

Large-scale tissue clearing (PACT): Technical evaluation and new perspectives in immunofluorescence, histology, and ultrastructure

Peter H. Neckel, Ulrich Mattheus, Bernhard Hirt,
Lothar Just, Andreas F. Mack
Scientific Reports



September 2016

Institut für klinische Anatomie und
Zellanalytik

Eberhard Karls Universität Tübingen

Large-scale tissue clearing (PACT): Technical evaluation and new perspectives in immunofluorescence, histology, and ultrastructure

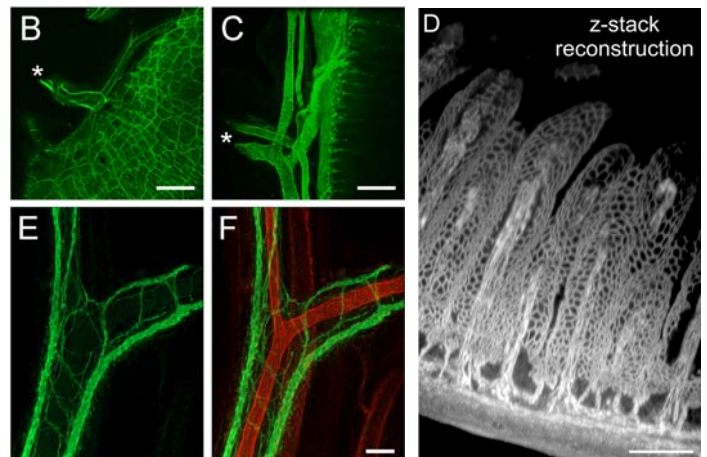
von Andreas F Mack
editiert von Markus Kipp (LMU München)

Angeregt durch optische Schnitttechniken wie konfokale Laserscan Mikroskopie und Light Sheet Microscopy wurden in jüngster Zeit Methoden zur Gewebeklärung weiterentwickelt. Diese Methoden verringern die hauptsächlich durch Membranlipide verursachte Streuung des Lichts in größeren Gewebeproben, sind aber oft nicht kompatibel mit spezifischen immunhistologischen und anderen Färbungen.

Wir haben mit unserem Team eines dieser Verfahren (Passive Clearing Technique, PACT) für klassische und spezifische Färbungen an der komplexen Gewebestruktur der Dünndarmwand optimiert. Dabei wird das Gewebe mit Paraformaldehyd und Acrylamid fixiert bzw. durchdrungen und anschließend zum Gel auspolymerisiert. Das verleiht den Zellstrukturen eine ausreichende Stabilität, so dass dann Lipide durch SDS herausgewaschen werden können. Dadurch wurde das Darmgewebe einer Maus komplett durchsichtig; menschliche Darmproben konnten ebenfalls geklärt werden.



Antikörperfärbungen an so geklärten Gewebeproben waren sowohl für Zytoskelettelemente (Cytokeratin, Tubulin), für membran-assoziierte Strukturen (ZO-1, Aquaporin-4) und intrazelluläre Epitope (Tyrosin Hydroxylase, HuC/D) möglich. An geklärten Gewebeproben führten wir außerdem Tests zum strukturellen Gewebserhalt nach klassischer Aufarbeitung des Gewebes gefolgt von HE und Azanfärbungen durch. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten erkennbare Zellstrukturen, aber tatsächlich keine Zellmembranen.

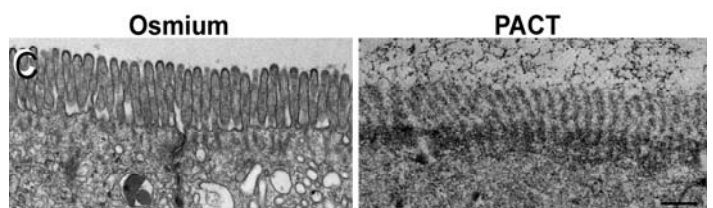


Mit konventioneller konfokaler Mikroskopie und Light Sheet Microscopy konnten wir so das gesamte enterische Nervensystem eines kleinen Darmabschnitts rekonstruieren (s. supplementary video 1 der Originalarbeit), oder den Verlauf des Schlussleistennetzes (ZO-1 Färbung) darstellen. Außerdem erlaubt uns die Methode den mesenterialen Eintritt der Blutgefäße und Nerven in die Darmwand zu verfolgen. Es sollte in Zukunft möglich sein, mit der PACT Methode die Feinstruktur der Nervengeflechte und Blutgefäße auch in pathologischem Gewebe zu untersuchen. Die exemplarisch für den Darm vorgestellte Klärungsmethode lässt sich natürlich auch auf andere Organe anwenden und ist zusammen mit Light Sheet Microscopy ein sehr nützliches Werkzeug zur Rekonstruktion von Gewebestrukturen.

Weitere Informationen

Institut für klinische Anatomie und
Zellanalytik
Universität Tübingen
an.mack@uni-tuebingen.de

Titelabbildung
Rekonstruktion des enterischen Nervensystem, markiert mit Antikörper gegen TuJ-1.



Apikale Zellregion von Enterozyten in Osmium-fixierter Kontrolle und nach PACT Gewebeklärung: Mikrovilli sind nach PACT Behandlung erkennbar, jedoch keine Zellmembranen.