

Oliver von Bohlen und Halbach und Rolf Dermietzel

# Methoden der Neurohistologie

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin

# Inhalt

Danksagung 11

**1. Einführung 13**

**2. Das Mikroskop 15**

- 2.1 Optische Einrichtungen (Linsensysteme) 16
  - 2.1.1 Okulare 16
  - 2.1.2 Zeichenokulare 16
  - 2.1.3 Objektive 17
  - 2.1.4 Numerische Apertur und Auflösungsvermögen 18
- 2.2 Mikroskopische Verfahren 18
  - 2.2.1 Fluoreszenzmikroskopie 18
  - 2.2.2 Phasenkontrastverfahren 20
  - 2.2.3 Interferenzphasenkontrast 20
- 2.3 Einstellung der Beleuchtung 21
- 2.4 Literatur 22

**3. Fixierung von Gewebe 23**

- 3.1 Die Fixierung 23
- 3.2 Fixierlösungen 25
- 3.3 Ethanol- oder Acetonfixierung 26
- 3.4 Fixiermethoden 27
  - 3.4.1 Immersionsfixierung 27
  - 3.4.2 Perfusionsfixierung 27

**4. Entwässern und Wässern von Präparaten 29**

**5. Puffersysteme 31**

**6. Schnittechniken 33**

- 6.1 Vibratomschnitte 33
  - 6.1.1 Agar-Agar-Einbettung 34
- 6.2 Gefrierschnitte 34
- 6.3 Kryostatschnitte 35
- 6.4 Paraffinschnitte 36
- 6.5 Kunststoffschnitte 38

- 6.5.1 Kunststoffeinbettung für immunhistologische Präparate 38
- 6.5.2 Kunststoffeinbettung für Semidünnschnitte 39
- 6.6 Messerarten 41

**7. Objektträger 43**

**8. Allgemeine Färbemethoden in der Histologie 47**

- 8.1 Generelle Zellfärbungen 47
  - 8.1.1 Hämalalaun-Eosin-Färbung 47
  - 8.1.2 Azanfärbung 48
  - 8.1.3 Bindegewebsfärbung nach Goldner 50
  - 8.1.4 Papanicolau 52

**9. Methoden der Neurohistologie 53**

- 9.1 Das Neuron 55
- 9.2 Stütz- und Nahrungewebe (Glia) 59
- 9.3 Informationsübertragung 60
  - 9.3.1 Elektrische Prozesse 60
  - 9.3.2 Funktionelle Morphologie des Axons 61
  - 9.3.3 Interaktionen zwischen Zellen 62
- 9.4 Literatur 63

**10. Allgemeine Färbemethoden in der Neurohistologie 65**

- 10.1 Nisslfärbungen 65
  - 10.1.1 Nisslfärbung mit Kresylviolett 65
  - 10.1.2 Nisslfärbung mit Thionin/Toluidinblau 67
- 10.2 Färbung von Neuriten 67
  - 10.2.1 Luxolblaufärbungen 68
  - 10.2.2 Klüver-Barrera-Färbung 69
- 10.3 Silberimprägnationen 70
  - 10.3.1 Modifizierte Bielschowsky-Färbung für die Zellkörper- und Faserfärbung 71
  - 10.3.2 Gallyas-Silberimprägnation 72
  - 10.3.3 Neurofibrillenfärbung nach Bodian 74
  - 10.3.4 Fink-Heimer-Färbung 74
  - 10.3.5 Silber/Gold/Osmium-Imprägnation (nach Fritsch und Zakon) 76
  - 10.3.6 Golgi-Färbungen 78
- 10.4 Acetylcholinesterase-(AChE-)Färbung 80
- 10.5 Literatur 81

**11. Tracing mit lichtstabilen Farbstoffen 83**

- 11.1 Meerrettich-Peroxidase-(HRP-)Methode 84

- 
- 11.2 *Phaseolus vulgaris*-Leucoagglutinin (PHA-L) 87
  - 11.3 Biotinyliertes Dextranamin (BDA) 88
  - 11.3.1 DAB-Reaktion mit dem ABC-Kit 90
  - 11.3.2 Nickel-Kobalt-Intensivierung 91
  - 11.3.3 Glucose-Oxidase-Technik 93
  - 11.3.4 Iontophoretische Applikation 93
  - 11.4 Cholera toxin Untereinheit B (CtB) 93
  - 11.5 Biocytin, Neurobiotin® 96
  - 11.5.1 Applikationsarten 98
  - 11.5.2 Histologische Aufarbeitung der Präparate 99
  - 11.6 Kobalt-Markierung 100
  - 11.6.1 Kobalt[II]-Lysin-Färbung 101
  - 11.6.2 Kobalt[III]-Lysin-Färbung 102
  - 11.6.3 Intensivierung der Kobalt-Lysin-Färbung 103
  - 11.6.4 Iontophoretische Applikation 105
  - 11.7 Literatur 105
  
  - 12. Tracing mit fluoreszierenden Farbstoffen 107**
  - 12.1 Fluoreszenzgekoppelte Dextranamine 108
  - 12.1.1 Anwendung 109
  - 12.1.2 Iontophoretische Applikation 110
  - 12.1.3 Mehrfachapplikationen 110
  - 12.1.4 Auswertung 111
  - 12.2 FluoroGold 111
  - 12.2.1 Iontophoretische Applikation 112
  - 12.2.2 Mehrfachapplikationen 113
  - 12.3 Fluoreszenzgekoppelte Beads 113
  - 12.4 Farbstoffe der Carbocyanin-Familie 114
  - 12.4.1 Einsatz am fixierten Gewebe 115
  - 12.4.2 Auswertung 116
  - 12.5 Lucifer Yellow 116
  - 12.5.1 Injektion in lebendes Gewebe 117
  - 12.6 Konversion in lichtstabile Produkte 117
  - 12.6.1 Photokonversion 117
  - 12.6.2 Photokonversion von Lucifer Yellow 119
  - 12.6.3 Konversion mittels Antikörper (für FDA) 119
  - 12.7 DAPI 121
  - 12.8 Literatur 121
  
  - 13. Druckapplikationen und *in vitro*-Ansätze 123**
  - 13.1 Druckapplikationen 123
  - 13.2 *In vitro*-Ansätze für die Tracer 124
  - 13.3 Literatur 127

- 14. Immunhistochemische Methoden 129**
  - 14.1 Direkte und indirekte Nachweismethoden 130
    - 14.1.1 Direkte Methode 130
    - 14.1.2 Indirekte Methode 130
    - 14.1.3 Immunfluoreszenz 131
    - 14.1.4 Unkonjugierte Antikörper-Enzym-Brücken-Methode 131
    - 14.1.5 Konjugierte Antigen-Methode 132
      - 14.1.5.1 Biotin-(Strept-)Avidin-Methode 132
    - 14.1.6 Immunogold-Markierung 133
    - 14.1.7 Sensitivität der Nachweisreaktionen 133
    - 14.1.8 Mögliche Fehlerquellen der Nachweisreaktionen 134
  - 14.2 Abläufe der Immunreaktionen 135
    - 14.2.1 APAAP-Methode 135
    - 14.2.2 PAP-Methode 136
    - 14.2.3 Färbung mit dem ABC-Kit (Avidin-Biotin-Methode) 138
    - 14.2.4 Direkte Immunfluoreszenz 139
  - 14.3 Alternative Substratlösungen 140
    - 14.3.1 AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) 140
    - 14.3.2 4-Chlor-1-Naphthol 141
    - 14.3.3 Hanker-Yates-Reagenz 141
  - 14.4 Antigendemaskierung 141
    - 14.4.1 Enzymatische Antigendemaskierung 142
    - 14.4.2 Hitzeinduzierte Antigendemaskierung 142
      - 14.4.2.1 Kochen im Schnellkochtopf 143
  - 14.5 Literatur 143
- 15. Peptidbindungsstudien 145**
  - 15.1 Autoradiographie 146
    - 15.1.1 Herstellung der Radioliganden 146
    - 15.1.2 Radioligandenstudie 147
  - 15.2 Peptidbindung mit Fluoreszenz 148
    - 15.2.1 Applikation *in vivo* 148
    - 15.2.2 Rezeptormarkierung an fixiertem Material 149
  - 15.3 Literatur 150
- 16. *c-fos*-Markierung 151**
  - 16.1 Literatur 152
- 17. NADPH-Diaphorase-Darstellung 153**
  - 17.1 Literatur 155
- 18. *In situ*-Hybridisierung 157**
  - 18.1 Literatur 162

- 19. Computergestützte Auswertung 163**
  - 19.1 Zelldarstellung und 3D-Imaging 163
  - 19.2 Zellzählung und Zellmorphometrie 167
  - 19.3 Ionen-Imaging 167
  - 19.4 Anforderungen 168
  
- 20. Liste der Hersteller und Händler 171**

**Index 179**

**Tafelteil**