

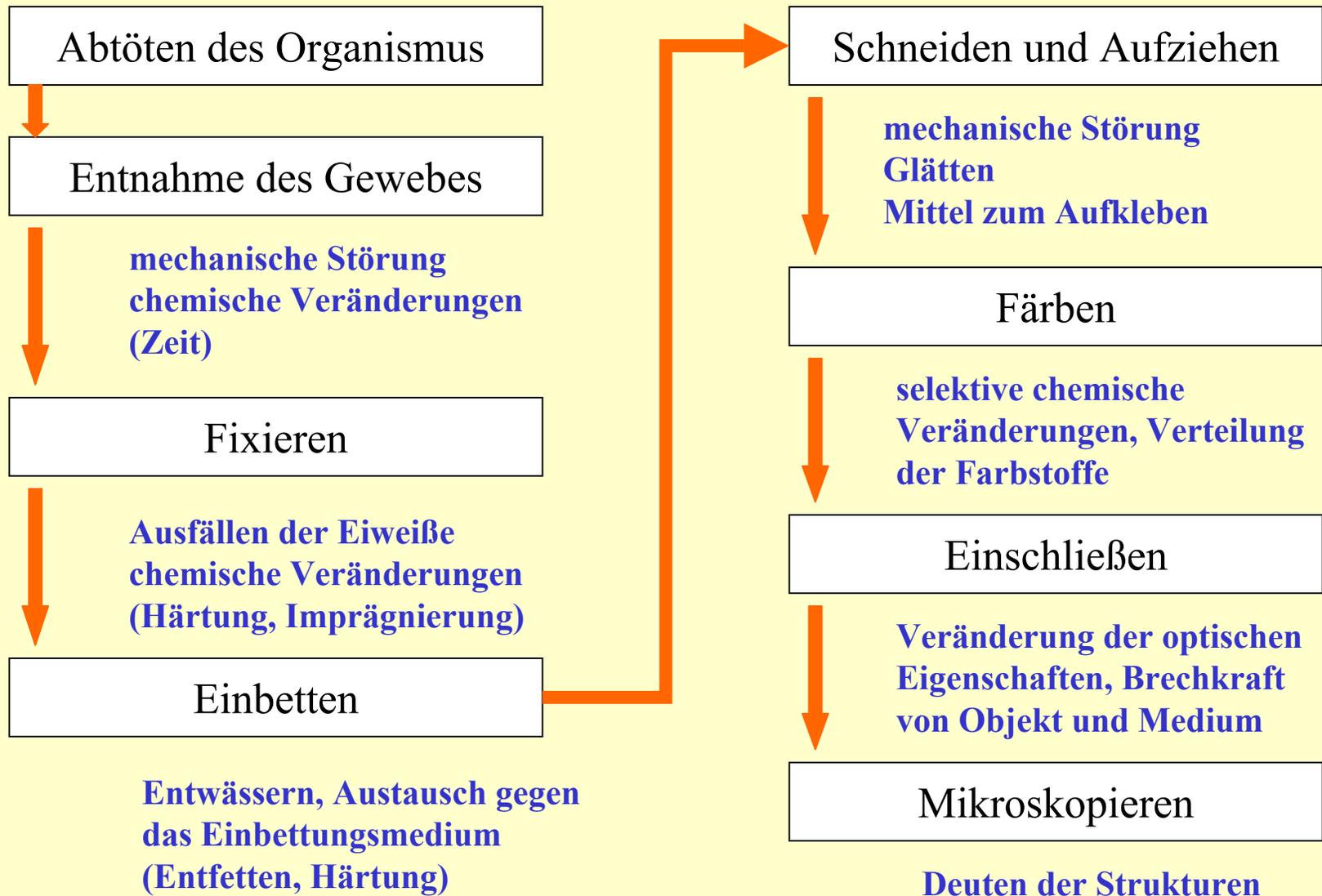
20. February 2004
Bielefeld

Von der Gendiagnose zum Phänotyp am
Beispiel neurologische Erkrankungen

Mikroskopische Präparate

Kontakt: Priv. Doz. Dr. Jörg W. Bartsch
Telefon:0521 106 5618
Fax:0521 106 5654
eMail:joerg.bartsch@uni-bielefeld.de

Vom Organismus zum mikroskopischen Präparat - Schritte eines Konstruktionsprozesses

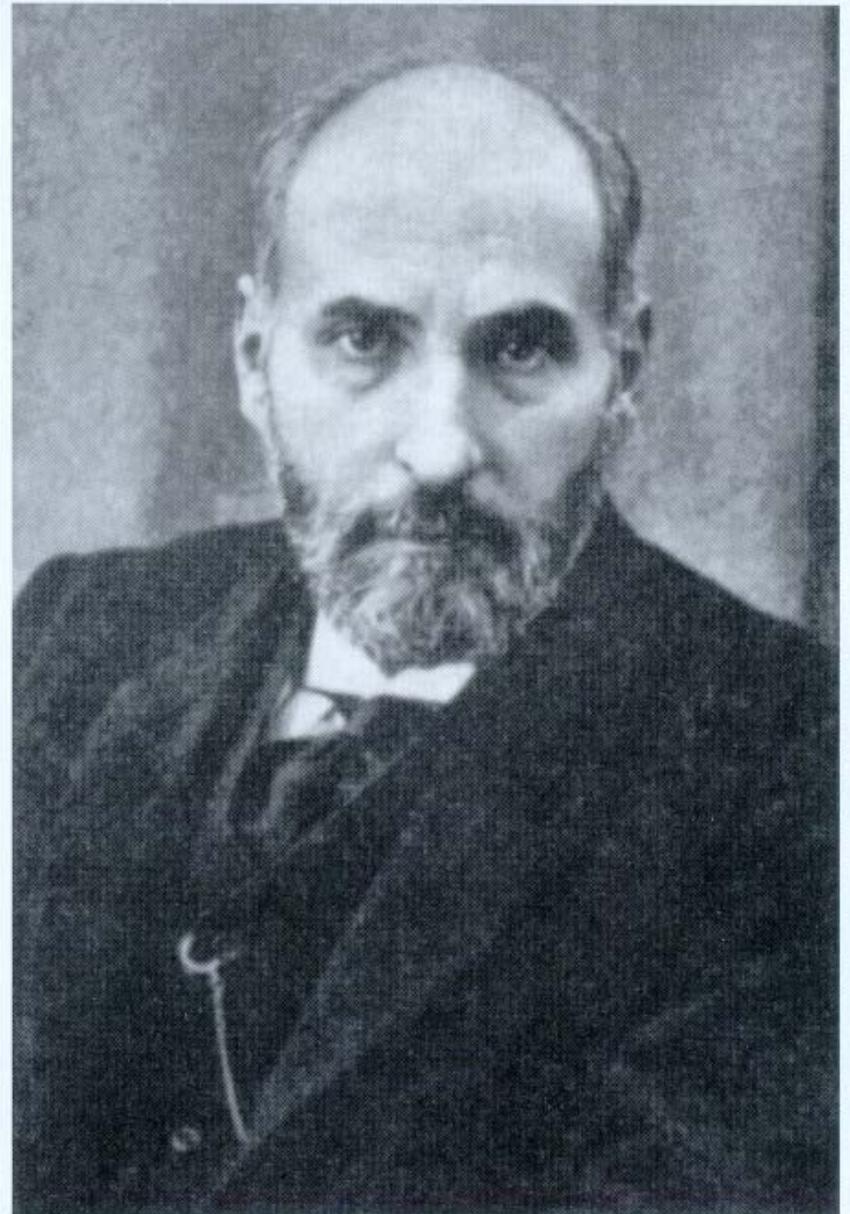


Färbemethoden für Nervengewebe:

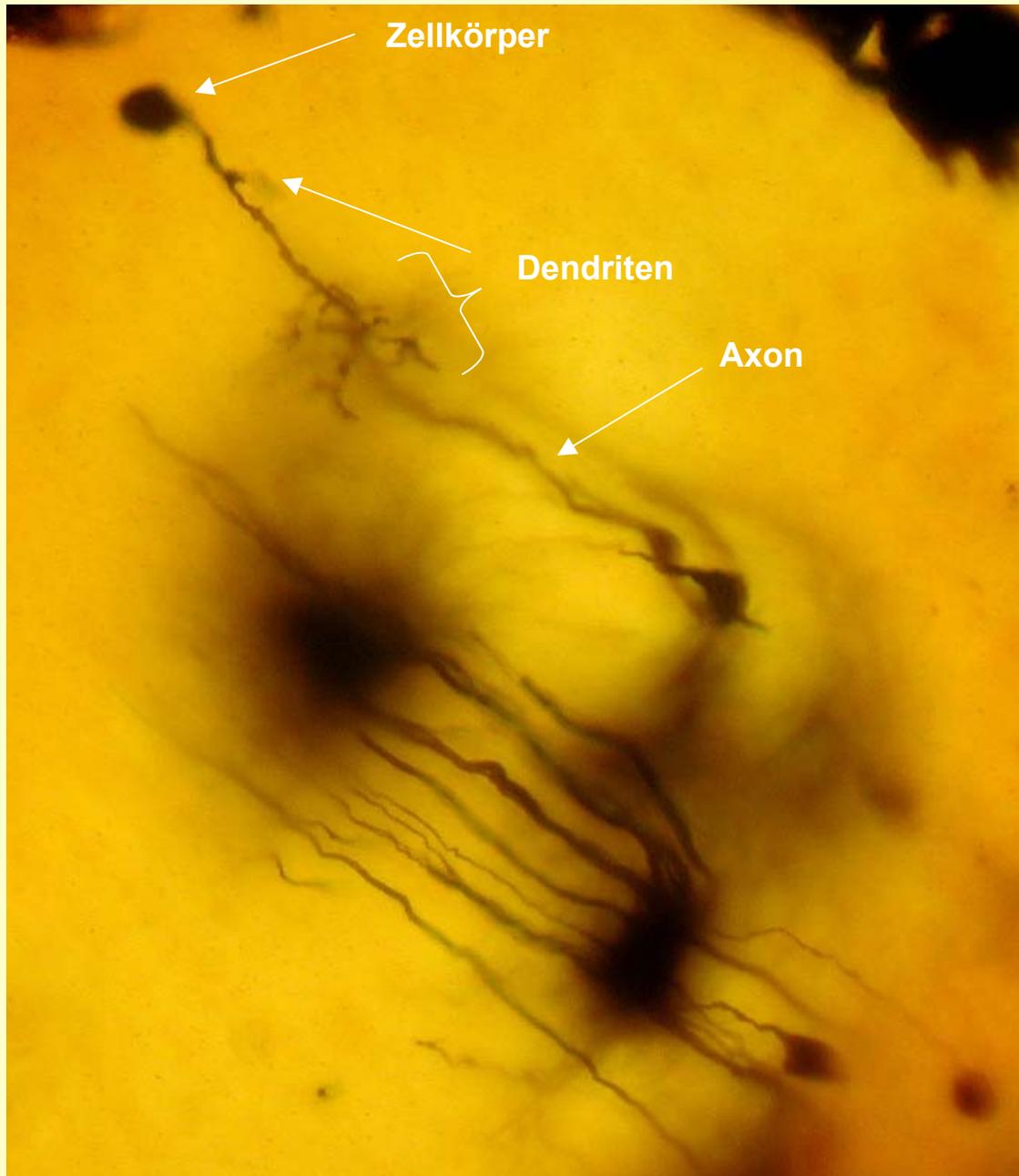
- allgemeine Färbemethoden, z.B. Kernfärbungen
- spezifische Färbemethoden, z.B. Nissl-Methode, Markscheidenfärbungen
- Imprägnierungen mit Metallsalzen (Silber, Osmium) Golgi-Methode; Neurofibrillenbild (Cajal)
- Injektion z.B. nach elektrophysiologischer Ableitung
- histochemische Verfahren
direkte und indirekte Immunfluoreszenz



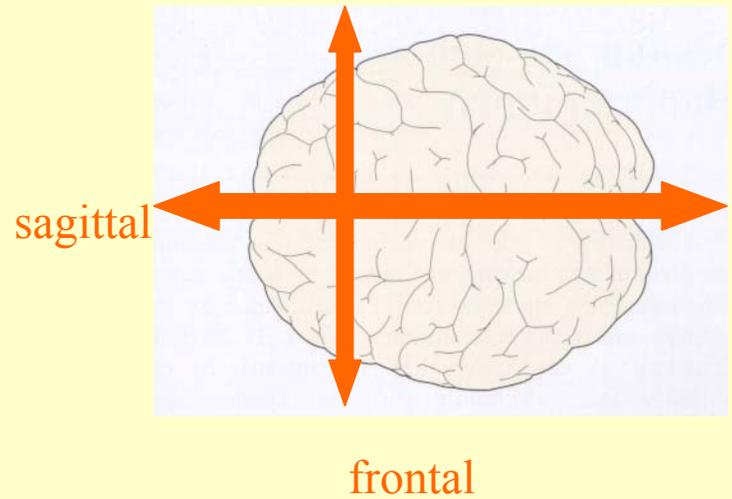
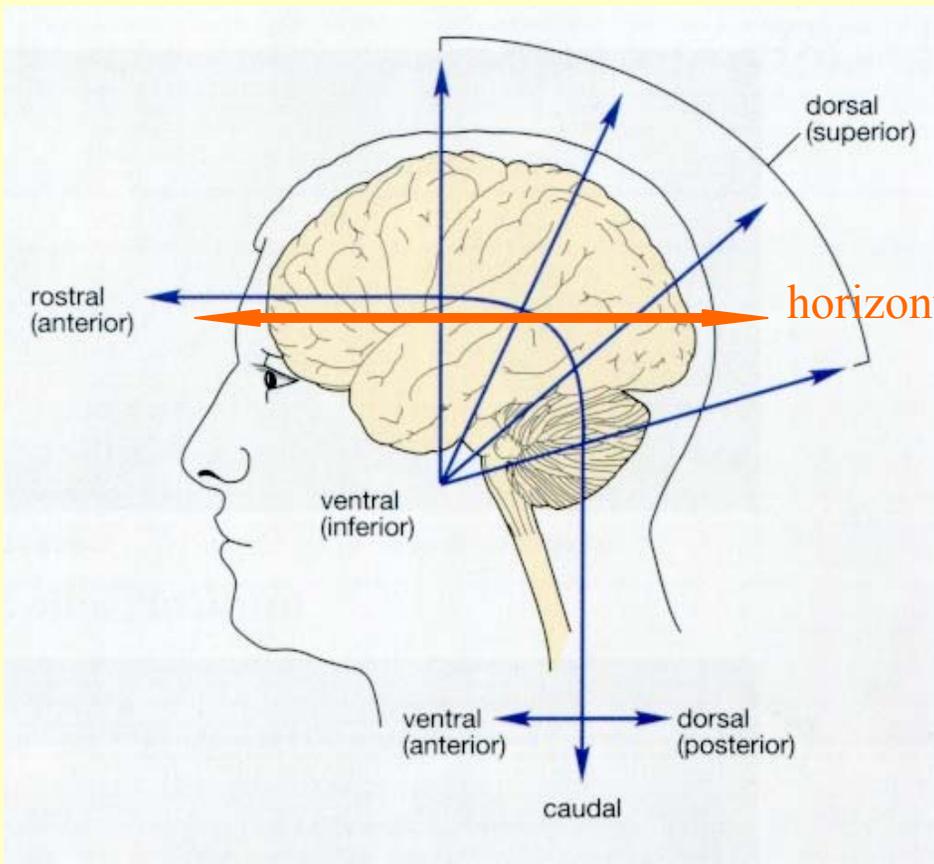
Golgi



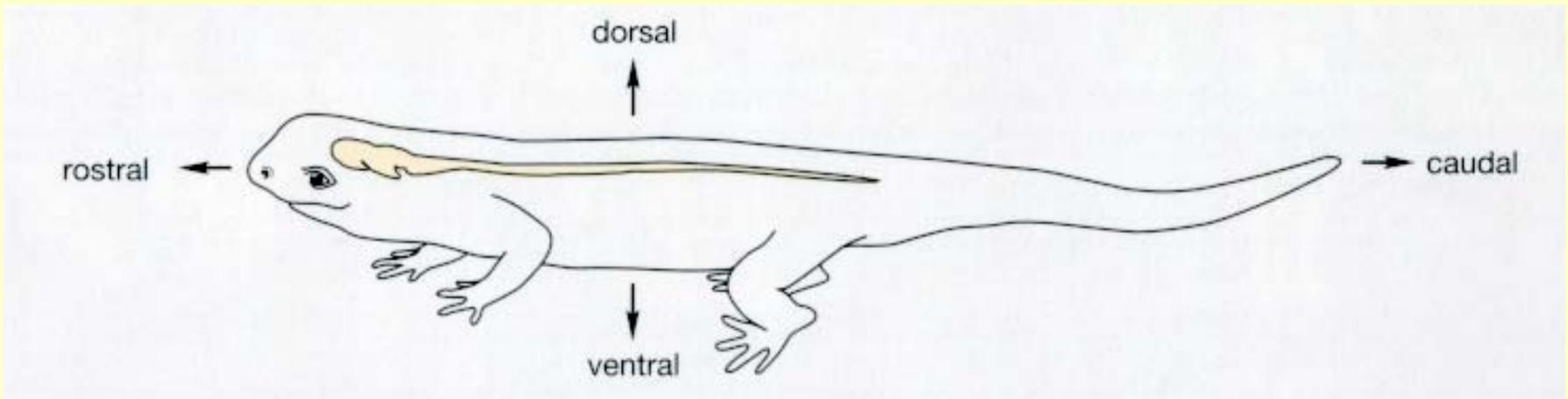
Ramón y Cajal



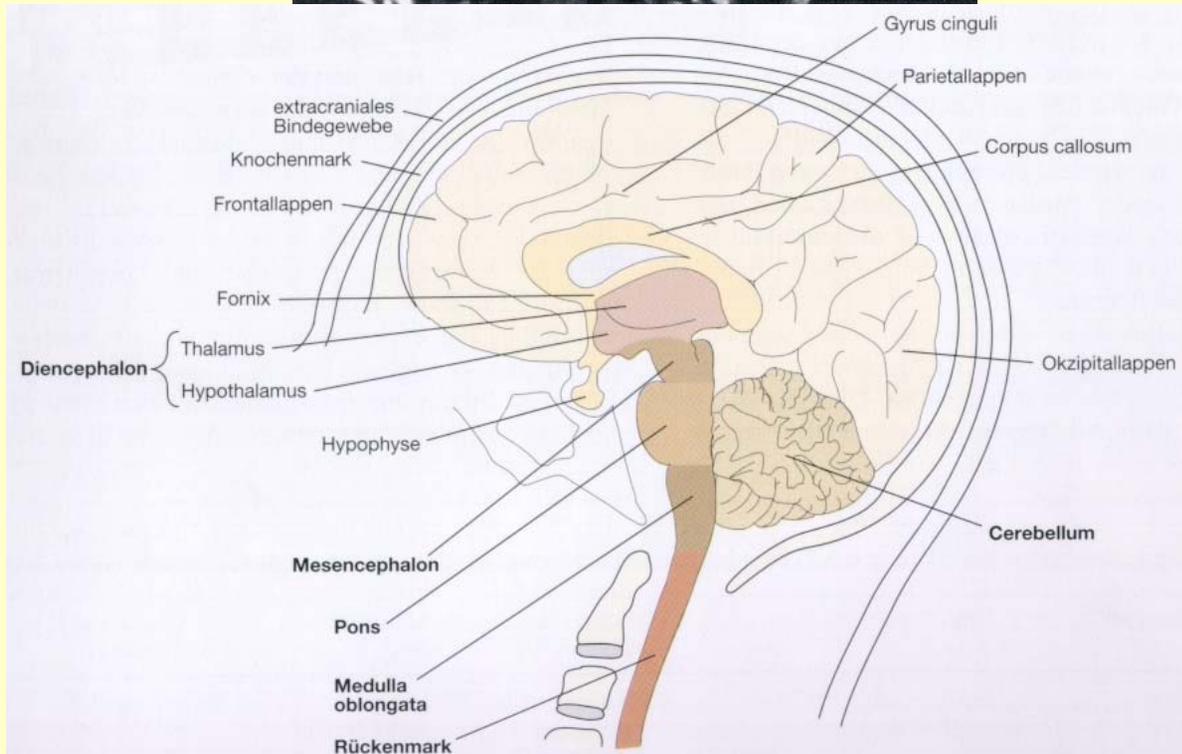
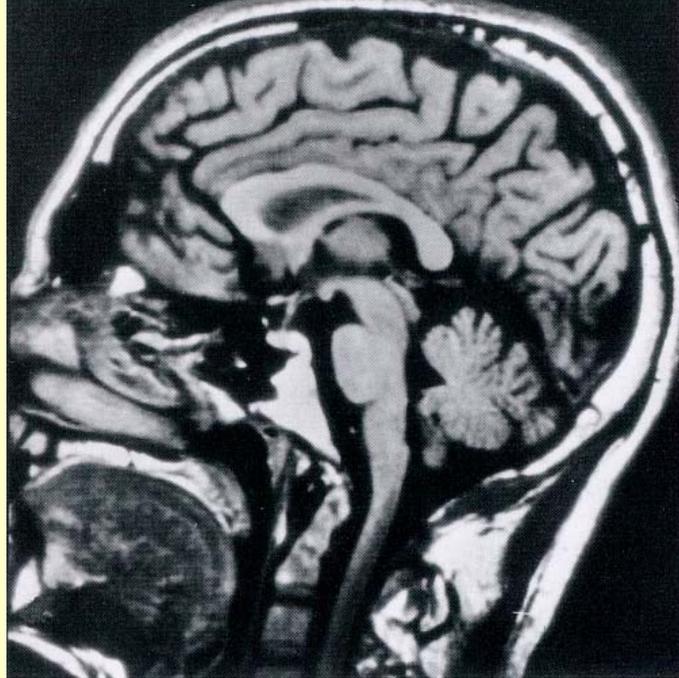
Monopolare Zelle, Golgi Färbung (Optischer Lobus, Leuchtkäfer)



Körperachsen
&
Schnittebenen



Homo sapiens
sagittaler Schnitt



weiße
Substanz



graue
Substanz

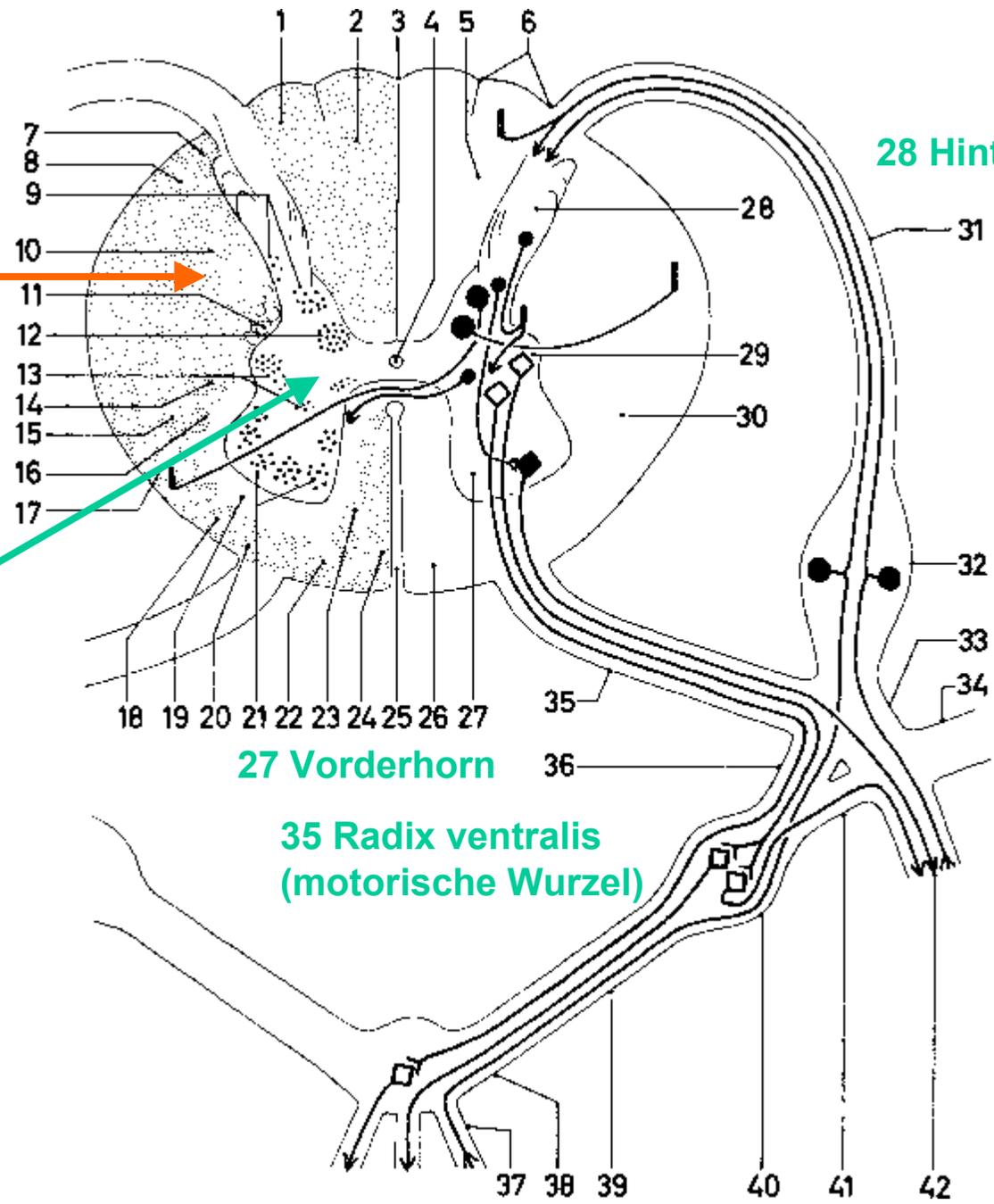


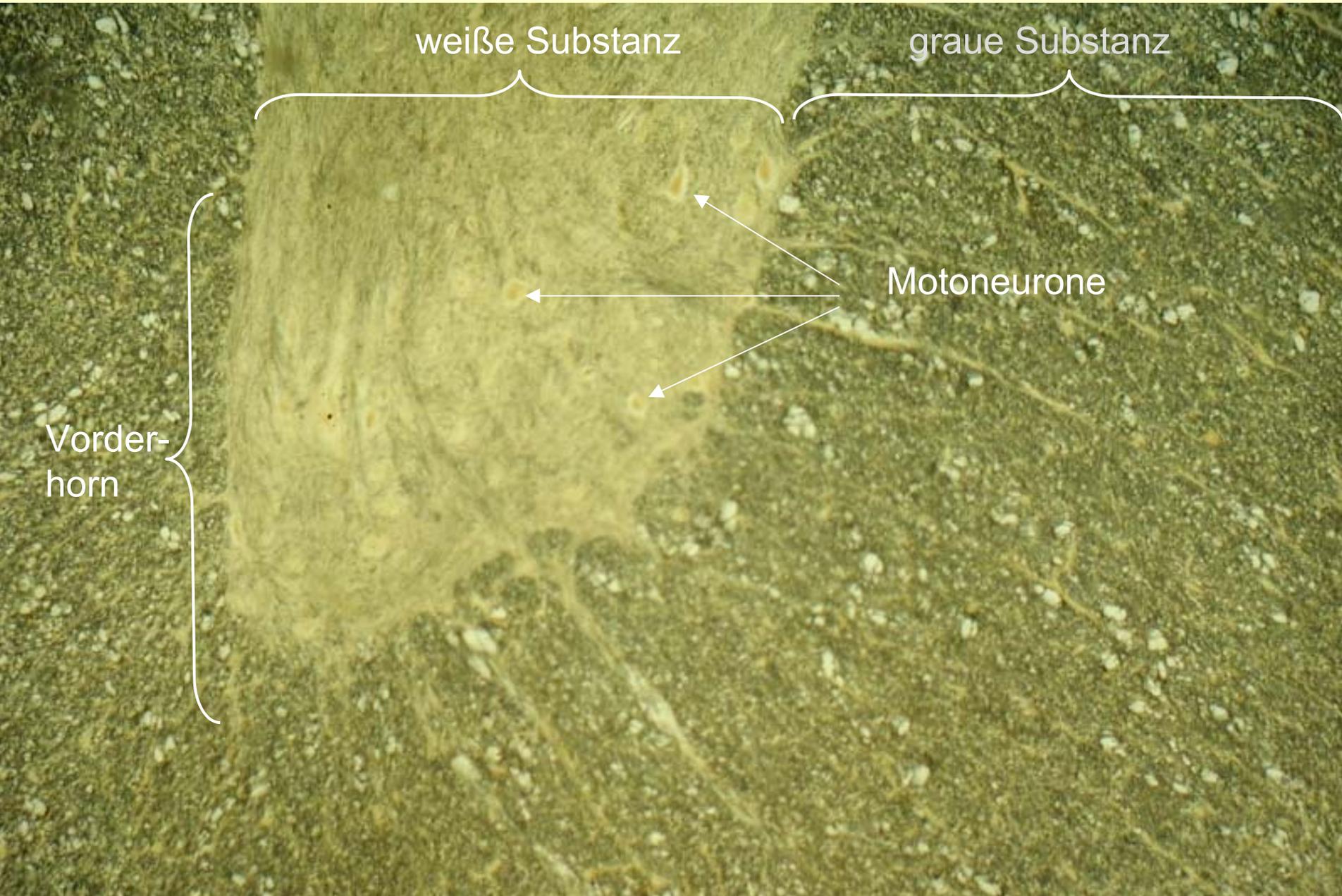
28 Hinterhorn

31 Radix dorsalis
(sensible Wurzel)

27 Vorderhorn

35 Radix ventralis
(motorische Wurzel)





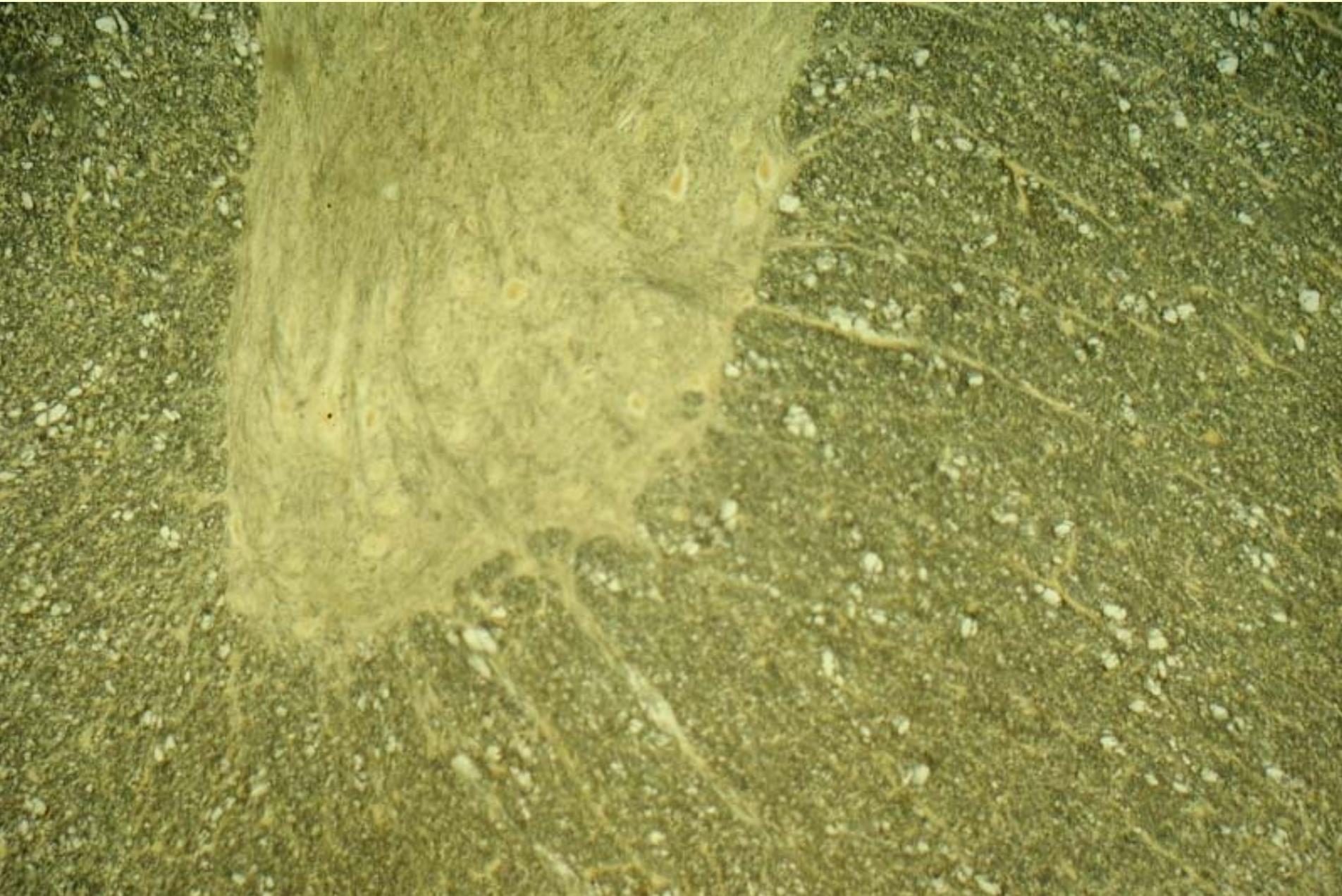
weiße Substanz

graue Substanz

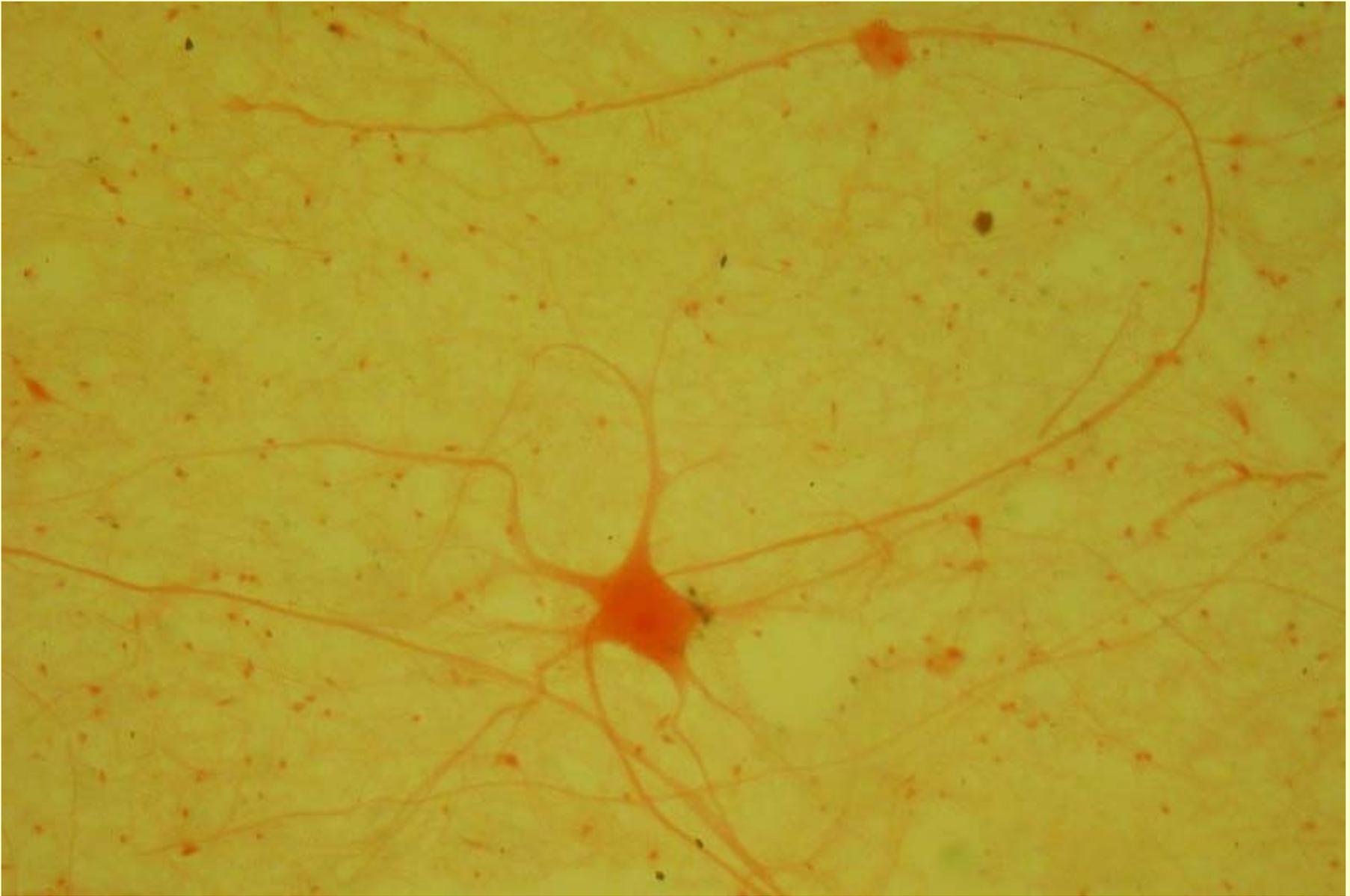
Motoneurone

Vorderhorn

Rückenmark (Mensch), Silberfärbung (nach Weigert)



Rückenmark (Mensch), Silberfärbung



Isoliertes Motoneuron aus dem Rückenmark (Hund, Karminfärbung)

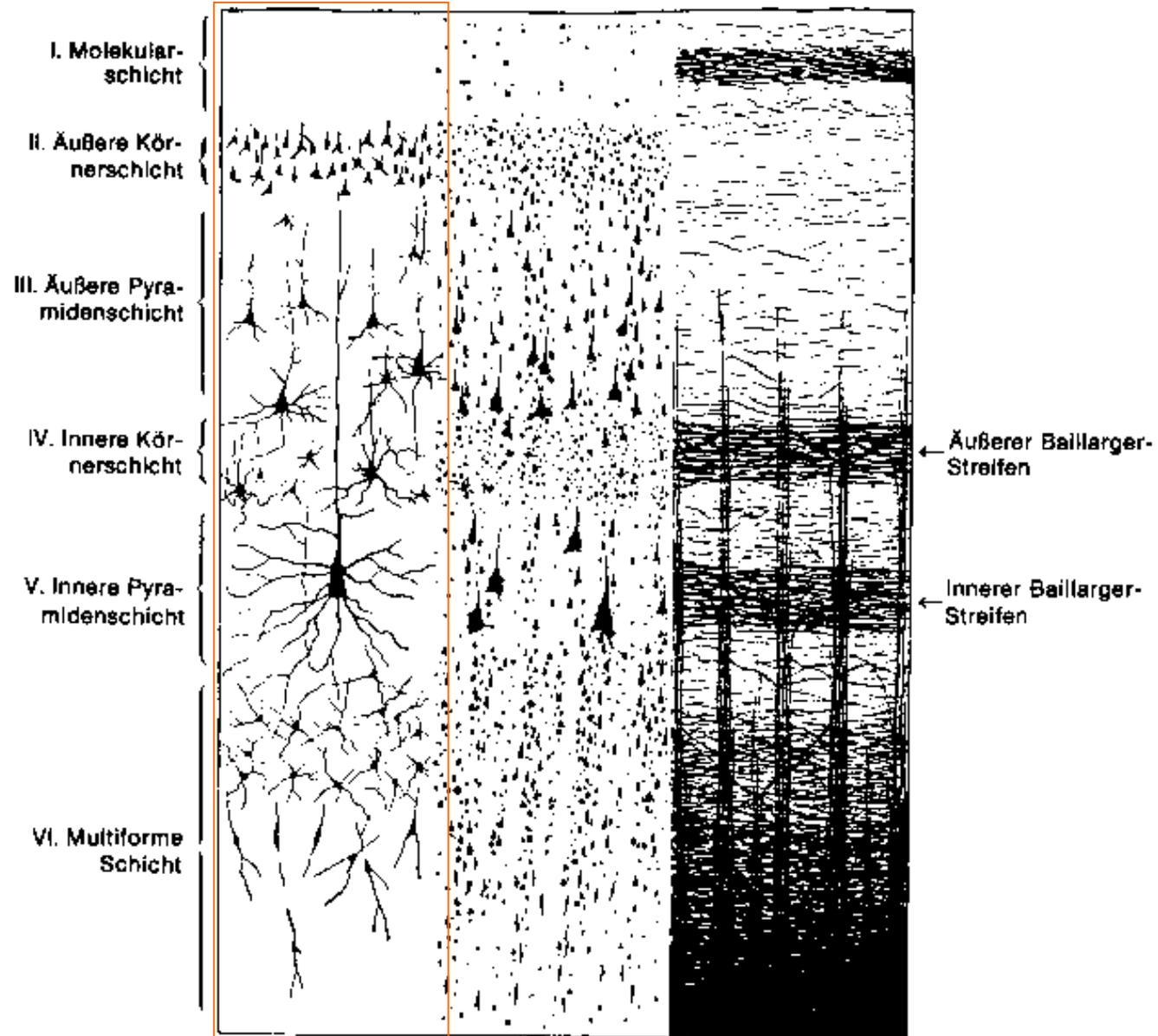
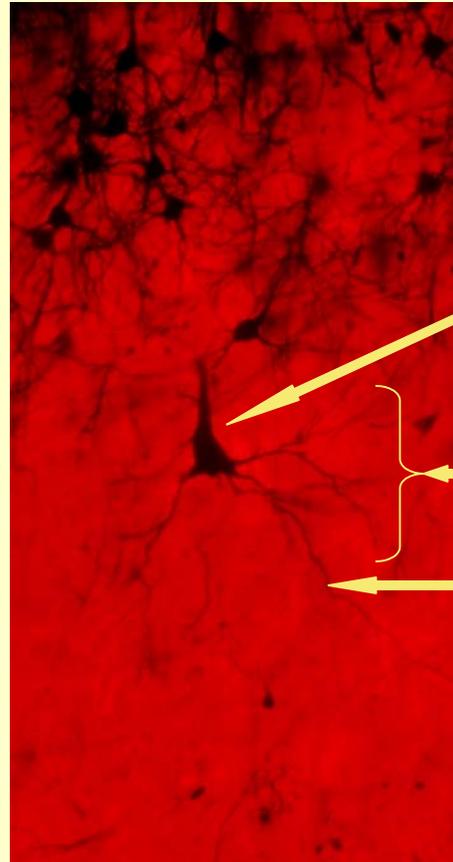
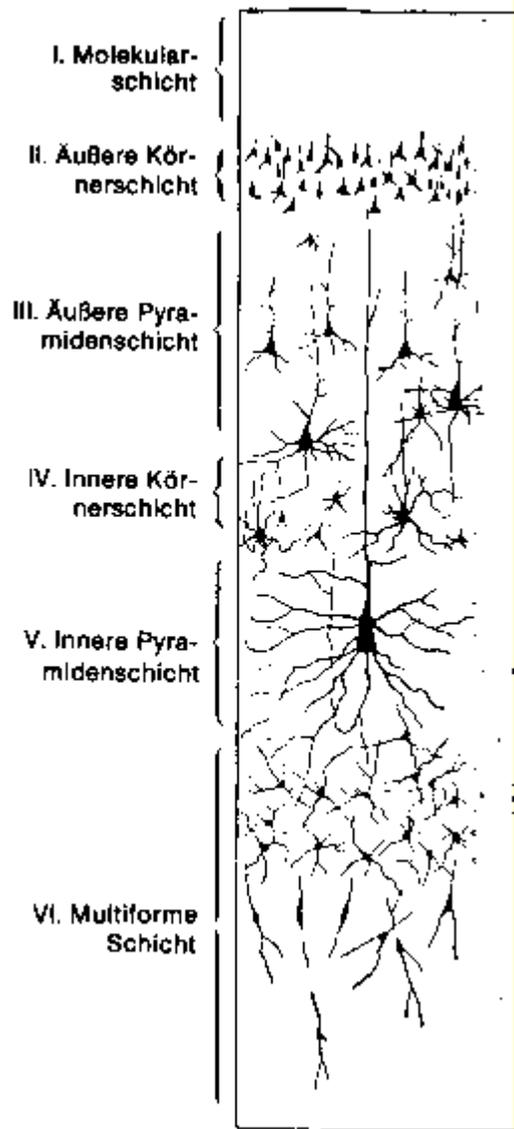


Abb. 130 Bau der Hirnrinde des Menschen, dargestellt mit drei verschiedenen Färbeverfahren. Schema nach Brodmann (aus Rauber, A., F. Kopsch: Lehrbuch und Atlas der Anatomie des Menschen, 19. Aufl. Bd. II. Thieme, Stuttgart 1955).

Chromsilber-Imprägnation

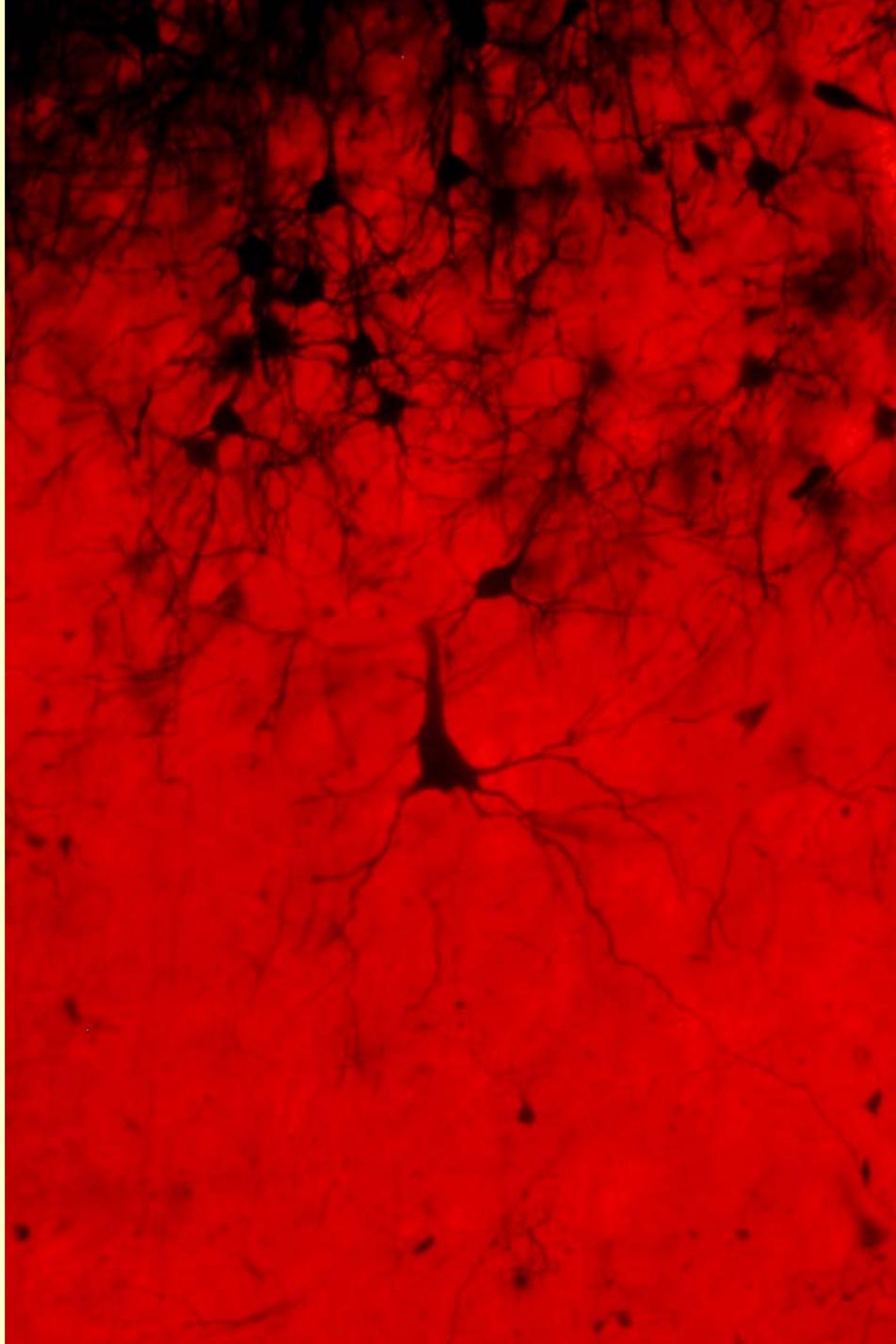


Pyramidenzelle

Dendriten

Axon

Golgi-Färbung (Ratte)



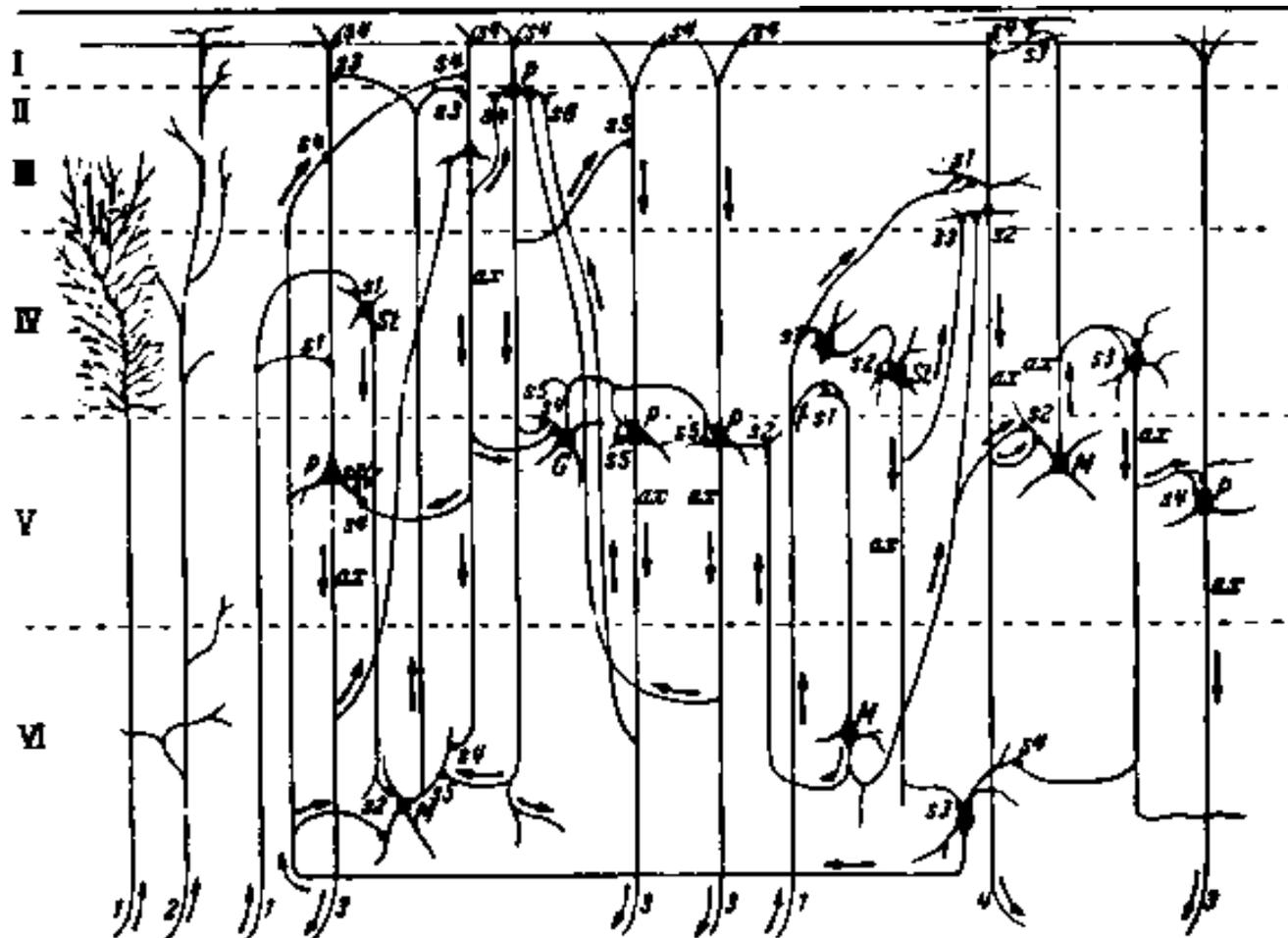


Abb. 131 Schema der Neuronenverbindungen in der Großhirnrinde. Afferentes System: 1 = Fasern aus dem Thalamus (Projektionsfasern); 2 = Fasern aus anderen Rindengebieten (Assoziationsfasern). Sie enden in den oberen Rindenschichten. Efferentes System: 3 = Projektionsfasern, z. B. der Pyramidenbahn; 4 = Assoziationsfasern zu anderen Rindengebieten. Sie verlassen die unteren Rindenschichten. Sie bilden die Grundlage zur Bildung von Erregungskreisen in verschiedenen Schichten. P = Pyramidenzellen; St = Sternzellen; G = granuliert oder Körnerzellen; ax = Axone (nach Lorente de No u. Larsell aus Schwieglk, H.: Handbuch der inneren Medizin, Bd. V/1. Springer, Berlin 1953).

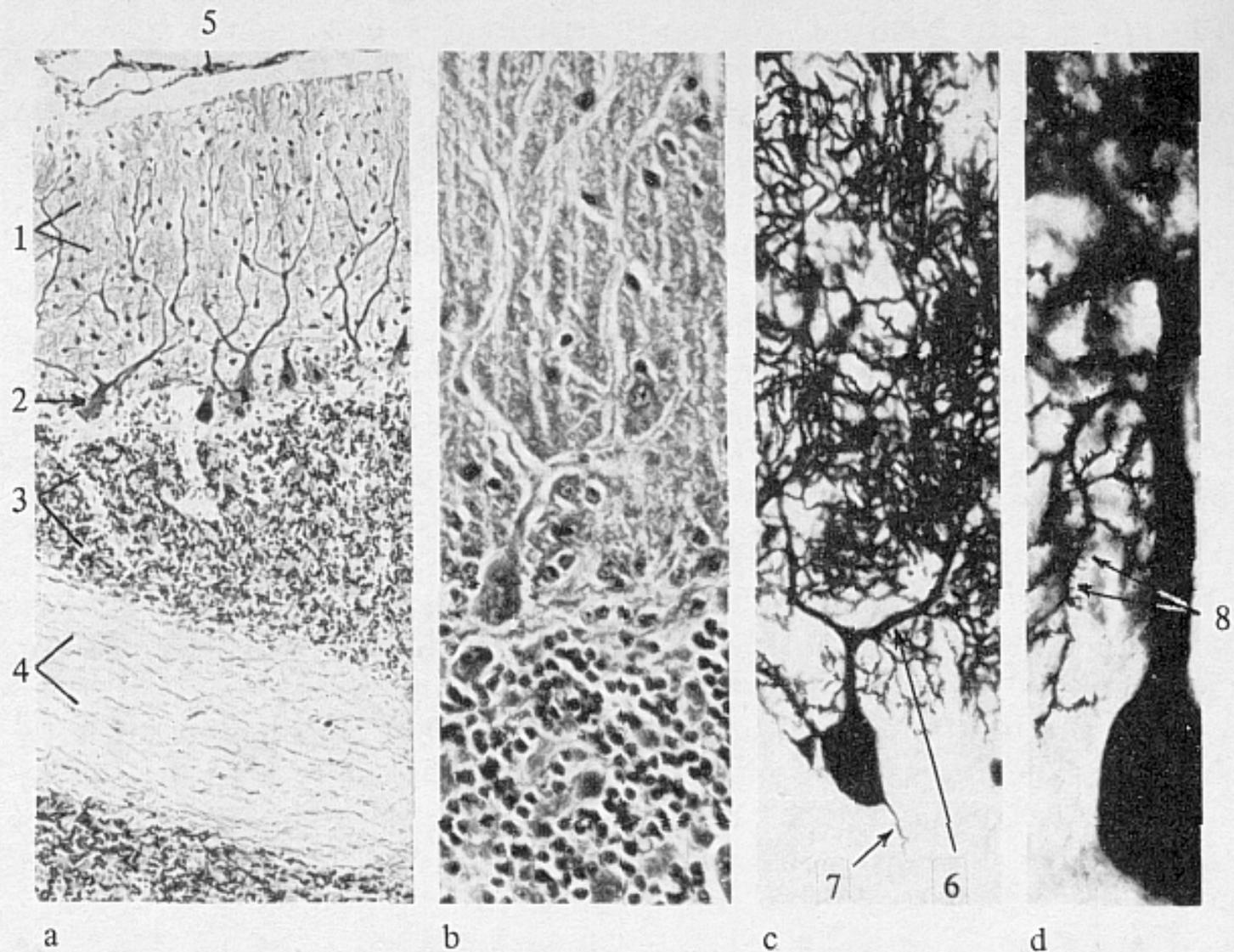


Abb. 128 Kleinhirn. a) Übersicht. Rinde: 1 = Stratum moleculare, 2 = Stratum gangliosum (Purkinje-Zellschicht), 3 = Stratum granulosum. 4 = Mark, 5 = Pia mater. Versilberung (Bodian). b) Rinde in Übersichtsfärbung (Luxol Fast Blue). c) Purkinje-Zelle im Golgi-Präparat, 6 = Dendrit, 7 = Axon. d) Stärkere Vergrößerung aus c), 8 = Synapsen am Dendriten sichtbar. Vergr. a) 70fach, b) und c) 220fach, d) 560fach.

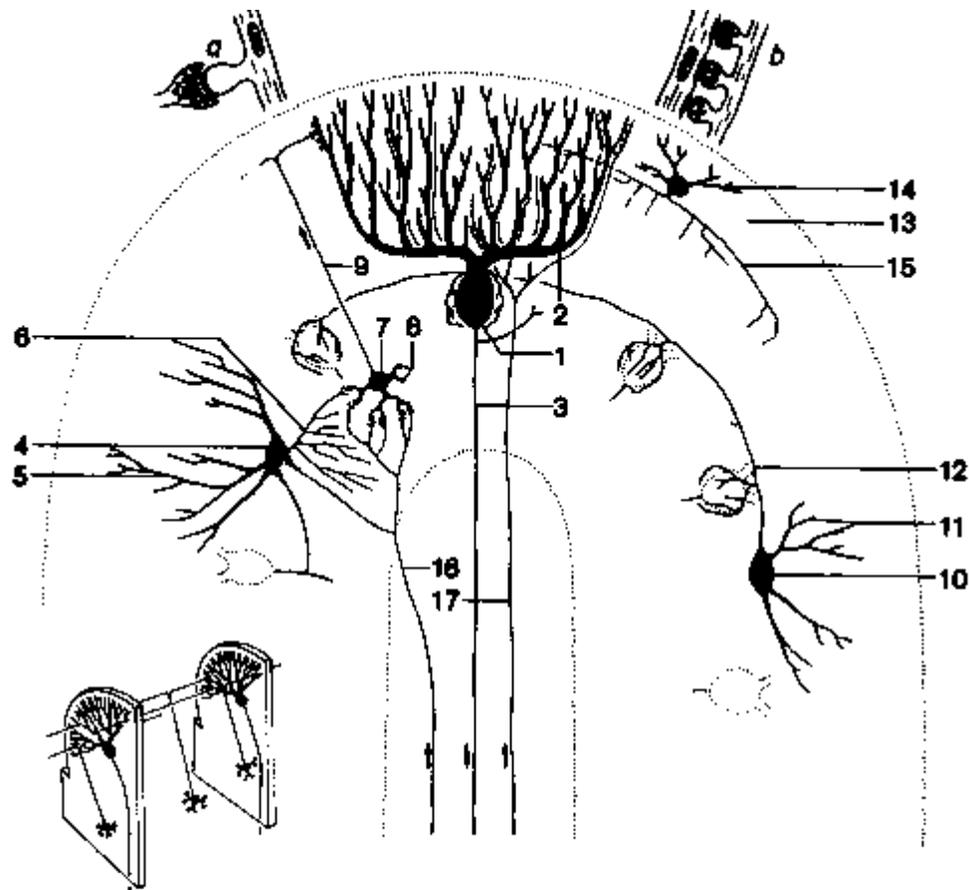
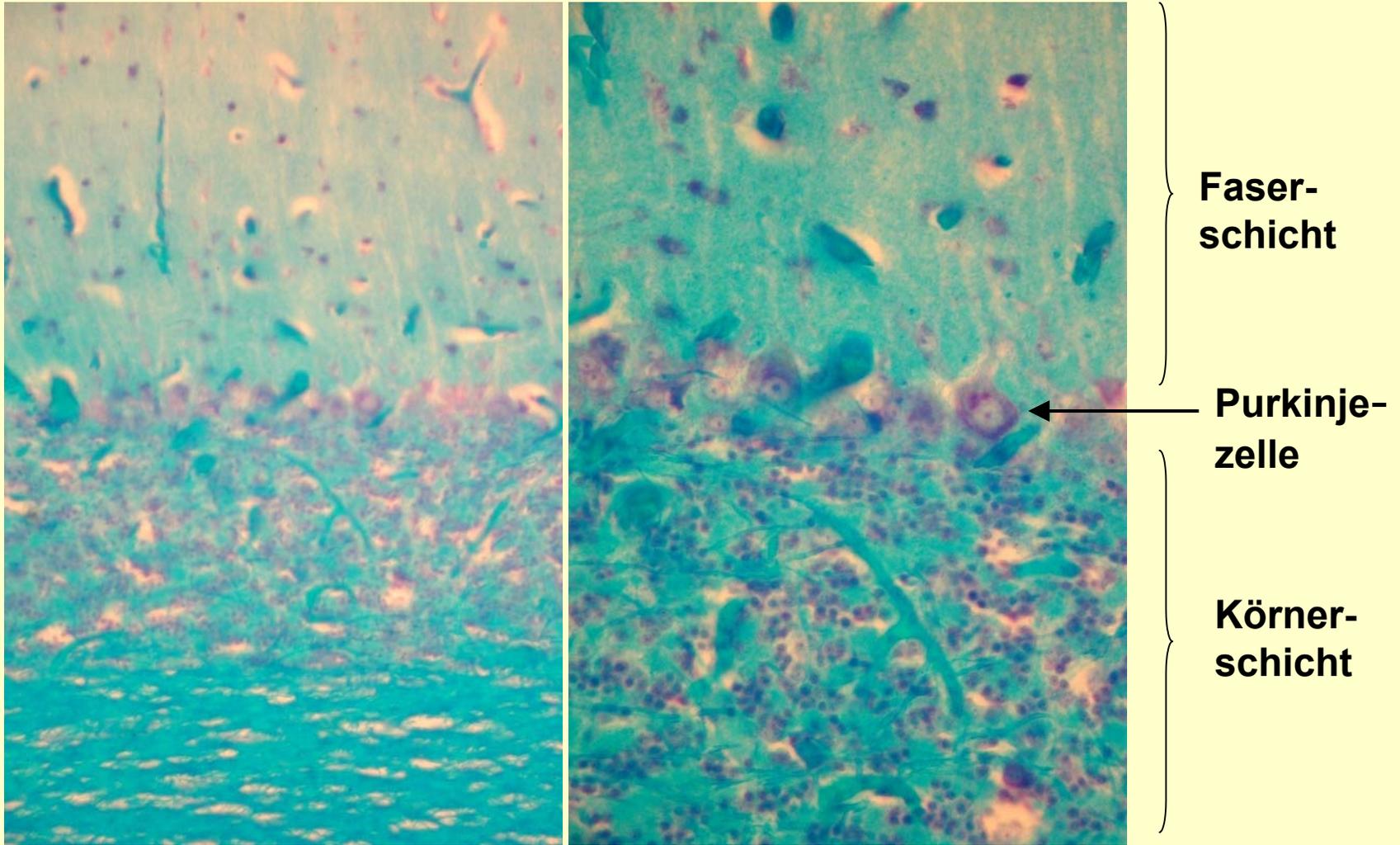
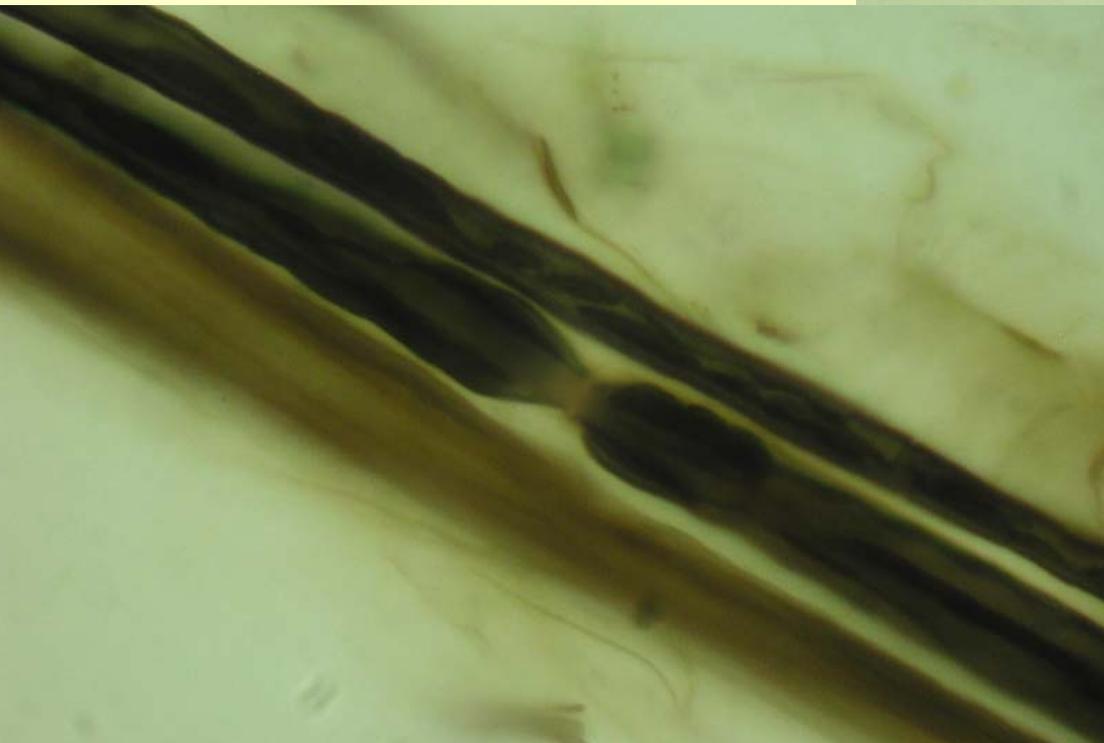
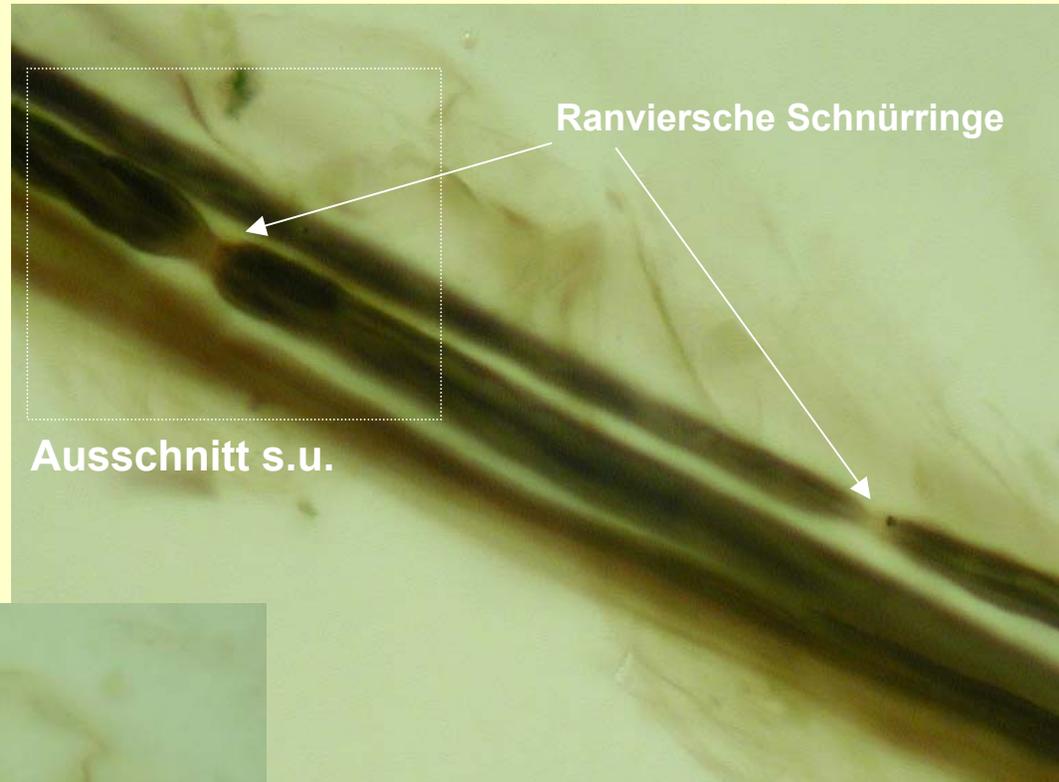


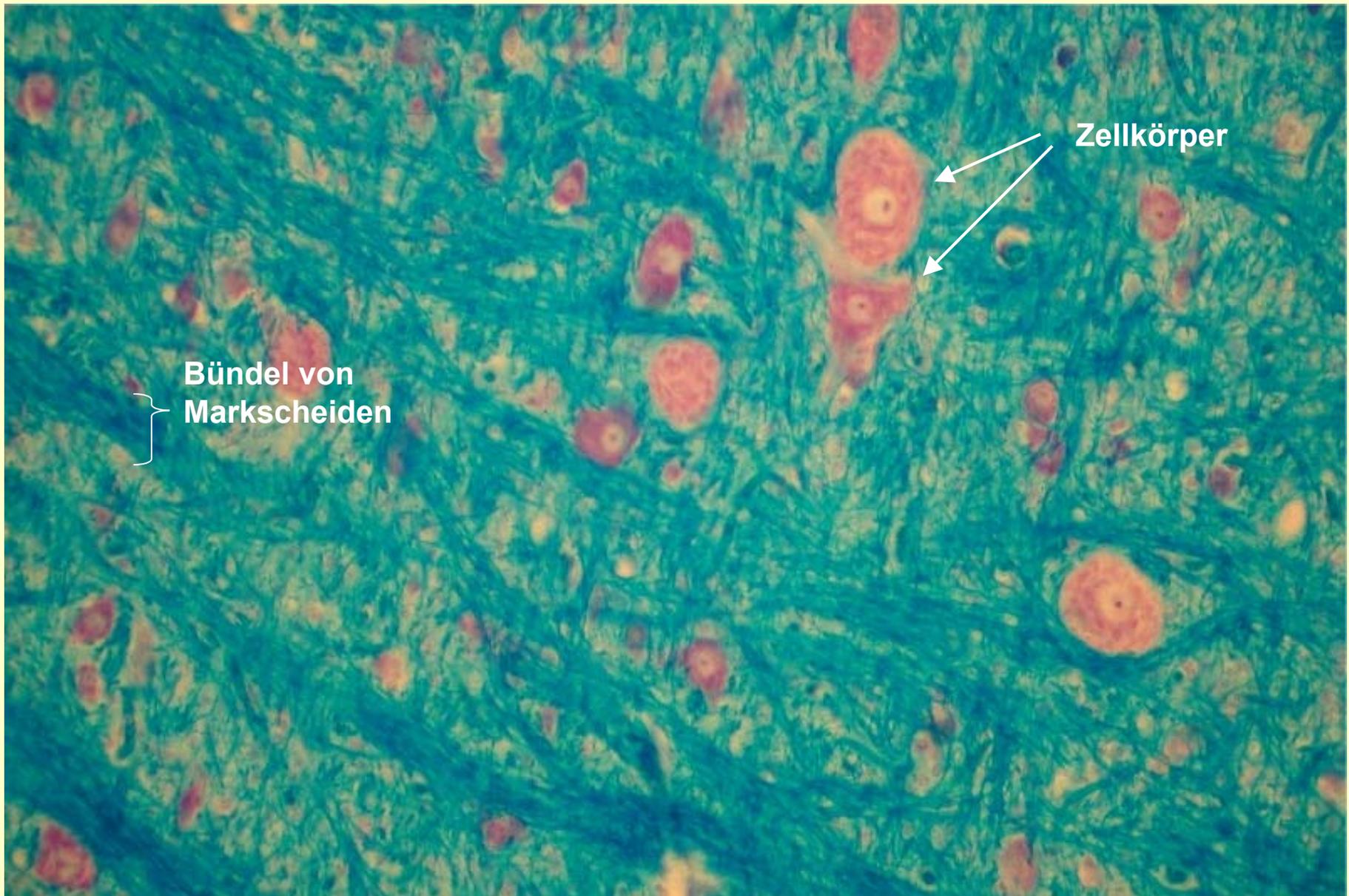
Abb. 129 Kleinhirnrinde, Versilberung, Auswahl einiger typischer Zellen. 1 = *Purkinje-Zelle* mit Dendritenbaum 2 und Neurit 3 (mit zellnaher rückläufiger Kollaterale), 4 = *Golgi-Zelle* mit Dendriten 5 und Neurit 6, 7 = *Körnerzelle* mit Dendriten 8 und Neurit 9 (teilt sich im Stratum moleculare auf und läuft eine lange Strecke in Richtung des Gyruverlaufs, kann deshalb an diesem Querschnitt nicht weiter verfolgt werden). 10 = *Korbzelle* mit Dendriten 11 und Neurit 12, der Kollateralen zu den Purkinje-Zellen abgibt, 13 = *Sternzelle* mit Dendriten 14 und Neurit 15, 16 = *Moosfaser* (= Neurit), 17 = *Kletterfaser* (= Neurit). Die Pfeile geben die Verlaufsrichtung der Erregungsleitungen an. a) E: Schema einer Synapse einer Körnerzelle am Purkinje-Zelldendriten. b) E: Schema von Synapsen einer Kletterfaser am Purkinje-Zelldendriten („Parallelkontakt“). Halbschematisch. Links unten verkleinertes Schema der räumlichen Anordnung der Purkinje-Zelldendriten und des Verlaufs der Körnerzellneuriten.



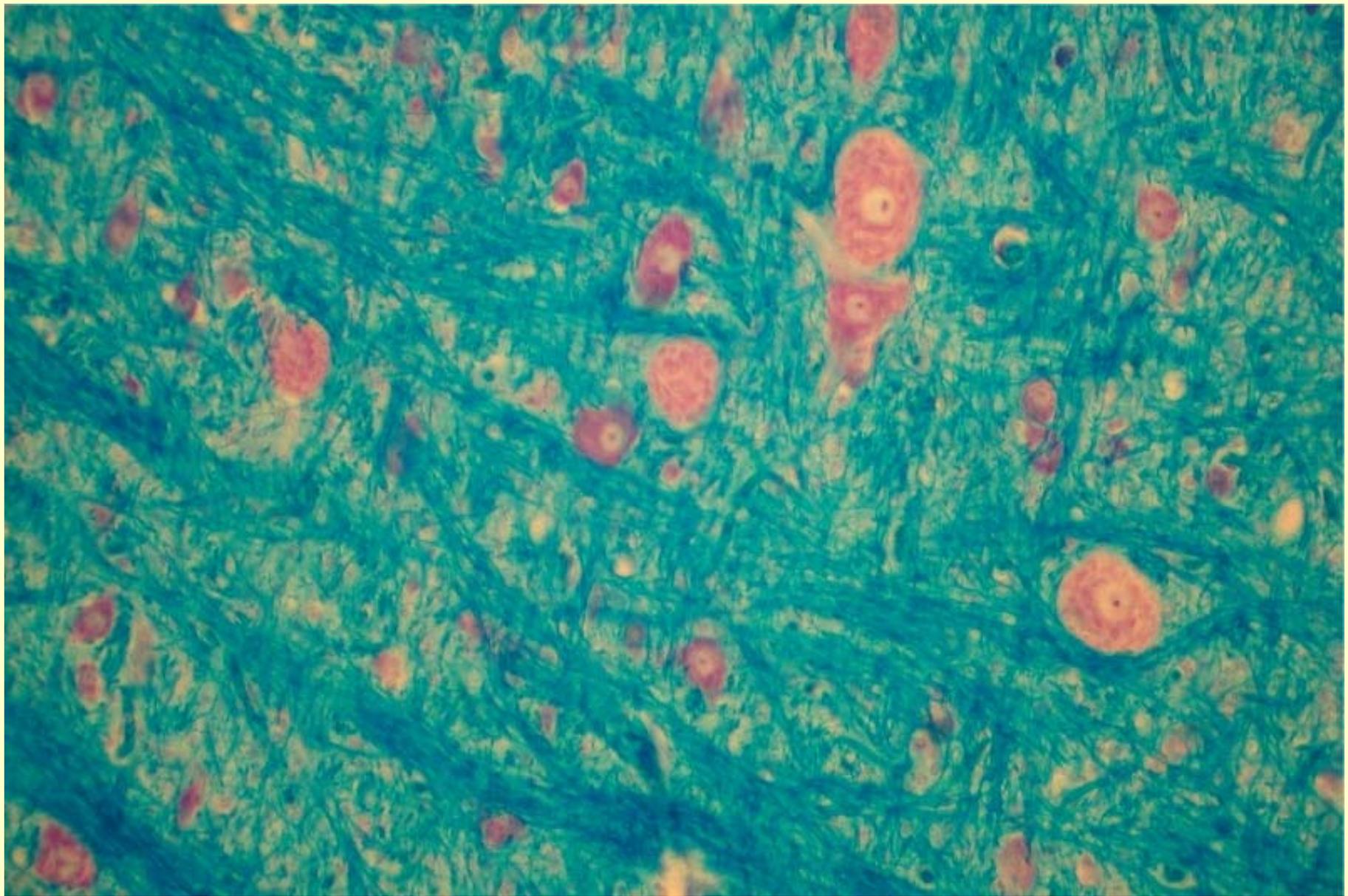
Ausschnitt aus dem Kleinhirn der Ente in zwei Vergrößerungen
Färbung mit Luxol-Fast-Blue und Kresylviolett

Isolierte Nervenfasern (Frosch)
Imprägnation mit Osmium-
tetroxid zur Darstellung
der Myelinhülle





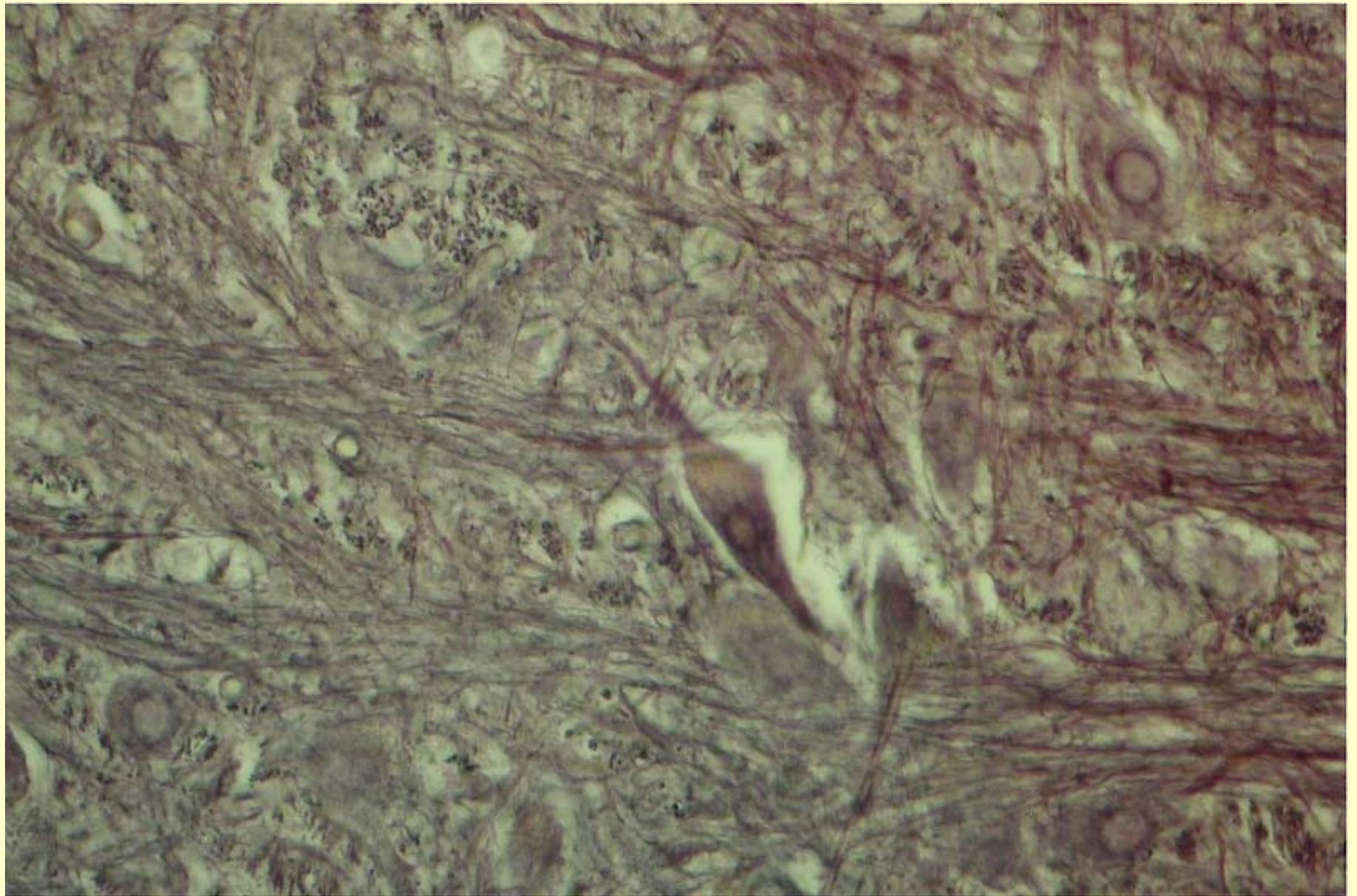
Ausschnitt aus dem Stammhirn der Ente
Färbung mit Luxol-Fast-Blue und Kresylviolett



Ausschnitt aus dem Stammhirn der Ente
Färbung mit Luxol-Fast-Blue und Kresylviolett



Ausschnitt aus dem Stammhirn der Ente
Versilberung nach Bodian (Neurofibrillen)

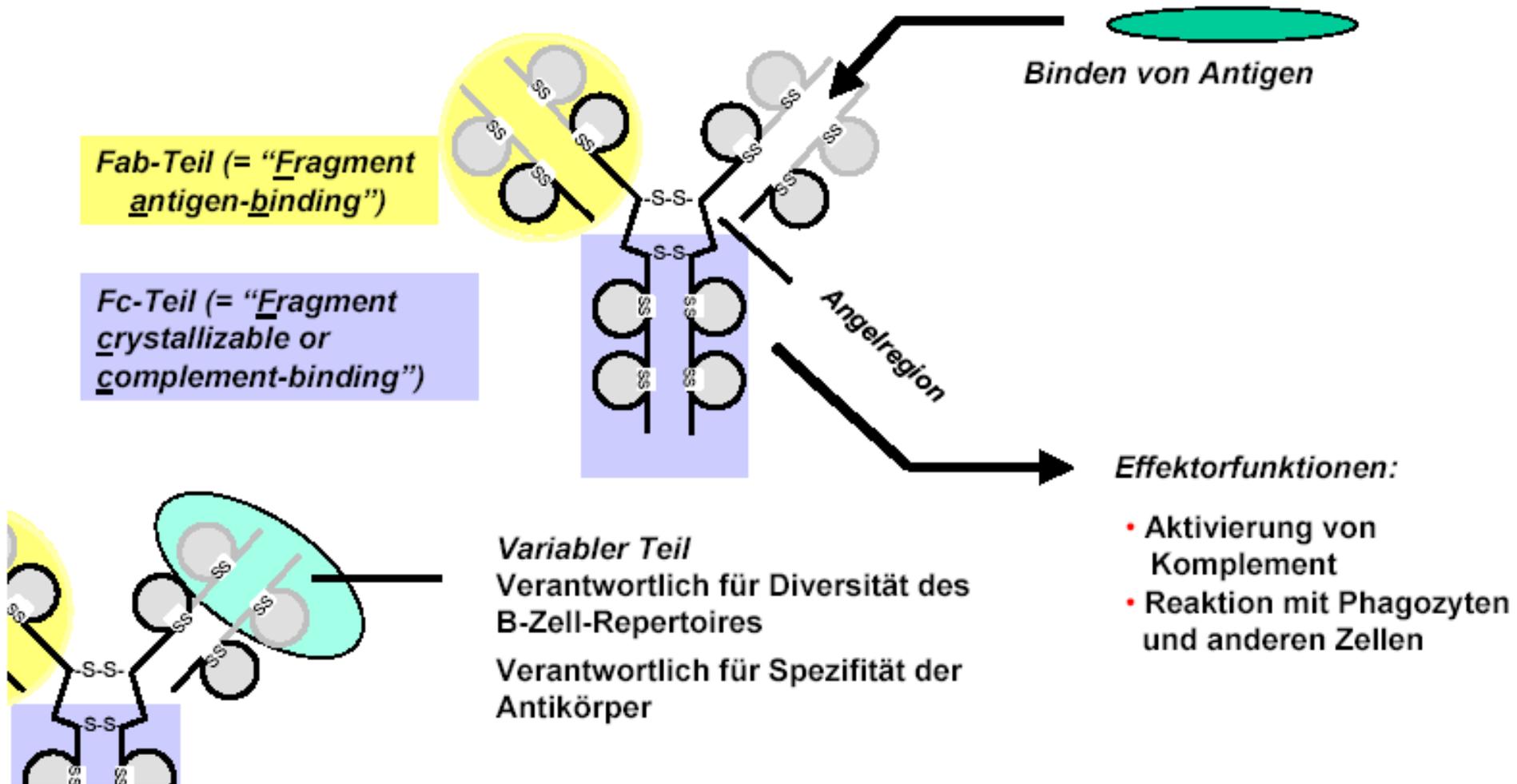


Ausschnitt aus dem Stammhirn der Ente
Versilberung nach Bodian (Neurofibrillen)

Antikörper sind Polypeptide mit zwei unterschiedlichen Eigenschaften

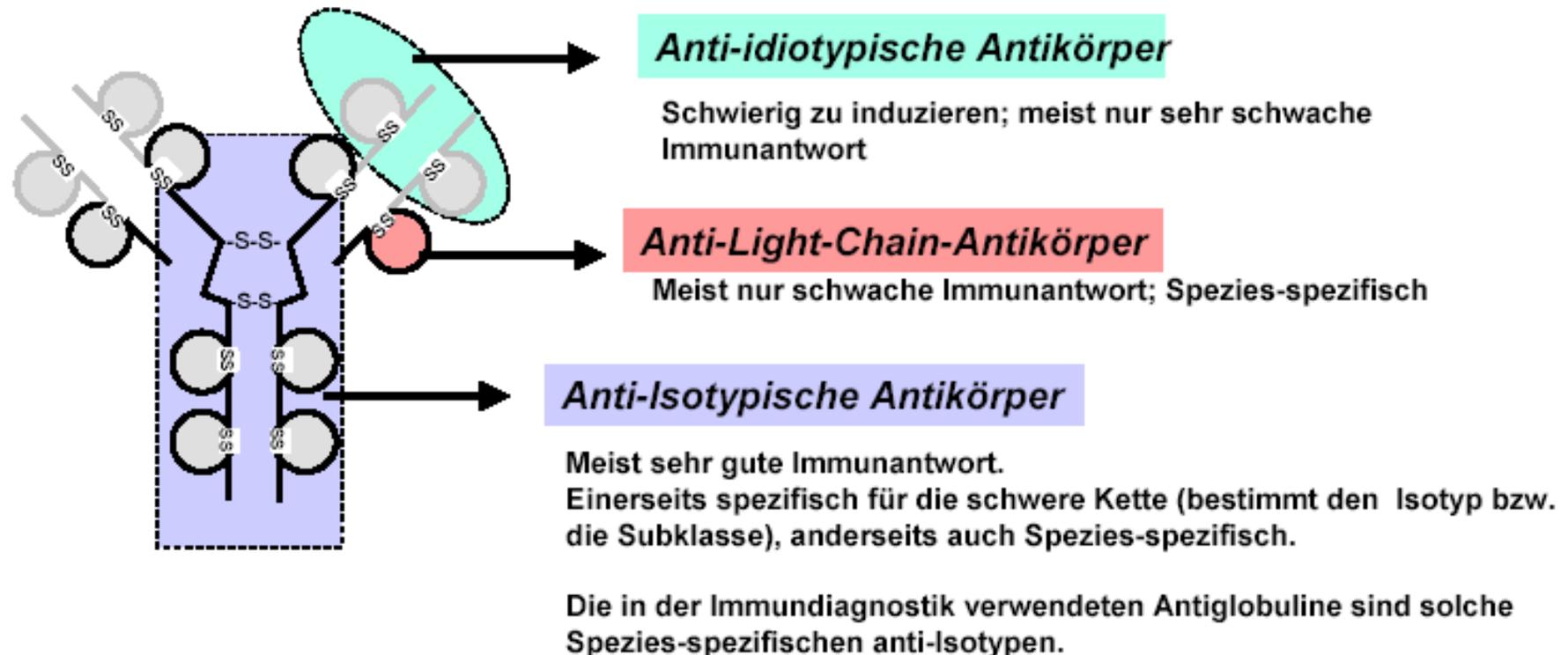
Fab-Teil (= "Fragment antigen-binding")

Fc-Teil (= "Fragment crystallizable or complement-binding")

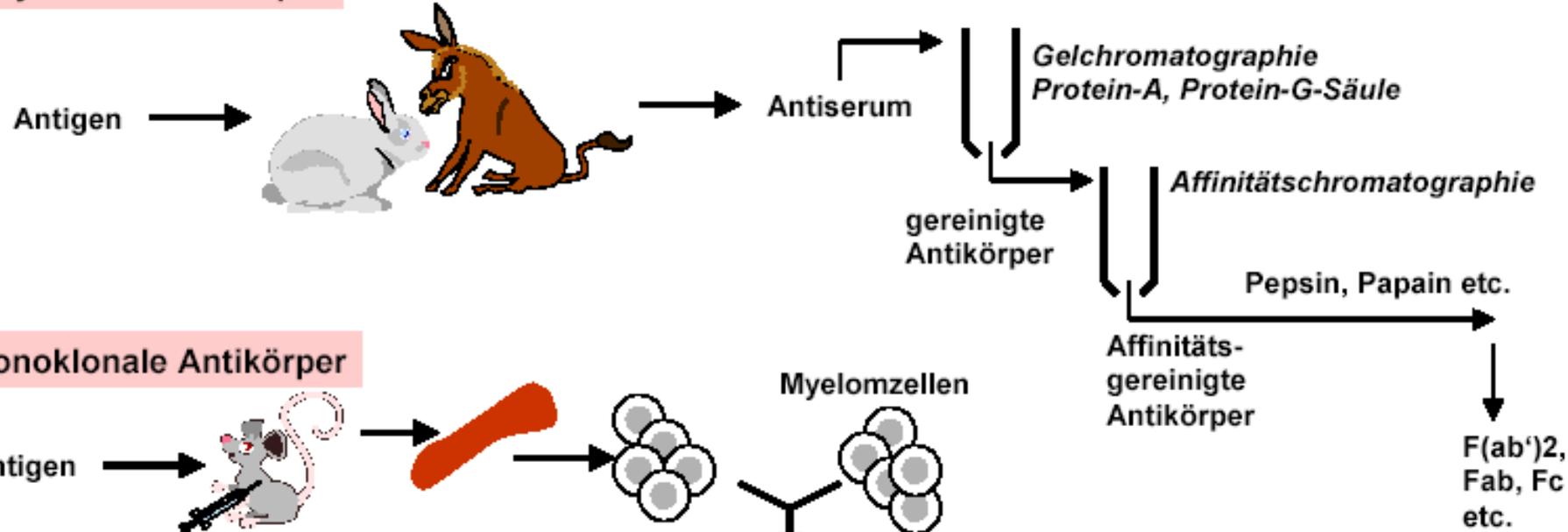


Antikörper sind Antigene und rufen die Bildung von anti-Antikörpern (Antiglobulinen) hervor.

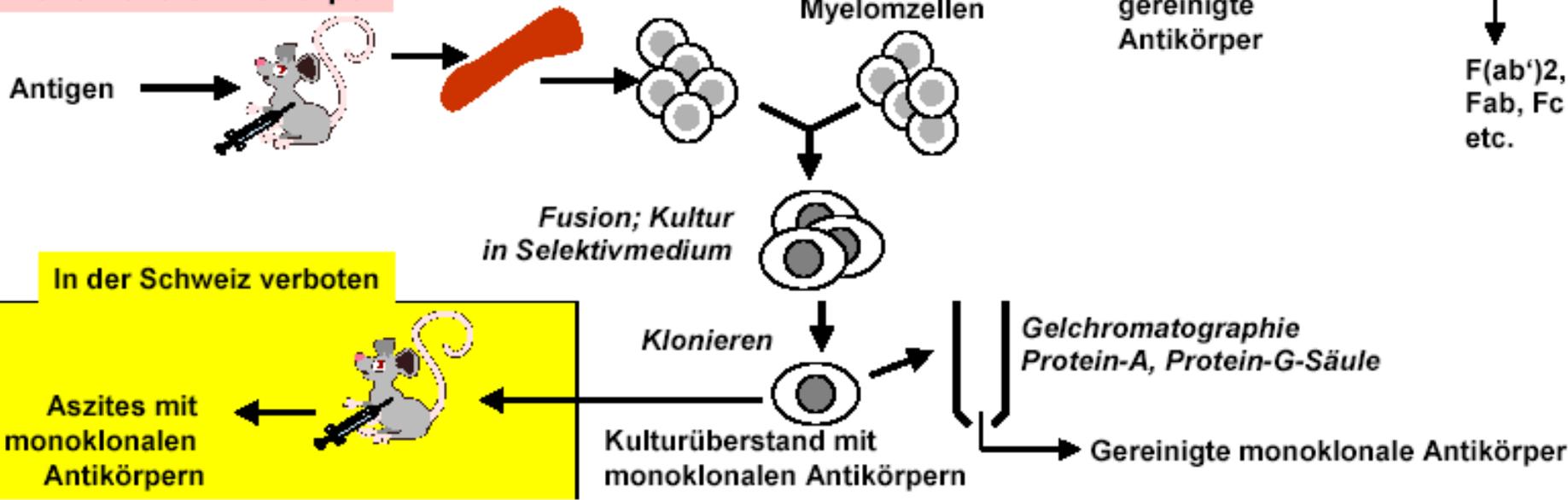
Verwendet man einen Antikörper als Antigen und injiziert sie in gereinigter Form in ein Versuchstier, bilden sich:



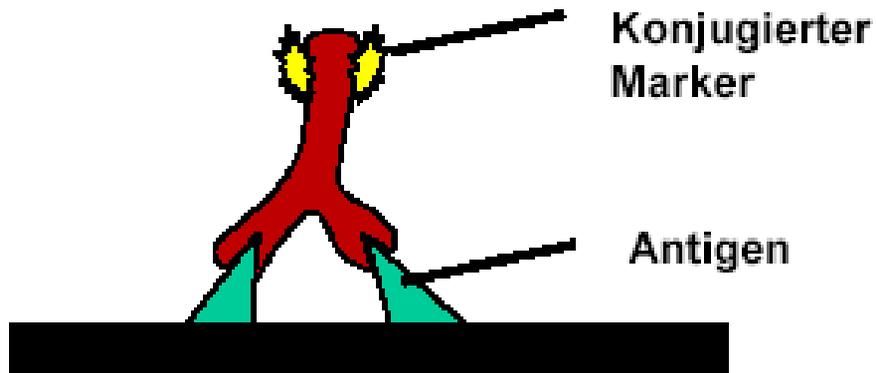
Polyklonale Antikörper



Monoklonale Antikörper



Einstufige Reaktion



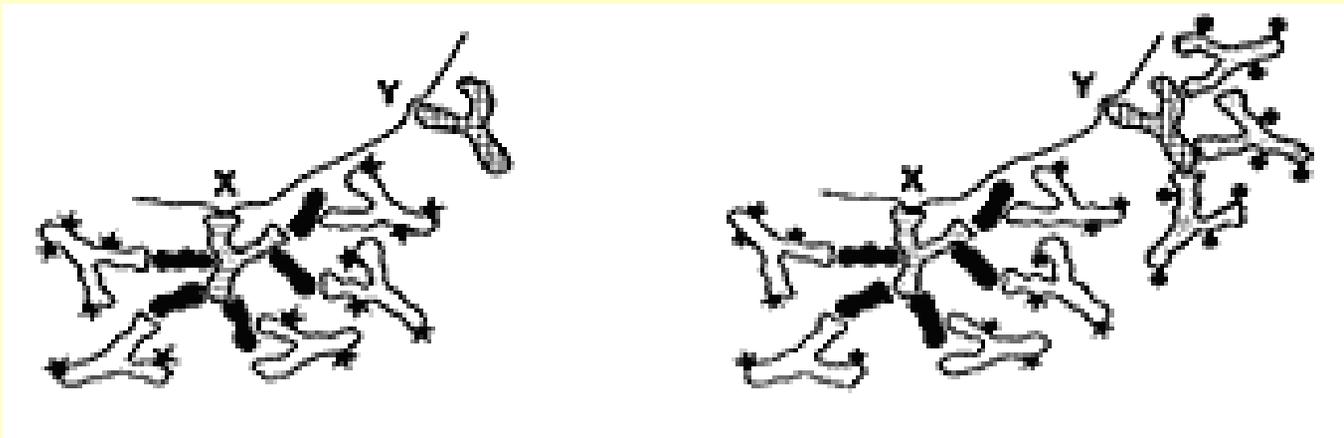
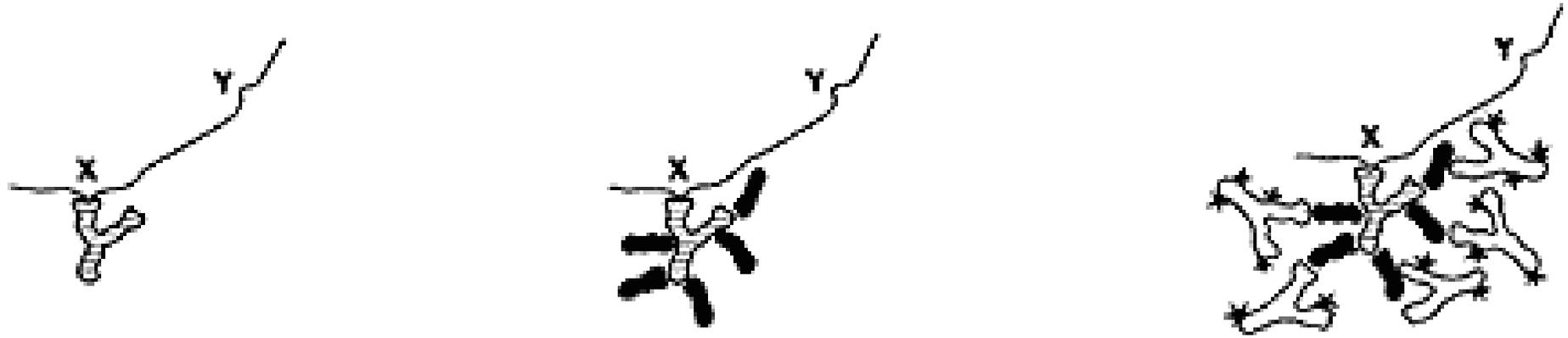
Mehrstufige Reaktionen





Beispiel: Zwei Primärantikörper aus Maus

Die im Überschuß eingesetzten Fab-Fragmente decken den ersten Primärantikörper vollständig ab, so daß keine freien Bindungsstellen mehr vorhanden sind. Anschließend kann der zweite Primärantikörper mit einem üblicherweise eingesetzten Sekundärantikörper detektiert werden.



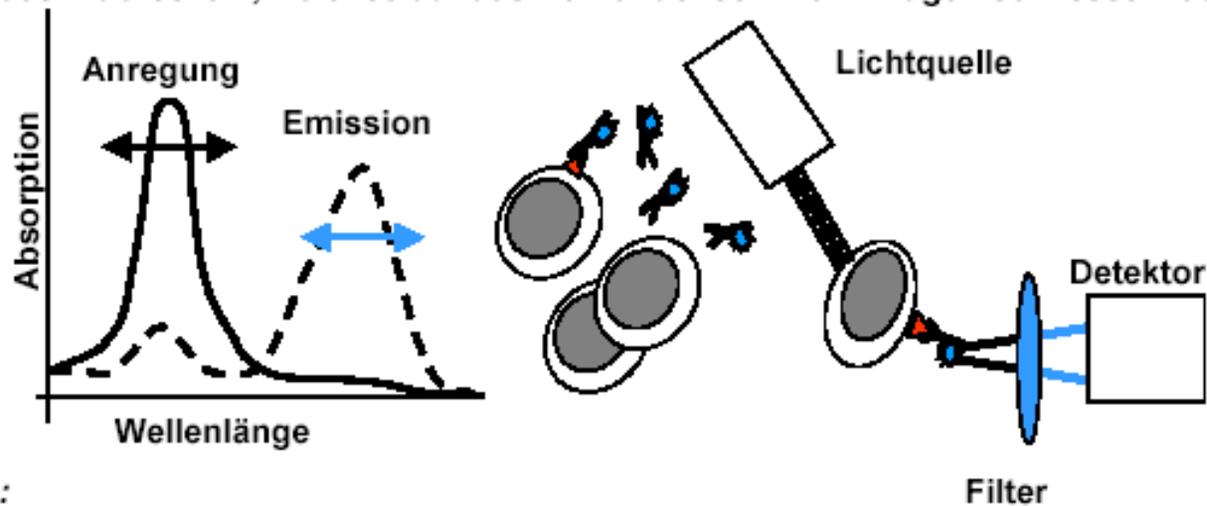
Zwei Primärantikörper aus Kaninchen

Die im Überschuß eingesetzten Fab-Fragmente decken den ersten Primärantikörper vollständig ab, so daß keine freien Bindungsstellen mehr vorhanden sind. Zusätzlich wird der erste Primärantikörper aus Kaninchen mit den Fab-Fragmenten aus Ziege maskiert, der dadurch mit einem gebräuchlichen Maus anti-Ziege Antikörper detektiert werden kann. Anschließend kann der zweite Primärantikörper mit einem üblicherweise eingesetzten Sekundärantikörper nachgewiesen werden.

Prinzip:

Bei der Immunfluoreszenz verwendet man immunologische Reagenzien (z.B. Antikörper), die mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert sind. Wird ein solches Fluoreszenz mit Licht geeigneter Wellenlänge angeregt, sendet es längerwelliges Licht aus (es "leuchtet"). Das Fluoreszenzlicht wird durch geeignete Filter herausgefiltert und aufgefangen.

Die Immunfluoreszenz ist nichts anderes als ein Mikroskop mit einem Präparat, das bei geeigneter Emissionswellenlänge betrachtet wird. Das natürliche Licht (inkl. Anregungslicht) wird weggefiltert, man sieht nur noch das Fluoreszenz, welches auf das Vorhandensein von Antigenen schließen lässt.



Abwandlungen:

- Flowzytometrie: Die Fluoreszenz von Einzelzellen werden im Durchfluss erfasst (siehe zelluläre Methoden).
- "Laser Confocal Microscope": Immunfluoreszenzmikroskopie kombiniert mit schichtweisem Erfassen der Information und Speicherung der Information mittels Computer.