

Aus dem Institut für Physiologische Chemie des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Komissarischer Leiter: Prof. Dr. Jan Koolmann

AG Molekulare Enzymologie: Frau Prof. Dr. Monika Löffler

# **ENZYMHISTOCHEMISCHER UND IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DER DIHYDROOROTAT-DEHYDROGENASE IM ZNS**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
dem Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Christian Michael Schaefer**

aus Kirchen

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps -Universität Marburg am: 29.01.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Monika Löffler

1. Korreferent: Prof. Dr. Dr. Andreas Neff

Teile der Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht:

**REGION-SPECIFIC DISTRIBUTION OF DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE  
IN THE RAT CENTRAL NERVOUS SYSTEM POINTS TO PYRIMIDINE *DE NOVO*  
SYNTHESIS IN NEURONS.**

Ch.M. Schaefer,<sup>1</sup> M.K.H. Schäfer,<sup>2</sup> and M. Löffler<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Physiological Chemistry, <sup>2</sup> Institute of Anatomy and Cell Biology,  
Philipps-Universität, Marburg, Germany.*

Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, eingereicht am 17. August 2009

Internationaler Tagungsvortrag:

**REGION-SPECIFIC DISTRIBUTION OF DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE  
(DHODH) IN THE RODENT CNS.**

Ch.M. Schaefer,<sup>1</sup> M.K.H. Schäfer,<sup>2</sup> and M. Löffler<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Physiological Chemistry, <sup>2</sup> Institute of Anatomy and Cell Biology,  
Philipps-Universität, Marburg, Germany.*

13th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, PP09, Stockholm, 21 – 24. Juni  
2009

## Inhaltsverzeichnis

## Seite

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die <i>de novo</i> Pyrimidinsynthese	1
1.2 Die Dihydrorotat-Dehydrogenase	3
1.3 Die Succinat-Dehydrogenase	5
1.4 Die Bedeutung von Inhibitoren der DHODH und des Pyrimidinstoffwechsels	6
1.5 Nachweis der Dehydrogenaseaktivität mit dem Tetrazolium-Formazan-System	8
1.6 Grundbegriffe der Zytologie und Histologie des zentralen Nervensystems	9
1.6.1 Das Neuron	10
1.6.2 Die zentralen Gliazellen	10
1.7 Zielsetzung	13
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial	14
2.1.1 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	14
2.1.2 Enzymhistochemischer-Nachweis mittels NBT-Reaktion	15
2.1.3 Immunhistochemischer Nachweis auf fixierten Gewebeschnitten	16
2.1.4 Inhibitoren der DHODH	18
2.1.5 Verbrauchsmaterial	18
2.1.6 Geräte und Hilfsmittel	18
2.2 Vorbereitung der Objektträger für Kryoschnitte – Silanisierung der Objektträger	19
2.3 Organentnahme für histochemische Untersuchungen	19
2.4 Herstellung von Kryoschnitten	20
2.5 Verwendete Antikörper	20
2.6 Proteingewinnung, -aufbereitung und -bestimmung	21
2.6.1 Proteingewinnung aus ZNS-Gewebe	21
2.6.2 Proteinaufbereitung und Konzentrierung	21
2.6.3 Proteinbestimmung	21
2.7 Immunchemischer Nachweis der DHODH mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese und Western Blot	22
2.7.1 Herstellung der Gele	22
2.7.2 Gelelektrophorese	23
2.7.3 Proteintransfer auf die Immobilon-Membran	23

2.7.4	Antikörper-Inkubation	24
2.7.5	ECL-Reaktion und Entwicklung des Röntgenfilms	24
2.8	Aktivitätsnachweis der DHODH	24
2.8.1	Die Inkubationskammer	24
2.8.2	Verifizierung und Optimierung der Versuchsmethodik	25
2.8.3	Standard-Durchführung der enzymhistochemischen Tests	26
2.9	Wirkung von Inhibitoren auf die DHODH	27
2.10	Wirkung von Redoxal und UID1 auf die Succinat-Dehydrogenase	29
2.11	Färbung der ZNS-Schnitte	30
2.12	Fotografie der ZNS-Schnitte	31
2.13	Immunhistochemischer Nachweis der DHODH auf Leber- und ZNS-Schnitten	31
2.13.1	Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode)	31
2.13.2	Durchführung	32
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1	Immunchemischer Nachweis der DHODH mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	34
3.1.1	Überprüfung und Optimierung der Methodik	34
3.1.2	Immunchemischer Nachweis der DHODH in Rattenleberextrakten	39
3.1.3	Immunchemischer Nachweis der DHODH im ZNS adulter Ratten	40
3.2	Nachweis der DHODH-Aktivität auf Kryoschnitten des ZNS mittels NBT-Technik	44
3.2.1	Optimierung der Versuchsmethodik	44
3.2.2	Verteilungsmuster der DHODH-Aktivität im ZNS	45
3.2.3	Zusammengefasste Erkenntnisse des enzymhistochemischen DHODH-Nachweises mittels NBT/Formazan-Reaktion	62
3.3	DHODH-Aktivität in Gegenwart von Inhibitoren	63
3.3.1	Leflunomid	63
3.3.2	Brequinar	65
3.3.3	Redoxal	67
3.3.4	Atovaquone	68
3.3.5	Dichloroallyl-Lawsone	70
3.3.6	UID1	71
3.3.7	Zusammenfassung der histochemischen Befunde	72
3.4	Untersuchung des inhibitorischen Potenzials von UID1 und Redoxal auf die Succinat-Dehydrogenase	73

3.5	Ergebnisse des immunhistochemischen DHODH-Nachweises	75
3.5.1	Unterschied zwischen der normalen und der mittels Tyramid verstärkten ABC-Methode zum Nachweis der DHODH	75
3.5.2	Der immunhistochemische Nachweis der DHODH in ausgewählten Hirnregionen	77
3.5.3	Abschließende Beurteilung der histochemischen und immunhistochemischen Ergebnisse	84
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>85</b>
4.1	Methodik	85
4.1.1	Die Wahl des Fixationsverfahrens	85
4.1.2	Einsatz von Redoxmediatoren	86
4.1.3	Farbgebung der NBT-Reaktion	87
4.1.4	Das Tiermodell Ratte	88
4.2	Betrachtung der Ergebnisse	90
4.2.1	Interpretationsansätze	90
4.2.2	Kritische Beurteilung	96
4.2.3	Darstellung des Stoffwechsels von Neuronen und Astrozyten unter Berücksichtigung des Pyrimdinstoffwechsels	100
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>103</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>105</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>119</b>

## 1. Einleitung

Pyrimidine sind lebensnotwendige Bestandteile von Zellen, ihres Stoffwechsels und ihrer Proliferation. Neben zahlreichen weiteren Funktionen (siehe 1.4 Die Rolle der Pyrimidine im ZNS), sind Pyrimidinnukleotide neben den Purinnukleotiden wesentliche Grundbausteine für DNA und RNA, eine Tatsache, die ihre zentrale metabolische Rolle unterstreicht. So werden für die RNA-Biosynthese die Pyrimidinnukleotide CTP und UTP benötigt; für die Synthese von DNA benötigt die Zelle die Desoxyribonukleotide dCTP und dTTP.

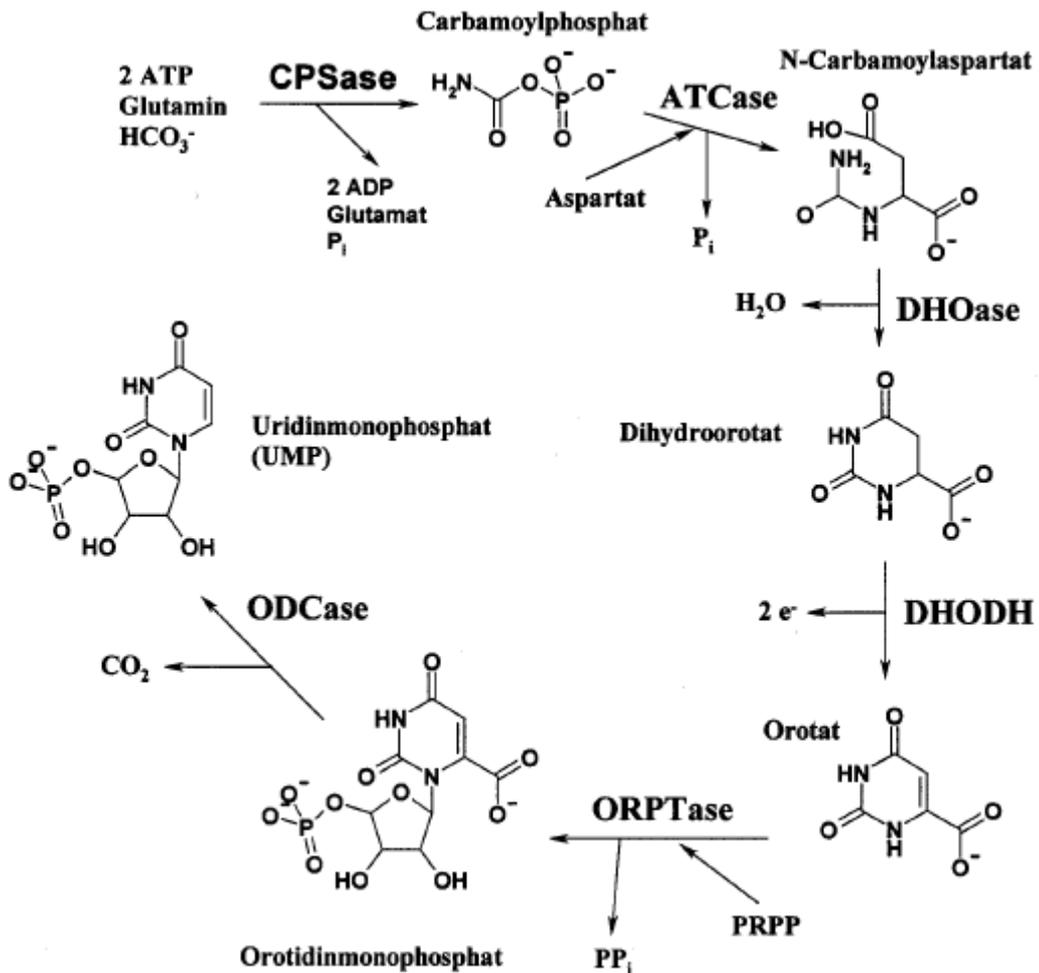
Um eine dauerhafte Versorgung mit Pyrimidinen zu gewährleisten, verfügt der menschliche Organismus über zwei Möglichkeiten der Pyrimidinbiosynthese: Einerseits können Pyrimidine aus intrazellulärem Abbau von Nukleinsäuren oder der Nukleosidaufnahme aus dem Blut wiedergewonnen werden (salvage-pathway). Andererseits sind Zellen zur *de novo* Pyrimidinsynthese, das heißt zum Neuaufbau der Ausgangssubstanz aller Pyrimidine, Uridin-5'-Monophosphat, befähigt.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH) ist das vierte Enzym der angesprochenen Pyrimidin-Neusynthese.

### 1.1 Die *de novo* Pyrimidinsynthese

Die *de novo* Biosynthese des Uridin-Monophosphats (UMP) ist ein sechsschrittiger Syntheseweg, dessen 4. Schritt durch die Dihydroorotat-Dehydrogenase katalysiert wird. Die Schritte der Neusynthese des UMP laufen folgendermaßen ab (siehe Abb. 1.1): Ausgangsstoffe sind Glutamin, zwei Moleküle ATP und  $\text{HCO}_3^-$ . Sie werden von der Carbamoylphosphat-Synthetase zu Carbamoylphosphat umgesetzt. Hierbei entstehen 2 Moleküle ADP, Glutamat und ein anorganisches Phosphat. Im zweiten Schritt wird Carbamoylphosphat unter Abspaltung eines anorganischen Phosphatrestes durch die Aspartat-Transcarbamoylase mit Aspartat verknüpft. Dieser Reaktion, deren Produkt N-Carbamoyl-Aspartat ist, ist die Schrittmacherreaktion der UMP *de novo* Synthese. Die dritte Reaktion (eine Gleichgewichtsreaktion) wird von der Dihydroorotase beschleunigt: N-Carbamoylaspartat zyklisiert nach Wasserabspaltung zu Dihydroorotat. Die ersten 3 Enzyme ((1) Carbamoylphosphat-Synthetase, (2) Aspartat-Transcarbamoylase und (3) Dihydroorotase) bilden das Multienzym-Protein CAD, welches cytosolisch lokalisiert ist. Wie bereits erwähnt, ist die Carbamoylphosphat-Synthetase-Aktivität des multifunktionellen Proteins CAD der wichtigste Kontrollpunkt zur Regulation der

Pyrimidinbiosynthese. Insgesamt führt eine per Phosphorylierung der CPSase herbeigeführte Konformationsänderung zu einer Beschleunigung der Pyrimidinbiosynthese. Grund dafür ist, dass die Aktivierbarkeit der CPSase durch PRPP (Phosphoribosyl-Pyrophosphat) in der phosphorylierten Form deutlich erhöht, die Hemmbarkeit durch UTP deutlich erniedrigt ist. Die Bindung von UTP an CAD bewirkt über eine Erhöhung der Michaelis-Konstante für ATP eine herabgesetzte ATP-Affinität des Enzyms. Die Geschwindigkeit der Pyrimidin-Biosynthese wird somit gedrosselt.



**Abb. 1.1 Die *de novo* Pyrimidinsynthese.** CPSase: Carbamoylphosphat-Synthetase, ATCase: Aspartat-Transcarbamoylase, DHOase: Dihydroorotase, DHODH: Dihydroorotat-Dehydrogenase, ORPTase: Orotat-Phosphoribosyl-Transferase, PRPP: Phosphoribosyl-Pyrophosphat, ODCase: Orotidinmonophosphat-Decarboxylase, aus Knecht (1998)

Im vierten Reaktionsschritt wird nun das Dihydroorotat von der Dihydroorotat-Dehydrogenase zu Orotat oxidiert. Die hierbei frei werdenden Elektronen werden über Ubichinon in die Atmungskette eingeschleust [Miller et al. 1968]. Die Oxidation von

Dihydroorotat zu Orotat ist der einzige Reaktionsschritt der Pyrimidinbiosynthese, der aufgrund der Lokalisation der DHODH mitochondrial stattfindet.

An das Orotat wird durch die Orotat-Phosphoribosyl-Transferase die Ribosephosphateinheit aus dem PRPP gekoppelt. Es entsteht Orotidinmonophosphat (OMP) und ein Pyrophosphat, das sofort hydrolytisch gespalten wird. Angetrieben durch diese Hydrolyse des Pyrophosphates, findet die Rückreaktion vom Orotat zum DHO physiologisch nicht statt. Das OMP wird zum Schluss durch die Orotidylat-Decarboxylase irreversibel zu UMP decarboxyliert. Das aus der Neusynthese entstandene Uridin-Monophosphat (UMP) ist das zentrale Zwischenprodukt der Pyrimidinbiosynthese. Es dient als Vorstufe für alle weiteren Nukleotide und Desoxynukleotide. Zunächst wird durch zweimalige Phosphorylierung des UMPs Uridin-Triphosphat (UTP) synthetisiert, um sodann mittels der Cytidin-Triphosphat-Synthase aus UTP Cytidin-Triphosphat (CTP) herzustellen. Das für die DNA-Synthese benötigte Desoxythymidintriphosphat (dTTP) wird in mehreren Schritten aus UDP synthetisiert.

Störungen der *de novo* Pyrimidinsynthese können zu ausgeprägten Krankheitsbildern führen. Ein Beispiel stellt die autosomal rezessiv vererbte Orotat-Azidurie dar, die auf einem Mangel an Uridin-5'-Monophosphat-Synthase (UMP-Synthase) beruht. Die UMP-Synthase ist ein bifunktionales Protein, welches die Aktivitäten der letzten beiden Enzyme der Pyrimidin-Neusynthese (Orotat-Phosphoribosyl-Transferase und Orotidinmonophosphat-Decarboxylase) einschließt [Kuilenburg et al., 2000]. Das klinische Bild dieser Erkrankung zeichnet sich unter anderem durch eine megaloplastische Anämie, eine Kristallurie und in einigen Fällen durch eine Harnleiterobstruktion aus [Löffler et al., 2005]. Die Behandlung des UMP-Synthase-Mangels besteht in der lebenslangen oralen Einnahme von Uridin.

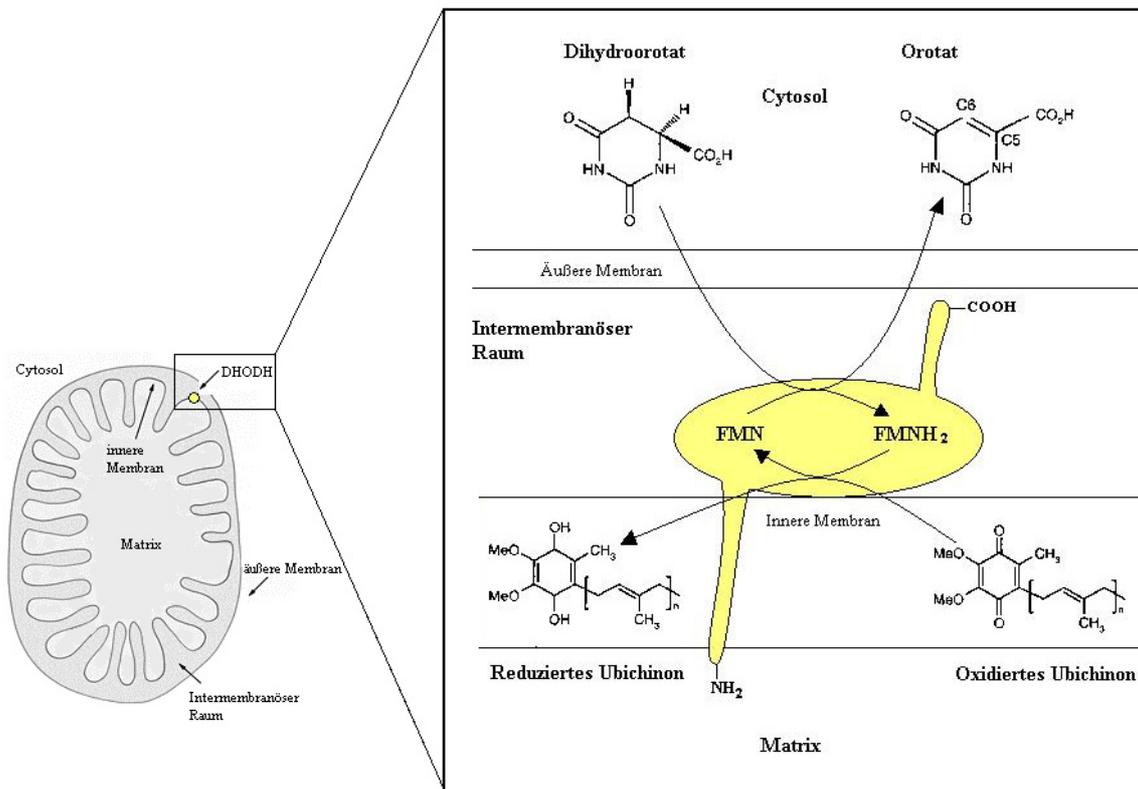
## 1.2 Die Dihydroorotat-Dehydrogenase

Wie unter 1.1 dargestellt, katalysiert die DHODH [EC 1.3.99.11] die Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat. Die DHODH nimmt im Rahmen der *de novo* Pyrimidinsynthese in zweierlei Hinsicht eine Sonderrolle ein. Zum einen handelt es sich beim DHODH-katalysierten Reaktionsschritt um die einzige Redoxreaktion im Biosyntheseweg des Uridinmonophosphat, zum anderen unterscheidet sich die DHODH durch ihre Lokalisation in der inneren Mitochondrienmembran von den übrigen (cytosolisch lokalisierten) Enzymen der *de novo* Pyrimidinsynthese.

**Lokalisation der DHODH**

In Eukaryonten ist die DHODH das einzige membranständige, mitochondriale Enzym der Pyrimidinsynthese. Lediglich einige Hefen (z.B. die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*) stellen mit ihrer löslichen DHODH eine Ausnahme dar [Nagy et al., 1992, Gojkovic et. al., 2004, Zameitat et al., 2007].

Die Lage der DHODH auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran [Chen und Jones, 1976] und die funktionelle Verbindung zur Atmungskette via Ubichinon, sichert die effiziente Oxidation von Dihydroorotat. Folglich ist die Pyrimidinbiosynthese obligat sauerstoffabhängig [Löffler, 1980, Löffler et al., 1997]. Als Konsequenz wird die Pyrimidinsynthese Schrittmacher für Zellwachstum und Proliferation, wenn das Sauerstoffangebot herabgesetzt ist [Löffler, 2004].



**Abb. 1.2 Lage der DHODH von höheren Eukaryonten und Darstellung der durch das Enzym**

**katalysierten Redoxreaktion.** Die linke Bildhälfte zeigt ein Mitochondrium in der Übersicht. Auf der rechten Seite ist der umrahmte Abschnitt des Mitochondriums herausvergrößert und stellt Lage wie Reaktionsmechanismus der DHODH dar: Die DHODH – lokalisiert auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran – oxidiert Dihydroorotat zu Orotat. Dabei wird der Cofaktor Flavinmononucleotid (FMN) reduziert. Dieser wird unter Reduktion von Ubichinon reoxidiert. Über Ubichinon werden die Elektronen in die Atmungskette eingeschleust.

Weitere Untersuchungen präzisierten die Topologie der DHODH. Angermüller und Löffler (1995) wiesen in einer elektronenmikroskopischen Studie die DHODH-Aktivität auf der Innenseite der inneren Mitochondrienmembran nach. Da das Enzym unter bestimmten experimentellen Bedingungen statt Ubichinon  $O_2$  als Elektronenakzeptor verwenden kann, gelang der Aktivitätsnachweis mit der Cerium-Technik (Angermüller 1989, Angermüller und Löffler 1995), die auf dem Nachweis des gebildeten  $H_2O_2$  beruht. Später konnte in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine N-terminale, zweiteilige Signalsequenz für den Import und die korrekte Insertion in die innere Mitochondrienmembran zuständig ist [Rotgeri und Löffler, 1994]. Eine für die Katalyse essentielle Aufgabe dieser Sequenz wurde jedoch von Rawls et al. (2000) ausgeschlossen, da sie in Bakterien und manchen Hefen nicht vorhanden ist. In Untersuchungen an Mitoplasten (Mitochondrien mit fragmentierter äußerer Membran) der Rattenleber war die DHODH für den Verdau von Proteasen zugänglich. Rawls et al. (2000) und Knecht (1998) vermuteten daher den größten Teil des Proteins auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran. Weiterhin gilt es festzuhalten, dass der N-Terminus zur Mitochondrienmatrix gerichtet und das Enzym mit dem anschließenden hydrophoben Transmembransegment in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist (vergleiche Abbildung 1.2).

### 1.3 Die Succinat-Dehydrogenase

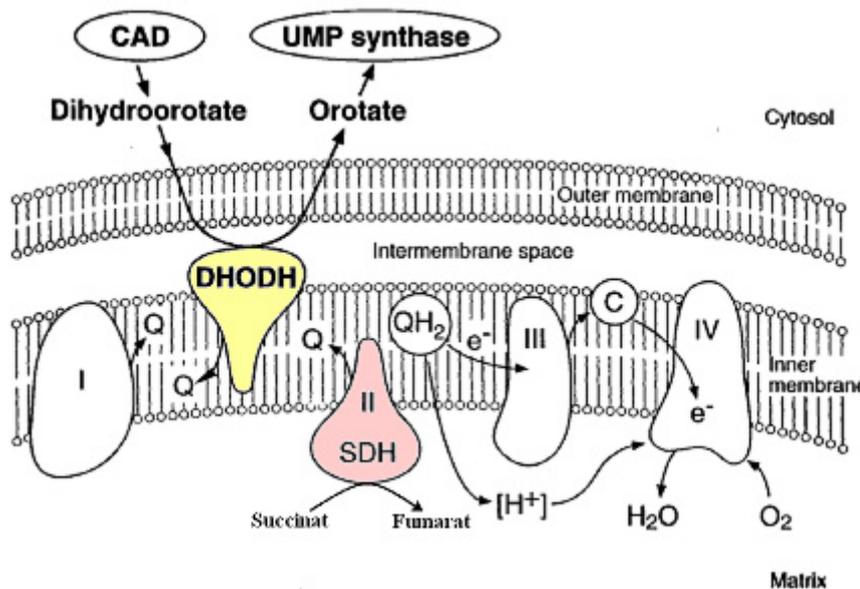


Abb. 1.3 Lokalisation der DHODH und der SDH in der Mitochondrien-Membran sowie ihr Bezug zur Atmungskette. In Anlehnung an Becker, 2004.

Da in den Untersuchungen zur Auswirkung von Hemmstoffen sowie in Versuchen zur Überprüfung der NBT-Methodik das Enzym Succinat-Dehydrogenase (SDH) zum Vergleich in dieser Arbeit herangezogen wurde, soll an dieser Stelle eine kurze Darstellung seiner Lokalisation und Funktion erfolgen.

Die SDH katalysiert den 6. Schritt des Citratzyklus, in dem Succinat zu Fumarat oxidiert wird. Ebenso wie die DHODH, nimmt die SDH bezüglich ihrer Lage eine gewisse Sonderstellung ein. Im Gegensatz zu den übrigen Enzymen des Citratzyklus, ist die SDH integraler Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran. Aus diesem Grund ist sie auch als Komplex II der Atmungskette bekannt. Elektronenakzeptor des FAD-haltigen Enzyms ist, ähnlich der DHODH, das Ubichinon.

#### 1.4 Die Bedeutung von Inhibitoren der DHODH und des Pyrimidinstoffwechsels

Die klinische Bedeutung der DHODH nahm in den letzten beiden Jahrzehnten mit der Entwicklung von Wirkstoffen, deren Angriffspunkt eben dieses Enzym darstellt, zu. Hierbei zeigten DHODH-Hemmstoffe vielversprechendes Potenzial als Immunsuppressiva, da besonders rasch proliferierende Zellen (z.B.: aktivierte Lymphozyten) auf die *de novo* Synthese von Pyrimidinen angewiesen sind. Die Aktivierung eines Lymphozyten geht mit der Expansion des zellulären Pyrimidinnukleotidgehaltes einher. Folge ist ein erhöhter Bedarf an Pyrimidinen, der nicht allein durch den salvage-pathway gedeckt werden kann [Rückemann et al., 1998]. Weitere klinische Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der DHODH-Inhibitoren. Dass die Pyrimidinbiosynthese ein wichtiges Angriffsziel für chemotherapeutische Interventionen ist, wird bei der Behandlung der menschlichen Malaria deutlich. Hier gelingt mit Antipyrimidinwirkstoffen (z.B. Atovaquone, Handelsname Malarone®) eine Bekämpfung des Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum*. Der Grund für die hohe Sensibilität von *Plasmodium falciparum* für DHODH-Inhibitoren wird damit begründet, dass der Malaria Parasit nicht über die für den Pyrimidin-salvage-pathway kodierenden Gene verfügt. Folglich ist er vollständig von der *de novo* Pyrimidinsynthese abhängig [Baldwin et al., 2002].

Gleiches gilt für den vor ca. zwanzig Jahren entdeckten *Helicobacter pylori*, der heute für peptische Ulzera und Magenkrebs verantwortlich gemacht wird. Das Magensäure tolerierende Bakterium ist ebenfalls vollständig auf die Pyrimidin-Neusynthese angewiesen, da es nicht über die Schlüsselenzyme des salvage-pathways verfügt [Copeland et al., 2000]. Diese Abhängigkeit ist im menschlichen Organismus aufgrund der Fähigkeit, Pyrimidine zu recyceln, nicht gegeben. Nur sich sehr schnell teilende menschliche Zellen scheinen von der *de novo* Pyrimidinsynthese in lebensnotwendiger Form abhängig zu sein. Daher bietet

die DHODH, neben anderen Enzymen des Pyrimidinstoffwechsels, einen geeigneten Angriffspunkt für die Therapie von Autoimmunerkrankungen und Krebs. In Rahmen der Krebstherapie muss insbesondere das Pyrimidinderivat 5-Fluoruracil (5-FU) genannt werden. Vor ca. 20 Jahren konnte erstmals ein Überlebensvorteil für Patienten mit Kolonkarzinom demonstriert werden, welche adjuvant mit 5-FU behandelt wurden. Da manche Krebsarten, wie z.B.: Kolorektaler Krebs, nur gering auf eine alleinige Therapie mit 5-FU ansprachen [Fleming et al., 1996], wurde in den vergangenen Jahrzehnten nach verschiedenen Möglichkeiten gesucht, die Wirkung von 5-FU zu verstärken. Eine Möglichkeit wurde von Fleming et al. (1996) vorgestellt: Demnach kann mit gleichzeitiger Gabe von sogenannten modulierenden Stoffen, wie N-(phosphonacetyl)-L-Aspartat (PALA) oder Dipyridamol (DP), die Zytotoxizität von 5-FU auf Tumorzellen verstärkt werden. Auch Methotrexat, welches als Folsäureantagonist in die Biosynthese des Pyrimidins Thymidinmonophosphat eingreift, hat sich als Therapeutikum von Neoplasien bewährt. Abschließend kann festgehalten werden, dass Hemmstoffe des Pyrimidinstoffwechsels von großer Bedeutung für die Krebstherapie sind: Ziel jeder kurativ intendierten Therapie ist die Heilung oder zumindest die Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens. Nach kompletter Resektion der sichtbaren Tumoranteile hängt folglich das Schicksal jedes Tumorpatienten davon ab, ob residuelle Tumorzellen außerhalb des Operationsgebietes verbleiben, welche ohne weitere medizinische Intervention zum Rezidiv führen können. Konzeptionell betrachtet, zielt eine adjuvante Therapie auf eine Eradikation aller Tumorzellen und damit auf eine Verbesserung der Heilungschance [Greuter, Jörger, Köberer, 2007].

Ein weiterer therapeutischer Einsatz der DHODH-Inhibitoren liegt in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis. Behandlungserfolge werden seit 2000 mit Leflunomid (Handelsname Arava<sup>®</sup>) erzielt. Dessen aktiver Metabolit A77 1726 ist ein guter Inhibitor der humanen DHODH. Pharmaka ähnlicher Struktur werden derzeit gegen Morbus Crohn getestet [homepage der 4SC AG: <http://www.4sc.de>]; der als 4SC-101 bezeichnete Stoff befindet sich laut Unternehmen in Phase II - Studien.

Die klinische Bedeutung von DHODH-Inhibitoren ist demnach unbestritten, die weitere Erforschung neuer Wirkstoffe viel versprechend. Solche Forschungen werden dadurch vorangetrieben, dass sowohl die Kristallstruktur der menschlichen DHODH [Liu et al., 2000] als auch die der Ratten DHODH [Hansen et al., 2004], sowie des Enzyms aus Plasmodium falciparum [Hurt et al., 2006] bekannt sind, und somit das Design neuer Inhibitoren mittels strukturbasierter Computeranwendungen möglich ist [Heikkila, 2004]. Die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Inhibitoren resultiert oftmals aus einer potenziellen Resistenzentwicklung der Erreger gegenüber medikamentöser Behandlung. Ein

Fallbeispiel für die Resistenzentwicklung gegen die Atovaquone-Proguanil Therapie im Rahmen der Malariabehandlung wurde 2007 beschrieben [Legrand et al., 2007].

### **1.5 Nachweis der Dehydrogenaseaktivität mit dem Tetrazolium-Formazan-System**

Das Redoxsystem Tetrazolium / Formazan blickt auf eine lange Geschichte zurück. Bereits vor über 100 Jahren (1875) synthetisierte Friese ein Formazan, ohne allerdings die Struktur der hergestellten Substanz zu kennen. In der folgenden Zeit gewannen Formazane in verschiedensten Bereichen an praktischer Bedeutung. Sie wurden unter anderem zur Färbung von Synthetikfasern sowie in der Fotoindustrie verwendet. In den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts beschrieben Kuhn und Jerchel die Nachweismöglichkeit von enzymatischen und nicht-enzymatischen Redoxreaktionen mit Hilfe des Redoxsystems Tetrazolium / Formazan. Bereits 1955 stellte Ninehan 240 Tetrazoliumsalze und 400 Formazane in einer Übersicht vor, was für die rapide Weiterentwicklung spricht. Die Redoxsysteme finden Anwendung in der Chemie, der Medizin und Pharmakologie. Eine herausragende Rolle spielen die Tetrazoliumsalze in der Histo- und Biochemie, wo sie dem Nachweis dehydrierender Enzyme dienen. Hier können sie verschiedenste Funktionen übernehmen: So wird beispielsweise das Tetrazoliumsalz Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) zum Nachweis von intakten Zellen genutzt (Vitalfärbung). In der Medizin eignet sich TTC daher für Schnelltests zur Wertbestimmung von Antibiotika und Desinfektionsmitteln. Dabei wird das Tetrazolium-Kation von Dehydrogenasen der Atmungskette (vornehmlich vom Komplex I) zu Formazan reduziert [Altman, 1976]. Die Reduktion führt zu einem roten Farbumschlag, der den Indikator für die stattgefundene Reaktion darstellt.

Im Falle des häufig verwendeten Nitroblue Tetrazolium (NBT), führt eine Oxidation bzw. die hierbei frei werdenden Wasserstoffatome zur Reduktion des Salzes, welches am Ort seines Entstehens ausfällt. Es bildet sich ein wasserunlösliches, dunkelblau-violettes NBT-Diformazan als Indikator und Detektor der enzymatischen Reaktion. Dieser Farbumschlag kann lichtmikroskopisch beurteilt werden. Abbildung 1.4 zeigt die Redox-Reaktion bei dem NBT-Nachweis der Dihydroorotat-Dehydrogenase. Die Reduktion des Tetrazoliumchlorides ist in diesem Fall an die enzymatische Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat gebunden. Dieser Vorgang ist irreversibel und läuft unter histochemischen Bedingungen nur in Richtung Formazanbildung ab. Ein Vorteil bei der Verwendung von NBT gegenüber TTC ist die hohe Reduzierbarkeit des Nitroblue Tetrazolium. Infolgedessen müssen bei dem enzymatischen NBT-Nachweis keine anaeroben Versuchsbedingungen herrschen, vorausgesetzt das Tetrazoliumsalz liegt in einer ausreichend hohen Konzentration vor (> 5

mM) [Seidler, 1991]. Dagegen würde bei einer geringeren Reduzierbarkeit (wie im Falle des TTC), unter aeroben Bedingungen, Sauerstoff als Akzeptor für Reduktionsäquivalente bevorzugt [Seidler, 1991]. Der Enzymnachweis müsste in diesem Fall unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt werden.

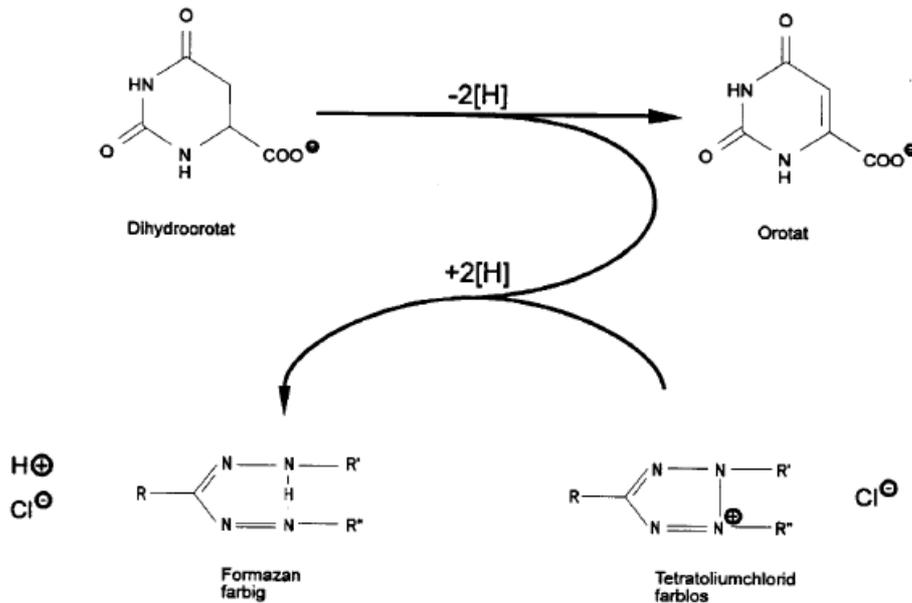


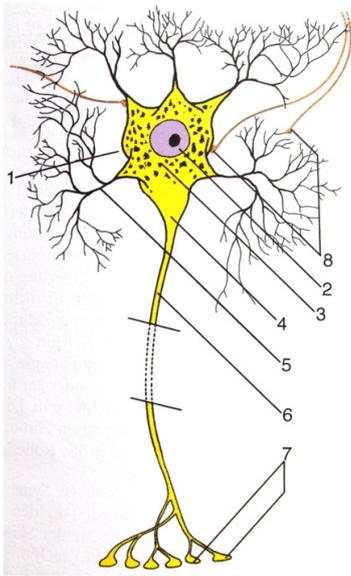
Abb. 1.4 DHODH mit Tetrazoliumsalz (aus Wegerle, 1993)

Auch die Konzentration des Akzeptor-Tetrazoliums beeinflusst die Versuchsergebnisse entscheidend. So kann eine zu hohe Tetrazolium-Konzentration zu einer Abschwächung von Enzymaktivitäten beitragen, während eine zu geringe Konzentration eine schwache Enzymlokalisation zur Folge hat [van Noorden, 1988].

## 1.6 Grundbegriffe der Zytologie und Histologie des zentralen Nervensystems

Die histochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden auf zahlreichen histologischen Schnitten des Ratten-ZNS durchgeführt. Daher sollen die wichtigsten zellulären Bestandteile des zentralen Nervensystems sowie deren wesentliche Funktionen beschrieben werden. Nervengewebe setzt sich grundsätzlich aus zwei Arten von Zellen zusammen: den Nervenzellen (Neuronen) und den Gliazellen.

### 1.6.1 Das Neuron



**Abb. 1.5 Aufbau eines Neurons** [Trepel, Neuroanatomie]. Erläuterungen im Text

Die Nervenzellen bilden die funktionelle Grundeinheit des Nervensystems. Grundsätzlich bestehen sie aus dem Perikaryon (1), das den Zellkern (2) enthält und einem oder mehreren Fortsätzen (die Dendriten (5) dienen dem Erregungsempfang, die Axone (6), die dem Axonkegel (4) entspringen, der Erregungsweitergabe). Im Gegensatz zu den Dendriten, die spines (Dornen) zum Erregungsempfang besitzen, befindet sich am Ende des Axons das Telodendron mit seinen synaptischen Endknöpfchen (7 bzw. 8: synaptische Endknöpfchen anderer Nervenzellen). Das Perikaryon ist das Stoffwechselzentrum des Neurons. Hier befindet sich ein stark ausgebildetes raues endoplasmatisches Retikulum, ein Hinweis auf die hohe Proteinsyntheserate. Transmitter oder zumindest inaktive Vorstufen werden hier synthetisiert um, in Vesikeln verpackt, weitertransportiert zu werden. Dieser antero-

grade Transport verläuft mit einer Geschwindigkeit von bis zu 400 mm pro Tag entlang von Neurotubuli durch das Axon. Diese Geschwindigkeiten werden nur beim schnellen axonalen Transport erreicht. Transportiert werden hauptsächlich Vesikel, welche durch Motorproteine (Kinesin, Dynein) entlang der Mikrotubuli bewegt werden. Ebenso ist ein retrograder Transport von Stoffen, (wie abgenutzten und leeren Organellen), die an der Synapse aufgenommen wurden, durch das Axon möglich. Hervorzuheben ist, dass ausdifferenzierte Neurone keine Zentriolen besitzen und somit ihre Teilungsfähigkeit eingebüßt haben.

### 1.6.2 Die zentralen Gliazellen

Glia- oder Supportzellen machen - ihre Anzahl betreffend - einen Anteil von 90 % aller Zellen des ZNS aus [Trepel, 2004] und sind zur Proliferation bzw. Zellteilung befähigt. Weiterhin gehen die meisten Hirntumoren von Gliazellen aus, wobei ihr Malignitätsgrad vom Differenzierungsgrad der Tumorzellen abhängig ist. Insgesamt unterscheidet man im zentralen Nervensystem vier verschiedene Formen von Gliazellen: Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikrogliazellen und Ependymzellen.

## Astrozyten

Die größten Gliazellen des ZNS (~ 40 µm) sind abgesehen von der Beteiligung am Glutamat-Glutamin Zyklus und der Konstanthaltung des Mikromilieus durch Aufnahme neuronaler Metaboliten, entscheidend an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Weiterhin sind sie zur Narbenbildung befähigt (Gliose, Astrozytennarbe) und erfüllen eine gewisse Stützfunktion. Welche komplexe Stellung Astrozyten im ZNS einnehmen, machen zahlreiche weitere Funktionen deutlich: Sie sind an der Differenzierung von Neuronen aus embryonalen und adulten neuronalen Stammzellen beteiligt und synthetisieren antioxidative Substanzen (Schutz umliegender Nervenzellen). Weiterhin gehört die Aufnahme von Transmittern aus ihrer Umgebung zu ihrem Aufgabenbereich. So verfügen sie beispielsweise über Glutamat-Transporter, mit denen sie eine extrazelluläre Glutamat-Anreicherung begrenzen können. Dies ist die Grundvoraussetzung, um eine tonische Rezeptor-Aktivierung und exzitotoxischen Schaden zu vermeiden.

Astrozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Funktion neuronaler Verschaltungen [Elmariah, 2005]. Beispielsweise steigern sie die Ausbildung glutamaterger Synapsen in Kulturen retinaler Ganglionzellen, spinaler Motoneuronen und hippocampaler Pyramidenzellen [Pfrieger und Barres, 1997, Ullian et al., 2001, 2004, Zhang et al., 2003, Hama et al., 2004, Christopherson et al., 2005]. Die Astrozyten nehmen hierbei ebenso Einfluss über lokalen Kontakt, wie über die Ausschüttung löslicher Faktoren; allerdings sind die zellulären und molekularen Mechanismen, mit denen die Astrozyten die Synaptogenese regulieren, noch nicht vollständig bekannt [Elmariah, 2005].

Bezüglich ihrer Morphologie unterscheidet man grundsätzlich schlanke, wenig verzweigte (fibrilläre Astrozyten) von solchen mit reicher verzweigten und dickeren Fortsätzen (protoplasmatische Astrozyten). Fibrilläre Astrozyten kommen vermehrt in weißer Substanz, protoplasmatische vor allem in grauer Substanz vor.

## Oligodendrozyten

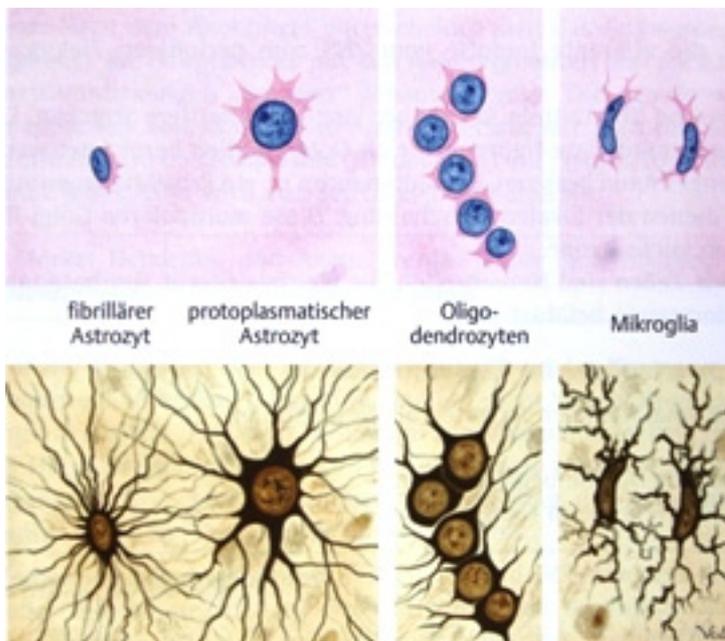
Morphologisch zeichnen sich die Oligodendrozyten durch wenige, kurze und nur gering verzweigte Fortsätze aus. Ihre Hauptaufgabe ist die Markscheidenbildung im zentralen Nervensystem. Hierbei umhüllen sie meist mehrere neuronale Fortsätze und bilden so die Gliascheide der einzelnen Axone und Dendriten. Klinisch-pathologische Bedeutung erlangen die Oligodendrozyten im Falle einer Erkrankung an Multipler Sklerose. Diese Autoimmunreaktion des Körpers ist selektiv gegen Oligodendrozyten gerichtet, so dass es im ZNS zur Markscheidenzerstörung kommt.

### Mikroglia (Hortega-Zellen)

Mikroglia weisen morphologisch und funktionell einige Besonderheiten auf: Sie sind, im Gegensatz zu den übrigen zentralen Glia, nicht ortsständig und weisen die höchsten Formvariationen auf. Ihr Ursprung lässt sich nicht auf das Neuralrohr, sondern auf aus dem Knochenmark ins ZNS eingewanderte Makrophagen zurückführen. Ihre Funktion gestaltet sich dementsprechend: Sie phagozytieren Reste untergegangenen Gewebes ebenso wie Antigen-Antikörper-Komplexe und können in das ZNS eingedrungene Mikroorganismen direkt zerstören. Eine Neurodegeneration wird aufgrund einer Aktivierung der Mikroglia durch inflammatorische Zytokine bei Erkrankung an Multipler Sklerose diskutiert.

### Ependym-Zellen

Sie kleiden die Hirnventrikel aus und erinnern morphologisch an prismatische Epithelzellen. Sie grenzen also den Liquor vom umliegenden Hirngewebe ab. Ihre Kinozilien- und Mikrovilli-besetzte Oberfläche deutet auf eine starke Sekretions- und Resorptionstätigkeit hin. Für die Liquorsekretion sind allerdings hauptsächlich die Plexus choroidei zuständig. Sie bestehen aus verzweigten Gefäßkonvoluten, die von Plexusepithel bedeckt werden.



**Abb. 1.6 Zelltypen der zentralen Glia** [Aumüller, Duale Reihe Anatomie]

## 1.7 Zielsetzung

Die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation basieren auf der bisherigen Projektarbeit am vierten Enzym der Pyrimidinbiosynthese, der Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH) und sollen vorangegangene Arbeiten zum direkten Nachweis des Enzyms in Geweben und Zellen erweitern. Es liegen bisher keine Untersuchungen an diesem Enzym zu Vorkommen, Aktivität und Verteilung im ZNS vor. Diese Thematik stellt den Mittelpunkt der Arbeit dar. Die Untersuchungen werden am Tiermodell Ratte durchgeführt. Für ein möglichst detailliertes und umfassendes Screening nach enzymreichen Hirnanteilen bzw. -zellen, werden mehrere Verfahren zur Detektion der DHODH angewendet:

1. Die Durchführung von Gelelektrophoresen und anschließenden Western Blots hat zum Ziel, die Existenz des Proteins in unterschiedlichen Anteilen des Gehirns nachzuweisen und dient somit der Positivkontrolle im Gewebe. Hierzu sollen Resektionen verschiedener Hirnanteile vorgenommen werden, um entsprechende Gewebekomponenten für die Gelelektrophorese zu gewinnen.
2. Enzymhistochemische Untersuchungen zur Aktivität sollen auf Kryoschnitten des Ratten-ZNS erfolgen. Zur Ermittlung des Verteilungsmusters der Enzymaktivität im gesamten Gehirn und dem zervikalen Rückenmark, wird die spezifische Farbstoffreaktion des Nitrobluetetrazoliumsalz - Formazan - Systems angewendet.  
Im Anschluss soll die Wirkung von verschiedenen DHODH-Inhibitoren im ZNS mit Hilfe der NBT-Technik dargestellt werden. Bei den zu untersuchenden Inhibitoren handelt es sich um Leflunomid, Brequinar, Atovaquone, Redoxal, DCL und UID1 (unknown inhibitor DHODH1). Ergänzend soll eine potenzielle Hemmung der Succinat-Dehydrogenase durch Redoxal und UID1 überprüft werden.
3. Die enzymhistochemischen Befunde sollen durch einen immunhistochemischen Nachweis der DHODH ergänzt werden. Dieser Nachweis des Enzyms mittels Antikörpern, die ihrerseits nachgewiesen werden, soll die detailliertere Lokalisation der DHODH auf zellulärer Ebene ermöglichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

Für wässrige Lösungen wurde Milli Q H<sub>2</sub>O eingesetzt. Folgende Chemikalien wurden verwendet:

#### 2.1.1 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

3-(Triethoxysilyl)-propylamin (TESAP)	Schuchardt
Aceton	Merck
Coomassie-Blau (Brilliant Blue R)	Sigma
ECL-Western Blotting detection reagents	GE-Healthcare
Magermilchpulver	Roth
PAGE-Ruler – Unstained Protein Ladder	Fermentas
Ponceau S	Serva
Protein Standard [Bovine Serum Albumin]	Sigma
Tween 20	Promega

#### Lösungen

10 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (APS)	10 mg / mL in Aliquots bei – 20 °C gelagert
Anodenpuffer I (2fach)	600 mM Tris / HCl, pH 10,4
Anodenpuffer II (2fach)	50 mM Tris / HCl, pH 9,4
Anodenpuffer I und II sowie der Kathodenpuffer wurden vor Gebrauch folgendermaßen verdünnt:	
	10 mL Stammlösung (= Anodenpuffer I, II oder Kathodenpuffer)
	8 mL Milli Q H <sub>2</sub> O
	2 mL Methanol
Acrylamid Stammlösung	30 % Acrylamid / 0,8 % Bis-Acrylamid
Blockierungsreagenz	5 % Magermilchpulver in PBS-Tween
Bradfordreagenz	0,01 % Serva Blue G
	10 % Phosphorsäure (85 %)
	5 % abs. Ethanol
Coomassie-Blau-Färbung	0,1 % Coomassie-Blau (Brilliant Blue R) in 50 % Methanol,

	7 % Essigsäure, 43 % Milli Q H <sub>2</sub> O
Entfärbungslösung	400 mL Methanol 100 mL 100 % Essigsäure 500 mL Milli Q H <sub>2</sub> O
Färbungslösung	0,25 % Coomassie Blue in Entfärbungslösung
Kathodenpuffer (2fach)	50 mM Tris / 80 mM ε-Aminocapronsäure, pH 9,4
Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % Natriumdodecylsulfat
PBS	150 mM NaCl, 20 mM Na-Phosphat, pH 7,4
PBS-Tween	150 mM NaCl, 20 mM Na-Phosphat, 0,05 % Tween 20, pH 7,4
Ponceau-Rot	0,2 % Ponceau S in 3 % Trichloressigsäure
Probenpuffer	30 mL Glycerin 30 mL 20 % SDS 25 mL 0,5 M Tris, pH 6,8 5 mL 2-Mercaptoethanol ad 100 mL mit Milli Q H <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris / HCl, pH 6,8 0,4 % SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris / HCl, pH 8,8 0,4 % SDS

### 2.1.2 Enzymhistochemischer Nachweis mittels NBT-Reaktion

Dihydroorotsäure	Sigma
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma
Kaiser's Glyceringelantine	Merck
Kresylviolett	Fluka
Na-Azid	Merck
Na-Cyanid	Merck
Nitrotetrazolium blue chloride (NBT)	Sigma
Paraformaldehyd	Aldrich-Chemie
Perchlorsäure	Merck

Lösungen

500 mM Na-Phosphatpuffer 432 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 68 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5)

500 mM Na-Phosphatpuffer 480 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8)

150 mM Na-Phosphatpuffer 130 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5)

150 mM Na-Phosphatpuffer 143 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8)

Kresylviolett-Lösung 0,5 % Kresylviolett in 60 mM  
Natriumacetat, 0,34 M Essigsäure

**2.1.3 Immunhistochemischer Nachweis auf fixierten Gewebeschnitten**

Albumin-Fraktion V	Roth
Antikörper (siehe Kapitel 2.5)	Laborbestände
Avidin / Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories
Avidin-Biotin-Komplex	Vector Laboratories
Biotinylierter Sekundärantikörper: Esel-anti-Kaninchen	Dianova
Depex	VWR
Filterpapier	Macherey-Nagel
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Isopropanol 96 %, 80 %, 70 %	Acros Organics
Isopropanol absolut	Acros Organics
Kupfer-2-Acetat	Serva
Pikrinsäure	Merck
TissueTek O.T.C. Einbettmedium	Sakura Finetik
Tyramide-Signal-Amplification (TSA) Kit	Perkin Elmer
Xylol 99,8 %	Merck

Lösungen

0,01 M Natriumcitrat-Puffer (pH 6,0)

- 54 mL 0,1 M Zitronensäure
- 246 mL 0,1 M tri-Natriumcitrat
- 3000 mL Milli Q H<sub>2</sub>O

50 mM PBS (pH 7,4)

- 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 375 mM NaCl

Bouin Hollande Stammlösung

- 25 g Kupfer-2-Acetat in Milli Q H<sub>2</sub>O lösen
  - 60 g Pikrinsäure mit 50 % H<sub>2</sub>O lösen
  - Mit Milli Q H<sub>2</sub>O auf 1 L auffüllen
  - Lösung wird filtriert (Porengröße 3µm)
- Aufbewahrung bei RT bis zu 4 Wochen möglich

Bouin Hollande Gebrauchslösung (wird nach Bedarf frisch angesetzt)

- 100 Teile Bouin Hollande Stammlösung
  - 10 Teile Formaldehydlösung 37 %ig
  - 1 Teil Eisessig
- Die Fixationsdauer beträgt zwischen 24 und 48 h; das Fixationsvolumen sollte etwa das 10fache des Gewebevolumens betragen

Rinderserumalbumin

- 5 %: 10 g BSA in 200 mL 50 mM PBS
- 1 %: 1g BSA in 100 mL 50 mM PBS

Diaminobenzidin-Amonium-Nickelsulfat-Reagenz (DAB-Nickel-Reagenz)

- 600 mg Nickel / 8 mL Milli Q H<sub>2</sub>O
- 100 mg DAB / 16 mL Milli Q H<sub>2</sub>O
- 800 mL 50 mM PBS

TN-Puffer

- 250 mL 2M Tris / HCl, pH 7,5
- 150 mL 5 M NaCl
- ad 5 L mit Milli Q H<sub>2</sub>O

#### 2.1.4 Inhibitoren der DHODH

A77 1726	Aventis Pharma
Atovaquone	Wellcome
Brequinar	Du Pont Nemours, Pharma GmbH
Dichloroallyllawsone	NIH, Bethesda USA
Redoxal	NIH, Bethesda USA
UID1	Laborbestände

#### 2.1.5 Verbrauchsmaterial

Blottingpapier	Schleicher und Schuell
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore
Mikrotiterplatten	Greiner
PAP-Pen	Plano

#### 2.1.6 Geräte und Hilfsmittel

Blottingapparatur	Biotechnologie GmbH
Brutschrank	Heraeus, 37 °C
Elektrophorese power supply	Consort
Entwicklungsmaschine	Agfa
Gefriertruhe	Raba, -20 °C
Kryostat	Jung, Frigocut 2800 E, -80 °C
Magnetrührer	Heidolph, MR 2000
Objektträger, Deckgläser	Roth, 76 x 26 mm
Mikroskop Ax70	Olympus
pH-Meter	Mettler, Toledo
Photometer	Pharmacia Biotech
Schüttler	EB, Hechingen
SPOT Kamera	Diagnostics Instruments inc.
Ultraschallbad	Bandelin electronic, Berlin
Waagen	Sartorius
Wärmebad	Köttermann
Biofuge Fresco	Heraeus, Zentrifugen

## 2.2 Vorbereitung der Objektträger für Kryoschnitte – Silanisierung der Objektträger

Die Objektträger wurden in schwarze Halter eingeräumt, die mitsamt Objektträgern in einem Kunststoffkasten verstaut wurden. 200 Objektträger wurden in einer Waschlösung (1,7 L heißes Wasser mit Spülmittel versetzt) auf dem Schüttler für eine Stunde gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger 3x mit heißem Wasser (→Wasserhahn), 1x mit demineralisiertem Wasser und 1x mit Reinstwasser nachgewaschen. Der nächste Waschschrift erfolgte für 45 Minuten in 70 % Isopropanol. Im Anschluss wurden die Objektträger für 1 Stunde bei 60°C im Trockenschrank getrocknet. Objektträger, die Flecken und Kratzer aufwiesen wurden aussortiert. Die sauberen und unbeschädigten Objektträger wurden folgendermaßen gewaschen und silanisiert:

- 30 Sekunden in 2 % 3-Triethoxysilyl-Propylamin (TESAP) in Aceton
- 30 Sekunden in Aceton 1
- 30 Sekunden in Aceton 2
- Wenige Sekunden in Aqua dem.
- Wenige Sekunden in Milli Q H<sub>2</sub>O
- Abschließend trocknete man die Objektträger bei 42°C im Trockenschrank.

## 2.3 Organentnahme für histochemische Untersuchungen

Als Versuchstiere dienten 2 Wistaratten im Alter von 1-1½ Jahren mit einem Gewicht von 600 – 700 Gramm. Die Betreuung und Fütterung wurde vom Institut für Anatomie und Zellbiologie Marburg durchgeführt. Fachtierärztliche Aufsicht und Kontrolle unterlag dem tierärztlichen Dienst des Klinikums Marburg. Weitere Arbeiten wurden unter der Anleitung von Dr. Martin Schäfer durchgeführt. Nach der Äthernarkose wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Für die Zwecke der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen einer partizipierten Resektion einer adulten Ratte mittels Pinzette folgende Gewebeproben gewonnen: Leber, Niere sowie einzelne Bereiche des ZNS. So wurden Hypothalamus, Bulbus olfactorius, Colliculi superiores, Colliculi inferiores, Thalamus, Kleinhirn, Hippocampus, Kortex, Rückenmark, Striatum, Hirnstamm und Hypophyse entnommen. Nach Entnahme wurden die Präparate zwecks Schockfrostung unmittelbar in flüssigen Stickstoff (-196,5 °C) eingetaucht. Bis zur weiteren Verwendung (Proteingewinnung für Western Blots oder Herstellung von Kryoschnitten) wurden die Gewebe bei -80°C gelagert.

## 2.4 Herstellung von Kryoschnitten

Hierzu wurden die Gewebeblöcke mit Tissue-Tek© auf den Objektisch aufgebracht. Nach Ausrichtung des Objektisches wurden Schnitte mit einer Schnittdicke von 14 µm hergestellt. Die Temperatur in der Kryostatkammer betrug hierbei -17°C. Die Schnitte wurden dann auf den zuvor silanisierten Objektträger aufgenommen. Nach einer Trocknungszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

## 2.5 Verwendete Antikörper

Sowohl für die Proteinbandendetektion im Rahmen des Western Blots, als auch für den immunhistochemischen Nachweis der DHODH, wurden Primärantikörper gegen die DHODH sowie verschiedene Sekundärantikörper verwendet.

Die verwendeten Antikörper gegen die DHODH wurden im Rahmen der Dissertation von Klaus Otto Grein (1998) erstmals hergestellt. Zunächst wurden in ausreichender Menge Präimmunproben in Form von Kaninchenserum entnommen. In der vorliegenden Arbeit wurde eben dieses Präimmunserum für einige Negativkontrollen auf Gewebeschnitten verwendet. Grein impfte die Tiere im Abstand von 4 Wochen mit hochgereinigtem Fusionsprotein (DHODH mit His-tag) durch subkutane Applikation. Die IgG-Gewinnung erfolgte durch regelmäßige Blutentnahme aus der Ohrtrandvene des Kaninchens und Abzentrifugieren des Serums. Um einen affinitätsgereinigten Antikörper gegen die DHODH zu erhalten, führte Grein eine affinitätschromatographische Reinigung im Batch-Verfahren durch. Bei der Durchführung der Western Blots wurden folgende Antikörper verwendet:

- K5 (Kaninchen 5) – Antikörper: Anti-DHODH-IgG (affinitätsgereinigter Primärantikörper)
- K5S (Kaninchen 5) – Antiserum: Rabbit-Anti-DHODH (Primärantikörper)
- Goat-anti-Rabbit-IgG (Sekundärantikörper)

Der immunhistochemische Nachweis der DHODH wurde mit Hilfe der folgenden Antikörper durchgeführt:

- K5 (Kaninchen 5) – Antikörper: Anti-DHODH-IgG (affinitätsgereinigter Primärantikörper)
- Donkey-anti-Rabbit-IgG (Sekundärantikörper)

## **2.6 Proteingewinnung, -aufbereitung und -bestimmung**

### **2.6.1 Proteingewinnung aus ZNS-Gewebe**

Das noch gefrorene Gewebe (bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert) wurde gewogen und mit einem Skalpell zerkleinert. Es folgte das Aufschließen des zerkleinerten Gewebes im Potter mit 125 mM Saccharose in 100 mM Kalium-Phosphatpuffer (pH 7,3). Anschließend wurde das aufgeschlossene Gewebe 10 Minuten bei 2000 UpM (= 600g) und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der hieraus resultierende Überstand wurde abgenommen und weitere 10 Minuten bei 13000 UpM (= 12000 g) und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde mit Probenpuffer versetzt. Ebenso wurde mit dem Überstand verfahren. Die auf diese Weise gewonnen Gewebehomogenate konnten nun der Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen werden. Alle genannten Zwischenschritte wurden unter Kühlung in Eis/ Eiswasser durchgeführt. Auch die Potter sowie der Probepuffer sind entsprechend vorgekühlt worden.

### **2.6.2 Proteinaufbereitung und Konzentrierung**

Zunächst werden die Proben des isolierten Materials sorgfältig gemischt und mit 100 mM Kalium-Phosphatpuffer (pH 7,3) folgendermaßen verdünnt:

25  $\mu\text{l}$  Probe + 225  $\mu\text{l}$  Puffer [1:10 - Verdünnung]

50  $\mu\text{l}$  1:10 – Verdünnung + 450  $\mu\text{l}$  Puffer [1:100 Verdünnung]

Diese Verdünnungen wurden mit den Pellet- und Überstandproben durchgeführt, so dass jeweils eine 1:10-Verdünnung und eine 1:100-Verdünnung der Pellet- bzw. Überstandproben vorlag.

Nun wurde mit den verdünnten Proben eine Proteinfällung mit 0,6 M Perchlorsäure durchgeführt (100  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Verdünnung + 200  $\mu\text{l}$  0,6 M Perchlorsäure). Die Lösungen wurden gemischt und für 10 Minuten im Eisbad gelagert. Nach Zentrifugation bei maximaler Drehzahl (13000 UpM) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 300  $\mu\text{l}$  3 % NaOH gelöst (30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank).

### **2.6.3 Proteinbestimmung**

20 ml Bradfordreagenz wurden mit 1 mL 1M NaOH gemischt. In die Mikrotiterplatte wurden pro Loch 10  $\mu\text{L}$  Probe bzw. Rinderserumalbumin-Standard + 100  $\mu\text{L}$  Bradfordreagenz pipettiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung mit dem Plattenphotometer.

**Tab. 2.1 Befüllung der Mikrotiterplatte**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>A</b>	0 µg Protein	50 µg Protein	100 µg Protein	150 µg Protein	200 µg Protein	1:10 *
<b>B</b>	0 µg Protein	50 µg Protein	100 µg Protein	150 µg Protein	200 µg Protein	1:10*
<b>C</b>	0 µg Protein	50 µg Protein	100 µg Protein	150 µg Protein	200 µg Protein	1:10*
<b>D</b>	25 µg Protein	75 µg Protein	125 µg Protein	175 µg Protein	225 µg Protein	1:100**
<b>E</b>	25 µg Protein	75 µg Protein	125 µg Protein	175 µg Protein	225 µg Protein	1:100**
<b>F</b>	25 µg Protein	75 µg Protein	125 µg Protein	175 µg Protein	225 µg Protein	1:100**

\* 1:10 Verdünnung von Pellet bzw. Überstand

\*\* 1:100 Verdünnung von Pellet bzw. Überstand

Die anschließende Auswertung am PC ergab die Proteingehalte der verschiedenen gewonnenen Proben. Der Auftrennung von Pellet und Überstand liegt die Überlegung zugrunde, dass die Mitochondrien nach der zweimaligen Zentrifugation vermehrt im Pellet angereichert sind. Da die DHODH in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, erreicht man so eine erhöhte DHODH-Konzentration im Pellet, was den späteren Nachweis erleichtert.

## 2.7 Immunchemischer Nachweis der DHODH mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese und Western Blot

### 2.7.1 Herstellung der Gele

**Tab. 2.2 Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel**

	TRENNGEL 12 %	SAMMELGEL 4,5 %
Aqua bidest	26,25 mL	21,0 mL
Trenngelpuffer	18,75 mL	-
Sammelgelpuffer	-	8,75 mL
Acrylamid Stammlösung	25,0 mL	5,25 mL
10 % APS	300 µL	150 µL
TEMED	70µL	50 µL

Die Trenngellösung wurde in die Apparatur gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, die Gelapparatur mit Sammelgellösung aufgefüllt und ein 13-zinkiger Probenkamm zur Ausformung der Taschen hineingesteckt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Gele bis zur Durchführung der Gelelektrophorese bei 6-8 °C feucht gelagert.

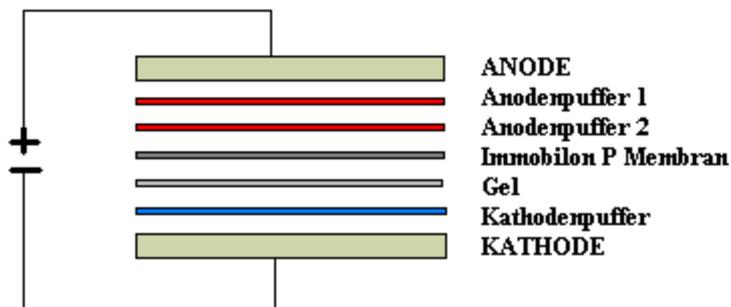
## 2.7.2 Gelelektrophorese

### Allgemeines Vorgehen

Nach Befüllung der Taschen, ließ man die Proben bei 80 V im Sammelgel laufen. Nach Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Die Elektrophorese wurde nach Erreichen des unteren Endes des Gels beendet.

## 2.7.3 Proteintransfer auf die Immobilon-Membran

Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut:



**Abb. 2.2 Aufbau des Blots**

Vorbereitend wurden die Filterkartons und die Immobilon P – Transfermembran auf die Gelgröße zugeschnitten. Außerdem musste die Transfermembran vor dem eigentlichen Transfer in Methanol getränkt und die Filterkartons in den entsprechenden Puffer eingelegt werden. Als Blotparameter wurden eine Transferzeit von 2,5 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Membran gewählt. Nach Ablauf der Transferzeit wurde die Membran für wenige Minuten mit Ponceau-Rot eingefärbt, um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte mit Milli Q H<sub>2</sub>O. Daraufhin konnte die Markerspür abgeschnitten, mit Comassieblau für eine Minute angefärbt und der Hintergrund mit Entfärbungslösung (siehe Seite 15) wieder entfärbt werden.

Die übrige Membran wurde für 1-2 Stunden in 5 %iger Magermilch (gelöst in PBS-Tween) geschüttelt, um die freien Membranbindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran 3 x 15 Minuten in PBS-Tween gewaschen.

## 2.7.4 Antikörper-Inkubation

### Inkubation mit K5-Antikörper bzw. K5S-Antiserum

Über Nacht wurde die Inkubation mit affinitätsgereinigtem K5-Antikörper bzw. K5S-Antiserum bei 4°C im Kühllabor durchgeführt. Hierbei wurden zu Beginn unterschiedliche Verdünnungen getestet, um die optimale Konzentration zu bestimmen (siehe Kapitel 3.1.1: Überprüfung und Optimierung der Methodik).

Am folgenden Tag wurde die Membran erneut für 3 x 15 Minuten in PBS-Tween gewaschen.

### Inkubation mit Sekundärantikörper

Für eine Stunde wurde die Membran mit dem Antikörper: Ziege-anti-Kaninchen-IgG-HRP bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurde die Membran 2 x 15 Minuten in PBS-Tween gewaschen und 2 x in PBS gespült.

## 2.7.5 ECL-Reaktion und Entwicklung des Röntgenfilms

Die Enhanced Chemolumineszenz (ECL) Reagenzien wurden nach Herstellerangaben zusammengegeben und die Membran für eine Minute vollständig mit dem ECL Reagenz bedeckt. Anschließend wurde sie zwischen zwei Folien gelegt. Nun wurde der Röntgenfilm in einer Filmkassette für unterschiedliche Dauer belichtet und anschließend entwickelt.

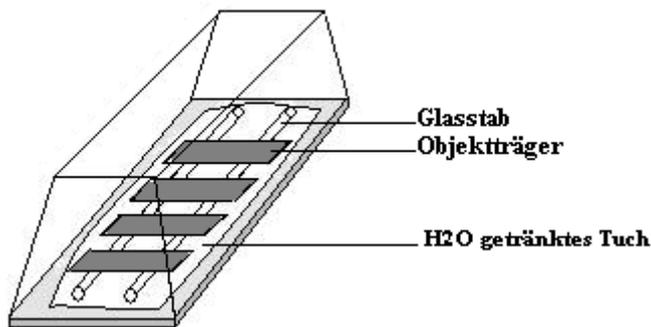
## 2.8 Aktivitätsnachweis der DHODH

Alle histochemischen Untersuchungen erfolgten unter Anwendung des in Kapitel 1. Einleitung beschriebenen Tetrazoliumsalzes NBT.

### 2.8.1 Die Inkubationskammer

Um ein Austrocknen der Gewebeschnitte zu vermeiden, fanden sämtliche Inkubationsschritte in einer feuchten Inkubationskammer statt. Durch Einlegen eines mit Milli Q H<sub>2</sub>O getränkten Stoff- oder Papiertuches am Boden der geschlossenen Kammer, entsteht im Inneren eine Sattdampfatosphäre die eine Feuchtigkeitsabgabe des Gewebes

verhindert. Während der Inkubation wurden die Objektträger auf zwei Glasstäben abgestützt, um eine direkte Berührung des Wassers durch die Objektträger zu vermeiden.



**Abb. 2.3 Inkubationskammer**

## 2.8.2 Verifizierung und Optimierung der Versuchsmethodik

Für erste Versuche wurden unfixierte, bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerte Kryoschnitte der Rattenleber sowie der Rattenniere verwendet. Hier wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten (Becker, 2004) eine hohe DHODH-Aktivität nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit dienten diese Untersuchungen der Überprüfung und Optimierung des Nachweisverfahrens (siehe Kapitel 2.9.2).

Außerdem wurde der Einfluss von Na-Cyanid (bzw. dessen Abwesenheit) auf das Ergebnis des DHODH-Nachweises mittels NBT getestet. Auch eine Substitution des Na-Cyanid durch Na-Azid und eine daraus eventuell resultierende Ergebnisbeeinflussung wurden untersucht. Der biochemische Wirkmechanismus besteht in der Störung der Elektronen-Transportkette der Atmungskette. Das Azid-Ion blockiert – wie auch Cyanid – die Sauerstoffbindungsstelle im aktiven Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase irreversibel. Der Theorie nach wird durch die Hemmung der Atmungskette ein höherer Anteil der durch die Orotat-Oxidation anfallenden Wasserstoffatome auf das Tetrazoliumchlorid übertragen. Somit wird eine stärkere, das heißt zuverlässigere Farbreaktion erreicht. Die Tests wurden nach dem unter 2.9.2 beschriebenen Versuchsablauf mit den in Tabelle 2.3 beschriebenen Inkubationslösungen durchgeführt.

Um Aussagen über die optimale Inkubationszeit treffen zu können, wurden unfixierte, bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrte Schnitte des Rattenhirns unterschiedlich lange inkubiert. Der pH-Wert von 8,0 wurde aus Vorversuchen (u.a. Becker, 2004) übernommen, da unter diesen Bedingungen die Aktivität der DHODH am höchsten ist.

**Tab. 2.3 Inkubationslösungen I**

<b>NACHWEIS DER DHODH IN ANWESENHEIT VON CYANID</b>	<b>NACHWEIS DER DHODH IN ANWESENHEIT VON AZID</b>	<b>NACHWEIS DER DHODH OHNE WEITERE ZUSÄTZE</b>
50 µL 20 mM NBT	50 µL 20 mM NBT	50 µL 20 mM NBT
100 µL 10 mM NaCN	100 µL 10 mM NaAzid	100 µL MilliQH <sub>2</sub> O
100 µL 150 mM Na-Phosphat- Puffer pH 8,0	100 µL 150 mM Na-Phosphat- Puffer pH 8,0	100 µL 150 mM Na-Phosphat- Puffer pH 8,0
250 µL 500 mM Na-Phosphat- Puffer pH 8,0	250 µL 500 mM Na-Phosphat- Puffer pH 8,0	250 µL 500 mM Na-Phosphat- Puffer pH 8,0
500 µL 20 mM DHO	500 µL 20 mM DHO	500 µL 20 mM DHO

### 2.8.3 Standard-Durchführung der enzymhistochemischen Tests

Die bei – 80°C gelagerten Kryoschnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit dem Pap Pen© umrandet. Es folgte die Inkubation mit den verschiedenen Inkubationslösungen (siehe Tab. 2.4 Inkubationslösungen II)

Es wurden 300-500 µl Inkubationslösung pro Schnitt aufgetropft bis dieser vollständig bedeckt war. Die Inkubationszeit für die Gewebeschnitte wurde in Voruntersuchungen ermittelt. Sie orientierte sich an dem Fortschritt der NBT-Reaktion. Die Blaufärbung wurde während der Inkubation in Abständen von 5 Minuten mikroskopisch kontrolliert. Die Inkubation erfolgte in Satttdampfatmosfera bei 37°C im Inkubationsschrank.

**Tabelle 2.4 Inkubationslösungen II**

<b>NACHWEIS DER DHODH</b>	<b>NEGATIVKONTROLLE</b>
50 µL 20 mM NBT	50 µL 20 mM NBT
100 µL 10 mM NaCN	100 µL 10 mM NaCN
100 µL 150 mM Na-Phosphat- Puffer pH 8,0	100 µL 150 mM Na-Phosphat- Puffer pH8,0
250 µL 500 mM Na-Phosphat- Puffer pH 8,0	250 µL 500 mM Na-Phosphat- Puffer pH 8,0
500 µL 20 mM DHO	500 µL MilliQ H <sub>2</sub> O

Nach Beendigung der Inkubation wurde die Inkubationslösung vorsichtig mit 150 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 abgespült. Dann wurden die Objektträger für eine Minute in eine Küvette mit 150 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 gestellt.

Zur Fixierung der Schnitte wurden diese für 15 Minuten in eine Küvette mit 4 %igem Paraformaldehyd gegeben, danach mit MilliQ H<sub>2</sub>O abgespült und für weitere 5 Minuten in

MilliQ H<sub>2</sub>O stehen gelassen. Schließlich wurde der Schnitt mit 1 Tropfen verflüssigter Glyceringelatine eingedeckt und ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und angedrückt. Die Glyceringelatine erstarrte bei Raumtemperatur. Die Reinigung der Objektträger von Gelatineüberschüssen wurde unter kaltem Wasser mit einer Bürste vorgenommen.

## 2.9 Wirkung von Inhibitoren auf die DHODH

Die Wirkung folgender Inhibitoren auf die DHODH-Aktivität wurde untersucht: A77 1726, Brequinar, Atovaquone, Redoxal, DCL, UID1. Da einige Inhibitoren in DMSO gelöst werden mussten, galt es, vorab zu klären, ob DMSO einen Einfluss auf die Farbintensität bzw. Farbgebung der Schnitte hat. Hierzu wurden Sagittalschnitte des Rattenhirns nahe der Medianebene mit unterschiedlich hohen Konzentration DMSO inkubiert (DMSO ersetzte den 150 mM Na-Phosphatpuffer). Mikroskopisch ließ sich kein Unterschied zwischen Positivinkubation (d.h. in Gegenwart des Substrates Dihydroorotsäure) ohne und Positivinkubation mit DMSO in Konzentration zwischen 2 – 10 % feststellen. Daher konnten bei weiteren Tests mit Inhibitoren, die in DMSO gelöst sind, bis zu einer Konzentration von 10 Volumenprozent der Inkubationslösung, Beeinträchtigungen des Ergebnisses durch DMSO ausgeschlossen werden. Die Versuche wurden analog zu dem unter 2.8.3 Standarddurchführung beschriebenen Verfahren mit folgenden Mischungen durchgeführt:

**Tab. 2.5 Inkubationsansätze mit A77 1726**

<b>1.1: A77 0,001 mM</b>	<b>1.2: A77 0,01 mM</b>	<b>1.3: A77 0,1 mM</b>	<b>1.4: A77 1 mM</b>	<b>1.5: A77 10 mM</b>
50 µL 20 mM NBT				
100 µL 10 mM NaCN				
250 µL 500 mM Na-Phosphat-Puffer				
500 µL 20 mM DHO				
<b>100 µL 0,01 mM A77</b>	<b>100 µL 0,1 mM A77</b>	<b>100 µL 1 mM A77</b>	<b>100 µL 10 mM A77</b>	<b>100 µL 100 mM A77</b>

Tab. 2.6 Inkubationsansätze mit Brequinar

<b>2.1: BREQUINAR 0,001 mM</b>	<b>2.2: BREQUINAR 0,01 mM</b>	<b>2.3: BREQUINAR 0,1 mM</b>	<b>2.4: BREQUINAR 1 mM</b>	<b>2.5: BREQUINAR 10 mM</b>
50 µL 20 mM NBT				
100 µL 10 mM NaCN				
250 µL 500 mM Na-Phosphat-Puffer				
500 µL 20 mM DHO				
<b>100 µL 0,01 mM Brequinar</b>	<b>100 µL 0,1 mM Brequinar</b>	<b>100 µL 1 mM Brequinar</b>	<b>100 µL 10 mM Brequinar</b>	<b>100 µL 100 mM Brequinar</b>

Tab. 2.7 Inkubationsansätze mit Atovaquone

<b>3.1: ATOVAQUONE 0,001 mM</b>	<b>3.2: ATOVAQUONE 0,01 mM</b>	<b>3.3: ATOVAQUONE 0,1 mM</b>	<b>3.4: ATOVAQUONE 1 mM</b>
50 µL 20 mM NBT	50 µL 20 mM NBT	50 µL 20 mM NBT	50 µL 20 mM NBT
100 µL 10 mM NaCN	100 µL 10 mM NaCN	100 µL 10 mM NaCN	100 µL 10 mM NaCN
250 µL 500 mM Na-Phosphat-Puffer	250 µL 500 mM Na-Phosphat-Puffer	250 µL 500 mM Na-Phosphat-Puffer	250 µL 500 mM Na-Phosphat-Puffer
500 µL 20 mM DHO	500 µL 20 mM DHO	500 µL 20 mM DHO	500 µL 20 mM DHO
<b>100 µL 0,01 mM Atovaquone *</b>	<b>100 µL 0,1 mM Atovaquone *</b>	<b>100 µL 1 mM Atovaquone *</b>	<b>100 µL 10 mM Atovaquone *</b>

\* gelöst in DMSO

Tab. 2.8 Inkubationsansätze mit Redoxal

<b>4.1: REDOXAL 0,001 mM</b>	<b>4.2: REDOXAL 0,01 mM</b>	<b>4.3: REDOXAL 0,1 mM</b>
50 µL 20 mM NBT	50 µL 20 mM NBT	50 µL 20 mM NBT
100 µL 10 mM NaCN	100 µL 10 mM NaCN	100 µL 10 mM NaCN
250 µL 500 mM Na-Phosphat-Puffer	250 µL 500 mM Na-Phosphat-Puffer	250 µL 500 mM Na-Phosphat-Puffer
500 µL 20 mM DHO	500 µL 20 mM DHO	500 µL 20 mM DHO
<b>100 µL 0,01 mM Redoxal *</b>	<b>100 µL 0,1 mM Redoxal *</b>	<b>100 µL 1 mM Redoxal **</b>

\* gelöst in DMSO

\*\* höchste erreichbare Konzentration

**Tab. 2.9 Inkubationsansätze mit DCL**

<b>5.1: DCL 0,01 <math>\mu</math>M</b>	<b>5.2: DCL 0,1 <math>\mu</math>M</b>	<b>5.3: DCL 1 <math>\mu</math>M</b>	<b>5.4: DCL 10 <math>\mu</math>M</b>	<b>5.5: DCL 100 <math>\mu</math>M</b>
50 $\mu$ L 20 mM NBT	50 $\mu$ L 20 mM NBT	50 $\mu$ L 20 mM NBT	50 $\mu$ L 20 mM NBT	50 $\mu$ L 20 mM NBT
100 $\mu$ L 10 mM NaCN	100 $\mu$ L 10 mM NaCN	100 $\mu$ L 10 mM NaCN	100 $\mu$ L 10 mM NaCN	100 $\mu$ L 10 mM NaCN
100 $\mu$ L 0,1 $\mu$ M DCL*	100 $\mu$ L 1 $\mu$ M DCL*	100 $\mu$ L 10 $\mu$ M DCL*	100 $\mu$ L 100 $\mu$ M DCL*	100 $\mu$ L 1 mM DCL*
250 $\mu$ L 500 mM Na-Phosphat-Puffer	250 $\mu$ L 500 mM Na-Phosphat-Puffer	250 $\mu$ L 500 mM Na-Phosphat-Puffer	250 $\mu$ L 500 mM Na-Phosphat-Puffer	250 $\mu$ L 500 mM Na-Phosphat-Puffer
500 $\mu$ L 20 mM DHO	500 $\mu$ L 20 mM DHO	500 $\mu$ L 20 mM DHO	500 $\mu$ L 20 mM DHO	500 $\mu$ L 20 mM DHO

\* gelöst in DMSO

**Tab. 2.10 Inkubationsansätze mit UID1**

<b>6.1: UID1 0,5 MM</b>	<b>6.2: UID1 0,05 MM</b>
50 $\mu$ L 20 mM NBT	50 $\mu$ L 20 mM NBT
100 $\mu$ L 10 mM NaCN	100 $\mu$ L 10 mM NaCN
100 $\mu$ L 5 mM UID1*	100 $\mu$ L 0,5 mM UID1**
250 $\mu$ L 500 mM Na-Phosphat-Puffer	250 $\mu$ L 500 mM Na-Phosphat-Puffer
500 $\mu$ L 20 mM DHO	500 $\mu$ L 20 mM DHO

\* gelöst in DMSO

\*\* höchste erreichbare Konzentration

## 2.10 Wirkung von Redoxal und UID1 auf die Succinat-Dehydrogenase (SDH)

Unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Löffler ließen eine inhibitorische Wirkung bestimmter DHODH-Inhibitoren auf die Succinat-Dehydrogenase vermuten. Um eine mögliche inhibitorische Wirkung von Redoxal bzw. UID1 auf die SDH nachzuweisen, wurde bis auf folgende Abweichungen analog zu dem unter 2.8.3 vorgestellten Verfahren vorgegangen:

Statt des 150 mM und des 500 mM Na-Phosphatpuffers pH 8, wurden entsprechend molare Na-Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,5 verwendet. Als Substrat diente 20 mM Succinat. Die Inkubationszeit wurde auf 20 Minuten reduziert, da aufgrund der höheren SDH-Aktivität im ZNS-Gewebe – im Vergleich zum DHODH-Nachweis – ein schnellerer Eintritt der blauvioletten Färbung zu beobachten war. Die Inkubationslösungen setzten sich wie folgt zusammen:

**Tab. 2.11 Inkubationslösungen der potenziellen SDH-Inhibitoren**

NACHWEIS DER SDH IN ANWESENHEIT VON REDOXAL	NACHWEIS DER SDH IN ANWESENHEIT VON UID1	NACHWEIS DER SDH	NEGATIVKONTROLLE
50 µL 20 mM NBT	50 µL 20 mM NBT	50 µL 20 mM NBT	50 µL 20 mM NBT
100 µL 10 mM NaCN	100 µL 10 mM NaCN	100 µL 10 mM NaCN	100 µL 10 mM NaCN
100 µL Redoxal *	100 µL UID1**	100 µL 150 mM Na- Phosphat-Puffer pH 7,5	100 µL 150 mM Na- Phosphat-Puffer pH 7,5
250 µL 500 mM Na- Phosphat-Puffer pH 7,5	250 µL 500 mM Na- Phosphat-Puffer pH 7,5	250 µL 500 mM Na- Phosphat-Puffer pH 7,5	250 µL 500 mM Na- Phosphat-Puffer pH 7,5
500 µL 20 mM Succinat	500 µL 20 mM Succinat	500 µL 20 mM Succinat	500 µL MilliQ H <sub>2</sub> O

\* Redoxal wurde in Konzentrationen von 0,01 mM; 0,1 mM und 1 mM (gelöst in DMSO) hinzugegeben

\*\* UID1 wurde in Konzentrationen von 0,5 mM und 5 mM (dies entspricht Endkonzentrationen von 0,05 mM bzw. 0,5 mM) hinzugegeben; gelöst in DMSO

## 2.11 Färbung der ZNS-Schnitte

Zur Kontrollfärbung der Nerven-Zellen im ZNS der Ratte wurde eine Kresylviolett-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die Objektträger 15 Minuten lang in Kresylviolett-Lösung gestellt. Die Objektträger durchliefen anschließend folgende Waschreihe:

- 3 Minuten Milli Q H<sub>2</sub>O
- 2 Minuten 70 % Isopropanol
- 1 Minute 95 % Isopropanol
- 2 x 1 Minute 100 % Isopropanol
- 2 x 5 Minuten Xylol

Abschließend wurden die Schnitte mit Depex eingedeckt und eingedeckelt.

## 2.12 Fotografie der ZNS-Schnitte

Die fotografische Dokumentation der Gewebeschnitte wurde durch ein Mikroskop vom Typ Olympus Ax70<sup>®</sup> mit der Spot RT Slider Kamera<sup>®</sup> und der dazugehörigen Software SPOT Image Analyser<sup>®</sup> digital aufgenommen.

## 2.13 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH auf Leber- und ZNS-Schnitten

### 2.13.1 Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode)

Hierbei wird die hohe Affinität von Avidin zu Biotin genutzt. Nachdem der Primärantikörper (K5-Antikörper: Anti-DHODH-IgG) an das Antigen gebunden hat, wurde in einem zweiten Schritt der biotinylierte Sekundärantikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist, auf den Schnitt gegeben. Schließlich wurde ein peroxidasekonjugierter Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex) eingesetzt. Dieser bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers. Die Peroxidase konnte nun mit dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht werden. Da Avidin vier Bindungsstellen für Biotin (siehe Abbildung 2.4) besitzt, kommt es zu einem Verstärkungseffekt, der die Empfindlichkeit der ABC-Methode steigert.

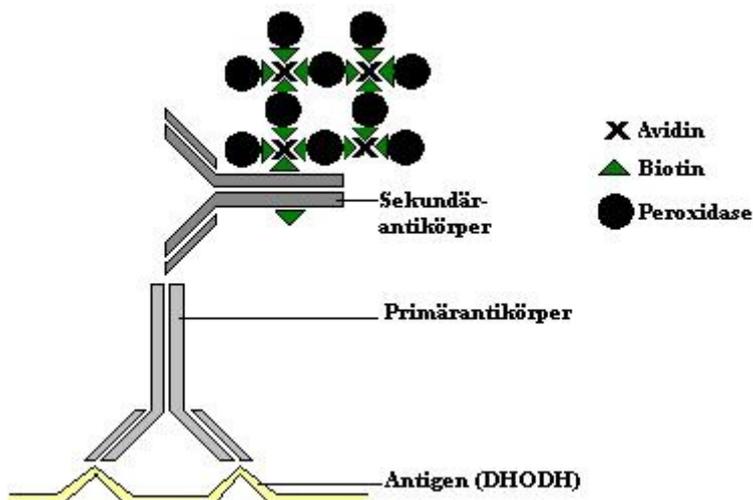


Abb. 2.4 Darstellung der ABC-Methode

Eine weitere Verstärkung wurde bei ausgewählten Schnitten durch Inkubation mit biotinyliertem Tyramid erreicht. Wie beschrieben (siehe oben) binden an den Primärantikörper sukzessive ein biotinylierter Sekundärantikörper und ein Streptavidin-Biotin-

Peroxidase-Komplex. Durch diesen Komplex wird die Präzipitation eines biotinylierten Phenolderivats, des Tyramids, in unmittelbarer Nähe des gebundenen Primär-Antikörpers katalysiert, was zu einer Erhöhung der Anzahl der Biotin-Moleküle und so zu einer Signalverstärkung führt.

### 2.13.2 Durchführung

#### Tag 1

Für den immunhistochemischen Nachweis der DHODH im ZNS der Ratte wurden mittels Paraformaldehyd fixierte, in Paraffin eingebettete Schnitte mit einer Schichtdicke von 8  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Gewebeproben sowie die verwendeten Materialien wurden durch die AG Weihe des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg bereitgestellt. Die Schnitte wurden in Xylol 3 x 10 Minuten entparaffiniert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert; Isopropanol absolut 10 Minuten, 0,15 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol 30 Minuten, Isopropanol absolut 10 Minuten, 96 % Isopropanol, 80 % Isopropanol, 70 % Isopropanol und 2 x Aqua bidest je 5 Minuten.

Nun wurden die Objektträger für 15 Minuten in 0,01 M Natriumcitratpuffer (pH6,0) gekocht (92-95 °C). Dann wurden die Objektträger trocken gesaugt und die Schnitte mit dem PAP-Pen<sup>®</sup> einzeln umfahren. Für weitere 30 Minuten wurden die Schnitte in eine Küvette mit 5 % BSA in 50 mM PBS, danach für 5 Minuten in 1 % BSA-PBS gestellt. Es folgte eine Avidin-Blockade mit 30 %igem Avidin in 1 %igem BSA-PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. So konnten die Bindungsstellen des endogenen Biotins des Gewebes mit Avidin geblockt werden. Nach einer erneuten Inkubation in 1 %igem BSA-PBS (5 Minuten) wurde die Biotinblockade mit 30 %igem Biotin (in 1 % BSA-PBS) analog zur Avidinblockade durchgeführt. Dadurch wurden die übrigen Bindungsstellen des Avidins für Biotin mit diesem besetzt. Nach einer dritten Inkubation mit 1 % BSA-PBS für 5 Minuten, wurde der Primärantikörper auf die Schnitte gegeben.

Um die optimale Konzentration des primären Antikörpers zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe (1:4, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10000, 1:20000) angesetzt. Die Schnitte wurden über Nacht mit dem primären Antikörper in einer feuchten Kammer bei 16 °C inkubiert.

#### Tag 2

Zunächst wurden die Schnitte am folgenden Morgen für weitere 2 Stunden bei 37° mit dem primären Antikörper inkubiert (in feuchter Kammer). Anschließend wurden folgende

Waschschritte durchgeführt: Der Antikörper wurde mit Aqua bidest abgespült und 3 x 5 Minuten in Aqua bidest gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte in 50 mM PBS für 10 Minuten gewaschen.

Nach einer 5 minütigen Inkubation mit 0,5 % BSA-PBS erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (in einer Konzentration von 1:200) für 45 Minuten bei 37°C. Die oben genannten Waschschritte sowie die folgende Inkubation in 0,5 % BSA-PBS wurden erneut durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem AB-Komplex 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Schnitte, auf denen mit Tyramid-Verstärkung gearbeitet werden sollte, wurden 5 Minuten in Aqua bidest und 3 x 5 Minuten in TN-Puffer gewaschen, bevor sie 10 Minuten mit biotinyliertem Tyramid inkubiert wurden. Anschließend erfolgte erneut die Waschung der Schnitte in TN-Puffer (2 x 5 Minuten), in Aqua bidest (1 x 5 Minuten) und 50 mM PBS (10 Minuten). Nach Inkubation mit 0,5 % BSA-PBS (5 Minuten) folgte erneut die Inkubation mit dem AB-Komplex (wie oben beschrieben). Die Schnitte, auf denen keine Tyramid-Verstärkung gewünscht war, wurden im Anschluss an die erste Inkubation mit dem AB-Komplex sofort gewaschen.

Nach Durchführung der Waschschritte wurden die Schnitte mit DAB-Nickel-Lösung 5 Minuten vorinkubiert. Zur Entwicklung der Farbreaktion wurden 112 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 800 mL DAB-Nickel-Lösung zugegeben. Nach 8 Minuten wurde die Farbreaktion durch Spülung in Aqua bidest gestoppt (3 x 5 Minuten). Die Schnitte wurden abschließend in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, 3 x mit Xylol gewaschen (je 10 Minuten) und mit Depex eingedeckelt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Immunchemischer Nachweis der DHODH mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese und Western Blot**

##### **3.1.1 Überprüfung und Optimierung der Methodik**

###### **3.1.1.1 DHODH-Nachweis mit affinitätsgereinigtem K5-Antikörper**

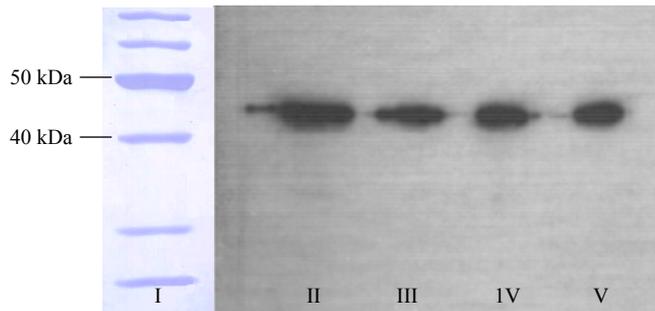
Die in Abschnitt 3.1 präsentierten Ergebnisse sollten die Optimierung der Versuchsdurchführung ermöglichen und den Nachweis der DHODH im Gewebehomogenat der Ratte erbringen. Die Resultate werden in chronologischer Reihenfolge dargestellt.

Zunächst erfolgte der Enzymnachweis in einer DHODH-Stammlösung mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot. Die Enzymkonzentration der verwendeten Stammlösung betrug 30 µg DHODH pro mL. Der affinitätsgereinigte Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:200 (in PBS-Tween), der Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:10000 (in PBS-Tween) verwendet. So gelang die Überprüfung der Reliabilität des immunhistochemischen DHODH-Nachweises unter Anwendung des K5-Antikörpers.

Die Durchführung der SDS-PAGE, des Western Blots mit anschließendem Antikörpernachweis und der ECL-Reaktion erfolgte wie in Kapitel 2.7 beschrieben. Abbildung 3.1.1 zeigt den für 45 Sekunden in einer Filmkassette belichteten Röntgenfilm. Die vier Proteinbanden sind klar zu erkennen. Eine Hintergrundreaktion liegt nicht vor. Quantitativ (bezüglich der aufgetragenen Proteinmenge) kann ein erster Eindruck gewonnen werden; die Bandenfläche scheint bei höherer Proteinmenge relativ vergrößert. Weiterführende semiquantitative Analyseverfahren kamen hier jedoch nicht zum Einsatz.

Bei der in der Stammlösung enthaltenen DHODH handelte es sich um das rekombinante, humane, N-terminal verkürzte Enzym mit einer Masse von 42,2 kDa [Grein, 1998]. Die Lokalisation der abgebildeten Banden korreliert mit den Angaben von Grein. Die Banden sind somit eindeutig der DHODH zuzuordnen.

Demnach konnte gezeigt werden, dass die, in Kapitel 2.7 beschriebene methodische Vorgehensweise, zum Nachweis der DHODH herangezogen werden kann. Der verwendete Antikörper zeigte die gewünschte Affinität zur DHODH.



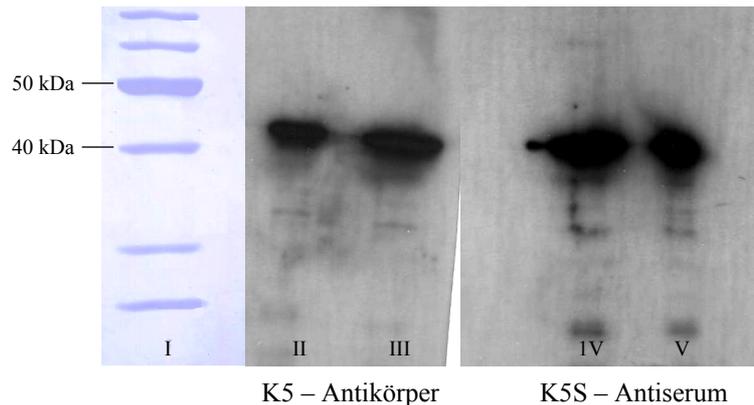
**Abb. 3.1.1 Western Blot I: Nachweis der aufgereinigten DHODH**, Belichtungszeit 45 Sekunden

- |     |   |
|-----|---|
| I   | 7 $\mu$ l Marker $\rightarrow$ PAGE Ruler (25 kDa – 70 kDa)   |
| II  | 16 $\mu$ l DHODH – Stammlösung [= 0,48 $\mu$ g Protein] + 4 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) |
| III | 12 $\mu$ l DHODH – Stammlösung [= 0,36 $\mu$ g Protein] + 3 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) |
| IV  | 8 $\mu$ l DHODH – Stammlösung [= 0,24 $\mu$ g Protein] + 2 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x)  |
| V   | 4 $\mu$ l DHODH – Stammlösung [= 0,12 $\mu$ g Protein] + 1 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x)  |

### 3.1.1.2 DHODH-Nachweis: Vergleich zwischen K5-Antikörper und K5S-Antiserum

Um die Ergebnisse unter Verwendung des affinitätsgereinigten K5-Antikörpers (vergleiche 3.1.1.1) mit denen einer K5S-Antiserum-Inkubation zu vergleichen, wurde mit beiden eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Für die Erstinkubation wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:200, das Antiserum in einer Verdünnung von 1:20000 verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde weiterhin Goat-anti-Rabbit-IgG in einer 1:10000-Verdünnung verwendet. Abbildung 3.1.2 zeigt den für 45 Sekunden belichteten Röntgenfilm.

Der qualitative Unterschied zwischen dem K5-Antikörper- und dem K5S-Antiserum-DHODH-Nachweis ist gering. Auf beiden Filmen zeigen sich, neben der deutlichen Bande der DHODH, einige Banden geringerer Fläche und Intensität. Jedoch führt die Verwendung des Antiserums im Vergleich zum affinitätsgereinigten Antikörper zu einer deutlicheren Darstellung von Banden kleinerer Proteine. Hierbei könnte es sich eventuell um Abbauprodukte der Dihydroorotat-Dehydrogenase handeln. Die DHODH-Bande ist bei beiden Ansätzen klar abzugrenzen und liegt im Bereich der für die verkürzte DHODH angegebenen Masse von 42,2 kDa [Grein, 1998].



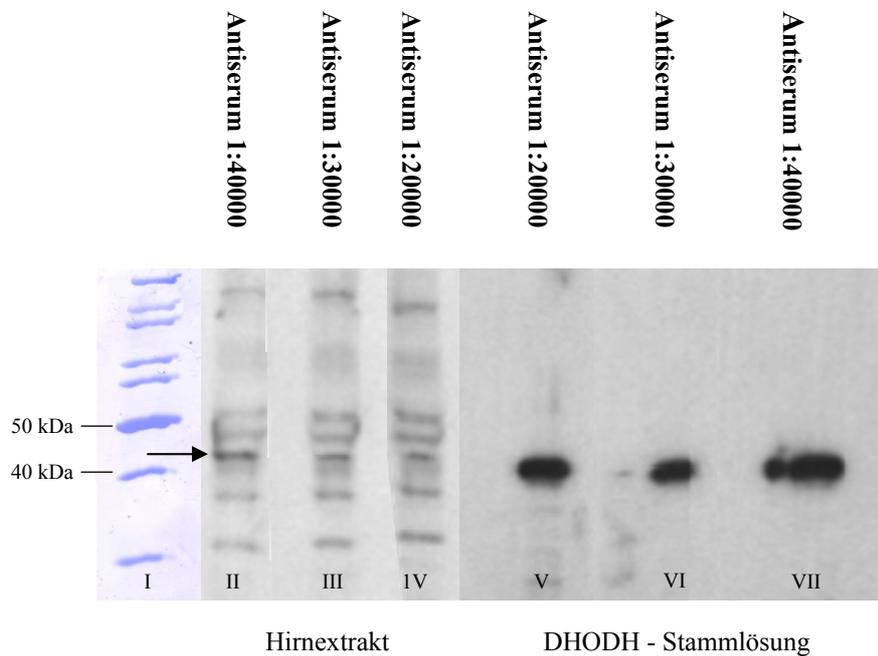
**Abb. 3.1.2 Western Blot II: Unterschiede in der Nachweisqualität zwischen aufgereinigtem K5 – Antikörper und K5 – Antiserum, Belichtungszeit 45 Sekunden**

- |     |  |
|-----|--|
| I   | 7 $\mu$ l Marker $\rightarrow$ PAGE Ruler (25 kDa – 70 kDa)  |
| II  | 12 $\mu$ l DHODH – Stammlösung [= 0,36 $\mu$ g Protein] + 3 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5 – Antikörper (1:200)   |
| III | 16 $\mu$ l DHODH – Stammlösung [= 0,48 $\mu$ g Protein] + 4 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5 - Antikörper (1:200)   |
| IV  | 16 $\mu$ l DHODH – Stammlösung [= 0,48 $\mu$ g Protein] + 4 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5S – Antiserum (1:20000) |
| V   | 12 $\mu$ l DHODH – Stammlösung [= 0,36 $\mu$ g Protein] + 3 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5S – Antiserum (1:20000) |

### 3.1.1.3 Titer-Optimierung des K5-Antikörpers und des K5S-Antiserums

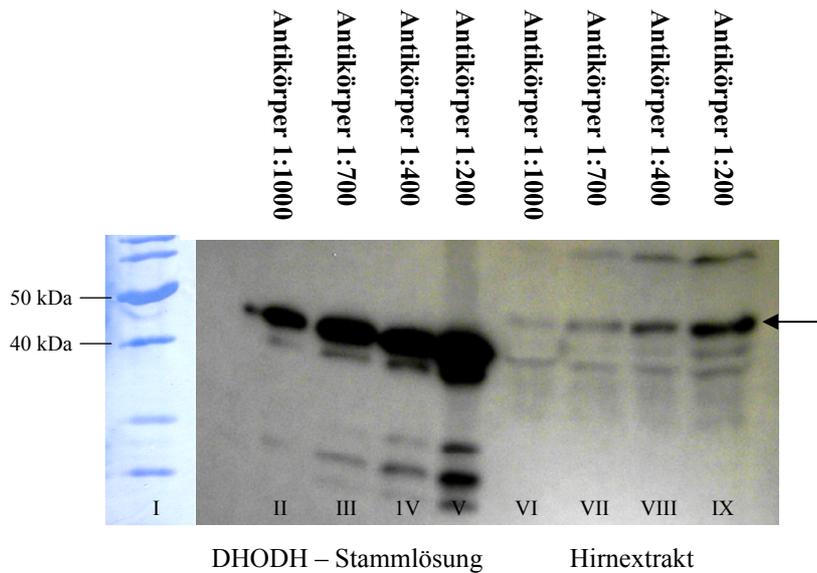
Das Ziel dieses Versuchsabschnittes bestand in dem Nachweis der Dihydroorotat-Dehydrogenase im Hirnextrakt der Ratte, unter Verwendung des K5-Antikörpers bzw. -Antiserums. Hierbei handelte es sich um Extrakt des gesamten Hirns. Für weiterführende Versuche an verschiedenen Gewebekomponenten (siehe Kapitel 3.1.2 und 3.1.3) sollten die optimalen Konzentrationen von K5-Antikörper und K5S-Antiserum bei der Anwendung im Rahmen des DHODH-Nachweises im Rattenhirn festgelegt werden. Hierzu wurden verschiedene Antikörper- und Antiserum-Konzentrationen bei der Erstinkubation eingesetzt: Der affinitätsgereinigte K5-Antikörper wurde in den Verdünnungen 1:200, 1:400, 1:700 und 1:1000, das K5S-Antiserum in den Verdünnungen 1:20000, 1:30000 und 1:40000 verwendet. Die Inkubation mit Sekundäntikörper Goat-anti-Rabbit IgG-HRP erfolgte analog zu den vorherigen Versuchen (Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.2). Zur Detektion der DHODH-Banden im Rattenhirnextrakt ließ man in derselben SDS-PAGE Verdünnungen einer DHODH Stammlösung als Kontrolle mitlaufen. Die Abbildungen 3.1.3 (Bestimmung des Antiserumtiters) und 3.1.4 (Bestimmung des Antikörpertiters)

zeigen die entsprechenden Röntgenfilme nach ECL-Reaktion und Belichtung für 30 Sekunden.



**Abb. 3.1.3 Western Blot III:** Bestimmung des Antiserumtiters, Belichtungszeit 30 Sekunden

- |     |   |
|-----|---|
| I   | 7 $\mu$ l Marker $\rightarrow$ PAGE Ruler (30 kDa – 120 kDa)  |
| II  | 12 $\mu$ l Hirnextrakt unverdünnt + 3 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x)<br>$\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5S-Antiserum 1:40000                   |
| III | 12 $\mu$ l Hirnextrakt unverdünnt + 3 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x)<br>$\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5S-Antiserum 1:30000                   |
| IV  | 12 $\mu$ l Hirnextrakt unverdünnt + 3 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x)<br>$\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5S-Antiserum 1:20000                   |
| V   | 8 $\mu$ l DHODH – Stammlösung [= 0,24 $\mu$ g Protein] + 2 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5S-Antiserum 1:20000 |
| VI  | 8 $\mu$ l DHODH – Stammlösung [= 0,24 $\mu$ g Protein] + 2 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5S-Antiserum 1:30000 |
| VII | 8 $\mu$ l DHODH – Stammlösung [= 0,24 $\mu$ g Protein] + 2 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5S-Antiserum 1:40000 |



**Abb. 3.1.4 Western Blot IV:** Bestimmung des Antikörpertiters, Belichtungszeit 30 Sekunden

- |      |  |
|------|--|
| I    | 7 $\mu$ l Marker $\rightarrow$ PAGE Ruler (25 kDa – 70 kDa)  |
| II   | 8 $\mu$ l DHODH-Stammlösung [= 0,24 $\mu$ g Protein] + 2 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5-Antikörper 1:1000 |
| III  | 8 $\mu$ l DHODH-Stammlösung [= 0,24 $\mu$ g Protein] + 2 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5-Antikörper 1:700  |
| IV   | 8 $\mu$ l DHODH-Stammlösung [= 0,24 $\mu$ g Protein] + 2 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5-Antikörper 1:400  |
| V    | 8 $\mu$ l DHODH-Stammlösung [= 0,24 $\mu$ g Protein] + 2 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5-Antikörper 1:200  |
| VI   | 12 $\mu$ l Hirnextrakt unverdünnt + 3 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5-Antikörper 1:1000                    |
| VII  | 12 $\mu$ l Hirnextrakt unverdünnt + 3 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5-Antikörper 1:700                     |
| VIII | 12 $\mu$ l Hirnextrakt unverdünnt + 3 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5-Antikörper 1:400                     |
| IX   | 12 $\mu$ l Hirnextrakt unverdünnt + 3 $\mu$ l Probenpuffer + Mercaptoethanol (4x) $\rightarrow$ Inkubation des Blots mit K5-Antikörper 1:200                     |

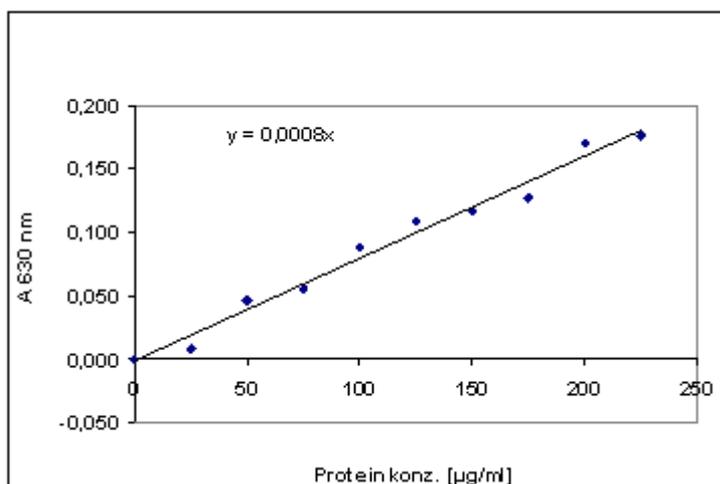
### Bewertung

Bei dem Antiserum erzielte die höchste Verdünnung von 1:40000 den deutlichsten Nachweis einer Proteinbande bei etwa 42 kDa. Insgesamt waren die Ergebnisse bei Verwendung des K5-Antikörpers jedoch zufrieden stellender. Der affinitätsgereinigte Antikörper stellte die DHODH-Bande am deutlichsten bei einer Verdünnung von 1:200 dar. Daher wurde bei den folgenden Versuchen der K5-Antikörper in einer Konzentration von

1:200 verwendet. Die Banden des DHODH - Standardproteins sind etwas unterhalb der DHODH-Banden des Hirnextraktes zu sehen. Bei dem hier verwendeten Protein handelt es sich um eine auf 42,2 kDa verkürzte Version der rekombinant gewonnenen DHODH [Grein, 1998]. Diese läuft im Vergleich zur nativen Ratten-DHODH (42,7 kDa) etwas weiter in das SDS-Gel hinein.

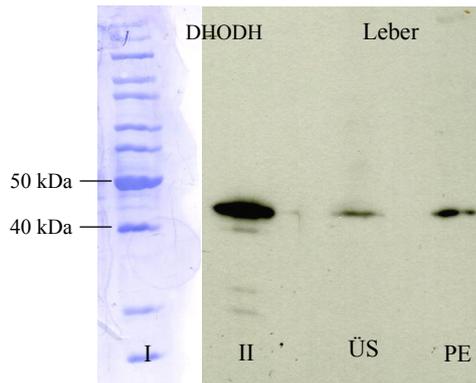
### 3.1.2 Immunchemischer Nachweis der DHODH in Rattenleberextrakten

Um das Verfahren zur Gewebeextraktion für das Hirn zu überprüfen, wurde zunächst Rattenleber, ein bekanntermaßen DHODH-reiches Gewebe, als Testgewebe verwendet. Außerdem sollte die Erfahrung, dass sich die DHODH besonders stark in Proben aus dem 14000 g - Pellet des Gewebeextraktes darstellen lässt, kontrolliert werden. Nach Abtrennung der Kerne und Gewebetrümmern bei 600 g werden die Mitochondrien im zweiten Zentrifugationsschritt im Pellet angereichert. Als ein mitochondrial lokalisiertes Enzym lässt sich die DHODH nur in dieser Fraktion nachweisen. Um die für die SDS-PAGE verwendete Proteinmenge angeben zu können, wurde eine Proteinbestimmung (nach Bradford, Kapitel 2.7) durchgeführt.



**Abb. 3.1.5 Proteinbestimmung nach Bradford.** Kalibrierkurve mit BSA als Standardprotein.

Abbildung 3.1.5 zeigt die Kalibrierkurve für diesen Test. Daraus errechneten sich die Proteinkonzentration von Pellet (25,86 mg/ml) und Überstand (48,13 mg/ml). Auf diese Weise konnte in der folgenden SDS-PAGE jeweils eine definierte Proteinmenge von 13 µg aufgebracht werden. Zur Detektion der DHODH im Western Blot wurde der affinitätsgereinigte K5-Antikörper (Anti-DHODH-IgG) verwendet. Der resultierende belichtete Röntgenfilm ist in Abbildung 3.1.6 dargestellt.



**Abb. 3.1.6 Western Blot V:** Immunchemischer Nachweis der DHODH in Leberextrakt

I	Marker → PAGE Ruler (25 kDa – 200 kDa)
II	0,24 µg DHODH Protein
ÜS:	Überstand
PE:	Pellet

### Bewertung

Die DHODH-Bande des Gewebe-Pellets erschien deutlich im Bereich von 42 kDa. Allerdings zeigte sich ebenfalls eine, wenn auch weniger starke Bande im Überstand. Es gelang also eine Anreicherung der DHODH im Pellet des Leberextraktes, die vollständige Konzentration des Enzyms allein im Pellet konnte jedoch nicht erreicht werden. Ein Grund hierfür könnte die Schwierigkeit der exakten Trennung von Überstand und Pellet darstellen. Das Vorliegen von Mitochondrienbruch im Überstand bietet sich als Erklärung an. Die angewandte Methode zur Gewinnung des Enzymproteins aus Gewebe konnte somit in ihrer Funktionalität bestätigt und auf die folgenden Untersuchungen der DHODH im Rattenhirn angewendet werden.

### **3.1.3 Immunchemischer Nachweis der DHODH im ZNS der adulten Ratte**

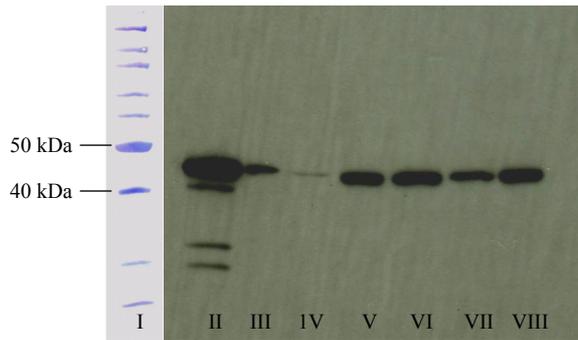
In der Literatur wurde der Nachweis der DHODH in Hirnextrakten verschiedener ZNS-Abschnitte bislang nicht beschrieben. Dieser Nachweis sollte daher zunächst mithilfe einer SDS-PAGE und Western Blots erbracht werden. Hierzu wurden die Mitochondrienfraktionen aus Gewebekomogenaten von Hypothalamus, Bulbus olfactorius, Colliculi superiores, Colliculi inferiores, Thalamus, Kleinhirn, Hippocampus, Kortex, Rückenmark, Striatum, Hirnstamm und Hypophyse gewonnen und deren Proteingehalt bestimmt. So konnten, zur gelelektrophoretischen Trennung, gleiche Proteinmengen

(jeweils ca. 13 µg Protein pro Spur) aufgetragen werden. Die Ergebnisse der Proteinbestimmungen sind in Tabelle 3.1.5 zusammengefasst.

**Tab. 3.1.5 Analyse des Proteingehaltes gewonnener ZNS-Extrakte**

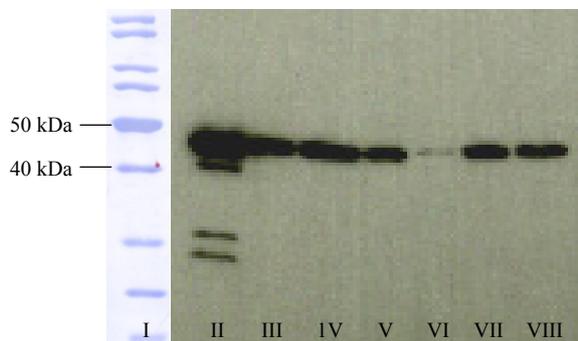
<b>GEWEBE</b>	<b>PROBEN</b>	<b>PROTEIN-KONZENTRATION</b>
<b>Hirnstamm</b>	Probe Pellet	8,00 mg/ml
	Probe Überstand	13,33 mg/ml
<b>Kleinhirn</b>	Probe Pellet	23,83 mg/ml
	Probe Überstand	20,33 mg/ml
<b>Hippocampus</b>	Probe Pellet	6,83 mg/ml
	Probe Überstand	11,17 mg/ml
<b>Kortex</b>	Probe Pellet	8,00 mg/ml
	Probe Überstand	18,60 mg/ml
<b>Rückenmark</b>	Probe Pellet	2,40 mg/ml
	Probe Überstand	2,80 mg/ml
<b>Thalamus</b>	Probe Pellet	11,80 mg/ml
	Probe Überstand	15,40 mg/ml
<b>Striatum</b>	Probe Pellet	5,80 mg/ml
	Probe Überstand	4,40 mg/ml
<b>Bulbus olfactorius</b>	Probe Pellet	13,60 mg/ml
	Probe Überstand	18,63 mg/ml
<b>Hypothalamus</b>	Probe Pellet	5,20 mg/ml
	Probe Überstand	12,80 mg/ml
<b>Colliculi inferiores</b>	Probe Pellet	4,00 mg/ml
	Probe Überstand	6,67 mg/ml
<b>Colliculi superiores</b>	Probe Pellet	2,00 mg/ml
	Probe Überstand	11,00 mg/ml
<b>Hypophyse</b>	Probe Pellet	4,00 mg/µl
	Probe Überstand	10,17 mg/µl

Die Ergebnisse der Detektion der DHODH mittels Western Blot unter Verwendung von K5-Antikörper in einer 1:200-Verdünnung, sind die in Abbildung 3.1.10 und Abbildung 3.1.11 dargestellt. Wie in den zuvor durchgeführten immunchemischen Nachweisen, ließ man isoliertes DHODH-Protein als Standard mitlaufen.



**Abb. 3.1.7 Immunchemischer DHODH-Nachweis im ZNS der Ratte (1) [Western Blot VI]**

I	7µl Marker → PAGE Ruler
II	0,36 µg DHODH aus Stammlösung
III	13 µg Protein aus Kleinhirn
IV	13 µg Protein aus Hirnstamm
V	13 µg Protein aus Hippocampus
VI	13 µg Protein aus Kortex
VII	13 µg Protein aus Striatum
VIII	13 µg Protein aus Rückenmark



**Abb. 3.1.8 Immunchemischer DHODH-Nachweis im ZNS der Ratte (2) [Western Blot VII]**

I	7µl Marker → PAGE Ruler
II	0,36 µg DHODH aus Stammlösung
III	13 µg Protein aus Hypothalamus
IV	13 µg Protein aus Bulbus olfactorius
V	13 µg Protein aus Hypophyse
VI	13 µg Protein aus Colliculi inferiores
VII	13 µg Protein aus Colliculi superiores
VIII	13 µg Protein aus Thalamus

Beurteilung

Zunächst ist festzustellen, dass in jedem der resezierten Hirnteile der immunchemische Nachweis der DHODH positiv war. Die Signale sind eindeutig der DHODH-Bande (links) zuzuordnen. Da gleiche Mengen an Protein eingesetzt wurden, wird hier der Versuch gemacht, die Gesamtzymmenge in den jeweiligen Hirnstrukturen abzuschätzen. Somit ließen sich die einzelnen Strukturen nach Bandenfläche einteilen:

<u>1. Gruppe:</u>	Kortex	↓	Abnehmende Bandenfläche
	Striatum		
	Hippocampus		
	Thalamus		
	Hypothalamus		
	Colliculi superiores		
	Hypophyse		
	Kleinhirn		
	Rückenmark		
<u>2. Gruppe:</u>	Hirnstamm		
	Colliculi inferiores		

Weil bei einer Dissektion des Ratten-ZNS detailgenaue Strukturgrenzen nur schwerlich einzuhalten sind, kann diese Aussage lediglich eine Orientierung für weitere Ansätze darstellen. Die Erkenntnis, dass sich das Enzym mit dem verwendeten Antikörper zuverlässig in den untersuchten Hirnarealen nachweisen ließ, war die wesentliche Voraussetzung für die weiterführende Untersuchung der Aktivität und Lokalisation des Enzyms. Hierzu wurden im Folgenden die NBT-Technik sowie der Antikörpernachweis mit affinitäts-gereinigtem IgG auf Hirnschnitten der Ratte durchgeführt.

### 3.2 Nachweis der DHODH-Aktivität auf Kryoschnitten des ZNS mittels NBT-Technik

#### 3.2.1 Optimierung der Methodik

Der histochemische Nachweis der DHODH wurde im Wesentlichen nach der von Becker (2004) beschriebenen Methode durchgeführt. Zunächst sollte diese Versuchsmethodik überprüft und optimiert werden. Als Referenzgewebe dienten hierzu Rattenleber und -niere. Die DHODH-Aktivität wurde in beiden Geweben bereits in vorangegangenen Arbeiten (Löffler et al., 1996) nachgewiesen. Bei Leberschnitten wurde eine optimale Inkubationszeit von 30 Minuten ermittelt, Nierengewebe musste im Rahmen der Standarddurchführung (Kapitel 2.9.3) nur 10 Minuten inkubiert werden. Als optimal gilt die kürzeste Inkubationszeit, bei der bereits eine sehr deutliche Farbreaktion zu erkennen ist. Die Farbreaktion wurde in 5 Minuten-Intervallen mikroskopisch kontrolliert und bewertet (siehe auch Tab. 3.2.1).

**Tab. 3.2.1 Optimierung der Versuchsmethodik mit Kryoschnitten der Leber und der Niere**

INKUBATION S-ZEIT [MINUTEN]	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Niere [+ Cyanid]	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Niere [+ Azid]	+	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
Niere [ohne Zusatz]	-	+	+	+	++	++	++	++	++	++	+++	+++
Niere [ohne DHO]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leber [+ Cyanid]	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Leber [+ Azid]	-	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Leber [ohne Zusatz]	-	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Leber [ohne DHO]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- keine Farbreaktion            ++ deutliche Farbreaktion  
+ leichte Farbreaktion        +++ sehr deutliche Farbreaktion

Weiterhin wurde die Notwendigkeit des Einsatzes von Cyanid bzw. Azid in der Inkubationslösung abgeklärt (siehe Kapitel 2.9.2). Die Inkubationslösungen enthielten Cyanid und Azid in einer Endkonzentration von 1 mM. Die Intensität der Farbreaktion wurde ebenfalls in 5 Minuten-Abständen mikroskopisch kontrolliert. Die Ergebnisse sind in der obigen Tabelle (Tab. 3.2.1) dargestellt.

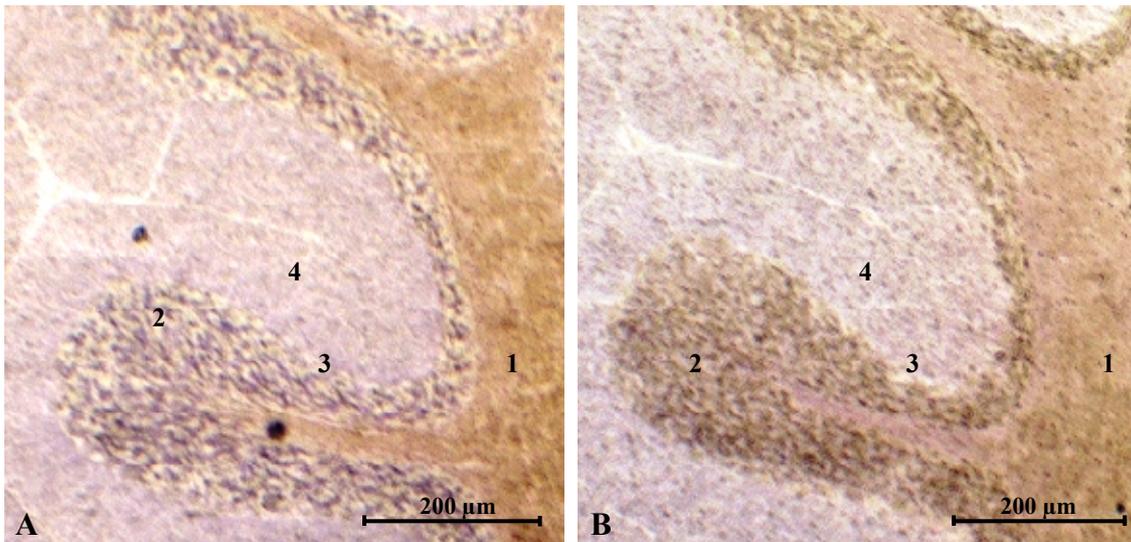
Diese Ergebnisse machen deutlich, dass durch den Einsatz von Cyanid nach kürzerer Zeit eine Farbreaktion zu erkennen war als bei den Inkubationen mit anderen Testansätzen. Azid führte zwar im Vergleich zu der Inkubation ohne Zusatz zu einer schnelleren Farbreaktion, konnte jedoch nicht die Ergebnisse von Cyanid im Inkubationsansatz erreichen. Da mit einer kürzeren Inkubationszeit eine geringere potenzielle Gewebeschädigung einhergeht, entschied man sich für den Inkubationsansatz mit Cyanid in einer Endkonzentration von 1 mM.

Im Anschluss wurden höhere Cyanid- und Azid-Konzentrationen (10 mM) ausgetestet. Sie führten jedoch nicht zu deutlich verbesserten Ergebnissen. Daher wurde das unter 2.9.3 als Standardvorgehen beschriebene Verfahren für alle weiteren NBT-Formazan-Nachweisreaktionen angewendet. Auch die geeignete Inkubationszeit für ZNS-Schnitte im Rahmen des NBT-Nachweises wurde experimentell festgelegt. Hierzu wurden Sagittalschnitte des ZNS bis zu 1,5 Stunden nach dem Standardverfahren inkubiert. Die mikroskopische Kontrolle der Schnitte in 5-Minuten-Abständen zur Beurteilung der Farbreaktion und der Gewebsschädigung ließ eine optimale Inkubationszeit von 60 Minuten erkennen. Für alle weiteren Versuche wurde die Inkubationsdauer für Hirnschnitte somit auf eine Stunde festgelegt.

### **3.2.2 Verteilungsmuster der DHODH-Aktivität im ZNS**

Da bislang kaum Daten zum Vorkommen der DHODH im ZNS vorliegen, wurde in dieser Arbeit ein Screening nach DHODH im Gehirn sowie im Rückenmark der Ratte durchgeführt. Hierzu wurde auf zahlreichen Sagittal- und Frontalschnitten, die das komplette Rattenhirn abdeckten, die Aktivität der DHODH mittels NBT/Formazan Nachweis durchgeführt. Die Ergebnisse für die wichtigsten funktionellen Zentren des Gehirns sind im Folgenden dargestellt.

### Cerebellum (Kleinhirn)



**Abb. 3.2.1 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im Kleinhirn, Übersichtsvergrößerung.**

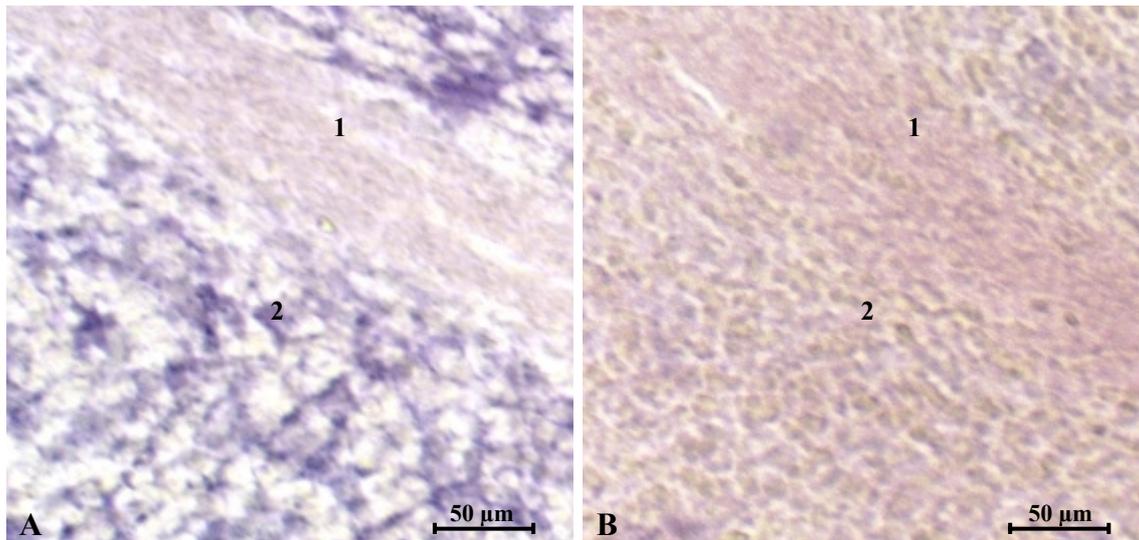
A: Aktivitätsnachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

- (1) Marklager
- (2) Körnerzellschicht
- (3) Purkinjezellschicht (in der Übersichtsvergrößerung nicht eindeutig dargestellt)
- (4) Molekularschicht

Die obigen Abbildungen zeigen den typischen histologischen Aufbau des Kleinhirns: Das Cerebellum lässt sich in das innen liegende Mark und die nach außen anschließende Rinde unterscheiden. Die Kleinhirnrinde gliedert sich von innen nach außen in Körnerschicht (Stratum granulosum), Purkinjezellschicht (Stratum purkinjense) und Molekularschicht (Stratum moleculare).

In der Übersichtsabbildung 3.2.1 wird bereits deutlich, dass sich der blau-violette Formazanniederschlag, der infolge der Reduktion des NBT durch DHO entsteht, im enzymhistochemischen Nachweis der DHODH (A) in erster Linie in der Körnerschicht gebildet hat. Die Aktivität der DHODH ist demnach in der Körnerschicht höher als in den übrigen Kleinhirnschichten. Im Einzelnen lassen sich folgende Betrachtungen anstellen:

Das Marklager besteht aus weißer Fasersubstanz. Erwartungsgemäß zeigt sich hier, mangels zellulärer Bestandteile, keine DHODH-Aktivität. Es ist kein markanter Unterschied zwischen dem Bild A und B der Abbildung 3.2.1 festzustellen. Im Marklager sind die Kleinhirnkerne (Bestandteile der grauen Substanz) eingelagert. Sie sind auf den obigen Abbildungen nicht angeschnitten.

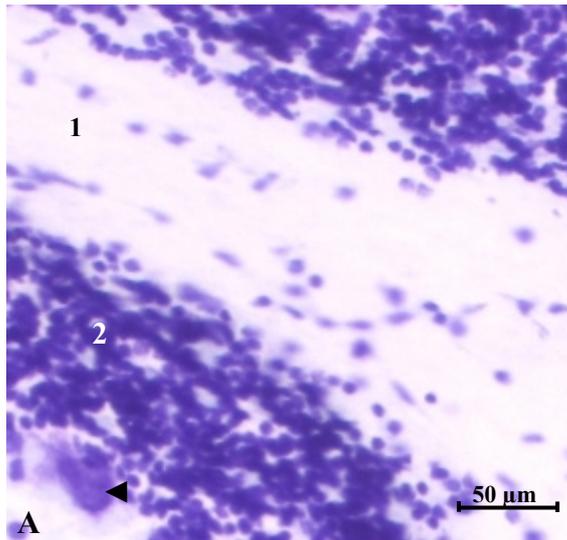


**Abb. 3.2.2 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im Kleinhirn, stärkere Vergrößerung.** A: Aktivitätsnachweis der DHODH. B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

- (1) Marklager
- (2) Körnerzellschicht

Insgesamt wird deutlich, dass das Stratum granulosum von allen vier Kleinhirnschichten die stärkste Farbreaktion im NBT-Test zeigt. Der deutliche blau-violetten Niederschlag spricht für eine hohe DHODH-Aktivität dieses Abschnitts in Relation zu den übrigen Kleinhirnstrukturen. Da die Körnerzellschicht bezüglich der DHODH-Aktivität alle anderen Kleinhirnschichten übertrifft, gilt es, die wesentlichen Unterschiede zu den übrigen Zonen hervorzuheben. Das Stratum granulosum ist die nervenzellreichste der vier Kleinhirnschichten. Es enthält 99 % der kortikalen Neurone [Trepel, 2004] und besteht überwiegend aus Körnerzellen. Diese multipolaren Neurone sind mit ihrem Transmitter Glutamat die einzigen erregenden Zellen der Kleinhirnrinde. Auf Abbildung 3.2.2 (A) sind zwischen den (aktiven) blau gefärbten Zellen, auch weiße Areale zu erkennen. Hierbei handelt sich wahrscheinlich um nicht-aktive Zellen. Hieraus ließe sich ableiten, dass sich im NBT-Nachweis nur Subpopulationen von Zellen der Kleinhirnrinde angefärbt haben (neben den Körnerzellen kämen beispielsweise GABAerge Interneurone oder Glia in Frage).

Da in diesem Fall die Körnerzellen nur schwerlich abzugrenzen sind, soll die darauf folgende Abbildung 3.2.3 (A) die Lokalisation und dichte Anordnung der Körnerzellen verdeutlichen. Bei dieser Abbildung handelt es sich um einen KS-gefärbten Sagittalschnitt des Kleinhirns. Hier ist die Körnerschicht (2) mit ihren dicht gepackten Neuronen deutlich von dem faserreichen Marklager (1) abzugrenzen.



**Abb. 3.2.3 KS-Färbung eines Kleinhirn-Sagittalschnittes.**

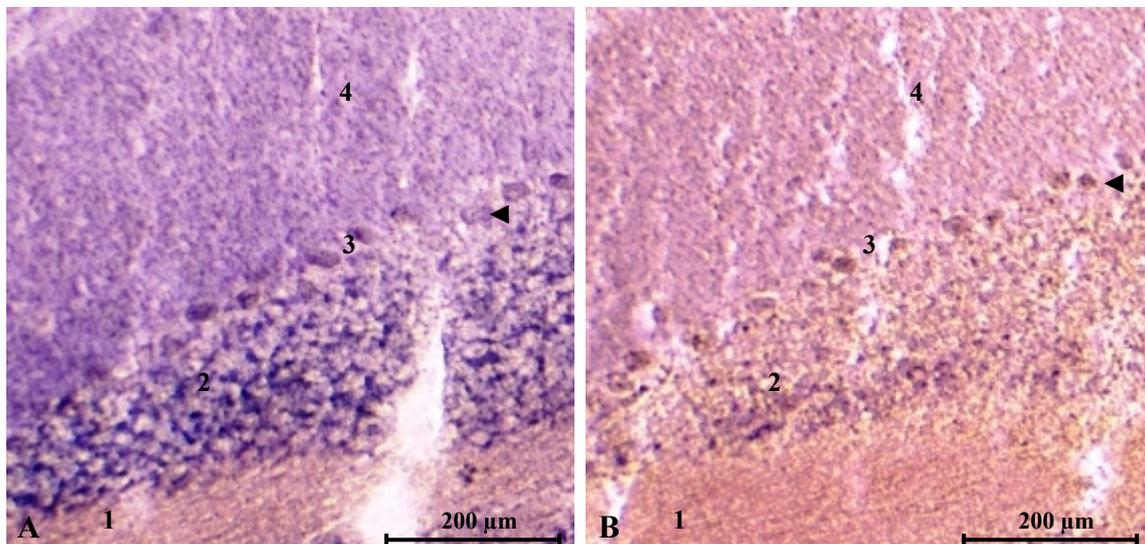
- (1) Faserreichen Marklager
- (2) Körnerschicht mit dicht gepackten Neuronen
- (◄) angeschnittene Purkinjezelle.

Körnerzellen empfangen Afferenzen aus den Ncll. pontis, den Ncll. vestibulares oder dem Rückenmark, die als Moosfaserafferenzen bezeichnet werden. Die Körnerzellen richten ihre Efferenzen in die Molekularschicht, wo sie als Parallelfasern Synapsen an den Dendritenbäumen der Purkinjezellen bilden. Sie übermitteln auf diese Weise als eine Zwischenstation die Information, die ihnen von extern zufließt, direkt an die Purkinjezellen weiter, wobei die Impulse über zahlreiche Kollaterale vervielfacht werden.

Neben den Körnerzellen findet man im Stratum granulosum in weitaus geringerem Ausmaß Astrozyten und Golgi-Zellen [Schiebler, 1999]. Golgi-Zellen sind eine Art „negatives Feedback“-System für die Körnerzellen. Ihr Dendritenbaum steigt wie derjenige der Purkinje-Zellen weit in die Molekularschicht auf, breitet sich dort aber im Gegensatz zu den Purkinje-Zellendriten nicht zweidimensional, sondern dreidimensional aus. Die Golgi-Zellendriten werden von den Parallelfasern der Körnerzellen, z.T. auch direkt von Moosfasern erregt. Die Axone der Golgi-Zellen bilden inhibitorische Synapsen an den Dendriten der Körnerzellen in den Glomeruli cerebellares.

Die Körnerzellschicht unterscheidet sich histologisch also vor allem durch ihren hohen Neuronenanteil von den übrigen Kleinhirnschichten. Die markante Blaufärbung im Aktivitätsnachweis (siehe Abbildungen 3.2.1 und 3.2.2 A) lässt vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen Neuronendichte und DHODH-Aktivität besteht. Um diesen Befund zu kontrollieren, wurde die neuronale Lokalisation der DHODH mittels eines immunhistochemischen Nachweisverfahrens überprüft (siehe Kapitel 3.6). Auch wenn einige Autoren Abschnitte der *de novo* Pyrimidinsynthese vor allem in Astrozyten vermutet

haben [Cammer, Downing, 1991], deutet der selektive Nachweis des präzipitierten Formazans in der Körnerschicht auf eine neuronale DHODH-Aktivität hin. Die weitere Besprechung dieser Annahme erfolgt in Kapitel 4. Diskussion.



**Abb. 3.2.4 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im Kleinhirn, stärkere Vergrößerung. A:**

Aktivitätsnachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

- (1) Marklager
- (2) Körnerzellschicht
- (3) Purkinje-Zellschicht
- (4) Molekularschicht.
- (◄) Purkinje-Zellen

Die Purkinje-Zellschicht besteht aus den Perikaryen der großen Purkinje-Zellen (→ größte Zellen des Kleinhirns), die von speziellen Astrozyten, den sogenannten Bergmann-Gliazellen, umgeben sind. Die Purkinje-Zellen sind die zentrale Schaltstelle der Kleinhirnrinde, an denen die Impulse fast aller Rindenneurone konvergieren und von dort aus zu den Projektionszielen außerhalb der Rinde weitergeleitet werden. Ihre Morphologie ist charakteristisch: Sie besitzen ein großes Perikaryon, das nach unten, in Richtung Marklager, ein langes Axon zu den Kleinhirnkernen schickt. Nach apikal, in Richtung der Molekularschicht, breitet sich entlang einer Ebene ein großer und reich verzweigter Dendritenbaum aus. An diesem Dendritenbaum befinden sich große Mengen an Synapsen. Die Purkinje-Zellen sind die einzigen efferenten Zellen der Kleinhirnrinde und wirken mit ihrem Transmitter GABA inhibitorisch auf die Kleinhirnkerne.

Im Stratum purkinjense lässt sich eine geringe Farbreaktion nachweisen. Für eine detailgenaue Abgrenzung unterschiedlicher Zellen ist der NBT-Nachweis nur bedingt geeignet, da er auf unfixiertem Gewebe durchgeführt wird und Zellgrenzen oft nicht klar zu

identifizieren sind. Dennoch scheint sich die DHODH-Aktivität vor allem auf das Zytoplasma der Purkinje-Zellen zu konzentrieren. Während die teilweise angeschnittenen Zellkerne der Purkinjezellen (Abb. 3.2.4, ◀) im Nachweis der DHODH (3.2.4 (A)) unverändert hell erscheinen, erkennt man im Zytoplasma das ausgefallene, violette Tetrazoliumsalz. Nach dieser Erkenntnis wäre die DHODH auch hier als neuronal lokalisiert anzunehmen, was hier jedoch ausdrücklich als Vermutung formuliert wird.

Die Molekularschicht ist die äußerste der drei Rindenschichten und besteht vorwiegend aus marklosen Nervenfasern, die von den Neuronen aller drei Rindenschichten stammen. Es existieren 2 Neuronentypen: die Korbzellen und die Sternzellen. Beide wirken über Transmitter GABA inhibitorisch auf die Purkinje-Zellen. Aufgrund der geringen Zelldichte dieser Schicht lässt sich insgesamt kein starker Unterschied zwischen der Farbreaktion der Negativkontrolle (Abb. 3.2.4, B) und derjenigen des DHODH-Aktivitätsnachweises (Abb. 3.2.4, A) erkennen. Die DHODH-Aktivität in diesem Bereich ist daher als gering zu betrachten.

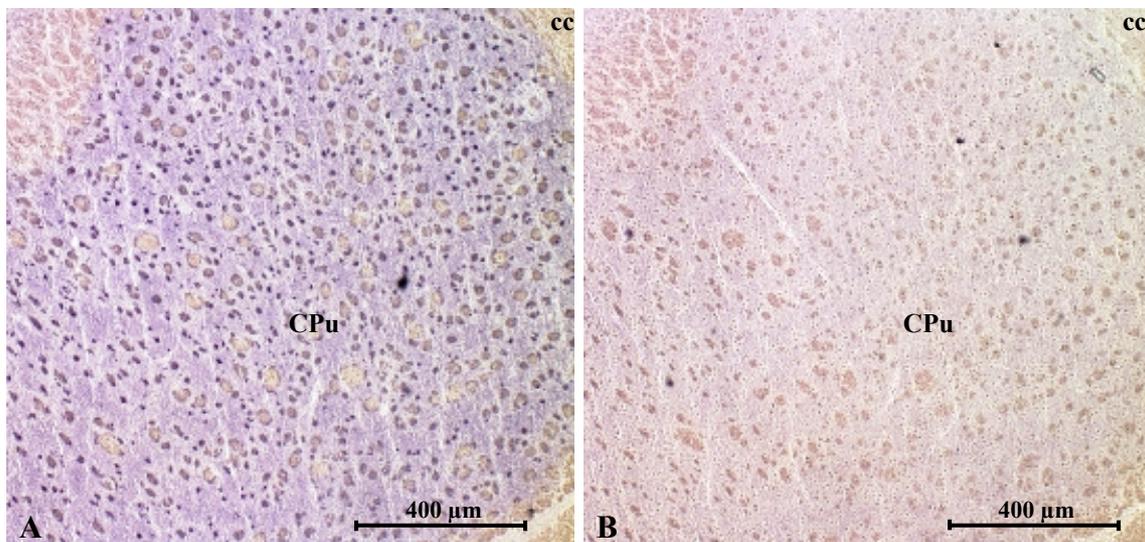
### **Striatum**

Das Striatum wird durch die Capsula interna in seine beiden Bestandteile, den Ncl. caudatus und das Putamen, geteilt. Im Rattenhirn fasst man die beiden Bestandteile des Corpus striatum zum sogenannten Caudato-Putamen zusammen, weil solche trennenden Strukturen des humanen Hirns im Rattenhirn nicht vorliegen. (Heimer et al., 1995).

Das Striatum erhält seine Afferenzen vor allem vom Kortex und von der Substantia nigra und sendet Efferenzen zum Pallidum und wiederum zur Substantia nigra. Dabei wirkt es in seinen Projektionsorten hemmend. Man kann dem Striatum für die motorischen Impulse, die ihm vom Großhirnkortex zufließen, vor allem eine hemmende Wirkung, im speziellen aber auch eine fördernde Funktion zuschreiben. Funktionsstörungen des Striatums verursachen meist hyperkinetische Syndrome, wie beispielsweise Chorea Huntington.

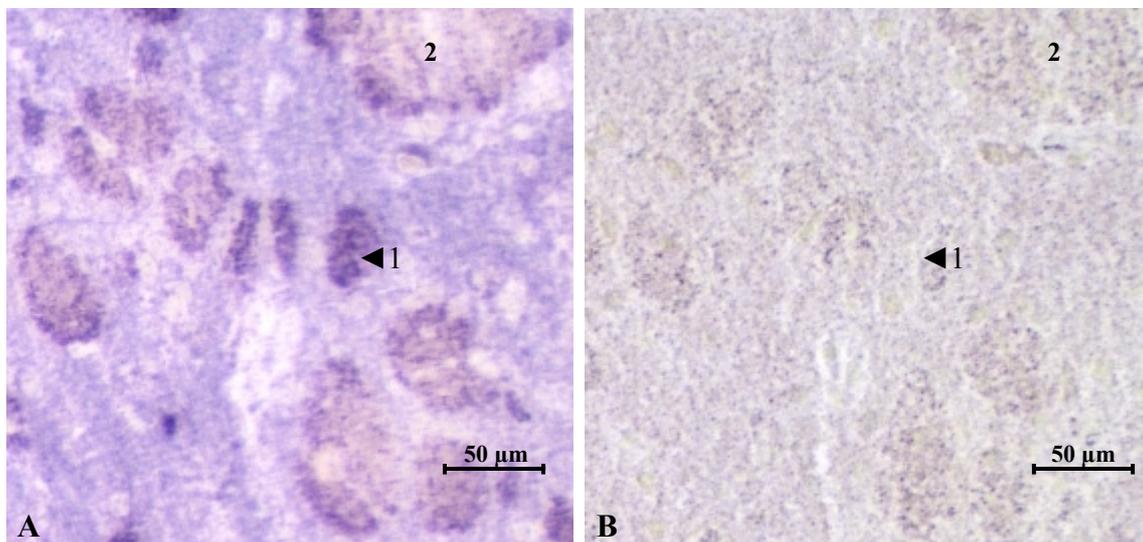
Histologisch betrachtet setzt sich das Striatum aus drei neuronalen Strukturen zusammen. Hierbei handelt es sich um die Fortsätze von Zellen außerhalb des Striatums (→ Afferenzen), die Projektionsneurone und Interneurone des Striatums. Hinzu kommen striatale Gliazellen. Mit einem Anteil von ca. 95 % [Kemp und Powell, 1971], bilden die sogenannten medium-spiny-Neurone ( $\varnothing$  des Zellkörpers: 20-25  $\mu\text{m}$ ) die häufigste Zellgruppe innerhalb des Striatums der Ratte. Sie sind die Projektionsneurone des Striatums. Des Weiteren enthält das Striatum große cholinerge ( $\varnothing$  bis zu 50  $\mu\text{m}$ ) und mittelgroße GABAerge aspiny (dornenlose) Neurone. Hierbei handelt es sich um die beiden Hauptsubtypen der Interneurone, die, wie zuvor erwähnt, anhand morphologischer und

neurochemischer Eigenschaften unterschieden werden [Paxinos, 2004]. Innerhalb der Inter- und Projektionsneurone lassen sich noch weitere Subpopulationen unterscheiden, auf die an dieser Stelle nicht eingegangen werden soll.



**Abb. 3.2.5 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im Striatum, Übersichtsvergrößerung.** A: Aktivitätsnachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

cc Corpus callosum  
CPu Caudato-Putamen



**Abb. 3.2.6 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im Striatum, stärkere Vergrößerung.** A: Aktivitätsnachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

(1) Ansammlung von Neuronen  
(2) Nervenfasern

Die Übersichtsabbildung 3.2.5 (A) zeigt eine deutliche DHODH-Aktivität im Caudato-Putamen. In der randständigen Struktur des Corpus callosum zeigt sich keinerlei NBT-

Reaktion. Das Ausbleiben einer Farbreaktion lässt sich darauf zurückführen, dass der Balken aus zahlreichen Nervenfasern besteht.

Dementsprechend bleiben innerhalb des Caudato-Putamen die Faserzüge frei von einem Tetrazoliumniederschlag. Die Verteilung der zellulär lokalisierten DHODH-Aktivität wird in höherer Vergrößerung auf Abbildung 3.2.6 noch deutlicher. Die DHODH-Aktivität scheint im Bereich von Neuronengruppierungen erhöht, während die Faserstrukturen frei von einer Reaktion bleiben. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde im Anschluss (siehe Kapitel 3.5) der immunhistochemische Nachweis der DHODH im Striatum der Ratte durchgeführt.

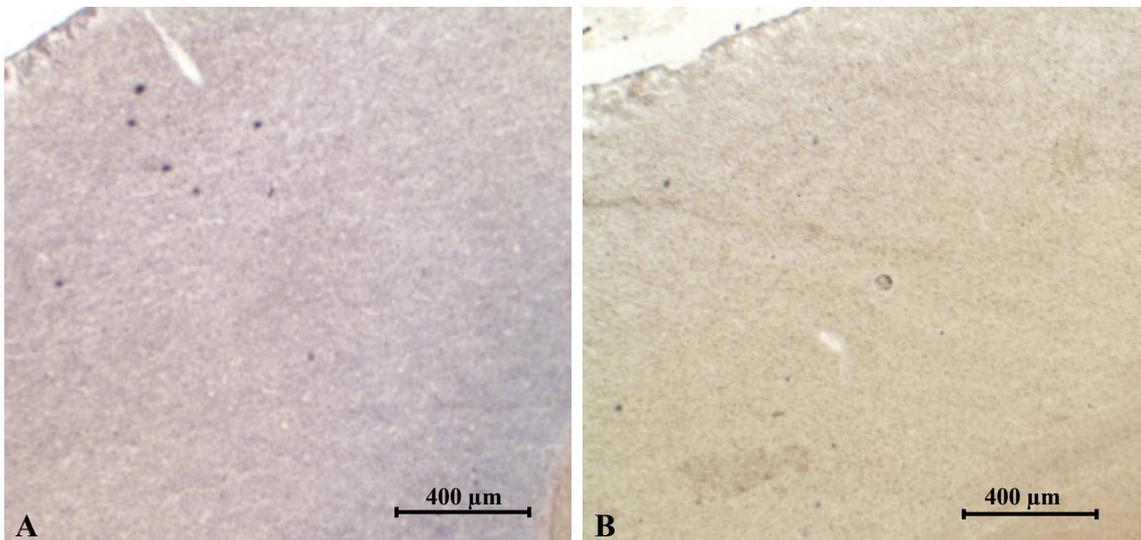
Eine weitere These bezüglich der Aktivitätsverteilung der DHODH auf Abbildung 3.2.6 (A), lässt sich nach Betrachtung der neurochemischen striatalen Gliederung formulieren. Das Striatum gliedert sich in Striosomen (Patches) und Matrix. Striosomen machen etwa 15-20% des Striatums aus und sind histochemisch von der Matrix zu unterscheiden [White und Hiroi, 1998]. Beide Regionen enthalten Nervenzellen, die allerdings in unterschiedlichen Zeiträumen gebildet werden und unterschiedliche neurochemische Phänotypen aufweisen. Im histologischen Schnitt stellen die Patches Querschnitte röhrenähnlicher Strukturen dar, die strahlenförmig durch die Matrix ziehen. Funktionell werden sie als Mediator von Verhaltensweisen, die mit Belohnung assoziiert sind, angesehen [White und Hiroi, 1998]. Betrachtet man die Verteilung der DHODH-Aktivität (Abbildung 3.2.6 (A)), könnte es sich bei den intensiv gefärbten Arealen um die Striosomen handeln.

### **Isokortex**

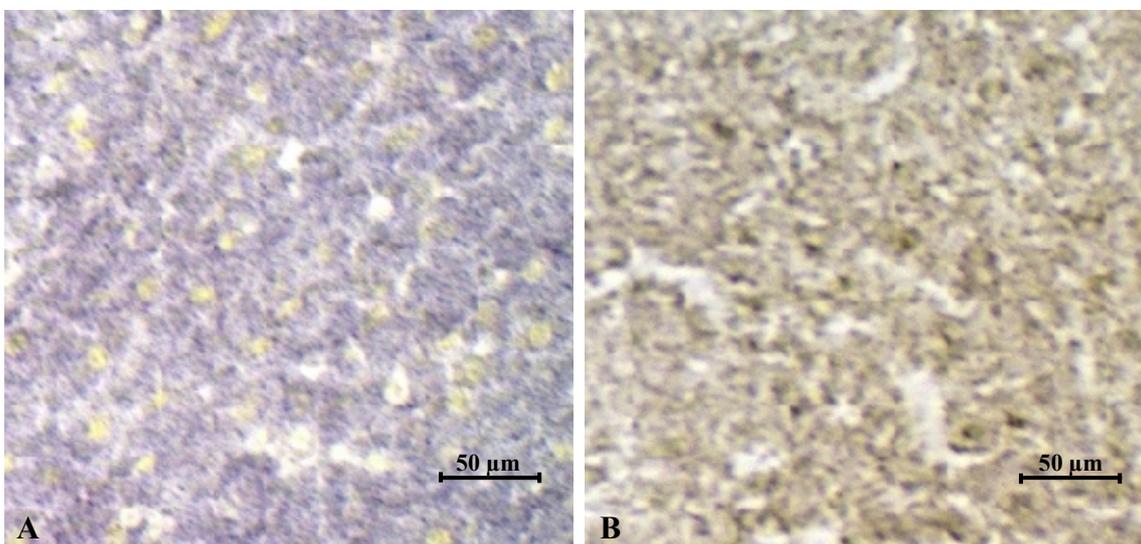
Funktionell lässt sich der Isokortex grob in zwei Bereiche einteilen. Der Bereich, der frontal des Sulcus centralis liegt, lässt sich der Motorik zuordnen, während der okzipital, parietal und lateral gelegene Anteil sensorische Funktionen übernimmt. Bei den abgebildeten histologischen Schnitten (Abbildung 3.2.7 und 3.2.8) handelt es sich um einen Ausschnitt des Frontalkortex.

85 % aller Neurone des Isokortex stellen Pyramidenzellen dar. Die übrigen 15 % machen Interneurone, sogenannte Nicht-Pyramidenzellen, aus. Letztere können über GABA hemmend bzw. über verschiedene Peptide erregend wirken und innerhalb der Rinde Neurone verknüpfen. Den Pyramidenzellen entspringt ein Apikaldendrit (zur Hirnoberfläche gerichtet) und mehrere Basaldendriten, an denen synaptische Endigungen von Axonen anderer Neurone ansetzen. Die Axone der Pyramidenzellen ziehen in andere Rindenregionen oder zu subkortikalen Kerngebieten.

Auffallend ist die laminäre Gliederung der Großhirnrinde, die v.a. durch die Anordnung der Pyramidenzellen hervorgerufen wird. Auf diese Schichtung wird im Rahmen des DHODH-Nachweises mittels DAB-Nickel-Reaktion näher eingegangen. Sie ist im NBT-Nachweis der Abbildungen 3.2.7 und 3.2.8 nicht zu erkennen.



**Abb. 3.2.7: Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im Frontalkortex, Übersichtsvergrößerung.** A: Aktivitätsnachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).



**Abb. 3.2.8 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im Frontalkortex, stärkere Vergrößerung.** A: Aktivitätsnachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

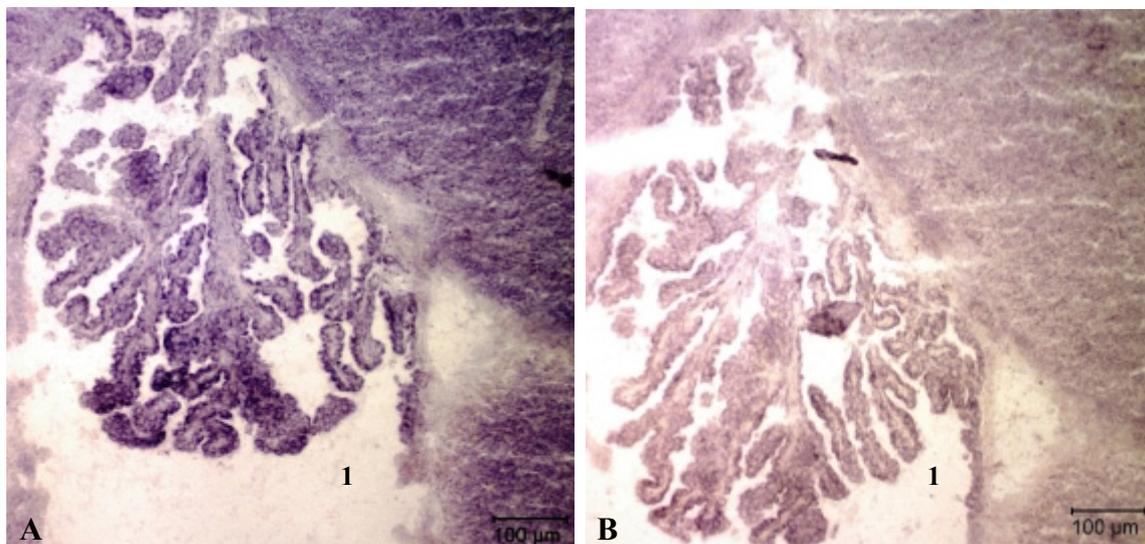
Grundsätzlich lässt sich bei dem Nachweis mittels NBT eine deutliche blau-violette Färbung erkennen, was für die Existenz der DHODH im Kortex spricht. Die DHODH-Aktivität ließ sich in allen Abschnitten des Kortex nachweisen (Frontal-, Temporal-, Parietal-, Okzipitallappen). Eine Differenzierung einzelner Zellen, in denen die DHODH

vermehrt lokalisiert ist, lässt sich nicht vornehmen. Der später durchgeführte Antikörper-Nachweis der DHODH soll hierüber genaueren Aufschluss geben.

### Ventrikelsystem

Die Ventrikel sind Bestandteile der inneren Liquorräume, zu denen neben den vier Hirnventrikeln, der Aqueductus mesencephali sowie der Canalis centralis gerechnet werden. Dagegen abgrenzen lassen sich die äußeren Liquorräume, deren größten Bestandteil der Subarachnoidalraum bildet. Die Abbildungen 3.2.9 und 3.2.10 zeigen den DHODH-Nachweis im 3. Ventrikel.

Die Liquorräume enthalten als Teil des Liquorsystems den Liquor cerebrospinalis. Dessen Zusammensetzung entspricht weitgehend der Interstitialflüssigkeit anderer Gewebe: ähnliche Ionenkonzentration, kaum Proteine (ca. 1 % des Blutwertes), wenige Zellen. Die Zellen sind meist Lymphozyten (maximal 5 Zellen pro 100 ml) [Trepel, 2004]. Die Funktion des Liquors besteht in der Konstanthaltung des chemischen Milieus im ZNS sowie dem mechanischen Schutz des ZNS-Gewebes.

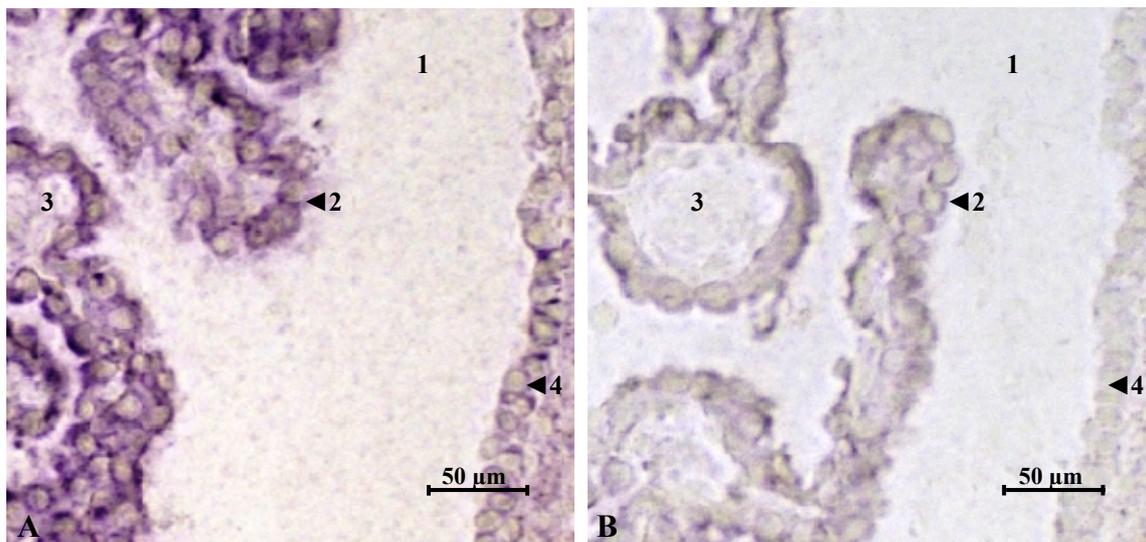


**Abb. 3.2.9 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im Ventrikelsystem, Übersichtsvergrößerung.** A: Aktivitätsnachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

(1) Liquorraum

Die Plexus choroidei, die sich im lateralen sowie im dritten und vierten Ventrikel befinden, sezernieren den Liquor. Sie sind eine Ausstülpung von gefäßreichem Pia-Gewebe durch das Ependym in die inneren Liquorräume hinein. Das Ependym ist an dieser Stelle in ein einschichtig kubisches Epithel transformiert (die sog. Lamina choroidea epithelialis), das dem Pia-Gewebe mit seinen fenestrierten Kapillaren aufsitzt.

Die Übersicht des 3. Ventrikels (Abb. 3.2.9) zeigt einen Intensitätsunterschied zwischen Aktivitätsnachweis (A) und Negativkontrolle (B) bezüglich der blau-violetten Färbung. Allerdings ist kritisch zu beurteilen, dass auch ohne das Substrat Dihydroorotat im Inkubationsansatz (B), eine gewisse Aktivität festzustellen ist. Hierbei handelt es sich allerdings nicht um die Aktivität der DHODH, sondern um eine Hintergrundaktivität. Diese wird durch verschiedenste Dehydrogenasen, die im Kryoschnitt offensichtlich noch endogenes Substrat zur Verfügung haben und dessen Redoxpotenzial zu dem des NBT passt, hervorgerufen.



**Abb. 3.2.10 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH der im Ventrikelsystem, stärkere Vergrößerung.** A: Aktivitätsnachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

- (1) Liquorraum (Liquor cerebrospinalis)
- (2) kubisches Plexusepithel des Plexus choroideus
- (3) Raum mit Blutgefäßen
- (4) Ependymzellen

Ein ähnliches Ergebnis gibt Abb. 3.2.10 wieder. Auch hier ist eine geringe Färbung der Negativkontrolle (B) festzustellen, die jedoch nicht auf eine DHODH-Aktivität, sondern auf sogenannte nothing-Dehydrogenasen zurückzuführen ist.

Abbildung 3.2.10 (A) zeigt weiterhin eine intensive blau-violett-Färbung des Zytoplasmas von Plexus choroideus-Zellen und Ependymzellen. Die Kerne heben sich deutlich ungefärbt ab. Die Plexus choroideus-Zellen sind spezialisierte Gliazellen, die Kinozilien und Mikrovilli besetzt sind. Sie stellen in einem Ultrafiltrationsprozess des Blutes Liquor her. Zusätzlich verfügen sie über die Möglichkeit eines aktiven Transportprozesses aus dem Blutplasma, wobei die  $\text{Na}^+$ -Sekretion aus dem Liquor besonders wichtig ist. Ebenso wird Magnesium aktiv aus dem Blutplasma transportiert, wodurch sich im Liquor eine gegenüber

dem Blut erhöhte Magnesium und Natriumkonzentration einstellt. Da aktive Transportprozesse Energie benötigen, spricht dies für die Anwesenheit von Mitochondrien in den Plexusepithelzellen. Durch die starke Faltung des Plexus choroideus sowie den Mikrovilli-Besatz wird zudem eine Oberflächenvergrößerung erreicht, die die effektiven Transportprozesse gewährleistet.

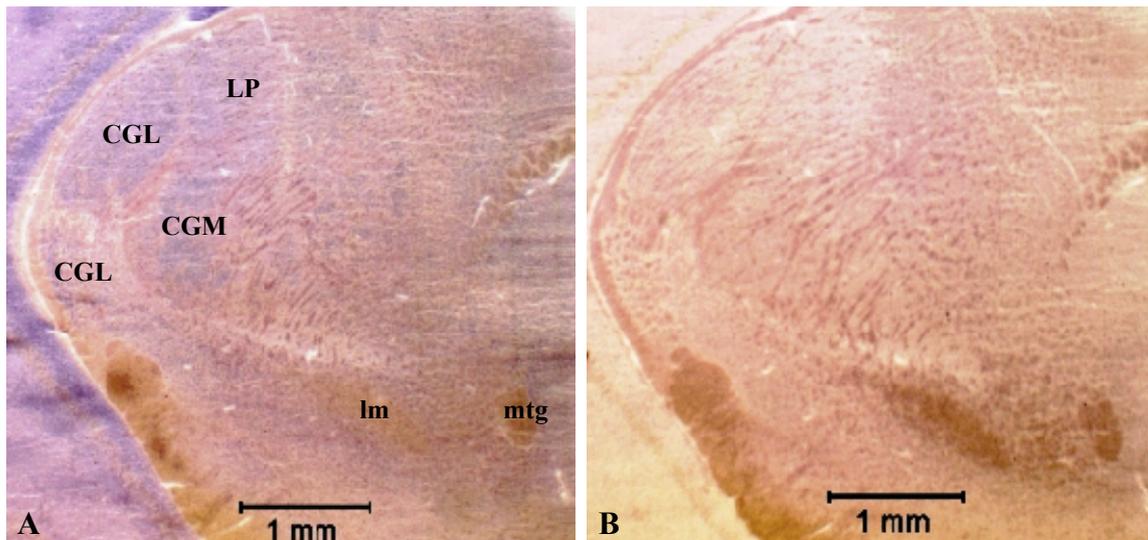
Abgesehen von den beschriebenen aktiven Transportprozessen wird weiterhin Energie für den Flimmerschlag der Kinozilien benötigt, die sich auf den Plexus choroideus - Epithelzellen sowie den Ependym-Zellen befinden. Für die Krümmung der Zilie selbst sind energiebedürftige, ATP-abhängige Verschiebungen der Mikrotubuli im Inneren der Zilie verantwortlich. Der Bewegungsmechanismus wird als ein Gleitmechanismus beschrieben. Dabei stellt der Dyneinarm, der an der A-Röhre verankert ist, mit seinen Spitzen Kontakte zur B-Röhre des benachbarten Dupletts her und veranlasst die ATP-abhängigen Verschiebungen der Tubulindupletts, so dass eine Biegung erzeugt wird.

Weil die DHODH nachweislich in Mitochondrien lokalisiert ist, könnte dies einen Grund für das Vorkommen des Enzyms in den Hirnventrikeln darstellen. Bereits 1996 beschrieben Löffler et al. eine hohe DHODH-Aktivität in exkretorischen und absorbierenden Geweben. In Anbetracht der Sekretions- und Resorptionsleistung der Plexus choroideus - Epithelzellen, korrelieren diese Ergebnisse mit der in Abbildung 3.2.9 und 3.2.10 beobachteten hohen DHODH-Aktivität. Die Zellkerne bleiben wie oben beschrieben frei von einer NBT-Reaktion, was die mitochondriale Lokalisation der DHODH unterstreicht. Die intensive Färbung des Zytoplasmas könnte weiterhin daraus resultieren, dass die Mitochondrien (und damit vermutlich auch die DHODH) durch den großen Kern und den damit verbundenen schmalen Zytoplasmasaum, in höherer Dichte vorliegen. Grundsätzlich muss diskutiert werden, ob das Vorkommen von Mitochondrien mit einer konstitutiven Expression der DHODH einhergeht.

### **Thalamus**

Der Thalamus der Ratte bildet, wie bei der Vielzahl der Wirbeltiere, den größten Teil des Zwischenhirns. Er setzt sich aus vielen einzelnen Kerngebieten (siehe Abbildung 2.3.11) mit unterschiedlichsten Funktionen zusammen. Die Thalamuskern haben eine intensive wechselseitige Faserbeziehung zum gesamten Großhirnkortex. Dabei besteht die Aufgabe des Thalamus nicht in der alleinigen Umschaltung von Impulsen. Zusätzlich gehören zahlreiche Integrationsvorgänge für sensible und motorische Impulse zu seinem Funktionsbereich.

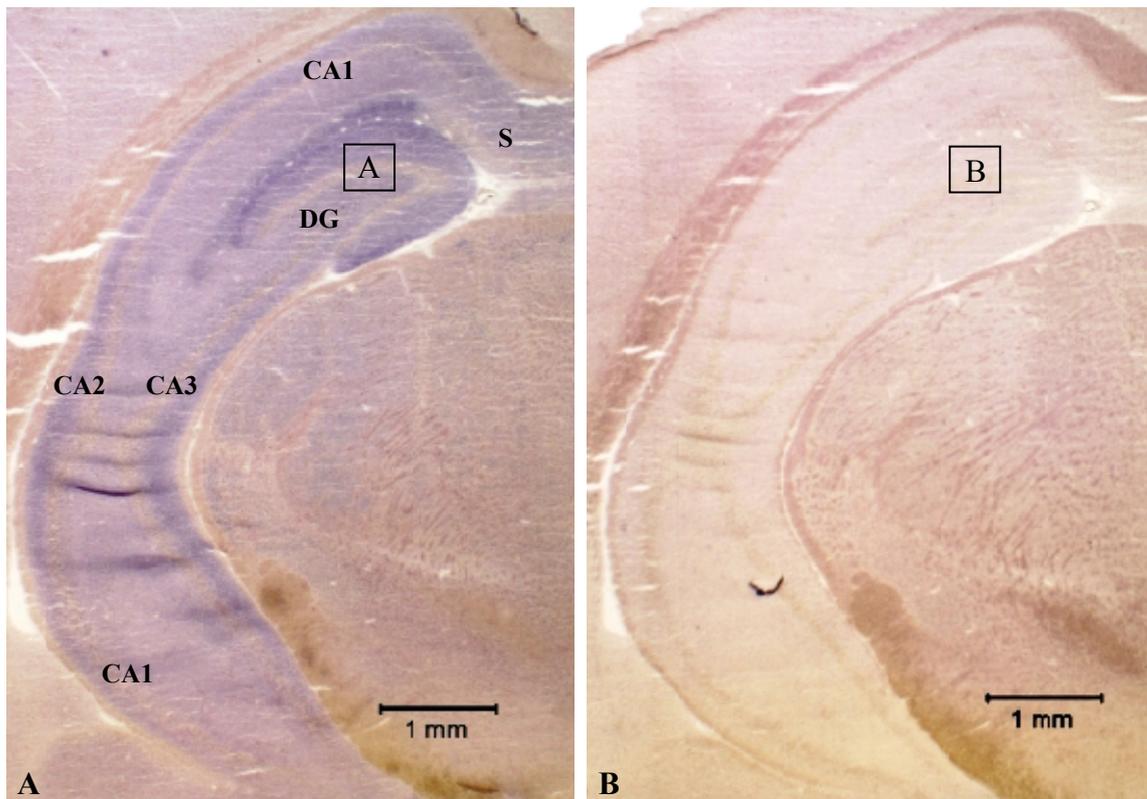
In der Übersichtsvergrößerung (Abb. 2.3.11) sind einige Kerngebiete des Thalamus frontal angeschnitten. Die gleichmäßige Violett-Färbung innerhalb der Kerngebiete im rechten Bild weist die DHODH-Aktivität dieser Regionen nach. Auf die Abbildung einer höheren Vergrößerung wurde verzichtet, da sich hier mittels NBT-Nachweis keine einzelnen Zelltypen unterscheiden ließen. In jedem Fall wurde die DHODH-Aktivität in den Thalamuskerngebieten nachgewiesen, während Leitungsbahnen wie der Lemniscus medialis und der Lemniscus mamillotegmentalis keinerlei Reaktion zeigten.



**Abb. 2.3.11 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im Thalamus, Übersichtsvergrößerung.**

A: Aktivitätsnachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

- LP Ncl. lateralis posterior
- CGM Corpus geniculatum mediale
- CGL Corpus geniculatum laterale
- lm Lemniscus medialis
- mtg Lemniscus mamillotegmentalis

**Hippocampus**

**Abb. 3.2.12 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im Hippocampus, Übersichtsvergrößerung.** A: Aktivitätsnachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

CA1 – CA3 Felder CA1 – CA3 des Ammonshornes (Cornu ammonis)

DG Gyrus dentatus

S Subiculum

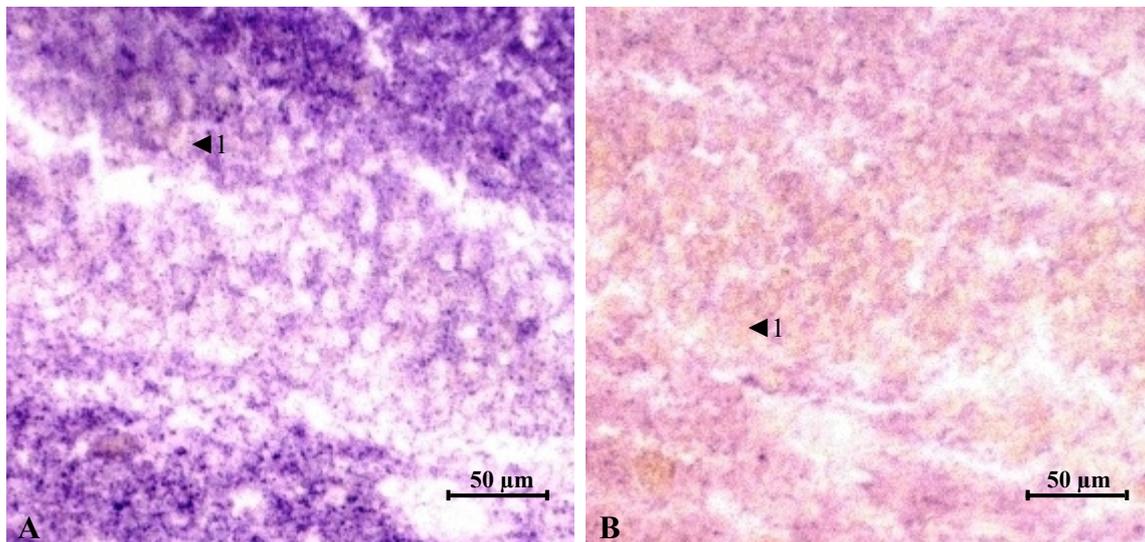
**A** in Abb. 3.2.13 (A) dargestellter Ausschnitt

**B** in Abb. 3.2.13 (B) dargestellter Ausschnitt

Funktionell betrachtet ist der Hippocampus Teil des limbischen Systems. In diesem Rahmen übernimmt er wichtige Aufgaben in Bezug auf Gedächtnis, Verhalten, emotionale und vegetative Funktionen. Im frontalen Querschnitt (Abb. 3.2.12) erkennt man die typische eingerollte Archikortexstruktur. Man unterscheidet hier drei Bereiche des Hippocampus: den Gyrus dentatus (DG), das Cornu ammonis und das Subiculum (S). Das Cornu ammonis lässt sich bei der Ratte in die Felder CA1 – CA3 unterteilen, die sich durch die unterschiedliche Anordnung und Größe ihrer Pyramidenzellen auszeichnen. Der Gyrus dentatus wird hingegen von kleineren, körnerzellartigen Neuronen gebildet.

Funktionell betrachtet ist der Hippocampus Teil des limbischen Systems. In diesem Rahmen übernimmt er wichtige Aufgaben in Bezug auf Gedächtnis, Verhalten, emotionale und vegetative Funktionen. Im frontalen Querschnitt (Abb. 3.2.12) erkennt man die typische

engerollte Archikortexstruktur. Man unterscheidet hier drei Bereiche des Hippocampus: den Gyrus dentatus (DG), das Cornu ammonis und das Subiculum (S). Das Cornu ammonis lässt sich bei der Ratte in die Felder CA1 – CA3 unterteilen, die sich durch die unterschiedliche Anordnung und Größe ihrer Pyramidenzellen auszeichnen. Der Gyrus dentatus wird hingegen von kleineren, körnerzellartigen Neuronen gebildet.



**Abb. 3.2.13 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im Hippocampus (Spitze des Gyrus dentatus), stärkere Vergrößerung.** A: Aktivitätsnachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

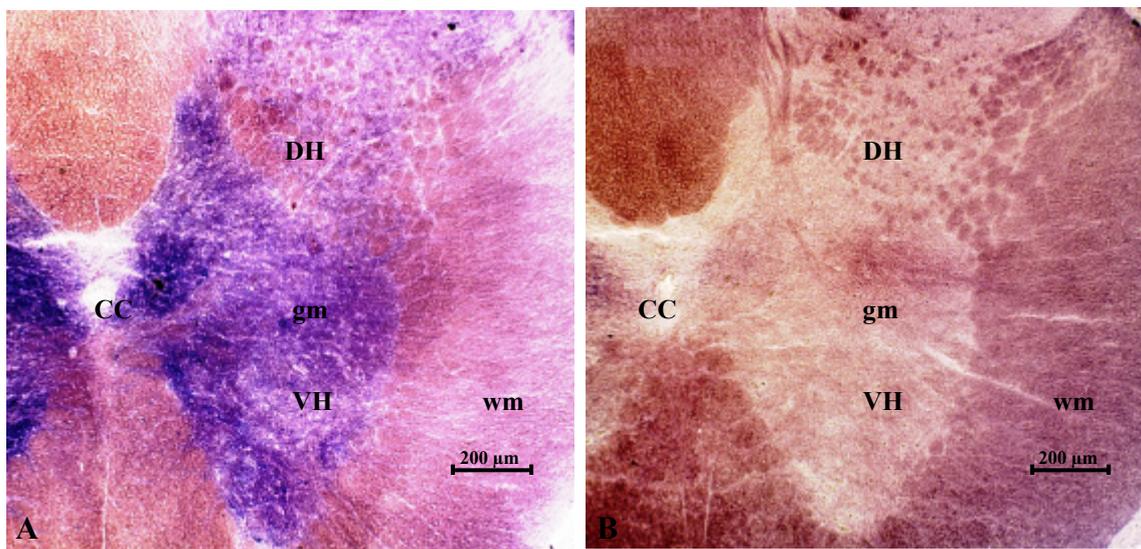
(1) Körnerzelle

Im Hippocampus zeigte sich eine starke Formazanbildung, was auf eine hohe DHODH-Aktivität schließen lässt. Die Aktivität ist in allen Anteilen des Hippocampus deutlich (Gyrus dentatus, Ammonshorn (CA1 – CA3) und Subiculum). Insbesondere die Region des Gyrus dentatus zeichnete sich durch eine besonders starke Aktivität aus. Abbildung 3.2.13 zeigt die Körnerzellen des Gyrus dentatus. Auf eine zelluläre Zuordnung der DHODH-Aktivität soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Die genaue Lokalisation des Enzyms wird im Anschluss anhand des immunhistochemischen Nachweises herausgearbeitet. Einen möglichen Erklärungsansatz für die hohe Enzymaktivität im Hippocampus könnte dessen hohe Plastizität darstellen. In der subgranulären Zone des Gyrus dentatus findet, wie auch in der subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels, im adulten Gehirn eine Neurogenese aus multipotenten neuralen Stammzellen statt [Imayoshi et al., 2009]. Die neu entstandenen Nervenzellen werden schließlich in die funktionellen Netzwerke der bestehenden Körnerzellen eingegliedert [Imayoshi et al., 2009]. Ob diese Tatsache in direktem Zusammenhang mit einer gesteigerten *de novo* Pyrimidinsynthese steht, gilt es in Zukunft abzuklären.

## Rückenmark

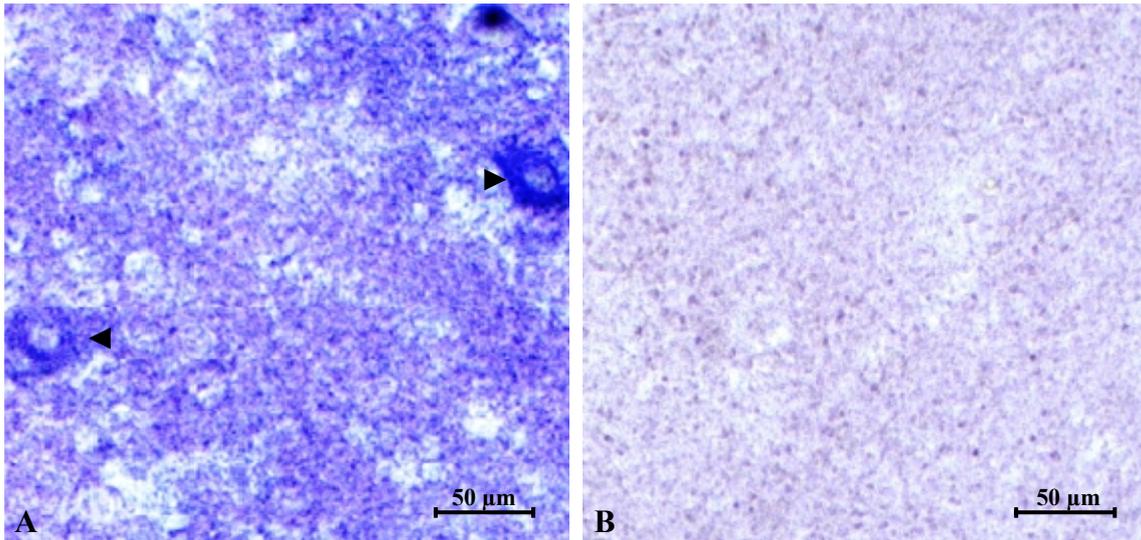
Ein Querschnittsbild des Rückenmarkes (vergleiche Abbildung 3.2.14) zeigt die Gliederung in graue und weiße Substanz. In der grauen Substanz befinden sich die Rückenmarksneurone, während die weiße Substanz lediglich deren Axone und Dendriten enthält.

Die graue Substanz lässt sich in Vorder- und Hinterhorn gliedern. Das Vorderhorn enthält im Wesentlichen Motoneurone. Dagegen stehen die Neurone des Hinterhorns hauptsächlich im Dienst der Sensibilität. Auf Abbildung 3.2.14 (A) wird deutlich, dass sich die NBT-Reaktion lediglich auf die graue Substanz des Rückenmarks beschränkt. In der weißen Substanz des Rückenmarks ist der DHODH-Nachweis negativ. Grund dafür ist ihre Zusammensetzung aus Nervenfasern. In Abbildung 3.2.15 (A) ist vor allem eine hohe neuronale DHODH-Aktivität festzustellen. Zwar ist der „Hintergrund“ ebenfalls intensiver blau als in der Negativkontrolle, die großen Neuronen zeigen jedoch die stärkste DHODH-Aktivität. Bei den im Nachweis der DHODH stark „aktiven“ Nervenzellen handelt es sich wahrscheinlich um die Motoneurone des Vorderhorns (Abb. 3.2.15(B)).



**Abb. 3.2.14 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im zervikalen Rückenmark, Übersichtsvergrößerung.** A: Aktivitätsnachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

gm	Graue Substanz
wm	Weiße Substanz
VH	Vorderhorn der grauen Substanz
DH	Hinterhorn der grauen Substanz
CC	Canalis centralis



**Abb. 3.2.15 Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH im Vorderhorn des zervikalen Rückenmarks, stärkere Vergrößerung.** A: Aktivitätsnachweis der DHODH. B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

(◄) Motoneurone des Vorderhorns

### 3.2.3 Zusammengefasste Erkenntnisse des enzymhistochemischen DHODH-Nachweises mittels NBT/Formazan-Reaktion

Das 4. Enzym der *de novo* Pyrimidinsynthese wurde in dieser Arbeit auf ZNS-Schnitten der Ratte nachgewiesen. Eine hohe DHODH-Aktivität ließ sich vor allem in den unter 2.3 vorgestellten Bereichen finden. Hierbei handelte es sich um den Thalamus, das Kleinhirn, den Kortex, den Hippocampus, das Striatum, die Plexus choroidei und das Rückenmark. Diese Ergebnisse korrelieren mit den eingangs durchgeführten Western Blots nach Gewebehomogenatherstellung: Thalamus, Kortex, Hippocampus, Kleinhirn, Rückenmark und Striatum zeigten im belichteten Röntgenfilm eine sehr starke DHODH-Protein-Bande. Auch in Bereichen geringer DHODH-Aktivität korrelieren die Ergebnisse der Western Blots mit denen des NBT-Tests. Im Hirnstamm war die DHODH-Aktivität im histochemischen Nachweis insgesamt betrachtet sehr gering (nicht abgebildet). Lediglich wenige Kerngebiete zeigten eine Enzymaktivität. Dementsprechend stellte sich im belichteten Röntgenfilm die Hirnstamm-Bande nur sehr schwach dar.

Die Feststellung erhöhter bzw. erniedrigter DHODH-Aktivität auf zellulärer Ebene gilt zwar im NBT-Test als kritisch, ließ hier jedoch folgende Vermutungen bzw. Aussagen zu: In den Neuronen der grauen Substanz des Rückenmarks wurde eine ausgeprägte Enzymaktivität festgestellt. Im Striatum deutete sich ebenfalls eine neuronale Lokalisation der DHODH in den hauptsächlich vertretenen medium-spiny Neuronen an. Weitere Areale hoher Nervenzelldichte wiesen eine gesteigerte Aktivität auf. So zeigte sich ein deutlicher NBT-Formazan-Niederschlag in der Körnerschicht des Kleinhirns sowie in den Kerngebieten des Thalamus. Eine eindeutig astrozytär lokalisierte DHODH-Aktivität zeigte sich lediglich in den spezialisierten Ependymzellen sowie den Zellen des Plexusepithels der Hirnventrikel, wobei der Formazan-Niederschlag innerhalb des Plexusepithels deutlich stärker ausfiel.

Den Befund einer überwiegend neuronalen Lokalisation des Enzyms mit Hilfe der katalytischen Enzymhistochemie, gilt es im Antikörper-Nachweis (Kapitel 3.5) zu überprüfen.

### 3.3 DHODH-Aktivität in Gegenwart von Inhibitoren

Als Referenz für die folgenden Abbildungen unter Anwendung von Inhibitoren werden zunächst der Nachweis der DHODH (Abbildung 3.3.1(A)) sowie die Negativkontrolle (Abb. 3.3.1(B)) im Kleinhirn der Ratte abgebildet. Wie bei den vorangegangenen Untersuchungen, wurden auch in dieser Testreihe alle Schnitte 60 Minuten lang inkubiert. Es muss betont werden, dass die in diesem Kapitel erwähnten  $IC_{50}$ -Werte stets für das isolierte Rattenenzym gelten. Auf histologischen Schnitten müssen erfahrungsgemäß höhere Konzentrationen für eine entsprechende Inhibition eingesetzt werden

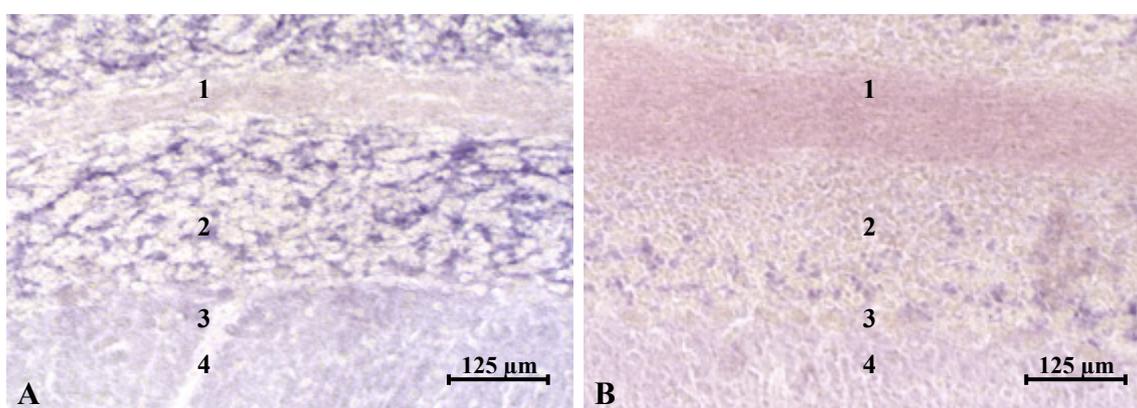
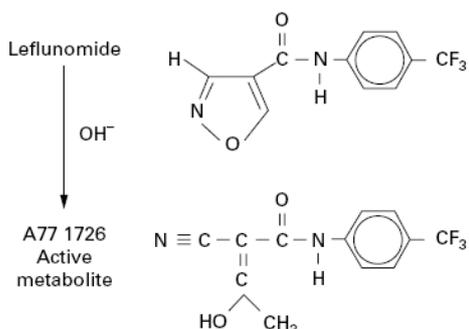


Abb. 3.3.1 A: Enzymhistochemischer Nachweis der DHODH, B: Negativkontrolle (ohne Dihydroorotat).

- (1) Marklager
- (2) Körnerschicht
- (3) Purkinjzellschicht
- (4) Molekularschicht

#### 3.3.1 Leflunomid

##### Überblick



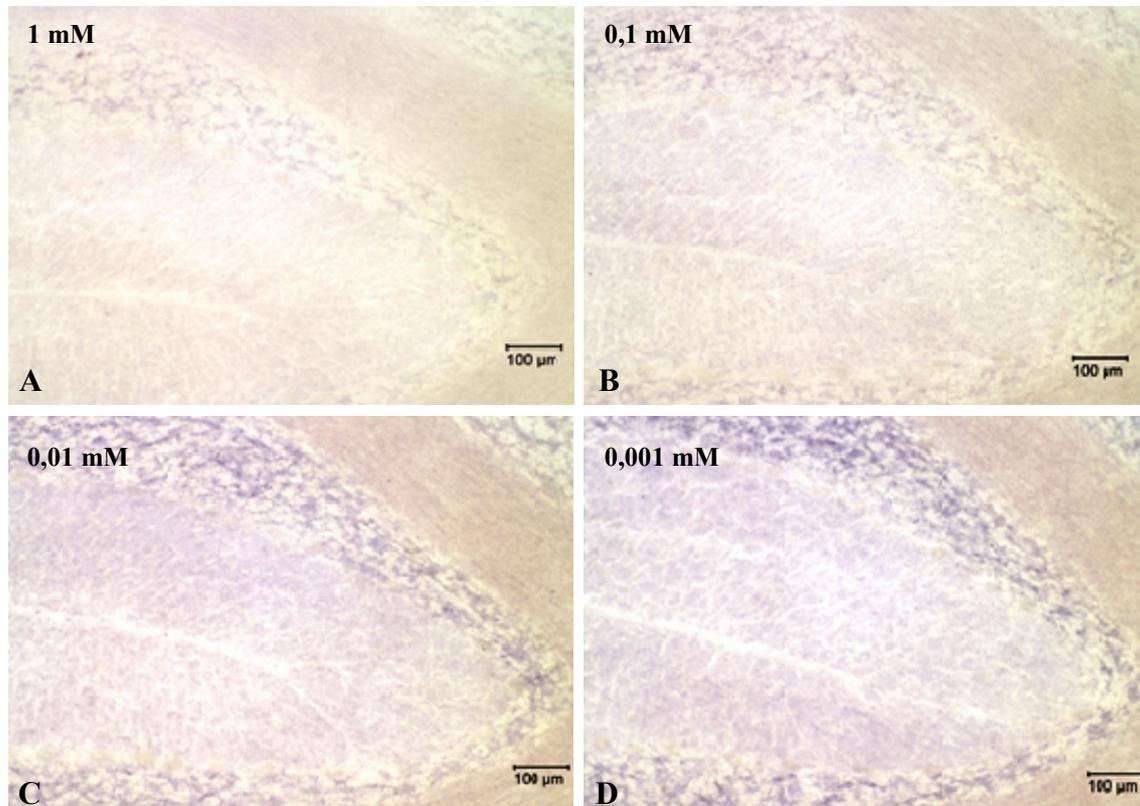
Das Isoxazolderivat Leflunomid und sein aktiver Metabolit A77-1726 zeigten in klinischen Versuchen eine vielversprechende antirheumatische Wirkung. Seit 2000 ist Leflunomid als ARAVA<sup>TM</sup> auf dem Markt zugelassen. Die Wirkung therapeutisch applizierbarer Dosen beruht auf der nichtkompetitiven, reversiblen Hemmung der

DHODH [Löffler und Knecht, 1998]. In sehr hohen Dosen verabreicht, führt Leflunomid außerdem zu einer Inhibition von Tyrosin-Kinasen [Korn, 2001]. Durch die DHODH-

Hemmung können Lymphozyten ihren (während der Proliferation) gesteigerten Pyrimidinbedarf nicht mehr decken und somit keine DNA- und RNA-Synthese betreiben. Auch im Nervensystem hat Leflunomid bereits eine vielversprechende therapeutische Wirkung bei der Behandlung autoimmuner Neuritis bewiesen. Korn et al. (2001) zeigten, dass eine induzierte autoimmune Neuritis am Tiermodell Ratte wirkungsvoll mit Leflunomid behandelt werden kann. Durch die sofortige orale Gabe des Inhibitors wurden Lähmungserscheinungen komplett vermieden. Selbst wenn Leflunomid nach dem Eintritt erster neuropathologischer Zeichen verabreicht wurde, wurde das Fortschreiten gestoppt und der Schweregrad und die Dauer der Neuritis reduziert. Entzündliche Infiltrate, Demyelinisation und axonale Degeneration des N. ischiadicus waren stark reduziert [Korn et al., 2001]. Der immunsuppressive Effekt des Leflunomids in Ratten wurde, neben der Erschöpfung des intralymphozytären Pyrimidin-Nukleotid-Pools, auf eine direkte, Tyrosin-Kinasen vermittelte Wirkung zurückgeführt.

Da Leflunomid als Prodrug in vivo rasch in A77-1726 umgewandelt wird, wurde in der vorliegenden Arbeit auf A77-1726 zurückgegriffen.

### Ergebnisse



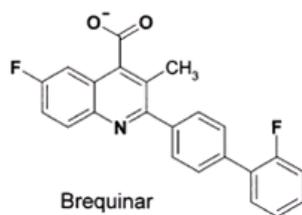
**Abb. 3.3.2** Aktivitätsnachweis der DHODH in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von A77-1726. A: 1 mM, B: 0,1 mM, C: 0,01 mM, D:0,001 mM.

Die Abbildungen 3.3.2 (A-D) zeigen einen Ausschnitt des Kleinhirns mit Kleinhirnmark, Körnerzell-, Purkinje-Zell- und Molekularschicht. In 1 mM Konzentration zeigt A77-1726 seine hohe inhibitorische Potenz (A). Es lässt sich lediglich eine sehr geringe Aktivität in der Körnerschicht feststellen. Die sukzessive Zunahme der DHODH-Aktivität auf den Abbildungen A-D korreliert eindeutig mit der Abnahme der Inhibitor-Konzentration. In 0,001 mM Konzentration (D) scheint die Inhibition durch A77 hier nur noch sehr gering, sodass die NBT-Reaktion beinahe derjenigen des Standardnachweises der DHODH (siehe Abbildung 3.3.1, A) entspricht.

A 77-1726 hat sich als relativ starker Inhibitor der Dihydroorotat-Dehydrogenase im ZNS erwiesen. Der Enzymnachweis via NBT hat sich hierbei als geeignete Nachweismethode inhibitorischen Potenzials herausgestellt.

### 3.3.2 Brequinar

#### Überblick



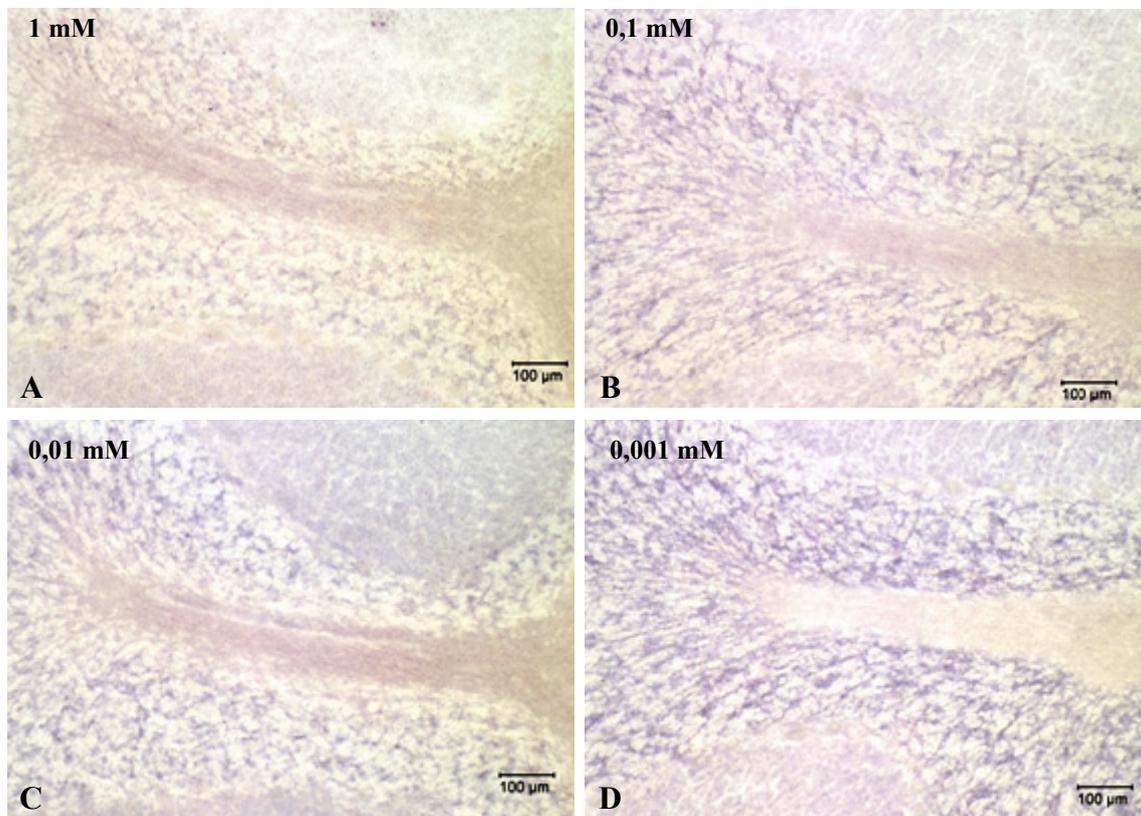
Klinische Studien mit Brequinar als Zytostatikum in Phase II wurden aufgrund gravierender Nebenwirkungen abgebrochen. Stattdessen wurde die Nutzung seiner immunsuppressiven Eigenschaft vorgeschlagen und in der Transplantationsmedizin an Nagern erprobt [Cramer, 1996]. Eine Anwendung der

Brequinartherapie im menschlichen Organismus stellt sich aufgrund der Toxizität auch hier als problematisch dar. Die Schwierigkeit besteht also darin, eine Dosierung zu wählen, die effektiv eine Transplantat-Abstoßung verhindert und gleichzeitig keine schwerwiegenden Nebenwirkungen hervorruft. Folglich ist Brequinar nur noch als Leitstruktur für die Entwicklung weiterer DHODH-Inhibitoren von Bedeutung. Neuere Hemmstoffe können nach Walse (2008) daher auch in brequinar-like-binding- und nonbrequinar-like-binding-Substanzen unterschieden werden.

Chemisch gesehen handelt es sich bei Brequinar um ein Cinchoninsäure-Derivat, welches 1985 von Dexter et al. erstmals als Wirkstoff für die Tumorthherapie beschrieben wurde. Löffler et al. konnten 1992, insbesondere unter hypoxischen Bedingungen, einen deutlichen antiproliferativen Effekt auf Zellen zeigen. Die geringe therapeutische Breite des Brequinars führten Knecht et al. (2000) auf seine Wirkung als langsam bindender („slow-binding“) Inhibitor mit hoher Affinität zur humanen DHODH zurück. Der Wirkmechanismus des Brequinars ist nicht unumstritten: Obwohl die Wirkung von Brequinar wie die von Leflunomid auf Zellen durch Gabe von Uridin aufgehoben werden konnte [Rückemann et al., 1998], wurde von einer anderen Gruppe, zumindest ein Teil der

Wirksamkeit des Brequinars der Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung zugeschrieben [Xu et al., 1997 und 1998].

### Ergebnisse

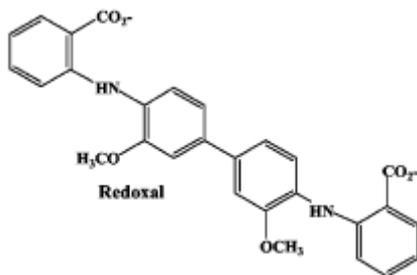


**Abb. 3.3.3** Aktivitätsnachweis der DHODH in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Brequinar. A: 1 mM, B: 0,1 mM, C: 0,01 mM, D:0,001 mM.

Die Abbildungen 3.3.3 (A-D) zeigen den DHODH-Nachweis mittels NBT-Reaktion mit sinkender Brequinar-Konzentration im Inkubationsansatz. In 1 mM Konzentration ist die Hemmung der DHODH im Vergleich zu den niedrigeren Inhibitor-Konzentrationen deutlich erhöht. Eine gewisse Restaktivität lässt sich allerdings auch hier in der Körnerschicht erkennen. Wird die Brequinar-Konzentration auf 0,1 mM (B) herabgesetzt, nimmt die DHODH-Aktivität stark zu. Brequinar scheint in dieser Konzentration nicht in der Lage zu sein, auf Gehirnschnitten die Aktivität der Ratten-DHODH in dem Maße zu inhibieren, in dem es A77-1726 in identischer Konzentration vermag (vergleiche Abb. 3.3.2 (B)). Ist die Brequinarkonzentration auf 0,001 mM herabgesenkt (D), erreicht die DHODH eine mit dem ungehemmten enzymhistochemischen Nachweis vergleichbare Aktivität. Die Inhibitionsfähigkeit von Brequinar ist demnach in dieser Konzentration erschöpft. In früheren Arbeiten zeigte sich Brequinar weitaus wirksamer an der humanen DHODH als am Rattenenzym [Knecht et al., 2000].

### 3.3.3 Redoxal

#### Überblick



Die Entdeckung von Redoxal als Hemmstoff der DHODH gelang mithilfe des COMPARE-Computeralgorithmus, mit dem neue Wirkstoffe durch den Vergleich mit bekannten Stoffen auf ihren wahrscheinlichen Wirkmechanismus hin untersucht wurden [Cleaveland et al., 1995]. Die tatsächliche Wirkung wurde an MOLT-4-Zellen (humane

Leukämiezellen) nachgewiesen [Cleaveland et al., 1995]. Im Jahr 2000 untersuchten Knecht und Löffler die Wirkungsweise des Redoxals detaillierter. Sie kamen zu dem Schluss, dass Redoxal, im Gegensatz zu einigen zuvor untersuchten DHODH-Inhibitoren [Jöckel et al., 1998], nicht mit der Atmungskette interagiert und auf andere Weise an die DHODEhase bindet als Brequinar, Leflunomid, Atovaquone und Dichloroallyl-Lawsone. Interessanter Aspekt der Untersuchungen war die Feststellung, dass der Hemmmechanismus als nicht kompetitiv bestimmt wurde. Daher schätzten Knecht und Löffler das zu erwartende toxische Potenzial des Redoxals niedriger als das von Brequinar und Dichloroallyl-Lawsone ein. Ihr Vorschlag, Redoxal als Leitstruktur für das Design neuer DHODH-Hemmstoffe zu verwenden, wurde 2008 umgesetzt.

#### Ergebnisse

Redoxal hat sich in dieser Arbeit als potenter Inhibitor der Ratten-DHODH im ZNS erwiesen. Abb. 3.3.4 zeigt, dass Redoxal in 0,1 mM Konzentration (A) die DHODH-Aktivität auf ein Minimum reduziert. In dieser Konzentration ist das Redoxal-Ergebnis mit dem der Negativkontrolle (Abb. 3.3.1, B) vergleichbar. Auch in 0,01 mM Konzentration (B) zeigt Redoxal noch einen deutlichen inhibitorischen Effekt, der dann in der nächst geringeren Inhibitorkonzentration (C) weitestgehend erschöpft ist. Redoxal zeigt, histochemisch betrachtet, ein stärkeres inhibitorisches Potenzial als Brequinar und A77-1726.

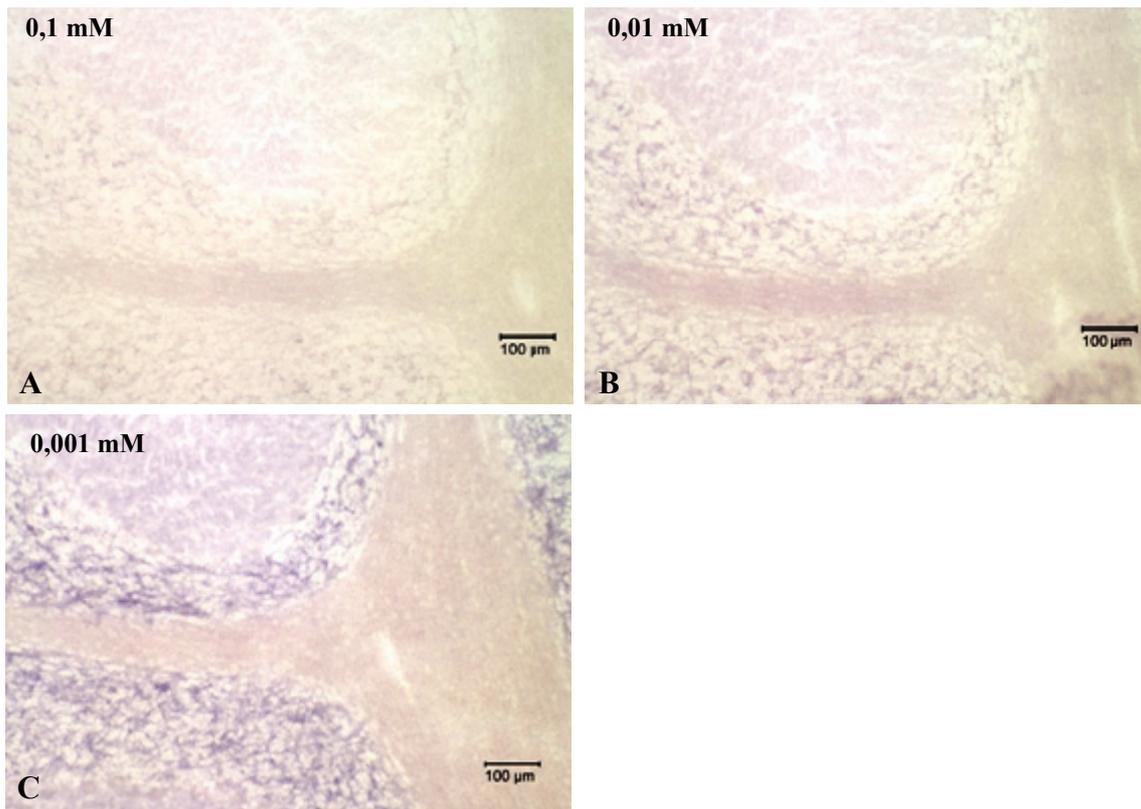
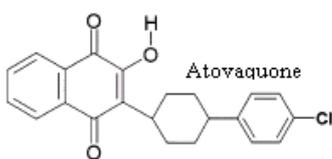


Abb. 3.3.4 Aktivitätsnachweis der DHODH in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Redoxal. A: 0,1 mM, B: 0,01 mM, C: 0,001 mM.

### 3.3.4 Atovaquone

#### Überblick



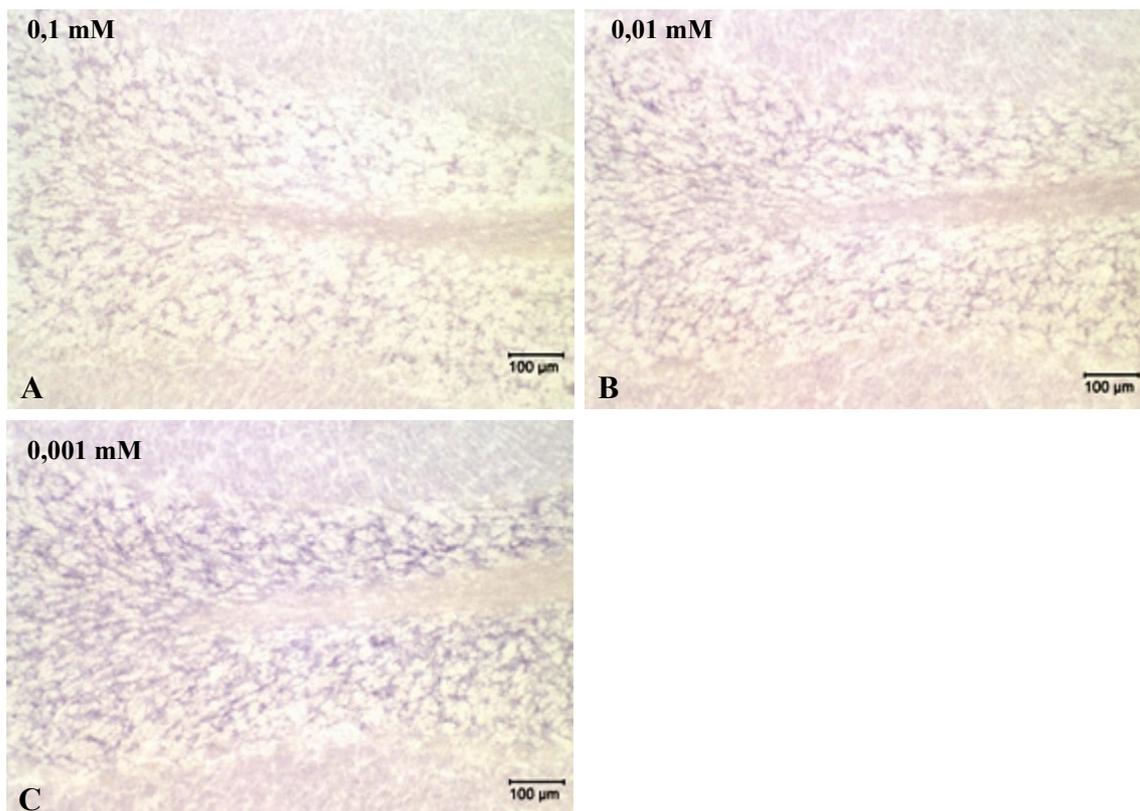
Atovaquone ist ein 1,4-Naphtochinon Derivat und beeinträchtigt nachweislich die Oxidation von Dihydroorotat. Es befindet sich in klinischer Anwendung gegen die Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* (Malurone<sup>®</sup>) und *Pneumocystis carinii* (Glaxo-Smith-

Wellcome). Naphthochinone wurden ebenfalls als Inhibitoren anderer Chinon-abhängiger Oxidoreduktasen der inneren Mitochondrienmembran beschrieben, wodurch sie enormen Effekt auf die Proliferation und das Wachstum von eukaryontischen Zellen ausüben.

Im Hinblick auf das Ubichinon-Co-Substrat der DHODH ist Atovaquone ein kompetitiver Hemmstoff des menschlichen sowie des Rattenenzym. In Bezug auf das Substrat Dihydroorotat wirkt Atovaquone als nicht-kompetitiver Inhibitor des Ratten- und als unkompetitiver Inhibitor des menschlichen Enzyms [Knecht et al., 2000].

Ergebnisse

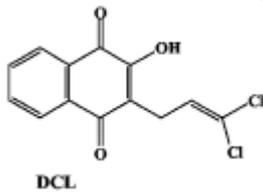
Die Abbildungen 3.3.5 (A-D) der hier untersuchten Kleinhirnschnitte zeigen die zunehmende DHODH-Aktivität bei verminderter Inhibitorkonzentration. Dieses umgekehrt proportionale Verhalten zwischen Aktivität und Atovaquone-Konzentration in der Inkubationslösung belegt die Wirksamkeit des Inhibitors im Nervengewebe der Ratte. Trotz der erkennbar verminderten Aktivität in Abb. 3.3.5 (A) scheint Atovaquone weitaus geringeres inhibitorisches Potenzial als beispielsweise A77-1726 zu besitzen. Von Knecht et al. (2000) ermittelte  $IC_{50}$ -Werte unterstreichen diese Beobachtung: Der  $IC_{50}$ -Wert des Atovaquone wird bei der Ratten-DHODH mit 698 nM, beim Menschen mit 14500 nM angegeben. Andererseits zeigte Atovaquone auf Gewebeschnitten ein höheres inhibitorisches Potenzial als Brequinar in gleicher Konzentration (vergleiche Abbildungen 3.3.5 (A) und 3.3.3 (B)). Dieses Ergebnis korreliert allerdings nicht mit den von Knecht (2000) ermittelten  $IC_{50}$ -Werten für Brequinar. Demnach ist der  $IC_{50}$ -Wert des Brequinar bezogen auf die Ratten-DHODH mit 367 nM niedriger als der des Atovaquone.



**Abb. 3.3.5** Aktivitätsnachweis der DHODH in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Atovaquone. A: 0,1 mM, B: 0,01 mM, C: 0,001 mM.

### 3.3.5 Dichloroallyl-Lawsone

#### Überblick



Dichloroallyl-Lawsone ist ebenfalls ein 1,4-Naphthochinon Derivat und leitet sich von dem Naturstoff Lawsone ab. Beide behindern die Oxidation von Dihydroorotat. DCL gilt als der potenteste Inhibitor des Rattenenzym. McKelvey et al. vermuteten 1979, dass DCL einen Nutzen in der Krebstherapie haben könnte. Daher bestimmten sie die maximale DCL-Plasma-Konzentration, die nicht zu einer Intoxikation führte. Hierbei hatte ein Erreichen der kritischen Maximaldosis von 130 mg DCL / L Plasma (dies entspricht einer Konzentration von 460  $\mu\text{M}$ ) bei Affen eine akute kardiale Toxizität zu Folge. Allerdings fand DCL, im Gegensatz zu Atovaquone, bislang keine klinische Anwendung. DCL wirkt als kompetitiver Inhibitor der menschlichen und als zeitabhängiger Inhibitor der Ratten-DHODH.

#### Ergebnisse

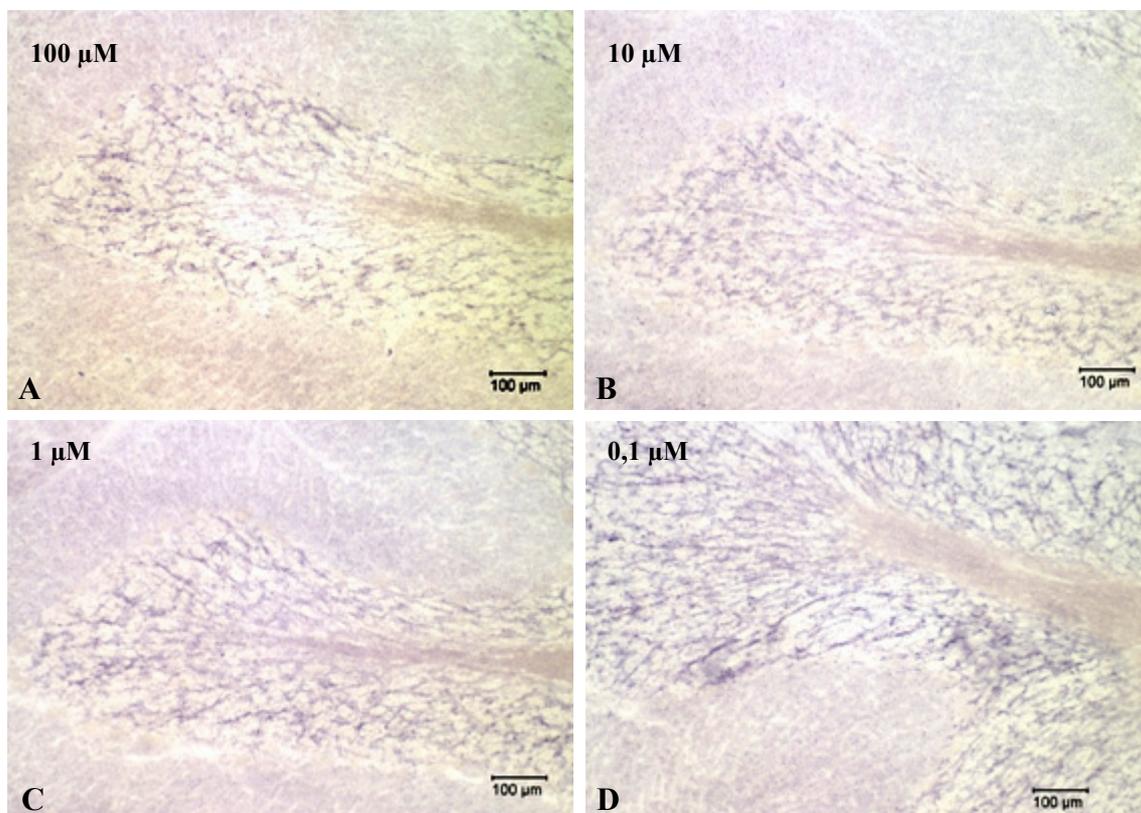


Abb. 3.3.6 Aktivitätsnachweis der DHODH in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von DCL.

A: 100  $\mu\text{M}$ , B: 10  $\mu\text{M}$ , C: 1  $\mu\text{M}$ , D: 0,1  $\mu\text{M}$ .

Entsprechend eines für die Ratten-DHODH niedrigen  $IC_{50}$ -Wertes von 10 nM [Knecht et al., 2000] zeigt sich, zumindest in 100  $\mu$ M InhibitorKonzentration (A), eine deutliche Hemmung der DHODH-Aktivität. Mit absteigenden Hemmstoffkonzentrationen nimmt die Enzymaktivität merklich zu.

### 3.3.6 UID1

#### Überblick

Bei dieser Verbindung handelte es sich um eine Testsubstanz mit noch nicht klar erwiesener Hemmwirkung auf die DHODH. Die Struktur wurde daher nicht mitgeteilt

#### Ergebnisse

Die Abbildungen 3.3.7 (A und B) zeigen einen Unterschied in ihrer Färbung. Der 0,5 mM Inhibitoransatz (A) bewirkt eine stärkere Inhibition als der geringer konzentrierte UID1-Ansatz (B). Es muss jedoch festgehalten werden, dass sich der Farbunterschied zur ungehemmten relativ gering darstellt. Nichtsdestotrotz gelang es, die inhibitorische Wirkung von UID1 auf die DHODH des Rattenhirns nachzuweisen. Zwar ist die Hemmung der DHODH-Aktivität bei den angewendeten InhibitorKonzentrationen gering. Dennoch lässt sich ein Aktivitätsunterschied zwischen Abb. 3.3.7 (A) und dem ungehemmten Aktivitätsnachweis (Abb. 3.3.1(A)) deutlich feststellen. Da höhere InhibitorKonzentrationen im Testansatz nicht löslich waren, konnten sie nicht untersucht werden.

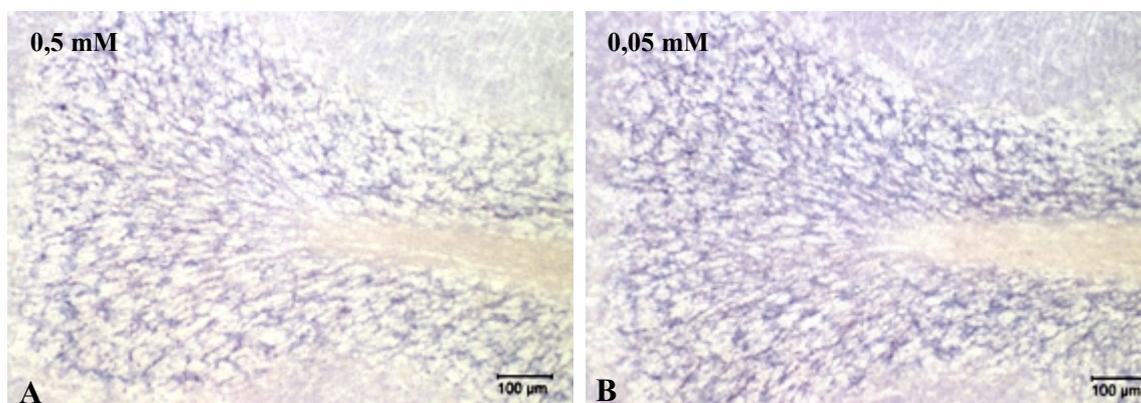


Abb. 3.3.7 Aktivitätsnachweis der DHODH in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von UID1. A: 0,5 mM, B: 0,05 mM.

### 3.3.7 Zusammenfassung der histochemischen Befunde

Alle untersuchten Inhibitoren zeigten im histochemischen Aktivitätsnachweis der DHODH ihr inhibitorisches Potenzial im Nervengewebe. Insbesondere der bislang kaum untersuchte Inhibitor UID1 sowie der Inhibitor DCL könnten in Zukunft Mittelpunkt therapeutisch orientierter Studien sein. Auch Walse et al. (2008) betonen die Relevanz der weiteren Untersuchung neuer DHODH-Inhibitoren für die klinische Anwendung. Die Einnahme von Arava (Wirkstoff: Leflunomid) kann mit ernststen Nebenwirkungen wie Diarrhoe, Hautausschlag, Abnormalitäten der Leberenzyme sowie Bluthochdruck verbunden sein [Walse et al., 2008]. Eine wesentliche Herausforderung wird also darin bestehen, DHODH-Inhibitoren und Pharmaka zu entwickeln bzw. zu erforschen, die für den menschlichen Organismus noch besser verträglich sind als einige aktuell erhältliche Präparate.

Weiterhin stützen die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche die Reliabilität des Aktivitätsnachweises der DHODH mittels NBT. Anerkannte DHODH-Inhibitoren wie A77-1726 oder Brequinar führten zu einer deutlichen Schwächung der Färbung auf den ZNS-Schnitten. Die durch die DHO-Zugabe erzielte Reaktion des NBT zu Formazan lässt sich also durch DHODH-Inhibitoren unterdrücken, was die Spezifität der Reaktion eindeutig stützt. Folglich ist die angewandte NBT-Methodik für den selektiven Nachweis des Enzyms im Gewebe geeignet.

### 3.4 Untersuchung des inhibitorischen Potenzials von UID1 und Redoxal auf die Succinat-Dehydrogenase

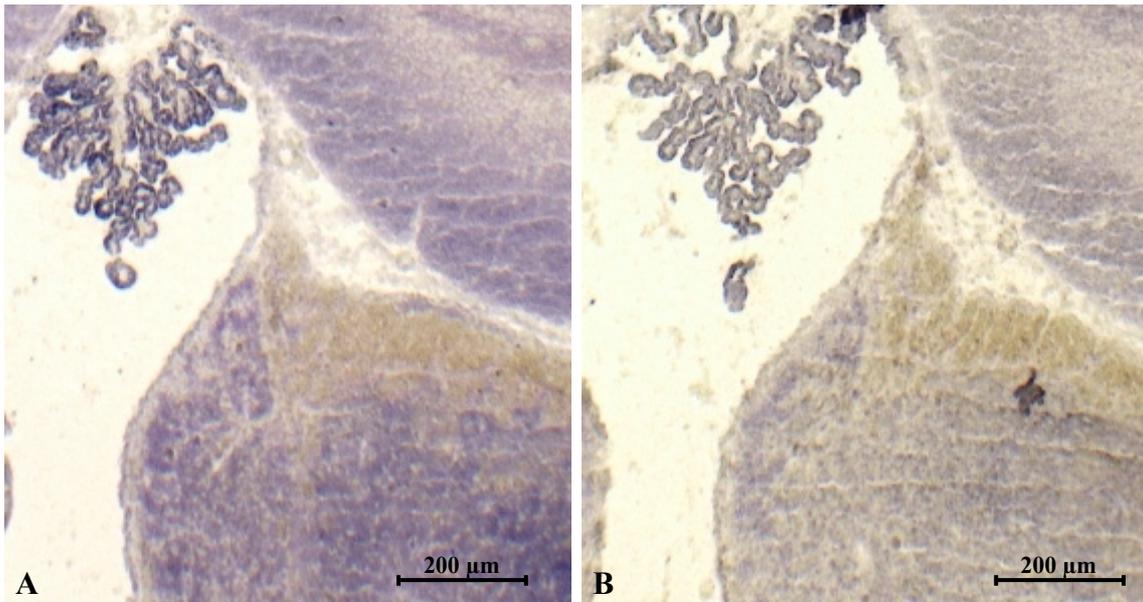
Hier sollte eine mögliche Inhibition der Succinat-Dehydrogenase durch Redoxal bzw. UID1 untersucht werden. Die Succinat-Dehydrogenase besitzt, ebenso wie die DHODH, Flavin als prosthetische Gruppe. Sie katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat im Rahmen des Citratzykluses. Der Elektronenakzeptor der SDH ist letztendlich das Ubichinon, welches zu seiner phenolischen Form (Ubichinol) reduziert wird.

#### Redoxal

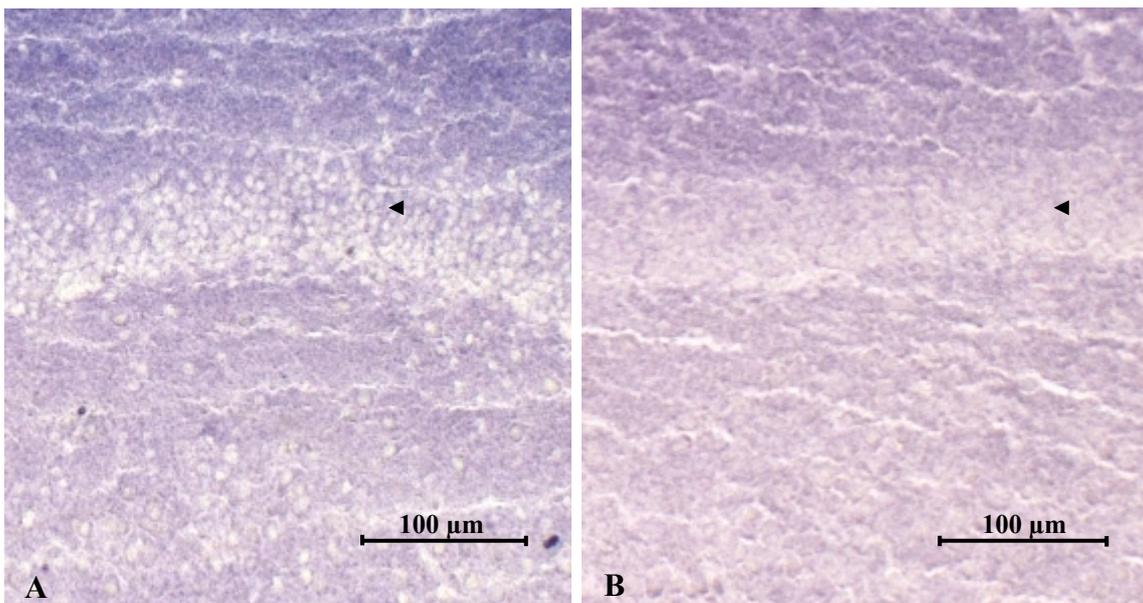
Der enzymhistochemische Nachweis in Abwesenheit des Inhibitors und die Inkubation mit Redoxal im Ansatz zeigten eine identische NBT-Färbung (nicht abgebildet). Lichtmikroskopisch konnte über den gesamten Inkubationszeitraum von 60 Minuten keine Beeinflussung der Succinat-abhängigen NBT-Reaktion festgestellt werden. Somit wurde an Gewebeschnitten des Ratten-ZNS gezeigt, dass Redoxal keine inhibitorische Wirkung auf die Succinat-Dehydrogenase besitzt.

#### UID1

Die folgenden Abbildungen 3.4.1 (A und B) und 3.4.2 (A und B) stellen den Unterschied zwischen ungehemmtem Aktivitätsnachweis und Inkubation mit Inhibitor im ZNS der Ratte dar. Diese Frontalschnitte zeigen den dritten Ventrikel mit Plexus choroideus, sowie einen Ausschnitt des Hippocampus. UID1 wurde in einer Konzentration von 0,5 mM und 0,05 mM eingesetzt. Die Abbildungen zeigen die Inkubationsergebnisse der höchsten verwendeten Inhibitorkonzentration. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Inkubation in Anwesenheit von UID1 eine relativ geringere Färbung zur Folge hatte. Unter niedrigeren UID1-Konzentrationen war dieser inhibitorische Effekt nur andeutungsweise erkennbar. Im Gegensatz zu Redoxal zeigte UID1 also eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase. Das inhibitorische Potenzial von UID1 in Bezug auf die Succinat-Dehydrogenase wurde somit eindeutig nachgewiesen.



**Abb. 3.4.1 Aktivitätsnachweis der SDH.** A: ungehemmter Aktivitätsnachweis, B: in Gegenwart von 0,5 mM UID1.



**Abb. 3.4.2 Aktivitätsnachweis der SDH im Hippocampus.** A: ungehemmter Aktivitätsnachweis, B: in Gegenwart von 0,5 mM UID1.

(◄) Körnerzellen

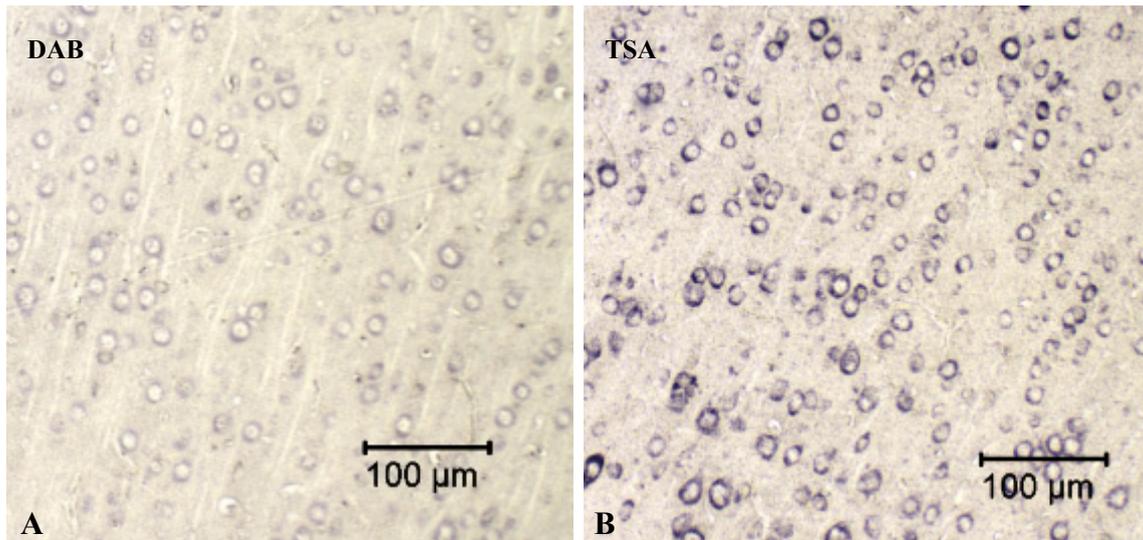
### **3.5 Ergebnisse des immunhistochemischen DHODH-Nachweises**

Mittels der zuvor angewandten NBT-Methodik gelang die Differenzierung DHODH-reicher und DHODH-ärmer Areale. Die Expression des aktiven Enzyms im Rattenhirn wurde somit nachgewiesen. Die hierfür verwendeten unfixierten Kryoschnitte sind jedoch anfällig gegenüber einer Gewebeschädigung während der Inkubation. Weiterhin ließ das Verfahren nicht in jedem Fall eine Zuordnung der Aktivität auf zellulärer Ebene zu. Nun sollte der Nachweis der DHODH mittels in Kaninchen generiertem Antikörper, Aufschluss über die genaue Lokalisation der DHODH im Hirngewebe geben. Hierbei galt es insbesondere zu klären, ob sich die DHODH hauptsächlich in Glia oder Neuronen nachweisen lässt oder gleichermaßen in beiden Zelltypen lokalisiert ist. Zur Negativkontrolle wurde bei entsprechenden Schnitten auf den Primärantikörper verzichtet.

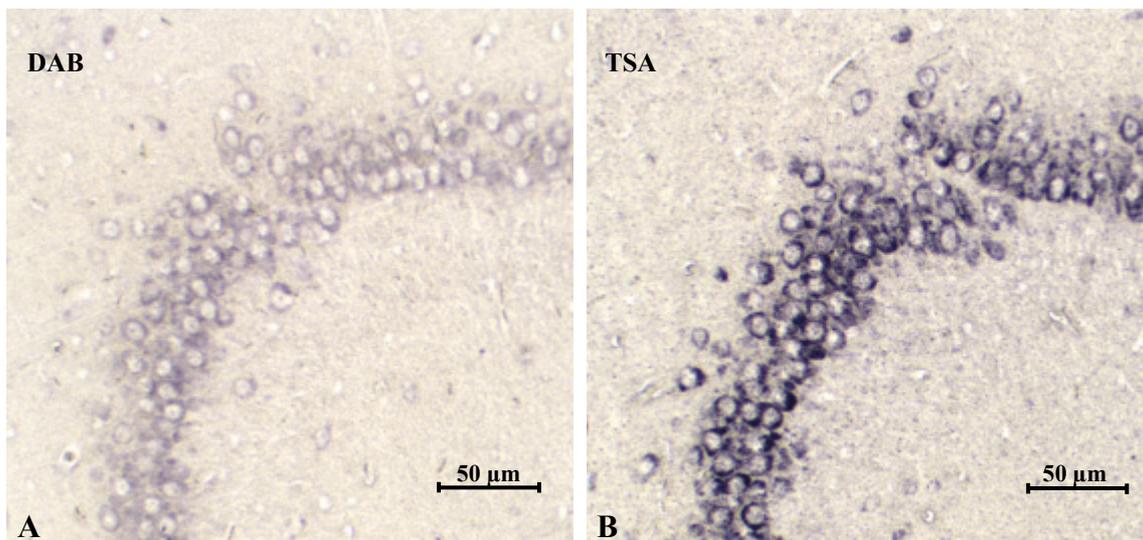
#### **3.5.1 Unterschied zwischen der normalen und der mittels Tyramid verstärkten ABC-Methode zum Nachweis der DHODH**

Da in den folgenden Ergebnissen ausschließlich Schnitte abgebildet sind, die mit Tyramid verstärkt wurden (TSA-Methode), soll eingangs der Unterschied zwischen dem verstärkten und dem unverstärkten Nachweis herausgestellt werden. Allerdings wurde zunächst, wie in Kapitel 2.13.2 beschrieben, eine Verdünnungsreihe des Primärantikörpers angesetzt, um dessen optimale Konzentration sowohl für den unverstärkten, als auch für den mittels Tyramid verstärkten immunhistochemischen Nachweis zu ermitteln. So wurde für den Tyramid-verstärkten Nachweis eine optimale Primärantikörper-Konzentration von 1:10, für den unverstärkten ein Titer von 1:4 ermittelt.

Es wird deutlich, dass sich die Ergebnisse bezüglich der Lokalisation enzymreicher und enzymarmer Gebiete nicht unterscheiden. Eine wesentlich vermehrte Hintergrundreaktion ist auf den „verstärkten“ Bildern (3.5.1 und 3.5.2 (B)) im Vergleich zu den unverstärkten (3.5.1 und 3.5.2 (A)) nicht zu erkennen. Lediglich in der Intensität des Nachweises zeigen sich die Unterschiede: Bei einer Primärantikörper-Konzentration von 1:10 zeigten die Tyramid behandelten Schnitte eine intensivere Färbung als die Schnitte des DAB-Nickel-Nachweises ohne Tyramid-Verstärkung und einer Antikörper-Konzentration von 1:4. Infolgedessen lässt sich mithilfe des Tyramid-Systems mit geringeren Antikörpermengen eine deutlich verbesserte Nachweisreaktion erreichen, die die Beurteilung der Ergebnisse erheblich vereinfacht. Die Spezifität geht bei diesem Verfahren nicht verloren. Daher wurden in dieser Arbeit die Schnitte abgebildet, auf denen der DAB-Nickel-Nachweis mittels Tyramid verstärkt wurde.



**Abb. 3.5.1 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH im Frontalkortex der Ratte.** A: DAB-Nickel-Nachweis der DHODH unverstärkt (DAB), B: verstärkter Nachweis (TSA).

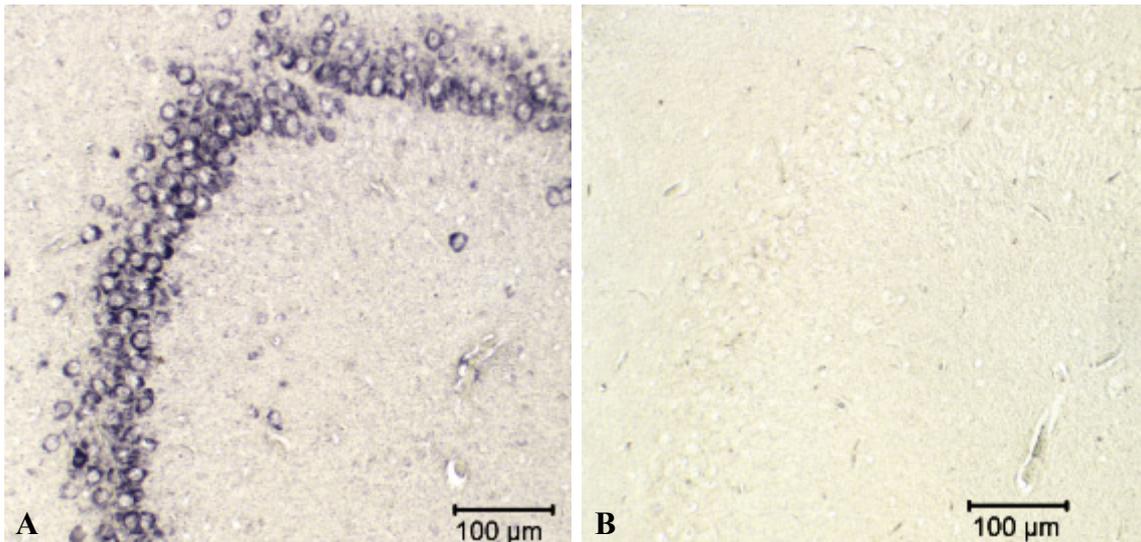


**Abb. 3.5.2 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH in der CA2-Region des Hippocampus.** A: DAB-Nickel-Nachweis der DHODH unverstärkt (DAB). B: verstärkter Nachweis (TSA).

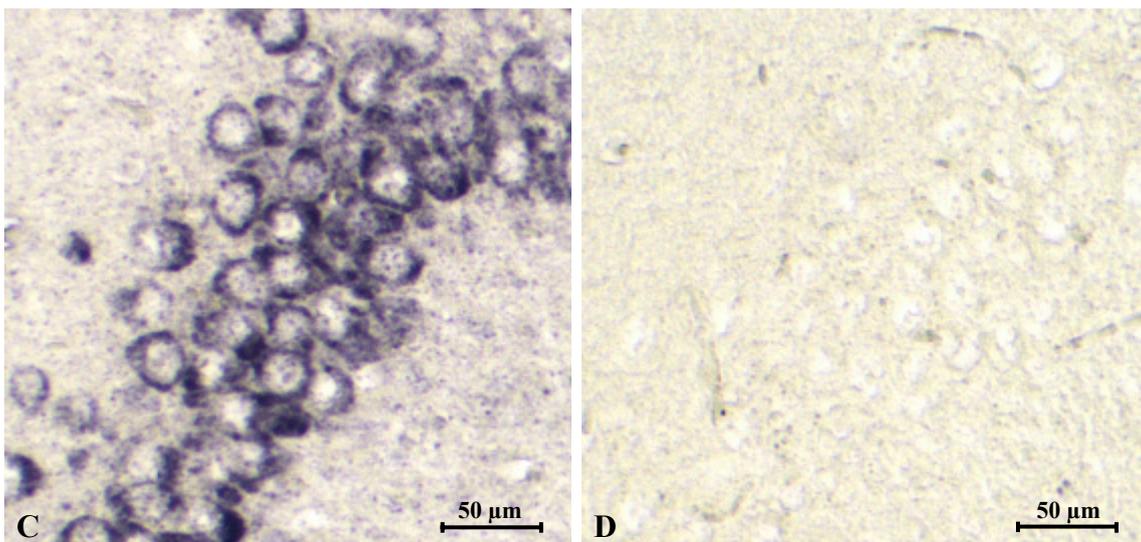
### 3.5.2 Der immunhistochemische Nachweis der DHODH in ausgewählten Hirnregionen

#### Hippocampus

#### Ergebnisse

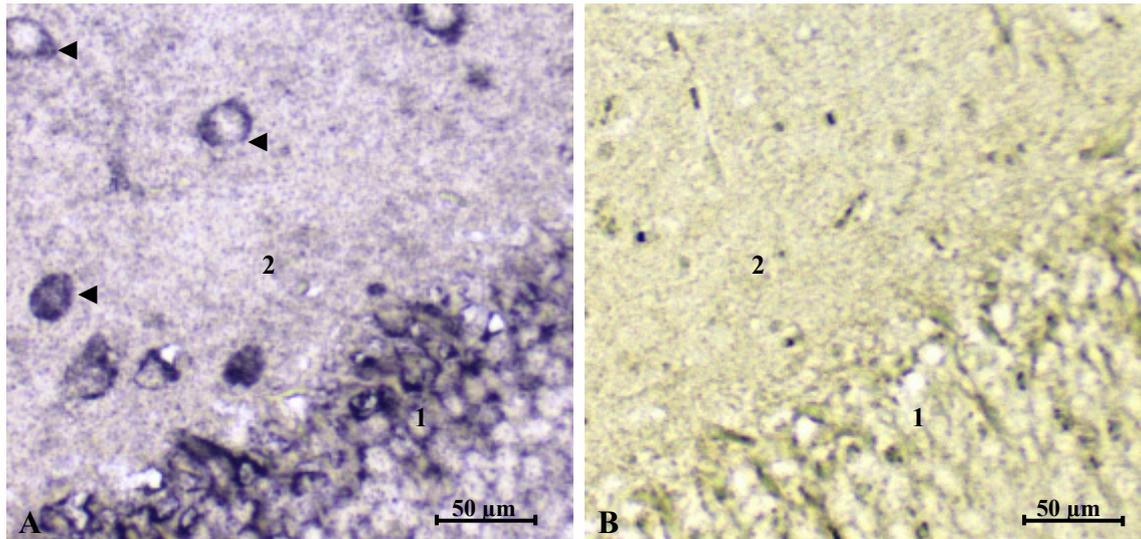


**Abb. 3.5.3 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH im Hippocampus, Übersichtsvergrößerung.** A: Nachweis der DHODH. Der abgebildete Bereich stellt in etwa die CA2-Region des Ammonshornes dar. B: Negativkontrolle.



**Abb. 3.5.4 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH im Hippocampus, stärkere Vergrößerung.** A: Nachweis der DHODH. Der abgebildete Bereich zeigt einen Ausschnitt der CA2-Region des Ammonshornes B: Negativkontrolle.

Die Abbildungen 3.5.3 und 3.5.4 zeigen Ausschnitte der CA2-Region des Ammonshorns. Es zeigt sich, dass sich die DHODH auf die Bereiche hoher Neuronendichte beschränkt. In diesem Fall handelt es sich um die dicht gepackten Pyramidenzellen der CA2-Region. Auch die Körnerzellen des Gyrus dentatus sowie die locker angeordneten Pyramidenzellen in Abbildung 3.5.5 zeigen laut Nachweisreaktion einen relativ hohen DHODH-Gehalt. Die Körnerzellen sind hier deutlich anhand ihrer typischen Größe von etwa 10 µm Breite und 16 µm Höhe [Paxinos, 2004] von den weitaus größeren Pyramidenzellen zu differenzieren.



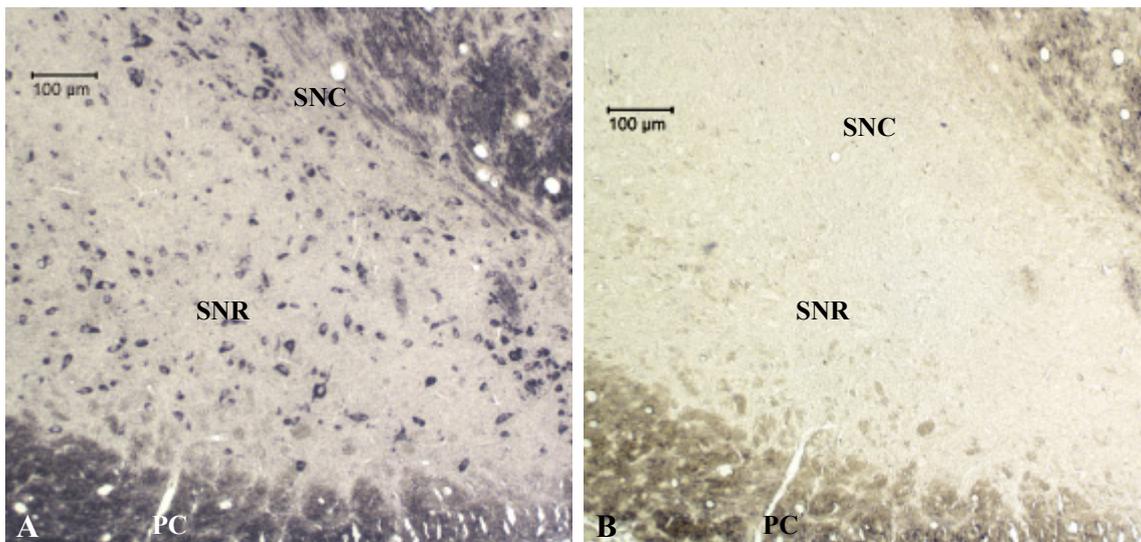
**Abb. 3.5.5 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH im Gyrus dentatus.** A: Nachweis der DHODH, B: Negativkontrolle.

- (1) Körnerzellen des Gyrus dentatus
- (2) Polymorphe Schicht des Gyrus dentatus
- (◄) Neuronen

### Substantia nigra

Das Kerngebiet der substantia nigra liegt im Mesencephalon und übernimmt wesentliche Funktionen für die Bewegungsinitiation. Dies erklärt sich durch ihre überwiegend dopaminergen Neurone, die in das Striatum projizieren und somit die Aktivität der striatalen Neurone hemmen. Da die striatalen Neurone einen inhibitorischen Effekt auf die motorischen Impulse des Großhirns haben, wirkt die Substantia nigra durch die angesprochenen Projektionen bewegungsfördernd. Eine Degeneration der dopaminergen Neurone hat Morbus Parkinson zur Folge.

## Ergebnisse



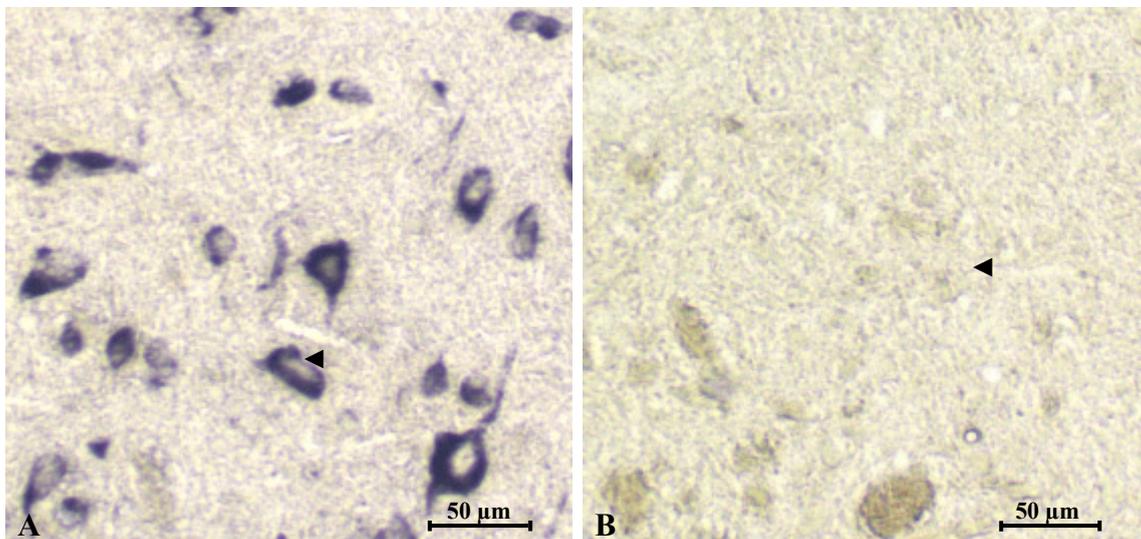
**Abb. 3.5.6 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH in der Substantia nigra (SNC + SNR). A:**

Nachweis der DHODH, B: Negativkontrolle.

SNR Substantia nigra, Pars reticulata

SNC Substantia nigra, Pars compacta

PC Pedunculus cerebellaris



**Abb. 3.5.7 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH in Neuronen der substantia nigra. A:**

Nachweis der DHODH. B: Negativkontrolle.

(◄) Neuronen

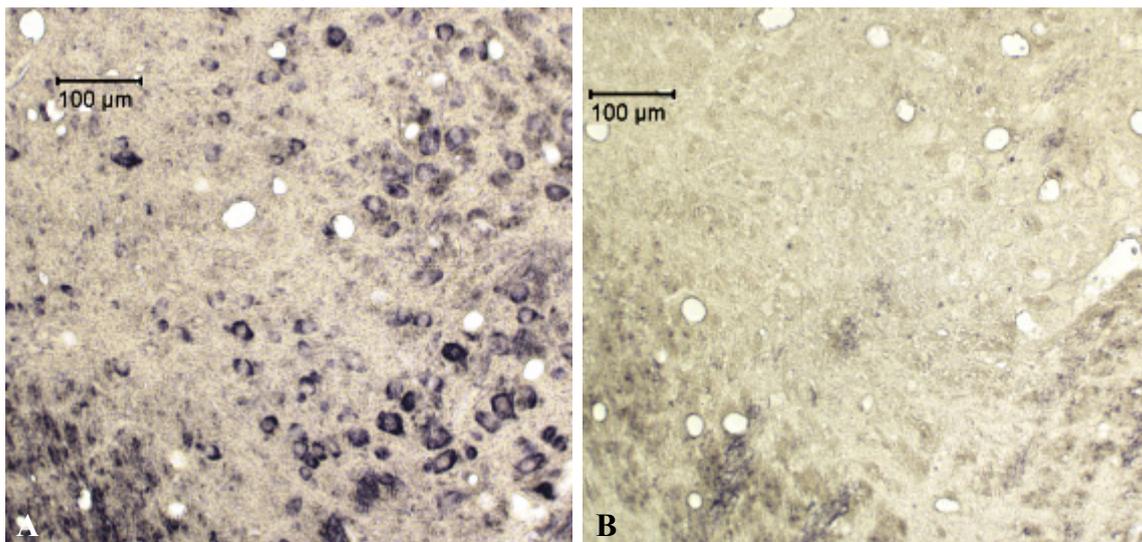
In der substantia nigra lassen sich zwei Haupt-Neuronentypen unterscheiden. Zum einen existieren dopaminerge Neurone, zum anderen solche, die auf GABA als Neurotransmitter zurückgreifen. Die dopaminergen Neurone befinden sich primär in der Pars compacta (SNC) des Kerngebietes, während die GABAergen Nervenzellen vermehrt in der Pars

reticulata (SNR) lokalisiert sind [Paxinos, 2004]. Morphologisch sind diese beiden Nervenzelltypen jedoch kaum voneinander zu unterscheiden. Die Pars compacta besitzt insgesamt eine höhere Dichte an Neuronen. In Abbildung 3.5.6 (A) wird deutlich, dass eine erhöhte Neuronendichte mit einem verstärkten DHODH-Vorkommen einhergeht. Wie aus Abbildung 3.5.7 (A) ersichtlich, sind die Nervenzellen der Substantia nigra der primäre Ort der DHODH-Lokalisation in diesem Kerngebiet. Die Hintergrundreaktion ist sehr gering, was den neuronalen Enzymnachweis noch deutlicher erscheinen lässt (siehe Abb. 3.5.7 (A)). Die Zellkerne der Neuronen erscheinen, analog zu den anderen untersuchten Hirnregionen, frei von Färbung. Lediglich im Zytosol der Neuronen ist der DHODH-Nachweis, entsprechend der mitochondrialen Lokalisation des Enzyms, positiv.

### Nucleus ruber

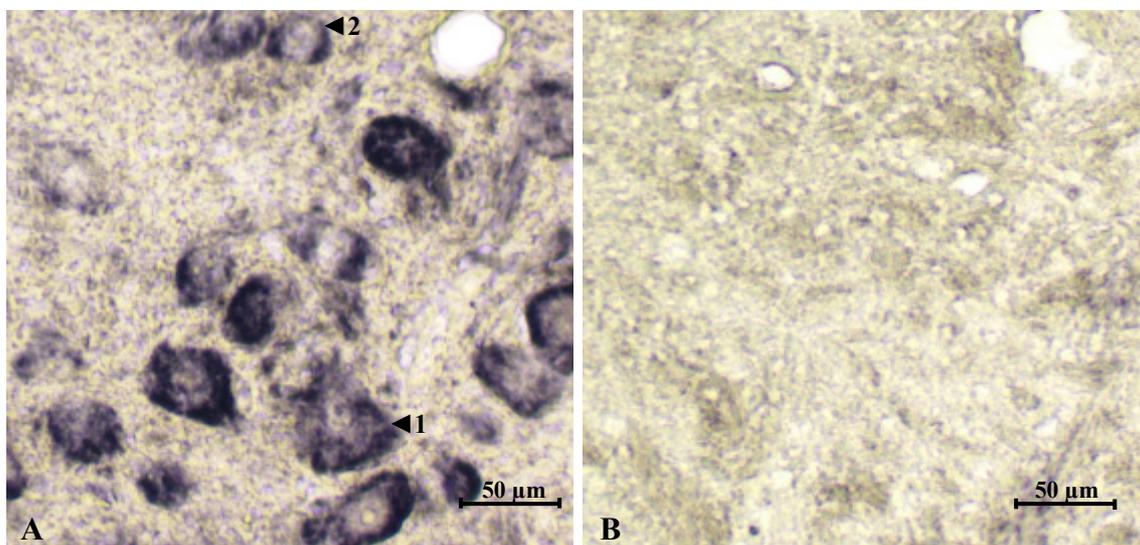
Die Bezeichnung Nucleus ruber lässt sich auf die blass rötliche Farbe dieser Struktur im frischen humanen Gewebe zurückführen. Ebenso wie die Substantia nigra befindet sich dieses Kerngebiet im Mittelhirn und ist Schaltstelle des motorischen Systems. Hierbei liefert es durch seine Projektionen ins Rückenmark selbst einen Anteil des extrapyramidal-motorischen Systems. Des Weiteren ist der Nucleus ruber funktionell eng mit dem Cerebellum verbunden, von welchem er zahlreiche Afferenzen erhält.

### Ergebnisse



**Abb. 3.5.8 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH im Nucleus ruber, Übersichtsvergrößerung.** A: Nachweis der DHODH. B: Negativkontrolle.

Reid et al. (1975) unterschieden vier Zelltypen innerhalb des Nucleus ruber. Deren Differenzierung beruhte primär auf der Größe ihrer Zellkörper. So wurden giant neurons ( $>40\ \mu\text{m}$ ), large neurons ( $26\text{-}40\ \mu\text{m}$ ), medium neurons ( $20\text{-}25\ \mu\text{m}$ ) und small neurons ( $<20\ \mu\text{m}$ ) unterschieden. Andere Autoren klassifizierten die Nervenzellen nach Zellkerngröße und -form (Tucker et al. 1989). Analog zu anderen Kerngebieten (z.B. substantia nigra), zeigen die Neuronen des Nucleus ruber im immunhistochemischen Nachweis der DHODH eine deutliche Färbung. Frei von einer Färbung bleiben die Zellkerne, in denen die DHODH nicht lokalisiert ist. Abbildung 3.5.9 zeigt vor allem giant- und large neurons. Sie besitzen ähnliche strukturelle Charakteristika und kommen vermehrt im kaudalen Drittel des Kerngebietes vor [Paxinos, 2004].

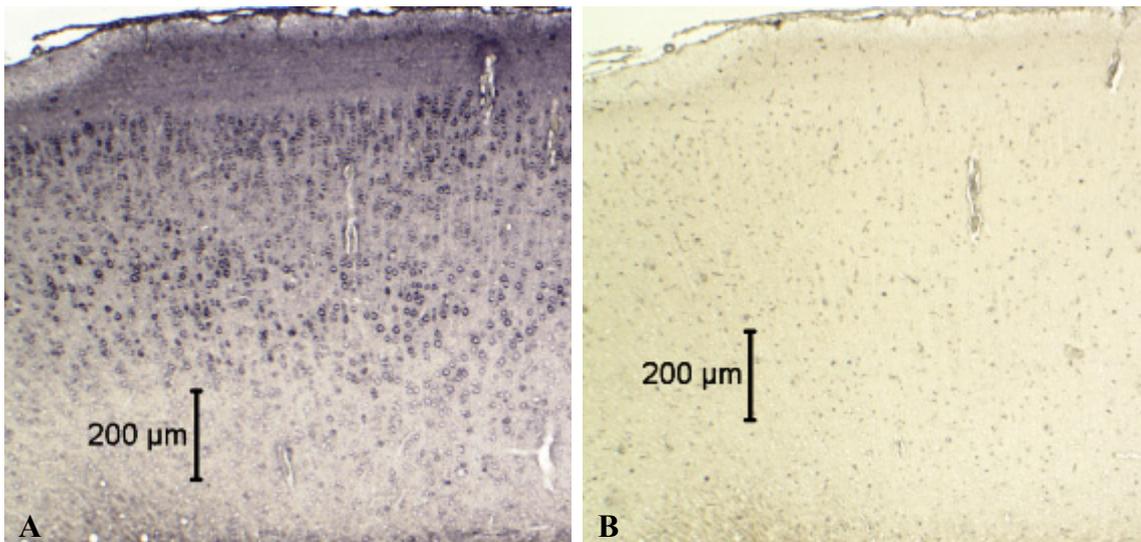


**Abb. 3.5.9 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH im Nucleus ruber, stärkere Vergrößerung.** A: Nachweis der DHODH. B: Negativkontrolle.

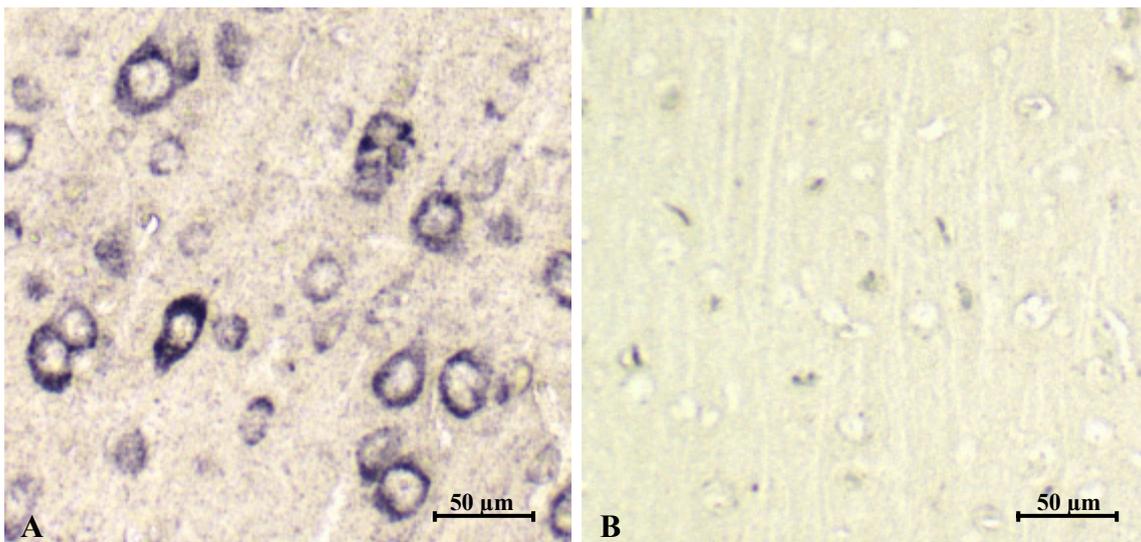
- (1) giant-neuron
- (2) large-neuron

### Isokortex

Der Isokortex der Ratte lässt sich, ebenso wie der des Menschen, in sechs Schichten untergliedern, die parallel zur Oberfläche des Kortex verlaufen. Von außen nach innen wird unterschieden zwischen Lamina molecularis (I), Lamina granularis externa (II), Lamina pyramidalis externa (III), Lamina granularis interna (IV), Lamina pyramidalis interna (V) und Lamina multiformis (VI). Die Bezeichnungen entsprechen den in der jeweiligen Schicht mehrheitlich vorkommenden Zellen, wobei die Molekularschicht überwiegend Fortsätze und die Lamina multiformis viele morphologisch unterschiedliche Zellen enthält.

Ergebnisse

**Abb. 3.5.10 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH im Frontalkortex, Übersichtsvergrößerung.** A: Nachweis der DHODH. B: Negativkontrolle.



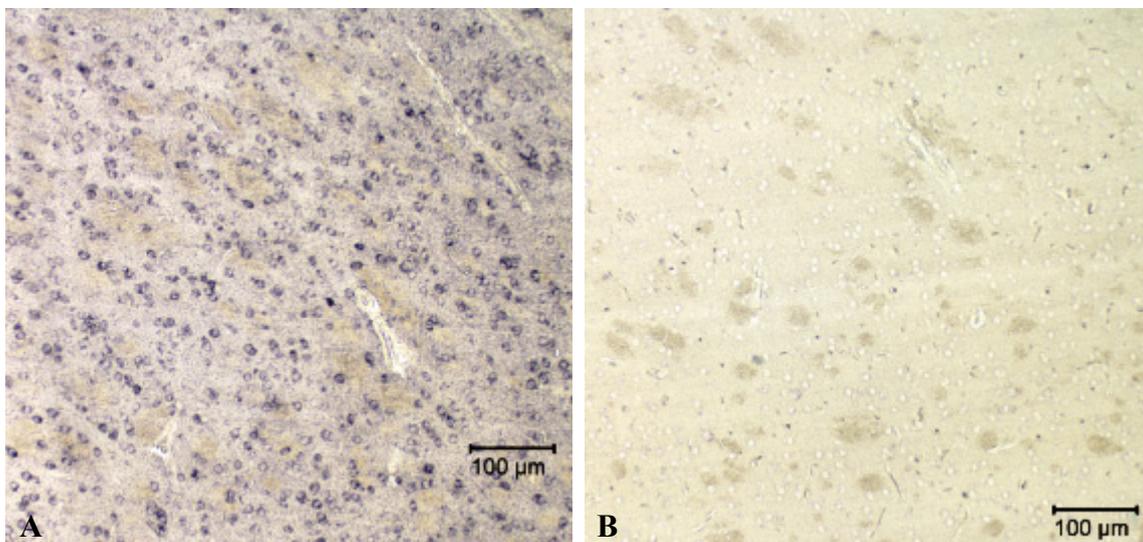
**Abb. 3.5.11 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH im Frontalkortex, stärkere Vergrößerung.** Ausschnitt aus der Lamina pyramidalis interna des Frontalkortex. A: Nachweis der DHODH. B: Negativkontrolle.

Die Abbildungen 3.5.10 und 3.5.11 zeigen Gewebeschnitte aus dem Bereich des frontalen Isokortex, der den motorischen Kortex der Ratte darstellt. Cytoarchitektonisch zeichnet sich der frontale Isokortex durch eine sehr gering ausgeprägte Lamina IV aus. Sie ist hauptsächlich in sensorischen Kortexarealen stark entwickelt. Im funktionell motorisch orientierten frontalen Isokortex zeigen sich dagegen eine ausgeprägte Lamina pyramidalis interna (V) und externa (III). Die DHODH wurde in den verschiedenen Neuronen aller Schichten nachgewiesen. Besonders stark erschien das Signal in den größeren

Pyramidenzellen (Laminae III und V). Da die Lamina molecularis nur über sehr wenige Nervenzellen verfügt, ist hier insgesamt wenig DHODH lokalisiert. Abb. 3.5.11 zeigt die enzymreichen Pyramidenzellen der Lamina pyramidalis interna. Wie in allen zuvor durchgeführten Nachweisen findet sich die DHODH im Zytoplasma der Nervenzellen. Der Kern ist ungefärbt.

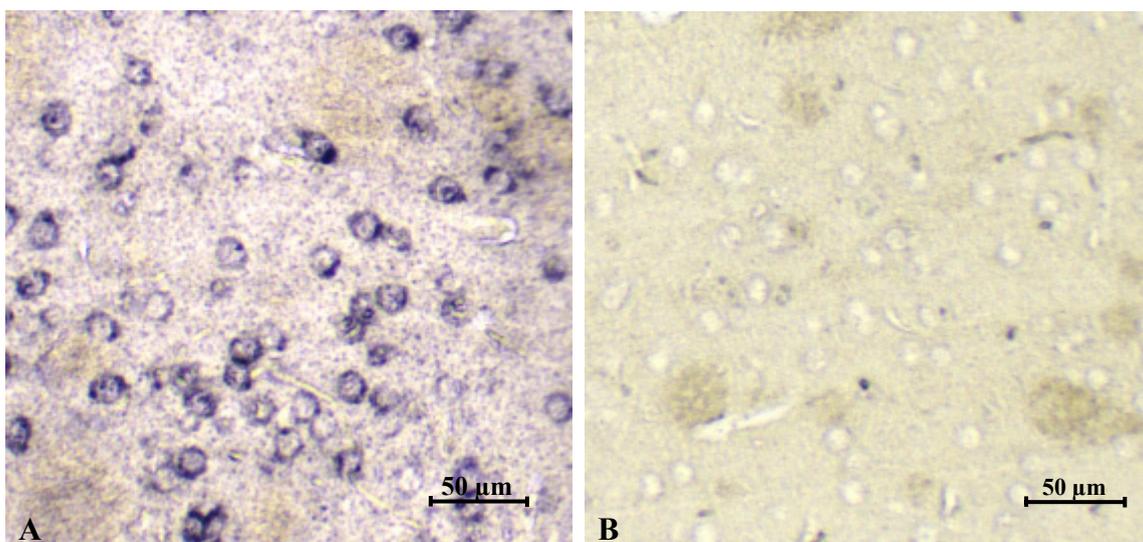
### Striatum

#### Ergebnisse



**Abb. 3.5.12 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH im Striatum, Übersichtsvergrößerung.**

A: Nachweis der DHODH. B: Negativkontrolle.



**Abb. 3.5.13 Immunhistochemischer Nachweis der DHODH im Striatum, stärkere Vergrößerung.**

A: Nachweis der DHODH. B: Negativkontrolle.

Bereits in der Übersicht (Abb. 3.5.12) wird deutlich, dass sich der DHODH-Nachweis sehr selektiv darstellt. Nur bestimmte Zellen zeigen einen relativ hohen Enzymgehalt im Vergleich zu ihrer Umgebung. Bei weiterer Vergrößerung (Abb. 3.5.13) wird deutlich, dass es sich bei den DHODH-reichen Zellen um die Nervenzellen des Striatums handelt. Schon aufgrund der zellulären Zusammensetzung des Striatums handelt es sich bei den abgebildeten, signalreichen Neuronen hauptsächlich um medium-spiny Neuronen (sie machen im Striatum der Ratte einen Anteil von 95 % aller Zellen aus). Die Anordnung der Nervenzellkörper ist relativ homogen und somit typisch für das Striatum. Anders als der Kortex mit seiner laminären Anordnung, besitzt das Striatum keine klare zytoarchitektonische Organisation [Paxinos, 2004]. Im Gegensatz zu Darstellungen der DHODH mittels katalytischer Enzymhistochemie (vergleiche Abbildungen 3.2.5 und 3.2.6, Seite 51) ließen sich immunhistochemisch deutliche Grenzen der Zellkörper darstellen. Der Formazanniederschlag im NBT-Nachweis erschien diffuser, zeigte allerdings ebenso wie der immunhistochemische Nachweis, ein recht homogen verteiltes Signal.

### **3.5.3 Abschließende Beurteilung der histochemischen und immunhistochemischen Ergebnisse**

In allen untersuchten Nervengewebe wurde die DHODH im Zytoplasma der Neuronen nachgewiesen. Eine genauere mitochondriale Lokalisation des Enzyms ist lichtmikroskopisch nicht möglich. Abgesehen von den Ependymzellen des Ventrikelsystems, konnte die DHODH mit den angewandten Methoden nicht in Gliazellen nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die DHODH in diesen Zellen überhaupt nicht oder in einer nicht nachweisbaren Menge vorliegt. In Kapitel 4. Diskussion sollen, unter anderem, mögliche Erklärungen dieser Erkenntnisse betrachtet werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodik

#### 4.1.1 Die Wahl des Fixationsverfahrens

##### Die Avidin-Biotin-Methode

Für diesen Versuchsabschnitt wurden fixierte, paraffinierte Gewebe verwendet. Dem Fixativ und dessen Anwendung kommt eine wichtige Rolle im Rahmen des immunhistochemischen Enzymnachweises zu. Seine Aufgabe besteht in der Proteindenaturierung unter Erhalt der antigenen Determinante, bei gleichzeitiger Wahrung der Zugänglichkeit des Antigens für den Antikörper. Dies ist, unter anderem, während den zahlreichen Spülvorgängen von Bedeutung. Bevor also der gebundene anti-DHODH-AK mittels Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) erfolgreich detektiert werden konnte, musste experimentell die geeignete Fixierung des Gewebes ermittelt werden. Hierzu wurde Leber-, Nieren- und auch Hirngewebe der Ratte unterschiedlich fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Eine Durchführung der ABC-Methode auf Bouin-Hollande-fixierten Schnitten erbrachte keinen Enzymnachweis. Daraufhin wurden entsprechende Schnitte mit Paraformaldehyd fixiert. Der DHODH-Nachweis gelang in diesem Fall und wurde durch Variation des Primärantikörpertiters weiter optimiert. Eine mögliche Ursache für die Abhängigkeit des Ergebnisses von der Art der Fixierung, ist eine potenzielle Maskierung oder Zerstörung von Antigenepitopen durch das Fixans. Es ist also denkbar, dass Antikörper entsprechende Epitope somit nicht mehr detektieren können. Dieses Risiko ist vermindert, wenn auf polyklonale Antikörper zurückgegriffen wird, die alternative Antigenepitope erkennen können.

Für alle weiteren Enzymnachweise mittels ABC-Methode wurden also PFA-fixierte Schnitte verwendet. Problematisch kann bei diesem Vorgehen laut Bourne (1989) die beschriebene Maskierung oder Zerstörung der Antigenepitope sein. Um eine Demaskierung zu erreichen, wurden die Gewebeschnitte für 15 Minuten auf einer Herdplatte gekocht, bevor sie mit dem Primärantikörper inkubiert wurden. Eine deutlich vermehrte Gewebeerstörung trat bei behutsamem Vorgehen offensichtlich nicht auf.

### Der Aktivitätsnachweis mit Tetrazoliumsalzen

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit unfixierten Kryoschnitten gearbeitet. Die Gefrierschnitttechnik kann rasch durchgeführt werden und bietet außerdem den Vorteil einer guten Antigen- und Enzymaktivitätserhaltung, weshalb sie zum Beispiel für Schnellschnitte bei Tumoroperationen eingesetzt wird. Ein schnelles Einfrieren der aus dem Tier entnommenen Gewebeprobe ist für die Schnittqualität essentiell. Eine Schockgefrierung von Untersuchungsmaterial in flüssigem Stickstoff entspricht einer physikalischen Haltbarmachung. Durch Anwendung des flüssigen Stickstoffes gelang im Rahmen der Teilresektion des Rattenhirns ein schlagartiges Einfrieren des Gewebes. Auf diese Weise konnte eine Eiskristallbildung und damit einhergehende Gewebedestruktion weitestgehend vermieden werden. Der entscheidende Vorteil dieser Methodik liegt in der quasi reversiblen Hemmung der Enzymaktivität. Nach dem Auftauen der unfixierten Kryoschnitte, kann eine Reaktivierung der enzymatischen Aktivität erwartet werden, was eine Grundvoraussetzung für die auf Aktivität basierende Nachweisreaktion in dieser Arbeit darstellt. So gelang es, die tatsächliche Dehydrogenaseaktivität der DHODH auf unfixierten Kryoschnitten des Ratten-ZNS mit dem spezifischen Substrat Dihydroorotat und einem geeigneten Tetrazoliumsalz nachzuweisen. Der Nachteil, den dieses Verfahren mit sich bringt, ist die einsetzende Gewebeschädigung während der Verarbeitung bei Raum- und Inkubationstemperaturen.

Um das inkubierte Gewebe nach der Reaktion chemisch haltbar zu machen und das Ergebnis festzuhalten, wurde eine Paraformaldehydfixierung angewendet. Durch Reaktion des Aldehydes mit freien Aminogruppen der Proteine des zu fixierenden Organs, werden diese vernetzt und denaturiert. Dadurch wird ihre Löslichkeit eingeschränkt, aber insbesondere enzymatische Reaktionen verhindert, und somit auch eine mikrobielle Zersetzung deutlich vermindert. Lösliche Substanzen bleiben im Allgemeinen in der entstehenden Netzstruktur haften.

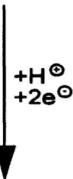
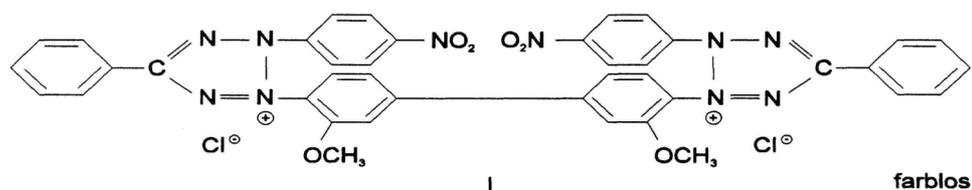
#### **4.1.2 Einsatz von Redoxmediatoren**

Bei der Durchführung eines histochemischen Dehydrogenase-Nachweises kann grundsätzlich die Frage nach der Sinnhaftigkeit des Einsatzes von Redoxmediatoren gestellt werden. Redoxmediatoren wie beispielsweise Menadion oder Phenazinmethosulfat (PMS), sind in der Lage, Wasserstoff von dem Coenzym rasch und direkt auf das Tetrazoliumsalz zu übertragen, welches dann den kristallinen Niederschlag bildet. In der vorliegenden Arbeit wurde auf den Einsatz von Redoxmediatoren bewusst verzichtet. Eine sinnvolle

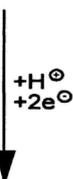
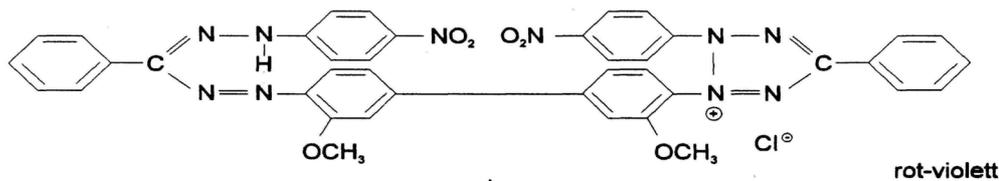
Indikation für die Anwendung von Redoxmediatoren bei Dehydrogenase-Nachweisen beschränkt sich weitestgehend auf solche Dehydrogenasen, bei denen die Gefahr der Diffusion des reduzierten Coenzym besteht. Dies ist beispielsweise bei zahlreichen, löslichen NAD-abhängigen Dehydrogenasen der Fall. Die Diffusion hätte zum Beispiel eine falsche Lokalisation der Enzymaktivität zur Folge. Dieser Fall trifft bei der DHODH nicht zu, da es sich um eine membrangebundene Dehydrogenase mit FMN als Coenzym (prothetische Gruppe) handelt. Wegerles Untersuchungen (1993) zur Aktivität der DHODH zeigten zudem keine gezielte Stimulierung der Enzym-Aktivität, sondern ebenfalls eine Steigerung der nicht spezifizierbaren Hintergrundaktivität.

#### 4.1.3 Farbgebung der NBT-Reaktion

##### Nitrobluetetrazoliumchlorid (NBT)



##### NBT-Monoformazan (Halbreduktionsprodukt)



##### NBT-Diformazan

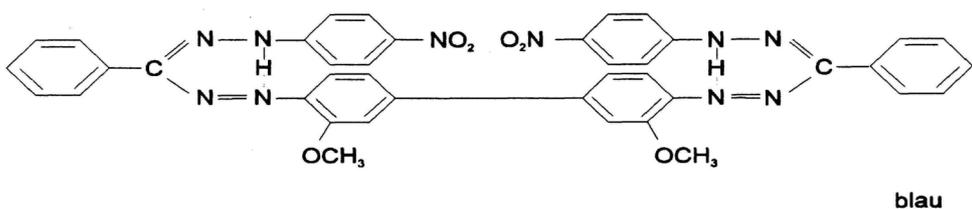


Abb. 4.1.1 Reduktion des NBT, aus Wegerle 1993

Bei der Betrachtung der histochemischen NBT-Ergebnisse fällt die Heterogenität des Farbtones auf. Zum einen lässt sich eine rot-violette, zum anderen eine blaue Farbkomponente feststellen. Diese sind auf verschiedenen Schnitten unterschiedlich stark ausgeprägt.

Für die Anwesenheit des roten Reaktionsproduktes gibt es laut Seidler (1991) zwei Erklärungen: Zum einen kann es sich bei dem roten Reaktionsprodukt um eine Verunreinigung des NBT durch ein bei der Synthese gebildetes Monotetrazoliumsalz handeln; es ist jedoch ebenso möglich, dass es sich um das Halbreduktionsprodukt des NBT handelt (Monoformazan, siehe Abb. 4.1.1). Selbstverständlich schließen sich die beiden Theorien nicht aus und könnten daher gemeinsam für die Rotfärbung verantwortlich sein. In der vorliegenden Arbeit stellte die Anwesenheit unterschiedlicher Farbtöne kein Problem dar, da die Betrachtung nur visuell erfolgte (keine photometrische Quantifizierung nach Extraktion des Farbstoffes mit organischen Lösungsmitteln).

Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass eine geringe Reduzierbarkeit des Di-Tetrazoliumsalzes sowie eine niedrige Enzymaktivität, die Bildung des roten Halbformazans begünstigen.

#### **4.1.4 Das Tiermodell Ratte**

##### **4.1.4.1 Unterschiede zum humanen Pyrimidin-Plasma-Spiegel**

Da in der vorliegenden Arbeit Rattengewebe untersucht wurde, sollen hier speziesbedingte Unterschiede zu dem humanen Blut-Pyrimidinspiegel diskutiert werden:

Pyrimidine kommen im Blut der Ratte hauptsächlich in Form von Cytidin [Traut, 1994], im Menschen vorwiegend in Form von Uridin vor [Wurtmann et al, 2000]. Eine Ursache ist laut Cansev (2006) die unterschiedliche Aktivität der Cytidin-Desaminase in Ratte bzw. Mensch. Die Cytidin-Desaminase, die Cytidin in Uridin umwandelt, ist demnach in Menschen wesentlich aktiver, was zu einem erhöhten Uridin-Spiegel führt. Verschiedene Untersuchungen betätigen diese Theorie: Eine orale Gabe von Cytidin in Form von CDP-Cholin erhöht den Plasma-Cytidin-Spiegel der Ratte (Lopez-Coviela et al, 1995). Dagegen bewirkt die Cytidingabe im Menschen im wesentlichen einen Anstieg des Uridin-Plasma-Spiegels. Dass der Nukleosid-Spiegel jedoch keine direkten Rückschlüsse auf den Nukleosid-Gehalt in der extrazellulären Flüssigkeit des Rattenhirns zulässt, hat folgende Ursache: Um in das Gehirn vorzudringen, müssen Nukleoside die Blut-Hirn-Schranke passieren, was über verschiedene Transporter geschieht. Deren Affinität zu Cytidin und Uridin ist jedoch nicht identisch. Für das Rattenhirn ist nachgewiesen, dass Uridin die Blut-

Hirn-Schranke wesentlich effektiver als Cytidin durchqueren kann [Cansev, 2006]. Daher scheinen Ergebnisse, die einen sieben Mal höheren Uridin- als Cytidingehalt der extrazellulären Flüssigkeit des Rattenhirns nachweisen [Dobolyi et al., 1998], trotz der niedrigeren Uridin-Blutplasmakonzentration, plausibel.

#### **4.1.4.2 Inhibition der Ratten- und der humanen DHODH durch A77-1726 bzw. Brequinar**

Die in Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 dargestellten histochemischen Ergebnisse zeigten, im Vergleich zu Brequinar, eine deutlich stärkere inhibitorische Wirkung von A77-1726 auf die Ratten-DHODH. Zur Erklärung dieser Ergebnisse ist die Kenntnis der unterschiedlichen Wirkungsintensität von A77 im menschlichen und im Rattenorganismus unerlässlich. Nach Untersuchungen von Löffler und Knecht [1998] haben Isoxazol-Derivate einen größeren inhibitorischen Einfluss auf die Ratten-DHODH ( $IC_{50} = 19 \text{ nM}$  für A77-1726), als auf die Menschen-DHODH ( $IC_{50} = 1,1 \text{ }\mu\text{M}$  für A77-1726). Dies ist insbesondere im Vergleich mit Brequinar von Bedeutung, dessen Wirkung auf die DHODH des Menschen und der Ratte die umgekehrte Tendenz zeigt.

Die hier beobachtete schwächere Inhibition der Ratten-DHODH durch Brequinar im Vergleich zu A77-1726 wird durch die Untersuchungen von Knecht et al. (2000) bestätigt: Die unterschiedlich starke Wirkung von Brequinar auf Ratten-DHODH- und menschliche DHODH-Aktivität wurde in umfangreichen kinetischen Untersuchungen von Knecht et al. (2000) analysiert. Da es sich bei Brequinar um einen slow-binding-Inhibitor der menschlichen DHODH handelt, wurden diese  $IC_{50}$ -Werte bei steady-state-Geschwindigkeiten bestimmt. Ein  $IC_{50}$  Wert von 10 nM bei der menschlichen DHODH steht einem  $IC_{50}$  Wert von 367 nM bei der Ratten-DHODH gegenüber. Brequinar wirkt also, im Gegensatz zu A77 1726, stärker inhibitorisch auf das menschliche als auf das Rattenenzym. Brequinar gilt als der potenteste Inhibitor der humanen DHODH, wohingegen Dichloroallyl-Lawsone als bislang stärkster Inhibitor des Rattenenzym ermittelt wurde. Dementsprechende Ergebnisse zeigte auch das enzymhistologische Bild der vorliegenden Arbeit.

## 4.2 Betrachtung der Ergebnisse

### 4.2.1 Interpretationsansätze

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass die Dihydroorotat-Dehydrogenase, also ein Enzym der *de novo* Pyrimidinsynthese, im Gehirn der Ratte vor allem in Neuronen lokalisiert ist. In Glia-Zellen ließ sich DHODH, mit Ausnahme der Ependymzellen, nicht eindeutig nachweisen.

Auf den ersten Blick scheint dieses Ergebnis überraschend: Die Anwesenheit der DHODH als viertes Enzym der *de novo* Pyrimidinsynthese ist Voraussetzung für die Bereitstellung der Pyrimidinbasen Uracil, Thymin und Cytosin sowie der entsprechenden Nukleosiden. Die drei Pyrimidinbasen sind elementare Bestandteile der DNA bzw. RNA. Aber gerade die DNA-Synthese scheint in Nervenzellen wenig „sinnvoll“, da sie nicht zur Zellteilung befähigt sind. Wie lässt sich also das Vorkommen der DHODH in Nervenzellen begründen? Die Antwort soll durch eine Darstellung verschiedener Funktionen der Pyrimidine im ZNS erfolgen.

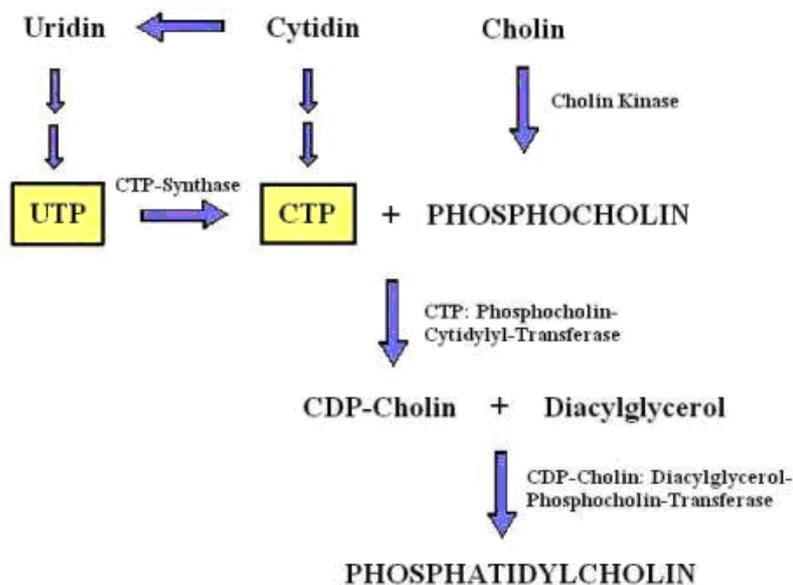
#### Schließt die Unmöglichkeit neuronaler Zellteilung neuronale DNA-Synthese aus?

Ausgewachsene Neuronen sind ausdifferenziert und teilen sich nicht. Eine neuronale DNA-Synthese ist demnach nicht notwendig und findet daher unter physiologischen Bedingungen auch nicht statt. Ein grundsätzlicher Ausschluss der DNA-Synthese in Neuronen ist dennoch falsch. Das zeigten neueste Ergebnisse von Höglinger et al., die 2007 den Pathomechanismus bei der Neurodegeneration durch Morbus-Parkinson untersuchten. Die Mechanismen, die zu einer Degeneration der dopaminergen Neurone der substantia nigra führen, sind nicht vollständig verstanden. Daher untersuchten Höglinger et al. Autopsie-Gewebe des menschlichen Gehirns von Patienten, die nachweislich an Morbus Parkinson erkrankt waren. Sie stellten eine DNA-Replikation innerhalb der nigralen dopaminergen Neuronen fest. Die stattgefunden DNA-Verdopplung wird als Ursache für die neuronale Apoptose gesehen. Für die DNA-Synthese ist die gesteigerte Expression von Mitose-assoziierten Proteinen in den erkrankten Neuronen verantwortlich. Während der beschriebenen pathologischen Vorgänge müssen also zusätzlich Pyrimidine für die DNA-Synthese vorhanden sein oder hergestellt werden. Für das Auffüllen des Pyrimidinnukleotidpools kommen gleichermaßen der salvage-pathway und die *de novo* Pyrimidinsynthese in Frage. Die letztere Annahme würde die Existenz der Dihydroorotat-Dehydrogenase voraussetzen. Die DHODH wurde in der vorliegenden Arbeit zweifelsfrei

im Zytoplasma der nigralen Neurone nachgewiesen. Dies lässt vermuten, dass die Neuronen der substantia nigra auch über die anderen Enzyme der Pyrimidinbiosynthese verfügen.

### Beteiligung von Cytidin und Uridin an der Phospholipid-Synthese

Außer Bestandteil von DNA und RNA zu sein, haben Pyrimidine weitere wichtige Funktionen im Stoffwechsel. Es wurde nachgewiesen, dass Cytidin und Uridin an der Phospholipid-Synthese für neuronale Membranen beteiligt sind: Die Biosynthese von Phosphatidylcholin (Lecithin), dem meist vertretenen Phosphatid des Gehirns, benötigt unter anderem Cytidin-Triphosphat und Phosphocholin. Innerhalb dieses Stoffwechselweges, der auch als Kennedy-Pathway bezeichnet wird (siehe Abb. 4.2.1), ist CTP an der Schrittmacherreaktion beteiligt [Kennedy und Weiss, 1956].



**Abb. 4.2.1 Phosphatidylcholin Biosynthese via Kennedy pathway.**

Im menschlichen Gehirn zirkulieren nur geringe Mengen an Cytidin, das zu Gehirn-CTP umgewandelt werden kann. Über UTP kommt es zu einer durch die CTP-Synthase katalysierten CTP-Bildung. Dieses CTP reagiert mit Phosphocholin um CDP-Cholin zu bilden, welches an Diacylglycerol gebunden Phosphatidylcholin ergibt; nach Cansev (2006)

Cansev (2006) vermutet, dass ein erhöhter CTP-Spiegel im Gehirn, der durch vermehrte exogene Zufuhr von Uridin oder Cytidin erreicht werden kann, zu einer erhöhten Membran-Phospholipid-Synthese führen könnte. Diese Annahme würde die Theorie eines im ZNS dominierenden salvage-pathways stützen. Allerdings ist festzuhalten, dass Neuronen eine Aufnahme von Stoffwechselprodukten direkt aus dem Blut nicht möglich ist, da sie selbst nicht mit der Blutbahn in Berührung kommen. Demnach sind sie entweder von Astrozyten

abhängig, die am Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen Neuronen und Blut beteiligt sind oder sie müssen die Bildung selbst bewerkstelligen. Da in der vorliegenden Arbeit die neuronale Lokalisation der DHODH gezeigt wurde, wird hieraus der Schluss gezogen, dass die Neuronen ihren Pyrimidinbedarf (in diesem Fall für Phospholipide) nicht über Astrozyten decken müssten und somit von einer Versorgung durch Astrozyten unabhängig wären.

### Die Glykogensynthese im Gehirn

Uridin ist in die Glykogensynthese des Gehirns involviert. Brown (2004) wies nach, dass der Stoffwechselweg der Glykogensynthese innerhalb des Gehirns stattfindet. Sowohl in Neuronen (Inoue et al., 1988) als auch in Astrozyten (Pellegrini et al., 1996), wurde die Expression der Glykogen-Synthase nachgewiesen. Die Glykogen-Synthase hat die Aufgabe, zuvor mittels UTP aktivierte Glukose (UDP-Glukose) auf die wachsende Glukan-Kette zu übertragen. In jedem Fall wird intrazellulär Uridin benötigt. Cornford und Oldendorf (1975) zeigten, dass Uridin die Ratten-Blut-Hirn-Schranke passieren kann und damit von Astrozyten für diesen wichtigen Zweck aufgenommen werden kann. Die hier dargestellte neuronale DHODH-Lokalisation erlaubt die Annahme, dass Neuronen unabhängig von Astrozyten das benötigte UTP selbst synthetisieren können.

### Uridin-Nukleotide als Neurotransmitter

Pyrimidin-Nukleotide können Einfluss auf das Gehirn haben, indem sie P2Y-Rezeptoren aktivieren. Diese G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, von denen mittlerweile acht Subtypen in Säugern nachgewiesen wurden, werden auf der Oberfläche von beinahe allen Zellen exprimiert [von Kügelgen, 2008]. Die den Rezeptor aktivierenden Nukleotide, werden als extrazelluläre Signalmoleküle von Neuronen durch vesikuläre Transmitterausschüttung freigesetzt [Burnstock, 1990, von Kügelgen, 1991]. Die Annahme, dass Pyrimidinderivate als Rezeptor-Liganden dienen, wurde durch Studien unterstützt, die eine Freisetzung von UDP, UTP und UDP-Glukose aus intrazellulären Speichern in ausreichenden Mengen nachwiesen, um eine Stimulation von P2Y-Rezeptoren im Gehirn zu erzielen [Lazarowski et al., 1997, 2003].

UTP wirkt vorwiegend an P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>4</sub>- und in geringem Maße an P2Y<sub>6</sub>-Rezeptoren. Hauptagonisten des letzteren Subtypes sind UDP und das unphysiologische 5-bromo-UDP. Der vierte pyrimidinsensitive Subtyp ist der P2Y<sub>14</sub>-Rezeptor, zu dessen Liganden UDP-Zucker gehören. Diese Erkenntnisse fasste von Kügelgen 2008 in einem Review zusammen.

Funktionell betrachtet, üben die Uracil-Nukleotide über die erwähnten Rezeptoren verschiedenste Effekte im Gehirn aus. Beispielsweise kann eine UTP-vermittelte P2Y-Stimulation Neuriten-Wachstum fördern [Pooler et al., 2005]; UTP hat in diesem Fall also einen neurotrophischen Effekt. Außerdem modulieren UDP und UTP die Noradrenalin-Freisetzung in zervikalen Ganglien der Ratte [Böhm et al., 1995], ein Effekt, der über den P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor vermittelt wird [Vartian et al., 2001]. Auch im Rahmen der Schmerzübertragung wirken UTP, UDP, CTP und CDP via P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren modulierend [Park et al., 2004].

Die beschriebenen Funktionen der Uracil-Nukleotide als Transmitter im Nervensystem, könnte eine weitere Notwendigkeit für eine eigene *de novo* Pyrimidinsynthese in Neuronen darstellen. Die neuronale Expression der DHODH erscheint von daher plausibel.

#### Der Einfluss von Orotsäure auf Neuronen

Die Dihydroorotat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Dihydroorotat zu Orotsäure bzw. Orotat. Somit steht eine zelluläre DHODH-Aktivität in direktem Zusammenhang mit der intrazellulären Orotsäureproduktion. In den späten neunziger Jahren wurde der Einfluss von Orotat auf den Stoffwechsel von Neuronen von verschiedenen Autoren untersucht. Hierbei zeigten sich protektive Effekte durch ein von exogen erhöhtes Orotatangebot während und nach Hypoxie-Zuständen.

Durch Ischämie (beispielsweise nach Trauma oder Schlaganfall) kommt es unter anderem zu einem Sauerstoffmangel, eine adäquate ATP-Produktion ist nicht mehr gewährleistet. Dies hat zur Folge, dass elektrochemische Ionengradienten nicht mehr aufrechterhalten werden können. Glutamat-Transporter benötigen jedoch gerade solche Ionengradienten für eine Glutamat-Clearance aus dem extrazellulären Raum. Daher kommt es zu einem Konzentrationsanstieg von Glutamat, welches nun als sogenanntes endogenes Exzitotoxin neurotoxisch auf postsynaptische Neurone wirkt [Olney, 1969]. Obwohl Barnes (1984) diese endogene Exzitotoxizität des Glutamats als den Hauptmechanismus für verzögerten neuronalen Tod nach vorübergehender Ischämie ansah, vermutet Akiho et al. (1998), dass die den Zelltod herbeiführenden Mechanismen ebenso mit Problemen der neuronalen Reparatur verbunden sind. Demnach gehört ein Mangel an Nukleotiden und Nukleinsäuren und dessen Folgen zu den Hauptursachen des verzögerten neuronalen Zelltodes [Akiho et al., 1998]. Nilson et al. zeigten bereits 1992, dass Orotat und Pyrimidin-Monophosphate die Überlebensrate und den hypoxischen Schaden an Hepatozyten während eines hypovolämischen Schocks vermindern konnten. Ähnliches vermuteten Akiho et al. bezüglich der Orotatwirkung im Gehirn. Sie gingen davon aus, dass Orotsäure einen

neuronalen Schaden nach Ischämie vermeiden kann, indem sie den Mangel an Nukleotiden kompensiert und die Phospholipidbiosynthese repariert. Tatsächlich konnten Akiho et al. (1998) nachweisen, dass eine exogene Orotsäureadministration bis zu 24 Stunden nach Eintritt der Ischämie vor neuronalem Schaden im CA1-Feld des Hippocampus schützen konnte. Daher sehen sie ein weites Therapiefeld für Orotatderivate, die das ZNS über die Blut-Hirn-Schranke möglichst effektiv mit Orotat versorgen können. Akiho et al. (1998) untersuchten zu diesem Zweck den Stoff YM-39558, welcher nach Passage der Blut-Hirn-Schranke zu Orotsäure hydrolysiert wird. Dessen Vorteil gegenüber der Gabe von Orotsäure besteht in der besseren Passage der Blut-Hirn-Schranke und der damit verbundenen effektiveren Orotatversorgung des Gehirns.

Die beschriebenen Ergebnisse könnten einen weiteren Hinweis auf eine möglicherweise neuronal stattfindende Pyrimidinsynthese darstellen. Dieser Aussage liegt folgende Überlegung zu Grunde: Ein akuter Sauerstoffmangel hemmt die Enzymaktivität der DHODH [Löffler, 1992]. Ebenso nimmt die intrazelluläre ATP-Konzentration mit anhaltendem Sauerstoffmangel ab. Folglich ist unter anderem die adäquate ATP-Bereitstellung für den ersten Reaktionsschritt der *de novo* Pyrimidinsynthese (katalysiert durch die Carbamoylphosphat-Synthetase) nicht mehr gewährleistet. Ein Andauern dieser hypoxischen Stoffwechselverhältnisse, hätte zwangsläufig die Erschöpfung des intrazellulären Pyrimidinpools zur Folge. Somit könnte die von Akiho (1998) beschriebene exogene Orotatadministration das vollständige Erliegen der neuronalen Pyrimidinsynthese abwenden. Geht man von einer Ausstattung der Neuronen mit den Enzymen der Pyrimidinsynthese aus, könnte das zugeführte Orotat intrazellulär durch die UMP-Synthase zu Uridinmonophosphat umgesetzt werden. Demnach würden die ersten vier Schritte der *de novo* Synthese „übersprungen“ und die UMP-Bereitstellung wäre in diesem Fall lediglich von der Aktivität der UMP-Synthase abhängig. Grundvoraussetzung für diesen Reaktionsschritt ist allerdings die ausreichende Verfügbarkeit von Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat.

Akiho et al. (1998) nahmen aufgrund ihrer Untersuchungen an, dass eine exogene Orotatadministration zu einem erhöhten Pyrimidinspiegel innerhalb der Nervenzellen führt. Demnach ist eine intraneuronale UMP-Synthese vom Ausgangsstoff Orotsäure durchaus denkbar.

#### Indirekter Nachweis der *de novo* Pyrimidinsynthese im ZNS der Ratte

Bourget und Tremblay untersuchten 1972 den Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]NaHCO<sub>3</sub> in RNA sowie in Orotsäure unter Verwendung von Gewebeschnitten des Rattenhirns und der Rattenleber.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um adulte Ratten, denen nach ihrer Tötung Leber und Gehirn entnommen wurde. Die zu untersuchenden Schnitte wurden bei 37°C, für eine Stunde in einer 4,67 mM  $[^{14}\text{C}]\text{NaHCO}_3$ -Lösung inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Menge des in RNA eingebauten,  $[^{14}\text{C}]$ -markierten Bikarbonats bestimmt. Die Versuchsanordnung zur Bestimmung des Einbaus in Orotsäure entsprach, abgesehen von einer Abweichung, der gerade beschriebenen: Diesem Ansatz wurde zusätzlich 10 mM 6-Azauridin, ein Inhibitor der Reaktion von Orotsäure zu UMP, hinzugefügt. So konnte die gebildete Orotsäure akkumuliert und bestimmt werden.

Bourget und Tremblay konnten auf diese Weise zeigen, dass im ZNS der adulten Ratte markiertes Bikarbonat in RNA eingebaut wird. Die Einbaumenge im Rattenhirn entsprach unter identischen Versuchsbedingungen circa  $\frac{1}{4}$  des im Lebergewebe eingebauten  $[^{14}\text{C}]$ -markierten Bikarbonats [Bourget und Tremblay, 1972]. Da die Leber in hohem Maße *de novo* Pyrimidinsynthese betreibt, ist die Einbauleistung des Nervengewebes erheblich.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch beim Einbau von  $[^{14}\text{C}]$ -markiertem Bikarbonat in Orotsäure-Moleküle beobachtet, wobei die Einbaurrate des Lebergewebes etwa doppelt so hoch war [Bourget und Tremblay, 1972].

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der *de novo* Pyrimidinsynthese des Nerven- und des Lebergewebes wurde von Bourget und Tremblay (1972) durch folgende Experimente aufgeklärt: Die Hinzugabe von Glutamin (10 mM) in die Inkubationslösung, führte im Nervengewebe zu einem vermehrten Einbau von  $[^{14}\text{C}]$ -Bikarbonat in RNA sowie in Orotsäure, während sich in der Leber keine signifikanten Veränderungen feststellen ließen. Weiterhin konnte durch 10 mM Azaserin (ein Inhibitor der Carbamoyl-Phosphat-Synthetase II) im Inkubationsansatz der Einbau in Orotsäure im Hirngewebe deutlich vermindert werden. Die Einbaurrate im Lebergewebe blieb dagegen konstant. Tremblay und Bourget (1972) folgerten daraus, dass im Gehirn der Ratte im Wesentlichen die Glutamin abhängige Carbamoylphosphat-Synthetase II an der *de novo* Pyrimidinsynthese beteiligt ist. Dagegen sei in der Leber die Carbamoylphosphat-Synthetase I aktiv. Diese Annahme erwies sich später als nicht vollständig korrekt, da auch in der Leber die CPS II - wenn auch 500-1000fach geringer als die CPS I [Monks et al., 1985] - aktiv ist.

Schlussendlich müssen die Ergebnisse von Tremblay und Bourget (1972) als erster Nachweis der *de novo* Pyrimidinsynthese im Hirngewebe der adulten Ratte betrachtet werden. Die Verwendung der neusynthetisierten Pyrimidine als Baustoffe der RNA, deutet auf eine mögliche Rolle der DHODH im Rahmen der Proteinsynthese des ZNS hin. Die Lokalisation einer Neusynthese von Pyrimidinen auf zellulärer Ebene ließ sich mittels der beschriebenen Verfahren allerdings nicht bestimmen.

#### 4.2.2 Kritische Beurteilung

Um die Befunde der vorliegenden Arbeit kritisch zu diskutieren, sollen hier die Ergebnisse anderer Autoren vorgestellt und besprochen werden, die eine neuronale DHODH-Lokalisation zunächst nicht unterstützen.

##### Die astrozytäre Lokalisation der CAD

Cammer und Downing beschrieben 1991 eine astrozytäre Lokalisation des Multienzymkomplexes CAD in Astrozyten des Nagerhirns. CAD setzt sich aus der Carbamoyl-Phosphat-Synthetase II, der Aspartat-Transcarbamylase und der Dihydroorotase zusammen und katalysiert im Rahmen der *de novo* Pyrimidinsynthese die ersten drei enzymatischen Reaktionen bis zur Herstellung des Dihydroorotates. Der folgende vierte Schritt wird von der Dihydroorotat-Dehydrogenase katalysiert. Aus dem funktionellen Zusammenhang beider Enzyme ergibt sich ein kritischer Vergleich zwischen den Untersuchungsergebnissen der vorliegenden Arbeit und den von Cammer und Downing veröffentlichten Resultaten.

Da beide Enzyme Bestandteil desselben Stoffwechselweges sind, erscheint ein gemeinsames Vorkommen innerhalb einer Zellform wahrscheinlich. Wenn CAD nur in Astrozyten und die DHODH vorwiegend in Neuronen lokalisiert wäre, könnte keiner der beiden Zelltypen eine vollständige *de novo* Pyrimidinsynthese aus entsprechenden Ausgangsstoffen realisieren.

Resultat einer solchen Überlegung wäre eine Dihydroorotatproduktion in Astrozyten. Das entstandene Dihydroorotat müsste nach einer solchen Theorie eine Funktion innerhalb der Astrozyten einnehmen, die nicht auf die *de novo* Pyrimidinsynthese zurückzuführen ist oder aber in Neurone gelangen, in denen die Synthese vollendet würde. Weder für die eine noch die andere Theorie wurden stützende Anhaltspunkte in anderen Veröffentlichungen gefunden. Die Literatursuche ergab zudem kein neueres Ergebnis, dass die astrozytäre Lokalisation des Multienzyms CAD verifiziert. In Zukunft wäre ein erneuter CAD-Nachweis zur eindeutigen Lokalisation im ZNS, mittels neuer Antikörper oder einem zweiten Verfahren (z.B: in-situ Hybridisierung), wünschenswert. Bisherige Ergebnisse könnten so überprüft und die Kenntnisse zur Pyrimidinbiosynthese erweitert werden. In Kombination mit Nachweisen der Orotat-Phosphoribosyl-Transferase und der Orotidinmonophosphat-Decarboxylase sowie der Uridin- und Cytidinkinasen im Nervengewebe könnte das Bild des Pyrimidinstoffwechsels im Nervensystem komplettiert werden.

### Hauptrolle des salvage-pathways im Nervensystem

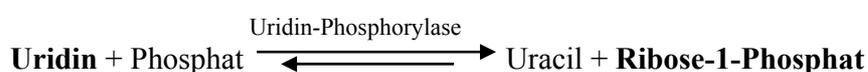
Insbesondere Reynold Spector befasste sich in den achtziger Jahren intensiv mit dem Pyrimidin(nukleotid)transport und -stoffwechsel im Gehirn. Er zeigte, dass Thymidin, Desoxycytidin und Desoxyuridin aus dem Blut über den Plexus choroideus in den Liquor cerebrospinalis und von hier aus ins Nervengewebe gelangen. Spector vermutete, dass der Hauptbedarf des Gehirns an Uridin durch über die Blutbahn zugeführtes Uridin gedeckt wird und nannte drei Gründe für diese Hypothese: Zunächst sind laut Spector die Konzentrationen der Enzyme der *de novo* Pyrimidinsynthese im ausgewachsenen Gehirn sehr gering. Zweitens nutzt das adulte Gehirn Uridin, nicht aber Orotsäure für den Aufbau von Uridinmonophosphat. Drittens benötigt ein isoliertes Gehirn Uridin in der Perfusionslösung, um seine Funktion aufrecht zu erhalten [Hogans et al., 1971, Tremblay et al., 1976, MacDonnell et al., 1980].

Das erste Argument ist insofern zu entkräften, als das in der vorliegenden Arbeit die Aktivität der DHODH im ZNS der Ratte mit einer verlässlichen Methode (NBT) nachgewiesen wurde. Die Existenz dieses Enzyms der *de novo* Pyrimidinsynthese wurde zusätzlich durch einen Antikörpernachweis sowie durch SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bestätigt. Grundsätzlich widersprechen sich diese Aussagen von Spector und die der vorliegenden Arbeit nicht, da Spector nicht die grundsätzliche Existenz der Enzyme der *de novo* Pyrimidinsynthese anzweifelt. Er bezieht sich bei seiner Aussage nicht auf seine eigenen Untersuchungen, sondern auf die Veröffentlichungen von Hogans et al. (1971). Sie wiesen mithilfe von Einbauexperimenten in RNA eine bevorzugte Verwendung von Uridin gegenüber der Orotsäure im ZNS-Gewebe der Ratte nach (siehe unten). Hieraus folgerten die Autoren das Vorherrschen des salvage-pathways im Gehirn der Ratte. Da die Enzyme der *de novo* Pyrimidinsynthese nicht direkt untersucht wurden, ist die Aussage von Spector bezüglich der Enzymkonzentration nicht zulässig.

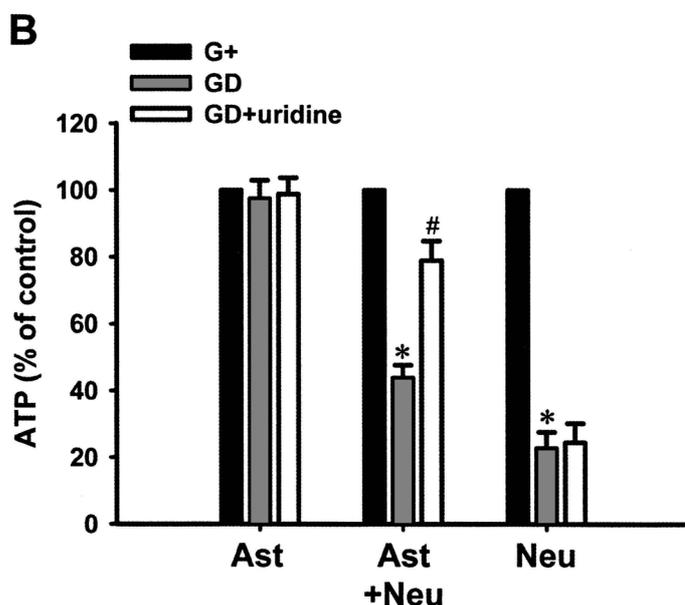
Die Nicht-Verwendung der Orotsäure für die UMP-Herstellung durch das adulte Gehirn kann durch die Erkenntnisse dieser Arbeit nicht direkt überprüft werden. Es kann nur mit Sicherheit festgestellt werden, dass im ZNS-Gewebe der Ratte Dihydroorotat zu Orotsäure umgesetzt wurde. Spector bezieht sich bei dieser Aussage vor allem auf Hogans et al., die 1971 die Herkunft der Pyrimidine für die RNA-Biosynthese im Gehirn untersuchten. Sie führten unter anderem in vitro-Studien am Tiermodell Ratte durch. Hierfür verwendeten sie Leber-, Nieren- und Gehirnschnitte, die in einer Inkubationslösung mit radioaktiv markiertem Uridin oder radioaktiv markierter Orotsäure für 60 Minuten inkubiert wurden. Anschließend wurde die RNA aus dem entsprechenden Gewebe isoliert und die Radioaktivität pro Gramm Gewebe als Faktor für den erfolgten Einbau der markierten

Pyrimidinvorläufer bestimmt. Es stellte sich heraus, dass das markierte Uridin im adulten Hirngewebe der Ratte in höherem Maße in die RNA eingebaut wurde, als die radioaktive Orotsäure. Dass diese Ergebnisse mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit in keinerlei Widerspruch stehen, wird durch folgende Überlegungen deutlich: Hogans et al. (1971) zeigten zwar indirekt, dass der salvage-pathway im Gehirn der Ratte dominiert. Ebenso wiesen sie jedoch, wenn auch in geringerem Ausmaß, das Stattfinden der *de novo* Pyrimidinsynthese von dem Ausgangsstoff Orotsäure indirekt nach. Die Versuchsanordnung von Hogans et al. (1971) erlaubte hierbei keinerlei Aussage über die zelluläre Lokalisation der untersuchten Stoffwechselwege innerhalb des Nervengewebes (neuronal oder glial), sondern betrachtete die gesamte Gewebemasse als Einheit. Im Großhirnkortex wiesen Hogans et al. (1971) eine im Vergleich zu Orotsäure ca. 6-8fach, im Cerebellum eine ca. 7-14fach höhere Uridin-Radioaktivität pro Gramm Gewebe nach. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass der salvage-pathway (ausgehend von Uridin) die Neusynthese von Pyrimidinen (ausgehend von Orotsäure) in etwa um die genannten Faktoren „übersteigt“. Welsch (2003) gibt an, dass das ungefähre Verhältnis von Neuronen zu Gliazellen im menschlichen Hirn 1:10 beträgt. Wenn man die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene neuronale Lokalisation der DHODH berücksichtigt und eine neuronal stattfindende Pyrimidin-Neusynthese annimmt, könnte das Mengenverhältnis von Neuronen zu Gliazellen ein Grund für das von Hogans et al. beschriebene Überwiegen des salvage-pathways im Gehirn erklären. Der neuronale DHODH-Nachweis scheint daher plausibel und anderen Befunden nicht widersprechend. Ein weiteres Argument für die im Gehirn stattfindende *de novo* Pyrimidinsynthese stellt die Veröffentlichungen von Akiho et al. (1998) dar. Sie vermuten, dass exogen zugeführte Orotsäure zu einer Erhöhung des Pyrimidingehaltes im Hirn führt. Orotsäure würde demnach für den Pyrimidinaufbau im ZNS verwendet, was die Anwesenheit der UMP-Synthase, als katalysierendes Enzym der letzten beiden Reaktionsschritte der Pyrimidin-Neusynthese, voraussetzt.

Dass Uridin als Bestandteil der Perfusionslösung für den Funktionserhalt eines isolierten Gehirns entscheidend ist, könnte zum einen auf die wichtige Rolle des salvage-pathways für Teile des Nervengewebes hindeuten. Andererseits kann Uridin eine entscheidende Funktion als alternative Energiequelle für das Nervengewebe einnehmen. Hierfür kommt die Ribose des Uridins in betracht, die durch das Enzym Uridin-Phosphorylase aus Uridin freigesetzt wird:



Choi et al. (2006) wiesen im Hirngewebe der Ratte nach, dass Uridin einen Ischämie bedingten Tod von Astrozyten durch den Aufrechterhalt des zellulären ATP-Spiegels verhindert. 2008 untersuchten sie, ob Uridin eine entsprechende Wirkung auf Neuronen besitzt. Hierzu wurden unter anderem Kulturen von Neuronen, Astrozyten sowie Mischkulturen von Neuronen und Astrozyten angelegt. Jeder Kultur wurde in An- und Abwesenheit von Uridin (50  $\mu$ M) für 2 Stunden Glukose entzogen. Nach der erneuten Hinzugabe von Glukose wurden die Zellen bis zu 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt der einzelnen Kulturen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2.2 dargestellt.



**Abb. 4.2.2 Inkubation von drei verschiedenen Kultursystemen** (Ast: reine Astrozytenkultur, Ast + Neu: Mischkultur von Astrozyten und Neuronen, Neu: reine Neuronenkultur) bei ausreichender Glukoseversorgung (G+: Kontrolle) sowie bei Glukoseentzug in An- (GD+uridine) und Abwesenheit (GD) von Uridin; Choi et al. (2008).

In reinen Neuronenkulturen führte eine Inkubation mit Uridin (GD + Uridin) im Vergleich zu einer Uridin-freien Inkubation (GD) zu einem nur geringfügig erhöhtem ATP-Spiegel. Der ATP-Spiegel sank in beiden Fällen auf ca. 30 % der Kontrollinkubation (G+). Dagegen stellte sich der neuroprotektive Effekt von Uridin in der Mischkultur von Astrozyten und Neuronen wesentlich deutlicher dar. Choi et al. (2008) folgerten hieraus, dass Uridin einen protektiven Effekt auf Neuronen besitzt. Dieser ist allerdings stark von der Anwesenheit der Astrozyten abhängig [Choi et al., 2008]. Ob diese eine hohe Aktivität der Uridinphosphorylase besitzen und das entstehende Ribose-1-Phosphat effizient in die Glykolyse zwecks Laktatbildung (siehe Seite 101) einschleusen können, ist nicht bekannt. Vor diesem Hintergrund ließe sich zumindestens vermuten, dass Neuronen in der

Aufnahme und Verwendung von Uridin limitierter sind. Dies könnte einen weiteren Grund für eine intraneuronale *de novo* Pyrimidinsynthese darstellen.

Schlussendlich muss festgehalten werden, dass die von Spector erwähnte vitalerhaltende Rolle des Uridins in der Perfusionslösung eines isolierten Gehirns, nicht allein auf den Aufrechterhalt des salvage-pathways von Pyrimidinen zurückzuführen ist. Der Ablauf der *de novo* Pyrimidinsynthese und die Anwesenheit der katalysierenden Enzyme im Nervengewebe werden daher grundsätzlich nicht in Frage gestellt.

#### **4.2.3 Darstellung der Stoffwechsellösungen von Neuronen und Astrozyten unter Berücksichtigung des Pyrimidinstoffwechsels**

Die Abbildung 4.2.3 stellt Teile der Stoffwechsellösungen von Astrozyten und Neuronen dar. Außerdem werden Austauschvorgänge zwischen diesen Zelltypen beschrieben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und deren Interpretation wurden mit einigen bereits nachgewiesenen Stoffwechselwegen von Hirnzellen in Verbindung gebracht.

Die Versorgung mit Sauerstoff und Glukose ist sowohl bei Astrozyten als auch bei Neuronen durch Aufnahme aus dem Blut gewährleistet. Neuronen beziehen außerdem Tryptophan sowie Phenylalanin als wichtige Vorstufen von Melatonin bzw. Dopamin über den Blutweg (vergleiche Abbildung 4.2.3).

Ein Beispiel für den Stoffaustausch zwischen Astrozyten und Neuronen stellt der Glutamat-Glutamin Zyklus (5) dar. Glutamat wird von Neuronen freigesetzt und von Astrozyten aufgenommen. Anschließend können die Astrozyten aus Glutamat gebildetes Glutamin in den synaptischen Spalt entlassen, wo es erneut von Neuronen aufgenommen wird. Nervenzellen selbst verfügen nicht über das Enzym Glutamin-Synthetase [Hertz et al., 1999] und können daher nicht eigenständig Glutamat in Glutamin umwandeln. Innerhalb der Neuronen könnte das aufgenommene Glutamin auch zur Synthese von Carbamoylphosphat, dem Ausgangsstoff der *de novo* Pyrimidinsynthese, herangezogen werden (6). Des Weiteren kann Glutamat intraneuronal durch Decarboxylierung in den Transmitter GABA umgewandelt (8) und in dieser Form an Astrozyten abgegeben werden (9) [Cakir et al., 2007]. Nach Waagepetersen et al. (2003) wird GABA innerhalb der Gliazellen irreversibel in Succinat und Glutamat umgewandelt (in Abbildung 4.2.3 nicht dargestellt).

Auch Glutathion nimmt eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel des Nervensystems ein. Reduziertes Glutathion wird durch Oxidation für die Eliminierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen wie  $H_2O_2$  benötigt (13). Es wird aus Glycin, Glutamat und Cystein gebildet (12), dessen Vorstufe Cystin ausschließlich von Astrozyten aus dem Blut



Ein weiteres, mögliches Beispiel für die Einbindung der *de novo* Pyrimidinsynthese in den Stoffwechsel der Nervenzellen, ist die Verwendung von Aspartat. Aspartat wird sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten gebildet und zwischen den Zellen ausgetauscht (11) [Cakir et al., 2007]. Intraneuronal vorhandenes Aspartat könnte im 2. Schritt der *de novo* Pyrimidinsynthese zur Bildung von N-Carbamoylaspartat herangezogen werden (10).

Ebenso kann Laktat von Astrozyten in den synaptischen Spalt entlassen und von hier aus von Neuronen aufgenommen werden (7). Die Neuronen könnten somit unter Sauerstoffmangel ihren Citratzyklus aufrecht erhalten. In welchem Ausmaß dieser Laktataustausch stattfindet, ist allerdings entscheidend von den energetischen Stoffwechselbedingungen abhängig [Cakir et al., 2007].

Histochemische und immunhistochemische Untersuchungen ergaben keinen deutlichen Hinweis auf die Existenz bzw. die Aktivität der DHODH in Astrozyten. Daher wurde die *de-novo* Pyrimidinsynthese, deren vierter Schritt (1) von der Dihydroorotat-Dehydrogenase katalysiert wird, lediglich in der Nervenzelle der Abbildung 4.2.3 dargestellt. Dies entspricht den in Kapitel 3 beschriebenen histochemischen sowie immunhistochemischen Ergebnissen. Mögliche Erklärungen für eine neuronale Aktivität der DHODH und die damit verbundene Synthese von Pyrimidinen könnten deren Funktion als Transmitter (4) sowie deren Verwendung für die Glykogensynthese (2), den Kennedy-Pathway (3) oder die Proteinsynthese via mRNA (14) darstellen (vergleiche Kapitel 4.2.1).

## 5. Zusammenfassung

Die mitochondrienständige Dihydroorotat-Dehydrogenase katalysiert als viertes Enzym der *de novo* Pyrimidinsynthese die Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat. Damit ist die DHODH entscheidend an der Bereitstellung von Uridinmonophosphat (UMP), sowie von Thymidin- und Cytidinnukleotiden, beteiligt. Diese nehmen als Bausteine der RNA bzw. der DNA eine zentrale Rolle im Zellstoffwechsel ein.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals eine umfassende Darstellung der DHODH im zentralen Nervensystem der Ratte. Diese Untersuchungen gaben Aufschluss über die Lokalisation sowie die Aktivität des Enzyms in verschiedenen Bereichen des Gehirns.

Der Nachweis der DHODH erfolgte zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen und anschließenden Western Blots. Hierzu wurden vorab die Antikörpertiter für diesen Nachweis experimentell optimiert. Anschließend wurde eine Proteingewinnung und -bestimmung nach Bradford im ZNS-Gewebe durchgeführt. Die folgenden SDS-PAGE und Western Blots wiesen die DHODH in allen resezierten Geweben nach: Demnach wurde das Vorkommen der DHODH in folgenden Hirnregionen gezeigt: Kortex, Striatum, Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, Colliculi superiores, Hypophyse, Kleinhirn, Rückenmark, Hirnstamm und Colliculi inferiores. Eine relativ schwache DHODH-Bande zeigte sich im Western Blot lediglich in Extrakten aus Hirnstamm und Colliculi inferiores.

Der Nachweis der Enzymaktivität der DHODH (Umsetzung von Dihydroorotat zu Orotat) im Rattenhirn gelang mittels Nitroblue-Tetrazolium-Reaktion. Hohe Aktivitäten zeigten sich insbesondere in nervenzellreichen Gebieten des Gehirns sowie in der grauen Substanz des Rückenmarkes und den Zellen der Plexus choroidei. Somit wurde die Enzymaktivität der DHODH im ZNS bewiesen, ein Befund, der für den Ablauf der *de novo* Pyrimidinbiosynthese im ZNS spricht.

Unter Anwendung derselben Methodik wurde die Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die DHODH im Rattenhirn untersucht. Als besonders potente Inhibitoren der DHODH zeigten sich bereits etablierte Hemmstoffe wie DCL, A77 1726, Atovaquone und Redoxal. Eine Hemmung der Ratten-DHODH durch Brequinar konnte, wenn auch in geringerem Maße, ebenso nachgewiesen werden. Außerdem wurde die inhibitorische Wirkung des bislang kaum untersuchten Stoffes UID1 dargelegt. Dieser erreichte neben einer Inhibition der DHODH-Aktivität, auch eine Hemmung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität im Gehirn der Ratte.

Abschließend wurde die Lokalisation der DHODH auf zellulärer Ebene mit Hilfe immunhistochemischer Methoden (ABC-Methode mit anschließendem DAB/Nickel-

Nachweis) in ausgewählten Bereichen des Rattenhirns präzisiert. Eindrücke des Aktivitätstests, nach denen die DHODH vor allem neuronal lokalisiert schien, wurden durch den Nachweis unter Anwendung eines affinitätsgereinigten Antikörpers bestätigt.

Die Dihydroorotat-Dehydrogenase ist demnach im ZNS der adulten Ratte aktiv und (mit Ausnahme der Ependym- und Plexus choroideus-Epithelzellen) vorwiegend neuronal lokalisiert. UMP, das Produkt der *de novo* Pyrimidinsynthese, kann, nach weiterer Umwandlung, an RNA-Synthese, Kennedy-Pathway, Glykogensynthese oder Transmitterbildung beteiligt sein. Eine Rolle für die *de novo* Pyrimidinsynthese im Hirn der Ratte ist somit denkbar.

## 6. Literatur

**Akiho H, Iwai A, Katoh-Sudoh M, Tsukamoto S, Koshiya K, Yamaguchi T (1998)**

Neuroprotective effect of YM-39558, orotic acid ethylester, in gerbil forebrain ischemia.

Jpn J Pharmacol. 76, 441-4

**Altman FP (1976)**

Tetrazolium salts and formazans.

Prog Histochem Cytochem. 9, 91-56

**Angermüller S (1989)**

Peroxisomal oxidases: cytochemical localization and biological relevance.

Prog Histochem Cytochem. 20, 1-65

**Angermüller S, Löffler M (1995)**

Localization of dihydroorotate oxidase in myocardium and kidney cortex of the rat.

An electron microscopic study using the cerium technique.

Histochem Cell Biol. 103, 287-92

**Bader B, Knecht W, Fries M, Löffler M (1998)**

Expression, purification, and characterization of histidine-tagged rat and human flavoenzyme dihydroorotate dehydrogenase.

Protein Expr Purif. 13, 414-22

**Baldwin J, Farajallah AM, Malmquist NA, Rathod PK, Phillips MA. (2002)**

Malarial dihydroorotate dehydrogenase. Substrate and inhibitor specificity.

J Biol Chem. 277, 41827-34

**Barnes DM (1984)**

NMDA receptors trigger excitement.

Science 239, 254-256

**Becker-Hintermeier C (2004)**

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

Dissertation, Philipps-Universität Marburg

**Böhm M, Castellano M, Agabiti-Rosei E, Flesch M, Paul M, Erdmann E (1995)**

Dose-dependent dissociation of ACE-inhibitor effects on blood pressure, cardiac hypertrophy, and beta-adrenergic signal transduction.

Circulation. 92, 3006-13

**Bourget PA, Tremblay C (1972)**

Pyrimidine biosynthesis in bat brain

Journal of Neurochemistry 19, 1617-1624

**Bourne S, Pemberton L, Moseley R, Lashford LS, Coakham HB, Kemshead JT (1989)**

Monoclonal antibodies M340 and UJ181.4 recognize antigens associated with primitive neuroectodermal tumours/tissues.

Hybridoma. 8, 415-2

**Burnstock G (1990)**

The fifth Heymans memorial lecture-Ghent.

Arch Int Pharmacodyn Ther 304, 7-33

**Brown AM (2004)**

Brain glycogen re-awakened.

J. Neurochem. 89, 537-552

**Cakir T, Alsan S, Saybasili H, Akin A, Ülgen KÖ (2007)**

Reconstruction and flux analysis of coupling between metabolic pathways of astrocytes and neurons: application to cerebral hypoxia.

Theoretical Biology and Medical Modelling 4, 1742-4682

**Cammer W, Downing M (1991)**

Localization of the multifunctional protein CAD in astrocytes of rodent brain.

J Histochem Cytochem. 39, 695-700

**Cansev M (2006)**

Uridine and cytidine in the brain: Their transport and utilization.  
Brain Res Rev. 52, 389-397

**Chen JJ, Jones ME (1976)**

The cellular location of dihydroorotate dehydrogenase: relation to de novo biosynthesis of pyrimidines.  
Arch Biochem Biophys. 176, 82-90

**Choi JW, Shin CY, Choi MS, Yoon SY, Ryu JH, Lee JC, Kim WK, El Kouni MH, Ko KH (2008)**

Uridine protects cortical neurons from glucose deprivation-induced death: possible role of uridine phosphorylase.  
J Neurotrauma. 25, 695-707

**Choi JW, Yoo BK, Shin CY, Ryu MK, Ryu JH, el Kouni MH, Lee JC, Kim WK, Ko KH (2006)**

Uridine prevents the glucose deprivation-induced death of immunostimulated astrocytes via the action of uridine phosphorylase.  
Neurosci Res. 56, 111-8

**Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA (2005)**

Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis.  
Cell. 120, 421-33

**Cleaveland ES, Monks A, Vaigro-Wolff A, Zaharevitz DW, Paull K, Ardalan K, Cooney DA, Ford H Jr (1995)**

Site of action of two novel pyrimidine biosynthesis inhibitors accurately predicted by the compare program.  
Biochem Pharmacol. 49, 947-54

**Copeland RA, Marcinkeviciene J, Haque TS, Kopcho LM, Jiang W, Wang K, Ecret LD, Sizemore C, Amsler KA, Foster L, Tadesse S, Combs AP, Stern AM, Trainor GL, Slee A, Rogers MJ, Hobbs F. (2000)**

Helicobacter pylori-selective antibacterials based on inhibition of pyrimidine biosynthesis.

J Biol Chem. 275, 33373-8

**Cornford EM, Oldendorf WH (1975)**

Independent blood-brain barrier transport systems for nucleic acid precursors.

Biochim. Biophys. Acta 394, 211-219

**Cramer DV (1996)**

Brequinar sodium.

Transplant Proc. 28, 960-3

**Dexter DL, Hesson DP, Ardecky RJ, Rao GV, Tippett DL, Dusak BA, Paull KD, Plowman J, DeLarco BM, Narayanan VL (1985)**

Activity of a novel 4-quinolinecarboxylic acid, NSC 368390 [6-fluoro-2-(2'-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)-3-methyl-4-quinolinecarb oxylic acid sodium salt], against experimental tumors.

Cancer Res. 45, 5563-8

**Dobolyi A, Reichart A, Szikra T, Szilagyi N, Kekesi AK, Karancsi T, Slegel P, Palkovits M, Juhasz G (1998)**

Analysis of purine and pyrimidine bases, nucleosides and deoxynucleosides in brain microsamples (microdialysates and micropunches) and cerebrospinal fluid.

Neurochem. Int. 32, 247-256

**Elmariah SB, Oh EJ, Hughes EG, Balice-Gordon RJ (2005)**

Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABAA receptors.

J Neurosci. 25, 3638-50

**Fleming RA, Capizzi RL, Muss HB, Smith S, Fernandes DJ, Homesley H, Loggie BW, Case L, Morris R, Russell GB, Richards F (1996)**

Phase I study of N-(phosphonacetyl)-L-aspartate with fluorouracil and with or without dipyridamole in patients with advanced cancer.  
Clin Cancer Res. 2, 1107-14

**Gojković Z, Knecht W, Zameitat E, Warneboldt J, Coutelis JB, Pynyaha Y, Neueglise C, Møller K, Löffler M, Piskur J. (2004)**

Horizontal gene transfer promoted evolution of the ability to propagate under anaerobic conditions in yeasts.  
Mol Genet Genomics. 271(4), 387-93

**Grein KO (1998)**

Gewinnung von Antikörpern aus Huhn und Kaninchen gegen die Dihydroorotat-Dehydrogenase des Menschen.  
Dissertation, Philipps-Universität Marburg

**Greuter S, Jörger M, Köberle D (2007)**

Adjuvante Therapie des Kolonkarzinoms.  
Onkologie 3/2007

**Hama H, Hara C, Yamaguchi K, Miyawaki A (2004)**

PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes.  
Neuron. 41, 405-15

**Hansen M, Le Nours J, Johansson E, Antal T, Ullrich A, Löffler M, Larsen S (2004)**

Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain.  
Protein Sci. 13, 1031-42

**Heikkilä, Davies M, Parsons MR, Johnson AP (2004)**

Structure-based design of inhibitors of class 2 dihydroorotate dehydrogenases.  
University of Leeds

**Heimer I (1995)**

The Human Brain and Spinal Cord: Functional Neuroanatomy and Dissection Guide.

Springer - Verlag

**Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR (1999)**

Astrocytes: glutamate producers for neurons.

J Neurosci Res 57, 417-428

**Höglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, Rouaux C, Michel PP, Alvarez-Fischer D, Boutilier AL, Degregori J, Oertel WH, Rakic P, Hirsch EC, Hunot S (2007)**

The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease.

Proc Natl Acad Sci USA. 104, 3585-90

**Hogans AF, Guroff G, Udenfriend S (1971)**

Studies on the origin of pyrimidines for bioynthesis of neural RNA in the rat.

J. Neurochem. 18, 1699-1710

**Hurt DE, Widom J, Clardy J (2006)**

Structure of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase with a bound inhibitor.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 62, 312-23

**Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Kageyama R (2009)**

Continuous neurogenesis in the adult brain.

Develop. Growth Differ. 51, 379-386

**Inoue N, Matsukado Y, Goto S, Myomoto E (1988)**

Localization of glycogen synthase in brain.

J. Neurochem. 50, 400-405

**Kemp JM, Powell TP (1971)**

The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 262, 383-401

**Knecht W, Henseling J, Löffler M (2000)**

Kinetics of inhibition of human and rat dihydroorotate dehydrogenase by atovaquone, lawsone derivatives, brequinar sodium and polyporic acid.  
Chem Biol Interact. 124, 61-76

**Knecht W, Löffler M (1998)**

Species-related inhibition of human and rat dihydroorotate dehydrogenase by immuno-suppressive isoxazol and cinchoninic acid derivatives.  
Biochem Pharmacol. 56, 1259-64

**Kennedy EM, Weiss SB (1956)**

The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids.  
J. Biol. Chem. 222, 193-214

**Korn T, Toyka K, Hartung HP, Jung S (2001)**

Suppression of experimental autoimmune neuritis by leflunomide.  
Brain. 124, 1791-802

**Lazarowski ER, Boucher RC (2001)**

UTP as an extracellular signaling molecule.  
News Physiol Sci. 16, 1-5

**Lazarowski ER, Paradiso AM, Watt WC, Harden TK, Boucher RC (1997)**

UDP activates a mucosal-restricted receptor on human nasal epithelial cells that is distinct from the P2Y2 receptor.  
Proc Natl Acad Sci USA. 94, 2599-603

**Lazarowski ER, Rochelle LG, O'Neal WK, Ribeiro CM, Grubb BR, Zhang V, Harden TK, Boucher RC (2001)**

Cloning and functional characterization of two murine uridine nucleotide receptors reveal a potential target for correcting ion transport deficiency in cystic fibrosis gallbladder.  
J Pharmacol Exp Ther. 297, 43-9

**Le Grand E, Denar M, Volney B, Ekala MT, Quinternet M, Bouchier C, Fandeur T, Rogier C, Carme B, Mercereau Puijalon O, Esterre P (2007)**

The First Case of Emergence of Atovaquone Resistance in Plasmodium falciparum during Second-Line Atovaquone-Proguanil Treatment in South America.  
Antimicrobiel agents and chemotherapy, 6/2007, 2280-2281

**Liu S, Neidhardt EA, Grossman TH, Ocain T, Clardy J (2007)**

Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents.  
Structure. 15, 25-33

**Löffler M (1992)**

The "anti-pyrimidine effect" of hypoxia and brequinar sodium (NSC 368390) is of consequence for tumor cell growth.  
Biochem Pharmacol. 43, 2281-7

**Löffler M (1980)**

On the role of dihydroorotate dehydrogenase in growth cessation of Ehrlich ascites tumor cells cultured under oxygen deficiency.  
Eur J Biochem. 107, 207-15

**Löffler M, Grein K, Knecht W, Klein A, Bergjohann U (1998)**

Dihydroorotate dehydrogenase. Profile of a novel target for antiproliferative and immunosuppressive drugs.  
Adv Exp Med Biol. 431, 507-13

**Löffler M, Becker C, Wegerle E, Schuster W (1996)**

Catalytic enzyme histochemistry and biochemical analysis of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase and succinate dehydrogenase in mammalian tissues, cells and mitochondria.  
Histochem Cell Biol. 105, 119-28

**Löffler M, Fairbanks LD, Zameitat E, Marinaki AM, Simmonds HA (2005)**

Pyrimidine pathways in health and disease  
Trends Mol Med. 11, 430-7

**Löffler M, Klein A, Hayek-Ouassini M, Knecht W, Konrad L (2004)**

Dihydroorotate dehydrogenase mRNA and protein expression analysis in normal and drug-resistant cells.

Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 23, 1281-5

**Lopez-Coviella I, Agut J, Savci V, Ortiz JA, Wurtman RJ (1995)**

Evidence that 5'-Cytidinediphosphocholine can affect brain phospholipid composition by increasing choline and cytidine plasma levels.

J. Neurochem. 65, 889-894

**MacDonnell P, Huff K, Grouse L, Guroff G (1980)**

Brain nucleic acids, in Biochemistry of Brain.

Pergamon Press

**McKelvey EM, Lomedico M, Lu K, Chadwick M, Loo TL (1979)**

Dichloroallyl lawsone.

Clin Pharmacol Ther. 25, 86-90

**Miller RW, Kerr CT, Curry JR (1968)**

Mammalian dehydroorotate-ubiquinone reductase complex.

Can J Biochem. 46, 1099-1106

**Monks A, Chisena CA, Cysyk RL (1985)**

Influence of ammonium ions on hepatic de novo pyrimidine biosynthesis.

Arch Biochem Biophys. 236, 1-10

**Nagy M, Lacroute F, Thomas D (1992)**

Divergent evolution of pyrimidine biosynthesis between anaerobic and aerobic yeasts.

Proc Natl Acad Sci USA. 89, 8966-70

**Nilson T, Jellinek M, Chandel B, Shapiro MJ, Baue AE (1992)**

Pyrimidine-enhanced purine uptake in hepatocytes and improved survival from hypovolemic shock.

Circ Shock. 37, 274-9

**Olney JW (1969)**

Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.

Science. 164, 719-21

**Park SY, Kim HI, Shin YK, Lee CS, Park M, Song JH (2004)**

Modulation of sodium currents in rat sensory neurons by nucleotides.

Brain Res. 1006, 168-76

**Paxinos, G. (2004)**

The Rat nervous system.

Elsevier

**Pellegrini G, Rossier C, Magistretti PJ, Martin JL (1996)**

Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase.

Mol. Brain Res. 38, 191-199

**Pfriegeer FW, Barres BA (1997)**

Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro.

Science. 277, 1684-7

**Pooler AM, Guez DH, Benedictus R, Wurtman RJ (2005)**

Uridine enhances neurite outgrowth in nerve growth factor-differentiated PC12.

Neuroscience. 134, 207-14

**Rawls J, Knecht W, Diekert K, Lill R, Löffler M (2000)**

Requirements for the mitochondrial import and localization of dihydroorotate dehydrogenase.

Eur J Biochem. 267, 2079-87

**Reid JM, Flumerfelt BA, Gwyn DG (1975)**

An ultrastructural study of the red nucleus in the rat.

J Comp Neurol. 162, 363-85

**Reid JM, Gwym DG, Flumerfelt BA (1975)**

A cytoarchitectonic and Golgi study of the red nucleus in the rat.  
J Comp Neurol. 162, 337-61

**Rotgeri A, Löffler M (1994)**

Molecular cloning and sequence analyses of rat liver dihydroorotate dehydrogenase.  
Adv Exp Med Biol. 370, 693-7

**Rückemann K, Fairbanks LD, Carrey EA, Hawrylowicz CM, Richards DF,  
Kirschbaum B, Simmonds HA. (1998)**

Leflunomide inhibits pyrimidine de novo synthesis in mitogen-stimulated T-  
lymphocytes from healthy humans.  
J Biol Chem. 273, 21682-91

**Seidler E (1991)**

The Tetrazolium-Formazan System: Design and Histochemistry.  
Progress in Histochemistry and cytochemistry. Volume 24 No 1. Gustav Fischer  
Verlag

**Spector R, Berlinger WG (1982)**

Localization and Mechanism of Thymidine Transport in the Central Nervous  
System.  
J Neurochem. 39, 837-41

**Traut TW (1994)**

Physiological concentrations of purines and pyrimidines.  
Mol. Cell. Biochem. 140, 1-22

**Tremblay GC, Jimenez U, Crandall DE (1976)**

Pyrimidine biosynthesis and its regulation in the developing rat brain.  
J. Neurochem. 26, 57-64

**Trepel M (2004)**

Neuroanatomie - Struktur und Funktion.  
Urban und Fischer

**Tucker C.L., Lee S.A., Kennedy P.R (1989)**

Re-defining the rat red nucleus: Cytoarchitecture and connectivity.  
Neurosc Abstr 15, 405

**Ullian EM, Harris BT, Wu A, Chan JR, Barres BA (2004)**

Schwann cells and astrocytes induce synapse formation by spinal motor neurons in culture.  
Mol Cell Neurosci. 25, 241-51

**Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001)**

Control of synapse number by glia.  
Science. 291, 569-70

**Van Noorden CJ (1988)**

On the role of oxygen in dehydrogenase reactions using tetrazolium salts.  
Histochem J. 20, 587-93

**Van Kuilenburg ABP, van Gennip AH, Becroft DMO, Webster DR (2000)**

Hereditary orotic aciduria and other disorders of pyrimidine metabolism.  
Metabolic and molecular bases of inherited disease Chapter13, 2663-2696

**Vartian N, Moskvina E, Scholze T, Unterberger U, Allgaier C, Boehm S (2001)**

UTP evokes noradrenaline release from rat sympathetic neurons by activation of protein kinase C.  
J Neurochem. 77, 876-85

**Von Kügelgen I (2008)**

Pharmakology of mammalian P2X- and P2Y-receptors.  
Biotrend reviews No.3 / 9-2008

**Von Kügelgen I, Starke K (1991)**

Noradrenaline-ATP co-transmission in the sympathetic nervous system.  
Trends Pharmacol Sci 12, 319-324

**Waagepetersen HS, Sonnewald U, Schousboe A (2003)**

Compartmentation of glutamine, glutamate, and GABA metabolism in neurons and astrocytes: functional implications.

Neuroscientist 9, 398-403

**Walse B, Dufe VT, Svensson B, Fritzson I, Dahlberg L, Khairoullina A, Wellmar U, Al-Karadaghi S (2008)**

The structures of human dihydroorotate dehydrogenase with and without inhibitor reveal conformational flexibility in the inhibitor and substrate binding sites.

Biochemistry. 47, 8929-36

**Wegerle E (1993)**

Die mitochondriale Dihydroorotat: Ubichinon-Oxidoreduktase [EC 1.3.3.1.]:

Cytochemische Untersuchungen.

Diplomarbeit Humanbiologie, Philipps-Universität Marburg

**Welsch (2003)**

Lehrbuch Histologie, 1. Auflage

Urban & Fischer - Verlag

**White NM, Hiroi N (1998)**

Preferential localization of self-stimulation sites in striosomes/patches in the rat striatum.

Proc Natl Acad Sci USA. 95, 6486-6491

**Wurtman RJ, Regan M, Ulus I, Yu L (2000)**

Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans.

Biochem. Pharmacol. 60, 989-992

**Xu X, Gong H, Blinder L, Shen J, Williams JW, Chong AS (1997)**

Control of lymphoproliferative and autoimmune disease in MRL-lpr/lpr mice by brequinar sodium: mechanisms of action.

J Pharmacol Exp Ther. 283, 869-75

**Xu X, Williams JW, Shen J, Gong H, Yin DP, Blinder L, Elder RT, Sankary H, Finnegan A, Chong AS (1998)**

In vitro and in vivo mechanisms of action of the antiproliferative and immunosuppressive agent, brequinar sodium.

J Immunol. 160, 846-53

**Zameitat E, Pierik AJ, Zocher K, Löffler M. (2007)**

Dihydroorotate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: spectroscopic investigations with the recombinant enzyme throw light on catalytic properties and metabolism of fumarate analogues.

FEMS Yeast Res. 7(6), 897-904

**Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S (2004)**

ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression.

Neuron. 40, 971-82

## 7. Anhang

### Lebenslauf

#### ■ Persönliche Daten

Name: Christian Michael Schaefer  
Geburtstag: 28.09.1983 in Kirchen (Sieg)  
Familienstand: ledig

#### ■ Schulausbildung

1990 – 1994 Maximilian-Kolbe-Grundschule, Scheuerfeld  
1994 – 1996 Geschwister-Scholl-Schule, Betzdorf  
1996 – 2003 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium, Betzdorf, Abitur im März  
2003

#### ■ Zivildienst

2003 – 2004 La Bégude-de-Mazenc (Frankreich)

#### ■ Studium

2004 – 2009 Studium der Zahnmedizin an der Philipps-Universität-Marburg,  
Examen im Juli 2009

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Austermann, Coca, del Rey, Daut, Dibbets, Feuser, Flores-de-Jacoby, Gente, Gloerfeld, Hasilik, Holzheidt, Koolman, Löffler, Lotzmann, Mandrek, Mengel, Mittag, Momeni, Neff, Neumüller, Nonnenmacher, Pancherz, Pieper, Ramaswamy, Röhm, Seitz, Sonntag, Stachniss, Steininger, Stiletto, Stoll, Wennemuth, Werner.

## **Danksagung**

Zunächst danke ich Frau Professor Monika Löffler für die hervorragende Betreuung bis zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit. Ihr Interesse für dieses Thema und ihre stetige Diskussionsbereitschaft waren mir eine große Hilfe; kurz: Vielen Dank für eine wertvolle Zusammenarbeit.

Dr. Martin Schäfer danke ich für die intensive Betreuung während meiner Arbeitsschritte im Institut für Anatomie und Zellbiologie.

Weiterhin bedanke ich mich bei Bettina Kowalski für die Einführung in diverse Labor-methoden und die unermüdliche und offene Beantwortung meiner Fragen. Natürlich sollen auch die unterhaltsamen Mittagspausen im Institut der Physiologischen Chemie nicht unerwähnt bleiben. Hierfür ein Dankeschön an Bettina, Petra, Ute, Beate und Dominik.

Ein Dank gebührt auch Barbara, Tina und Conni für ihre Unterstützung im Institut für Anatomie und Zellbiologie (AG Weihe).

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

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

„Enzymhistochemischer und immunhistochemischer Nachweis der Dihydroorotat-Dehydrogenase im ZNS“

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 \_\_\_\_\_

Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## Summary

The fourth enzyme of the *de novo* pyrimidine biosynthesis, dihydroorotate dehydrogenase, catalyzes the oxidation of dihydroorotate to orotate. Thus, DHODH is decisively involved in the organism's supply with uridinemonophosphate, as well as cytidine and thymidine nucleotides. Representing essential elements of DNA and RNA, these molecules play an important role in cell metabolism. In the present work, an extensive presentation of DHODH in rat's CNS was realized for the first time. This study gave information about the localization and activity of DHODH in different areas of rodent brain.

First of all the enzyme was detected via SDS polyacrylamide gel electrophoresis, followed by several Western blots. As a precondition for these tests, the antibody titres were experimentally optimized. Subsequently, a protein preparation and detection by the use of the Bradford protein assay was made in CNS tissue. The subsequent SDS-PAGE revealed the existence of DHODH in all dissected tissues. In detail the enzyme was detected in the brain areas below: cortex, striatum, hippocampus, thalamus, hypothalamus, superior colliculi, cerebellum, spinal cord, brainstem and inferior colliculi. Only the extracts of brainstem and inferior colliculi showed bands of low intensity.

The enzyme activity of DHODH (oxidation of dihydroorotate to orotate) in rat brain, was investigated by the nitroblue tetrazolium (NBT) assay. High activity appeared in brain areas, which are relatively rich in neurons. Furthermore, grey matter of the spinal chord as well the plexus choroideus showed the subcellular location of DHODH. Thus, enzyme activity of DHODH in rat brain was proved, that supports the theory of an active pyrimidine *de novo* synthesis taking place in brain.

Using the NBT assay, the effect of different inhibitors on DHODH activity was investigated in rat brain. Established inhibitors, such as DCL, A77 1726, atovaquone and redoxal, turned out to be especially potent. An inhibition of rat DHODH by brequinar was also shown, even though to a minor extent. Furthermore, the inhibitory effect of the barely reviewed substance UID1 on DHODH was presented. Besides, UID1 was capable of inhibiting succinate dehydrogenase activity in rat brain.

Finally, the localization of DHODH on cellular level was defined by the use of immunohistochemical methods in selected brain areas. Using an affinity-purified antibody, the findings of the diverse activity tests were confirmed, suggesting a neuronal enzyme localization.

Concluding it has to be stated, that DHODH is active in CNS of adult rats and that it is (with the exception of plexus choroideus cells) predominantly localized in neurons. An important role of dihydroorotate-dehydrogenase in rat brain seems to be possible.