

Arno Schad
Dr. med.

Genexpression peroxisomaler Proteine: Analyse mittels *in situ* Hybridisierung

Geboren am 17.05.1969
Reifeprüfung am 15.06.1988
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1990 bis SS 1999
Physikum am 24.03.1993
Klinisches Studium in Mannheim
Praktisches Jahr in Mannheim
Staatsexamen am 11.05.1999 an der Universität Heidelberg

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

Peroxisomen stellen in Eukaryoten ein zelluläres Kompartiment dar, das auf bestimmte Aufgaben u.a. im Lipidstoffwechsel und bei der Metabolisierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) spezialisiert ist. Die Expression peroxisomaler Enzyme wird auf transkriptioneller Ebene reguliert – so z.B. die Enzyme der peroxisomalen β -Oxidation in der Rattenleber durch den Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptor α (PPAR α), einen Transkriptionsfaktor aus der Steroidhormonrezeptor-Superfamilie. Die Untersuchung der Expression von mRNAs peroxisomaler Proteine ist daher von besonderer Bedeutung für Studien über Regulation und Induktion sowie Gewebeverteilung peroxisomaler Stoffwechselwege.

Morphologisch lässt sich mRNA im Gewebeschnitt mittels der Methode der *in situ* Hybridisierung (ISH) darstellen. Diese erlaubt sowohl Aussagen zur gewebs- und zellspezifischen Expression von mRNA als auch zur jeweiligen transkriptionellen Aktivität – hier durch die verschiedenen Signalintensitäten.

Im Rahmen dieser Studie wurde daher ein Protokoll zur nichtradioaktiven *in situ* Hybridisierung für verschiedene peroxisomale Proteine kodierende mRNAs etabliert und standardisiert. Durch die Kombination von Perfusionsfixierung mit Paraffineinbettung wurde dabei eine wesentlich bessere Strukturhaltung erreicht als bei der Verwendung von Gefrierschnitten. Nach Permeabilisierung der Schnitte mit Proteinase K konnte mit Digoxigeninmarkierten cRNA-Sonden, die im Vergleich z.B. zu Oligonukleotid-Sonden eine effektivere Hybridisierung erlauben, ein spezifischer mRNA-Nachweis erreicht werden. Dieser bietet eine mit radioaktiven Methoden vergleichbare hohe Sensitivität bei wesentlich besserer Strukturhaltung.

Die Spezifität und Sensitivität der Methode wurde anhand des Albumin- und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase- (GAPDH-) mRNA-Nachweises in der Rattenleber etabliert. Mit diesem Protokoll wurde die Verteilung der Transkripte der peroxisomalen Enzyme Katalase und Uratoxidase sowie die der Enzyme der peroxisomalen β -Oxidation, Acyl-CoA-Oxidase, peroxisomale Hydratase und peroxisomale Thiolase sowie des peroxisomalen 70 kD-Membranproteins in der Rattenleber dargestellt.

In der Leber von Kontrolltieren zeigten Katalase- und Uratoxidase-mRNA eine gleichmäßige Verteilung im Leberläppchen. Während die Verteilung der Katalase-mRNA von Peroxisomen-Proliferatoren nicht verändert wurde, konnte für die der Uratoxidase eine Suppression durch Peroxisomen-Proliferatoren nachgewiesen werden. Sowohl nach Bezafibrat als auch nach Gabe von BM 15.766, einem Peroxisomen-Proliferator, der keine Induktion der peroxi-

somalen β -Oxidation bewirkt, zeigte sich eine deutliche Reduktion der Uratoxidase-mRNA in den perizentralen Hepatozyten.

Die mRNAs der peroxisomalen β -Oxidationsenzyme waren in der Leber von Kontrolltieren nur sehr schwach nachweisbar, zeigten aber nach eintägiger Behandlung der Tiere mit dem Peroxisomen-Proliferator Bezafibrat eine enorme Zunahme der Expression in perizentralen Hepatozyten. Nach sechstägiger Bezafibrat-Behandlung reagierten die periportalen Hepatozyten ähnlich wie die perizentralen, und es wurde für alle untersuchten mRNAs der peroxisomalen β -Oxidationsenzyme eine im Leberläppchen gleichmäßig verteilte Induktion detektiert. Diese Dynamik der zonalen Heterogenität der Induktion der Expression von mRNAs peroxisomaler β -Oxidationsenzyme in der Leber von mit Peroxisomen-Proliferatoren behandelten Ratten konnte mit den herkömmlichen morphologischen Methoden auf Proteinebene bisher nicht gezeigt werden.

Die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung an Leberschnitten von mit Peroxisomen-Proliferatoren behandelten Ratten zeigen, dass die Expression peroxisomaler Enzyme einer differenzierten transkriptionellen Regulation unterliegt, für die bisher unbekannt Faktoren verantwortlich sein müssen, deren Wirkungen über die schon bekannten des PPAR α hinausgehen.

Ausgehend von den Untersuchungen an der Rattenleber wurde das vorgestellte *in situ* Hybridisierungs-Protokoll auch für die Detektion der Katalase-mRNA in verschiedenen extrahepatischen Geweben der Ratte eingesetzt. So konnten Katalase-Transkripte in den proximalen Tubuli der Niere gezeigt werden, die bekanntlich zahlreiche Peroxisomen enthalten. Darüber hinaus wurde die Katalase-mRNA in verschiedenen Steroidhormonproduzierenden Zellen der Nebennierenrinde sowie in den Leydig-Zellen des Hodens nachgewiesen. Hier zeigte sich, dass die *in situ* Hybridisierung besonders dafür geeignet ist, die Gewebeverteilung der Expression peroxisomaler Proteine in Organen zu untersuchen, in denen immunhistochemisch nur schwer darstellbare »Mikroperoxisomen« mit einem Durchmesser von 100–200 nm vorkommen.

Für den Nachweis von mRNAs peroxisomaler Proteine im Zentralnervensystem, das bei peroxisomalen Erkrankungen besonders betroffen ist, musste das Standardprotokoll weiter modifiziert werden, damit eine wesentlich höhere Sensitivität erreicht werden konnte. Hierzu wurde die *catalyzed reporter deposition*- (CARD-) Signalverstärkung mit Tyramin eingesetzt. Mit dieser war es möglich, die mRNAs der peroxisomalen Enzyme Katalase und D-Aspartat-Oxidase in verschiedenen Abschnitten des Rattengehirns darzustellen. Hierbei zeigte sich, dass sich die Lokalisation der beiden untersuchten mRNAs weitgehend deckte und diese – im Gegensatz zu bekannten immunhistochemischen Daten – hier in Neuronen, nicht aber in Gliazellen gefunden wurden. Diese Differenzen in der Protein- und mRNA-Expression im ZNS könnte auf grundsätzliche Unterschiede zwischen Neuronen und Gliazellen hinsichtlich der Halbwertszeit peroxisomaler Proteine und deren mRNAs hindeuten.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Studie ein Protokoll zum nichtradioaktiven Nachweis von mRNAs peroxisomaler Proteine in verschiedenen Organen der Ratte etabliert, das für unterschiedliche Fragestellungen zur Gewebeverteilung und Regulation der Expression peroxisomaler Proteine eingesetzt werden kann und dabei klassische biochemische und morphologische Untersuchungsmethoden ergänzt. Weiterhin zeigen die anhand der vorgestellten experimentellen Ansätze erhobenen Befunde, dass sowohl die Sensitivität der Methode als auch die Qualität der Strukturerhaltung zu einer hohen Präzision der Detektion beitragen.