

## 7. Histochemie der Nukleinsäuren

Durch die Verwendung **histochemischer und zytochemischer Methoden** kann man in einer Zelle oder in einem Gewebe chemische Komponenten mit der Hilfe von Färbungsmethoden identifizieren - und gleich auch lokalisieren. Mit Histochemie werden intra- und extrazelluläre Gewebekomponenten in Schnitten untersucht, die aus Geweben angefertigt worden sind. Das zytochemische Verfahren, welches als einer Zweig der Histochemie betrachtet werden kann, ist für die Untersuchung von einzelnen Zellen geeignet, die keine Gewebe bilden; z.B. Zellkulturen, Blutzellen oder andere Proben mit diagnostischem Zweck (z.B. Papanicolau-Abstrich).

Die Identifizierung von Makromolekülen in mikroskopischen Präparaten geschieht durch spezifische Reaktionen, deren farbiger Endprodukt im Lichtmikroskop leicht zu untersuchen ist. Bei den **immunhistochemischen** und **immunzytochemischen Verfahren** nutzt man markierte Antikörper statt Farbstoffen, deshalb sind diese Methoden zur Identifizierung von spezifischen Proteinmolekülen geeignet.

Die oben genannten Methoden sind sowohl für qualitative als auch für quantitative Untersuchung von Makromolekülen geeignet, da damit ein bestimmtes Molekül identifiziert werden kann, und die Farbintensität deutet auf die Menge dieses bestimmten Moleküles hin.

Natürlich werden Fixierung und andere Präparationsschritte noch vor der Färbung gebraucht. Manchmal sind spezielle Verfahren unerlässlich (z.B. bei der Färbung von Lipide darf man die Präparate mit lipidlösenden Stoffen wie z.B. Xilol nicht behandeln) aber die Hauptprinzipien sind die gleichen: die Molekülen sollen ihre Lokalisierung in vivo bewahrend fixiert werden, und die originale Struktur der Zellen und die des Gewebes soll erhalten bleiben. (Die Einzelheiten darüber finden Sie im Kapitel „Lichtmikroskopie“.)

Viele histochemische Methoden werden täglich, routinemäßig in den Laboren der Pathologie angewendet, deshalb ist es wichtig, die medizinische Bedeutung dieser Methoden zu betonen.

In diesem Kapitel werden solche Methoden kurz erklärt, mit deren Hilfe Nukleinsäuren (DNA, RNA oder beide) spezifisch identifiziert werden können:

- Feulgen'sche Reaktion (DNA-Färbung)
- Methylgrün-Pyronin Färbung (Methylgrün: DNA-Färbung, Pyronin: RNA-Färbung )
- Gallocyanin-Chromalaun Färbung (DNA- und RNA-Färbung).

## Die Feulgen'sche Reaktion

### Theorie

Die Methode wurde von Feulgen und Rossenbeck entwickelt.

Die zwei Hauptschritten der Reaktion sind die folgenden:

1. Bildung freier Aldehydgruppen in Desoxyribose Molekülen der DNA.

Durch milde saure Hydrolyse lösen sich die Purinbasen von DNA ab, und freie Aldehydgruppen werden formiert (meistens wird dazu 1 N HCl verwendet.) Es ist wichtig, diesen Schritt vorsichtig durchzuführen, weil eine lange und starke Hydrolyse auch die Phosphodiesterbindungen der DNA zerstört.

2. Reaktion der freien Aldehydgruppen der depurinierten DNA mit dem Schiff-Reagenz.

Das Schiff-Reagenz enthält in schwefliger Säure gelöstes Fuchsin. Konjugierte Doppelbindungen des Fuchsinmoleküls geben dem Farbstoff eine purpurrote Farbe. In dem mit der schwefligen Säure gebildeten Komplex werden diese Doppelbindungen umgeordnet, und dadurch wird das Molekül farblos. Diese Form des Farbstoffes nennen wir Leukofuchsin. Eine chemische Reaktion zwischen Leukofuchsin und den freien Aldehydgruppen der depurinierten DNA ergibt die Wiederherstellung der originalen Struktur der Doppelbindungen, und das Fuchsin wird seine originale purpurrote Farbe zurückgewinnen.

### Praktische Arbeit

#### *7.1. Feulgen'sche Reaktion in Pflanzenzellen*

*Ziel des Experiments:* Untersuchung des DNA-Inhaltes in Zellkernen aus dem Epidermis einer Zwiebel. Mit der Feulgen'schen Reaktion werden die Zellkerne lila gefärbt, das Zytoplasma bleibt ungefärbt.

*Protokoll des Experiments:* die Schritten sind – mit der Ausnahme der Hydrolyse - bei Raumtemperatur durchzuführen.

a. Ziehen Sie 2-3 Epidermisschichten von der Zwiebel ab

- b. Legen Sie die Epidermis-Stücke in die Behälter mit Juel-Fixative für 10 Minuten. (Fixierung)
- c. Waschen Sie die Präparaten mit Leitungswasser für 3 Minuten (Entfernung von überschüssigem Fixative).
- d. Legen Sie die Präparaten in 96%-ige Ethanol für 5 Minuten (partielle Dehydrierung).
- e. Legen Sie die Präparaten in 1 N HCl in den Thermostat auf 60°C für 10 Minuten (milde saure Hydrolyse).
- f. Spülen Sie die Präparaten mit 1 N HCl bei Raumtemperatur, danach mit destilliertem Wasser.
- g. Legen Sie die Präparaten ins Schiff'sche Reagenz für 40 Minuten.
- h. Spülen Sie die Präparaten mit verdünnter schwefliger Säure für 4 Minuten.
- i. Waschen Sie die Präparaten mit Leitungswasser für 4 Minuten (Entfernung des nicht gebundenen Farbstoffes).
- j. Legen Sie die Präparaten auf Objektträger, und bedecken Sie es mit Deckglas.
- k. Untersuchen Sie das Präparat in Lichtmikroskop. Benutzen Sie alle Objektive mit verschiedenen Vergrößerungen. Zeichnen Sie das beste Bild ins Laborheft ab.

## *7.2. Untersuchung des Lebergewebes eines Säugetieres gefärbt mit der Feulgen'schen Reaktion*

*Ziel des Experiments:* Untersuchung von DNA der Säugerzellen durch Feulgen'sche Reaktion. Die Zellkerne sind lila gefärbt.

### *Protokoll des Experiments:*

Auf dem Labortisch finden Sie angefertigte Schnitte von Rattenleber mit Feulgen'scher Färbung. Untersuchen Sie den Schnitt im Lichtmikroskop. Benutzen Sie alle Objektive mit verschiedenen Vergrößerungen. Zeichnen Sie das beste Bild ins Laborheft ab.

Bei der Präparation waren die histochemischen Schritten ähnlich, wie bei der 7.3. Übung.

## **Methylgrün-Pyronin Färbung**

### **Theorie**

Mit der Methylgrün-Pyronin Färbung können nukleare DNA und zytoplasmatische RNA untersucht werden: Methylgrün färbt DNA grün, Pyronin färbt RNA rot. (Färbung des RNA-Inhaltes des Nukleolus und des DNA-Inhaltes vom Zytoplasma wird verdeckt durch die

Färbung der anderen Nukleinsäure, was dort in grösserem Anteil vorkommt. Die zwei basischen Farbstoffen werden oft zusammen, in gemischter Form verwendet.

Der genaue Hintergrund der chemischen Reaktion ist nicht bekannt. Wahrscheinlich bestimmen die stereochemische Konfiguration und die unterschiedlichen Polymerisationsgraden der einzelnen Nukleinsäure ihre Affinität zu den Farbstoffen: Methylgrün bindet sich zu der höher polymerisierten DNA, während Pyronin sich zu der weniger polymerisierten RNA bindet.

## **Praktische Arbeit**

### *7.3. Methylgrün-Färbung von Pflanzenzellen*

*Ziel des Experiments:* Untersuchung von DNA-Inhalt in den Zellkernen der Zwiebel Epidermis. Der Zellkern wird durch Methylgrün grün gefärbt, das Zytoplasma bleibt ungefärbt.

*Protokoll des Experimentes:* die Schritten sind auf Raumtemperatur durchzuführen.

- a. Ziehen Sie 2-3 Epidermisschichten von der Zwiebel ab !
- b. Legen Sie die Epidermis-Stücke in die Behälter mit Juel Fixative für 15 Minuten (Fixierung).
- c. Waschen Sie die Präparate mit Leitungswasser für 3 Minuten (Entfernung des überflüssigen Fixierungsmittels).
- d. Legen Sie die Präparate in Methylgrün für 5 Minuten.
- e. Waschen Sie die Präparate mit 50%-igem Alkohol für 5 Minuten (Entfernung des überflüssigen Farbstoffes).
- f. Legen Sie die Präparate auf den Objektträger, und bedecken Sie sie mit Deckglas.
- g. Untersuchen Sie das Präparat im Lichtmikroskop. Benutzen Sie alle Objektive mit verschiedenen Vergrößerungen. Zeichnen Sie das beste Bild ab ins Laborheft.

### *7.4. Untersuchung des Lebergewebes eines Säugetieres gefärbt mit der Methylgrün-Pyronin*

*Ziel des Experiments:* Untersuchung von DNA- und RNA-Inhalt in Säugerzellen. Der DNA-Inhalt des Zellkernes wird durch Methylgrün grün gefärbt, der RNA-Inhalt der zytoplasmatischen Organellen wird durch Pyronin rötlich gefärbt.

*Protokoll des Experiments:* Auf dem Labortisch finden Sie angefertigte Schnitte mit Methylgrün-Pyronin Färbung. Untersuchen Sie den Schnitt im Lichtmikroskop. Benutzen Sie alle Objektive mit verschiedenen Vergrößerungen. Zeichnen Sie das beste Bild ins Laborheft ab!

Bei der Präparation waren die histochemische Schritten ähnlich, wie bei der 7.3. Übung.

## **Gallozyanin-Chromalaun Färbung**

### **Theorie**

Mit dieser Methode kann der DNA- und der RNA-Inhalt der Zellen gleichzeitig untersucht werden. Die Nukleinsäure enthaltenden Zellkomponenten werden gräulich-blau gefärbt.

Die Färbung wird mit dem Komplex von Gallozyanin und Chromalaun durchgeführt. Der Komplex bindet sich zu den Phosphatgruppen der Nukleinsäuren.

Die Methode kann für DNA- oder RNA-Färbung spezifisch gemacht werden, wenn die nicht gewünschten Moleküle zuerst durch RNase oder DNase entfernt werden.

### **Praktische Arbeit**

#### *7.5. Untersuchung von Gallozyanin-Chromalaun gefärbtem Lebergewebe mit oder ohne RNase-Behandlung*

*Ziel des Experiments:* Untersuchung des Nukleinsäure-Inhaltes der Säugerzellen. Die Zellen werden mit Gallozyanin-Chromalaun gräulich-blau gefärbt. Durch die unterschiedlichen Nukleinsäure-Konzentrationen sind in dem Schnitt Organellen mit verschiedener Schattierung zu sehen. Nach der RNase Behandlung des Schnittes wird nur der Zellkern gefärbt.

*Protokoll des Experiments:* Auf dem Labortisch finden Sie Gallozyanin-Chromalaun gefärbte, davor mit RNase behandelte oder nicht behandelte Schnitte. Untersuchen Sie die Präparaten im Lichtmikroskop. Benutzen Sie alle Objektive mit verschiedenen Vergrößerungen. Zeichnen Sie die besten Bilder ins Laborheft ab. Vergleichen Sie die Schnitte mit oder ohne RNase Behandlung.

## 8. POLARISATIONS- UND PHASENKONTRASTMIKROSKOPIE

### POLARISATIONSMIKROSKOPIE

Die Polarisationsmikroskopie ist eine Variante der Lichtmikroskopie. Diese Methode ist für die Untersuchung von doppelbrechenden Strukturen verwendbar. Es ist charakteristisch für die doppelbrechenden, sogenannten anisotropen Strukturen, deren Brechungsindex sich in zwei zueinander senkrechten Ebenen unterscheidet. Dadurch können diese Strukturen die Schwingungsebene der auf sie fallenden polarisierten Lichtstrahlen verdrehen. Diese Verdrehung hängt von der räumlichen Orientierung der doppelbrechenden Strukturen ab. Die anisotropen Objekte (in Biologie z.B. anorganische Kristalle, Proteinfaserbündel usw.) kann man mit dem Polarisationsmikroskop beobachten. Das zu untersuchende Objekt befindet sich zwischen zwei Polarisationsfiltern (Polarisator und Analysator).

Der Polarisator befindet sich unter dem Kondensator, im Farbfilterhalter des Beleuchtungssystems. Er lässt nur polarisiertes Licht durch, das in einer einzelnen Ebene schwingt. (Das natürliche Licht schwingt in allen Richtungen). Der Analysator ist ein ähnliches Filter, der sich über das Objektiv befindet. Der Polarisator und der Analysator werden aus Polaroidfilmen oder aus kalzit-enthaltenden Nicol-Prismen hergestellt.

Wenn die Schwingungsebenen der zwei Filter parallel sind, geht das mit dem Polarisator hergestellte polarisierte Licht durch den Analysator und beleuchtet das Gesichtsfeld (maximale Lichttransmission, Abb. 8.1.A.). Die gekreuzte Stellung der Polarisationsfilter verhindert die Lichttransmission und ergibt dunkles Gesichtsfeld (Abb. 8.1.B.). Wenn das zu untersuchende Präparat doppelbrechende Strukturen (z.B. Haar, Kollagen, Mikrotubuli, Mikrofilamente, Stärke) enthält, drehen sie selbst die Schwingungsebenen des polarisierten Lichtes weg. Dadurch kann dieses weggedrehte Licht durch den Analysator gehen, und diese anisotropen Regionen werden hell, während die anderen, sogenannten isotropen Regionen dunkel bleiben (Abb. 8.1.C.).

Die Verdrehung von den Schwingungsebenen des polarisierten Lichtes bezeichnet man als Doppelbrechung, die kristallisierten, gut geordneten Strukturen aufweisen. Diese Strukturen sind doppelbrechend oder anisotrop. Die isotropen Strukturen oder Materialien können die Schwingungsebene von polarisiertem Licht nicht wegdrehen. Die sind die amorphe Materialien.

Wenn das doppelbrechende Objekt mit der Schwingungsebene des aus dem Polarisator austretenden polarisierten Lichtes parallel ist, geht das aus dem Objekt

austretende polarisierte Licht nicht durch den Analysator, weil die optische Achse des Analysators auf die optische Achse der doppelbrechenden Struktur senkrecht ist. Das Ergebnis in diesem Fall ist ein dunkles Gesichtsfeld im Mikroskop (Abb. 8.1. D.). Die Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop lassen die submikroskopischen molekularen Strukturen der Objekte aufschließen.

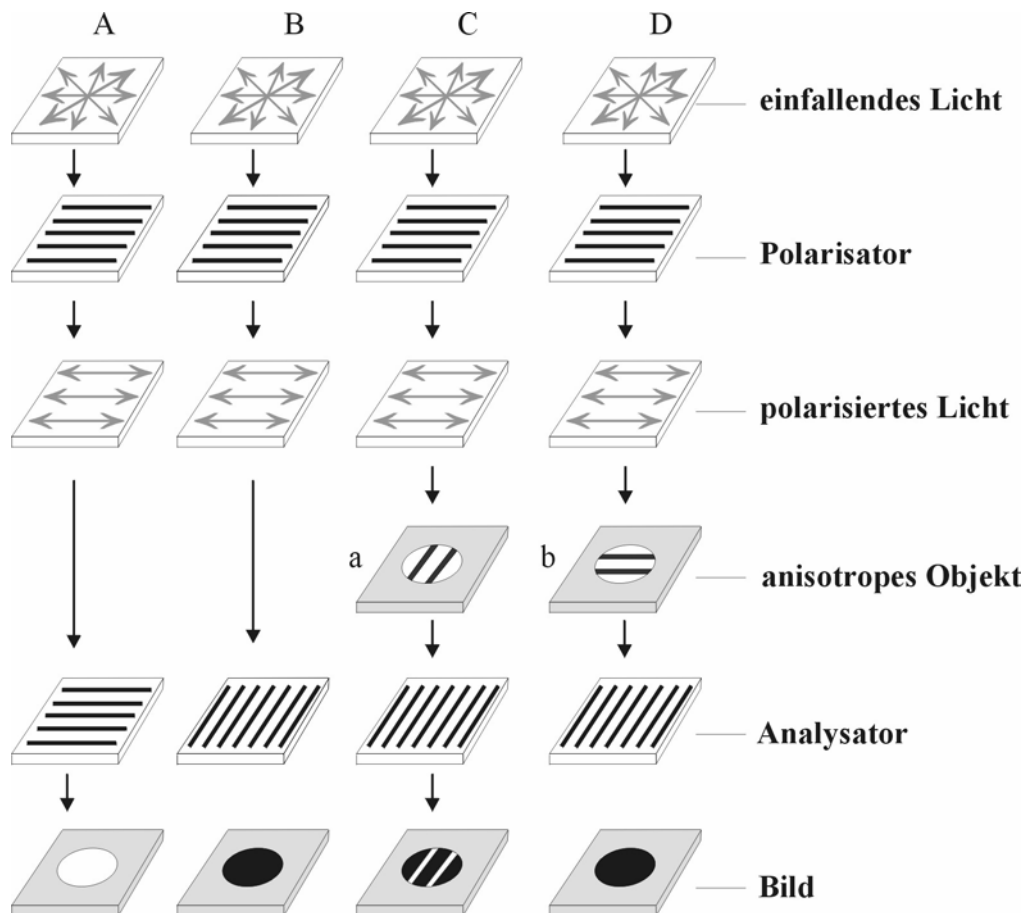


Abbildung 8.1. Das Grundprinzip der Polarisationsmikroskopie (Details im Text). A: Wenn der Polarisator und der Analysator parallel sind; ist das Gesichtsfeld hell. B: Wenn der Polarisator und der Analysator senkrecht (gekreuzt) sind, ist das Gesichtsfeld dunkel. C: Das Bild des doppelbrechenden Objektes ist sichtbar, wenn das Objekt mit dem Analysator oder Polarisator nicht parallel ist. C: Der Polarisator und der Analysator sind gekreuzt, aber das doppelbrechende Objekt ist mit dem Polarisator parallel, deswegen ist das Gesichtsfeld dunkel.

## Experiment

### 8.1. Die Beobachtung des Gesichtsfeldes des Polarisationsmikroskopes

*Der Zweck der Untersuchung.* Die Beobachtung der Beleuchtung vom Gesichtsfeld bei paralleler und senkrechter Position des Analysators und Polarisators.

#### Das Experiment

- a. Das Licht einschalten und die Beleuchtung des Mikroskopes einstellen.
- b. Das Gesichtsfeld und die Lichtstärke bei der Verwendung des Objektivs sowohl mit der kleinen (10-facher) als auch mit der großen (40-facher) Vergrößerung kontrollieren.
- c. Den Polarisator im Farbfilterbehälter drehen und die Veränderung der Gesichtsfeldbeleuchtung (hell und dunkel) während 360 Grad Umdrehung beobachten. (S. die Erklärung im Text.) Der Analysator ist im Tubus befindlich, er wird während des Experimentes nicht gedreht.
- d. Die Ergebnisse ins Laborheft aufzeichnen und die Ursache der Ergebnisse erklären.

#### *8.2. Beobachtung von menschlichem Haarpräparat im Polarisationsmikroskop.*

*Der Zweck der Untersuchung.* Die doppelbrechenden Eigenschaften des menschlichen Haares werden im Polarisationsmikroskop untersucht. Diese Methode wird auch in forensischen Wissenschaften verwendet.

#### Das Experiment

- a. Den Polarisator bis zu der maximalen Gesichtsfeldbeleuchtung drehen. In dieser Position sind der Polarisator und der Analysator parallel.
- b. Das menschliche Haarpräparat auf den Objektisch des Mikroskops legen und mit dem 10-fachen Objektiv untersuchen.
- c. Den Polarisator bis der Erscheinung von dunklem Gesichtsfeld drehen und das Bild vom bestrahlten leuchtenden Haar gegen den dunklen Hintergrund beobachten. Das Haar ist ein doppelbrechendes, anisotropes Material, das die Konsequenz der orientierten Strukturen von Keratinfasern ist.
- d. Die Untersuchung mit der Verwendung von 40-fachem Objektiv wiederholen, wie oben im Punkt c. angegeben.
- e. Das im Polarisationsmikroskop gesehene Bild des Haares ins Laborheft aufzeichnen.

#### *8.3. Untersuchung von Stärkekörnern mit Polarisationsmikroskop*

*Der Zweck der Untersuchung.* Die Stärkekörner enthalten kristallisierte Polysaccharidmoleküle. In diesem Experiment kann man die gut-geordnete, orientierte Struktur von Stärkekörnern beobachten.

### Das Experiment

- a. Kleine Menge von der Stärke mit einer Glasstange auf einen Objektträger auflegen. Einen Tropfen von destilliertem Wasser auf die Stärke tropfen, und mit einem Deckglas decken.
- b. Den Objektträger auf den Objektisch des Mikroskops legen und die Stärkekörner beobachten, wie oben im Punkt 8.2.a.-d. angegeben. Im Gesichtsfeld von Polarisationsmikroskop sind die Stärkekörner als helle, runde oder ovale Gebilde sichtbar. Die Interferenzfarben und die dunklen, queren Linien entstehen wegen der die Stärkekörner aufbauenden schichtigen Kristalle. Die Orientierung von dunklen Linien verändert sich (dreht sich um), wenn wir den Polarisator umdrehen. Erklären Sie dieses Phänomen!
- c. Einige Bilder von im dunklen Hintergrund beobachteten Stärkekörner ins Laborheft aufzeichnen.

### *8. 4. Untersuchung der doppelbrechenden (anisotropen) Eigenschaften von Calciumoxalat-Kristallen*

*Der Zweck der Untersuchung.* Die äußeren epidermalen Schichten der Zwiebel (*Allium cepa*) enthalten doppelbrechende Kristalle, die mit dem Polarisationsmikroskop beobachtet werden können. Diese Kristalle enthalten Calciumoxalat, das sich im Cytoplasma von Zwiebel-Epidermalzellen bildet.

### Das Experiment

- a. Ein Stück der epidermalen Schicht von Zwiebel auf den Objektträger legen und mit einem Deckglas bedecken. (Die epidermale Schicht ist in kleinen Stücken, und die Stücke wurden mit 50% Ethanol behandelt, um die Luft aus dem extrazellulären Raum zu entfernen.)
- b. Den Objektträger auf den Objektisch des Polarisationsmikroskopes legen und die Calciumoxalat-Kristalle beobachten, wie oben im Punkt 8.2.a.-d. angegeben. Die Kristalle erscheinen in Prisma-Form und in Abhängigkeit ihrer Stellung zu der Ebene vom polarisierten Licht sind sie unterschiedlich beleuchtet.
- c. Einige von den Kristallen ins Laborheft aufzeichnen, wie sie im dunklen Hintergrund erscheinen.

## **DIE PHASENKONTRASTMIKROSKOPIE**

Das menschliche Auge kann nur die in der Wellenlänge (Farbe) und in der Intensität

erfolgte Veränderungen wahrnehmen. Eines der Hauptprobleme der Mikroskopie biologischer Objekte ist deren Kontrastarmut, weil die meisten Zellkomponenten für das sichtbare Licht transparent sind. Es gibt nur wenige Ausnahmen, z. B. die Pigmente, die farbstoff-enthaltenden Zellen, die bestimmte Wellenlänge des sichtbaren Lichtes absorbieren (farbige Zellkomponenten). Die Hauptursache der geringen Lichtabsorptionsfähigkeit ist der hohe Wassergehalt, aber die Zellkomponenten besitzen auch noch im getrockneten Zustand nur wenigen Kontrast.

Eine von den Möglichkeiten um die Strukturen sichtbar zu machen ist die Verwendung von selektiven Farbstoffen. In diesen gefärbten Präparaten wird der Kontrasteffekt mit einem Unterschied der Lichtabsorption zwischen den verschiedenen Teilen des Präparates erzeugt. Aber in den meisten Fällen kann die Färbung in lebendigen Zellen nicht verwendet werden. Das Gewebe muß vor der Färbung fixiert, dehydriert und eingebettet werden, und diese Prozesse rufen strukturelle, morphologische und chemische Veränderungen hervor.

Das Phasenkontrastmikroskop ist ein modifiziertes Lichtmikroskop, das für die Untersuchung von ungefärbten und lebendigen Zellen hergestellt wurde (Abb. 8.2.). Die Zellen und ihre Organellen (z.B. der Zellkern, das Mitochondrium, das sekretorische Granulum usw.) besitzen nur geringen Kontrast, das heißt, die Unterschiede der Lichtabsorption sind sehr gering. Obwohl kleine Phasenverschiebung zwischen den durch die absorbierenden (Organelle) und transparenten Gebiete (Cytoplasma) durchgehenden Lichtstrahlen entsteht, die Interferenz verursacht keine wahrnehmbare Veränderung der Amplitude der Lichtstrahlung. Diese Phasendifferenz und Phasenverzögerung sind die Konsequenz der geringen Unterschiede der Dicke und des Refraktionsindex der unterschiedlichen Teile von biologischen Präparaten. Das kann man mit einem normalen Lichtmikroskop nicht sehen. Das Phasenkontrastmikroskop verändert diese geringe Phasenverschiebung und die Unterschiede des Refraktionsindex werden in Unterschiede der Intensität und Lichtstärke (Kontrast) umgewandelt, die man schon mit menschlichen Augen sehen kann.

Dieser Veränderungsprozess wird durch die speziellen Bestandteile vom Phasenkontrastmikroskop gesichert. Die sind die Phasenobjektive, die die Phasenplatte enthalten, der Phasenkondensator, der den Phasenring besitzt, das Teleskop-Mikroskop und das grüne Farbfilter.

Das durch die Zellkomponenten verzögerte Licht wird durch die Phasenplatte im Phasenobjektiv weiter verzögert. Mit dieser Methode wird die Phasendifferenz zur Amplitudendifferenz und Intensitätsdifferenz verändert.

Die Linsen der Phasenobjektive werden so konstruiert, dass sie in der Ebene von ihren hinteren Fokus der Phasenplatte eingelegt werden, deswegen entspricht die Stellung

der Phasenplatte geometrisch den Phasenring, der das aus dem Phasenkondensor austretende Licht zur Phasenplatte richtet.

Das Teleskop-Mikroskop sorgt für die Zentrierung der Phasenplatte und des Phasenringes. Das grüne Farbfiler ist ein ständiger Bestandteil des Phasenkontrastmikroskopes, das den optimalen Kontrast sichert.

Wenn die Phasenplatte und der Phasenring in der optischen Achse des Mikroskopes einander decken, haben die ungefärbte und lebendige Objekte genug Kontrast.

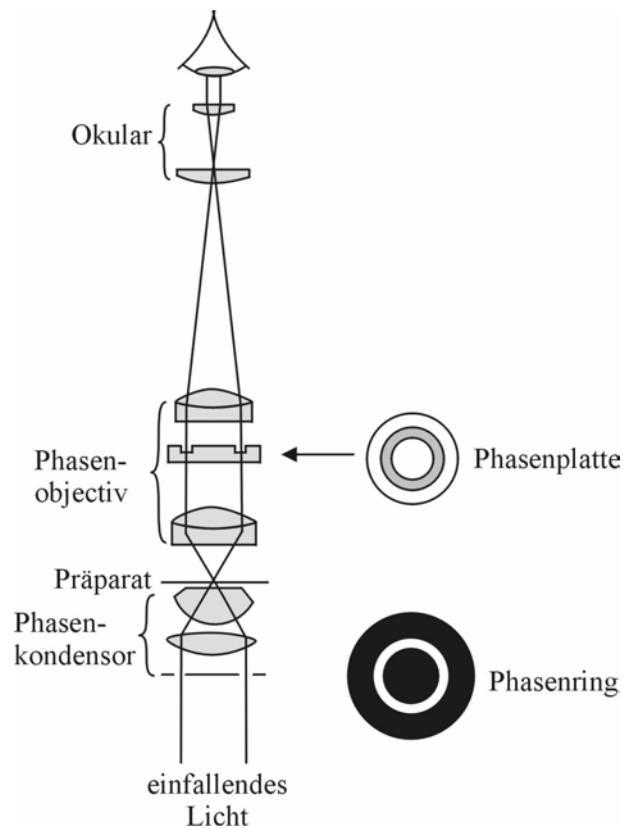


Abbildung 8.2. Der Aufbau des Phasenkontrastmikroskopes.

## Experiment

### 8.5. Die Zentrierung des Phasenkontrastmikroskop

*Der Zweck der Untersuchung.* Das Phasenkontrastmikroskop kann nur maximalen Kontrast sichern, wenn die Phasenplatte und der Phasenring geometrisch einander entsprechen. Diese Stellung kann durch die Zentrierung von diesen Bestandteilen gesichert werden. (Abb. 8.3.).

### Die Schritte des Experimentes

- a. Das Licht einschalten und die Beleuchtung kontrollieren (den Phasenkondensator in die höchste Stellung heben). Das grüne Farbfilter in den Farbfilterbehälter des Beleuchtungssystems einlegen.
- b. Das Phasenobjektiv mit der kleinen (10fachen) Vergrößerung in die optische Achse des Mikroskops einstellen. Das Phasenobjektiv enthält die Phasenplatte. Die "Ph"-Markierung an der Seite der Metafassung vom Phasenobjektiv zeigt, dass die Phasenplatte im Objektiv ist. Die Nummer bei der "Ph"-Markierung zeigt die geometrischen Eigenschaften des Objektivs. Diese Nummer muß mit der Nummer des Phasenringes von der Phasenplatte identisch sein. Die Vergrößerungen und die Nummerierungen unserer Phasenobjektive sind die folgenden: 10 fache – Ph1, 40fache – Ph3, 100fache – Ph4;
- c. Die drehbare Scheibe des Phasenkondensators in die Stellung „1“ drehen (die richtige Stellung wird mit einem Pfeil gezeigt). In dieser Stellung sind die Phasenplatte und die Phasenring in die optische Achse des Mikroskopes (sie decken sich).
- d. Das Okular aus dem Tubus des Mikroskops nehmen und das Teleskop-Mikroskop in jenen einstellen.
- e. Mit der Verwendung des Teleskop-Mikroskopes die Bilder vom Phasenring (grün) und von der Phasenplatte (dunkel) fokussieren.
- f. Wenn die zwei ringförmige Strukturen sich nicht decken, sollen wir die Zentrierung auf die folgende Weise durchführen: wir zentrieren den Phasenring mit den Schrauben des Phasenkondensators um der Phasenring innerhalb der Grenze von der Phasenplatte zu haben, damit sich die zwei Komponenten decken. Der maximale Kontrast wird erreicht, wenn die Phasenplatte und der Phasenring sich genau decken.
- g. Die in den Punkten b-e geschriebenen Schritte mit den 40fachen und 100fachen Objektiven wiederholen. Benutzen Sie den Phasenring mit der Markierung 3 und 4 des Phasenkondensators.

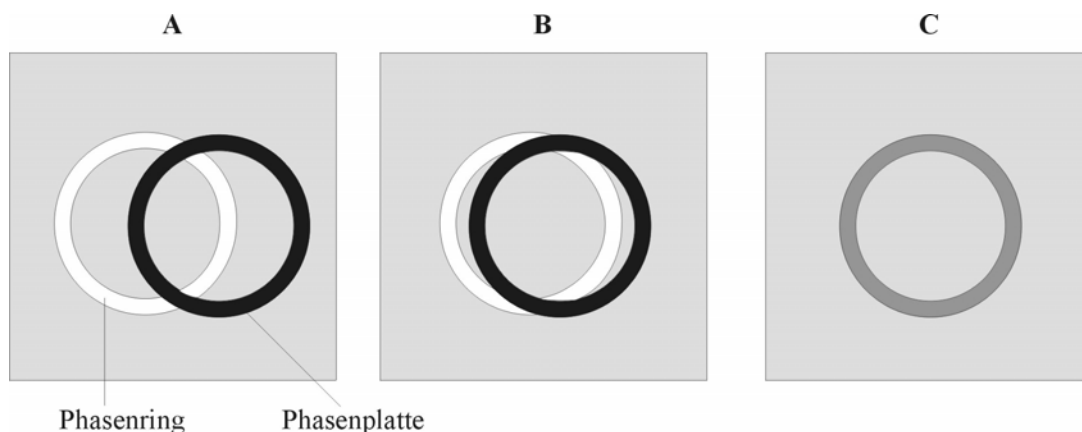


Abbildung 8.3. Die Stellung der Phasenplatte (dunkel) und des Phasenringes (grün)

während der Zentrierung. A: das Bild des Gesichtsfeldes vor der Zentrierung. B: das Bild des Gesichtsfeldes während der Zentrierung. C: das Bild des Gesichtsfeldes nach der Zentrierung.

#### 8.6. Untersuchung vom pflanzlichen Präparat mit Phasenkontrastmikroskop.

*Der Zweck der Untersuchung.* Nach der Zentrierung ist das Phasenkontrastmikroskop für die Untersuchung von feinen Bestandteilen der Zelle verwendbar, die man mit Lichtmikroskop nicht beobachten kann.

#### Die Schritte des Experimentes

- a. Eine epidermale Schicht von einem Zwiebelunterblatt entfernen.
- b. Einen Stück von der epidermalen Schicht auf einen Objektträger auflegen, einen Tropfen destilliertes Wasser darauf tropfen, und mit einem Deckglas decken.
- c. Das Präparat auf den Objektisch vom Phasenkontrastmikroskop legen und die Zellen mit den Objektiven von kleiner (10facher) und großer (40facher) Vergrößerung beobachten. Vergessen Sie nicht den Phasenring zu wechseln. Ins Laborheft einige von Zwiebelepidermis-Zellen, wie sie mit dem Objektiv von 40facher Vergrößerung sichtbar sind, aufzeichnen.
- d. Nach den oben geschriebenen Untersuchungen das grüne Farbfilter aus dem Farbfilterbehälter des Beleuchtungssystems entfernen und die drehbare Scheibe in die "0"-Stellung stellen. In dieser Stellung funktioniert das Mikroskop wie ein normales Lichtmikroskop. Das Präparat jetzt mit dem Objektiv von 40facher Vergrößerung beobachten. Jetzt sehen Sie die Vorteile der Untersuchungsmethoden des Phasenkontrastmikroskopes. Die mit dieser Untersuchungsmöglichkeiten erreichten mikroskopischen Bilder von einigen Zellen ins Laborheft aufzeichnen. Vergleichen Sie dieses Bild mit dem Bild bei dem Punkt c..

#### 8.7. Untersuchung von PC12-Zellen mit Phasenkontrastmikroskop

*Der Zweck der Untersuchung.* Das Phasenkontrastmikroskop wird häufig für die Untersuchung von lebendigen Zellen verwendet. In diesem Experiment beobachten wir Zellen von Gewebekulturen. Die PC12-Zelle stammen aus einer Phäochromocytom-Zell-Linie von Ratten.

Die unbehandelten (kontroll) PC12-Zellen sind klein, rund, ähnlich den Nebennierenmarkzellen (chromaffin Zellen). Nach der Behandlung vom NGF (nerve growth factor, Nervenwachstumsfaktor) lassen sich die Zellen Neurite (Fortsätze) wachsen, ähnlich den sympathischen Neuronen. Die kontroll und die differenzierten PC12-Zellen ins Laborheft aufzeichnen.

## 9. Histochemie des Cytoplasmas

### Theorie

Wir nennen histochemischen oder cytochemischen Verfahren solche Reaktionen, mit deren Hilfe die einzelne Makromolekülen in der Geweben, bzw. Zellen durch spezifische, nur auf sie charakteristische Reaktionen nachzuweisen sind.

Im Nachfolgenden sind die am häufigsten bekannte Methoden für Nachweis der Makromolekülen des Cytoplasmas zusammengefasst; Detektierung von Nukleinsäuren befinden Sie unter Übung 7.

#### *Histochemie der Lipiden*

Lipide sind Makromoleküle mit charakteristischen hydrophoben Eigenschaften, und deshalb sind löslich in apolare Lösungsmittel. Deswegen ist es wichtig, beim histochemische Detektierung von Lipide die Benutzung von apolarem Lösungsmittel (z.B. Aceton) zu vermeiden. Eine der meist populäre sog. physikalische Nachweis ist Sudanschwarz Färbung; in diesem Fall wird die lipidlösliche Sudanfarbstoff in freie Lipide akkumulieren, und die lipidreiche Teile der Zellen dunkelblau/schwarz färben. Lipide sind auch nach sog. chemische Methode nachweisbar: die kovalenten Doppelbindungen der Fettsäuren reagieren mit **Osmiumtetroxid**, das Endprodukt der Reaktion scheint in schwarze Farbe aus.

#### *Histochemie der Kohlenhydraten*

Fast alle Typen von Kohlenhydraten (einige stark säurische Glukosaminoglykan ausgenommen) sind leicht und schnell durch Perjodsäure-Schiff Methode zu detektieren. Als erste Schritte werden Hydroxylgruppen von Hexosen mit Hilfe von Perjodsäure ( $\text{HIO}_4$ ) in Aldehydgruppen umgewandelt. Schiff'sche Reagenz wird dann diese Aldehydgruppen reduzieren, und davon eine sog. magentarotes Endprodukt formieren.

#### *Histochemie der Proteine und Enzyme*

Detektierung von Proteinen in allgemeinen ist auf Identifizierung der reaktive Gruppen von Aminosäuren basiert. Die verschiedene Funktionsgruppen sind mit verschiedenen Methode nachzuweisen; eine der am häufigsten verwendeten Methoden ist die sog. **Ninhydrin-Reaktion**. Das Prinzip dieses Verfahrens ist ähnlich zum Prinzip der PAS-Reaktion: Ninhydrin oxidiert Aminosäuren, bildet Aldehydgruppen die mit Schiff-Reagenz leicht zu detektieren sind. Sulfhydrylgruppen der schwefelenthaltenden Aminosäuren oder Disulfidbrücke zwischen ihnen sind mit **Tetrazoliumreaktion** nachzuweisen. *Aromatische Aminosäure (His, Trp, Tyr)* reagieren mit Benzidin eine färbige Endprodukt ergebend: der Name des Verfahren ist **Benzidinreaktion**.

Der Grundsatz der Lokalisierung von Enzymen sind die Färben und Nachweisen das Endprodukt mit einer Reaktion, die von den Enzymen katalisiert wird.

Es ist kritisch, solche Fixierungstechnik zu benutzen, der die katalitische Aktivität des Enzyms nicht beschädigt; eine Möglichkeit dafür ist z.B. Gefrierbruch. Diese Methode erfordert keine, die Tertiärstruktur des Enzyms wahrscheinlich zerstörende Fixative, weil die Präparaten werden plötzlich zu sehr niedrige Temperature abgekühlt und getrocknet werden. Identifizierung der Enzyme von bestimmten Organellen läßt das Organell in der Zelle zu lokalisieren; zur Lokalisierung von Lysosomen wird z.B. saure Phosphatase Reaktion verwendet.

### *Immunhistochemie*

Wir sprechen über Immunhistochemie (oder Immuncytochemie), wenn Lokalisation von einzelnen Proteinen im Gewebe (Zellen) wird durch spezifische, markierte Antikörper determiniert. Antikörper sind sog. Immunglobuline, Proteine, die von B-Lymphozyten produziert sind. Ihre Rolle ist die für Organismus fremde Proteine - die Antigene - zu identifizieren, und zu ihnen binden, um die Immunantwort vom Organismus gegen sie zu begünstigen. Da die Antigen-Antikörper-Reaktion absolut spezifisch ist, die Identifizierung von gesuchten Proteinen durch immunhistochemische Methoden sehr exakt durchzuführen ist.

Bei **direkter Methode** verwendet man nur einen sog. ersten Antikörper, welcher den Antigen erkennt; bei **indirekter Methode** auch einen sekundären Antikörper, welche den erste erkennt und bindet. Damit kann man das Signal verstärken. Markierung vom Antikörper bedeutet verschiedene Technike; man koppelt daran *fluoreszierende Farbstoff*, oder *Enzym*, das eine Reaktion mit einem farbigen Endprodukt katalisiert. (ein von der meist verwendeten Enzyme

ist *Horseradish-Peroxidase*.) Für Immunelektronenmikroskopie bindet man zum Antikörper Materialien mit großer Elektronenaffinität, z.B. *kolloidale Goldpartikel*, und nennt man dieses Verfahren **Immunogold**-Technik.

## Praktische Arbeit

### 9.1. Färbung von Nebenniere durch Sudanschwarz

*Ziel des Experimentes:* Nachweis von Lipiden durch Sudanfärbung in Nebenniere.

Auf dem Labortisch befinden sich fixierte und geschnittene Rattennebeniere-Schnitten. Die Nebenniere besteht aus zwei Teile: das zentrale Nebennierenmark und darum die Nebennierenrinde. Das Nebennierenmark sezerniert Adrenalin und Noradrenalin (wichtige Regulatoren des Blutdruckes, der Stressreaktion, Blutzuckerspiegel). Die Nebennierenrinde produziert drei wichtige Steroidhormongruppen, Mineralokortikoide, Glucocorticoide, Androgene. Weil Steroide Lipiden sind, ist die Nebennierenrinde ein hervorragendes Objekt zur Demonstration der Lipidfärbung.

*Protokoll des Experimentes:*

- a. Tropfen Sie 70%-ige Äthanol auf den Schnitt und lassen Sie es da für 2 Minuten. (Das Äthanol erleichtert die Penetration des Farbstoffes ins Gewebe)
- b. Löschen Sie das Äthanol vorsichtig ab; berühren Sie den Schnitt nicht!
- c. Tropfen Sie Sudanschwarz auf den Schnitt und lassen Sie es da für 2 Minuten.
- d. Löschen Sie den Farbstoff vorsichtig ab.
- e. Spülen Sie das Präparat in 70%-ige Äthanol.
- f. Spülen Sie das Präparat mit Leitungswasser für 3x1 Minuten.
- g. Spülen Sie das Präparat mit destilliertem Wasser für 1 Minute.
- h. Löschen Sie das überflüssige Wasser vom Schnitt ab. Tropfen Sie 1 Tropfen Gelatine auf das Deckglas, und bedecken Sie vorsichtig den Schnitt damit.
- i. Untersuchen Sie das Präparat im Lichtmikroskop. Mit kleinere Vergrößerung ist der ganze Nebenniere durchsichtbar. Zeichnen Sie ins Laborheft ins Laborheft ab.

### 9.2. Untersuchung vom Rattenleber gefärbt mit PAS-Reaktion

*Ziel des Experimentes:* Nachweis von Kohlenhydraten durch PAS-Färbung in Leberzellen.

Die Präparation des Schnittes und Prinzip der Technik ist in theoretischem Teil zusammengefasst. Ihre Aufgabe ist, den Schnitt mit jedem Objektiv zu untersuchen, und das beste Bild ins Laborheft abzeichnen. Beachten Sie, daß die intensive purpurrote Farbe befindet sich in dem Cytoplasma der Zellen, und die Zellkerne sind farblos. Das ist einerseits

in dem Leberzellen speicherte Glykogen, andererseits im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat befindliche glykosilierte Proteine zu verdanken.

### 9.3. Untersuchung von Präparat gefärbt durch saure Phosphatase Reaktion

*Ziel des Experimentes:* Nachweis und Lokalisierung von Lysosomen durch saure Phosphatase-Reaktion.

Saure Phosphatase-Enzyme gehören zu den *saure Hydrolasen der Lysosomen*; ihre Nachweis ist auch eine Methode für Lokalisierung von Lysosomen. Unter dieser Färbung verwendet man spezifische Substrate, von welchen das Enzym Phosphationen freisetzt. Nächste Schritte ist von Phosphationen unlösliche Bleiphosphat zu bilden. Bleiphosphat wird danach in *Bleisulfid* umgewandelt – das gibt typische *braune* Präzipität des Schnittes, welche zeigt das Ort von Lysosomen in der Zellen. Untersuchen Sie das Präparat mit allen Objektiven, und zeichnen Sie das beste Bild ins Laborheft ab.

### 9.4. Immunhistochemische Untersuchung von Insulin- und Glukagonproduzierende Zellen

*Ziel des Experimentes:* Identifizieren von A und B Zellen der Bauchspeicheldrüse nach der ausschneidete Hormone mit immunhistochemische Methode.

*Langerhans-Insel* der Bauchspeicheldrüse enthalten Zellen von verschiedene Typen, welche für Sezernierung von Hormone mit verschiedene Funktion verantwortlich sind. *A-Zellen* produzieren *Glukagon*, *B-Zellen* sezernieren *Insulin*; beide Hormone nehmen in der Regulierung der Blutzuckerspiegel teil.

Auf dem Schnitte *doppelte immuncytochemische Färbung* werden die zwei verschiedene Hormon sezernierenden Zelltypen mit zwei verschiedene Farbe gezeigt: Anti-Glukagon Antikörper werden durch sekundäre Antikörper erkennt, zu welchen schwarzes Endprodukt produzierende Enzymmoleküle gekoppelt sind. Sekundäre Antikörper, welche Anti-Inzulin erkennen, produzieren rotes Endprodukt. Leicht zu sehen, daß die Abbau-Enzym bildende Zellen der Bauchspeicheldrüse überhaupt nicht, aber Langerhans Insel intenziv gefärbt sind.

Am Rand der Inseln sieht man schwarz gefärbte A-Zellen, in der Mitte rot gefärbte B-Zellen. Untersuchen Sie das Präparat mit allen Objektiven, und zeichnen Sie das beste Bild ins Laborheft ab.