Phosphorylase: Methode zum Nachweis im Endometrium des Kaninchens

Von H.-W. Denker
(Arbeitsgruppe Professor Gottschewski, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg i. Br.)

Mit 3 Abbildungen im Text

Im Endometrium des trächtigen Kaninchens ist bis $7^1/_3$ d p. c. Phosphorylase mit den bekannten histochemischen Methoden nicht nachweisbar (Abb. 1, vgl. Bo 1961, 1962). Geprüft wurden die Prozeduren von Takeuchi (s. Pearse 1960), Grillo (1961), PVP-Zusatz nach Eränkö und Palkama (1961) und Korsgaard und Wulff (1967), Protaminzusatz nach Guha (1962), Dextranzusatz nach Meijer (1968). Die Blei-Präzipitationsmethode von Hori (1964) gibt gelegentlich sehr schwache, schwer zu bewertende Anfärbungen. Bei Zusatz von EDTA zum Inkubationsmedium (Hori 1966) findet man nach den Methoden vom Takeuchi-Typ frei flotierende Glykogenflocken auf dem Schnitt, besonders reichlich bei PVP- oder Dextranzusatz.

Eine erhebliche Phosphorylaseaktivität des Endometriums läßt sich aber nachweisen, wenn man die Diffusion durch Verwendung eines Agarosegelmediums drastisch vermindert (Abb. 2). Die Aktivität kann bestimmten Abschnitten der Schleimhautkrypten und be-

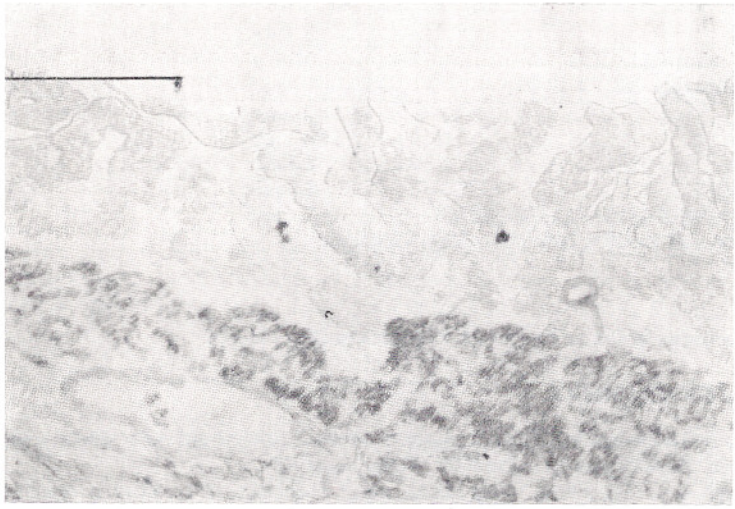

Abb. 1. Phosphorylasereaktion im flüssigen Inkubationsmedium. Uterus, Kaninchen, 7 d p. c. 90fach. Nur das Myometrium reagiert positiv. Im Bereich des Endometriums bis auf einige frei bewegliche Glykogenflocken keine Anfärbung.

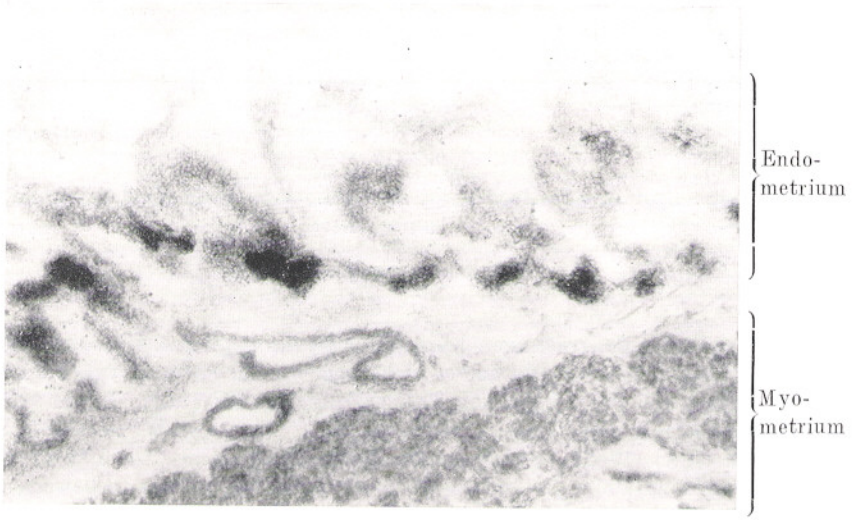

Abb. 2. Phosphorylasereaktion im Agarosegelmedium. Uterus, Kaninchen, 7 d p. c. 90fach. Starke Reaktion im Endometrium; Myometrium ähnlich Abb. 1.

stimmten Zytoplasmapartien zugeordnet werden. Nach einer Reihe von Versuchen verwende ich jetzt folgende Methode:

Ansatz A:

Glykogen	2 mg
Adenosin-5'-phosphat · H_2O	4,5 mg
Glukose-1-phosphat-Na_2 · 4 H_2O	25 mg
NaF	60 mg
EDTA-Na_2	100 mg
Aqua bidest.	7,5 m*l*
Äthanol p. a.	2,5 m*l*
0,1 m Na-Azetat-Essigsäurepuffer *p*H 5,8	5 m*l*

evtl. Zugabe von Insulin, Adrenalin oder Glukagon)

Ansatz B:

1 % Agaroselösung in 0,1 m Na-Azetat-Essigsäurepuffer *p*H 5,8.

Herstellung des Substratgels:

Von Ansatz B Ausstriche auf Objektträgern herstellen (0,4 m*l* auf 4,5 × 2,5 cm), waagerecht erstarren lassen. Aufbewahrung in feuchter Kammer bei 4 °C.
Vor Gebrauch diese Ausstriche mit 1 m*l* Ansatz A bedecken, in feuchter Kammer 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen lassen, abgießen, senkrecht 1 bis 2 Min. an der Luft antrocknen lassen.
(Alternative: 5 m*l* A mit 2 m*l* 4 % Agaroselösung im gleichen Puffer bei 40 bis 50 °C vermischen, davon Ausstriche herstellen)

Ausführung:

Auf diesen Ausstrichen Kryostat-Nativschnitte montieren.
Inkubation in feuchter Kammer bei 37 °C 3 Stunden.
Färbung mit verdünnter Lugolscher Lösung (1 : 9).
Einschluß in Lugol-Glyzerin (1 : 5).
Die Färbung ist nur 15 Minuten haltbar. Vorher können die Präparate im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Für die Erklärung der Notwendigkeit einer drastischen Diffusionshemmung bieten sich zwei Möglichkeiten an: 1. Das neugebildete Glykogen ist leicht diffusibel infolge Fehlens bindender Proteine. 2. Die Phosphorylase des Endometriums ist leicht diffusibel. Für die letztere Deutung spricht, daß sich im Inkubationsmedium eine hohe Phosphorylaseaktivität demonstrieren läßt.

In einem späteren Stadium, 8 d p. c., wird Phosphorylase im Endometrium auch mit Standardprozeduren nachweisbar. Zum gleichen Zeitpunkt tritt an den gleichen Orten Glykogen auf (Denker 1969). Bekanntlich bindet sich das Enzym leicht an Glykogen (vgl. Barber u. a. 1967), eventuell auch an Glykoproteine (Hori 1964). Vor 8 d p. c. lag im glykogenfreien Endometrium bereits eine hohe Phosphorylaseaktivität vor (s. o.), war aber zu leicht diffusibel, um mit konventionellen Prozeduren erfaßbar zu sein. Das läßt vermuten, daß das Enzym in einigen Strukturen mit diesen Methoden nur an den Orten histochemisch nachweisbar ist, an denen Glykogen vorkommt (bzw. ein Protein, das Glykogen, Phosphorylase oder beide bindet). In diesem Fall würde das erhaltene Muster die Verteilung dieser Stoffe wiedergeben. Durch Zugabe höherer Konzentrationen von Glykogen oder Dextran läßt sich dieser Effekt nicht vermeiden. Eine Prüfung mit dem hier angegebenen Agarosegelmedium erscheint daher wertvoll.

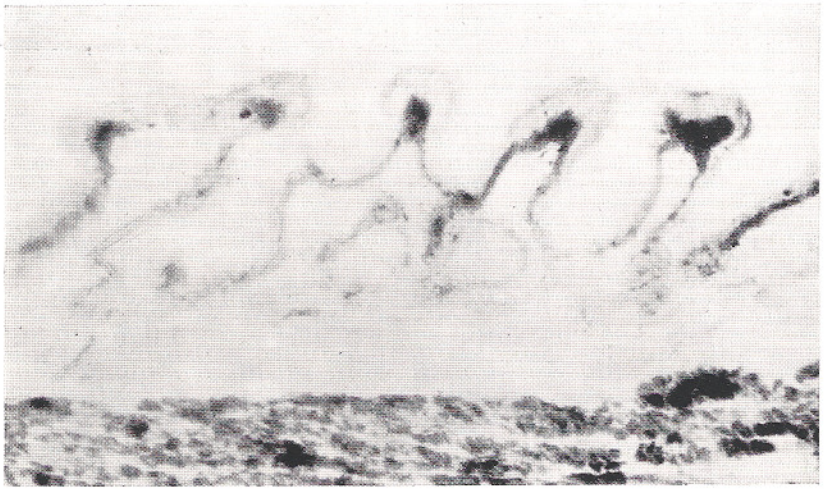

Abb. 3. Phosphorylasereaktion im Agarosegelmedium. Uterus, Kaninchen, 8 d p. c. 90fach. Starke Reaktion an der Basis der Uterusepithelzellen und im Myometrium. Ausführung des Tests im flüssigen Inkubationsmedium liefert in diesem Stadium der Trächtigkeit ein völlig gleiches Bild.

Literatur

Barber, A. A., S. A. Orrell jr., E. Bueding: Association of enzymes with rat liver glycogen isolated by rate-zonal centrifugation. J. Biol. Chem. **242**, 4040–4044 (1967).

Bo, W. J.: The effect of hormone treatment on the phosphorylase activity of the rabbit uterus. J. Histochem. Cytochem. **9**, 430–433 (1961).

— A histochemical comparison of glycogen synthesis from glucose-1-phosphate and uridine diphosphoglucose in uterine sections. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **111**, 186–189 (1962).

Denker, H. W.: Topochemie hochmolekularer Kohlenhydratsubstanzen in Frühentwicklung und Implantation des Kaninchens. Dissertation Naturwissenschaftl. Fakultät Marburg 1969.

Eränkö, O., A. Palkama: Improved localization of phosphorylase by the use of polyvinyl pyrrolidone and high substrate concentration. J. Histochem. Cytochem. **9**, 585 (1961).

Grillo, T. A. I.: A histochemical study of phosphorylase in the tissues of the chick embryo. J. Histochem Cytochem. **9**, 386–391 (1961).

Guha, S. J.: Etudes histochimiques à propos de la phosphorylase et de „branching enzyme". Thèse Doct. Sci. Nat., Paris 1962.

Hori, S. H.: Cytological phosphorylase locations in rat liver and muscle as shown by a lead precipitation method. Stain Technol. **39**, 275–278 (1964).

— Effect of EDTA on histochemical demonstration of phosphorylase activity. J. Histochem. Cytochem. **14**, 501–508 (1966).

Korsgaard, B., H. R. Wulff: An improved method for the histochemical demonstration of phosphorylase in tissue sections. Acta path. microbiol. Scand. **70**, 236–240 (1967).

Meijer, A. E. F. H.: Improved histochemical method for the demonstration of the activity of α-glucan phosphorylase. I. The use of glycosyl acceptor dextran. Histochemie **12**, 244–252 (1968).

Pearse, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and Applied. 2nd Ed. Churchill, London 1960.

Anschrift des Verfassers: Dr. H.-W. Denker, Arbeitsgruppe Professor G. H. M. Gottschewski am Max-Planck-Institut für Immunbiologie Freiburg, Freiburg i. Br., Stefan-Meier-Straße 8.

Einzeln nicht im Buchhandel

Überreicht vom Verfasser

Acta histochemica

Herausgegeben von HERMANN VOSS, Greifswald, GERHARD E. VOIGT, Lund, und JOACHIM-HERMANN SCHARF, Halle

---

Sonderdruck aus

Supplementband X

Histochemie der Ultrastruktur

Verhandlungen
der Gesellschaft für Histochemie
auf dem XIII. Symposion in Graz vom 17. bis 21. September 1969

Herausgegeben von

HORST ZIMMERMANN, Frankfurt a. M.-Höchst

VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA

Alle Rechte vorbehalten · Printed in the German Democratic Republic
Lizenznummer 261 700/142/71