

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden durchgeführt an 19 Rotwangenschmuckschildkröten (*Trachemys scripta elegans*) beiden Geschlechts. Das Gewicht betrug zwischen 109,0 g - 650,0 g, die ventrale Panzerplatte maß 10 - 14 cm. In einem der Experimente wurde eine kleinere Schildkröte untersucht (65,0 g, ventrale Panzerplatte 2,7 cm). Die Tiere stammten aus Berliner Zoohandlungen und wurden unmittelbar zur Untersuchung erstanden.

### 2.2 Präparation

Die Versuchstiere erhielten intraperitoneal eine Injektion von Pentobarbitalnatrium in 0,9% NaCl. Nach Ausbleiben des Konjunktival-Reflexes (sowie Herz- und Atemstillstand) wurde die ventrale Panzerplatte unter Verwendung einer elektrischen Knochensäge gelöst und es erfolgte mittels peristaltischer Pumpe (Desaga) eine transkardiale Perfusion von etwa 1,5 Litern eisgekühlter 4%iger Paraformaldehyd-Lösung in 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4 für die Dauer von ca. 20 Minuten.

Im Anschluss wurde der Gastrointestinal- und der Urogenitaltrakt in toto von anal her präpariert. Es folgte die Präparation von Lunge und Luftwegen, der Kopf wurden abgetrennt und verschiedene spinale und sympathische Ganglien wurden präpariert. Die Organe wurden dann zum Gefrierschutz bei 4°C für etwa 24 Stunden in eine 20%ige Saccharoselösung gegeben. Das zu untersuchende Gewebe wurde nun mittels Skalpell oder Rasierklinge passend zur Objektträgergröße zerteilt und mit Hilfe eines Einbettungsmediums (Tissue-Tec) im Kryostaten (2800 Frigocut E, Reichert-Jung) aufgefroren. Das Material wurde dann innerhalb einer Woche verarbeitet und bis dahin bei -22°C luftdicht aufbewahrt. Die geweblichen Präparationen erfolgten unter Zuhilfenahme des Anatomieatlas *Laboratory*

*Anatomy of the Turtle* (Ashley, 1962).

### 2.3 Anfertigung der Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte wurden bei  $-25^{\circ}\text{C}$  direkt auf mit Chromalaun (0,025%)-Gelatine (0,25%)-beschichtete Objektträger aufgenommen. Nun erfolgte durch ein wenige Minuten dauerndes Antauen der Schnitte eine Fixierung auf den Objektträgern. Diese wurden wiederum bei  $-22^{\circ}\text{C}$  für einige Tage aufbewahrt oder direkt den Markierungsprozeduren zugeführt. Die Schnitte betragen  $20\ \mu$ , bis auf die erste und zweite Untersuchungsreihe, diese wurden in  $60$  bzw.  $40\ \mu$  Schnittdicke angefertigt.

### 2.4 Pufferlösungen

Folgende Pufferlösungen wurden verwendet:

PBS:  $0,145\ \text{M NaCl}$ ,  $0,01\ \text{M Phosphat}$ , pH 7,1-7,2 bestehend aus  $8,5\ \text{g NaCl}$ ,  $1,07\ \text{g NaHPO}_4$  und  $0,39\ \text{g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\ \text{H}_2\text{O}$  pro Liter Aqua destillata.

PBST: PBS mit 0,3% Lösung Triton X-100 (Sigma, St. Louis).

### 2.5 NADPH-Diaphorase-Histochemie

Zur Markierung wurde eine Lösung aus  $1\ \text{mg/ml NADPH}$  (Biomol, Hamburg) und  $0,25\ \text{mg/ml Nitroblau-Tetrazolium}$  (Serva, Heidelberg) in  $100\ \text{mM Natriumphosphatpuffer}$  (PB) mit 0,3% Triton X-100 (Sigma, St. Louis) hergestellt. Um die Membranpermeabilität zu erhöhen, wurden die Kryostatschnitte bei Raumtemperatur für eine Stunde mit einer 0,3% Lösung Triton X-100 (Sigma, St. Louis) in PB vorinkubiert. In den meisten Untersuchungen

wurde der Histochemie die indirekte Immunfluoreszenz (s.u.) vorgeschaltet; die NADPH Diaphorase-Reaktion erfolgte dann 1-3 Tage nachdem die Gewebeschnitte fotografiert waren.

Jeder Objektträger wurde mit ca. 200 µl Lösung für 1,5 - 2,5 Stunden bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Reaktion wurde durch einmaliges Spülen mit Aqua bidestillata beendet.

Zum Abschluss folgte zur Konservierung der Gewebeschnitte das Eindeckeln der Objektträger. Anfänglich erfolgte dies mit Glyceringelatine (Kaiser's), in späteren Untersuchungsreihen nach Dehydrierung mittels Entellan (Merck), da dies eine bessere Haltbarkeit gewährleistet.

## 2.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Der für den Nachweis von NOS eingesetzte Antikörper stammt von Dr. Bernd Mayer, Graz. Mayer et al. stellten 1990 das Antiserum her, das gegen die aus dem Zerebellum des Schweins gereinigte Stickoxidsynthase gerichtet ist. Die polyklonalen Antikörper stammen aus Kaninchen.

Nach einer Vorinkubation von einer Stunde in PBS erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in PBST für 24 Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Die histologischen Schnitte wurden mit einem lipophilen Klebstoff (PAP-Pen, SCI) umrahmt, um eine sichere Inkubation mit genügend hoher Antikörperkonzentration zu gewährleisten.

Durch anschließendes dreimaliges Waschen (jeweils 10 Minuten) wurden die nicht gebundenen Antikörper eluiert. Zur Markierung wurde ein mit einem Fluorochrom (Cyanin 3) gekoppelter Sekundärantikörper (goat anti-rabbit IgG (H+L), Jackson) in einer Verdünnung von 1:200 in PBST verwendet. Nach einer zweistündigen Inkubationsphase mit dem Sekundärantikörper folgte wiederum ein dreimaliges Waschen mit PBS. Nun wurden die gewebebeschichteten Objektträger mit Glycerin reversibel eingedeckelt und die markierten

Strukturen innerhalb der nächsten Tage in Fluoreszenzlicht mikroskopiert und fotografiert.

Nach Entfernen der Deckgläser schloss sich das Auswaschen des Glycerins durch vorsichtiges Übergießen der Objektträger mit PBS an. Dann erfolgte die NADPH-Diaphorase-Histochemie. Anhand der protokollierten Koordinaten sowie von Fotografien konnte ein direkter Vergleich beider Markierungen an demselben Gewebeschnitt vorgenommen werden. Zur Konservierung der Gewebeschnitte wurden sie mit Kaiser's Glyceringelatine oder Entellan (jeweils: Merck) eingedeckelt.

## 2.7 Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)

Die Peroxidase-Antiperoxidase-Markierung wurde in zwei Untersuchungsreihen verwendet. Um die in den Gewebepräparationen befindlichen Peroxidasen auszuschalten, wurde für die Dauer von 30 Minuten eine Vorinkubation in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur mit 1%igem  $H_2O_2$  in 50 mM  $NaPO_4$  durchgeführt.

Nach fünfminütigem Waschen der gewebetragenden Objektträger mit PBS folgte eine einstündige Inkubation in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur in PBST, um auch in diesem Untersuchungsverfahren eine gute Membranpenetration zu erwirken.

Im nächsten Schritt erfolgte eine 24-stündige Inkubation des Primärantikörpers (Verdünnung 1:1000) in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur, dem ein dreimaliges Waschen (jeweils 10 Minuten mit 100 mM PBS) folgte.

Als Sekundär-Antikörper wurde ein sogenannter Brückenantikörper (affini pure donkey anti-rabbit IgG (H+L) minimal crossreaction to bovine, chicken, goat, guinea pig, hamster, mouse, rat, and sheep serum proteins, Immuno Jackson Research) eingesetzt. Dieser verstärkt das Signal, indem er wesentlich mehr Bindungsstellen für den dritten Enzymgekoppelten Antikörper (PAP antibody developed in rabbit, Sigma) bietet.

Der Brückenantikörper wurde in der Verdünnung 1:100 in PBST gelöst und für zwei Stunden auf der Gewebepräparation in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur belassen.

Es folgte dreimaliges Waschschrift mit PBS, danach eine einstündige Inkubation mit dem PAP-Antikörper (1:100 in PBS). Der nächste Schritt des Untersuchungsverfahrens war ein dreimaliges Waschen in PBS (jeweils 5 Minuten).

Nun folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Substrat 0,5%igem Diaminobenzidin (DAB, Ken-em-tec) plus 0,01%igem  $H_2O_2$ , das bei Antikörpermarkierung zu einem unlöslichen braunen Farbstoff reagiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde anschließend mit PBS gewaschen und die Objektträger wurden mit Entellan (Merck) eingedeckt.

## 2.8 Kontrolluntersuchungen zu den immunologischen Versuchsreihen

Parallel zu den Antikörper-inkubierten Gewebepreparationen wurden auch solche mitgeführt, die ohne Primärantikörper und ohne Primär- und Sekundärantikörper waren. Dies diente dem Nachweis von unspezifischen Reaktionen bezüglich der Immunfluoreszenz, wie dem Nachweis von Autofluoreszenz, und in der Peroxidase-Antiperoxidase-Markierung der Detektion von Hintergrundfärbungen, wie dem Vorhandensein endogener Peroxidase-Reaktivität.

In Vorversuchen von G. Brüning an ausgewählten Schnitten von *Trachemys scripta elegans* konnte gezeigt werden, dass keine positiven Markierungen mit dem Antiserum (Anti-NOS 1:1000) mehr auftraten, wenn die Gewebepreparationen mit gereinigter NOS 10  $\mu\text{g/ml}$  vorinkubiert waren.

## 2.9 Kontrolluntersuchungen zur Histochemie

In drei Untersuchungsreihen wurde bei ausgewählten Gewebepreparationen der Reaktionslösung zur NADPH-Diaphorase-Histochemie entweder Levamisol (Sigma, 5 mmol/l) beigefügt oder es wurde mit Levamisol präinkubiert. Die Substanz stellt einen

Hemmstoff der alkalischen Phosphatase dar. Diese katalysiert die Umwandlung von NADPH zu NADH. In diesen Experimenten wurde überprüft, ob die durchgeführte Reaktion wirklich auf NADPH-Diaphorase oder, nach Dephosphorylierung des NADPH durch Phosphatase, etwa auf der Aktivität einer NADH-Diaphorase beruht.

Nitroarginin stellt einen kompetitiven Hemmstoff der Stickoxid-Synthase dar. In einer der Versuchsreihen wurden mit N-omega-Nitro-L-Arginin (Sigma, 5 mmol/l) 1 Stunde bei 37°C vorinkubierte Schnitte mitgeführt, von denen aus vorherigen Untersuchungen bekannt war, dass sie markierte Strukturen enthalten.

## 2.10 Histologische Färbungen

Zur orientierenden Darstellung der spezifischen Histologie von *Trachemys scripta elegans* und zur Überprüfung des Anteils von markierten Nervenzellen an der Gesamtheit aller Zellen wurden die Hämatoxilin-Eosin-Färbung und die Kresylviolett-Färbung angewandt.

### 2.10.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Diese Färbung ist eine sukzessive Lackfärbung mit einem Kernfarbstoff (Aluminium- oder Eisenhämatoxylin) und einem sauren Zytoplasmafarbstoff (Eosin).

Lösungen:

Ethanol 70 %ig, 90%ig

Aceton 100%ig

Xylol 100%ig

1%ige Eosinlösung: 1g Eosin ad 100ml Aqua bidestillata

Mayers Hämalaunlösung

Für die Färbereihe wurden 200 ml Eosinlösung angesetzt:

178 ml 100%iges Ethanol

2 ml Eisessig

20 ml 1%ige Eosinlösung

Eintauchen in gefüllte Küvetten bzw. Waschen der gewebebeschichteten Objektträger wie folgt:

2 Minuten in Aqua bidestillata

10 Minuten in Hämalun zur Kernfärbung (blaue Färbung)

10 Minuten unter fließendem Leitungswasser

3 Minuten in Eosin-Ethanol-Eisessiglösung zur Zytoplasma- u.

Kollagenfasernfärbung (rote Färbung)

einmaliges kurzes Eintauchen in Aqua bidestillata

je 5 Minuten:

in 70, 80, 96, 100, 100 %igen Ethanol

5 Minuten in Xylol 100%ig

5 Minuten in Xylol 100%ig

Im Anschluß wurden die Präparate mit Entellan (Merck) versehen und mit einem Deckglas luftfrei eingedeckt.

### 2.10.2 Kresylviolett-Färbung

Stammlösung:	Kresylechtviolett (Merck)	2g
	Aqua bidestillata	100 ml
Puffer (pH 3,8):	Natrium-Acetat (Merck)	2 g

	Aqua bidest	1000 ml
	Eisessig (Merck)	3 ml
Gebrauchslösung:	Stammlösung	1 ml
	Puffer	100 ml
	Vor Gebrauch filtrieren	
Färbung:	Gebrauchslösung	5 min
	96% Ethanol	5 sec
	100 % Ethanol	2 x 5 min
	Xylol	2 x 5 min
	Eindecken in Entellan (Merck)	

### 2.11 Fotografische Dokumentation

Für die Dokumentation der Ergebnisse wurden die Gewebepräparate bei 50-400facher Vergrößerung durch ein Zeiss-Axioplan Lichtmikroskop fotografiert. Zur fotografischen Dokumentation der Fluoreszenzpräparate wurden Ilford HP5 (400 ASA)-Filme verwendet. Zur Fotografie der PAP- und NADPH-Histochemie wurden Agfa Ortho (25ASA)-Filme benutzt. Die erstellten Abzüge wurden gescannt (ScanMagic 9636 S; Adobe Photoshop 3.0) und gedruckt (Drucker: Epson Stylus Photo; Sigel InkJet-Papier).

### 2.12 Auswertung

Die untersuchten Organe wurden in Längs- wie in Querschnitten auf positive Markierungen untersucht. Alle kompakten Organe sind mindestens einmal vollständig geschnitten und untersucht worden. Dies gilt nicht für den Darm und das Oviduct. Diese Organe wurden anhand repräsentativer Abschnitte auf NOS geprüft.

Nach der Erstellung von Präparaten in Hämatoxilin-Eosin-Färbung und Kresylviolett-Färbung wurden die ersten histochemischen Versuche gemacht. Zur spezifischen Testung wurde dann erst die indirekte Immunzytochemie durchgeführt, der anhand desselben Präparats die Histochemie folgte. Alle angefertigten Gewebepräparate eines Versuchstieres wurden in beiden Techniken mikroskopisch gesichtet; repräsentative Abschnitte wurden fotografiert.