Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A. Hasilik

Arbeitsgruppe Molekulare Enzymologie: Frau Prof. Dr. M. Löffler

Enzymhistochemischer Nachweis der Dihydroorotat-Dehydrogenase/ Oxidase in verschiedenen Säugerorganen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Cornelia Becker-Hintermeier
aus Marburg

Marburg 2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....IV

1. Einleitung 1

1.1 Die *de novo* Synthese von Uridinmonophosphat 1

1.2 Das Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase 3

1.3 Das Enzym Succinat-Dehydrogenase 5

1.4 Die Oxidaseaktivität der Dihydroorotat-Dehydrogenase 6

1.5 Histochemie von Dehydrogenasen 6

1.6 Inhibitoren der Dihydroorotat-Dehydrogenase..... 7

1.7 Zielsetzung..... 9

2. Material und Methoden 10

2.1 Chemikalien 10

2.2 Verwendete Lösungen und Puffer 10

2.3 Geräte und Hilfsmittel 11

2.4 Fotografie.. 11

2.5 Vorbereitung der Objektträger.....11

2.6 Organentnahme für die histochemischen Untersuchungen.....12

2.7 Fixierungen unter verschiedenen Bedingungen 12

2.8 Herstellung von Organschnitten 13

2.9 Die Hämatoxylin-Eosin Übersichtsfärbung 13

2.10 Nachweis der Dihydroorotat-Dehydrogenase und Succinat-Dehydrogenase mit Hilfe von Tetrazoliumsalzen 14

2.11 Nachweis der Oxidaseaktivität mittels Cerium-Capture-Technik 15

3. Ergebnisse 18

3.1 Versuche zur Organfixierung 18

3.2 Vorversuche zur histochemischen Dehydrogenasedarstellung.....18

3.2.1 Variation der Substratkonzentration.....19

3.2.2 Anwendung des Redoxmediators Menadion.....19

3.3 Histologische Darstellung der DHODH und SDH in den inneren Organen..... 20

3.3.1 - im Digestionssystem: Speicheldrüse, Ösophagus, Dünndarm, Colon, Leber,.....20 Pankreas

3.3.2 - in der Niere....37
3.3.3 - in den männlichen Reproduktionsorganen: Hoden, Prostata, Bläschendrüse, Nebenhoden, Samenstrang 41
3.3.4 - in den weiblichen Reproduktionsorganen: Uterus, Ovar, Tube 54
3.3.5 - in Muskelgewebe: Skelettmuskulatur, Herz 60
3.3.6 - im lymphatischen Organ Milz 66
3.3.7 - in der Haut 69
3.3.8 - im Nervensystem: Kleinhirn, Großhirn 74
3.3.9 - in der Nebenniere 79
3.3.10 - in der Luftröhre 82
3.3.11 - in der laktierenden Brustdrüse 85
3.4 - in humanen pathologischen Geweben 87
3.4.1 - im Adenokarzinom der Niere 87
3.4.2 - im Nephroblastom (Wilms-Tumor)....91
3.4.3 - im Fibrom der Haut 96

4. Diskussion 98
4.1 Vorfixierung von Gewebe 98
4.2 Anwendung von Tetrazoliumsalzen und Formazanen 99
4.3 Anwendung von Redoxmediatoren 101
4.4 Wirkung des Inhibitors Brequinar 102
4.5 Die Oxidaseaktivität der Dihydroorotat- Dehyrogenase 104
4.6 Abschließende Betrachtung des Organscreenings 105

5. Zusammenfassung 109

6. Literaturverzeichnis 111

Abkürzungsverzeichnis

ATCase	Aspartat-Transcarbamylase
CAA	Carbamylaspartat
CAD	Carbamylphosphat-Synthetase + Aspartat-Transcarbamylase + Dihydroorotase
CPSase 2	Carbamylphosphat Synthetase 2
	5-Cyanotolyl-tetrazoliumchlorid (5-Cyano-2,3-di-para-tolyl)-tetrazoliumchlorid
DAB	3,3`-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DHO	L-5,6-Dihydroorotsäure
DHODH	Dihydroorotat-Dehydrogenase (EC 1.3.99.11)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinucleotid
FM	Flavinadeninmononucleotid
H.E.	Hämatoxylin Eosin
M	Molar (mol/L)
NAD	Nicotinamid-adenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid-adenindinucleotid (reduzierte Form)
NBT	Nitrobluetetrazoliumchlorid
	(2,2`-Di-p-nitro-phenyl-5,5`-diphenyl-3,3`-(3,3`-dimethoxy-4,4`-diphenylen)-ditetrazoliumchlorid
OA	Orotsäure/ Orotat
OPRTase	Orotidylatphosphoribosyl-Transferase
PFA	Paraformaldehyd
PMS	Phenazinmethosulfat (oxidierte Form)
SDH	Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.99.1)
Tris	Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan
UMP	Uridinmonophosphat
UMP-Synthase	Orotat-Phosphoribosyl-Transferase + Orotidylat-Decarboxylase

1. Einleitung

Säuger können ihren Bedarf an Pyrimidinen sowohl durch komplette Neusynthese als auch durch die Aufnahme vorgeformter Pyrimidinnucleoside decken ("*salvage pathway"*). Dies bedeutet, dass dabei einerseits der Nucleinsäureabbau und andererseits die Nahrungsaufnahme eine entscheidente Rolle spielen. Bei dieser Arbeit wurde die *de novo*-Synthese betrachtet. Die Dihydroorotat-Dehydrogenase ist das vierte Enzym in der *de novo* Biosynthese des Uridinphosphat und katalysiert die Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat. Uridinphosphat ist die Ausgangsverbindung für alle Pyrimidinnucleotide und somit für die Synthese von DNA und RNA von essentieller Bedeutung. Pyrimidinmetabolite spielen bei verschiedenen Stoffwechselprozessen sowie für Zellregeneration eine wichtige Rolle. Gezielte Anwendung von antiparasitären, antimikrobiellen oder antiproliferativ wirkenden Substanzen kann zur Hemmung der Pyrimidinnucleotidbildung führen und damit die DNA- und RNA-Synthese sowie den Zellstoffwechsel erheblich beeinträchtigen. Ein angeborener Pyrimidinmangel infolge insuffizienter Enzyme der Biosysnthese (z.B. Orotatacidurie) führt zur Leukopenie, Fatiquesyndrom, Immundefiziten sowie physiologischen und intelektuellen Leistungsminderungen. Diese Erkrankung wird mit der Gabe von 100 mg Uridin pro Kilogramm Körpergewicht am Tag therapiert (Suttle, D.P. et al., 1989).

1.1 Die *de novo* Synthese von Uridinmonophosphat

Der sechs Reaktionsschritte umfassende Syntheseweg führt zur Herstellung von Uridinmonophosphat, einer wichtigen Ausgangssubstanz für die zur DNA- und RNA-Synthese notwendigen Pyridmidinnucleotide. Für den ersten im Cytosol stattfindenden Schritt wird die energiereiche Verbindung Carbamylphosphat benötigt. Sie entsteht mit Hilfe des Enzyms CPSase 2 sowie 2 Molekülen ATP aus Glutamin und Hydrogen-carbonat. Die ATCase katalysiert anschließend unter Abspaltung von zwei Molekülen Wasser und Phosphat die Bildung von N-Carbamylaspartat aus Carbamylphosphat und Aspartat. Es folgt eine reversible Zyklisierung zur Dihydroorotsäure. Aktiviert wird dieser Vorgang von der DHOase. Die oben genannten drei Enzyme katalysieren die im Cytosol ablaufenden Reaktionsschritte und bilden in Säugern ein multifunktionelles Enyzm, das sogenannte CAD, dessen Vorteil einerseits in der optimalen Auslastung des Enzymsystems besteht und andererseits Abbauvorgängen entgegenwirkt (Voet & Voet,

1992). Es kommt dabei zu einer „Kanalisierung" der Reaktionsprodukte entlang des jeweiligen aktiven Zentrums. Die Dihydroorotsäure gelangt anschließend vom Cytosol durch die äußere zur inneren Mitochondrienmembran, wo sie von der membranständigen Dihydroorotat-Dehydrogenase zu Orotat dehydriert wird. Die zwei freigesetzten Wasserstoffatome können nur auf den Elektronenakzeptor Ubichinon in der Atmungskette übertragen werden (Miller, 1971; Chen & Jones 1976; Löffler, 1980). Alle folgenden Schritte laufen wieder cytosolisch ab.

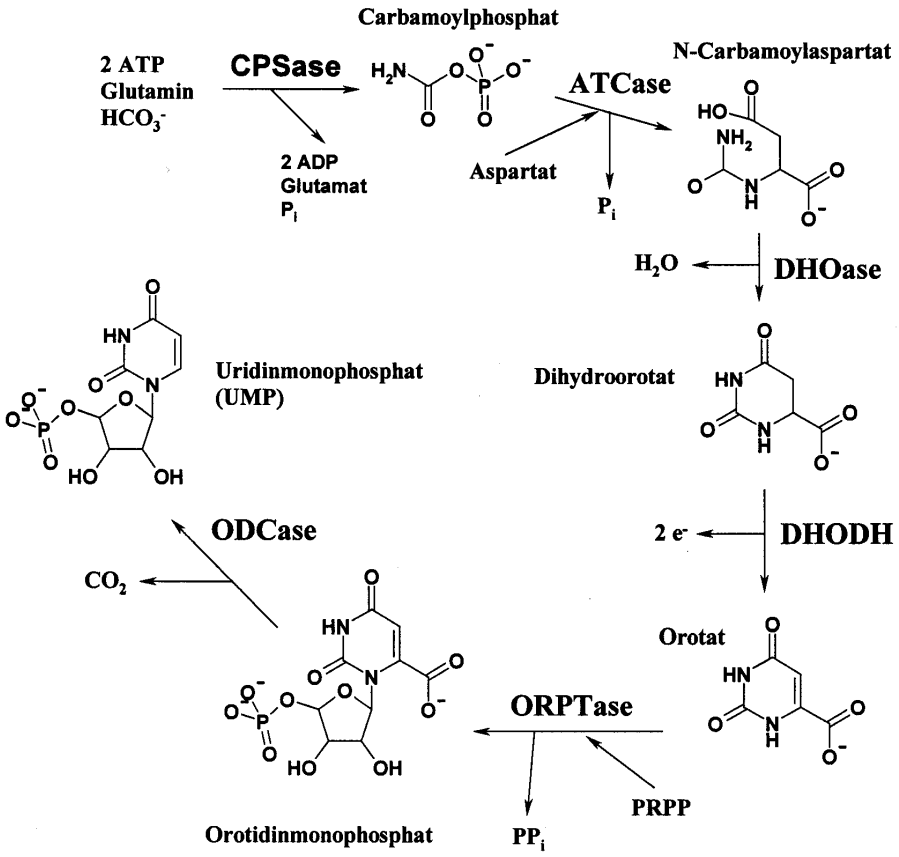


Abb. 1-1: Die *de novo* Pyrimidinbiosynthese

CPSase: Carbamoylphosphat-Synthetase, ATCase: Aspartat-Transcarbamoylase, DHOase: Dihydroorotase, DHODH: Dihydroorotat Dehydrogenase, ORPTase: Orotat-Phosphoribosyl-Transferase, ODCase: Orotidinmonophosphat-Decarboxylase

Die entstandene Orotsäure bildet unter Abspaltung von Pyrophosphat mit Phosphoribosyldiphosphat eine N-glykosidische Bindung, so dass Orotidin-5`-Phosphat entsteht. Katalysiert wird dieser Schritt durch die Orotidin-5-Phosphat-Phosphorylase. Nach Decarboxylierung mit Hilfe der Orotidylat-Decarboxylase kommt die neue Verbindung Uridinmonophosphat zustande. Sie ist die Grundsubstanz aller weiteren Pyrimidinnucleotide (Cytidin, Thymidin). Die beiden letztgenannten Enyzme gehören

ebenfalls einem multifunktionellen Enzymsystem an und werden UMP-Synthase genannt. Im Genom des Menschen sind diese auf Chromosom 2, die DHODH auf Chromosom 16 und das CAD-Enzym auf Chromosom 3 lokalisiert.

1.2 Das Enzym Dihydroorotat-Dehydrogenase

Die DHODH liegt als einziges Enzym in der *de novo* Pyridmidinsynthese nicht cytosolisch vor, so wie zum Beispiel jene von Gram-positiven Bakterien oder der Bäckerhefe, sondern ist membranassoziiert (Roy, 1992). Sie gehört keinem multi-funktionellem Enzymsystem an. So nahmen Chen und Jones 1976 an, sie sei auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, während frühere Arbeiten von Angermüller und Löffler (1995) die Innenseite der inneren Membran favorisierten (Abb.1.2). Weiterführende Untersuchungen an Rattenleberorganellen konnten beweisen, dass das Enzym an der Außenseite der inneren Membran gebunden und mit einem hydrophoben Proteinanteil in der innere Membran verankert ist (Abb. 1.2). Das N-terminale Ende des Enzyms reicht in den Matrixraum hinein (Knecht, 1998; Rawls et al., 2000). Diese Erkentnisse wurden aus der beobachteten Proteaseresistenz des Enzyms in intakten Mitochondrien sowie einer Proteaseempfindlichkeit der DHODH in Mitoplasten geschlossen. Dabei handelt es sich um Mitochondrien, deren Außenmembran infolge osmotischer Vorgänge zerstört worden ist. Erstmals wurde die Dihydroorotat-Dehydrogenase 1953 von Liebermann und Kornberg beschrieben. Sie untersuchten den Anaerobier *Zymobacterium oroticum*. Dabei handelte es sich um eine Spezifität, denn das Enzym ist hier im Cytosol lokalisiert, hat eine katabole Funktion und ist NADH abhängig, unterscheidet sich also wesentlich von den später entdeckten und untersuchten anabolen Dihydroorotat-Dehydrogenasen. Unterschiede treten auf bezüglich ihrer Cofaktoren, dem proximalen Elektronenakzeptor, ihrer Lokalisation und ihres Molekulargewichts. Sie enthalten jedoch alle Flavine als prosthetische Gruppen. Dies hat zu unterschiedlichen Namensgebung mit verschiedenen EC Nummern geführt. So existiert eine Dihydroorotat-Dehydrogenase, Dihydroorotat-Ubichinon-Oxidoreductase (EC 1.3.99.11) und die Dihydroorotat-Oxidase (EC 1.3.3.1). Erste histochemische Untersuchungen bezüglich der Enzymaktivität an Rattenorganen wurden von Cohen (1962) und von Castoldi (1968) durchgeführt. Letztgenannter Autor wies die DHODH in unterschiedlichen Blutzellen nach und fand eine zunehmende Aktivität bei einigen hämatologischen Erkrankungen. In den vergangenen Jahren sind die Aminosäuresequenzen der Dihydroorotat-Dehydrogenase in einigen Pilzen,

Pflanzen, Bakterien und Protozoen aufgeklärt worden. Im folgenden sind Beispiele für die Isolierung und Untersuchungen der DHODH aus unterschiedlichen Spezies aufgeführt:

Bakterien : *Lactobacillus bulgaricus* (Taylor et al., 1971), *Escherichia coli* (Karibian & Couchoud, 1974), *Lactococcus lactis* (Rowland et al., 1997),

Pilze: *Neurospora crassa* (Miller, 1971),

Protozoen: *Trypanosoma brucei* (Pascal et al., 1983),
Plasmodium falciparum (Krungkrai, 1995),

Säuger: Rattenleber (Forman & Kennedy, 1977, Lakaschus & Löffler, 1992), Schweineleber (Krüger, 1990, Altekruse, 1991), *Ehrlich Ascites Tumorzellen* (Shoaf & Jones, 1973, Lakaschus et al., 1991).

In einigen der oben genannten Arbeiten wird deutlich, dass in niederen Organismen entweder die cytosolische oder die membrangebunden DHODH vorliegen kann. So besitzt zum Beispiel der Parasit *Trypanosoma brucei* die cytosolische Form des Enzyms, während jene von *Plasmodium falciparum* membrangebunden ist. Pilze wiederum enthalten zum größten Teil das membranassoziierte Enzym, während der Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* als Ausnahme ein cytosolisches Enzym besitzt. Bei den genannten Gram-negativen Bakterien ist die DHODH membranständig und kann die Reduktionsäquivalente entweder anaerob auf das Fumarat-Reductase-System übertragen oder aerob in die Atmungskette einschleussen. Die DHODH in höheren Eukaryonten ist ausschließlich in der Mitochondrienmembran lokalisiert und über Ubichinon mit der Elektronentransportkette gekoppelt (Chen & Jones, 1976; Löffler, 1980). Damit ist die Pyrimidinsynthese obligat sauerstoffabhängig (Löffler, 1980). Aus diesem Grund können Störungen in der Atmungskette, Inhibitoren, oder Hypoxie zu einer Beeinträchtigung der RNA- und DNA-Synthese führen (Löffler, 1980; 1985, 1992b). Der Arbeitsguppe ist es gelungen, durch Immunisierung von Huhn und Kaninchen Antikörper gegen humane DHODH herzustellen und sie an Paraffinschnitten und im Westernblot zu untersuchen (Grein, 1997). Dabei wurden auch genauere Ergebnisse bezüglich des Molekulargewichts der aus Geweben isolierten Enzyme gewonnen. Zu Beginn der praktischen Untersuchungen für die vorliegende Arbeit gab es wenige Studien über das Enzym in Eukaryonten und Säugetieren, wie z.B. menschliche Milz (Gero & O`Sullivan, 1985) oder Rattenleber (Forman & Kennedy, 1977) und es war noch nicht rekombinant untersucht worden. In neueren Arbeiten konnte die DHODH mit Hilfe der NBT-Technik sowohl in Homogenaten von humanen

Monozyten, Melanomzellen der Maus sowie in unterschiedlichen Zelllinien mit Hilfe eines Mikrotiterplattenassays nachgewiesen werden (Schneider, 2000).

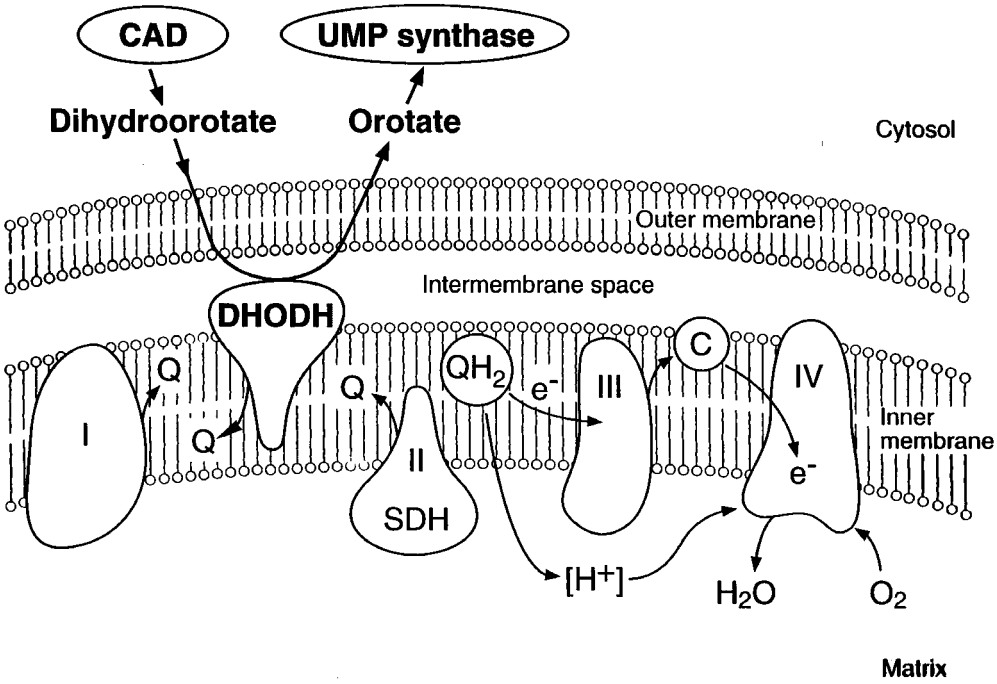


Abb.1.2: Lokalisation der DHODH und SDH in der Zellmembran

1.3 Das Enzym Succinat Dehydrogenase

Sie ist ein wichtiges Enzym im Citratzyklus und stellt gleichzeitig den Komplex II der Atmungskette dar Succhinat: Ubichinon-Oxidoreduktase (EC 1.3.99.11). Der Citratcyclus läuft im Matrixraum von Mitochondrien ab, wo es zum Endabbau von Acetyl-CoA kommt, dem zentralen Metaboliten des Intermediärstoffwechsels. Das Acetyl-CoA ist durch ß-Oxidation der Fettsäuren entstanden, aus dem Aminosäure-abbau oder durch oxidative Decarboxylierung von Pyruvat. Die anabole Funktion des Zyklus liegt in der Bereitstellung von Vorstufen für die Aminosäure- und Hämsyntese sowie der Gluconeogenese. Die SDH oxidiert im sechsten Schritt das Succinat zu Fumarat unter Bildung von reduziertem Flavinadenindinucleotid. Der Wasserstoff wird anschließend über Ubichinon auf die Atmungskette übertragen. Hier kann, so wie es für die DHODH auch möglich ist, eine indirekte Enzymhemmung durch Cyanid, einem Inhibitor der Cytochromoxidase erfolgen, so dass die Reduktionsäquivalente nicht mehr von der Atmungskette aufgenommen werden können. In der vorliegenden Arbeit ist dieses Enzym aus folgenden Gründen ebenfalls untersucht worden: Es ist wie die in dieser Arbeit zu untersuchende DHODH mitochondrial gebunden (Abb 1.2) und ein häufig untersuchtes Enzym (Stryer, 1996). Als Markerenzym der Mitochondrien (Linß,

1999; Burkitt, 1993) stellt sie demnach eine geeignete Positivkontrolle dar (Seidler & Kunde, 1971; Andersen & Hoyer, 1973; Seidler & Hecht, 1978; Garbarsch et al., 1978; Kohnoe et al.,1991). Es war davon auszugehen, dass die SDH Aktivität höher als die DHODH Aktivität sein wird.

1.4 Die Oxidaseaktivität der Dihydrootatat-Dehydrogenase

Das zu untersuchende Enzym nutzt normalerweise Ubichinon als physiologischen Elektronenakzeptor. Voruntersuchungen hatten jedoch gezeigt, dass unter besonderen Bedingungen, zum Beispiel wenn die Elektronen direkt von Flavin auf Sauerstoff übertragen werden, eine direkte Reaktion mit Sauerstoff möglich ist (Löffler & Lakaschus, 1992). Auch die Entstehung von Ubichinonradikalen, die ihrerseits mit Sauerstoff reagieren können, ist möglich. Es entsteht dabei Wasserstoffperoxid, das sich mit der Cerium- Diaminobenzidintechnik histochemisch nachweisen lässt (Halhuber et al., 1988; Angermüller und Fahimi, 1988). Aus der Reaktion von Ceriumionen mit dem freiwerdenden Hydroperoxid entsteht Cerium-Perhydroxid, das in saurem Reaktionsmilieu zur oxidativen Polymerisation von DAB führt. Der braune kristaline DAB-Niederschlag lokalisiert das nachzuweisenden Enzym. In der vorliegenden Arbeit sollte nun erstmals die Oxidaseaktiviät der DHODH an gesunden und einigen pathologischen Geweben überprüft und nachgewiesen werden. Bisher war bekannt, dass die Oxidaseform vorwiegend in Mikroorgansimen anzutreffen ist, während die Dehydrogenase hauptsächlich bei höheren Eukaryonten vorliegt. Nach Untersuchungen von Lakaschus (1993) betrug der Anteil einer Oxidaseaktivität gegenüber der Dehydrogenase aus präparierten Ratten- und Schweinemitochondrien sowie EAT-Zellen, ungefähr 15-20%.

1.5 Histochemie von Dehydrogenasen

Bei den Dehydrogenasen handelt es sich um wichtige Enzyme, welche die Reaktion zwischen zwei Substraten katalysieren. Dabei werden zwei Elektronen eines Donors vom Enzym auf ein Akzeptorsubstrat bzw. auf ein Coenzym, wie zum Beispiel NAD oder NADP, übertragen. Der Donor wird bei diesem Vorgang oxidiert, der Akzeptor reduziert. Eine zweite Gruppe von Dehydrogenasen, hier werden die beiden Enzymsysteme DHODH und SDH eingeordnet, besitzen eine prosthetische Gruppe, zum Beispiel FAD oder FMN (Pearse, 1972). Um die Enzymreaktion sichtbar zu machen,

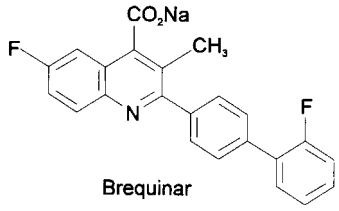
können die Elektronen in einem zweiten Schritt vom reduzierten Flavin oder Ubihydrochinon auf ein Tetrazoliumsalz mit positivem Potential übertragen werden, so dass nun das farblose, lösliche Salz zum reduzierten, tiefgefärbten und wasserunlöslichen Formazan wird (Abb. 2.1,S. 14). Mit diesem Vorgang wird die Enzymaktivität detektiert. Heutzutage kommen aus der Fülle der bekannten lediglich sechs bis acht Tetrazoliumsalze in der Histochemie zum Nachweis dehydrierender Enzyme zur Anwendung (Seidler, 1991). Ein gut untersuchtes und oft verwendetes Salz ist das Ditetrazoliumsalz NBT. Es ist wie die meisten Salze farblos sowie wasserlöslich und sollte als Indikator zum Nachweis der Dihydroorotat-Dehydrogenase und Succinat-Dehydrogenase in der vorliegenden Arbeit eingesetzt werden. Tetrazoliumsalze haben eine stickstoffhaltige, 5-atomige, heterozyklische Struktur, verbunden mit drei unterschiedlichen Substituenten. Infolge chemischer Reduktion, dass heißt bei der Übertragung von Wasserstoff, so auch bei der Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat, kommt es zur Aufspaltung der Ringformation (Abb. 2.1). Es entstehen wasserunlösliche, ungeladene, gegen Säure empfindliche, dunkelgefärbte Formazane. Auf diese Weise lassen sich Dehydrogenasen, Steroide, Zucker oder andere reduzierende Substanzen nachweisen (Seidler, E., 1991).

1.6 Inhibitoren der Dihydroorotat-Dehydrogenase

Die Entwicklung neuer Inhibitoren der Pyrimidinsynthese und damit auch Hemmstoffe des hier zu untersuchenden Enzyms ist z.B. von Bedeutung bei der Krankheit Malaria, oder bei der Bekämpfung von opportunistischen Infektionen, wie sie Pneumocystis carinii darstellt. Eine weiterer wichtiger Aspekt ist die Behandlung von Tumoren (Ittard et al., 1995). Die Inhibitoren der DHODH können in 3 Gruppen eingeteilt werden (Jöckel et al., 1998; Knecht, 1998). Hemmend auf die DHODH wirken zum einen Stoffe, welche die Atmungskette blockieren, also nicht enzymspezifisch sind wie Zyanid oder Azid. Eine weitere Gruppe von Substanzen konkurriert mit L-DHO kompetetiv um das aktive Zentrum. Dazu gehört unter anderem 5-Aza-Dihydroorotsäure, die als Hemmstoff an isolierten Enzymen aus Ratten- und Schweineleber erfolgreich getestet wurde (Lakaschus, 1993; Krüger, 1990). Weitere Beispiele für die zweite Gruppe sind Dichlorallyllawson und Lapachol (Bennet et al., 1979; Knecht, 1997) als Ubichinon-Analoga. Aber auch Strukturanaloga zu Orotat oder Chinonanaloga zählen zu dieser Gruppe. Eine ähnliche Struktur weist auch der antibakterielle

Gyrasehemmer Ciprofloxacin (“Ciprobay”) auf. Zur dritten Inhbitorenklasse gehören unter anderem Isoxazol (Leflunomide), Triazine (Toltrazuril) oder Chinchonin-abkömmlinge wie Brequinar. Zur Vernichtung von Parasiten entwickelte Pharmaka in der Medizin sind ebenfalls antipyrimidin wirksam. So inhibiert das Antikokzidienmittel Toltrazuril (Baycox^{R}) die Dihydrooratat-Dehydrogenase, jedoch wurde auch eine Hemmung der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex 1) beobachtet (Harder & Haberkorn, 1989; Löffler et al., 1997; Jöckel et al., 1998). Seine inhibierende Wirkung auf die DHODH ist deutlich geringer als jene des Chinolincarbonsäurederivats Brequinar, welches der wirksamste Inhibitor der DHODH ist (Abb.1.3).

Brequinar®



Brequinar

Abb. 1.3

Seine Auswirkungen auf die Pyrimidinsynthese wurden an tierischen Geweben, in Zellkulturen und an Patienten nachgewiesen (Peters et al., 1990; Löffler et al., 1992) und sie konnten unter hypoxischen Versuchsbedingungen zu einer zusätzlichen synergistische Wachstumshemmung von Brequinar auf Zellen führen. Seine dosisabhängige zytostatische Wirkung wurde zunächst in der Maus, an menschlichen Tumormodellen und später sowohl in klinischer Phase 1 als auch 2 getestet (Arteaga et al., 1989), wobei Patienten mit z.B. Lungenkarzinom, Colonkarzinom und Nieren-tumoren behandelt wurden. Aufgrund erheblicher Nebenwirkungen mußten jedoch die Studien vorzeitig beendet werden. Eine klinische Anwendung als Zytostatikum fand nicht statt. In weiterführenden Untersuchungen, bei Einsatz von niedrigen Dosierungen, ist eine immunsuppressive Komponente aufgefallen, so dass Brequinar bei Trans-plantationen im Tiermodell ausgetestet wurde (Cramer, 1992). Aufgrund der DHODH Hemmung führt seine Anwendung zur verminderten Syntheserate von DNA- und RNA-Vorstufen und somit zur geringeren Zellproliferation mit eingeschränkter Protein-synthese. Eingehende Voruntersuchungen hatten eine unterschiedliche Wirkung von Brequinar auf die Oxidase- und Dehydrogenaseaktivität der DHODH gezeigt. Seine geringere Wirkung auf die Oxidaseaktivität legte die Vermutung nahe, dass der Wirkmechanismus nur in Verbindung mit Ubichinon als Elektronenrezeptor funktioniert (Lakaschus & Löffler, 1992), was in späteren Untersuchungen bestätigt

wurde (Knecht & Löffler, 1998). Die Entwicklung neuer Inhibitoren der Pyrimidinsynthese und damit auch von Hemmstoffen des hier zu untersuchenden Enzyms hat seitdem vorrangig die Modulation der Immunantwort zum Ziel gehabt. Für die Bekämpfung von Tumoren wurden bis dato keine Inhibitoren der Pyrimidin *de novo S*ynthese klinisch zugelassen und eingesetzt.

1.7 Zielsetzung

1. In Vorversuchen sollte zunächst geeignetes Untersuchungsmaterial (anfixiertes Gewebe oder Kryostatschnitte) gefunden werden, um damit die optimalen Versuchsbedingungen für den enzymhistochemischen Nachweis der DHODH und eines mitochondrialen Konrollenzyms, der SDH, zu ermitteln.
2. Für den Aktivitätsnachweis dieser Dehydrogenasen an Gewebeschnitten sollte ein Nitrobluetetrazoliumsalz eingesetzt werden. Der dabei entstehende blaue Formazanniederschlag zeigt lichtmikroskopisch das Verteilungsmuster der Enzymaktivität in den verschiedenen Organen.
3. Ein anschließend durchgeführtes Screening sollte dazu verhelfen, enzymreiche Gewebe zu finden. Ein hoher Enzymgehalt ist die erste Voraussetzung für die erfolgreiche Anreicherung und Reindarstellung eines Proteins aus nativem Gewebe.
4. Parallel zur DHODH wurde die ebenfalls mitochondrial gebundene, hier als Referenzenzym verwendete SDH, über die es bereits zahlreiche Arbeiten gab, ebenfalls untersucht.
5. Mit diesen enzymhistochemischen Assays sollte die Wirkung eines neuentwickelten Hemmstoffes für DHODH: Brequinar (damals in Beginn Klinische Phase 2-Studien) direkt am Gewebe nachgewiesen werden.
6. Da in der Literatur und in Experimenten durch die Arbeitsgruppe eine Oxidasenebenaktivität der DHODH beschrieben worden war, galt es in folgenden Untersuchungen diese Nebenaktivität histologisch darzustellen. Dazu mußte die in der Literatur beschriebene Cerium-Diaminobenzidin Technik für den Oxidase Nachweis adaptiert werden. Das Ziel war die Erstellung eines Organscreenings und ein qualitativer Vergleich der Enzymverteilung von Dehydrogenase- und Oxidaseaktivität in den verschiedenen Geweben. Desweiteren sollte geklärt werden, ob sich die Inhibitorwirkung von Brequinar auch bezüglich dieser Nebenaktivität bestätigt.
7. Anschließend war geplant, beide enzymhistochemischen Nachweisverfahren an humanen normalen und pathologisch veränderten Geweben auszutesten.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Brequinar Sodium©	DuPont Nemours, Pharma GmbH, Bad Homburg
Bernsteinsäure Dinatriumsalz	Merck, Darmstadt
Ceriumchlorid ($CeCl_3$)	Serva, Heidelberg
Cobaltchlorid ($CoCl_2$)	Merck, Darmstadt
L-5,6-Dihydroorotat	Sigma, Deisenhofen
Diaminobenzidin	Sigma, Deisenhofen
Eosin G R	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Kaiser`s Glyzeringelantine	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
NBT	Sigma, Deisenhofen
Phenazinmethosulfat	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Serva, Heidelberg
Tris-Maleat	Sigma, Deisenhofen

Alle übrigen Chemikalien wurden in der höchsten Reinheitsstufe von den Firmen Serva (Heidelberg); Roth (Karlsruhe); Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Verwendete Lösungen und Puffer

Bernsteinsäure	0,05 M/ pH 7,5
Brequinar	1 mM Stammlösung/ 100 mM Trispuffer (pH 8,0)
Ceriumchlorid	30 mM Stammlösung
$CoCl_2$	10% Stammlösung/ 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,3)
Diaminobenzidin	0,5 % Stammlösung/ 50 mM Natriumacetat, pH 5,2
	0,05 % Endkonzentration
Dihydroorotatsäure	50 mM Stammlösung/ 100 mM Trispuffer, (pH 8,0)
	10 mM Endkonzentration
$MgCl_2$	0,5 % in aqua bidest gelöst
Natrium-Acetat-Puffer	200 mM Stammlösung (pH 5,3)
Natriumazid	200 mM Stammlösung ,100 und 10mM Endkonzentration
Tris-Maleat-Puffer	100 mM, pH 8,0

NBT	20 mM Stammlösung
NaOH	0,2 M Stammlösung
NaCN	10 mM Stammlösung
Succinatlösung	0,05 M Bernsteinsäure/ 0,1M Trispuffer (pH 7,5)

2.3 Geräte und Hilfsmittel

Brutschrank	Fa. Heraeus, 37 °C
Gefriertruhe	Raba, -20 °C
Kryostat	Jung, Frigocut 2800 E, Heidelberg, -80 °C
Magnetrührer	Fa. Heidolph, MR 2000
Objektträger	Maße= 2,5&7,5 cm.; Dicke=1mm
pH-Meter	Fa Schott, CG 840
Schüttler	Edmund Bühler, KS 10, 7400 Tübingen
Waage	Fa. Sartorius, 2001 MP 2
Waage	Fa. Sartorius, 1213 MP
Wärmebad	Köttermann, Labortechnik, A-G-93-074
Zentrifuge	Hermle (BHG), Z230 M

2.4 Fotografie

Farbdiafilm	Fujichrom sensa 100
Farbdiafilm	Kodak EPY Ektachrome 64 T (Kodak AG, Stuttgart)
Lichtmikroskop	Fa. Zeiss, 459380
Photomikroskop	Axiomat Fa. Zeiss, 475619-9900

2.5 Vorbereitung der Objektträger

Über Nacht wurden die Objektträger unter dem Abzug in verschließbaren Glasküvetten mit Chromschwefelsäure gereinigt. Am nächsten Tag erfolgte zunächst ein zweistündiger Spülvorgang mit fließendem Leitungswasser und anschließend eine dreimalige Reinigung mit aqua bidest. Nach vierstündiger Hitzesterilisation bei 200 °C folgte das Eintauchen in eine Lösung aus 0,25 M NH_4OAc mit anschließendem Trocknungsvorgang bei 600 °C. Danach wurden die Objektträger mit Poly-L-Lysin (50µg/ml) 30 Minuten lang bei Raumtemperatur beschichtet. Nach dem Trocknungsvorgang konnten sie in staubfreien verschließbaren Glasbehältern gelagert werden.

2.6 Organentnahme für die histochemischen Untersuchungen

Als Versuchstiere dienten je 15 männliche und 15 weibliche Wistarratten im Alter von 0,5 - 1,5 Jahre. Sie wogen zwischen 300 und 700 Gramm und sind unter kontrollierten Bedingungen gehalten und gefüttert worden (Temperatur: 21 °C). Die Betreuung und Fütterung wurde von Frau Gutschank durchgeführt (Institut für Anatomie und Zellbiologie Marburg). Fachtierärztliche Aufsicht und Kontrolle unterlag Dr. Schulz (Tierärztlicher Dienst des Klinikums Marburg). Nach der Äthernarkose wurden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet und das Abdomen eröffnet. Es wurden folgende Organe entnommen: Herz, Skelettmuskel, Zunge, Niere, Leber, Milz, Magen, Dünn- und Dickdarm, Prostata, Hoden, Ovar, Uterus, Pankreas, Großhirn, Kleinhirn, Duodenum, Haut, Speiseröhre, Skelettmuskulatur und Speicheldrüse. Anschließend erfolgte das Schneiden in 10-20 mm große Stücke sowie das sofortige Eintauchen in flüssigen Stickstoff (-196,5 °C), so dass es zu einer Schockfrostung kam. Danach konnten sie in Plastikbeutel verpackt bei –80 °C aufbewahrt werden. Ebenso wurde mit den Proben verfahren, welche aus pathologischen Routineuntersuchungen des Klinikums Marburg stammten (Prof. Dr. Rüschoff danke ich für die Unterstützung bezüglich dieser Präparate).

2.7 Fixierungen unter verschiedenen Bedingungen

Das Fixieren führt zum Erhalt von Organstruktur und sollte sowohl die Autolyse durch freiwerdende Enzyme als auch die mikrobielle Zersetzung des Gewebes von außen verhindern. Verschiedene Fixierungen müssen immer ausgetestet und miteinander verglichen werden, um die optimalen Bedingungen für einen Enzymnachweis zu finden. Dabei sind sowohl vorfixierte Gewebe ausgetestet worden als auch native schock-gefrorene Organe.

Herstellung von Fixierlösungen

1. Methacarn- Fixierlösung: 60 ml Carnoy, 30 ml Cloroform,10 ml Eisessig

2. Formol-Calcium-Fixierung nach

a) Baker: 1 g CaCl , 50 ml aqua dest, 10 ml Formol

b) Mc Manus: 1 g Kobaltnitrat, 80 ml aqua bidest, 10 ml 10 % CaCl 10 ml Formol

Holt`sches Gemisch: 30 g Saccharose, 1 g Gummiarabicum

Die Lösungen wurden vorgekühlt und die frisch entnommenen Organe über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank fixiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine 4- fache Spülung im Holt´schen Gemisch. Bei dieser Konservierungsmethode handelte es sich um eine Immersionsfixierung, wobei das betreffende Organstückchen in die Lösung eingelegt wurde. Das fixierte Gewebe konnte nun direkt geschnitten oder in der Kühltruhe aufbewahrt werden.

3. Paraformaldehydfixierung: 4g Paraformaldehyd in 50 ml 0,1M Phosphatpuffer

Das Gemisch wurde unter dem Abzug auf 70 °C erwärmt und unter Rühren 0,1N NaOH hinzugefügt. Wenn der Neutralisationspunkt erreicht war, löste sich das Aldehyd schlagartig auf und die Lösung klarte auf. Nach dem Abkühlen erfolgte die Filtration und eine pH Einstellung (7,2-7,4). Die hier häufig angewendete Postfixation nach Enzymreaktion wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Es folgte ein Spülvorgang in fließendem Leitungswasser und das Eindecken in Glyzeringelantine.

2.8 Herstellung von Organschnitten

Zur Herstellung von Organschnitten wurde sowohl fixiertes als auch natives, stickstoff-gefrostetes Gewebe im vorgekühlten Kryostaten auf eine Temperatur von –20 °C gebracht und mit Hilfe eines Gewebeklebers (Tissue-Tec) auf den Kryostatstempel aufgefroren. Die Schnittdicke sollte nicht mehr als 10 µm betragen. Es erfolgte der Schneidevorgang mit einer für die Lichtmikroskopie optimalen Stärke von 6-10 µm sowie das Aufziehen mit Hilfe eines Pinsels auf die ebenfalls vorgekühlten mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger. Die Aufbewahrungstemperatur der Objektträger lag bei bei –40 °C.

2.9 Die Hämatoxylin-Eosin Übersichtsfärbung

Unfixierte Schnitte wurden für 1 bis 2 Minuten in aqua dest gespült und anschließend erfolgte die Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (7-10 Minuten). Nach der Bläuung unter fließendem Leitungswasser (10-15 Minuten) und erneutem Spülen mit aqua dest konnte die Färbung mit Eosin (0,5- 1 Minute) durchgeführt werden. Es folgte ein weiterer Spülvorgang und die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe bis abschließend das Gewebe in Kaiser`s Glyzeringelantine eingedeckt wurde. Mit dieser Färbung stellen sich azidophile Gewebeanteile wie Plasma- und Interzellularsubstanzen

in abgestuften Rottönen sowie basophile Strukturen wie Zellkerne und Knorpelgrundsubstanz blau dar (Knoche, 1979).

2.10 Nachweis der Dihydroorotat-Dehydrogenase und Succinat-Dehydrogenase mit Hilfe von Tetrazoliumsalzen

In der vorliegenden Arbeit wurde das farblose, wasserlösliche NBT zum Nachweis der DHODH verwendet (Stoward et al., 1991). Wie unter 1.5 beschrieben, führen bei der enzymatischen Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat die zwei freiwerdenden Wasserstoffatome zur Reduktion des Salzes, welches am Ort seines Entstehens präzipitiert. Es entsteht ein wasserunlösliches, dunkelblaues NBT-Diformazan als Indikator und Detektor der enzymatischen Reaktion (Abb. 2.1.). Der Vorgang ist irreversibel und läuft unter histochemischen Bedingungen nur in Richtung Formazanbildung ab.

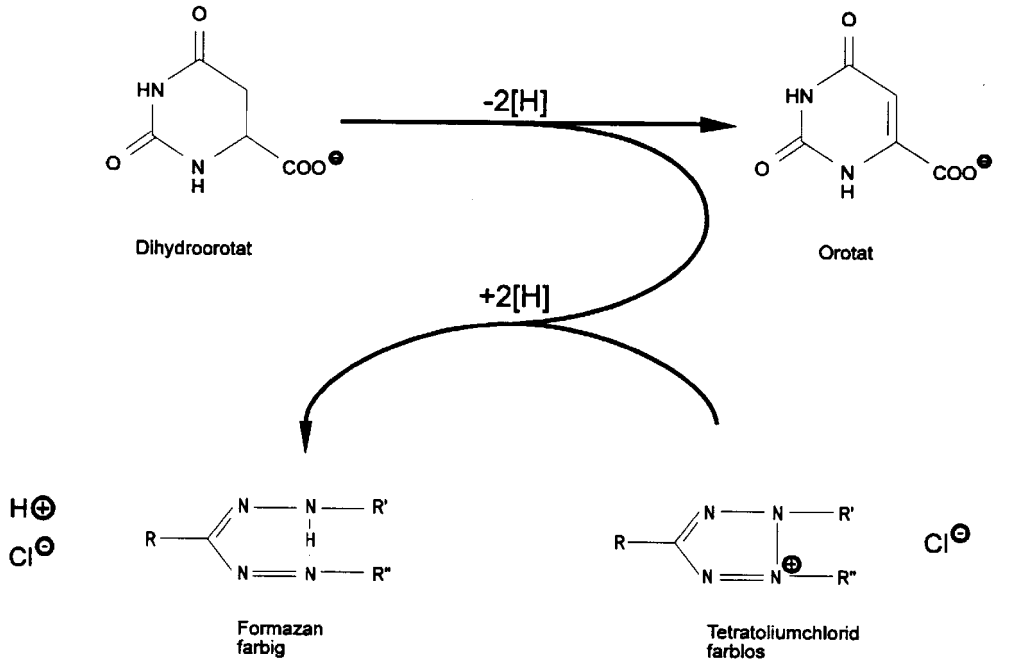


Abb 2.1: Nachweis der DHODH mit Tetrazoliumchlorid (aus Wegerle, 1993)

Durchführung der Vorinkubation

Inkubationslösung:	650 µl 100 mM Tris-Maleat- Puffer, pH 8,0
	650 µl 20 mM NBT
	250 µl 10 mM NaCN
	250 µl 0,5 % $MgCl_2$
	750 µl aqua bidest

Zur Darstellung der SDH war die pH Einstellung auf 7,5 notwendig. Zunächst erfolgte eine fünfminütige Vorinkubation der angetauten Kryostatschnitte in der oben beschriebenen, auf 37°C erwärmten Testlösung. Wurde der Inhibitor eingesetzt, so mußten 2000 µl Hauptinkubationslösung mit 4 µl Brequinarstammlösung (10 µM Endkonzentration) gemischt werden.

Durchführung der Hauptinkubation: 1000 µl Inkubationslösung
1000 µl 50 mM DHO

Es wurden 400 µl des Testansatzes auf jeweils einen Objektträger pipetiert. Um die Spezifität der Anfärbung zu kontrollieren, wurde dem Kontrollschnitt im Testansatz anstelle von Substrat aqua bidest beigefügt. Es folgte die Inkubation bei 37°C in der feuchten Kammer. Hierfür ist der Boden eines verschließbaren Kunststoffbehälters mit aqua bidest getränktem Filterpapier ausgelegt worden. Darauf angeordnete Glasstäbe dienten als Unterlage der vorbereiteten Objektträger. Die Inkubationskammer wurde geschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Bei 37°C im Brutschrank entstand eine wasserdampfgesättigte Umgebung, welche die Schnitte vor dem Austrocknen bewahrte. Es wurden verschiedene Zeiten für die Dauer der Inkubation ausgetestet (von 10 Minuten bis zu zwei Stunden). Desweiteren wurde zu Beginn der Untersuchungen der Redox-mediator Menadion (Vitamin K_3 in Aceton) in einer Menge von 2 bis 3 Tropfen hinzugefügt um auszutesten, ob eine Reaktionsverstärkung erreicht werden konnte.

Nachbehandlung, Fixierung

Nach dem Dekantieren der Inkubationsmischung wurde zweimal für 5 Minuten in 0,1M Tris-Maleat-Puffer gespült. Anschließend erfolgte eine Fixierung für 2-5 Minuten in 4 % Paraformaldehyd und das Eindecken der Schnitte in 300µl Glyzeringelantine. Anschließend wurde diese mit einem sauberen, staubfreien Deckglas verschlossen und die Präparate mikroskopisch beurteilt sowie photografiert.

2.11 Nachweis der Oxidaseaktivität mittels Cerium-Capture-Technik

Die Anwendung von dreiwertigen Ceriumionen (Cer^{3+}) als Nachweisreagenz für anorganisches Orthophosphat oder H_2O_2 wurde von Briggs und Coautoren 1975 entwickelt. Angermüller und Fahimi (1988) modifizierten die Technik zum Nachweis von Peroxisomen-Oxidase in Rattenniere und Leber. Sie benutzten Cobalt und

Nickelionen zur Verstärkung der enzymatischen Reaktion. Auch Robinson et al. (1991) beschrieben die Cerium-Capture Technik zum Nachweis von Oxidasen. Beim Oxidasenachweis kommt es durch entstehendes H_2O_2 in einer Lösung aus DAB mittels Ceriumionen, zu einer Konversionsreaktion von Ceriumhydroxid zu Ceriumperhydroxid. Die in der neuen Verbindung entstehende Perhydroxygruppe oxidiert und führt zur oxidativen Polymerisation und Zyklisierung des farblosen DAB zu DAB-Braun (Abb. 2.2). Der entstehende braune Niederschlag lokalisiert das zu untersuchenden Enzym. Inkubationsmedien und feuchte Kammer, in der die Enzymreaktion stattfindet, wurden zu Beginn für 10 bis 15 Minuten auf 37 °C erwärmt.

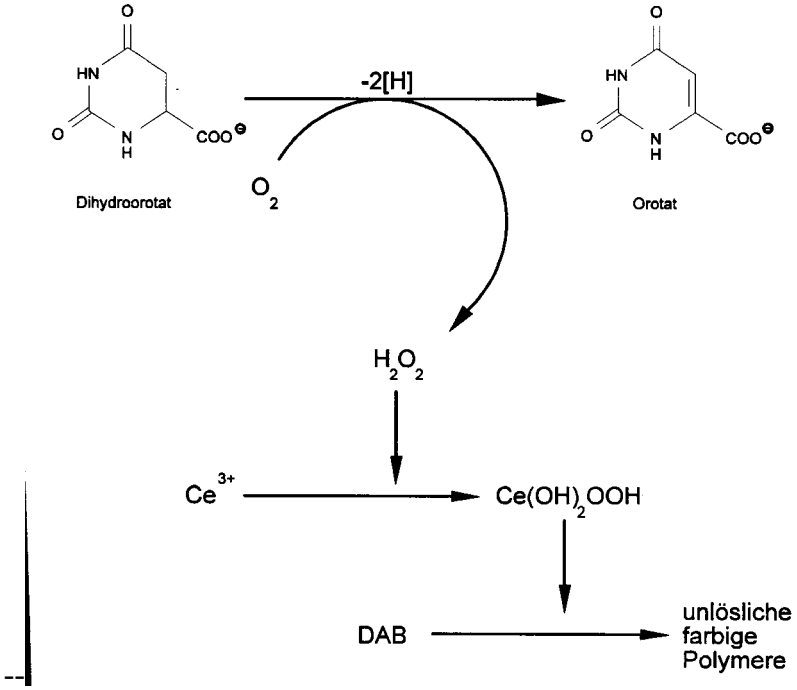


Abb. 2.2 Nachweis der Oxidase Aktivität mit Cerium (aus Wegerle, 1993)

Durchführung der Vorinkubation

Vorinkubationslösung:
500 µl 30 mM $CeCl_3$
1000 µl 500 mM NaN_3
500 µl 10 mM NaCN
3000 µl 100 mM Tris-Maleat-Puffer pH 8,0

Der pH-Wert wurde mit einigen Tropfen NaOH auf 8,0 eingestellt und die Lösung anschließend filtriert (Porengröße 0,2 µm) und auf 37 °C erwärmt. Nach Auftragen von

400 µl der Vorinkubationslösung auf die Gewebeschnitte erfolgte eine Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C in der erwärmten, feuchten Kammer.

Durchführung der Hauptinkubation

Hauptinkubationslösung: 500 µl 30 mM $CeCl_3$
1000 µl 200 mM NaN_3
500 µl 10 mM NaCN
1000 µl 50 mM DHO
2000 µl 100 mM Tris-Maleat-Puffer pH 8,0

Zur Austestung von Brequinar wurde dieses der Hauptinkubationslösung in einer Endkonzentration von 10 µM zugefügt. Nach anschließendem Auftropfen von 400µl Inkubationslösung auf die Objektträger erfolgte die Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C.

Visualisierung:

Visualisierungslösung: 500 µl 0,5 % DAB-Lösung
1000 µl 200 mM NaN_3
500 µl 420 mM $CoCl_2$
3000 µl 500 mM NaAC-Puffer, pH 5,3

Es wurde bei 40 °C für 30 Minuten inkubiert, die Visualisierungslösung vom Objektträger dekantiert und dieser in Färbeküvetten mit vorgewärmtem Puffer aus 100 mM Tris-Maleat (pH 8,0) und folgend in 50 mM NaAC-Puffer (pH 5,3) für je zweimal 10 Minuten gespült.

Nachbehandlung und Fixierung

Nach Entfernung der Visualisierungslösung war eine 10 minütige Inkubation der Schnitte je zweimal in 50 mM NaAC-Puffer (pH 5,2) notwendig. Danach mußte die Fixierung in 2 % PFA für 10 Minuten durchgeführt werden sowie das Eindecken in Kaiser´s Glyzerin Gelantine.

3. Ergebnisse

3.1 Versuche zur Organfixierung

Um dauerhafte Zellstrukturen zu erhalten, wurden in Vorversuchen die unter 2.7 erwähnten Fixierungen ausgetestet. Es ist bekannt, dass durch Methacarn- Baker- und Mc Manusfixierungen eine gute Strukturerhaltung der Mitochondrien erzielt werden kann (Romeis, 1989; Knoche, 1979). Bei diesen Immersionsfixierungen wurden durch Einlegen von Organstückchen in chemische Lösungsmittel dauerhafte Präparate hergestellt. Die Ergebnisse führten jedoch nicht zu dem gewünschtem Erfolg einer spezifischen Formazanpräzipitation. Die Methacarn fixierten Organe enthielten zum Teil eine äußere ringförmig angeordnete, dunkelbraune Färbung während die Mitte heller gefärbt erschien. Aufgrund ihrer weichen Konsistenz war es schwierig, von den vorbehandelten Geweben Schnitte herzustellen. Häufig kam es zu Einrissen während des Schneidevorgangs, so dass diese Organe nicht weiter verwendet werden konnten. Enzymaktivität wurde oft nicht mehr nachgewiesen, zum Teil ergaben sich auch unspezifische Anfärbungen ohne exakte Formazanniederschläge. Aus diesem Grund wurde von einer weiteren Verwendung vorfixierten Gewebes abgesehen. Schnitte von Paraformaldehyd vorbehandelten Geweben ließen sich deutlich besser anfertigen. Dennoch hatten auch sie die Tendenz, sich schon während des Schneidevorgangs einzurollen. Die damit erzielten Ergebnisse waren nicht so zufriedenstellend wie jene, die durch die Verwendung von unfixiertem Gewebe entstanden sind, so dass die letztgenannte Methode in allen weiteren Versuchen angewendet wurde.

3.2 Vorversuche zur histochemischen Dehydrogenasedarstellung

Für erste Versuche wurden unfixierte, bei –80 °C aufbewahrte Organschnitte der Rattenleber verwendet, sowie die Substratkonzentration als auch die pH-Wert-einstellung variiert und eine Zeitkinetik durchgeführt, um die Versuchsbedingungen zu optimieren. Natriumcyanid wurde in einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Seine Zugabe ist immer dann notwendig, wenn eine Blockierung der Atmungskette nötig ist. Dabei wird die Cytochromoxidase gehemmt, so dass die Elektronen im letzten Schritt der Atmungskette nicht auf molekularen Sauerstoff übertragen werden können. An Leberschnitten wurden erste DHODH- und SDH- Nachweise getestet und eine Zeitkinetik bei Raumtemperatur im NBT Test durchgeführt (60, 90, 105 und 120

Minuten). Erst nach einer 90 minütigen Inkubation konnte eine leichte makroskopische Blaufärbung beim DHODH Nachweis beobachtet werden. Im Lichtmikroskop zeigte sich ein feinkörniger blauer Formazanniederschlag. Zur Beschleunigung der enzymatischen Reaktion war es sinnvoll, weitere Versuche bei 37 °C im Brutschrank durchzuführen. In der Regel reichte bei fast allen Organen eine 60 minütige Inkubation, um gute enzymhistochemische Ergebnisse zu erzielen. Bei der so modifizierten Enzymreaktion im NBT Test konnte für die SDH schon nach 20 Minuten eine makroskopische Blaufärbung der Leberschnitte erzielt werden. Die Farbintensität der DHODH im Schnitt war jeweils geringer, die Verteilung der Farbgranula im Gewebe jedoch identisch. Bei der Diskussion der einzelnen histochemischen Ergebnisse und dem Vergleich mit vorangegangenen Arbeiten (z.B. Cohen, 1962) muß noch einmal die subjektive Beurteilung und Befunderhebung der mikroskopischen Betrachtung hervorgehoben werden. Dennoch sind die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Nachweismethoden eine wertvolle Hilfe für den Enzymnachweis in Gewebe und Zellen.

3.2.1 Variation der Substratkonzentration

Um den Bereich der optimalen Substratsättigung von SDH und DHODH zu finden, kam zunächst die Substratkonzentration von 50 mM und 100 mM zur Austestung, wobei der pH-Wert mit NaOH sorgfältig eingestellt und kontrolliert werden musste. Es zeigte sich beim Einsatz der höheren Substratmenge keine intensivere Färbung der Schnitte und damit keine gesteigerte Enzymaktivität. So genügte in allen weiteren Versuchen der Einsatz einer 50 mM Substratlösung.

3.2.2 Anwendung des Redoxmediators Menadion

Um eine Verstärkung der Enzymreaktion zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit Menadion (Vitamin K3 in Aceton) dem Testansatz beigefügt (Romeis, 1989) und auf Rattennierenkryostatschnitte aufgetropft. Das Gewebe färbte sich nach einstündiger Inkubationsdauer dunkelblau. Zugabe von Menadion verstärkte insbesondere beim SDH Nachweis deutlich die Enzymreaktion, weniger intensiv fiel das Ergebnis beim DHODH Test aus, so dass es zu einer Überreaktion mit Anfärbung der sonst negativ dargestellten Glomeruli gekommen war. Ähnliche Ergebnisse beschrieb Cohen (1962), der neben der Zugabe von Menadion unter anderem EDTA erprobte. Einzig die Zugabe von Polyvinylpyrrolidon führte bei seinen Untersuchungen zu einer feineren

Verteilung der Formazangranula in Leberschnitten. Dieses Ergebnis deutet auf eine Zunahme von Hintergrundaktivität hin, der sogenannten “Nothing-Dehydrogenase-aktivität” bei Zugabe von Menadion zur Inkubationslösung. Aus diesem Grund ist in allen weiteren Versuchen auf eine Zugabe von Mediatoren verzichtet worden. Jedoch enthielt die Inkubationslösung immer NaCN, um unerwünschte Nebenaktivitäten der Atmungskette zu blockieren.

3.3 Histologische Darstellung der DHODH in den inneren Organen

Im folgenden werden die untersuchten Organe kurz beschrieben, die Ergebnisse der Untersuchungen im Bild dargestellt, befundet und interpretiert.

3.3.1 Histologische Darstellung der DHODH und SDH im Digestionssystem

Histologische Darstellung der DHODH und SDH in der Speicheldrüse

Histologischer Überblick

Sie produziert und sezerniert ein dünnes protein- und enzymreiches, für die Verdauung und immunologische Abwehr wichtiges Sekret, das Amylase, Lysozym, Laktoferrin und aus Plasmazellen IgA enthält. In der vorliegenden Arbeit wurde die Glandula parotis untersucht. Sie ist aufgebaut aus Acini, Schaltstücken, Streifenstücken und Ductuli interlobularis.

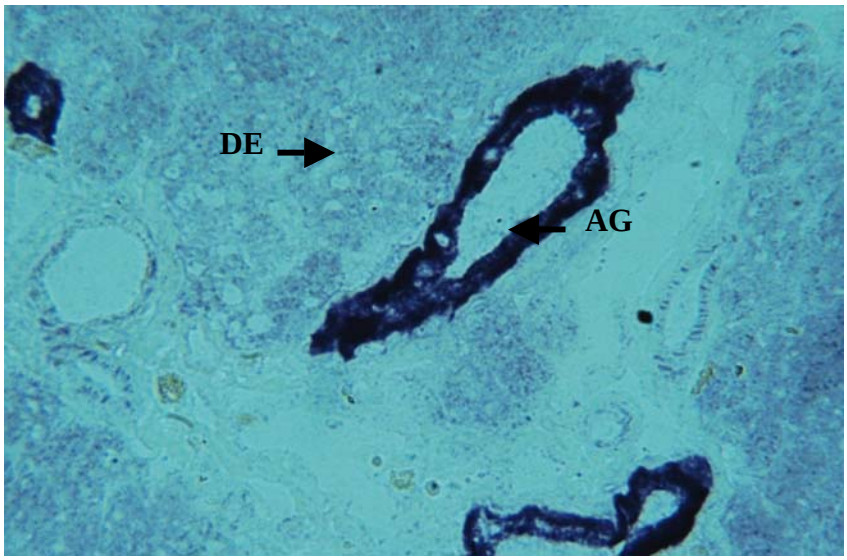


Abb 3.1: Speicheldrüse (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x 400

Markante Enzymaktivitäten sind in den Ausführungsgängen (AG) erkennbar, die Drüsenendstücke bleiben weniger gefärbt (DE).

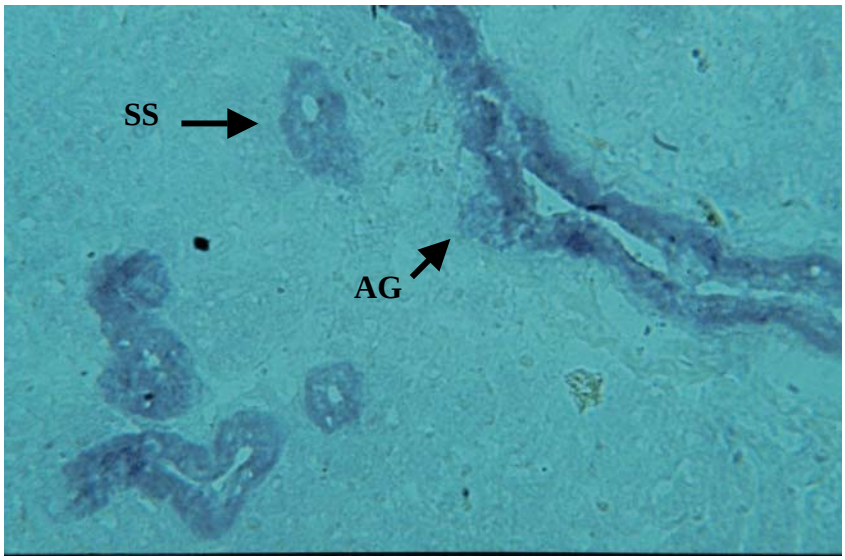


Abb. 3.2: Speicheldrüse (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x400

Eine mittelstarke Anfärbung zeigten Streifenstücke (SS) und auch Ausführungsgänge (AG).

Befunde

In der mikroskopischen Übersicht stellte sich die Bindegewebskapsel sehr hell dar. Die Drüsenendstücke sind rein serös und kamen im histologischen Präparat gleichmäßig hellblau gefärbt vor. DHODH Aktivität ließ sich in den Drüsenendstücken kaum nachweisen, während im SDH Test eine deutlich mittelblaue Enyzmreaktion in den einzelnen Drüsenläppchen auffiel. Deutlich intensiv dunkelblaue Färbung mit mittelgroben Formazanpartikel fand sich in den Streifenstücken und den interlobulären Ausführungsgangsystemen (Abb.3.2), insbesondere beim Nachweis der SDH Enzymaktivität (Abb.3.1).

Im Oxidasetest war lediglich eine leichte Anfärbung in den Streifenstücken und interlobulären Ausführungsgangsystemen zu erkennen. Drüsenendstücke erschienen nicht gefärbt. Der Einsatz von Brequinar im NBT- und Oxidasenachweisverfahren führte zu einer Hemmung der entsprechenden Enzymsysteme.

Interpretation

Das Sekret der Speicheldrüse wird von den Endstücken über Schaltstücke in Streifenstücke geleitet, von dort in den Ductus interlobularis zum Ductus lobularis und weiter in den Ductus excretorius. Die hohe Enzymaktivität der SDH- im NBT Test bei der Beobachtung der Streifenstücke und des interlobulären Ausführungsgangsystems steht in direktem Zusammenhang mit den dort zahlreich vorkommenden Mitochondrien (Abb. 3.1). Sie sind hier palisadenförmig angeordnet und führen damit zu einer basalen

Streifenbildung (Burkitt et al.1993). Streifenstücke können aktiv, dass heißt unter Energieverbrauch, Ionen rückresorbieren und sezernieren und verändern damit ihr Sekret, das nun hypoton wird (Burkitt et al, 1993). Auffallend war die niedrige Aktivität der DHODH in den Drüsenendstücken, die im SDH Test etwas stärker blau gefärbt erschien. Beim Oxidasenachweis war lediglich eine geringe Aktivität in den Streifenstücken und interlobulären Ausführungsgangsystem vorhanden, wobei Lymphozyten und Plasmazellen deutlich braun im interstitiellen Bindegewebe erschienen, demnach zu einer unspezifischen Mitreaktion beigetragen haben. Nur die Gewebeanteile in denen aktive Transportvorgänge stattfinden, zeigten demnach positive Enzymreaktionen im Oxidasetest, nicht aber die speichelbildenden Drüsenendstücke.

Histologischer Nachweis der DHODH und SDH in der Speiseröhre

Histologischer Überblick

Im ungefähr 25 cm langen Ösophagus wird der Nahrungsbrei, ausgehend vom Larynx bis zum Mageneingang, mit Hilfe von in der gut ausgebildeten Muskulatur entstehenden peristaltischen Wellen transportiert. Der Ösophagus ist aufgebaut aus mehrschichtig unverhornten Plattenepithel, Lamina propria mucosa, Lamina muscularis mucosa, Tela submucosa, Stratum circulare und longitudinale.

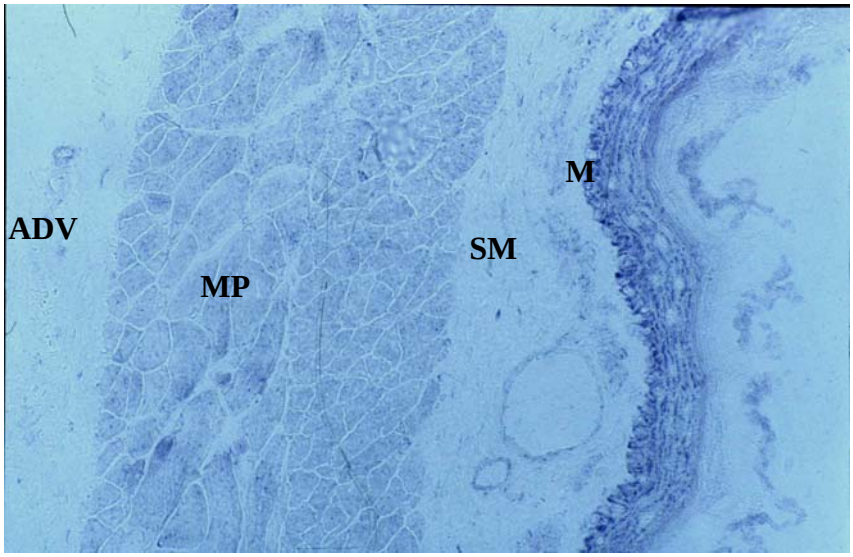


Abb. 3.3: Ösophagus (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x100

Sichtbare Enzymaktivität konnte in der muscularis propria (MP) und Mucosa, geringere in der Submucosa (SM) und Adventitia nachgewiesen werden (E=Epithel, LMM= Lamina muscularis mucosae).

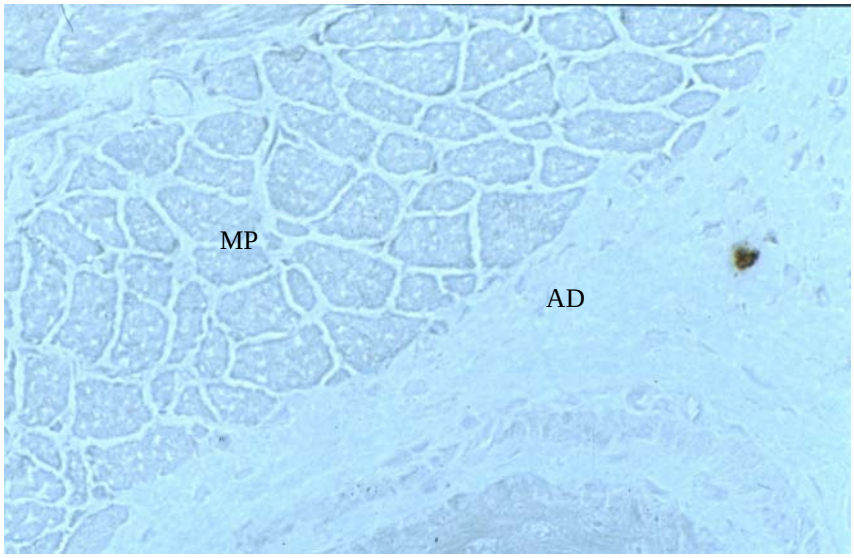


Abb. 3.4: Ösophagus (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Leerwert, Vergr. x200

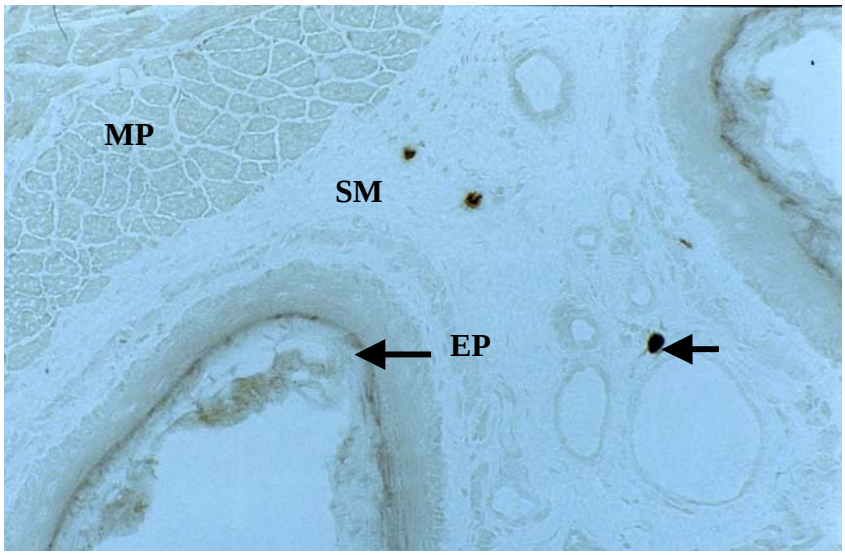


Abb. 3.5: Ösophagus (Ratte), Oxidase Nachweis der DHODH, Vergr. x200

Eine leichte Oxidasereaktion war im Epithel (EP) und der Muscularis propria (MP) nachzuweisen. Unspezifische Befunde traten vereinzelt in Makrophagen (M) der Submukosa (SM) auf (LMM= Lamina muscularis mucosa).

Befunde

Zunächst fiel eine hohe Gesamtaktivität der SDH in der mikroskopischen Übersicht auf sowie eine gut erhaltene Organstruktur. Die deutlichste Anfärbung war in der äußeren Muskelschicht vorhanden (Abb.3.3). Von dort ausgehend nahm die Enzymmenge in den nun flacher werdenden Zellen in Richtung Organlumen ab, das heißt die innere Muskelschicht beinhaltete weniger Aktivität, gefolgt von der Basalzellschicht des Epithels und der Lamina propria. In den regenerativ wirkenden Basalzellen war eine mittelgrobe Tetrazoliumkörnung zu beobachten. Die Granulation des blauen

Niederschlags gestaltete sich feiner und nach apikal deutlich geringer. In dieser Schicht können vereinzelt neuroendokrine Zellen auftreten, die jedoch mit der NBT Technik nicht differenzierbar waren. In der Submucosa fielen einzelne deutlich blau gefärbt Zellen auf, bei denen es sich am ehesten um Plasmazellen oder Lymphozyten handelte. Die Lamina muscularis mucosa war hell gefärbt und deutlich von der Submucosa abzugrenzen. Ebenfalls dargestellte Gefäße in der Submucosa waren an der ringförmigen Formazananordnung der dort befindlichen Muskelzellen erkennbar. Die äußere Längs- und innere Ringmuskulatur erschienen im histologischen Präparat tangential angeschnitten. Die Enzymaktiviät innerhalb einer Muskelfaser variierte. Im Vergleich zu den oben beschriebenen Ausführungen ergab der DHODH Test geringere Enzymaktivitäten jedoch mit dem bemerkenswerte Unterschied, dass dort das Plattenepithel am intensivsten reagierte, während sich die Muskulatur hell darstellte. Die Blaufärbung war auch hier in der Basalzellschicht am größten. Im Oxidasetest stellte sich das Epithel mit seinen dunkelbraunen Basalzellen hellocker gefärbt dar (Abb.3.5). Schon in der Übersicht fielen deutlich vereinzelt intensiv gefärbte Zellen in der Submucosa auf. Auch im Kontrollschnitt ohne Substrat konnte eine, wenn auch leichte Anfärbung nachgewiesen werden, so dass von einer unspezifischen Hintergrundreaktion auszugehen ist. Da diese Färbung jedoch eindeutig geringer war als jene bei den substrathaltigen Schnitten, muss von einer geringen Oxidasereaktion im Ösophagus ausgegangen werden. Brequinar führte zu einer Hemmung der Enzymaktivität im NBT- und Oxidasetest und führte zu einem dem Leerwert ähnlichen histologischen Ergebnis.

Interpretation

Der hier dargestellte histologische Anschnitt beinhaltete einen oralen Querschnitt des Ösophagus mit für die SDH hohen Enzymaktivitäten in der Muskulatur. Sie hat die wichtige Aufgabe, permanent Kontraktionen zu erzeugen und damit einen Verschluß dieses Teils herbeizuführen (Herold, 1997). Eine Erschlaffung erfolgt erst beim Schluckakt. Etwas geringer war die Aktivität in der Basalzellschicht des mehrschichtig unverhornten Plattenepithels. Es findet dort RNA- und DNA Synthese statt, die notwendig ist für die Regeneration des Oberflächenepithels. In der hell gefärbten Lamina propria stellten sich einige dunkelblaue Zellkerne dar, bei denen es sich um Plasmazellen oder Lymphozyten handelt, also um unspezifische Anfärbungen. Cohen

beschrieb 1962 die hohe Aktivität der DHODH im Gastrointestinaltrakt, ohne jedoch Ergebnisse über den Ösophagus mitzuteilen. Hier wurde erstmals die Oxidaseaktivität in der Speiseröhre nachgewiesen, wobei das mehrschichtig unverhornte Plattenepithel eine höhere Aktivität zeigte als die übrigen Schichten (Abb 3.5). In der Lamina propria und der Submucosa lagen dunkelbraun gefärbte Einzelzellen. Es sind Lymphozyten und Plasmazellen. Daß eine unspezifische Hintergrundreaktion vorhanden ist, belegte der Kontrollschnitt mit heller gefärbten Strukturen.

Histologische Darstellung der DHODH und SDH im Dünndarm

Histologischer Überblick

Für den Dünndarm (Duodenum, Jejunum und Ileum) charakteristisch ist die 600-fache Oberflächenvergrößerung durch Kerckring`sche Falten, Zotten und Mikrovilli. Oberste Schicht ist eine Mucosa mit Epithel sowie die Lamina propria. Es folgt die Lamina muscularis mucosa und anschließend die Tunica muscularis propria. Die Aufgabe des Dünndarms ist die enzymatische Verdauung und Resorption.

Befunde

In der mikroskopischen Übersicht des Dehydrogenasenachweises imponierten die Kerckring`schen Falten mit ihren vorwiegend längsgeschnittenen Zotten und querdargestellten Krypten. Im SDH Test war die höchste Enzymaktivität im vorwiegend aus Saumzellen bestehenden Oberflächenepithel und dort in dem apikalen Anteil der Krypten nachzuweisen (Abb.3.6). Im Vergleich zu den genannten Ausführungen war im DHODH Nachweis die Anfärbung des Epithels lediglich etwas geringer. Hell gefärbte Becherzellen in diesem Epithel fielen durch ihre kelchartige Form auf. Sie enthielten beide Enzymsysteme und färbten sich besonders intensiv, wenn sie ihr Sekret noch nicht abgegeben haben (Abb. 3.7). Dann konnten sie kaum noch mit ihrem schlanken, basal senkrecht stehenden ungefärbten Kern, vom gewöhnlichem Oberflächenepitel unterschieden werden. In der Lamina propria erschien der Formazanniederschlag beim Nachweis der SDH um ein vielfaches höher als im DHODH Test. Bei der weiterführenden Betrachtung zeigte sich für die SDH eine hohe Enzymaktivität in der inneren Ring,- und äußeren Längsmuskulatur. Brequinar führte zu einer Hemmung der DHODH Aktivität.

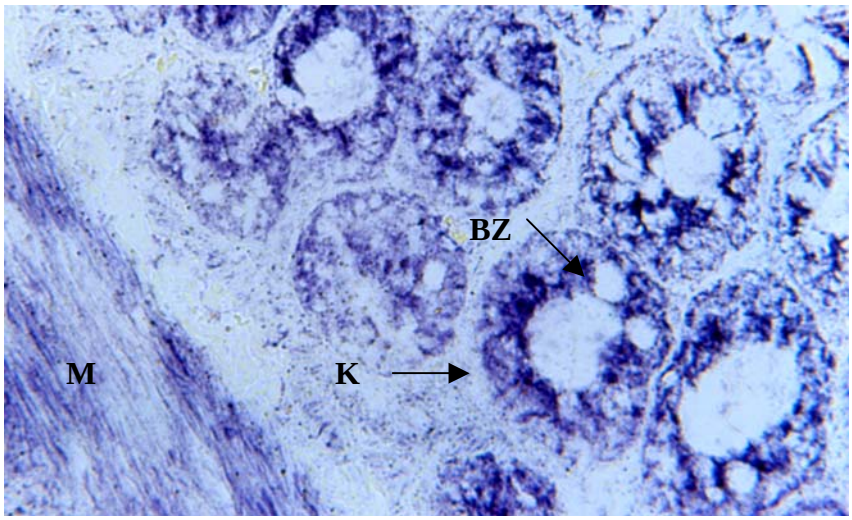


Abb. 3.6 Jejunum (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x 200
Intensive Enzymnachweise wurden in den Krypten (K) und der Muskulatur (M) gefunden, während die Becherzellen (BZ) in der Mitte hell ausgespart blieben.

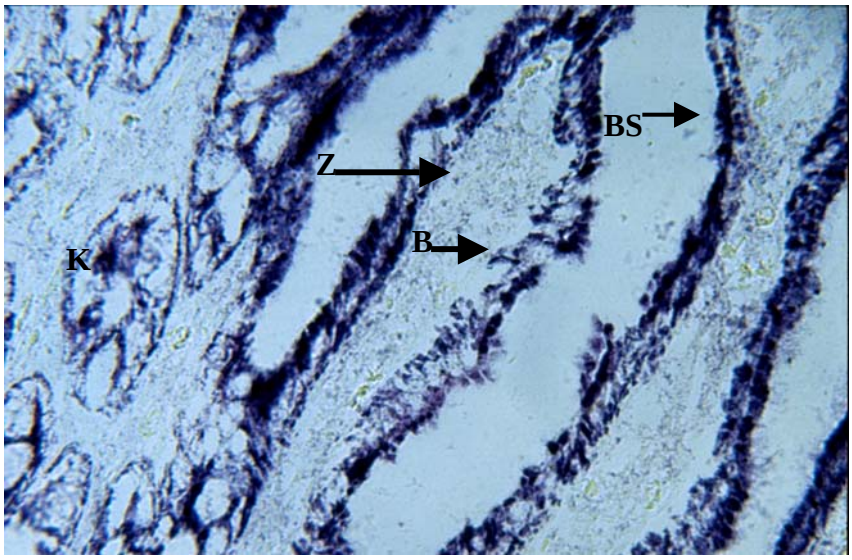


Abb. 3.7: Jejunum (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. 200

Hohe Enzymreaktionen waren im Bürstensaum (BS) der Enterozyten im Bereich der Zotten (Z) nachweisbar. (B = Becherzellen)

Die Intensität des braunen DAB-Niederschlags im Oxidsetest war wesentlich geringer als die Farbtönung im NBT Test (Abb.3.8). Dennoch zeigten insbesondere die Zotten des Jejunums eine feine und homogen verteilte Färbung, mit einem etwas höheren Anteil im apikalen Zellbereich. Dies ist vergleichbar mit den Befunden im NBT Nachweis. Im Bindegewebe der Lamina propria traten vereinzelt dunkelbraun gefärbte Zellen deutlich auf, bei denen es sich um Makrophagen handelt (Abb. 3.8). Bei der Beurteilung der Muskelschichten fiel eine wenig differenzierte, homogene Darstellung auf. Wurde Brequinar als Inhibitor eingesetzt, so erschien die Lamina propria bis auf bräunliche Einzelzellen ungefärbt und belegte damit die Spezifität der nachgewiesenen

Reaktion. Im apikalen Bereich der Saumzellen war der Bürstensaum hochaktiv (Abb. 3.6 und 3.7). Er besteht aus Mikrovilli, die zur Oberflächenvergrößerung des Darms beitragen (Schiebler et al., 1986).

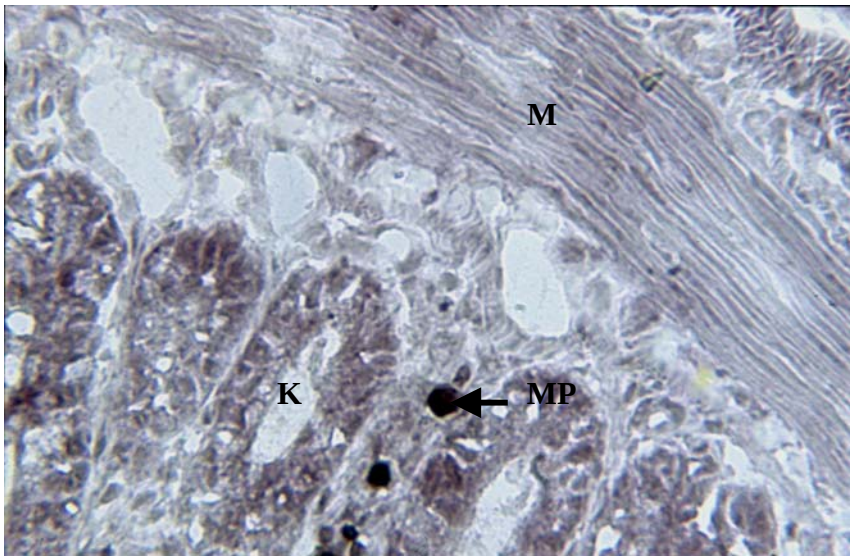


Abb. 3.8: Jejunum (Ratte), Oxidase Nachweis der DHODH, Vergr. x 400

Positive Oxidasereaktionen waren in den Krypten festzustellen (K), weniger gefärbt zeigte sich die Mukulatur (M). (MP= Makrophagen).

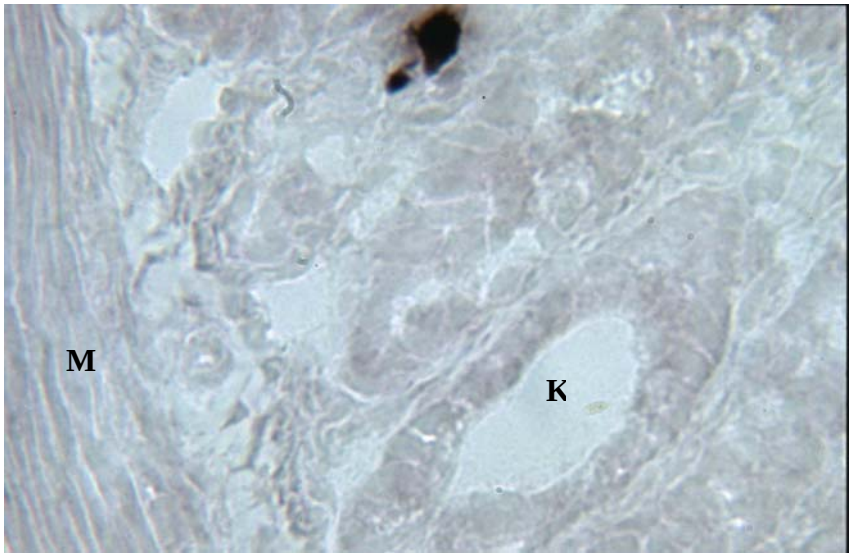


Abb. 3.9: Jejunum (Ratte), Oxidase Nachweis der DHODH, Leerwert, Vergr. x 400

Eine schwache unspezifische Reaktion ist im Leerwertpräparat ubiquitär nachzuweisen.
(M= Muskulatur, K=Krypten)

Interpretation

Im Rahmen der Verdauungstätigkeit werden im Dünndarm Fettsäuren, Aminosäuren und Monosaccharide durch das Oberflächenepithel aufgenommen. Hierfür muß Energie

in Form von ATP von den in den Enterozyten reichlich vorhandenen Mitochondrien bereitgestellt werden. Die hohe Enzymaktivität des gesamten Dünndarms hat ihren Ursprung in den Lieberkühnschen Drüsen mit zur Mitose fähigen Stammzellen. Hier findet der Zellzyklus statt und ist für die Regeneration der Schleimhaut von Bedeutung. Zellen erneuern sich jeden 3. bis 5. Tag und wandern anschließend von den Krypten ausgehend in Richtung Drüsenlumen. Auf dem Weg dorthin differenzieren sie sich und bekommen ihre endgültige Enzymausstattung. Sie sind charakteristisch für resorbierende Epithelien und enthalten Aktin und Myosin, das ihnen die Fähigkeit zur Kontraktion verleiht. Für diesen energiezehrenden Prozess werden zusätzlich zahlreiche Mitochondrien benötigt. Daneben sind die Bürstensaumenzyme für die Verdauung und Resorptionsvorgänge von Bedeutung (Burkitt et al., 1993). In der geringer gefärbten Lamina propria war eine Unterscheidung der einzelnen Zelltypen in beiden Nachweisverfahren nicht möglich. Dort findet im Gegensatz zum Epithel weniger Stoffwechselaktivität statt. Hohe Aktivitäten in der Muskulatur deuten auf Energiegewinnung hin die notwendig ist, um Kontraktionen durchführen zu können. Nur so kann die Weiterleitung von Nahrungsresten getätigt werden. Für den Dünndarm charakteristisch sind ebenfalls endokrine Zellen, die sich vorwiegend in den Krypten befinden und für ihren Stoffwechsel gleichfalls Energie benötigen. Da sie in deutlich geringerer Menge vorkommen, im Gegensatz zu den Enterozyten, war ihre Enyzmaktivität kaum nachzuweisen. Die oben erhobenen Befunde stimmen mit den Beobachtungen von Cohen (1962) überein. Er beschrieb hohe Enzymaktivitäten im Bereich der Krypten des Dünndarms, konnte jedoch eine Anfärbung an der Epitheloberfläche sowie der Zottenspitze nicht mehr nachweisen. Diese Beobachtungen stehen in Widerspruch zu denen in der vorliegenden Arbeit. Wenn auch die Zottenspitzen etwas heller erschienen, so war dort sehr deutlich sowohl für die SDH als auch für die DHODH eine hohe Enzymaktiviät nachzuweisen. Diese Ergebnisse werden durch die oben erwähnten Stoffwechselprozesse gestützt und erklärt.

Eine Oxidasereaktion in allen drei Dünndarmabschnitten ließ sich in geringem Umfang beobachden (Abb.3.8). Insbesondere im Jejunum zeigte das Oberflächenepithel einen deutlichen DAB Niederschlag, der homogen im apikalen Zellbereich zu sehen war, wo resorbierende und sezernierende Stoffwechselprozesse stattfinden. In der Lamina propria imponierten dunkelbraun gefärbt Zellen. Es sind die dort vorkommenden Makrophagen, die zu einer unspezifische Mitreaktion führten.

Histologische Darstellung der DHODH und SDH im Dickdarm

Histologischer Überblick

Der Dickdarm besteht aus Caecum, Colon und Rectum. Von den tiefer liegenden Darmabschnitten wurde das vorwiegend aus Falten bestehende Colon untersucht. Das Oberflächenepithel enthält Saumzellen mit Mikrovilli, Becherzellen und vereinzelt entereochromaffine Zellen. Der Lymphfollikel enthaltenden Submucosa folgt die innere und äußere Muskulatur. Hauptaufgabe des Colons ist die Resorption von Wasser und Elektrolyten sowie der Abbau von Kohlenhydraten und Lipiden.

Befunde

Schon in der Übersichtsbetrachtung ließ sich eine hohe Enzymaktivität der SDH (Abb. 3.10) sowie eine lediglich geringere Anfärbung der DHODH beobachten (Abb. 3.11). Intensiv gefärbt erschienen die Glandula intestinales. Die Hauptaktivität dort war in den längsgeschnittenen Krypten, insbesondere in den basalen und apikalen Anteilen der Epithelzellen nachzuweisen (Abb. 3.10, 3.11). Im Epithel konnten zahlreiche Mitosen beobachtet werden, die zu einer intensiven Anfärbung beigetragen haben. Charkteristisch für das einschichtige hochprismatischem Epithel sind die vor allem muzinhaltigen Becherzellen. Sie waren deutlich vom übrigen Oberflächenepithel durch ihr „ballonartiges“ Aussehen mit hellem Zentrum zu unterscheiden. Die zellreiche, sich anschließende Lamina propria sowie die innere Ring- und äußere Längsmuskulatur waren lediglich gering gefärbt. Die Ergebnisse im Oxidasetest entsprachen ebenfalls den schon erwähnten Ausführungen der oberen Darmabschnitte. Eine Oxidasereaktion fand sich im Oberflächenepithel, insbesondere im apikalen Zellbereich. Die zahlreichen Becherzellen waren an ihrem hellen schaumig wirkenden Zentrum zu erkennen. Auch im Colon erschienen prominente dunkelbraune Zellen in der Lamina propria, während die glatte Muskulatur sehr fein gefärbt blieb.

Interpretation

Intensiver Enzymnachweis im Dickdarm ist verbunden mit Zellregeneration des Oberflächenepithls und damit zahlreichen nachzuweisenden Mitosen, Zellvermehrung sowie Nukleinsäuresynthese (Burkitt et al., 1993) und Pyrimidinsynthese. Die oben genannten Stoffwechselprozesse erfordern die Bereitstellung von Energie durch Mitochondrien. Apikal dicht gedrängt fiel der kräftig blaue Formazanniederschlag des mitochondrienreichen Bürstensaums auf (Abb. 3.10 und 3.11). Sie sind wichtig für die

resorptiven Stoffwechselvorgänge im Dickdarm. Schleimproduzierende Becherzellen, deren Sekret dem Oberflächenschutz und dem Faecestransport dient, sind von ihrer Morphologie kelchförmig mit einem basalliegenden schmalen Zellkern. An ihrer Zellbasis liegen reichlich Mitochondrien als Energielieferanten für die Glyko-proteinsynthese, d.h. zur Herstellung von UDP-Glucose und UDP-Galaktose. Endokrine Zellen treten im Gegensatz zum Jejunum und Ileum in geringerer Menge auf. Ihre Anzahl ist auch gegenüber den Zellen des Oberflächenepitels deutlich niedriger, so dass kaum Enzymaktivität gemessen werden konnte.

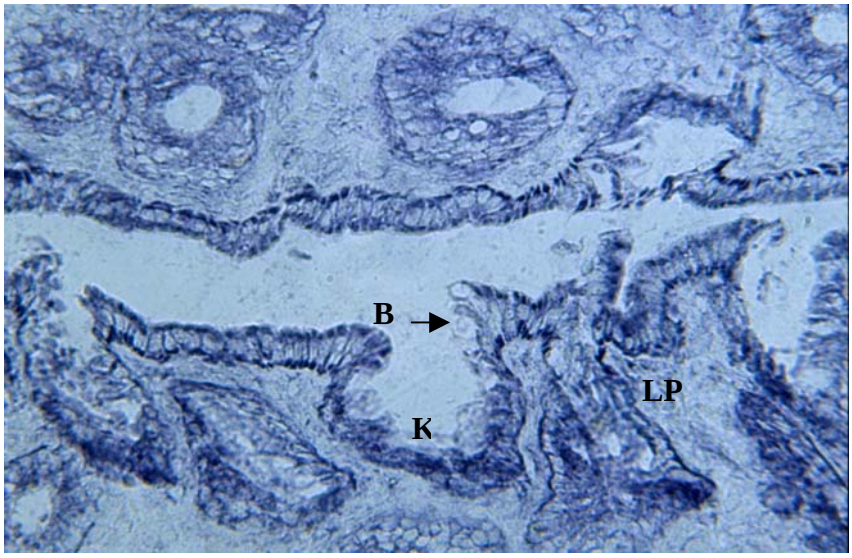


Abb. 3.10: Colon (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x100

Hohe Enzymaktiviät war im Epithel der Krypten (K) nachzuweisen. (B=Becherzelle, LP= Lamina propria)

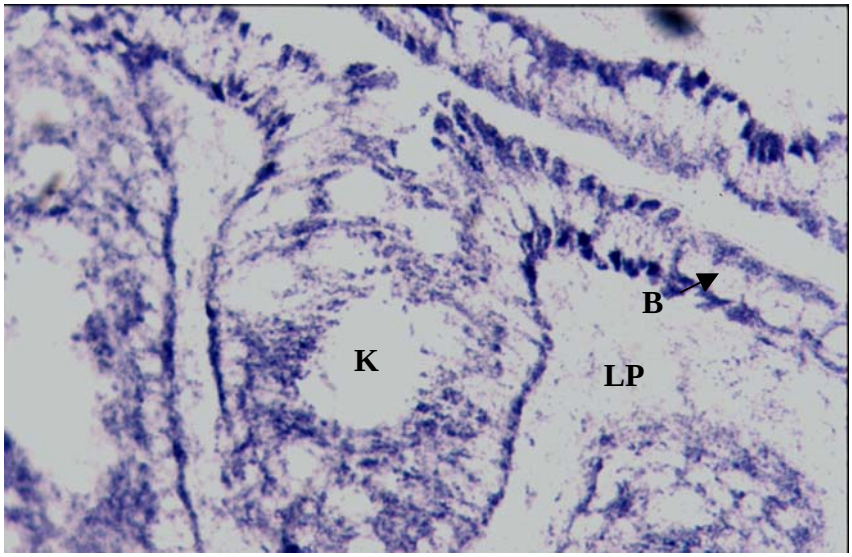


Abb. 3.11: Colon (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x200

Die DHODH Aktivität war lediglich etwas geringer als jene der SDH.
(K=Krypten, B=Becherzellen, LP= Lamina propria)

Eine Oxidaseaktivität ließ sich im Dickdarm nachweisen, wobei die Befunde ebenfalls wie im NBT Test, durch den Einsatz von Brequinar als spezifischen Inhibitor, eindeutig belegt wurden. Vergleichbar den Befunden im Dünndarm konnte die höchste Akivität im Epithel und in den Becherzellen nachgewiesen werden. Vereinzelt in der Lamina propria prominent gefärbte Zellen sind am ehesten als unspezifische Anfärbungen von Lymphozyten und Makrophagen zu werten.

Histologische Darstellung der DHODH und SDH in der Leber

Histologischer Überblick

Das Organ bildet und sezerniert Gallenflüssigkeit, Proteine und Gerinnungsfaktoren, speichert und setzt Lipide und Glucose frei und betreibt Aminosäureabbau, Harnstoffbildung und Medikamentenabbau. Sie ist aus Läppchen aufgebaut, die aus Zentralvenen, Glissonschen Trias, Leberzellreihen und Sinusoiden bestehen. Mehrere Läppchen grenzen an ein periportales Feld, welches eine Vene mit nährstoffreichen Pfordaderblut sowie die Arteria interlobularis und einen Gallengang enthält.

Befunde

Die Übersicht zeigte im NBT Test gegenüber dem H.E. Bild eine strukturelle Veränderung, so zum Beispiel die beginnende Auflösung des Gewebes oder eine Erweiterung der Sinusoide. DHODH und SDH zeigten die höchste Anfärbbarkeit in der Zone 1 der funktionalen Einteilung von Leberläppchen nach Rappaport (Abb. 3.12, 3.13). Auffällig war in der Übersichtsvergrößerung eine Abnahme der Farbstoffverteilung von der 1. zur 3. Zone. In der Vergrößerung wurde die feine Tetrazoliumgranulation besonders um den ungefärbten Zellkern deutlich. Es fiel auf, dass auch in ein und derselben Zone die einzelnen Zellen unterschiedliche Farbintensität aufwiesen und damit in ihrer Enzymaktivität verschieden waren. Eine schwach positive Enzymdarstellung gelang ebenfalls in den Kupffer Zellen. Äste der Vena hepatica, oft oval dargestellt mit großem leeren Lumen und von hell gefärbten Bindegewebe umgeben, waren gut sichtbar. Beim Vergleich der Übersichten wurde die geringere Blaufärbung und damit niedrigere Enzymaktivtät der DHODH deutlich (Abb.3.12). Die höhere Enzymaktivität im Periportalfeld war sehr gut gegenüber der geringeren Farbintensität im Läppchenzentrum abzugrenzen. Dabei erschien diese intensivere Blaufärbung nur unwesentlich dunkler als sie im SDH Test nachweisbar war. Die Zugabe von 10 µM Brequinar zum Testansatz führte zu einer Hemmung der Enzymaktivität der DHODH

(Abb. 3.14). Wurde jedoch der Inhibitor dem Testansatz des SDH Nachweises zugefügt, so ergab sich keine Enzymaktivitätshemmung. Im positiven Oxidasetest imponierte der DAB Niederschlag nicht granulär, sondern zeigte eine nahezu homogene Darstellung in allen Zellen, mit einer mittelbraunen Anfärbung der Kerne (Abb. 3.15). Im Gegensatz zur DHODH war sie deutlich schwächer. Wie im NBT Test färbte sich die 1. Zone um das Periportalfeld erkennbar stärker an. Die Enzymaktivität nahm schon in der Übergangszone 2 ab und war in der peripheren Zone 3 deutlich geringer. Im Vergleich war der mitgeführte Leerwert gleichmäßig, fast hellgelb. Sinusoide erschienen im Gegensatz zum Dehydrogenasenachweis eng gestellt, Zellgrenzen waren nicht sichtbar. Die einzelnen histologischen Strukturen der Kontrollschnitte waren ungefärbt, so dass von einer enzymspezifischen Reaktion auszugehen ist. Beim Einsatz von Brequinar kam es zu einer Hemmung der Oxidase. Gallengänge waren leicht positiv dargestellt.

Interpretation

Die Einteilung der Leberläppchen nach Rappaport gliedert die Azini in Zone 1 bis 3 auf. Diese Zonengliederung ist ein dynamischer Vorgang und nach funktionellen Gesichtspunkten zu betrachten. Sie kann sowohl infolge von Änderungen der Stoffwechselprozesse als auch bei Zu- oder Abnahme der Anzahl an vorhandenen Mitochondrien variabel sein (Jungmann & Katz, 1982).

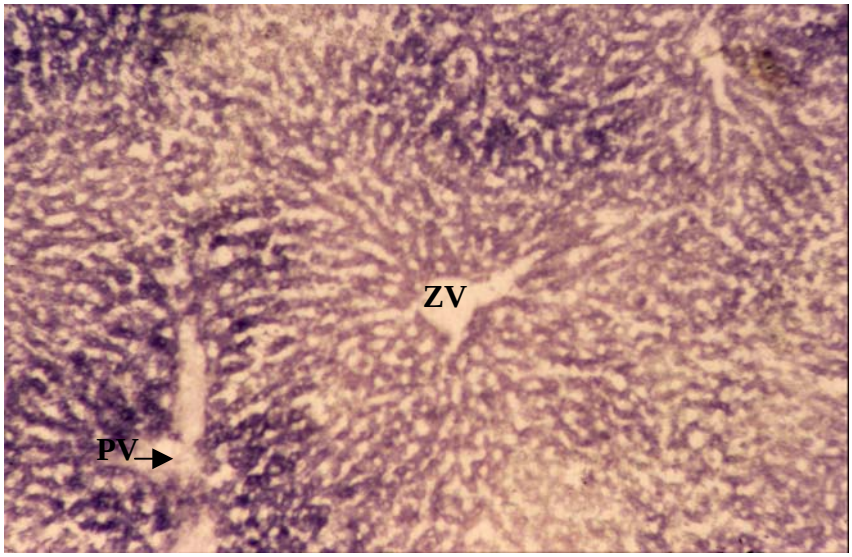


Abb. 3.12: Leber (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x100

Intensiver Enzymnachweis war in den Hepatozyten der Läppchenzone 1 (GD) festzustellen.
(ZV= Zentralvene, PV= Äste der V. portae)

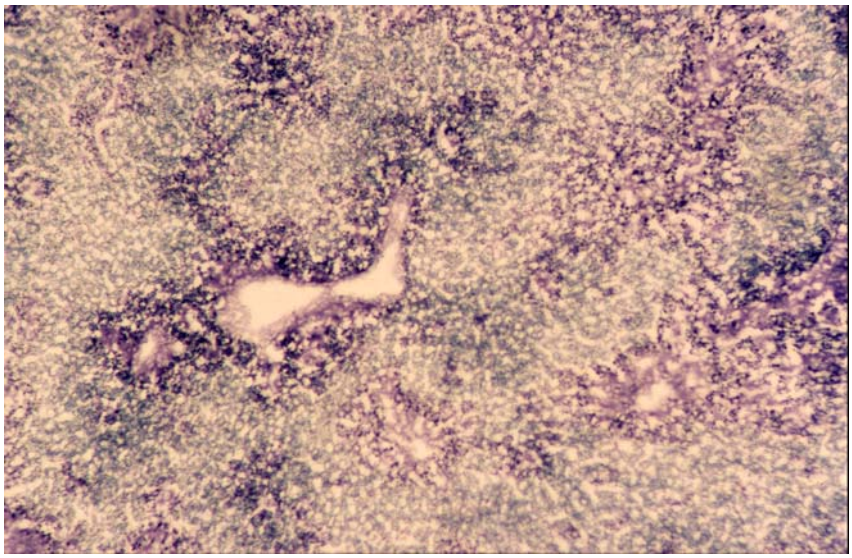


Abb. 3.13: Leber (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x100

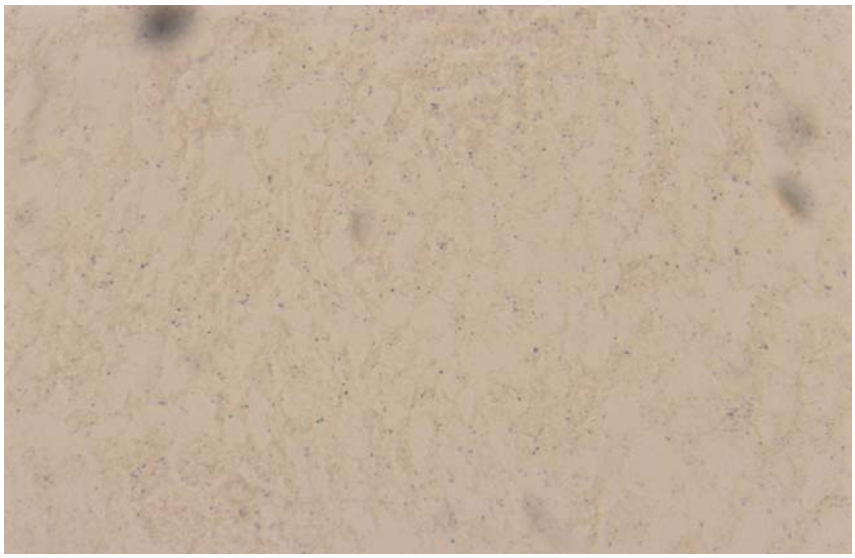


Abb. 3.14: Leber (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Zugabe von Brequinar, Vergr. x200

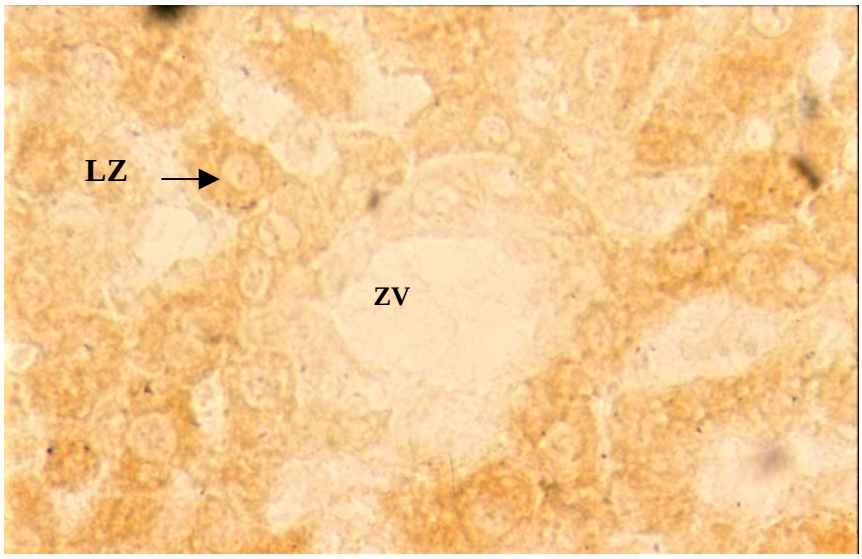


Abb. 3.15: Leber (Ratte), DHODH Oxidase, Vergr. x200 (ZV=Zentralvene, LZ=Leberzelle)

Es sind jeweils zwei benachbarte Leberläppchen am Aufbau eines Azinus beteiligt, an deren Eckpunkte jeweils ein periportales Feld liegt. Die erste Zone hat unter anderem einen hohen Gehalt an Cytochromoxidase. Aus diesen Gründen ist dort die höchste DHODH und SDH- Aktivität nachzuweisen. Hier findet vorwiegend biologische Oxidation, Amino- und Fettsäureabbau statt sowie Gluconeogenese oder Harnsstoffbildung weshalb ATP von den zahlreichen Mitochondrien gebildet werden muß. Untersuchungen mit gegen DHODH gerichteten monospezifischen Kaninchen-IgG wurden von Lakaschus (1994) durchgeführt und bestätigten die zuvor beschriebenen Beobachtungen. Hierbei fand sich ebenfalls die höchste Enzymaktivität in der Leber im Bereich der Periportalfelder. Die niedrige Enzymaktivität der Zentralzone (Abb. 3.12, 3.13) kann in Zusammenhang stehen mit dem abnehmenden Sauerstoff- und Mitochondriengehalt. Sie sind morphologisch kleiner und ihre innere DHODH enthaltende Membran besitzt weniger Faltenstrukturen (Ross & Reith, 1987). Für diese Erklärung sprechen auch Ergebnisse von unterschiedlichen Enzymaktivitäsmessungen an isolierten Mitochondrien, die durch Zentrifugation aufgearbeitet wurden (Löffler et al., 1996). Bei seinen Untersuchungen kam Cohen (1962) ebenfalls zu den Erkenntnissen einer hohen Enzymaktivität im Periportalfeld sowie die auch hier bestätigte, leichte Anfärbbarkeit der Kupffer Zellen. Ihre Aufgabe ist es unter anderem, Bakterien und Zellreste zu phagozytieren. Im Oxidasetest konnte durch eine gleichmäßige Braunfärbung, die in hellerer Tönung auch im Leerwert sichtbar wurde, die sehr schwache Enzymaktivität dargestellt werden, mit einer hohen unspezifischen Hintergrundreaktion (Abb 3.15). Gefärbte Neutrophile Granulozyten, wie auch hier zu beobachten, beschrieben schon Gossrau et al. (1989) beim Nachweis der Aminosäureoxidase in der Rattenleber. Sie postulierten, dass eine Myeloperoxidase zu dieser positiven Enzymreaktion beigetragen habe.

Histologische Darstellung der DHODH und SDH im Pankreas

Histologischer Überblick

Das Pankreas ist von einer Bindegewebshülle umgeben, welche die Drüse in Läppchen unterteilt. Der exokrine Teil enthält proteinbildende seröse Zellen, die unter anderem verdauungswirksame inaktive Enzyme enthalten. Das alkalische Verdauungssektret wird über Schaltstücke in Interlobulärgänge und von dort in größere Ausführungsgänge

abgegeben. Der endokrine Drüsenanteil enthält A-Zellen (Glukagon), B-Zellen (Insulin), D-Zellen (Somatostatin) und PP-Zellen (Pankreatisches Polypeptid).

Befunde

Während der Inkubation im NBT Test konnte SDH schon nach 20 Minuten makroskopisch anhand einer leichten Blaufärbung nachgewiesen werden (Abb.3.17). In der mikroskopischen Übersicht fiel die helle, bindegewebige Kapsel auf. Drüsenendstücke stellten sich in mittelblauer Anfärbung dar, mit deutlich geringerer DHODH Aktivität. Es konnte eine vermehrte Blaufärbung von Anschnitten in Gefäßnähe beobachtet werden. Drüsenendstücke gehen in organellenarme Schaltstücke über, die wiederum das Sekret in die hier ungefärbten Ausführungsgänge weiterleiten (Abb. 3.16). Langerhanssche Inseln erschienen sowohl im SDH- als auch DHODH Test nur gering gefärbt (Abb. 3.16, 3.17). Sie zeigten in der 400er Vergrößerung vereinzelt mittelgrobe, gut verteilte Formazanpartikelchen, die außerhalb des Zellkerns im basalen Anteil lokalisiert lagen. Einzelne Zelltypen konnten nicht differenziert werden.

Der Oxidasetest fiel bei relativ starker Gewebeschädigung und homogener Anfärbung unspezifisch aus. Aufällig war die gleiche Farbintensität in den endokrinen und exokrinen Gewebeanteilen. Zugabe von 1 µM Brequinar erzeugte ein helles Bild, d.h. schwache Färbung konnte nicht durch Brequinar unterdrückt werden.

Interpretation

Der exokrine Bestandteil der Drüse produziert nach Stimulation von Cholezystokinin und Sekretin aus dem Duodenum sowie Gastrin aus dem Magen und nach Vagusstimmulation in den serösen Endstücken ein inaktives, Lipase- und Amylasehaltiges Verdauungssekret (Schiebler et al., 1986). Im Pankreas fehlen die vorkommenden mitochondrienreichen Streifenstücke, was die schwache Aktivität im Ausführungsgangsystem erklärt (Abb 3.16). Eine mittelstarke Aktivität wurde in der Tubuloazinösen Drüse (TAD, Abb. 3.17) des exokrinen Pankreas beobachtet, kaum Anfärbungen zeigten die Langerhansschen Inseln (LI, Abb.3.17). Langerhanssche Inseln als der endokrine Anteil des Pankreas produzieren Glucagon, Insulin, Somatostatin und Pankreatisches Polypeptid, deren Menge jedoch deutlich unter derjenigen des exokrinen Anteils liegt und damit eine geringe Farbreaktion hervorruft. Diese Befunde sind konform mit jenen von Cohen gemachten Beobachtungen (1962), wobei dieser eine mittelmäßigen Enzymaktivität festgestellt hat.

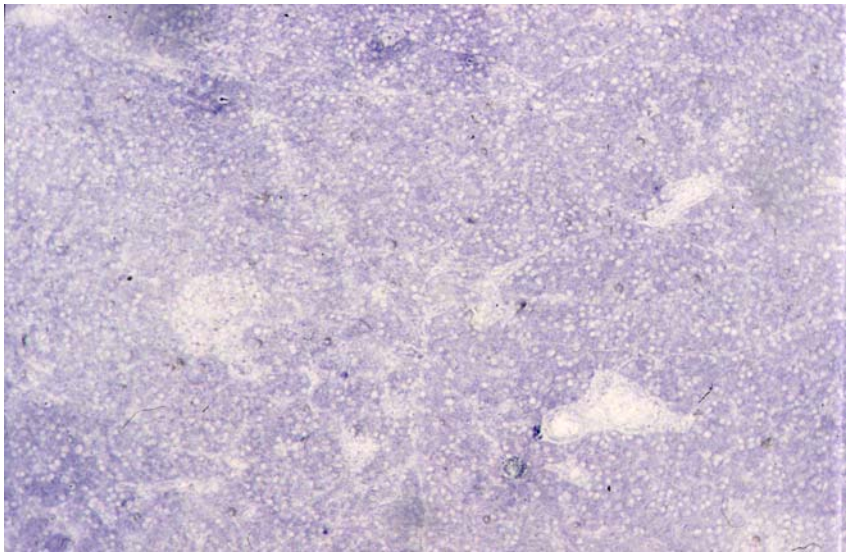


Abb. 3.16: Pankreas (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x100

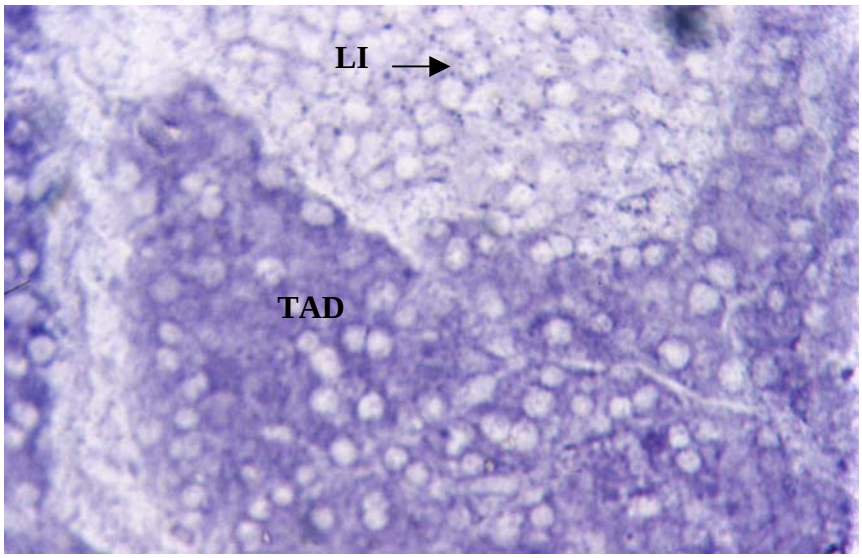


Abb. 3.17: Pankreas, SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x200 (LI=LangerhansI. TAD=exokr. Drüse)

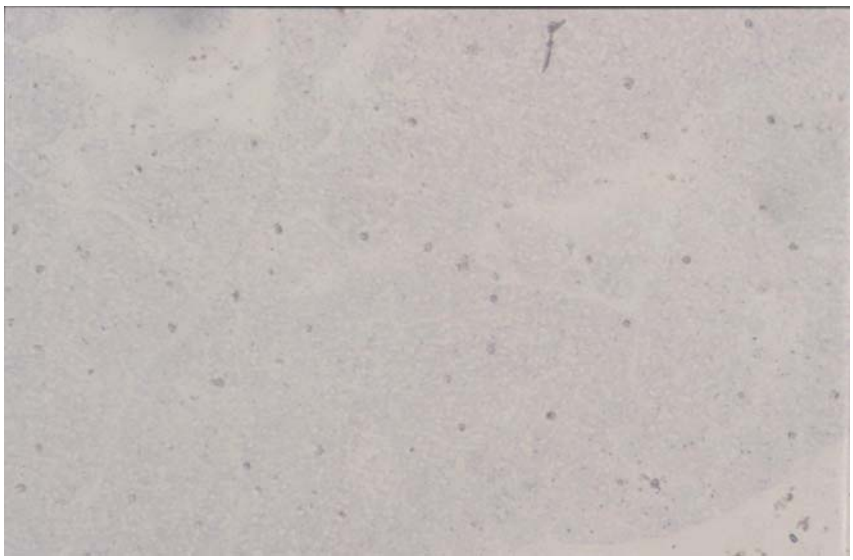


Abb. 3.18: Pankreas (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Leerwert, Vergr. x100

In der vorliegenden Arbeit konnten lediglich sehr geringe Anfärbungen für die DHODH gesehen werden. Eine mögliche Erklärung könnte im Zusammenhang mit dem Alter der Versuchstiere stehen. Cohen untersuchte jüngere Ratten, die seiner Meinung nach enzymaktivere Organe besitzen. Eine Oxidaseaktivität nachzuweisen ist in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig gelungen. Homogene ockerfarbene histologische Schnitte, die von den Leerwertreaktionen nicht zu unterscheiden waren, deuteten auf unspezifische Hintergrundreaktionen, so dass die Resultate als negativ angesehen werden müssen.

3.3.2 Histologische Darstellung der DHODH und SDH in der Niere

Histologischer Überblick

Die wichtigste Aufgabe der Niere ist die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes, die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten, der Säure-Basehaushalt und die Hormonbildung (u.a. Erythropoetin, Renin, Kallikrein, Prostaglandine). Die Niere ist aus Mark und Rinde aufgebaut und enthält die für die Harnbereitung wichtigen Strukturen die Nephrone und Sammelrohre.

Befunde

In der NBT Technik zeigten histologische Schnitte zum Nachweis der SDH bereits nach einer Inkubation von 10 Minuten eine makroskopische Blaufärbung, insbesondere im Rindenbereich (Abb.3.20). Sehr intensiv erschienen die proximalen und distalen Tubuli angefärbt, die sich als gewundene Abschnitte in der Nähe der Nierenkörperchen befinden. Ihre basal senkrechte Streifung war dunkelblau und deutlich erkennbar. Besonders die Hauptstücke, hier mit unscharfen Zellgrenzen und unregelmäßigem Lumen dargestellt, zeigten eine hohe Enzymaktivität im basalen Zellbereich (Abb. 3.19). Die Zellkerne blieben ungefärbt. Als helle Aussparung traten die Nieren-körperchen sowie die Bowmann`sche Kapsel mit ihren Glomerulumschlingen in Erscheinung. Eine sehr hohe Enzymaktivität wurde auch im Bürstensaum der Hauptstückzellen sichtbar. Die geraden Abschnitte der proximalen und distalen Tubuli, in den Markstrahlen verlaufend, besaßen ebenfalls eine hohe Enzymaktivität, sie war jedoch geringer als in den gewundenen Abschnitten. Mittelblau gefärbt stellten sich die geraden Abschnitte der Mittelstücke dar, mit ihrem niedrigem Epithel und weitem Lumen deutlich erkennbar. Insbesondere die basale Streifung trat deutlich in den Vordergrund. Der dünne Teil der Henleschen Schleife war schwierig differenzierbar

und von geringer Enzymaktivität. Auch die Sammelrohre erschienen nur schwach positiv. Wenn man die Aktivitäten von SDH und DHODH vergleicht, so zeigte letztgenannte eine geringere Enymausstattung .

In der mikroskopischen Übersicht beim Oxidasenachweis war das negative Mark gegenüber der schwach gefärbten Nierenrinde abzugrenzen (Abb. 3.23). In der Niere fand sich eine mäßige Oxidaseaktivität mit dunkelbrauner Anfärbung in den basalen Abschnitten der proximalen und distalen Tubuli (Abb. 3.23). Die DAB Körnung erschien homogen und sehr fein verteilt. Auch die Zellkerne stellten sich, wie schon in der Leberzelle beobachtet, positiv dar. Da die Lumen der einzelnen Tubuli, im Gegensatz zu denen im Dehydrogenasetest, sehr eng erschienen, war es schwierig die verschiedenen Abschnitte einzuordnen und zu befunden. Dabei war die DAB Verteilung in ein und demselben Querschnitt nicht gleichmäßig, sondern in einzelnen Zellen verstärkt. In den Kontrollschnitten konnte die Nierenstruktur andeutungsweise erkannt werden, jedoch ohne DAB Niederschlag. Zugabe von 10 µm Brequinar hemmte sowohl die Dehydrogenase als auch die Oxidaseaktivität der DHODH.

Interpretation

Hohe Aktivitäten von SDH und DHODH in den gewundenen Abschnitten von proximalen und distalen Tubuli, nachgewiesen mit der Tetrazoliumtechnik (Abb. 3.20, 3.19), wurden auch von Cohen (1962) beschrieben. Er unterschied jedoch nicht die in den Bürstensäumen und basalen Zellabschnitten sehr intensiv nachzuweisende Färbung. Die gewundenen und geraden Anteile der Hauptstücke beinhalten Bürstensaum und Mikrovilli, welche den Stoffaustausch fördern (z.B. aktive Transportvorgänge). So werden im gewundenen Abschnitt aktiv Sulfat, Glucoronide, Harnsäure und verschiedene Fremdstoffe wie Arzneimittel sezerniert, d.h. es werden größere Mengen Energie benötigt. Bürstensäume enthalten Aktin und Myosin und sind bei der Kontraktion von Bedeutung. Die Natrium-Kalium-ATPase der basalen Zellmembran braucht ebenfalls Energie, die von den in ihrer Nähe liegenden Mitochondrien geliefert wird. Nur so ist sichergestellt, dass Natriumionen aktiv ins Interstitium gepumpt werden können, denen Wasser und Chlorid passiv folgen. Dies erklärt die hohe SDH- und DHODH Aktivität und daraus resultierende intensive Anfärbbarkeit der histologischen Schnitte. Am Tubulus rectus und contortus proximalis erschien lichtmikroskopisch eine basale Streifung, hervorgerufen durch die Parallelanordnung der cristaereichen Mitochondrien. Ebenfalls wird Energie benötigt, damit im proximalen Tubulussystem

aktiv Natrium, Kalium, Glucose, Aminosäuren und Calcium resorbiert und transportiert werden können. Die hohe Anzahl der Mitchondrien im proximalen Tubulussystem und die dort stattfindenden Stoffwechselvorgängen erklären die in den vorliegenden Untersuchungungen nachgewiesenen hohen Enzymaktivitäten von SDH und DHODH (Abb. 3.20, 3.19).

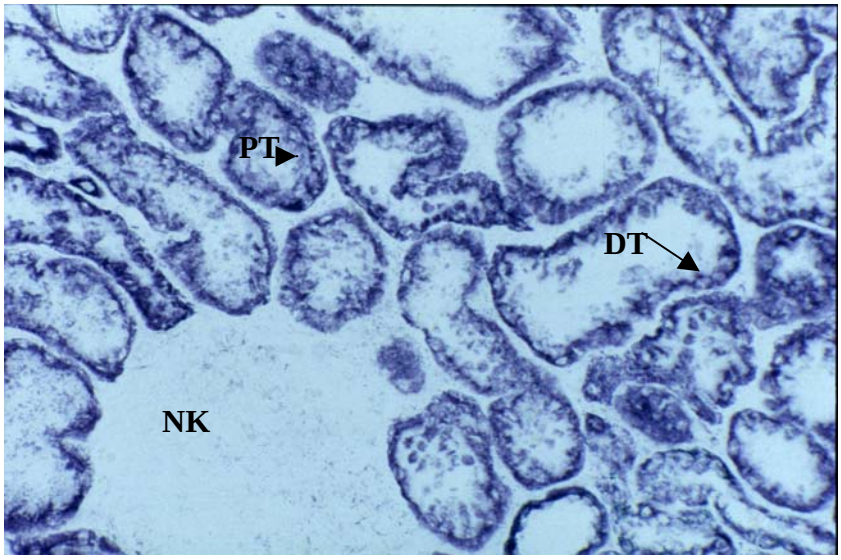


Abb. 3.19 Niere (humane), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x200

Während die Nierenkörperchen ungefärbt bleiben (NK), zeigen proximale Tubuli (PT) und distale Tubuli (DT) deutliche Enzymreaktionen.

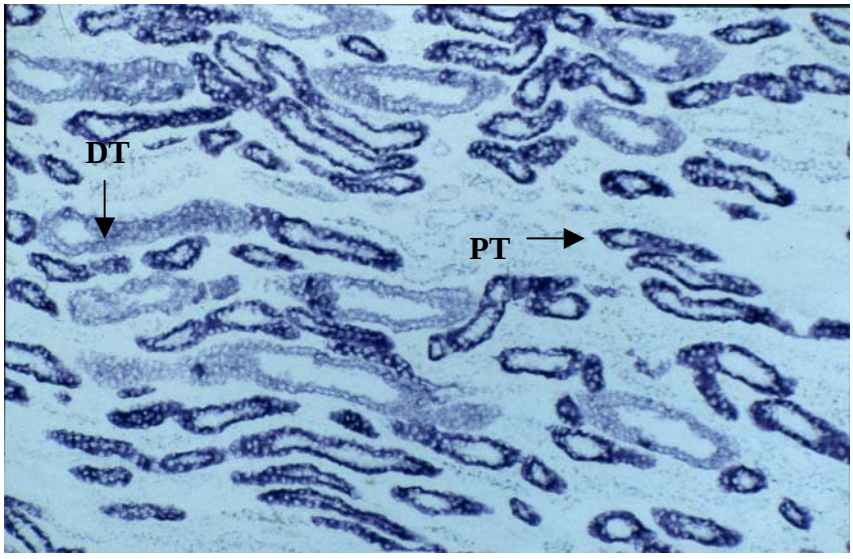


Abb. 3.20: Niere (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x200

In der Außenzone des Nierenmarks befinden sich vorwiegend gerade Abschnitte von kräftig gefärbten proximalen Tubuli (PT) und distalen Tubuli (DT).

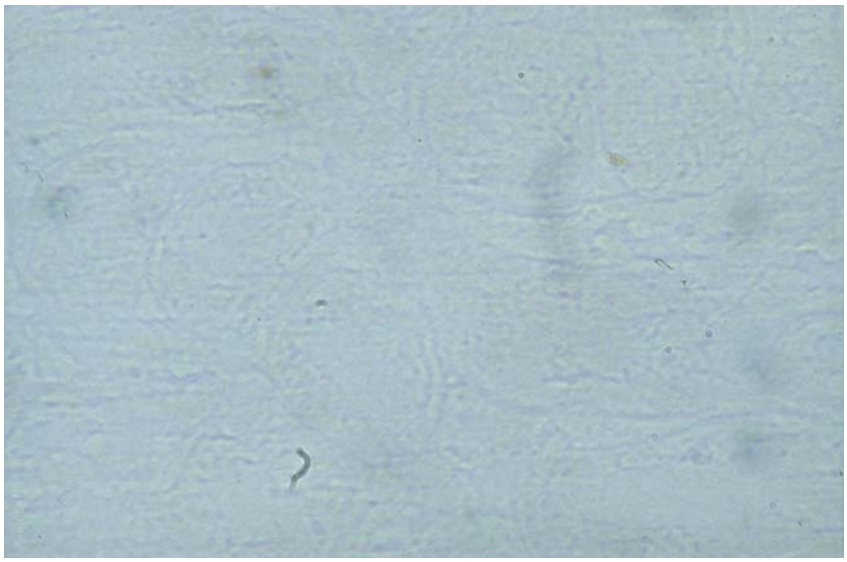


Abb. 3.21: Niere (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Leerwert, Vergr. x200

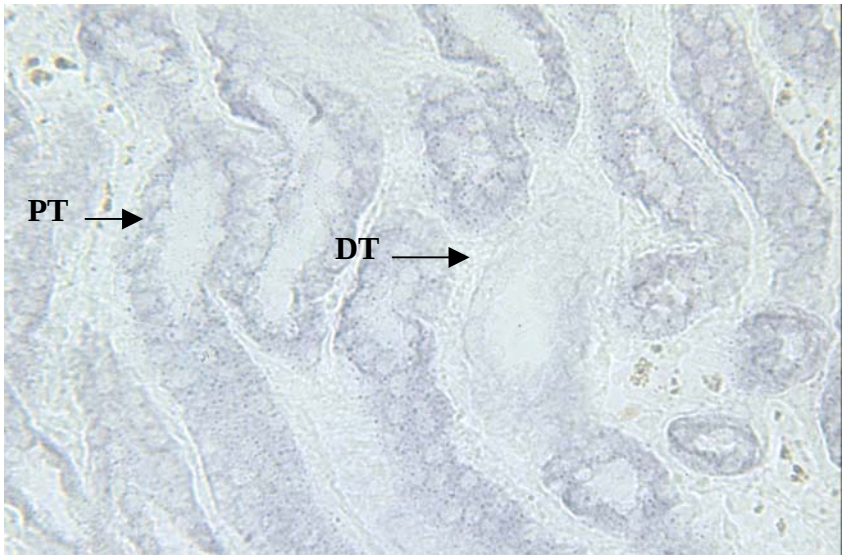


Abb. 3.22: Niere (humane), DHODH Nachweis, Zugabe von Brequinar als Inhibitor, Vergr. x200
Brequinar hemmt die Enzymaktivität am proximalen (PT) und distalem Tubulus (DT).

Im dünnen Teil der Henleschen Schleife befinden sich nur geringe Mengen an Mitochondrien (Schiebler et al., 1986). In diesen organellenarmen Abschnitten finden vorwiegend passive Transportvorgänge statt, wie z.B. der Ausstrom von Wasser in das Interstitium. So erklärt sich die im mikroskopischen Bild nur blasse Darstellung mit geringer Enzymaktivität. Mit den Ergebnissen von Cohen ebenfalls konform sind die hier ungefärbten Glomerulumschlingen. Dort kommt es zur Filtration der harnpflichtigen Substanzen. In den Sammelrohren wird hauptsächlich Wasser rückresorbiert, um eine Harnkonzentrierung zu erreichen. Es finden deshalb keine aktiven energieverbrauchenden Transportvorgänge statt.

Immuncytochemische Untersuchungen mit DHODH Antikörpern, gewonnen aus Hühnereiern und Kaninchenserum, bekräftigen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse in der Rattenniere (Grein, 1998). Eine DHODH Enzymaktivität wurde dabei sowohl in proximalen als auch in distalen Tubuli, insbesondere in der Nierenrinde nachgewiesen. Weiterführende Arbeiten mit gereinigten IgG AK von Kaninchen bestätigten ebenfalls die vorliegenden Beobachtungen in der menschlichen Niere. Deutliche Farbreaktionen in den Nierentubuli, die an aktiven Transportprozessen beteiligt sind, sowie keine Enzymreaktion der Glomeruli waren die Ergebnisse dieser Untersuchungen (Grein, 1998). Die Oxidaseaktivität der DHODH ließ sich in mittlerer Stärke (Abb. 3.23), insbesondere im proxmalen Tubulussystem, nachweisen. Kern-färbung ist auch hier als einer unspezifische Nebenreaktion anzusehen.

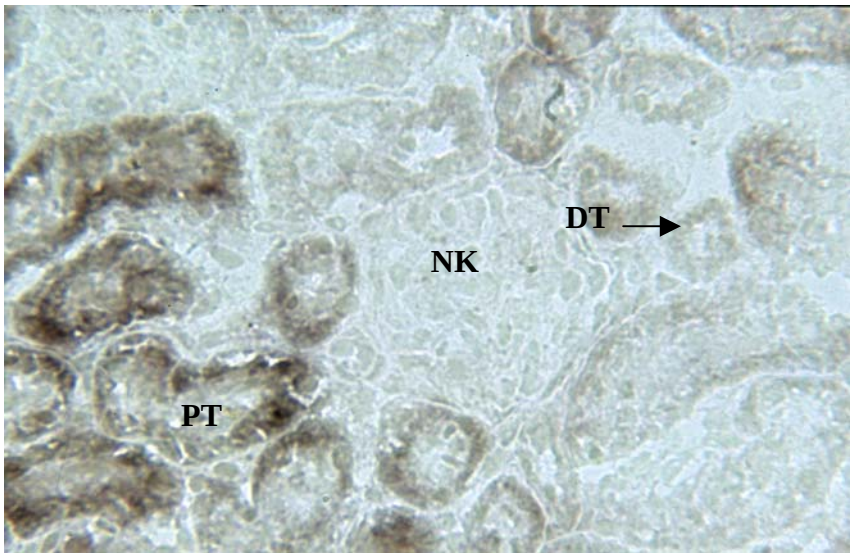


Abb. 3.23: Niere (Ratte), Oxidase Nachweis der DHODH, Vergr. x200

Die proximalen Tubuli (PT) zeigten eine stärkere Oxidasereaktion als die distalen Tubuli (DT). (NK= Nierenkörperchen).

3.3.3 Histologische Darstellung der DHODH und SDH im männlichen Reproduktionsorganen

Histologische Darstellung der DHODH und SDH im Hoden

Histologischer Überblick

Der Hoden ist aus ca. 250 Läppchen aufgebaut und von einer Bindegewebshülle umgeben. Jedes Läppchen besteht aus 1 bis 4 Kanälchen (Tubuli seminiferi convoluti). Sie münden in die Tubuli seminiferi recti und von dort in das Ausführungsgangsystem, dem Rete testis, das über ductuli efferentes mit dem Nebenhoden verbunden ist. Die

Hodenkanälchen besitzen eine Basalmembran mit kontraktilen Elementen. Ihr schließen sich das Keimepithel sowie die Sertoli- oder Stützzellen an.

Befunde

Beim Dehydrogenasenachweis mit der NBT Methode ließen sich in der mikroskopischen Übersicht zunächst die tangential, quer oder schräg angeschnittenen Hodenkanälchen erkennen. Die Stuktur wirkte aufgelockert, zum Teil waren die Tubuli auch infolge der Inkubation zerstört. Schon in der Übersicht fiel die grob gekörnte, kräftig dunkelblaue Färbung der SDH und DHODH vorwiegend im basalen Zellbereich des Keimepithels und im Bindegewebe zwischen den einzelnen Kanälchen auf (Abb. 3.24, 3.25). Die Zellgrenzen der einzelnen Entwicklungsstadien der Spermatogenese waren nicht immer eindeutig zu erkennen. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen ist die Organstruktur bei der H.E. Färbung deutlich besser erhalten geblieben und die einzelnen Zelltypen waren dort gut zu unterscheiden. Die Zellkerne erschienen wie aus dem Zellverband herausgelöst und wirkten, wie auch schon in den vorhergehenden Untersuchungen, optisch nicht gefärbt. Im SDH Test machte lediglich ihre basale Lage eine Identifizierung möglich. Die Enzymaktivität der DHODH fiel deutlich geringer aus als jene des Referenzenzyms, zeigte aber das gleiche Verteilungsmuster wie oben beschrieben (3.25). Eine mäßige Enzymaktivität enthielt ebenfalls das umgebenden Bindegewebe der Tubuli, d.h. die Myoepithelzellen waren gut erhalten und hellblau gefärbt. Im bindegewebigem Zwischenraum der nebeneinanderliegende Hodenkanälchen konnte ein feinverteilter Tetrazoliumniederschlag in den Leydig Zellen beobachtet werden (Abb.3.24, 3.25). Bei der Betrachtung der ausgereiften Spermien fiel auf, dass Kopf, Hals, Haupt- und Endstück nicht darstellbar waren. Im Bereich der Mittelstücke jedoch konnte eindeutig eine hohe Enzymaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.25, 3.26). Komprimiert erscheinende Mittelstücke waren diejenigen, die intensiver gefärbt wirkten als Spermien mit langestreckter Form. Der Einsatz von Brequinar führte zur Hemmung der Enzymaktivität.

Ein Versuch, die Oxidase nachzuweisen, gelang nur in geringem Maße. Die histologischen Strukturen waren nach langen Inkubationszeiten zum Teil zerstört. Enzymsubstrathaltige histologische Schnitte färbten sich während der Inkubation nicht an, so dass sie von der mitgeführten Kontrolle kaum unterschieden werden konnten.

Interpretation

Die langen Inkubationszeiten führten bei einigen Untersuchungen (insbesondere beim Oxidasenachweis) am Hoden zur beginnenden Zerstörung des Gewebes. Auch das im Hoden fehlende, stabilisierend wirkende Bindegewebe kann eine Rolle spielen bei den erzielten Ergebnissen. Auffallend kräftig reagierten Spermatogonien (Abb.3.24, 3.25). Dort sind Mitochondrien dem sogenannten Crista-Typ zuzuordnen. Diese Form beinhaltet in somatischen Zellen fingerförmigen Einfaltelungen der inneren Membran.

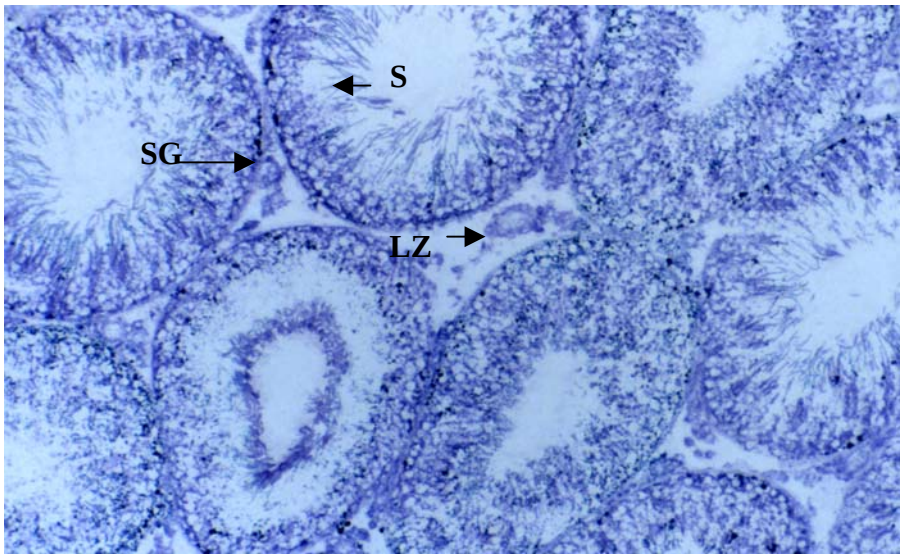


Abb. 3.24: Hoden (Ratte) SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x 100

Enzypositiv waren Spermatogonien (SG) und Spermatiden (S), sowie die Mittelstücken der Spermien (S) und die Leydig Zellen (LZ).

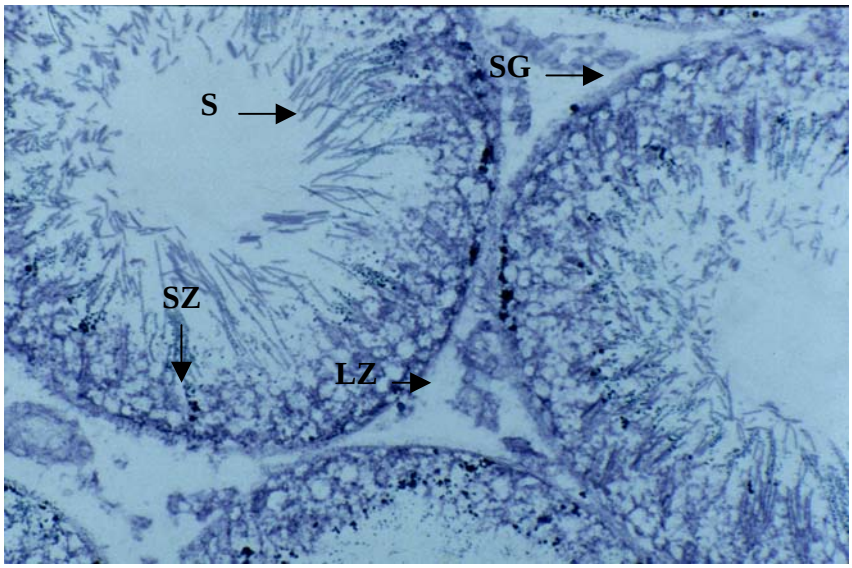


Abb. 3.25: Hoden (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Verg. x200

Positive Enzymreaktionen wurden in den Spermatogonien (SG), aber auch in Spermatozyten (SZ), Leydig Zellen (LZ) und den Mittelstücken der Spermien nachgewiesen (S).

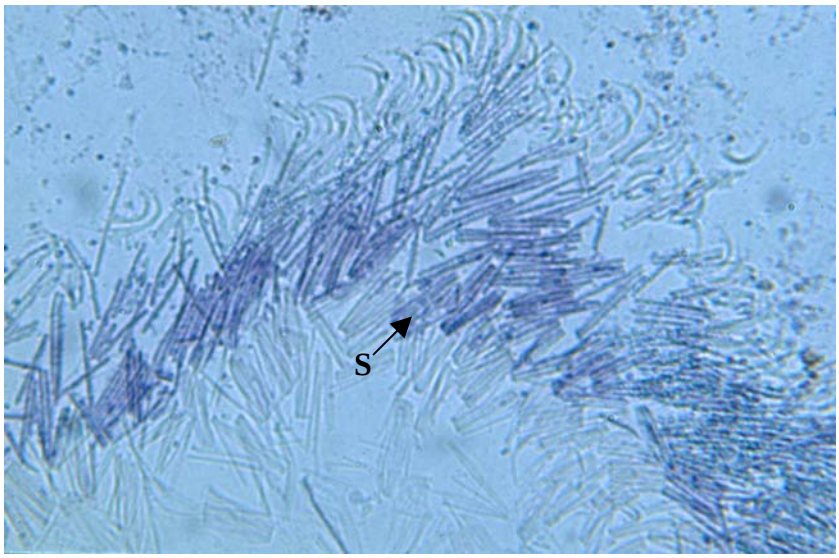


Abb. 3.26: Hoden (Ratte), Spermien, DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x200

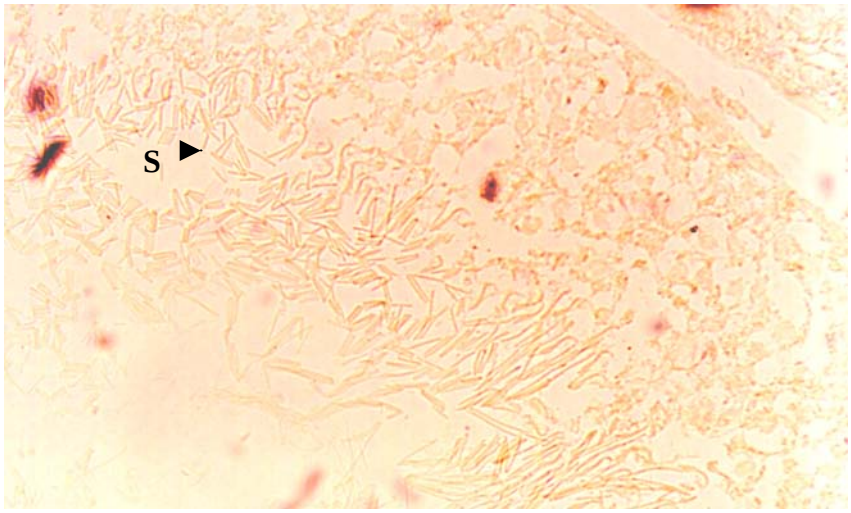


Abb. 3.27: Hodenkanälchen (Ratte), Oxidasenachweis, Vergr. x 200
Eine Oxidasereaktion konnte nicht nachgewiesen werden. (S= Spermien)

Der erhobene Befund steht mit den dort proliferativen Stoffwechselprozessen, wie zum Beispiel die mitotische Teilung der Spermatogonien oder auch die meiotische Teilung der Spermatozyten, im Zusammenhang. Aus den B-Spermatogonien, die schon etwas abgerückt der Basalmembran vorzufinden sind, aber dennoch in Kontakt zu ihr stehen entstehen, wenn sie in die Reifeteilung eintreten, primäre Spermatozyten und am Ende der meiotischen Zellteilung sekundäre Spermatozyten, so dass die zunächst 46 Chromosomen enthaltenden Zellen nun nur noch den haploiden Chromosomensatz beinhalten (Schiebler et al., 1986). Spermatozyten gehen sofort in die 2. Reifeteilung, eine Synthesephase mit DNA-Verdopplung findet nicht mehr statt, so dass in diesem Stadium auch keine erhöhte Enzymaktivität zu erwarten war. Spermatiden sind

das Ergebnis dieser Reifeteilung. Während der oben genannten meiotischen Reifeteilung beginnt eine Umformung der Mitochondrien, nun entstehen kondensierte Formen (Fawcett, 1970; Machrado de Domenech et al., 1972). Dabei sind sie später in Gruppen verteilt im Cytoplasma vorzufinden und enthalten lediglich wenig differenzierte Cristae. Eine wenn auch leicht geringere Enzymaktivität von SDH und DHODH war in den reifen Keimzellen nachweisbar (Abb.3.24, 3.25). Dies Ergebniss steht in Widerspruch zu den von Cohen (1962) erhobenen Befunden der in seiner Arbeit postulierte, dass jene Zellen, die weiter lumenwärts anzutreffen sind, überhaupt keine DHODH Aktivität aufweisen würden. Diese Annahme ist auch unverständlich, denn in den lumenwärts liegenden Spermatiden finden weitere Differenzierungs- und Reifungsprozesse statt. Es kommt zu Informations- und Stoffaustausch zwischen gleichen Zellgruppen. Auch die Sertolizellen waren positiv dargestellt, wenn auch nicht so eindeutig wie im vergleichenden H.E. Bild. Sertolizellen mit ihren sezernierenden Eigenschaften ernähren und stützen das Keimepithel, nehmen das von den Leydig Zwischenzellen produzierte Testosteron auf, binden es an ein Androgenbindendes Protein, um dies erneut zu sezernieren (Schiebler et al., 1986; Burkitt et al., 1993). Dafür benötigen sie Mitochondrien, die in größeren Mengen basal in den Zellen auftreten. Weiterhin benötigen sie ATP um Motilität erzeugen zu können, die zur Freisetzung der reifen Spermatozyten führt. In Widerspruch zu den von Cohen veröffentlichen Ergebnissen steht ebenfalls die in der vorliegenden Arbeit beobachtete intensive Enzymaktivität der SDH und DHODH in den Mittelstücken der Spermien (Abb. 3.26). Dort befinden sich bekanntermaßen eine große Anzahl von in Spiralen angeordneter Mitochondrien, die Energie für die Geißelbewegung liefern müssen (Burkitt et al., 1993). Einige Spermienmittelstücke zeigten unterschiedliche Farb-intensitäten. Da ein Teil von ihnen in kondensierter, kompakter und komprimierter Form vorlag mit intensiver Blaufärbung, andere wiederum langgestreckt und fadenförmig mit hellerer Färbung erschienen, konnte histologisch, mikroskopisch nicht entschieden werden, ob dort unterschiedliche Enzymaktivitäten vorlagen.

DHODH konnte in humanen und bovinen Spermatozoen mit Hilfe von Kaninchen-Antikörpern in der Westernblottechnik untersucht und nachgewiesen werden (Schneider, 2000; Dietz et al., 2000). Dies bestätigte die beobachteten positiven Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Dabei konnte eine 16-fach höhere Aktivität im humanen Ejakulat gegenüber dem bovinen festgestellt werden. Nach Meinung der Autorin sind die unterschiedlich nachzuweisenden Enzymmengen einerseits auf die

verschiedenen Nachweisverfahren zurückzuführen, aber auch Leukozyten in der menschlichen Probe oder Kontamination mit Epithelzellen könnten zu einer Erhöhung der Aktivität beigetragen haben. Dieser speziellen Fragestellung wurde in weiteren Arbeiten nachgegangen (Dietz, 2003; Edelmann, 2003). Enzympositive, Testosteron produzierende Leydig Zellen beinhalten für ihre Steroide produzierenden Vorgänge tubulär angeordnete Mitochondrien, so dass DHODH und SDH nachgewiesen werden konnten.

Im Hoden war die Oxidaseaktivität verglichen mit proliferativem Epithel im Darm deutlich geringer. Die langdauernden Inkubationsbedingungen führten zu einer beginnenden Zerstörung des empfindlichen Epithels. Einzelne Entwicklungsstadien der Spermatozyten konnten nicht, wie im H.E. Präparat eindeutig identifiziert werden. Spermien kamen im Gegensatz zum NBT Test nicht zur Darstellung. Basal liegende Zellen zeigten eine etwas höhere Enzymaktivität als apikal gelegene. Auch im Zwischengewebe liegende Leydig Zellen zeigten eine leichte positive Enzymreaktion.

Histologische Darstellung der DHODH und SDH in Prostata und Ductus deferens

Histologischer Überblick

Seitlich an der Urethra liegt der Lobus dexter und sinister, dorsal der Lobus medius. Die Prostata produziert und speichert als exokrine Drüse ein schwach saures Sekret. Unter ihrer derben Bindegewebskapsel befinden sich zahlreiche glatte Muskelzellen. Bindegewebssepten unterteilen die Drüse in bis zu 50 tubulo-alveoläre Einzeldrüsen, die sowohl elastische als auch kollagene Fasern sowie Nerven und Gefäße enthalten. Ihr Epithel kann sowohl ein- als auch mehrschichtig oder mehrreihig sein.

Befunde

In der mikroskopischen Übersicht imponierte zunächst im NBT Test die hell gefärbte Bindegewebskapsel. Der Dehydrogenasenachweis konnte in allen drei Drüsenanteilen der Prostata bei beiden Enzymsystemen sehr gut dargestellt werden wenn auch die Aktivität im Vergleich mit dem Nebenhoden weniger intensiv ausfiel. Oft zeigten die Abschnitte mit engem Lumen eine höhere Enzymaktivität. Im Vordergrund stand das blau gefärbte Drüsenepithel (Abb.3.28). Insbesondere der apikale und basale Zellbereich über dem Kern beinhaltete hohe Enzymaktivitäten mit einem breitem Saum aus Formazankörnchen. Die basal liegenden Zellkerne dagegen erschienen hell

ausgespart, umgeben von einem schmalen Saum feinkörnigen Niederschlags. Fibroelastisches Bindegewebe umgab die Läppchen und war deutlich hell gefärbt (Abb. 3.28). Es enthält zahlreiche glatte Muskelfasern, die ebenfall hellblau zur Darstellung gekommen sind. Auffallend bei der Darstellung der dorsalen Prostata war, dass Farbintensitätsunterschiede zwischen der DHODH und der SDH nicht so intensiv wie zum Beispiel im Darm oder im Hoden dominierten. In der 400er Vergrößerung konnte man deutlich die sehr fein gefärbten Stereocilien im apikalen Zellbereich beobachten. Prostatasteine, es handelt sich dabei um eingedicktes Sekret, wurden jedoch nur in H.E. gefärbten Präparaten im Lumen nachgewiesen. Bei relativ gut erhaltener histologischer Struktur stellte sich eine hochaktive Oxidasereaktion in der Prostata dar (Abb.3.31). Intensiv braun gefärbt dominierten die Zellkerne im Gegensatz zu jenen in den Kontrollschnitten (Abb.3.32), wobei das übrige Cytoplasma vorwiegend gleichmäßg gefärbt erschien. Auffallend war auch die intensive Färbung der interstitiellen Bindegewebszellen sowie Zellen der umgebenden Muskulatur. Die histologischen Strukturen waren trotz langer Inkubationszeit relativ gut erhalten, nur bei stärkerer Vergrößerung wurde das Ausmaß von Gewebeschäden deutlich. Der Einsatz von Brequinar als Enzyminhibitor führte auch hier zu einer Aktivitätshemmung sowohl im NBT Test als auch im Oxidasenachweis, wobei die Zellkerne positiv gefärbt blieben.

Im gleichen Schnittbild stellte sich der Ductus deferens dar (Abb.3.30). Seine Hauptaufgabe ist der Spermientransport vom Nebenhoden zur Urethra (Burkitt et al., 1993). Intensiv dunkelblau war der apikale Saum des mit Stereocilien besetzten Flimmerepithels im SDH- und DHODH Nachweisverfahren. Auf der Basalmembran liegend, imponierte ein schmaler, ebenfalls dunkelblauer Farbniederschlag. In der darauffolgenden, mittelblau gefärbten stark gefalteten dreischichtigen Muskulatur dominierte die mittlere intensiv gefärbte Ringmuskulatur. Das in der Muskelschicht liegende Venengeflecht des Plexus pampiniformis ließ sich sowohl in histologischen Schnitten von H.E. und NBT gefärbten Schnitten mikroskopieren. Die in ihrer Aktivität geringer nachzuweisende DHODH befand sich vorwiegend im Epithel, Bindegewebe dagegen war kaum gefärbt.

Im gleichen Schnittbild konnten Samenbläschen beobachtet werden. Es zeigte sich ein spiralig gewundenes Gangsystem mit hochprismatischem Epithel (Abb. 3.33), umgeben von einer breiten Muskelschicht längs- und querverlaufenden Fasern. Muskelfasern

erschienen im Tetrazoliumnachweisverfahren mittelblau gefärbt und waren nicht eindeutig voneinander abzugrenzen. Die höchste Aktivität war im zweireihige Zylinderepithel nachzuweisen. Die DHODH zeigte eine etwas geringere Aktivität. In der Übersicht war vorwiegend das Epithel dargestellt, die zellreiche Lamina propria mit ihren kollagenen und elastischen Fasern erschienen kaum gefärbt.

Interpretation

Das dünnflüssige Prostatasekret mit seinem pH-Wert von 6,4 wird unter Einfluß von Testosteron gebildet (Burkitt et al., 1993). Die saure Phosphatase ist ein wichtiges in der exokrinen Drüse produziertes Leitenzym. Eine Erhöhung ihrer Enzymakivität ist unter anderem beim Prostata Karzinom der Fall (Herold, G., 1997). Für die Sekretionsflüssigkeit der in großer Anzahl vorkommenden Hauptzellen werden zahlreiche Mitochondrien zur Energielieferung für die Proteinsynthese benötigt. So ist der hohe Gehalt an den hier im NBT Test nachzuweisenden Enzymen SDH und DHODH zu erklären. In der vorliegenden Arbeit wurden dorsale, laterale und ventrale Anteile der Drüse untersucht. Beim Vergleich dieser drei histologischen Strukturen ergaben bis auf eine Ausnahme keine Farbunterschiede für beide Enzymsysteme bei jeweils etwas niedrigeren Aktivität der DHODH. Ein interessantes Ergebnis fand sich jedoch im Bereich des dorsalen Anteils, denn hier erschien unter gleichen Inkubationsbedingungen die Aktivität der DHODH fast genauso hoch wie jene des Referenzenzyms. Um diese Beobachtungen jedoch verifizieren zu können, müsste in weiteren Untersuchungen eine semiquantitative Bildanalyse durchgeführt werden.

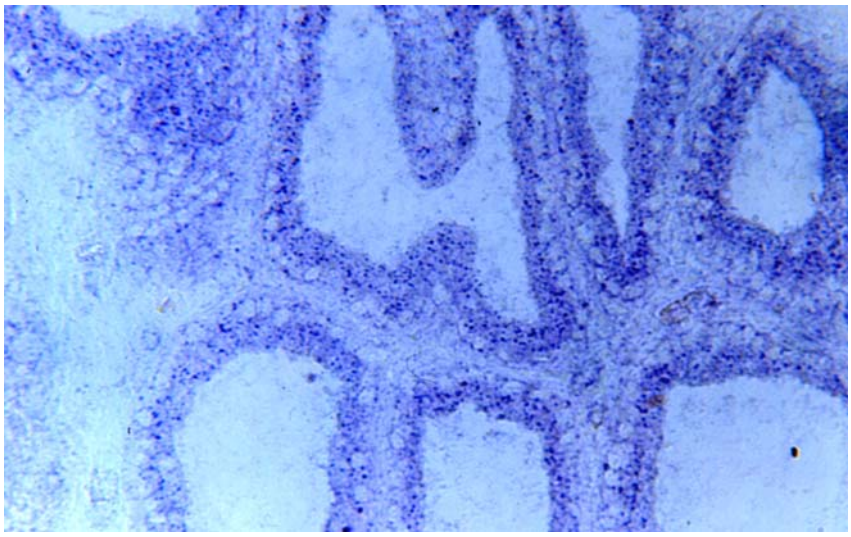


Abb. 3.28: Ventrale Prostata (Ratte), DHODH, NBT Färbung, Vergr.x 150
Positiv reagierten das Epithel (ZE) und die glatten Muskelfasern (GM) im Stroma.

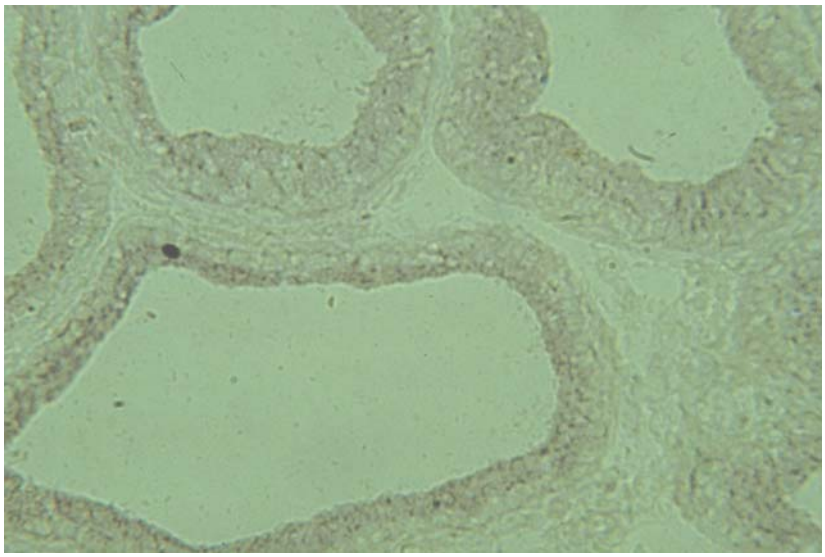


Abb. 3.29: Prostata (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Leerwert, Vergr. x100

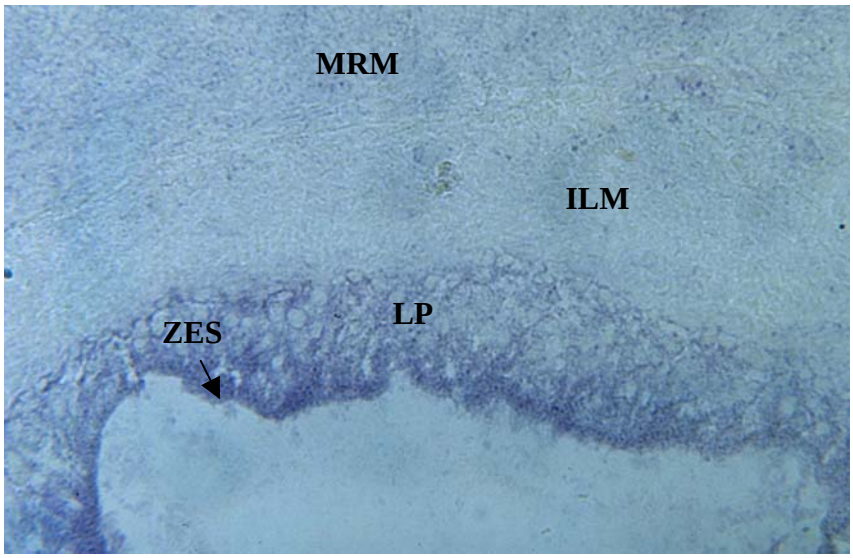


Abb. 3.30: Ductus deferens (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr 200

Das Zylinderepithel mit Stereocilien (ZES) zeigte eine intensive Blaufärbung, weniger Enzymaktivität war in der Lamina propria (LP) und in der inneren Längsmuskulatur (ILM) sowie der mittleren Ringmuskulatur (MRM) nachzuweisen .

Oxidaseaktivitäten waren im Vergleich zu anderen Geweben in relativ hoher Menge nachzuweisen (Abb. 3.31). Die homogene Cytoplasmafärbung mit Darstellung brauner Kerne weisen auf unspezifische Nebenreaktionen hin, wie sie schon in anderen Organen anzutreffen waren. In Bezug auf die Arbeit von Cohen (1962) ist anzumerken, dass er die drei Anteile der Prostata nicht einzeln untersucht und die Aktivitäten miteinander verglichen hat. Im ductus deferens war insbesondere in dem stereocilientragenden Epithel die Menge der Enzymaktivität in etwa vergleichbar mit derjenigen des Nebenhodens. Die unbeweglichen Stereocilien sollen an absorptiven energiezehrenden Prozessen beteiligt sein. Dies ist eine mögliche Erklärung für eine positive

Enzymreaktion. Zwischen beiden Epithelformen besteht große Ähnlichkeit (Burkitt et al., 1993). Eine mittelgradig nachzuweisende Enzymaktivität in der glatten, dreischichtigen Muskulatur deutet auf die ATP- Gewinnung hin. Sie ist von Bedeutung für die Kontraktionen, um den Weitertransport der Spermien zu gewährleisten. Cohen (1962) erwähnte in seinen Untersuchungen eine je nach Organ unterschiedliche Aktivität in der glatten Muskulatur, die von negativen Befunden bis zu hoch aktiven Enzymnachweis reichte. Untersuchungen des ductus deferens wurden jedoch nicht beschrieben. Auffallend niedrig erschien dort die Oxidaseaktivität.

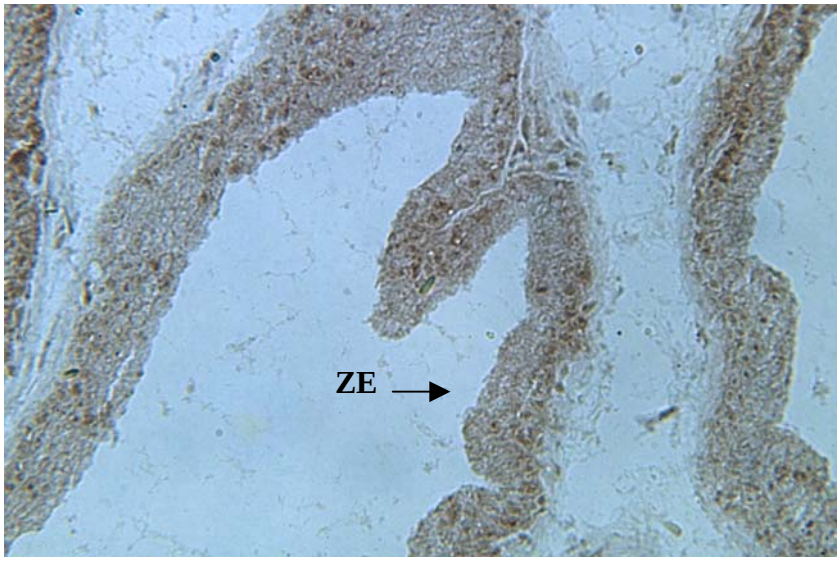


Abb. 3.31: Prostata (Ratte), Oxidase Nachweis der DHODH, Vergr. x100
Das Zylinderepithel (ZE) zeigte im Oxidasetest eine hohe Enzymaktivität.

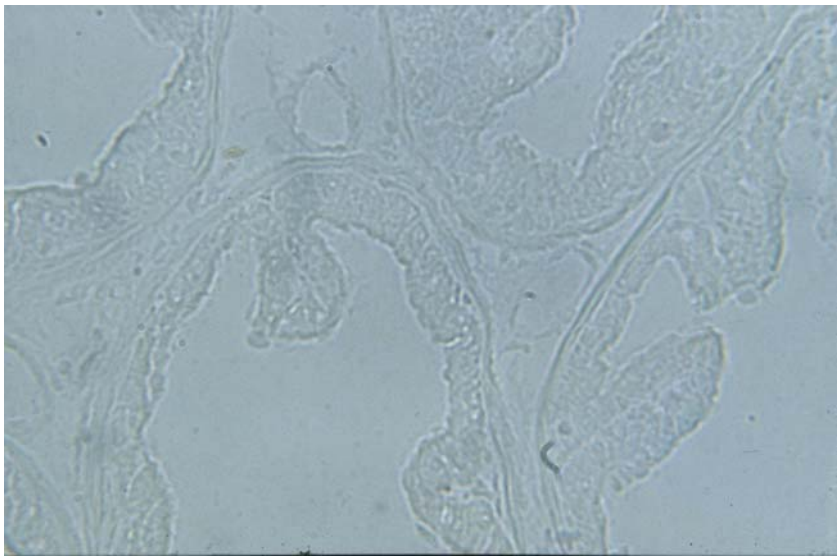


Abb. 3.32: Prostata (Ratte), Oxidase Nachweis der DHODH, Leerwert, Vergr. x 100

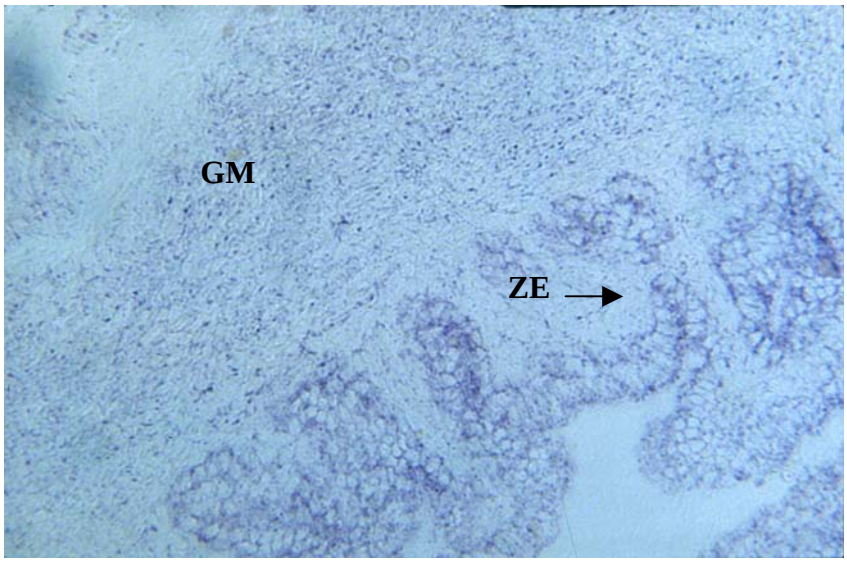


Abb. 3.33: Bläschendrüse (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x100

Das Zylinderepithel (ZE) der Samenblase zeigte eine höhere Enzymaktivität als die glatte Muskulatur (GM)

Eine intensive Anfärbung im Tetrazoliumtest fand sich auch in der Bläschendrüse, Abb.3.33). Das mehrreihige testosterongesteuerte, sekretorisch tätige Epithel steht vorwiegend im Dienst der Proteinbildung und ist aus Gründen der Energiebereitstellung reichlich mit Mitochondrien ausgestattet. So werden unter anderem Fructose, Vitamin C, Fibrinogen und Prostaglandine sezerniert, die für den Stoffwechsel und die Bewegung der Spermien essentiell sind. Dies erklärt die hier beobachtete hohe Enzymreaktion. Die sich anschließenden äußeren zirkulären und inneren longitudinalen glatten Muskelfaserbündel zeigten eine wesentlich geringere Färbung, im Gegensatz zu der quergestreiften Skelettmuskulatur. Die geringe Oxidaseaktivität ergab dunkelbraun dargestellte Zellkerne. Sie ist wie auch die Zellfärbung in der Lamina propria als unspezifische Reaktion anzusehen. Das übrige Zytoplasma erschien dagegen homogen dargestellt. Da der Leerwert keine Kernfärbung zeigte ist anzunehmen, dass in den drei genannten Organabschnitten eine leichte Oxidasereaktion vorhanden war (Abb. 3.32).

Histologische Darstellung der DHODH und SDH im Nebenhoden

Histologischer Überblick

Die Hauptaufgabe der Nebenhoden ist die Sammlung, Speicherung und Reifung der Spermatozyten. Verbunden werden Nebenhodengang (Ductus epididymis) und Hoden (Rete testis) durch Ductuli efferenti. Der Nebenhodengang ist in Caput, Corpus und Cauda unterteilt. Die ductuli efferentes haben ein unregelmäßiges Epithel mit

resorbierenden Kinocilien, die unterstützt von glatter Muskulatur den Transport von Spermien und Samenflüssigkeit in den Nebenhodengang gewährleisten.

Befunde

Im NBT Test zeigte sich eine sehr hohe SDH Aktivität. Die Drüsenendstücke waren im Gegensatz zur Prostata mit weitem Lumen dargestellt, das zweireihige Zylinderepithel regelmäßig und ohne Falten. Sehr intensiv blaugefärbt erschien das Epithel und dort insbesondere der apikale Zellbereich (Abb.3.34) mit den deutlich erkennbaren Stereocilien. Ungefärbte und gut differenzierbare Zellkerne waren von einem Tetrazoliumsaum umgeben. Mit geringer Enzymaktivität erschien das Zwischengewebe mit seiner glatten Muskulatur. Daneben waren jeweils auch Gangabschnitte dargestellt mit besonders intensivem Formazanniederschlag.

Auf demselben Schnittbild befanden sich ebenfalls Ductuli efferentes. Ihre SDH Enzymaktivität war mikroskopisch beurteilt genauso hoch wie jene im Ductus epididymis. Im Vergleich zu oben genannten Beobachtungen erschien die DHODH lediglich geringer aktiv zu sein, bei ansonsten gleicher Farbverteilung (Abb.3.35). Insgesamt stand auch hier die intensive Blaufärbung des Epithels im Vordergrund, während sich das Interstitium fast negativ dargestellte. Glatte Muskulatur zeigte sich lediglich geringer enzymaktiv. Der Einsatz von Brequinar als Inhibitor führte zu einer Hemmung der Enzymaktivität.

Abb. 3.34: Nebenhoden (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x100

Intensive Enzymaktivität ist im Zylinderepithel (ZE) des ductus epididymis, im Bindegewebe (BG) liegende Muskelzellen sind geringer gefärbt.

Abb. 3.35: Nebenhoden (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x200
Enzympositiv stellte sich das Zylinderepithel (ZE) dar. (BG=Bindegewebe)

Interpretation

Die höchsten Enzymaktivitäten wurden im apikalen Bereich des zweireihigen Zylinderepithels im Ductus epididymis mit seinen Hauptzellen und Stereocilien beobachtet. Sie sind für den Transport und die Spermienbeweglichkeit von Bedeutung (Ross et al., 1987). Im Vergleich von SDH und DHODH wurde bei letztgenanntem Enzym eine etwas geringere Anfärbung sichtbar. Diese Befunde decken sich mit den Erkenntnissen der Physiologie und erklären die Wichtigkeit der DHODH für die RNA Vorstufen-synthese und für die Bereitstellung von UTP zur Zuckeraktivierung in diesem Organ, d.h. mit den resorptiven und sekretorischen Aufgaben dieser Zelltypen. So werden unter anderem Sialinsäure, Proteine, Enzyme wie zum Beispiel saure Hydrolasen und Glykoproteine im Nebenhoden gebildet und abgeben. Durch Stoffaustausch bei Transportvorgängen wird ein saures Mileu erzeugt, was zu einer gewünschten Motilitätsminderung der Spermien führen soll. Für diese Vorgänge werden energiereiche Verbindungen in Form von ATP nötig. Ductuli efferentes, im gleichen Präparat ebenfalls sichtbar, zeigten eine gleich hohe Aktivität von SDH und DHODH, wie sie oben beschrieben im Ductus epididymis nachzuweisen war. Die Ductuli efferentes besitzen kinozilientragende Zellen, so dass ATP für die Bewegung der noch unbeweglichen Spermatozyten auf ihrem Weg vom Hoden zum Nebenhoden erforderlich ist. Unterstützt wird dieser Vorgang von den umgebenden glatten Muskelfasern. Letztgenannte haben jedoch nur eine geringe SDH und DHODH Aktivität. Nicht zilientragende Zellen haben vorwiegend resorbierende Aufgaben

(Schiebler et al., 1986), die einen Energieverbrauch bedeuten und damit die hohe Anzahl der dort vorkommenden Mitochondrien erklären. Dies führte zum hier vorhandenen Nachweis der hohen Enzymaktivitäten.

3.3.4 Histologische Darstellung der DHODH und SDH im weiblichen Reproduktionstrakt

Histologische Darstellung der DHODH und SDH im Uterus

Histologischer Überblick

Der Uterus wird in Corpus, Isthmus und Cervix unterteilt. Die innere Endometriumschicht besteht aus einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel. Es folgt das stratum functionale mit Nerven, Gefäßen und Drüsen sowie das stratum basale. Außen schließt sich das Myometrium mit scherengitterartig verlaufenden glatten Muskelzellen sowie das Bindegewebe und die Serosa an.

Befunde

In der mikroskopischen Übersicht fiel für beide Enzymnachweise eine deutlich dunkelblaue Färbung im Bereich der längs- und quergeschnittenen Drüsen auf, während das übrige Gewebe eine mäßige Aktivität zeigte (Abb.3.36., 3.37). Es waren vorwiegend quergeschnitte Drüsenlumen des corpus uteri mit beginnender Verzweigung des Epithels zu beobachten. In der Übersicht zeigte ein Ausschnitt den basalen Anteil des Stratum functionale. Bei den vorliegenden Untersuchungen handelte es sich um ein Übergangsstadium von der Proliferations- in die Sekretionsphase des Stratum functionale bzw. um ein spätes Proliferationsstadium. Die Drüsenschlängelung war deutlich zu erkennen. Der apikale Anteil des Epithels erschien wesentlich dunkler gefärbt als das umgebende Bindegewebe und die Muskelschicht (Abb. 3.36, 3.37). Einzelne Zellen des Epithels wölbten sich in das Lumen hinein vor, das selbst hochprismatisch, zum Teil zweireihig erschien und in der Mitte mit einem hellen, aufgetriebenen Zellleib zu mikroskopieren war. Basal hatte sich zum Teil grobkörnige Formazangranula distal vom Zellkern abgelagert, der selbst hell ausgespart blieb. Enzymaktivitäten der DHODH waren im Bereich der Drüsen gegenüber der SDH fast genauso intensiv beobachtbar. Das umgebende Drüsenstroma erschien nur sehr hell dargestellt. Die Muskulatur zeigte relativ wenig Blaufärbung im Gegensatz zum

Musculus psoas. Im Oxidasetest konnte keine Enzymaktivität im Bereich der Uterusdrüsen nachgewiesen werden. führte im NBT- und Oxidasetest jeweils zur Hemmung von Enzymaktivität. Brequinar als spezifischer Inhibitor der SHODH führt zu einer Hemmung der Enzymaktivität.

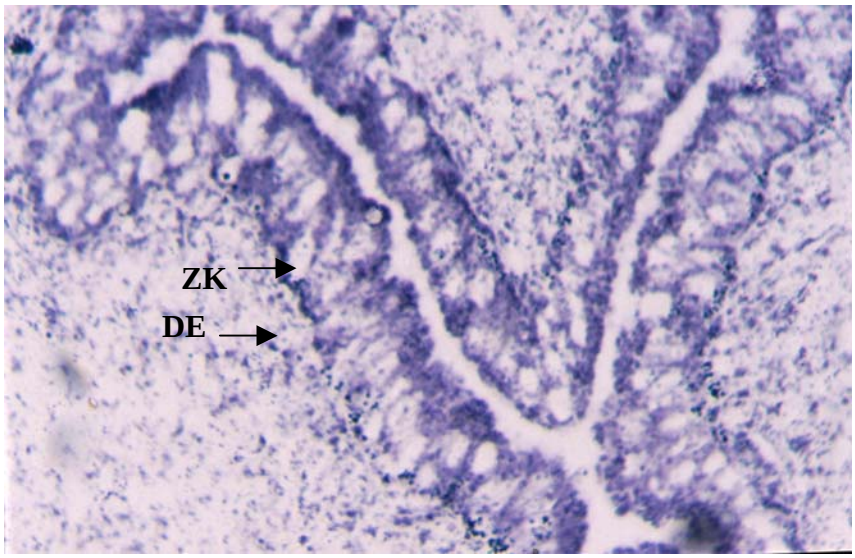


Abb. 3.36: Uterus (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x200

Hohe Enzymaktivität konnte im Drüsenepithel (DE) nachgewiesen werden, der Zellkern (ZK) blieb jedoch vom Farbniederschlag ausgespart.

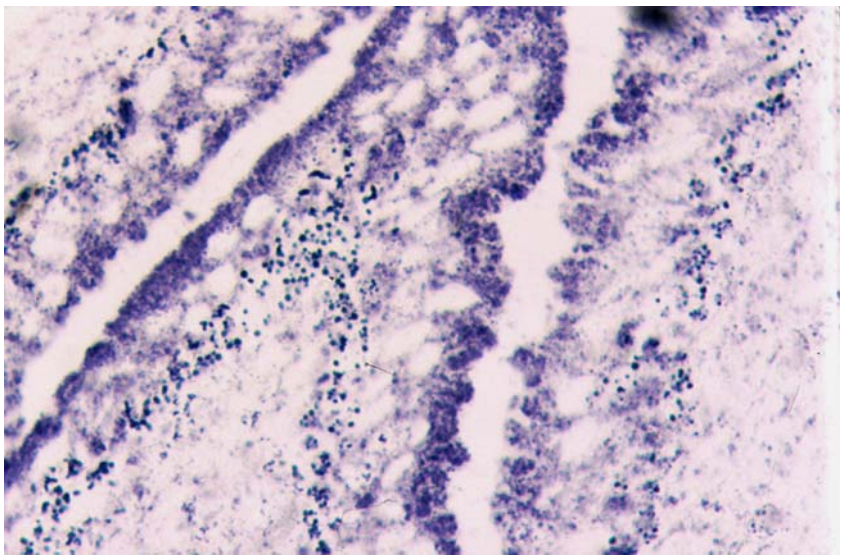


Abb. 3.37: Uterus (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x200

Auch der DHODH Nachweis ergab eine hohe Enzymaktivität.

Interpretation

Bei dem vorliegenden histologischen Ausschnitt handelte es sich um die Übergangsphase vom Proliferationsstadium in das Sekretionsstadium. Im Bereich der Uterusschleimhaut unterliegt das Stratum functionale zyklischen Veränderungen, die den

Vorbereitungen einer Keimimplantation dienen. Das Stratum basale bleibt bestehen, von dort aus kommt es zur Regeneration des in der Desquamatiosphase abgestoßenen Epithels mit Wachstum von Epithelzellen, Drüsen, Gefäßen und Bindegewebszellen (Ross et al., 1987). Für diese Vorgänge muß die Nukleinsäuresynthese gesteigert werden und eine vermehrte Enzymaktivität ist nachzuweisen. Am Ende dieser Phase kommt es unter Progesteroneinfluss zur Verzweigung der Drüsenabschnitte, die ein „sägezahnähnliches“ Aussehen bekommen, was in dem vorliegendem Bildabschnitt recht deutlich dargestellt werden konnte. Unter Einfluss von im corpus luteum gebildetem Progesteron kommt es in der sich nun anschließenden Sekretionsphase durch das Drüsenepithel zur Protein- und UDP- Glukosebildung, so dass Glykogen entsteht. Es wird in die Zellen eingelagert und führt zu einer Vergrößerung dieser histologischen Schicht (Burkitt et al., 1993). Dies trägt zur hier beobachteten kräftigen Blaufärbung bei (Abb. 3.36, 3.37). Das Glykogen fördert die Ernährung der befruchteten Eizellen. Intensive Anfärbung im apikalen Pol der Einzelzelle kommt durch die oben beschriebenen Stoffwechselaktivitäten zustande. Aufgrund seiner Beobachtungen beschrieb Cohen (1962) ebenfalls eine positive Enzymreaktion in den Uterusdrüsen. Dabei erwähnte er jedoch nicht die Entwicklungsphase seiner Schleimhautpräparate, so dass ein direkter Vergleich beider Arbeiten diesbezüglich nicht möglich war. Interessant wäre die Untersuchung der Enzymexpression während verschiedener Entwicklungsstadien, liegt doch die Vermutung nahe, eine höhere Aktivität während der Aufbauphase vorzufinden im Gegensatz zur Desquamationsphase.

Darstellung der DHODH und SDH im Ovar

Histologischer Überblick

Eine Aufgabe des Ovars besteht in der Produktion und Entwicklung von Keimzellen. Eine weitere wichtige Funktion ist u.a. die Synthese von Östrogen und Progesteron. Das Ovar ist Außen von Peritonealepithel umgeben, darauf folgt die Tunica albuginea. In der Rinde des Organs liegen Ovarialfollikel in unterschiedlichen Entwicklungsstadien im zellreichen Bindegewebe. Im Mark befinden sich Gefäße und Nerven.

Befunde

Im NBT Test fiel zunächst die Rinde mit ihren Follikeln sowie das gefäßreiche Ovarialmark auf. Es ergab sich eine hellblaue Färbung der DHODH, SDH erschien

dunkler und intensiver dargestellt (Abb. 3.38, 3.39). Es konnte jedoch im Vergleich zu anderen Organen (z.B. Darm) eine niedrigere Enzymaktivität mit relativ grobkörniger Formazangranulation schon in der übersichtlichen Betrachtung festgestellt werden. Die Organstruktur war zum Teil zerstört. Sowohl im Dehydrogenase- als auch im Oxidasenachweis fand sich lediglich eine geringe Anfärbung des einschichtigen ovarialen Oberflächenepithels. Die ungefärbten Zellkerne waren umgeben von ringförmig angeordneten Formazankörnchen. Die darunterliegende Tunica albuginea war nicht farbig dargestellt. Intensiv dunkelblau zeigten sich die hier nur in geringer Anzahl vorkommenden Primärfollikel im Gegensatz zu den helleren Sekundärfollikeln. Sie waren oft tangential angeschnitten, so dass kein Zellkern sichtbar wurde (Abb. 3.38). Auch die interstitiellen Zellen des Rindenstromas erschienen hellblau gefärbt. Sie bestehen zum größten Teil aus Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Dunkelblau dargestellte Sekundärfollikel mit ihrem mehrschichtigen Epithel waren relativ zahlreich vorhanden. Weiß erschien die Oozyte, von einer bräunlichen Ringstruktur umgeben, der Zona pellucida. Die Eizellen wirkten mikroskopisch wie herausgelöst, ohne Darstellung des Nucleolus. In der Membrana granulosa wurden zum Teil grobkörnige Formazanpaktikel sichtbar. Theca interna und externa konnten nicht voneinander unterschieden werden. Spindelförmige Stromazellen, welche die Follikel umgeben, waren ebenfalls sehr hell gefärbt. Sie differenzieren sich im Laufe der Entwicklung zu Theca interna Zellen. Ihr Zellkern war wie im H.E. Präparat erkennbar, herausgelöst. Die zona pellucida, die sich zwischen Stratum granulosum und Oozyte des Sekundärfollikels befindet, war bei diesen Betrachtungen immer zerstört. Positive Ergebnisse zeigten auch die Tertiärfollikel (Abb. 3.38) mit ihren Kammern und Kavernen. Es konnte hier deutlich eine Theka interna und externa differenziert werden, wobei erstgenannte ausgeprägtere Enzymaktivitäten aufwies. Mittelblau gefärbt sowohl beim Nachweis der DHODH als auch bei der SDH waren die in allen Entwicklungsstadien vorkommenden Follikelatresien sowie das Corpus luteum, während die Granulasaluteinzellen eine geringere Aktivität beinhalteten. Das Ovarialmark mit seinen Stromazellen stellte sich insgesamt wenig gefärbt dar.

In einigen Präparaten konnte ein Eileiteranschnitt beobachtet werden. Intensiv dunkelblau stellte sich der basale Abschnitt des einschichtigen Zylinderepithels dar sowie die zum Teil sehr gut sichtbaren Flimmerzellen. In der Mitte erschien der Zellleib mit geringerer Aktivität. Bei diesen histologischen Untersuchungen waren lediglich das Epithel und die darunter befindliche Lamina propria angeschnitten. Es fehlten sowohl

Serosa als auch Muskelschichten. Es fiel sowohl bei den substrathaltigen Schnittbildern als auch bei den Leerwertpräparaten eine gelbliche unspezifische Ablagerung auf. Beim Oxidasenachweis waren die Präparate stark zerstört und die einzelnen Strukturen kaum erkennbar (Abb.3.40). Es zeigte sich schon in der mikroskopischen Übersicht eine gleichmäßige hellbraune Färbung. Einzelne Bezirke mit vermehrter Aktivität sahen im Kontrollschnitt ähnlich aus. Lediglich wenige Zellen wirkten etwas intensiver gefärbt.

Interpretation

Im NBT Test zeigte sich für die SDH eine intensive und für die DHODH eine mäßige Enzymaktivität. Cohen (1962) beschrieb ebenfalls positive Enzymreaktionen in den Granulosazellen, wobei das Eizellepithel mäßig aktiv sei.

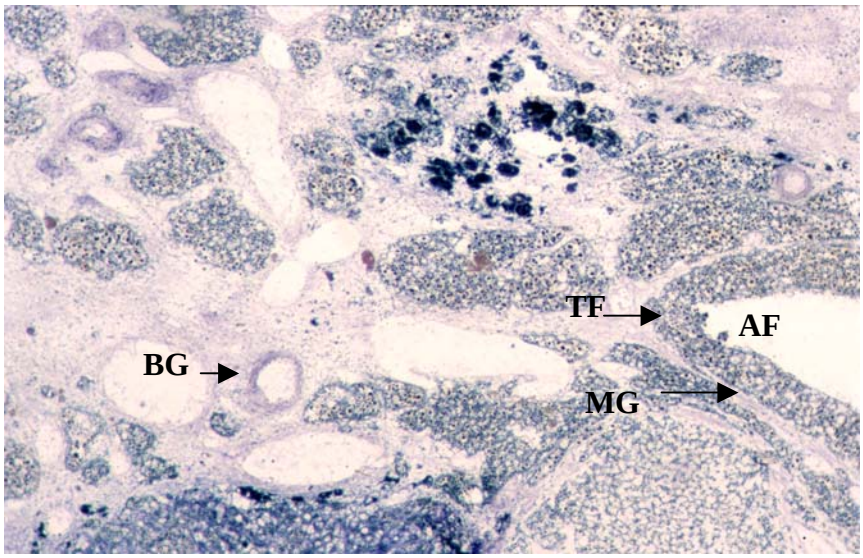


Abb. 3.38: Ovar (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x200
Intensive Färbung wurde in der membrana granulosa (MG) des Tertiärfollikels (TF) nachgewiesen. (BG= Blutgefäß, AF= Antrum folliculi).

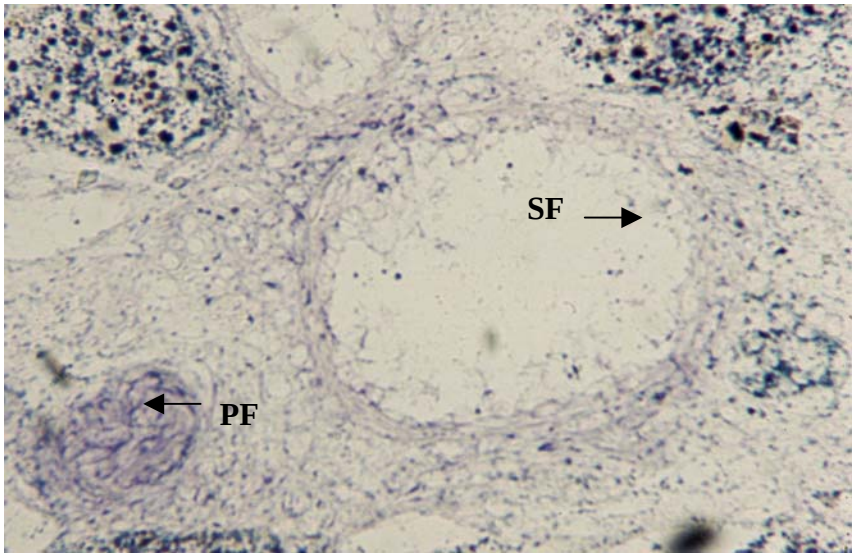


Abb. 3.39: Ovar (Ratte), DHODH Nachweis, Vergr. x200

Enzympositiv reagierten Primärfollikel (PF), Sekundärfollikel (SF) waren deutlich geringer gefärbt.

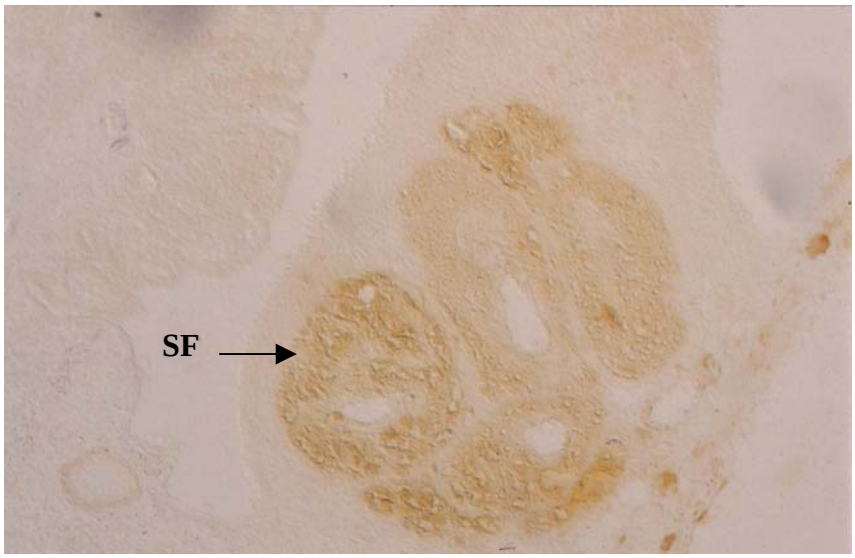


Abb. 3.40: Ovar (Ratte), Oxidasenachweis der DHO, Vergr. 200
Oxidasereaktion konnte u.a. auch in Sekundärfollikeln (SF) nachgewiesen werden.

Intensive dunkelblaue Färbungen der Primärfollikel war die Folge von großer Enzymaktivität in den zahlreichen Mitochondrien des tubulären Typs, die für mitotische Zellprozesse und damit für die Vermehrung des Epithels nötig sind. Es entwickeln sich mit Hilfe von Follikelstimulierendem Hormon daraus die Sekundär- und Tertiärfollikel. Markante Aktivitäten in der Theca interna des Tertiärfollikels ist die Folge von dort stattfindender Steroidsynthese. Die Externa mit ihren spindelförmigen Zellen (Ross et al., 1987) leistet keine Hormonsynthese und ist deswegen deutlich weniger gefärbt. Die zona pellucida war in vielen histologischen Schnitten zerstört. Sie besteht aus Proteoglykanen und Glykoproteinen, die sicherlich infolge der Inkubationsbedingungen herausgelöst worden sind. Die interstitiellen Zellen des Rindenstromas mit ihren Mitochondrien, die zur perinucleären Anordnung neigen (Stevens & Lowe, 1992), waren hellblau bzw. ockerfarben dargestellt. Es soll sich dabei um Fibroblastenähnliche Zellen handeln, von denen viele Steroidproduzierende Aufgaben haben, somit hohe Syntheseleistung betreiben und Mitochondrienreich sind. Eine sehr deutliche Anfärbung war ebenfalls im corpus luteum sichtbar. Insbesondere die Granulosaluteinzellen stellten sich positiv dar. Das corpus luteum ist der Zellanteil eines Follikels, der nach der Ovulation im Ovar verbleibt und sich unter Einwirkung des Luteinisierenden Hormons aus der Hypophyse verändert (Schmidt-Matthiesen, 1992). Es entwickeln sich daraufhin Granulosalutein- und Thekaluteinzellen. Außerdem verfügen deren Mitochondrien über Enzyme, die zur Herstellung von Pregnenolon- und für die Cholesterinbiosynthese

Bedeutung haben. Das Ovarialmark hingegen mit vorwiegend Bindegewebszellen, Nerven und Gefäßen zeigte demnach kaum Enzymaktivität. Beim Vergleich des hier untersuchten Gewebes mit z.B. dem Gastrointestinaltrakt, der Leber oder der Niere war die nachzuweisende Enzymaktivität deutlich geringer. Histologische Präparate, in denen eine Oxidasereaktion gefunden werden sollte, ergaben ein fast gleichmäßiges, ockerfarbenes mikroskopisches Bild. Aus diesen Beobachtungen muss die Vermutung geäußert werden, dass lediglich geringe Oxidasereaktion in diesem Gewebe vorhanden ist (Abb.3.40). Bei den einzelnen etwas intensiver gefärbten Zellen im Stroma kann es sich um eine unspezifische Reaktion von Fibroblasten handeln. Für diesen Test müsste das Gewebe eventuell anders vorbereitet werden, jedoch wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit diese Ansätze nicht weiter verfolgt.

3.3.5 Histologische Darstellung der DHODH und SDH in der Muskulatur

Histologische Darstellung der DHODH und SDH in der quergestreiften Muskulatur

Histologischer Überblick

Als quergestreifte Skelettmuskulatur wurde in der vorliegenden Arbeit der Musculus psoas untersucht. Jede einzelne Faser wird von Bindegewebe, dem Endomysium, umhüllt. In den Bindegewebssepten verlaufen Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven. Ein Charakteristikum der Skelettmuskulatur ist ihre Querstreifung, die durch die Parallelanordnung der Myofibrillen zustande kommt.

Befunde

Beim Nachweis der Dehydrogenaseaktivität fiel eine intensive Enzymreaktion bei gut erhaltener Organstruktur auf (Abb.3.41). Die Muskulatur kam hier sowohl im Längs- als auch im polygonalen Querschnitt zur Darstellung. Einzelne Fasertypen als parallel angeordnete Bündel zusammengefasst, mit bis zu 100 randständigen Kernen waren im Querschnitt gut an ihrer unterschiedlicher Farbverteilung zu erkennen (Abb.3.41, 3.42). Es ergab sich ein „schachbrettartiges“ Muster hervorgerufen durch die unterschiedliche hohen Enzymaktivitäten der einzelnen Fasern. Endomysium mit darin verlaufenden Blut- und Lymphgefäßen sowie Nervenfasern färbten sich nicht an. In jeder Gruppe von Faserbündel erschienen sowohl einzelne, mit sehr hoher Enzymaktivität, also intensiver Blaufärbung, als auch solche mit lediglich mittelblauem Erscheinungsbild.

Anteilsmäßig waren Fasern mit hoher Aktivität etwas weniger als die Hälfte vom Gesamtanteil eines Faserbündels vertreten. Die Formazankristalle waren feinkörnig und lagerten sich bevorzugt in den äußeren Randbereichen der einzelnen Fasern ab. Beim Einsatz des Inhibitors Brequinar entstand ein ebenso helles histologisches Bild wie es im Kontrollschnitt ohne Substrat zur Darstellung kam. Versuche eine Oxidasereaktion nachzuweisen ergaben lediglich sehr schwache hellbraune gleichmäßige Anfärbungen (Abb. 3.43). Beim Drehen an der Mikrometerschraube wurden dunkelbraune, feine und vereinzelt auftretende Kristalle sichtbar. Sie waren den einzelnen Muskelfasern nicht zuzuordnen, so dass man von einer negativen Enzymreaktion ausgehen muss.

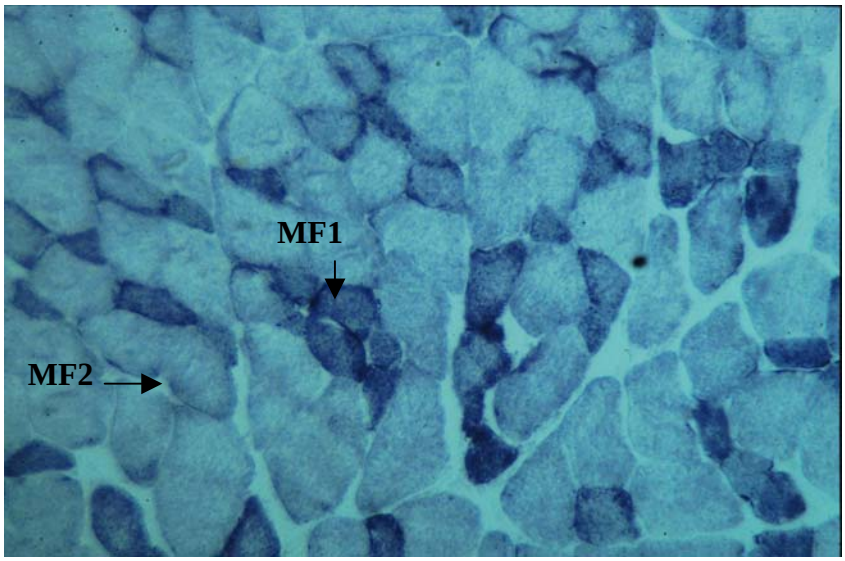


Abb. 3.41: Skelettmuskel (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x200
Intensiv dargestellt sind Typ 1 Fasern (MF1), geringer aktiv die Typ 2 Fasern (MF2).

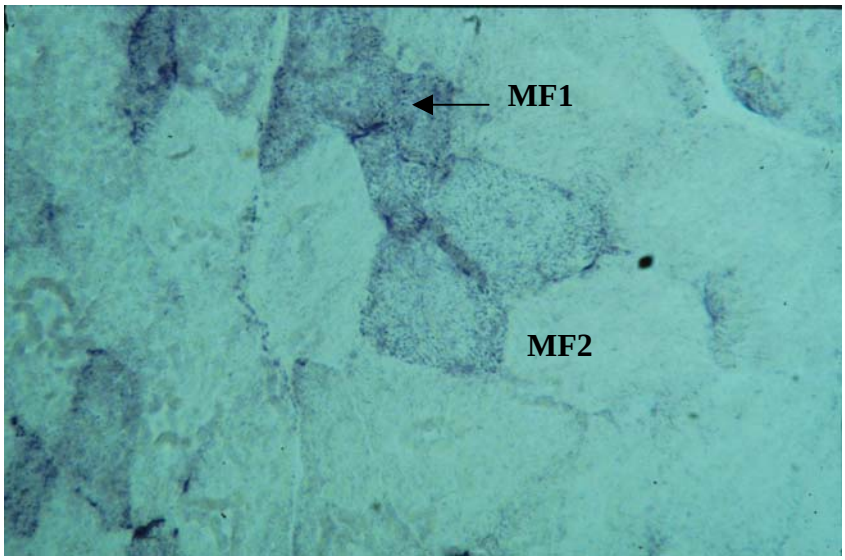


Abb. 3.42: Skelettmuskel (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x200
(MF1 =Muskelfasertyp 1, MF2= Muskelfasertyp 2)

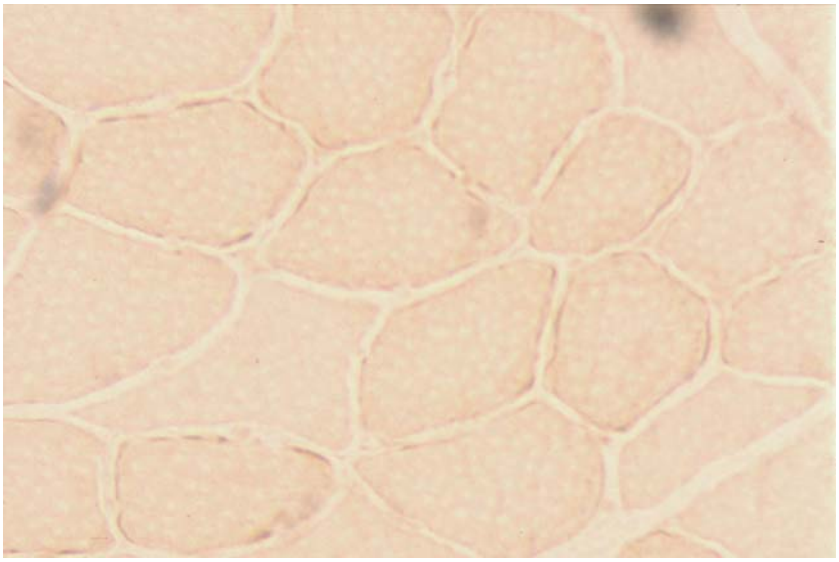


Abb. 3.43: Skelettmuskel (Ratte), Oxidase Nachweis der DHODH, Vergr. x200
Es konnte keine Oxidasereaktion im Skelettmuskel nachgewiesen werden.

Interpretation

Die hohe Enzymaktivität der DHODH läßt auf die große Anzahl von Mitochondrien in der Skelettmuskulatur schließen, deren Aufgaben es ist, durch oxidative Phosphorylierung Energie zu gewinnen und somit Muskelkontraktionen zu ermöglichen. Die Parallelanordnung von Aktin- und Myosinfibrillen führte zur Erzeugung eines quergestreiften mikroskopischen Bildes. Die unterschiedliche Farbverteilung der Faserbündel kommt durch die charakteristische Lage der Mitochondrien zustande. Sie befinden sich vorwiegend in Gruppen liegend, dicht unter dem Plasmalemm oder in Reihen zwischen den Myofibrillen (Leonhardt et al., 1987). Die beim Dehydrogenasenachweis unterschiedlichen Formazanniederschläge stehen in Zusammenhang mit dem Auftreten von unterschiedlichen Fasertypen in der Skelettmuskulatur. Typ 1 Fasern sind fähig, langsame und kräftige Kontraktionen auszuführen. Aufgrund ihres hohen Myoglobingehaltes werden sie auch rote Fasern genannt. Ihre Energie gewinnen sie aus oxidativen Stoffwechselvorgängen, die Dauerleistungen erbringen können, wie sie bei der Haltefunktion benötigt wird. In den vorliegenden Untersuchungen waren sie aufgrund ihres hohen Gehalts an Mitochondrien intensiv dunkelblau gefärbt. Kurze zügige Kontraktionen verrichten die hier in größerer Menge nachgewiesenen Typ 2 Fasern. Ihre mäßige Aktivität steht in Zusammenhang mit der geringen Anzahl an Mitochondrien. Ihre Energiegewinnung erfolgt überwiegend aus glykolytischen Vorgängen. Intermediärfasern konnten in der

vorliegenden Arbeit nicht von den übrigen Fasertypen unterschieden werden. Auch Cohen (1962) hatte Skelettmuskulatur in seiner Arbeit untersucht. Seine unterschiedlich gewonnenen Proben ergaben je nach Gewebe unterschiedliche Enzymaktivitäten. Jedoch machte er keine Angaben, um welche Muskelstrukturen es sich handelte, denn dies ist entscheidend in der Beurteilung der verschiedenen Fasertypen. Eine Oxidasereaktion war nicht nachzuweisen (Abb. 3.43).

Histologische Darstellung der DHODH und SDH im der Herzmuskulatur

Histologischer Überblick

Von außen nach innen ist das Herz aus Epikard, mit Gefäßen und Nerven, Myokard und Endokard aufgebaut. Das Myokard besteht aus spiralig angeordneten Herzmuskelzellen, das Endothel aus Bindegewebe, Gefäßen und Nervenbündel. Die einzelnen Zellen beinhalten einen mittelständige Kern und sind im Gegensatz zum Skelettmuskel durch disci intercalares miteinander verbunden.

Befunde

Aufällig war die schon nach wenigen Minuten makroskopisch sichtbare Blaufärbung der SDH im NBT Test (Abb. 3.44). In der mikroskopischen Übersicht zeigte sich eine hohe Aktivität mit intensiver dunkelblauer Anfärbung der einzelnen Muskelzellen. Muskelfasern mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten, wie sie in der Skelettmuskulatur vorkommen, waren nicht vorhanden. Die Zellgrenzen erschienen in der Übersicht relativ undeutlich. Infolge der quergeschnittenen Myofibrillen ergab sich ein „marmoriertes“ Bild der Herzmuskelfasern (Ross & Reith, 1987). Zum histologischen Qualitätsvergleich der Schnitte wurde ein Präparat mit H.E. gefärbt. Dort konnte man vorwiegend längsgeschnittene Fasern erkennen mit mittelständigen, kräftig gefärbten Zellkernen. Ebenso intensiv dargestellt waren die Glanzstreifen. Im Vergleich DHODH und SDH war die Farbintensität des letztgenannten Enzyms um ein vielfaches höher (Abb.3.44, 3.45). Wurde beim SDH Nachweis ebenfalls eine Stunde inkubiert, so zeigte sich ein dunkelblau bis schwarz gefärbtes Ergebnis.

Bei mittelbrauner Anfärbung der Faserbündel im Oxidasetest ergab sich eine kräftige Kernfärbung (Abb. 3.47). Im Bindegewebe erschienen braun gefärbte Zellen, wobei es sich höchstwahrscheinlich um Plasmazellen handelte. Daneben kamen intensiv gefärbte Zellen mit dreieckförmiger Gestalt zur Darstellung, wobei dies am ehesten im

Perimysium vorkommende Fibrozyten waren. Glanzstreifen konnten als feine dunkle Banden identifiziert werden. Die Negativkontrolle des Oxidasetests ergab eine ungefärbte histologische Darstellung, so dass von einer spezifischen Enzymreaktion auszugehen ist. Dies wurde in nachfolgenden Arbeiten bestätigt (Jöckel, 1995). Die Zugabe von Breqiunar als Enzyminhibitor führte zu einer Hemmug der DHODH Reaktion.

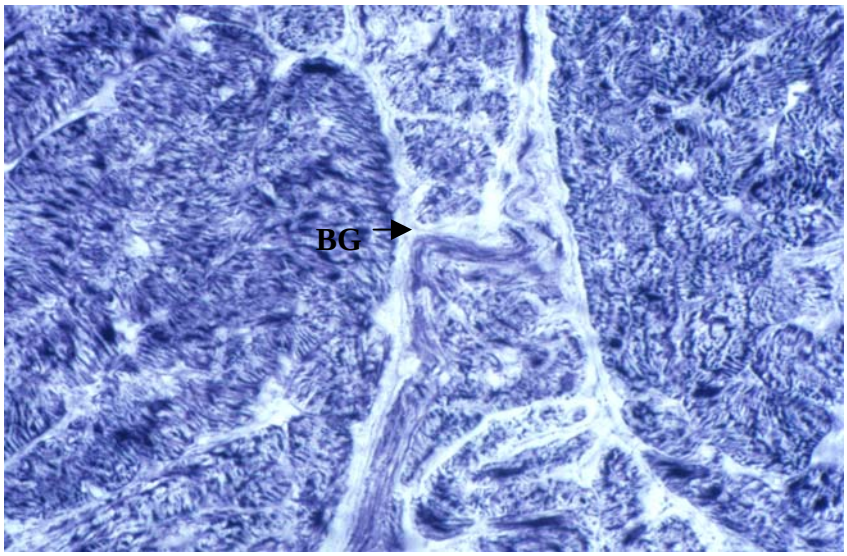


Abb. 3.44: Herzmuskel quergeschnitten (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x200

Eine intensive Ánfärbung konnte in den Herzmuskelfasern nachgewiesen werden, während das Bindegewebe (BG) ungefärbt blieb.

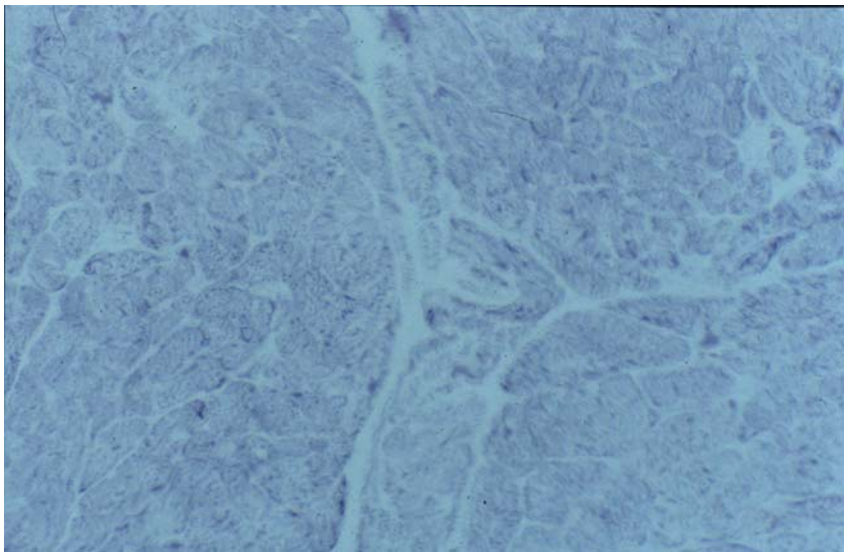


Abb. 3.45: Herzmuskel (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x 200

Der DHODH Nachweis im Herzmuskel war deutlich geringer als die SDH Aktivität.

Abb. 3.46: Herzmuskel (Ratte), Querschnitt, DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x100
Keine Anfärbung wurde im Leewertschnitt nachgewiesen.

Interpretation

Sowohl für die SDH und im geringen Maße für die DHODH konnten im Herzmuskel Enzymaktivitäten mit NBT nachgewiesen werden (Abb. 3.44, 3.45). Doch im Gegensatz zur Skelettmuskulatur war die Anfärbung des histologischen Präparates relativ gleichmäßig. Nur in der starken Vergrößerung wurden geringe Aktivitäts-unterschiede der einzelnen Muskelfasern deutlich, die zu einem „marmorierten" Erscheinungsbild beigetragen haben. Sie sind jedoch minimal und nicht mit denen der Typ 1 und 2 Fasern des Skelettmuskels zu vergleichen. Das Arbeitsmyokard besitzt im Gegensatz zur Muskulatur der Erregungsbildung- und Fortleitung eine große Anzahl an Mitochondrien. Sie liegen aneinandergereiht sowohl zwischen den Myofilamenten als auch an den Polenden der einzelnen Zellen. Charakteristisch sind ihre christaereichen Auffaltelungen, die zur Vergrößerung der inneren Zellmembran führen (Burkitt et al., 1993). So ist auch die Enzymausstattung wesentlich höher. Sie sind von Bedeutung für die Energiegewinnung in Form von ATP, die für Muskelkontraktionen und damit auch für die Pumpfunktion des Herzmuskels essentiell sind. Bestätigt werden diese Beobachtungen aus vorangegangenen Arbeiten bei denen ebenfalls eine mittelstarke Enzymaktivität nachgewiesen wurde (Cohen, 1962). Desweiteren konnte erstmals eine schwache Oxidaseaktivität der DHO in diesem Gewebe beobachtet werden (Abb. 3.47). Die relativ homogene, mittelbraune Anfärbung des Kontrollschnittes war deutlich heller und die Zellkerne ungefärbt. Substrathaltige Schnitte ergaben dunkelbraune Zellkerne in den einzelnen Muskelfasern und in den Zellen des umgebenden Bindegewebes. Bei

diesen handelte es sich um Plasmazellen oder Makrophagen, die zu einer unspezifischen Reaktion beigetragen haben.

Abb. 3.47: Herzmuskel (Ratte), Oxidase Nachweis der DHODH, Vergr. x200

Intensive Oxidasereaktion konnte in den einzelnen Herzmukelzellen (HMZ), mit deutlich gefärbten Zellkern (ZK) beobachtet werden.

3.3.6 Histologische Darstellung der DHODH und SDH in einem Lymphatischen Organ, der Milz

Histologischer Überblick

Die Funktionen der Milz bestehen in der Immunabwehr, dem Abbau von Erythrozyten, der Bildung von Lymphozyten und im geringen Maße ist auch Blutspeicherung möglich. Von der Kapsel ausgehende Trabekel, die als Leitstruktur für Nerven, Gefäße und Lymphe dienen, unterteilen das Organ. Die weiße Pulpa enthält Lymphknötchen mit einer Zentralarterie, Lymphozyten und Markrophagen. Dazwischen liegt die rote Pulpa mit ihren retikulären Fasern sowie Erythrozyten, Plasmazellen und Makrophagen.

Befunde

In der Übersichtsaufnahme war keine Bindegewebskapsel erkennbar. Die Milz erschien hell dargestellt, mit ihrem hohen Gehalt an kollagenen Bindegewebe und elastischen Fasern aber ohne Nachweis von Muskelzellen. In der Übersicht zeigte der SDH Nachweis die retikuläre Milzstruktur hell- bis mittelblau gefärbt (Abb. 3.48). Die Enzymaktivität der DHODH erschien deutlich geringer zu sein wie jene der SDH (Abb. 3.48, 3.49). Im Gegensatz zu der H.E. Übersichtsfärbung konnten rote und weiße Pulpa nicht voneinander

differenziert werden. Das feine retikuläre Gewebe wurde während des Schneidevorgangs oft leicht zerstört. Vereinzelt fielen in der Übersicht gelbliche, wahrscheinlich unspezifische Präzipitate auf. In der 400er Vergrößerung sah man das leer wirkende retikuläre Bindegewebe der roten Pulpa. Zentralarterien in der weißen Pulpa konnten an ihrer runden Form mit wenig vereinzelten Formazankörnchen in der Media erkannt werden. Die Enzymaktivität in der weißen Pulpa zeigte sowohl im SDH- als auch im DHO Nachweis keine Unterschiede zu den übrigen Organstrukturen. Auffällig waren deutlich gefärbte Einzelzellen mit braunen Kernen. Eine Oxidasereaktion wurde nicht beobachtet.

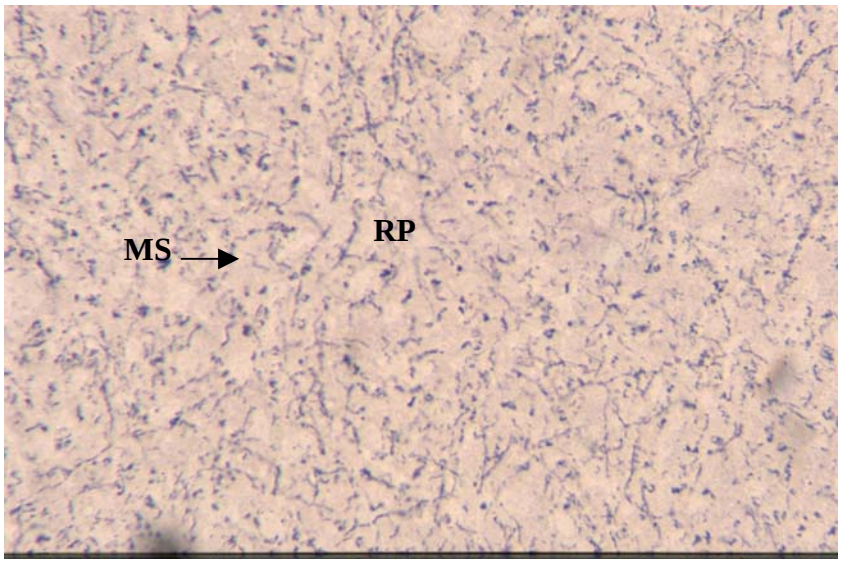


Abb. 3.48: Milz (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x 200

Mäßiger Enzymnachweis konnte in der roten Pulpa (RP) der Milz erbracht werden.
(MS= Milzsinus)

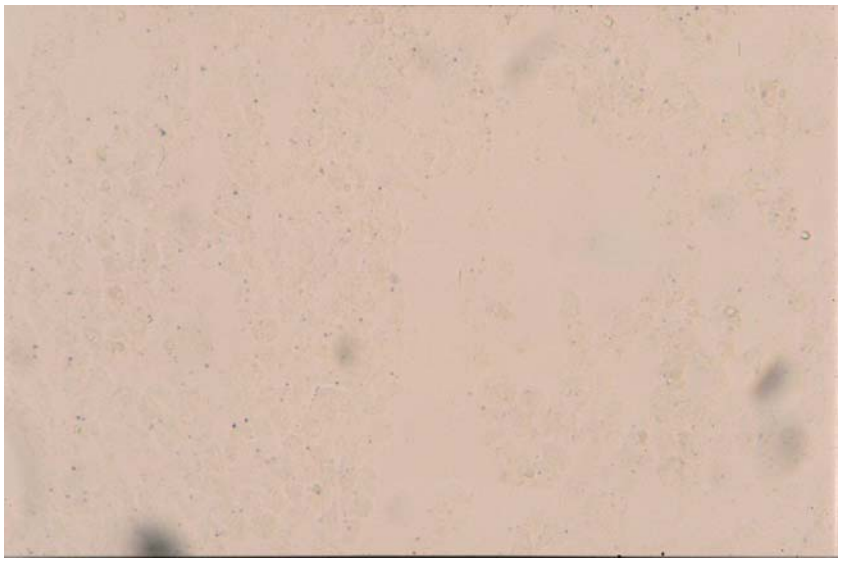


Abb. 3.49: Milz (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x100

Eine DHODH Reaktion mit dem NBT Test wurde nur andeutungsweise festgestellt.

Interpretation

Diskret vermehrte Aktivität konnte im NBT Nachweisverfahren um die Zentralarterie beobachtet werden. Cohen beschrieb in seiner Arbeit (1962) eine eindeutige Aktivität der DHODH in den Milzknötchen, besonders in der für immunologische Vorgänge wichtigen Marginalzone, die an die rote Pulpa angrenzt und für Interaktionen von Blutzellen, Antigenen und Antikörpern von Bedeutung ist (Burkitt et al., 1993). Diese Beobachtungen stimmen mit in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen nicht vollständig überein. Die Aktivität in den Milzknötchen war in wenigen Fällen vermehrt und vereinzelt kamen große und gefärbte Zellen in der Marginalzone zur Darstellung. Sie waren auch im Leerwertschnitt leicht gefärbt. Es kann sich dabei um Makrophagen handeln, die durch Phagozytose Stoffe aufgenommen haben und damit zu einer unspezifischen Farbreaktion führten. In der Mehrzahl der beobachteten Strukturen fanden sich keine Aktivitätsunterschiede, so dass man die weiße Pulpa lediglich an der Zentralarterie identifizieren konnte. Der von Cohen beschriebene negative Randsaum war in der vorliegenden Arbeit nicht darstellbar. In weiterführenden Untersuchungen hatte Cohen (1985) Kaninchen mit verschiedenen Antigenen geimpft (humanes Gamma-Globulin, humanes Serumalbumin), um zu prüfen, ob dadurch Veränderungen bezüglich der DHODH Aktivität innerhalb der weißen Pulpa auftreten. Er beobachtete schon in der Marginalzone von unbehandelten Kontrollschnitten der Milz eine deutliche Aneinanderreihung von Formazanpartikeln. Neben einer schmalen ungefärbten Schicht lag das aktivitätslose Keimzentrum. Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, wobei jedoch eine Unterscheidung von Randzone und Keimzentrum fast unmöglich war. Ursächlich kann hierfür der fehlende Antigenkontakt sein (Schiebler et al., 1986). Die mit Antigen in Kontakt gekommenen Tiere zeigten in der Milz ab dem 4. Tag nach Beginn der Immunisierung eine vermehrte DHODH Aktivität in allen Zellen des Follikelzentrums und ab dem 5. Tag in den dort vorkommenden Makrophagen intensive Färbungen, welche nach dem 8. Tag wieder rückläufig waren. Nach 14 Tage waren keine Unterschiede gegenüber den Kontrollen zu erkennen. Die Autoren begründen diese Beobachtungen mit der durch Antigen-Kontakt hervorgerufenen vermehrten Zellproliferation von Lymphozyten und Plasmazellen sowie damit verbundenen Antikörperbildung und Herstellung von Mediatorstoffen, die für die immunologischen Reaktionen von Bedeutung sind. Die in der vorliegenden Arbeit nicht zu unterscheidenen Keimzentren haben demnach keinen Antigen-Kontakt gehabt und müssen als Primärfollikel angesehen werden (Schiebler et al., 1986).

Weiterhin ist anzumerken, dass die Schnittdicke in den vorliegenden Untersuchungen deutlich geringer war (10 µM gegenüber 30 µM) und damit auch die Farbintensität geringer sein könnte. Histologische Kontrollen zeigten in den Untersuchungen ebenfalls, wenn auch deutlich heller, eine leichte Anfärbung, so dass zusätzlich von einer leichten unspezifischen Hintergrundreaktion auszugehen ist. Diese Backgroundfärbungen der roten Pulpa wurde auch von Cohen (1982) beschrieben. Er postulierte, sie sei durch phagozytiertes, antigenhaltiges Material in den Makrophagen hervorgerufen worden.

3.3.7 Histologische Darstellung der DHODH und SDH in der Haut

Histologischer Überblick

Die Epidermisoberfläche mit ihrem unverhornten Plattenepithel enthält außer Keratinozyten auch Pigmentzellen (Melanozyten), Tastzellen (Merkel Zellen) und Makrophagen (Langerhans Zellen). Von außen nach innen ist sie aufgebaut aus: Stratum corneum, Stratum lucidum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale. Es sind anschließend die Dermis mit ihrem Stratum papillare und reticulare zu mikroskopieren. Es folgt die Tela subcutanea und Fettgewebe.

Befunde

Zunächst wurde in der Cutis die dunkelblau gefärbte Epidermis sichtbar (Abb. 3.51). Im Stratum basale mit ihren kubischen bis hochprismatischen Zellen erschien eine größere Menge an Formazanpartikel. Nach apikal folgte das Stratum spinosum, die Stachelzellschicht, deren Zellgrenzen in Richtung Oberfläche immer undeutlicher wurden. In den kleinen Keratinozyten nahm die Enzymaktivität deutlich ab (Abb. 3.51). Im organellenarmen Stratum granulosum wurde die geringste Anfärbung sichtbar. Das Stratum lucidum konnte mikroskopisch nicht differenziert werden, während die Hornschicht sehr hell dargestellt erschien. In den apikalen Zellschichten waren die Formazankörnchen nicht mehr wie in den basalen Strukturen um den Zellkerne angeordnet, sondern aneinander gereiht und horizontal orientiert. Melanozyten und die ebenfalls in der Epidermis als Tastzellen vorkommenden Merkelzellen sowie die Langerhanszellen konnten mit den hier durchgeführten Methoden nicht identifiziert werden. In der Dermis sowie im Stratum papillare des coriums ergab sich nur ein geringer Enzymnachweis. In der Tela subcutanea sah man sehr helles Bindegewebe,

einzelne glatte Muskelfaserbündel sowie Haarwurzeln und mittelblau gefärbte Talgdrüsen. Ihre Basalzellen enthielten die höchste Enzymaktivität und erschienen folglich dunkler dargestellt. Einzelne, dem Drüsenlumen naheliegende Zellen, wirkten in ihren Strukturen aufgelockert, sie hatten durch Lipideinlagerung an Größe zugenommen. Enzymaktivität enthielt auch die Muskulatur, mit ihren randständigen, flachen Kernen (Abb. 3.50). Hier war ähnlich wie in der Epidermis ein großer Farbunterschied zwischen der dunkelblau gefärbten Muskulatur im SDH Test und der geringeren Anfärbung beim DHODH Nachweis zu erkennen. Haare waren im Dehydrogenase- und Oxidasetest braun gefärbt und kamen sowohl im histologischen Querschnitt als auch im Leerwertpräparat zur Darstellung (Abb. 3.50, 3.52). Im Längsschnitt dargestellte Haarpapillen besaßen große Zellen, die von mittelgrober Formazanstruktur umgeben waren. Sehr eindeutig sah man die seitlichen Epithelzellen der Papille, während der Cortex selbst intensiv rot-braun gefärbt blieb. Dieser Befund konnte auch in den Leerwertpräparaten beobachtet werden (Abb. 3.52). Umgeben ist der Cortex von einer harten Cuticula, die im NBT Test kaum sichtbar erschien. Es folgte die sehr hell darstellbare innere epitheliale Wurzelscheide, vorwiegend aus verhornten Zellen bestehend. Es schloss sich mittelblau gefärbt die äußere epitheliale Wurzelscheide an. Die folgende Bindegewebshülle war kaum erkennbar. Auch im DHODH Nachweis war die Enzymaktivität sehr hoch. Am intensivsten gefärbt war der Haarcortex, gefolgt von mittelstarker Aktivität in der Muskulatur des Musculus arrector pili und weniger intensiv die Haarpapillen. Weitere beobachtbare histologische Strukturen waren die mittelblau dargestellten Schweißdrüsen, deren Enzymaktivität mit jener der Muskulatur (M.arector pili) vergleichbar war.

Die Qualität der histologischen Präparate im Oxidasetest war gegenüber dem NBT Nachweisverfahren reduziert, mit einer sehr hellen, ockerfarbenen Epidermis und intensiv dargestelltem Stratum basale (Abb. 3.54). Gering gefärbt erschien die Hornschicht sowie die äußere, epitheliale Wurzelscheide, der Cortex und der M. arector pili. Bei den einzelnen, dunklen, Zellen handelte es sich um im Stratum basale befindliche Melanozyten. Im Vergleich zu den genannten Ergebnissen kamen mit Brequinar behandelte Präparate und Kontrollschnitte ungefärbt zur Darstellung (Abb. 3.52, 3.53). Die epitheliale Wurzelscheide und der Cortex waren heller, Makrophagen jedoch deutlich positiv gefärbt. Ebenfalls ließen sich vereinzelt dunkelbraune Zellen, wahrscheinlich Plasmazellen und Makrophagen, erkennen. Im substratlosen

Kontrollschnitt zeigten sich ebenfalls Braunfärbungen, so dass diese Reaktionen mit einer hohe Hintergrundfärbung behaftet ist.

Interpretation

Die hohe Enzymaktivität des Epithels steht im Zusammenhang mit aktiver Zellproliferation und der daher notwendigen Pyrimidinbiosynthese, denn das mehrschichtig verhornte Plattenepithel erneuert sich von dieser Schicht ausgehend innerhalb von drei Wochen (Abb. 3.51). Im Stratum basale liegen die mitochondrienreichen Melanozyten (Burkitt et al., 1993). Sie nehmen bei Einwirkung von UV-Licht aus ihrer Umgebung L-Tyrosin auf und bilden Melanin mit Hilfe des Enyms Tyrosinase.

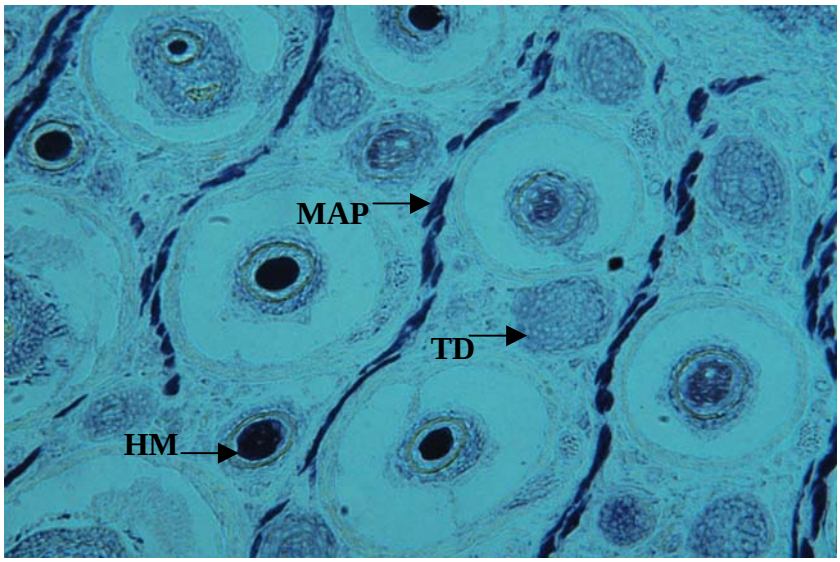


Abb. 3.50: Haut (Ratte), SDH Nachweis mit NBT,Vergr. x 200

Intensiv gefärbt waren Musculus arrector pili (MAP), Haarmark (HM) und die Talgdrüsen (TD)

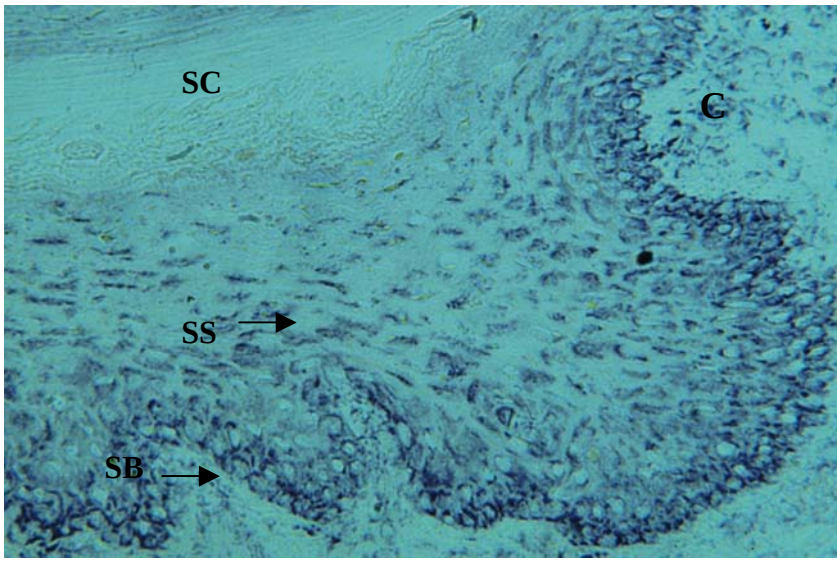


Abb. 3.51: Haut (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x 200

Sehr deutlich war der Enzymnachweis im Stratum basale (SB) der Epithelschicht und im Stratum spinosum (SS). Das Stratum corneum war aktivitätslos. (C= Corium)

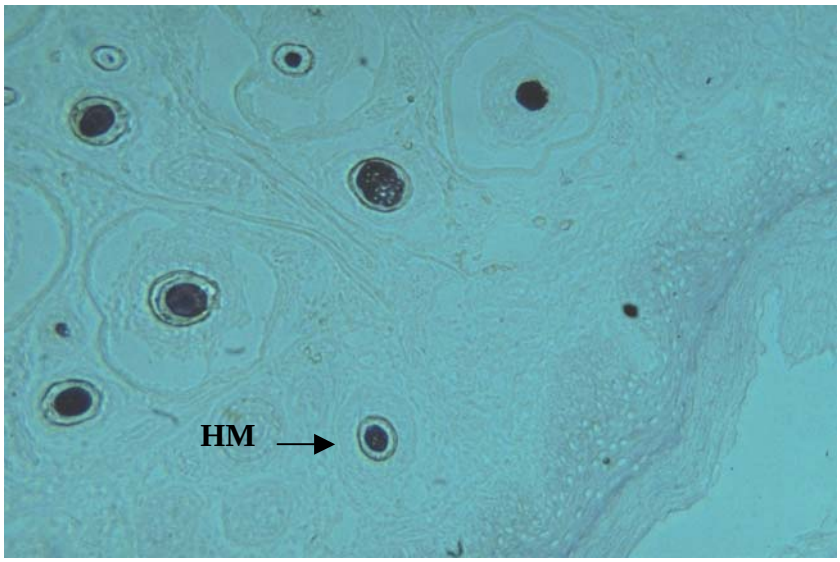


Abb. 3.52: Haut (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Leerwert, Vergr. x200

Unspezifische Anfärbungen wurden im Haarmark (HM) der Kontrolle beobachtet.

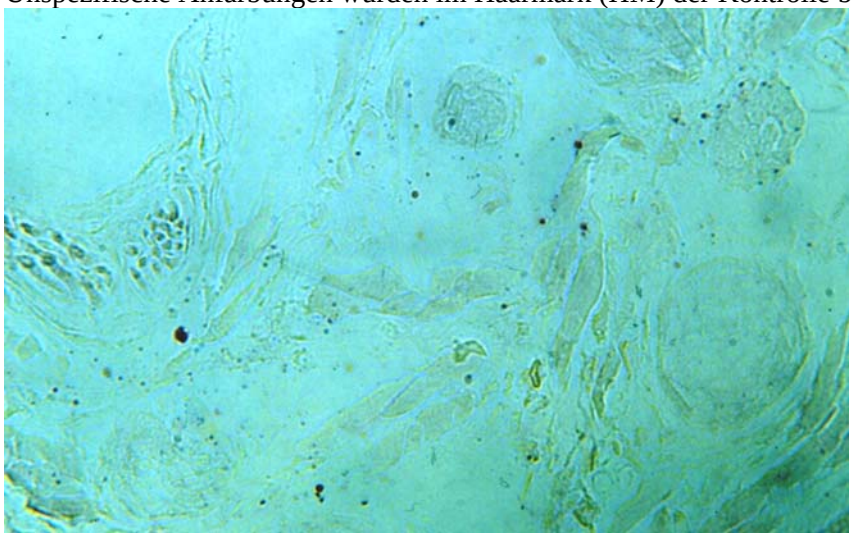


Abb. 3.53: Haut (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Inkubation mit Brequinar Vergr.x 200.

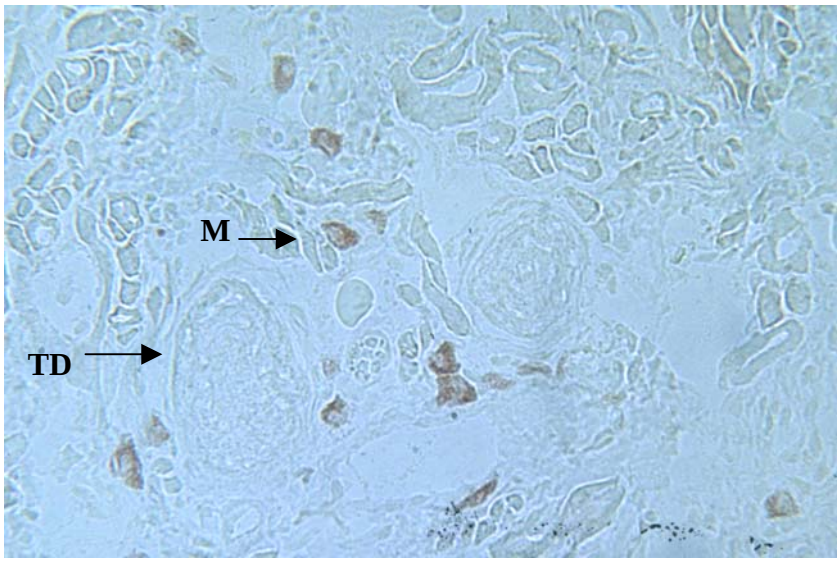


Abb. 3.54: Haut (Ratte), Oxidase Nachweis der DHODH, Vergr. x100

Negativer Oxidasenachweis, einzel gefärbte Makrophagen (TD =Talgdrüse)

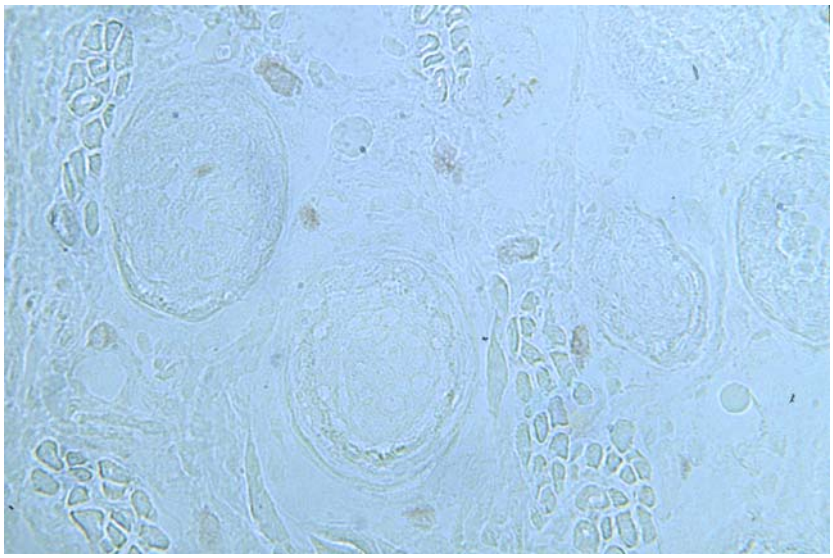


Abb. 3.55: Haut (Ratte), Oxidaseleerwert, Vergr. x200,

Melanin wandert in die Zellfortsätze und wird an Keratinozyten in der Nachbarschaft abgegeben. So wird die Haut vor den schädlichen Wirkungen des UV-Lichts geschützt. Melanozyten konnten im vorliegenden Hautpräparat nicht nachgewiesen werden. Im Stratum spinosum findet ebenfalls RNA- und DNA Synthese statt, so dass DHODH und SDH deutlich hohe Aktivitäten zeigten, wenn auch etwas geringer als im Basalzell-bereich. Im Stratum granulosum war weniger Formazanniederschlag zu beobachten, da diese Schicht das Keratohyalin, ein histidinreiches Protein in die Zellen einlagert und bekannterweise organellenarm ist (Burkitt et al., 1993). Geringe Anfärbungen des Stratum corneums stehen im Zusammenhang mit im Absterben begriffenen Zellen und damit verminderter Stoffwechselaktivität. Das Stratum germinativum zeichnet sich durch eine hohe Anzahl an Ribosomen und Polysomen aus, welche für eine intensive Proteinsynthese notwendig sind und folglich auch zu einem hohen RNA-Turnover beitragen (Löffler et al., 1996). Sowohl im Stratum papillare als auch im reticulare waren ebenfalls lediglich sehr geringe Enzymaktivitäten nachzuweisen. Sie enthalten zur Immunabwehr reichlich Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen sowie Fibroblasten, die Elastin und Grundsubstanz bilden (Burkitt et al., 1993). Eine eindeutige Anfärbung zeigten insbesondere die Talgdrüsen in der Tela subcutanea. Von ihren Basalzellen proliferiert das flache Epithel der holokrinen Drüsen, deren Zellen nach Abgabe des Sekrets an der Oberfläche zugrunde gehen. Dort findet folglich intensive Protein- und RNA- Synthese statt, die dem Nachweis hoher Enzymaktiviät erklärt. Zellen der Talgdrüsen lagern während ihrer Entwicklung Triglyzeride, Cholesterin und freie Fettsäuren ein, die bei der Inkubation herausgelöst wurden. Auch

die Muskelfasern des M. arrector pili, die ein Aufrichten der Haare ermöglichen, zeigten eine hohe Enzymaktivität der SDH und der DHODH (Abb.3.50, 3.51). Für ihre Kontraktion wird Energie in Form von ATP benötigt, die von den Mitochondrien geliefert werden muss. Die Haare waren intensiv blau gefärbt. Ihr Wachstum geht von den hier positiv reagierenden Papillen aus. Dort finden sich zahlreiche Mitosen zur Neubildung der Epithelzellen, die infolge von Keratineinlagerung dem Cortex eine intensiv rot-braune Färbung verleihen. Dies war ebenfalls in den Leerwertschnitte zu beobachen (Abb. 3.52). Cohen beschrieb in seiner Veröffentlichung (1962) ähnliche Befunde. Er vermutete eine Reduktion des Tetrazoliumsalzes durch Sulfhydrylgruppen im Keratin der Haare. Im Gegensatz zu seinen negativen Ergebnissen bezüglich des DHODH Nachweises in der Haut stehen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen positiven Befunde. Es konnten wiederholt eindeutige Färbungen in unterschiedlichen Arealen der Haut nachgewiesen werden, welche mit Hilfe der substratlosen Kontrollschnitte und dem Einsatz von Brequinar bestätigten werden konnten. Der Inhibitor erwies sich als gutes Hilfsmittel um spezifische von unspezifischen Reaktionen zu differenzieren. Oxidaseakivität ließ sich nur in geringem Umfang beobachten. Infolge der langen Inkubationszeiten bei 37 °C waren die Schnitte stark beansprucht worden und zum Teil zerstört. In der sehr hellen mikroskopischen Übersicht zeigte lediglich das Stratum basale eine leichte Anfärbung. Bei Färbungen im Bereich des Cortex kann es sich ebenfalls um unspezifische Enzymreaktion handeln, möglicherweise hervorgerufen durch Reduktion von Ceriumsalz durch Sulfydryl-gruppen der Haare. Bei den prominent in Erscheinung tretenden dunkelbraun gefärbten Einzelzellen muss es sich um Plasmazellen oder Fibrozyten handeln, also ebenfalls um unspezifische Mitreaktionen.

3.3.8 Histologische Darstellung der DHODH und SDH im Nervengewebe

Darstellung der DHODH und SDH im Kleinhirn (Cerebellum)

Histologischer Überblick

Das Kleinhirn als Koordinationszentrum kontrolliert den Muskeltonus, steuert damit das Gleichgewicht und fördert die „zielgerechten Ausführung aller motorischer Aktivitäten“ (Duus, 1987). Es ist von innen nach außen aufgebaut aus: grauer Kleinhirnrinde mit grauer Körnerschicht (Statum granulosum), Purkinjezellen (Stratum ganglionare), Molekularschicht und Kleinhirnmark mit den Kernen Nuclei fastigii,

eboliformes, globosus und dentatus. Von diesen Kernen ausgehend werden die Signale des Cerebellums in verschiedene Anteile des Gehirns weitergeleitet.

Befunde

Im NBT Test stellte sich die hellblau gefärbte Pia mater dar. Es ist die Bindegewebshülle mit ihren zahlreichen Blutgefäßen. Die graue Rinde war im Gegensatz zum weißen Kleinhirnmark makroskopisch intensiv blau gefärbt. Im SDH Nachweis wurde als mittelblau gefärbte Struktur die Molekularschicht sichtbar (Abb. 5.57). Dort vorkommende Stern- und Korbzellen konnten jedoch nicht identifiziert werden. Daneben erschien die zellreiche Körnerschicht in kräfig blauer Darstellung. Im Stratum ganglionare befinden sich die großen Purkinjezellen, die jedoch in ihrer Anfärbung deutlich heller waren als z.B. die Körnerzellen. Es zeigte sich eine zum Teil grobkörnige Darstellung mit „netzartiger“ Formation. Dabei handelte es sich um den Zellkern. Eine hellblaue Struktur mit feinverteilter Granulation war im Stratum moleculare mikroskopierbar. Höchstwahrscheinlich handelte es sich dabei um die Nervenzellkörper. Im Kleinhirnmark (Corpus medullare) befinden sich keine Nervenzellkörper, sondern Gliazellen und Nervenfasern. Im NBT Test konnte für für SDH und DHODH lediglich eine mäßige Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.56, 3.57). Das mikroskopische Bild der DHODH zeigte im Gegensatz zur SDH nur eine sehr geringe Enzymaktivität, die nicht eindeutig vom mitgeführten Leerwert unterschieden werden konnte. Eine Oxidaseaktivität wurde nicht festgestellt, denn das vorliegende Präparat war nicht von den substratlosen Schnitten zu unterscheiden.

Interpretation

Die empfindliche Gewebestruktur war in manchen Abschnitten leicht zerstört. Die sich in drei Schichten gliedernde Kleinhirnrinde zeigte die höchste Enzymaktivität in der innen liegenden, zellreichen Körnerschicht (Abb. 3.56, 3.57). Hier finden sich zahlreiche unter anderem kleine Körnerzellen, an der alle afferenten Signale der Kleinhirnrinde enden. Daneben enthält sie auch große Körnerzellen, Nervenfasern und Gliazellen (Schiebler et al., 1986). Die einzelnen Zelltypen konnten mit den hier angewandten Färbemethoden jedoch nicht unterschieden werden. Insbesondere die äußere Molekularschicht erschien häufig abgelöst als Folge der Inkubationsbedingungen. Diese Schicht ist bekannterweise relativ zellarm und enthält vorwiegend Korbzellen und Sternzellen. Sie besitzen lange bis in die äußere Molekularschicht hineinreichende und verzweigte Dentriten, die bei der Anwendung

von Silbersalzen sichtbar werden (Ross und Reith, 1987). Die insgesamt nur geringe Enzymaktivität in dem hier untersuchten Nervengewebe ist sicherlich auf die dort nur geringen Stoffwechselprozesse, also auch der geringen *de novo* Pyrimidinbiosynthese zurückzuführen. Mehrere Versuche, eine Oxidaseaktivität nachzuweisen, gelangen nicht. Cohen hatte in seiner 1962 veröffentlichten Arbeit keine Versuche unternommen, die DHODH im Nervengewebe nachzuweisen. Hier wird vermutlich vermehrt *salvage pathway* durchgeführt.

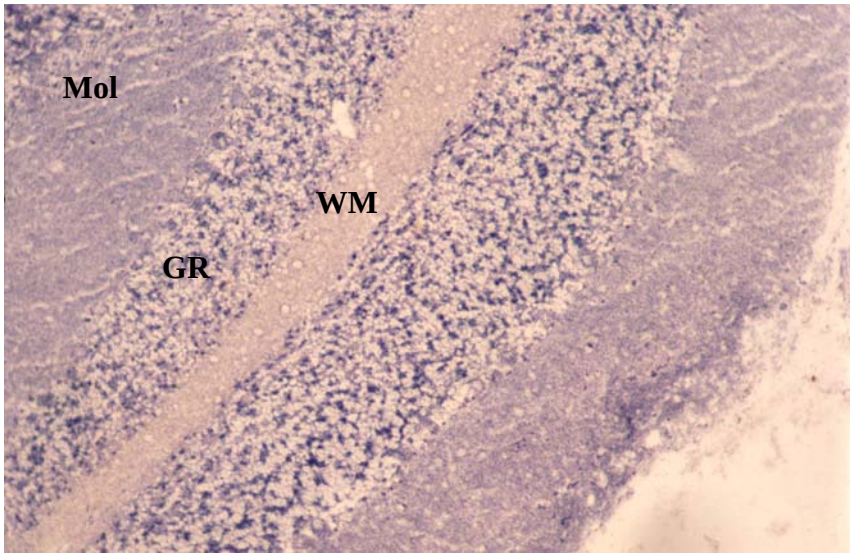


Abb. 3.56: Kleinhirn (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x100

Intensiv gefärbt erschien im NBT Test die äußere Molekularschicht (MOL) und die zellreiche Körnerschicht (GR). Das Mark (WM) dagegen blieb recht hell dargestellt.

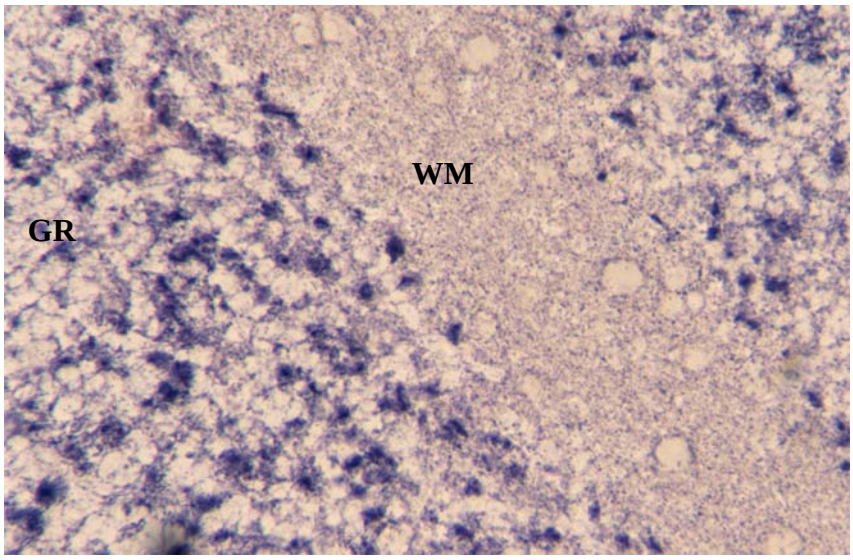


Abb. 3.57: Kleinhirn (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x200

Intensive Enzymaktivität ergab die innere Körnerschicht (GR), deutlich geringer erschien das weiße Mark (WM).

Histologische Darstellung der DHODH und SDH im Großhirn

Histologischer Überblick

Das Großhirn ist aus grauer Rinde und weißem Mark aufgebaut. Es hat die Aufgabe der Informationsverarbeitung und muss integrative Leistungen auf höchster Ebene erbringen. Der komplexe Isocortex besteht aus den folgenden Schichten: Molekularschicht (Stratum moleculare), äußere Körnerschicht (Stratum granulare externum), äußere Pyramidenschicht (Stratum pyramidale externum), innere Körnerschicht (Stratum granulare internum), innere Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale internum), Multiforme Schicht (Stratum multiforme).

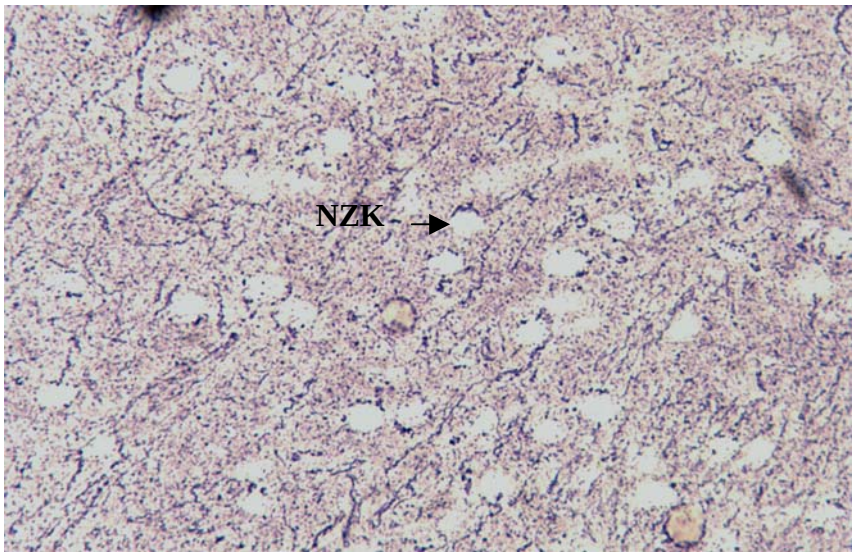


Abb. 3.58 Großhirn (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x200

Die Nervenzellkörper (NZK) erschienen im Dehydrogenasenachweis hell ausgespart, die Emzyaktivität der DHODH war deutlich geringer, als die der SDH.

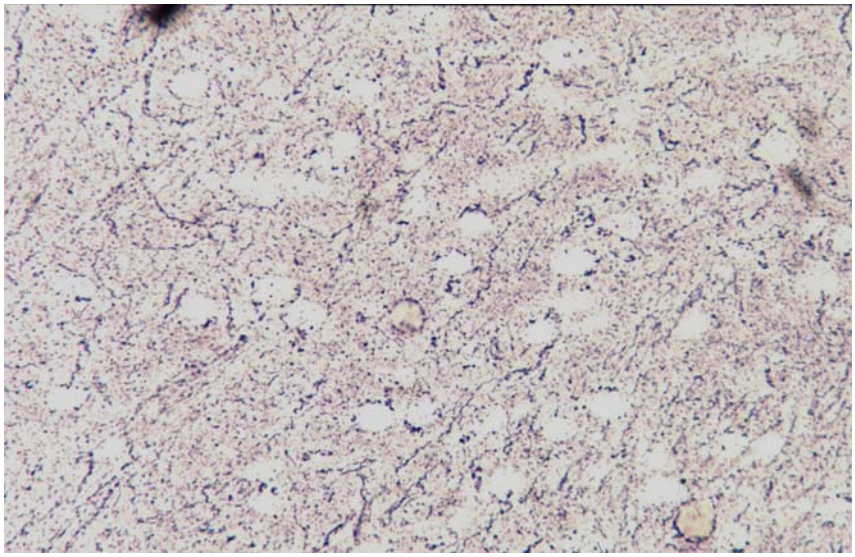


Abb. 3.59: Großhirn (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x200

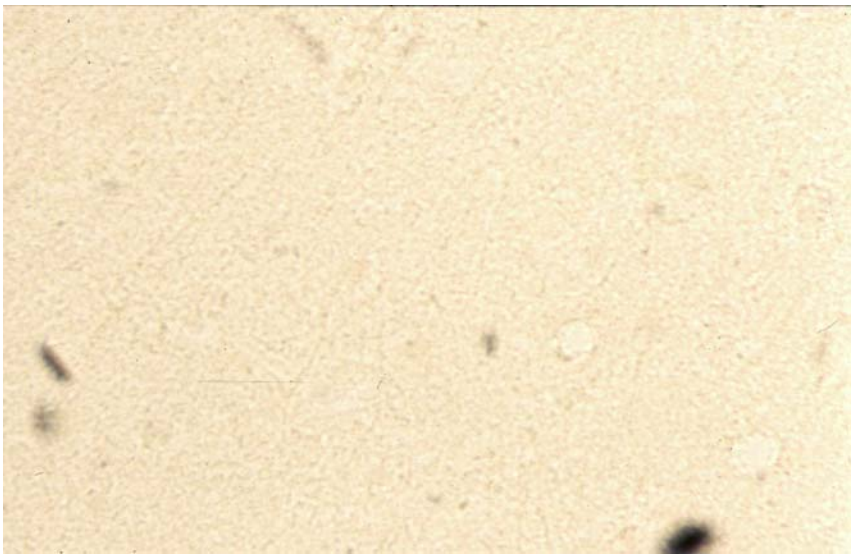


Abb. 3. 60: Großhirn (Ratte), negativer Oxidase Nachweis der DHODH, Vergr. x100

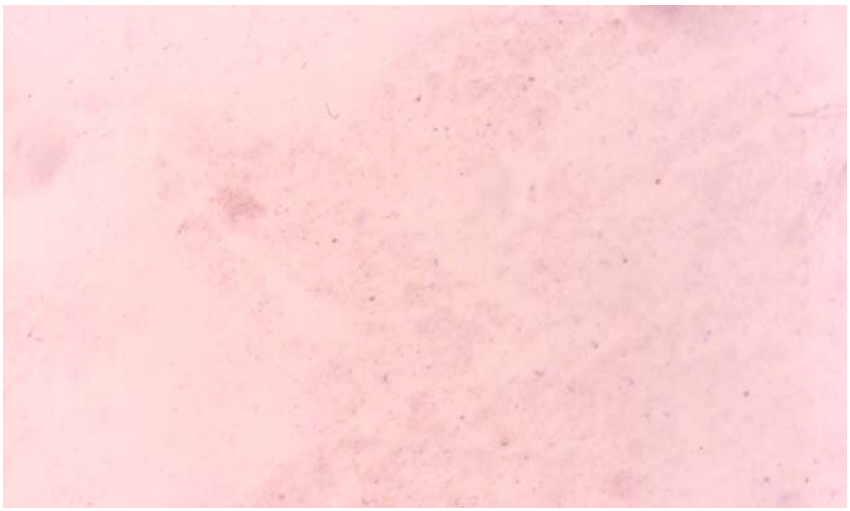


Abb. 3.61: Großhirn (Ratte), Oxidase Nachweis, Leerwert

Befunde

Nach einstündiger Inkubation konnte im NBT Test die SDH homogen hellblau gefärbt im Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 3.58, 3.59). Erst in der Vergrößerung wurden sehr geringe Unterschiede und eine Einteilung in verschiedene Schichten möglich. Der Formazanniederschlag war feinkörnig. Bei der etwas dunkler gefärbten, kernreichen Zone, musste es sich um das Großhirnmark handeln. Die hohe Enzymaktivität hatte dort zu einem gröberen Formazanniederschlag geführt. Die multiforme Schicht, die direkt an das Mark angrenzt, war hell dargestellt mit feinverteiltem blauem Niederschlag. Hier zeigte sich wie in allen übrigen Zonen, aber in deutlich geringerer Menge, porenartige Strukturen mit einem aktivitätsfreien Zentrum. Dabei muss es sich um Nervenzellkörper

handeln, die ringförmig um den Kern angeordnete Farbkörnchen enthielten. Weiterhin fiel oftmals die Aneinanderreihung von Farbpartikeln auf, die ein „fadenförmiges“ Bild entstehen ließen. Die innere Pyramidenschicht war mit einer deutlich vermehrten Enzymaktivität ausgestattet. Die innere Körnerschicht und äußere Pyramidenschicht konnten nicht voneinander abgegrenzt werden. Die äußere Molekularschicht dagegen beinhaltete eine sehr geringe Aktivität von SDH und DHODH. Im Vergleich der beiden Enzymaktivitäten war jene der DHODH im Gebensatz zur SDH deutlich vermindert (Abb. 3.59). Auch eine Oxidaseaktivität ließ sich nicht nachweisen (Abb. 3.60).

Interpretation

Für beide Enzyme war im NBT Test im Vergleich zu anderen Organen nur ein geringer Nachweis an Aktivität gelungen. Eine Unterteilung der einzelnen Großhirnschichten war nur begrenzt möglich. Etwas vermehrt war die Färbung im zellreichen Mark beobachtbar. Außer der inneren Pyramidenschicht, wo sich ebenfalls erhöhte Enzymmengen nachweisen ließen, war die Aktivität in allen anderen Zonen ungefähr gleich hoch. Die Nervenzellkerne wirkten optisch leer, mit um den Kern angeordneten, blauen Farbpigmenten. Erklären lassen sich diese Befunde mit dem Vorkommen von kleinen Mitochondrien, die im Perikaryon gleichmäßig verteilt vorzufinden sind, aber auch in Aufteilungen am Axonenden, der Leitungsbahn für afferente Signale. In den Perikarya findet Proteinsynthese statt (Schiebler et al.,1986), deren Produkte in den Axonen in Richtung Peripherie transportiert werden.

3.3.9 Histologische Darstellung der DHODH und SDH in der Nebenniere

Histologischer Überblick

Unter der Bindegewebskapsel liegt die Rinde mit der Zona glomerulosa, von Fasern und Kapillaren umgeben, die strangförmige Zona fasciculata und anschließend die Zona reticularis. Das Nebennierenmark enthält netzförmig angeordnete Zellverbände sowie reichlich Kapillaren und Venolen. In der Nebennierenrinde werden Mineralkortikoide, Glucokortikoide sowie geringe Mengen an Geschlechtshormonen synthetisiert. Adrenalin und Noradrenalin dagegen werden im Nebennierenmark hergestellt.

Befunde

Der NBT Test ließ für die SDH und DHODH lediglich eine geringe Anfärbung erkennen (Abb. 3.62). Die Formazankörnchen erschienen feinkörnig und regelmäßig über den gesamten Schnitt verteilt, mit einer leicht vermehrten Konzentration in der Zona reticularis. Sie liegt dem Nebennierenmark direkt an, das sich selbst negativ darstellte. Eine eindeutige Schichtengliederung, wie sie im H.E. Präparat möglich wurde, war im NBT Nachweisverfahren nicht gegeben. Auch sind keine großen Aktivitätsunterschiede zwischen der DHODH und SDH zu beobachten gewesen. Im Oxidasenachweis zeigte dagegen die mikroskopische Übersicht zunächst eine kräfige, gleichmäßig verteilte, ockerbraune Färbung (Abb. 3.63). Der Bildausschnitt war jedoch sehr klein, so dass nicht alle Anteile der Nebenniere dargestellt worden sind. In der hellen Organkapsel waren zum Teil die dort befindlichen Arterien zu sehen mit einigen ebenfalls hellocker gefärbten roten Blutkörperchen. Unter der Organkapsel befand sich die höchste Oxidaseaktivität in der Zona glomerulosa, mit in Gruppen liegenden Zellen. Ihre großen dunkelbraun gefärbten Kerne waren, im Gegensatz zum spärlich ausgebildeten Zytoplasma, deutlich gegeneinander abzugrenzen. Bei Betrachtung in der 400er Vergrößerung ließ sich eine unterschiedliche Enzymaktivität sowohl in den Zellkernen selbst, als auch in den „Zellnestern“ beobachten (Abb. 3.63). Der Übergang in die zweite Rindenzone war weniger deutlich, die Oxidaseaktivität geringer. Auch in der Zona reticularis konnte eine deutlich geringere Enzymaktiviät nachgwiesen werden.

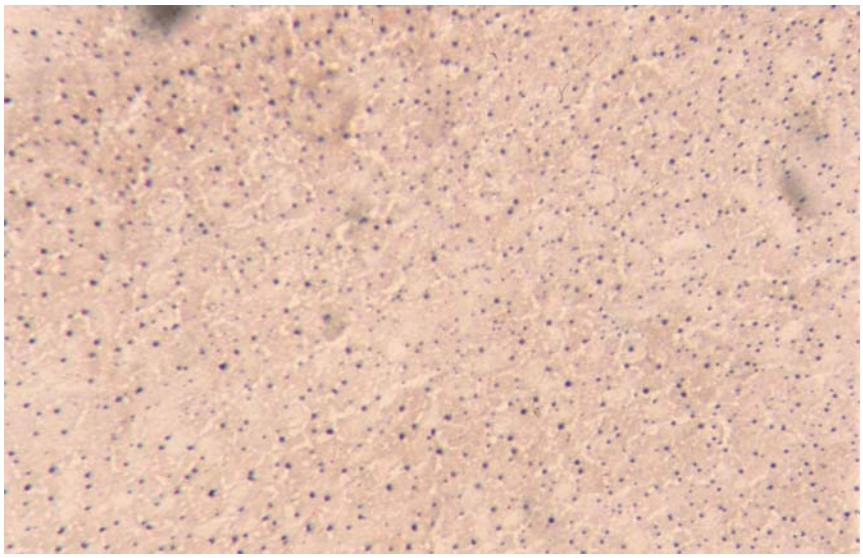


Abb. 3.62: Nebenniere (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x100

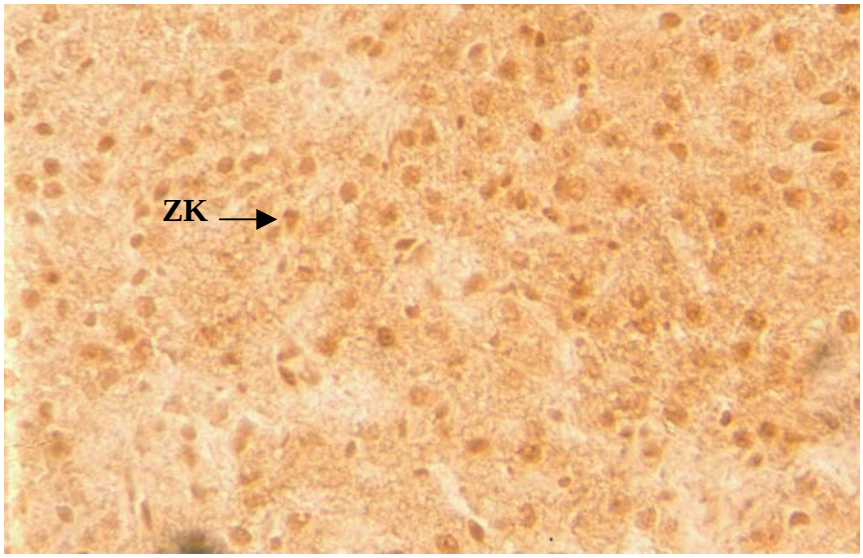


Abb. 3.63: Nebenniere (Ratte), Oxidase Nachweis, Vergr. 200

Im positiven Nachweis waren insbesondere die Zellkerne (ZK) deutlich gefärbt.

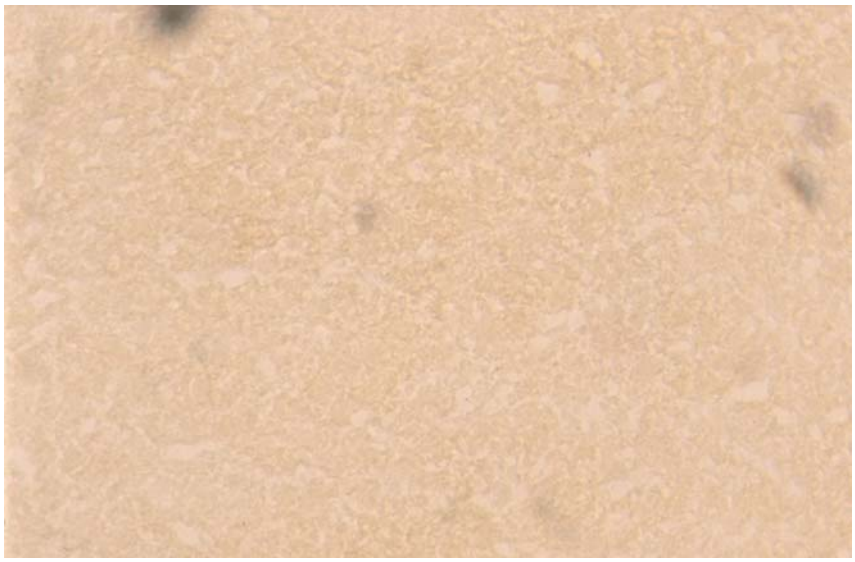


Abb. 3.64: Nebenniere (Ratte), Oxidase Nachweis, Leerwert, Vergr. 200

Interpretation

Geringe Enzymaktivitäten in der Zona reticularis wurden auch von Cohen (1962) beschrieben. Diese Befunde sind identisch mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Beobachtungen. Überraschenderweise war in den ersten beiden, von der Kapsel ausgehenden Zellschichten, keine nennenswerte Enzymaktiviät nachzuweisen, wird doch in der Zona glomerulosa mit ihren tubulären oder ovalen, mitochondrien-reichen Zellen das Mineralkortikoid Aldosteron produziert (Burkitt et al., 1993, Schiebler et al., 1986). Es ist wichtig für die Natrium Retention sowie die Abgabe von Kalium, Ammoniumionen und Wasserstoffionen der Zelle (Herold, 1997) und dient

damit der Aufrechterhaltung von Wasser- und Elektrolythaushalt. Desweiteren wird Desoxycortison produziert. In der mittleren Zona fasciculata befinden sich ebenfalls zahlreiche tubuläre Mitochondrien. Hier wird Cortison und Cortisol synthetisiert, essentielle Regulatoren des Fettstoff- Protein- und Kohlenhydratstoffwechsels. So könnte man für diese histologische Schichten eigentlich eine größere Aktivität erwarten. Daneben entstehen, wie in der Zona reticularis, geringe Mengen an Geschlechtshormonen. Leichte Anfärbungen dort haben ihre Ursache in dem Vorhandensein von zahlreichen, tubulären Mitochondrien.

Im Oxidasetest zeigte sich eindeutig die höchste Enzymaktivität in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde mit ihren tubulären Mitochondrien (Abb. 3.63). In der geringer gefärbten Zona fasciculata befinden sich ebenfalls tubuläre Mitochodrien. Hier findet vorwiegend mit Hilfe von in der Hypophyse freigesetzten, direkt auf die Nebennierenriende wirkenden ACTH die Biosynthese von Corticosteroiden statt. Geringe Mengen Androgene und Östrogene werden ebenfalls gebildet. Die Zellen der Retikularisschicht erschienen deutlich kleiner, besitzen langgestrechte Mitochondrien. Sie war nur spärlich ausgebildet, was am Entwicklungsstadium der Tiere liegen kann. So macht während der Geschlechtsreife diese Schicht nur 7% aus, während der Anteil der Fasciculata bei 50% liegt.

3.3.10 Histologische Darstellung der DHODH und SDH in der Luftröhre

Histologischer Überblick

Die Luftröhre ist aufgebaut aus Tunica mucosa respiratoria (respiratorisches Epithel und Lamina propria mit seromucösen Drüsen, elastischen Fasern und Lymphfollikel, Tunica fibromusculocartilaginea (Knorpelring, straffes Bindegewebe, Lymphfollikel, elastische Fasern, und seromucöse Drüsen) und der Tunica adventitia.

Befunde

Schon in der Übersicht hoben sich sowohl das mehrreihige Flimmerepithel als auch die Muskelfaserbündel mit dem Tetrazoliumnachweisverfahren deutlich von den übrigen Schichten ab (Abb. 3.67). Dabei fiel die SDH Akitivät sehr viel kräftiger aus. Bei eingehender Betrachtung des Epithels waren deutlich die Zellkernaussparungen sichtbar. Eine große Formazanmenge und Blaufärbung war im apikalem Bereich (in den Flimmerhaaren) zu verzeichnen (Abb. 3.65, 3.67). Im Epithel lokalisierte Basal- und

Flimmerepithelien konnten kaum voneinander unterschieden werden. Lediglich die Becherzellen mit ihrem aufgetriebenen hellen Zellleib konnten eindeutig identifiziert werden. Die sich anschließende zellarme Mucosa war deutlich geringer gefärbt. Weniger Enzymaktivität wurde ebenfalls in der Submucosa beobachtet. Sie enthielt zahlreiche enzymaktive und dunkelblau gefärbte, seromucöse Drüsenausführungsgänge. Es folgte die gering aktive Knorpelschicht mit einer minimalen Blaufärbung (Abb. 3.66). Das den Knorpel umgebende Perichondrium (Knorpelhaut) stellte sich hell dar. Bei den in der 400er Vergrößerung erscheinenden großen, gelblich-ockerfarbenen Zellen mit geringer Farbgranulation handelte es sich wahrscheinlich um Chondrozyten. Diejenigen in nächster Nähe zum Perichondrium waren recht klein, schmal und mittelblau gefärbt sowie von länglicher Form. In der 400er Vergrößerung konnte eindeutig die positive Reaktion bzw. der Enzymnachweis innerhalb der einzelnen Chondrozyten erbracht werden. Knorpelhof und Kapsel unterschieden sich jedoch nicht von den Knorpelzellen. Als letzte Zone wurden Bündel glatter Muskelzellen intensiv blau mikroskopiert, d.h. es konnte ein hoher Enzymaktivitätsnachweis erbracht werden. Die Muskulatur grenzt direkt an das Perichondrium an und war im vorliegenden Fall mit einer deutliche nachweisbaren Enzymaktivität ausgestattet. Es erschienen in den Faserbündeln Areale mit starker Färbung und Gebiete mit schwacher Aktivität, so dass ein schachbrettartiges Muster entstanden ist.

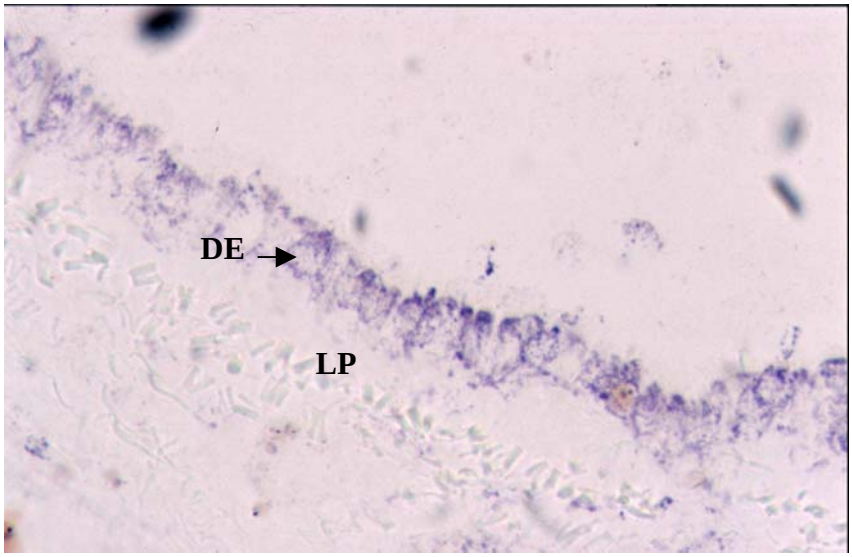


Abb. 3.65: Trachealepithel, DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x 200

Eine positive Enzymreaktion konnte im Drüsenepithel (DE) nachgewiesen werden, während die Lamina propria (LP) ungefärbt blieb.

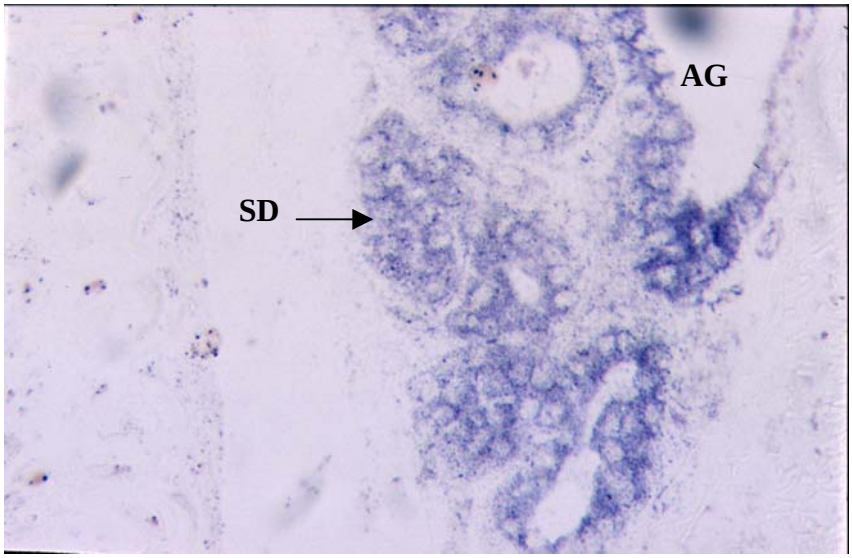


Abb. 3.66 : Trachealdrüsen, DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x200

Eine positive Enzymreaktion konnte in den seromucösen Drüsen (SD) und dem Ausführungsgangssystem (AG) nachgewiesen werden.

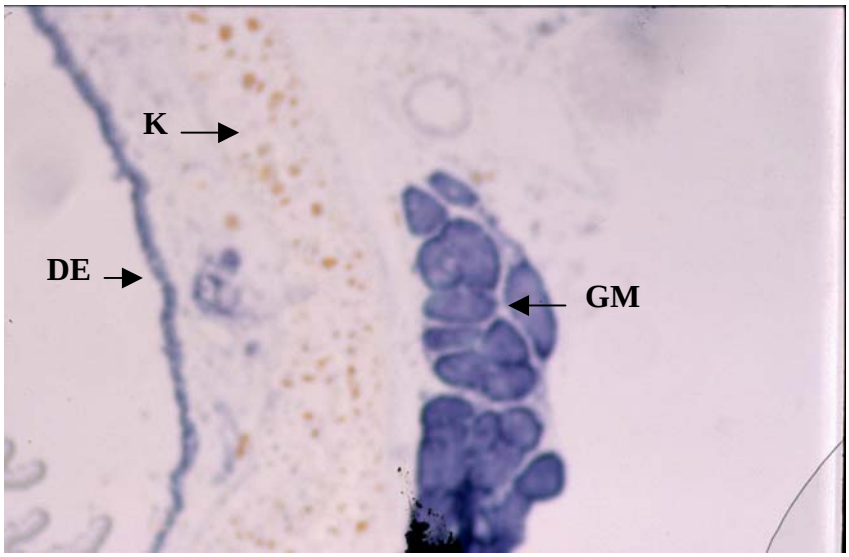


Abb. 3.67: Luftröhre (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x200

Intensive Anfärbungen zeigten das Drüsenepithel (DE) und die glatte Muskulatur (GM) im Tetrazoliumnachweisverfahren. Der Trachealknorpel (K) stellte sich sehr hell dar.

Interpretation

In diesem Organ konnte für die SDH eine sehr hohe und für die DHODH im NBT Test eine etwas geringere Enzymaktiviät nachgewiesen werden. Höchste Anfärbungen im apikalen Zellbereich des Flimmerepithels stehen in Zusammenhang mit kinozilien-tragenden Epithelzellen. Sie besitzen reichlich für die Energiegewinnung notwendige Mitochondrien (Schiebler et al., 1986). Dies ist insbesondere für die Bewegung der Zilien von Bedeutung, um z.B. Sekret und Fremdkörper in Richtung Pharynx zu

befördern. Auch protektiv wirkende schleimbildenden Becherzellen stellten sich enzympositiv dar. Im caudalen Anteil des Epithels befinden sich mitosefähige Basalzellen, die Proteinbiosynthese betreiben und damit zu einem hohen RNA-turnover beitragen. Darüberhinaus ist der Bedarf an UTP hier besonders hoch, weil u. a. für die Synthese von Oligosacchariden und Glucoproteinen UTP- aktivierte Zucker und Proteoglykane große Mengen an UDP-Glucose und UDP-Galaktose benötigen. Enzymaktivität konnte in der glatten Muskulatur nachgewiesen werden. Ihre Kontraktionen, die eine hohe Anzahl an energiebereitstellenden Mitochondrien benötigen, führen zur Annäherung der Knorpelringe zueinander. Sie unterstützten damit den Hustenreflex. Eine mäßige Enzymaktivtät der DHODH ließ sich auch in den gemischten sero-mucösen Drüsen der Lamina propria nachweisen. Sie bilden sowohl ein dünnes Protein- als auch Enymhaltiges Sekret. Interessant war die Betrachtung des hyalinen Knorpels in der Trachea. Er enthält Chondrozyten, die extrazelluläre Matrix produzieren, d.h. zum Beispiel auch sulfatierte Glykosaminoglykane und Grundsubstanz. Damit betreiben sie aktiv Protein- und Proteoglykansynthese und stellen sich ebenfall gering enzympositiv dar. In den Chondrozyten können Lipidtropfen vorkommen, die größer sind als der Zellkern selbst. Möglicherweise handelte es sich bei hier beobachteten gelblichen Zelleinschlüssen um solche Tropfen oder um Glykogen.

3.3.11 Histologische Darstellung der DHODH und SDH in der laktierenden Brustdrüse

Histologischer Überblick

Die Brustdrüse ist aus 15 bis 20 tubulo-alveolären Drüsen aufgebaut. Sie ist in Lobi aufgeteilt und wird durch Bindegewebszüge in weitere Lobuli unterteilt. Ductuli lactiferi sind die kleinsten Milchgänge, die in Ausführungsgänge münden. Sie bilden den Sinus lactiferi, der an der Spitze der Papilla mammae endet. Zwischen den einzelnen Drüsen und Läppchen befindet sich Binde- und Fettgewebe.

Befunde

Das zum Vergleich und Identifizierung mit H.E. behandelte Präparat war relativ hell in seiner Anfärbung. Bei der hier untersuchten Brustdrüse handelte es sich um eine laktierende Mamma mit unterschiedlich weiten Drüsenendstücken, wobei einige ein eosinophiles Material enthielten mit zum Teil sichtbaren Vakuolen. Nach einstündiger Inkubationszeit waren im Dehydrogenasenachweis die Drüsenläppchen der SDH

intensiv dunkelblau gefärbt (Abb. 3.68) während DHODH Aktivität (Abb. 3.69) lediglich schwach zur Darstellung kam. Zellgrenzen waren zum Teil aufgelöst und die Zellkerne hell ausgespart. Intensiv gefärbte Gangabschnitte zeigten in der 400er Vergrößerung, dass insbesondere im basalen Zellbereich und apikal des Kerns die höchste Formazanansammlung vorkam. Beim Einsatz von Brequinar kam es zu einer spezifischen Hemmung der DHODH. Im Oxidasetest konnte ebenfalls lediglich eine schwache Reaktion hervorgerufen werden. Insbesondere die Drüsenläppchen zeigten hier eine ockerfarbene Anfärbung, deutlich ausgeprägt in den Gangabschnitten. Wie in den übrigen Organen kamen die Zellkerne dunkelbraun zur Darstellung.

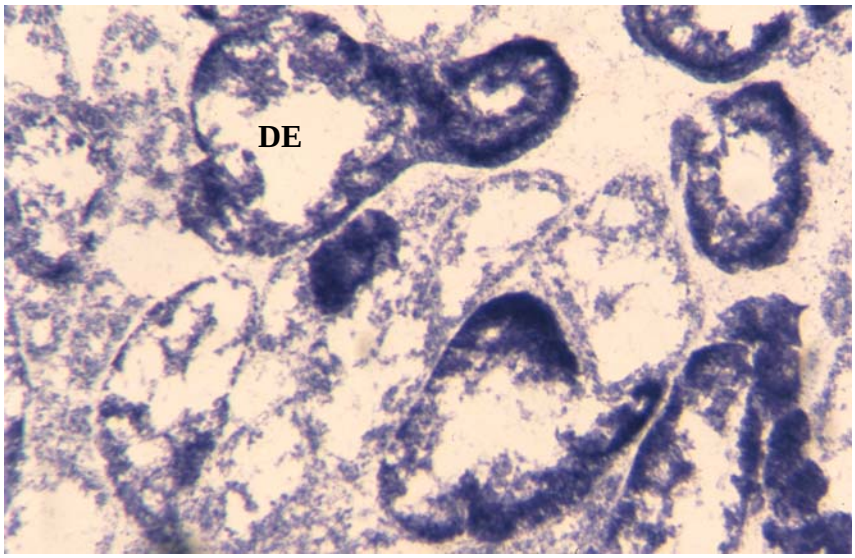


Abb. 3.68 Mamma lactans (Ratte), SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x200
SDH Aktivität wurde in basalen Drüsenendstücke (DE) mit NBT nachgewiesen.

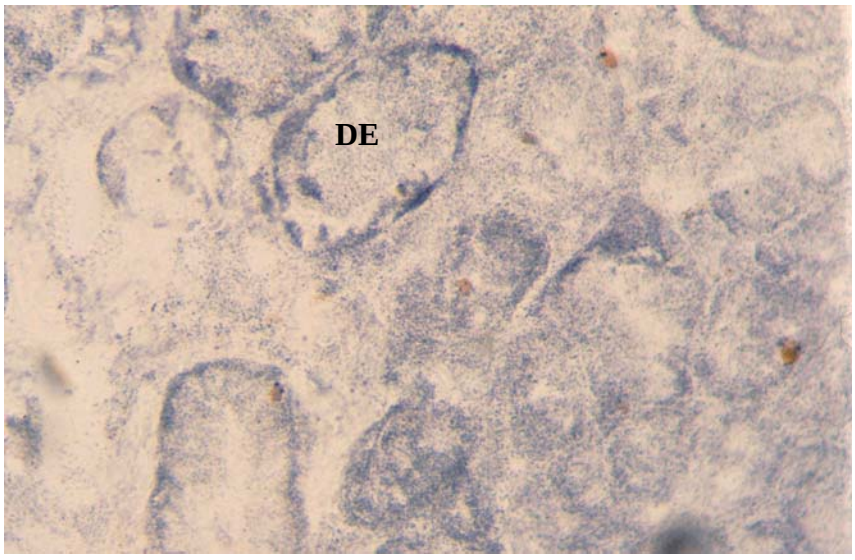


Abb. 3.69: Mamma lactans (Ratte), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x200
Der DHO Nachweis fiel deutlich geringer aus. Zellgrenzen sind kaum erkennbar.

Interpretation

Schon die Übersichten zeigten eine deutlich höhere Enzymaktivität der SDH gegenüber der DHODH im NBT Test. Ungefähr ein Drittel der Ausführungsgänge waren intensiv blau dargestellt. Die umgebenden Myoepithelzellen waren mit diesem Nachweisverfahren nicht zu differenzieren. Die hohe Enzymaktivität der Drüsenendstücke ist durch die Synthesevorgänge zu erklären. Nach der Entbindung wird durch den fallenden Hormonspiegel von Östrogen und Progesteron vermehrt Prolactin ausgeschüttet, welches die Milchproduktion stimuliert. Dabei werden die Proteine in den Drüsenendstücken am rauhen Endoplasmatischem Retikulum synthetisiert und im Golgiapparat in Vakuolen verpackt (Burkitt et al., 1993). Für die Protein- und RNA-Synthese sind Mitochondrien zur Energiebereitstellung notwendig. Ein Nachweis der Oxidaseaktivität war in geringem Maße ebenfalls möglich, wobei die Endstücke und Ausführungsgänge homogen gefärbt waren. Die Spezifität der Reaktion wurde durch den Hemmeffekt des Brequinars sowohl im Oxidase- wie im Dehydrogenasetest belegt.
Die Frage, ob in der ruhenden Brustdrüse eine geringere Enzymaktivität nachzuweisen ist, kann im vorliegenden Fall nicht beantwortet werden, da hierfür kein Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand. Dies ist aber anzunehmen, da die Drüsenendstücke noch nicht voll ausgereift waren (Ross & Reith, 1987) und dementsprechen die Anzahl an epithelialen Gängen deutlich geringer ist. Eine höhere Aktivität wird sicherlich in der proliferierenden Milchdrüse nachzuweisen sein, wo es unter Mitwirkung von aus dem corpus luteum und später aus der Plazenta stammenden Östrogen und Progesteron zur Entwicklung von Acini und Drüsenläppchen kommt (Ross & Reith, 1987; Burkitt et al., 1993). Um diese Annahmen zu bestätigen, müssten in weiterführenden Untersuchungen Brustdrüsen unterschiedlicher Entwicklungsstadien mit den hier angewandten Nachweisverfahren untersucht werden.

3.4 Histologische Darstellung der DHODH und SDH in humanen pathologischen Geweben

3.4.1 Histologische Darstellung der DHODH und SDH im Adenokarzinom der Niere

Bei den zur Verfügung gestellten Gewebeproben handelte es sich um ein hellzelliges, malignes, epitheliales Nierenzellkarzinom im Stadium G2. Das bedeuted einen mäßigen Malignitätsgrad und mittleren Differenzierungsgrad. Im allgemeinen sind die

betroffenen Patienten über sechzig Jahre alt und zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hat der Tumor schon eine Größe von 3 bis 15 cm erreicht (Riede & Schäfer, 1995). Als auslösende Ursachen für die Entstehung des Tumors werden aromatische Kohlenwasserstoffe, Cadmium, Antibiotika, Aflatoxine, Blei, Östrogeneinwirkung oder Pfeiffen- und Zigarettenrauch diskutiert. Diese Tumorform wird oft spät erkannt, da zu Beginn der Erkrankung häufig keine körperlichen Beschwerden auftreten. Ein Leitsymtom ist die Hämaturie, später eventuell auch Flankenschmerzen, Anämie, Fieber, Erythrozyturie, Hypertonie und Polyglobulie. Eine hämatogene Metastasierung in Knochen, Leber, Hirn und Lunge kann zum Zeitpunkt der Diagnose erfolgt sein.

Histologischer Überblick

Das hier untersuchte Gewebe gehörte mit seinem hohen Lipid- und Glykogenanteil zum *klarzelligen* Typ. Makroskopisch fand sich beim Aufschneiden des Materials ein "*buntes Bild*" mit gelblicher Schnittfläche die durch Blutungen, Fibrosen, Nekrosen evt. auch verkalkten Arealen entstanden ist. Die Zellen selbst können alveolär oder trabekulär angeordnet sein (Thomas, 1986). Im Zytoplasma enthaltenes Glykogen erscheint hell d.h. optisch leer im histologischen Schnitt. Malignität ist daran zu erkennen, dass zahlreiche Atypien, Polymorphien und Mitosen auftreten sowie Zelleinbrüche in Gefäße und das Nierenbecken zu beobachten sind.

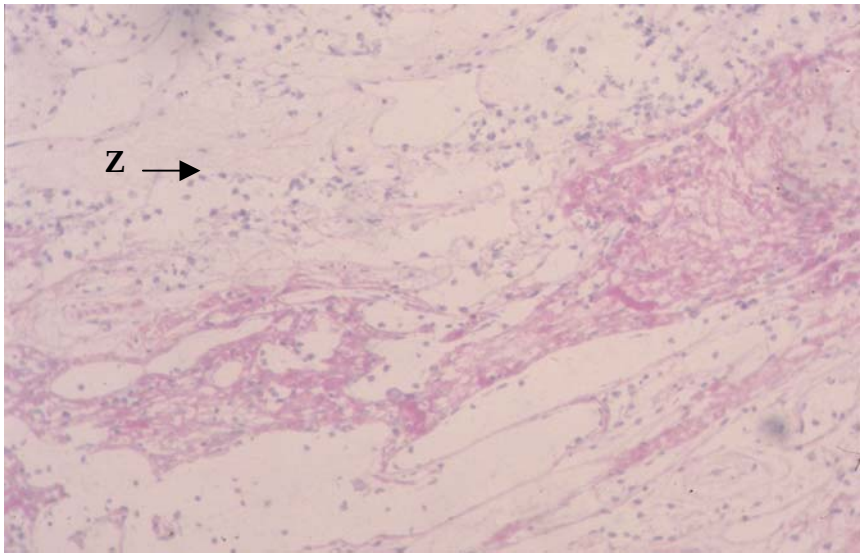


Abb. 3.70: Hypernephroides Nierenkarzinom (Mensch), H.E. Färbung, Vergr. x100
Vorwiegend die Zellkerne sind im H.E. Bild erkennbar. Das Protoplasma ist sehr hell.

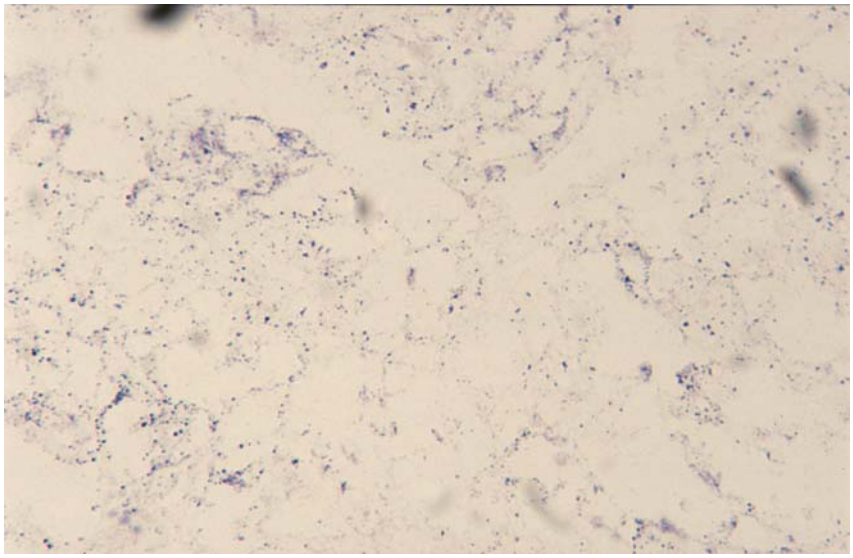


Abb. 3.71: Nierenkarzinom (Mensch), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x100

Die NBT Färbung ergab ein “retikuläres” Bild, indem einzelne Zellen nicht voneinander abgegrenzt werden konnten.

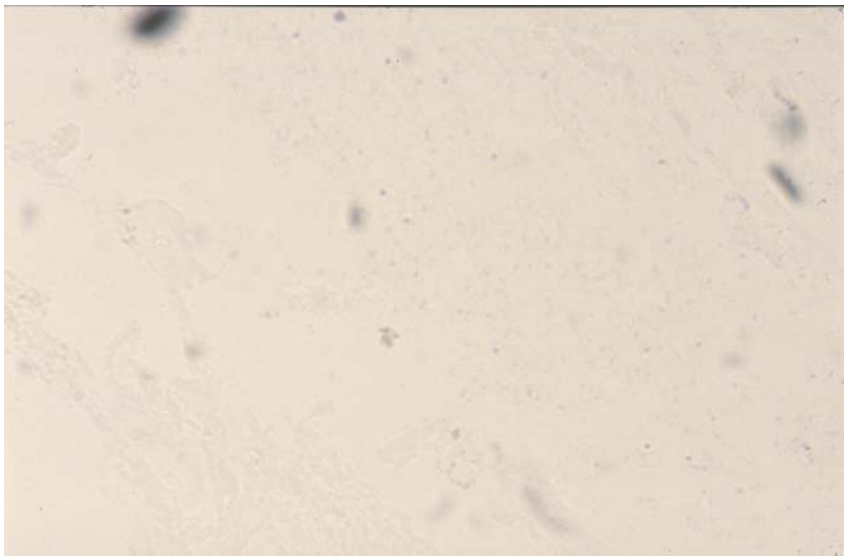


Abb. 3.72: Nierenkarzinom (Mensch), DHODH Nachweis mit NBT, Leerwert, Vergr. x100

Befunde

In der H.E. Übersichtsfärbung ließ sich ausschließlich pathologisches Gewebe begutachten. Schon in der Übersicht fiel das bunte Zellbild mit Anteilen von locker strukturiertem Gewebe auf, was zahlreiche einzelne Tumorzellen enthielt, die insbesondere mit ihren gut erhaltenen intensiv gefärbten Zellkernen dominierten (Abb. 3.70). Zellgrenzen konnten nicht beobachtet werden. Die Zellkerne waren polymorph, unterschiedlich groß und wenige Mitosen sichtbar. Die Einzelzellen erschienen plasmaarm und polygonal. Einzelne Zellgruppen waren durch Stromasepten

voneinander getrennt und zahlreiche Kapillare sichtbar. Alveolär angeordnete Zellen, von reichlich eosinophilem Material umgeben, enthielten selbst nur wenige Kerne. Es stellten sich auch hämorrhagisch infarzierte, eosinophile Gewebeanteile dar. Gut vaskularisiertes Bindegewebe enthielt Zellen mit gelb-braunem Pigment, wobei es sich um Hämosiderinablagerungen handeln könnte. Schon in der Übersicht konnte im NBT Test einer starke Zerstörung der Schnitte erkannt werden. Vereinzelt stellten sich Gefäße im Querschnitt dar, mit positiver Enzymreaktion in der Media. Im Detail betrachtet konnte die feine Formazangranulation über den gesamten Schnitt verteilt beobachtet werden, wobei vereinzelt Zellen von blauen Farbpartikeln umgeben waren (Abb. 3.71). Zum Vergleich waren substratlose Präparate ungefärbt (Abb. 3.72). Der Reaktionsausfall im DHODH Nachweis war deutlich niedriger als jener im SDH Test. Mit dem Einsatz von Brequinar kam eine Hemmung der Enzymreaktion zustande.

Interpretation

Zur Genese der Tumorentstehung soll außer den im allgemeinen Teil unter histologischem Überblick erwähnten Stoffen auf genetischer Ebene der Verlust des Tumor-Suppressorgens im Bereich des kurzen Armes von Chromosom 3 beteiligt sein. Ebenfalls wird ein später auftretender Verlust von Antimetastsasierungsgenen verantwortlich gemacht (Riede & Schäfer, 1995). Der Tumor differenziert sich aus verschiedenen Nephronanteilen und kann so tubulopapilläre, zystische oder solide Wachstumsformen hervorbringen. Mit einer Häufigkeit von 80% leitet er sich immunhistochemisch von den proximalen Tubuli ab und expremiert Vimentin und zylinderepitheltypisches Keratin. Die histologische Struktur ist je nach Tumorform unterschiedlich, so können alveolär-cystische Bildungen, aber auch trabekuläre, tubuläre oder cystopapilläre Formen entstehen. Bei den vorliegenden Untersuchungen handelte es sich um einen klarzelligen Nierentumor aus dem Stadium G2. In diesem Fall waren die Kerne etwas größer und zum Teil auch große Nukleolen nachweisbar. In diesem fortgeschrittenem Stadium konnten im H.E. Präparat feine Granulationen im Zytoplasma beobachtet werden (Abb. 3.70). Sie sollen durch Akkumulation von Zellorganellen zustande kommen (Remmele, 1997)). Hämorrhagisch infazierte Gewebeanteile gelten als Kennzeichen eines steigenden Malignitätsgrades und können gelegentlich mit Hämosiderinablagerungen verbunden sein. Die Struktur war, im Gegensatz zu den H.E. gefärbten Schnitten, oft zerstört und nicht gut zu mikroskopieren (Abb. 3.71). Dort ließ sich erkennen, dass der Tumor kaum noch Ähnlichkeit mit der

gesunden Niere zeigte. In dem netzartig wirkendem Grundgerüst des Tumors gab es deutliche Unterschiede im Nachweis von Enzymaktivitäten in den Einzelzellen, wenn auch sonst die Formazangranulation recht gleichmäßig über die histologischen Schnitte verteilt war. Wie hier zu beobachten, traten die einzelnen Zellen durch fadenförmige Zytoplasmaausläufer miteinander in Kontakt. Das heißt durch die Zerstörung der Strukturen infolge der Inkubationsbedingungen kam ein „maschenartiges“ Bild zustande (Abb. 3.71). Eine mögliche Ursache ist die hier alveoläre Anordnung der Zellen. Das Zytoplasma war sehr hell, was auf einen gestörten Glykogen- und Glucosestoffwechsel zurückzuführen ist. Dies führte zur Ansammlung von Phospholipiden und Neutralfetten und trägt somit zur transparenten Plasmafarbe bei. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden sie infolge der langen Inkubationsbedingungen und Waschvorgänge herausgelöst. Da im Leerwertpräparat ebenfalls als Zeichen einer schwachen Enzymreaktion sehr helle Anfärbungen auftraten, ist von einer leichten unspezifischen Hintergrundreaktion auszugehen (Abb. 3.72). Mitosen wurden in den vorliegenden Präparaten nicht so häufig beobachtet, was mit den Veröffentlichungen anderer Autoren übereinstimmt (Riede & Schäfer, 1995). Die Proliferationsrate der Grad 2 Tumoren liegt bei 6 % (Remmele, 1997), so dass aus diesen Angaben die geringe Mitoserate und damit auch die niedrige Enzymaktivität von SDH und DHODH verständlich wird. Möglicherweise findet man im Vergleich zu Grad 3 Tumoren dort eine höhere Enzymaktivität, denn deren Proliferationsrate soll nach Literaturangaben bei 29 % liegen. Um diese Vermutung zu überprüfen, müssten in weiterführenden Untersuchungen Tumoren in unterschiedlichen Entwicklungsstadien parallel getestet werden.

3.4.2 Histologische Darstellung der DHODH und SDH im Nephroblastom (Wilms-Tumor)

Histologischer Überblick

Der Wilms Tumor ist maligne und besteht aus primitivem nephroblastischem Gewebe. Er bildet embryonale Strukturen, tritt vorwiegend im Kindesalter auf (Riede & Schäfer, 1995) und ist aus den folgenden drei Komponenten aufgebaut: blastemischer Anteil mit zellreichen zytoplasmaarmen Zellen, Stroma mit fibrös-myxoidem Anteil, epithelialer Anteil mit zum Teil primitiven Tubuli und unreifen Glomeruli.

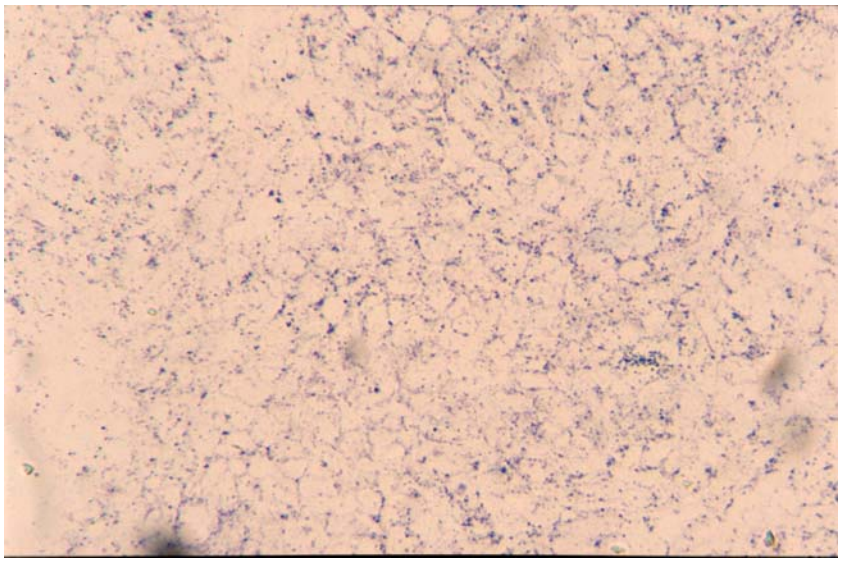


Abb. 3.73: Wilms-Tumor (Mensch) SDH Nachweis mit NBT, Vergr. x100
Es ergab sich ein „wabenartiges“ mikroskopisches Bild.

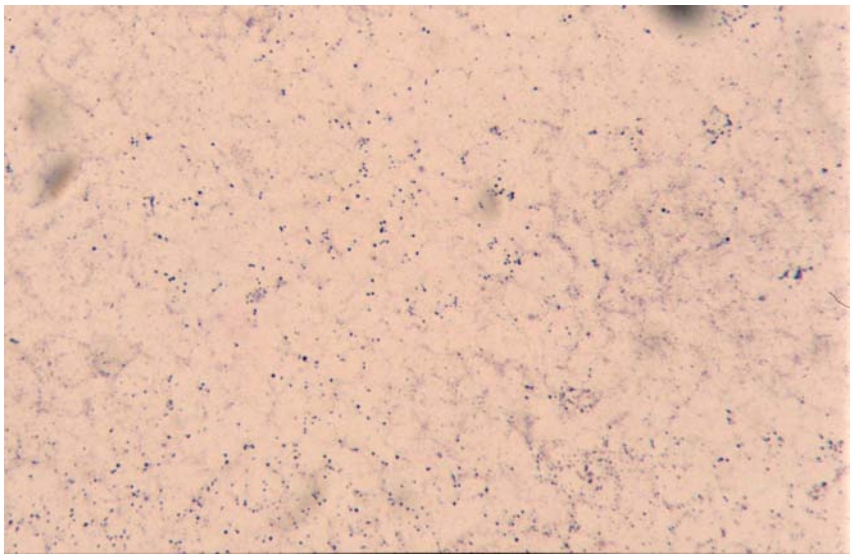


Abb. 3.74: Wilms-Tumor (Mensch), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x100
Die DHODH Enzymaktivität war deutlich geringer als die der SDH.

Befunde

Das sehr hell gefärbte H.E. Präparat zeigte deutlich die unterschiedlichen Komponenten, wie sie für diese Tumorform charakteristisch sind und oben aufgeführt wurden (Abb. 3.75). Es fielen überwiegend eosinophile Zellanhäufungen auf. Die relativ großen Zellen lagen dicht gedrängt nebeneinander, wobei die Zellkerne klein und hyperchromatisch erschienen (Abb. 3.75). Daneben war ein zellarmes, lockermaschiges Stroma erkennbar. Im geringen Umfang erkannte man tubuläre Strukturen sowie mesenchymale Anteile mit vereinzelt spindelförmigen Zellen. Viele unreife hell ausgesparte Kerne waren in NBT Test umgeben von feinverteilter Formazangranulation

und dicht zusammengepackt. Andere bildeten netzartige Ausläufer als Verbindung mit ihren Nachbarzellen. In der Übersicht fiel beim SDH- und in geringerem Umfang beim DHODH Nachweis eine fast gleichmäßige, über den gesamten Schnitt verteilte Färbung auf (Abb. 3.73, 3.74). Das NBT Bild zeigte für die SDH im Vergleich zum adulten Nierenzellkarzinom eine intensive mittelblaue Anfärbung. Im Stroma war weniger Enzymaktivität nachzuweisen. Dafür traten intensiv gefärbte größere Zellen mit rotbraunen Kernen auf. Die Anwendung von Brequinar führte zu einer spezifischen Hemmung der Enzymaktivität.

Bei Betrachtung der Färbung im Oxidasetest war ein homogenes, gelbes Verteilungsmuster erkennbar (Abb. 3.76). Kleine Zellanhäufungen mit intensiver Anfärbung und ockerfarbenen Kern sowie prominenten Nucleolus waren deutlich zu erkennen. Die dazugehörigen histologischen Leerwertschnitte erschienen heller gefärbt, mit prominenten dunklen Einzelzellen (Abb. 3.77). Demnach ist eine leicht unspezifische Reaktion aufgetreten. Auch hier ergab sich bei der Anwendung von Brequinar ein dem Leerwert entsprechendes Bild.

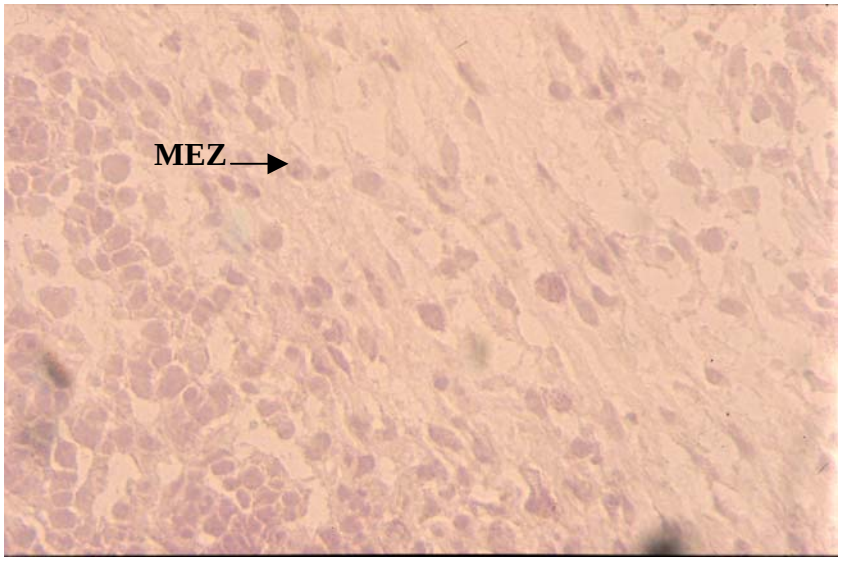


Abb. 3.75: Wilms-Tumor (Mensch), H.E. Färbung, Vergr. x100

Zu erkennen sind die mesenchymalen, epithelähnlichen Zellen (MEZ) ohne Darstellung von Glomeruli.

Interpretation

Das Nephroblastom ist ein vorwiegend im Kindesalter von 2-3 Jahren auftretender, maligner Tumor, der aus nephroblastischem Gewebe besteht und embryonale Strukturen bildet (Riede & Schäfer, 1995). Er metastasiert relativ spät hämatogen in Leber, Lunge, Knochen und Gehirn und wird in diesem Fall mit Chemotherapie und Bestrahlung behandelt. Ausgelöst wird das Wachstum durch Mutation verbunden mit Allelverlust von Chromosom 11 und dem Verlust der Tumorsuppressorgene WT-1 und WT-2. Dies führt zu einem ungehemmten Wachstum von embryonalen Zellen und der Möglichkeit zur Entstehung von Mehrfachtumoren oder Fehlbildungen im Urogenitalbereich (Riede & Schäfer, 1995). Sein Wachstum ist infiltrativ und destruktiv mit frühzeitigem Einbruch in des Venensystem (Doerr & Uehlinger, 1966). Er ist zu Beginn klinisch häufig unauffällig, kann aber auch zu Leukozytose, Anämie und arterieller Hypertonie führen. Makroskopisch weist er oft Blutungen, Zysten oder Nekrosen auf. Er besteht aus einfachen, tubulären Strukturen, zytoplasmaarmen, zellreichen Komponenten und Stromaanteilen. In der vorliegenden Untersuchung konnten im H.E. Bild alle drei genannten Gewebeanteile, wie sie für den Tumor typisch sind, nachgewiesen werden (Abb. 3.73). Im Vergleich zum SDH Nachweis muß die Enzymmenge der DHODH als gering bezeichnet werden (Abb.3.74, 3.75). Vorwiegend in dem epithelialen Anteil, der hier nur in sehr geringem Umfang darstellbar wurde, ließ sich eine deutliche Blaufärbung sehen, d.h. tubuläre Strukturen kamen bei dem hier vorliegenden Untersuchungen nur wenige zur Darstellung. Diese Beobachtungen weisen auf die hohe Anaplasie des untersuchten Tumors hin. In diesem Fall finden sich nur sehr wenige Tubuli im Präparat, deren Anteil bei geringerer Anaplasie deutlich zunimmt (Riede & Schäfer, 1995). Der blastemische Anteil mit massenhaft kleinen, zytoplasmaarmen, hyperchromatischen Kernen erschien deutlich gefärbt, d.h. hatte eine höhere Enzymaktivität als das Stroma. Aus dem erhobenen Befund kann man auf die dort stattfindende Zellvermehrung und hohe Mitoserate schließen, die im Vergleich zum adulten Nierenzellkarzinom deutlich im Vordergrund steht. In der Literatur wird ebenfalls das zahlreiche Auftreten von Mitosen beschrieben (Doerr & Uehlinger, 1966). Da der Leerwert im Oxidsetest heller gefärbt erschien, ist anzunehmen, dass kaum eine Oxidasereaktion vorhanden war, aber auch eine unspezifisch Hintergrundreaktion entstanden ist. Bei den einzelnen im Leerwert positiven Zellen kann es sich um Makrophagen handeln. Die genannten positiven Zellanhäufungen erschienen im

Leerwert ungefärbt, so dass es auch hier eine spezifische Enzymreaktion sein muss. Brequinar im Testansatz führte zu einer Hemmung der Oxidasereaktion.

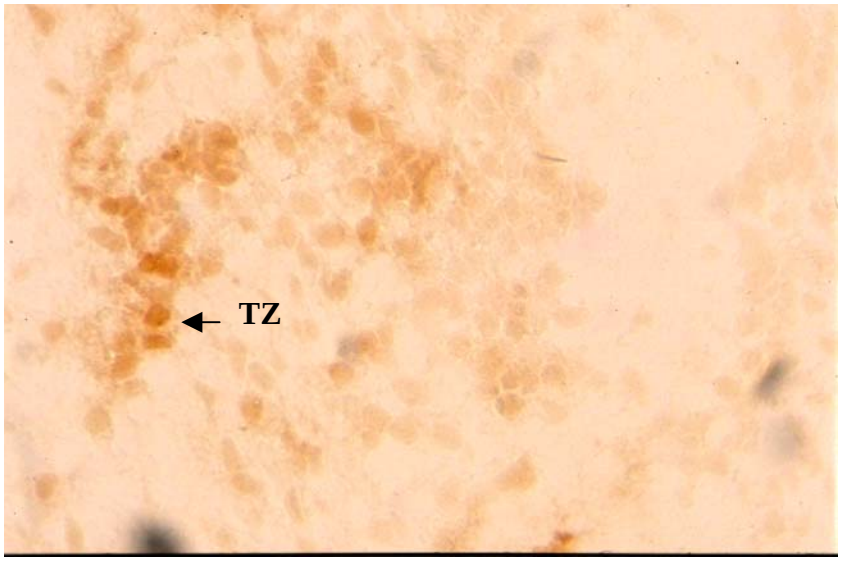


Abb. 3.76: Wilms-Tumor (Mensch), Oxidase Nachweis der DHODH, Vergr. x200

Im Oxidasetest sind Tumorzellen (TZ) unterschiedlich dunkel, der Kern dagegen intensiv gefärbt.

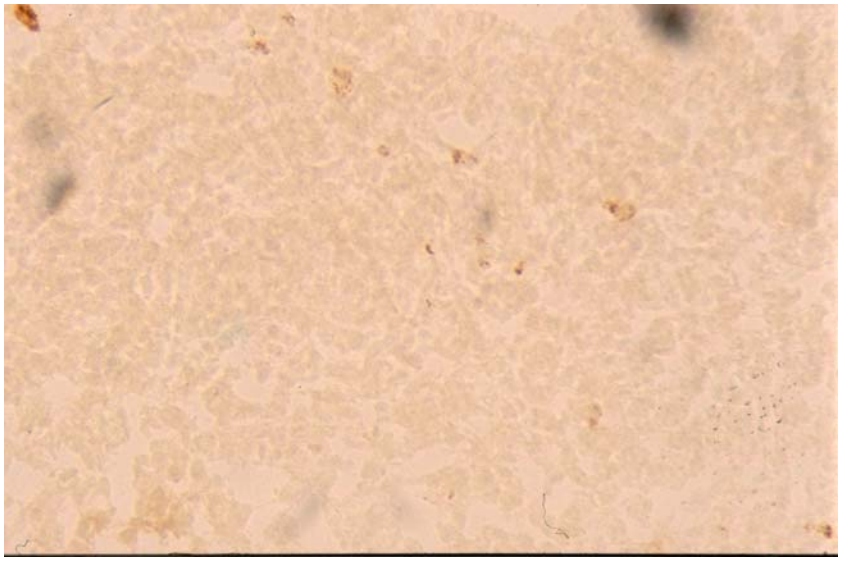


Abb. 3.77: Wilms-Tumor Mensch, Oxidase Nachweis der DHODH, Leerwert, Vergr. X100

3.4.3 Histologische Darstellung der DHODH und SDH im Fibrom der Haut

Histologischer Überblick

Fibrome sind helle, schmerzlose in den Faltenregionen der Haut gelegene Anhängsel und kommen häufig am Hals lokalisiert vor (Jung, 1991). Ihre Form kann sowohl gestielt als Fibroma pendulans sowie auch im Hautniveau gelegen auftreten. Nach kleinen Hautverletzungen z.B. durch Insektenstiche können sich die mit Hämosiderin-einlagerungen entstehenden Histiozytome entwickeln, welche später in Fibrome umgewandelt werden. Da sie auf Druck schmerzhaft sind, werden sie häufiger entfernt.

Befunde

Der SDH Nachweis mit NBT ergab eine feinkörnige, mittelblaue Anfärbung. In der 400er Vergrößerung konnten die einzelnen Zellen mit ihren hell ausgesparten Zellkernen deutlich voneinander unterschieden werden. Im Stratum basale wurden große Zellen mit dunkelbrauner Pigmenteinlagerung beobachtet, wobei der Kern ungefärbt blieb. Einzelne, große Zellen des sich anschließenden Stratum spinosum waren ebenfalls enzympositiv. Pigmenteinlagerung enthielten nur noch wenige Zellen. Im Stratum basale und spinosum war die nachzuweisende Färbung etwa gleich intensiv. Es folgte das Stratum granulosum mit länglichen dunklen Formazankörnchen und geringer Blautönung. Dann bildete die wenig gefärbte sehr dünne Hornhaut die oberste Schicht, mit ebenfalls einem geringen Anteil an Pigmenteinlagerungen. Im Vergleich zur gesunden Haut erschienen die apikalen Zellen hier nicht abgeflacht. Auffallend in der Epidermis war, dass in den oberen Schichten vereinzelt Zellen vorkamen, mit intensiverem Enzymnachweis und grobkörniger Granulation. Der Leerwert zeigte lediglich eine Anfärbung der Melaningranula. Die sich unter der Epidermis befindliche Dermis mit ihrem Stratum papillare und reticulare stellte sich als lockermaschiges Gebilde, mit zum Teil positiver Enzymreaktion und unregelmäßig angeordneten Zellen dar. Bei Anwendung von Brequinar war eine Dehydrogenasehemmung eingetreten.

Eine Oxidasereaktion konnte eindeutig nachgewiesen werden. Dabei war die höchste Anfärbung in der Epidermis zu beobachten gewesen. Insbesondere die Zellkerne der Basalzellschicht erschien dunkelbraun gefärbt. Auch die im Stratum spinosum vorkommenden Keratinozyten beinhalteten zum Teil feine, braune Granula, wobei

einzelne Zellen gegeneinander nicht abgegrenzt werden konnten. Die Farbintensität nahm nach apikal deutlich ab. In der Dermis befindliche Zellen mit ihren in Form und Größe variablen Zellkörper wiesen ebenfalls reichlich braune Pigmenteinschlüsse auf. Die Oxidaseaktivität ist in pathologischen Gewebeanteilen deutlich höher als im angrenzenden, hier ebenfalls angeschnittenen gesunden Hautgewebe.

Interpretation

Eine eindeutige Färbung der SDH und DHODH konnte mit NBT erzielt werden. Insbesondere die Basalzellschicht war dunkelblau dargestellt mit gehäuft nachzuweisenden Melanozyten, erkennbar an den braunen Pigmenteinschlüssen. Diese waren auch in der Leerwertreaktion angefärbt und stellen somit eine unspezifische Reaktion dar. Wie in der gesunden Haut ist die Epidermis mit ihrer zellproliferativen Aufgabe intensiv dargestellt, mit Ausnahme der abgebildeten Pigmenteinschlüsse. Starke Enzymreaktion war in der Basalzellschicht (Abb. 3.78) der Epidermis zu beobachten. Die hohe Enzymaktivität war bis etwa zur Mitte der Epidermis nachzuweisen und nahm von dort signifikant ab. Da keine gesunden Hautareale mitangeschnitten waren lässt sich nicht sagen, ob in diesem Fall eine Zunahme der Enzymaktivität durch vermehrte Zellproliferation stattgefunden hat.

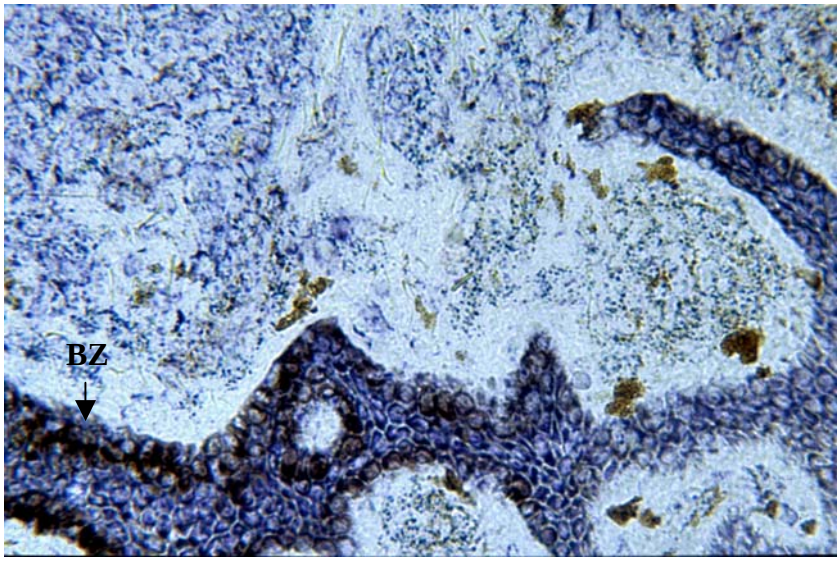


Abb. 3.78: Fibrom der Haut (Mensch), DHODH Nachweis mit NBT, Vergr. x100 (BZ=Basazellschicht)

4. Diskussion

4.1 Vorfixierung von Gewebe

Die chemische Fixierung ist gut geeignet, um Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Nucleinsäuren in Zellstrukturen haltbar zu machen. Ein Beispiel für die Konservierung von Organen ist die Anwendung von den unter 2.7 erwähnten Fixierlösungen. Sie führte jedoch zu Schwierigkeiten beim Schneidevorgang. Eine Möglichkeit, die zur Entstehung der weichen Konsistenz bei nach Baker und Methacarn vorbehandelten Geweben beitragen könnte, ist der Einsatz einer zu hohen Fixiermittelkonzentration. Sie führt durch Proteinausfällung zu einer Diffusionsbarriere an der Schnittoberfläche, so dass die Lösung nicht weiter in das Organ vordringen kann. Das Innere des zu fixierenden Gewebes bleibt somit weich. Es muss also darauf geachtet werden, dass die Diffusionsgeschwindigkeit im Einklang mit der Konzentration des Fixiermittels und der Größe des Objekts ist (Knoche, 1979). Die Organstückchen sollten demnach nicht zu groß sein, eine Kantenlänge von 3-10 mm wird empfohlen. Ein weiteres Beispiel einer chemischen Haltbarmachung ist die in dieser Arbeit angewendete postenzymatische Paraformaldehydfixierung. Es reagiert der reaktive Aldehyd mit Aminosäuren der Proteine des zu fixierenden Organs. Sie werden denaturiert und vernetzt, ihre Löslichkeit wird eingeschränkt, aber auch enzymatische Reaktionen und mikrobielle Zersetzung deutlich vermindert. Lösliche Substanzen bleiben in der entstehenden Netzstruktur haften. Schnitte von PFA behandelten Organen ließen sich wesentlich besser anfertigen. Dennoch hatten auch sie die Tendenz, sich schon während des Schneidevorgangs einzurollen. Aus diesem Grund wurde von einer weiteren Verwendung vorfixierter Gewebe abgesehen. Eine Schockgefrierung von Untersuchungsmaterial z.B. in flüssigem Stickstoff entspricht einer physikalischen Haltbarmachung. Solange kein Auftauvorgang stattfindet, werden sowohl autolysierend wirkende Enzyme als auch mikrobielle Zersetzung verhindert. Das bedeutet, die Haltbarmachung des Gewebes währt nur so lange, wie dieses bei möglichst tiefen Temperaturen aufbewahrt wird (Knoche, 1979). Das Einfrieren sollte schlagartig durchgeführt werden, um eine Eiskristallbildung zu vermeiden. Sie kann zur Zerstörung der Organstruktur führen. Dieses Verfahren wurde hier angewendet und den oben beschriebenen Fixierungen den Vorzug gegeben, weil die Enzymaktivität so reversibel gestoppt werden konnte und eine Reaktivierung nach dem Auftauen möglich war.

4.2 Anwendung von Tetrazoliumsalzen und Formazan

Erste enzymhistochemische Versuche, DHODH mit Hilfe des NBT nachzuweisen wurden von Cohen (1962) und Castoldi et al. (1968) durchgeführt. Die Autoren untersuchten Blutzellen und Knochenmarkausstriche. Heute finden von der Fülle an bekannten Tetrazoliumsalzen nur wenige ihre praktische Anwendung (Altmann, 1976 a,b; Seidler et al., 1979; Van Noorden, 1984). Wenn Formazane bestimmte Gruppen wie Sulfate, Hydroxy- Amino- oder Carboxylgruppen enthalten, dann können sie in der Enzymhistochemie verwendet werden. Diese Salze sind nur in Lipiden und organischen Lösungsmittel, d.h. in hydrophober Umgebung löslich, jedoch nicht in Pufferlösungen. Heute werden für enzymhistochemische Zwecke vorwiegend NBT oder TNBT verwendet. Ihr Vorteil ist die Bildung einer feinkörnigen Granulation und damit exakte Lokalisation, die Entstehung von farbintensiven Formazanen und die gute Reduzierbarkeit (Seidler, 1991). Weiterhin sollten folgende Eigenschaften vorhanden sein: ein gutes Penetrationsvermögen in Zellkompartimente und Gewebeschnitte und ein möglichst niedriges Redoxpotential (jedoch nicht so niedrig dass die Salze von bestimmten Substanzen im Inkubationsmedium alleine schon reduziert werden können). Das Redoxpotential von Dihydroorotat/Orotat wird in der Literatur mit –0,250 Volt angegeben. Das des NBT liegt bei etwa –0,050 Volt (Pearse, 1961) und ist von daher als Elektronenakzeptor auch für das Enzym DHODH ideal. Die einzelnen Formazane absorbieren bei unterschiedlichen Wellenlängen, insbesondere unterscheiden sich dabei auch die Mono- und Diformazane. Das Formazan des NBT absorbiert bei 605 nm (Altmann, 1972), wenn seine Extraktion zum Beispiel mit Butanol erfolgt. Wird es in anderen organischen Lösungsmitteln gelöst, ändert sich das Absorptionsverhalten. Es ist demnach abhängig von der Art des Lösungsmittels, in dem sich das Formazan befindet, denn Tetrazoliumsalze sind wasserlöslich, Formazane dagegen nicht. In der vorliegenden Arbeit war dieser Punkt nicht relevant, da keine Notwendigkeit bestand, eine Extraktion durchzuführen. Wichtig war diese Eigenschaft für eine parallel durchgeführte Diplomarbeit, in der NBT als Elektronenakzeptor für DHODH Messungen an permeabilisierten Zellen aus Zellkulturen eingesetzt wurde (Wegerle, 1993). Die entstandenen Präzipitate mußten zur Quantifizierung gelöst werden. Brequinar hemmt den Übergang von Flavin auf Ubichinon und sollte jedoch die Enzymoxidase (Übergang des Wasserstoffs bei Flavin) nicht hemmen (Lakaschus, 1991). Vereinzelt ist bei den hier durchgeführten Versuchen eine unspezifische Anfärbung sowohl im NBT Testverfahren als auch beim Oxidasenachweis, gleichmäßg

über die histologischen Schnitte verteilt, aufgetreten. Dieses in der Literatur als *"Nothing-Dehydrogenaseaktivität"* bezeichnete Phänomen gilt als eine vom spezifischen Enzym unabhängige Reduktion der Tetrazoliumsalze zum Formazan (Seidler, 1991) und soll hauptsächlich während der ersten Inkubationsminuten in einem substratlosen Medium auftreten (Kunze, 1979). Es wird die Möglichkeit einer nichtenzymatischen Reduktion von Tetrazoliumsalzen erwähnt, wenn sich zum Beispiel ungelöste Stoffe im Inkubationsmedium befinden. Aber auch Bestandteile der histologischen Präparate wie Sulfhydrylgruppen von Aminosäuren, Coenzyme, reduzierende Zucker, Ganglioside und biogene Amine kommen als Ursache für die Entstehung unspezifischer Reaktionsprodukte in Frage. Eine Verfälschung der Aussage durch solche Niederschläge kann ebenfalls eintreten wenn Nebenprodukte, die bei der enzymatischen Reaktion entstehen geeignete, im Inkubationsmedium vorkommende Substrate nutzen und in der darauffolgenden Reaktion Tetrazoliumsalze reduzieren (Lojda & Havrankova, 1975; Gossrau, 1978; van Noorden & Jongs, 1987; Seidler, 1988). Bei der durch die DHODH katalysierten Reaktion dürfte diese Möglichkeit gering sein, da nur Ubichinon als spezifischer oder gegebenenfalls Sauerstoff als unspezifischer Elektronenakzeptor beschrieben sind. Es wurde vermutet, dass die Zugabe von NaCN und NaN_3 welche notwendig sind, um die Atmungskette zu blockieren und damit den Aktivitätsnachweis steigern, ebenfalls unspezifische Formazanbildung fördern könnte. Beobachtet wurde dies bei Untersuchungen an Blutzellen und Knochenmarkausstrichen (Castoldi et al., 1968), jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit nicht auf Cyanidzugabe verzichtet werden. Die Kontrolle ohne Substrat wurde stets mitgeführt. Van Noorden postulierte 1984, dass die reduzierende Wirkung von Thiolgruppen in Proteinen, Cystein oder Glutathion eine Dehydrogenase-aktivität vortäuschen können. Deswegen empfahl er, N-Ethylmaleimid als Sulfhydrylblocker einzusetzen um diese *"Nothing"* Aktivität zu unterdrücken. Der größte Anteil der unspezifischen Reaktion soll jedoch durch die Isoenzyme der Laktat-Dehydrogenase verursacht werden. Sie verstoffwechseln endogenes Laktat, reagieren coenzymabhängig und lassen sich durch Zugabe von Pyruvat hemmen. In einer parallel durchgeführten Untersuchung von EAT-Zellen fiel ebenfalls eine hohe *„Nothing-Dehydrogenase"* Aktivität auf (Wegerle, E., 1993). Die Zugabe von N-Ethylmaleinid, p-Chlormercuribenzoat oder Pyruvat führte zu keiner Reduktion dieser Hintergrundaktivität, so dass diese Chemikalien in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet wurden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Qualität des

Formazanniederschlags (diffus, körnig, grobkörnig) im histologischen Schnitt von vielen Faktoren abhängig ist, wie zum Beispiel vom verwendeten Tetrazoliumsalz, den Strukturen im Gewebeschnitt und dort vor allen den Membranlipiden, ggf. dem Lösungsmittel, der Inkubationsdauer, der Temperatur und dem nachzuweisendem Enzym selbst (Kunze, 1979).

4.3 Anwendung von Redoxmediatoren

In zahlreichen Veröffentlichungen wird beschrieben, dass die Formazanausbeute durch Zugabe von Hilfsstoffen erhöht wird. Unter anderem wurden Phospholipide, Triton X-100, oder Tween 80 hinzugegeben. Doch ist der "aktivierende" Effekt dieser Substanzen nicht genau bekannt (Seidler et al., 1978; Seidler, 1979, van Noorden, 1988). Wenn NAD-abhängige Dehydrogenasen histochemisch nachgewiesen werden sollen, können die Reduktionsäquivalente wie Elektronen oder Wasserstoff oft nicht schnell genug auf die Akzeptoren übertragen werden, sondern benötigen Hilfsstoffe, sogenannte Redoxmediatoren (Altmann, 1976a; Butcher, 1982; Butcher & van Noorden 1984). Diese werden dem Testansatz beigefügt und führen zu einer "Verstärkung" der Reaktion, d.h. der Formazanbildung. Heute werden als Redoxmediatoren am häufigsten Menadion und Phenazinmethosulfat (PMS) verwendet. In einer parallel durchgeführten Diplomarbeit wurden die Enzymaktivitäten von DHODH in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen geprüft (Wegerle, 1993). Eine Steigerung der Aktivität hatte man sich hier durch die Zugabe von PMS erhofft, die vermehrte Blaufärbung war jedoch nicht so hoch wie erwartet. Die Aktivität von SDH fiel höher aus (54 auf 156 nmol Succinat/min pro 10^8 Zellen) als jene der DHO (17,5 auf 19 nmol DHO/ min pro 10^8 Zellen). Insbesondere resultierte eine starke Hintergrundreaktion, deren Ursache die schon von Garbarsch et al. (1978) postulierte überproportionale Verstärkung der *„Nothing- Dehydrogenaseaktivität"* sein könnte, denn EAT-Zellen besitzen eine hohe LDH Aktivität. Aus diesem Grunde ist PMS in dieser Arbeit nicht ausgetestet worden. Statt dessen wurde Menadion angewendet. Die Zugabe von Menadion zur Testlösung führte zu einer intensiven Blaufärbung und zum Teil zu einer Überreaktion der Rattennierenschnitte, wobei in Übereinstimmung mit den Befunden von Wegerle eine intensivere Anfärbung beim Nachweis der SDH zu beobachten war. Es bedeutet ein vermehrtes Auftreten von unspezifischen Hintergrundreaktionen so dass in weiteren Versuchen auf die Zugabe von Mediatoren verzichtet wurde. Dieses Ergebnis steht im

Widerspruch zu vorhergehenden Untersuchungen an Blutzellen, bei denen der Zusatz von Menadion zur Inkubationslösung keinen Einfluß auf den Reaktionsnachweis hatte (Castoldi et al., 1968). Ein weiterer Grund, keine Mediatorstoffe anzuwenden war die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit erstmals der Hemmstoff Brequinar an histochemischen Schnitten ausgetestet werden sollte. Es gab und gibt bis heute keine Untersuchungen zu einer möglichen Wechselwirkung zwischen Brequinar und Redoxmediatoren am isolierten Enzym.

4.4 Wirkung des Inhibitors Brequinar

Brequinar ist ein hochpotenter Inhibitor der DHODH (Chen et al., 1986; Lakaschus & Löffler 1992; Knecht et al., 1996b). Die Substanz wurde von DuPont zur Anwendung als Zytostatikum entwickelt (Dexter et al., 1985). Seine Wirkung ist nicht kompetetiv, das heißt der Hemmstoff lagert sich außerhalb der Substratbindungsstelle an, so dass das Substrat Dihydroorotsäure noch gebunden wird. Wie inzwischen geklärt wurde, verhindert Brequinar die Übertragung der Elektronen vom Flavin auf das Ubichinon. Es kommt zu einer Verminderung des Pyrimidinnucleotidpools UTP und CTP in den Zellen und damit zu einer verminderten Bildung von DNA und RNA. Seine Wirkung konnte sowohl am Tumormodell, im Tierversuch als auch in klinischen Studien nachgewiesen werden (Arteaga et al., 1989). Es zeigte sich an Koloncarcinomzellen *in vitro* eine ebensogute Wirkung wie sie von anderen bekannten Chemotherapeutika hervorgerufen wird, so zum Beispiel Methotrexat, 5-Fluorouracil oder 1-ß-D-Arabino-furanosylcytosin. Dieser Hemmeffekt auf das Zellwachstum wird unter hypoxischen Versuchsbedingungen noch verstärkt (Löffler, 1992b). Wegerle (1993) konnte bei ihren Untersuchungen an Ehrlich-Aszites Tumorzellen, die mit Brequinar vorbehandelt wurden, eine fast 100%ige Abnahme der DHODH-Aktivität nachweisen. Im Vergleich dazu kam es zu keiner Verminderung der SDH. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Inhibitor erstmalig erfolgreich an Rattenkryostatschnitten getestet, nachdem in der Arbeitsgruppe Untersuchungen an isolierten Rattenenzymen aus Leber, Niere und Herz die Wirkung bewiesen haben (Löffler et al., 1997). In weiteren Experimenten führte Brequinar dort zur Aufhebung des Sauerstoffverbrauchs von isolierten Mitochondrien, wenn diese mit Dihydroorotsäure als Substrat inkubiert wurden. Bei *in vitro* Versuchen an isolierten Enzymen im humanem Gewebe genügte 1µM, um eine Hemmwirkung hervorzurufen. In der vorliegenden Arbeit wurde in allen untersuchten Organen eine

Hemmung der DHODH Aktivität eindeutig festgestellt, die auch bei Untersuchungen von menschlichem Tumorgewebe bestätigt werden konnte. Eine Inaktivierung des ebenfalls mitochondriengebundenen Kontrollenzyms SDH war auch in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht nachweisbar. Neben seiner wachstums-hemmenden Wirkung auf verschiedene menschliche Tumore wurde auch eine Inhibierung der B- und T-Zellaktivität erkannt, so dass der Einsatz von Brequinar eine Verminderung der Antikörperproduktion zur Folge hat (Batt et al., 1995). So zeigten *in vitro* Studien unter anderem an gemischten Lymphozytenkulturen von Affen und Ratten eine dosisabhängige Korrelation zwischen der Suppression der Immunantwort und einer Verminderung von UTP und CTP in peripheren Blutzellen (Eiras-Hreha, G., 1993; Simon et al., 1993). Es wurde angenommen, Brequinar bei zellulärerer Hypersensivität und AK-vermittelten Reaktionen einsetzen zu können, wie es bei Psoriasis und Rheumatoider Arthritis der Fall ist. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite wurden später die klinischen Tests mit Brequinar jedoch eingestellt. Vorklinische Untersuchungen am Tiermodell zeigten seine Hauptwirkung auf den Gastro-intestinaltrakt und auf das Knochenmark, aber auch starke Nebenwirkungen wie hämatologische Repressionen mit Anämie, Thrombopenie und Leukopenie, als auch dosisabhängig Dermatitis, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Mukositis und Phlebitis (Cramer et al., 1992a; Peters et al., 1990; Loveless & Neubauer, 1986). Eine andere Substanz, Leflunomid, welche ebenfalls die DHODH hemmt, wurde später entwickelt und im Jahr 2000 in USA, 2001 in Deutschland und 2003 in Japan zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis zugelassen (ARAVA ™). Brequinar-Derivate wurden weiterhin als Immunsuppressiva bei Organtransplantationen im Tierexperiment erprobt (Cramer, 1996). Präklinische Untersuchungen in Bezug auf Organtransplantationen wurden an Meerschweinchen, Ratten und Herztransplantaten von Affen untersucht. So stellte man ein verlängertes Überleben des Transplantats nach Vorbehandlung mit Brequinar fest (Cramer et al., 1992a; Collnes et al., 1992). Bisher ist häufig Cyclosporin und als weitere Entwicklung Tacrolismus (FK 506) angewandt worden, um Abstoßungs-reaktionen bei Organtransplantationen zu vermeiden. Sie hemmen die cytokinabängige B- und T-Zellinteraktion und schränken deren klonale Expansion ein. Cyclosporin A stoppt die Interleukin 2 Produktion (Kahan, 1994). Nachteilig ist die Nephrotoxizität dieser Pharmaka, so dass die Entwicklung von nebenwirkungsarmen Substanzen angestrebt wird. Es wird derzeit geprüft, inwiefern Leflunomid in Kombination mit anderen Immunsuppressiva (z.B. Methotrexat oder Mycophenolate) eingesetzt werden

kann, um deren Nebenwirkungen einzuschränken. Fest steht, dass das hier untersuchte Enzym DHODH dass bisher einzig gesicherte Zielenzym sowohl für Leflunomide als auch für Brequinar ist (Greene, 1995; Jöckel et al., 1998; Knecht et al., 1996b) und die immunmodulierende Wirkung durch Absenken des Pyrimidinnucleotid- und Desoxynucleotid- Pools in Lymphozyten erzielt wird (Rückemann et al., 1998).

4.5 Die Oxidaseaktivität der Dihydroorotat-Dehydrogenase

In vorangegangenen Untersuchungen konnte nach Enzympräparationen aus Gewebe neben der DHODH Aktivität auch eine Oxidasereaktion nachgewiesen werden (Lakaschus, 1991). Sie lag bei 10% der Dehydrogenaseaktivität. Solche direkten Reaktionen mit Sauerstoff sind bei flavinhaltigen Enzymen möglich. Hierbei gelangen die Elektronen vom reduzierten FMN auf Sauerstoff, bevor Ubichinon diese binden kann. Es stellte sich die Frage, ob dass Enzym bei Störungen in der Atmungskette *in vivo* ebenfalls direkt mit Sauerstoff reagieren kann und somit zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beiträgt. Aus diesem Grunde sollte in der vorliegenden Arbeit diese Fragestellung anhand von Untersuchungen an Gewebeschnitten geklärt werden. In späteren Experimenten mit einem anderen Testverfahren (Spektroskopie) war ein Oxidasenachweis an rekombinanten Enzymen praktisch nicht mehr möglich (Knecht, 1997). Es wurde indirekt geschlossen, dass diese Nebenaktivität der DHODH möglicherweise weitaus geringer als 10% ist. Dabei wurde nicht geklärt, ob das angewandte Testverfahren empfindlich genug reagierte. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde ein Testsystem verwendet, welches die Bildung von H_2O_2 sichtbar macht. Wasserstoffperoxid wurde dabei von Ceriumionen abgefangen und zur Bildung von Cer-Perhydroxid umgesetzt. Dies führt zur Polymerisation von DAB, welches als brauner Niederschlag sichtbar wird. In der vorliegenden Arbeit wurde histochemisch mit dieser Methode eindeutig eine Dihydroorotat abhängige Oxidaseaktivität nachgewiesen. Die Frage ob H_2O_2 direkt am Enzym entstand oder später in einem Teil der Atmungskette, weil erst die letzte Reaktion durch Zyanid gehemmt wurde, konnte nicht mit dieser Technik beantwortet werden. Brequinar hemmt den Übergang von Flavin auf Ubichinon. Die Enzymoxidasereaktion sollte es demnach nicht stoppen (Lakaschus, 1991). Wenn jedoch der Inhibitor wie hier beschrieben die Oxidasereaktion ebenfalls hemmt, muss der Schluß gezogen werden, dass die H_2O_2-Bildung nicht direkt am Enzym sondern später, z.B. auf der Stufe des Ubichonons im Schnitt-

präparat erfolgte. Eine noch spätere Bildung ist unwahrscheinlich, da Komplex IV ja durch Zyanid gehemmt wird.

Für die Entwicklung der Oxidaseaktivität war es nötig, sehr lange Inkubationszeiten einzuhalten. Sie führten möglicherweise in manchen Fällen nicht nur zur sichtbaren Qualitätsminderung der histologischen Präparate, sondern auch zur Zerstörung von Proteinen und Membranstrukturen. Aus diesem Grund ist möglicherweise in einigen Fällen keine Oxidasereaktion gemessen worden, wie es bei der Untersuchung von Pankreasgewebe der Fall war. Wenn eine Oxidasereaktion nachgewiesen werden konnte, waren immer die Zellkerne intensiv braun gefärbt. Dies beruht möglicherweise auf ROS im Zellkern, die mit der DHODH nicht im Zusammenhang stehen. Untersuchungen von Gossrau und Mitarbeitern (1989) ergaben, dass Zusatz von Cobalt- oder Nickelchlorid zum Testansatz eine intensivere Anfärbung und Darstellung bei der Oxidaseaktivität im Ceriumtest bewirkte und unspezifische Reaktionen unterdrückt wurden. Seine Ergebnisse beruhten auf der Untersuchung der Aminosäureoxidase in der Rattenleber. Daher muss angenommen werden, dass die Aktivität von Myeloperoxidasen (z.B. in Makrophagen) und Peroxidasen beim Oxidasenachweis nicht vollständig durch Natriumcyanid verhindert werden konnte, so wie es beim Nachweis der Dehydrogenase der Fall war. So konnten auch bei manchen Oxidase negativen Geweben oder Leerwertschnitten Makrophagen oder Fibrozyten nachgewiesen positiv reagieren.

4.6 Abschließende Betrachtung des Organscreenings

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, ein gutes Ausgangsgewebe für Präparation von Dihydroorotat Dehydrogenase zu finden, um in späteren Untersuchungen nicht nur wie bisher auf Lebermitochondrien angewiesen zu sein. Die Nitrobluetetrazoliumtechnik erwies sich als gute Möglichkeit, das Enzym im histologischen Gewebe nachzuweisen, wenn unter konstanten Bedingungen gearbeitet wurde. In diesem Fall waren die Ergebnisse eindeutig und reproduzierbar. Je nach Organ wird sowohl die SDH als auch die DHODH in unterschiedlich starker Ausprägung exprimiert, was anhand der folgenden Tabelle ersichtlich wird (+++ = hohe Aktivität, ++ = mittelstarke Aktivität, + = geringe Aktivität, - = keine Aktivität meßbar)

Untersuchte Organe	DHODH	SDH	Oxidase
Brustdrüse	+	++	+
Dünndarm	+++	+++	++
Dickdarm	+++	+++	++
Großhirn	+	+	n.b. (=nicht bestimmt)
Haut	++	+++	+
Hoden	++	+++	-
Kleinhirn	+	++	n.b.
Leber	++	+++	+
Luftröhre	+	+	+
Milz	+	++	-
Muskulatur (quergestreift)	++	+++	-
Muskulatur (Herz)	+	+++	+
Nebenhoden	++	++	+
Nebenniere	+	+	n.b.
Niere	+++	+++	++
Ösophagus	+	++	+
Ovar	+	++	+
Pankreas	+	++	-
Prostata	++	++	++
Speicheldrüse	+	++	+
Gebärmutter	++	++	-
Adenokarzinom der Niere	+	+	-
Nephroblastom	+	+	-
Fibrom der Haut	+	++	+

Als enzymreiche Organe wurden solche erkannt, die hohe Aktivitäten der DHODH in Geweben mit proliferativen, regenerativen oder sekretorisch tätigen Prozessen und damit großer Nukleinsäuresynthese aufwiesen. So zählten sowohl Leber, Niere, Magen-Darm-Trakt, aber auch Herzmuskel, Skelettmuskulatur, männlicher Reproduktionstrakt, Uterus, Schweißdrüse und Haut zu den enzymreichen Geweben. Interessant waren die Befunde einer positiven Reaktion in Spermatozoen, in denen keine Pyrimidinsynthese stattfinden sollte. Dieses Ergebnis wurde von Cohen (1962) nicht beschrieben, jedoch von Dietz et al. (2000) bestätigt. Von der Menge an Aktivität zeigte im histologischen Schnitt die Leber, gefolgt von Darm und Niere die höchsten Anfärbungen. Es konnten die vorliegenden Ergebnisse bei Untersuchungen an isolierten Mitochondrien aus Ratten und Meerschweinchenorganen bestätigt werden (Löffler et al., 1991; Schuster, 1994). In

den folgenden Jahren wurden die Methoden der Enzymisolierung aus Mitochondrien aufgrund der Herstellung von rekombinanter DHODH abgelöst (Knecht et al., 1996b).
Geringere Mengen an Enzymaktivität wurde in den pathologischen Geweben von adultem und kindlichem Nierentumor gefunden. Hier muß darauf hingewiesen werden, dass diese Organe zunächst pathologisch makroskopisch untersucht worden sind, ehe ein Einfrieren durchgeführt wurde, während in allen anderen Fällen eine sofortige Schockfrostung stattfand. Dies kann ebenfalls zu einem Verlust von Enzymaktivität führen.
Bei dem Versuch, eine Oxidaseaktivität der DHODH nachzuweisen, konnte in einigen Organen, so zum Beispiel in der Prostata, Herzmuskel, Jejunum, Colon, Ösophagus, Mamma lactans oder Speicheldrüse, eine oft homoge Braunfärbung im Gewebe beobachtet werden. Dabei handelte es sich um Gewebe, die im NBT Testverfahren eine sehr starke Reaktion hervorgerufen haben. Da die Oxidaseaktivität ungefähr 10% der Dehydrogenaseaktivität betragen soll (Lakaschus, 1993), ist diese geringe Färbung zu erklären. Da der Unterschied zu den Kontrollen deutlich war wurde zunächst angenommen, dass es sich um eine spezifische Oxidasereaktion der DHODH handelte. Diese Reaktion führte jedoch zu einer gleichmäßigen Anfärbung in allen Zellen, die ganz im Gegensatz zu dem körnigen Farbniederschlag im NBT Test stand. Eine mögliche Erklärung, die zur Entstehung solcher Resultate führte, ist die Diffusion des entstandenen H_2O_2 durch Zellen und Membrane, denn H_2O_2 ist permeabel, was durch lange Inkubationszeiten gefördert werden kann. Kontrollschnitte zeigten ebenfalls leichte etwas geringere Brauntönung, so dass es zur Entstehung von Hintergrundreaktionen gekommen ist. Diese erklären sich auch durch die Tatsache, dass im Ansatz Azid und Cyanid enthalten sind, welche die Katalase und andere H_2O_2-“Killer” hemmen. Auch positive Kernreaktionen in substrathaltigen Präparaten erhärten diese Annahme. Daneben gab es Gewebe wie Ovar, Pankreas, Groß- und Kleinhirn, bei denen keine Oxidasereaktion nachgewiesen werden konnte. Hier zeigte auch der Dehydrogenasenachweis nur geringe Anfärbungen. Aber auch die in vorangegangenen und späteren Arbeiten vorgefundene geringe Menge an Oxidaseaktivität (Lakaschus, 1993; Knecht, 1996b) weisen darauf hin, dass eventuell das Nachweisverfahren nicht empfindlich genug detektiert. Eine weitere Möglichkeit ist, dass eventuell positive Färbungen dann auftreten, wenn eine Vorschädigung des Enzyms oder seiner Umgebung stattgefunden hat. So könnten auch die langen Inkubationszeiten von 21 Stunden eine Gewebeschädigung begünstigen und damit eine Nebenreaktion beim

Oxidasenachweis fördern, die jedoch von unspezifischen schwer abzugrenzen ist. Falsche Befunde könnten ebenso durch Reaktion von endogenen Substraten mit DAB entstehen. Aufgrund dieser Überlegungen und hinsichtlich neueren Untersuchungen bei denen *in vitro* keine Oxidaseaktivität der DHO nachweisbar war, muss davon ausgegangen werden, dass diese nur in Ausnahmefällen entsteht. Beispiele dafür sind hypoxische Bedingungen oder Reoxygenierung, die zur Bildung von Sauerstoff-radikalen führen und damit Gewebeschäden hervorrufen. Unter diesen Gesichtspunkten muss auch das Ergebnis einer vorangegangenen Untersuchung betrachtet werden (Wegerle, 1993). Es wurde dort bei unter Hypoxie gehaltenen Ehrlich-Aszites-Tumor-zellen eine vermehrte Oxidaseaktivität nachgewiesen, so dass Wasserstoff nicht in die Atmungskette eingeschleust wurde, sondern mit O_2 direkt zu H_2O_2 reagierte. Positive Oxidasereaktionen, deren Anteil 15-20% der Dehydrogenaseaktivität betragen hatte, bei Untersuchungen an Ratten- und Schweineleber sowie in EAT-Zellen (Lakaschus, 1994), können ihren Ursprung in der Inhomogenität der aufgearbeiteten Mitochondrien haben, denn in späteren Arbeiten mit hochgereinigten und rekombinant hergestellten Enzymen war eine Oxidasereaktion in dieser Höhe nicht mehr beobachtet worden. Damals ist man von der Annahme ausgegangen, diese Enzymform der DHODH sei ähnlich wie jene der Kurz-Ketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase, die aus humanen Leber- und Nierengewebe gewonnen wurde (Pearse, 1972). Wasserstoffperoxid entstehe dann, wenn keine geeigneten Elektronenakzeptoren vorhanden seien. Auch die Xanthin-Dehydrogenase konnte unter hypoxischen Bedingungen in eine Oxidase umgewandelt werden und damit zur Sauerstoffradikalbildung beitragen (Engerson et al., 1987).

5. Zusammenfassung

Das Pyrimidinnucleotid Uridinmonophosphat (UMP) ist ein Grundbaustein der RNA und Ausgangssubstanz für die Bildung von Cytidin- und Thymidinnucleotiden. UTP und CTP sind essentiell für die Aktivierung von Zucker in der Zelle (UDP-Glucose, UDP-Galactose u.a.) und haben somit eine wichtige Rolle bei der Glykogensynthese und der Bildung von Glykoproteinen und Glykolipiden (CDP- Cholin für Lecithine). Für die UMP-Synthese sind in allen Zellen sechs Reaktionsschritte notwendig. Das vierte Enzym, die Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH) katalysiert die Oxidation von Dihydroorotsäure zu Orotsäure (Orotat). Im Gegensatz zu den übrigen cytosolisch lokalisierten Enzymen befindet sich die DHODH auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran und ist dort über eine hydrophobe N-terminale Proteinsequenz in der Innenmembran verankert. Der entzogene Wasserstoff wird vom Akzeptor Ubichinon übernommen und an die Atmungskette weitergeleitet. Somit ist die Pyrimidinbiosynthese obligat sauerstoffabhängig. Aus der Bedeutung des Enzyms für den Nukleinsäure-Vorstufenstoffwechsel erklärt sich das pharmakologische Interesse an der Entwicklung von klinisch relevanten Hemmstoffen. Es stehen inzwischen Inhibitoren zur Verfügung mit antiproliferativem, antimikrobiellem und antiparasitärem Wirkungsprofil, z.B. zur Behandlung von Rheumatoider Arthritis, Malaria sowie anderen Infektionskrankheiten. Ziel der Arbeit war eine umfassende, enzymhistochemische Darstellung und Charakterisierung dieser Dehydrogenase anzufertigen und mit der ebenfalls mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase zu vergleichen. Dieses geschah auch mit dem Anliegen, für die Gruppe weiteres enzymreiches Gewebe zu finden, da die Enzymreinigung aus Tierorganen nicht mit zufriedenstellender Ausbeute verlief. Zunächst wurden die optimalen Bedingungen für den DHODH- und SDH Nachweis an Gewebeschnitten erarbeitet: native Kryostatschnitte waren allen Vorfixierungsmethoden zur Strukturerhaltung für die Demonstration der Enzymaktivität weitaus überlegen. Auf die Anwendung von Redoxmediatoren (z.B. Menadion) wurde verzichtet, da diese zwar sichtbar verstärkten, aber auch eine höhere unspezifische Hintergrundfärbung verursachten. Für den Enzymaktivitätsnachweis erwies sich das Salz Nitrobluetetrazolium (NBT) als zuverlässiges Reagenz. Der bei der Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat freiwerdende Wasserstoff reduziert NBT zum wasserunlöslichen, hervorragenden Indikator, dem blauen Formazan, welches die Enzymaktivität auf dem Organschnitt markiert. Die Ergebnisse waren eindeutig und reproduzierbar.

Ausgeprägte Enzymaktivität war in stoffwechselaktiven Geweben (z.B. Leber) und in Gewebe mit hohen Proliferationsraten und aktiven Transportprozessen (z.B. Ileum- und Kolonkrypten) nachzuweisen. Die permanenten Zellerneuerung der Epidermis mit hoher Pyrimidinsynthese dürfte der Grund für die hohe Aktivität der DHODH und SDH in der Haut sein. Desweiteren zeigten sich sekretorisch tätige Organe wie Niere (distale und proximale Tubuli), Prostata und Ausführungsgangsysteme von Speicheldrüsen enzympositiv. Erwähnenswert ist die deutliche Färbung im Hoden und die nicht erwartete Enzymdarstellung in Spermatozoen. Dort wo Energie in Form von ATP benötigt wird, wurden ebenfalls hohe Enzymaktivitäten nachgewiesen. In abnehmenden Konzentrationen waren Skelett- und Herzmuskulatur sowie intestinale glatte Muskulatur blau gefärbt. In drei verschiedenen pathologischen Geweben wurde das hier zu betrachtente Enzym exemplarisch untersucht. Dabei fand sich im Gegensatz zum gesunden Nierengewebe lediglich eine schwache Enzymreaktion im Nephroblastom und im Wilms Tumor. Eine mögliche Ursache ist das nach der pathologischen Untersuchung verspätete Einfrieren des Gewebes. Um die Beobachtungen zu verifizieren, müsste eine große Anzahl von Tumoren mikroskopiert werden. Intensiver war die Anfärbung im Fibrom der Haut.

Die in der Literatur beschriebene Oxidase Aktivität der DHODH, d.h. die Übertragung des Wasserstoffs direkt auf Sauerstoff unter H_2O_2 Bildung, wurde ebenfalls geprüft. Der Nachweis beruht auf der Reaktion des Ceriumsalzes zum Cerium-Perhydroxid und dies führt anschließend zur Polymerisation von Diaminobenzidin. Das bräunliche Produkt fand sich auf vielen Organschnitten, besonders stark in Darm, Niere, Prostata und Leber, also in Geweben mit hohen Dehydrogenaseaktivität. Dies würde bedeuten, dass das Flavoenzym DHODH prinzipiell zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beitragen kann. In einigen Geweben, so in M.psoas, Ovar, Pankreas, Uterus und Nierentumor wurde keine Oxidaseaktivität nachgewiesen. Es konnte hier nicht geklärt werden, ob dies eine Eigenschaft der Gewebe, die bei langen Inkubationszeiten möglicherweise auch unterschiedlich geschädigt wurden, oder ein Problem der Nachweisgrenze war. Erstmalig wurde hier die Wirkung eines medizinisch relevanten Inhibitors auf die DHODH Aktivität direkt an tierischem und humanem Gewebe demonstriert. Dies geschah erfolgreich mittels Dehydrogenase- und Oxidase Nachweis. Brequinar befand sich zu Beginn der Untersuchungen in der klinischen Phase 2 als Zytostatikum, erlangte jedoch später aufgrund seiner geringen therapeutischen Breite und vielen Nebenwirkungen keine Zulassung.

6. Literaturverzeichnis

Altekruse, D. (1991)
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie

Altmann, F.P. (1972)
Quantitative dehydrogenase histochemistry with special reference to the pentose shunt dehydrogenases.
Progr. Histochem. Cytochem. ***4****, 225-273*

Altman, F. P., Butcher, R. G. (1973)
Studies on the reduction of tetrazolium salts. The isolation and characterisation of a half-formazan intermediate product during the reduction of neotetrazoliumchloride.
Histochemistry ***37****, 333-350*

Altmann, F.P. (1976a)
Tetrazolium salts: a consumer`s guide.
Histochemistry ***8****, 471-485*

Altmann, F.P. (1976b)
Tetrazoliumsalts and formazans.
Progr. Histochem. Cytochem., ***9***

Andersen, H., Hoyer, P.E. (1973)
Studies in succinate dehydrogenase histochemistry.
Histochemie ***35****, 173-188*

Angermüller, S., Bruder, G., Völkl, A., Fahimi, D. (1987)
Localisation of xanthinoxidase in crystalline cores of peroxidase. A cytochemical and biochemical study.
Europ. J. of Cell Biol. ***45****, 137-144*

Angermüller, S., Fahimi, D.H. (1988)
Light microscopic visualisation of the reaction product of cerium used for the localisation of peroxisomes.
J. Histochem. Cytochem. ***36,*** *23-28*

Angermüller, S., Löffler, M. (1995)
Localization of dihydroorotate oxidase in myocardium and kidney cortex of the rat.
Histochemistry ***103,*** *287-292*

Arteaga, C.L., Brown, T.D., Kuhn, J.G. (1989)
Phase 1 clinical and pharmacokinetic trial of breqiunar sodium (DUP 785; NSC 368 390).
Cancer Res. ***49****, 4648-4653*

Batt, D.G., Copeland, R.A. (1995)
Immunosuppressive structure-activity relationships of brequinar and related cinchominic acid derivates.
Bioorg. Med. Chem. Letter ***5****, 1549-1554*

Bennet, L.L., Smithers, D., Rose, L.M., Adamson, D.J., Thomas, H.J. (1979)
Inhibition of synthesis of pyrimidine nucleotides by 2-hydroxy-3-(3,3-dichloroallyl)-1,4-naphtoquinone.
Cancer Res. ***39****, 4868-4874*

Burkitt, H.G., Young, B., Heath, J.W. (1993)
Weather`s functional histology. A text and colour atlas.
3rd Edition, Churchill Livingstone.

Butcher, R.G. (1982)
J. Histochem. ***14****, 165*

Böck, P. (1989)
Mikroskopische Technik.
Urban & Schwarzenberg Verlag.

Briggs, R.T., Drath, D.B., Karnovsky, M.J. (1975)
Localisation of NADH-oxidase on surface of human polymorphonuclear leucocytes by a new cyrochemical method.
J. Cell Biol. ***67****, 566-584*

Castoldi, G.L., Yam, L.T., Mitus, W.J. (1968)
Cytochemical demonstration of dihdrooroticacid dehydrogenase in blood and bone marrow cells.
Acta Haemat. ***39,*** *203-213*

Chen, C.C., Jones, M.E. (1976)
The cellular location of dihydrooratate dehydrogenase: relation to de novo biosynthesis of pyrimidines.
Arch. Biochem. Biophys. ***176,*** *82-90*

Chen, S.F., Ruben, R.L., Dexter, D.L. (1986)
Cancer Res. ***46*** *, 5014-5019*

Collins, B.H., Areford, M.L., Fabian, M.A., Jaffee, B.B. & Bollinger, R.A. (1993)
Brequinar sodium potentiates the effect of cyclosporin in experimental small bowel transplantation.
Transplant. Proc. ***25****, 2.37*

Cramer, D.V., Chapman, F.A., Jaffee, B.D., Jones, E.A., Knoop, M.A., Hreha-Eiras, G., Makowa, L. (1992a)
The effect of a new immunosuppressive drug, Brequinar sodium, on heart, liver and kidney allograft rejection in the rat.
Transplant. ***53****, 303-308*

Cramer, D.V. (1996)
Brequinar sodium.
Transplant. Proc. ***28****, No 2, 960-963*

Cohen, R.B. (1962)
Histochemical demonstration of a dihydroorotat dehydrogenase system in tissues.
Lab. Invest ***11****, 531-537*

Cohen, R. B., Cohen, S. (1985)
Detection of dihydroorotate dehydrogenase activity as a marker of *de novo* nucleic acid synthesis in germinal centers of spleens following antigen.
Adminis. J. of Experiment. Phathol. ***3****, 171-176*

Collins, B.H., Areford, M.L., Fabian, M.A., Jaffe, B.D., Bollinger, R.R. (1993)
Brequinar sodium potentiates the effects of cyclosporine in experimental small bowel transplantation.
Transplant. Proc. ***25,*** *2. 37*

Dexter, D.L., Hesson, D.P., Ardecky, R.J., Rao, G.V., Tipett, D.L. (1985)
Activity of novel 4-quinolinecarboxylic acid, NSC 368390 (6-Fluoro-2-(2`-fluoro-1,1`-biphenyl-4-yl)-3-methyl-4-quinolinecarboxylic acid sodium salt) against experimental tumors.
Cancer Res. ***45****, 5563-5568*

Dietz, C., Hinsch., E., Löffler, M. (2000)
Immunocytochemical detection of mitochondrial dihydrorootate dehydrogenase in human spermatozoa.
Int. J. Andro. ***23,*** *294-299*

Dietz, C. (2004)
Dissertation in Niederschrift, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin.
.

Dileepan, K.N., Kennedy, J. (1985)
Complete inhibition of the dihydroorotate oxidation and superoxide by 1,1,1-trifluoro-3-thenoyleacetone in rat liver mitochondria.
Biochem. J. ***225****, 189-194*

Doerr, W., Uehlinger, E. (1966)
Spezielle pathologische Anatomie. Band 3
Niere und ableitende Harnwege.
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York

Duus, P. (1987)
Neurologisch-topische Diagnostik: Anatomie, Physiologie, Klinik.
Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Edelmann, P. (2004)
Dissertation in Niederschrift, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin.

Egger, G. (1973)
Substantive Bindungen von Tetrazoliumsalzen. (Licht- und Elektronen-mikroskopische Beobachtungen).
Acta Histochem. (Jena) ***46****, 130-135*

Eiras-Hreha, G. (1993)
Brequinar sodium: Monitoring immunosuppressive activity.
Transplant. Proc. ***25****, 2. 32*

Engersson, T.D., McKelvey, T.G., Eyssen, H.J., Mannaerts, G.P. (1987)
Conversion of xanhine dehydrogenase to oxydase in ischemic rat tissues.
Biochem. J. ***292****, 23-30*

Farber, E. (1956b)
Histochemical localization of spezific oxidative enzymes III. Tetrazolium stains for diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase and the succhinodehydrogenase system.
J. Histochem. Cytochem. ***4****, 284-294*

Fawcett, D.W. (1969)
Die Zelle.
Urban & Schwarzenberg Verlag München Berlin Wien

Fawcett, D.W. (1970)
A comparative view of sperm ultrastrucure.
Biol. Reprod. Supp. ***2,*** *90-127*

Feigl, F. (1958)
Spot tests in inorganic analysis.
Elsevier, New York.

Forman, H.J., Kennedy, J. (1977)
Purification of the primary dihydroorotate dehydrogenase (oxidase) from rat liver mitochondria.
Prep. Biochem. ***7****, 345-355*

Frederiks, W.M., Marx, F., Bosch, K.S., Van Noorden, C.J.F. (1987)
Diurnal variation in 5- nucleotidase activity in rat liver. A quantitative histochemical study.
Histochem. ***87,*** *439-443*

Friese, P. (1875)
Zur Kenntnis der gemischten Azoverbindung.
Ber. dtsch. chem. Ges. ***8,*** *1078-1080*

Frederiks, W.M., Marx, F. (1989)
Changes in acidphosphatase acitivity in rat liver after ischemia.
Histochemistry ***93,*** *161-166*

Gero, A.M., O`Sullivan, W.J. (1985)
Human spleen dihydroorotate dehydrogenase: properties and partial purification.
Biochem. Med. ***34****, 70-82*

Gossrau, R. (1964)
Tissue fraction studies.
Biochemistry J. ***92****, 179-184*

Gossrau, R. (1978)
Tetrazoliummethoden zum histochemischen Hydrolasenachweis.
Histochemistry ***58****, 203-218*

Gossrau, R., Fredriks, W.M., Van Norden, C.J.F., Frederiks, W.M. (1989)
Enhanced light microscopic visualization of oxidase activity with the cerium capture method.
*Histochemistry **92**, 349-353*

Gossrau, R., Fredriks, W.M. (1990)
Histochemistry of reactive oxygen-species (ROS)- generating oxidases in cutaneous and mucous epithelial of laboratory rodents with special reference to xanthine oxidase.
*Histochemistry **94,** 539-544*

Greene, S., Watanabe, K., Braatscz-Trulson, J., Lou, L. (1995)
Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase by the immunosuppressive agent leflunomide.
*Biochem. Pharmacol. **50,** 861-867*

Grein, K.O. (1997)
Gewinnung von Antikörpern aus Huhn und Kaninchen gegen die Dihydroorotat-Dehydrogenase des Menschen.
Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin

Grundmann, E. (1989)
Einführung in die allgemeine Pathologie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York

Gunnewig, K. (1993)
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie

Halhuber, K.J., Linß, W. (1984)
Zur Verwendungsmöglichkeit von Cer für den ultrahistochemischen Nachweis von Enzymen.
Acta Histochem. XXX, 313-317

Halhuber, K.J., Gossrau, R., Möller, U., Hulstaert, C.E., Zimmermann, N., Feuerstein, H. (1988)
The cerium perhydroxide-diaminobenzidin procedure.
*Histochemistry **90**, 289-297*

Harder, A., Haberkorn, A. (1989)
Possible mode of action of toltrazuril studies on two eimeria species and mammalian and Ascaris suum enzymes.
*Parasitol. Res. **76**, 8-12*

Herold, G. (1997)
Innere Medizin, Eine vorlesungsorientierte Darstellung.
Verlag Arzt und Information, Köln

Hines, V., Keys, L.D., Johnston, M. (1986)
Purification and properties of the bovine liver mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase.
*J. Biol. Chem. **261**, 11386-11392*

Ittard, I., Asawamahasaka, A., Barlett, M.S., Smith, J.W. & Meshnick, S.R. (1995)
Effects of atavaquone and other inhibitors on pneumocystis carinii dihydroorotate dehydrogenase.
Antimicrob. Agents Chemother. ***39,*** *325-328*

Jöckel, J. (1995)
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin.

Jöckel, J., Wendt, B., Löffler, M. (1998)
Structural and functional comparison of agents interfering with dihydroorotate, succinate and NADH oxidation of rat liver mitochondria.
Biochem. Pharmacol. ***56*** *, 1053-1060*

Jung, Ernst G. (1991)
Dermatologie.
MLP, Duale Reihe, Hippokrates Verlag Stuttgart

Jungmann, K., Katz, N. (1982)
Funcional hepatocellular heterogenity.
Hepatology ***2****, 385-395*

Karibian, D., Couchoud, P. (1974)
Dihydroorotate oxidase of *Escherichia coli* K12: purification and relation to the cytoplasmatic membrane.
Biochem. Biophys. Acta ***364****, 218-232*

Klinger, M.H.F., Halhuber K.J. (1991)
Ultrahistochemischen Nachweis von Enzymen.
Acta histochem. ***90,*** *55-63.*

Knecht, W., Köhler, R., Minet, M., Löffler, M. (1996b)
Anti-peptide immumoglobins from rabbit and chicken eggs recognise recombinant human dihydroorotate dehydrogenase and a 44-kDa protein from rat liver.
Eur. J. Biochem. ***236****, 609-613*

Knecht, W., Bergjohann, U., Gonski, S., Kirschbaum, B., Löffler, M. (1996)
Functional expression of a fragment of human dihydroorotate dehydrogenase by means of the baculovirus expression vector system, and kinetic investigation of the purified recombinant enzyme.
Eur. J. Biochem. ***240****, 292-301*

Knecht, W. (1998)
Expression, Charakterisierung und Untersuchung zur Inhibition der Dihydroorotat-Dehydrogenase des Menschen und der Ratte.
Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin.

Knecht, W., Löffler, M. (1998)
Species-related inhibition of human and rat dihydroorotate dehydrogenase by immunosuppressive isoxazol and cinchonimi acid derivates.
Biochem. Pharmacol. ***56****, 1259-1264*

Knecht, W., Löffler, M. (2000)
Redoxal as a new leadstructure of dihydoorotate dehydrogenase inhibitors: a kinetic study of the inhibition mechanism.
*FWBS Letters **467**, 27-30*

Knoche, H. (1979)
Leitfaden der histologischen Technik.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York

Kohnoe, S. (1991)
The microtiter SDS test is more advantageous than SDI test for assessing the chemosensitivity of human tumor cells.
*Anti-Cancer Drugs **2**, 145-152*

Kuhn, R., Jerchel, D. (1941a)
Tetrazoliumsalze.
*Ber. dtsch. chem. Ges. **74**, 941-948.*

Krungkrai, J., Cerami, A., Henderson, G.B. (1991)
Purification and characterization of dehydroorotate dehydrogenase from the malaria parasite *Plasmodium bergheri.*
*Biochemistry **30**, 1934-1935*

Krungkrai, J. (1995)
Purification, characterization and localization of mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase in *Plasmodium falciparum*, human malaria parasite.
*Biochem. et Biophys. Acta **1243**, 351-360*

Kunze, K.D. (1979)
Bedeutung der Redoxmediatoren für den histochemischen Nachweis von Dehydrogenasen- In: Histo- und Cytochemie dehydrierender Enzyme. Grundlagen und Problematik. *Barth; Leipzig*

Krüger, H. (1990)
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie.

Lakaschus, G. (1993)
Immuncytochemische und Enzymchemische Charakterisierung des Dihydroorotat-Dehydrogenase/Oxidase.
Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie.

Lakaschus, G., Krüger, H., Heese, D., Löffler, M. (1991)
Evidence from in vitro studies that dihydroorotat dehydrogenase may be a source of toxic oxygen species.
*Adv. Exp. Med. Biol. **309A**, 361-364*

Lakaschus, G., Löffler, M. (1992)
Differential susceptibility of dihydroorotatdehydrogenase\ oxidase to brequinar sodium in vitro.
*Biochem. Pharmacol. **43**, 1025-1030*

Leonhardt, H., Tillmann, B. (1987)
Anatomie des Menschen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

Liebermann, J., Kornberg, A. (1953)
Enzymic synthesis and breakdown of a pyrimidine, orotic acid 1. Dihydro-orotic dehydrogenase.
Biochem. Biophys. Acta. ***12****, 223-234*

Linß, W., Fanhänel, J. (1999)
Histologie, Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie.
de Gruyter Verlag, Berlin New York

Löffler, M. (1980)
On the role of dihydroorotate dehydrogenase in growth cessation of Ehrlich ascites tumor cells cultured under oxygen deficency.
Europ. J. Biochem. ***107****, 207-215*

Löffler, M. (1985)
Towards a further understanding of the growthinhibition action of oxygen eficiency: evaluation of the effect of antimycin on profliferating Ehrlich ascites tumor cells.
Exp. Cell Res. ***157,*** *195-206*

Löffler, M. (1992a)
A cytokinetic approach to determine the range of O_2-dependence of pyrimidine(deoxy) nucleotide biosynthesis relevant for cell proliferation.
Cell Prolif. ***25****, 169-179*

Löffler, M. (1992b)
The “anti-pyrimidine effect” of hypoxia and brequinar sodium (NSC 368390) is of consequence for tumor cell growth.
Biochem. Pharmacol. ***43****, 2281-2287*

Löffler, M. (1994)
Pyrimidines as pacemakers of cell proliferation at low oxygen tension a general biological principle?
Paths of Pyrmidines, an Intern. Newsletter, ***2,*** *1*-6

Löffler, M., Becker C., Wegerle, E., Schuster, G. (1996)
Catalytic enzyme histochemistry and biochemical analysis of dihydroorotate-dehydrogenase/oxidase and succinate dehydrogenase in mammalian tissues, cells and mitochondria.
Histochem. Cell Biol. ***105,*** *119-128*

Löffler, M., Jöckel, J., Schuster, G., Becker C. (1997)
Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotids.
Molec. Cell. Biochem. ***174****, 125-129*

Lojda, Z., Havrankova, E. (1975)
The histochemical demonstration of aminopeptidase with bromir dolylleucinamide
*Histochemistry **43**, 355-366*

Lojda, Z., Gossrau, R., Schiebler, T.H. (1976)
Enzymhistochemische Methoden.
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York

Loud, A.V. (1968)
A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchym cells.
*J. Cell Biol. **55**, 27-32*

Loveless, S.E., Neubauer, R.H. (1986)
Antimetastatic activity of DUP-785: a novel anticancer agent.
*Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **27**, 276*

Machado de Domenech, E., Domenech, E.C., Aoki, A., Blanco, A. (1972)
Association of the testicular lactate dehydrogenase isoenzyme with a special type of mitochondria.
*Biol. Reprod. **6**, 136-147*

Makowka, L., Sher, L.S., Cramer, v. D. (1993)
The development of brequinar as an immunosuppressive drug for transplantation.
*Immunol. Reviews **136**, 51-70*

Miller, R.W., Curry, J.R. (1969)
Mammalian dihydroorotate-ubiquinone reductase complex 2. correlation with cytochrome oxidase, mode of linkage with the cytochrome chain, and general properties.
*Can. J. Biochem. **45**, 1283-1307*

Miller, R.W. (1971)
Dihydroorotate-quinone reductase of neurospora crassa mitochondria.
*Arch. Biochem. Biophys. **146**, 256-270*

Mladenovic, V., Domljan, Z., Rozman, B., Jajic, L., Mihajlovic, D., Dordevic, J., Popovic, M., Dimitrijevic, M., Zivkovic, M., Campion, G., Musikic, P., Löw-Friedrich, I., Oed, C., Seifert, H., Strand, V. (1995)
Safty and effectiveness of leflunomide in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis (Results of a randomized, placebo-controlled, phase 2 study).
*Arthritis & Rheumatism **38**, 1595-1603*

Niemi, M., Mustakallio, K.K. (1965)
A model for NADH-tetrazolium reductase. Histochemical implication of light-induced electron transfer in NADH-ribafalvin-tetrazolium comlexes.
*Histochemie **4**, 451- 458*

Pascal, R. A., Trang, N.L., Cerami, A., Walsh, C. (1983)
Purification and properties of dihydroorotate oxidase from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei.*
*Biochem. **22**, 171-178*

Pearse, A. G. E., Hess, R. (1961)
Substantivity and other factors responsible for formazan patterns in dehydrogenase histochemistry.
*Experentia **17**, 136- **141***

Pearse, A.G.E., (1972)
Histochemistry, theoretical and applied.
3th edn., Churchill Livingstone, London

Pechmann, H.v., Runge, P. (1894a)
Oxidation der Formazylverbindungen. I.
*Ber. dtsch. chem. Ges. **27**, 323- 324*

Peters, G.J., Laurenssee, E., de Kant, E., Nadal, J.C., Pinedo, H.M. (1987)
*Invest. New Drugs **5**, 235-244*

Peters, G.J., Schwartsmann, G., Nadal, J.C., Groeningen, C.J., Vijgh, W.J.F., van der, Pinedo, H.M. (1990)
In vivo inhibition of the pyrimidine de novo enzyme dihydroorotic acid dehydrogenase by Brequinar Sodium (DUP-785; NSC 368390) in mice and patients.
*Cancer Res. **50**, 4644-4649*

Rawls, J., Knecht, W., Diekert, K., Lill, R., Löffler, M. (2000)
Requierments for the mitochondrial import and localization of dihydroorotate dehydrogenase.
*Eur. J. Biochem. **267**, 2079-2087*

Remmele, W. (1997)
Pathologie. Zweite neubearbeitetet Auflage.
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York

Riede, U.N., Schäfer, H.,E. (1995)
Allgemeine und spezielle Pathologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York

Robinson, J.M., Karnovsky, M.J., Stoward, P. J., Lewis, P.R. (1991)
Oxidases. In: Stoward P.J., Pearse AGE (eds) Histochemistry: theoretical applied 4 th edn, *Churchill Livingstone, Edinburgh,* **3**, *95-122*

Romeis, B. (1989)
Mikroskopische Technik.
17. Aufl., Urban &Schwarzenberg Verlag, Stuttgart

Ross, M.H., Reith, E.J. (1987)
Atlas der Histologie. *Schwer Verlag, Stuttgart*

.

Rotgeri, A. (1994)
Klonierung von cDNA-Klonen der Dihydroorotat-Dehydrogenase und der Cholin-Dehydrogenase aus Rattenleber.
Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin.

Rowden, G., Dean, S. (1991)
J. Electron Micros. Techn. ***18****, 121-125*

Rowland, P., Nielsen, F.S., Jensen, K.F., Larsen, S. (1997)
The crystal structure of the flavin containing enzyme dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis.*
Structure ***5****, 239-252*

Roy, A. (1992)
Nucleotide sequence of URA 1 gene of s*accahomyces cerevisiae.*
Gene ***118****, 149-150*

Rückemann, R., Fairbanks, L.D., Carrey, E.A., Hawrylowicz, C.M., Richards, D.F., Kirschbaum, B. & Simmonds, H.A. (1998)
Leflunomide inhibits pyrimidine *de novo* synthesis in mitogen-stimulated T-lymphocytes from healthy humans.
J. Biol. Chem. ***270****, 29690-29697*

Seidler, E., Kunde, D. (1971)
Ein verbesserter histochemischer Nachweis von Gewebeschädigung mit Monotetrazoliumsalzen.
Acta Histochem. ***39****, 148-1*

Seidler, E., Hecht, A. (1978)
Die Eignung verschiedener Ditetrazoliumsalze als Reduktionsindikatoren in der Enzymhistochemie.
Acta Histochem. 61, 48-52

Seidler, E., Wohlrab, F., Kunze, K. D. (1979)
Quantifizierung der histochemischen Nachweise dehydrierender Enzyme Grundlagen und Problematik.
Verlag *Barth, Leipzig*

Seidler, E. (1979)
Zum Mechanismus der Tetrazoliumsalzreduktion und Wirkungsweise der Phenazinmethosulfates.
Acta Histochem. ***65****, 209-218*

Seidler, E. (1991)
The tetrazolium-formazan system: design and histochemistry.
Progr. Histochem. ***84****, 227-234*

Schiebler, T.H., Peiper, U., Schneider, F. (1986)
Histologie, Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie.
(nach Junqueira, L.C., Carneiro, J.: Basic Histoloy)
Springer Verlag, Berlin Heidelberg

Schmidt-Matthiesen, H. (1992)
Gynäkologie und Geburtshilfe.
Schattauer Verlag, Stuttgart New York

Schneider, V. (2000)
Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin.

Schuster, G. (1994)
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin.

Seidler, E. (1973)
Charakterisierung der NADH2-Lipoamid-Dehydrogenase als Tetrazoliumreductase.
Acta Histochem. ***47****, 30-41*

Severin, E. (1987)
Die halbautomatische Messung der Redoxaktivität in Einzelzellen mit einem fluoreszierenden Formazan.
Acta Histochem. (Jena) ***31****, 169-176*

Severin, E., Seidler, E. (1992)
Calibration of a flow cytometric assay of Glucose-6-Phosphatase dehydrogenase activity.
Cytometry ***13****, 322-326*

Shoaf, W.T., Jones, M.E. (1973)
Uridylic acid synthesis in Ehrlich ascites carcinoma. Properties, subcellular distribution, and nature of enzyme complexes of the six biosyntetic enzymes.
Biochem. ***12****, 4039-4051*

Simon , P., Townsend, R.M., Harris, R.R., Jones, E.A., Jaffee, B.D. (1993)
Brequinar sodium: inhibition of dihydroorotic acid dehydrogenase, depletion of pyrimidine pools and consequent inhibition of immune functions *in vitro*.
Transplant. Proc. ***25****, 2, 77*

Stellmach, J. (1984)
Fluorescent redox dyes.
Histochemistry ***80****, 137-143*

Stevens, A., Lowe, J. (1999)
Lehrbuch der Histologie.
VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Stoward,P.J., Pearse, A.G.E. (1991)
Histochemistry. Theoretical and Applied Volume 3 enzyme Histochemistry.
Churchill Livingstone, Edingburgh

Suttle, D.P., Becroft, D.M.O, Webster, D.R. (1989)
Heriditär orotic aciduria and other disorders of pyrimidine metabolism.
In: CR Scriver, Al Beaudet, Sly, W.S., Valle, D. (eds), The metabolic Basis of Inherited Disease.
Mc Graw-Hill, London, 1095-1126

Stevens A., Lowe J. (1992)
Histologie.
VHC, Weinheim

Stellmach , E., Stellmach, J. (1984)
Impulscytofluorometrie der Redoxaktivität von Einzelzellen mit einem neuen fluoreszierenden Formazan.
Acta Histochem. ***75****, 101-105*

Stryer, L. (1996)
Biochemie.
Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg

Taylor, M.L., Eames, W.H., Taylor, C.D. (1971)
Biosynthetic dihydroorotate dehydrogenase from *Lactobacillus bulgaricus.*
J. Bacteriol. ***105****, 1015-1017*

Thomas, C., Sandritter, W. (1986)
Histopathologie. Lehrbuch und Atlas für die Kurse der allgemeinen und speziellen Pathologie.
Schattauer Verlag, Stuttgart New York

Van Noorden, C.J.F. (1984)
Histochemistry and cytochemistry of Glucose-6-Phosphate dehydrogenase.
Progr. Histochem. Cytochem. ***15****, 1-85*

Van Noorden, C.J.F., Butcher, R.G. (1984)
Histochemical localization of NAD(P)- dependent dehydrogenase activity with four different tetrazolium salts.
J. Histochem. Cytochem. ***32****, 998-1004*

Van Noorden, C.J.F., Jonges, G.N. (1987)
Quantification of the histochemical reaction for alkaline phosphatase activity using the indoxyl-tetranitro-BT method.
Histochem. J. ***19****, 94-102*

Van Noorden, C.J.F. (1988)
On the role of oxygen in dehydrogenase reactions using tetrazolium salts.
Histochem. J. ***20****, 587-593*

Voet, D., Voet, J.G. (1992)
Biochemie.
VCH Weinheim

Wegerle, E. (1993)
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin.

Wenk, H. (1970)
Beitrag zum histochemischen Nachweis pyridinnukleotid-abhängiger Dehydrogenasen; der Einfluß von Coenzym und Phenazinmethosulfat auf die histotopochemische Lokalisation.
Acta Histochem. ***37****, 379-396*

Wohlrab, F., Fuchs, U. (1967)
Nichtenzymatische TNBT-Färbung von Gewebestrukturen. Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen.
*Histochemie **9**, 256-268*

Wohlrab, F., Seidler, E., Kunze K.D. (1979)
Histo- und Zytochemie dehydrierender Enzyme, Grundlagen und Problematik.
Verlag Barth , Leipzig

Wenk, H. (1970)
Beitrag zum histochemischen Nachweis pyridinnukleotid- abhängiger Dehydrogenasen der Einfluß von Coenzymen und Phenazinmethosulfat auf die histotopochemische Lokalolisation.
*Acta Histochem. **37**, 379-396*

Weiss, L. (1983)
Histology, Cell and Tissue Biology.
Fifth Edition, The mammillan Press

Zameitat, E., (2001)
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin.

7. Anhang

Curriculum vitae

Name:	Cornelia Becker- Hintermeier, geb. Becker
Geboren am:	03.04.1964 in Marburg/ Lahn
Eltern:	Karl Becker
	Monika Becker, geb. Fink
Familienstand:	verheiratet, zwei Kinder

Schulausbildung

1970 - 1971	Grundschule Oberweimar
1971 – 1974	Grundschule Niederweimar
1974 – 1980	Friedrich- Ebert Realschule in Marburg, mittlere Reife
1980 – 1983	Elisabethschule in Marburg, Juni 1983 Abitur

Berufsausbildung und Tätigkeit

Okt. 1983 – Aug. 1984	landwirtschaftliches Praktikum
Sept. 1984 – Sept. 1986	Ausbildung zur medizinisch- technischen Laboratoriums-assistentin in Marburg
Jan. 1987 – Dez. 1990	Tätigkeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie (Prof. Dr. med. Aumüller) in Marburg
Okt. 1987 - Nov. 1994	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg
Jan. 1995 – Juni 1996	Ärztin im Praktikum der Chirurgischen Abteilung des Kreis-krankenhauses Frankenberg/ Eder
seit Juli 1996	Assistenzärztin der Inneren Abteilung des Kreiskranken-hauses Frankenberg/ Eder
Juni 1998 – April 2000	Erziehungsurlaub
Feb. 2002 – Feb. 2005	Elternzeit

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Aziz, Beato, Daume, Emons, Fruhstorfer, Ganz, Gemsa, Glanz, Golenhofen, Gressner, Griss, Hartmann, Havemann, Hilgermann, Huffmann, Kern, Kleinsasser, Klenk, Koop, Kretschmer, Kuni, Lange, Lauer, Löffler, Lorenz, Mannheim, Massarat, Memel, Neumann, Neurath, Oepen, Pfab, Pflüger, Priebe, Prinz, Rothmund, Schmitz-Moormann, Schulz, Schneider, Schwerk, Sigrist, Slenczka, Wagner, Wesemann, von Wichert, Zelder.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in den Instituten für Physiologische Chemie sowie Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Monika Löffler durchgeführt.

Zunächst möchte ich mich vielmals bei Frau Prof. Dr. M. Löffler für die Überlassung des Themas, ihre engagierte Betreuung und geduldige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Aumüller bedanke ich mich herzlich für die Hilfe beim Photografieren der histologischen Präparate und die Ermöglichung, alle histologischen Untersuchungen in seinem Labor am Institut für Anatomie und Zellbiologie durchführen zu können.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Aumüller danke ich für die nützlichen Anregungen und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere Herrn Dr. U. Rausch für die Beurteilung der histologischen Schnitte, Herrn M. Dreher für die Unterstützung bei der Fixierung und Anfertigung der Präparate, Frau I. Dammshäuser und Frau C. Keppler für ihre Tipps bezüglich der Photoaufnahmen.

Meinem Mann Rolf und meinen Kindern Anna und Philipp möchte ich für die Aufmunterung, Geduld und die Ablenkung während der Fertigstellung der Arbeit danken.

Auch meinen Eltern Monika und Karl Becker möchte ich tiefen Dank aussprechen für ihre immerwährende Hilfe und Unterstützung während meiner Ausbildung.

Diese Arbeit wurde durch Bereitstellung von Sachmitteln aus der P.E. Kempkes-Stiftung und W. Sander Stiftung ermöglicht.

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin in Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Enzymhistochemischer Nachweis der Dihydroorotat-Dehydrogenase/Oxidase in verschiedenen Säugerorganen."

im Institut für Physiologische Chemie unter Leitung von Frau Prof. Dr. Monika Löffler ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.
Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 22. 06. 2004

Vorspann zur Zusammenfassung

1. **Engeres Fachgebiet**: Histochemie, Physiologische Chemie

2. **Name, Vorname**: Becker-Hintermeier, Cornelia

3. **geboren am:** 03.04.1964 **in**: Marburg/ Lahn

4. **Titel der Dissertation**: „Enzymhistochemischer Nachweis der Dihydroorotat-Dehydrogenase/Oxidase in verschiedenen Säugerorganen“.

4. **letzte besuchte Schule**: Elisabethschule **in:** Marburg/Lahn

6. **Reifeprüfung am:** 01.06.1983

7. **Studiengang:** Humanmedizin, 14 Semester in Marburg/Lahn

8. **Staatsexamen am:** 23.11. 1994

9. **Promotion:** Dr. med.

10. **Referentin:** Prof. Dr. Monika Löffler

11. **Correferent:**

Personalbogen

Name, Vorname:	Becker-Hintermeier, Cornelia, geb. Becker
Geboren:	am 03.04.1964 in Marburg/ Lahn
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Anschrift:	Auf der Beune 11, 35096 Oberweimar
Telefonnummer:	06421/ 78809
Vorbildung:	Elisabethschule in Marburg
Reifezeugnis am :	01.06.1983
Angenommen als Doktorandin am:	04.06.1992
ärztliche Abschlußprüfung am:	23.11.1994
Studiengang:	14 Semester Humanmedizin in Marburg/Lahn

Titel der Dissertation:

„Enzymhistochemischer Nachweis der Dihydroorotat-Dehydrogenase/ Oxidase in verschiedenen Säugerorganen.“

Universität:	Philipps- Universität Marburg /Lahn
Dekan:	Prof. Dr. B. Maisch
Referent:	Frau Prof. Dr. M. Löffler

Gesuch

Cornelia Becker-Hintermeier
Auf der Beune 11
35096 Oberweimar

An den Herrn Dekan
des Fachbereichs Humanmedizin
Herrn Prof. Dr. Maisch
Baldingerstraße
35033 Marburg

GESUCH: hiermit bitte ich um Zulassung zur Promotion zur Dr. med.

Meinem Gesuch füge ich folgende Unterlagen bei:

1. Personalbogen
2. Lebenslauf
3. Reifezeugnis
4. Das Zeugnis über das an einer deutschen Universität bestandene medizinische Staatsexamen.
5. Ehrenwörtliche Erklärung
6. Polizeiliches Führungszeugnis
7. Studienbuch
8. 10 x Zusammenfassung geheftet mit dem Vorspann
9. Bezahlung der Promotionsgebühr erfolgt nach Zahlungsaufforderung durch das Dekanat.
10. Dissertation