

Vergleich verschiedener Immun-Dekorationsmethoden für die Rasterelektronenmikroskopie am Beispiel eines Protein-Antigens auf der Oberfläche der Hefe *Candida albicans*

A Comparison of Decoration Techniques for the Demonstration of Immunocomplexes by Scanning Electron Microscopy: Labeling of a Protein Antigen on the Surface of the Yeast *Candida albicans*

Margarete Borg

Hygiene Institut der Universität, Abteilung medizinische Mikrobiologie, Kreuzberggring 57, D-3400 Göttingen

Z. Naturforsch. **40c**, 539–550 (1985); received March 5, 1985

Labeling Techniques, Scanning Electron Microscopy, *Candida albicans*, Surface Antigen

The labeling of immunocomplexes for scanning electron microscopy (SEM) is a fairly new technique, and the various procedures, that have been proposed, have not yet been compared. Such comparative evaluation was performed with *Candida* protease as a target antigen. This secretory enzyme of the opportunistic yeast *Candida albicans* can be localized on the surface of fungal blastopores and mycelia, both after growth in proteinaceous medium and upon infection of murine peritoneal macrophages. The presence of the protease antigen was confirmed by immunofluorescence and by immunoperoxidase-light microscopy.

The decoration of protease – anti protease complexes for SEM was attempted with colloids derived from the immunoperoxidase reaction, by the immunogold technique, and by antibodies linked to beads of synthetic polymers (polystyrene, polymethacrylate, polyacrolein). In addition, inactivated *Staphylococcus aureus* was used, which binds to antibodies through its protein-A.

The high resolution by SEM of surface structures was matched only by the colloid based decoration techniques. All conjugates with beads suffered from inconsistent binding, which did not correspond with the distribution of the surface antigen. The comparatively best result with beads was obtained with polystyrene (Latex). Colloid based techniques in addition allow for critical point drying, which cannot be applied to synthetic beads in the usual manner.

Einleitung

Die Einführung immunologischer Nachweismethoden in die Mikroskopie geht auf Coons und Mitarbeiter zurück, die 1942 erstmals über die Verwendung von Antikörpern berichteten, die mit Fluoreszein-Isothiocyant beschichtet waren (Übersicht bei [1]).

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden in der Folge Techniken zum Nachweis von Immunkomplexen angegeben, die sich auf die Verwendung elektronendichter Partikel stützten (Übersicht bei [2]).

Auch für die relativ neue Methode der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden inzwischen Techniken zum Nachweis von Immunkomplexen entwickelt.

Das Prinzip des Rasterelektronenmikroskops (REM) wurde schon 1938 von Ardenne beschrieben [3]. Das REM wurde jedoch erst nach 1950 von Oatley und Mitarbeitern realisiert (vgl. dazu [4]).

Der Nachweis von Immunkomplexen beschränkt sich bei der Rasterelektronenmikroskopie grundsätzlich auf die Oberfläche des Objekts und bedarf der „Dekoration“ mit Partikeln, die anhand ihrer einheitlichen Morphologie für den Betrachter identifizierbar sind. Dazu können natürliche Partikel wie Mikroben (z.B. *Staphylococcus aureus*, [5]) oder synthetische Polymerpartikel wie Polystyrol (Latex), Methacrylat und Polyacrolein verwendet werden [6–8].

Auch die Ablagerung von kolloidalem Gold und kolloidalem Diaminobenzidin (DAB) wurde zur Identifikation von Immunkomplexen mit dem REM verwendet [9, 10]. Der Vergleich dieser verschiedenen Methoden am Beispiel eines definierten Protein-Antigens (Carboxyl-Protease) auf der Oberfläche der Hefe *Candida albicans* ist Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

Materialien

Mycophil[®]-Agar: Becton und Dickinson, Heidelberg.

Anti-Meerschweinchen-Gammaglobulin vom Kaninchen: Behring, Marburg.

Methacrylat-Kugeln (0,5 µm, Covaspheres[®] MX): Covalent Technology Corporation, Redwood City, CA, USA.

Anti-Meerschweinchen-Peroxidasekonjugat vom Kaninchen: DAKO, Garching.

Thioglykolat-Medium: Difco, Detroit, Michigan, USA.

Anti-Meerschweinchen-Gammaglobulin-FITC-Konjugat vom Kaninchen: Miles, München.

Iso-Sensitest-Bouillon[®]: Oxoid, Wesel.

Polystyrol-Kugeln („Latex“, 0,3 µm) und Polyacrolein-Kugeln (0,25 µm): Polyscience, St. Goar.

Paraformaldehyd und Polyethylenglykol 20000: Serva, Heidelberg.

Glutaraldehyd, *p*-Phenylendiamin, Diaminobenzidin-Tetrachlorid und Aminoethylcarbazol: Sigma, Taufkirchen.

Alle übrigen Laborchemikalien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

Das spezifische Antiserum vom Meerschweinchen gegen die sekretorische Protease von *C. albicans* CBS 2730 wurde von Dr. R. Röchel, Göttingen, zur Verfügung gestellt.

Methoden

Kultivation der Hefen

Candida albicans CBS 2730 wurde bei Raumtemperatur auf Mycophil[®]-Schrägarar aufbewahrt. Vor Verwendung wurde die Hefe auf Bierwürz-Agar überimpft und 48 h bei 37 °C inkubiert.

Peritoneal-Makrophagen

Die Gewinnung von Peritoneal-Makrophagen aus der Maus erfolgte in Anlehnung an Dörfling [11].

Die Mäuse wurden mit 3 ml Thioglykolat-Bouillon intraperitoneal stimuliert. Die Makrophagen wurden

drei Tage danach durch Peritoneal-Spülung mit HBSS gewonnen; sie wurden einmal in HBSS gewaschen (150 × g, 5 min), im Medium 1640-199 mit 10% fötalem Kälberserum (FKS Medium [12]) resuspendiert und auf eine Zellzahl von 3 × 10⁵ Zellen/ml eingestellt.

Jeweils 1 ml dieser Zell-Suspension wurde in die Vertiefung einer sterilen Zellkulturplatte (Nunc, No. 134673) überführt, auf deren Boden ein rundes Deckglas (Ø 12 mm) lag. Die Zellen benötigten zur Adhärenz an das Deckglas mindestens 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂.

Infektionsexperimente

Adhärente Peritoneal-Makrophagen wurden mit 1 ml einer Suspension von *Candida* Blastosporen (10⁶ Zellen/ml) infiziert, die zuvor mit unspezifischem Maus-Serum (10% in FKS-Medium) opsonisiert worden waren (30 min, 37 °C). Die Ansätze wurden in den Zellkulturplatten zentrifugiert (200 × g, 2 min), um Zellen und Hefen in engen Kontakt zu bringen.

Anschließend wurde für maximal 8 h inkubiert (37 °C; 5% CO₂). Darauf wurden die Präparate einmal mit PBS gespült und mit Paraformaldehyd (1% in PBS) fixiert (1 h, 22 °C).

Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde in Anlehnung an Wick *et al.* [1] durchgeführt. Dazu wurden die fixierten Präparate zweimal mit PBS gespült und mit 1% Rinderserumalbumin (RSA) in PBS 30 min bei 22 °C inkubiert, um die unspezifische Adsorption von Protein zu verringern. Das spezifische Antiserum vom Meerschweinchen wurde in einer Verdünnung von 1:250 in PBS + 1% RSA auf die Präparate gebracht. Die Kontrollen erhielten adsorbiertes unspezifisches Serum vom Meerschweinchen in gleicher Konzentration. Nach 12 Stunden Inkubation (8 °C) wurden die Präparate sehr sorgfältig dreimal mit PBS gespült; anschließend wurden sie mit anti-Meerschweinchen-FITC vom Kaninchen (1:100 in PBS + 1% RSA) 90 min bei 37 °C inkubiert. Zum Schluß wurden die Präparate abermals zweimal mit PBS gespült.

Zur Fluoreszenz-Mikroskopie wurden die Präparate mit einem Tropfen PBS-Glycerin (1+9) mit 0,1% *p*-Phenylendiamin eingedeckt [13].

Abkürzungen:

HBSS, Hank's gepufferte Salzlösung;
PBS, Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung;
RSA, Rinderserumalbumin;
DAB, Diaminobenzidin;
AEC, Aminoethylcarbazol;
FITC, Fluoreszein-Isothiocyant.

Herstellung von Antikörper-Konjugaten für die indirekte Immunasterelekttronenmikroskopie

a) *S. aureus*-Konjugat [14]

Staphylococcus aureus ATCC 12598 wurde in Iso-Sensitest^R-Bouillon angezüchtet (48 h, 37 °C). Die Bakterien wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 50% Äthanol abgetötet (2 h, 22 °C). Die abgetöteten Bakterien wurden dreimal mit PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 50 mg/ml in PBS eingestellt. Diese Stamm-Suspension war bei -20 °C über mehrere Monate haltbar, ohne daß an den Bakterienzellen Gefrierschäden auffällig wurden.

b) Polystyrol-Partikel (Latex)

Die Kopplung von Polystyrol-Kugeln an Antikörper erfolgte in Anlehnung an Singer und Plotz [15].

0,1 ml einer Stammsuspension von Polystyrol-Partikeln (1%, Ø 0,3 µm) wurden mit 0,5 ml der Antikörper-Stammlösung (anti-Meerschweinchen-Gammaglobulin vom Kaninchen, 5 mg/ml) gemischt; 9,4 ml einer Lösung von 50 mM Glycin in 0,1 M NaCl, pH 8,2 wurden hinzugefügt. Der Ansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und dabei langsam gerührt. Das Polystyrol-Antikörper-Konjugat wurde durch Zentrifugation (9000 × g, 15 min, 4 °C) zweimal mit PBS gewaschen; das Sediment wurde schließlich in 4 ml PBS resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt. Das Konjugat war in Gegenwart von Natriumazid (4 mM) wenigstens für 4 Wochen brauchbar.

c) Methacrylat-Partikel

Die kovalente Kopplung von Immunglobulinen an Polymethacrylat-Kugeln wurde erstmals von Rembaum und Dreyer [16] beschrieben.

Aktiviert fluoreszierende Methacrylat-Kugeln (Ø 0,5 µm, Covaspheres^R MX) waren kommerziell erhältlich. Die Kopplung von Immunglobulin an die Kugeln erfolgte in Anlehnung an Mirro *et al.* [7] 20 µl der Suspension von Covaspheres^R wurden mit 100 µl einer Antikörper-Stammlösung (1 mg/ml in PBS) gemischt, 0,88 ml PBS wurden hinzugefügt und 2 h bei 22 °C inkubiert.

Zur Absättigung der noch freien reaktiven Gruppen wurde nach Zugabe von RSA (1% Endkonz.) noch eine weitere Stunde (22 °C) inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde durch Zentrifugation (1000 × g, 15 min) zweimal mit PBS gewaschen und

in PBS + 1% RSA resuspendiert. Die Konjugatpartikel waren wenigstens für 4 Wochen unter Zusatz von Natriumazid (4 mM) lagerungsfähig.

d) Polyacrolein-Kugeln

Die Polyacrolein-Partikel wurden in Anlehnung an Kumakura *et al.* [17] mit anti-Meerschweinchen-Gammaglobulin kovalent gekoppelt. Dazu wurden 50 µl der Polyacrolein-Kugeln (Ø 0,25 µm, Stammsuspension 2%) mit 10 µl anti-Meerschweinchen-Gammaglobulin gemischt (Stammlsg. 10 mg/ml); 940 µl Puffer (0,2 M Carbonatpuffer + 0,5 M NaCl pH 8,5) wurden hinzugefügt. Diese Suspension wurde 2 h (22 °C) unter langsamem Rühren inkubiert. Zur Absättigung der noch freien reaktiven Aldehydgruppen wurde Glycin (0,2 M Endkonzentration) hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde weitere 5 h (22 °C) inkubiert.

Das Polyacrolein-Konjugat wurde einmal mit Carbonat-Puffer (750 × g, 10 min) und zweimal mit PBS gewaschen. Vor Verwendung wurde dem Konjugat Rinder Serumalbumin (1% Endkonzentration) zugefügt.

e) Präparation von kolloidalem Gold

Die Präparation von kolloidalem Gold aus Gold-Tetrachlorid wurde nach Angabe von Frens [18] durchgeführt.

Zur Herstellung von Gold-Kolloiden mit etwa 40 nm Durchmesser wurden 50 ml der Gold-Tetrachlorid-Stammlösung (0,1 mg/ml in Aqua bidest.) mit 0,5 ml Tri-Natrium-Citrat-Lösung (30 mM in Aqua bidest.) gemischt und 5 min gekocht. Die Suspension verfärbt sich dabei über blau nach rot. Nach dem Erkalten wurde die Suspension der Gold-Kolloide mit 0,2 M Kaliumcarbonat auf pH 6,9 eingestellt.

Kopplung von kolloidalem Gold an Antikörper (in Anlehnung an Roth [19])

Zu 10 ml kolloidalem Gold wurden 100 µl anti-Meerschweinchen-Gammaglobulin (5 mg/ml in 5 mM NaCl) gegeben.

Diesem Ansatz wurde nach 3 min Polyethylenglykol (PEG) 20000 (10 mg/ml in Wasser) hinzugefügt. Nach Zentrifugation (11000 × g, 1 h, 4 °C) wurde das Sediment mit 1,5 ml PBS + 0,2 mg/ml PEG 20000 aufgenommen. Diese Stamm-Suspension konnte zum Gebrauch bis zu 20× in PBS + 1% RSA

verdünnt werden, sie war wenigstens 3 Monate bei 4 °C lagerfähig.

Vorbereitung der Präparate für die Immun-Rasterelektronen-Mikroskopie

Für die Darstellung des Protein-Antigens mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurden die Präparate der indirekten Immunreaktion unterworfen. Dabei wurde nach dem Protokoll für die Immunfluoreszenz verfahren (s. o.). Anstelle des dort verwendeten FITC-Konjugats wurden jedoch die verschiedenen korpuskulären Antikörper-Konjugate verwendet (s. Ergebnisse). Danach wurden die Präparate mit 2% Glutaraldehyd in PBS (30 min 22 °C) nachfixiert. Sie wurden in aufsteigender Alkoholreihe entwässert (10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%) und entweder luftgetrocknet (Polystyrol, Methacrylat, Polyacrolein) oder in eine aufsteigende Amylacetatreihe (20%, 40%, 80%, 100%) überführt und unter Verwendung von CO₂ mit der Kritischen-Punkt-Methode getrocknet.

Die Präparate wurden anschließend mit Gold-Palladium bedampft und der REM unterworfen. Dazu wurde das Gerät Novascan-30 (Zeiss, Oberkochen) bei 15 kV verwendet.

Ergebnisse

Immunfluoreszenz

Mit der indirekten Immunfluoreszenz war das Protease-Antigen auf extrazellulär liegenden Pilzelementen und auf Blastosporen und Keimschläuchen nachzuweisen (Abb. 1b).

Die Spezifität der Immunreaktion wurde durch Kontrollansätze bestätigt, die mit normalem Meerschweinchenserum behandelt worden waren (Abb. 1c). Die Verteilung der Fluoreszenzintensität ließ auf eine gleichmäßige Präsenz des Proteaseantigens in der Zellwand von Blastosporen und Myzelien schließen.

Aufgrund der Paraformaldehyd-Fixation der Präparate konnte das Protease-Antigen nur auf Pilzzellen erfaßt werden, die sich außerhalb der Makrophagen befanden. Intrazellulär liegende Hefen konnten nicht sicher dargestellt werden. Offenbar wird auch die Fluoreszenz von Hefen ausgelöscht, die extrazellulär, aber unter Phagozyten liegen. Extrazellulär verdeckte und intrazellulär liegende Pilzzellen konnten deshalb mit der Immunfluoreszenz nicht diffe-

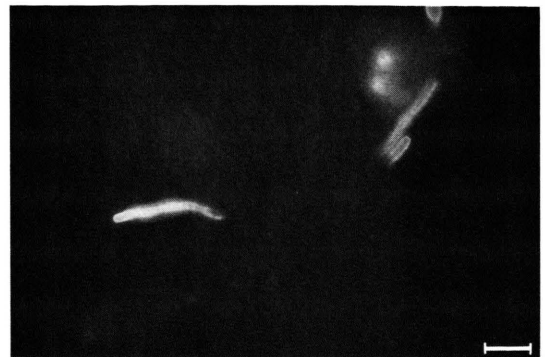
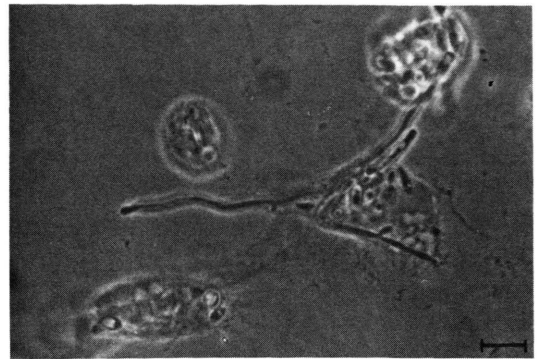


Abb. 1. Fluoreszenzoptischer Nachweis von sekretorischer Protease auf phagozytierten und aus Makrophagen aussprossenden Zellen von *C. albicans* CBS 2730. Acht Stunden nach Infektion der adhärennten Peritoneal-Makrophagen mit *Candida* Blastosporen wurden die Präparate mit Paraformaldehyd fixiert und der Immunreaktion mit anti-Protease (vom Meerschweinchen) und einem fluoreszeinkonjugierten Antiglobulin unterworfen (Einzelheiten s. Ergebnisse).

a) Phasenkontrast; der Balken entspricht 10 µm.

b) Fluoreszenz desselben Präparats wie in a) (Zeiss, Filterkombination 487709). Das Protease-Antigen ist nur auf Blastosporen und Myzelien nachzuweisen, die außerhalb der Makrophagen liegen.

c) Fluoreszenz (wie in b) des Kontrollpräparats, das anstelle von anti-Protease mit dem Vorserum desselben Tieres behandelt worden war. Bedingungen sonst wie in b.

renziert werden. Diese Unterscheidung ist auch mit der Phasenkontrast-Mikroskopie kaum zu treffen (vgl. Abb. 1a).

Immun-Peroxidase-Reaktion

Diese Reaktion wurde in Anlehnung an das Protokoll der Immunfluoreszenz durchgeführt; allerdings wurden zur Inhibition der endogenen Peroxidase der Makrophagen die fixierten Ansätze mit 3% H_2O_2 vorbehandelt (22 °C, 30 min).

Der Nachweis der spezifischen Immunkomplexe erfolgte mit einem kommerziellen anti-Meerschweinchen Peroxidase-Konjugat vom Kaninchen (100× verdünnt in PBS + 1% RSA).

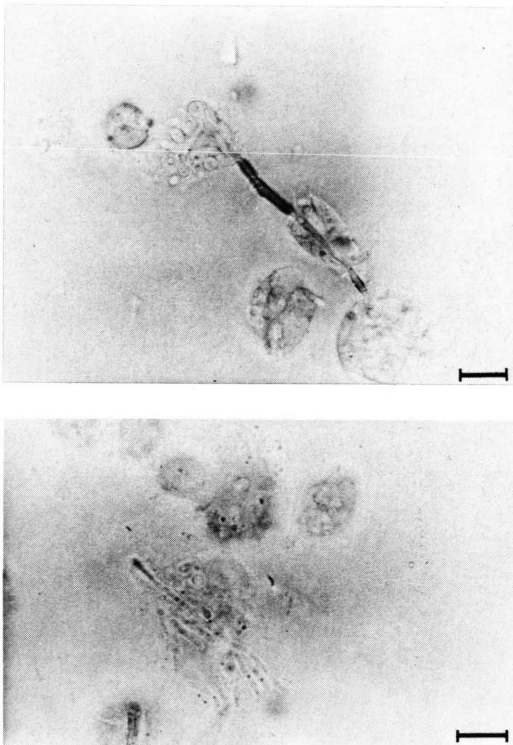


Abb. 2. Lichtoptischer Nachweis der sekretorischen *Candida*-Protease durch Immunperoxidase-Reaktion

a) Die fixierten Präparate wurden nach Reaktion mit anti-Protease (wie in Abb. 1) mit einem Antiglobulin-Peroxidase-Konjugat (vom Kaninchen) inkubiert. Der Nachweis gebundener Peroxidase erfolgte durch die Reaktion mit H_2O_2 und Diaminobenzidin. Die dunklen Kolloide erlauben die Lokalisation des Protease-Antigens auf Pilzzellen.
b) Kontrollpräparat nach Peroxidase-Reaktion wie in a). Das spezifische Antiserum wurde durch ein Meerschweinchen-Kontrollserum ersetzt.

Gebundenes Peroxidase-Konjugat wurde mit einem chromogenen Substratgemisch aus 0,03% H_2O_2 und DAB (1 mg/ml in PBS) nachgewiesen [20]. Alternativ wurde ein Gemisch von H_2O_2 und Aminoethylcarbazol (AEC) (0,5 mg/ml in 20 mM Acetat-Puffer pH 5,0–5,5 mit 10% Dimethylsulfoxid) verwendet [21].

Abb. 2 zeigt das Ergebnis der Reaktion mit H_2O_2 -DAB.

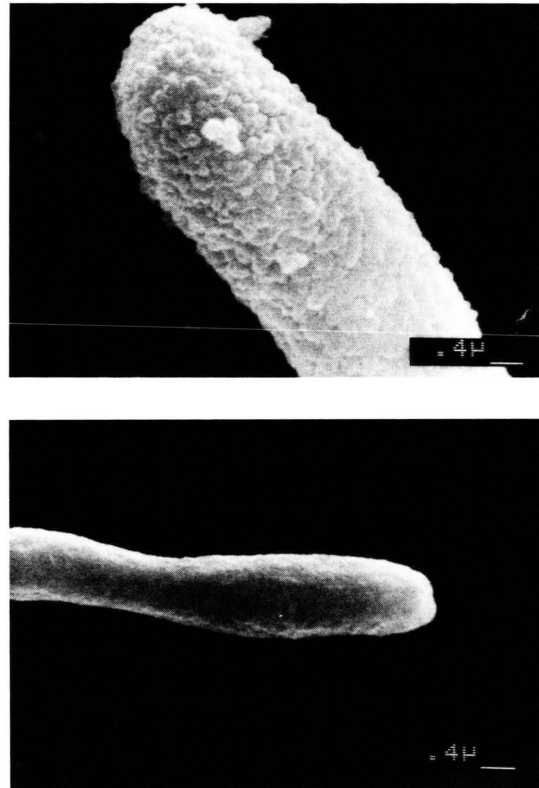


Abb. 3. REM-Darstellung der Protease-Antigens auf der Oberfläche von *C. albicans* CBS 2730 durch Immunperoxidase-Reaktion mit H_2O_2 und Aminoethylcarbazol als Substrat. Die Präparate wurden nachfixiert, über die Alkoholreihe entwässert und mit der Kritischen-Punkt-Methode getrocknet (Einzelheiten s. Text).

a) Nachweis der sekretorischen Protease von CBS 2730 auf Pilzzellen mit abgelagerten AEC-Kolloiden als Produkt der Immunperoxidase-Reaktion. Beachte die gleichmäßige Verteilung des Farbkolloids über die gesamte Zelloberfläche und die Zunahme des Zelldurchmessers durch Ablagerung von Kolloid. Die Vergrößerung ist aus dem eingeblen deten Maßstab ersichtlich.

b) Kontrollpräparat, bei dem das spezifische Antiserum gegen das Vorserum ausgetauscht worden war. Zustand nach Peroxidase-Reaktion wie in a).

Nach der DAB-Reaktion waren die Blastosporen und Myzelien mit einem gleichmäßigen braunen Farbstoff überzogen; die Reaktion mit AEC und H_2O_2 führt zu einem roten Farbstoff (nicht abgebildet).

Bei der Betrachtung derselben Präparate mit dem REM zeigte sich, daß die aus den Makrophagen aussprossenden Hefezellen nach Reaktion mit beiden chromogenen Substratgemischen dicht mit abgelagerten Farbstoff-Kolloiden übersät waren. Durch die Auflagerung der Kolloide wurde der Umfang der Pilzzellen fast verdoppelt (Abb. 3).

Immundekoration mit definierten Partikeln

a) *Staphylococcus aureus* ATCC 12598

Zur Dekoration von Immunkomplexen sind Zellen von *S. aureus* geeignet, die auf der Oberfläche Protein A besitzen. Dieses Kriterium erfüllt besonders der Stamm Cowan I [23]. Protein A wird auch durch die Äthanol-Inaktivierung der Bakterien kaum denaturiert [24]. Die Stamm-Suspension der abgetöteten Bakterien wurde $10\times$ in PBS + 1% RSA verdünnt und auf die Präparate aufgetragen. Diese konnten nach gründlicher Wäsche und Glutaraldehyd-Nachfixation der Vorbehandlung für das REM unterzogen werden.

Das Ergebnis ist in Abb. 4 dargestellt. Die Pseudomyzelien und Blastosporen waren zwar recht dicht mit Staphylokokken bedeckt, es waren aber immer wieder Bezirke auf den Pilzzellen zu finden, die keine Partikel gebunden hatten.

Ein Vergleich mit dem Ergebnis der Immunperoxidase-Reaktion legt nahe, daß die Unregelmäßigkeiten bei der Bindung von *S. aureus* nicht auf einer spezifischen Verteilung des Protease-Antigens beruhen, sondern eine Instabilität der Bindung von Bakterien an Immunkomplexe widerspiegeln.

b) Polystyrol-Kugeln (Latex)

Das Protease-Antigen konnte auch mit Polystyrol-Antikörper-Adsorbaten nachgewiesen werden. Dazu wurde der Suspension von antikörper-beladenen Polystyrol-Partikeln ($\varnothing$ 0,3 μ m) RSA als Trockensubstanz bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml zugesetzt. Die Suspension wurde dann unverdünnt auf die Präparate gebracht, die vor der Inkubation zentrifugiert wurden ($150\times g$, 1 min), um einen engeren Kontakt zwischen Hefen und Konjugat herzu-

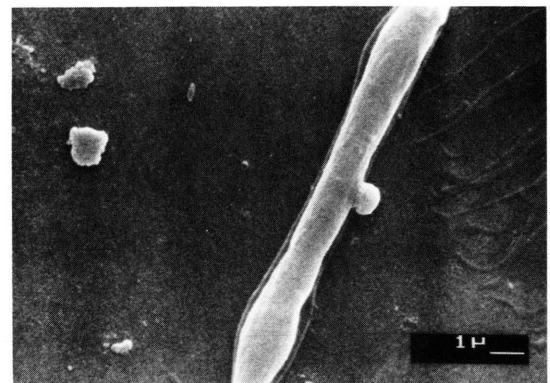
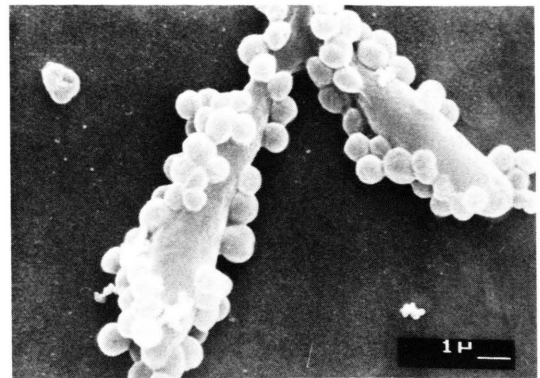


Abb. 4. REM-Darstellung von *Candida*-Protease durch Immundekoration mit inaktivierten *S. aureus* ATCC 12598
a) Bakterienzellen, die über ihr Protein A an die spezifischen Immunkomplexe auf der Oberfläche der Hefe gebunden sind.

b) Kontrollpräparat, bei dem das spezifische Antiserum durch Meerschweinchen-Vorserum ersetzt worden ist. Zustand nach Exposition gegenüber *S. aureus*-Zellen wie in a.

stellen. Nach der Inkubation (1 h, 37 °C) wurden die nachfixierten Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und luftgetrocknet, da sich eine Behandlung mit Amylacetat aufgrund der Löslichkeit von Polystyrol verbot.

Das Ergebnis der Reaktion ist in Abb. 5 zu sehen. Die „Dekoration“ mit Polystyrol-Kugeln entspricht dem mit *S. aureus* erzielten Ergebnis. Auch hier war ein unregelmäßiges Binden der Kugeln an die Hefe zu beobachten.

c) Polymethacrylat-Kugeln

Die Immundarstellung der sekretorischen Protease mit Hilfe von Methacrylat-Kugeln wurde an Hefezellen durchgeführt, die allein in FKS-Medium kultiv-

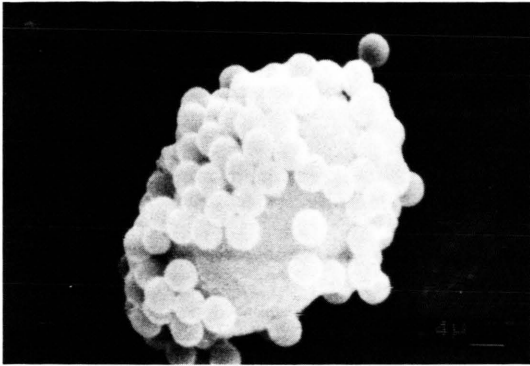


Abb. 5. REM-Darstellung des Protease-Antigens auf *Candida*-Zellen durch Dekoration mit einem Adsorbat von spezifischen Antikörpern an Polystyrol-Kugeln. Der angegebene Durchmesser der Kugeln betrug $0,3\ \mu\text{m}$ (Experimentelle Bedingungen s. Text). Im Kontrollpräparat waren ähnlich wie in Abb. 4 b nur vereinzelte Polystyrolkugeln nachweisbar (nicht abgebildet).

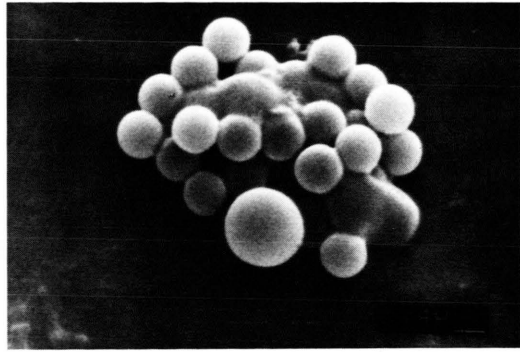


Abb. 6. REM-Darstellung des Protease-Antigens auf *Candida*-Zellen mit antikörper-gekoppelten Polymethacrylat-Kugeln.

Der angegebene Durchmesser der Polymethacrylat-Kugeln betrug $0,5\ \mu\text{m}$ (Experimentelle Bedingungen s. Text).

a) Immundekoration einer Blastospore; die unregelmäßige Bindung der Polymethacrylat-Kugeln repräsentiert nicht die Verteilung des Protease-Antigens.

b) Blastosporen aus einem Kontrollansatz mit Vorserum anstelle von anti-Protease. Das Präparat war praktisch frei von Polymethacrylat-Kugeln. Die Schrumpfung der Hefezellen wurde durch die notwendig gewordene Lufttrocknung des Präparats hervorgerufen.

viert worden waren. Nach der Reaktion von anti-Protease mit Hefezellen wurde die unverdünnte Stamm-Suspension von antikörper-beladenen Polymethacrylat-Kügelchen mit den Hefezellen gemischt und zentrifugiert ($100 \times g$, 15 min). Danach wurde der Reaktionsansatz 2 h inkubiert ($22\ ^\circ\text{C}$). Die Zellen wurden sorgfältig zweimal mit PBS gewaschen ($750 \times g$, 10 min) und mit Glutaraldehyd nachfixiert. Sie wurden über die Alkoholreihe entwässert und luftgetrocknet, da sich auch hier wegen der Löslichkeit der Polymethacrylat-Kugeln der Kontakt mit Amylacetat verbot.

Das Ergebnis ist in Abb. 6 dargestellt. Die Darstellung von Immunkomplexen mittels gekoppelter Polymethacrylat-Kugeln führte zu einem schlechteren Ergebnis als die Dekoration durch Polystyrol-Kügelchen oder *S. aureus*-Zellen. Der Grund dafür ist zu diskutieren.

d) Polyacrolein-Kugeln

Der Nachweis des Protein-Antigens mit Hilfe des Polyacrolein-Konjugats wurde nur an Hefezellen allein durchgeführt. Die mit spezifischen Antikörpern beschichteten Hefezellen wurden mit dem anti-Meerschweinchen Polyacrolein-Konjugat unter langsamem Rühren inkubiert (90 min, $22\ ^\circ\text{C}$). Die Präparate wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen, mit Glutaraldehyd (2%) nachfixiert und über

die Alkoholreihe entwässert. Da auch Polyacrolein-Kugeln im Amylacetat löslich sind, mußten die Präparate schließlich luftgetrocknet werden.

Die Immundekoration über Polyacrolein-Kugeln führte zu schlechten Ergebnissen, da die uns zur Verfügung stehenden Kugeln unspezifisch aggregierten. Diese Kugel-Aggregate waren selbst unter Zusatz von Detergenz (1% Triton), von hochmolarer Salzlösung ($\text{NaCl}\ 1\ \text{M}$) bzw. Ultraschall (35 kHz) nicht aufzulösen. Die Spezifität der Immunreaktion konnte unter diesen Bedingungen kaum beurteilt werden (Abb. 7).

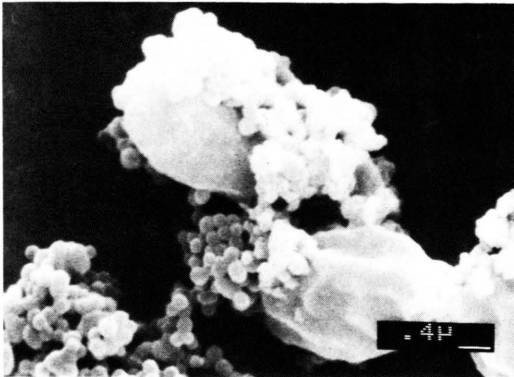


Abb. 7. REM-Darstellung des Protease-Antigens auf *Candida*-Zellen mit antikörper-gekoppelten Polyacrolein-Kugeln.

Der angegebene Durchmesser der Kugeln betrug $0,25\ \mu\text{m}$. Die Spezifität der Bindung an die Pilzzellen ist schwer zu beurteilen, da Polyacrolein-Kugeln auch spontan zur Aggregation neigten (Einzelheiten s. Text). Im Kontrollpräparat waren gleichfalls Kugelaggregate nachweisbar (nicht abgebildet). Die Schrumpfung der Hefezellen ist wiederum auf die Lufttrocknung zurückzuführen.

e) Immun-Gold

Nach Ablauf der Reaktion von anti-Protease mit den Präparaten wurden diese mit dem Immunglobulin-Goldkonjugat (Stammlösung 1:15 verdünnt in PBS + 1% RSA) beschichtet und nieder-tourig zentrifugiert ($150 \times g$, 2 min).

Nach der Inkubation (2 h, $22\ ^\circ\text{C}$) wurden die Präparate gründlich gespült und mit 2% Glutaraldehyd nachfixiert. Sie wurden über die Alkoholreihe entwässert und mit der Kritischen-Punkt-Methode getrocknet.

Entsprechend einem Vorschlag von Horisberger [25] wurden die Präparate über einen kürzeren Zeitraum mit Gold-Palladium bedampft (1 min statt 4 min), um die Immun-Goldkolloide deutlicher auf den Hefen hervortreten zu lassen.

Blastosporen und Myzelien waren gleichmäßig mit Gold-Kolloid überzogen. Die Kontrollpräparate, die Meerschweinchen-Leerserum erhalten hatten, wiesen hingegen an entsprechender Stelle kaum Goldkolloid auf (Abb. 8).

Diskussion

Die lichtmikroskopische Darstellung von spezifischen Immunkomplexen ist eine etablierte Methode, die in Forschung und medizinischer Diagnostik breite Anwendung gefunden hat. Zur Markierung der

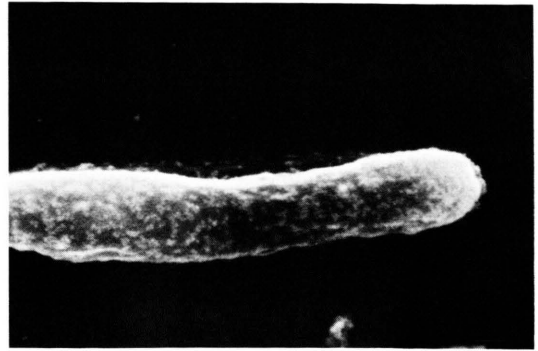


Abb. 8. REM-Darstellung des Protease-Antigens auf *Candida*-Zellen durch antikörper-gekoppelte Goldkolloide. Die Herstellung des kolloidalen Goldes, seine Kopplung an Antikörper und die Reaktion mit dem spezifischen Immunkomplex an der Oberfläche von Pilzzellen wurde wie im Text beschrieben durchgeführt.

a) Abgelagerte Goldkolloide deuten auf eine relativ gleichmäßige Verteilung des Protease-Antigens. Zu einer vielschichtigen Ablagerung von Kolloid, wie bei der Immunperoxidase-Reaktion, kommt es bei der Immungold-Technik nicht. Der Durchmesser der Pilzzellen wird kaum verändert.

b) Kontrollpräparat, das unter Verwendung von Vorserum hergestellt wurde. Nur wenige Kolloidpartikel sind unspezifisch abgelagert worden.

Komplexe dient häufig das Enzym Meerrettichperoxidase bzw. der Fluoreszenz-Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (Übersichten: [20] bzw. [1]). Auch mit dem Transmissionselektronenmikroskop lassen sich Immunkomplexe elegant darstellen, wobei elektronenundurchlässige Schwermetalle, vor allem das Eisen aus Ferritin oder Peroxidase Anwendung finden (Übersicht: [2]). Viel seltener wurden bisher Versuche unternommen, Immunkomplexe auch mit der relativ neuen Rasterelektronenmikroskopie (REM) nachzuweisen. Da die REM auf die Darstellung von

Oberflächenstrukturen beschränkt ist, müssen die Immunkomplexe im Gegensatz zur Lichtmikroskopie und zur Transmissionselektronenmikroskopie mit Partikeln identifizierbarer Form und Größe „dekoriert“ werden.

Zur Darstellung von Immunkomplexen mit dem REM sind in der Literatur eine Reihe von Methoden angegeben worden (Übersicht: [26]). Drei dieser Methoden stützen sich auf Konjugate von Antikörpern mit Polymerkügelchen definierter Größe.

Die Kopplung von Polystyrol-Kugeln, besser unter dem Namen „Latex“ bekannt, wurde für das REM zuerst von Mannweiler *et al.* [6] angegeben. In gleicher Weise konnten auch Polyacrolein- oder Polymethacrylat-Kügelchen verwandt werden [8, 7].

Kolloidale Komplexe, deren Größe nur begrenzt kontrolliert werden kann, dienen bei der Immunperoxidase-Reaktion und bei der Immungold-Technik dem Nachweis von Immunkomplexen [10, 9, 25]. Biologisch definierte Partikel und die Fähigkeit von bakteriellem Protein A zur Bindung an das Fc-Fragment der meisten Immunglobuline [24] werden beim Nachweis von Immunkomplexen durch geeignete Staphylokokken ausgenutzt [5].

Die Vor- und Nachteile dieser Methoden haben wir am Beispiel eines definierten Proteinantigens auf der Oberfläche von *Candida* Hefen verglichen. Es handelt sich dabei um die sekretorische Carboxylprotease, die bereits bis zur Homogenität aufgereinigt und charakterisiert worden ist [27]. Zum Nachweis des Enzyms standen monospezifische Antikörper zur Verfügung, die durch Immunisierung vom Kaninchen und Meerschweinchen gewonnen worden waren [28]. *Candida* Protease wird offenbar bei der Infektion von Mensch und Tier in größeren Mengen von der Hefe gebildet, was seinen Ausdruck im Auftreten hoher spezifischer Antikörpertiter findet [29, 30].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß *Candida*-Protease von der Hefe auch in einem Infektionsmodell gegenüber Peritoneal-Makrophagen der Maus gebildet wird. Dieser Nachweis konnte sowohl mit der bewährten Immunfluoreszenz als auch mit allen Immun-REM-Techniken geführt werden.

Die in dieser Arbeit geprüften Immun-REM-Techniken sind jedoch unterschiedlich zu bewerten: das betrifft sowohl die vorab notwendigen Kopplungsreaktionen als auch das Ergebnis der Dekoration selbst.

Eine Ausnahme bilden die *S. aureus*-Zellen, die das Protein A von Natur aus auf ihrer Zelloberfläche tragen. Hier entfällt eine Kopplungsreaktion.

Die Bindung von Immunglobulin an *Polystyrol-Kugeln* („Latex“) kann auf einfachste Art durch eine Adsorption bei basischem pH erreicht werden [15]. Diese von Mannweiler *et al.* [6] zuerst für die REM adaptierte Technik führte in unserem Modell zu befriedigenden Ergebnissen. Die von anderen Autoren [31] vorgeschlagene Möglichkeit einer Kopplung von Antikörpern an Polystyrol über Glutaraldehyd in Anlehnung an Avrameas [32] führte hingegen zu keinem befriedigenden Ergebnis, da das Antigen mit diesem Polystyrol-Konjugat nicht dargestellt werden konnte. Ein Grund dafür ist nicht bekannt.

Die von Rembaum und Dreyer [16] beschriebenen *Polymethacryl-Kugeln* enthalten reaktive Hydroxyl- und Carboxyl-Gruppen, an die Immunglobuline über ihre freien Amino-Gruppen kovalent binden sollen. Die Kopplungsreaktion kann in PBS, also unter annähernd physiologischen Bedingungen, durchgeführt werden.

Das Ergebnis war dennoch schlechter als nach Dekoration mit *S. aureus* oder mit Latex-Kugeln. Für das bessere Ergebnis der Latex-Technik kann die geringere Größe dieser Partikel ($\varnothing$ 0,3 μ m im Vergleich zu 0,5 μ m bei Polymethacrylat-Kugeln) von Bedeutung sein, denn größere Partikel werden während der notwendigen Spülschritte leichter vom Präparat gewaschen als kleinere Partikel.

Von Margel *et al.* [8] sind *Polyacrolein-Kugeln* beschrieben worden, die über freie Aldehyd-Gruppen mit primären Amino-Gruppen von Immunglobulinen kovalent reagieren können. Die Kopplungsreaktion bereitete uns jedoch Schwierigkeiten, da die Kügelchen sich bereits während der Reaktion zusammenlagerten und Aggregate bildeten, die sich später weder durch Behandlung mit 1% Triton X100, 1 M NaCl oder Ultraschall auflösen ließen.

Solche Probleme traten nicht auf bei der Kopplung von Antikörpern an Goldkolloide. Das Goldkolloid-Konjugat wurde dazu nach der Methode von Roth [19] selbst hergestellt. Die Größe der Kolloide war dabei begrenzt regulierbar im Bereich von 5 bis 150 nm. Die Bindung von Immunglobulinen an Goldkolloide erfolgt offenbar nur durch nicht-kovalente Bindungen aufgrund von Van-der-Waals-Kräften. Die Bindung ist jedoch stabil genug, um die Kolloide während aller Spülschritte am Ort der Immunreaktion zu fixieren.

Bei der Immunperoxidase-Reaktion ist die Kopplung von Immunglobulin an das Enzym notwendig. Dafür sind eine Reihe verlässlicher Methoden angegeben worden (Übersicht bei [33]). Außerdem sind viele Peroxidase-Konjugate kommerziell erhältlich. Die Kopplung des Enzyms wird praktisch nur da notwendig, wo die Immunreaktion mit einem spezifischen Konjugat direkt sichtbar gemacht werden soll.

Während aus der Immunfluoreszenz auf eine lückenlose Besetzung der Oberfläche von *Candida*-Blastosporen und Myzelien mit Proteinantigen geschlossen werden konnte, zeigte die Immundekoration von Pilzzellen über Kugel-Konjugate (*S. aureus*, Polystyrol, Polymethacrylat und Polyacrolein) immer wieder Oberflächen-Bezirke auf, die keine Kugeln gebunden hatten.

Bei der Dekoration mit Antikörper-Kolloid-Konjugat (Gold) oder bei einer peroxidase-gekoppelten Reaktion mit kolloidalem Produkt waren solche Defekte auf den Oberflächen von Pilzzellen nicht zu beobachten. Den Defekten liegt demnach keine ungleiche Verteilung des Protease-Antigens auf der Oberfläche zugrunde. Sie beruhen wahrscheinlich auf einer sterischen Behinderung, die durch die Größe der Kugeln bedingt ist [34]. Außerdem kann jede Kugel nur eine begrenzte Zahl von Bindungen eingehen, die der Belastung während der Spülschritte nicht standhalten, wenn die Kugeln zu groß sind.

Ein weiterer Nachteil aller drei Arten von Polymer-Kügelchen ist ihre Löslichkeit in Amylacetat. Damit verbietet sich die Kritische-Punkt-Trocknung der Präparate unter Verwendung dieses Lösungsmittels, die als schonenste Methode der Trocknung angesehen wird [35]. Die an ihrer Stelle durchgeführte Lufttrocknung führte zu Schäden am Präparat, die besonders an den Oberflächen der Makrophagen deutlich wurde. Wenn Freon 13 anstelle von Amylacetat zur Verfügung steht, können jedoch Polystyrol und Polymethacrylat-Partikel der Kritischen-Punkt-Trocknung unterworfen werden [36, 37].

Wesentlich bessere Ergebnisse als mit allen Kugel-Konjugaten wurde mit der Immundekoration durch Kolloide erzielt. Kolloidale Partikel sind mit einem Durchmesser von 1–100 nm [38] mindestens um den Faktor 3 kleiner als die verwendeten Kügelchen.

Für die Immun-REM stehen zwei Arten von Kolloiden zur Verfügung: Kolloide, die direkt an Immunglobuline gekoppelt sind (Immungold) und Kolloide, die als Produkt aus einer enzym-gekoppelten Reaktion entstehen.

Kolloidales Gold ist von Faulk und Taylor [39] zur Immundarstellung in die Elektronenmikroskopie eingeführt worden. In der REM konnten mit Hilfe dieser Methode Mannan auf Blastosporen, Fibronectin auf Fibroblasten und Concanavalin-A-Rezeptoren auf Blasen-Epithel dargestellt werden [9, 40, 26]. Unsere eigenen Präparate zeigten eine gleichmäßige Schicht von Goldkolloiden sowohl auf Blastosporen als auch auf Myzelien der Hefe, während auf der Oberfläche der Makrophagen praktisch kein Goldkolloid abgelagert war. Die Verteilung und Lokalisation des Kolloids entsprach dem Ergebnis der Immunfluoreszenz. Da die gekoppelten Goldkolloide die Kritische-Punkt-Trocknung tolerieren und zugleich die Leitfähigkeit der Oberfläche des Präparats verbessern, sind der Erhaltungszustand des Präparats und die erzielte Auflösung von Oberflächenstrukturen sehr gut.

Ein Nachteil von Kolloiden liegt in der vergleichsweise geringen Gleichmäßigkeit der Partikel. Die Variationsbreite in der Partikelgröße von Goldkolloiden wurde von Frens mit 10% angegeben [18]. Hinzu kommt, daß eine Immundekoration über Kolloide erst bei höheren Vergrößerungen sichtbar wird und eine sehr einheitliche, bestenfalls glatte Struktur der entsprechenden Oberfläche von Kontrollpräparaten voraussetzt. Auf glatten Oberflächen, wie denen der Hefen, ist das Kolloid leicht zu identifizieren. Vor dem Hintergrund unregelmäßiger Oberflächenstrukturen, wie z.B. bei Darmzotten [41] wird es hingegen schwierig, das Kolloid vom Untergrund abzugrenzen. In einem solchen Fall müßte auf die Immundekoration mit Kugel-Konjugaten zurückgegriffen werden.

Dieselbe Einschränkung wie für vorgeformte Goldkolloide gelten auch für Kolloide, die als Produkt einer gekoppelten Peroxidase-Reaktion am Ort der Immunkomplexe gebildet werden. Die dabei entstehenden Kolloide aus DAB und AEC sind farbig und können im Lichtmikroskop nachgewiesen werden. Die gleichmäßige Verteilung der Farbkolloide auf Blastosporen und Myzelien entsprach dem Ergebnis der Immunfluoreszenz. Die Peroxidase-Reaktion ist selbstlimitierend [42], sie kommt unter den gegebenen Bedingungen in etwa 10 min zum Stillstand. Nach diesem Intervall hatten die Farbkolloide eine durchschnittliche Größe von 50–100 nm erreicht, während die Kontrollpräparate praktisch frei von Ablagerungen waren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden anderer Autoren, die

mit Hilfe der Immunperoxidase-Reaktion im REM Proteine und Lektine auf Zelloberflächen nachgewiesen haben [10, 43]. In ähnlicher Weise konnten Immunkomplexe auch über eine gekoppelte Reaktion mit alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden [44].

Der Vergleich der sechs untersuchten Immun-dekorationsmethoden für die Rasterelektronenmikroskopie zeigt, daß der Nachweis von Immunkomplexen auf den vorwiegend glatten Oberflächen der *Candida* Hefen am besten mit Methoden zu führen ist, die sich der spezifischen Ablagerung von Kolloiden bedienen. Im Gegensatz zu den Immundekorationsmethoden, die sich auf die Ablagerung lichtmikroskopisch sichtbarer Kügelchen stützen, kann bei Verwendung der kolloid-gestützten Techniken davon ausgegangen werden, daß die Verteilung der Partikel derjenigen des Antigens weitgehend entspricht. Dies gilt besonders für die Immungold-Technik, da die abgelagerten Gold-Kolloide im Gegensatz zu den Farbkolloiden der Peroxidase-Reaktion diskret sind und damit eine recht genaue Beurteilung der Antigenverteilung auf der Oberfläche erlauben. Bei der Peroxidase-Reaktion bewirkt das gekoppelte Enzym einen Verstärkungseffekt. Dieser kann jedoch auf Kosten der mikroskopischen Auflösung gehen, wenn die abgelagerten Farbkolloide in dichten

Schichten die Details der Oberfläche vollständig verdecken. Keine der beiden kolloidgestützten Techniken führt jedoch zu offensichtlichen Defekten im Verteilungsmuster, wie sie bei den verschiedenen Polymer-Präparaten und bei der Dekoration von *S. aureus* regelmäßig auftreten. Ein weiterer Vorteil der Kolloid-Techniken ist ihre Verträglichkeit mit der Kritischen-Punkt-Trocknung unter Verwendung von Amylacetat, das von den Polymerkügelchen (Polystyrol, Polymethacrylat und Polyacrolein) nicht toleriert wird. Der Nutzen kolloid-gestützter Dekorationstechniken ist jedoch da begrenzt, wo die zugrunde liegende Oberfläche selbst eine unregelmäßige Struktur aufweist.

Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Rüchel, der nicht nur das spezifische Antiserum bereitgestellt hat, sondern zusätzlich durch viele konstruktive Ideen und kritische Anmerkungen das Zustandekommen dieser Arbeit entscheidend gefördert hat.

Ich möchte mich bei Karin Engelhardt und Benedikt Pollok für ihre technische Assistenz bedanken.

Frau A. Siegmann sei für das Schreiben des Manuskripts herzlich gedankt.

Die Arbeit wurde mit einem Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

- [1] G. Wick, S. Baudner und F. Herzog, Immunfluoreszenz, Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg 1976.
- [2] S. C. Holt und T. J. Beveridge, Can. J. Microbiol. **28**, 1 (1982).
- [3] M. von Ardenne, Z. Phys. **109**, 553 (1938).
- [4] K. C. A. Smith und C. W. Oatley, Brit. J. Appl. Phys. **6**, 391 (1955).
- [5] V. Ghetie, K. Nilsson und J. Sjöquist, Scand. J. Immunol. **3**, 397 (1974).
- [6] K. Mannweiler, H. J. Dahmke und G. Rutter, Naturwissenschaften **59**, 170 (1972).
- [7] J. Mirro Jr., J. F. Schwartz und C. I. Civin, J. Immunol. Meth. **47**, 39 (1981).
- [8] S. Margel, U. Beitler und M. Ofarim, J. Cell. Sci. **56**, 157 (1982).
- [9] M. Horisberger, J. Rosset und H. Bauer, Experientia **31**, 1147 (1975).
- [10] E. Y. Chi und W. R. Henderson, J. Histochem. Cytochem. **32**, 332 (1984).
- [11] P. Dörfling, in: Immunologische Arbeitsmethoden (Hrsg. H. Friemel), 2. Aufl., S. 75, Fischer, Stuttgart 1980.
- [12] J. S. Sundsmo und O. Götze, Cell. Immunol. **52**, 565 (1976).
- [13] G. D. Johnson und G. M. Nogueira-Araujo, J. Immunol. Meth. **43**, 349 (1981).
- [14] R. A. Ansorg, S. Heine und C. J. Kraus, Med. Microbiol. Immunol. **173**, 233 (1984).
- [15] J. M. Singer und C. M. Plotz, Amer. J. Med. **21**, 888 (1956).
- [16] A. Rembaum und W. J. Dreyer, Science **208**, 364 (1980).
- [17] M. Kumakura, M. Suzuki, S. Adachi und I. Kaetsu, J. Immunol. Meth. **63**, 115 (1983).
- [18] G. Frens, Nature (phys. Science) **241**, 20 (1973).
- [19] J. Roth, in: Techniques in Immunocytochemistry Vol. **1**, S. 108 (Hrsg. G. R. Bullock und P. Petrusz), Academic Press, London 1982.
- [20] H. G. Farr und P. K. Nakane, J. Immunol. Meth. **47**, 129 (1981).
- [21] P. K. Nakane und G. B. Pierce Jr., J. Histochem. Cytochem. **14**, 192 (1966).
- [22] J. Burns, in: Techniques in Immunocytochemistry Vol. **1**, S. 91 (Hrsg. G. R. Bullock und P. Petrusz), Academic Press, London 1982.
- [23] J. W. Goding, J. Immunol. Meth. **20**, 241 (1978).
- [24] J. J. Langone, Adv. Immunol. **32**, 157 (1982).
- [25] M. Horisberger, J. Rosset und H. Bauer, Arch. Microbiol. **109**, 9 (1976).
- [26] G. M. Hodges, M. A. Smolira und D. C. Livingston, in: Immunolabelling for Electron Microscopy (Hrsg. J. M. Polak und I. M. Varndell), S. 189, Elsevier, Amsterdam 1984.

- [27] R. Rüchel, *Biochim. Biophys. Acta* **659**, 99 (1981).
- [28] R. Rüchel und B. Böning, *J. Immunol. Meth.* **61**, 107 (1983).
- [29] F. Macdonald und F. C. Odds, *J. Med. Microbiol.* **13**, 423 (1980).
- [30] U. Haun, Dissertation, Fachbereich Medizin, Göttingen 1985.
- [31] H. Gamliel, R. Leizerowitz, D. Gurfel und A. Polliack, *J. Microscopy* **123**, 189 (1981).
- [32] S. Avrameas und T. Ternynck, *Immunochemistry* **8**, 1175 (1971).
- [33] M. J. O'Sullivan und V. Marks, *Meth. Enzymol.* **73**, 147 (1981).
- [34] M. Horisberger, *Trends in Biochemical Science* **8**, 395 (1983).
- [35] K. A. Rosenbauer und B. H. Kegel, *Rasterelektronenmikroskopische Technik*, Thieme, Stuttgart 1978.
- [36] D. S. Linthicum und S. Sell, *J. Ultrastructure Research* **51**, 55 (1975).
- [37] R. S. Molday, W. J. Dreyer, A. Rembaum und S. P. S. Yen, *J. Cell Biol.* **64**, 75 (1975).
- [38] S. M. Rapoport, *Medizinische Biochemie*, VEB Volk und Gesundheit, Berlin 1977.
- [39] W. P. Faulk und G. M. Taylor, *Immunochemistry* **8**, 1081 (1971).
- [40] L. K. Trejdosiewicz, M. A. Smolira, G. M. Hodges, S. L. Goodman und D. C. Livingston, *J. Microscopy* **123**, 227 (1981).
- [41] T. Landsverk und H. Gamlem, *Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. A* **92**, 353 (1984).
- [42] H. Gallati und H. Brodbeck, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **20**, 221 (1982).
- [43] R. Bretton, D. A. Clark und L. Nathanson, *J. Microscopy* **17**, 93 (1973).
- [44] M. T. Makler, C. R. Miecko und A. J. Pesce, *Clin. Chem.* **27**, 1609 (1981).