

Alfred Böcking



*Geboren am 10. 8. 1944 in Sagan (Schlesien).
Besuch des Gymnasiums in Kettwig (Ruhr)
und Hamburg. 1965–71 Medizinstudium in
Freiburg i. Br., Wien und McKeesport (USA).
1971 Staatsexamen und Promotion in
Freiburg i. Br. 1972–75 wissenschaftlicher
Angestellter in der Biochemischen Abteilung
des Pathologischen Instituts der Universität
Freiburg i. Br.*

Die biochemischen Befunde der Verteilung der unspezi- fischen Esterase aus zyto- chemischer Sicht

Zusammenfassung

Mit biochemischen Untersuchungs-
methoden (Zellpartikelfraktionierung)
wird die unspezifische Esterase als
spezifisch mikrosomales Enzym
ausgewiesen. Durch die ultrahisto-
chemische Darstellung der Esterase
konnte gezeigt werden, daß es sich
dabei um einen artefiziellen Befund
handelt. In der Hauptstückzelle der
Niere kommt es z. B. im Moment der
mechanischen Verletzung der Zelle
zu einer Diffusion der primär lös-
lichen Esterase aus den Mitochon-
drien und einer unspezifischen An-
lagerung an mikrosomale Vesikel.

Vorbemerkung

Die intrazelluläre Ortsbestimmung von Enzymen erfolgt meist durch Aktivitätsbestimmungen an Zellpartikelfractionen. Soweit die direkte Lokalisation von Enzymen in der intakten Ultrastruktur mit histochemischen Methoden gelungen war, ergab sich bisher eine volle Übereinstimmung zwischen biochemischen und ultrahistochemischen Befunden. Dies beweist, daß die betreffenden Enzyme bei der Zellpartikelfraktionierung ihr Kompartiment nicht verlassen haben. Geschieht dies aber wider Erwarten, so ist der Nachweis oft nur mit Schwierigkeiten zu führen. Dabei kann die Ultrahistochemie wertvolle Dienste leisten.

Unter »unspezifischer Esterase« (E. C. 3.1.1.) versteht man eine Familie schwer unterscheidbarer Enzymindividen, welche sich disk-elektrophoretisch in 15 – 20 Komponenten auftrennen läßt. Ihr gemeinsames Kriterium ist die Fähigkeit, eine Vielzahl von Carbonsäureestern zu hydrolysieren. Diese Enzymfamilie gibt uns heute noch große Rätsel auf, da wir zwar wissen, daß sie fast ubiquitär in Arten und Zellen anzutreffen ist und einige biochemische Erkenntnisse eine wesentliche Funktion im Stoffwechsel erwarten lassen, wir das natürliche Substrat und damit die biologische Rolle der Esterase aber bis heute nicht kennen. Bei unseren Bemühungen um die Funktionsaufklärung der einzelnen Glieder dieser Enzymfamilie handelt es sich um reine Grundlagenforschung. Das heißt, wir können heute nur schwerlich die Frage beantworten, wozu eines Tages unsere Forschungsergebnisse in der Praxis nützlich sein werden. Denkt man aber daran, daß ein angeborener Enzymdefekt einer E 600 resistenten Esterase (Wolman's disease) bei Säuglingen zu einer immensen Ablagerung von Fetten in inneren Organen mit Todesfolge führt, so wird deutlich, daß die Aufklärung der biologischen Rolle dieser Enzyme nicht nur von theoretischer, sondern auch von praktischer Bedeutung für Medizin und Biologie sein wird.

Bisher kamen die Ansätze zur Aufklärung der Funktion der unspezifischen Esterase aus der Biochemie, doch haben bisher alle Ergebnisse wenig zum Verständnis dieses multiplen Enzyms beigetragen. Wir haben nun zusätzlich zu biochemischen Untersuchungen den Weg der ultrahistochemischen Enzymlokalisation eingeschlagen, in der Überlegung, daß die Kenntnis des intrazellulären Enzymortes für die Aufklärung der biologischen Rolle nützlich sein könne.

Esteraseverteilung aus biochemischer Sicht

Bedient man sich der Methode der Zellpartikelfraktionierung, um die intrazelluläre Verteilung der Esterase zu bestimmen, so werden von allen Untersuchern an verschiedenen Organen und Species sowie mit diversen Substraten übereinstimmend folgende Befunde erhoben:

1. Ein nur geringer Anteil (3 – 10 %) der Esterase wird gelöst gefunden, während der überwiegende Teil (> 90 %) an Zellpartikel gebunden vorliegt.
2. Der Hauptanteil der partikelgebundenen Esterase (etwa 70 %) entfällt auf die Mikrosomenfraktion.
3. Weniger als 10 % der Zellesterase wird in den Mitochondrien gefunden.

Der hohe Anteil der Mikrosomenfraktion an der zellulären Esterase führte dazu, daß dieses Enzym als spezifisch mikrosomal angesehen, ja sogar verschiedentlich als mikrosomales Leitenzym verwandt wurde.

Esteraseverteilung aus histochemischer Sicht

Aus nativen Kryostatschnitten diffundieren innerhalb von 1 – 2 Minuten 70 – 80 % der gleichen Esterasen in die Inkubationslösung und dies nachgewiesenermaßen nicht partikelgebunden. Im Gegensatz zu den Befunden bei der Zellpartikelfraktionierung stellt sich die Esterase hier also als ein vorwiegend lösliches Enzym dar. Um die Aufklärung dieser mit zwei verschiedenen Untersuchungsmethoden gewonnenen, widersprüchlichen Befunde haben wir uns bemüht.

Wir haben zunächst die unspezifische Esterase mit O-Acetyl-8-hydroxichinolin als Substrat elektronenmikroskopisch dargestellt. Die Darstellung (Abb. 1) erfolgte an 30 µm Kryostatschnitten von glutaraldehydfixierten Mäusenieren. Das elektronendichte, granuläre Reaktionsprodukt markiert den Sitz der Esterase. Die Artefaktfreiheit und Reproduzierbarkeit der Methode, die in unserer Arbeitsgruppe entwickelt worden ist, wurde eingehend durch Kontrollversuche abgesichert, so daß wir davon ausgehen dürfen, daß die Lokalisation des Reaktionsproduktes, auch im ultrastrukturellen Bereich, der Lokalisation der Esterase entspricht, sofern man gewisse Versuchsbedingungen einhält. In Abbildung 1 ist deutlich zu erkennen, daß die Esterase überwiegend in der Mitochondrienmatrix der Hauptstückzellen dargestellt wird und nicht etwa an den Vorläufern der Mikrosomen, den endoplasmatischen Membranen.

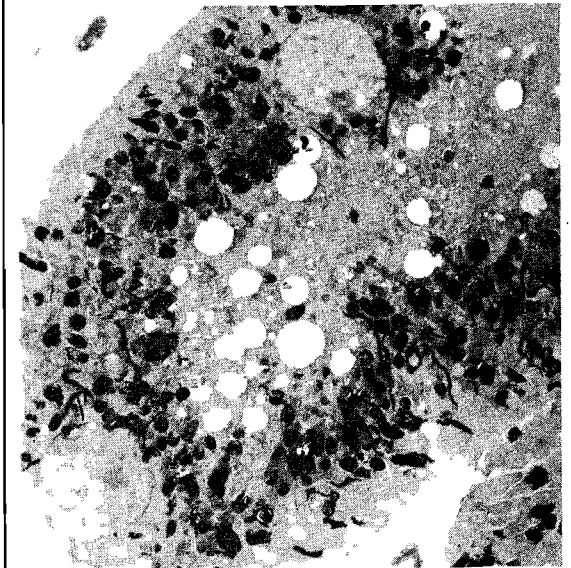


Abb. 1 – 6
Elektronenmikroskopische Darstellungen

Abb. 1
Niere, Hauptstück, NMRI Maus. Vorwiegend

Die Methode der Zellpartikelfraktionierung wies demgegenüber aber nur einen geringen Anteil der Zelleresterase in der Mitochondrienfraktion aus. Führt man nun eine elektronenmikroskopische Esterasedarstellung an – mittels Zellpartikelfraktionierungstechnik isolierten – Nierenmitochondrien durch (Abb. 2), so findet man die Matrix derartiger Mitochondrien vollständig frei von Esterase. Lediglich an Mitochondrienmembranen wird wenig Reaktionsprodukt angetroffen.

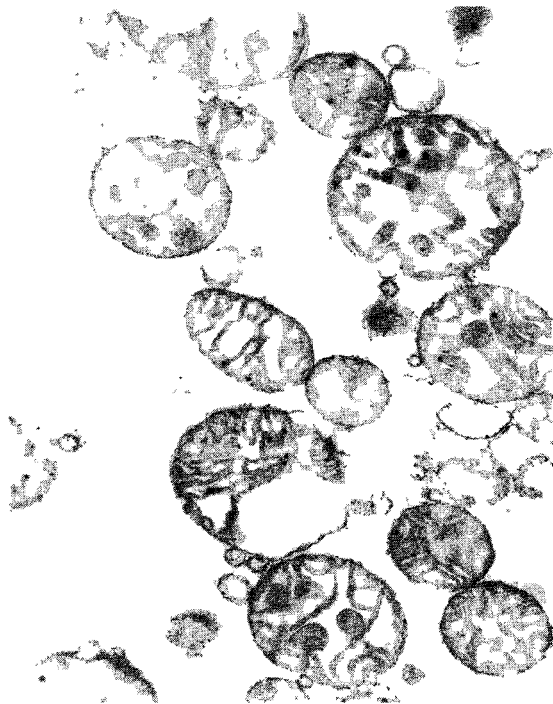


Abb. 2
Isolierte Nieren-Mitochondrien. Matrix ohne Esteraseaktivität. 19 000 x.

Eine Esterasedarstellung an einer mit dem herkömmlichen Verfahren isolierten Nieren-Mikrosomenfraktion (Abb. 3) zeigt einige der Vesikel prall mit Reaktionsprodukt gefüllt; alle weisen jedoch diffus in ihrem Innern und an ihren Membranen Reaktionsprodukt auf. Die Ergebnisse der quantitativen Aktivitätsbestimmungen und der elektronenmikroskopischen Esterasedarstellungen an Zellpartikelfractionen sind also durchaus miteinander in Einklang zu bringen. Sie widersprechen aber nach wie vor den Befunden, die wir mit der ultrahistochemischen Esterasedarstellung an intaktem Gewebe erheben können.

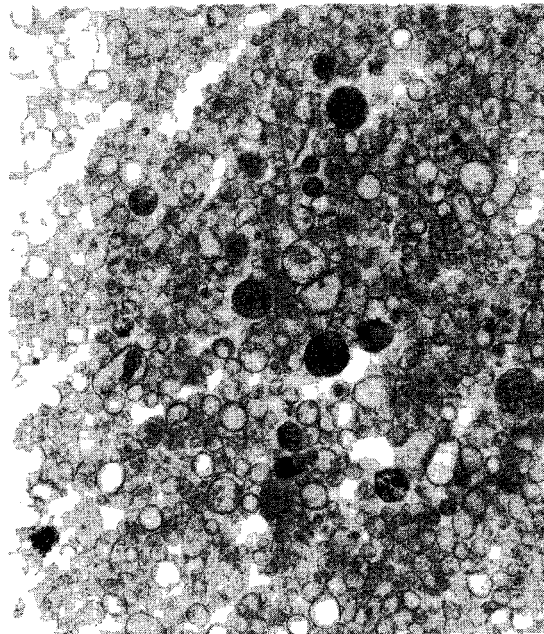


Abb. 3
Nieren-Mikrosomenfraktion. Einige Vesikel angefüllt mit Reaktionsprodukt. 19 000 x.

Die wahrscheinliche Auflösung dieser widersprüchlichen Befunde ergab sich durch eine zufällige Beobachtung:

Betrachtet man im Elektronenmikroskop die Randpartien der 30 μm dicken Kryostatschnitte dort näher, wo zwangsläufig einige unfixierte Zellen durch die Rasierklinge angeschnitten worden sind, so entdeckt man in diesen Zellen, deren strukturelle Integrität zerstört wurde, eine Umkehr der Esteraselokalisation (Abb. 4). Esterase in Mitochondrien ist kaum noch zu finden, diese wird stattdessen um die Mitochondrien herum im Zytoplasma angetroffen. Die höhere Vergrößerung (Abb. 5) zeigt einmal die Mitochondrien, deren Matrix Esterase entleert ist, und zum anderen zu mikrosomalen Bläschen umgewandeltes endoplasmatisches Retikulum, an welchen jetzt größere Mengen Reaktionsprodukt zu finden sind.

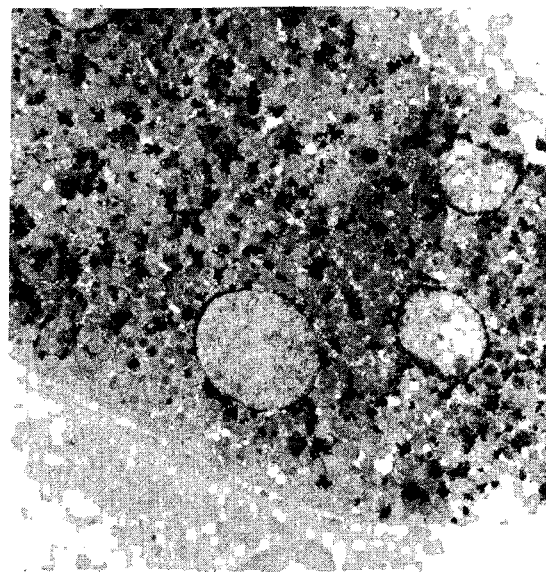


Abb. 4
Hauptstückzellen, vor der Fixation angeschnitten. Umkehr der Enzymlokalisierung. 3600 x.

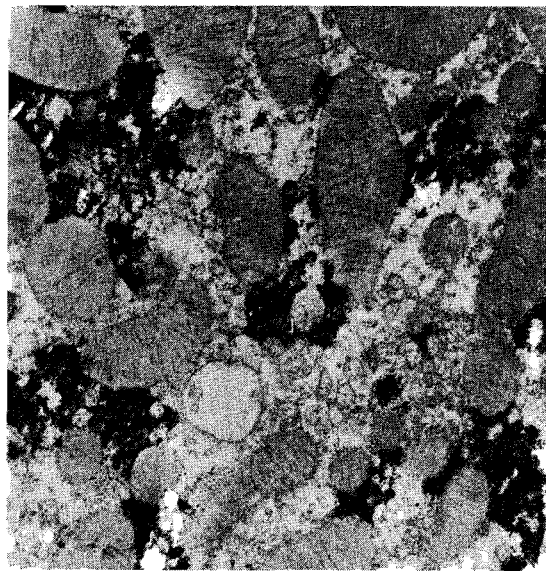


Abb. 5
Durch Anschnitt verletzte Hauptstückzellen. Mitochondrienmatrix Esterase-frei, mikrosomale Bläschen Esterase-reich. 19 000 x.

Stellt man nun die Hypothese auf, daß im Moment des Anschneidens der vitalen Zelle das Enzym aus den Mitochondrien hinaus diffundiert, so müßte man diesen Prozeß eventuell elektronenmikroskopisch in verschiedenen Stadien beobachten können. Daß dies möglich ist, zeigt die Abbildung 6, in der bereits ein Großteil der Esterase aus der Mitochondrienmatrix »herausgelaufen« ist und im umgebenden Zytoplasma an mikrosomalen Membranen vorgefunden wird.

Den Erwartungen entsprechend sind bereits in einem Nierenhomogenat, in welchem die Zellen ja mechanisch zerstört worden sind, die Mitochondrien frei von Esterase.

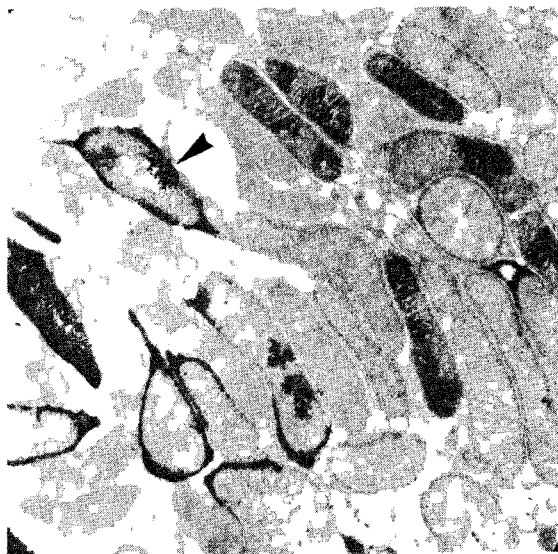


Abb. 6
Durch Anschnitt verletzte Hauptstückzellen.
Aus Mitochondrien »herauslaufende« Esterase. 19 000 x.

Die eingangs geschilderten, widersprüchlichen Befunde zur subzellulären Lokalisation der unspezifischen Esterase lassen sich demnach damit erklären, daß es durch die mechanische Zerstörung der osmotisch sehr aktiven Hauptstückzelle zu einer Umverteilung der primär weitgehend löslichen Esterase kommt, hier von der mitochondrialen Matrix an mikrosomale Membranen. Das einmal solchermaßen an Mikrosomen gebundene Enzym erscheint dann jedoch strukturgebunden und ist auch durch mehrmaliges Waschen in Pufferlösungen nicht mehr von den Strukturen abzulösen. Jedoch ist es uns gelungen, esterase-arme Mikrosomenfraktionen herzustellen, indem wir zur Homogenisation Kryostatschnitte anstelle von kompaktem Gewebe verwendet haben.

Wir stellen trotz dieser von uns angenommenen Enzymverteilung nicht in Abrede, daß ein gewisser Prozentsatz der an den Mikrosomen gefundenen Esterase auch ursprünglich an den Vorläufern derselben, den endoplasmatischen Membranen, lokalisiert ist.

Die hier vorgetragene These wird durch einige weitere quantitative, disk-elektrophoretische und ultra-histochemische Befunde gestützt. Unter Berücksichtigung dieser Befunde muß es problematisch erscheinen, die intrazelluläre Verteilung der Esterase durch Enzymaktivitätsbestimmungen an Zellpartikelfractionen bestimmen zu wollen. Als mikrosomales Leitenzym darf die Esterase wohl keinesfalls mehr angesehen werden.