Elektronenmicroscopie en de ontrafeling van de interne structuur van de cel¹

FRANK ROELS²

Samenvatting

De hoge resolutie van de elektronenmicroscopen die vanaf de jaren '50 ter beschikking kwamen van het biomedisch onderzoek, leidde niet automatisch tot de identificatie van bekende en nog onbekende celstructuren. Zelfs vandaag wordt de interpretatie van vooral pathologische en diagnostische ultrastructurele afwijkingen verder bestudeerd en uitgebreid. Meerdere pistes werden tegelijkertijd gevolgd.

De vergelijking met lichtmicroscopische beelden was slechts gedeeltelijk toepasbaar omdat de meeste LM kleuringen niet bruikbaar zijn in de EM. Elektronenmicroscopie van celfracties bekomen door centrifugatie, en anderzijds de (immuno)-cytochemische localisatie van enzym-activiteiten en antigenen, maakte de herkenning mogelijk van lysosomen, peroxisomen, en de functies van Golgi apparaat, ergastoplasma en mitochondriën. Het was ook cytochemie die mitochondriale en peroxisomale mozaïeken zichtbaar maakte. Telkens men een ander celtype of weefsel bekijkt moet veel onderzoek worden overgedaan. Virussen in lichaamsvochten worden zeer snel opgespoord dankzij negatieve kleuringen, en elektronenmicroscopie blijft essentieel in het verklaren van nieuwe infectieziekten, zoals het geval was voor het Ebola-Marburg virus, AIDS en SARS.

¹ Bewerking van de voordracht gehouden op het Symposium "Geschiedenis van de elektronenmicroscopie", ingericht door de Vereniging der Geneesheren, Oudstudenten van de Faculteit Geneeskunde en Gezondheidswetenschappen, Universiteit en Universitair Ziekenhuis, Gent (15 sept 2005).

² Correspondentieadres: Prof em Dr Frank Roels, Vakgroep Pathologie, Universitair Ziekenhuis, De Pintelaan 185, 9000 Gent. Email: Frank.Roels@UGent.be

Inleiding

Toen in 1966 een elektronenmicroscop ter onze beschikking kwam, realiseerden we ons meteen dat de interpretatie van de nieuwe beelden méér vragen opriep dan oploste. De vele kleuringen die vanaf de 19^e eeuw steeds meer details in de lichtmicroscop hadden zichtbaar gemaakt, waren onbruikbaar voor EM. Ook moesten nieuwe fixatieven en inbeddingsmiddelen worden ontwikkeld. Succesvolle fixatieven voor LM bevatten vaak azijnzuur maar dat vernietigde de mitochondriën en andere organellen. Osmiumtetroxide preserveerde goed de lipidenmembranen en verhoogde hun elektrondensiteit; maar het penetreerde nauwelijks in weefsel. De dubbele fixatie: eerst een aldehyde, gevolgd door Os, zou enorme mogelijkheden scheppen omdat lipiden, eiwitten, enzymactiviteiten en antigenen grotendeels bewaard bleven. Echter, formaldehyde, welbekend uit de lichtmicroscopie, leidde in de eerste pogingen tot lelijke beelden, en werd snel verdrongen door glutaraaldehyde ofschoon dit enkel voor zeer dunne fragmenten geschikt is tengevolge van de trage penetratie. Stanley Holt in London corrigeerde de osmotische druk van formol met sucrose of calciumchloride en was de eerste om zure fosfatase activiteit in lysosomen te visualiseren, in 1959 (1, 2). Gomori zelf, de uitvinder van het fosfatase reagens, heeft de lysosomen nooit gezien : hij fixeerte alles in aceton waardoor de membranen lek werden en de enzymes diffundeerden (3, 4). Gebufferde formol + 1% CaCl_2 penetreert snel, en indien gevolgd door OsO_4 gereduceerd met kaliumferrocyanide, geeft een uitstekende ultrastructurele preservatie, o.m. van glycogeen; bovendien kan van hetzelfde fragment (zonder Os) ook ingebed worden in paraffine of LR-White, voor alle lichtmicroscopische, resp. immunokleuringen (5, 6). Voor sommige enzymes of antigenen blijft glutaraaldehyde favoriet (7).

Het eerste inbeddingshars was methacrylaat dat bij polymerisatie veel structuren beschadigde. Epon 812 of LX hebben dit euvel verholpen.

Tenslotte ervoeren we ook dat de eerste elektronenmicroscop nog niet de stabiele en correct belichte beelden opleverde van nieuwere exemplaren, zodat ook de scherpte van de foto's vatbaar was voor verbetering.

De geïnteresseerde lezer vindt nog vele weetjes en referenties in het uitgebreid artikel uit 2001 van Françoise Hagenuenau en medewerkers (8).

Vergelijkingen met lichtmicroscopie

Voor de *celkernen*, de *chromosomen* en de *spoelfiguur* was herkenning in de EM niet zo moeilijk. Toch was het een nieuwe ontdekking dat de spoeldraden fijne buisjes waren van 30 μm doormeter, microtubuli, één van de bestanddelen van het celskelet, naast de dunnere actine en de intermediaire filamenten; ze blijven enkel bewaard na glutaraaldehyde fixatie. De *centriolen* bleken zeer elegant opgebouwd uit 9 x 3 buisjes; wat gelijkenis vertoont maar ook verschilt van een cilium dat er 9 x 2 heeft, plus 2 centrale buisjes, precies zoals de as van een spermatozoön staart die trouwens uit een centriool ontstaat.

De *kernmembraan* bleek dubbel, vertoont poriën die door een zeer dunne membraan gesloten worden, en is soms verbonden met het endoplasmatisch reticulum.

Mitochondriën waren reeds uitvoerig in de lichtmicroscop bestudeerd (de benaming stamt van Benda, 1897-1898), zowel na vitale kleuringen met Janusgroen (in 1900), als na fixatie. Daarvoor waren wel bijzondere fixatieven vereist (Regaud of formol-Ca). In de proximale en vooral de distale niertubuli vormen de rijen langwerpige rechte mitochondriën de “staafjes van Heidenhahn”; in de EM kon men ze niet missen.

Maar de enzymen van de mitochondriën moest men leren uit de celfractionering, door biochemische metingen op geïsoleerde organellen.

Schneider, Claude³ en Hoogeboom vanaf 1948, en anderen, vonden er de enzymes van de respiratoire keten. Echter, elektronenmicroscopie van de geïsoleerde mitochondriën leidde in 1953 nog tot een foutieve interpretatie van hun structuur (fig. 1). Geleidelijk aan zou men gaan beseffen dat door de vernietiging van de cellen die aan de centrifugatie voorafging, en door de gebruikte media, veel organellen gewijzigd en beschadigd werden. Daartegenover zagen Palade⁴ (10) en Sjöstrand (11) in coupes de dubbele mitochondriale membraan, de cristae die uitstulpen uit de binnenste van beide, en de grijze matrix die meestal enkele zeer donkere korrels bevat. Later bewees men dat de korrels Ca reserves zijn.

Fig. 1: Foutieve interpretatie van de structuur van een mitochondrion uit 1953, hoofdzakelijk te verklaren door het uitgangsmateriaal, nl door homogenisatie en centrifugatie geïsoleerde mitochondriën (9).

Fig 1: erroneous interpretation of mitochondrial structure derived from isolated organelles

Abb. 13. Zusammenfassendes, schematisches Bild der Beobachtungen über die Ultrastruktur der isolierten Mitochondrien. (Nach GLIMSTEDT und LAGERSTEDT 1953.)

³ Albert Claude ontving in 1974 de Nobelprijs, samen met George Palade en C. de Duve. Hij was ook de eerste voorzitter van de Belgische Vereniging voor Elektronenmicroscopie.

⁴ Zie voetnoot 3.

De mitochondriale morfologie bleek meteen buitengewoon variabel, tussen diverse celtypes, maar vooral onder invloed van fysiologische en pathologische omstandigheden. Sterk gestegen oxidatieve fosforylatie lokt de zgn dense configuratie uit: zeer donkere matrix en witte gedilateerde ruimten binnen de cristae (12). Anoxie of andere celschade doet de matrix snel transparant worden; vaak blijven vlokkige neerslagen over. Bij het syndroom van Reye zwellen de mitochondriën sterk op terwijl de cristae kort en zeldzaam worden, de korrels verdwijnen.

Het golgiapparaat of diktyosoom kon in de EM snel herkend worden omdat voor één keer de kleuringen gebruikt door Camillo Golgi in 1898 ook electronen tegenhouden: Os + KI, of zilver. Het golgi-veld bleek wel erg complex te zijn. Er was een pakket van afgeplatte parallele cisternen, meestal met een kromming zodat men functioneel een convexe cis-zijde, en concave trans-zijde kon onderscheiden. Verder zag men kleine en grote secretiekorrels en primaire lysosomen uit de cisternen ontstaan. Later voegde Novikoff nog de naburige cisternen van het endoplasmic reticulum toe alsook de lysosomen, tot het *GERL*, en dit op basis van een gemeenschappelijke enzyminhoud: zure fosfatase. Het golgi-veld varieerde sterk naargelang de functionele toestand van de cel (secretie), en tussen celtypes.

Lichtmicroscopisch was de “*borstelzoom*” of “*gestreepte zoom*” in het darmepitheel en niertubuli langdurig onderwerp van diverse interpretaties, tot de EM toonde dat het telkens om ontelbare vingervormige microvilli ging, die in beide organen de resorptie-oppervlakte enorm vergroten. Bij *coeliakie* worden de microvilli in de darm vernietigd uiteraard met verlies van resorptie vermogen.

Een andere merkwaardige vondst was de bouw van *myeline*, die in de LM zijn kleurbaarheid vaak ontleent aan zijn lipidengehalte. Dat begreep men nu goed,

omdat ze bestaat uit vele concentrische lagen plasmamembraan, zonder cytoplasma ertussen, gevormd door en blijvend verbonden met de oligodendrocyt of schwanncel (Sjöstrand, 1953, e.a.).

De dwarse streping van *skelet- en hartspier* bekend uit de lichtmicroscopie kon nu verklaard worden door de overlap van dikke ($10\ \mu\text{m}$) myosine filamenten met de dunnere, $6\ \mu\text{m}$ actine. Beide zijn verbonden door dwarse brugjes bestaande uit zware meromyosine, althans tijdens de spiercontractie. Hiervoor toonde de ultrastructuur meteen een model. Tengevolge van de vrijstelling van energie door de ATPase functie van de zware meromyosine, worden de actine filamenten actief verschoven ten opzichte van de myosine, en de spiervezel wordt korter. Gladde spiercellen bevatten dezelfde filamenten, alleen zijn ze niet mooi gerangschikt, en bevatten ze in verhouding veel méér actine (15:1). Myocard is niet opgebouwd uit een syncytium zoals eerst gedacht, maar uit afzonderlijke cellen die stevig aan elkaar zijn gehecht waardoor de intercalated disk gevormd wordt.

Elektronenmicroscopie van celfracties

Celfracties leverden in dezelfde periode enorm veel nieuwe informatie op over de biochemische inhoud van afgezonderde celorganellen (enzymen, nucleïne-zuren, lipiden...). EM van deze fracties lag voor de hand, maar de resultaten waren niet meteen eenduidig wegens de wijzigingen ondergaan door de organellen tijdens de isolatie, en tevens omdat de fracties in de eerste jaren zeer onzuiver waren: elke fractie bevat bijna alle celbestanddelen behalve kernen, zij het in verschillende verhoudingen (13).

De *microsomen* waren zeer lichte organellen die veel RNA bevatten. In feite ontstaan ze pas tijdens de homogenisatie en isolatie, door fragmentatie van het glad en ruw endoplasmatisch reticulum, d.i. zonder en met ribosomen. Het waren Palade en Siekevitz die in 1956 EM beelden van coupes en fracties naast

elkaar plaatsten (14). Het ergastoplasma was reeds uit de LM bekend als “basofiele blokken” zoals de nissl-stof in neuronen, en in de hepatocyt. Het lumen van het (R)ER in coupes is normaal spleetvormig maar het zet blaasvormig uit tijdens de fractionering, en ook in vivo door celschade zoals anoxie. Wanstaltige dilatatie van het lumen kent men ook door stapeling van bvb. een eiwit in het lumen: bij erfelijke alpha-antitrypsine-deficiëntie.

Lysosomen werden door C. de Duve⁵ en medewerkers gedefinieerd als “zakjes met latente hydrolasen”, voor het eerst geïsoleerd uit de lever van de rat (15). EM van de fractie leidde tot twijfel en discussie omdat ze ook mitochondriën en microbodies bevatte (16). De vraag was: met welke ultrastructurele bestanddelen in de levercel stemmen de lysosomen overeen? De oplossing zou komen van de cytochemie: door herkenbare localisatie in coupes van lysosomiale enzymes (zie verder). Weldra werden talrijke lysosomiale stapelingsziekten ontdekt, vaak dankzij electronenmicroscopie: zowel *erfelijke*, zoals de saccharidosen, lipidosen, peroxisomale ziekten...; evenals *verworven stapeling*: door aminoglycosiden antibiotica (17)(fig. 2), door amiodarone e.a.

Fig. 2: Lysosomen met fosfolipidenstapeling in de proximale tubulus van een patiënt behandeld met tobramycine. De zwarte neerslag is reactieproduct van zure fosfatase volgens een verbeterde Gomori-procedure (F. Roels en M. De Broe).

⁵ Zie voetnoot 3.

Peroxisomen of *microbodies* waren reeds beschreven in de nier in 1954 door Rhodin, en in lever door Rouiller en Bernhard in 1956 (18), vooraleer ze werden herkend in de lysosomale fracties van de lever, dit laatste dankzij hun gestreepte nucleoid of core die stabiel bleef na isolatie. Hun enzyminhoud ging men vermoeden, vanaf 1953, door de aanrijking van catalase⁶ en uraatoxidase in sommige fracties (19-

⁶ catalase activiteit werd reeds in 1812 beschreven, eerst in erythrocyten, die in volwassen toestand geen peroxisomen meer bezitten maar cytoplasmatische catalase. De eerste resultaten van celfractionering (1949, 1950) melden nog voor de lokalisatie van catalase in lever: “mitochondriale fractie”, “cytoplasma”. Later zou men begrijpen dat het enzym deels uit de peroxisomen werd vrijgesteld tijdens de isolatie.

22). Dit laatste enzym is stevig verbonden met de nucleoid; het produceert waterstofperoxide. Deze stof wordt door het catalase zeer snel omgezet in water en zuurstof. Wegens de rol van microbody-enzymen in het peroxide metabolisme lanceerde de groep van de Duve in 1960 een nieuwe naam: “peroxisomen”. Het onderscheid tussen lysosomen en microbodies was enkele jaren het onderwerp van heftige discussie; interessant blijven ook nu de historische teksten van Novikoff (13) en Rouiller (18).

Er weze nog opgemerkt dat de mens geen uraatoxidase bezit – waardoor kan hij lijden aan jicht! – en zijn microbodies bezitten geen nucleoid. Het ontbreken van dit ultrastructureel kenmerk maakt hun herkenning in menselijke lever moeilijk zonder cytochemische markering.

Cytochemie voor elektronenmicroscopie

Met deze kleuringen kunnen enzymes en antigenen ultramicroscopisch gelokaliseerd worden in individuele cellen en celorganellen – verschillend dus van de biochemische meting op homogenaten en celfracties.

Het principe van deze reacties is steeds:

Enzym + substraat + capturing agent → *reactieproduct* dat terplaatse neerslaat en zichtbaar is.

Bijvoorbeeld : *Fosfatase + fosfaat + Pb ion* → *loodfosfaat* (is zwart in de electronenbundel).

Voor immuun reacties:

Antigen + specifiek antilichaam → *+ proteineA + goudbolletjes* (zijn zwart in de elektronenbundel).

Het bacterieel proteineA bindt zich gaarne aan antilichamen wat dus hier benut wordt (6). In plaats van proteineA wordt ook een plantaardig enzym gebruikt (HorseRadish Peroxidase) dat men vervolgens laat reageren met een kleurstof (DAB) die elektrondens wordt door binding met Os. Antigenen die te gevoelig

zijn voor elke fixatie of voor inbedding konden gelokaliseerd worden in ultradunne cryostaatcoupes, een moeilijke techniek die het lab van Geuze heeft geperfectionneerd (23).

De gomori methode voor zure fosfatase uitgevoerd na een gepaste fixatie liet Holt en Hicks in 1961 toe de leverlysosomen ontdekt door de Duve et al, te identificeren als de “pericanaliculaire dense bodies” of de reeds langer bekende lipofuscines (2). Deze zijn erg divers qua afmeting en inhoud, zeker bij de mens; in feite zijn het secondaire en tertiaire lysosomen (restbodies). Kupffercellen (macrofagen) bezitten meestal veel grotere lysosomen dan parenchymcellen; ook hun enzymactiviteit ligt hoger. Neutrofielen (microfagen) hebben kleine primaire lysosomen, die tevens myeloperoxidase bevatten; maar als men ze iets te “eten” aanbiedt, worden het snel grote fagocytosevacuolen waarvan de enzymactiviteit perifeer tegen de membraan wordt gedrukt.

In het *RER lumen* lokaliseerde men o.m. glucose-6-fosfatase en peroxidase (dit laatste in onrijpe granulocyten, speekselklieren en traanklier (wordt dan uitgescheiden!), schildklier (zorgt voor binding van jodium aan het thyroglobuline), thrombocyten (24). Voor de peroxidase reactie wordt diaminobenzidine (DAB) gebruikt dat door het enzym met verbruik van H_2O_2 gepolymeriseerd wordt en neerslaat. De intracellulaire syntheseseweg van pancreasfermenten werd met de immuno-goud methode ontrafeld (23)

Op de *binnenste mitochondriale membraan en cristae* visualiseerde men o.m. cytochroom c + cytochroom oxidase, deze laatste eveneens dankzij DAB (25, 26); deze reactie vereist nu zuurstof. De buitenste membraan bevat o.m. monoamine oxidase, de matrix weer andere enzymes - de lijst is te lang om op te sommen. Individuele organellen in dezelfde cel bezitten niet dezelfde activiteit. Bij sommige patiënten met erfelijke defecten worden mozaïeken

gevonden: cellen met, en cellen zonder mitochondriale cytochrom oxidase (fig. 3).

Fig. 3: Mitochondriale mozaïek in de lever van een patiënt met Pearson syndrome. Na kleuring voor cytochrom oxidase tonen de mitochondriale membraan en cristae in één levercel een normale, sterke activiteit, maar de mitochondriën in de aangrenzende cel zijn zwak gekleurd tot negatief. De zeer donkere homogene bollen zijn peroxisomen (pijlen). Genetisch werd een deletie in het mitochondriaal DNA gevonden (37).

De markering die *peroxisomen* goed herkenbaar zou maken is de reactie voor catalase activiteit: $H_2O_2 + DAB + catalase \rightarrow DAB \text{ polymeer (onoplosbaar en osmiofiel)}$ (26). Zo werden ze in veel andere celtypes herkend (niertubuli, oligodendrocyten, bijnierschors, myocardiocyten, gekweekte fibroblasten, maar hun aantallen en afmetingen lopen sterk uiteen). Bovendien werd het enzym ook vrij in het cytoplasma van de levercel gevonden, althans bij sommige diersoorten (rhesusaap, cavia, schaap). Meerdere oxidasen in de peroxisomen produceren H_2O_2 (uit D-aminozuren; polyamines; vetzuren), verschillende kan men in de EM lokaliseren dankzij ceriumhydroperoxide dat neerslaat en electrodens is (7) Bij patiënten met erfelijke peroxisomale ziekten ontbreken ofwel deze organellen (Zellweger cerebro-hepato-renaal syndroom, infantiele Refsum), ofwel missen ze één of meerdere enzymen (adrenoleukodystrofie), of nog vindt men mozaïeken, d.w.z. levercellen met en andere zonder peroxisomen (5, 27, 28). Het alanine-glyoxylaat aminotransferase kan met de immuno-goud methode mooi gelokaliseerd worden (6); bij primaire hyperoxalurie is het afwezig, of inactief, of verkeerd gelokaliseerd.

Nucleïnezuren kunnen als een fijne draad gespreid worden op een eiwitfilm (Kleinschmidt techniek) en in de EM gezien worden, bijvoorbeeld het circulaire DNA van een bacteriophage, en de replicatie-vork. In coupes kon men DNA en RNA onderscheiden dankzij vertering door een nuclease; er werden ook specifieke kleuringen beschreven (fig. 4).

Fig. 4: Nucleolus in de kern van een levercel na oplossen van het RNA door RNAase, en kleuring van het DNA met geoxideerd DAB aan pH 2,5 en uranylacetaat. De ribosomen op het endoplasmatisch reticulum (pijl) zijn niet meer zichtbaar, evenmin als de RNA korrels die typisch zijn voor de nucleolus. Wel ziet men in de nucleolus fijne draden van DNA (euchromatine). De heterochromatine daarentegen is opgebouwd uit een kluwen van dickere vezels (29).

Elementen (Fe, Cu, Al, La...) worden geïdentificeerd en gelokaliseerd in cellen, indien tenminste in voldoende concentratie, dankzij hun typische elektronen absorptie- en X-stralen spectra (EELS en EDX), uiteraard met hiervoor uitgeruste microscopen (30).

Virussen

Zij werden in de EM meestel herkend door hun kleine afmetingen en grote aantallen; en na experimentele infecties van gekweekte cellen. Hun eerste beschrijvingen (1939 e.v.) danken we aan Helmut Ruska, broer van Ernst, Nobelprijswinnaar en bouwer van de eerste EM⁷. Elektronenmicroscopie is de snelste methode om een nieuw microorganisme op te sporen uitgaande van lichaamsvochten (feces, urine...), eventueel na concentrering indien het aantal partikels niet zeer groot is. Door de zgn. negatieve kleuring worden de intacte partikels omgeven door een contraststof zoals uranylacetaat of fosfowolframzuur, zodat hun buitenzijde met hoge resolutie kan worden bekeken. Vooral bij nieuwe ziekten levert EM een cruciale bijdrage, zoals voor het Ebola-Marburg virus (31), AIDS (32) en SARS (33, 34), en vervolgens voor een detailstudie van de virusopbouw (35). Angst voor bioterrorisme doet ook de belangstelling voor EM toenemen (36)⁸. Vandaag bestaat een internationaal netwerk van EM labo's die gespecialiseerd zijn in virusopsporing.

Besluit

Dankzij de hoge resolutie van de elektronenmicroscopie groeide het aantal intra- en extracellulaire waarneembare structuren op een bijna explosieve wijze. De interpretatie van beelden en functies is mogelijk door de interactie met andere methodieken, vooral het biochemisch onderzoek van celfracties en de (immuun)cytochemie. De vergelijking met lichtmicroscopie op hetzelfde materiaal blijft steeds zeer wenselijk.

Abstract

Electron microscopy and the elucidation of cellular structure

⁷ Helmut Ruska kreeg zijn opleiding in het Charité hospitaal van Berlijn, zoals Rudolf Virchow, Robert Koch, Nobelprijswinnaar Paul Ehrlich en Hans-G Creutzfeldt.

⁸ Miller vertelt dat het pokkenvirus reeds in de 18^e eeuw tegen de Amerikaanse Indianen gebruikt werd door de Britten (26).

The high resolution of the electron microscope, available for biomedical investigators since the fifties, did not automatically lead to identification of known and novel cellular components. Even to-day our interpretation of pathological and diagnostic alterations is still being completed. Several approaches were used simultaneously.

Comparison with light microscopy was only partially applicable because most LM stains could not be used. EM of cellular fractions obtained by centrifugation, and (immuno)cytochemical localisation of enzyme activities and antigens enabled the recognition of lysosomes and peroxisomes, and of the functions of the Golgi apparatus, endoplasmic reticulum and mitochondria. Cytochemistry also lead to the visualisation of mitochondrial and peroxisomal mosaics. When ones switches to other cell types and tissues, basic studies must often be repeated. Viruses can be detected by very fast techniques of negative staining, and EM remains essential in the elucidation of novel infectious diseases as it was for Ebola-Marburg virus, HIV and SARS.

Key words: lysosomes – mitochondria – mosaic – peroxisomes – virus – cytochemistry – electron microscopy.

Dankwoord

Dank aan Prof Marleen Praet, voor gebruik van de EM faciliteiten en de aangename gastvrijheid in de dienst.

Literatuur

1. HOLT SJ, HICKS RM. The localization of acid phosphatase in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; *11*: 47-66.
2. HOLT SJ. Factors governing the validity of staining methods for enzymes, and their rearing upon the Gomori acid phosphatase technique. *Exp Cell Res* 1959; *Suppl 7*: 1-27.
3. GOMORI G. Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathological conditions. *Arch Path* 1941; *32*: 189-199.
4. WOLF, A, KABAT EA, NEWMAN W. Histochemical studies on tissue enzymes. III. A study of the distribution of acid phosphatases with special reference to the nervous system. *Am J Path* 1943; *19*: 423-435.

5. ROELS F, DE PREST B, DE PESTEL G. Liver and chorion cytochemistry. *J Inherit Metab Dis* 1995; *18 Suppl 1*: 155-171.
6. ESPEEL M, VAN LIMBERGEN G. Immunocytochemical localization of peroxisomal proteins in human liver and kidney. *J Inherit Metab Dis* 1995; *18 Suppl 1*: 135-154.
7. DEPRETER M, NARDACCI R, TYTGAT T, ESPEEL M, STEFANINI S, ROELS F. Maturation of the liver-specific peroxisome versus laminin, collagen IV and integrin expression. *Biol Cell* 1998; *90*: 641-652.
8. HAGUENAU F, HAWKES PW, HUTCHISON JL, SATIAT-JEUNEMAITRE B, SIMON GT, WILLIAMS DB. Key events in the history of electron microscopy. *Microsc Microanal* 2003; *9*: 96-138.
9. GLIMSTEDT G, LAGERSTEDT S. Observations on the ultrastructure of isolated mitochondria. *Lund Univ Arsskr* 1953; *49*, nr 3, geciteerd door ZEIGER K. Morphologie des Cytoplasmas. In: BÜCHNER F, LETTERER E, ROULET F (herausg), *Handbuch der Allgemeinen Pathologie*, 2r Band 1r Teil, 1955.
10. PALADE GE. The fine structure of mitochondria. *Anat Rec* 1952; *114*: 427-451.
11. SJÖSTRAND FS. Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature* 1953; *171*: 30-32.
12. HACKENBROCK CR, REHN TG, WEINBACH EC, LEMASTERS JJ. Full Text Oxidative phosphorylation and ultrastructural transformation in mitochondria in the intact ascites tumor cell. *J Cell Biol* 1971; *51*: 123-137.
13. Novikoff AB. Lysosomes and related particles. In: Brachet J, Mirsky AE. *The Cell, Biochemistry, Physiology, Morphology. Volume II, Cells and their components parts*. New York and London: Academic Press, 1961: 423-489.
14. PALADE GE, SIEKEVITZ P. Pancreatic microsomes; an integrated morphological and biochemical study. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; *2*: 671-690.
15. DE DUVE C, PRESSMAN BC, GIANETTO R, WATTIAUX R, APPELMANS F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*. 1955; *60*: 604-617.
16. BEAUFAY H, DE DUVE C, NOVIKOFF AB. Electron microscopy of lysosomerich fractions from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; *2 (4, Suppl)*: 179-184.
17. DE BROE ME, PAULUS GJ, VERPOOTEN GA, ROELS F, BUYSENS N, WEDEEN R, VAN HOOFF F, TULKENS PM. Early effects of gentamicin, tobramycin, and amikacin on the human kidney. *Kidney Int* 1984; *25*: 643-652.
18. ROUILLER CH, JÉZÉQUEL A-M. Electron microscopy of the liver: In: Rouiller Ch (ed). *The Liver, Morphology, Biochemistry, Physiology, Volume I*. New York and London: Academic Press, 1963: 195-264.
19. NOVIKOFF AB, PODBER E, RYAN J, NOE E. Biochemical heterogeneity of the cytoplasmic particles isolated from rat liver homogenate. *J Histochem Cytochem* 1953; *1*: 27-46.
20. THOMSON JF, KLIPFEL FJ. Further studies on cytoplasmic particulates isolated by gradient centrifugation. *Arch Biochem Biophys* 1957; *70*: 224-238.
21. DE DUVE C, BEAUFAY H, JACQUES P, RAHMAN-LI Y, SELLINGER OZ, WATTIAUX B, DE CONINCK S. Intracellular localization of catalase and of some oxidases in rat liver. 1960. *Biochim Biophys Acta* 1960; *1000*: 321-322.
22. NOVIKOFF AB, ESSNER E. The liver cell. Some new approaches to its study. *Am J Med* 1960; *29*: 102-131.
23. GEUZE JJ, SLOT JW, TOKUYASU KT. Immunocytochemical localization of amylase and chymotrypsinogen in the exocrine pancreatic cell with special attention to the Golgi complex.

J Cell Biol 1979; 82: 697-707.

24. ROELS F, WISSE E, DE PREST B, VAN DER MEULEN J. Cytochemical discrimination between catalases and peroxidases using diaminobenzidine. *Histochemistry* 1975; 41: 281-312.

25. SELIGMAN AM, KARNOVSKY MJ, WASSERKRUG HL, HANKER JS. Non-droplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J Cell Biol* 1968; 38: 1-14.

26. NOVIKOFF AB, GOLDFISCHER S. Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J Histochem cytochem* 1969; 17: 675-680.

27. ESPEEL M, MANDEL H, POGGI F, SMEITINK JA, WANDERS RJ, KERCKAERT I, SCHUTGENS RB, SAUDUBRAY JM, POLL-THE BT, ROELS F. Peroxisome mosaicism in the livers of peroxisomal deficiency patients. *Hepatology* 1995; 22: 497-504.

28. ROELS F, SAUDUBRAY JM, GIROS M, MANDEL H, EYSKENS F, SARACIBAR N, ATARES PUEYO B, PRATS JM, DE PREST B, DE PRETER K, PINEDA M, KRYSTKOWIAK P, GOOTJES J, WANDERS RJ, ESPEEL M, POLL-THE BT. Peroxisome mosaics. *Adv Exp Med Biol* 2003; 544: 97-106.

29. ROELS F, GOLDFISCHER S. Ultrastructural staining of nucleic acids with oxidized diaminobenzidine. *Acta Histochem Suppl* 1977; 20: 77.

30. YANG Z, SCHRYVERS D, ROELS F, D'HAESE PC, DE BROE ME. Demonstration of lanthanum in liver cells by energy-dispersive X-ray spectroscopy, electron energy loss spectroscopy and high-resolution transmission electron microscopy. *J Microsc* 2006; 223 (Pt 2): 133-139.

31. ELLIS DS, STAMFORD S, TVOEY DG, LLOYD G, BOWEN ET, PLATT GS, WAY H, SIMPSON DI. Ebola and Marburg viruses: II. Their development within Vero cells and the extra-cellular formation of branched and torus forms. *J Med Virol* 1979; 4: 213-225.

32. BARRÉ-SINOUSSE F, CHERMANN JC, REY F, NUGEYRE MT, CHAMARET S, GRUEST J, DAUGUET C, AXLER-BLIN C, VEZINET-BRUN F, ROUZIOUX C, ROZENBAUM W, MONTAGNIER L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868-871.

33. NG ML, TAN SH, SEE EE, OOI EE, LING AE. Early events of SARS coronavirus infection in vero cells. *J Med Virol*. 2003; 71: 323-331.

34. KSIAZEK TG, ERDMAN D, GOLDSMITH CS, ZAKI SR, PERET T, EMERY S, TONG S, URBANI C, COMER JA, LIM W, ROLLIN PE, DOWELL SF, LING AE, HUMPHREY CD, SHIEH WJ, GUARNER J, PADDOCK CD, ROTA P, FIELDS B, DERISI J, YANG JY, COX N, HUGHES JM, LEDUC JW, BELLINI WJ, ANDERSON LJ, SARS WORKING GROUP. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1953-1966.

35. NODA T, SAGARA H, YEN A, TAKADA A, KIDA H, CHENG RH, KAWAOKA Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*. 2006; 439: 490-492.

36. MILLER SE. Bioterrorism and electron microscopic differentiation of poxviruses from herpesviruses: dos and don'ts. *Ultrastruct Pathol* 2003; 27: 133-140.

37. ROELS F, VERLOO P, SENECA S, MEERSSCHAUT V, EYSKENS F, SMET J, MARTIN JJ, PRAET M, VAN COSTER R. Mitochondrial mosaics in the liver of patients with Pearson and Alpers-Huttenlocher syndromes. *J Inher Metab Dis* 2006; 29 (Suppl 1): 119.