

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	
------------------	--