

Daniel Reich
Dr. med.

**Immuncytochemische Darstellung peroxisomaler Proteine:
Einfluß der Gewebeaufarbeitung auf die Erhaltung der Morphologie und Antigenizität.
Eine quantitative Untersuchung**

Geboren am 29.12.1969 in Mannheim
Reifeprüfung am 14.05.1989 in Mannheim
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1990/91 bis SS 1998
Physikum am 07.09.1992 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Mannheim
Praktisches Jahr in Mannheim
Staatsexamen am 20.05.1998 an der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie
Doktorvater: Prof. Dr. med. H. D. Fahimi

In dieser Studie wurden verschiedene Gewebeaufarbeitungsprotokolle morphologisch und semiquantitativ im Hinblick auf einen optimierten immuncytochemischen Nachweis von peroxisomalen Proteinen in Kombination mit einer optimalen Ultrastrukturierung und deren Visualisierung miteinander verglichen.

Zu diesem Zweck wurde Rattenlebergewebe nach einer standardisierten Perfusionsfixierung mit einem Aldehydgemisch (4% Paraformaldehyd + 0,25% Glutaraldehyd) der weiteren Aufarbeitung zugeführt. Neben der konventionellen Einbettung in Epon und der standardmäßig für die Immuncytochemie genutzten Einbettung in LR-White wurden Assays für die Kryo-Ultramikrotomie, Gefriersubstitution und Einbettung in modernere Polyacrylharze wie Lowicryl HM 23 und Unicryl ausgearbeitet. Zur Beurteilung der Antigenizitätserhaltung wurden die peroxisomalen Proteine Katalase, Acyl-CoA Oxidase und Multifunktionelles Enzym immuncytochemisch mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern nachgewiesen und deren Markierungsdichten bei den verschiedenen Aufarbeitungsprotokollen mit einem Bildanalyse-System semiquantitativ miteinander verglichen. Der Einfluß der Nachfixierung mit reduziertem Osmium vor der Einbettung auf die Markierungsdichte wurde ebenso untersucht, wie deren Abhängigkeit von der verwendeten Antikörperkonzentration.

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass für die untersuchten peroxisomalen Enzyme in der Rattenleber durchaus gesteigerte Markierungsdichten durch die schonenderen Tieftemperatur-Einbettverfahren in Unicryl und Lowicryl HM 23 bei hervorragender Ultrastrukturierung zu erzielen sind. Die Kryo-Ultramikrotomie bereitet neben ihren Vorteilen, wie der relativ kurzen Antikörperinkubationsprotokolle und der exzellenten Ultrastrukturierung mit hohen resultierenden Markierungsdichten, gewisse Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, da das Herstellen ultradünner Gefrierschnitte und deren weitere Verarbeitung ungleich höhere technische Ansprüche stellt als die konventionelle Ultramikrotomie. Insbesondere bei der Analyse des immuncytochemischen Verhaltens des Enzyms Katalase ließen sich aufgrund seiner biologischen Widerstandsfähigkeit und seiner hohen Konzentrationen in hepatozytenständigen Peroxisomen die Einflüsse der einzelnen Arbeitsschritte auf die Antigenizitätserhaltung gut erfassen. In diesem Zusammenhang wurde auch die Beeinflussung der Markierungsdichte durch die Antikörper-Inkubationstemperatur und die Inkubationsdauer quantitativ erfasst.

Katalase ist das einzige peroxisomale Protein, das sich in klassischen Epon-Ultradünnschnitten in signifikanten Mengen nachweisen läßt. Obwohl Katalase durch die Behandlung des Gewebes mit Osmiumtetroxid nicht vollständig zerstört wird, reduziert sich die Markierungsdichte nach

Eponeinbettung ganz erheblich um ca. 60% gegenüber nicht mit Osmium behandeltem Gewebe. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch nach der Einbettung in LR-White. In Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung in Bezug auf morphologische Daten und dem Vorkommen von zu untersuchenden Proteinen kann es jedoch durchaus lohnenswert sein, mit einem solchen Assay zu arbeiten, da die Verwendung von Osmium zur Membrankontrastierung nicht nur die spezifischen sondern auch die unspezifischen Antikörperbindungsstellen reduziert und damit erlaubt, den Antikörper auch in höheren Konzentrationen zu verwenden.

Als Anwendungsbeispiele mögen Fragestellungen zur Biogenese von Peroxisomen gelten, bei denen eine gute Membrandarstellung unerlässlich ist, und die immunocytochemische Detektion von Katalase nur der eindeutigen Identifizierung von Organellen als Peroxisomen dient. Bei anderen Untersuchungen hingegen mag die morphologische Untersuchung nur als Ergänzung zu biochemischen Daten dienen und soll in gleichen Relationen die Reduktion oder Induktion eines Enzyms unter bestimmten Versuchsbedingungen zeigen, wobei der morphologische Aspekt nicht im Vordergrund steht. In einem solchen Fall möchte man mit der Markierungsdichte so nah wie möglich an der tatsächlich vorhandenen Menge des untersuchten Moleküls sein. In Hinblick darauf wurde die zu solchen Zwecken standardmäßig verwendete Einbettung in LR-White mit den oben erwähnten Tieftemperatur-Einbettprotokollen verglichen. Dabei ergab sich eine optimierte morphologische Darstellung und eine signifikant erhöhte Markierungsdichte für peroxisomale Enzyme bei der Verwendung von Unicryl im Vergleich zu LR-White. Auch ein adaptiertes Gefriersubstitutionsprotokoll mit der anschließenden Einbettung in Lowicryl HM 23 zeigte eine mit der in Unicryl vergleichbare Antigenizitätserhaltung. Das morphologische Erscheinungsbild des in Unicryl eingebetteten Materials war deutlich besser als in der entsprechenden Lowicryl HM 23 Gruppe. Die Einbettung mit Unicryl führte zu einer hervorragenden Erhaltung der Ultrastruktur, sowie zu den besten Ergebnissen (Markierungsdichten) bei der semiquantitativen Immunocytochemie. Das Einbettverfahren mit Unicryl empfiehlt sich somit auch für weitere immunocytochemische Fragestellungen als Standardprozedur.