfachmarkierungen auf ultrastruktureller Ebene durch Post-Embedding-Techniken stark limitiert. Des Weiteren haben diese kolloidalen Marker den Nachteil, dass sie aufgrund ihrer Größe (zwischen 5-20 nm) und einer daraus resultierenden sterischen Hinderung schlecht zum Ort der Antikörperbindung diffundieren. Eine Mehrfachmarkierung durch Antikörper mit Kolloiden verschiedener Größen ist folglich durch eine zunehmende sterische Hinderung mit steigendem Durchmesser der Partikel nur schwer auswertbar.

2. Alkalische Phosphatase als mögliches neues Markerenzym

2.1. Lichtmikroskopische immunenzymatische Doppelmarkierung mit alkalischer Phosphatase und Peroxidase

Auf lichtmikroskopischem Niveau ist eine simultane immunenzymatische Doppelmarkierung einfacher zu realisieren als auf ultrastruktureller Ebene. Das braune DAB-Reaktionsprodukt der Peroxidase kann mit dem blauen Präzipitat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indiolphosphat/Nitro-Blue-Tetrazolium (BCIP/NBT) der alkalischen Phosphatase kombiniert werden. Dieser immunenzymatische Niederschlag ist, wie die meisten Reaktionsprodukte der alkalischen Phosphatase, unbrauchbar für die Elektronenmikroskopie. Da das Präzipitat alkohollöslich ist, würde die Markierung während der Dehydrierung des Gewebes verloren gehen oder sich diffus um den Ort der Antikörperbindung verteilen. Des Weiteren weisen die Produkte der alkalischen Phosphatase eine unzureichende oder unbekannte Elektronendichte auf. Eine Methode für die immunzytochemische Detektion von alkalischer Phosphatase auf elektronenmikroskopischer Ebene muss demnach ein alkoholunlösliches und elektronendichtes Reaktionsprodukt liefern.

2.2. Die Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für alkalische Phosphatase

Die klassische Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode, in der Literatur bereits für endogene alkalische Phosphatase beschrieben, liefert ein alkoholunlösliches elektronendichtes Präzipitat (Robinson und Karnovsky, 1983; van Goor et al, 1989; Halbhuber et al 1992, 1994; van Noorden et al, 1993). Bei dieser Reaktion fällt das Cer mit anorganischem Phosphat aus, welches mittels Hydrolyse von Phosphomonoestern wie para-Nitrophenylphosphat oder β -Glycerophosphat durch die alkalische Phosphatase freigesetzt wird. Hierbei entsteht ein schwer lösliches aber unsichtbares Cer(III)-Phosphohydroxid. Dieses Reaktionsprodukt kann mittels Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in ein sichtbar gelbes und noch schwerer lösliches Cer(IV)-Phosphohydroperoxid konvertiert werden (Tab. 1). Für lichtmikroskopische Untersuchungen kann mittels DAB ein weiteres, dunkelbraunes und daher kontrastreicheres Präzipitat auf das Cer(IV)-Phosphohydroperoxid niedergeschlagen werden.

Erste Versuche zeigten, dass diese Methode aufgrund zu geringer Sensitivität nicht ohne weiteres für immunzytochemische Untersuchungen anwendbar ist. Demnach war die Erarbeitung eines neuen Protokolls durch eine Modifikation der konventionellen Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode notwendig.

(1)	<u>alkalische Phosphatase</u> p-Nitrophenylphosphat + H₂O → p-Nitrophenol + PO₄³⁻
(2)	<u>Cer-Präzipitation</u> x Ce³⁺ + y PO₄³⁻ + z OH⁻ → Ce(III)_x(OH)_z(PO₄)_y Cer fällt mit dem durch die alkalische Phosphatase freigesetzten orto-Phosphat zu einem unsichtbaren Cer(III)-Phosphohydroxid aus.
(3)	<u>Cer-Oxidation und Visualisierung</u> Ce(III)_x(OH)_z(PO₄)_y + n H₂O₂ → Ce(IV)_x(OH)_{z-n}(OOH)_n(PO₄)_y + n H₂O Das entstehende gelbe Cer(IV)-Phosphohydroperoxid ist ein alkoholunlösliches und elektronendichtes Präzipitat.
(4)	<u>Diaminobenzidin(DAB)-Verstärkung (Präzipitation)</u> Ce(IV)_x(OH)_{z-n}(OOH)_n(PO₄)_y + DAB → DAB (oxidiert) Das Cer(IV)-Phosphohydroperoxid oxidiert DAB, welches als dunkles Präzipitat immunpositive Strukturen markiert. Diese Verstärkung ist besonders für die Lichtmikroskopie geeignet.

Tabelle 1: Chemie der immunzytochemischen Markierung mit Cer durch alkalische Phosphatase (modifiziert nach Halhuber et al, 1992).

Die alkalische Phosphatase setzt Phosphat frei (1), welches mit Cer(III) zu einem schwer löslichen unsichtbaren Cer(III)-Phosphohydroxid ausfällt (2). Dieses Reaktionsprodukt kann mittels H₂O₂ in ein sichtbares gelbes Cer(IV)-Phosphohydroperoxid konvertiert werden (3). Für die Lichtmikroskopie kann mittels DAB ein weiteres kontrastreiches Präzipitat auf das Cer(IV)-Phosphohydroperoxid niedergeschlagen werden (4).

Um diese Technik für immunzytochemische licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen heranziehen zu können, ist es notwendig, die Reaktionsbedingungen zu modifizieren. Das Präzipitat der alkalischen-Phosphatase-Reaktion muss eine hinreichende Intensität der Färbung und eine gute Lokalisation nicht weit vom Ort der Antikörperbindung aufweisen.

2.3. Immunenzymatische Doppelmarkierung mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für alkalische Phosphatase und dem Peroxidase-DAB-System

Die Entwicklung einer immunenzymatischen Doppelmarkierung mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik setzt voraus, dass sich die beiden enzymatischen Reaktionen nicht gegenseitig stören und beeinflussen. Des Weiteren gibt es auf ultrastruktureller Ebene keine Möglichkeit, die korrespondierenden Präzipitate der alkalischen Phosphatase und der Peroxidase mittels konventioneller Transmissionselektronenmikroskopie zu unterscheiden. Durch eine element-spezifische Visualisierung des Cers mittels Energiefilter-Transmissionselektronenmikroskopie (EFTEM) könnten die beiden korrespondierenden Präzipitate, Cer(IV)-Phosphohydroperoxid und DAB/Osmium jedoch differenziert betrachtet werden. Bei einer erfolgreichen Modifikation dieser Anwendung und in Kombination mit der Peroxidase-DAB-Technik kann die Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode für die alkalische Phosphatase in Verbindung mit EFTEM das Spektrum der möglichen Methoden für die immunzytochemische Mehrfachmarkierung auf elektronenmikroskopischer Ebene erheblich erweitern.

3. *Energiefiltertransmissionselektronenmikroskopie (EFTEM)*

3.1. Theoretische Überlegungen zu EFTEM

Bei der energiefilternden Transmissionselektronenmikroskopie entsteht, wie auch bei der konventionellen Transmissionselektronenmikroskopie (kTEM), die Abbildung durch Elektronenstreuung im Präparat. Im kTEM werden die in einem großen Streuwinkel gestreuten Elektronen über die Objektivaperturblende ausgeblendet und erzeugen so den Kontrast (Abb. 2 B). Diese ausgeblendeten Elektronen sind hauptsächlich elastisch gestreute Elektronen, welche aufgrund Coulombscher Wechselwirkungen zwischen Atomkern und Elektron eine Ablenkung erfahren haben. Sie verlieren während ihres Fluges durch das Präparat, wie auch die ungestreuten Elektronen (Abb. 2 A), keine Energie.

EFTEM beruht auf der Abbildung von Primärelektronen, die auf ihrem Weg durch das Präparat Energie verloren haben. Diese inelastische Streuung basiert auf der Wechselwirkung des Primärelektrons mit einem Sekundärelektron im Präparat (Abb. 2 C). Das Primärelektron trifft auf ein Elektron einer Elektronenschale eines Probenatoms, ionisiert das Atom und verliert so einen Energiebetrag (Ionisierungsenergie). Dieser Energieverlust ist spezifisch für Elektronen einer bestimmten Elektronenschale eines Elements. Passieren die Elektronen des Primärelektronenstrahls eine definierte Struktur des Schnittes mit einer hohen Konzentration eines bestimmten Elementes, so verliert ein Teil dieser Elektronen eine bestimmte Energie. Dieser Energieverlust entspricht genau der Ionisierungsenergie, welche notwendig ist, um die Elektronen der inneren Schalen der Atome dieses Elementes aus ihrer Bahn zu werfen. Ein Elektronenstrahl, der z.B. eine Region mit einer hohen Konzentration des Elements Cer passiert hat, weist neben ungestreuten und elastisch gestreuten Elektronen auch Elektronen mit spezifischen Energieverlusten bei 907 eV, 887 eV, 128 eV und 31 eV auf. Diese Energieverluste sind den Ionisierungsenergien der M-Schalen (887 und 907 eV), N- (128 eV) und O- (31 eV) des Cers zuzuordnen. Aufgrund dieses Effekts kann mit Hilfe der energiefilternden Elektronenmikroskopie sowohl eine Elementverteilung in einer untersuchten Region als auch ein quantitativer Nachweis geführt werden.

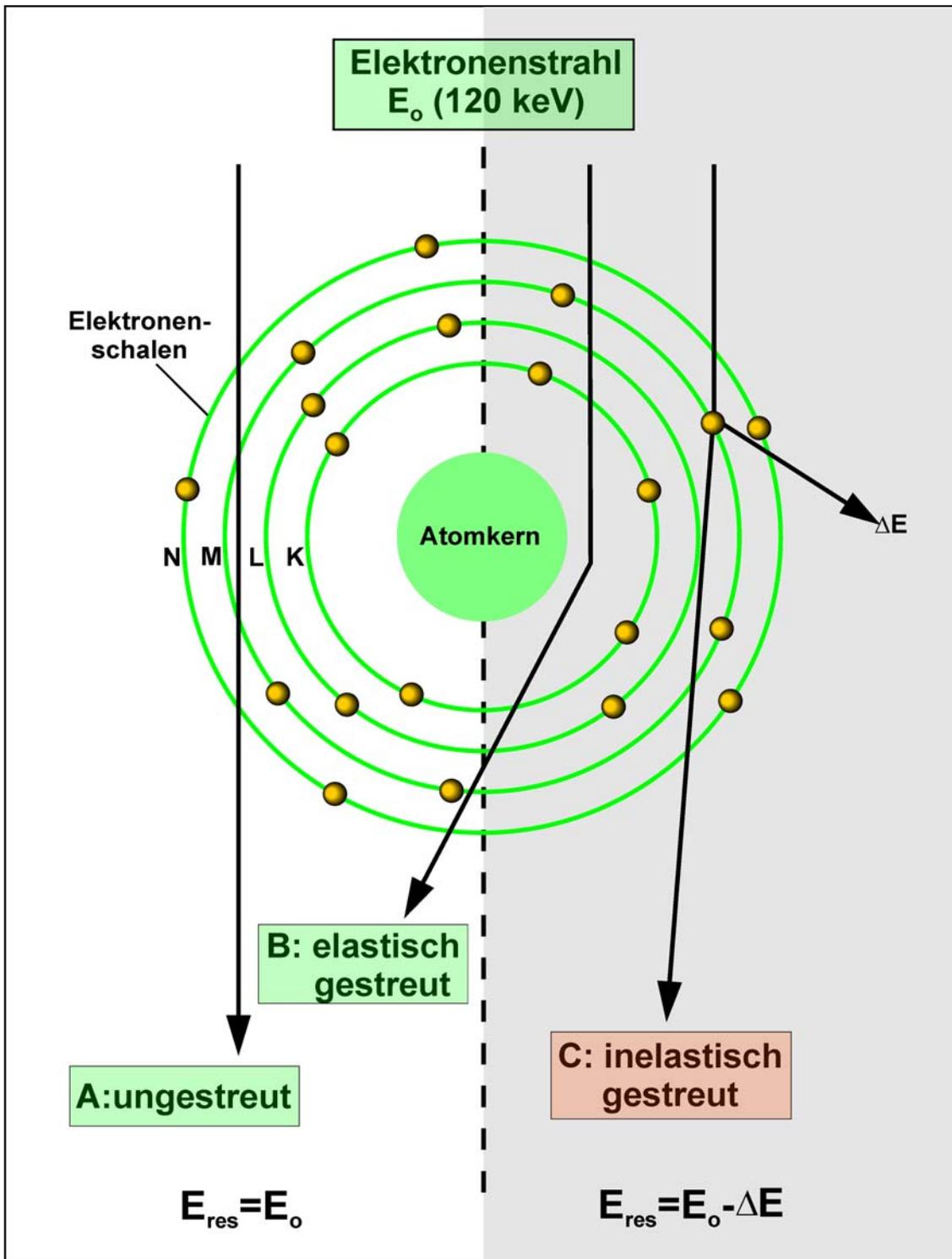


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Streuungsarten im Elektronenmikroskop.

In der konventionellen Transmissionselektronenmikroskopie werden vor allem die aufgrund Coulombscher Kräfte elastisch gestreuten Elektronen (B) ausgeblendet, während ungestreute Elektronen (A) den Leuchtschirm erreichen. Aufgrund dieses Phänomens kann auf dem Leuchtschirm ein Kontrast dargestellt werden. Die Abbildung von Elektronen, die auf ihrem Weg durch das Präparat durch Wechselwirkungen mit den Sekundärelektronen Energie verloren haben (C), werden für die energiefilternde Transmissionselektronenmikroskopie nutzbar gemacht. Dieser Energieverlust der Primärelektronen ist spezifisch für jedes Elektron einer bestimmten Elektronenschale eines Elements. (modifiziert nach Reimer et al, 1992)

Der im kTEM abgebildete Elektronenstrahl besteht nach dem Passieren des Präparats aus Elektronen mit verschiedenen Energien (Abb. 3 A). Eine Trennung der Elektronen verschiedener Energien kann aufgrund der unterschiedlichen Ablenkung im Magnetfeld erfolgen. Mit einem OMEGA-Filter lassen sich die Elektronen noch in der Säule durch vier magnetische Prismen gemäß ihrer Energie räumlich voneinander trennen (Abb. 3 B).

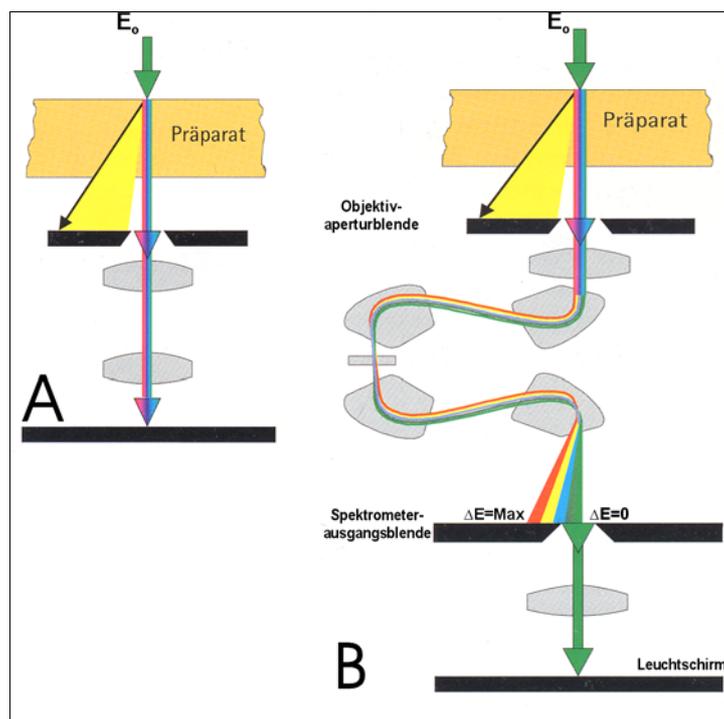


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Abbildungen (konventionell und energiefilternd).

Eine konventionelle transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme bildet Primärelektronen verschiedener Energien ab (A). Der Kontrast wird über das Ausblenden elastisch gestreuter Elektronen mit großem Streuwinkel erzeugt. Eine Trennung der Elektronen verschiedener Energien kann über die unterschiedliche Ablenkung im Magnetfeld erreicht werden. In einem LEO 912 Omega (B) können Elektronen verschiedener Energien noch in der Säule durch vier magnetische Prismen gemäß ihrer Energie räumlich voneinander getrennt werden. Mit dieser Technik ist es möglich, elementspezifische Kontraste in Form eines Spektrums oder als Bild auf dem Leuchtschirm darzustellen (Abbildung Fa. LEO, Oberkochen).

Wird nun die Energie des Elektronenstrahls (E_0) um einen bestimmten Betrag (ΔE) erhöht, werden auf dem Leuchtschirm jene Elektronen abgebildet, die genau diesen Betrag (ΔE) verloren haben (Abb. 3 B). Damit kann sowohl ein Energieverlustspektrum (Electron Energy Loss Spectrum, EELS) als auch ein Energieverlustbild (Electron Spectroscopic Imaging, ESI) auf dem Leuchtschirm dargestellt werden.

Ein EELS weist einen exponentiellen Abfall der Elektronenintensität gegenüber dem Energieverlust auf (Abb. 4, beispielhaft für einen Eisenoxidfilm, aus Reimer et al, 1992). Dieses Spektrum setzt sich aus einem Anteil an Elektronen zusammen, welche inelastisch gestreut wurden, mehrfach gestreut wurden oder auf andere Weise Energie abgegeben haben (Wärme u.a.). Letztere kennzeichnen den exponentiellen Abfall. Aufgrund ihrer geringen Häufigkeit können mehrfach gestreute Elektronen im 80 nm dicken Ultradünnschnitt vernachlässigt werden (de Bruijn et al, 1993). Die inelastisch gestreuten Elektronen weisen im Spektrum eine Ionisationskante bzw. Absorptionskante bei einem bestimmten Energieverlust auf. In Abb. 4 sind für den Eisenoxidfilm die $M_{2,3}$ - (54 eV) und $L_{2,3}$ -Kanten (702 und 720 eV) des Eisens sowie die K-Kante des Sauerstoffs (532 eV) deutlich zu erkennen.

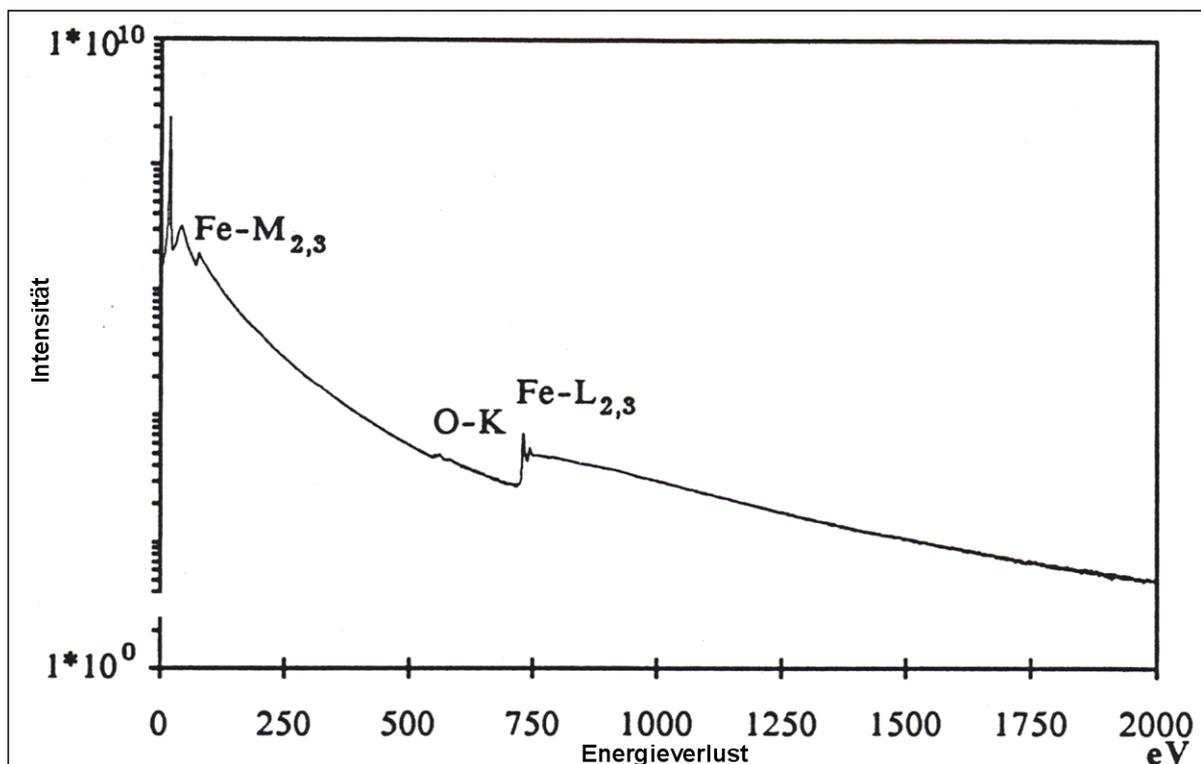


Abbildung 4: Energieverlustspektrum (EELS) beispielhaft für einen Eisenoxidfilm (aus Reimer et al, 1992).

Ein EELS weist einen exponentiellen Abfall der Elektronenintensität bei steigendem Energieverlust auf. Ein EELS-Spektrum setzt sich aus einem Anteil inelastisch gestreuter, mehrfach gestreuter und Elektronen, welche auf andere Weise Energie verloren haben (u.a. Wärme), zusammen. Mehrfach gestreute Elektronen können im Ultradünnschnitt vernachlässigt werden. Die inelastisch gestreuten Elektronen des Eisenoxidfilms zeigen eindeutig Ionisationskanten der $M_{2,3}$ - (54 eV) und $L_{2,3}$ -Elektronenschalen (702 eV und 720 eV) des Eisens sowie der K-Schale des Sauerstoffs (532 eV).

Wird ein Energieverlustbild unmittelbar vor der Absorptionskante, ein zweites genau auf der Absorptionskante aufgenommen und die Differenz aus beiden gebildet ergibt sich ein Elementverteilungsbild (ESI). Für das Beispiel der $L_{2,3}$ -Kante des Eisenoxidfilms würde das Vorkantenbild bei ca. 650 eV und das Bild auf der Ionisationskante bei 720 eV Energieverlust aufgenommen und Pixel für Pixel die Differenz aus beiden gebildet werden.

Eine bessere Auflösung der Elementverteilung ergibt sich aus der Drei-Fenster-Power-Law-Methode (Reimer et al, 1992). Es werden zwei Energieverlustbilder vor der Ionisationskante aufgenommen und der exponentielle Abfall auf die Absorptionskante extrapoliert. Das Differenzbild aus dem extrapolierten Bild und dem Energieverlustbild auf der Ionisationskante ergibt ein stark verbessertes Elementverteilungsbild.

Theoretisch sind mit EFTEM simultane immunzytochemische Mehrfachmarkierungen nur durch die Anzahl geeigneter Elemente limitiert. Aufgrund dieser Überlegungen sollte EFTEM eine hervorragende Methode darstellen, die weit über das bisher Mögliche hinaus Mehrfachmarkierungen in der Immunzytochemie auf ultrastruktureller Ebene erlaubt. Voraussetzung ist die Entwicklung speziell geeigneter immunzytochemischer Techniken, wie die simultane Visualisierung von alkalischer Phosphatase und Meerrettichperoxidase für EFTEM. Diese simultane immunenzymatische Doppelmarkierung soll in der vorliegenden Arbeit entwickelt werden.

3.2. Zusätzliche potenzielle Marker für immunzytochemische Untersuchungen mit EFTEM

Aufgrund der Überlegung, dass eine elementspezifische Visualisierung mittels EFTEM theoretisch nur durch die Zahl geeigneter elektronendichter Labels limitiert ist, könnten weitere potenzielle Marker für immunzytochemische Mehrfachmarkierungsuntersuchungen nutzbar gemacht werden. Dazu zählen sowohl etablierte immunzytochemische Methoden, wie silberverstärktes Nano-Gold und Ferritin-markiertes Protein A als auch potenzielle neue Marker wie Dextran-umhülltes superparamagnetisches Eisenoxid (USPIO; Lawaczeck et al, 1997; Kresse et al, 1998) und Nickel(II)-Nitrilotriacetylsäure-Glutathion-Gold-Beads (Ni(II)-NTA-GSHgold; Hainfeld et al, 1999). Allerdings müssen diese potenziellen Labels hinsichtlich ihrer Eignung für EFTEM untersucht werden. In Verbindung mit den für EFTEM in der Literatur beschriebenen Methoden, wie boronierte Antikörper und Protein A (Bendayan et al, 1989; Qualmann et al, 1996), könnte so in Zukunft das Spektrum simultaner Mehrfachmarkierungen erheblich erweitert werden.

4. Das Modellsystem *Bulbus olfactorius*

In der vorliegenden Arbeit wurde der Bulbus olfactorius (BO) der Ratte als Modellsystem für die Entwicklung einer immunenzymatischen Doppelmarkierung herangezogen.

In der glomerulären Schicht des BO bilden die Axone der sensorischen olfaktorischen Neurone aus dem Riechepithel über den Nervus olfactorius synaptische Kontakte mit Projektionsneuronen des BO. Die Regionen im Neuropil, in denen diese synaptischen Kontakte gebildet werden, heißen Glomerula. Neurone mit dem gleichen Geruchsrezeptor projizieren zu genau einem topographisch festgelegten Glomerulum der etwa 1000 Glomerula pro BO des Nagetierorganismus (Mombarts et al, 1996; Kosaka et al, 1998). In diesen Glomerula gibt es synaptische Kontakte zu den Projektionsneuronen des BO, den Mitral- und Büschelzellen, welche zum olfaktorischen Kortex (Berkowicz und Trombley, 2000) und anderen Hirnregionen projizieren. Diese Kontakte repräsentieren die erste Station der Informationsverarbeitung und -weiterleitung im olfaktorischen System. Die Aktivität eines Glomerulums kann durch Interneurone beeinflusst werden (Shepherd, 1963; Getchell und Shepherd, 1975 a, b). Diese periglomerulären Neurone umsäumen den Rand jedes einzelnen Glomerulums. Die periglomerulären Zellen sind eine heterogene Population von Interneuronen, die durch ihre Neurotransmitter unterschieden werden. Viele dieser periglomerulären Zellen sind dopaminerg, aber auch eine Kolo-kalisation von Dopamin und γ -Aminobuttersäure (GABA) ist beschrieben (Kosaka et al, 1998). Dopamin wird als wichtigster Modulator der synaptischen Transmission zwischen den olfaktorischen Rezeptorzellen und den Mitral-/Büschelzellneuronen des BO, bedingt durch eine präsynaptisch vermittelte D2-Rezeptor-Aktivierung, postuliert (Araneda et al, 1999). Außerdem bilden periglomeruläre Zellen symmetrische dendrodendritische Synapsen mit Mitral- und Büschelzellen. Diese bilden ihrerseits wiederum asymmetrische dendrodendritische Synapsen mit den periglomerulären Zellen. Zusätzlich nehmen Afferenzen aus aufsteigenden modulatorischen Systemen Einfluss auf die Signaltransduktion im BO. Diese aufsteigenden modulatorischen Systeme können serotoninerg, noradrenalinerg oder cholinerg sein (Kosaka et al, 1998). Dichte serotoninerge Projektionen aus den Raphe Nuklei innervieren die glomeruläre und die Körnerzellschicht des BO (Araneda et al, 1999). Die serotoninergen Fasern, die in

der glomerulären Schicht enden, weisen auf einen direkten modulatorischen Einfluss des Hirnstamms auf die Verarbeitung des olfaktorischen Inputs bereits im ersten Schritt der Informationsbearbeitung hin. Es ist bisher nicht bekannt, ob die serotoninergeren Axone einen direkten synaptischen Kontakt mit dopaminergen periglomerulären Neuronen oder anderen neuronalen Elementen der glomerulären Schicht eingehen. Alternativ könnte Serotonin mittels so genannter „Volume Transmission“, einem Freisetzen des Transmitters ins Neuropil, über eine größere Distanz parakrin-modulatorisch Einfluss nehmen.

Um diese Fragen zu klären, soll die ultrastrukturelle Verteilung der monoaminen Neurotransmitter Dopamin und Serotonin in der glomerulären Schicht des BO der Ratte mittels der neu zu entwickelnden immunenzymatischen Doppelmarkierung untersucht werden. Dopaminerge Neurone sollen mit monoklonalen Mausantikörpern gegen Tyrosinhydroxylase, dem Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese, biotinylierten Pferd-anti-Maus als Zweitantikörper, Streptavidin-alkalische-Phosphatase als Markersystem und der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik markiert werden. Die serotoninergeren Afferenzen aus den Raphe Nuklei sollen mit polyklonalen Antikörpern gegen Serotonin aus dem Kaninchen (Behringer et al, 1991), peroxidasemarkierten Ziege-anti-Kaninchen Zweitantikörpern und mit der Peroxidase-DAB-Technik nachgewiesen werden.

5. Ziel der Arbeit

Mit der vorliegenden Doppelmarkierungsstudie soll ein wesentlicher Beitrag zur Entwicklung von Techniken geleistet werden, die das simultane Immunmarkieren von vier und mehr Antigenen in einem Ultradünnschnitt erlauben. Ziel der Arbeit ist die Erarbeitung einer neuen immunenzymatischen Markierungstechnik für die Pre-Embedding-Elektronenmikroskopie. Das entstehende Reaktionsprodukt muss dabei alkoholunlöslich und elektronendicht sein, sowie von herkömmlichen Immunmarkierungen durch EFTEM-Analyse unterscheidbar sein. So könnte eine simultane elektronenmikroskopische Visualisierung von mehr als drei Antigenen in einem Gewebeschnitt etabliert werden.

Des Weiteren sollen in der Literatur beschriebene immunzytochemische Markierungen für die Elektronenmikroskopie, wie Protein-A-markiertes Ferritin und silberverstärktes Nano-Gold, auf ihre Tauglichkeit für EFTEM untersucht werden. Eine Kombination dieser beiden Methoden mit der in der vorliegenden Arbeit zu entwickelnden Doppelmarkierungstechnik und den in der Literatur beschriebenen Methoden mit boronierten Antikörpern oder Protein A (Bendayan et al, 1989; Qualmann et al, 1996) würde die Zahl der verfügbaren Marker für ultrastrukturelle Mehrfachmarkierungen weiter erhöhen.

II. Material und Methoden

1. Allgemeines

1.1. Chemikalien und Pufferlösungen

Lösungen:

PBS: 8 g Natriumchlorid (137 mM), 0,2 g Kaliumchlorid (2,7 mM), 1,4 g (Phosphate Buffered Saline) Natriumhydrogenphosphat (10,1 mM) in 1 l H₂O lösen (pH 7,4 mit NaOH eingestellt).

Soweit nicht anders vermerkt wurden Chemikalien von höchstem Reinheitsgrad (p.a.-Qualität) der Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) verwendet. Falls auf Produkte anderer Hersteller zurückgegriffen wurde oder die jeweilige Chemikalie von entscheidender Bedeutung für die Methode war, ist das Produkt und die Bezugsfirma zusätzlich erwähnt.

Als allgemeiner Standardpuffer wurde Phosphat-gepufferte-Salzlösung (Phosphat-Buffered-Saline, PBS) verwendet.

1.2. Wasserqualität

Geräte:

Milli-Q-Anlage: (Millipore, USA).

Für alle Puffer und Lösungen wurde Wasser der Güte Milli-Q (Typ 1, National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS -) verwendet.

2. Gewebe

2.1. Tiere, Perfusion und Lagerung des Gewebematerials

Lösungen:

Anästhesielösung:	0,1 mg/g Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketamin-50-Curamed, CuraMED Pharma, Karlsruhe), 20 µl Xylazinhydrochlorid (2 % Rompun, BayerVital, Leverkusen) und 5 IE Natrium-Heparin (Heparin-Natrium-2500-ratiopharm, Ratiopharm, Ulm).
Vorspüllösung:	Longasteril 70 (mit Elektrolyten; Fresenius, Bad Homburg).
Fixierungslösung:	4 % Paraformaldehyd, 0,05 % Glutaraldehyd und 0,2 % Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4.
Nachspüllösung:	0,5 % Saccharose in 100 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 7,4.
Gefrierschutz:	30 % Saccharose in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4.

Erwachsene Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts wurden mit Ether betäubt, und das Anästhetikum wurde intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die Tiere transkardial mit Vorspüllösung (10 s $3,333 \times 10^4$ Pa), der Fixierungslösung (5 min $3,333 \times 10^4$ Pa und 20 min $2,666 \times 10^3$ Pa), gefolgt von der Nachspüllösung (5 min $1,998 \times 10^4$ Pa) perfundiert. Gehirne und Nieren wurden entnommen und über Nacht in 30 % Saccharose gefriereschützt, in flüssigem Hexan (- 60 °C) eingefroren und bis zum Gebrauch bei - 80 °C gelagert.

2.2. Modellgewebe Superose-Kir6.2.His-Tag-Antigen-Beads in Agarose

2.2.1. Beladen der Superosebeads mit dem Kir6.2.His-Tag-Antigen

Lösungen:

Superose:	Superose 12 prep grade (Pharmacia Biotech, Schweden).
Aktivierungslösung:	10 % Divinylsulfon (DVS; Fluka, Buchs) in 500 mM Natriumcarbonatpuffer pH 11.
Inkubationslösung:	1 mg/ml Kir6.2. His-Tag (Thomzig et al, 2001; eigenes Labor) in 500 mM Natriumcarbonatpuffer pH 10.
Waschpuffer 1:	500 mM Natriumcarbonatpuffer pH 11.
Waschpuffer 2:	500 mM Natriumcarbonatpuffer pH 10.
Absättigungslösung:	1 M Ethanolamin pH 8.
Agaroselösung:	4 % Agarose in H ₂ O.

5 ml des Superosegels wurden dreimal in PBS, zweimal in Waschpuffer 1 gewaschen und über einen Büchner-Trichter abgesaugt. Anschließend wurde zum Gel 5 ml Aktivierungslösung gegeben und dieses nach 120 min Inkubation (schütteln, Raumtemperatur) ausgiebig auf einem Büchner-Trichter mit H₂O gewaschen bis die Waschlösung einen neutralen pH aufwies. Dem so aktivierten Gel sind 5 ml Inkubationslösung zugegeben worden. Das Antigen wurde dann über Nacht bei Raumtemperatur (mischen) an die Gel-Kügelchen gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung 2 und kurzer Vorinkubation in Absättigungslösung wurden die freien aktivierten Gruppen 4 h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur mit 5 ml Absättigungslösung blockiert. Das antigenbeladene Gel wurde erneut mit H₂O und PBS über einem Büchner-Trichter gewaschen und kühl gelagert (4 °C; Thomzig et al, 2001).

2.2.2. Violette Superose-Referenzbeads mit Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

Lösungen:

Superose:	Superose 12 prep grade (Pharmacia Biotech, Schweden).
Oxidationslösung:	1 % Perjodsäure (HJO ₄) in H ₂ O.
Schiff-Reagenz:	Schiff-Reagenzlösung (Fluka, Buchs; Chayen et al, 1975).
SO ₂ -Waschlösung:	0,5 % Kaliumdihydrogensulfit, 0,25 N HCl in H ₂ O.

200 µl Superose-Kügelchen wurden über einen Büchner-Trichter mit PBS gewaschen, die vicinalen Diole 15 min in Oxidationslösung zu Aldehydgruppen oxidiert und wiederum mit PBS gewaschen. Anschließend sind die oxidierten Superose-Kügelchen 20 min mit Schiff-Reagenz angefärbt und mit SO₂-Waschlösung gespült worden. Nach dem Waschen mit PBS konnten die gefärbten Kügelchen bis zur Verwendung kühl gelagert werden (4 °C).

2.2.3. Superose-Kir6.2.His-Tag-Antigen-Beads in Agarose

Lösungen:

Agaroselösung: 4 % Agarose in H₂O.

Geräte:

Thermomixer: (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg).

50 µl antigenbeladenes Gel (siehe oben), 40 µl mit PAS-Reaktion gefärbtes Gel (siehe oben) und 10 µl PBS wurden gut gemischt und auf 75 °C vorgewärmt. Dieses Gemisch wurde in 100 µl 4 % Agarose (75 °C) auf einem Thermomixer gelöst, schnell in Eiswasser erstarrt und bis zur Verwendung kühl gelagert (4 °C).

3. Lichtmikroskopie

3.1. Kryostatschnitte

Geräte:

Kryostat: 2800 Frigocut E (Leica, Heidelberg).

Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurden Kryostatschnitte des Gewebes mit einer Dicke von 20 µm am Kryostat (- 24 °C Kammertemperatur, - 21 °C Gewebstemperatur) hergestellt und für die weiteren Bearbeitungsschritte frei flotierend in PBS aufgenommen.

3.2. Objektträgerbeschichtung

Lösungen:

Beschichtungslösung: 15 g Gelatine (gepulvert), 1,76 g Chrom(III)Kaliumsulfat-Dodecahydrat in 630 ml H₂O bei 70 °C lösen. Zugabe von 300 ml Ethanol und 70 ml Eisessig.

Die Objektträger wurden vor dem Verwenden Chrom/Gelatine beschichtet. Sie sind für 3 min bei 70 °C in die filtrierte Beschichtungslösung getaucht und anschließend mindestens 1 d staubfrei getrocknet worden.

3.3. Histochemische Färbungen

3.3.1. Kresylviolett

Lösungen:

Kresylviolettlösung: 1 g Kresylviolett, 20 mM Essigsäure in 500 ml H₂O, mit NaOH pH 4,0 eingestellt.

Entellan: Entellan (Merck, Darmstadt).

Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger aufgezogen, getrocknet, in einer aufsteigenden Reihe Ethanol (je 5 min 70 %, 90 %, 96 % 2 x 100 %) folgend von Xylol (30 min) entfettet und über die Ethanolreihe abfallend in H₂O überführt. Die Zytoplasmafärbung mit frisch filtrierter Kresylviolettlösung wurde 30 min durchgeführt, gefolgt von Waschen in H₂O (2 min), dem Entwässern über eine aufsteigende Reihe Ethanol (je 5 min 70 %, 90 %, 96 % 2 x 100 %) sowie Xylol (2 x 5 min) und dem Eindeckeln des Schnittes in Entellan. Diese Färbung stellt vor allem saure Strukturen wie Zellkerne und Nissel-Schollen dar. Im Folgenden ist die Entwässerung des Gewebes, wenn nicht anders beschrieben, wie hier dargestellt durchgeführt worden.

3.3.2. Toluidinblau

Lösungen:

Toluidinblaulösung: 1 g di-Natriumtetraborat, 1 g Toluidinblau und 40 g Saccharose werden in 100 ml H₂O gelöst (pH 9,35 eingestellt).

Diese Zytoplasmafärbung wurde zum Gegenfärben von zuvor eingebetteten immunzytochemisch markierten Semidünnschnitten und deren Kontrollen herangezogen. Mit dieser Methode werden vor allem saure Strukturen angefärbt. Der auf einen Objektträger aufgezogene Semidünnschnitt wurde auf einer Wärmeplatte bei 90 °C getrocknet und anschließend mit einem Tropfen Toluidinblaulösung 1 min inkubiert. Der Gewebeschnitt ist dann mit H₂O gespült, über eine Ethanolreihe sowie Xylol entwässert und in Entellan eingedeckelt worden. Die Toluidinblaulösung wurde vor dem Gebrauch zentrifugiert.

3.4. Enzymzytochemische Färbungen endogener alkalischer Phosphatase

3.4.1. Endogene alkalische Phosphatase mit BCIP/NBT

Lösungen:

- Vorinkubationslösung: 100 mM Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan, 150 mM Natriumchlorid, 50 mM Magnesiumchlorid in H₂O, mit NaOH auf pH 9,5 eingestellt.
- Reaktionslösung: 0,46 mM Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT) und 0,43 mM 5-Bromo-4-Chloro-3-Indiolyphosphat (BCIP) in Vorinkubationslösung.
- Reaktionskontrolllösung: 2 mM L(-)-2,3,5,6,-Tetrahydro-6-Phenylimidazo(2,1-b)-Thiazolhydrochlorid (Levamisol) in Reaktionslösung.
- Mowiol (Ansatz):
- 2,4 g Mowiol (Mowiol 4-88; Hoechst, Frankfurt am Main), 6 g Glycerin in 6 ml H₂O mischen und 3 h bei Raumtemperatur stehen lassen.
 - 12 ml Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (200 mM) und 10 min bei 50 °C mixen.
 - 15 min bei 5000 x g abzentrifugieren.
 - 2,5 % 1,4-Diazabicyclo-(2.2.2)-Octan (DABCO) lösen.

Die Kryostatschnitte der Niere wurden flotierend in PBS gewaschen und 10 min in Vorinkubationspuffer inkubiert. Zur Visualisierung der endogenen alkalischen Phosphatase wurde die Reaktion für 10-30 min mit dem Reaktionspuffer durchgeführt. Danach ist die Reaktion durch Auswaschen des Reaktionspuffers mit PBS gestoppt worden (3 x 5 min). Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger aufgezogen, 30 min an der Luft getrocknet und in Mowiol eingedeckelt.

Kontrollversuche sind mit der Reaktionskontrolllösung durchgeführt worden. Das dieser Lösung zugesetzte Levamisol hemmt endogene alkalische Phosphatasen mit Ausnahme von alkalischer Phosphatase aus dem Kalbsdarm.

3.4.2. Endogene alkalische Phosphatase mit Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode nach Halbhuber

Lösungen:

Waschpuffer:	25 mM Glycin in H ₂ O, mit NaOH auf pH 10 einstellen.
Vorinkubationslösung:	50 mM Glycin, 25 mM N-[Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl]-Glycin (Tricin) und 30 % Saccharose in abgekochtem und rückgekühltem H ₂ O, mit NaOH auf pH 9,0 einstellen.
Reaktionslösung:	3,9 mM Magnesiumsulfat, 3 mM Cerium(III)-Chlorid (Fluka, Buchs) und 1 mM p-Nitrophenylphosphat in Vorinkubationslösung.
Reaktionskontrolllösung:	2 mM L(-)-2,3,5,6,-Tetrahydro-6-Phenylimidazo(2,1-b)-Thiazol-Hydrochlorid (Levamisol) in Reaktionslösung.
Visualisierungspuffer:	5 % H ₂ O ₂ in Waschpuffer.
Verstärkungspuffer:	0,015 % 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat (Diaminobenzidin, DAB; Aldrich, USA), 2 % Ammonium-Nickel-Sulfat, 100 mM Natriumacetat in H ₂ O, pH 5,3.

Die Kryostatschnitte der Niere wurden in Waschpuffer gewaschen (3 x 10 min), 20 min im Vorinkubationspuffer inkubiert und die Reaktion durch Zugabe des Reaktionspuffers gestartet (30-120 min). Durch Waschen mit Waschpuffer (1 x 2 min, 3x15 min) wurde die Reaktion gestoppt und durch Zugabe des Visualisierungspuffers das Präzipitat visualisiert (5 min). Nach dem Spülen mit Waschpuffer wurde das Präzipitat mit dem Verstärkungspuffer in ein dunkelbraunes Produkt überführt (5 min). Anschließend wurden die Gewebsschnitte gewaschen (3 x 5 min), auf beschichtete Objektträger aufgezogen, entwässert und in Entellan eingedeckelt.

Kontrollversuche sind durch Zugabe von Levamisol zum Reaktionspuffer (Reaktionskontrolllösung) durchgeführt worden.

3.5. Immunzytochemie

3.5.1. Antikörperinkubation

Lösungen:

Reduktionslösung:	264 mM Natriumborhydrid in PBS.
Vorinkubation (1. Antikörper):	0,3 % Triton-X-100, 0,05 % Phenylhydrazin, 10 % NGS (Normal Goat Serum; PAN-Biotech, Aidenbach) in PBS.
Inkubation (1. Antikörper):	Entsprechende Antikörperverdünnung in 0,3 % Triton-X-100, 10 % NGS, 0,1 % Natriumazid, 0,01 % Thimerosal (Ethylmerkurithio-salocylsäure-Natriumsalz) in PBS.
Vorinkubation (2. Antikörper):	2 mg/ml BSA (Rinder-Serum-Albumin) in PBS.
Inkubation (2. Antikörper):	Entsprechende Antikörperverdünnung in 0,3 % Triton-X-100, 0,1 % Natriumazid in Vorinkubationslösung 2. Antikörper (PBS-A).

Antikörperverdünnungen:

a-TH (Maus):	1:1000 monoklonaler Anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörper (a-TH; Roche Diagnostics, Mannheim) in Inkubationspuffer 1. Antikörper.
a-5HT (Kaninchen):	1:100 polyklonaler Anti-Serotonin-Antikörper (a-5HT; Behringer et al, 1991) in Inkubationspuffer 1. Antikörper.
B-HaM:	1:2000 Biotinylierter-Pferd-anti-Maus-Antikörper (B-HaM; Vector, Buringame) in Inkubationspuffer 2. Antikörper.
B-GaR:	1:2000 Biotinylierter-Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (B-GaR; Vector, Buringame) in Inkubationspuffer 2. Antikörper.
aP-HaM:	1:500 alkalische-Phosphatase-Pferd-anti-Maus-Antikörper (aP-HaM; Vector, Buringame) in Inkubationspuffer 2. Antikörper.

Die Kryostatschnitte wurden dreimal in PBS gewaschen, 15 min bei Raumtemperatur zur Reduktion freier Aldehydgruppen in Reduktionslösung und 30 min in Vorinkubationslösung 1 inkubiert. Das Phenylhydrazin diente zur Zerstörung endogener Peroxidaseaktivitäten. Anschließend sind die Schnitte direkt in die geeignet konzentrierte Erstantikörperlösung überführt worden (36 h, 5 °C). Nach zweimaligem Waschen in PBS (20 und 40 min) sowie 60 min Vorinkubation in PBS-A ist das Gewebe mit der entsprechenden Zweitantikörperlösung inkubiert worden (18 h, 5 °C). Die Schnitte wurden dann zweimal mit PBS gewaschen (20 und 40 min)

und der Kopplung und Entwicklung des jeweiligen Signalsystems zugeführt (siehe unten).

Kontrollexperimente sind ohne Zugabe des Erstantikörpers und durch vorherige Blockade des Antikörpers mit dem jeweiligen Fusionsprotein durchgeführt worden. Beim letzteren Ansatz wurde die Erstantikörperlösung vor dem Einwirken auf den Schnitt für 2 h mit 10 µg/ml des jeweiligen Fusionsproteins inkubiert. Die Kontrollschnitte sind im Anschluss wie unter *Markersysteme und Färbungen* behandelt worden.

3.5.2. Streptavidin-markierte alkalische Phosphatase aus dem Kalbsdarm

Lösungen:

Vorinkubationslösung (PBS-A): 2 mg/ml BSA (Rinder-Serum-Albumin) in PBS.

SA-aP: 1:1000 Streptavidin-alkalische-Phosphatase (SA-aP; Life Technologies, Eggenstein) in PBS-A.

Nach einer 30-minütigen Vorinkubation in PBS-A wurden die mit Erst- und biotinylierten Zweitantikörpern markierten Schnitte (siehe oben) mit Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Lösung inkubiert (12 h, 5 °C). Anschließend wurde das Gewebe zweimal mit PBS gewaschen (20 und 40 min) und der jeweiligen Färbung mit alkalischer Phosphatase zugeführt.

3.5.3. ABC-Peroxidase-Komplex

Lösungen:

Vorinkubationslösung (PBS-A): 2 mg/ml BSA (Rinder-Serum-Albumin) in PBS.

ABC-Komplex: 1:1000 Elite A (Avidin H; ABC-Elite Kit, Vector, Wiesbaden) in PBS-A mischen und 1:1000 Elite B (Biotinyl-Peroxidase; ABC-Elite Kit, Vector, Wiesbaden) dazugeben, mischen und vor Gebrauch mindestens 30 min den ABC-Komplex ausbilden lassen.

Die mit den Erst- und biotinylierten Zweitantikörpern markierten Schnitte (siehe oben), sind zweimal mit PBS gewaschen (20 und 40 min) und 60 min mit PBS-A vorinkubiert worden. Die Schnitte wurden dann 6 h mit der ABC-Komplex-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen (10, 20 und 30 min). Anschließend sind die Gewebsschnitte der Peroxidase-Färbung mit Diaminobenzidin zugeführt worden (siehe unten).

3.5.4. Färbungen

3.5.4.1. BCIP/NBT-Technik für alkalische Phosphatase

Die Markierung ist wie in Punkt 3.4.1. durchgeführt worden. Der Reaktionslösung wurden zur Inhibierung der Aktivität endogener alkalischer Phosphatase 2 mM Levamisol zugegeben. Levamisol hemmt alkalische-Phosphatase-Aktivitäten mit Ausnahme jener aus dem Kalbsdarm.

3.5.4.2. Cer-Phosphat-H₂O₂- Methode für alkalische Phosphatase nach Halbhuber (1994)

Die Färbung ist wie unter Punkt 3.4.2. beschrieben durchgeführt worden. Der Reaktionslösung wurden auch in diesem Fall zur Inhibierung der Aktivität endogener alkalischer Phosphatase 2 mM Levamisol zugegeben.

3.5.4.3. Optimierung der Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode für alkalische Phosphatase für die Immunzytochemie

3.5.4.3.1. Biochemische Untersuchungen

Geräte/Materialien:

ELISA-Reader:	Dynatech MR 5000 (Denkendorf).
96-Well-Mikrotiterplatten:	ELISA-Mikrotiterplatte Falcon 3912, MicroTest III Flexible Assay Plate (Becton, USA).

Vor einer Optimierung der Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode auf immunzytochemischem Niveau sind biochemische Optimierungsuntersuchungen durchgeführt worden. Es wurden die Reaktionsbedingungen der Streptavidin-markierten alkalischen Phosphatase photometrisch über den Umsatz des para-Nitrophenylphosphates in das gelbe para-Nitrophenol bei 405 nm gemessen. Die Reaktionen sind in Mikrotiterplatten durchgeführt und die Extinktionszunahme ist mit einem konventionellen ELISA-Reader vermessen worden. In parallelen Kontrolluntersuchungen ohne alkalische Phosphatase in den verschiedenen Puffersystemen wurde der spontane Zerfall des para-Nitrophenylphosphates zu

para-Nitrophenol sowie die spontane Oxidation des Cer(III) zum gelben Cer(IV) gemessen. Diese Kontrollwerte sind anschließend von den Messergebnissen mit alkalischer Phosphatase in den Puffersystemen subtrahiert worden, um ausschließlich die Aktivität des Enzyms darzustellen.

Es wurden 50 mU Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase im jeweiligen Reaktionspuffer eingesetzt. Verschiedene Parameter des Reaktionspuffers wurden variiert und anschließend einer Optimierung der Reaktionsbedingungen dieser Isoform des Enzyms in der Immunzytochemie zugeführt. Die Reaktionszeit lag bei mindestens 160 min, wobei Messintervalle zwischen 1 min und 10 min angesetzt wurden. Alle Reaktionen wurden als Doppelanalysen durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

Variationen des Reaktionspuffers:

- Puffersysteme:
- Glycin-Puffer
 - Glycin-Tricin-Puffer
 - Tricin-Puffer
 - Tricin-Diethanolamin-Puffer
- Pufferkonzentrationen:
- Jede Komponente in den zuvor genannten Puffersystemen je 25 mM, 50 mM und 100 mM
- pH-Werte:
- 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0
- Cer-Konzentrationen:
- 0 mM
 - 3 mM
 - 6 mM
 - 10 mM
- Magnesiumsulfat:
- ohne MgSO_4
 - Zugabe von 3,9 mM MgSO_4
- Saccharose:
- ohne Saccharose
 - 5 % Saccharose
 - 30 % Saccharose

3.5.4.3.2. Immunzytochemische Optimierung der Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode

Ausgehend von der beschriebenen „Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode für alkalische Phosphatase nach Halbhuber (1994)“ und den „biochemischen Untersuchungen“ (siehe 3.5.4.2. und 3.5.4.3.1.) sind die Reaktionsbedingungen immunzytochemisch variiert, optimiert und lichtmikroskopisch ausgewertet worden. Einige auf biochemischem Wege ausgeschlossene Reaktionsbedingungen sind hier nicht durchgeführt worden (u.a. Glycin-Puffer, pH 8-9).

Variationen des Reaktionsbedingungen:

- | | |
|---|---|
| Puffersysteme: | - Tricin-Puffer
- Tricin-Diethanolamin-Puffer |
| Pufferkonzentrationen: | - Jede Komponente der oben genannten Puffersysteme je 50 mM und 100 mM |
| pH-Werte: | - 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0 |
| Cer-Konzentrationen: | - 3 mM; 6 mM ; 10 mM |
| Magnesiumsulfat: | - ohne MgSO ₄
- Zugabe von 3,9 mM MgSO ₄ |
| Saccharose: | - ohne Saccharose
- 5 % Saccharose
- 30 % Saccharose |
| Temperatur des Reaktionspuffers: | - Raumtemperatur
- 5 °C
- 37 °C |
| Entgasen des Puffers: (CO ₂ -Gehalt) | - Nicht abgekochtes Wasser
- Abgekochtes Wasser
- Zugabe von 10 mM Natriumcarbonat zum Puffer
- Lösen von Trockeneis im Puffer |
| Zugabe von Levamisol: | - Ohne Levamisol
- 2 mM Levamisol |

Variationen der Visualisierungs- und Verstärkungsreaktionen:

- Cer-Oxidation mit H₂O₂:
- 0,2 %
 - 0,4 %
 - 0,8 %
- DAB-Konzentrationen:
- 0,2 mg/ml
 - 0,5 mg/ml
 - 0,8 mg/ml
- DAB-Verstärkungs-Puffer:
- 50 mM Tris-Puffer
 - 100 mM Na-Acetat-Puffer

3.5.4.4. Das optimierte Cer-Phosphat-H₂O₂-Protokoll für alkalische Phosphatase in der Lichtmikroskopie

Lösungen:

Vorinkubationspuffer:	0,27 g N-[Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl]-Glycin (Tricin, 50 mM), 10,8 g Saccharose (30 %), 29 mg MgSO ₄ (3,9 mM) in 28 ml gekochtes und rückgekühltes H ₂ O (vorsichtig mischen). Zugabe von 0,158 g Diethanolamin (50 mM), einstellen von pH 10 mit 1 N NaOH und auf 30 ml auffüllen.
Reaktionspuffer:	Vorsichtig 11 mg Cerium(III)-Chlorid (3 mM, Fluka, Buchs) und 100 µl Levamisol-Stock in 10 ml Vorinkubationspuffer 2 lösen.
Tricin-Puffer:	8,99 g N-[Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl]-Glycin (Tricin, 50 mM) in 1000 ml abgekochtes und rückgekühltes H ₂ O, pH 9.5 mit 1N NaOH einstellen.
Para-Nitrophenylphosphat-Stock:	45,7 mg para-Nitrophenylphosphat (100 mM) in 1 ml H ₂ O lösen.
Levamisol-Stock:	0,482 g L(-)-2,3,5,6,-Tetrahydro-6-Phenylimidazo(2,1-b)-Thiazol-Hydrochlorid (Levamisol; 200 mM) in 10 ml H ₂ O lösen.
Konversionspuffer:	0,2 % H ₂ O ₂ gelöst in Tricin-Puffer.
DAB-Verstärkungspuffer 1:	0,5 mg/ml 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat (Diaminobenzidin, DAB; Aldrich, USA), 2 % Ammonium-Ni-sulfat in 50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Puffer (pH 7,6).
DAB-Verstärkungspuffer 2:	0,5 mg/ml 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat (Diaminobenzidin, DAB; Aldrich, USA), 2 % Ammonium-Ni-sulfat in 100 mM Na-Acetat-Puffer (pH 5,3).

Durchführung:

1. Kryostatschnitte wie beschrieben (siehe 3.1.).
2. Immunmarkierung wie beschrieben (siehe 3.5.1.).
3. Zweimal 10 min mit PBS waschen.
4. Dreimal 20 min mit Tricin-Puffer waschen.
5. 30 min Vorinkubation mit Vorinkubationspuffer.
6. 500 µl Reaktionspuffer und starten der Reaktion durch Zugabe von 5 µl para-Nitrophenylphosphat-Stock (Reaktionstemperatur 37 °C) für ca. 60-120 min.
7. Dreimal 5 min mit Tricin-Puffer waschen.
8. Oxidation des Cer(III)-Phosphohydroxid zu Cer(IV)-Phosphohydroperoxid mit 500 µl Konvertierungspuffer (Es entsteht ein gelbes Präzipitat).
9. Dreimal 5 min mit Tricin-Puffer waschen.
10. Inkubieren mit 500 µl DAB-Verstärkungspuffer 1 oder 2 für 10 min (Es entsteht ein dunkelbraunes bis schwarzes Präzipitat)
11. Zweimal 5 min mit Tricin-Puffer waschen.
12. Aufziehen der Schnitte auf beschichtete Objektträger.
13. Dehydrierung mit Ethanol und eindeckeln wie beschrieben.

3.5.4.5. Färbung des Peroxidase-ABC-Komplexes für die Lichtmikroskopie

Lösungen:

Vorinkubationslösung:	3 mg 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat (Diaminobenzidin, DAB; Aldrich, USA) in 1 ml H ₂ O lösen, 1 ml Tris-Stock (100 mM), 8 ml H ₂ O und 100 µl Imidazol-Stock (10 mM) dazugeben.
Reaktionspuffer:	0,015 % Ammonium-Nickel-Sulfat in 0.5 ml Vorinkubationspuffer, starten der Reaktion durch Zugabe von 25 µl 0,3 % H ₂ O ₂ .
Tris-Stock (1 M):	12.2 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (1 M) in 200 ml H ₂ O lösen (mit 10 N HCl pH 7.6 einstellen).
Imidazol-Stock:	681 mg Glyoxalin (Imidazol; 1 M) in 10 ml H ₂ O lösen (mit 10 N HCl pH 7.6 einstellen).

Nach einer 15-minütigen Vorinkubation ist die gebundene Meerrettichperoxidase mittels des Inkubationspuffers (3-6 min) dargestellt worden. Anschließend wurden die Gewebsschnitte mit PBS gewaschen (3 x 5 min), auf beschichtete Objektträger aufgezogen, 30 min an der Luft getrocknet, entwässert und in Entellan eingedeckelt.

3.5.4.6. Simultane Doppelmarkierung von Peroxidase und alkalischer Phosphatase auf lichtmikroskopischem Niveau

Die Lösungen für die simultane immunenzymatische Doppelmarkierung sind wie zuvor unter den Punkten „Das optimierte Cer-Phosphat- H_2O_2 -Protokoll für alkalische Phosphatase in der Lichtmikroskopie“ und „Färbung des Peroxidase-ABC-Komplexes für die Lichtmikroskopie“ beschrieben angesetzt worden (siehe 3.5.4.4. und 3.5.4.5.).

Durchführung:

1. Kryostatschnitte wie beschrieben.
2. Immunmarkierung wie beschrieben (Peroxidase über biotinylierten Zweitantikörper, alkalische Phosphatase mit aP-gekoppeltem Zweitantikörper).
3. Inkubation mit ABC-Komplex wie beschrieben.
4. Dreimal 20 min mit PBS waschen.
5. 15 min Vorinkubation mit Peroxidase-Vorinkubationspuffer.
6. 500 μ l Peroxidase-Inkubationspuffer zugeben und starten der Peroxidase-reaktion durch weitere Zugabe von 25 μ l 0.3 % H_2O_2 für 3-6 min (Es entsteht ein braun-schwarzes Präzipitat der Peroxidaseraktion).
7. Stoppen der Reaktion durch zweimaliges Waschen mit PBS (5 min) und einmal 10 min PBS mit 0.1 % NaN_3 waschen (Peroxidaseinhibierung).
8. Dreimal 20 min mit Tricin-Puffer waschen.
9. 30 min Vorinkubation mit aP-Vorinkubationspuffer.
10. 500 μ l aP-Reaktionspuffer zugeben und starten der Reaktion durch weitere Zugabe von 5 μ l para-Nitrophenylphosphat-Stock (Reaktionstemperatur 37 °C) für ca. 60-120 min.
11. Dreimal 5 min mit Tricin-Puffer waschen.
12. Oxidation des Cer(III)-Phosphohydroxid zu Cer(IV)-Phosphohydroperoxid mit 500 μ l Konvertierungspuffer (Es entsteht ein gelbes Präzipitat der alkalischen Phosphatase-Reaktion).
14. Dreimal 5 min mit Tricin-Puffer waschen.
15. Aufziehen der Schnitte auf beschichtete Objektträger wie beschrieben.
16. Dehydrierung mit Ethanol und eindeckeln wie beschrieben.

3.6. Lichtmikroskopische Auswertung

Geräte/Software:

- Lichtmikroskop:
- Leica DMLS (Leica, Wetlar).
 - Leiz DMRB (Leica, Wetlar).
- Kamera:
- 3 CCD DXC-950 Power HAD (Sony, Japan).
 - Olympus DP 10 (Olympus, Japan).
- Computer:
- Power Macintosh 8600/250 (Apple, USA).
 - PC (Olympus, Japan).
- Bildaufnamesoftware:
- Sicon Image Version 1.62 für Mac (National Institutes of Health, USA).
 - Olympusbildaufnahmesoftware von SIS (AnalySIS 3.0; Olympus, Japan).
- Bildbearbeitungssoftware:
- Adobe Photoshop 5.0 für Mac und PC.
 - Corel Draw 9.0 für PC.

Die lichtmikroskopische Auswertung und Dokumentation der Schnitte erfolgte über die oben genannten Systeme.

4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

4.1. Vibratomschnitte

Geräte/Material:

Vibratom:	Vibratome 3000 (Tissue Sectioning System, Technical Products International, USA).
Sekundenkleber:	Sekundenkleber (Uhu, Bühl/Baden).

Die bei - 80 °C gelagerten Gewebelöckchen wurden in 30 %iger Saccharose-lösung in PBS aufgetaut und für je 10 min über eine 15 %-, 10 %-, 5 %ige Saccharose-PBS-Lösung in PBS überführt. Anschließend sind die Löckchen mit einem Sekundenkleber auf einem Objekthalter fixiert worden. Mit einem Vibratom sind in PBS bei 4 °C 40 µm Gewebsschnitte hergestellt worden. Geschnitten wurde mit langsamer Geschwindigkeit bei hoher Amplitude. Die in PBS frei flotierenden Schnitte sind dann der Pre-Embedding-Immunzytochemie zugeführt worden (siehe 4.2.4.).

4.2. Pre-Embedding-Immunzytochemie

4.2.1. Antikörperinkubation

Lösungen:

Reduktionslösung:	264 mM Natriumborhydrid in PBS.
Vorinkubation (1. Antikörper):	0,1 % Triton-X-100, 0,05 % Phenylhydrazin, 10 % NGS (Normal Goat Serum; PAN-Biotech, Aidenbach) in PBS.
Inkubation (1. Antikörper):	Antikörperverdünnung in 10 % NGS, 0,1 % NaN ₃ , 0,01 % Thimerosal (Ethylmerkurithiosalocylsäure-Natriumsalz) in PBS.
Vorinkubation (2. Antikörper):	2 mg/ml BSA (Rinder-Serum-Albumin) in PBS (PBS-A).
Inkubation (2. Antikörper):	Antikörperverdünnung in Vorinkubationslösung 2. Antikörper (PBS-A) mit 0,1 % NaN ₃ .

Antikörperverdünnungen:

a-TH (Maus):	1:200 monoklonaler Anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörper (a-TH; Roche Diagnostics, Mannheim) in Inkubationspuffer 1. Antikörper.
a-5HT (Kaninchen):	1:100 polyklonaler Anti-Serotonin-Antikörper (a-5HT; Behringer et al, 1991) in Inkubationspuffer 1. Antikörper.
B-HaM:	1:1000 Biotinylierter-Pferd-anti-Maus-Antikörper (B-HaM; Vector, Buringame) in Inkubationspuffer 2. Antikörper.
B-GaR:	1:2000 Biotinylierter-Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (B-GaR; Vector, Buringame) in Inkubationspuffer 2. Antikörper.
aP-HaM:	1:200 alkalische-Phosphatase-Pferd-anti-Maus-Antikörper (aP-HaM; Vector, Buringame) in Inkubationspuffer 2. Antikörper.

Die Antikörper- und Markersysteminkubationslösungen sind grundsätzlich wie für die Lichtmikroskopie beschrieben durchgeführt worden. Zur besseren Erhaltung der Ultrastruktur wurde das Detergenz Triton-X-100 ausschließlich 0,1 %ig und nur im ersten Vorinkubationsschritt eingesetzt. Die Antikörper- und Markersystemlösungen enthielten kein Triton-X-100.

Kontrollexperimente sind ohne Zugabe des Erstantikörpers und durch vorherige Blockade des Antikörpers mit dem jeweiligen Fusionsprotein durchgeführt worden. Beim Letzteren wurde die Erstantikörperlösung vor dem Einwirken auf den Schnitt 2 h mit 10 µg/ml des jeweiligen Fusionsproteins inkubiert. Die Kontrollschnitte sind im Anschluss wie unter „*Färbung der Markersysteme für die Elektronenmikroskopie*“ beschrieben behandelt worden (siehe 4.2.4.).

4.2.2. Streptavidinmarkierte alkalische Phosphatase aus dem Kalbsdarm

Lösungen:

Vorinkubationslösung (PBS-A): 2 mg/ml BSA (Rinder-Serum-Albumin) in PBS.

SA-aP: 1:1000 Streptavidin-alkalische-Phosphatase (SA-aP; Life Technologies, Eggenstein) in PBS-A.

Nach einer 30-minütigen Vorinkubation in PBS-A wurden die mit Erst- und biotinylierten Zweitantikörpern markierten Schnitte (siehe oben) mit SA-aP-Lösung inkubiert (12 h, 5 °C). Anschließend wurde das Gewebe zweimal mit PBS gewaschen (20 und 40 min) und der jeweiligen Färbung mit alkalischer Phosphatase zugeführt (siehe unten).

4.2.3. ABC-Peroxidase-Komplex

Lösungen:

Vorinkubationslösung (PBS-A): 2 mg/ml BSA (Rinder-Serum-Albumin) in PBS.

ABC-Komplex: 1:1000 Elite A (Avidin H; ABC-Elite Kit, Vector, Wiesbaden) in PBS-A mischen und 1:1000 Elite B (Biotinyl-Peroxidase; ABC-Elite Kit, Vector, Wiesbaden) dazugeben, erneut mischen und vor Gebrauch mindestens 30 min den ABC-Komplex ausbilden lassen.

Die mit den Erst- und biotinylierten Zweitantikörpern markierten Schnitte sind zweimal mit PBS gewaschen (20 und 40 min) und 60 min mit PBS-A vorinkubiert worden. Die Schnitte wurden 6 h mit der ABC-Komplex-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen (10, 20 und 30 min).

4.2.4. Färbung der Markersysteme für die Elektronenmikroskopie

4.2.4.1. Optimierte Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode für alkalische Phosphatase in der Elektronenmikroskopie

Lösungen:

Vorinkubationspuffer:	0,27 g N-[Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl]-Glycin (Tricin, 50 mM), 10,8 g Saccharose (30 %), 29 mg MgSO ₄ (3.9 mM) in 28 ml gekochtes und rückgekühltes H ₂ O (vorsichtig mischen). Zugabe von 0,158 g Diethanolamin (50 mM), einstellen von pH 10 mit 1N NaOH und auf 30 ml auffüllen.
Reaktionspuffer:	Vorsichtig 11 mg Cerium(III)-Chlorid (3 mM, Fluka, Buchs) und 100 µl Levamisol-Stock in 10 ml Vorinkubationspuffer 2 lösen.
Tricin-Puffer:	8,99 g N-[Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl]-Glycin (Tricin, 50 mM) in 1000 ml abgekochtes und rückgekühltes H ₂ O, pH 9,5 mit 1N NaOH einstellen.
Para-Nitrophenylphosphat-Stock:	45,7 mg para-Nitrophenylphosphat (100 mM) in 1 ml H ₂ O lösen.
Levamisol-Stock:	0,482 g L(-)-2,3,5,6,-Tetrahydro-6-Phenylimidazo(2,1-b)-Thiazol-Hydrochlorid (Levamisol; 200 mM) in 10 ml H ₂ O lösen.
Konversionspuffer:	0,2 % H ₂ O ₂ gelöst in Tricin-Puffer.

Die Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode für die Elektronenmikroskopie wurde wie unter „*Optimierte Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode für alkalische Phosphatase in der Lichtmikroskopie*“ beschrieben bis zur Oxidation des Cers mit H₂O₂ (siehe 3.5.4.4., Punkte 2.-9.) durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte der weiteren Aufarbeitung für die Elektronenmikroskopie zugeführt.

4.2.4.2. Färbung des Peroxidase-ABC-Komplexes für die Elektronenmikroskopie

Lösungen:

Vorinkubationslösung:	3 mg 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat (Diaminobenzidin, DAB; Aldrich, USA) in 1 ml H ₂ O lösen, 1 ml Tris-Stock (100 mM), 8 ml H ₂ O und 100 µl Imidazol-Stock (10 mM) dazugeben.
Reaktionspuffer:	0,5 ml Vorinkubationspuffer, starten der Reaktion durch Zugabe von 25 µl 0,3 % H ₂ O ₂ .
Tris-Stock (1 M):	12,2 g Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (1 M) in 200 ml H ₂ O lösen und pH 7.6 einstellen.
Imidazol-Stock:	681 mg Glyoxalin (Imidazol; 1 M) in 10 ml H ₂ O lösen und pH 7,6 einstellen.

Die Peroxidase-Visualisierung ist, mit einer Ausnahme, nach dem beschriebenen Protokoll „*Färbung des Peroxidase-ABC-Komplexes für die Lichtmikroskopie*“ durchgeführt worden (siehe 3.5.4.5.). Mit dem Reaktionspuffer ist 10 min entwickelt worden, wobei dem Reaktionspuffer kein Ammonium-Nickel-Sulfat zugesetzt wurde.

4.2.4.3. Simultane immunenzymatische Doppelmarkierung von Peroxidase und alkalischer Phosphatase für die Elektronenmikroskopie

Das für die immunenzymatische Doppelmarkierung auf ultrastruktureller Ebene entwickelte Protokoll:

Lösungen:

Vorinkubationspuffer 1: (Peroxidase)	3 mg 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat (0,3 mg/ml) in 1 ml H ₂ O lösen, 1 ml Tris-Stock (100 mM), 8 ml H ₂ O und 100 µl Imidazol-Stock (10 mM) dazugeben.
Inkubationspuffer 1: (Peroxidase)	0,5 ml Vorinkubationspuffer 1, starten der Reaktion durch Zugabe von 25 µl H ₂ O ₂ .
Vorinkubationspuffer 2: (alkalische Phosphatase)	0,27 g N-[Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl]-Glycin (Tricin; 50 mM), 10,8 g Saccharose (30 %), 29 mg MgSO ₄ (3,9 mM) in 28 ml gekochtes und rückgekühltes H ₂ O (vorsichtig mischen). Zugabe von 0,158 g Diethanolamin (50 mM), einstellen von pH 10 mit 1N NaOH und auf 30 ml auffüllen.
Reaktionspuffer 2: (alkalische Phosphatase)	Vorsichtig 11 mg Cerium(III)-Chlorid (3 mM, Fluka, Buchs) und 100 µl Levamisol-Stock (2 mM) in 10 ml Vorinkubationspuffer 2 lösen.
Tris-Stock:	12,2 g Tris-(Hydroxymethyl)-Amino-Methan (1 M) in 200 ml H ₂ O lösen und pH 7,6 einstellen.
Imidazol-Stock:	681 mg Glyoxalin (Imidazol; 1 M) in 10 ml H ₂ O lösen und pH 7,6 einstellen.
Tricin-Puffer:	8,99 g N-[Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl]-Glycin (Tricin, 50 mM, Sigma, München) in 1000 ml abgekochtes und rückgekühltes H ₂ O, pH 9,5 mit 1N NaOH einstellen.
Para-Nitrophenyl-Phosphat-Stock:	45,7 mg para-Nitrophenylphosphat (100 mM) in 1 ml H ₂ O lösen.
Levamisol-Stock:	0,482 g L(-)-2,3,5,6,-Tetrahydro-6-Phenylimidazo(2,1-b)-Thiazol-Hydrochlorid (Levamisol; 200 mM) in 10 ml H ₂ O lösen.
Konversionspuffer:	0,2 % H ₂ O ₂ gelöst in Tricin-Puffer.
Inhibierungspuffer (Peroxidase):	0,1 % Natriumazid in PBS.

Durchführung:

1. Vibratomschnitte wie beschrieben (siehe 4.1.).
2. Immunmarkierung wie beschrieben (siehe 4.2.1.).
3. Dreimal 20 min mit PBS waschen.
4. 15 min Vorinkubation mit Vorinkubationspuffer 1.
5. Wechseln des Vorinkubationspuffers 1 und starten der Peroxidasereaktion durch Zugabe von 25 μl 0.3 % H_2O_2 (10 min).
6. Stoppen der Reaktion durch zweimaliges waschen mit PBS (5 min), gefolgt von einmaligem Waschen mit Peroxidaseinhibierungspuffer (10 min).
7. Dreimal 20 min mit Tricin-Puffer waschen.
8. 30 min Vorinkubation mit Vorinkubationspuffer 2.
9. 500 μl Reaktionspuffer 2 und starten der Reaktion durch Zugabe von 5 μl para-Nitrophenylphosphat-Stock (Reaktionstemperatur 37 °C), Reaktionszeit ca. 60-120 min.
10. Dreimal 5 min mit Tricin-Puffer waschen.
11. Oxidation des Cer(III)-Phosphohydroxids zu Cer(IV)-Phosphohydroperoxid mit 500 μl Konvertierungspuffer.
12. Aufarbeitung für die Elektronenmikroskopie wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

4.2.4.4. Silberverstärkte Nano-Gold-markierte Zweitantikörper

Lösungen:

Inkubationslösung	1:40 Nano-Gold-Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (0,8 nm Au-GaR; Aurion, Niederlande) in 0,1 % NaN_3 , 0,1 % Tween-20 (Auroprobe; Amersham Life Science, UK), 0,1 % carboxymethyliertes Rinder-Serum-Albumin (BSA-C; Aurion, Niederlande) in PBS-A.
2. Antikörper:	
PBS-Tween:	0,05 % Tween-20 in PBS.
Nachfixierungslösung:	2 % Glutaraldehyd in PBS.
Natriumnitrat-Lösung:	150 mM NaNO_3 in H_2O pH 6,5.
Gummi-Arabicum-Lösung:	1 Gewichtsteil Gummi-Arabicum (Aurion, Niederlande), 2 Gewichtsteile H_2O mehrere Tage bei Raumtemperatur rühren, abzentrifugieren, der klare Überstand ist gebrauchsfertig.
Silberverstärkungs-Lösung:	1 Volumenteil Silber A (Amersham Life Science, UK), 1 Volumenteil Gummi-Arabicum-Lösung gut mischen, 1 Volumenteil Silber B (Amersham Life Science, UK) dazugeben und gut mischen.
Phosphat-Puffer:	100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$ in H_2O pH 7,4.

Für diese Anwendung ist eine modifizierte Inkubationslösung für den Zweitantikörper eingesetzt worden (siehe Inkubationslösung 2. Antikörper). Alle anderen Antikörperinkubationsschritte blieben, wie unter Punkt 4.2.1. beschrieben, unverändert. Die Inkubationszeit der Zweitantikörper betrug 18 h bei 4 °C. Anschließend wurden die Schnitte eine Stunde mit PBS-Tween, eine weitere Stunde mit PBS gewaschen, die Antikörper 15 min mit Nachfixierungslösung fixiert und in PBS überführt. Nach mehrmaligem Waschen mit Natriumnitratlösung (5x10 min) sind die Nano-Gold-markierten Zweitantikörper 30 min im Dunkeln mit Silberverstärkungs-Lösung silberverstärkt worden. Anschließend wurden die Gewebsschnitte mit PBS gewaschen (3x10 min), 15 min mit Nachfixierungslösung fixiert, wiederum mit PBS gewaschen (2x10 min) und der weiteren Aufarbeitung für die Elektronenmikroskopie zugeführt (siehe unten).

4.2.5. Aufarbeitung für die Elektronenmikroskopie

4.2.5.1. Osmiumfixierung, Entwässerung und Einbettung

Lösungen:

Osmiumfixierungs-Lösung:	1 % Osmiumtertroxid (OsO_4 ; Polysciences Europe, Eppelheim) in H_2O .
Araldit-Gemisch:	30 Gewichtsteile Araldit CY 212 (Serva, Heidelberg), 24 Gewichtsteile 2-Dodecenybersteinsäureanhydrid (DDSA; Serva, Heidelberg), vorsichtig blasenfrei mischen bis das Gemisch schlierenfrei ist.
Einbettungs-Vorinkubations-Medium (Intermedium):	22 g Araldit-Gemisch, 0,6 ml 2,4,6,-Tris-(Dimethylaminomethyl)-Phenol (DMP-30; Sigma, München) in 20 ml 1,2-Epoxypropan (Propylenoxid) mischen.
Einbettungs-Medium:	2 ml 2,4,6,-Tris-(dimethylaminomethyl)-phenol (DMP-30; Sigma, München) in 100 g Araldit-Gemisch vorsichtig blasenfrei mischen bis das Gemisch schlierenfrei ist.

Material:

Aclar-Folie (AlliedSignal, USA).

Die in PBS flotierenden Schnitte wurden zweimal kurz in H_2O gewaschen, auf einen Objektträger flach aufgezogen und 15 min mit einem Tropfen Osmiumfixierungs-Lösung überdeckt. Nach der Überführung in H_2O wurden die Schnitte in Schnappdeckelgläschen überführt, über eine Alkoholreihe (1 x 40 %, 1 x 60 %, 2 x 70 %, 1 x 90 %, 2 x 96 %, 3 x 100 % Ethanol) je 5 min entwässert, 2 x 5 min mit dem Intermedium Propylenoxid gewaschen und über Nacht bei leichtem Schütteln im Einbettungs-Vorinkubations-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 2 x 2 h in das Einbettungs-Medium überführt und zwischen einem Aralditobjektträger und Aclar-Folie unter leichter Beschwerung durch Messingklötzchen flach eingebettet. Die Polymerisation des Epoxidharzes ist für 72 h bei 65 °C durchgeführt worden.

4.2.3.2. Ultradünnschnitte, Grids und Kontrastierung

Lösungen:

Kontrastierungslösung 2% Uranylacetat-Dihydrat in 70 % Methanol.

(Uranylacetat):

Kontrastierungslösung 1,33 g Blei(II)-Nitrat, 1,76 g Natriumcitrat in 50 ml H₂O pH 12.

(Bleinitrat):

Geräte/Materialien:

Sekundenkleber: Sekundenkleber (Uhu, Bühl/Baden).

Diamantmesser: Ultra 45° (Diatome, Schweiz).

Ultramikrotom: Ultracut S (Reichert, Nussloch).

Grids: Athene-Netzchen (Kupfer; Smesthurst High-Light, USA).

Die gewünschten Regionen wurden mit einer Rasierklinge aus den eingebetteten Gewebsschnitten herausgeschnitten, mit Sekundenkleber auf Blöckchen geklebt, getrimmt und mit einem Diamantmesser am Ultramikrotom in 80 nm dicke Ultradünnschnitte geschnitten. Anschließend sind die Ultradünnschnitte auf 200 Mesh Kupfer-Grids überführt und getrocknet worden. Vor der elektronenmikroskopischen Auswertung wurden die Ultradünnschnitte 5 min auf einem Tropfen Uranylacetat-Kontrastierungslösung kontrastiert, mit H₂O gespült, getrocknet, 5 min auf einem Tropfen Bleinitrat-Kontrastierungslösung kontrastiert (Reynolds, 1963), mit H₂O gespült und wiederum getrocknet.

Parallel wurden für lichtmikroskopische Übersichtskontrollen 700 nm dicke Semidünnschnitte hergestellt, auf Objektträgern Toluidinblau gegengefärbt (siehe oben) und in Entellan eingedeckelt.

4.3. Post-Embedding-Immunzytochemie

4.3.1. Blockeinbettung in Araldit

Lösungen:

Fixierungslösung:	4 % Paraformaldehyd, 0,05 % Glutaraldehyd und 0,2 % Pikrinsäure in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,4.
Osmiumfixierungs-Lösung:	4 % Osmiumtetroxid (OsO ₄ ; Polysciences Europe, Eppelheim) in PBS.
Araldit-Gemisch:	30 Gewichtsteile Araldit CY 212 (Serva, Heidelberg), 24 Gewichtsteile 2-Dodecenybersteinsäureanhydrid (DDSA; Serva, Heidelberg), vorsichtig blasenfrei mischen bis das Gemisch schlierenfrei ist.
Einbettungs-Vorinkubations-Medium:	22 g Araldit-Gemisch, 0,6 ml 2,4,6,-Tris-(Dimethylaminomethyl)-Phenol (DMP-30; Sigma, München) in 20 ml 1,2-Epoxypropan (Propylenoxid) mischen.
Einbettungs-Medium:	2 ml 2,4,6,-Tris-(Dimethylaminomethyl)-Phenol (DMP-30; Sigma, München) in 100 g Araldit-Gemisch vorsichtig blasenfrei mischen bis das Gemisch schlierenfrei ist.

Die in Fixierungslösung flotierenden Gewebestücke sind 2 x 1 h in PBS gewaschen, 2 h in Nachfixierungslösung fixiert, 3 x 2 h in PBS gewaschen, 30 min und über Nacht (16 h) in 70 % Ethanol inkubiert worden. Die weitere Dehydrierung des Gewebes wurde 1 x 30 min in 80 %, 2 x 30 min in 90 %, 2 x 30 min in 96 %, 3 x 30 min in 100 % Ethanol und 2 x 30 min in Propylenoxid durchgeführt. Anschließend sind die Blöckchen über Nacht (16 h) in Einbettungs-Vorinkubations-Medium überführt worden. Nach 2 x 2 h Vorinkubation in Einbettungs-Medium sind die Gewebelöckchen in mit diesem Medium gefüllten Gelatine kapseln überführt und 72 h bei 65 °C polymerisiert worden. Aus dem eingebetteten Gewebematerial wurden die gewünschten Regionen mittels Skalpell und herkömmlicher Rasierklingen herausgeschnitten und getrimmt.

4.3.2. Ultradünnschnitte

Geräte/Materialien:

Diamantmesser: Ultra 45° (Diatome, Schweiz).

Ultramikrotom: Ultracut S (Reichert, Nussloch).

Grids: Athene-Netzchen (Nickel; Smesthurst High-Light, USA).

Die gewünschten Regionen des eingebetteten Gewebes wurden für die Post-Embedding-Immunzytochemie mit einem Diamantmesser am Ultramikrotom in 80 nm dicke Ultradünnschnitte geschnitten und auf 200 Mesh Nickelgrids überführt.

4.3.3. Post-Embedding-Markersysteme

4.3.3.1. Silberverstärkte Nano-Gold-markierte Zweitantikörper

Lösungen:

TBS (Tris-Buffered-Saline):	50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan, 150 mM NaCl, 2,6 mM KCl in H ₂ O pH 7,6.
TBS-X:	0,5 ml Triton-X-100 werden in 500 ml TBS gelöst.
Ätzlösung 1:	1 % Periodsäure (HJO ₄) in H ₂ O.
Ätzlösung 2:	1 % Natriummetaperiodat in H ₂ O.
Vorinkubationslösung 1. Antikörper:	100 µl NGS (Normal Goat Serum; PAN Biotech, Aidenbach), 40 g BSA (Bovine Serum Albumin) werden in 1,9 ml TBS-X gelöst.
Inkubationslösung 1. Antikörper:	1:200 Anti-GABA-Antikörper (polyklonal; Euliz, 2000; eigenes Labor) in Vorinkubationslösung 1. Antikörper.
Vorinkubationslösung 2. Antikörper:	40 mg BSA (2 %) in 2 ml TBS-X.
Inkubationslösung 2. Antikörper:	1:40 Nano-Gold-Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (0,8 nm Au-GaR; Aurion, Niederlande) in Vorinkubationslösung 2. Antikörper.
Phosphat-Puffer (PB):	100 mM NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O in H ₂ O pH 7,4.
Nachfixierungslösung:	2 % Glutaraldehyd in PB.
Silberverstärkungs-Lösung:	Developer und Enhancer (Aurion Silver Enhancement Kit; Aurion, Niederlande) werden im Verhältnis 1+20 gemischt.

Die Grids mit den Ultradünnschnitten wurden auf einen Tropfen H₂O gelegt, für 5 min auf einen Tropfen Ätzlösung 1, für weitere 5 min auf einen Tropfen Ätzlösung 2 überführt und mit H₂O gespült. Vor der 3-stündigen Erstantikörperinkubation wurden die Grids 10 min auf einem Tropfen TBS-X und 1h in Vorinkubationslösung für den Erstantikörper vorinkubiert. Anschließend sind die Grids mit TBS-X gespült, 5 min auf einen Tropfen Vorinkubationslösung für den Zweitantikörper überführt und 1,5 h mit der Zweitantikörperlösung inkubiert worden. Nach dem Spülen mit TBS wurden die Antikörper für 5 min mit Nachfixierungslösung fixiert und mit H₂O gewaschen. Zur Silberverstärkung der Nano-Gold-markierten Zweitantikörper wurden die Grids für 30 min auf einem Tropfen Silberverstärkungslösung inkubiert, intensiv mit H₂O gespült und getrocknet.

Anschließend sind die Grids wie oben beschrieben mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert worden.

Kontrollexperimente sind ohne Zugabe des Erstantikörpers und durch vorherige Blockade des Antikörpers mit dem jeweiligen Fusionsprotein durchgeführt worden. Beim Letzteren wurde die Erstantikörperlösung vor dem Einwirken auf den Schnitt 2 h mit 10 µg/ml des jeweiligen Fusionsproteins inkubiert. Die Kontrollschnitte sind im Anschluss wie zuvor beschrieben behandelt worden.

4.3.3.2. Ferritin-Protein-A-Markierung

Lösungen:

TBS (Tris-Buffered-Saline):	50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan, 150 mM NaCl, 2,6 mM KCl in H ₂ O pH 7,6.
TBS-X:	0,5 ml Triton-X-100 werden in 500 ml TBS gelöst.
Ätzlösung 1:	1 % Periodsäure (HJO ₄) in H ₂ O.
Ätzlösung 2:	1 % Natriummetaperiodat in H ₂ O.
Vorinkubationslösung 1. Antikörper:	100 mg BSA (Bovine Serum Albumin), 0,1 % Gelatine werden in 1,9 ml TBS-X gelöst.
Inkubationslösung 1. Antikörper:	1:200 Anti-GABA-Antikörper (polyklonal; Euliz, 2000; eigenes Labor) in Vorinkubationslösung 1. Antikörper.
Vorinkubationslösung 2:	40 mg BSA (2 %) in 2 ml TBS-X.
Inkubationslösung 2:	1:500 Ferritin-markiertes Protein A (Protein A-Ferritin, 10 mg Protein pro ml; Sigma, München) in Vorinkubationslösung 2.
Phosphat-Puffer (PB):	100 mM NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O in H ₂ O pH 7,4.
Nachfixierungslösung:	2 % Glutaraldehyd in PB.

Die Grids mit den Ultradünnschnitten wurden auf einen Tropfen H₂O gelegt, für 5 min auf einen Tropfen Ätzlösung 1, für weitere 5 min auf einen Tropfen Ätzlösung 2 überführt und mit H₂O gespült. Vor der 3-stündigen Erstantikörperinkubation wurden die Grids 10 min auf einem Tropfen TBS-X und 1 h in Vorinkubationslösung für den Erstantikörper vorinkubiert. Anschließend sind die Grids mit TBS-X gespült, 5 min auf einen Tropfen Vorinkubationslösung 2 überführt und 1,5 h mit der Inkubationslösung 2 inkubiert worden. Nach dem Spülen mit TBS

wurden die Antikörper für 5 min mit Nachfixierungslösung fixiert, mit H₂O gewaschen, getrocknet und wie beschrieben kontrastiert.

Kontrollexperimente sind ohne Zugabe des Erstantikörpers und durch vorherige Blockade des Antikörpers mit dem jeweiligen Fusionsprotein durchgeführt worden. Beim Letzteren wurde die Erstantikörperlösung vor dem Einwirken auf den Schnitt 2 h mit 10 µg/ml des jeweiligen Fusionsproteins inkubiert.

4.4. Weitere mögliche getestete Marker

4.4.1. Dextran-umhülltes Eisenoxid (USPIO)

Geräte/Materialien:

Diamantmesser:	Ultra 45° (Diatome, Schweiz).
Ultramikrotom:	Ultracut S (Reichert, Nussloch).
Grids:	Athene-Netzchen (Kupfer; Smesthurst High-Light, USA).

Einer erwachsenen Wistar-Ratte wurde das Dextran-umhüllte superparamagnetische Eisenoxid (USPIO; Kresse et al, 1998), welches als Leberkontrastmittel für die T2-MRI dient, intravenös injiziert (Zusammenarbeit mit Herr Dr. Zimmer, Neuroradiologie der Charité; Lawaczeck et al, 1997; Kresse et al, 1998). Nach zweistündiger Inkubation wurde das Tier wie beschrieben fixiert, die Leber entnommen und in Araldit Block-eingebettet.

Die gewünschten Regionen des als Blöckchen eingebetteten Gewebes wurden mit Rasierklingen herausgeschnitten, aufgeklebt, getrimmt, mit einem Ultramikrotom in 80 nm dicke Ultradünnschnitte geschnitten und auf 200 Mesh Kupfer-Grids überführt. Nach der Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleinitrat wurden die Ultradünnschnitte elektronenmikroskopisch ausgewertet.

Parallel wurden für lichtmikroskopische Übersichtskontrollen 700 nm dicke Semidünnschnitte hergestellt, auf Objektträgern Toluidinblau gegengefärbt (siehe oben) und in Entellan eingedeckelt (siehe oben).

4.4.2. Markierung der Superose-Kir6.2.His-Tag-Antigen-Beads mit Nickel(II)-Nitrilotriacetylsäure-Glutathion-Gold-Kolloiden (Ni(II)-NTA-GSH-Gold)

Lösungen:

Tris-Puffer:	100 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan in H ₂ O (pH 7.6).
Ni(II)-NTA-GSH-Gold-Lösung:	1:20 Ni(II)-NTA-GSH-Gold-Lösung in Tris-Puffer.
Fixierungslösung:	2 % Glutaraldehyd in PBS.
Natriumnitrat-Lösung:	150 mM NaNO ₃ in H ₂ O pH 6,5.
Gummi-Arabicum-Lösung:	1 Gewichtsteil Gummi-Arabicum (Aurion, Niederlande), 2 Gewichtsteile H ₂ O mehrere Tage bei Raumtemperatur rühren, abzentrifugieren, der klare Überstand ist gebrauchsfertig.
Silberverstärkungs-Lösung:	1 Volumenteil Silber A (Amersham Life Science, UK), 1 Volumenteil Gummi-Arabicum-Lösung gut mischen, 1 Volumenteil Silber B (Amersham Life Science, UK) dazugeben und gut mischen.
Phosphat-Puffer:	100 mM NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O in H ₂ O pH 7,4.

Geräte/Materialien:

Vibratom:	Vibratome 3000 (Tissue Sectioning System, Technical Products International, USA).
Sekundenkleber:	Sekundenkleber (Uhu, Buhl/Baden).
Diamantmesser:	Ultra 45° (Diatome, Schweiz).
Ultramikrotom:	Ultracut S (Reichert, Nussloch).
Grids:	Athene-Netzchen (Nickel; Smesthurst High-Light, USA).

Vom Modellgewebe mit Superose-Kir6.2.His-Tag-Antigen-Beads in Agarose (siehe oben) wurden 40 µm Vibratomschnitte angefertigt. Die Schnitte sind flotierend über Nacht mit einer 1:20 in Tris-Puffer verdünnten Lösung des Ni(II)-NTA-GSH-Gold (Hainfeld et al, 1999) inkubiert worden. Nach dreimaligem Waschen mit Tris-Puffer und PBS für je 10 min wurden die Schnitte 15 min mit Fixierungslösung nachfixiert, 2x10 min mit PBS und mit Natriumnitratlösung (5x10 min) gespült. Anschließend ist zur Sichtbarmachung der Ni(II)-NTA-GSH-Gold-Kolloide 30 min im Dunkeln mit Silberverstärkungslösung silberverstärkt worden. Nach dem Waschen mit PBS (3x 10 min) wurden die Schnitte 15 min mit Nachfixierungslösung fixiert und wiederum

mit PBS gewaschen (2x10 min). Die so markierten Schnitte des Modellgewebes wurden wie beschrieben in Araldit flach eingebettet und ultradünn geschnitten.

Kontrollen sind mit Modellgewebe ohne Superose-Kir6.2.His-Tag-Antigen-Beads in Agarose durchgeführt worden.

Parallel wurden zu jedem eingebetteten Schnitt lichtmikroskopische Kontrollschnitte auf beschichtete Objektträger aufgezogen, entwässert und in Entellan eingedeckelt.

4.5. Elektronenmikroskopische Auswertung

Geräte:

Elektronenmikroskop:	Leo 912 Omega (Leo, Oberkochen).
Slow-Scan-Kamera:	Slow-Scan, High-Speed -1024x1024 Bildpunkte- (Proscan, Scheuring).
Computer:	PC-S/N105-220332131 (SIS, Münster).
Datenaufnahme und	- AnalySIS 2.0 (SIS, Münster).
-berechnungssoftware:	- AnalySIS 3.0 (SIS, Münster).
Bildbearbeitungssoftware:	- Adobe Photoshop 5.0 für Mac und PC. - Corel Draw 9.0 für PC.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem EM 912 Omega durchgeführt. Digitale Bilder sind mit einer Slow-Scan-Kamera aufgenommen worden. Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS) und Electron Spectroscopic Imaging (ESI) wurden mit der Software AnalySIS berechnet und ausgewertet. Für ESI-Untersuchungen ist die Drei-Fenster-Power-Law-Methode (Reimer et al, 1992) herangezogen worden. Die weitere Bildbearbeitung fand mit den oben genannten Systemen statt.

Die parallel angefertigten Toluidinblau gegengefärbten Semidünnschnitte für lichtmikroskopische Übersichtskontrollen wurden mit den für die Lichtmikroskopie beschriebenen Systemen untersucht (siehe 3.6.).

III. Ergebnisse

1. Lichtmikroskopie

1.1. Konventionelle Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für die Enzymzytochemie von endogener alkalischer Phosphatase

Eine Methode zur Immunmarkierung mit alkalischer Phosphatase für die Elektronenmikroskopie setzt ein alkoholunlösliches und elektronendichtes Reaktionsprodukt voraus. Die Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für alkalische Phosphatase liefert solch ein Präzipitat, das auf lichtmikroskopischem Niveau mit 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat (Diaminobenzidin; DAB) visualisiert werden kann (Robinson und Karnovsky, 1983; van Goor et al, 1989; van Noorden und Frederiks, 1993; Halbhuber et al., 1992, 1994). Um die Sensitivität der Methode abzuschätzen, wurde zunächst endogene alkalische Phosphatase in der Rattenniere angefärbt.

Im Vergleich der konventionellen Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode (Abb. 5 C, D; Halbhuber et al., 1994) mit der weit verbreiteten 5-Bromo-4-Chloro-3-Indiolphosphat/Nitro-Blue-Tetrazolium(BCIP/NBT)-Technik für alkalische Phosphatase (Abb. 5 A, B; McGadey, 1970; Grossrau, 1978; Leary et al, 1983; de Jong et al, 1985), die ein alkohollösliches Präzipitat liefert, zeigten beide Methoden etwa die gleiche Intensität und Sensitivität der Färbung. Allerdings wies die konventionelle Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik eine etwas stärkere spezifische Markierung auf, wenn auch der unspezifische Hintergrund erhöht war. In beiden Fällen ist endogene alkalische Phosphatase im Bürstensaum des Tubulusepithels der Rinde (R), der Außen- und Innenzone (AZM, IZM) des Marks (M) der Niere markiert. Die Markpapille (MP), aber auch die Glomerula der Nierenrinde (Abb. 5 B, D), sind nicht oder kaum angefärbt.

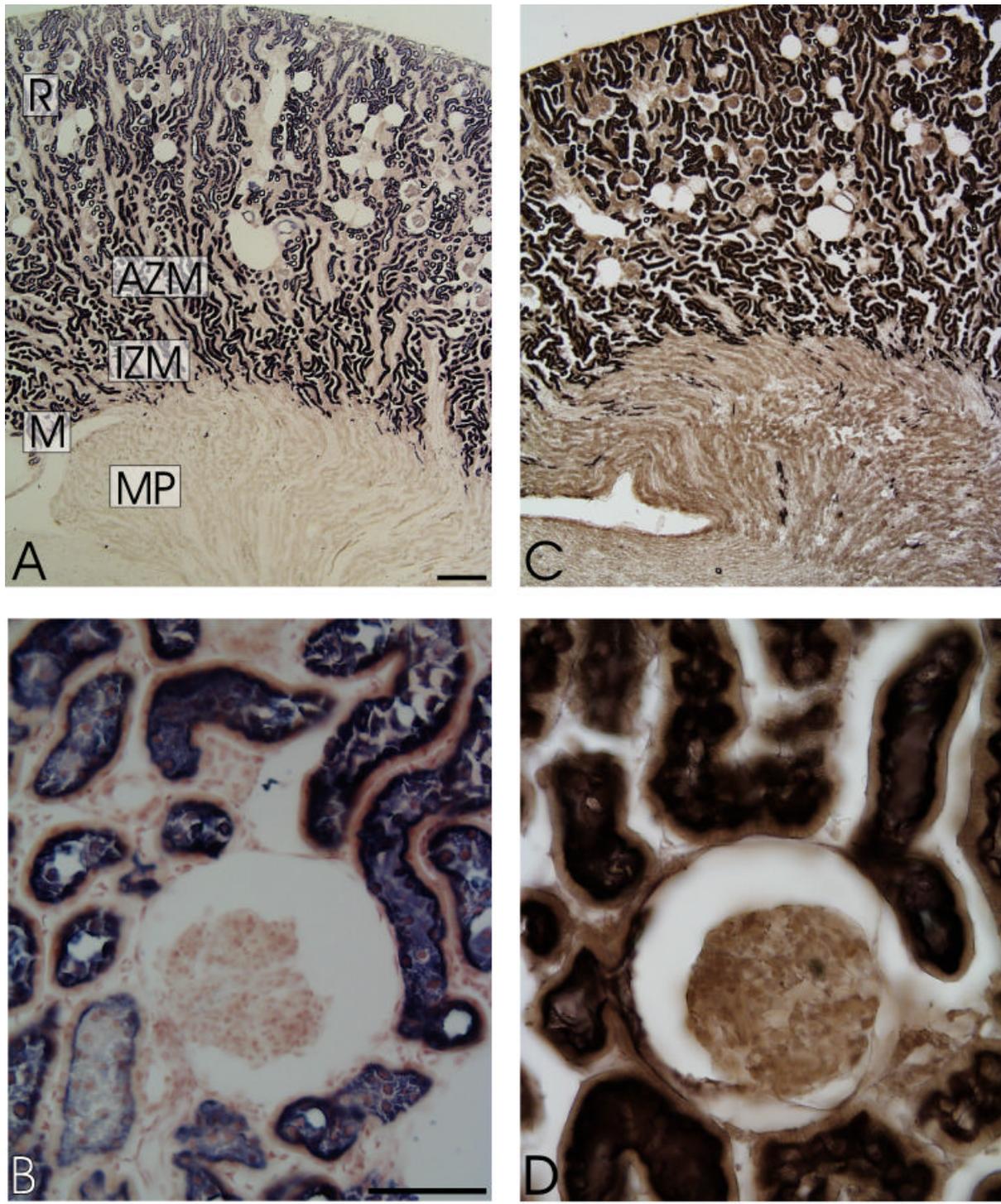


Abbildung 5: Enzymzytochemische Darstellung endogener alkalischer Phosphatase mit BCIP/NBT und der konventionellen Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode.

Endogene alkalische Phosphatase im Tubulussystem der Rattenniere ist mit BCIP/NBT (A, B) und mit der konventionellen Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode (C, D; Halbhuber et al, 1994) angefärbt worden. Die konventionelle Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik (C, D) zeigt im Vergleich mit der BCIP/NBT-Methode (A, B) etwa die gleiche Intensität mit einer etwas stärkeren Hintergrundfärbung. Dies ist vor allem im Vergleich der Nierenglomerula zu erkennen (B, D). Messbalken: 500 µm in (A) und (C), 100 µm in (B) und (D). (R - Rinde, M - Mark, AZM - Außenzone des Marks, IZM - Innenzone des Marks und MP - Markpapille)

1.2. Immunenzymatische Einfachmarkierung von alkalischer Phosphatase

1.2.1. Konventionelle Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik in der Immunzytochemie

Für Untersuchungen zur Eignung und Sensitivität der konventionellen Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik in der Immunzytochemie wurde der Bulbus olfaktorius der Ratte als Modell herangezogen. Zunächst wurde die Zytoarchitektur des Modellgewebes mittels der klassischen Kresylviolett-färbung dargestellt. Die Übersicht verdeutlicht die typische Schichtung des Bulbus olfaktorius (Abb. 6 A). In der Ausschnittvergrößerung (Abb. 6 B) können die Schicht der ankommenden Riechfäden des Nervus olfaktorius (NOS), die glomeruläre Schicht (GS), die äußere und innere plexiforme Schicht (EPS und IPS) - getrennt durch die Mitralzellschicht (MZS) - sowie die Körnerzellschicht (KZS) klar differenziert werden.

In ersten vergleichenden immunzytochemischen Untersuchungen wurden Zellkörper und Dendriten von periglomerulären- und Büschelzellneuronen im Bulbus olfaktorius der Ratte mit monoklonalen Mausantikörpern gegen Tyrosinhydroxylase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Dopaminsynthese, markiert. Als Detektionssystem wurden biotinylierte Zweitantikörper (biotinylierter Pferd-anti-Maus-Antikörper) und mit alkalischer Phosphatase markiertes Streptavidin eingesetzt. In diesen Experimenten ergab die konventionelle Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode eine selbst bei stärkerer mikroskopischer Vergrößerung eine kaum nachweisbare Immunfärbung (Abb. 7 C, D). Es wurden ausschließlich Zellkörper angefärbt. Neuronale Fortsätze waren gar nicht zu erkennen. Im Gegensatz dazu wurde mit der BCIP/NBT-Technik zur Darstellung von alkalischer Phosphatase eine starke immunenzymatische Markierung neuronaler Zellkörper und Fortsätze erzielt (Abb. 7 A, B). Vor einer Anwendung der Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik in der Immunzytochemie auf ultrastrukturellem Niveau mittels Elektronenmikroskopie musste deshalb die Sensitivität der alkalischen-Phosphatase-Reaktion entscheidend gesteigert werden.

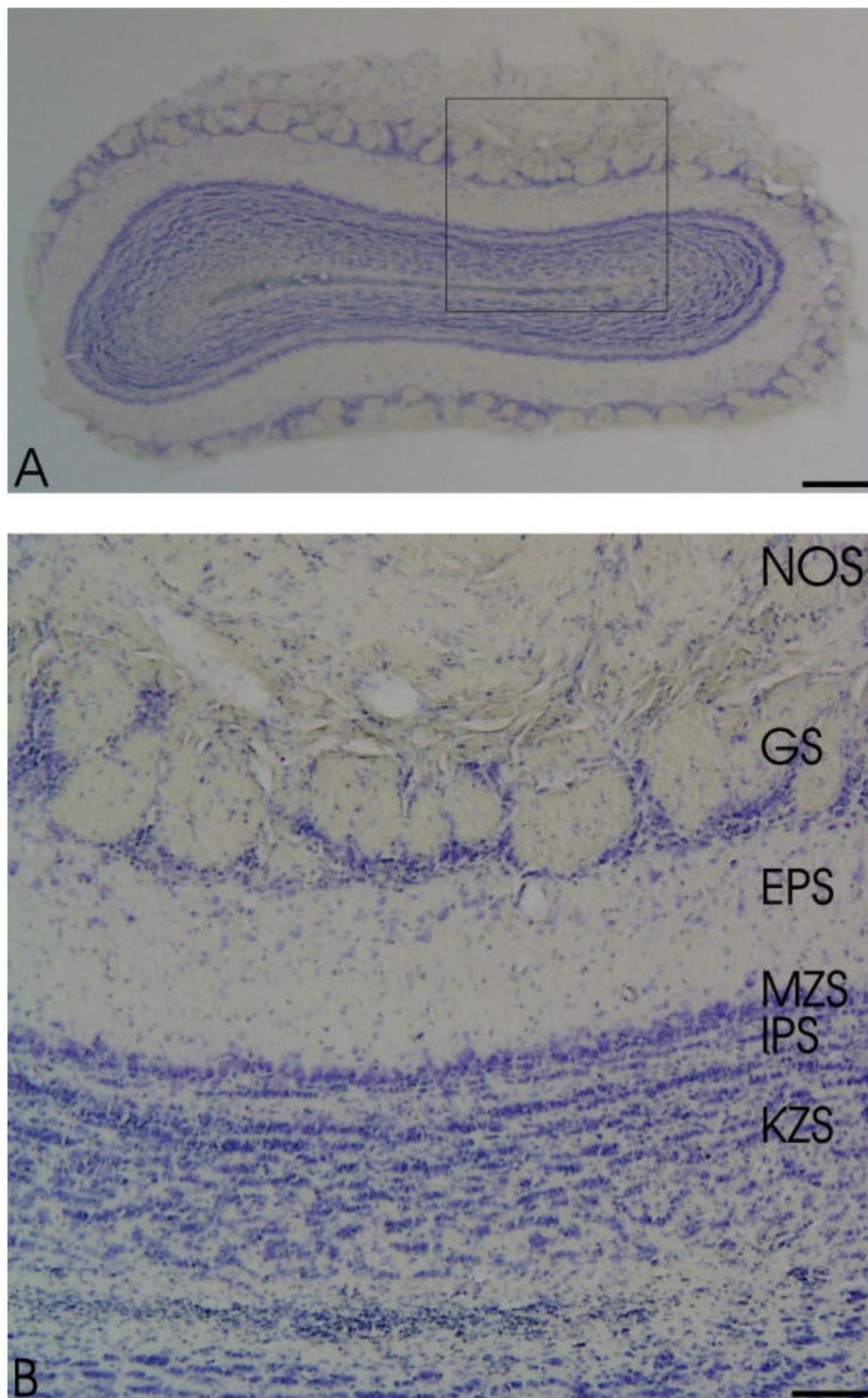


Abbildung 6: Kresylviolett-färbung des Bulbus olfactorius der Ratte.

Kresylviolett färbt vor allem Zellkerne und Nisselschollen von Nervenzellen an. Eine Übersicht des Schnittes (A) zeigt die typische Schichtung des Bulbus olfactorius. In der Ausschnittvergrößerung (B) des in (A) abgebildeten Rahmens sind die Schicht der zu den Glomerula projizierenden Riechfäden des Nervus olfactorius (NOS), die glomeruläre Schicht (GS), die externe und innere plexiforme Schicht (EPS und IPS) - getrennt durch die Mitralzellschicht (MZS) - sowie die Körnerzellschicht (KZS) deutlich zu erkennen. Messbalken: 400 μm in (A), 100 μm in (B).

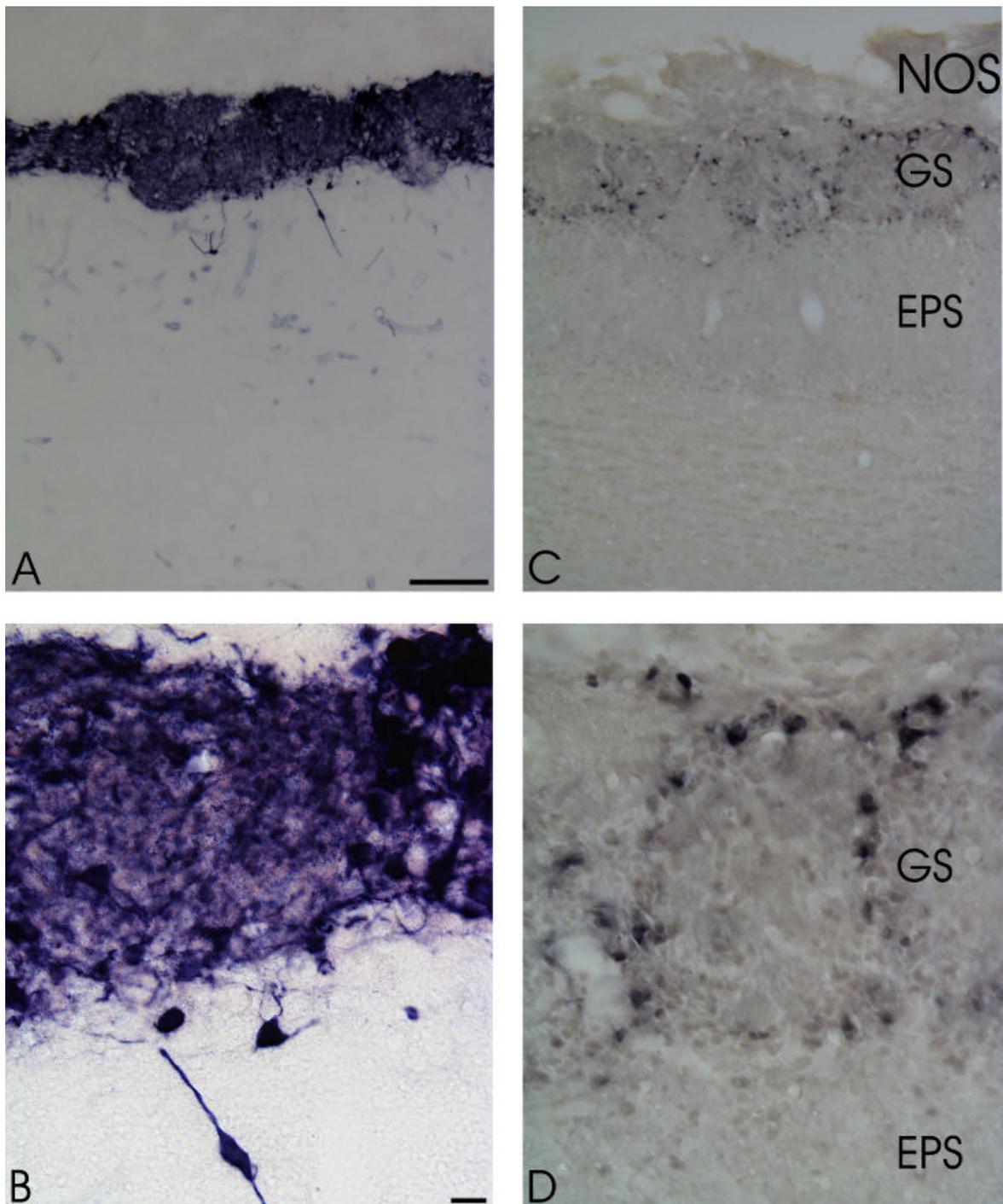


Abbildung 7: Immunzytochemischer Vergleich der BCIP/NBT-Technik mit der konventionellen Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode.

Dopaminerge Neurone und Fortsätze von periglomerulären Zellen in den Glomerula und Büschelzellen der äußeren plexiformen Schicht des Bulbus olfaktorius der Ratte sind mit monoklonalen Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase, biotinylierten Zweitantikörpern und Streptavidin-alkalische-Phosphatase als Detektionssystem markiert worden. Die BCIP/NBT-Färbung zeigte eine starke immunenzymatische Reaktion (A, B). Im Gegensatz dazu markierte die konventionelle Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik (C, D) nur wenige immunpositive Zellen. Neuronale Fortsätze waren überhaupt nicht angefärbt. Messbalken: 200 µm (A) und (C), 20 µm (B) und (D). (NOS - Schicht des Nervus olfaktorius, GS - glomeruläre Schicht, EPS - externe plexiforme Schicht)

1.2.2. Optimierung der konventionellen Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für die Immunzytochemie

1.2.2.1. Puffersysteme und Substrate

Nach ersten Vorversuchen zeigte sich, dass die Wahl des Puffers entscheidende Auswirkungen auf die Sensitivität der Reaktion hat. N-[Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl]-Glycin (Tricin) wurde als Puffersystem für das Testen möglicher Substrate wie β -Glycerophosphat, para-Nitrophenylphosphat, Ethanolaminphosphat und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indiolphosphat (BCIP) für die Immunzytochemie eingesetzt. Das Präzipitat des Substrates Ethanolaminphosphat verteilte sich diffus um den Ort der Immunmarkierung (Abb. 8 C). Beim BCIP-Präzipitat war die diffuse Verteilung erst während des Entwässerns mit Ethanol zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Die beiden Substrate β -Glycerophosphat und para-Nitrophenylphosphat zeigten gut lokalisierte Präzipitationen und diffundierten nicht weit vom Ort der Antikörperbindungsstellen weg (Abb. 8 A, B). Für die weiteren Untersuchungen wurde para-Nitrophenylphosphat herangezogen, dessen gelbes Reaktionsprodukt Nitrophenol bei 405 nm mit einem konventionellen ELISA-Reader (Photometer) gemessen und quantifiziert werden kann. So konnten erste Versuche zur Optimierung der Reaktionsbedingungen unter Verwendung eines kolorimetrischen Verfahrens durchgeführt werden, ohne dabei auf zeitraubende Immunfärbungen zurückgreifen zu müssen. Auf diese Weise wurden verschiedene Puffer, Cer-Konzentrationen, Kofaktoren und andere Reaktionsbedingungen durch photometrische Messung des während der enzymatischen Reaktion entstandenen gelben Nitrophenols getestet. In parallelen Kontrollexperimenten ohne Zugabe von alkalischer Phosphatase zu den Puffern wurden die spontane Hydrolyse des para-Nitrophenylphosphates sowie die spontane Oxidation des Cer(III) zum gelben Cer(IV) gemessen. Diese Kontrollwerte wurden anschließend von den Messergebnissen mit alkalischer Phosphatase in den Puffersystemen subtrahiert, um die Aktivität des Enzyms darzustellen (Abb. 9).

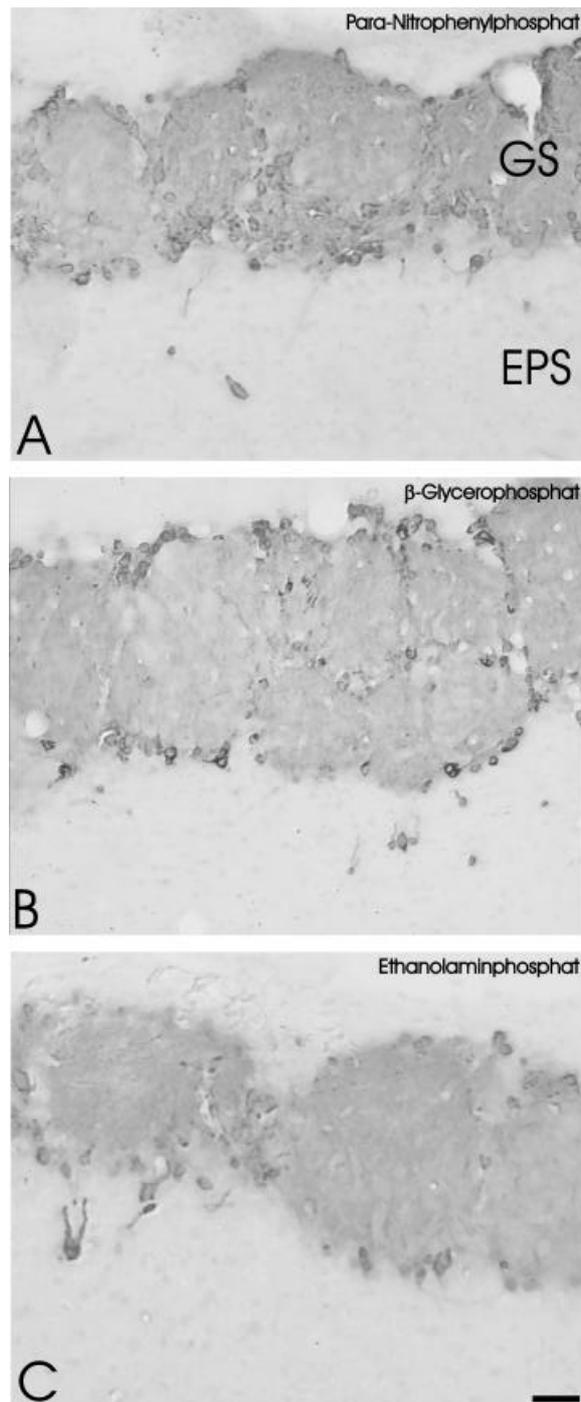


Abbildung 8: Vergleich verschiedener Substrate für die alkalische Phosphatase in der Immunzytochemie.

Schnitte des Bulbus olfactorius der Ratte wurden mit Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase, biotinylierten Zweitantikörpern, und Streptavidin-alkalische-Phosphatase (aP) als Detektionssystem markiert. Als Reaktionspuffer für die aP-Visualisierung wurden 50 mM Tricin gewählt. Ein Vergleich der verschiedenen Substrate für die aP-Visualisierung zeigte, dass para-Nitrophenylphosphat (A) und β -Glycerophosphat (B) eine spezifische Lokalisation des Cer-Präzipitates ohne starke Diffusion vom Ort der Antikörperbindung weg liefern. Das Präzipitat des Substrates Ethanolaminphosphat verteilte sich dagegen diffus um den Ort der Immunmarkierung (C). Messbalken: 50 μ m in (A), (B) und (C). (GS - glomeruläre Schicht, EPS - externe plexiforme Schicht)

Zunächst wurden verschiedene Puffersysteme wie Tricin-, Glycin-Tricin- und Tricin-Diethanolamin-Puffer getestet (Abb. 9 und 10). Der Tricin-Diethanolamin-Puffer beschleunigte die Reaktion um ungefähr 30 % im Vergleich zum Tricin-Puffer. Die Reaktionsrate der alkalischen Phosphatase war entscheidend geringer, wenn der Reaktionspuffer Glycin enthielt (Abb. 9). Auch verschiedene Konzentrationen der Pufferkomponenten Tricin und Diethanolamin hatten Einfluss auf die Reaktion. Die besten Resultate ergaben Pufferkonzentrationen von 50 mM Tricin und 50 mM Diethanolamin. Eine Erhöhung der Konzentration des Chelatbildners Tricin über 50 mM führte zu einer verringerten Sensitivität der alkalischen-Phosphatase-Reaktion und einer unspezifischeren Hintergrundfärbung (Daten nicht gezeigt). Eine Erhöhung der Diethanolaminkonzentration führte zu einer diffuseren Verteilung des Präzipitates um den Ort der Antikörperbindungsstellen (Daten nicht gezeigt).

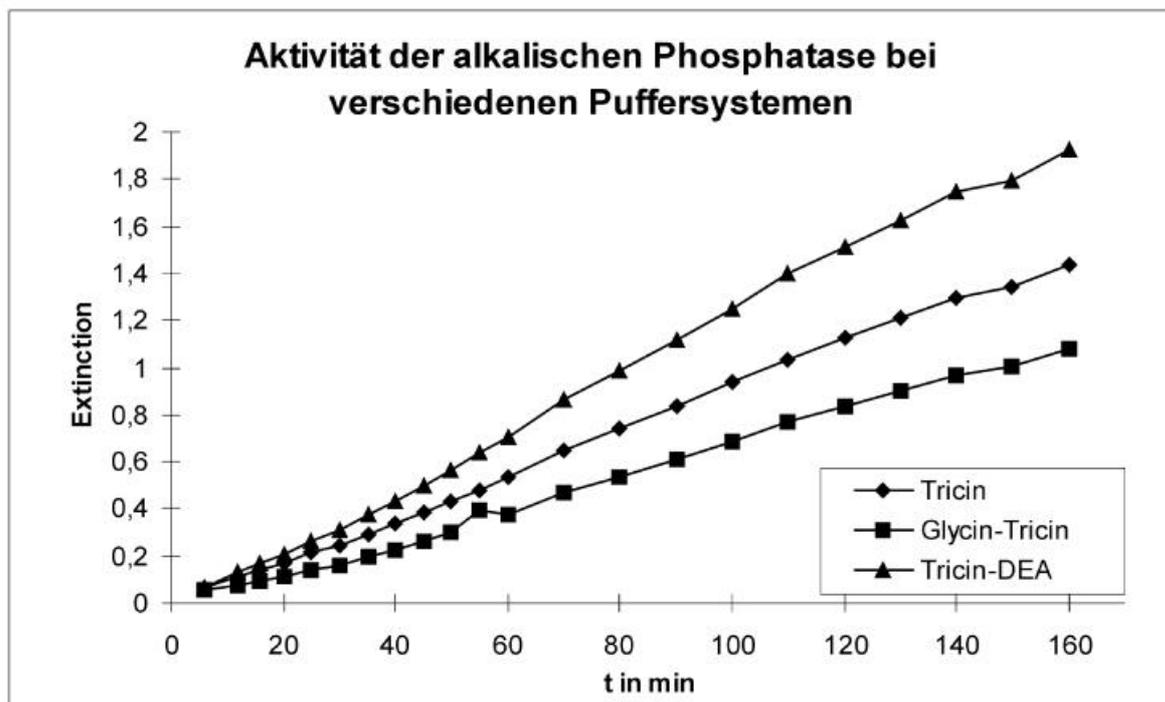


Abbildung 9: Abhängigkeit der alkalischen-Phosphatase-Aktivität vom Puffersystem.

Der Einfluss verschiedener Puffersysteme auf die Reaktionsrate der alkalischen Phosphatase wurde durch photometrische Messung des Reaktionsprodukts para-Nitrophenol in Mikrotiterplatten bei 405 nm bestimmt. Der Tricin(50 mM)-Diethanolamin(50 mM)-Puffer (?) beschleunigte die Reaktion im Vergleich mit einem Tricin(50 mM)- (♦) oder Glycin(50 mM)-Tricin(25 mM)-Puffer (■)erheblich. (DEA - Diethanolamin)

In Abb. 10 sind immunzytochemische Reihenuntersuchungen mit Reaktionszeiten zwischen 15 und 60 min mit (Abb. 10 A - D) und ohne (Abb. 10 E - F) Zugabe von 50 mM Diethanolamin zum 50 mM Tricin-Puffer dargestellt. Der Glycin-Tricin-Puffer wurde für die immunzytochemischen Voruntersuchungen aufgrund der geringeren Reaktionsrate (Abb. 9) nicht mehr herangezogen. Diese Immunfärbungen zeigten, dass die Sensitivität und die Reaktionsrate durch 50 mM Diethanolamin im Puffer entscheidend verbessert werden kann. Eine erhöhte Phosphotransferaseaktivität der alkalischen Phosphatase durch die Zugabe von Diethanolamin, wie in der Literatur allgemein für Alkoholamine beschrieben (Bretaudiere und Spillman, 1984), kann somit für diese Reaktionsbedingungen und diese Isoform des Enzyms nicht bestätigt werden. Im Falle einer Phosphotransferaseaktivität der alkalischen Phosphatase würde kein anorganisches Phosphat freigesetzt werden, welches mit dem im Puffer enthaltenen Cer zu einem Cer-Phosphat ausfällt.

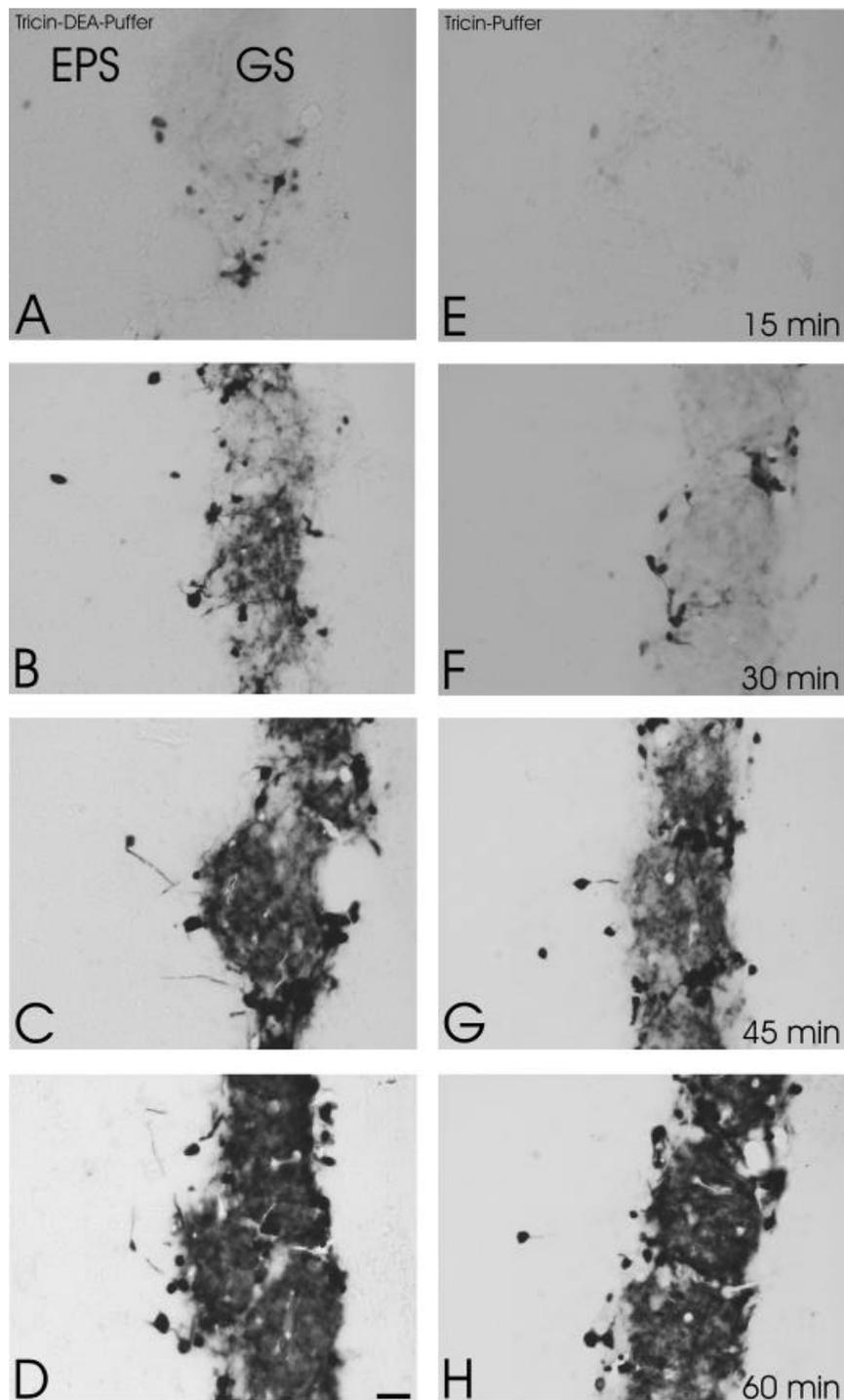


Abbildung 10: Immunzytochemischer Vergleich der Aktivität von alkalischer Phosphatase mit den beiden Puffersystemen Tricin-Diethanolamin und Tricin.

Schnitte des Bulbus olfactorius der Ratte wurden mit Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase, biotinylierten Zweitantikörpern und Streptavidin-alkalische-Phosphatase (aP) als Detektionssystem markiert. Die Stärke der aP-Reaktion wurde in Abhängigkeit von der Zeit (zwischen 15 und 60 min) und vom Puffersystem (je 50 mM Tricin-Diethanolamin (A - D) und 50 mM Tricin (E - H)) bestimmt. Wie bei der kolorimetrischen Bestimmung der aP-Aktivität (siehe Abb. 5) erwies sich auch hier der Puffer aus 50 mM Tricin und 50 mM Diethanolamin als optimal für die aP-Reaktion. Messbalken: 50 μm in (A) - (H). (GS - glomeruläre Schicht, EPS - externe plexiforme Schicht, DEA - Diethanolamin, aP - alkalische Phosphatase)

1.2.2.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen

Der optimale pH-Wert für die immunzytochemische Reaktion wurde bei 10 ermittelt (Abb. 11 D). Niedrigere pH-Werte zeigten bei 30 min Reaktionszeit eine weniger starke Markierung (Abb. 11 A, B, C). pH-Werte von 9,3 und weniger wiesen außerdem eine erhöhte Diffusion des Präzipitates auf (Abb. 11 A, B).

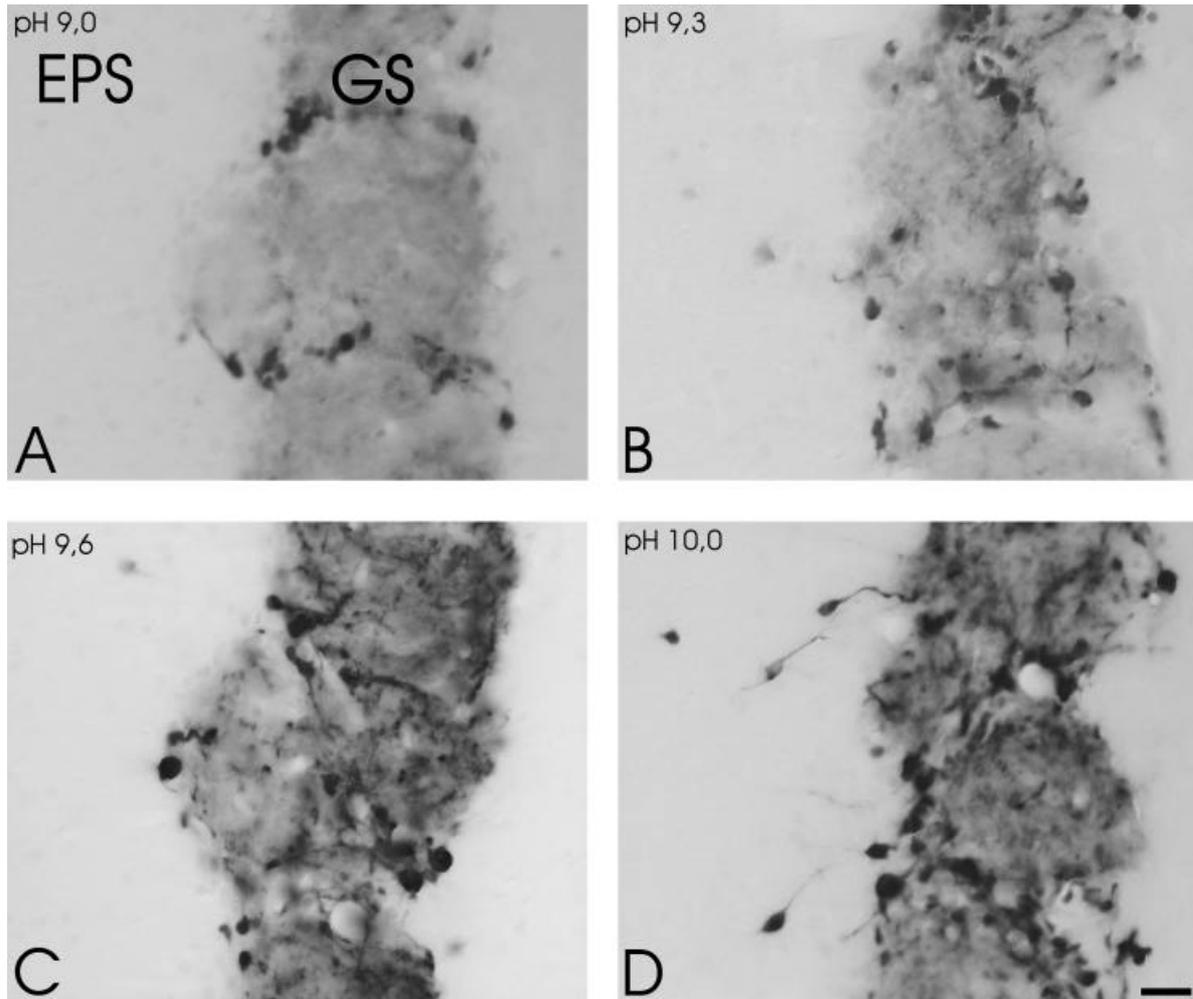


Abbildung 11: Abhängigkeit der alkalischen-Phosphatase-Reaktion bei verschiedenen pH-Werten.

Schnitte des Bulbus olfactorius der Ratte wurden mit Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase, biotinylierten Zweitantikörpern und Streptavidin-alkalische Phosphatase (aP) als Detektionssystem markiert. Es sind pH-Werte von pH 9,0 (A), pH 9,3 (B), pH 9,6 (C) und pH 10 (D) immunzytochemisch getestet worden. Bei pH-Werten unter 9,3 verteilte sich das Präzipitat zusätzlich zur geringeren Spezifität diffus um den Ort der Antikörperbindung (A, B). Bei pH 10 war die immunenzymatische Reaktion am stärksten (D). Gleichzeitig zeigte das Präzipitat die geringste Diffusionsneigung. Messbalken: 50 μ m in (A)-(D). (GS - glomeruläre Schicht, EPS - externe plexiforme Schicht)

Bei Variation der Cer-Konzentration (0 mM, 3 mM, 6 mM und 10 mM) im Reaktionspuffer zeigte sich bei einer Konzentration von 3 mM eine erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase, die zu einem Extinktionsmaximum führte (Abb. 12 A, schwarze Balken). Cer-Konzentrationen über 3 mM führten offensichtlich zu einer Inhibierung des Enzyms bzw. zu einem Aufheben des positiv beschleunigenden Effekts durch Cer(III) auf die alkalische Phosphatase (Abb. 12 A). Immunzytochemische Untersuchungen mit verschiedenen Cer-Kkonzentrationen zeigten für Konzentrationen von 3 und 6 mM Cer eine ähnliche Sensitivität bei etwas intensiverer Färbung mit 6 mM Cer (Abb. 12 B, C). 10 mM Cer führte zu einer teilweisen Inhibierung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (Abb. 12 D).

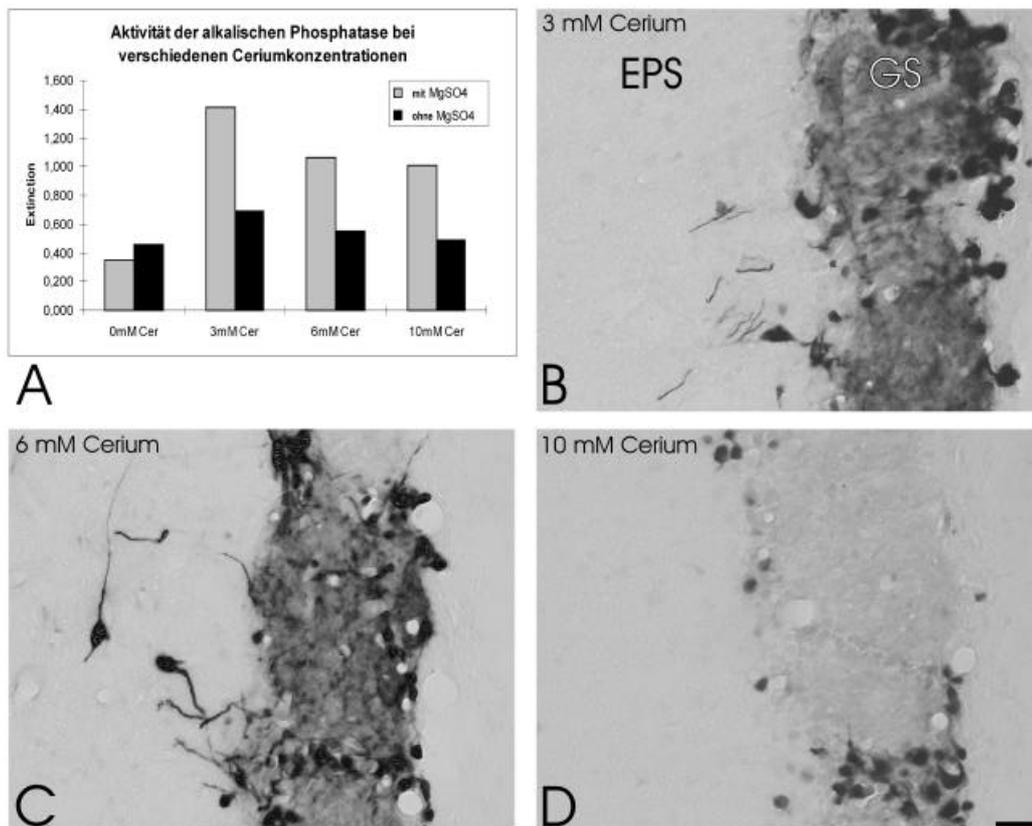


Abbildung 12: Biochemische und immunzytochemische Untersuchung des Einflusses der Cer-Konzentration und des Kofaktors Mg^{2+} auf die alkalische-Phosphatase-Reaktion.

Das Reaktionsprodukt para-Nitrophenol wurde photometrisch in Mikrotiterplatten bei 405 nm gemessen und so der Einfluss der Cer-Konzentration und des Kofaktors Mg^{2+} bestimmt (A). Bei einer Cer-Konzentration von 3 mM wurde die maximale Reaktionsrate in Abwesenheit von Mg^{2+} erreicht (A, dunkle Balken). Die Zugabe von Magnesiumsulfat bewirkte einen weiteren Anstieg der Reaktionsrate um ca. 50 % (A, helle Balken). Immunzytochemisch (anti-Tyrosinhydroxylase, biotinylierte Zweitantikörper und Streptavidin-alkalische-Phosphatase) ergaben sowohl 3 mM (B) als auch 6 mM Cer (C) gut lokalisierte Reaktionsprodukte. Bei einer Konzentration von 10 mM Cer zeigte die alkalische Phosphatase hingegen einen starken Aktivitätsverlust (D). Messbalken: 40 μ m in (B), (C) und (D). (GS - glomeruläre Schicht, EPS - externe plexiforme Schicht)

Eine Zugabe von 3,9 mM MgSO_4 zum Cer-Reaktionspuffer beschleunigte die Reaktion um etwa 50 % (Abb. 12 A, graue Balken). Dies ist auf den positiven allosterischen Effekt von Mg^{2+} auf die alkalische Phosphatase zurückzuführen (Bretaudiere und Spillman, 1984; Chappelet-Tordo et al, 1974). Eine erhöhte Reaktionsrate durch die Zugabe von 3,9 mM MgSO_4 zu dem hier verwendeten Reaktionspuffer ohne Cer konnte hingegen nicht beobachtet werden (Abb. 12 A, schwarze und graue Balken).

Um die Diffusion des Reaktionsproduktes während der Fällung zu verringern, wurde dem Reaktionspuffer Saccharose zugesetzt (Robinson und Batton, 1990; Araki et al, 1993; Halbhuber et al, 1994). In Gegenwart von 30 % Saccharose im Reaktionspuffer ergab sich eine deutlichere Markierung der neuronalen Strukturen als ohne Zugabe von Saccharose (Abb. 13 A, B). Die kolorimetrische Messung von entstandenem Nitrophenol bei 405 nm mit und ohne Saccharose zeigte keine Unterschiede in den Reaktionsgeschwindigkeiten und somit keinen inhibitorischen Effekt des Zuckers auf das Enzym (Abb. 13 C).

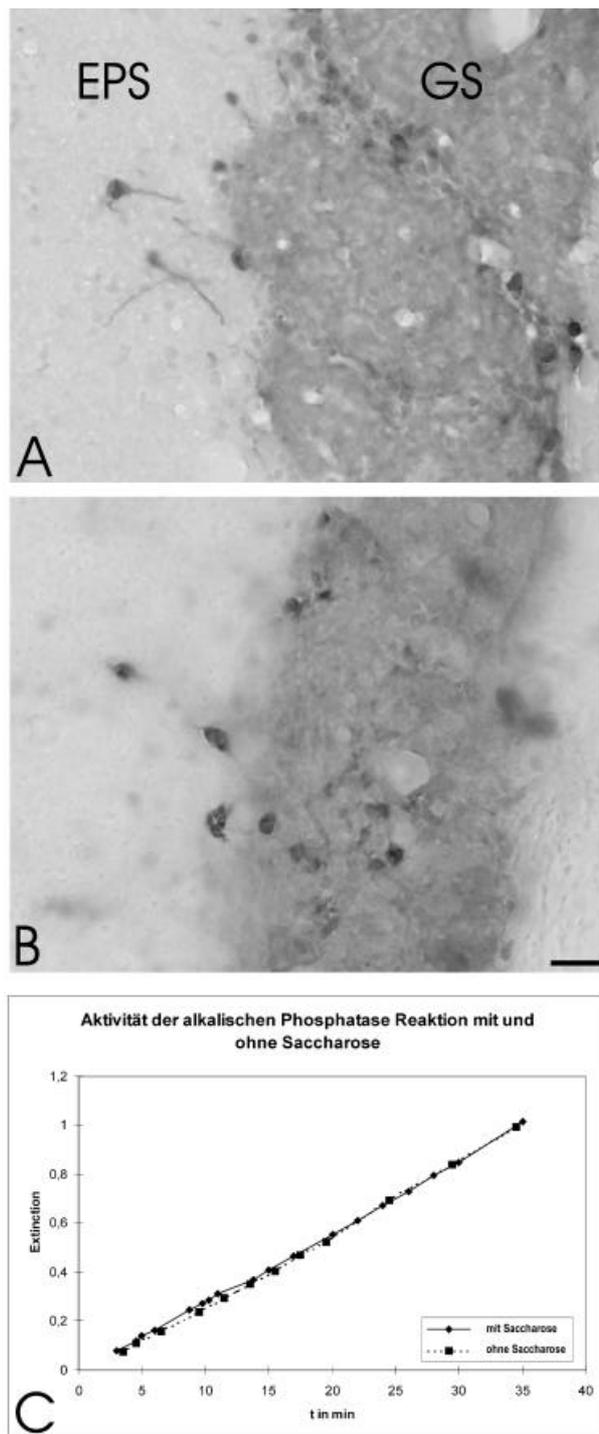


Abbildung 13: Einfluss der Zugabe von Saccharose zum Puffer auf die alkalische-Phosphatase-Reaktion.

Schnitte des Bulbus olfaktorius der Ratte wurden mit Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase, biotinylierten Zweitantikörpern und Streptavidin-alkalische Phosphatase (aP) als Detektionssystem markiert. Die Zugabe von 30 % Saccharose zum Reaktionspuffer (A) bewirkte eine klarere Markierung neuronaler Strukturen (B). Photometrisch wurde die Aktivität der aP in Mikrotiterplatten über das bei der Reaktion entstandene para-Nitrophenol ermittelt (C). Dabei zeigte der Vergleich der Puffer mit (◆) und ohne Saccharose (■) keine Unterschiede in der Aktivität der aP in Gegenwart des Zuckers. Messbalken: 40 µm in (A) und (B). (GS - glomeruläre Schicht, EPS - externe plexiforme Schicht, aP - alkalische Phosphatase)

Das Entgasen des Wassers durch Kochen vor dem Ansetzen des Reaktionspuffers verbesserte die Sensitivität der Reaktion im immunzytochemischen Versuch entscheidend (Abb. 14 A, B; Hulstaeret et al, 1992; persönliche Mitteilung Halbhuber). Die Kontrollversuche mit Zugabe von Trockeneis (Abb. 14 C) bzw. Natriumcarbonat (Abb. 14 D) zum abgekochten Wasser bestätigten die Vermutung, dass CO_2 die Reaktion negativ beeinflusst.

Eine Reaktionstemperatur von 37°C erwies sich als optimal für die Cer-Phosphat- H_2O_2 -Methode mit alkalischer Phosphatase (Daten nicht gezeigt).

Verschiedene Konzentrationen von H_2O_2 zur Oxidation des Cer(III)-Phosphohydroxides zum gelben Cer(IV)-Phosphohydroperoxid ergaben keine Unterschiede in der Markierung (Daten nicht gezeigt).

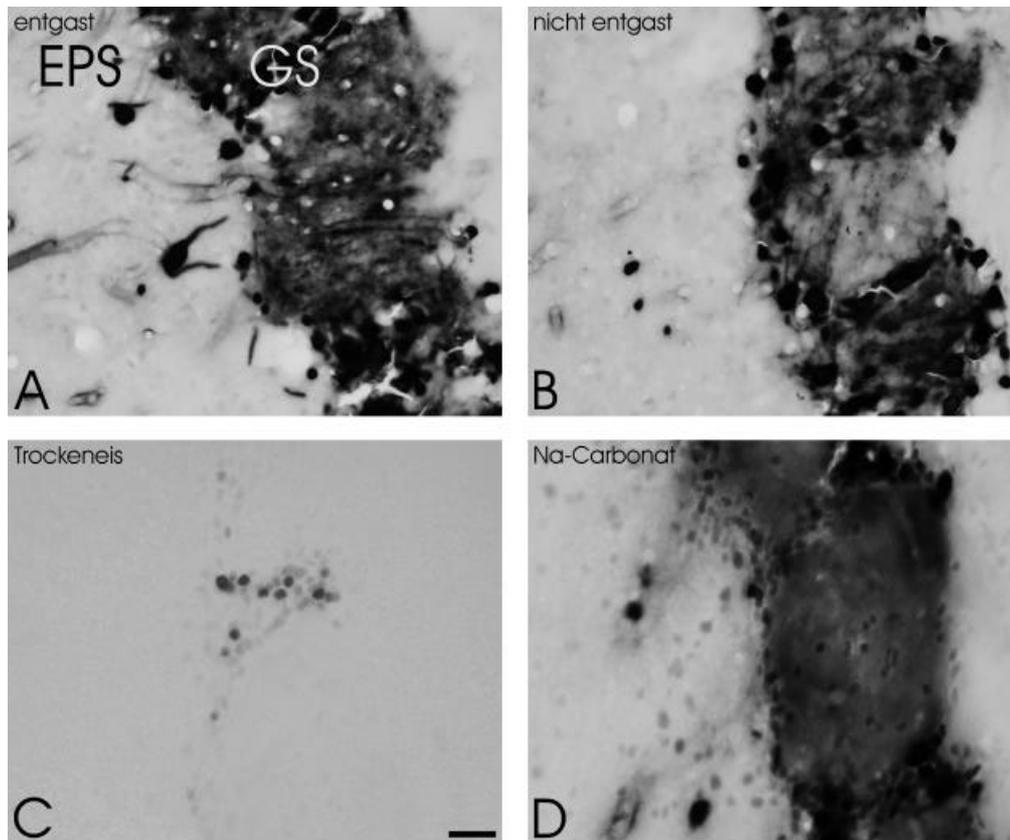


Abbildung 14: Einfluss von gelöstem Carbonat auf die alkalische-Phosphatase-Visualisierung.

Schnitte des Bulbus olfaktorius der Ratte wurden mit Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase, biotinylierten Zweitantikörpern, und Streptavidin-alkalische-Phosphatase (aP) als Detektionssystem markiert. Das Entgasen des Wassers vor dem Ansetzen des Reaktionspuffers durch Aufkochen verbesserte die Sensitivität der Reaktion im immunzytochemischen Versuch entscheidend (A im Vergleich mit B). Die Kontrollversuche durch Zugabe von Trockeneis (C) bzw. Natriumcarbonat (D) zum abgekochten Wasser bestätigten die Hypothese, dass CO_2 die Reaktion hemmt. Messbalken: 20 μm in (A) - (D). (GS - glomeruläre Schicht, EPS - externe plexiforme Schicht)

1.2.2.3. Lichtmikroskopische Kontrastverstärkung

Die Optimierung der lichtmikroskopischen Kontrastverstärkung mittels Diaminobenzidin (DAB) wurde auf DAB-Konzentrationen, Entwicklungszeit und den Einsatz von Tris bzw. Acetat als Puffer für die Verstärkungsreaktion beschränkt (Daten nicht gezeigt). Eine DAB-Konzentration von 0,5 mg/ml und 10 min Entwicklungszeit ergaben die besten Resultate. In Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan(Tris)-Puffer ergab sich eine stärkere DAB-Markierung als in Acetat-Puffer. Allerdings war auch die unspezifische Hintergrundfärbung erhöht. Die Wahl des Verstärkungspuffers hängt demnach von der jeweiligen Fragestellung ab.

1.2.2.4. Vergleich der konventionellen mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für alkalische Phosphatase auf lichtmikroskopischer Ebene

Im Vergleich mit der konventionellen Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode für die Enzymzytochemie führten die in dieser Arbeit für den Einsatz in der Immunzytochemie eingeführten Modifikationen zu einer entscheidenden Steigerung in Sensitivität und Intensität der Cer-Färbung von dopaminergen Strukturen in der glomerulären und äußeren plexiformen Schicht im Bulbus olfaktorius der Ratte (Abb. 15 B, C). Des Weiteren war die immunzytochemische Markierung mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik von dopaminergen periglomerulären- und Büschelzellen genauso sensitiv wie die Färbung mit BCIP/NBT (Abb. 15 A, B). Die modifizierte Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik wies sogar auf eine etwas stärkere Färbung Tyrosinhydroxylase-positiver Strukturen hin. Auf lichtmikroskopischem Niveau sind einige Risse in immunmarkierten Strukturen zu erkennen (Abb. 15 B, Pfeile), welche aufgrund der zwei Präzipitate in der Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik mit DAB-Entwicklung entstanden sein könnten. DAB präzipitiert an der Stelle des Cer(IV)-Phosphohydroperoxides, wodurch sehr starre und zerbrechliche Strukturen an Orten mit starker Immunreaktivität entstehen. Diese Probleme sind auf elektronenmikroskopischer Ebene größtenteils nicht vorhanden, da hier nur bis zum Cer-Phosphat-H₂O₂-Reaktionsprodukt entwickelt wurde.

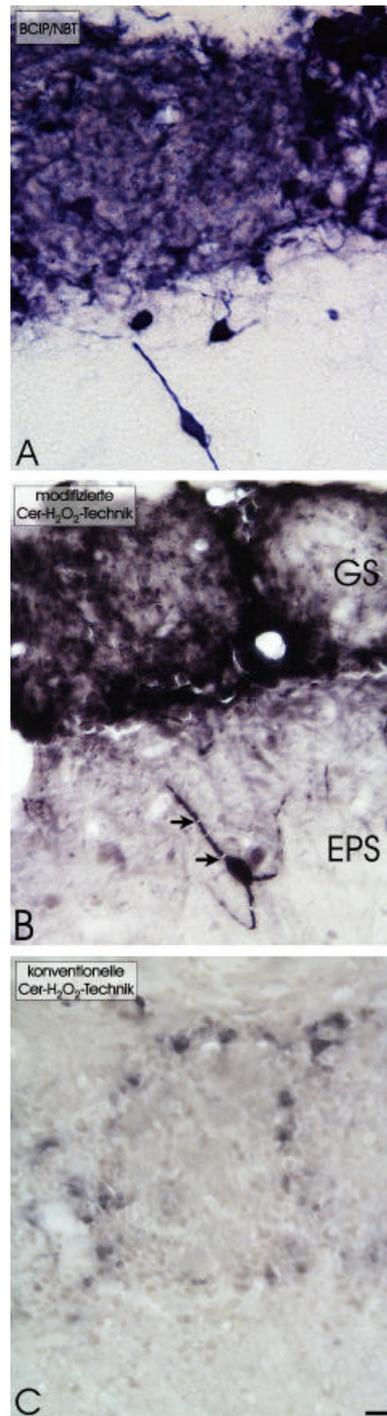


Abbildung 15: Gesteigerte Sensitivität der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode in der Immunzytochemie.

Schnitte des Bulbus olfactorius der Ratte wurden mit Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase, biotinylierten Zweitantikörpern und Streptavidin-alkalische-Phosphatase (aP) als Detektionssystem markiert. Die immunzytochemische Markierung mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik (B) von dopaminergen periglomerulären und Büschelzellen war mindestens genauso sensitiv wie die Färbung mit BCIP/NBT (A). Risse in mit Cer immunmarkierten Strukturen (B, Pfeile) gehen wahrscheinlich auf die zwei Präzipitate bei Kontrastverstärkung mit DAB zurück. Im Vergleich mit der konventionellen Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode (C) für die Enzymzytochemie zeigt sich die entscheidende Steigerung in Sensitivität und Intensität der Färbung dopaminergener Strukturen durch die modifizierte Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode (B). Messbalken: 20 µm in (A), (B) und (C). (GS - glomeruläre Schicht, EPS - externe plexiforme Schicht)

Auch ein Vergleich von Färbungen endogener alkalischer Phosphatase in der Rattenniere mit der konventionellen (Abb. 16 C) und optimierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik (Abb. 16 B) zeigt einen Sensitivitätssprung durch eine Verringerung des unspezifischen Hintergrundes. Die optimierte Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode (Abb. 16 B) war genauso sensitiv und frei von unspezifischem Hintergrund wie eine Markierung mit BCIP/NBT (Abb. 16 A).

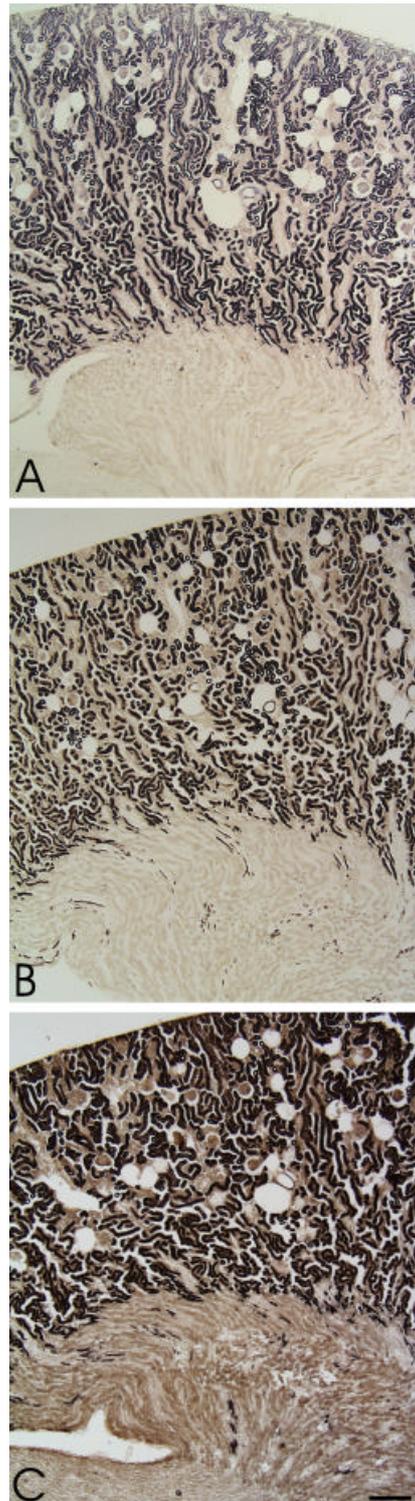


Abbildung 16: Gesteigerte Sensitivität der Darstellung endogener alkalischer Phosphatase mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode.

Ein Vergleich der Färbungen von endogener alkalischer Phosphatase im Tubulussystem der Rattenniere mit der konventionellen (C) und der für die Immunzytochemie optimierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik (B) zeigt die erhöhte Sensitivität der optimierten Methode sowie eine Verringerung des unspezifischen Hintergrundes. Die modifizierte Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode (B) ist genauso sensitiv und frei von unspezifischem Hintergrund wie die Markierung mit BCIP/NBT (A). Messbalken: 500 µm.

1.3. Simultane immunenzymatische Doppelmarkierung von Tyrosinhydroxylase und Serotonin auf lichtmikroskopischer Ebene mittels optimierter Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik und ABC-DAB-Methode

1.3.1. Das entwickelte Doppelmarkierungsprotokoll

Durch eine Kombination der entwickelten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für alkalische Phosphatase mit der allgemein üblichen Peroxidase-ABC-DAB-Methode konnte ein immunenzymatisches Doppelmarkierungsprotokoll erarbeitet werden (Tab. 2 a, b).

<u>Lösungen:</u>	
Vorinkubationspuffer 1: (Peroxidase)	3 mg Diaminobenzidin in 1 ml H ₂ O lösen, 1 ml Tris-Stock, 8 ml H ₂ O und 100 µl Imidazol-Stock dazugeben.
Inkubationspuffer 1: (Peroxidase)	0,5 ml Vorinkubationspuffer 1, starten der Reaktion durch Zugabe von 25 µl H ₂ O ₂ .
Vorinkubationspuffer 2: (alkalische Phosphatase)	0,27 g Tricin (50 mM), 10,8 g Saccharose (30 %), 29 mg MgSO ₄ (3,9 mM) in 28 ml gekochtes und rückgekühltes H ₂ O (vorsichtig mischen). Zugabe von 0,158 g Diethanolamin (50 mM), einstellen von pH 10 mit 1N NaOH und auf 30 ml auffüllen.
Reaktionspuffer 2: (alkalische Phosphatase)	Vorsichtig 11 mg Cer(III)-Chlorid (3 mM) und 100 µl Levamisol-Stock in 10 ml Vorinkubationspuffer 2 lösen.
PBS: (Phosphate Buffered Saline)	8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1,4 g Natriumhydrogenphosphat in 1 l H ₂ O lösen (vor dem Auffüllen pH 6,81 mit NaOH einstellen).
Tris-Stock:	12,2 g Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan in 200 ml H ₂ O lösen und pH 7,6 einstellen.
Imidazol-Stock:	681 mg Imidazol in 10 ml H ₂ O lösen und pH 7,6 einstellen.
Tricin-Puffer:	8,99 g N-[Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl]-Glycin (Tricin; 50 mM) in 1000 ml entgastem H ₂ O, pH 9,5 mit 1N NaOH einstellen.
p-Nitrophenyl-Phosphat-Stock:	45,7 mg para-Nitrophenylphosphat (100 mM) in 1 ml H ₂ O lösen.
Levamisol-Stock:	0,482 g Levamisol (200 mM) in 10 ml H ₂ O lösen.
Konversionspuffer	0.2 % H ₂ O ₂ gelöst in Tricin-Puffer.

Tabelle 2a: Lösungen für das entwickelte Doppelmarkierungsprotokoll.

Puffer und Lösungen für das entwickelte Doppelmarkierungsprotokoll mit der optimierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für alkalische Phosphatase und der Peroxidase-ABC-DAB-Methode.

Durchführung:

1. Vibratom- oder Kryostatschnitte wie in Material und Methoden beschrieben.
2. Immunmarkierung wie in Material und Methoden beschrieben.
3. Dreimal 20 min mit PBS waschen.
4. 15 min Vorinkubation mit Vorinkubationspuffer 1.
5. Wechseln des Vorinkubationspuffers 1 und starten der Peroxidasereaktion durch Zugabe von 25 µl 0,3 % H₂O₂ für 10 min.
6. Stoppen der Reaktion durch zweimaliges Waschen mit PBS (5 min) und einmal 10 min PBS mit 0,1 % Natriumazid zur Peroxidaseinhibierung waschen.
7. Schnitte dreimal 20 min mit Tricin-Puffer waschen.
8. 30 min Vorinkubation mit Vorinkubationspuffer 2.
9. In 500 µl Reaktionspuffer 2 aufnehmen und starten der Reaktion durch Zugabe von 5 µl para-Nitrophenyl-Phosphat-Stock (Reaktionstemperatur 37°C) für ca. 100 min.
10. Dreimal 5 min mit Tricin-Puffer waschen.
11. Oxidation des Cer(III) zu Cer(IV) mit 500 µl Konvertierungspuffer (Es entsteht ein gelbes Präzipitat für elektronenmikroskopische Untersuchungen oder lichtmikroskopische Doppelmarkierungsversuche).
12. Dehydrierung mit Ethanol wie in Material und Methoden beschrieben.
13. Flacheinbettung in Araldit oder Aufziehen auf beschichtete Objektträger wie in Material und Methoden beschrieben.

Tabelle 2b: Das entwickelte Doppelmarkierungsprotokoll für alkalische Phosphatase und Peroxidase.

Das entwickelte Doppelmarkierungsprotokoll mit der optimierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für alkalische Phosphatase und der Peroxidase-ABC-DAB-Methode. Die verwendeten Lösungen sind in Tab. 2a dargestellt.

1.3.2. Simultane Doppelmarkierung mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik und der ABC-DAB-Methode für die Lichtmikroskopie

Mit den optimierten Reaktionsbedingungen der Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik konnte alkalische Phosphatase klar, sensitiv und mit starker Intensität immunzytochemisch nachgewiesen werden. Tyrosinhydroxylase-immunmarkierte Schnitte des Bulbus olfaktorius der Ratte zeigten eine starke Markierung von Zellkörpern und Dendriten mit dem gelben Ce(IV)-Phosphohydroperoxid, welche ein Glomerulum umgeben (Abb. 17 A). Ein paralleler Schnitt zeigte mittels Peroxidase-ABC-DAB-System immungefärbte serotoninerge Fasern aus dem Raphe Nuclei des Mittelhirns, welche die Glomerula innervieren (Abb. 17 B; Araneda,1999). In einer Doppelfärbung mittels des gelben Cer(IV)-Phosphohydroperoxids und des dunkelbraunen DAB-Reaktionsproduktes konnten die beiden Präzipitate klar unterschieden werden (Abb. 17 C). Das gelbe Cer-Phosphat-H₂O₂-Präzipitat repräsentierte dopaminerge Strukturen (Tyrosinhydroxylase positiv), und der dunkle DAB-Niederschlag zeigte serotoninerge Fasern. Beide immunenzymatischen Färbungstechniken sind offensichtlich für eine Doppelmarkierung kompatibel und stören einander nicht.

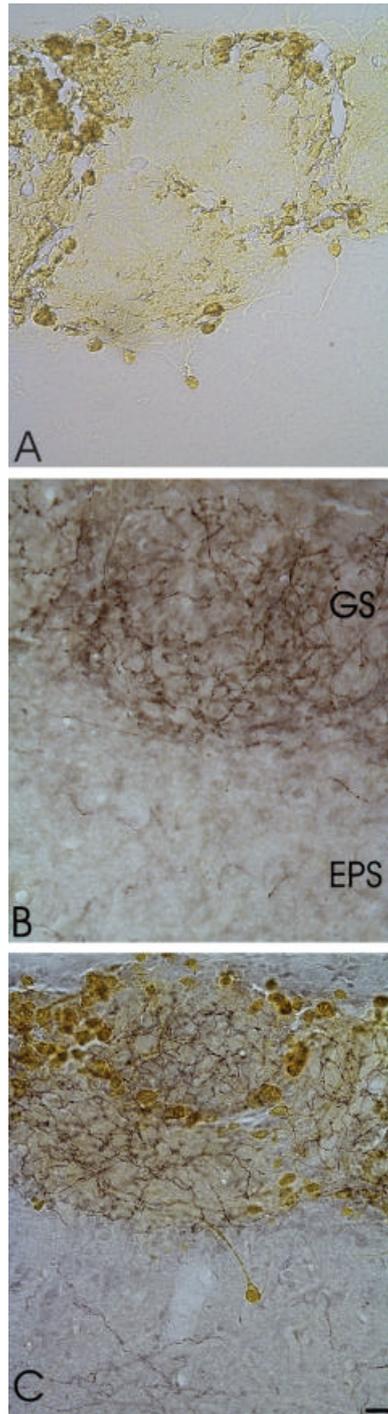


Abbildung 17: Simultane immunenzymatische Visualisierung von Tyrosinhydroxylase und Serotonin im Bulbus olfaktorius auf lichtmikroskopischem Niveau.

Ein Schnitt des Bulbus olfaktorius der Ratte wurde mit anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörpern und anschließend mit alkalischer Phosphatase (aP) konjugierten Zweitantikörpern inkubiert (A). Neuronale Zellkörper und Fortsätze sind mit dem gelben Cer(IV)-Präzipitat der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik ohne DAB-Verstärkung visualisiert worden (A). Serotonerge Fasern sind am darauffolgenden Schnitt mit anti-Serotonin-Antikörpern markiert und mittels der ABC-Methode mit DAB/Nickel visualisiert worden (B). Im doppelmarkierten Schnitt (C) kann das gelbe Präzipitat der aP klar und eindeutig vom braunen DAB-Niederschlag der Peroxidase unterschieden werden. Serotonerge Fasern und dopaminerge Fortsätze bilden Netzwerke in den Glomerula, die von dopaminergen periglomerulären Zellen umgeben sind. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich beide immunenzymatische Reaktionen nicht gegenseitig stören. Messbalken: 20 µm in (A), (B) und (C). (GS - glomeruläre Schicht, EPS - externe plexiforme Schicht)

2. Elektronenmikroskopie

2.1. Modifizierte Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für die Elektronenmikroskopie

Ein mit der optimierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode Tyrosinhydroxylase-markierter und für die Elektronenmikroskopie eingebetteter Vibratomschnitt zeigt das gelbe Cer-Phosphat-H₂O₂-Reaktionsprodukt in dopaminergen Neuronen in der glomerulären Schicht des Bulbus olfaktorius (Abb. 18 A, Pfeile). In einem Toluidinblau gegengefärbten Semidünnschnitt ist ein dopaminerges Cer-Phosphat-H₂O₂-markiertes Zellkörper und dessen Fortsatz dunkler gefärbt als seine Umgebung (Abb. 18 B, Pfeil). Ein Ultradünnschnitt im direkten Anschluss an den dargestellten Semidünnschnitt zeigt in der elektronenmikroskopischen Übersicht dunkle Strukturen, welche das Cer-Phosphat-H₂O₂-Präzipitat repräsentieren (Abb. 18 C, Rahmen). Die Ausschnittvergrößerung (Abb. 18 D) zeigte eindeutig die Markierung von Neuronen und einem Dendriten durch das Cer-Phosphat-H₂O₂-Präzipitat.

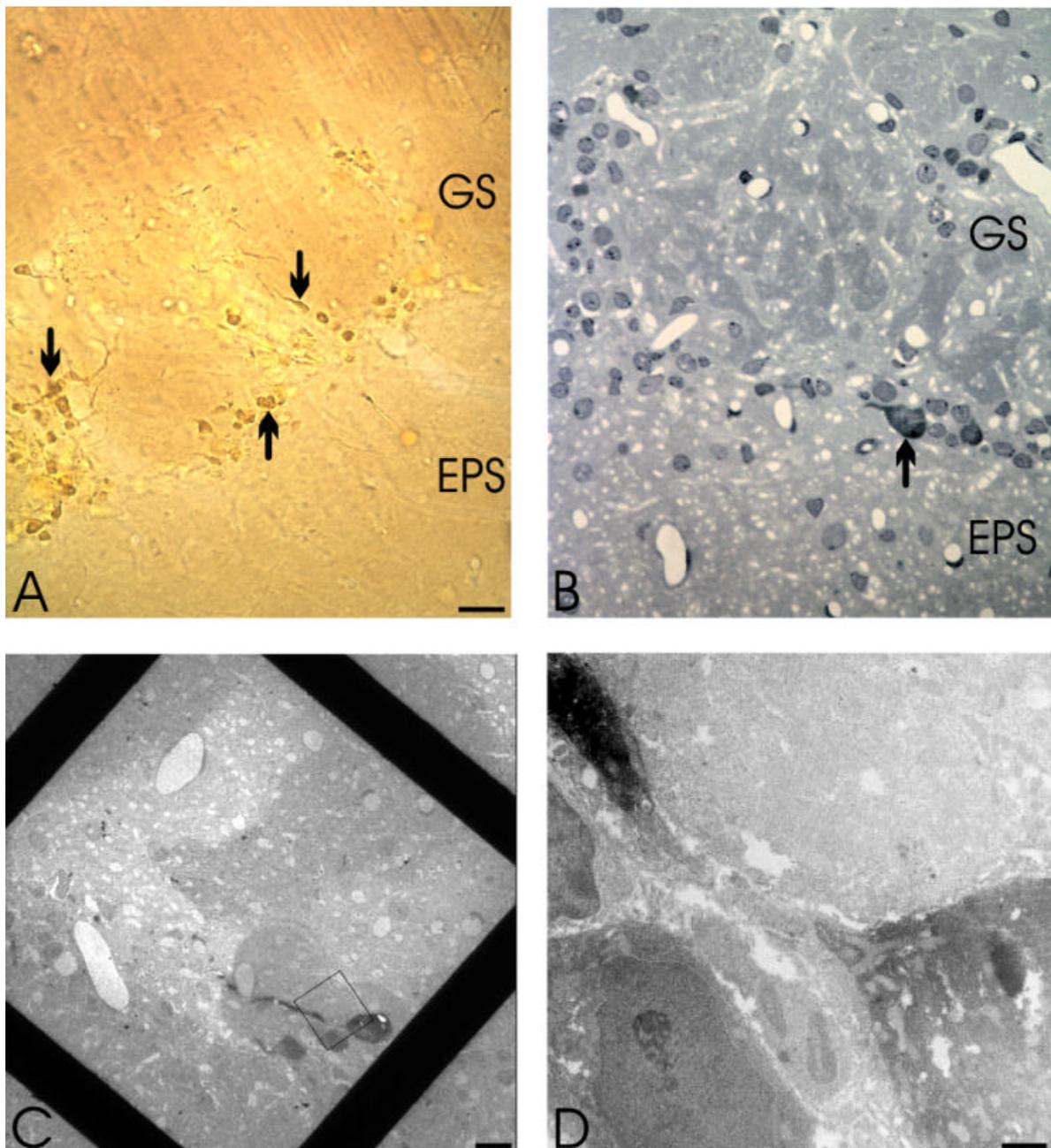


Abbildung 18: Immunenzymatische Visualisierung von Tyrosinhydroxylase mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik auf elektronenmikroskopischem Niveau.

Vor der Einbettung in Araldit wurden die Schnitte des Bulbus olfaktorius der Ratte mit Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase, biotinylierten Zweitantikörpern sowie Streptavidin-alkalische Phosphatase (aP) als Detektionssystem markiert und mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik bis zum gelben Cer(IV)-Präzipitat visualisiert (A, Pfeile). Von diesem eingebetteten Gewebe wurden Semidünnschnitt (B) und Ultradünnschnitte (C, D) angefertigt. Im Toluidinblau gegengefärbten Semidünnschnitt ist eine markierte Tyrosinhydroxylase-positive Zelle zu erkennen (B, Pfeil). Der benachbarte Ultradünnschnitt zeigt in der elektronenmikroskopischen Übersicht dunkle Strukturen, die das Cer-Phosphat-H₂O₂-Präzipitat repräsentieren (C, Rahmen). Die Vergrößerung (D) zeigt einen Ausschnitt aus dem Perikaryon eines Neurons und den proximalen Abschnitt eines Dendriten, die beide durch das Cer-Phosphat-H₂O₂-Präzipitat markiert sind. Messbalken: 20 µm in (A), 10 µm (B) und (C), 1000 nm in (D). (GS - glomeruläre Schicht, EPS - externe plexiforme Schicht)

Das elektronenspektroskopische Elementverteilungsbild mittels Electron Spectroscopic Imaging (ESI) an der M_4 - und M_5 -Kante des Cers (Abb. 19 E) stellt die Cer-Verteilung im betrachteten Bildausschnitt dar. Dazu ist die Drei-Fenster-Power-Law-Methode bei Energieverlusten von 795 eV, 863 eV und 887 eV gewählt worden. Die Elementverteilung ergibt sich aus den Energieverlustbildern vor der $M_{4,5}$ -Absorptionskante (Abb. 19 A, B, W_2 795 eV und W_1 863 eV) und auf der $M_{4,5}$ -Absorptionskante des Cers (Abb. 19 C, W_{max} 887 eV). Da mit steigendem Energieverlust die unspezifischen Hintergrundkontraste exponentiell abfallen, wird mittels der beiden Energieverlustbilder vor der $M_{4,5}$ -Ionisationskante (W_2 , W_1) eine Extrapolation der unspezifischen Kontraste auf der Absorptionskante des Cers durchgeführt. Das extrapolierte Bild wird dann von der Aufnahme auf der Ionisationskante (W_{max}) subtrahiert. Aus dem Differenzbild ergibt sich der spezifische Energieverlust durch Cer und damit die Cer-Verteilung in der betrachteten Region (Abb. 19 E). Das invertierte elektronenmikroskopische Hochkontrastbild (HCI) bei 250 eV Energieverlust (Abb. 19 D) und das Cer-Verteilungsbild als Falschfarbenbild übereinandergelegt zeigen die mittels Cer-Phosphat- H_2O_2 -Technik markierten Strukturen (Abb. 19 F). Das Hochkontrastbild wird in biologischen Proben vor der Kohlenstoffionisationskante bei 250 eV oder wenn möglich bei 0 eV Energieverlust aufgenommen. Bei Elementverteilungsbildern mit höheren Energieverlusten muss das Hochkontrastbild wegen thermischer Verzerrung und zur Schonung des Präparates bei 250 eV Energieverlust fotografiert werden. Dieses Hochkontrastbild - kurz vor der K-Ionisationskante des Kohlenstoffs (284 eV) - kann anschließend invertiert werden, was zu einem Bild führt, das konventionellen transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen entspricht. Die Abbildungen zur Cer-Phosphat-Verteilung wurden mit einem Energiespalt von 15 eV aufgenommen. Dieses Energiefenster gibt die Gesamtbreite des abgebildeten Energieverlustes an. So ist z.B. das Ionisationskantenbild von Cer eine Abbildung von Elektronen zwischen 887 eV und 902 eV Energieverlust. Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die optimierte Cer-Phosphat- H_2O_2 -Technik sowohl für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) als auch für Energiefilter Transmissionselektronenmikroskopie (EFTEM) genutzt und somit zur simultanen Mehrfachmarkierung eingesetzt werden kann.

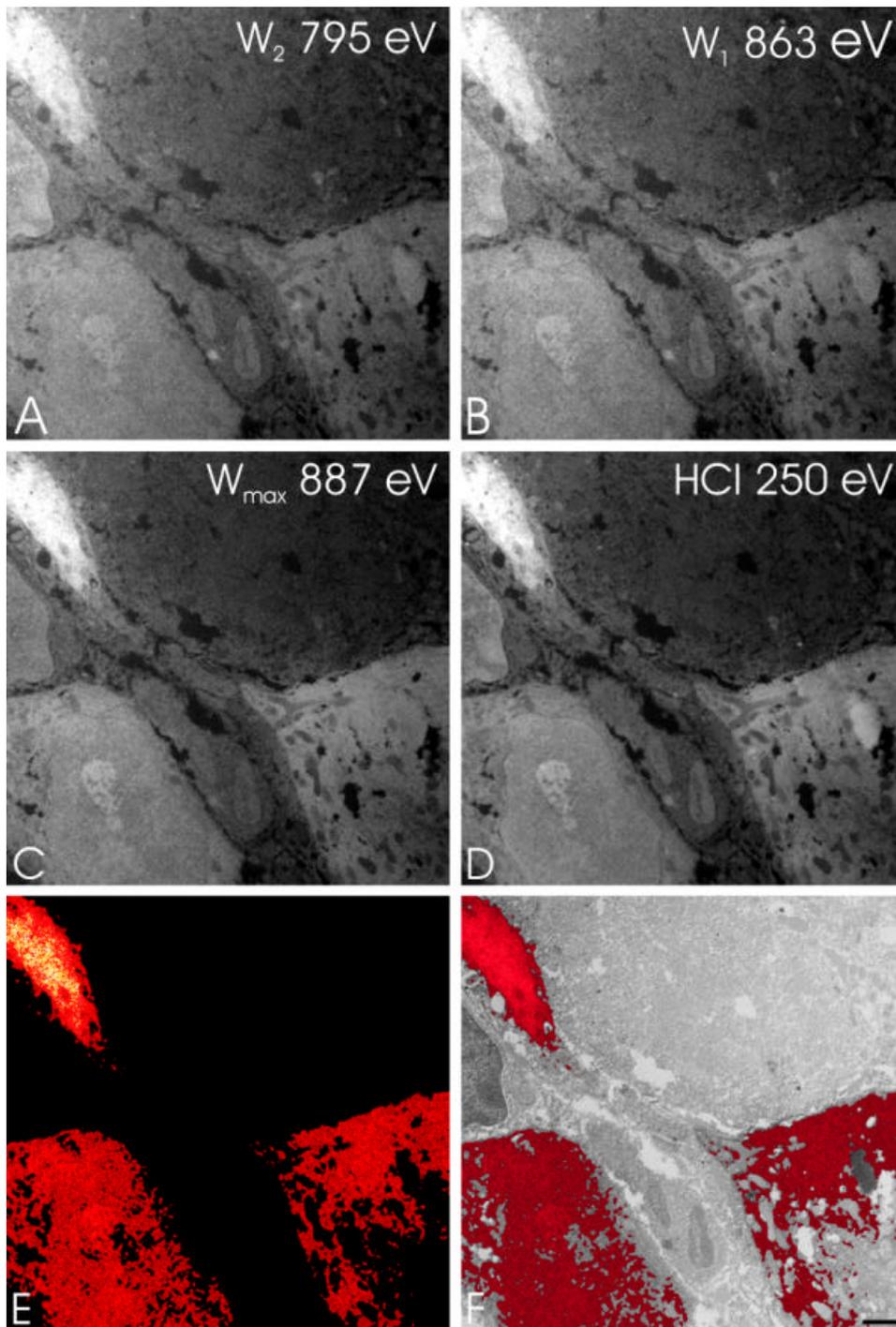


Abbildung 19: Visualisierung des Cer-Präzipitates mittels Electron Spectroscopic Imaging (ESI).

Mittels einer ESI-Serie wurde die Cer-Verteilung im immunzytochemisch gefärbten Schnitt aus Abb. 18 dargestellt. Das Cer-Verteilungsbild (E) wurde mit der Drei-Fenster-Power-Law-Methode aus den Vorkantenbildern (A, B) und dem Bild auf der Ionisationskante (C) errechnet. Das Hochkontrastbild (HCl, D) vor der Kohlenstoffionisationskante wurde invertiert, um eine konventionelle elektronenmikroskopische Abbildung darzustellen. Das errechnete Elementverteilungsbild (E) wurde als Overlay über dieses invertierte Bild gelegt (F). Somit konnte die Cer-Verteilung in der betrachteten Region dargestellt werden (F). Mit dieser Methode wurde sowohl das Präzipitat in den beiden Zellkörpern als auch in dem Fortsatz als Cer-Präzipitat identifiziert. Diese neuronalen Strukturen waren somit Tyrosinhydroxylase-positiv. Messbalken: 1000 nm.

2.2. Simultane immunenzymatische Doppelmarkierung von Tyrosinhydroxylase und Serotonin auf ultrastruktureller Ebene mittels optimierter Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik und ABC-DAB-Methode

An Vibratomschnitten des Bulbus olfaktorius der Ratte sind Tyrosinhydroxylase-positive Strukturen mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode sowie Serotonin mit dem Peroxidase-ABC-DAB-System angefärbt worden. Toluidinblau gegengefärbte Semidünnschnitte zeigen schwarze serotoninerge Axone (Abb. 20 A, Pfeile), während Tyrosinhydroxylase-positive Zellkörper (Abb. 20 A, Pfeilkopf) nur leicht dunkler erscheinen als die umgebenden Strukturen. Auf ultrastruktureller Ebene (Abb. 20 B, Rahmen aus 20 A, Pfeil und Pfeilkopf) stellen sich beide Markierungen als dunkle elektronendichte Präzipitate dar. Diese Reaktionsprodukte können mittels konventioneller Transmissionselektronenmikroskopie nicht voneinander unterschieden werden, wohl aber mittels elementspezifischer Visualisierung des Cers über EFTEM. Dabei zeigte ein Elektronen-Verlust-Spektrum (Electron-Energy-Loss-Spectrum, EELS) der immunpositiven Zelle am oberen rechten Rand in Abb. 20 B zwei charakteristische Peaks (Abb. 20 C, Pfeil). Eine Auftragung der Elektronenintensität gegen den Energieverlust weist diesen Peaks einen Energieverlust von 887 eV und 907 eV zu, welche den M₄- und M₅-Ionisationskanten von Cer zuzuordnen sind (Abb. 20 C). Diese Peaks sind dem exponentiell abnehmenden Hintergrundsignal inelastisch gestreuter Elektronen aufgesetzt.

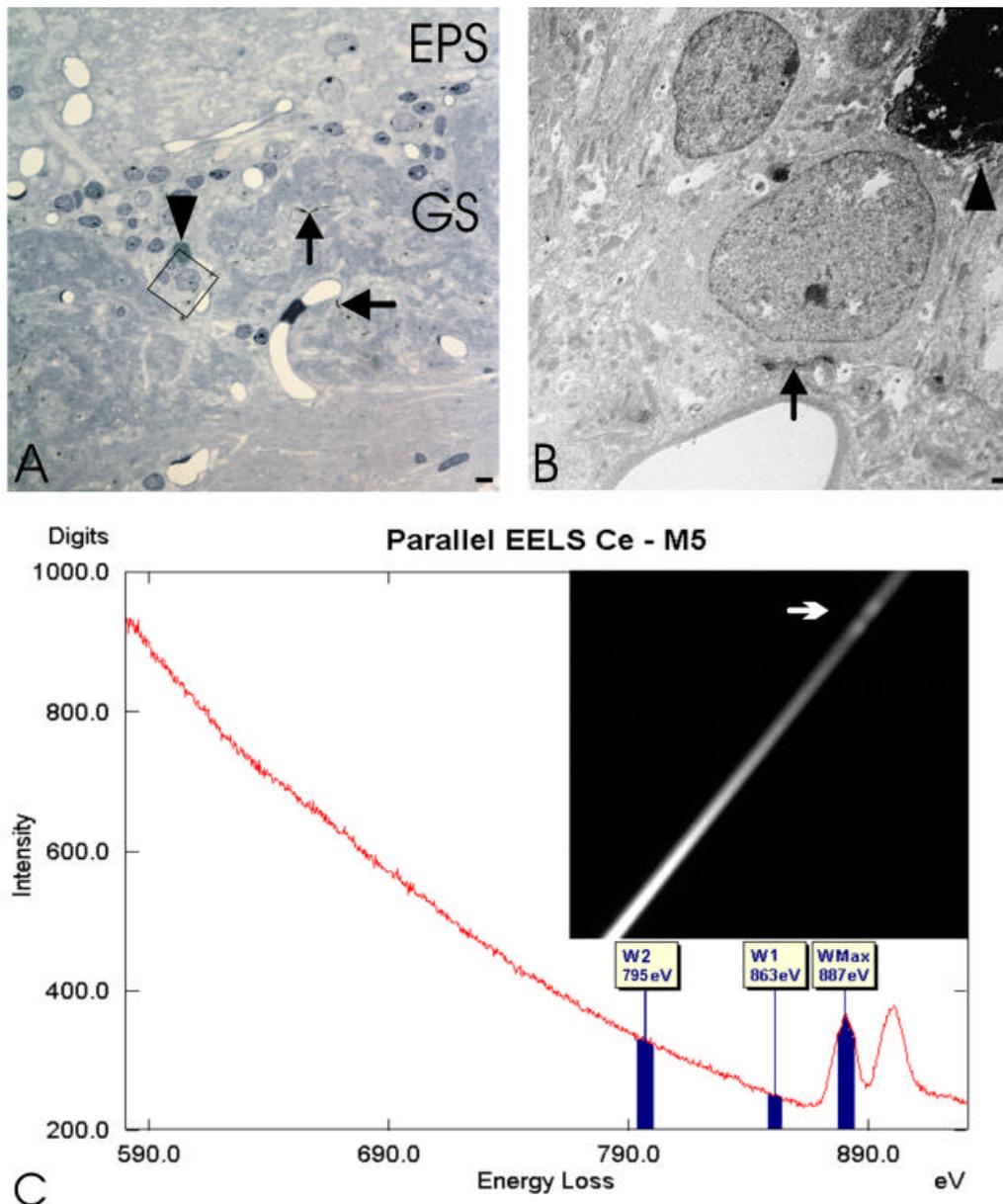


Abbildung 20: Immunenzymatische Doppelmarkierung mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik und Peroxidase-DAB/Os auf elektronenmikroskopischem Niveau.

Schnitte des Bulbus olfactorius der Ratte wurden sowohl mit Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase, gefolgt von alkalische-Phosphatase(aP)-markierten Zweitantikörpern als auch mit anti-Serotonin-Antikörpern, biotinylierten Zweitantikörpern und dem ABC-Komplex inkubiert. Peroxidase wurde mit DAB/Nickel und die aP mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik visualisiert. Im mit Toluidinblau gefärbten Semidünnschnitt (A) wurden sowohl serotonerge Axone (A, Pfeile) als auch periglomeruläre Zellkörper (A, Pfeilkopf) identifiziert. Die Ausschnittvergrößerung auf ultrastruktureller Ebene (B, Rahmen aus A) zeigt zwei markierte Strukturen, die beide elektronendicht sind (B, Pfeile, Pfeilkopf). Diese beiden Präzipitate konnten morphologisch nicht voneinander unterschieden werden. Ein Elektronen-Verlust-Spektrum (EELS) der immunpositiven Zelle am oberen rechten Rand (B) zeigt zwei charakteristische Peaks (C, Pfeil). Eine Auftragung der Elektronenintensität gegen den Energieverlust weist diesen Peaks einen Energieverlust von 887 eV und 907 eV zu, welche den M₄- und M₅-Ionisationskanten von Cer zuzuordnen sind (C). Somit ist diese Zelle als Tyrosinhydroxylase-positiv identifiziert. Messbalken: 10 µm in (A), 1000 nm in (B). (GS - glomeruläre Schicht, EPS - externe plexiforme Schicht)

Die für die Drei-Fenster-Power-Law-ESI (Electron Spectroscopic Imaging)-Analyse des betrachteten Bildausschnittes (Abb. 20 und 21) gewählten Energieverlustfenster von 15 eV (W_2 , W_1 und W_{max}) sind im Spektrum (Abb. 20 C) dargestellt. Die Hintergrundbilder (Abb. 21 A, B) wurden auf die $M_{4,5}$ -Ionisationskante des Cers extrapoliert und vom aufgenommenen Signal auf der Kante (Abb. 21 C) subtrahiert. Aus dieser Drei-Fenster-Power-Law-Methode resultiert ein Cer-Verteilungsbild (Abb. 21 E). Eine Überlagerung des mittels ESI erstellten Elementverteilungsbildes auf das invertierte Hochkontrastbild bei 250 eV (Abb. 21 D) ergibt ein transmissionselektronenmikroskopisches Cer-Verteilungsbild der betrachteten Region (Abb. 21 F).

Mit Hilfe dieser Methode konnte eine Unterscheidung zwischen dem Cer-Präzipitat und dem DAB/Osmium-Niederschlag und damit zwischen Tyrosinhydroxylase- und Serotonin-immunpositiven Strukturen getroffen werden (Abb. 21 F). Die Zelle in der oberen rechten Ecke wurde mittels ESI als dopaminerges periglomeruläres Neuron identifiziert. Der immungefärbte Fortsatz in der Mitte des Bildes (Abb. 21 F, Pfeil) enthielt kein Cer und war somit serotoninerg.

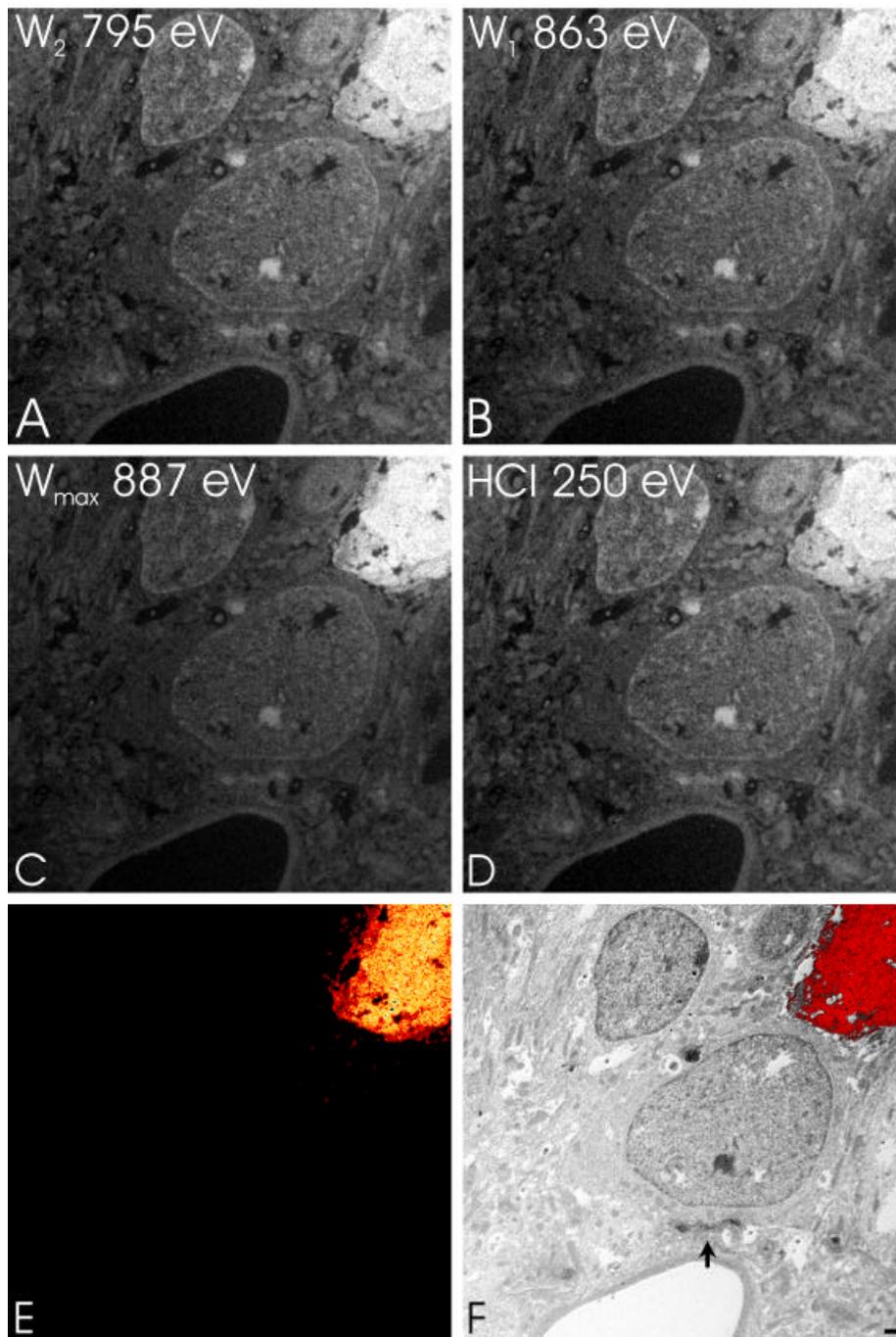


Abbildung 21: Immunenzymatische Doppelmarkierung mit der modifizierten Cer-Phosphat- H_2O_2 -Technik und Peroxidase-DAB/Os auf ultrastruktureller Ebene mittels ESI.

Mittels einer ESI-Serie wurde die Cer-Verteilung im immunzytochemisch doppelgefärbten Schnitt aus Abb. 20 dargestellt. Das Cer-Verteilungsbild (E) wurde mit der Drei-Fenster-Power-Law-Methode aus den Vorkantenbildern (A, B) und dem Bild auf der Ionisationskante (C) errechnet. Das Hochkontrastbild (D) vor der Kohlenstoffionisationskante ist invertiert worden, um eine konventionelle elektronenmikroskopische Abbildung darzustellen. Das errechnete Elementverteilungsbild (E) wurde als Overlay über dieses invertierte Bild gelegt (F). Somit konnte die Cer-Verteilung in der betrachteten Region dargestellt werden (F). Das Neuron (F, oben rechts) wurde auf Grund des Cer-Verteilungsbildes (F, rotes Overlay) als Tyrosinhydroxylase-positiv identifiziert. Der neuronale Fortsatz in der Mitte des Bildes (F, Pfeil) enthielt kein Cer, war also mit DAB markiert und somit serotoninerg. Messbalken: 1000 nm in (A)-(F).

2.3. Andere getestete Marker für weiterführende immunzytochemische Mehrfachmarkierungen auf ultrastruktureller Ebene mittels EFTEM

2.3.1. Silberverstärkte Nano-Gold markierte Zweitantikörper

Die Lokalisation von γ -Aminobuttersäure (GABA) in einem periglomerulären Neuron mittels Nano-Gold- und Silberverstärkung zeigt Abb. 22. Nach der Vorbereitung für die Post-Embedding-Immunzytochemie wurde mit polyklonalen anti-GABA-Antikörpern aus Kaninchen, dann mit Nano-Gold-markierten Zweitantikörpern (Au-Ziege-Anti-Kaninchen) inkubiert und anschließend das 0,8 nm starke kolloidale Nano-Gold silberverstärkt. Die Übersicht (Abb. 22 A) zeigt ein periglomeruläres Neuron mit Zellkern (unten rechts). Ein Ausschnitt der Übersichtsvergrößerung (Abb. 22 A, Rahmen) ist in Abb. 22 B dargestellt und zeigt eindeutig Silberkörner (Pfeile). Mittels ESI ist ein Elementverteilungsbild (Abb. 22 C, unten rechts) an der $M_{4,5}$ -Ionisationskante des Silbers bei 451 eV (Abb. 22 C, oben rechts W_{\max}) erstellt worden. Die Vorkantenbilder für die Extrapolation mit der Drei-Fenster-Power-Law-Methode sind bei 320 eV (W_2 , nicht dargestellt) und 355 eV (Abb. 22 C, oben links W_1) mit einem Energiefenster von 10 eV aufgenommen worden. Das Falschfarbenoverlay weist die Kolloide eindeutig als Silberkolloide aus und zeigt somit, dass es sich hier um ein GABA-immunpositives Neuron handelt (Abb. 22 D, Pfeile). In der Darstellung der ESI-Analyse (Abb. 22 C) sind ausschließlich das direkte Vorkantenbild W_2 (Abb. 22 C, oben links) und das Bild auf der Ionisationskante W_{\max} (Abb. 22 C, oben rechts) abgebildet, was für die folgenden Darstellungen der Methode in dieser Arbeit beibehalten wird.

Die immunzytochemische Markierung mittels silberverstärkten Nano-Gold-markierten Zweitantikörpern kann auch als Pre-Embedding-Methode eingesetzt werden. Der Einsatz dieser Pre-Embedding-Technik mit einer anschließenden elementspezifischen Visualisierung des Silbers durch EFTEM wurde positiv getestet (Daten nicht gezeigt). Vorversuche hinsichtlich einer simultanen immunzytochemischen Doppelmarkierung dieser Reaktion im Pre-Embedding-Verfahren mit der modifizierten Cer-Phosphat- H_2O_2 -Methode verliefen ebenfalls viel versprechend. Es traten keine gegenseitigen Beeinflussungen der Reaktionen auf (Daten nicht gezeigt).

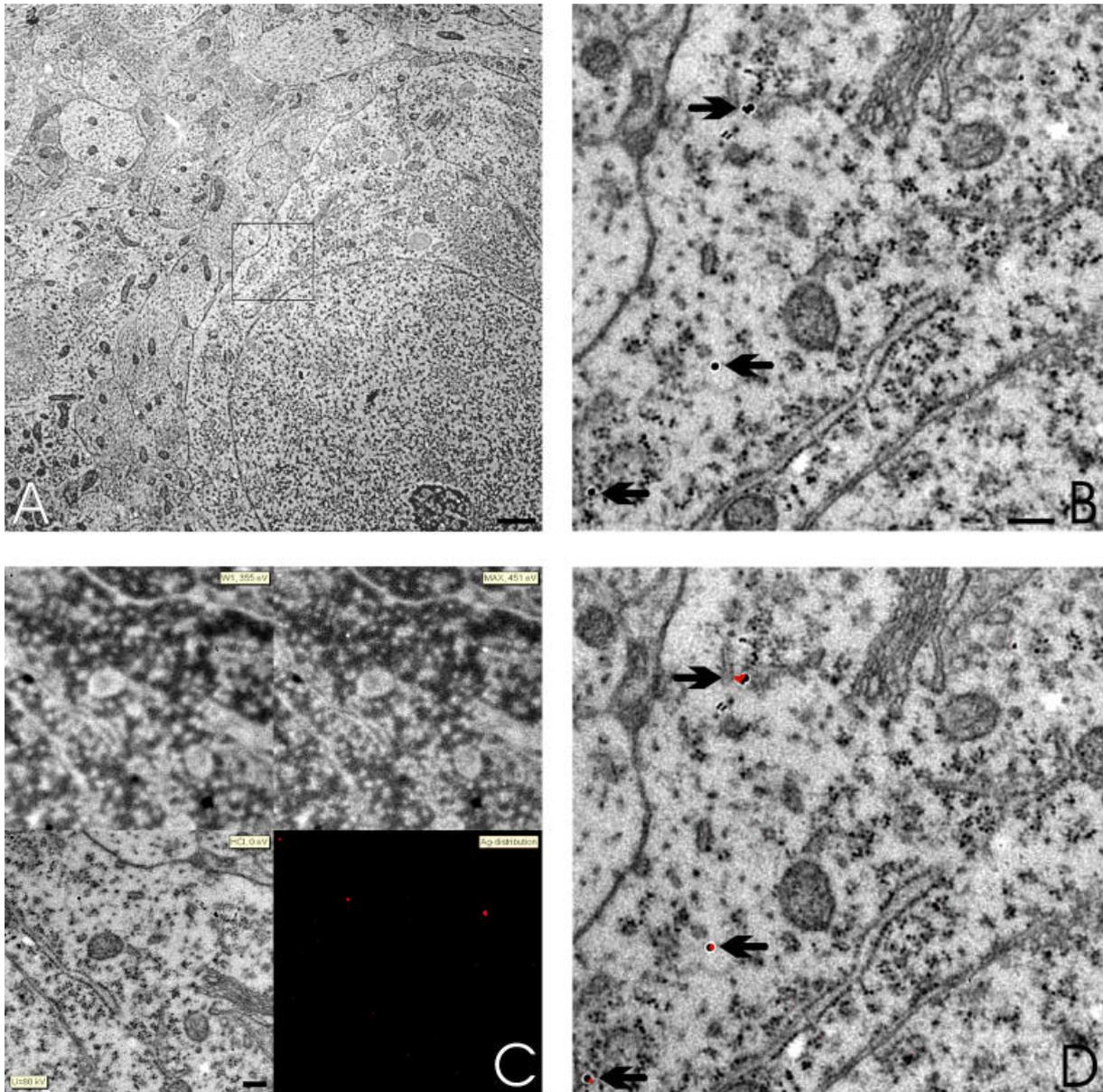


Abbildung 22: Immunzytochemischer Nachweis von silberverstärkten Nano-Gold-Antikörpern mit EFTEM.

Im Post-Embedding-Verfahren wurde ein Ultradünnschnitt des Bulbus olfactorius der Ratte mit polyklonalen anti-GABA-Erst- und Nano-Gold-markierten Zweitantikörpern inkubiert und das kolloidale Nano-Gold silberverstärkt. Die Übersicht zeigt ein periglomeruläres Neuron mit Zellkern (A, unten rechts). In der Ausschnittvergrößerung (B; A, Rahmen) sind eindeutig kolloidale Markierungen zu erkennen (B, Pfeile). Mittels ESI wurde ein Elementverteilungsbild (C, unten rechts) an der $M_{4,5}$ -Ionisationskante des Silbers bei 451 eV (C, oben rechts) erstellt. Die Vorkantenbilder für die Extrapolation mit der Drei-Fenster-Power-Law-Methode sind bei 320 eV (nicht gezeigt) und 355 eV (C, oben links) aufgenommen worden. Das Falschfarbenoverlay auf die konventionelle elektronenmikroskopische Abbildung (C, unten links) weist die Kolloide eindeutig als Silberkolloide aus und zeigt somit, dass es sich hier um ein GABA-immunopositives Neuron handelt (D, rotes Overlay mit Pfeilen markiert). Messbalken: 5 μm in (A), 500 nm in (B) und (D), 500 nm in (C, unten links).

2.3.2. Ferritin-markiertes Protein A

Ultradünnschnitte des Bulbus olfaktorius der Ratte wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und anschließend mit Ferritin-markiertem Protein A inkubiert (Abb. 23). In Abb. 23 A ist ein Ausschnitt aus dem Perikaryon eines periglomerulären Neurons mit einem synaptischen Kontakt (Pfeil) gezeigt. Die Eisenverteilung in diesem Bereich ist auf der $L_{2,3}$ -Ionisationskante des Eisens bei 720 eV (Abb. 23 B, oben rechts W_{max}) sowie den Vorkantenbildern bei 635 eV (W_2 , nicht gezeigt) und 688 eV (Abb. 23 B oben links W_1) mit einem Energiefenster von 15 eV aufgenommen und mittels Drei-Fenster-Power-Law-Methode berechnet worden (Abb. 23 B, unten rechts). Das Falschfarbenoverlay zeigt die Eisen- und damit Ferritinverteilung im Schnitt (Abb. 23 C). Es handelt sich um ein GABA-immunpositives Neuron. Das synaptische Endknöpfchen ist ebenfalls GABA-positiv. Darüber hinaus zeigt der Schnitt einen starken Hintergrund an Ferritinpartikeln, der ohne das Elementverteilungsbild schwer oder gar nicht zu erkennen wäre. Hieraus ergibt sich ein weiterer Vorteil der Methode. Es ist eine klare Unterscheidung der Immunmarkierung von möglichen Artefakten, z.B. durch das Kontrastieren, und von anderen Partikeln möglich.

Diese beiden etablierten Markierungsmethoden - Nano-Gold mit Silberverstärkung und Ferritin-markiertes Protein A - eignen sich demnach für eine simultane immunzytochemische Mehrfachmarkierung mittels EFTEM. Erste Versuche zeigten, dass diese beiden Post-Embedding-Markierungsmethoden mit der modifizierten Cer-Phosphat- H_2O_2 -Technik kompatibel sind (Daten nicht gezeigt).

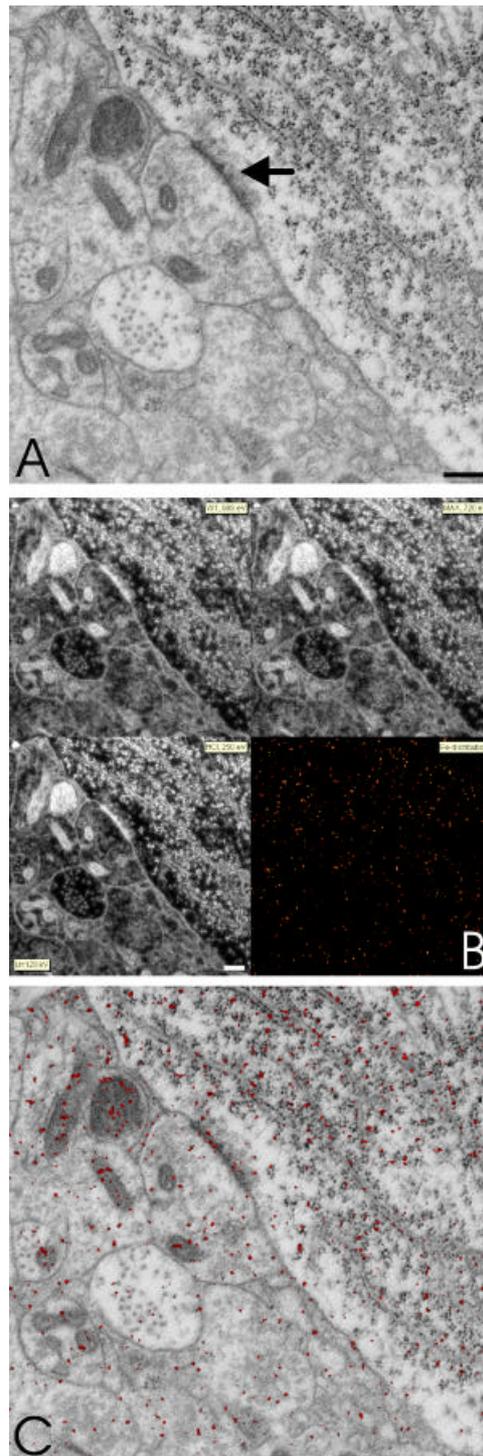


Abbildung 23: Immunzytochemischer Nachweis von Ferritin-markierten Antikörpern mit ETEM.

Im Post-Embedding-Verfahren wurde ein Ultradünnschnitt des Bulbus olfaktorius der Ratte mit polyklonalen anti-GABA-Erst- und ferritinmarkierten Zweitantikörpern inkubiert. In diesem Fall wurde das Zytoplasma eines periglomerulären Neurons mit einem synaptischen Kontakt (A, Pfeil) dargestellt. Die Eisenverteilung wurde auf der $L_{2,3}$ -Ionisationskante des Eisens bei 720 eV (B, oben rechts) mit den Vorkantenbildern bei 635 eV (nicht gezeigt) und 688 eV (B, oben links) aufgenommen und mittels Drei-Fenster-Power-Law-Methode berechnet (B, unten rechts). Das Falschfarbenoverlay zeigt die Eisen- und damit Ferritinverteilung im Schnitt (C). Sowohl das Neuron als auch die Synapse sind immunpositiv für GABA. Das Bild zeigt ebenfalls einen starken Hintergrund an Ferritinpartikeln im Schnitt, welcher ohne das Elementverteilungsbild schwer oder gar nicht zu erkennen wäre, was einen weiteren Vorteil von ESI aufzeigt. Messbalken: 500 nm in (A) und (C), 500 nm in (B, unten links).

2.3.3. Dextran-umhülltes superparamagnetisches Eisenoxid (USPIO)

Ein weiteres Metallkolloid, Dextran-umhülltes superparamagnetisches Eisenoxid, welches als Leberkontrastmittel für die Kernspintomographie eingesetzt wird, wurde auf seine Eignung zum Nachweis mittels EFTEM untersucht. Einer Ratte wurde das Dextran-umhüllte superparamagnetische Eisenoxid (USPIO) intravenös injiziert (Zusammenarbeit mit Herr Dr. Zimmer, Neuroradiologie der Charité; Lawaczeck et al, 1997; Kresse et al, 1998). Nach zweistündiger Inkubation wurde das Tier perfundiert, die Leber entnommen und eingebettet. Das Lebergewebe wurde dann mittels EFTEM auf Eisenoxid hin untersucht. Die Übersicht (Abb. 24 A) zeigte Hepatozyten (HE), Sinusoide mit Erythrozyten (ER) und eine Kupffersche Sternzelle (KS) mit Lysosomen, die stark mit Eisenoxid markiert sind (Abb. 24 B). Diese Lysosomen wurden mittels der Drei-Fenster-Power-Law-ESI-Methode an der $L_{2,3}$ -Ionisationskante bei 720 eV (Abb. 24 C, oben rechts W_{max}) des Eisens untersucht (Abb. 24 C). Die Vorkantenbilder sind bei 635 eV (W_2 , nicht gezeigt) und bei 678 eV (Abb. 24 C, oben links W_1) mit einem Energiespalt von 15 eV aufgenommen worden. Das Falschfarbenoverlay (Abb. 24 D) zeigt die Eisenverteilung in den Lysosomen. Damit handelt es sich hier um das Dextran-umhüllte superparamagnetische Eisenoxid. In einer weiteren Eisenverteilungsberechnung mit ESI bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 24 E, Rahmen aus 24 D) wird gezeigt, dass diese Eisenoxidkolloide auch einzeln dargestellt werden können (Abb. 24 F). Die in diesem Versuch verwendeten Partikel haben einen Durchmesser von 15 nm, könnten aber für eine Anwendung in der Immunzytochemie auch in geringerer Größe hergestellt werden (persönliche Mitteilung Kresse). Es handelt sich somit um einen weiteren potenziellen Marker für die EFTEM-Immunzytochemie, der an Antikörper gebunden werden kann.

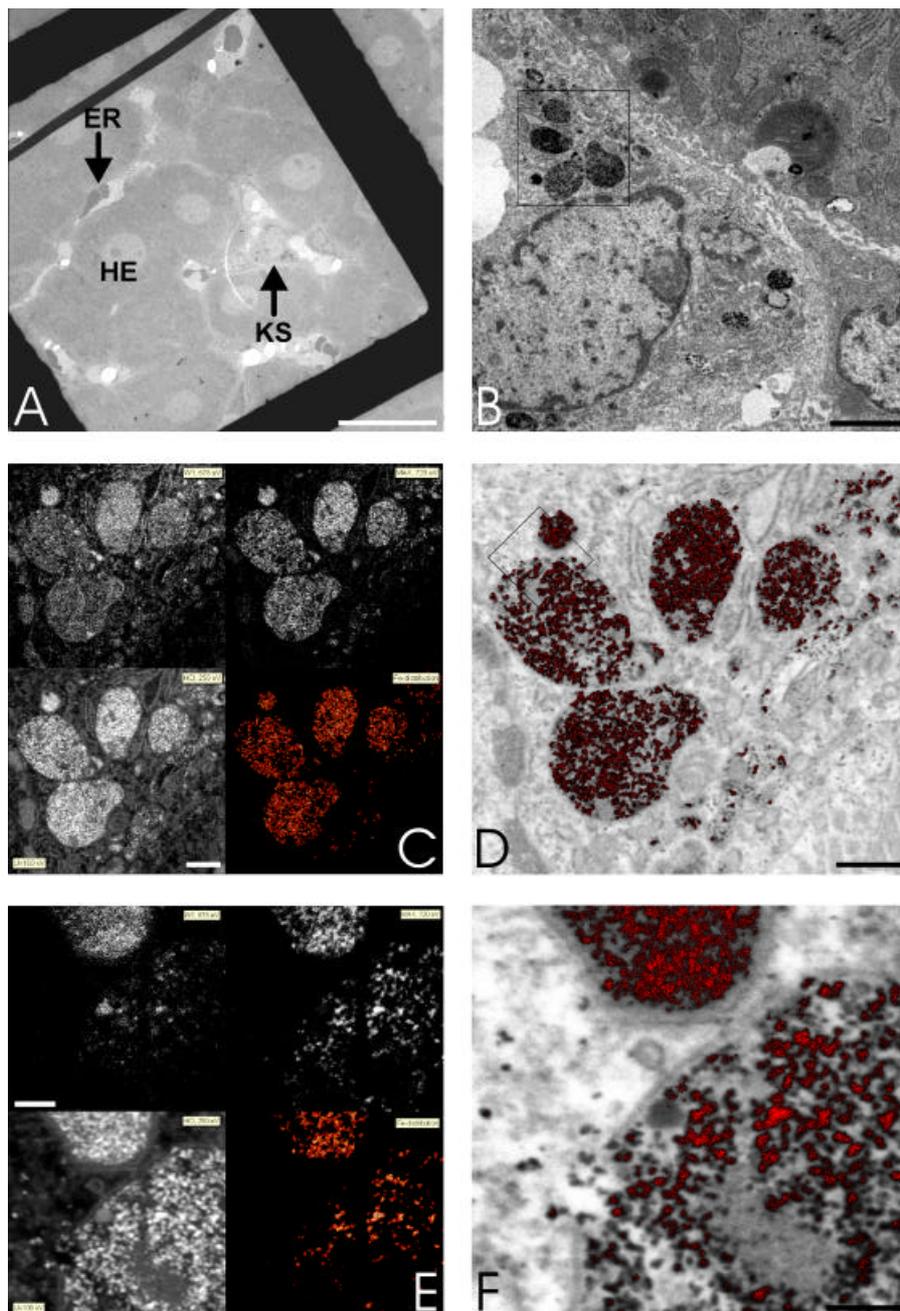


Abbildung 24: Dextran-umhülltes Eisenoxid als möglicher Marker für EFTEM-Immunzytochemie.

Ein weiteres potenzielles Markerkolloid, Dextran-umhülltes superparamagnetisches Eisenoxid (USPIO), das als Leberkontrastmittel für die Kernspintomographie eingesetzt wird, wurde auf seine Eignung zum Nachweis mittels EFTEM untersucht. Einer Ratte wurde das Eisenoxid intravenös injiziert. Nach Perfusionsfixierung wurde es in der Leber visualisiert. Die Übersicht (A) zeigt Hepatozyten (HE), Sinusoide mit Erythrozyten (ER) und eine Kupffersche Sternzelle (KS) mit Lysosomen. Die Kupffersche Sternzelle scheint das Eisenoxid phagozytiert und in Lysosomen angereichert zu haben (B). Diese Lysosomen wurden mittels ESI und der Drei-Fenster-Power-Law-Methode an der $L_{2,3}$ -Ionisationskante bei 720 eV des Eisens (C, oben rechts) untersucht. Die Vorkantenbilder sind bei 635 eV (nicht gezeigt) und bei 678 eV (C, oben links) aufgenommen worden. Das Falschfarbenoverlay (D) zeigt die Eisenverteilung und damit, dass es sich beim elektronendichten Inhalt der Lysosomen um das Dextran-umhüllte Eisenoxid handelt. Mit einer weiteren Eisenverteilungsanalyse bei stärkerer Vergrößerung (E, Rahmen aus D) konnte im Falschfarbenoverlay (F, Rahmen aus D) gezeigt werden, dass diese Eisenoxidkolloide auch einzeln darstellbar sind. Messbalken: 20 μm in (A), 2000 nm in (B), 500 nm in (C, unten links), 500 nm in (D), 100 nm in (E, oben links), 100 nm in (F).

2.3.4. Nickel(II)-Nitrilotriacetylsäure-Glutathion-Gold-Kolloide (Ni(II)-NTA-GSH-Gold)

Mit Kir.6.2.-His-Tag-Antigen beladene Superosebeads (Thomzig et al, 2001) wurden in Agarose eingebettet. Vibratomschnitte dieses Modellgewebes sind mit Nickel(II)-Nitrilotriacetylsäure-Glutathion-Gold-Beads (Ni(II)-NTA-GSH-Gold; Hainfeld et al, 1999) inkubiert und anschließend für die licht- und elektronenmikroskopische Sichtbarmachung silberverstärkt worden. Das silberverstärkte kolloidale Ni(II)-NTA-GSH-Gold markiert die His-Tags der Antigene, welche lichtmikroskopisch (Abb. 25 A) und elektronenmikroskopisch von den Übersichten bis zur Detailansicht (Abb. 25 B, C, D) gut zu erkennen sind. Das ESI-Nickel-Verteilungsbild (Abb. 25 E, unten rechts) der Detailansicht (Abb. 25 D) ist auf der $L_{2,3}$ -Ionisationskante bei 865 eV (Abb. 25 E, oben rechts W_{max}) Energieverlust und den Vorkantenbildern bei 760 eV (W_2 , nicht gezeigt) und 830 eV (Abb. 25, oben links W_1) Energieverlust bei einem Energiefenster von 15 eV aufgenommen und mittels Drei-Fenster-Power-Law-Methode errechnet worden (Abb. 25 E). Das Falschfarbenoverlay (Abb. 25 F) zeigte, dass dieses kolloidale Derivat über seinen Gehalt an Nickel nachgewiesen und somit in Zukunft als Marker für die Immunzytochemie genutzt werden kann.

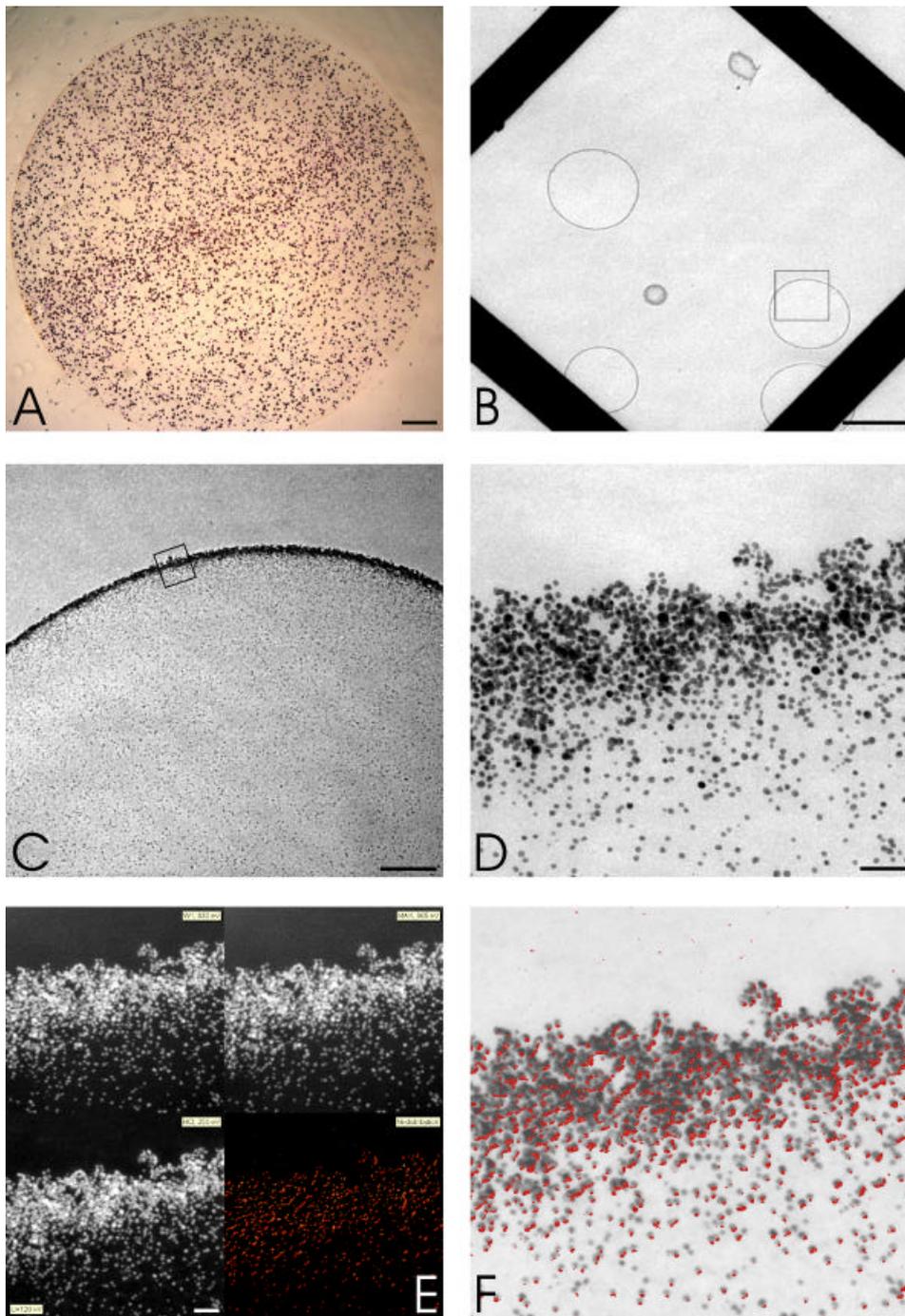


Abbildung 25: Nickel(II)-Nitrilotriacetyl-säure-Glutathion-Gold-Kolloide (Ni(II)-NTA-GSH-Gold) als potentieller Marker für EFTEM-Immunzytochemie.

In Agarose eingebettete und mit Kir.6.2-His-Tag-Antigen beladene Superosebeads wurden vibrator-geschritten, mit Ni(II)-NTA-GSH-Gold inkubiert und anschließend silberverstärkt. Das silberverstärkte kolloidale Ni(II)-NTA-GSH-Gold bindet an die His-Tags der Antigene, welche licht- (A) und elektronenmikroskopisch von den Übersichten bis zur Detailansicht (B, C, D, Vergrößerungsausschnitt jeweils im Rahmen gezeigt) gut dargestellt werden konnten. Das ESI-Nickelverteilungsbild (E, unten rechts) ist auf der $L_{2,3}$ -Ionisationskante bei 865 eV (E, oben rechts) und den Vorkantenbildern bei 760 eV (nicht gezeigt) und 830 eV Energieverlust (E, oben links) aufgenommen und mittels Drei-Fenster-Power-Law-Methode errechnet worden. Das Falschfarbenoverlay (F) zeigt, dass dieses Kolloid durch seinen Gehalt an Nickel nachgewiesen werden kann. Messbalken: 400µm in (A), 20 µm in (B), 2000 nm in (C), 100 nm in (D) und (F), 100 nm in (E, unten links).

3. Weitere Anwendungsmöglichkeiten der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik

Auf Grund des guten Kontrastes zwischen dem gelben Cer-Phosphat-H₂O₂-Reaktionsprodukt der alkalischen Phosphatase und dem dunkelbraunen bis schwarzen DAB/Ni-Präzipitat der Peroxidase könnten sehr gut Kollokalisationsstudien auf lichtmikroskopischer Ebene durchgeführt werden.

Einige Cer-markierte Tyrosinhydroxylase-positive Neurone schienen in elektronenmikroskopischen Elementverteilungsbildern eine stärkere Immunreaktivität in den neuronalen Fortsätzen (Dendriten) aufzuweisen als im Perikarion (Abb. 19). Das weist darauf hin, dass die modifizierte Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode in Verbindung mit EFTEM auch zur Quantifizierung der Antigenkonzentration auf ultrastruktureller Ebene herangezogen werden kann (van Noorden und Jonges, 1987; Jonges et al, 1990; Reimer et al, 1992; van Noorden und Frederiks, 1993; Beckers et al, 1996). Für solche Untersuchungen sind allerdings intensive und langwierige Voruntersuchungen und Kalibrierungen notwendig, die den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätten.

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ist eine Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik zur Visualisierung von alkalischer Phosphatase in der Immunzytochemie entwickelt worden, die für eine Pre-Embedding-Mehrfachmarkierung auf elektronenmikroskopischem Niveau eingesetzt werden kann. In Kombination mit der 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat (Diaminobenzidin, DAB)-Meerrettichperoxidase-Technik ist eine simultane immunenzymatische Doppelmarkierung auf ultrastruktureller Ebene möglich. Die beiden elektronendichten Präzipitate der alkalischen Phosphatase (Cer(IV)-Phosphohydroperoxid) und der Peroxidase (Diaminobenzidin/Osmium) können mittels Elektronenenergieverlustspektroskopie (Electron Energy Loss Spectroscopy, EELS) und Elementverteilungsbildern (Electron Spectroscopic Imaging, ESI) unterschieden werden.

Als Modellsystem wurde in der vorliegenden Arbeit der Bulbus olfaktorius der Ratte gewählt. Dabei ist die ultrastrukturelle Verteilung der monaminen Neurotransmitter Dopamin und Serotonin in der glomerulären Schicht immunzytochemisch untersucht worden. Die Aktivität eines Glomerulums wird durch periglomeruläre Zellen der benachbarten Glomerula und durch zentrale Afferenzen zum Bulbus olfaktorius beeinflusst und moduliert. Die zentralen Afferenzen beziehen auch das Serotonin aus den Raphe Nuklei des Mittelhirns ein. Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nach scheinen diese serotoninergen Fasern keine synaptischen Kontakte mit dopaminergen periglomerulären Zellen zu etablieren.

1. Die simultane Mehrfachmarkierung auf elektronenmikroskopischem Niveau ist limitiert

1.1. Post-Embedding

Immunelektronenmikroskopische Färbemethoden sind durch die Zahl der Markierungen, die simultan in einem Gewebsschnitt visualisiert werden können, begrenzt. Für Post-Embedding-Mehrfachmarkierungen werden heutzutage oft mit kolloidalem Gold markierte Zweitantikörper oder Protein A eingesetzt. Eine Unterscheidung der verschiedenen immunzytochemischen Marker wird in diesem Fall über die Größe der Kolloide vorgenommen. Durch den Einsatz von Kolloiden unterschiedlicher Durchmesser sind demnach simultane Mehrfachmarkierungen über eine Doppelfärbung hinaus möglich (Wenzel et al, 1997; Wenzel et al, 2000). Eine Vergrößerung der kolloidalen Goldpartikel setzt allerdings die Sensitivität der Immunmarkierung aufgrund zunehmender sterischer Hinderung erheblich herab. Dies führt dazu, dass in der Praxis häufig nur Nano-Gold (0,8 nm), 5 und 10 nm goldmarkierte Zweitantikörper eingesetzt werden. Ein weiteres Problem stellt die Zerstörung und/oder Maskierung der Antigene während der Kunststoffeinbettung dar. Sehr viele Epitope sind gegenüber der Einbettungsprozedur für die Elektronenmikroskopie sensitiv. Aus diesen Gründen ist das Post-Embedding-Verfahren für die Immunzytochemie stark limitiert.

1.2. Pre-Embedding

Pre-Embedding-Methoden wie die Peroxidase-DAB-Technik (Su-Ming et al, 1981; Straus, 1982; Trojanowski et al, 1983; Kosaka et al, 1986; Levy et al, 1986; Grumbach und Veh, 1995) und/oder Nano-Gold mit Silberverstärkung (Burry et al, 1992; Martone et al, 1992; Laube et al, 1996; Erhard et al, 1996) werden heutzutage in der Praxis am häufigsten eingesetzt. Beide, kolloidale Metallpartikel als auch das elektronendichte immunenzymatische Präzipitat der Peroxidase, ergeben im elektronenmikroskopischen Bild eine mehr oder weniger schwarze Markierung. Kolloidale Metallpartikel können dabei aufgrund ihrer ultrastrukturellen Form und Größe differenziert vom Präzipitat betrachtet werden. Verschiedene immunenzymatische Präzipitate sehen im konventionellen elektronenmikroskopischen Bild ähnlich bzw. gleich aus und können daher morphologisch nicht voneinander unterschieden werden. Auch Artefakte, die während der Markierungsprozedur, der Einbettung oder der Kontrastierung entstehen, können oft nicht von der Immunmarkierung unterschieden werden. Für eine Lösung dieser Probleme und eine Unterscheidung von mehr als einer immunenzymatischen Markierung ist die Energiefilter-Transmissions-Elektronenmikroskopie (EFTEM) ideal geeignet. Sowohl Electron Spectroscopic Imaging (ESI) als auch Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS) lassen eine Identifizierung der Markerelemente im Gewebeschnitt zu. Theoretisch sind mit Hilfe von EFTEM simultane immunzytochemische Mehrfachmarkierungen nur durch die Anzahl geeigneter Elemente limitiert.

Immunenzymatische Färbetechniken (Abb. 1 A) haben den Vorteil einer möglichen großen Verstärkung des Signals und damit einer höheren Sensitivität. Einerseits kann die Aktivität des Enzyms über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten und so die Menge an Präzipitat über die Zeit variiert werden. Zum anderen kann dies durch die Verstärkung mittels Avidin-Biotin-Enzym-Systemen (Abb. 1 B, C; Su-Ming et al, 1981; Grumbach und Veh, 1995) geschehen. Die nichtkovalente Bindung zwischen Biotin und Avidin ist sehr stark und durch eine Dissoziationskonstante von 10^{-15} M charakterisiert (Wilchek und Bayer, 1990a). Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Wird ein biotinylierter Zweitantikörper eingesetzt und mittels eines biotinmarkierten Enzyms sowie Avidin ein so genannter ABC-Komplex gebildet (Su-Ming et al, 1981; Grumbach und Veh, 1995), wird eine

erhebliche Verstärkung erzielt. In diesem Fall wurden Signalverstärkungen um mehr als das zehnfache beschrieben (Wilchek und Bayer, 1990b). Aufgrund dieser Vorteile immunenzymatischer Färbetechniken wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode für die immunzytochemische Visualisierung von alkalischer Phosphatase auf ultrastrukturellem Niveau entwickelt. Das Cer-Präzipitat dieser modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik wurde anschließend mit Hilfe von EFTEM elementspezifisch visualisiert. Als weiterer Schritt ist ein immunenzymatisches Doppelmarkierungsprotokoll mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für alkalische Phosphatase und der in der Praxis weit verbreiteten Peroxidase-DAB-Methode entwickelt worden. Durch eine elementspezifische Visualisierung des Cer-Präzipitates durch EFTEM konnten die Reaktionsprodukte der alkalischen Phosphatase und der Peroxidase voneinander unterschieden werden.

2. Energiefilternde Transmissionselektronenmikroskopie (EFTEM)

2.1. Identifizierung und Lokalisation des Cer-Präzipitates der alkalischen-Phosphatase-Reaktion mittels EFTEM

Bei der konventionellen Transmissionselektronenmikroskopie gibt es Elektronen, die ohne Interaktion das Präparat passieren (Abb. 2 A). Diese ungestreuten Elektronen liefern die Helligkeit auf dem Leuchtschirm. Andere, so genannte elastisch gestreute Elektronen verlieren keine Energie, werden aber aufgrund Coulombscher Kräfte stark in ihrem Winkel abgelenkt (Abb. 2 B). Die elastische Streuung von Elektronen wird vor allem durch schwere Kerne wie Osmium oder Uran hervorgerufen, die für die Kontrastierung des Schnittes eingesetzt werden. Eine Ausblendung dieser in ihrem Winkel stark abgelenkten Elektronen bewirkt eine dunkle Abbildung von Strukturen - wie Membranen und Mitochondrien - auf dem Leuchtschirm. Einige Elektronen des Strahls interagieren spezifisch mit Elektronen bestimmter Elektronenschalen aus dem Material des Schnittes (Abb. 2 C). Diese Interaktion bewirkt einen Energietransfer (inelastische Streuung) vom Primärelektron auf die Moleküle des Schnittes. Ist im Präparat in einer definierten Struktur eine hohe Dichte eines Elements enthalten, so werden in dieser Region vor allem inelastisch gestreute Elektronen dieses Elements abgebildet. Dieser Effekt kann mit einem konventionellen Elektronenmikroskop nicht visualisiert werden.

In einem EFTEM, wie dem LEO 912 Omega, passiert der Elektronenstrahl vor dem Erreichen des Leuchtschirms den Energiefilter (Omegafilter). Mit Hilfe dieses Filters können die Elektronen des Elektronenstrahls ihrem Energiegehalt nach entlang einer Achse räumlich getrennt und dargestellt werden (Abb. 3 B). Diese Trennung wird durch die unterschiedliche Ablenkung von Elektronen verschiedener Energien im Magnetfeld erreicht. Die Auftragung der Elektronen, die den Schirm erreichen, gegen ihre Energie (EELS) ergibt einen exponentiellen Energieabfall (Abb. 4; Abb. 20). Elektronen, die z. B. eine Struktur mit einer hohen Dichte an Cer passieren, verlieren eine definierte Energie durch das Herausschleudern der $M_{4,5}$ -Schalenelektronen des Cers aus ihrer Bahn (Ionisierungsenergie). Um ein Elektronenenergieverlustspektrum aufnehmen zu können, muss eine gut detektierbare Anzahl inelastisch gestreuter Elektronen mit dem Energieverlust $M_{4,5}$ -Ionisationskanten des Cers den Schirm erreichen. Die $M_{4,5}$ -Ionisationspeaks des

Cers liegen bei 887 und 907 eV Energieverlust. Werden die Elektronen nach einer Hintergrundsubtraktion mittels der Drei-Fenster-Power-Law-Methode zur Generierung eines Bildes verwendet, erhält man ein Elementverteilungsbild (ESI) der betrachteten Region (Reimer et al, 1992). Das Übereinanderlegen des ESI-Bildes auf das invertierte Hochkontrastbild zeigt somit die Cer-Verteilung im morphologischen Detail.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die EELS vor allem Informationen über die chemische Natur des Elements und/oder dessen Bindungszustand liefert und durch ESI die Verteilung dieses Elements in der betrachteten Region des Ultradünnschnitts aufgeklärt werden kann (de Bruijn et al, 1993; Hendzel und Bazett-Jones, 1996; Beckers et al, 1996; Leapman et al, 1997; Martin et al, 1999; Akagi et al, 2000). Des Weiteren kann mit Hilfe von EFTEM eine Quantifizierung von Elementen durchgeführt werden (Reimer et al, 1992; Beckers et al, 1996). Daher stellt EFTEM nicht nur eine hervorragende Methode zur Visualisierung von Mehrfachmarkierungen auf ultrastruktureller Ebene dar, sondern ist auch für eine mögliche Quantifizierung der Antigene geeignet. Dies ist eine weitere denkbare Anwendung der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik (van Noorden und Jonges, 1987; Jonges et al, 1990; van Noorden und Frederiks, 1993). Für solche quantitativen Untersuchungen wären allerdings aufwändige Vorversuche und Kalibrierungsexperimente notwendig, die nicht Aufgabe der vorliegenden Arbeit waren.

Mit Hilfe von EFTEM ist es außerdem möglich, ein so genanntes „Elemental Mapping“ in biologischen Proben durchzuführen (Leapman, 1986). Dies gilt besonders für eine Kombination dieser Technik mit EDX-Methoden (Energy Dispersive X-Ray; Laepman, 1986; van Dort et al, 1989). Mit EFTEM können vor allem leichte Elemente sehr sensitiv detektiert werden, während mit EDX die schweren Elemente gut analysierbar sind (Leapman, 1986). So können mit EFTEM unter anderem die intrazelluläre Lokalisation, der Bindungszustand und eine Quantifizierung funktioneller Elemente untersucht werden (Leapman und Hunt, 1995). Der Effekt auf die Ferritin-Eisenspeicherung in der Rattenleber bei erhöhter Eisenzufuhr wurde von Cleton et al (1989) mit Hilfe solcher Untersuchungen aufgeklärt. Auch der Phosphorylierungszustand von Neurofilamenten (Leapman et al, 1997; Martin et al, 1999) und die Dichte von Nukleinsäuren und Proteinen in

Zellkernen über eine Phosphor-, Stickstoff- und Kohlenstoffverteilung (Henzel und Bazett-Jones, 1996) sind mittels EFTEM analysiert worden. Dass Kobaltionen für die Blockade von synaptischer Transmission und die Erregung von Muskelzellen verantwortlich sein können, konnte eindrucksvoll mittels ESI-Untersuchungen gezeigt werden (Akagi et al, 2000). Die Lokalisation von Bor und Jod während entsprechender Krebstherapien analysierte Huxham et al (1992). Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnten Rückschlüsse auf die Effektivität der jeweiligen Behandlung gezogen werden.

So sind neben der Immunzytochemie viele weitere Anwendungen dieser Technik, wie z.B. die Aufklärung von Rezeptorpathways über markiertes Transferrin (Kresse et al, 1998 - Transferrinkopplung an USPIO -) oder eine Markierung für In-Situ-Hybridisierungsuntersuchungen, vorstellbar.

2.2. Cer, ein optimales Element für die immunzytochemische Visualisierung von alkalischer Phosphatase mit EFTEM

Lanthanide wie Cer, Gadolinium oder Europium ergeben ein sehr klares Spektrum, und an den M-Ionisationskanten entstehen scharfe Peaks - sogenannte „White Lines“ - im EELS (Reimer et al, 1992). Aufgrund dieser theoretischen Überlegungen und den schon erwähnten Vorteilen immunenzymatischer Techniken wurde als Erstes die Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik ausgewählt und für eine Anwendung in der Immunzytochemie modifiziert sowie adaptiert. Diese Methode zeichnet sich durch die geringe Löslichkeit des Cer(IV)-Phosphohydroperoxides in wässriger und alkoholischer Lösung aus. Besonders die letztgenannte Eigenschaft ist für die Elektronenmikroskopie von entscheidender Bedeutung. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wird dazu benutzt, um anorganisches Phosphat aus dem Substrat para-Nitrophenylphosphat freizusetzen. In Anwesenheit von Cer(III)-Ionen fällt das freie Phosphat sofort zu einem Cer(III)-Phosphohydroxid aus. Anschließend wird das Cer(III)-Phosphohydroxid mit Wasserstoffperoxid zu einem weniger löslichen gelben Cer(IV)-Phosphohydroperoxid oxidiert (Tab. 1). Ursprünglich ist diese Technik für die histochemische Visualisierung von endogener alkalischer Phosphatase in Vertebratengewebe entwickelt worden (Robinson und Karnovski, 1983; van Goor et al, 1989; Halbhuber et al, 1992, 1994; van Noorden und Frederiks, 1993). Vorversuche zeigten jedoch, dass diese Methode nicht einfach für das immunzytochemische Markieren von Hirnschnitten der Ratte mit alkalischer Phosphatase übernommen werden konnte. Ein Grund könnte die Herkunft der üblicherweise in der Immunzytochemie an Zweitantikörper oder Streptavidin gekoppelten alkalischen-Phosphatase-Aktivitäten aus dem Kalbsdarm sein. Der Gedanke liegt nahe, dass diese Isoform des Enzyms möglicherweise andere Reaktionsbedingungen benötigt als die in früheren Studien untersuchten endogenen alkalische-Phosphatase-Aktivitäten (Robinson und Karnovski, 1983; van Goor et al, 1989; Halbhuber et al, 1992, 1994). So variieren z.B. die k_m -Werte verschiedener humaner Isoenzyme der alkalischen Phosphatase aus Darm, Niere, Leber, Gehirn und Plazenta zwischen 67 und 25.000 μ M, die pH-Optima liegen zwischen 9,0 und 10,7 und die Temperaturoptima reichen von 25 bis 40°C (William und Ghosh, 1967). Diese funktionelle Komplexität verschiedener alkalischer-Phosphatase-Aktivitäten könnte ein Grund für die nötige Modifikation der Reaktionsbedingungen vor einer

Anwendung in der Immunzytochemie darstellen. Außerdem ist der Besatz endogener alkalischer Phosphatase im Bürstensaum von Epithelgeweben sehr dicht. So wurden im Kalbsdarm 60, in der Pferdeniere 15 und in humaner Plazenta 80 mg Protein pro kg feuchtem Gewebe bei einem Molekulargewicht zwischen 100.000 und 150.000 D ermittelt (Fernely, 1971). Der Substratumsatz in der Darmmukosa und Niere der Ratte oder in humaner Plazenta lag bei ungefähr 10 μmol pro min und g Gewebe (Fernely, 1971). So könnte aufgrund eines sehr dichten Besatzes mit endogener alkalischer Phosphatase die Sensitivität der Cer-Phosphat- H_2O_2 -Technik in den enzymzytochemischen Originalmethoden eine weniger bedeutende Rolle gespielt haben.

2.3. Modifizierung der Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für die Immunzytochemie

Für eine Anwendung der Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik in der Immunzytochemie wurden unter anderem Substrate, Pufferkonzentrationen und -zusammensetzungen, Cer-Konzentrationen, Kofaktoren und die Reaktionsbedingungen auf photometrischer, lichtmikroskopischer und elektronenmikroskopischer Ebene variiert.

Schon in ersten Vorversuchen zeigte sich, dass die Wahl des Puffers eine entscheidende Bedeutung hat. Das Puffersystem N-[Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl]-Glycin (Tricin; 50 mM) zeigte im Vergleich mit dem allgemein verwendeten Glycin-(50 mM)-Tricin-(25 mM)-Puffer einen ungefähr 15%igen Anstieg der Reaktionsrate (Abb. 9 und 10). Die Pufferkapazität von Tricin (pK_a 8,1) ist bei den für diese Reaktion verwendeten pH-Werten allerdings erschöpft. Das spielte aufgrund des Sensitivitäts- und Intensitätssprunges durch den Einsatz dieses Puffersystems jedoch eine untergeordnete Rolle. Die Zugabe von 50 mM Diethanolamin zum 50 mM Tricin-Puffer ergab eine weitere Steigerung der Sensitivität und Intensität in biochemischen und immunzytochemischen Untersuchungen. Somit konnte eine erhebliche Beschleunigung der Aktivität der alkalischen Phosphatase durch dieses Alkoholamin erreicht werden (Bretaudiere und Spillman, 1984). Eine erhöhte Phosphotransferaseaktivität der alkalischen Phosphatase durch die Zugabe von Diethanolamin, wie in der Literatur allgemein für Alkoholamine beschrieben (Bretaudiere und Spillman, 1984), kann somit für die Reaktionsbedingungen der vorliegenden Studie und die hier eingesetzte Isoform des Enzyms nicht bestätigt werden. Bei einer Phosphotransferaseaktivität der alkalischen Phosphatase würde kein anorganisches Phosphat freigesetzt, sondern durch die Phosphatase auf das Alkoholamin übertragen werden. In diesem Fall wäre kein freies anorganisches Phosphat im Puffer verfügbar, das sich mit den Cer(III)-Ionen zu einem Cer(III)-Phosphat niederschlagen könnte, was hier eindeutig nicht der Fall ist.

Eine Erhöhung der Diethanolaminkonzentration über 50 mM führte zu einer diffuseren Verteilung des Präzipitates um den Ort der Antikörperbindung, was auf eine Transferaseaktivität des Enzyms bei diesen Konzentrationen des Alkoholamins hinweisen könnte. Auch aus einer Steigerung der Tricin-Konzentration über 50 mM resultierte eine diffusere Verteilung des Präzipitates. Dies könnte auf die chelatbildenden Eigenschaften des Tricins zurückzuführen sein. Wenn durch eine

Verschiebung des Gleichgewichtes kaum noch freie Cer(III)-Ionen in Lösung vorhanden sind und infolgedessen durch die alkalische Phosphatase freigesetztes Phosphat nicht sofort mit Cer(III)-Ionen ausfallen kann, wäre ein solcher Effekt denkbar. Des Weiteren werden in der Literatur Chelatbildner wie EDTA als Inhibitoren der alkalischen-Phosphatase-Aktivität diskutiert (Fernely, 1971; Bretauiere und Spillman, 1984).

Der Einsatz von Cer(III)-Chlorid der Firma Fluka stellte sich als entscheidend für die Reaktion heraus. Cer(III)-Salze anderer Hersteller führten zu einer verringerten Sensitivität der Reaktion, was auf inhibierende Rückstände in den Reagenzien zurückgeführt wurde. Cer(III)-Nitrat, ein weiteres käufliches Cer(III)-Salz, zeigte einen vollständig inhibierenden Effekt auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase.

Die getesteten Substrate para-Nitrophenylphosphat und β -Glycerophosphat produzierten gut lokalisierte Cer-Niederschläge (Abb. 8 A, B). Das Präzipitat des Substrates Ethanolaminphosphat verteilte sich hingegen diffus um den Ort der Immunmarkierung (Abb. 8 C). Dies könnte auf eine Phosphotransferaseaktivität der alkalischen Phosphatase durch die Zugabe von Ethanolaminphosphat oder durch das während der Reaktion entstehende Ethanolamin zurückzuführen sein (siehe oben). Beim Einsatz von 5-Bromo-4-Chloro-3-Indiolphosphat (BCIP) als Substrat verteilte sich das Präzipitat während des Entwässerns mit Ethanol diffus im Gewebsschnitt. Somit musste dieses Substrat für elektronenmikroskopische Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Der ideale pH-Wert für diese Reaktion der alkalischen Phosphatase wurde bei 10 ermittelt. Höhere pH-Werte wurden nicht getestet, um das Gewebe nicht übermäßig zu beanspruchen. Mit biochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass 3 mM Cer(III) einen beschleunigenden Effekt auf die Reaktionsrate hatte (Abb. 12 A). Cer-Konzentrationen von 3 bis 6 mM zeigten in immunzytochemischen Experimenten die besten Ergebnisse (Abb. 12 B, C), hingegen konnte bei 10 mM Cer eine Inhibierung der Aktivität festgestellt werden (Abb. 12 D).

Ein positiver allosterischer Effekt durch Zugabe von 3,9 mM Mg^{2+} -Ionen konnte bestätigt werden (Chappelet-Tordo et al, 1974; Bretauiere und Spillman, 1984).

Zur schärferen Darstellung markierter Strukturen wurde dem Reaktionspuffer 30 % Saccharose zugegeben (Robinson et al, 1990; Araki et al, 1993; Halbhuber et al, 1994). Die Wirksamkeit dieser Maßnahme bestätigte sich in immunzytochemischen Experimenten (Abb. 13 A, B). Der Effekt geht vermutlich auf die Verringerung der Diffusion von Cer(III)-Ionen, freigesetztem Phosphat und des Reaktionsproduktes während der Fällung in der hochviskosen Zuckerlösung zurück. Ein Einfluss der Zuckerzugabe auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase konnte mit biochemischen Untersuchungen ausgeschlossen werden (Abb. 13 C).

Die Sensitivität der Reaktion konnte durch Entgasen des Wassers vor dem Ansetzen des Reaktionspuffers entscheidend verbessert werden (Abb. 14 A, B; Hulstaeret et al, 1992; persönliche Mitteilung Halbhuber). Auf welchen Effekt dieser Sensitivitätssprung zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden. Dies war allerdings auch nicht die Aufgabe der vorliegenden Arbeit. Durch Kontrollversuche unter Zugabe von Trockeneis (Abb. 14 C) bzw. Natriumcarbonat (Abb. 14 D) zum abgekochten Wasser, konnte jedoch die Vermutung erhärtet werden, dass CO₂ die Reaktion negativ beeinflusst.

Eine Reaktionstemperatur von 37°C erwies sich als optimal, was für eine alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm auch zu erwarten war.

Durch diese und weitere Optimierungsschritte konnte ein Immunfärbungsprotokoll für die alkalische Phosphatase entwickelt werden, welches in Sensitivität und Spezifität der heutzutage für lichtmikroskopische Untersuchungen üblichen BCIP/NBT-Technik (McGadey, 1970; Grossrau, 1978; Leary et al, 1983; de Jong et al, 1985) in nichts nachsteht.

Besonders für immunzytochemische Mehrfachmarkierungen auf ultrastruktureller Ebene ist die entwickelte Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik eine große Bereicherung. Mit stark erhöhter Sensitivität gegenüber den Originalmethoden für die Enzymzytochemie stellt die entwickelte Methode einen zusätzlichen immunenzymatischen Marker für Pre-Embedding-Prozeduren dar. Mittels EFTEM kann das Cer-Präzipitat eindeutig identifiziert werden. Das erfolgreiche Etablieren dieser Methode für das elektronenmikroskopische Immunmarkieren ist ein wichtiger Schritt zur Entwicklung von Methoden, um simultan vier oder mehr Antigene in einem Ultradünnschnitt darstellen zu können.

2.4. Eine Antigenquantifizierung mit der Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik scheint möglich

Einige Cer-markierte Tyrosinhydroxylase-positive Neurone schienen in elektronenmikroskopischen Elementverteilungsbildern eine stärkere Immunreaktivität in neuronalen Fortsätzen (wahrscheinlich Dendriten) aufzuweisen als im Perikaryon (Abb. 19). Das weist darauf hin, dass die modifizierte Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode in Verbindung mit EFTEM auch zur Quantifizierung der Antigenkonzentration auf ultrastruktureller Ebene herangezogen werden kann (van Noorden und Jonges, 1987; Jonges et al, 1990; van Noorden und Frederiks, 1993). So könnte über die Konzentration an Cer im Niederschlag auf die Antigenkonzentration in der betrachteten Region des Ultradünnschnittes geschlossen werden. Für solche Untersuchungen wären sowohl quantitatives ESI (Beckers et al, 1996) als auch EELS (Reimer et al, 1992) hervorragend geeignet. Hierzu sind allerdings intensive und langwierige Vorversuche und Kalibrierungsexperimente notwendig, die den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätten.

2.5. Weitere mögliche Marker für eine auf EFTEM basierende Visualisierung

Verschiedene konventionelle immunzytochemische Marker für die Elektronenmikroskopie - wie kolloidales Gold (Haking et al, 1998), Eisen in Form von Ferritin-markiertem Protein A (Abb. 23; Kishida et al, 1975; Beckers et al, 1998) und silberverstärktes Nano-Gold (Abb. 22) - können mit EFTEM elementspezifisch visualisiert werden. Boronierte Zweitantikörper oder Protein A stellen eine weitere Möglichkeit des Markierens für EFTEM dar (Kishida et al, 1975; Bendayan et al, 1989; Qualmann, 1996). Europium (Takalo et al, 1994), Gadolinium (Rebizak et al, 1997) oder Dextran-umhülltes superparamagnetisches Eisenoxid (USPIO; Fig. 20; Lawaczek et al, 1997; Kresse et al, 1998) sowie Nickel als Nickel(II)-Nitrilotriacetylsäure-Glutathion-Gold-Beads (Ni(II)-NTA-GSH-Gold; Fig. 21; Hainfeld et al, 1999) sind weitere Metalle, die sehr gut für EELS und ESI geeignet sind und somit potenzielle Marker für die EFTEM-Immunzytochemie darstellen. Diese zusätzlichen Marker könnten das Repertoire für simultane Mehrfachmarkierungen noch entscheidend vergrößern. Erste Ansätze hierzu sind in der vorliegenden Arbeit gelegt worden.

3. Simultane immunenzymatische Visualisierung von Tyrosinhydroxylase und Serotonin im Bulbus olfaktorius der Ratte

3.1. Immunenzymatische Doppelmarkierung

Für eine immunenzymatische Doppelmarkierung ist es notwendig, dass sich die beiden enzymatischen Reaktionen nicht gegenseitig beeinflussen und stören. Um zu untersuchen, ob diese Voraussetzung bei der Kombination von alkalischer Phosphatase/Cer mit Meerrettichperoxidase/DAB gegeben ist, wurde das monaminerge Transmittersystem des Bulbus olfaktorius (BO) als Modell gewählt. Für dieses System ist bis heute nicht bekannt, ob die aufsteigenden serotoninerger Fasern synaptische Kontakte mit dopaminergen periglomerulären Zellen bilden. Tyrosinhydroxylase-immunpositive periglomeruläre Neurone und Büschelzellen wurden mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für alkalische Phosphatase sowie serotoninerger Axone mit der ABC-DAB/Osmium-Methode für Peroxidase dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden immunenzymatischen Reaktionen zur simultanen Doppelmarkierung eines Gewebsschnittes eingesetzt werden können. Eine gegenseitige Beeinflussung beider Reaktionen konnte ausgeschlossen werden.

3.2. Immunenzymatische Doppelmarkierung des Modellsystems Bulbus olfaktorius

In der glomerulären Schicht des Bulbus olfaktorius der Ratte sind dichte Netzwerke serotoninerger Fasern gefunden worden. Diese, mittels immunzytochemischer Doppelmarkierung als serotoninerg identifizierten aufsteigenden Axone stammen Tracing-Studien zufolge aus den Raphe Nuklei des Mittelhirns (Moore et al, 1978; McLean und Shipley, 1987; Araneda et al, 1989, 1999). Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die serotoninergen Fasern die glomeruläre Schicht des BO massiv innervieren. Serotonin-positive Axone wurden in unmittelbarer Nähe zu dopaminergen periglomerulären Zellen gefunden, was die Etablierung von synaptischen Kontakten zwischen den beiden monaminergen Transmittersystemen als möglich erscheinen ließ. Der größte Teil der serotoninergen Axone in der glomerulären Schicht trug große kugelförmige Varikositäten. Die Segmente zwischen den Varikositäten waren sehr schmal und von unterschiedlicher Länge. Diese Fasern ähnelten somit morphologisch den so genannten M-Typ-Axonen, die hauptsächlich aus dem medialen Raphe Nukleus stammen sollen (Kosofsky und Molliver, 1987). Diese Einteilung ist allerdings nach wie vor umstritten (vgl. Morin und Meyer-Bernstein, 1999).

Die Hinweise auf mögliche synaptische Kontakte zwischen serotoninergen Fasern und periglomerulären Zellen sowie deren Fortsätzen aus den lichtmikroskopischen Untersuchungen konnten auf elektronenmikroskopischem Niveau nicht bestätigt werden. Die Raphe-Axone waren immer in einiger Entfernung zu den periglomerulären Zellen und deren Fortsätzen zu finden. Dieser Abstand lag mindestens im zwei- bis dreistelligen Mikrometerbereich. Tatsächlich konnte in dieser Studie kein synaptischer Kontakt mit irgendeinem neuronalen Element in der glomerulären Schicht des BO gefunden werden.

Diese Ergebnisse weisen auf eine parakrine Freisetzung und Wirkung des Serotonins im BO hin. Diese so genannte „Volume-Transmission“ ist in monaminergen und peptidergen Neurotransmissionssystemen des Zentralnervensystems weit verbreitet (Agnati et al, 1995). So gibt es viele Anhaltspunkte für eine extrasynaptische Freisetzung von Monaminen wie Dopamin in der Substantia nigra (Jaffe et al, 1998) und anderen Regionen des Mittelhirns der Ratte (Cragg et al,

2001). Darüber hinaus sind Rezeptoren und Transporter dieser Transmittertypen in vielen Regionen des Zentralnervensystems großteils extrasynaptisch lokalisiert (Agnati et al, 1995). Zhou et al (1998) beschrieben Serotonintransporter im medialen Vorderhirnbündel und anderen Hirnregionen in Abwesenheit von Synapsen und postulierten in diesem Fall eine „Volume-Transmission“. In vielen Fällen ergeben die Rezeptorexpression und die Transmitterlokalisation sogar eine nicht zueinander passende, so genannte Mismatch-Verteilung im Zentralnervensystem (vgl. z. B. Agnati et al, 1995). Für das serotoninerge System des Nukleus Raphe dorsalis ist sowohl die synaptische als auch die extrasynaptische somatodendritische Freisetzung von Serotonin beschrieben (Chazal und Ralston, 1987). Zahlenmäßig dominiert hier die extrasynaptische Freisetzung.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit legen einen parakrinen Funktionsmodus für Serotonin im Bulbus olfactorius nahe. Es wäre daher denkbar, dass das freigesetzte Serotonin der serotoninergen Axone die Aktivität der Glomerula über „Volume-Transmission“ beeinflusst. Dies kann sowohl für dopaminerge periglomeruläre Zellen als auch für andere neuronale Strukturen der Glomerula gelten.

4. Ausblick

Der methodisch gesetzte Fokus der vorliegenden Studie zeigt, dass die neuartige Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für alkalische Phosphatase eine zusätzliche sensitive Markierungsmethode für die immunenzymatische Licht- und Elektronenmikroskopie darstellt. Somit konnte das Repertoire für die immunenzymatische Markierung auf ultrastruktureller Ebene erheblich erweitert werden. Diese Methode ist mit der üblichen und weit verbreiteten Peroxidase/DAB-Technik kombinierbar. Die beiden Präzipitate können mittels elementspezifischer Visualisierung des Cer-Präzipitates durch Energiefilter-Transmissions-Elektronenmikroskopie (EFTEM) unterschieden werden. Unter Berücksichtigung weiterer, schon etablierter Markierungstechniken ist diese Arbeit als erster Schritt hin zu einer simultanen immunzytochemischen Mehrfachmarkierung von vier und mehr Antigenen in einem Schnitt auf elektronenmikroskopischem Niveau zu sehen.

Auf lichtmikroskopischer Ebene stellt das gelbe Cer(IV)-Phosphohydroperoxid aufgrund des guten Kontrastes zum schwarzen DAB-Produkt der Peroxidase einen hervorragenden Marker für immunzytochemische Kollokalisationsstudien dar. Durch die gesteigerte Sensitivität der Reaktion in enzymhistochemischen Untersuchungen (Abb. 16) könnte diese modifizierte Methode zu neuen Erkenntnissen über die Verteilung und Lokalisation endogener Phosphatasen auf licht- und elektronenmikroskopischem Niveau beitragen. Weitere Vorteile auf ultrastruktureller Ebene, wie mögliche quantitative enzym- und immunzytochemische Untersuchungen mittels der entwickelten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik in Verbindung mit EFTEM werden aufgezeigt und diskutiert. Auch eine Anwendung dieser neuen Methode für In-Situ-Hybridisierungs-Experimente ist denkbar. Mögliche Artefakte, welche während der Markierung, der Einbettungsprozedur und/oder der Nachkontrastierung des Schnittes entstehen, können mittels EFTEM identifiziert und somit von morphologisch ähnlichen Immunmarkierungen unterschieden werden.

Erste Versuche der Doppelmarkierung mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik für alkalische Phosphatase und der Pre-Embedding-Nano-Gold-Silberverstärkungs-Methode waren ebenfalls erfolgreich, so dass auch in diesem Fall die Kombinierbarkeit der Reaktionen bestätigt wurde. So kann in kurzer Zeit mit der Etablierung einer Dreifachmarkierung mittels Peroxidase/DAB-, alkalischer Phosphatase/Cer-Phosphat-H₂O₂- und der Nano-Gold-Silberverstärkungs-Methode

gerechnet werden. Ansätze für die Etablierung weiterer immunzytochemischer Marker, die mit Hilfe vom EFTEM identifiziert werden können, werden in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt. In der Zukunft könnten somit neuronale Erregungskreise mit vier und mehr Markern an einem Ultradünnschnitt untersucht werden.

V. Zusammenfassung

Für das Verständnis der molekularen Funktionsabläufe in neuronalen Erregungskreisen ist die Kenntnis der zellulären und subzellulären Lokalisation von Molekülen der Signaltransduktion an neurochemisch identifizierten Zellen, Zellausläufern und Synapsen erforderlich. Dies verlangt in der Regel eine simultane Visualisierung verschiedener Antigene wie Neurotransmitter, Rezeptoren, Transporter und Ionenkanäle auf ultrastruktureller Ebene. Mit immunzytochemischen Methoden werden Antikörper gegen diese Antigene mit dem Gewebsschnitt inkubiert. Die Sichtbarmachung dieser Erstantikörper wird dann über markierte Zweitantikörper vollzogen. Eine Pre-Embedding-Doppelmarkierung kann mittels Peroxidase als immunenzymatischem Marker in Kombination mit silberverstärktem Nano-Gold als zweitem Label durchgeführt werden. Eine Anwendung von mit kolloidalem Gold markierten Zweitantikörpern mit einer Post-Embedding-Technik auf das Pre-Embedding zweifachmarkierte Gewebe kann ein drittes Label ermöglichen. Viele Antigene enthalten jedoch einbettungssensitive Epitope, die während der Einbettung zerstört und/oder maskiert werden. Dies limitiert die Möglichkeiten der simultanen Mehrfachfärbung auf dem ultrastrukturellen Level stark.

In der vorliegenden Arbeit ist eine immunenzymatische Doppelmarkierungstechnik entwickelt worden, die es erlaubt, immunmarkierte alkalische Phosphatase und Peroxidase simultan in einem Gewebsschnitt zu visualisieren. Immunenzymatische Markierungstechniken bieten den Vorteil einer möglichst großen Verstärkung des Signals und einer daraus resultierenden höheren Sensitivität. Dieses neu erarbeitete Doppelmarkierungsprotokoll stellt somit eine zusätzliche Methode zur Pre-Embedding-Mehrfachmarkierung dar. Die Methode beruht auf der Aktivität von alkalischer Phosphatase, welche durch das Freisetzen von anorganischem Phosphat im Reaktionspuffer vorhandenes Cerium(III) niederschlägt (Cer-H₂O₂-Technik). In Kombination mit der heutzutage üblichen Peroxidase/Diaminobenzidin (DAB)-Methode können lichtmikroskopisch zwei Präzipitate differenziert werden. Das gelbe Cerium(IV)-Phosphohydroperoxid der modifizierten Cer-H₂O₂-Technik steht in gutem Kontrast zum schwarzen DAB-Produkt der Peroxidase-Reaktion. Eine Unterscheidung der beiden elektronendichten Reaktionsprodukte im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurde mit Hilfe

einer elementspezifischen Visualisierung des Ceriums im Präzipitat der alkalischen Phosphatase mittels Energiefilter-Transmissions-Elektronenmikroskopie (EFTEM) möglich.

Im Modellgewebe, dem Bulbus olfaktorius (BO) aus dem Gehirn der Ratte, wurden dopaminerge Neurone immunzytochemisch mit der neuen Cer-H₂O₂-Technik sowie aufsteigende serotoninerge Fasern mit der Peroxidase/DAB Methode im BO markiert. Dabei konnten keine synaptischen Kontakte zwischen serotoninergen Axonen und dopaminergen periglomerulären Zellen gefunden werden, was auf eine parakrine Transmission hinweist.

Des Weiteren stellt das gelbe Cerium(IV)-Phosphohydroperoxid der modifizierten Cer-H₂O₂-Technik aufgrund des guten Kontrastes zum schwarzen DAB-Produkt der Peroxidase einen hervorragenden Marker für lichtmikroskopische Kollokalisationsstudien dar. Auch weitere Vorteile auf ultrastrukturellem Niveau - wie eine mögliche Identifizierung von Artefakten - sowie Ansätze für mögliche neue Anwendungsgebiete - wie quantitative enzym- und immunzytochemische Untersuchungen - mittels EFTEM werden aufgezeigt und diskutiert.

Diese neue Methode erweitert die Zahl und verbessert die Möglichkeiten von Mehrfachmarkierungen auf elektronenmikroskopischem Niveau. Sie stellt einen weiteren Schritt zur Entwicklung von Techniken für die simultane Visualisierung von mehr als drei Antigenen in einem Schnitt auf ultrastruktureller Ebene dar. Erste Versuche einer simultanen Mehrfachmarkierung mit der für alkalische Phosphatase entwickelten Cer-H₂O₂-Methode und der Nano-Gold-Silberverstärkungs-Technik für die Elektronenmikroskopie waren sehr erfolgreich. Weitere mögliche immunzytochemische Marker werden für den Einsatz in der energiefilternden Elektronenmikroskopie vorgestellt und getestet. So könnten in der Zukunft schon bald neuronale Erregungskreise mit mehr als vier Markierungen ultrastrukturell untersucht werden.

VI. Anhang

1. Literaturverzeichnis

Agnati LF, Zoli M, Strömberg I, Fuxe K (1995) Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience* 69:711-726

Akagi T, Hashikawa T, Hirai K, Motelica-Heino I, Tsuji S (2000) Electron spectroscopic imaging (ESI) of cobalt ions responsible for the blockade of synaptic transmission and excitability of muscle cells in frog neuromuscular preparations. *Proc Japan Acad* 76:7-11

Araneda S, Magoul R, Calas A (1989) Tracing specific transmitter pathways in the rat CNS: combination of [3H]serotonin retrograde labelling with immunocytochemical detection of endogenous transmitters. *J Neurosci Meth* 30:211-218

Araneda S, Gysling K, Calas A (1999) Raphe serotonergic neurons projecting to the olfactory bulb contain galanin or somatostatin but not neurotensin. *Brain Res Bull* 49:209-214

Araki N, Yokota S and Takashima (1993) The cerium-based method is advantageous in combination of phosphatase enzyme cytochemistry with post-embedding immunocytochemistry. *Acta Histochem Cytochem* 26:569-576

Beckers AL, Gelsema ES, de Bruijn WC, Celton-Soeteman MI, Van Eijk HG (1996) Quantitative electron spectroscopic imaging in bio-medicine: evaluation and application. *J Microsc* 183:77-88

Beckers AL, de Bruijn WC, Jongkind JF, Celton-Soeteman MI, Apkarian RP, Gelsema ES (1998) Energy-filtering transmission electron microscopy as a tool for structural and compositional analysis of isolated ferritin particles. *Scanning Microsc Suppl* 8:261-275

Behringer DM, Meyer KH, Veh RW (1991) Antibodies against neuroactive amino acids and neuropeptides. II. Simultaneous immunoenzymatic double staining with labeled primary antibodies of the same species and a combination of the ABC method and the hapten-antihapten-bridge (HAB) technique. *J Histochem Cytochem* 39:761-770

Berkowicz DA, Trombley PQ (2000) Dopaminergic modulation at the olfactory nerve synapse. *Brain Res* 855:90-99

Bendayan M, Barth RF, Gingras D, Londono I, Robinson PT, Alam F, Adams DM, Mattiazzi L (1989) Electron spectroscopic imaging for high-resolution immunocytochemistry: use of boronated protein A. *J Histochem Cytochem* 37:573-580

Bondi A, Chierigatti G, Eusebi V, Fulcheri E, Bussolatti G (1982) The use of β -Galactosidase as a tracer in immunocytochemistry. *Histochem* 76:153-158

Bretaudiere JP and Spillman T (1984) Alkaline Phosphatases. In Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M, eds. *Methods of Enzymatic Analysis, Vol IV, Enzymes 2: Esterrases, Glycosidases, Lyases, Ligases*. Weinheim, Verlag Chemie, 75-92

Burry RW, Vanré DD and Hayes DM (1992) Silver enhancement of gold antibody probes in pre-embedding electron microscopic immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 40:1849-1856

Cappelet-Tordo D, Fosset M, Iwatsubo M, Gache C, Lazdunski M (1974) Intestinal alkaline phosphatase. Catalytic properties and half of the sites reactivity. *Biochemistry* 13:1788-1795

Chayen J, Bitensky L, Butcher RG (1975) *Histochemie. Grundlagen und Methoden.* Verlag Chemie, Weinheim, p. 53

Chazal G, Ralston HJ 3rd (1987) Serotonin-containing structures in the nucleus raphe dorsalis of the cat: an ultrastructural analysis of dendrites, presynaptic dendrites, and axon terminals. *J Comp Neurol* 259:317-329

Cleton MI, Mosert LJ, Sorber LW, de Jong AA, de Jeu-Jaspars CM, de Bruijn WC (1989) Effect of phlebotomy on ferritin iron content in the rat liver as determined morphometrically with the use of electron energy loss spectroscopy. *Cell Tissue Res* 256:601-605

Cordell JL, Falini B, Erber W, Ghosh A, Abdulaziz Z, Macdonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY (1984) Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32:219-229

Cragg SJ, Nicholson C, Kume-Kick J, Tao L, Rice ME (2001) Dopamine-mediated volume transmission in midbrain is regulated by distinct extracellular geometry and uptake. *J Neurophysiol* 85: 1761-1771

De Bruijn WC, Sorber ES, Gelsema ES, Beckers ALD, Jongkind JF (1993) Energy-filtering transmission electron microscopy of biological specimens. *Scanning Microscopy* 7:693-709

De Jong ASH, van Kessel-van Vark M, and Raap AK (1985) Sensitivity of various visualisation methods for peroxidase and alkaline phosphatase in immunoenzyme histochemistry. *Histochem J* 17:1119-1130

Erhard H, Rietveld FJ, Brocker EB, de Waal RM, Rüter DJ (1996) Phenotype of normal cutaneous microvasculature. Immunoelectron microscopic observations with emphasis on the differences between blood vessels and lymphatics. *J Invest Dermatol* 106:135-140

Eulitz D (2000) Dopaminerge Neurone im motorischen und limbischen Mesencephalon unterscheiden sich in ihrer Ausstattung mit Kir3-Kanälen. Dissertation im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

Fernely HN (1971) Mammalian Alkaline Phosphatases. *The Enzymes* (Boyer PD, Editor), Academic Press New York, 4:417-447

Getchel TV, Shepherd GM (1975a) Short-axon cells in the olfactory bulb: dendrodendritic synaptic interaction. *J Physiol* 251:523-548

Getchel TV, Shepherd GM (1975b) Synaptic actions on mitral and tufted cells elicited by olfactory nerve volleys in the rabbit. *J Physiol* 251:497-522

Grossrau R (1978) Tetrazoliummethoden zum histochemischen Hydrolasennachweis. *Histochemistry* 58:203-218

Grumbach IM and Veh RW (1995) A new ABC procedure for detection of antigens at increased sensitivity. *J Histochem Cytochem* 43:31-37

Hainfeld JF, Liu Wenqiu, Halsey CMR, Freimuth P, Powell RD (1999) Ni-NTA-gold clusters target His-tagged proteins. *J Struct Biol* 127:185-198

Haking A, Troester H, Richter K, Burzlaff A, Spring H, Trendelenburg MF (1998) Heavy metal contrast enhancement for the selective detection of gold particles in electron microscopical sections using electron spectroscopic imaging. *Bioimaging* 6:130-137

Halbhuber KJ, Schulze M, Rohde H, Bublitz R, Feuerstein H, Walter M, Linss W, Meyer HW, Horn A (1994), Is the brush border membrane of the intestinal mucosa a generator of "chymosomes"? *Cell Mol Biol* 40:1077-1096

Halbhuber KJ, Feuerstein H, Möller U, Klinger M (1992) Modified cerium-based and Gomori-based cerium methodes for light microscopic phosphatase histochemistry: The cerium-perhydroxide-diaminobenzidine-nickel (Ce-H₂O₂-DAB-Ni and Ce/Ce-H₂O₂-DAB-Ni) two-step procedure. *Acta Histochem* 92:87-103

Hendzel MJ and Bazett-Jones DP (1996) Probing nuclear ultrastructure by electron spectroscopic imaging. *J Microsc* 182:1-14

Hulstaeret CE, Halbhuber KJ and Kalicharan D (1992) Electron microscopical demonstration of alkaline phosphatase activity with the cerium-based method in citrate-containing medium at pH 9.3 and the influence of glutaraldehyde fixation. *Cell Mol Biol* 38:545-552

Huxham IM, Gaze MN, Workman P, Mairs RJ (1992) The use of parallel EEL spectral imaging and elemental mapping in the rapid assessment of anti-cancer drug localisation. *J Microsc* 166:367-380

Jaffe EH, Marty A, Schulte A, Chow RH (1998) Extrasynaptic vesicular transmitter release from the somata of substantia nigra neurons in rat midbrain slices. *J Neurosci* 18:3548-3553

Jonges GN, van Noorden CJF and Gossrau R (1990), Quantitative histochemical analysis of glucose-6-phosphatase activity in rat liver using an optimized cerium method. *J Histochem Cytochem*

Kishida Y, Olson BR, Berg RA, and Prockop DJ (1975) Tow improved methodes for preparing ferritin-protein conjugates for electron microscopy. *J Cell Biol* 64:331-339

Kosaka T, Nagatsu I, Wu JY, Hama K (1986) Use of high concentrations of glutaraldehyde for immunocytochemistry of transmitter-synthesizing enzymes in central nervous system. *Neuroscience* 18:975-990

Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T (1998) How simple is the organisation of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res* 30:101-110

Kosofsky BE, Molliver ME (1987) The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1:153-168

Kresse M, Wagener S, Pfefferer D, Lawaczeck R, Elste V, Semmler W (1998) Targeting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles to tumor cells in vivo by using transferring receptor pathways. *Magn Reson Med* 40 (2):236-242

Laube G, Röper J, Pitt JC, Swing S, Kistner U, Garner CC, Pongs O, Veh RW (1996) Ultrastructural localization of shaker-related potassium channel subunits and synapse-associated protein 90 to septate-like junctions in rat cerebellar Pinceaux. *Brain Res Mol Brain Res* 42:51-61

Lawaczeck R, Bauer H, Frenzel T, Hasegawa M, Ito Y, Kito K, Miwa N, Tsutsui H, Vogler H and Weinmann H-J (1997), Magnetic iron oxide particles coated with carboxydextran for parental administration and liver contrasting –Pre-Clinical Profile of SH U555A-. *Acta Radiologica* 38:584-597

Leapman RD (1986) Quantitative electron energy loss spectroscopy and elemental mapping in biology. *Microbeam Analysis—1986*:187-92

Leapman RD and Hundt JA (1995) Compositional imaging with electron energy loss spectroscopy. *J Microsc Soc Am* 1:93-108

Leapman RD, Gallant PE, Reese TS, Andrews SB (1997) Phosphorylation and subunit organization of axonal neurofilaments determined by scanning transmission electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7820-7824

Leary JJ, Brigati DJ, Ward DC (1983) Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-Blots. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4045-4049

Levy AI, Bolam JP, Rye DB, Hallanger AE, Demuth RM, Mesulam M-M, and Wainer BH (1986) A light and electron microscopic procedure for sequential double Antigen localization using diaminobenzidine and benzidine dihydrochlorid. *J Histochem Cytochem* 34:1449-1457

Martin R, Door R, Ziegler A, Warchol W, Hahn J, Breitig D (1999) Neurofilament phosphorylation and axon diameter in the squid giant fibre system. *Neuroscience* 88:327-336

Martone ME, Armstrong DM, Young SJ, Groves PM (1992) Ultrastructural examination of enkephalin and substance P input to cholinergic neurons within the rat neostriatum. *Brain Res* 594:253-262

McGadey J (1970) A Tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie* 23:180-184

McLean JH, Shipley MT (1987) Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: I. Origins and laminar specificity of serotonergic inputs in the adult rat. *J Neurosci* 7:3016-3028

Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-686

Moore RY, Halaris AE, Jones BE (1978) Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *J Comp Neurol* 180:417-38

Morin LP, Meyer-Bernstein EL (1999) The ascending serotonergic system in the hamster: comparison with projections of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuroscience* 91:81-105

Qualmann B, Kessels MM, Klobasa F, Jungblut PW, Sierralta WD (1996) Electron spectroscopic imaging of antigens by reaction with boronated antibodies. *J Microsc* 183:69-77

Rebizak R, Schaefer M, Dellacherie É (1997) Polymetric Conjugates of Gd³⁺-diethylenetriaminepentaacetic acid and dextran. 1. Synthesis, Characterization, and Paramagnetic Properties. *Bioconjugate Chem* 8:605-610

Reimer L, Zepke U, Moesch J, Schulze-Hillert St, Ross-Messemer M, Probst W, Weimer E (1992) EELSpectroscopy. A Reference Handbook of Standard Data for Identification and Interpretation of Electron Energy Loss Spectra and for Generation of Electron Spectroscopic Images, Oberkochen, p. 27

Reynolds ES (1963), The use of lead citrat at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-212

Robinson JM and Karnovsky MJ (1983) Ultrastructural localisation of several phosphatases with cerium. *J Histochem Cytochem* 31:1197-1208

Robinson JM and Batton BE (1990) Localisation of cerium-based reaction products by scanning laser reflectance confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 38:315-318

Shepherd GM (1963) Responses of mitral cells to olfactory nerve volleys in the rabbit. *J Physiol* 168:89-100

Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG (1970) Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase- antihorseradish peroxidase) and its use in identification of Spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18:315-333

Straus W (1982), Imidazole increases the sensitivity of the cytochemical reaction for peroxidase with diaminobenzidine at neutral pH. *J Histochem Cytochem* 30:491-493

Su-Ming HSU, Raine L and Fanger H (1981), Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29:577-580

Takalo H, Mikkala VM, Mikola H, Liitti P, Hemmilä I (1994) Synthesis of Europium(III) chelates suitable for labeling of bioactive molecules. *Bioconjugate Chem* 5:278-282

Thomzig A, Wenzel M, Karschin C, Eaton MJ, Skatchkov SN, Karschin A, Veh RW (2001) Kir6.1 is the principal pore-forming subunit of astrocyte but not neuronal plasma membrane K-ATP channels. *Mol Cell Neurosci* 18:671-690

Trojanowski JQ, Obrocka MA, Lee VM (1983) A comparison of eight different chromogen protocols for the demonstration of immunoreactive neurofilaments or glial filaments in rat cerebellum using the peroxidase-antiperoxidase method and monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 31:1217-1223

Van Dort JB, Ketlaars GAM, Daems WTh, and de Bruijn (1989) Ultrastructural electron probe X-ray microanalytical reaction product identification of three different enzymes in the same mouse resident peritoneal macrophage. *Histochemistry* 92:243-53

Van Goor H, Gerrits PO, Hardonk MJ (1989) Enzyme histochemical demonstration of alkaline phosphatase activity in plastic-embedded tissues using a gomori-based cerium-DAB technique. *J Histochem Cytochem* 37:399-403

Van Noorden CJF and Jonges GN (1987) Quantification of the histochemical reaction for alkaline phosphatase activity using the indoxyl-tetranitro BT method. *Histochemical Journal* 19:94-102

Van Noorden CJF and Frederiks WM (1993) Cerium methods for light and electron microscopical histochemistry. *J of Microscopy* 171:3-16

Wenzel HJ, Buckmaster PS, Anderson NL, Wenzel ME and Schwartzkroin PA (1997) Ultrastructural Localisation of neurotransmitter immunoreactivity in mossy cell axons and their synaptic targets in the rat dentate gyrus. *Hippocampus* 7:559-570

Wenzel HJ, Woolly CS, Robbins CA and Schwartzkroin PA (2000) Kainic acid-induced mossy fiber sprouting and synapse formation in the dentate gyrus of rats. *Hippocampus* 10:244-260

Wilchek M and Bayer EA (1990a) Introduction to Avidin-Biotin Technology. *Methods in Enzymology* 184:5-13

Wilchek M and Bayer EA (1990b) Applications of Avidin-Biotin Technology: Literature Survery. *Methods in Enzymology* 184:15-45

William HF and Ghosh NK (1964) Isoenzymes of Human Alkaline Phosphatase. *Advances in Clinical Chemistry* 10:255-370

Zhou FC, Tao-Cheng JH, Segu L, Patel T, Wang Y (1998) Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Res* 805:241-254

2. *Abbildungsverzeichnis*

- Abb. 1 Schematische Darstellung immunzytochemischer Markierungen.
- Abb. 2 Schematische Darstellung von Streuungsarten im Elektronenmikroskop.
- Abb. 3 Elektronenmikroskopische Abbildungen (konventionell und energiefilternd).
- Abb. 4 Energieverlustspektrum (EELS) beispielhaft für einen Eisenoxidfilm (aus Reimer et al, 1992).
- Abb. 5 Enzymzytochemische Darstellung endogener alkalischer Phosphatase mit BCIP/NBT und der konventionellen Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode (Halbhuber et al, 1994).
- Abb. 6 Kresylviolett-färbung des Bulbus olfaktorius der Ratte
- Abb. 7 Immunzytochemischer Vergleich der BCIP/NBT-Technik mit der konventionellen Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode (Halbhuber et al, 1994).
- Abb. 8 Vergleich verschiedener Substrate für die alkalische Phosphatase in der Immunzytochemie.
- Abb. 9 Abhängigkeit der alkalischen-Phosphatase-Aktivität vom Puffersystem.
- Abb. 10 Immunzytochemischer Vergleich der Aktivität von alkalischer Phosphatase mit den beiden Puffersystemen Tricin-Diethanolamin und Tricin.
- Abb. 11 Abhängigkeit der alkalischen-Phosphatase-Reaktion bei verschiedenen pH-Werten.
- Abb. 12 Biochemische und immunzytochemische Untersuchung des Einflusses der Cer-Konzentration und des Kofaktors Mg²⁺ auf die alkalische-Phosphatase-Reaktion.

- Abb. 13 Einfluss der Zugabe von Saccharose zum Puffer auf die alkalische-Phosphatase-Reaktion.
- Abb. 14 Einfluss von gelöstem Carbonat auf die alkalische-Phosphatase-Visualisierung.
- Abb. 15 Gesteigerte Sensitivität der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode in der Immunzytochemie.
- Abb. 16 Gesteigerte Sensitivität der Darstellung endogener alkalischer Phosphatase mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Methode.
- Abb. 17 Simultane immunenzymatische Visualisierung von Tyrosinhydroxylase und Serotonin im Bulbus olfaktorius auf lichtmikroskopischem Niveau.
- Abb. 18 Immunenzymatische Visualisierung von Tyrosinhydroxylase mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik auf elektronenmikroskopischem Niveau.
- Abb. 19 Visualisierung des Cer-Präziptates mittels Electron Spectroscopic Imaging (ESI).
- Abb. 20 Immunenzymatische Doppelmarkierung mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik und Peroxidase-DAB/Os auf elektronenmikroskopischem Niveau.
- Abb. 21 Immunenzymatische Doppelmarkierung mit der modifizierten Cer-Phosphat-H₂O₂-Technik und Peroxidase-DAB/Os auf ultrastruktureller Ebene mittels ESI.
- Abb. 22 Immunzytochemischer Nachweis von silberverstärkten Nano-Gold-Antikörpern mit EFTEM.
- Abb. 23 Immunzytochemischer Nachweis von Ferritin-markierten Antikörpern mit EFTEM.
- Abb. 24 Dextran-umhülltes Eisenoxid als möglicher Marker für EFTEM-Immunzytochemie.

-
- Abb. 25 Nickel(II)-Nitrilotriacetylsäure-Glutathion-Gold-Kolloide (Ni(II)-NTA-GSH-Gold) als potenzieller Marker für EFTEM-Immunzytochemie.
- Tab. 1 Chemie der immunzytochemischen Markierung mit Cer durch alkalische Phosphatase (modifiziert nach Halbhuber et al, 1992).
- Tab. 2a Lösungen für das entwickelte Doppelmarkierungsprotokoll.
- Tab. 2b Das entwickelte Doppelmarkierungsprotokoll für alkalische Phosphatase und Peroxidase.

3. Abkürzungsverzeichnis

ΔE	Energiedifferenz
A	Avidin
a-5HT	polyklonaler Anti-Serotonin-Antikörper
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AG	Antigen
Ag	Silber
aP	alkalische Phosphatase
aP-HaM	alkalische-Phosphatase-markierter Pferd-anti-Maus-Antikörper
a-TH	monoklonaler Anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörper
Au	Gold
Au-GaR	Nano-Gold Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper
AZM	Außenzone des Marks der Niere
B	Biotin
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indiolphosphat
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3-Indiolphosphat/Nitro-Blue-Tetrazolium
B-GaR	biotinylierter-Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper
B-HaM	biotinylierter-Pferd-anti-Maus-Antikörper
BO	Bulbus olfaktorius
BSA	Rinder-Serum-Albumin (Bovine Serum Albumine)
BSA-C	carboxymethyliertes Rinder-Serum-Albumin
Ce	Cer / Cerium
CO ₂	Kohlendioxid

D	Dalton
DAB	3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DDSA	2-Dodecenylderivateinsäureanhydrid
DEA	Diethanolamin
Diaminobenzidin	3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochloriddihydrat
DMP-30	2,4,6,-Tris(Dimethylaminomethyl)phenol
DVS	Divinylsulfon
E	Enzym
E_0	Ausgangsenergie
EDX	Energy Dispersive X-Ray
EELS	Electron Energy Loss Spectroscopy
EFTEM	Energy Filtered Transmission Electron Microscopy
ELISA	Enzyme Linked Immuno Essay
EPS	externe plexiforme Schicht des Bulbus olfaktorius
ER	Erythrozyten
E_{res}	resultierende Energie
ESI	Electron Spectroscopic Imaging
eV	Elektronenvolt
Fe	Eisen
GABA	γ -Aminobuttersäure
GS	glomeruläre Schicht des Bulbus olfaktorius
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Hochkontrastbild
HE	Hepatozyt

IE	internationale Einheit
IPS	innere plexiforme Schicht des Bulbus olfaktorius
IZM	Innenzone des Marks der Niere
keV	Kilo-Elektronenvolt
k_m -Wert	Michaeliskonstante
KS	Kupfersche Sternzelle
kTEM	konventionelle Transmissionselektronenmikroskopie
KZS	Körnerzellschicht des Bulbus olfaktorius
Mac	Macintosh Computer von Apple
Mg	Magnesium
MP	Markpapille der Niere
MZS	Mitralzellschicht des Bulbus olfaktorius
Na	Natrium
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
NGS	Ziegenserum (Normal Goat Serum)
Ni	Nickel
Ni(II)-NTA- GSHgold	Nickel(II)-Nitrilotriacetylsäure-Glutathion-Gold-Beads
NOS	Schicht des Nervus olfaktorius
O	Sauerstoff
O	O-Elektronenschale
Os	Osmium
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PB	Phosphat-Puffer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)

PBS-A	Rinder-Serum-Albumin in Phosphate Buffered Saline
PC	Personalcomputer
pK _a	Dissoziationskonstante der Säure
R	Nierenrinde
S	Schwefel
SA-aP	Streptavidin-alkalische-Phosphatase
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-Buffered-Saline)
TBS-X	Triton-X-100 in Tris-Buffered-Saline
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tricin	N-[Tris-(Hydroxymethyl)-Methyl]-Glycin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
USPIO	Dextran-umhülltes superparamagnetisches Eisenoxid
W ₁	erstes Energiefenster vor der Ionisationskante
W ₂	zweites Energiefenster vor der Ionisationskante
W _{max}	Energiefenster bei maximaler Ionisierungsenergie (Ionisationskante)

Alle nicht aufgeführten Größen und deren Einheiten entsprechen dem SI-System (System International D`Unites) oder den DIN-Abkürzungen der deutschen Sprache.

4. Publikationen zum Thema der Arbeit

4.1. Veröffentlichung

Christoph Radcke, Thomas Stroh, Florian Dworkowski, and Rüdiger W. Veh
“Specific Visualisation of Precipitated Cerium by Energy Filtered Transmission Electron Microscopy (EFTEM) for Detection of Alkaline Phosphatase in Immunoenzymatic Double Labeling of Tyrosine Hydroxylase and Serotonin in the Rat Olfactory Bulb” April 2002 eingereicht bei Histochemistry and Cell Biology.

4.2. Posterbeitrag

C. Radcke, F. Dworkowski, and R.W. Veh, “Simultaneous Electron Microscopic Visualisation of Immunophosphatase and Immunoperoxidase with aid of Energy Filtered Transmission Electron Microscopy”. 17. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg (27.09 bis 29.09.2000).

Veröffentlicht in: Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft - Annals of Anatomy - (2001)183: 276.

5. Lebenslauf

Name	Radcke
Vorname	<u>Christoph</u> Alexander
Anschrift	Neumannstraße 114 13189 Berlin
Telefon	030 / 4710388
E-Mail	radcke@wita.de, christoph.radcke@t-online.de
Geburtsdatum	26.09.1968
Geburtsort	Nauen
Staatsangehörigkeit	Deutschland
Familienstand	verheiratet

- Akademischer Werdegang**
 (umgekehrt chronologisch)

Seit Jan. 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der WITA GmbH.
Aug. 1998 - Jan. 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitätsklinikum Charité, Institut für Anatomie, AG. Elektronenmikroskopie und molekulare Neuroanatomie.
Okt. 1999 - Jan. 2001	Assoziiertes Mitglied im Graduiertenkolleg 238 „Schadensmechanismen im Nervensystem - Einsatz bildgebender Verfahren“.
April 1993 - Juli 1998	Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Berlin (Abschluss Gut).
Jan. 1997 - Mai 1998	Forschungsprojekt für die Novo Nordisk Ferment AG / Schweiz.
Okt. 1990 - April 1993	Studium der Lebensmitteltechnologie bis Abschluss des Vordiploms (Gut) an der Humboldt Universität zu Berlin.
Sept. 1989 - Sept. 1990	Hochschulreife im zweiten Bildungsweg an der Technischen Hochschule Köthen.

- Ausbildung / Beruf**
 (umgekehrt chronologisch)

Mai 1989 - Aug. 1989	Spirituosenfacharbeiter bei der Firma Schilkin Berlin.
Nov. 1987 - April 1989	Wehrdienst.
Juli 1987 - Nov. 1987	Spirituosenfacharbeiter bei der Firma Schilkin Berlin.
Juni 1987 - Juli 1987	Facharbeiter in der Kelterei Lockwitzgrund Dresden.
Sept. 1985 - Mai 1987	Berufsausbildung zum Facharbeiter für Obst- und Gemüseverarbeitung spez. Getränke in der Kelterei Lockwitzgrund Dresden mit vorzeitigem Abschluss.
Sept. 1975 - Juli 1985	10-klassige polytechnische Oberschule in Berlin.

6. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med. Rüdiger W. Veh für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die Betreuung und die weit über das übliche Maß hinausgehende Ausbildung auf neuroanatomischem, histologischem und immunologischem Gebiet. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl möchte ich für die Übernahme des Themas meiner Dissertation und die Betreuung an der Technischen Universität Berlin danken. Dr. Thomas Stroh gilt besonderer Dank für die wissenschaftliche Hilfe, das zeitraubende Durcharbeiten des Manuskriptes und die daraus folgenden fruchtbaren Diskussionen für die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit. Die Einarbeitung in immunzytochemische und histologische Fragestellungen auf elektronenmikroskopischem Niveau sowie das Erörtern wissenschaftlicher Probleme mit Dr. Mareike Wenzel waren mir eine große Hilfe. Ohne die hervorragende technische Unterstützung von Florian Dworkowski bei der Erarbeitung der Methode hätte die vorliegende Arbeit den Zeitrahmen bei weitem gesprengt. Besonders möchte ich Herrn Gerd Schlapa für die technische Hilfe am Elektronenmikroskop danken. Petra Loge und Heike Heilmann haben durch ihre technische Unterstützung und Annett Kaphahn durch ihre Teamassistenz einen großen Anteil am Gelingen der Arbeit. Das Lesen des Manuskriptes durch Dr. Andreas Brune und Dr. Angelika Görzen und das sprachliche Durcharbeiten des Manuskriptes durch Alina Kanitz waren mir eine sehr große Hilfe. Vielen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter der AG Elektronenmikroskopie und molekulare Neuroanatomie des Anatomischen Institutes der Charité.

7. Erklärungen an Eides statt

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Technischen Universität vom 36.06.1996 (Dr.-Ing.) bekannt ist.

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbstständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Veröffentlichungen von irgendwelchen Teilen der vorliegenden Dissertation sind von mir wie in Kapitel VI.4. „*Publikationen zum Thema der Arbeit*“ vorgenommen worden.

Weiter erkläre ich, dass ich nicht schon anderweitig einmal die Promotionsabsicht angemeldet oder ein Promotionsverfahren beantragt habe.

Christoph Radcke