

## Abteilung Mikroskopische Anatomie

■ Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Grube

### Forschungsprofil

An der Abteilung sind sowohl die klassische Histologische Technik, die Histochemie und Methoden der Ultrastrukturforschung, als auch die licht- und elektronenmikroskopische Immunhistochemie sowie die digitale Bildanalyse etabliert. Das Methodenarsenal wird ergänzt durch biochemische und molekularbiologische Untersuchungstechniken.

Mit den genannten Methoden werden Forschungsprojekte zu Fragestellungen in verschiedenen Organen und Systemen (Endokrinium, Atemtrakt, weibliches und männliches Genitale) bearbeitet.

### Quantifizierung in der Immunhistochemie

Mit immunhistochemischen Methoden lassen sich im Gewebeschnitt praktisch sämtliche Strukturproteine oder zelluläre „Marker“ sowie sezernierte Substanzen spezifisch nachweisen. Deshalb gehören die entsprechenden Nachweisverfahren zum Standard in der zellbiologischen Forschung. Darüber hinaus werden immunhistochemische Substanznachweise seit längerer Zeit auch routinemäßig in der humanpathologischen Diagnostik angewandt. Dabei ist eine Quantifizierung in immunhistochemischen Präparaten unproblematisch, soweit sie sich etwa auf die Bestimmung von Flächen oder Zellzahlen beschränkt. Eine weitergehende Frage ist, inwieweit die Intensität (optische Dichte) des immunhistochemischen Reaktionsprodukts mit der Menge des jeweils nachgewiesenen Antigens korreliert werden kann. Hierbei sind zahlreiche Faktoren von Bedeutung, sowohl von seiten der histologischen Technik als auch der einzelnen Schritte im immunhistochemischen Protokoll.

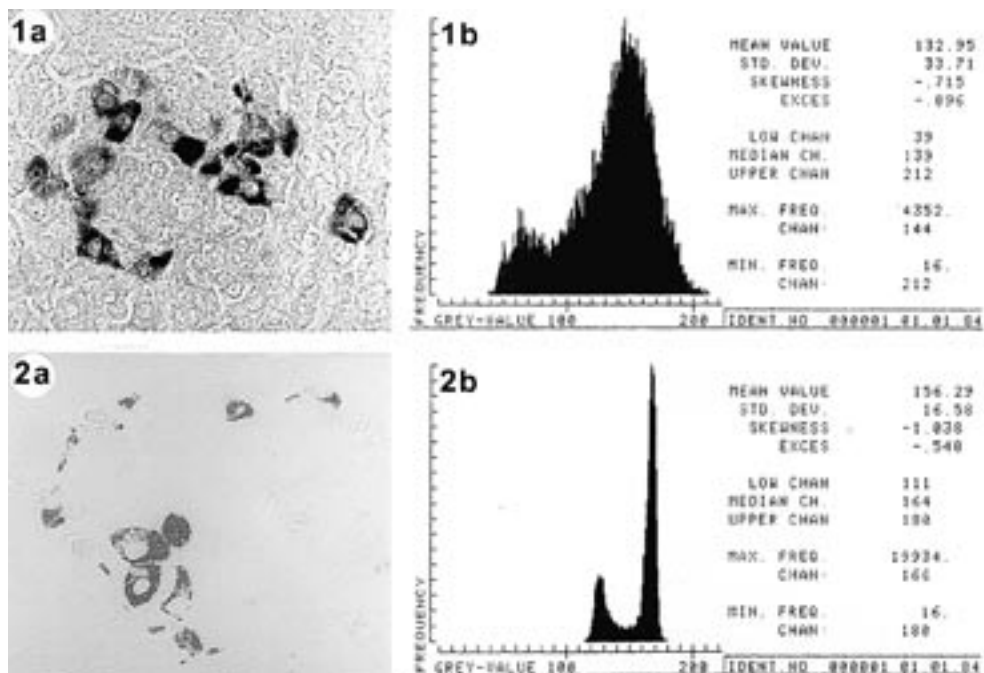
In einer längeren Untersuchungsreihe haben wir systematisch alle Variablen geprüft, die in dieser Hinsicht zu berücksichtigen sind. Diese Untersuchungen sollten gleichzeitig klären, unter welchen Reaktionsbedingungen eine wechselseitige Beziehung zwischen der Konzentration des jeweiligen Antigens und der optischen Dichte des Reaktionsprodukts besteht.

Die entsprechenden densitometrischen Bestimmungen wurden - bei standardisierter mikroskopischer Technik und kontrollierter Beleuchtung - mit einem Interaktiven Bildanalyse-System (IBAS, Zeiss-Kontron) durchgeführt. Ein Meßprogramm mit 15 Arbeitsschritten lieferte Histogramme der Immunreaktivitäten, die primär als Grauwerte bestimmt und dann in Transmission und optische Dichte übersetzt wurden.

Die Untersuchungen wurden durchgeführt an Gewebeproben aus dem Pankreas (Mensch, verschiedene Säuger); Antiseren gegen pankreatische Hormone (Insulin, Glucagon, Somatostatine) und gegen Chromogranin A dienten als primäre Antiseren. Als immunhistochemisches Protokoll wurde meist die Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Technik, in einigen Fällen auch

die Avidin-Biotin-Complex (ABC) Methode verwendet. Insgesamt wurden 14 Variable der histologischen Technik und des immunhistochemischen Protokolls überprüft. Wir beschränken uns hier auf die Darstellung derjenigen Parameter, die sich als besonders wichtig in der genannten Fragestellung erwiesen haben.

Hinsichtlich der Variablen von seiten der histologischen Technik waren hauptsächlich die Art der Gewebefixierung, des Einbettungsmediums und die histologische Schnittdicke von Belang. Lyophilisiertes, dampffixiertes, in Kunstharz eingebettetes Gewebe ist dem üblicherweise verwendeten immersionsfixierten, paraffin-eingebetteten Gewebe vorzuziehen: In



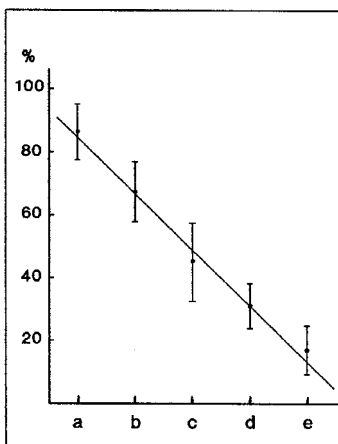
**Abb. 1 und 2:** Immunhistochemische Reaktionen und entsprechende Histogramme der Grauwerte in Paraffin- und Kunstharz-Schnitten (menschliches Pankreas, Glucagon-Zellen). Beim Paraffinschnitt (6 mm, Abb. 1a) ist im zugehörigen Histogramm (Abb. 1b) eine klare Trennung der Grauwerte zwischen Immunreaktivitäten und Hintergrund nicht möglich. Für den Kunstharzschnitt (0,5 mm, Abb. 2a) zeigt das entsprechende Histogramm (Abb. 2b) eine klare Diskrimination zwischen Immunreaktivität (linker, kleiner Gipfel) und Hintergrund (rechter, hoher Gipfel).

Kunstharzschnitten ist zum einen die Schnittdicke konstant und kontrollierbar (hier mittels Auflichtinterferometrie bestimmt), zum andern ergibt sich unter diesen Bedingungen eine klare Separation zwischen den Grauwerten „Hintergrund“ und „Immunreaktion“ (Abb. 1 und 2).

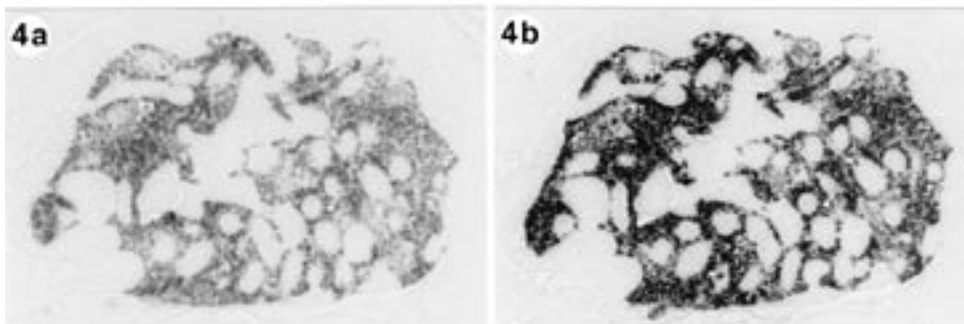
Das immunhistochemische Protokoll weist bei den heute üblichen „indirekten“ Techniken eine große Anzahl von Variablen auf. Sie wurden an semidünnen (0.5 mm) Serienschritten überprüft, die jeweils alternativ immunhistochemisch prozessiert wurden. Solche Schnitte

gehen nahezu durch die gleiche Ebene und sind deshalb für die Feststellung allfälliger Unterschiede zwischen Immunreaktivitäten besonders geeignet (vgl. auch Abb. 4).

Von besonders großer Bedeutung für die Dichte des immunhistochemischen Reaktionsprodukts waren (vorhersehbar) die Konzentration des primären Antiserums oder der verwendeten Chromogen-Lösung (Di-aminobenzidin = DAB und  $H_2O_2$ ). Aber auch bisher eher vernachlässigte Parameter erwiesen sich als wichtig in diesem Zusammenhang, zum Beispiel Art und Zusammensetzung (Molarität) der Pufferlösungen, die zur Verdünnung der Seren oder als Spülpuffer Verwendung fanden.



**Abb. 3:** Zusammenhang zwischen Dichte des immunhistochemischen Reaktionsprodukts (Ordinate) und Konzentration des primären Antiserums (Abszisse). Ein Antiserum gegen Chromogranin A wurde in aufsteigender Verdünnung zwischen 1:4.000 (a) und 1: 64.000 (e) verwendet. In diesem Bereich besteht eine (pseudo-)lineare Korrelation zwischen der Konzentration des Antiserums und der Dichte des immunhistochemischen Reaktionsprodukts.



**Abb. 4:** Effekte der eingesetzten Pufferlösungen auf die Dichte der immunhistochemischen Markierung. Insulin-Nachweis an zwei semidünnen Nachbarschnitten einer Langerhansschen Insel. Das Chromogen (DAB) wurde in identischen Konzentrationen eingesetzt, jedoch in unterschiedlichen Puffern gelöst: im üblichen Tris-HCl-Puffer (4a) oder in Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung (4b).

Bei Verwendung aufsteigender Verdünnungsreihen des 1. Antiserums zeigt sich eine weitgehend parallele Abnahme der Dichte der immunhistochemischen Reaktionsprodukte (Abb. 3).

Bei diesen Untersuchungen hat sich weiterhin gezeigt, daß eine stöchiometrische Bezie-

hung zwischen Antigen-Menge und optischer Dichte der Immunreaktivität offenbar erst bei höheren Verdünnungen der Antiseren auftritt. Die für eine quantitative Immunhistochemie optimale Verdünnung eines Antiserums liegt also in einem höheren Bereich als dem, der zur dichtesten Immunreaktion führt (!).

Von erheblichem Einfluß auf die Dichte der Immunreaktion können auch (wie oben erwähnt) die eingesetzten Pufferlösungen sein. Solche Effekte werden hier illustriert mit Befunden zum Chromogen DAB. Dies wird seit seiner Einführung als Farbgeber (1966) üblicherweise in Tris-HCl-Puffer angesetzt. Ein anderer Puffer erweist sich jedoch als viel effizienter (Abb. 4).

Schließlich wurde auch die Reproduzierbarkeit immunhistochemischer Reaktionen untersucht: Verglichen wurden identisch prozessierte Präparate aus ein und demselben Versuchsansatz und Präparate, die in unterschiedlichen Ansätzen (mit jeweils neu angesetzten Reagenzien) bearbeitet worden waren. Die „Intra-assay“-Varianzen erwiesen sich als vergleichsweise geringfügig; dagegen zeigten die „Inter-assay“-Varianzen teilweise ein erhebliches Ausmaß.

Zusammenfassend haben sich also die Variablen einer immunhistochemischen Reaktion nach Art und Ausmaß im einzelnen charakterisieren lassen. Sie lassen sich (mit Ausnahme der eben genannten Inter-assay-Varianz) durch entsprechende Berücksichtigung minimieren. Gleichzeitig tragen die vorliegenden Befunde dazu bei, die Effizienz immunhistochemischer Substanznachweise zu verbessern.

■ Verantwortlich: D. Grube

## Weitere Forschungsprojekte

**Charakterisierung der „Pregnancy-associated glycoproteins“ (PAG) aus der Rinderplazenta.**

■ K. Klisch. Förderung: DFG

**Die Bedeutung der Clara-Zellen für den Surfactant-Metabolismus der Lunge unter experimentellen Bedingungen.**

■ G. Bargsten

**Migrationsstudien von Lymphozyten in einem in vitro-Modell.**

■ G. Bargsten

**Das endokrine Pankreas unter orthologischen und pathologischen Bedingungen.**

■ D. Grube

**Lokalisation und Funktion molekularer Bausteine der Synapse in nicht-neuronalen Zellen.**

■ P. Redecker

**Clathrin-assoziierte Proteine in männlichen Keimzellen.**

■ P. Redecker

**Rolle des Eisenstoffwechsel-regulierenden Proteins Hpcidin in endokrinen Zellen.**

■ P. Redecker

**Publikationen**

Bachmann O, Riederer B, Rossmann H, **Groos S**, Schultheis PJ, Shull GE, Gregor M, Manns MP, Seidler U. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 2 is the predominant NHE isoform in murine colonic crypts and its lack causes NHE3 upregulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: 125-33.

**Bargsten G**. Cytological and immunocytochemical characterization of the insulin secreting insulinoma cell line RINm5F. *Arch Histol Cytol* 2004; 67: 79-94.

Brasch F, Johnen G, Winn-Brasch A, Guttentag SH, **Schmiedl A**, Kapp N, Suzuki Y, Muller KM, Richter J, Hawgood S, Ochs M. Surfactant protein B in type II pneumocytes and intra-alveolar surfactant forms of human lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 449-58.

Eckardt C, Eckardt U, **Groos S**, Luciano L, Reale E. Macular translocation in a patient with adult-onset foveomacular vitelliform dystrophy with light- and electron-microscopic observations on the surgically removed subfoveal tissue. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 242: 456-67.

**Groos S**, Busche R, von Engelhardt W, Reale E, Luciano L. Excessive apoptosis of guinea pig colonocytes may lead to an imbalance between phagocytosis and degradation in vivo. *Cell Tissue Res* 2004; 316: 77-86.

**Grube D**. Constants and variables in immunohistochemistry. *Arch Histol Cytol* 2004; 67: 115-134.

Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Fuchs M, Kaminski K, Schaefer A, Schieffer B, Hillmer A, **Schmiedl A**, Ding Z, Podewski E, Poli V, Schneider MD, Schulz R, Park JK, Wollert KC, Drexler H. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circ Res* 2004; 95: 3613-20.

Hohlfeld JM, **Schmiedl A**, Erpenbeck VJ, Venge P, Krug N. Eosinophil cationic protein alters pulmonary surfactant structure and function in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 496-502.

Kallenbach K, Leyh RG, Lefik E, Walles T, Wilhelmi M, Cebotari S, **Schmiedl A**, Haverich A, Mertsching H. Guided tissue regeneration: porcine matrix does not transmit PERV. *Biomaterials* 2004; 25: 3613-20.

**Klisch K**, Thomsen PD, Dantzer V, Leiser R. Genome multiplication is a generalised phenomenon in placentomal and interplacentomal trophoblast giant cells in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16: 301-6.

Koslowski R, Barth K, Augstein A, Tschernig T, **Bargsten G**, Aufderheide M, Kasper M. A

new rat type I-like alveolar epithelial cell line R3/1: bleomycin effects caveolin expression. *Histochem Cell Biol* 2004; 121: 509-19.

**Schmiedl A**, Krug N, Hohlfeld JM. Influence of plasma and inflammatory proteins on the ultrastructure of exogenous surfactant. *J Electron Microsc* 2004; 53: 407-16.

### **Buchbeiträge**

**Grube D**, Forssmann WG. Disseminierte endokrine Zellen. In: Drenckhahn D, Herausgeber. Benninghoff-Drenckhahn. *Anatomie*, Bd. 2, 16. Auflage. München: Elsevier; 2004. p. 218-27.

### **Abstracts**

2004 wurden 5 Abstracts publiziert.

### **Weitere Tätigkeiten in der Forschung**

D. Grube: Im Editorial Board der Zeitschriften *Archives of Histology and Cytology* und des *Journal of Electron Microscopy*; Gutachter für Fachzeitschriften; Mitglied im International Scientific Advisory Board des 16th International Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA, Kyoto, Japan).