

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Institutsleiter: Prof. Dr. E. Weihe
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Immunhistochemischer Nachweis von Sulphydryloxidase und Katalase während der prä- und postnatalen Entwicklung der Rattenhaut

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg vorgelegt

von

Wagma Mehlhorn
aus Kabul

Marburg, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 30.01.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. J. Seitz

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Hertl

Meinen Töchtern Sahar Marie und Sana Christin

***„Der Weisheit Anfang ist die Furcht des Herrn,
und den Heiligen erkennen, das ist Verstand.“***

Die Bibel, Sprüche 9, 10

Abstract

Keratinization is a highly complex process which leads in the end to a physical barrier for the organism. Post-translational modifications of epidermal proteins help to maintain the structural integrity of the epidermis. This makes the skin firm and impermeable to hydrophilic substances.

One essential step during post-translational modification is the cross-linking of sulfhydryl groups within cysteine residues to disulfides. Sulfhydryloxidase (SOX) is an enzyme that is believed to catalyze disulfide bond formation and thereby promote the formation of the organism's epidermis.

The idea that SOX is involved in the keratinization process is so far based on results that have been obtained in studies on neonatal or adult animals. This work focusses on the foetal epidermis and demonstrates where and when the enzyme is first detectable in the prenatal epidermis. For this purpose, skin of prenatal rat at different days of gestational stage and newborn rat was treated with immunohistological and immunofluorescent techniques. SOX was detected at the same time as the first histological signs of keratinization became visible in the uppermost layers of the epidermis. Furthermore SOX was detected specifically in the stratum granulosum of newborn rats.

Moreover, rat esophagus was also examined as another example of keratinizing epithelium using the same methods as described above. SOX was detected at the same time with the beginning of keratinization in the cell layers where the cornification process takes place.

The reaction catalyzed by SOX produces H_2O_2 which is believed to be degraded by catalase (CAT). Thus in this work we study when and where both SOX and CAT are observed during the epidermal differentiation of rat skin. CAT appears in the same cell layers as SOX, but shows a temporal delay of one day.

We show - for the first time - that both SOX and CAT are correlated with the keratinization process starting at day 18 of gestation. Together these results strongly support the hypothesis that SOX plays a key role within the keratinization process and that CAT is involved in the degradation process of the accruing H_2O_2 .

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| <i>Abstract</i> | 2 |
| <i>Inhaltsverzeichnis</i> | 3 |
| <i>Abkürzungsverzeichnis</i> | 6 |
| 1. Einleitung | 7 |
| Haut | 7 |
| Funktion, Anatomie, Histologie | 7 |
| Embryonale und fetale Entwicklung der Haut | 9 |
| Rattenhaut | 9 |
| Ösophagusepithel | 11 |
| Keratinisierung | 11 |
| Sulfhydryloxidase | 13 |
| Sulfhydryloxidase der Haut | 14 |
| Sulfhydryloxidase der Rattenhaut | 18 |
| Katalase | 18 |
| Klinische Bedeutung | 20 |
| Ziele der Arbeit | 21 |
| 2. Materialien | 23 |
| Tiere | 23 |
| Antikörper | 23 |
| Primärantikörper | 23 |
| Sekundärantikörper | 24 |
| Chemikalien | 24 |
| PBS-Puffer | 25 |
| Geräte | 25 |
| 3. Methoden | 26 |
| Herstellung der Präparate | 26 |
| Tötung der Tiere | 27 |
| Entnahme der Feten und Organe | 27 |

| | |
|---|-----------|
| Immersionsfixierungen | 27 |
| Formol-Fixierung | 27 |
| Bouin-Fixierung | 27 |
| Zamboni-Fixierung | 28 |
| Paraformaldehyd-Fixierung | 28 |
| Weitere Behandlung der fixierten Gewebe | 28 |
| Paraffineinbettung | 28 |
| Anfertigung der Paraffinschnitte | 29 |
| Färbungen | 29 |
| H.-E.-Färbung | 29 |
| Kernfärbung mit DAPI | 30 |
| Immunhistologische Nachweisverfahren | 30 |
| Immunhistochemisches Verfahren | 31 |
| Immunfluoreszenz-Verfahren | 33 |
| Digitale Fotografie und Bildbearbeitung | 34 |
| 4. Ergebnisse | 35 |
| Fixierungen und optimale Antikörperverdünnungen | 35 |
| Kontrollen der immunhistologischen Nachweisverfahren | 36 |
| Kontrollen der Immunfluoreszenz | 36 |
| Kontrollen der LAB-Färbungen | 41 |
| HE-Färbungen | 41 |
| Sulphydryloxidase | 41 |
| Katalase | 41 |
| Haarfollikel | 41 |
| Ösophagusepithel | 41 |
| 5. Zusammenfassung der Ergebnisse | 41 |
| 6. Diskussion | 41 |
| Beurteilung der Methoden | 41 |
| Entwicklung der Rattenhaut | 41 |
| Sulphydryloxidase | 41 |
| Katalase | 41 |
| Das Ösophagusepithel | 41 |
| 7. Zusammenfassung | 41 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Literaturverzeichnis</i> | <u>41</u> |
| <i>Verzeichnis der akademischen Lehrer</i> | <u>41</u> |
| <i>Danksagung</i> | <u>41</u> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|----------------------------------|
| Abb. | Abbildung |
| Ag | Antigen |
| Ak | Antikörper |
| C | Celsius |
| CAT | Katalase |
| Cy | Cyanine |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinucleotid |
| F _C | Fragment crystallizable |
| Gl. seborrh. | Glandulae seborrhoicae |
| H.-E. | Hämatoxilin-Eosin |
| Ig | Immunglobulin |
| kDa | Kilo-Dalton |
| LAB | Labelled avidin-biotin |
| PBS | Phosphat Buffered Saline |
| p.c. | Post coitum |
| PFA | Paraformaldehyd |
| SOX | Sulphydryloxidase |
| SST | Schwangerschaftstag |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |

1. Einleitung

Haut

Funktion, Anatomie, Histologie

Die Haut des Menschen ist mit 1,5 – 2 m² das größte und mit 3,5 – 10 kg das schwerste Organ des menschlichen Körpers und besitzt als dessen äußerste Begrenzung ein breites Funktionspektrum (Schiebler et al. 1997). Zum einen stellt sie eine Barriere gegenüber schädlichen physikalischen oder chemischen Umwelteinflüssen sowie Mikroorganismen dar. Zum anderen fungiert die Haut als Sinnesorgan. Rezeptoren für den Tastsinn (Druck, Berührung, Vibration) und das Temperaturempfinden (Thermorezeptoren) sowie Schmerzrezeptoren sind in der Haut lokalisiert. Darüberhinaus reguliert sie den Wärme- und Wasserhaushalt, absorbiert UV-Strahlung und ist in den Hormonstoffwechsel (Vitamin D) involviert (Fritsch and Kühnel 2001). Die Leisten der Hand- und Fußinnenflächen sind so spezifisch für das jeweilige Individuum, dass sie sogar von anthropologischem und kriminologischem Interesse sind (Gibbs 1967).

Histologisch kann die Haut in zwei Schichten eingeteilt werden: die obere Epidermis und die darunterliegende Dermis, die durch eine Basalmembran voneinander getrennt sind. Das subkutane Fettgewebe bildet schon den Übergang zu den darunterliegenden Organen (Jung and Moll 2005).

Beim Menschen ist die Epidermis ein verhorntes, mehrschichtiges Plattenepithel mit einer Dicke zwischen 30 und 300 µm (Kühnel 1999). Die vorherrschende Zellart sind die Keratinozyten. Daneben gibt es in geringerem Maße noch Melanozyten, die immunologisch aktiven Langerhans-Zellen sowie Mechanorezeptoren (Merkel-Zellen). Die Melanozyten befinden sich im Stratum basale, wo sie ähnlich wie die basalen Keratinozyten mit der Basalmembran assoziiert sind. Sie produzieren Melanin, welches sie in sog. Melanosomen speichern und an die Keratinozyten abgeben. Es fungiert als wichtiger UV-Schutz der Haut. Langerhans-Zellen findet man vorwiegend im Stratum spinosum. Es handelt sich hierbei um dendritische Zellen,

die zum zellulären Immunsystem gehören und für die Antigenpräsentation zuständig sind (Fritsch 1998).

In der menschlichen Epidermis lassen sich lichtmikroskopisch 5 Schichten unterscheiden, welche in Abbildung 1 schematisch dargestellt sind. Von basal nach apikal gesehen findet man direkt auf der *Basalmembran* das *Stratum basale* mit kubischen, teilungsfähigen Zellen, von denen die Differenzierung der weiter apikal gelegenen Schichten ausgeht. Daran schließt sich das *Stratum spinosum* mit größeren und nach apikal hin abgeflachten Keratinozyten an. Diese Zellen sind durch Desmosomen derart verbunden, dass sie ein „stacheliges“ (spinosum) Aussehen erhalten. Das *Stratum granulosum* ist histologisch durch die vielen basophilen Keratohyalin granula im Zytoplasma zu erkennen. Die Leistenhaut der Hand- und Fußinnenseiten besitzen ein *Stratum lucidum*, eine Grenzschicht zwischen dem noch vitale Zellen enthaltenden *Stratum granulosum* und dem weiter apikal befindlichen *Stratum corneum*. Das *Stratum corneum* besteht aus flachen, kernlosen Zellen und Tonofilamenten.

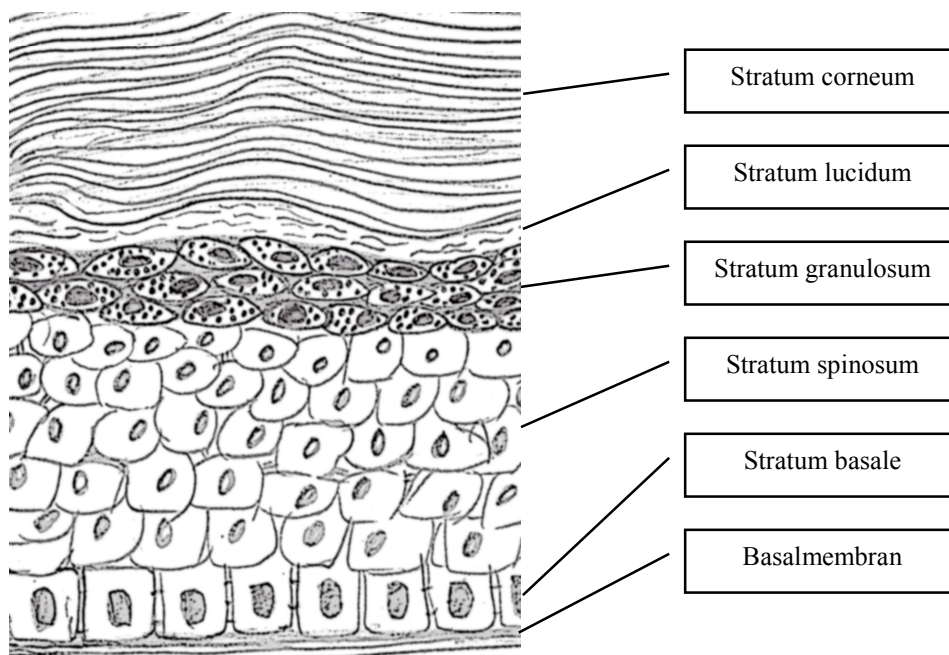


Abbildung 1: Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus der Epidermis.

Die Dermis liegt unter der Epidermis und ist mit ihr zapfenartig verbunden. Hier herrschen vor allem Bindegewebszellen (Fibroblasten) und die von ihnen synthetisierten Fasern vor. Aus dem Immunsystem kommen in der Dermis Histozyten (später ausdifferenziert Makrophagen) und Mastzellen vor (Junqueira et al. 2004). Die Grundsubstanz der Dermis (auch dermale Matrix genannt) besteht neben den von den Fibroblasten gebildeten Fasern haupt-

sächlich aus einem Gemisch von Proteoglykanen. Das wichtigste Faserprotein ist Kollagen, welches sich zu Fibrillen zusammenlagert (Fritsch 1998).

Embryonale und fetale Entwicklung der Haut

Entwicklungsgeschichtlich sind die Hautschichten unterschiedlicher Herkunft. Die Epidermis als oberste Schicht leitet sich von dem Ektoderm ab, die darunterliegende Dermis vom Mesoderm (Sadler 1998). Beim Menschen vollzieht sich die Epidermisentwicklung in drei Abschnitten und beginnt mit einer einzelnen Zellschicht, die dann proliferiert und sich bis zur Verhornung weiter differenziert (Foster et al. 1988). Dies geschieht von der basalen Zellschicht aus, deren Zellen sich ständig teilen und die damit neu gebildeten Schichten vor sich her schieben, weshalb diese Schicht auch *Stratum germinativum* genannt wird. Im weiteren Verlauf der Embryogenese entwickelt sich so das *Stratum intermedium*, welches sich durch Zellen mit einem vergrößerten Zytoplasma, in dem Glycogen nachgewiesen werden kann, auszeichnet. Als *Periderm* wird die äußerste Zellschicht bezeichnet. Etwa ab der 17. – 22. Schwangerschaftswoche kann man beim menschlichen Embryo ein *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum*, *Stratum lucidum* (an der Leistenhaut) und *Stratum corneum* differenzieren, ähnlich wie beim neugeborenen Kind (Hashimoto et al. 1966).

Innerhalb der Epidermis gibt es auch Zellen, die von der Neuralleiste abstammen, nämlich die Melanoblasten, die sich später zu Melanozyten (Pigmentzellen) differenzieren und schon vor der Geburt mit der Produktion von Melanin beginnen (Holbrook et al. 1989).

Die in der Dermis vorhandenen Bindegewebszellen beginnen schon in der Embryonalzeit mit der Produktion von Kollagen und elastischen Fasern (Sadler 1998).

Rattenhaut

In der Grundlagenforschung wird gerne Rattenhaut als Modell für die menschliche Haut herangezogen. Dies erklärt sich einerseits aus der Ähnlichkeit bezüglich des anatomischen und histologischen Aufbaus, andererseits aber natürlich auch aus der breiten Verfügbarkeit wegen der einfachen und kostengünstigen Haltung der Tiere. So wurde Rattenhaut schon mehrfach zur Erforschung der Wundheilung (z.B. Dorsett-Martin 2004), von verschiedensten Hauterkrankungen wie z.B. der Psoriasis (z.B. Schon 1999) oder Alopecia areata (z.B. McElwee et

al. 1998) sowie zur Untersuchung von Arzneimittelwirkungen auf die Haut (z.B. Utrecht 2005) u.a. herangezogen.

Analog zu der menschlichen dermalen Histogenese kann man auch bei der Entwicklung der Rattenhaut das Prinzip der schrittweisen, sich von basal nach apikal vollziehenden Differenzierung der Zellen beobachten (Hanson 1947). Zu Beginn wird die Epidermis auch hier nur von einer ein-, später einer mehrschichtigen Lage von platten bis kubischen Epithelzellen gebildet, dem *Stratum germinativum*. Von dieser Zelllage aus werden die folgenden Schichten gebildet. Etwa ab dem 15. – 16. Schwangerschaftstag (SST) erscheint auch in der Rattenhaut das *Stratum intermedium*, welches zum *Stratum spinosum* und dem *Stratum granulosum* weiter differenziert. Letztere sind bei der Ratte etwa ab dem 18. – 19. SST zu erkennen. Eine dem menschlichen *Stratum corneum* entsprechende Schicht ist erst beim neugeborenem Tier sichtbar (Hanson 1947), wobei elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt haben, dass die Entwicklung der Hornschicht schon ab etwa dem 18. SST unter dem Periderm beginnt (Bauer 1972).

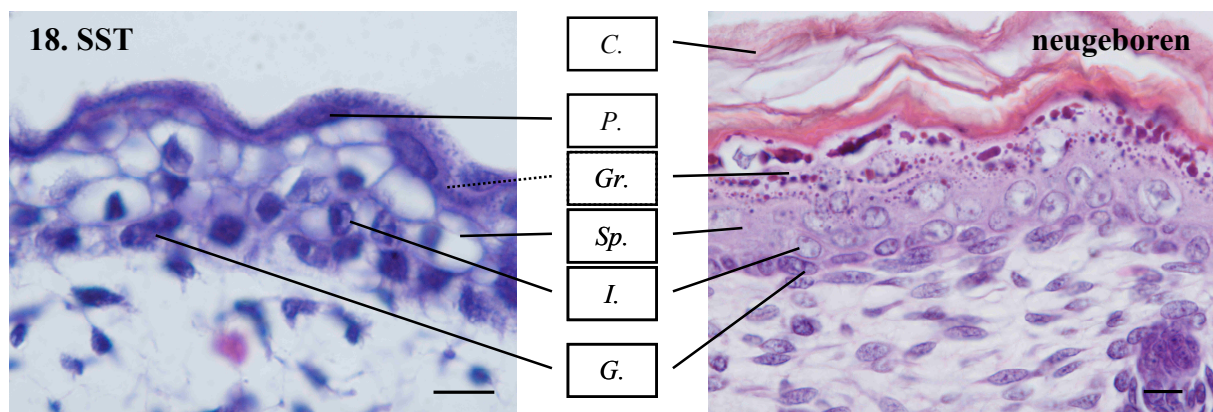


Abbildung 2: H.E.-gefärbte Schnitte der Rattenhaut vom 18. SST und von neugeborenen Ratten zur Darstellung der Histogenese. G.: *Stratum germinativum*; I.: *Stratum intermedium*; Sp.: *Stratum spinosum*; Gr.: *Stratum granulosum*; C.: *Stratum corneum*; P.: *Periderm*
Balken: 10 μ m

Schon sehr früh wird auch bei der Ratte ein *Periderm* sichtbar. Es umfasst die oberste, einschichtige, nicht keratinisierende Zelllage aus flachen Zellen mit sehr dichtem Zytoplasma (Fraser 1928) und ist während der gesamten Fetalzeit nachweisbar. Es geht nahtlos in das Amnionepithel über, dem es strukturell sehr ähnelt. Vermutlich haben beide den gleichen Ursprung und eine ähnliche Funktion (Bonneville 1968). Die Haut der neugeborenen und die der

adulten Ratte zeigen einen ähnlich geschichteten Aufbau wie die menschliche Haut (siehe Abbildung 2).

Ösophagusepithel

Beim Menschen besitzt die Speiseröhre ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel. Man differenziert zwischen einem Stratum germinativum und einem Stratum superficiale. Die Zellen werden von basal nach apikal immer flacher und liegen in den obersten Schichten parallel zur Oberfläche. Im Gegensatz zum verhornten Epithel sind in den Zellen aller Schichten Zellkerne enthalten (Kühnel 1999). Darüberhinaus findet man im unteren Ösophagusdrittel muköse Drüsen (Schiebler et al. 1997).

Über die Histologie, Ultrastruktur und Embryogenese des Ösophagusepithels bei der Ratte ist bisher nur sehr wenig publiziert. Bekannt ist, dass es sich im Gegensatz zum Menschen um ein mehr oder weniger stark verhorntes, mehrschichtiges Plattenepithel handelt, das auf einer dichten Lamina propria sitzt (Hebel and Stromberg 1986). Die ersten Zeichen der Keratinisierung während der Embryogenese sind um den 18. - 19. SST zu erkennen, wobei Keratohyalin granula und apikale, kernlose Epithelzellen beschrieben werden (Kober 1975). Der Ösophagus der Ratte dient somit im Rahmen der vorliegenden Arbeit dazu, ein weiteres Beispiel für ein verhornendes Epithels zu studieren.

Keratinisierung

Damit die Haut ihre Schutzfunktion übernehmen kann, muss sie undurchlässig werden für pathogene Keime und andere Irritantien. Dieser Prozess erfolgt durch die Keratinozyten der Epidermis im Rahmen einer sich von basal nach apikal vollziehenden Differenzierung (Fuchs 1990). Im Stratum basale liegen die noch teilungsfähigen Stammzellen, die durch ständige Teilung für Nachschub in die darüber liegenden Zellschichten sorgen. Die im Stratum spinosum und Stratum granulosum liegenden Keratinozyten sind schon weiter ausdifferenziert. In ihnen sind Gene zur Produktion von vielen verschiedenen Strukturproteinen aktiviert, deren Expression der Epidermis Stabilität gibt und ihre Integrität erhält (Eckert et al. 1997).

Zum größten Teil gehören diese Proteine der Familie der Keratine an, diese machen wiederum ca. 85% des Gesamtproteins der Hornschicht aus (Presland and Dale 2000). Keratine sind unlösliche Strukturproteine mit hoher Temperatur- und pH-Resistenz. Sie bilden ein intrazelluläres Netzwerk von Intermediärfilamenten, die an Desmosomen und Hemidesmosomen verankert sind und mit anderen Matrixproteinen interagieren. Die einzelnen Keratine bilden 2 – 3 nm dicke Protofilamente, die sich jeweils paarweise zu Protofibrillen zusammenlagern (4,5 nm dick). Die Keratine sind reich an der Aminosäure Cystein, was die Bildung von zahlreichen Disulfidbrücken möglich macht, durch welche sowohl die Struktur der Proteine als auch das intrazelluläre Netzwerk und die Protofibrillen gefestigt werden (Menefee 1977; Parry and North 1998).

Im Stratum granulosum werden die Keratine weiter vernetzt, um so ein intrazelluläres Netzwerk zu bilden. Für diese Vernetzung ist das histidinreiche Protein Filaggrin notwendig, was als Profilaggrin zusammen mit den Keratinen die amorphen, irregulär geformten, basophilen Keratohyalin granula bildet. Zusammen mit den Keratinen macht das Filaggrin bis zu 90% der Proteinmenge der Epidermis aus (Proksch et al. 2008).

Ein weiterer Schritt der Differenzierung der Korneozyten ist die Bildung des sog. „cornified envelope“. Es handelt sich hierbei um ein komplexes Netzwerk aus Proteinen (v.a. Involukrin) und einer ceramidreichen Lipidschicht, die an der Zellmembran der Keratinozyten ab dem Stratum spinosum entsteht. Sie festigt einerseits die mechanische Struktur der Membran und sorgt andererseits für eine chemische Barriere gegenüber vielen Keratinolytika (Fritsch 1998).

Die so entstandenen Keratinozyten besitzen also ein dichtes Netzwerk an Intermediär- und Keratinfilamenten und eine äußerst stabile Zellmembran. Im weiteren Verlauf der Differenzierung stellen die Zellen ihre Syntheseleistung ein, bauen Zellorganellen ab und verlieren den Zellkern. Es entstehen so flache, „backsteinartige“ Bausteine, die v.a. durch epidermisspezifische Lipide zusammengehalten, gewissermaßen „verklebt“, werden. Diese Lipide werden als Odland-Körperchen gebildet und per Exozytose in den interzellulären Raum abgegeben (Nemes and Steinert 1999).

Sowohl bei der Zusammenlagerung, Aggregation und Stabilisierung der Keratine (Sun and Green 1978), der Verknüpfung der Keratine mit dem Filaggrin (Fritsch 1998) als auch bei der Bildung des „cornified envelopes“ (Nemes and Steinert 1999) werden unter anderem Disulfidbrücken aus freien Sulfhydrylgruppen gebildet (Ogawa et al. 1979; Broekaert et al. 1982). Sie stabilisieren die Strukturproteine in ihrer Tertiärstruktur und vernetzen die einzelnen

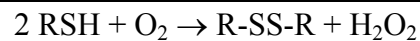
Komponenten miteinander. Man nimmt an, dass für die enzymatische Verknüpfung freier SH-Gruppen zu Disulfidbrücken in der Epidermis Sulfhydryloxidasen zuständig sind.

Sulfhydryloxidase

Sulfhydryloxidasen sind in der Natur weit verbreitete Enzyme, die die oxidative Verknüpfung von freien SH-Gruppen zu Disulfidbrücken (S-S) katalysieren, wobei freier Sauerstoff als Elektronenakzeptor benutzt wird (Chang and Morton 1975; Ostrowski et al. 1979). Es wurden bisher sowohl (eisen- und kupferabhängige) Metalloenzyme als auch Flavoproteine (FAD-abhängig) beschrieben (Rony et al. 1958; Yamada et al. 1987a; Benayoun et al. 2001). Während die frühen Berichte über die Metallabhängigkeit der Sulfhydryloxidasen mittlerweile angezweifelt werden (Kodali and Thorpe 2010), sind die FAD-abhängigen Enzyme in den letzten Jahren weiter klassifiziert und daraufhin Quiescin-Sulfhydryl-Oxidasen (QSOX) genannt worden. Der Name leitet sich von der hohen genetischen Ähnlichkeit und Korrelation zu Quiescin Q6 ab, welches in menschlichen Lungenfibroblasten gefunden wurde und dort beim Übergang vom proliferativen zum Ruhestadium exprimiert wird (Coppock et al. 1993; Hooper et al. 1999a). Allen Vertretern der QSOX-Familie gemeinsam ist mindestens eine Thioredoxin-Domäne am N-terminalen Ende sowie am C-terminalen Ende eine sog. ERV/ALR-Domäne („essential for respiration and vegetative growth“ / „augmenter of liver regeneration“), die die FAD-Bindungsstelle besitzt. Beide Domänen sind auch einzeln beschrieben worden, letztere u.a. in Hefen und in der Mitochondrienmembran (Becher et al. 1999; Lee et al. 2000; Bihlmaier et al. 2007), so dass man bzgl. der QSOX-Familie vermutet, dass es sich um eine Fusion von phylogenetisch älteren Enzymen handelt (Coppock et al. 1998). Mittlerweile sind solche QSOX in einer Vielzahl von eukaryonten Organismen gefunden und beschrieben worden, von Pflanzen über Einzellern bis hin zum Menschen (Limor-Waisberg et al. 2013) und sogar in Reptilien (Alibardi 2015). Sie zeigen über alle Spezies- und Artengrenzen hinweg einen hohen Grad an genetischer Konservierung (Kodali and Thorpe 2010). Spezielle Untersuchungen wurden z.B. gemacht an Sulfhydryloxidasen in Kuh- (Janolino and Swaisgood 1975) und menschlicher Milch (Isaacs et al. 1984), im Dünndarm von Ratten (Lash and Jones 1983), in der Bläschendrüse von Ratten (Ostrowski and Kistler 1980; Benayoun et al. 2001), im Hamster- (Chang and Morton 1975) und menschlichen Hoden (Aumuller et al. 1991), in Hühnereiern (Hooper et al. 1999b), im Gehirn von Ratten

(Mairet-Coello et al. 2002), in *Aspergillus niger* (de la Motte and Wagner 1987) und *Penicillium spp.* (Kusakabe et al. 1982), in Insekten wie z.B. *Anopheles gambiae* (Magalhaes et al. 2008), in Hefezellen (Becher et al. 1999) und in der Haut von z.B. Ratten, Mäusen, Rindern, Kaninchen und auch Menschen (siehe Sulphydryloxidase der Haut).

Bei der Katalyse von freien SH-Gruppen zu Disulfidbrücken (S-S) durch Sulphydryloxidasen wird freier Sauerstoff als Elektronenakzeptor benutzt. Infolge dieser Reaktion entsteht H_2O_2 , was folgende Formel ausdrückt:



Diese Bildung von Disulfidbrücken ist vor allem bei der Reifung von Proteinen wichtig, da dies ein wichtiger Schritt während der posttranslationalen Modifizierung ist (Cook and Hogg 2013). Neu synthetisierte, noch ungefaltete Proteine werden u.a. durch die von der SOX verknüpften Disulfidbrücken in ihre endgültige Tertiär- und Quartärstruktur überführt (Coddling et al. 2012). Zu ihrer Bildung wird die Aminosäure Cystein oxidiert und mit einem weiteren Cystein verknüpft (Heckler et al. 2008). Sulphydryloxidasen sind in hoher Konzentration vor allem in Geweben zu finden, die eine starke sekretorische Aktivität aufweisen. Die intrazelluläre Lokalisation entspricht der von Exportproteinen: endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und sekretorische Granula (Thorpe et al. 2002; Chakravarthi et al. 2007).

Sulphydryloxidase der Haut

1958 wurde zum ersten Mal eine Enzymaktivität in der Haut von Kaninchen biochemisch charakterisiert, welche SH-Gruppen zu verknüpfen schien (Rony et al. 1958). Es konnte gezeigt werden, dass durch Extrakte aus Kaninchenhaut die Umsetzung SH-haltiger Substrate wie Glutathion und Cystein unter Sauerstoffverbrauch katalysiert wurde. Auch wenn die Ergebnisse eine große Streuung aufwiesen (von Inhibition bis Beschleunigung der Katalyse), konnte trotzdem der Schluss gezogen werden, dass die Haut des Kaninchens ein Enzym oder ein Enzymsystem besitzt, welches freie SH-Gruppen zu Disulfidbrücken umsetzt, und das demnach „Sulphydryl-Oxidase“ genannt wurde.

Über eine Sulphydryloxidase in der Haut wurden erst wieder ab Anfang der 80'er Jahre weitere Arbeiten publiziert (Takamori et al. 1980; Goldsmith 1987). Wieder konnte gezeigt wer-

den, dass verschiedene Substrate durch dieses Enzym katalytisch umgesetzt werden konnten, diesmal allerdings aus der Haut von jungen Ratten. Die absolute Aktivität war in der Dermis und Epidermis gleich, wohingegen die spezifische Aktivität in der Dermis höher war. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Rony am Kaninchen konnte Takamori keinen Hinweis auf eine Metallabhängigkeit der SOX in der Rattenhaut finden (Takamori et al. 1980).

Einige Jahre später erschienen zwei weitere Arbeiten, die das bis dahin „skin sulfhydryl oxidase“ getaufte Enzym an der Haut von Rindern untersuchten (Yamada et al. 1987a; Yamada et al. 1987b). Es konnten so jeweils mit ähnlichen Methoden wieder weitgehend die Ergebnisse von 1958 und 1980 bestätigt werden. Yamada et al. zeigten allerdings mit Extrakten aus verschiedenen Bereichen der Rinderschnauze, dass die absolute Aktivität dieser „Haut-Sulfhydryl oxidase“, gemessen durch den Umsatz von DTNB (5,5'-dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)), in der Dermis am höchsten war, wohingegen die relative Aktivität (in Bezug auf ng DNA bzw. mg lösliche Proteine) im Stratum granulosum der Epidermis zwischen 2,7 und 4,5 mal höher war als in der Dermis. Weitere Arbeiten schlossen sich an, in denen es überwiegend um die (bio-) chemischen und stöchiometrischen Eigenschaften dieses Enzyms ging (Yamada 1989; Yamada et al. 1989; Yamada et al. 1994). In diesen Arbeiten zeigte sich unter anderem eine Kupferabhängigkeit dieses Enzyms, womit es formal in die Gruppe der Metalloenzyme eingereiht wurde.

Es gab schon länger Hinweise auf SH- und S-S-Gruppen auch in der menschlichen Haut, woraus sich indirekt auch auf eine entsprechende Oxidase schließen ließ (Ogura et al. 1962). Ein direkter Nachweis dieses Enzyms in der *menschlichen* Haut wurde jedoch erstmals 1992 erbracht (Park et al. 1992). Das Enzym wurde aus präputialer Haut isoliert, aufbereitet und biochemisch charakterisiert. Das gereinigte Enzym wurde als Antigen in Kaninchen injiziert und mit dem so gewonnenen Antikörper verschiedene menschliche Gewebe immunhistochemisch untersucht. In der Haut war die SOX vor allem im Stratum granulosum zu detektieren. Bei Ratten wurden erst 2000 erste Versuche zur immunhistochemischen Lokalisation der SOX durchgeführt (Hashimoto et al. 2000). Hierzu wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die Sulfhydryloxidase der Ratten-Bläschendrüse verwendet (Kumari et al. 1990), dessen Kreuzreaktivität mit einem ebenfalls 65 kDa großen Enzym der Rattenhaut gezeigt werden konnte. Hashimoto et al. zeigten die Lokalisation dieses Antigens im Stratum lucidum (bzw. zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum) der Rattenhaut, und damit in denselben Schichten, in denen mit N-(7-dimethylamino-4-methyl coumarinyl)-maleimid (DACM) Disulfidbrücken nachgewiesen werden konnten. In einer weiteren Studie wurde geprüft, ob es nach Behandlung der Rattenhaut mit TPA (12-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate), all-trans-

retinoin-Säure und UVB-Bestrahlung zu einer veränderten SOX-Immunreaktion kommt (Hashimoto et al. 2001). Es zeigte sich auch hier, dass die Lokalisation des SOX-Antigens mit der der S-S-Brücken übereinstimmte.

Tabelle 1: Eigenschaften der Haut-Sulphydryl-Oxidase (SOX).

| | Eigenschaft | Spezies | Quelle | |
|----------------------------------|--|--------------------|---------------|------|
| Stöchiometrie: | $R(SH)_2 + O_2 \rightarrow RSS + H_2O_2$ | Ratte | 4, 6 | |
| Experimentelle Substrate: | Dithiothreitol, Dithioerythritol, D-Penicillamin, L-Cystein, N-acetyl Cystein, 2-Mercaptoethanol, Gluthation | Ratte | 2 | |
| | Gluthation, Cystein | Kaninchen | 1 | |
| | Dithiothreitol > 2-ME > GSH > Cystein | Rind | 3 | |
| pH-Optimum: | 8,2 | Ratte | 2 | |
| Temperaturoptimum: | 45 °C | Ratte | 2 | |
| isoelektrischer Punkt: | 4,65 | Ratte | 2 | |
| Molekulargewicht: | ca. 65 – 66 kDa | Ratte | 2, 7 | |
| | | Maus | 9 | |
| | | Mensch | 5 | |
| Metallabhängigkeit: | keine | Ratte | 2 | |
| | Kupfer | Kaninchen | 1 | |
| | | Rind | 3 | |
| Größe: | | | | |
| | DNA: | 1704 Basenpaare | Maus | 9 |
| | Aminosäuren: | 568 | Maus | 9 |
| Lokalisation: | | | | |
| | biochemisch (spezifische Aktivität) | Dermis > Epidermis | Ratte | 2 |
| | | Stratum granulosum | Rind | 3 |
| | immunhistochemisch (Antigen) | Stratum granulosum | Ratte | 10 |
| | | | Mensch | 5 |
| | | | Reptilien | 12 |
| | | Stratum lucidum | Ratte | 7, 8 |
| | | Schweißdrüsen | Mensch | 5 |
| | | Gl. seborrh. | Ratte | 10 |
| | | Haarfollikel | Ratte | 10 |
| | | Dermis | Maus | 11 |
| | intrazellulär | Zytosol | Ratte | 2 |

Quellen:

1. Rony et al. 1958
2. Takamori et al. 1980
3. Yamada et al. 1987
4. Yamada et al., 1989
5. Park et al. 1992
6. Yamada et al. 1994
7. Hashimoto et al. 2000
8. Hashimoto et al. 2001
9. Matsuba et al. 2002
10. Tury et al. 2005
11. Portes et al. 2008
12. Alibardi 2015

2002 wurde dann die erste umfassendere Arbeit zur biochemischen und genetischen Charakterisierung der Sulphydryloxidase in der Epidermis von Mäusen publiziert, die u.a. diese Haut-SOX der Gruppe der Quiescin-SOX, und somit den FAD-abhängigen Sulphydryloxidasen, zuordnete (Matsuba et al. 2002).

2006 erschien eine Arbeit von Tury et al., die das Vorkommen der QSOX in verschiedenen Organen der Ratte untersuchten. Für den immunhistochemischen Nachweis wurde ebenfalls ein gegen die SOX der Bläschendrüse von Ratten gerichteter Antikörper benutzt (Benayoun et al. 2001). Auch hier konnte in der Epidermis, genauer im Stratum granulosum, das QSOX-Antigen markiert werden, wogegen es in der Dermis oder in anderen Schichten der Epidermis nicht gefunden wurde. Besonders erwähnt wurde eine starke Färbung von Zellen in den seboreischen Drüsen und Haarfollikeln, die von den anderen Autoren bis dahin nicht beschrieben wurde (Tury et al. 2006).

2008 haben Portes et al. erstmals, ähnlich wie vorliegende Arbeit, die Sulphydryloxidase während der pränatalen Periode in Mäusen untersucht. Ganz im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Arbeiten beschreibt diese Arbeitsgruppe hierbei jedoch ein völliges Fehlen des SOX-Antigens in der Epidermis, wohingegen es sich in der Dermis deutlich darstellen ließ (Portes et al. 2008).

Eine Zusammenfassung über die bisherigen Erkenntnisse der Haut-SOX sind in Tabelle 1 dargestellt.

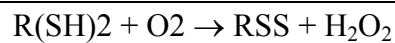
Da man weiß, dass während des Keratinisierungsprozesses in den Strukturproteinen der Epidermis freie SH-Gruppen zu Disulfidbrücken verknüpft werden (siehe Kapitel „Keratinisierung“ auf Seite 11), und die Lokalisation der SOX mit der von S-S-Brücken in der Epidermis weitgehend übereinstimmt (Hashimoto et al. 2000), nimmt man eine wichtige Funktion der SOX im Keratinisierungsprozess an (Hashimoto et al. 2001). Ähnliches zeigen Ergebnisse von Untersuchungen an der Haut von Reptilien. Alibardi konnte an verschiedenen Reptilien zeigen, dass eine QSOX (bzw. mehrere Isoformen) an der Grenze zwischen lebenden Zellschichten und gehärteter Hornschicht / Schuppen vorkommt, und zog den Schluss, dass Sulphydryloxidasen bei dem speziellen Härtungsprozess der Reptilienhaut für die Reifung und Quervernetzung der hierbei benutzten Strukturproteine verantwortlich sind (Alibardi 2015).

Dass die Sulphydryloxidase dagegen sehr wahrscheinlich keine Funktion in dem Prozess des Haarwachstums einnimmt, konnte Hamada und Suzuki an der Haut von Mäusen nachweisen (Hamada and Suzuki 1996).

Sulphydryloxidase der Rattenhaut

Obwohl also die Haut-SOX schon in der Mitte des letzten Jahrhunderts erstmals nachgewiesen wurde, sind Details zum Enzym in der Haut noch recht spärlich und teilweise auch widersprüchlich (siehe Tabelle 1). Zudem sind alle bisherigen Erkenntnisse an verschiedenen Spezies herausgefunden worden (Kaninchen, Ratte, Rind, Maus, Mensch). Vorliegende Arbeit untersucht speziell die SOX der pränatalen und neugeborenen Haut der Ratte. Zur besseren Übersicht ist deswegen im Folgenden das aktuell gesicherte Wissen über die SOX der Rattenhaut zusammengefasst:

Es gibt in der Haut der Ratte ein Enzym, welches *in vitro* in verschiedenen Substraten freie SH-Gruppen unter Sauerstoffverbrauch zu Disulfidbrücken verknüpft (Takamori et al. 1980). Die gefundene Stöchiometrie speziell der Ratten-Haut-SOX scheint sich von der anderer Sulphydryloxidasen zu unterscheiden (Yamada et al. 1989; Yamada et al. 1994), nämlich:

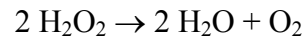


Das Enzym hat ein Molekulargewicht von etwa 65 kDa (Takamori et al. 1980; Hashimoto et al. 2000), arbeitet bei einem pH-Optimum von 8,2 (Takamori et al. 1980) und hat ein Temperaturoptimum von 45 °C (Takamori et al. 1980). Über die Lokalisation gibt es widersprüchliche Angaben: die spezifische Aktivität ist in der Dermis am höchsten (Takamori et al. 1980), immunhistochemische Färbungen zeigen jedoch eine Lokalisation im Stratum granulosum bzw. lucidum der Epidermis und keine Färbung in der Dermis (Hashimoto et al. 2000; Hashimoto et al. 2001; Tury et al. 2006). Interessanterweise wird für die SOX der Rattenhaut keine Metallabhängigkeit beschrieben (Takamori et al. 1980), jedoch für die vom Kaninchen und Rind (Rony et al. 1958; Yamada et al. 1987b). Über die SOX der pränatalen Rattenhaut gibt es noch keine Erkenntnisse.

Katalase

Das Enzym Katalase findet man in nahezu allen Organen und Zelltypen (Chance et al. 1979; Grabenbauer et al. 2001). Meistens ist sie intrazellulär in kleineren Organellen lokalisiert,

insbesondere in den Peroxisomen, wo sie u.a. klassischerweise als Markerenzym dient (De Duve 1973). Die Katalase katalysiert die neutralisierende Umsetzung von H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff und trägt somit zur Reduktion des oxidativen Stresses der jeweiligen Organe bei. Die Reaktionsgleichung der Katalyse lässt sich wie folgt beschreiben:



Betrachtet man speziell die Haut, gehört die Katalase zusammen mit der Superoxid-Dismutase zu den Enzymen, die mit am meisten zur Abwehr von oxidativem Stress beitragen (Sander et al. 2002). Vor allem die Exposition der Haut mit UV-Licht ist ein wesentlicher Faktor für die Entstehung von Radikalen, für die es ein effizientes Schutzsystem bedarf (Cross et al. 1998; Thiele et al. 2001). Die Katalase ist innerhalb dieses Systems für den letzten Reaktionsschritt verantwortlich: zunächst werden Superoxide von der Superoxid-Dismutase gespalten, wobei Wasserstoffperoxid entsteht, Wasserstoffperoxid wiederum ist das Substrat der Katalase, die es zu Wasser und Sauerstoff umsetzt. Die Interaktion beider Enzyme ist wichtig für einen effizienten Schutz der Haut vor endogen und exogen entstandenen freien Radikalen (Hellemans et al. 2003).

Tabelle 2: Eigenschaften der Katalase (CAT).

| | Eigenschaft | Quelle |
|-------------------------------|---|---------------|
| Katalysierte Reaktion: | $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ | 2 |
| pH-Optimum: | 6,8 | 1 |
| Molekulargewicht: | 240.000 kDa | 2 |
| Untereinheiten: | 4 | 2 |
| Aktives Zentrum: | Fe^{3+} -Protoporphyrin | 2 |
| Dermale Lokalisation: | | |
| biochemisch (Aktivität) | Epidermis | 3 |
| immunhistochemisch (Antigen) | Epidermis, Stratum granulosum | 4 |
| intrazellulär | Peroxisomen, Zytosol | 2 |

Quellen:

1. Williams 1928
2. Chance et al. 1979
3. Shindo et al. 1994
4. Muramatsu et al. 2005

Sowohl Messungen der biochemischen Aktivität als auch immunhistochemische Färbungen zeigen ein verstärktes Vorkommen der Katalase in der Epidermis (Shindo et al. 1994; Grabenbauer et al. 2001), hier besonders im Stratum granulosum (Muramatsu et al. 2005). Für

den Keratinisierungsprozess der Haut ist die Katalase insofern interessant, als dass dieser Prozess mit hoher Syntheseleistung und vielen metabolischen Umbauvorgängen der Keratinozyten einhergeht, in dessen Folge auch viele Stoffwechselendprodukte wie z.B. H_2O_2 anfallen. In Analogie zu den Versuchen von Hashimoto et al., bei denen die Haut-SOX und freie SH-Gruppen bzw. Disulfidbrücken simultan dargestellt wurden, hat die Arbeitsgruppe um Muramatsu 2005 die Katalase und ihr Substrat Wasserstoffperoxid in der Rattenhaut untersucht (Muramatsu et al. 2005). Sie konnten zeigen, dass in der Epidermis H_2O_2 hauptsächlich im Stratum granulosum gebildet wird. Auch der Nachweis der Katalase war im Wesentlichen beschränkt auf das Stratum granulosum. Da frühere Arbeiten gezeigt hatten, dass die Superoxiddismutase als potentieller H_2O_2 -Produzent eben nicht ausschließlich in dieser Schicht zu finden ist (Kobayashi et al. 1991; Sander et al. 2002; Hellemans et al. 2003), stellte Muramatsu die Hypothese auf, dass zumindest ein Teil des endogen entstehenden H_2O_2 des Stratum granulosums durch die Haut-SOX produziert wird. Die Katalase als H_2O_2 -abbauendes Enzym steht seiner Hypothese nach somit in direktem funktionellen Zusammenhang mit dem H_2O_2 -Produzenten SOX in der Haut. Tabelle 2 gibt einen Überblick über einige Eigenschaften der Katalase.

Klinische Bedeutung

Die klinische Relevanz der Forschung über dermale Enzymsysteme, insbesondere der Enzyme, die in das vielfältige Redoxsystem involviert sind, liegt begründet in vielen Erkrankungen, für deren Entstehung Fehlfunktionen dieser Systeme verantwortlich gemacht werden.

Die Dysbalance der Redoxsysteme in der Epidermis im Allgemeinen und die fehlerhafte Funktion der dermalen Katalase im Speziellen wird z.B. als ein wichtiger pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der depigmentierenden Hauterkrankung Vitiligo angesehen (Arican and Kurutas 2008). So konnte zum Beispiel Sravani et al. zeigen, dass die Aktivität der Katalase bei Vitiligo-Patienten in befallenen Hautpartien im Vergleich zu gesunden Hautregionen signifikant erniedrigt war (Sravani et al. 2009). Die Ergebnisse von Schallreuter et al. zeigten, dass diese reduzierte Aktivität nicht nur in den befallenen Hautpartien zu finden ist, sondern auch in der klinisch gesunden Haut (Schallreuter et al. 1991). Dies steht offenbar in direktem Zusammenhang mit der vorhandenen Menge von H_2O_2 in der Haut bei betroffenen Patienten

(Salem et al. 2009). Therapeutisch ist schon versucht worden, die fehlende Katalase von Außen in Form eines Katalasegels auf die Haut aufzutragen (Kostovic et al. 2007).

Über die klinisch-pathologische Bedeutung der Sulfhydryloxidase, vor allem die der Haut, ist beim Menschen noch recht wenig bekannt. Zumindestens indirekt scheint sie bei der Pathogenese des „Kinky-hair-Syndroms“ bzw. der „Menkes Krankheit“ beteiligt zu sein, bei der es in Folge eines Defektes des Gens *ATP7A*, welches für ein Kupfertransportprotein codiert, zu einem Funktionsverlust von kupferabhängigen Enzymen kommt (Bertini and Rosato 2008). Da bei betroffenen Patienten auch erhöhte Werte von freien Sulfhydrylgruppen im Keratin der Haare festgestellt werden konnte, schloss man folglich auf eine Kupferabhängigkeit der entsprechenden defekten Oxidase (Danks et al. 1972). Klinisch macht sich dies bei betroffenen Babys neben anderer Symptome in abnorm brüchigen, glanzlosen und hypopigmentierten Haaren sowie insgesamt hyperelastischem Gewebe (inkl. der Haut) bemerkbar (Bankier 1995). Obwohl die Kupferabhängigkeit der Haut-SOX mittlerweile in Frage gestellt wird (Kodali and Thorpe 2010), wird die Fehlfunktion einer Sulfhydryloxidase in der menschlichen Haut bei der Entstehung der dermalen Symptome inklusive fehlgebildeter Haare bei der „menkes disease“ als ein ursächlicher Faktor angesehen (Chen 2006; Ojha and Prasad 2016).

Ziele der Arbeit

Bisher publizierte Studien weisen darauf hin, dass die Haut-SOX an dem Keratinisierungsprozess von verhornenden Epithelien beteiligt ist. Bisher veröffentlichte Arbeiten beschäftigten sich ausschließlich mit der SOX- und SH- bzw. S-S-Lokalisation in der Epidermis neugeborener oder adulter Ratten mit bereits fertig ausdifferenzierter und verhornter Epidermis. Die vorliegende Arbeit untersucht die SOX erstmals während der Zeitspanne der Entwicklung von einem unverhornten, undifferenzierten Epithel zu einem vollständig verhornenden Epithel der Rattenhaut. Ziel ist es, den Zeitpunkt des ersten Auftretens des SOX-Antigens und seine Lokalisation während des fetalen Keratinisierungsprozesses zu untersuchen.

Den gleichen Fragestellungen wird bei der Untersuchung der Katalase nachgegangen. Die Untersuchung der Katalase erscheint insofern sinnvoll, als dass bei der Verknüpfung von Disulfidbrücken in den Keratinen durch die Haut-Sulfhydryloxidase während der Keratinisie-

ung Wasserstoffperoxid entsteht. Wasserstoffperoxid ist ein Substrat der Katalase. Sollte tatsächlich, wie von anderen Autoren vermutet, in der Epidermis während der Keratinisierung die Katalase bei der Spaltung des von der SOX produzierten Wasserstoffperoxides beteiligt sein, müssten beide Enzyme eine gewisse Parallelität bezüglich Lokalisation und zeitlichem Auftreten während der epidermalen Differenzierung zeigen.

Als weiteres Beispiel eines verhornenden Epithels wird des Weiteren das Ösophagusepithel mit den gleichen Techniken und bezüglich der gleichen Fragestellungen untersucht.

2. Materialien

Tiere

Als Versuchstiere wurden Wistar-Ratten verwendet. Sie wurden im hauseigenen Tierstall während der Versuchszeit in einem 12h/12h Tag-/Nacht-Rhythmus mit Futter ad libitum gemäß geltender Tierschutzverordnungen gehalten.

Eine Tierversuchsanzeige (AZ VI 63 - 19c 20/15 c MR 20/26) vom 17. Oktober 2003 wurde vom Regierungspräsidium Giessen genehmigt.

Antikörper

Primärantikörper

Die Herstellung des in dieser Arbeit benutzten Anti-Sulphydryloxidase-Antikörpers wurde von der Arbeitsgruppe Seitz durchgeführt und war nicht Teil der vorliegenden Arbeit (Kumari et al. 1990). Es handelt sich um einen polyklonalen Antikörper gegen SOX der Bläschendrüse von Ratten, erzeugt in Kaninchen. Dieser wurde schon mehrfach zum immunhistochemischen Nachweis des SOX-Antigens verwendet (Seitz et al. 1989; Aumuller et al. 1991), eine Kreuzreaktion mit der Haut-SOX der Ratte konnte gezeigt werden (Hashimoto et al. 2000; Hashimoto et al. 2001; Matsuba et al. 2002)

Der Anti-Katalase-Antikörper wurde freundlicherweise von A. Völkl, Heidelberg überlassen. Es handelte sich um einen polyklonalen Antikörper gegen die Katalase in der Rattenleber, der in Kaninchen erzeugt und ebenfalls schon früher charakterisiert worden war (Beier et al. 1988).

Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper diente biotinyliertes Anti-Kaninchen-IgG. Dieses war Bestandteil des kommerziell erhältlichen LSAB[®]-Kits der Dako Corporation, Carpinteria, CA (USA).

Für die Behandlung der Gewebeschnitte mit der Immunfluoreszenzmethode wurden mehrere Cy-3 bzw. rhodaminmarkierte Sekundärantikörper getestet, die in Tabelle 3 näher aufgeführt sind. In Kapitel 4 finden sich nähere Erläuterungen. Für die im Ergebnisteil präsentierten Bilder wurde der mit #4 bezeichnete Sekundärantikörper verwendet.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

| Bezeichnung | Antikörper | | Markierung | Firma | Code / Charge |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------------------|---------------------------------|
| | Ursprung | Target | | | |
| #1 | Mouse | Anti-rabbit | Cy3 | Jackson Immuno-Research | Code: 211-165-109 Lot: 47203 |
| #2 | Goat | Anti-rabbit | Cy3 | Dianova, Hamburg | Code: 111-165-003 |
| #3 | Mouse | Anti-rabbit | Rhodamin | Jackson Immuno-Research | Code: 211-085-109 Lot: 29276 |
| #4 | Goat | Anti-rabbit | Cy3 | Jackson Immuno-Research | Code: 111-165-003 Lot: 44029 |

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind, soweit nichts anderes angegeben, von der Firma Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Urheberrechtlich geschützte Namen sind nicht extra gekennzeichnet (auch nicht in den folgenden Kapiteln „Geräte“ und „Verbrauchsmaterialien“).

Weitere Chemikalien / Reagenzien:

Isopropanol (CH_3)₂CHOH:

ACROS Organics

DAPI:

GIBCO BRL

Eindeckmittel:

100 ml PBS – 50% Glycerin + 1,5g Propylgallate

LSAB-Kit:

Dako Corporation (Carpinteria, CA, USA)

Ethanol:

E. Merck (Darmstadt)

Roti[®]-Block: 10x Konzentrat (Carl Roth GmbH + Co
Karsruhe)

PBS-Puffer

In 1 Liter Aqua dest.: 87 g NaCl, 3 g KH₂PO₄, 14 g Na₂HPO₄,
zum Gebrauch 1:10 verdünnen.

Geräte

Schlittenmikrotom: Jung (Heidelberg)

Mikroskope: Leica Mikroskopie & Systeme GmbH,
Wetzlar oder Carl Zeiss

Fluoreszenzmikroskop: Leica Mikroskopie & Systeme GmbH,
Wetzlar

3. Methoden

Herstellung der Präparate

Für die Untersuchung der einzelnen Enzyme während der Hautentwicklung wurden Rattenfeten in verschiedenen Stadien der Schwangerschaft verwendet. Dafür wurden an einem definierten SST (Schwangerschaftstag) 0 ein Weibchen mit einem Bock verpaart. Wurde das Weibchen trächtig, galt der Tag nach der Verpaarung als SST 1. Verlief die Schwangerschaft regelrecht, so wurden die Feten entweder am 16., 17., 18., 19. oder 20. SST entnommen und fixiert. Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verschiedenen Tiere.

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Rattenfeten zur Gewinnung der Präparate

| SST: | Gesamtzahl der Embryonen im Wurf: |
|-------------|--|
| 16. | 14 |
| 17. | 11 |
| 18. | 2 |
| 19. | 8 |
| 20. | 9 |

Rattenweibchen lassen nur im fruchtbaren Stadium des Zyklus, also im späten Proestrus und Estrus, eine Begattung zu (Hebel and Stromberg 1986). Je nach vorherrschender Zellart im Vaginalsekret bzw. in der Spülflüssigkeit kann auf den Zeitpunkt im Zyklus geschlossen werden (im Estrus liegen große, verhornende Epithelzellen vor). Deshalb wurde vor der Verpaarung bei jedem Rattenweibchen eine Vaginalspülung durchgeführt und diese lichtmikroskopisch untersucht. Waren die o. g. Zellen nachzuweisen, wurde der Paarungsversuch durchgeführt. Fehlten die spezifischen mikroskopischen Hinweise auf die fruchtbaren Tage, wurde am folgenden Tag erneut eine Vaginalspülung durchgeführt. So konnten die nötigen Verpaarungsversuche optimiert und Fehlversuche minimiert werden.

Tötung der Tiere

Zunächst wurden die neugeborenen bzw. trächtigen Ratten in einem CO₂-Behälter betäubt. Anschließend wurden sie durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet.

Entnahme der Feten und Organe

Die getöteten Ratten wurden in Rückenlage auf einem Tieroperationstisch fixiert. Mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette wurde die Bauchdecke angehoben, es folgte die Eröffnung durch einen Längsschnitt. Der Uterus wurde freigelegt und präpariert. Die Feten wurden entnommen, in einem CO₂-Behälter betäubt und in den unten aufgeführten Lösungen für mindestens 24 h fixiert.

Immersionsfixierungen

Folgende Immersionsfixierungen haben Anwendung gefunden. Die Feten wurden entsprechend der gängigen Protokolle für ca. 24 h in den jeweiligen Lösungen fixiert:

Formol-Fixierung

| |
|--------------------------------|
| 4 % Formol in H ₂ O |
|--------------------------------|

Bouin-Fixierung

| | |
|----------|---------------------------------------|
| 15 Teile | gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung |
| 5 Teile | Formaldehydlösung (37 %) |
| 1 Teil | Eisessig |

Zamboni-Fixierung

| | |
|------------|---|
| 20 g | Paraformaldehyd |
| 150 ml | gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung 2 Stunden bei 60°C im Wärmeschrank mit 2,5% NaOH tropfenweise neutralisiert |
| ad 1000 ml | PBS |

Paraformaldehyd-Fixierung

| |
|----------------------------|
| 4 % Paraformaldehyd in PBS |
|----------------------------|

Weitere Behandlung der fixierten Gewebe

Zur **Entwässerung** der Präparate wurden diese für 24 h in eine 70 % Ethanol-Lösung gelegt, wobei diese einmalig gewechselt wurde. Die vollständige Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (3-mal 2 h in Ethanol 80%, anschließend jeweils 2-mal 1,5 h in Ethanol 90%, 96% und Isopropanol 98%).

Zur **Entfernung des Alkohols** wurden die Präparate daraufhin mit Intermedien aus Zedernholz I, II und III behandelt, jeweils für 24 h.

Paraffineinbettung

Die Tiere wurden aus dem Intermedium in eine gesättigte Lösung von Paraffin in Benzol überführt. Die Aufbewahrung erfolgte für 30 Minuten in einem Wärmeschrank bei 30 °C. Über Paraffin mit steigenden Schmelzpunkten fand die Einbettung der Ratten in Paraplast statt (jeweils 2-mal 1,5 h bei 46 – 48 C°, 52 – 54 C° und 56 – 58 C°). Nach dem Erkalten konnten die Blöcke aus der Metallform herausgelöst werden.

Anfertigung der Paraffinschnitte

Zunächst wurden Objektträger dünn mit Chromalaun-Gelatine (Pappas 1971) beschichtet, um zu verhindern, dass aufgezogene Schnitte sich bei Inkubationen und Spülvorgängen ablösen. Das Beschichtungsmedium wurde folgendermaßen hergestellt:

1,0 g Gelatine
0,1 g Kaliumchrom-III-sulfat,
ad 200 ml Aqua dest. bei 50 C°

Auf einem Schlittenmikrotom der Firma Jung, Heidelberg, wurden 4 bis 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden dann in warmes Aqua dest. überführt und auf die beschichteten Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden zuletzt in einem Wärmeschrank für 12 h bei 45°C getrocknet.

Färbungen

H.-E.-Färbung

Histologische Schnitte der Feten und der neugeborenen Ratten wurden zunächst mit H.E. gefärbt. Die Hämalaun-Eosin-Färbung gilt als Standard und erlaubt eine orientierende Übersicht. Auf diese Weise ließ sich ein Überblick über die Entwicklung der Haut sowie des Oesophagus und ihrer jeweiligen Schichten gewinnen. Die H.E.-gefärbten Schnitte dienen außerdem als Orientierungshilfe bei von Beurteilung von Präparaten, die mittels immunhistologischen Methoden untersucht worden waren.

Es wurde ein Standardprotokoll verwendet, wie es in histologischen Labors üblich ist, beinhaltend die Entparaffinierung der Schnitte in Xylol, Hydratation in absteigender Alkoholreihe, Färbung mit sauren Hämalaun, Bläuen in Leitungswasser, Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, Färbung mit Eosin-Phloxin, Waschen in Ethanol sowie erneut eine aufsteigende Alkoholreihe. Zuletzt wurden die Schnitte in Corbit-Balsam eingedeckt.

Das saure Hämalaun wurde wie folgt hergestellt:

| |
|---|
| 0,1 g Hämatoxillin |
| 0,02 g Natriumjodat |
| 5,0 g Kalialaun |
| 100 ml Aqua dest.; über Nacht stehen lassen, am nächsten Tag Gabe von |
| 5,0 g Chloralhydrat |
| 0,1 g Zitronensäure |
| 5 Min. lang aufkochen, abkühlen und filtrieren |

Das Eosin-Phloxin wurde wie folgt hergestellt:

| |
|----------------------|
| 100 ml Eosin Y (1%) |
| 10 ml Phloxin B (1%) |
| 780 ml Ethanol (96%) |
| 4 ml Eisessig |

Kernfärbung mit DAPI

Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde der blaufluoreszierende Farbstoff DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) benutzt. Dieser fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe. In Verbindung mit doppelsträngiger DNA liegt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm. Der Farbstoff wurde in einer 1:100-Verdünnung zu dem jeweiligen Zweitantikörper gemischt (Endkonzentration: 1 µg/ml) und entsprechend lange auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurde wie oben beschrieben mehrfach mit PBS gewaschen, bevor die Schnitte auf dem Objektträger eingedeckt wurden.

Immunhistologische Nachweisverfahren

Immunhistologische Färbungen von Geweben haben sich in den letzten Jahrzehnten als zuverlässige Methoden zur Detektion von Antigenen bewährt. Hierbei wird die Eigenschaft von

Antikörpern genutzt, sich spezifisch an ein Antigen zu binden. Durch Markierung eines solchen Antikörpers kann die Lokalisation des Antigens auf Gewebeschnitten optisch sichtbar gemacht werden. Die verwendeten Antikörper können prinzipiell auf zwei verschiedene Arten markiert sein: indirekt und direkt (Friemel 1984). Bei der direkten Methode kommt ein Antikörper zum Einsatz, der an sich schon markiert ist, ein weiterer Färbeschritt entfällt somit. Dagegen ist bei der indirekten Methode nicht der Primärantikörper markiert, sondern ein gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichteter Sekundärantikörper.

Die Markierung kann auf vielfältige Arten erfolgen. Bei der Immunfluoreszenz-Technik werden die verwendeten Antikörper mit fluoreszierenden Substanzen gekoppelt, die so unter einem Fluoreszenzmikroskop, angeregt durch monochromatisches Licht, sichtbar werden (Coons and Kaplan 1950). Immunenzym-Verfahren dagegen beruhen auf der enzymatischen Umsetzung eines Chromogens in einen Farbkomplex, der mittels eines Lichtmikroskops zu sehen ist (Nakane and Pierce 1967).

Immunhistochemisches Verfahren

In der vorliegenden Arbeit wurde als immunhistochemisches Nachweisverfahren der SOX- und CAT-Antigene die sog. LAB-Methode (labelled avidin-biotin technique) verwendet. Hier wird der Sekundärantikörper mit dem Vitamin Biotin gekoppelt, welches eine spezifische und hohe Affinität zu dem Glycoprotein Avidin besitzt. Das Avidin ist wiederum mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt. Diese Affinität des Avidins zu Biotin ermöglicht nach Zugabe des Avidin-Peroxidase-Komplexes eine spezifische Bindung. So entsteht schließlich ein Biotin-Avidin-Peroxidase-markierter Sekundärantikörper, der durch den Primärantikörper am Antigen gebunden ist. Das daraufhin zugegebene Diaminobenzidin („DAB“) wird durch die Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 zu einem braunen, unlöslichen Farbprodukt umgesetzt, wodurch indirekt das Antigen detektierbar wird.

Zur Durchführung der LAB-Methode wurde das DAKO LSAB+ Kit (DAKO CORPORATION) verwendet (vergleiche hierzu Abbildung 3). Nach Entparaffinierung der Schnitte in Xylol und Hydratation in einer absteigenden Alkoholreihe wurde zunächst die endogene Peroxidaseaktivität geblockt (mittels 3% H_2O_2 in PBS). Die enzymatische Umwandlung des Diaminobenzidins wurde somit spezifisch nur von der Peroxidase am Sekundärantikörper katalysiert.

Danach wurden analog unspezifische Antikörperbindungsstellen mittels ROTI-Block geblockt. Dies diente ebenfalls zur Sicherung der Spezifität der Ergebnisse. Durch die Blockung unspezifischer Antigene bindet der Primärantikörper nur an sein Antigenepitop. Nach mehreren Spülvorgängen konnte dann der Primärantikörper aufgetragen werden, der über Nacht in der Feuchtkammer bei + 4 C° im Kühlschrank inkubiert wurde (Abbildung 3, A). Dann wurde der biotinylierte Sekundärantikörper zugegeben (Abbildung 3, B), und anschließend die Streptavidin-Peroxidase-Lösung (Abbildung 3, C). Nun konnte das DAB hinzugegeben werden, die Färbereaktion wurde unter dem Lichtmikroskop verfolgt und entsprechend mit Aqua dest. gestoppt (Abbildung 3, D). Nach einer abschließenden Dehydrataion in einer aufsteigenden Alkoholreihe konnten die Schnitte in Corbit-Balsam eingedeckt werden.

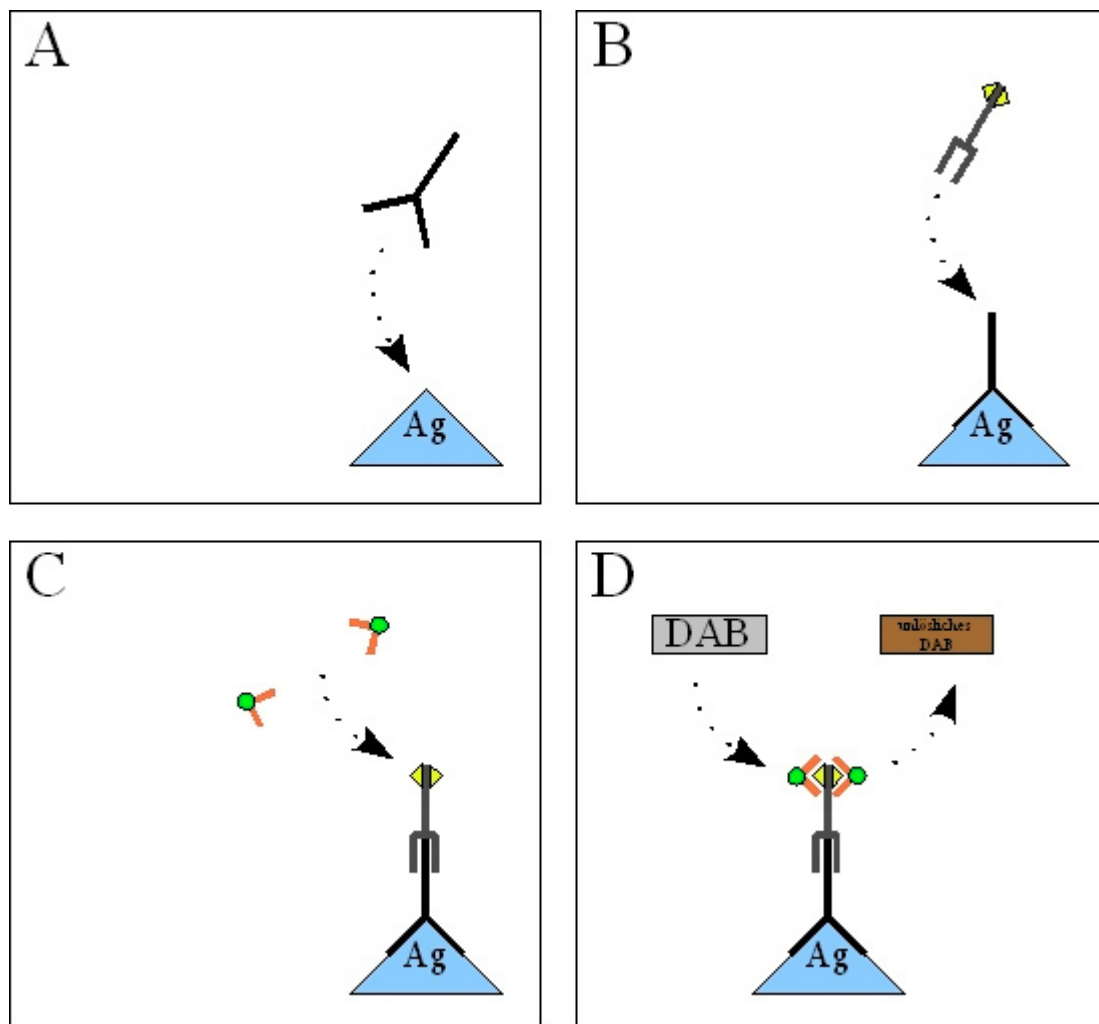


Abbildung 3: Schematische Darstellung der LAB-Methode. Erläuterung im Text.

Immunfluoreszenz-Verfahren

In der vorliegenden Arbeit wurden für das Immunfluoreszenz-Verfahren hauptsächlich Cy3-markierte Sekundärantikörper verwendet. Eine Auflistung findet sich in Tabelle 3. Auch hier wurde ein etabliertes Protokoll verwendet (vergleiche hierzu Abbildung 4). Nach Entparaffinierung der Schnitte in Xylol und Hydratation in einer absteigenden Alkoholreihe wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen mit ROTI-Block geblockt. Danach konnte der spezifische Primärantikörper aufgetragen werden (Abbildung 4, A), es folgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper in einer Feuchtkammer bei + 4 C° im Kühlschrank über Nacht (Abbildung 4, B). Am Folgetag konnte der markierte Sekundärantikörper zusammen mit dem Kernfarbstoff DAPI aufgetragen werden (Abbildung 4, C), es erfolgte eine 60 minütige Inkubation. Eingedeckt wurden die Schnitte mit einem Eindeckmittel aus 100 ml PBS + 50% Glycerin + 1,5g Propylgallat.

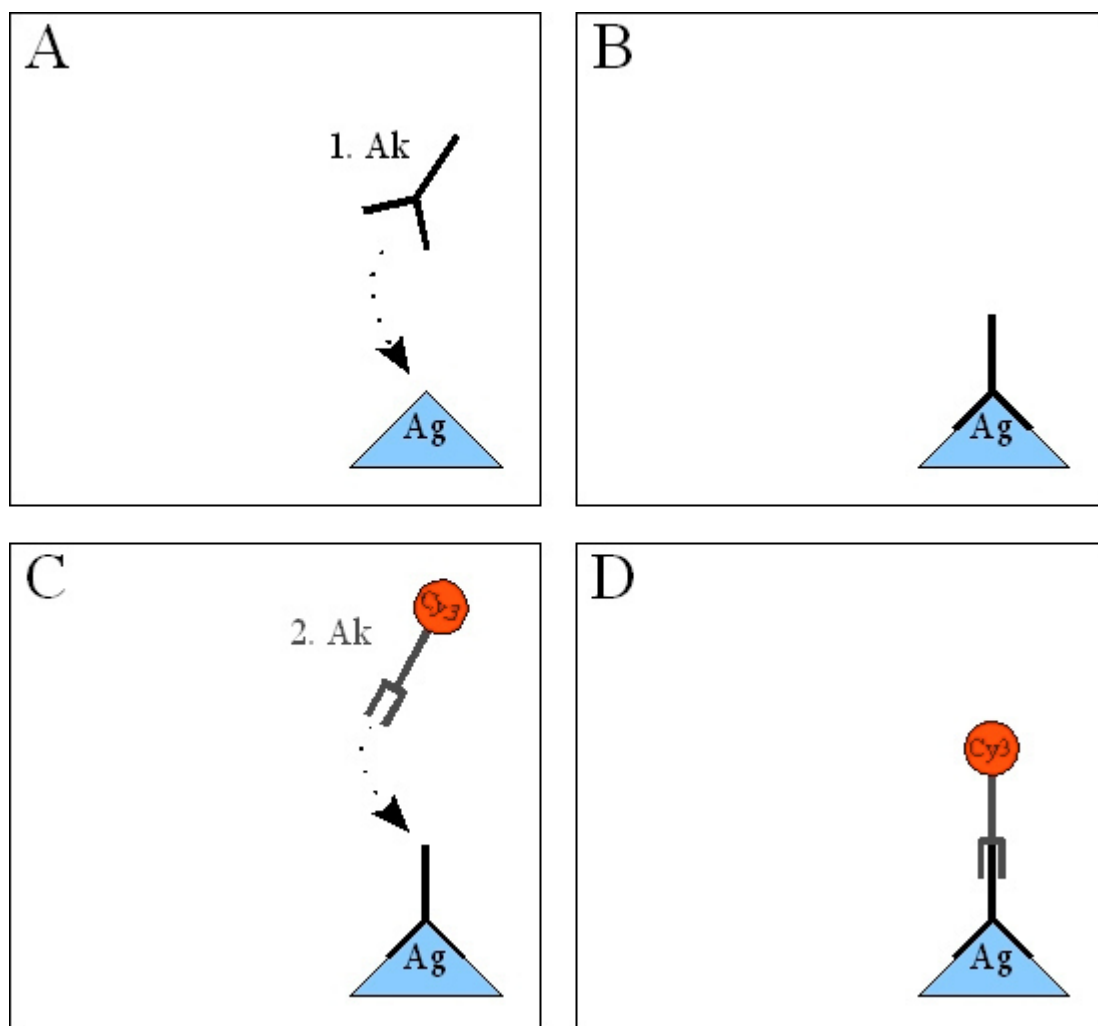


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenztechnik mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern. Erläuterung im Text.

Digitale Fotografie und Bildbearbeitung

Alle Photographien dieser Arbeit wurden an einem Leica (Fluoreszenz-) Mikroskop mit Hilfe einer Digitalkamera (DXM1200F der Firma Nikon) durchgeführt. Die Bilder wurden mit dem Programm Nikon ACT-1 (Version 2.51) aufgenommen und digital archiviert. Die Bildbearbeitung wurde mit dem Programm Corel[®] PHOTO-PAINT Version 6.0 oder GIMP 2.8 vorgenommen.

Die Bilder der H.E.- und LAB-Färbungen wurden ohne Fluoreszenzfilter aufgenommen und ohne größere Bildbearbeitung verwendet.

4. Ergebnisse

Fixierungen und optimale Antikörperverdünnungen

Vorversuche waren notwendig, um die optimalen Fixierungsbedingungen und Antikörperverdünnungen festzustellen. Hierzu wurden neugeborene Ratten gemäß der in Kapitel 3 beschriebenen Fixierprotokolle behandelt und mit unterschiedlichen Verdünnungsreihen der Primär- und Sekundärantikörper inkubiert. Als optimale Verdünnung der Sekundärantikörper wurde die höchste Verdünnung angenommen, bei der eindeutig kein unspezifisches bzw. ungewollt spezifisches Signal bei Negativkontrollen und gerade noch eine eindeutig spezifische Fluoreszenz bzw. Färbung bei Positivkontrollen zu sehen war. Der Primärantikörper wurde in der höchsten Verdünnung verwendet, bei der gerade eben ein spezifischer Nachweis in den Positivkontrollen möglich war (Friemel 1984). Alle Versuche wurden für jeweils beide immunhistologischen Detektionsmethoden optimiert (Immunfluoreszenz-Technik und LAB-Färbung).

Die Fixierung mit Paraformaldehyd erwies sich für den Nachweis der SOX- und CAT-Antigene als am günstigsten. Alle anderen beschriebene Fixiermethoden (Formol-, Bouin- und Zambonifixierung) ließen nur schwächere Reaktionen zu (nicht gezeigt). Lediglich das Präparat der Abbildung 25 war mit Bouin fixiert (Immunfluoreszenz-Methode, Katalase im Ösophagusepithel). Die gefundenen optimalen Antikörperverdünnungen sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Ergebnisübersicht der Vorversuche zur Findung der optimalen Antikörperverdünnungen. Die Bezeichnungen der Sekundärantikörper entspricht der aus Tabelle 3.

| | | Antikörper | Optimale Verdünnung | |
|----------|----|--|----------------------|-----------------|
| | | | für Immunfluoreszenz | für LAB-Methode |
| primär | | Anti-SOX | 1:1500 | 1:1000 |
| | | Anti-CAT | 1:8000 | 1:5000 |
| | | | | |
| sekundär | #1 | Mouse-anti-Rabbit-Cy3 (JacksonImm.R.) | 1:400 | |
| | #2 | Goat-anti-Rabbit-Cy3 (Dianova) | 1:400 | |
| | #3 | Mouse-anti-Rabbit-Rhodamin (JacksonImm.R.) | 1:400 | |
| | #4 | Goat-anti-Rabbit-Cy3 (JacksonImm.R.) | 1:500 | |

Wie weiter unten aufgeführt zeigten alle verwendeten Sekundärantikörper bei Verwendung mit der Immunfluoreszenzmethode ein mehr oder weniger stark artifizielles Signal in der Epidermis ab dem 19. SST. Wie in Abbildung 7 zu sehen erschien der Antikörper #4 als derjenige mit der geringsten (bzw. fehlenden) unspezifischen Reaktion an den hier verwendeten Gewebeschnitten. Das Artefakt beschränkte sich lediglich auf die oberste Zellschicht (Periderm) bzw. Hornschicht, so dass dieser Sekundärantikörper für die weiteren Versuche benutzt wurde.

Kontrollen der immunhistologischen Nachweisverfahren

Um die Aussagekraft immunohistochemischer Befunde zu gewährleisten, sind Kontrollen erforderlich, die die Spezifität der durchgeführten Reaktionen prüfen. Obwohl die Sekundärantikörper kommerziell erworben wurden und die Spezifität der beiden Primärantikörper schon früher untersucht und bestätigt wurde (Yokota and Fahimi 1981; Beier et al. 1988; Hashimoto et al. 2000), wurden bei allen hier vorgestellten Versuchsreihen Kontrollen mitgeführt. Es wurden sowohl Leerwertkontrollen (nicht gezeigt) als auch Negativkontrollen durchgeführt (Friemel 1984). Für die Negativkontrollen wurde bei sonst identischem Färbeprotokoll statt des Erstantikörpers die entsprechende Menge an PBS-Puffer aufgetragen. Als Positivkontrolle dienten Schnitte von Geweben der neugeborenen Ratte, bei denen schon beide Antigene (SOX und CAT) nachgewiesen worden waren (Hashimoto et al. 2000; Hashimoto et al. 2001; Muramatsu et al. 2005; Tury et al. 2006).

Kontrollen der Immunfluoreszenz

Zuerst wurde der verwendete Sekundärantikörper auf seine Spezifität zum Primärantikörper hin überprüft. Es wurden Schnitte von Rattenfeten und neugeborener Ratten über Nacht nur mit Blockreagenz inkubiert, um dann den fluoreszierenden Sekundärantikörper zuzugeben (siehe Abbildung 5). Obwohl die Präparate nicht mit einem Primärantikörper behandelt wurden, konnte man im subkutanen Bindegewebe regelmäßig fluoreszierende Strukturen erkennen. Vergleiche mit entsprechenden HE-Färbungen zeigten, dass es sich hierbei um ange-

schnittene Blutgefäße mit Erythrozyten handelte. Diese enthalten vermutlich ein unspezifisches Bindungsepitop für den Sekundärantikörper.

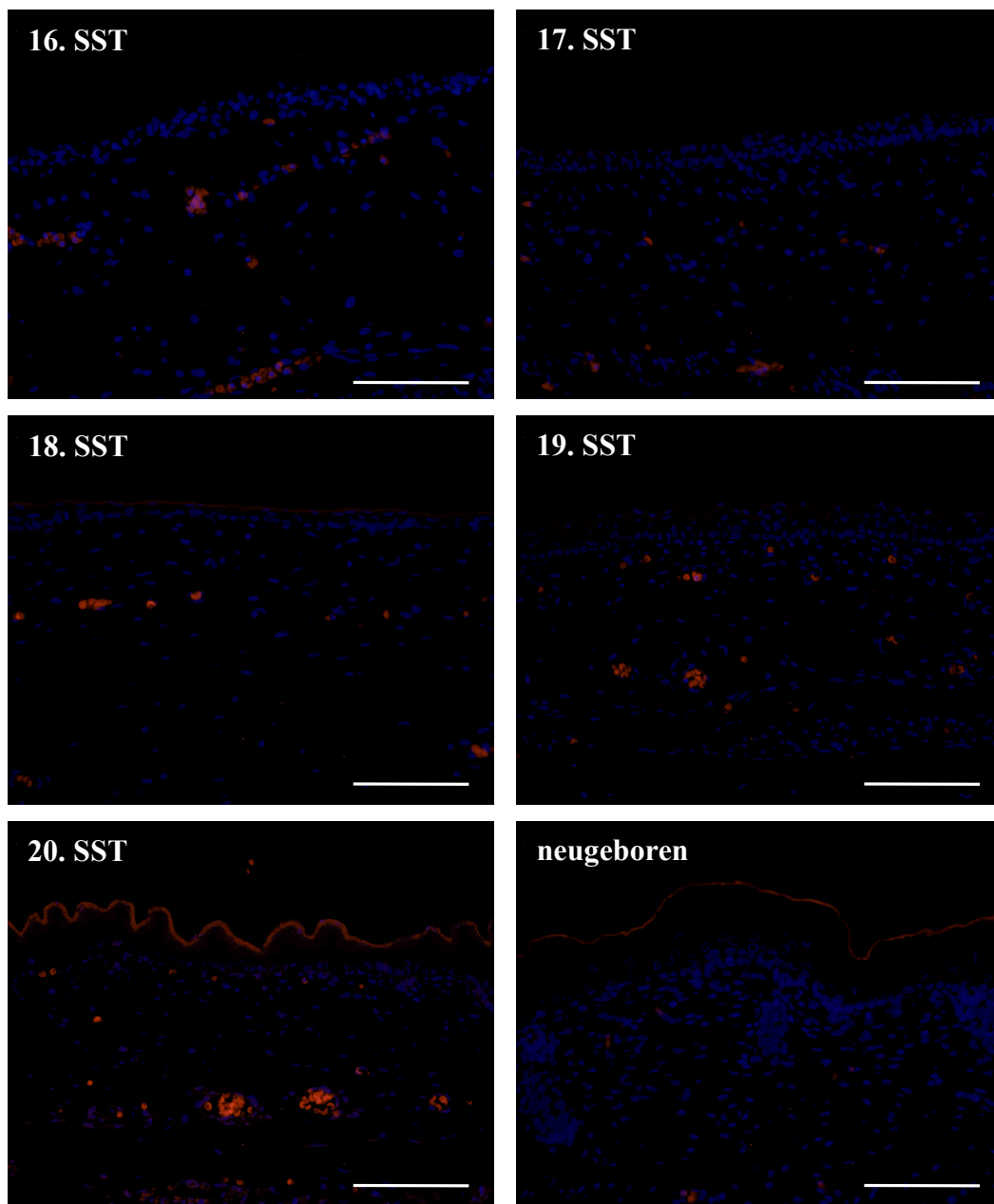


Abbildung 5: Negativkontrollen der Cy3-Immunfluoreszenz der Epidermis von fetalen und neugeborenen Ratten mit DAPI-Kernfärbung. Zu erkennen sind die artifiziell gefärbten Erythrozyten in angeschnittenen Blutgefäßen sowie das im Text näher beschriebene Artefakt an der Epidermis ab dem 19. SST.
Balken: 100 μ m.

Es ließ sich zudem erkennen, dass die Gewebeschnitte der Feten vom 19. und 20. SST insgesamt mehr unspezifische Hintergrundfluoreszenz zeigten als die vom 16. bis 18. SST und von der neugeborenen Ratte. Vergleichende Kontroll-Aufnahmen waren also bei diesen Tagen

heller und intensiver. Dies war aber nicht nur auf die hier untersuchte Epidermis beschränkt, sondern zeigte sich im gesamten Präparat.

Bei den Rattenfeteten vom 19. bis zum 20. SST konnte man in zunehmenden Maße ein diffuses Fluoreszenzsignal direkt in (bzw. an) der obersten Zellschicht der Epidermis erkennen. Am 19. SST war dieses Signal erst in höheren Vergrößerungen zu sehen, am 20. SST und bei der neugeborenen Ratte aber auch schon in der Übersicht. Bei den neugeborenen Tieren fand sich die oberste Hornschicht markiert. Die Epidermisschichten blieben dagegen frei.

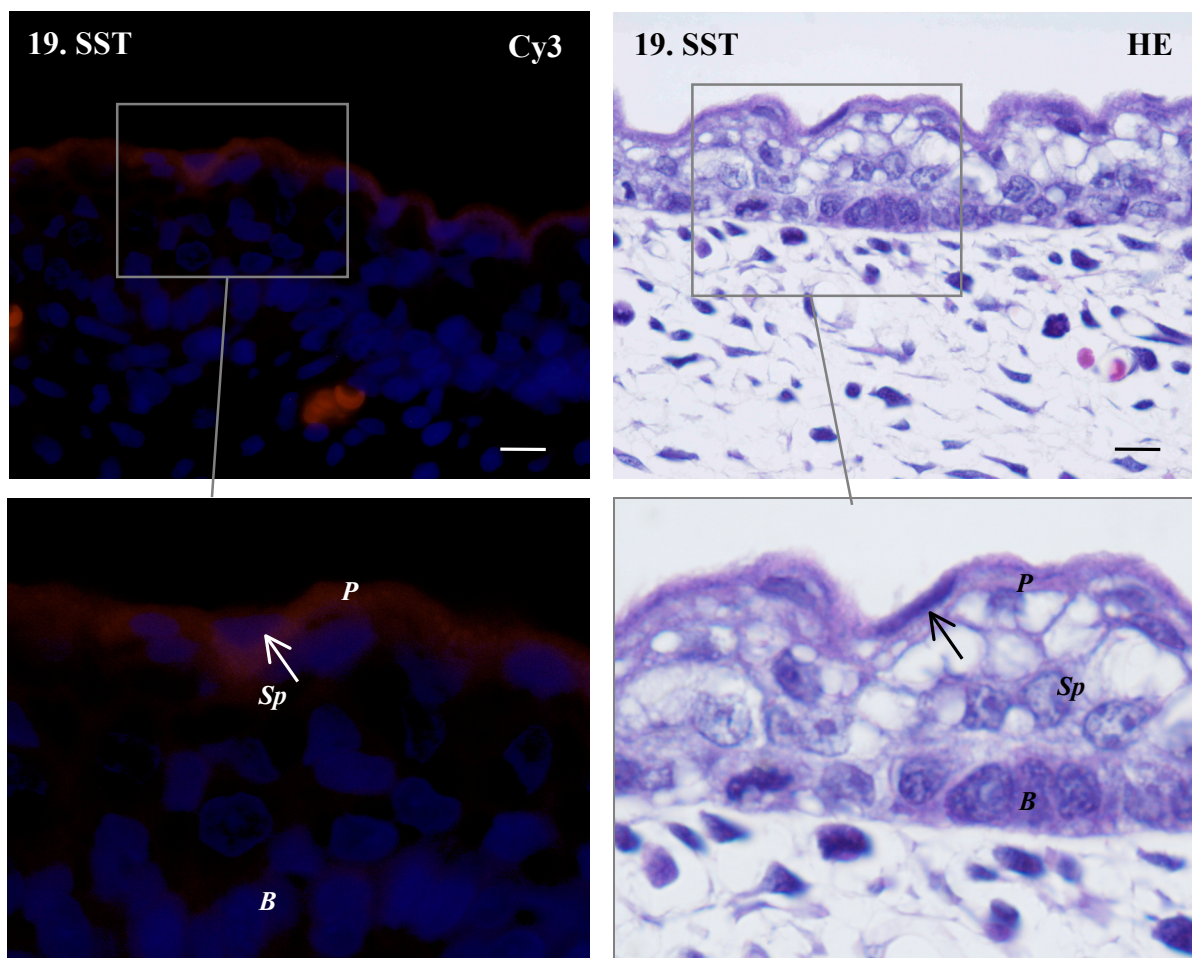


Abbildung 6: Feten des 19. SST im Vergleich: Negativkontrollen der Immunfluoreszenzmethode (links) sowie HE-Färbung (rechts).

*P: Periderm; B: Stratum basale; Sp: Stratum spinosum, Pfeile: Zellkern
Balken: 10 µm*

Im Vergleich mit H.E.-Färbungen entspricht diese fluoreszierende Zellschicht histologisch am ehesten dem Periderm bzw. dem sich darunter entwickelnden Stratum corneum. Kennzeichen des Periderms sind die flachen, quer zur Oberfläche liegenden Zellen mit dichtem, kondensiertem Zytoplasma und flachen, langen Zellkernen, die sich deutlich vom darunterliegenden

Stratum spinosum unterscheiden lassen (vgl. Abbildung 6). Eine genaue morphologische Unterscheidung, ob nun das Periderm direkt oder die sich darunter entwickelnde Hornschicht vom Sekundärantikörper falsch positiv erfasst wurde, ließen die gewählten Methoden nicht zu. Bei den Gewebeproben von neugeborenen Ratten war allein die oberste Lage des Stratum corneum markiert.

Um zu überprüfen, ob und in welchem Maße diese artifiziellen Markierungen Effekte des verwendeten Sekundärantikörpers waren, wurden Kontrollen mit vier verschiedenen Sekundärantikörpern an Gewebeschnitten von Rattenfeteten (18. SST bis neugeborenes Tier) durchgeführt. Die hierzu verwendeten Sekundärantikörper können der Tabelle 3 entnommen werden. Abbildung 7 zeigt Gewebeschnitte dieser Kontrolluntersuchungen mit allen vier Sekundärantikörpern. Die eindeutig negativen Proben der Rattenfeteten der Tage 16 und 17 sind nicht gezeigt.

Das oben beschriebene Artefakt auf den untersuchten Gewebeschnitte war bei jedem der verwendeten Sekundärantikörpern zu sehen. Bei den Proben von neugeborenen Tieren fand sich ein Signal ausschließlich an der Hornschicht. Alle Antikörper wurden in mehreren Verdünnungen verwendet mit immer den gleichen Ergebnissen.

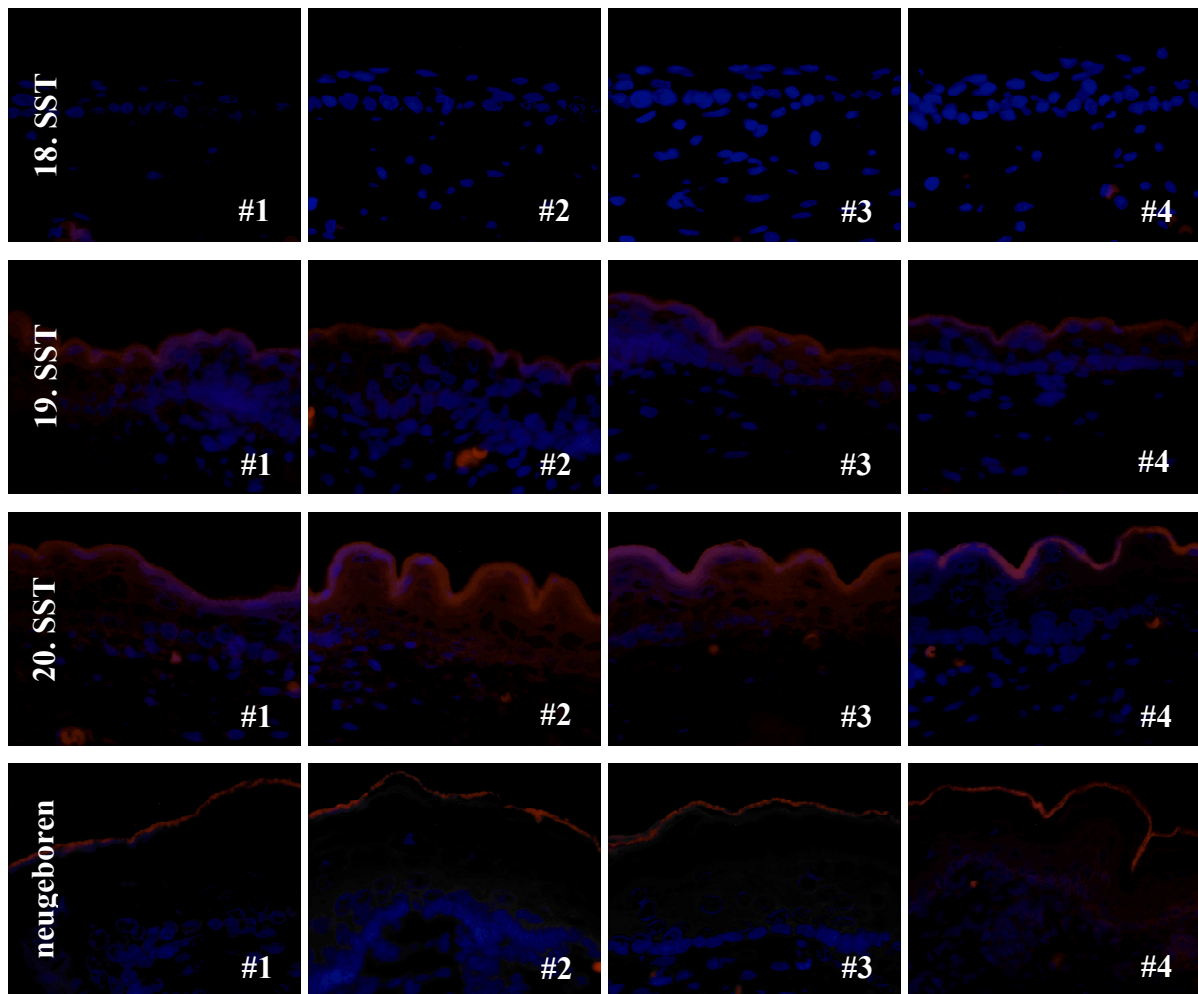


Abbildung 7: Verschiedene Sekundärantikörper im Kontrollversuch vom 18. SST bis neugeborene Ratte. Die Nummerierungen beziehen sich auf die Angaben in der Tabelle 3 auf Seite 24.

Auch die Negativkontrollen beim Ösophagusepithel der Ratte erbrachten die gleichen Ergebnisse wie oben für die Epidermis beschrieben. Dies ist in Abbildung 8 dargestellt.

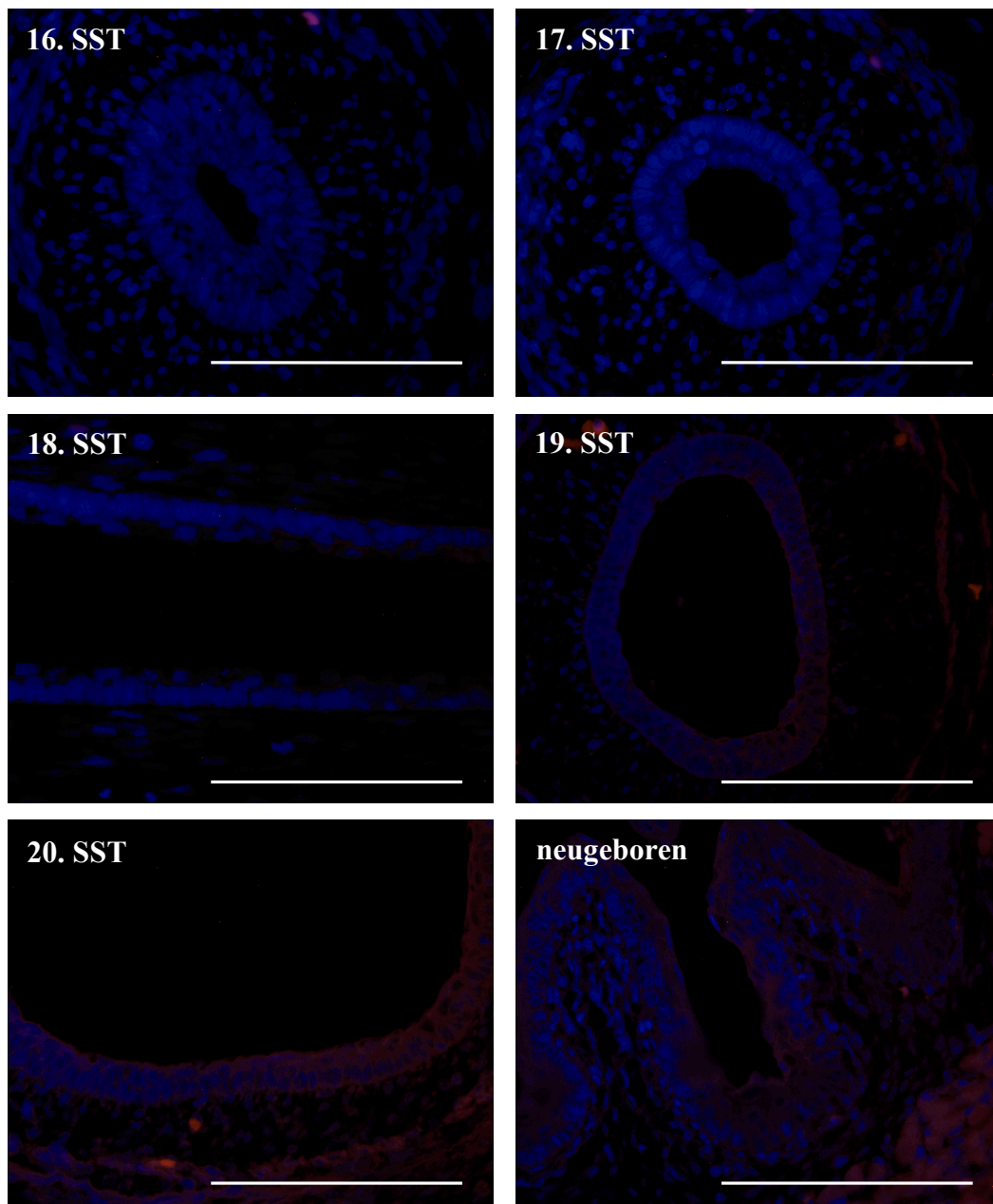


Abbildung 8: Negativkontrollen der Cy3-Immunfluoreszenz des Ösophagusepithels von fetalen und neugeborenen Ratten mit DAPI-Kernfärbung.
Balken: 100 µm

Kontrollen der LAB-Färbungen

Da gezeigt werden konnte, dass alle verfügbaren fluoreszierenden Sekundärantikörper ein Artefakt an der Epidermis bzw. Hornschicht der Rattenfeten ab dem 19. SST hervorriefen, wurde ein weiteres immunhistochemisches Verfahren angewendet, die LAB-Methode. Zusätzlich wurde eine Gegenfärbung der Kerne durchgeführt, um die Orientierung auf dem

Schnitt zu erleichtern und eventuelle Färbungen eindeutig zu lokalisieren. Die Zellkerne sind in den folgenden Bildern demnach leicht blau gefärbt. Es wurden auch bei dieser Methode Kontrollen durchgeführt. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse: alle Kontrollen waren negativ, keinerlei Epitope wurden auf diesen Gewebeschnitten markiert.

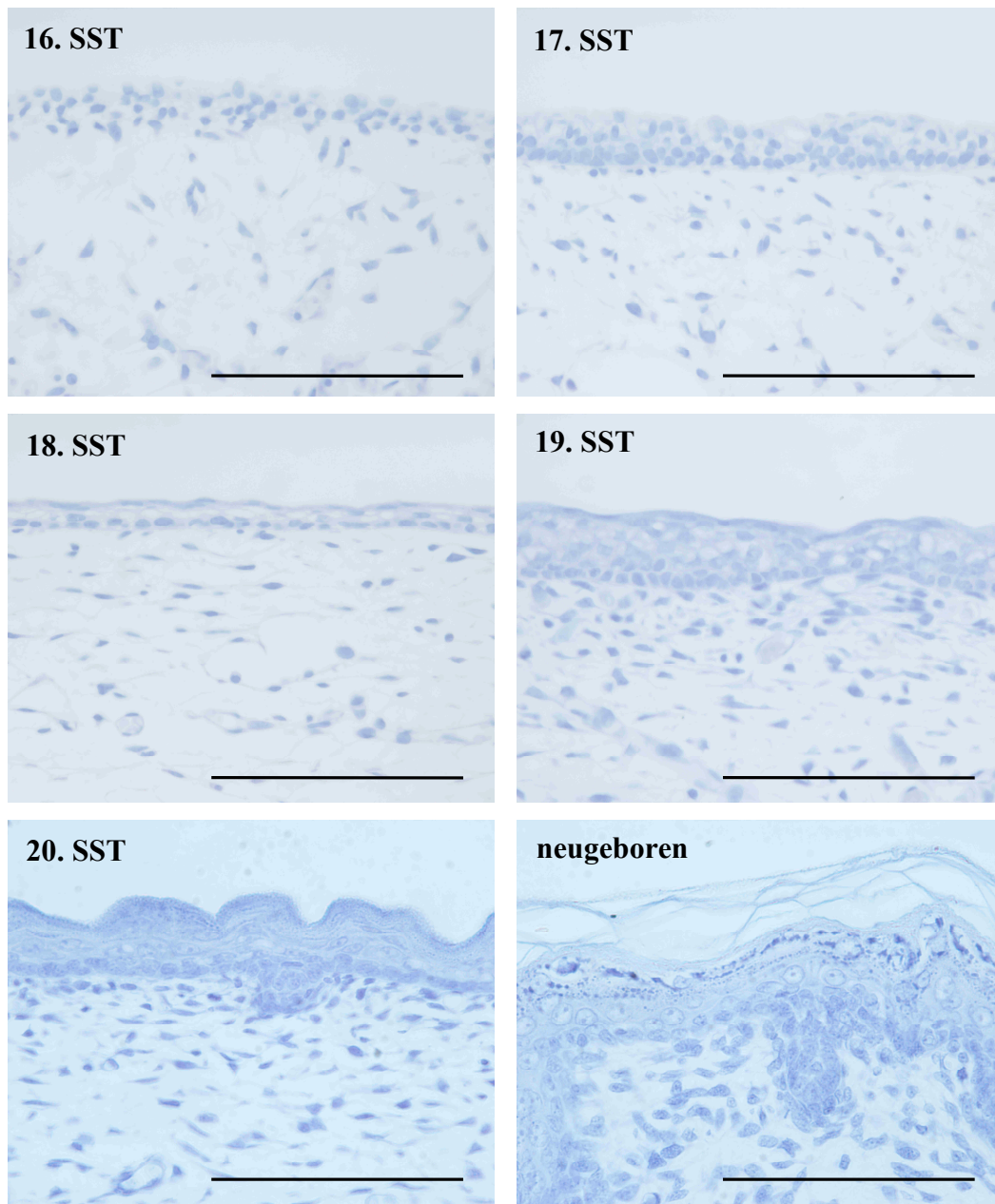


Abbildung 9: Negativkontrollen der LAB-Methode vom 16. SST bis 20. SST und neugeborene Ratten. Es lassen sich keine unspezifischen Färbungen erkennen.
Balken: 100 µm.

HE-Färbungen

Zunächst wurden Gewebeschnitte von Ratten-Feten vom 16. SST bis zum 20. SST und von neugeborenen Ratten mittels HE-Färbung gefärbt, um einen morphologischen Überblick über die Anatomie und Entwicklung der Epidermis der Ratte zu bekommen (Abbildung 10). Man konnte erkennen, dass die Epidermis von Tag zu Tag mehr Zelllagen aufwies. Bei neugeborenen Ratten zeigte sich die typische Schichtung mit Stratum basale/germinativum, intermedium, spinosum, granulare und corneum.

Die Epidermis der Rattenfeten vom 16. SST bestand aus diffus nebeneinander liegenden, im wesentlichen isoprismatischen Zellen ohne erkennbare Schichtung. Am 17. SST zeigten sich ein bis zwei zusätzliche Zelllagen. Der epidermale Zellverband erschien dichter. Ab dem 18. SST konnte man eine basale Zellschicht erkennen, auf die sich weitere Zelllagen aufsetzten. Die Zellen der basalen Schicht, dem Stratum germinativum, waren im wesentlichen isoprismatisch. Je weiter apikal die Zellen lagen, desto flacher wurden sie. Direkt über dem Stratum germinativum zeigte sich nun deutlich das Stratum intermedium / spinosum mit unregelmäßigen, vesikulären Zellen, die ungeordnet ca. 2 – 3 Zelllagen ausmachten. Das Zytoplasma der obersten, flachen Zellen erschien kondensiert und der Zellkern war flach und lang, was typische histologische Erkennungsmerkmale des Periderms sind. Einzeln konnte man auch schon Granula des sich entwickelnden Stratum granulosum erkennen (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 2).

Im subkutanen Gewebe waren zu allen Zeitpunkten lockere Zellverbände und Gefäße mit zum Teil noch enthaltenden Erythrozyten zu erkennen. Die Proben von den Feten vom 19. SST zeigten zusätzliche Zelllagen und einer noch welligeren Oberfläche. Die Zellen des Stratum intermedium / spinosum erschienen noch größer und vesikulärer. Direkt darüber konnte man immer noch deutlich das Periderm erkennen. Hier ließen sich nun im Vergleich zu den Gewebeschnitten von Feten des 18. SST noch regelmäßiger Granula ausmachen als Hinweis auf das Stratum granulosum, welches sich direkt unter dem Periderm entwickelte und je nach Dicke des Periderms fast bis an die Oberfläche reichte. Auffällig war, dass sich zu diesem Zeitpunkt schon regelmäßig Lücken im Periderm feststellen ließen, in denen hornähnliche Strukturen von ihrer Unterlage abzuschilfern schienen.

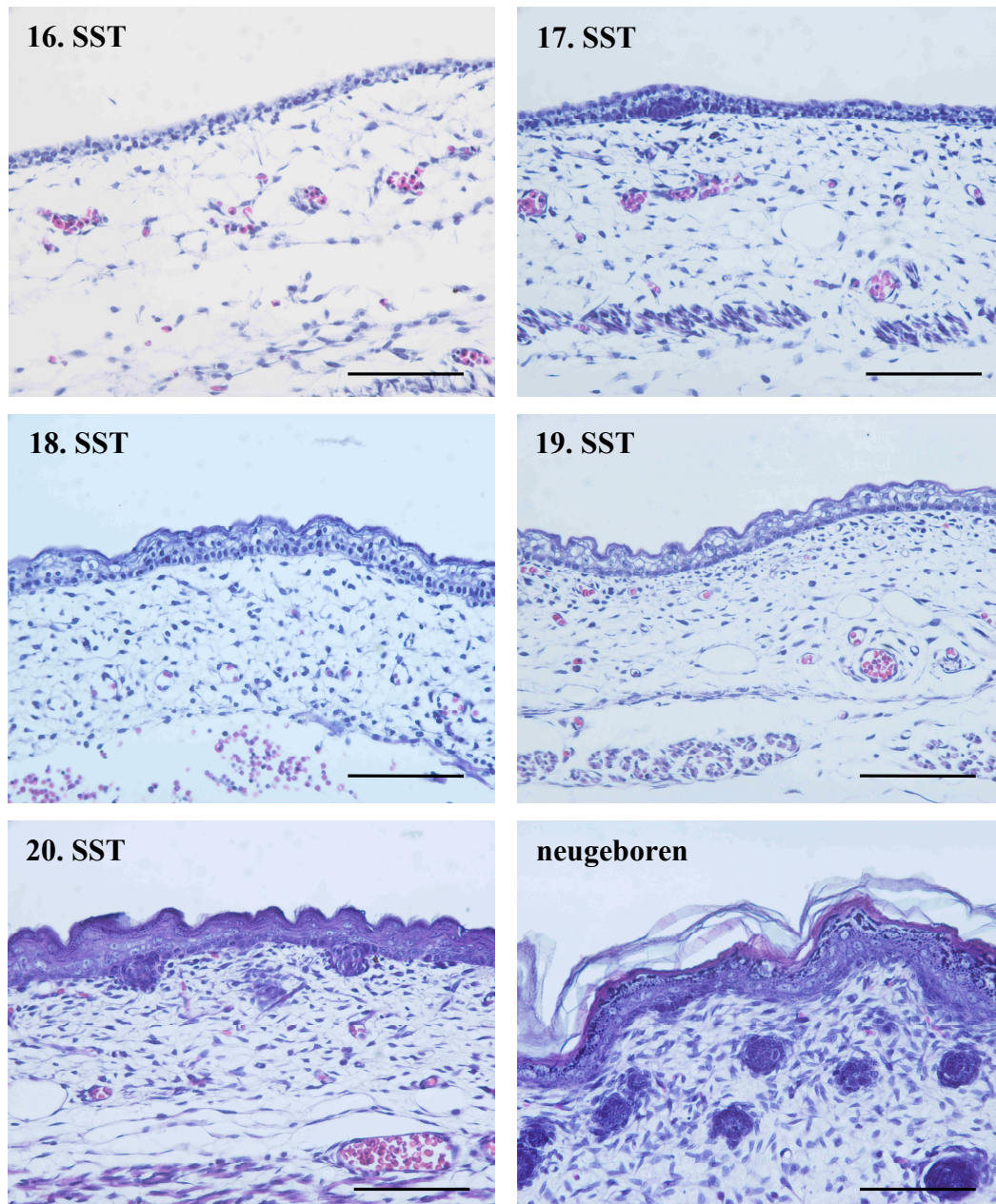


Abbildung 10: HE-Färbungen der Haut von Ratten vom 16. SST bis neugeborene Ratten .
Balken: 100 μ m

Die Epidermis der Rattenfeten des 20. SST erschien im Gesamten gedrungener. Die großen Vakuolen und Vesikel im Stratum intermedium und spinosum vor dem 20. SST, die diesen Zellschichten ein aufgelockertes Aussehen gaben, waren nun nicht mehr so ausgeprägt vorhanden. Zellgrenzen ließen sich nur schwer erkennen. Deutlich zeigte sich nun ein Stratum granulosum. Es ließ sich auch eine dünne Schicht abgeschilfterter Hornlamellen erkennen als erstes Zeichen für die Bildung eines Stratum corneum, welches nicht kontinuierlich über das gesamte Integument sichtbar war. Ähnliches war schon vereinzelt bei den Proben der Feten

vom 19. SST und sogar vom 18. SST erkennbar. Peridermzellen ließen sich nur noch vereinzelt darstellen. Ab dem 20. SST waren auch Haarfollikel zu sehen, die von der Epidermis bis in die darunterliegende Subkutis reichten. Die Epidermis der neugeborenen Ratte zeigte das Bild eines ausdifferenzierten, mehrschichtigen, verhornenden Epithels. Eine deutliche Hornschicht war nun abgrenzbar. Im Stratum granulosum fanden sich eosinophile Granula. Höhere Vergrößerungen zur Benennung der einzelnen Schichten sind in Abbildung 11 dargestellt.

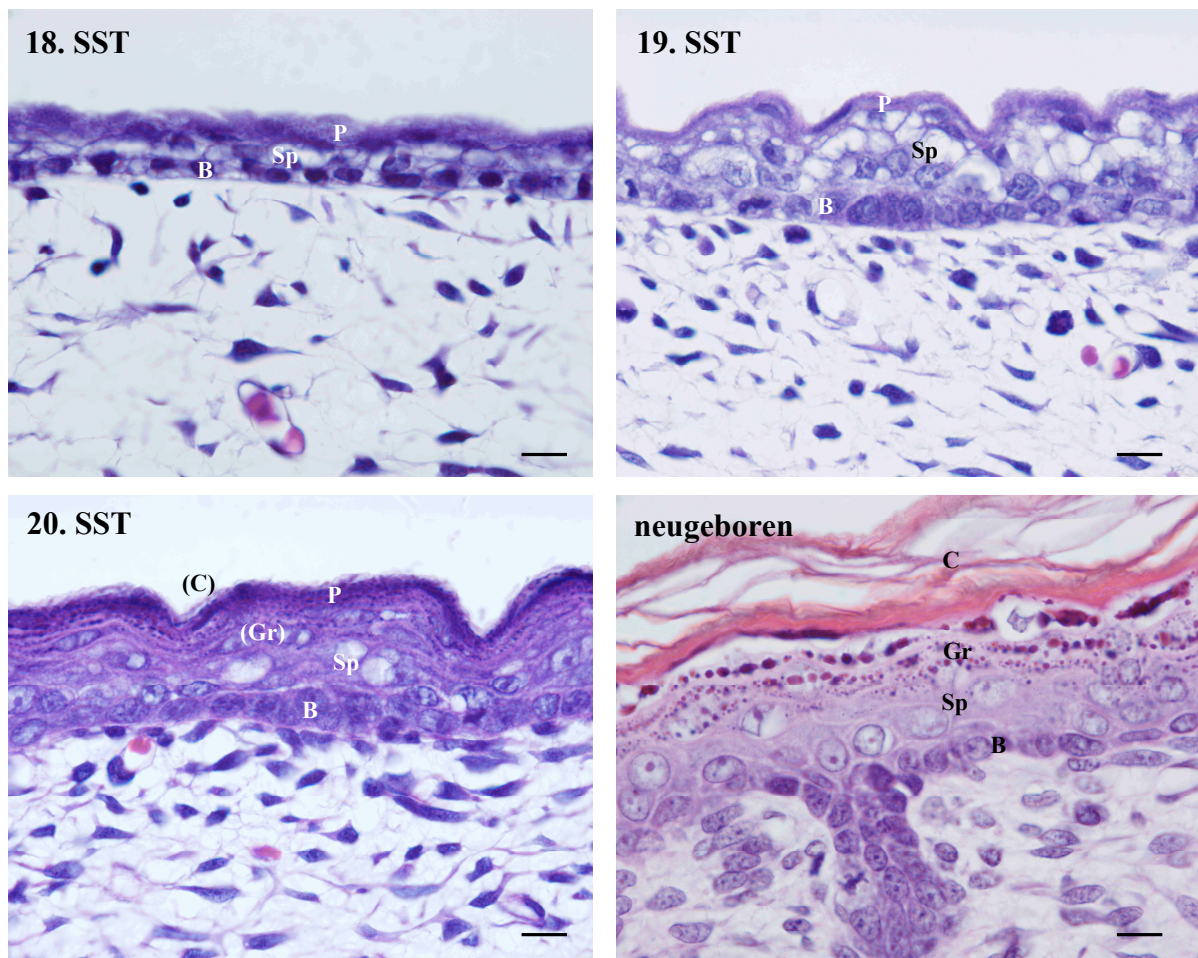


Abbildung 11: HE-Färbungen der Rattenhaut vom 18. SST bis neugeborene Ratten. B: Stratum basale; P: Periderm; Sp: Stratum spinosum; Gr: Stratum granulosum; C: Stratum corneum.
Balken: 10 µm

Sulphydryloxidase

Die Schnitte von embryonaler und neugeborener Ratte wurden außer mit HE-Färbungen auch mittels immunhistochemischer Verfahren auf die Anwesenheit des Enzyms SOX untersucht. Zur Anwendung kam ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen SOX aus der Bläschen-drüse der Ratte. Die Immunkomplexe wurden mittels Immunfluoreszenz bzw. mit Hilfe der LAB-Methode lichtmikroskopisch nachgewiesen. Ziel beider Nachweismethoden war einerseits, die genaue Lokalisation und Verbreitung dieses Enzyms in der Epidermis zu untersuchen, und andererseits den Zeitpunkt des ersten Auftretens des Antigens während der Embryogenese zu bestimmen.

Die beiden immunhistologischen Methoden zur Detektion des Haut-SOX-Antigens in der embryonalen und neugeborenen Rattenhaut haben im Wesentlichen die gleichen Ergebnisse erbracht. Sie unterschieden sich jedoch aufgrund der unterschiedlichen Auswertungsmethoden (Fluoreszenzmikroskopie vs. Lichtmikroskopie) und der sich daraus ergebenden Kontrast- und Farbunterschiede, so dass insbesondere die Verteilung des SOX-Antigens unterschiedlich bewertet werden konnte. Darüberhinaus war die LAB-Methode eine gute Kontrolle des weiter oben beschriebenen Artefaktes der fluoreszierenden Sekundärantikörper (siehe ab Seite 36), da die artifizielle Färbung des beginnenden Stratum corneum / Periderms hier nicht auftrat. Eine vergleichende Übersicht von HE-, LAB- und Fluoreszenzbildern ist in Abbildung 12 gezeigt.

Die Gewebeschnitte, die mittels der Immunfluoreszenztechnik behandelt wurden, zeigten am 16. und 17. SST in der Epidermis keinerlei Signal, gleiches galt für die Bilder der LAB-Methode. Am 18. SST wurde ein klares, über der obersten Zellschicht gelegenes Fluoreszenzsignal sichtbar. Mittels der LAB-Methode zeigte sich zusätzlich auch eine leichte, diffuse Braunfärbung der gesamten Epidermis. Diese Färbung wurde in Hautpartien am Rücken der Tiere am 19. SST wieder diffuser und eher auf die gesamte Epidermis verteilt. Das bei den Gewebeproben des 19. SST erkennbare Fluoreszenzsignal an den apikalen Zellschichten ließ sich am ehesten auf den weiter oben beschriebenen Sekundärantikörperartefakt zurückführen, da eine entsprechende Färbung mittels der LAB-Methode nicht gelang.

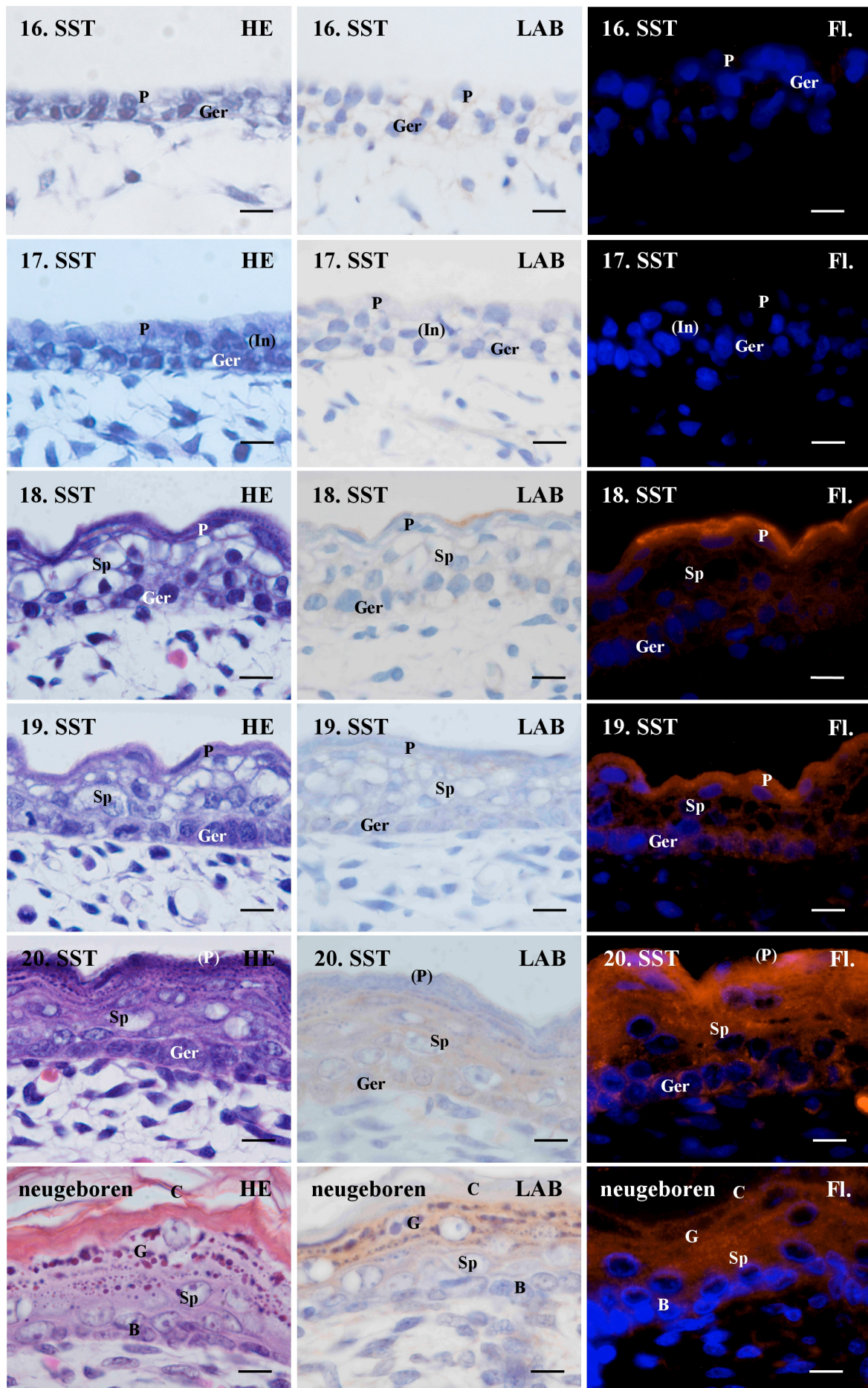


Abbildung 12: Erklärung auf Seite 48

Erklärung zu Abbildung 12 auf Seite 47: Vergleichende Darstellung der HE-Färbung (Links), LAB-Färbung (Mitte) und Immunfluoreszenz (Rechts) mit Anti-SOX-Antikörper vom 16. SST bis zur neugeborenen Ratte, dorsale Hautpartien. Fl: Fluoreszenz; B: Stratum basale; Sp: Stratum spinosum; P: Periderm; C: Stratum corneum; G: Stratum granulosum; In: Stratum intermedium; Ger: Stratum germinativum.
Balken: 10 μ m

Die Epidermis der Feten des 20. SST fand sich mittels der LAB-Methode intensiv und homogen gefärbt. Unter Verwendung der Immunfluoreszenztechnik war dagegen apikal eine stärkere Signalintensität zu beobachten als in den basalen Zellschichten.

Bei den Gewebeschnitten von neugeborenen Ratten war eine Markierung der SOX konzentriert und spezifisch im Stratum granulosum der Epidermis zu erkennen, sowohl mittels der Fluoreszenz- als auch mit der LAB-Methode. Die basalen Zellschichten blieben frei, ebenso die Haarfollikel. Einzelne Lamellen der nun aufgelockerten Hornschicht reagierten ebenfalls positiv.

Auffällig war ein deutlicher Unterschied zwischen dorsalen und ventralen Hautpartien. Dorsal zeigte sich ab dem 18. SST die klar zu erkennende, in der obersten Zellschicht gelegene Fluoreszenz, wohingegen ventral dieses noch nicht sichtbar war (siehe Abbildung 13). Erst am 19. SST ließ sich auch an der ventralen Rattenhaut ein ähnliches Signal erkennen. Bei den Proben der neugeborenen Tiere war in der Epidermis ein Unterschied in der Fluoreszenzintensität zu erkennen: dorsal war die Fluoreszenz intensiver und stärker als ventral. Diese Ergebnisse konnten mit beiden Detektionsverfahren erzielt werden.

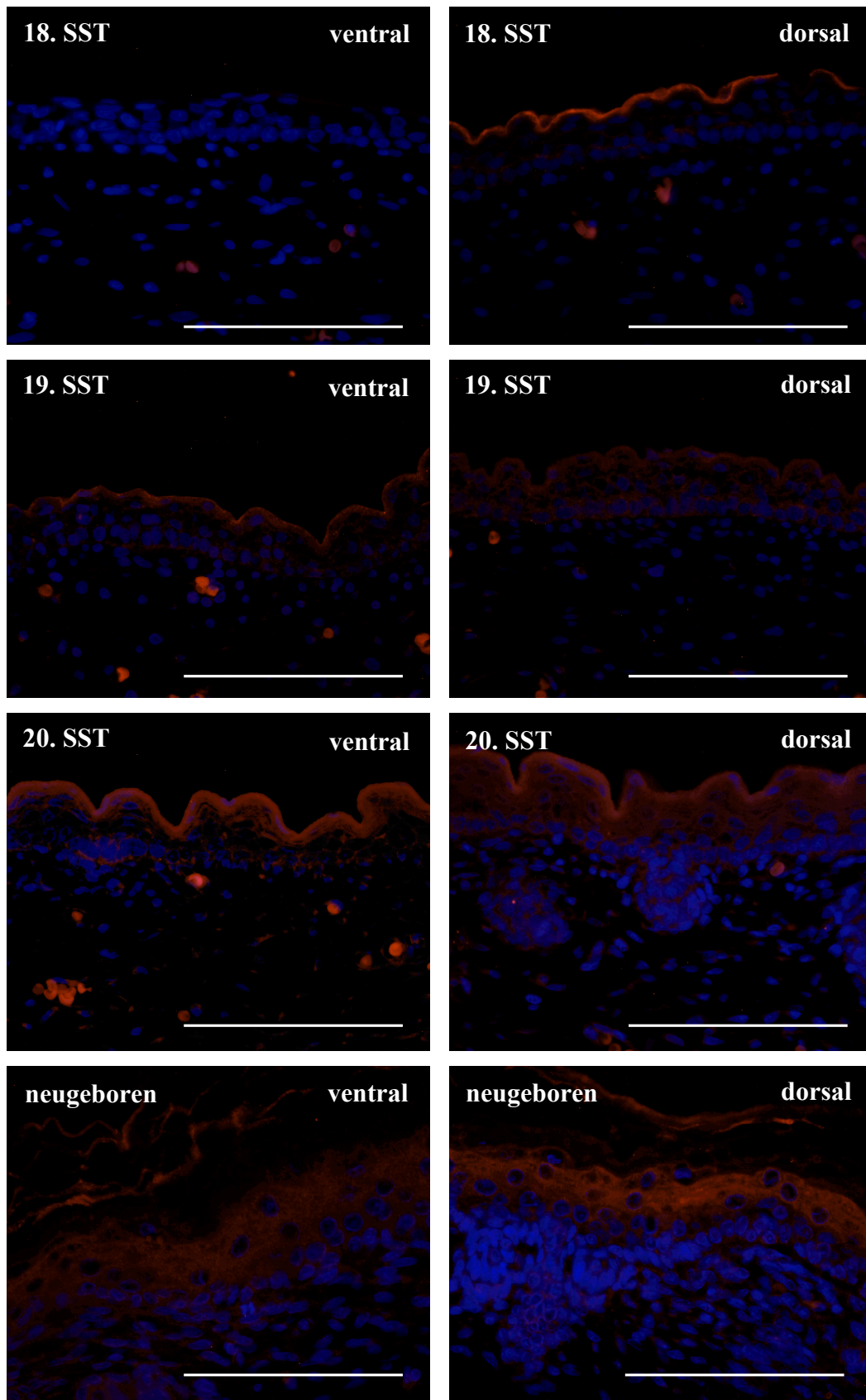


Abbildung 13: Immunfluoreszenz, SOX-Cy3 + DAPI-Kernfärbung zur Darstellung des unterschiedlichen Nachweises des SOX-Antigens in der ventralen und dorsalen Rattenhaut.
Balken: 100 μ m

Bezüglich der Nachweisbarkeit der SOX in der fetalen Rattenhaut war der 18. SST sehr bedeutsam. Hier ließ sich an der dorsalen Rattenhaut zum ersten Mal das Antigen detektieren. Abbildung 14 zeigt einige Ausschnitte von diesem Zeitpunkt. Es war auffällig, dass die bandförmigen Immunreaktionen über der Epidermis nur abschnittsweise zu erkennen waren. Es gab weite Abschnitte, die markiert waren, neben ebenso langen Abschnitten ohne erkennbares Fluoreszenzsignal. Dies zeigte sich sowohl am 18. SST an der dorsalen als auch am 19. SST an der ventralen Rattenhaut.

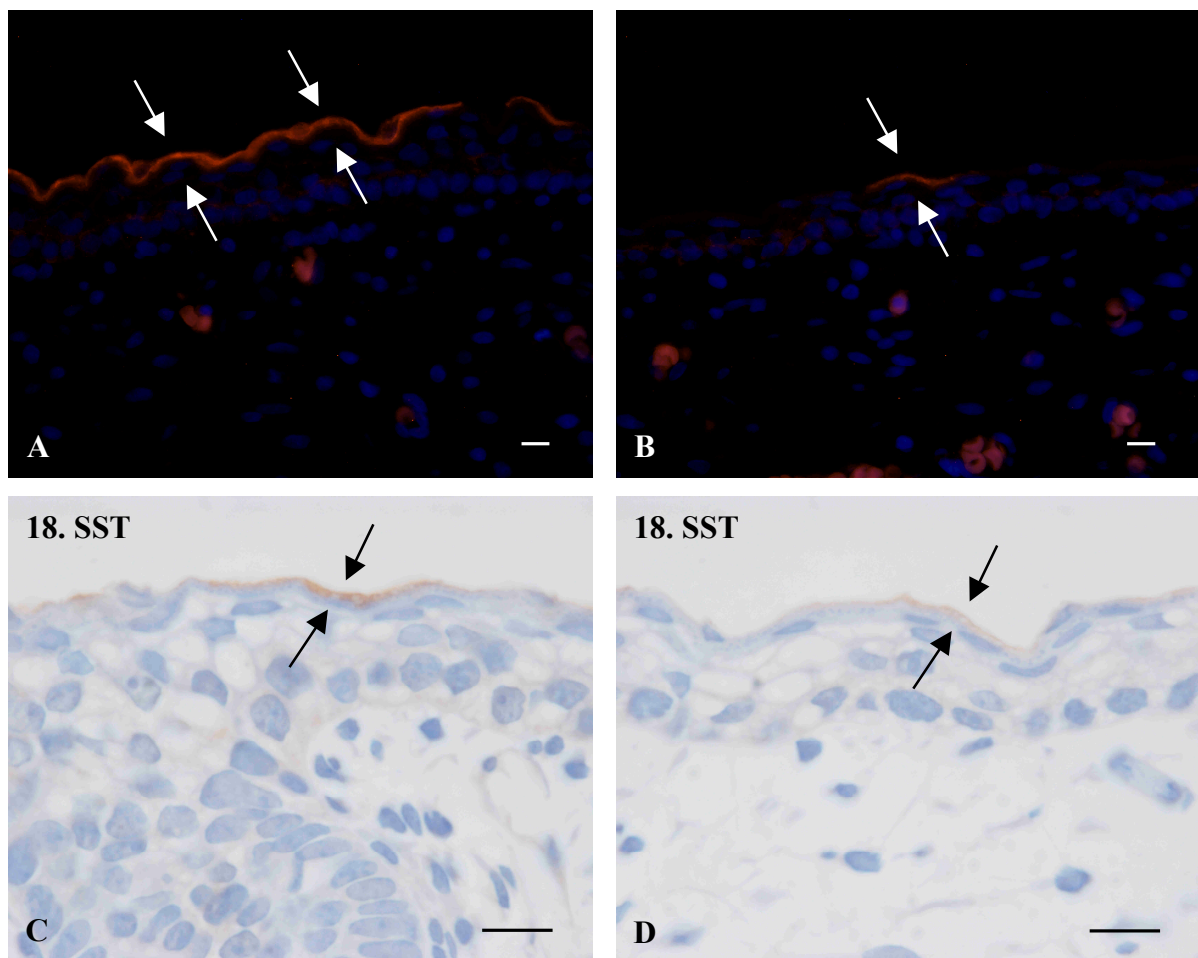


Abbildung 14: Mehrere Ausschnitte aus der dorsalen Haut eines Rattenfetus zum Zeitpunkt 18. SST, die Kontrollen sind nicht abgebildet. Die abschnittsweise vorkommenden Markierungen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. A+B Immunfluoreszenz-, C+D LAB-Technik. Balken: 100 µm.

Die unterschiedliche Aussagekraft der beiden Detektionsverfahren wird besonders bei Betrachtung in höherer Vergrößerung deutlich. Abbildung 15 zeigt exemplarisch Ausschnittsvergrößerungen ab dem 18. SST bis zur neugeborenen Ratte (Immunfluoreszenztechnik).

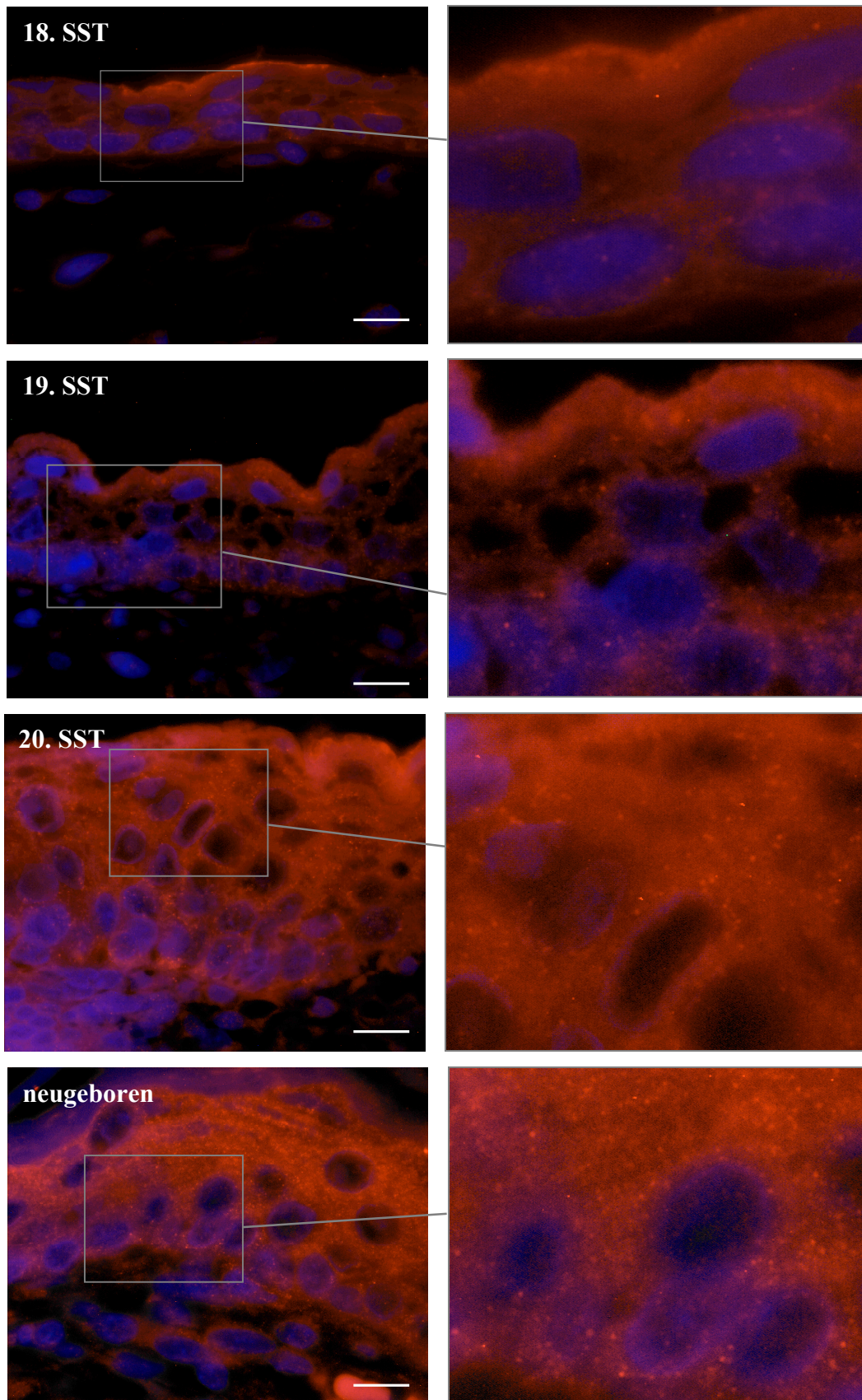


Abbildung 15: Ausschnittsvergrößerungen ab dem 18. SST, Anti-SOX, dorsale Hautpartien der Ratte. Rechts jeweils der markierte Ausschnitt aus links. Immunfluoreszenztechnik. Balken: 10 µm

Hier war zu erkennen, dass sich das Signal in punktförmigen, granulären, im Cytoplasma verteilten Strukturen konzentrierte. Dies galt auch für die weiter oben beschriebenen bandförmigen Strukturen am 18. SST (vgl. Abbildung 11).

Abbildung 16 zeigt ähnliche Ausschnittsvergrößerungen von Proben, die mittels der LAB-Methode behandelt wurden. Erkennbar war hier eine homogene Verteilung des Farbsignals ohne erkennbare Granula.

Tabelle 6 gibt einen zusammenfassenden Überblick über das Auftreten des SOX-Antigens während der fetalen Entwicklung der Rattenhaut in den einzelnen Epidermisschichten. Es wurden hierfür nur die dorsalen Hautpartien berücksichtigt. Wie weiter oben ausgeführt konnte in ventralen Hautpartien das SOX-Antigen erst einen SST später nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der SOX-Nachweisbarkeit in den verschiedenen Epidermisschichten während der Entwicklung vom 16. SST bis zur neugeborenen Ratte in der dorsalen Epidermis. +: SOX nachweisbar; ++: SOX deutlich nachweisbar; (+): SOX fraglich oder unspezifisch nachweisbar.

| SOX | 16. | 17. | 18. | 19. | 20. | neug. |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| Stratum corneum | | | | (+) | (+) | (+) |
| Stratum granulosum | | | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Stratum spinosum | | | (+) | + | ++ | |
| Stratum intermedium | | | (+) | + | + | |
| Stratum germinativum / basale | | | (+) | + | + | |

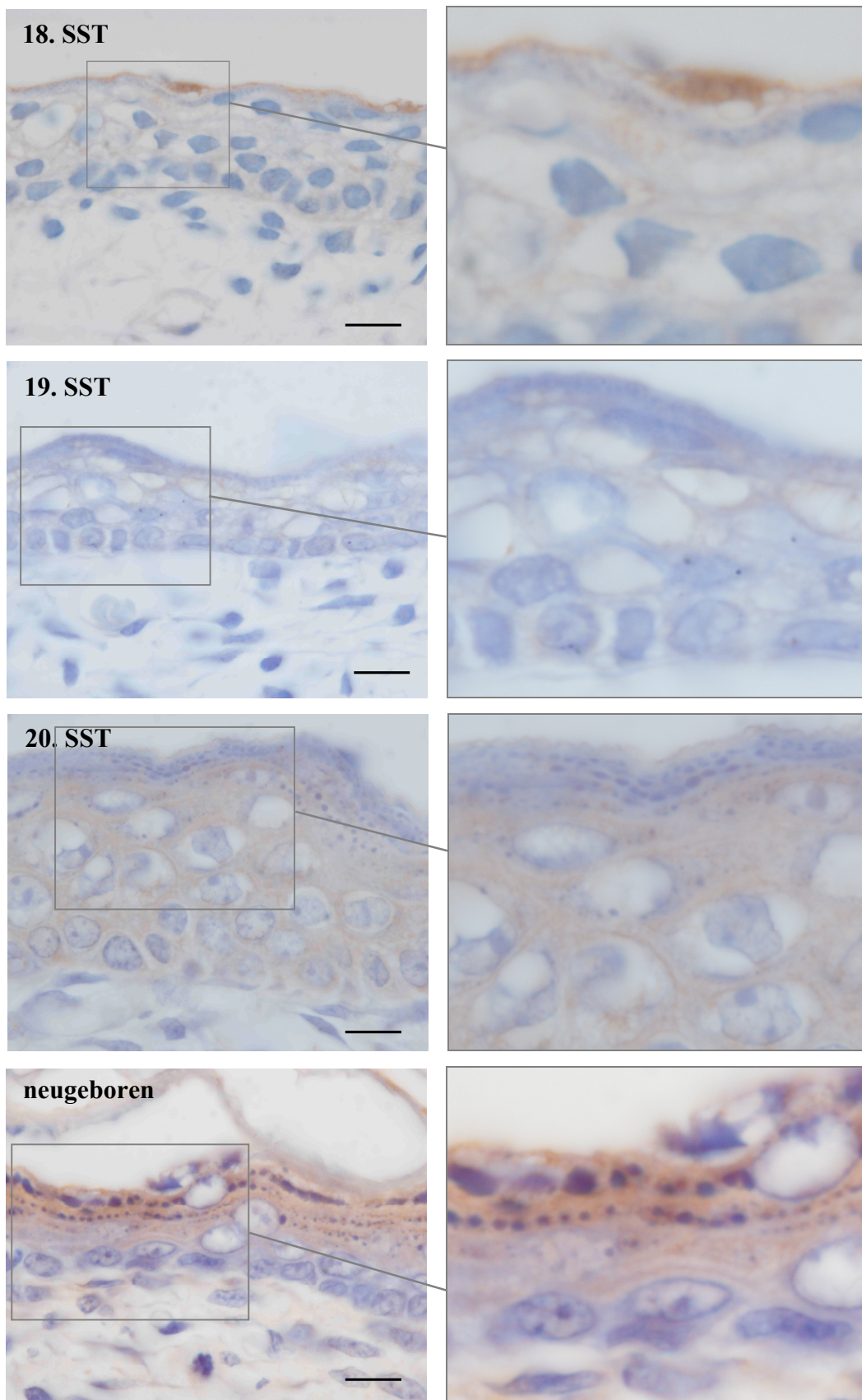


Abbildung 16: LAB-Färbungen der dorsalen Rattenhaut vom 18. SST bis neugeborene Ratte, rechts Ausschnittsvergrößerungen aus links.
Balken: 10 µm

Katalase

In der Entwicklung und Funktion der Haut wird der Katalase eine wichtige Rolle im Redox-System zugeschrieben. Im Folgenden wurde mit den gleichen Methoden wie im vorherigen Abschnitt auch die Katalase nachgewiesen. Hier wurden ebenfalls den Fragen nach dem Zeitpunkt des ersten Auftretens und der Lokalisation nachgegangen, um die Ergebnisse mit denen der SOX zu vergleichen.

Die Ergebnisse ließen auch hier sowohl Unterschiede zwischen als auch Gemeinsamkeiten bei den beiden Detektionsmethoden erkennen. Während die LAB-Methode eher genauere Aussagen über die Lokalisation des Antigens in den jeweiligen Zellschichten zuließ, konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik eher das erste Auftreten und die intrazelluläre Verteilung der Katalase beurteilt werden. Analog zu Abbildung 12 sind auch für die Reaktionen mit dem Anti-Katalase-Antikörper vergleichende Bildserien mit HE-Färbung, LAB-Färbung und Immunfluoreszenz abgebildet (siehe Abbildung 17).

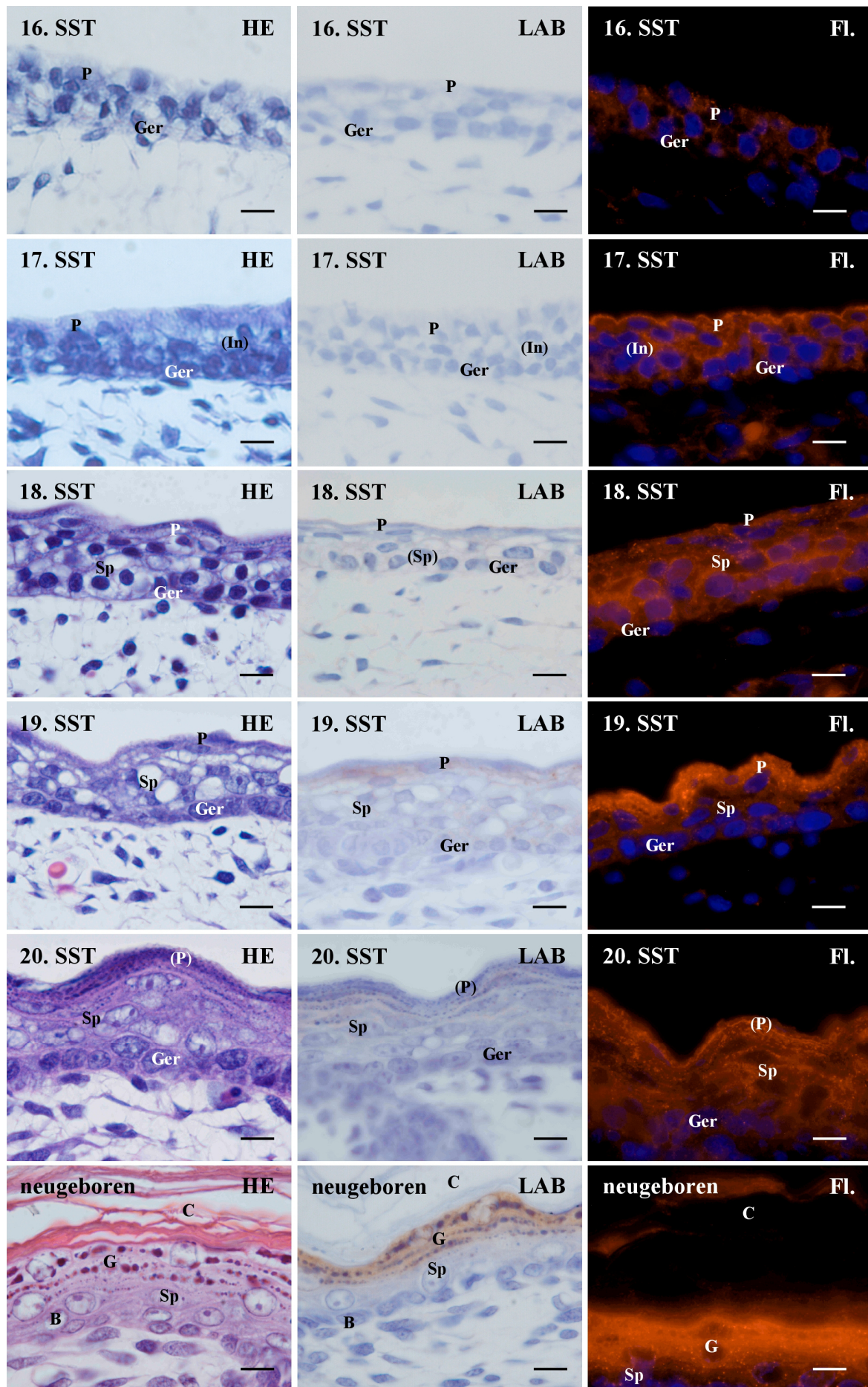


Abbildung 17: Erklärung auf Seite 56

Erklärung zu Abbildung 17 auf Seite 55: Vergleichende Darstellung der HE-Färbung (Links), LAB-Färbung (Mitte) und Immun-fluoreszenz (Rechts) mit Anti-CAT vom 16. SST bis zur neugeborenen Ratte, dorsale Hautpartien. Fl: Fluoreszenz; B: Stratum basale; Sp: Stratum spinosum; P: Periderm; C: Stratum corneum; G: Stratum granulosum; In: Stratum intermedium; Ger: Stratum germinativum.
Balken: 10 μ m

Bereits am 16. SST war ein schwaches Fluoreszenzsignal in der gesamten Epidermis erkennbar. In höheren Vergrößerungen (siehe Abbildung 18) war zu sehen, dass der fluoreszierende Immunkomplex feinkörnig granulär in den Epidermiszellen verteilt war, vermutlich den Peroxisomen entsprechend. Diese feinkörnige Verteilung blieb während des gesamten untersuchten fetalen Entwicklungszeitraums bestehen.

Am 17. SST und 18 SST war jeweils das Fluoreszenzsignal immer deutlicher und kräftiger zu erkennen. Am 17. SST waren jedoch in den apikalen Zellschichten tendenziell mehr Granulae zu erkennen als in den basalen Epidermisschichten, am 18. SST war dies genau umgekehrt.

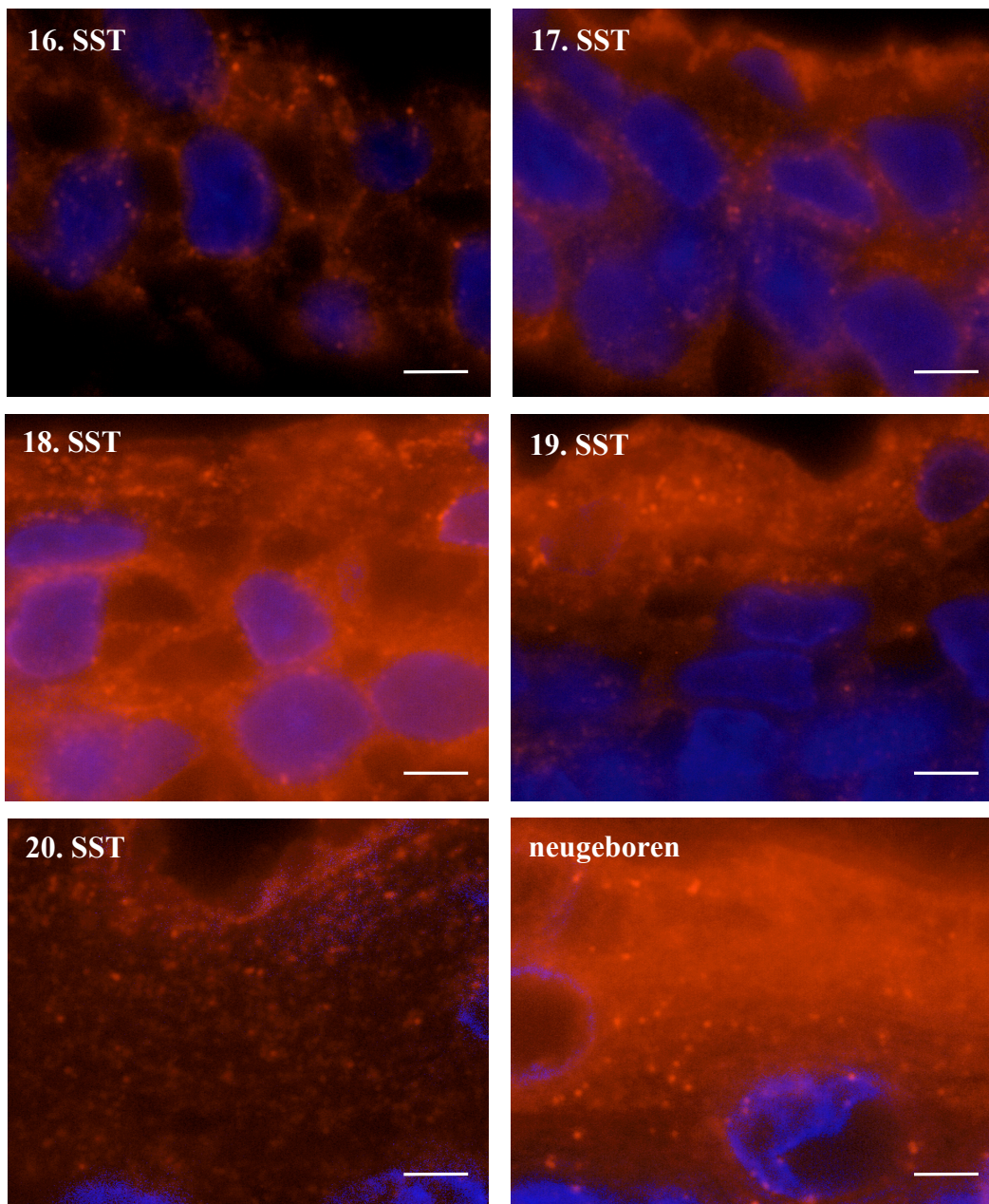


Abbildung 18: Ausschnittsvergrößerungen, Immunfluoreszenz mit Anti-Katalase-Cy3 + DAPI-Kernfärbung der dorsalen Rattenhaut. Rechts: Ausschnitte aus links. Balken: ca. 5 μm

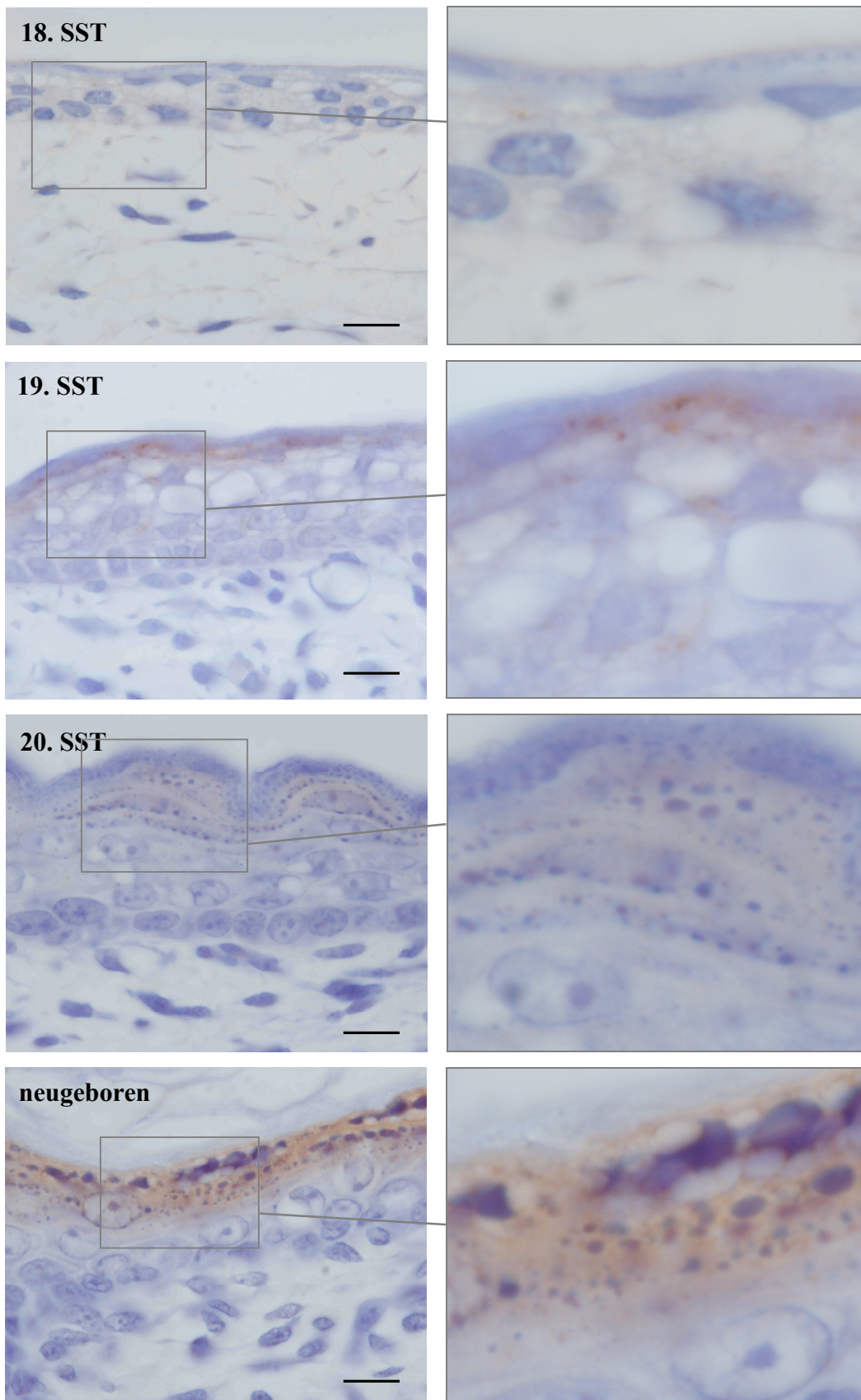


Abbildung 19: Ausschnittsvergrößerungen, LAB-Methode mit Anti-Katalase ab dem 18. SST.
Balken: 10 µm

Vom 18. zum 19. SST war eine deutliche Veränderung der Lokalisation des CAT-Antigens zu sehen. Die vorher vor allem basal erkennbare Immunfluoreszenz war gänzlich nach apikal verlagert. Vor allem in den Proben der Rattenfeten, die mittels der LAB-Methode behandelt wurden, ließ sich gut erkennen, dass die markierten Strukturen eher unter dem Periderm lokalisiert waren.

Eine ähnliche Verteilung war auch bei den Gewebeschnitten des 20. SST zu sehen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals war teilweise zu diesem Zeitpunkt noch intensiver als am 19. SST.

Auf den Gewebeschnitten der neugeborenen Ratten zeigte sich letztendlich eine spezifische Immunreaktion im Stratum granulosum. Besonders hervorzuheben bei der Haut der neugeborenen Ratte sind einzelne Katalase-positive Zellen bzw. Zellgruppen, die am Grund von Haarfollikeln lokalisiert waren. Vergleicht man ventrale und dorsale Hautpartien, so war kein Unterschied beim Nachweis der Katalase zu erkennen.

Tabelle 7 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse beider Detektionsverfahren mit dem Katalase-Antikörper.

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der Katalase-Nachweisbarkeit in den verschiedenen Epidermisschichten während der Entwicklung vom 16. SST bis zur neugeborenen Ratte in der dorsalen Epidermis. +: Katalase nachweisbar; ++: Katalase deutlich nachweisbar; (+): Katalase schwach nachweisbar.

| Katalase | 16. | 17. | 18. | 19. | 20. | neug. |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| Stratum corneum | | | | (+) | + | (+) |
| Stratum granulosum | (+) | + | + | ++ | + | ++ |
| Stratum spinosum | (+) | + | + | (+) | + | |
| Stratum intermedium | (+) | + | + | (+) | | |
| Stratum germinativum / basale | (+) | + | + | (+) | | |

Haarfollikel

Am Grund von Haarfollikeln ließen sich regelmäßig Ansammlungen von Zellen erkennen, die mit beiden immunhistologischen Detektionsverfahren eine besonders intensiv positive Immunreaktion für Katalase zeigten. Dies ließ sich nur auf den Gewebeschnitten von neugebo-

renen Ratten beobachten, nicht jedoch bei den anderen untersuchten Stadien der fetalen Entwicklung. Abbildung 20 zeigt zwei Beispiele in unterschiedlichen Vergrößerungen.

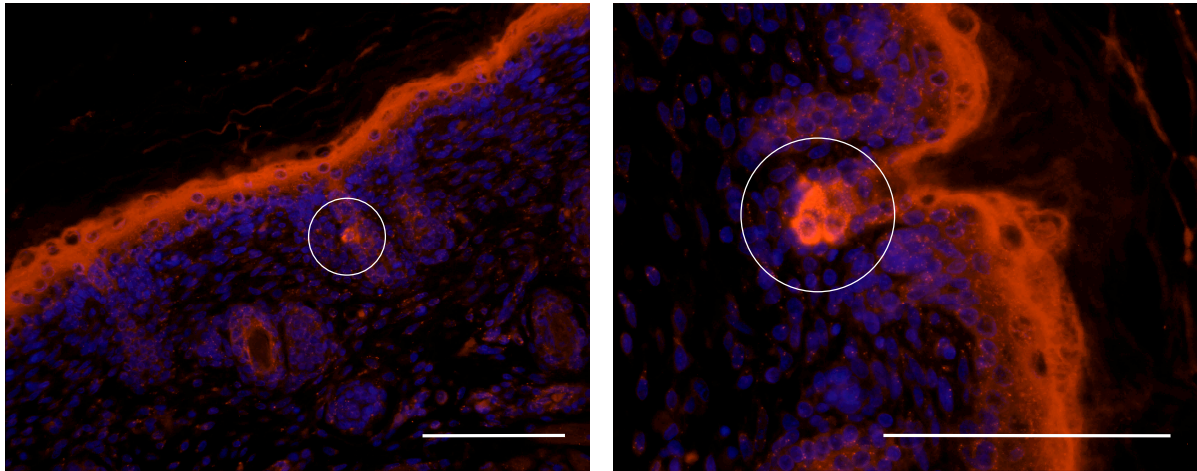


Abbildung 20: Beispiele von Katalase-positiven Zellen in den Haarfollikeln der neugeborenen Rattenhaut (Immunfluoreszenztechnik)
Balken: 100 µm

Man erkennt deutlich das Katalase-Antigen im Stratum granulosum als kontinuierliches Fluoreszenzsignal. Im subkutanen Gewebe sind hauptsächlich die blau gefärbten Zellkerne der Bindegewebszellen zu erkennen (DAPI). Am Grund und am Rand von einzelnen Haarfollikeln waren einzelne, wenige, zusammenliegende Zellen zu erkennen, welche sich ebenfalls mit dem Antikörper intensiv markieren ließen. Auch mit der LAB-Methode ließen sich diese Zellen nachweisen, wie Abbildung 21 zeigt. Im Längsschnitt der Haarfollikel lagen diese Zellen gegenüber, was vermuten ließ, dass sich diese Katalase-positiven Zellen als eine Art Ring um das Haar legten. Teilweise war aber auch nur eine einzelne Zelle zu finden, welche die beschriebene Markierung zeigte.

Abbildung 22 zeigt diese Zellen und Zellnester in höherer Vergrößerung (Immunfluoreszenz- und LAB-Methode). Analog zur Epidermis lassen sich hier punktförmige Strukturen erkennen, die im gesamten Zytoplasma einzelner Zellen verteilt sind (Peroxisomen).

Anzumerken ist, dass das SOX-Antigen an den Haarfollikeln nicht detektiert werden konnte.

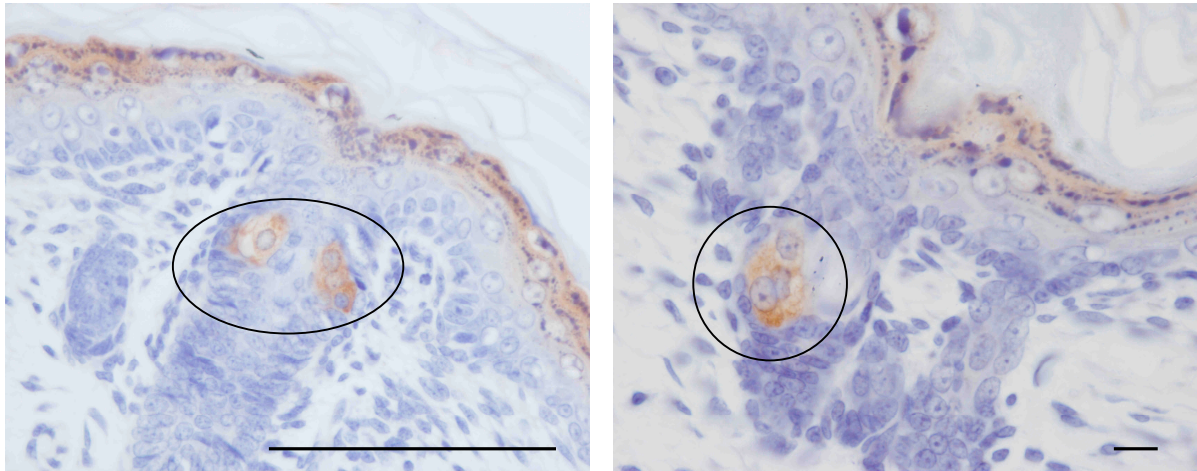


Abbildung 21: Beispiele von Katalase-positiven Zellen in den Haarfollikeln der neugeborenen Rattenhaut (LAB-Methode).

Balken: links 100 μm , rechts 10 μm

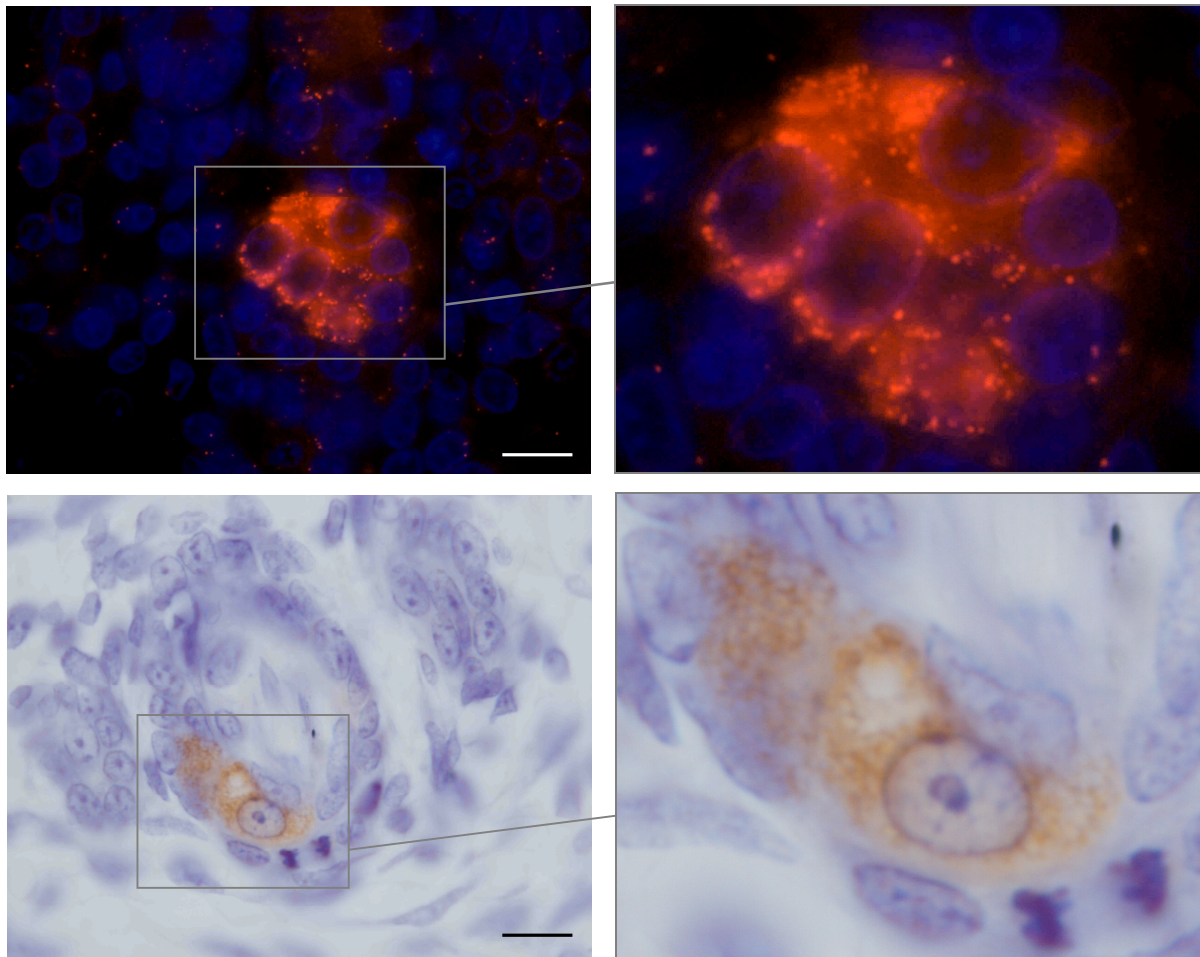


Abbildung 22: Katalase-positive Zellen in höherer Vergrößerung an den Haarfollikeln der Haut von neugeborenen Ratten, nachgewiesen mit Anti-Katalase mittels Immunfluoreszenztechnik (oben) und LAB-Methode (unten).

Rechts Ausschnitte aus links.

Balken: 10 μm

Ösophagusepithel

Die Hornschicht der Haut nimmt eine wichtige mechanische und chemische Schutzfunktion wahr. Zum Aufbau dieser Hornschicht werden SH-Gruppen der Strukturproteine durch die SOX verknüpft. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die SOX während der fetalen Entwicklung der Rattenhaut ab dem 18. SST in apikalen Zellschichten auftritt und bis zur Geburt spezifisch im Stratum granulosum nachzuweisen ist.

Bei der Ratte ist auch das Ösophagusepithel, im Unterschied zum menschlichen Ösophagus, ein verhorntes Plattenepithel. Es wurde deshalb als weiteres Beispiel eines verhornten Epithels auf die Nachweisbarkeit der beiden Antigene untersucht.

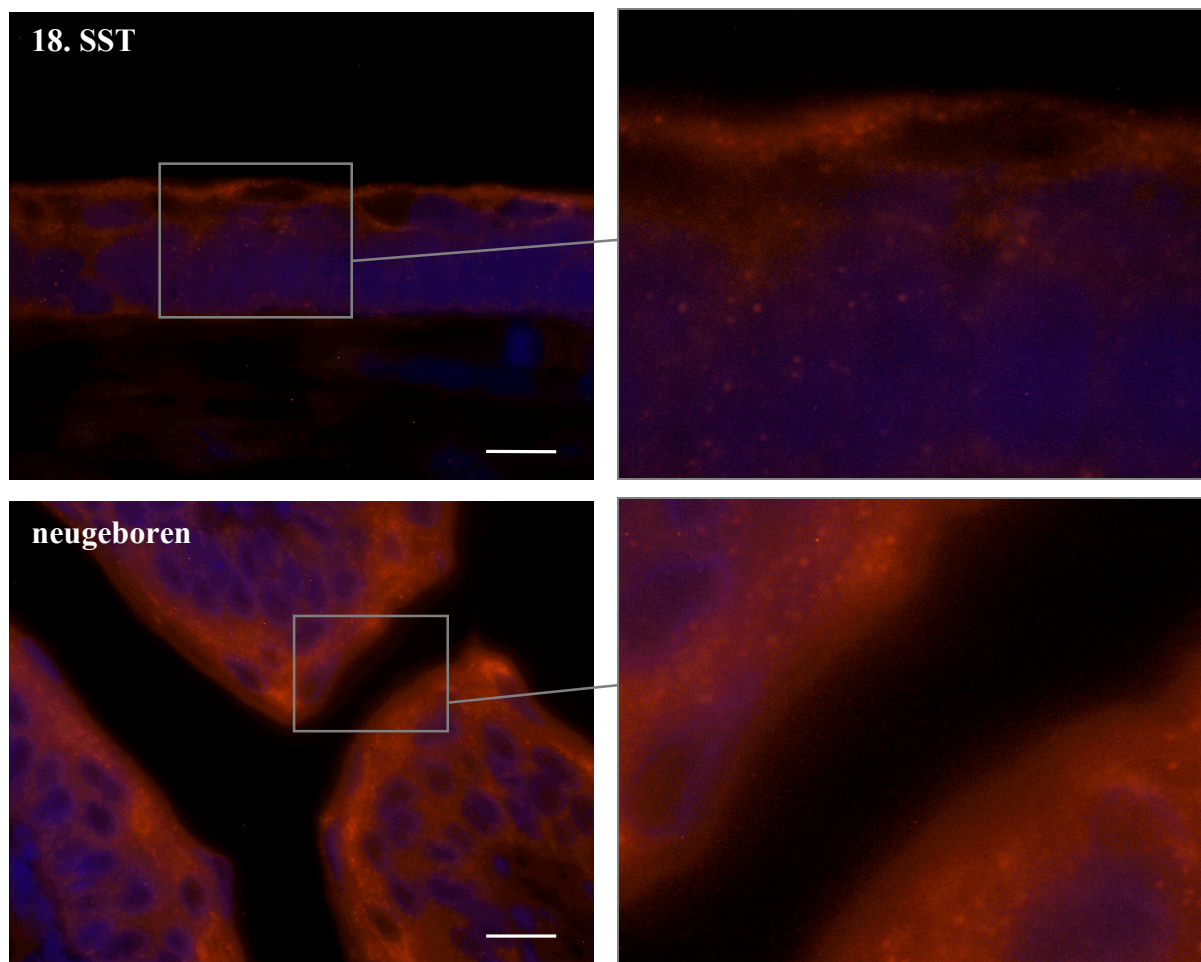


Abbildung 23: Ösophagus der Ratte, Immunfluoreszenztechnik mit Anti-SOX am 18. SST und beim neugeborenen Tier.

Balken: 10 µm

Die Ergebnisse ähnelten denen der Untersuchungen an der Epidermis. Ab dem 18. SST ließ sich das SOX-Antigen diskontinuierlich über der obersten Zellschicht nachweisen. Abbildung 23 und Abbildung 24 zeigen exemplarisch Ausschnittsvergrößerungen von Gewebeschnitten des Rattenösophagus vom 18. SST und von neugeborenen Ratten. Auch hier war die aus z.B. der Abbildung 15 bekannte feinkörnige Verteilung des SOX-Antigens zu erkennen.

Auf den Gewebeschnitten neugeborener Ratten ließ sich eine gleichmäßige Verteilung des SOX-Antigens im Epithel erkennen. Darüberhinaus fielen aber einzelne Zellen auf, deren Zytoplasma deutlich kräftiger markiert war. Diese befanden sich ausschließlich in der obersten Zellschicht. In der Epidermis waren solche Zellen nicht zu erkennen.

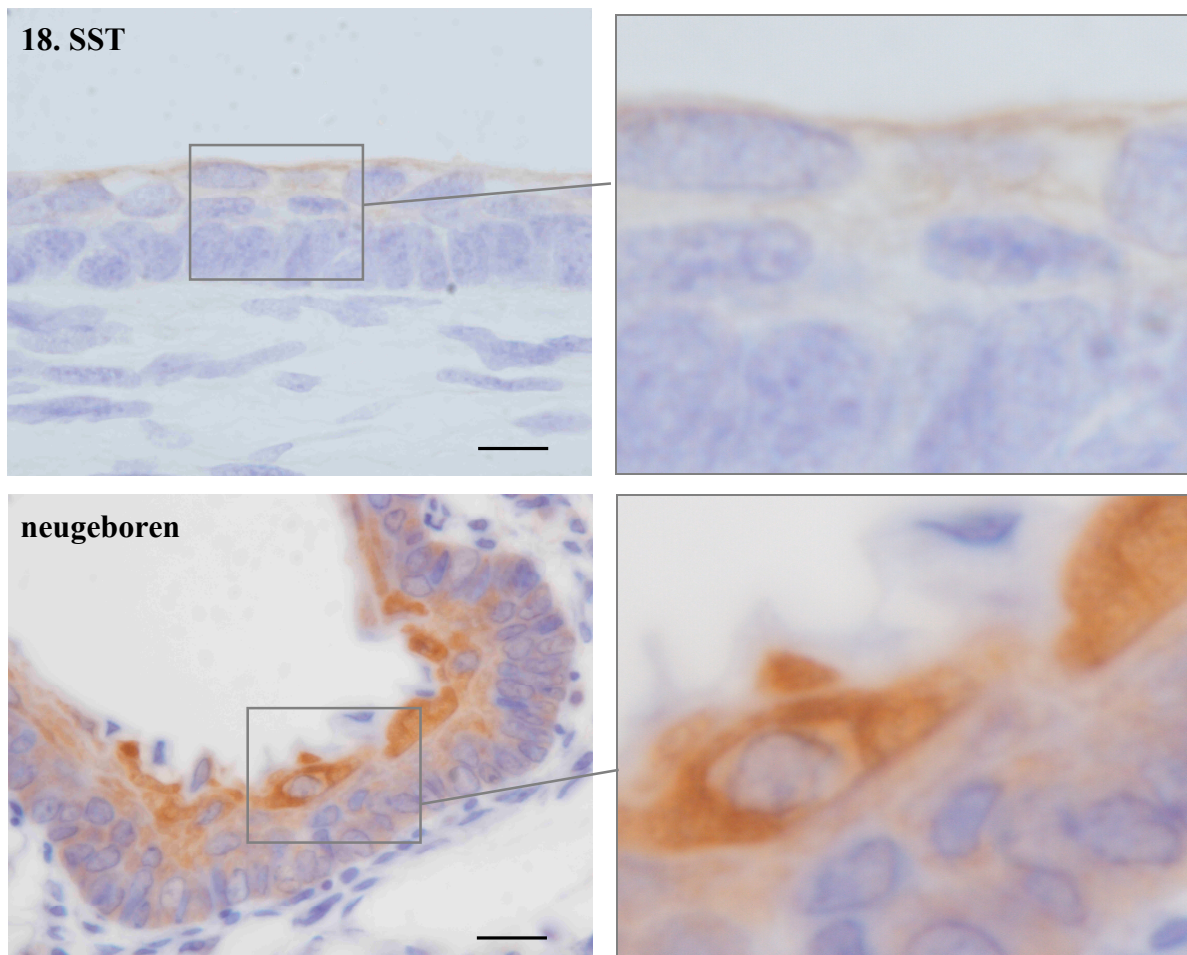


Abbildung 24: Ösophagus der Ratte, LAB-Technik mit Anti-SOX am 18 SST. und beim neugeborenen Tier.
Balken: 10 µm

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Untersuchungen mit dem SOX-Antikörper ist das Katalase-Antigen im Epithel des Ösophagus gleichmäßig nachweisbar ohne Hinweis auf das Vorliegen von besonders markierten Zellen im Epithelverband (Abbildung 25).

In den Gewebeschnitten, die mittels der LAB-Technik behandelt wurden, ließ sich die körnige Verteilung erkennen wie sie in der Epidermis zu sehen war. Dagegen fand sich in den Proben, die mittels der Immunfluoreszenzmethode untersucht wurden, eine gleichmäßige Immunfluoreszenz über das gesamte Epithel.

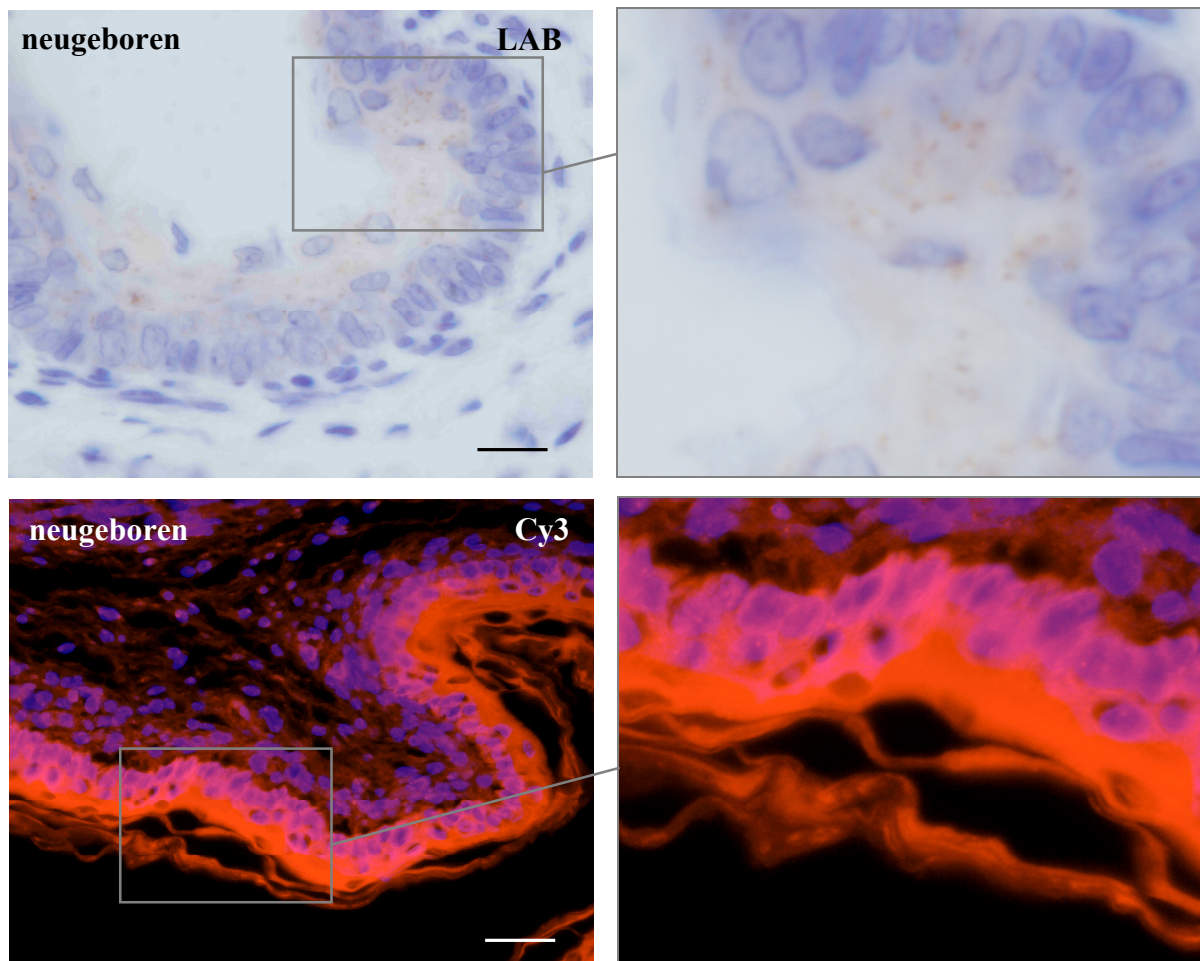


Abbildung 25: Ösophagusepithel der neugeborenen Ratte, LAB-Methode (oben) und Immunfluoreszenz (unten, Gewebe fixiert mit Bouin) mit Anti-Katalase.
Balken: 10 μ m

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Vorversuche waren notwendig, um die für die immunhistologische Behandlung der Gewebeschnitte optimalen Bedingungen zu bestimmen. Es wurden Fixierungen mit Formol-, Bouin-, Zamboni- und Paraformaldehydlösungen durchgeführt. Die Paraformaldehydfixierung stellte sich als die beste Fixiermethode für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immundecktionsverfahren heraus.

Zunächst wurden an den Rattenfeten vom 16. bis zum 20. SST und an neugeborenen Ratten HE-Färbungen durchgeführt, um einen Überblick über die dermale Histogenese zu bekommen und die Ergebnisse mit schon bekannten Erkenntnissen zu vergleichen. Es stellte sich heraus, dass die verwendeten Präparate alle Merkmale der normalen, beschriebenen fetalen Entwicklung und Histologie der Rattenhaut zeigten.

Die SOX ließ sich in den Präparaten der Feten vom 16. und 17. SST in der Epidermis nicht nachweisen (siehe Abbildung 12). Am 18. SST war ein deutliches, schmales, bandförmiges Signal an der obersten Zellschicht zu sehen, das als Akkumulation punktförmiger, granulärer Strukturen zu erkennen war (vgl. Abbildung 15). Dieses Signal war nicht durchgängig über das gesamte Integument zu detektieren.

Am 19. SST war das Antigen zwar deutlich nachweisbar, jedoch eher diffus in der gesamten Epidermis. Auch hier ließen sich granuläre Strukturen erkennen. Gleiches war auch bei den Gewebeschnitten der Feten des 20. SST zu sehen, wohingegen bei den Proben der neugeborenen Ratten die SOX spezifisch im Stratum granulosum nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 15).

Besonders auffällig war der Unterschied dieser Entwicklung zwischen ventraler und dorsaler Rattenhaut. Dorsal war bereits am 18. SST das Antigen deutlich zu detektieren, ventral erst ab dem 19. SST (vgl. Abbildung 13). Insgesamt erschien auch die Signalintensität an der ventralen Rattenhaut schwächer als an der dorsalen.

Die gleichen Gewebeproben wurden auch mit einem Antikörper gegen Katalase untersucht. Mittels Immunfluoreszenztechnik konnte die Katalase schon in der Haut von Feten des 16. und 17. SST nachgewiesen werden. Eine entsprechende Fluoreszenz war sehr schwach in

allen Zellen der Epidermis erkennbar. Bei den Gewebeschnitten der Haut von Rattenfeten des 18. SST war die Katalase im Stratum germinativum am deutlichsten nachweisbar, bei denen des 19. und 20. SST am ehesten unter dem Periderm (ähnlich wie die SOX, siehe Abbildung 18). Bei den Proben von den neugeborenen Ratten war die Fluoreszenzmarkierung, ähnlich wie bei der SOX, spezifisch im Stratum granulosum zu sehen. Der fluoreszierende Immunkomplex erschien feingranulär im Zytoplasma der Epidermiszellen verteilt.

Im Gegensatz zur SOX konnte die Katalase bei allen Gewebeschnitten sowohl in den dorsalen als auch in den ventralen Hautpartien der Ratten zeitgleich nachgewiesen werden.

Auch die Präparate, die nach der LAB-Methode behandelt wurden, zeigten bei der Verwendung des Anti-Katalase-Antikörpers nahezu gleiche Ergebnisse wie mit der Immunfluoreszenzmethode. Besonders deutlich konnten u.a. die granulären Strukturen unter dem Periderm am 19. SST sowie die spezifische, kräftige Färbung des Stratum granulosum beim neugeborenen Tier gesehen werden (vgl. Abbildung 19).

Die Katalase wurde zudem auch noch in speziellen Zellen in Haarfollikeln nachgewiesen, dies jedoch erst in den Gewebeschnitten der Ratten nach Geburt. Auch hier war das detektierte Antigen eindeutig granulär verteilt (siehe Abbildung 22). Das SOX-Antigen war in diesen Zellen nicht zu detektieren.

Zum Vergleich wurde auch der Ösophagus als weiteres Beispiel eines mehrschichtigen, (bei der Ratte) verhornten Plattenepithels untersucht. Verglichen mit dem Nachweis der SOX an der Epidermis konnten hier die Ergebnisse reproduziert werden: ab dem 18. SST zeigte sich eine bandförmige, diskontinuierliche Markierung in der obersten Zellschicht, die bis nach Geburt an Intensität zunahm. In höheren Vergrößerungen waren auch hier im Zytoplasma immunpositive Granulae zu erkennen. Zusätzlich fanden sich auch spezielle, SOX-positive Zellen in der obersten Schicht des Epithelverbandes, die ein besonders kräftiges Signal zeigten. Katalase konnte in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden.

6. Diskussion

Beurteilung der Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Enzyme während der fetalen Entwicklung der Rattenhaut immunhistologisch untersucht. Es wurden hierfür bereits etablierte Methoden zur Gewebegewinnung und -aufbereitung sowie für die immunhistologischen Untersuchungen angewendet.

Bzgl. der Gewebegewinnung ist zu bemerken, dass für die Feten des jeweiligen Schwangerschaftstages nur jeweils ein Muttertier genommen wurde. Etwaige Unregelmäßigkeiten wie z.B. pathologische Schwangerschaften, unbemerkt gebliebene Krankheiten sowohl der Muttertiere als auch der Feten o.ä. konnten somit nicht durch mehrfaches Durchführen der Versuche kontrolliert werden. So ist z.B. zu erwähnen, dass für die Untersuchung des 18. SST nur 2 Feten entnommen werden konnten (siehe Tabelle 4), während die maximale Anzahl von Feten am 16. SST bei 14 lag.

Die Ergebnisse zeigten jedoch keine offensichtlichen Hinweise auf methodische Fehler. Verglichen mit den bisher publizierten histologischen Untersuchungen (licht- und elektronenmikroskopisch) konnten bei den hier verwendeten Präparaten alle Merkmale sowohl der sich normal entwickelnden fetalen Rattenhaut als auch der des Ösophagusepithels festgestellt werden (Fraser 1928; Hanson 1947; Bonneville 1968; Bauer 1972; Kober 1975; Hebel and Stromberg 1986).

Die verwendeten Primärantikörper zur Detektion des SOX- und Katalase-Antigens wurden auf ihre Spezifität schon zuvor überprüft und in mehreren Untersuchungen erfolgreich eingesetzt (Beier et al. 1988; Seitz et al. 1989; Kumari et al. 1990; Aumuller et al. 1991; Hashimoto et al. 2000; Hashimoto et al. 2001; Matsuba et al. 2002). Die fluoreszierenden Sekundärantikörper und die Materialien für die LAB-Methode wurden kommerziell erworben (DAKO, Jackson Immono-Research), so dass eine vorherige firmeneigene Überprüfung der Qualitätsmerkmale vorausgesetzt werden konnte. Zur korrekten Durchführung der immunhistologischen Versuche sind jedoch aufgrund der vielfältigen Fehlermöglichkeiten stets eigene Positiv- und Negativkontrollen mit den tatsächlich verwendeten Präparaten und Färberoutinen durchgeführt worden (Bordeaux et al. 2010).

Die Positivkontrollen zeigten in Vorversuchen mit Gewebeschnitten von neugeborenen Ratten gleiche Ergebnisse bzgl. der Lokalisation des SOX- und CAT-Antigens wie bereits publiziert (Park et al. 1992; Hashimoto et al. 2000; Grabenbauer et al. 2001; Hashimoto et al. 2001; Nardacci et al. 2004; Muramatsu et al. 2005; Tury et al. 2006).

Bezüglich der Negativkontrollen müssen die in Kapitel 4 dargestellten Ergebnisse kritisch berücksichtigt werden: bei allen Versuchen konnte man in den Negativ-Kontrollen unabhängig von den verwendeten fluoreszierenden Sekundärantikörpern an der Epidermis ab dem 18. SST fluoreszierende Strukturen erkennen. Welche Strukturen hier leuchteten war nicht von Anfang an klar ersichtlich. Aufgrund der Lokalisation schien am ehesten das Periderm oder das sich darunter entwickelnde Stratum corneum zu fluoreszieren. Dass dieses Phänomen bei einigen Präparaten auftrat (18., 19. und 20. SST in abnehmender Intensität) und bei anderen nicht (16. und 17. SST), ist ein Hinweis darauf, dass die fluoreszierenden Strukturen erst im Verlauf der Fetogenese gebildet werden. Somit kann angenommen werden, dass das sich zu diesem Zeitpunkt entwickelnde Stratum corneum die Ursache für dieses Artefakt ist. Dafür spricht auch, dass bei den neugeborenen Ratten ausschließlich die abgeschilferten Hornlamellen des Stratum corneum fluoreszierten. Und nicht zuletzt ist die Tatsache, dass das Ösophagusepithel (weiter unten diskutiert) ähnliche Artefakte zeigte, obwohl das Epithel des Gastrointestinaltrakts kein Periderm besitzt, ein Hinweis darauf, dass nur ein molekularer Bestandteil der Hornsubstanz, jedoch keine vitalen Zellen oder Zellstrukturen fluoreszierten. Zwei Erklärungen hierfür erscheinen möglich: zum einen sind Artefakte durch Kreuzreaktionen der benutzten Antikörper ein bekanntes Problem in der Immunhistologie. Zwar kommen solche Artefakte überwiegend dann vor, wenn der Primärantikörper an Epitope bindet, gegen die er eigentlich nicht gerichtet ist (zusätzliche Unspezifität der Primärantikörper). Aber auch Kreuzreaktionen von Sekundärantikörpern sind bekannt, u.a. mit Antigenen der Epidermis bzw. in der Hornschicht (z.B. Maier 2006; Portes et al. 2008).

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit könnte die sog. Autofluoreszenz von Strukturproteinen, insbesondere von Keratin und Kollagen, sein (Pena et al. 2005). Besonders stark quervernetzte Proteine zeigen bei Anregung durch monochromatisches Licht eine endogene Fluoreszenz, was auch routinemäßig in der Diagnostik von z.B. Präkanzerosen epithelialer Tumore genutzt wird (Wu and Qu 2006; Zheng et al. 2008). Da diese Strukturproteine erstmals bzw. vermehrt ab dem 18. SST gebildet werden, wäre das Auftreten z.B. einer Keratineigenfluoreszenz in der Hornschicht zu diesem Zeitpunkt gut erklärbar.

Als solches erkannt beeinträchtigt dieses Artefakt jedoch nicht die Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich der Nachweisbarkeit der SOX und Katalase in der Epidermis der Ratte, da

die Immunreaktion der beiden Antikörper immer deutlich von der eher flau fluoreszierenden Hornschicht zu unterscheiden ist.

Entwicklung der Rattenhaut

In der vorliegenden Arbeit ist die Rattenhaut während der Entwicklung vom 16. SST bis einen Tag nach Geburt untersucht worden. Die histologisch-morphologischen Ergebnisse sind vergleichbar mit bereits publizierten Arbeiten (Fraser 1928; Hanson 1947; Bonneville 1968; Stern et al. 1971; Bauer 1972; Hebel and Stromberg 1986).

Die meisten Autoren sind sich einig, dass um den 18. SST ein abrupter Sprung in der Entwicklung der Rattenhaut stattfindet. Zu diesem Zeitpunkt sind erste vermehrt auftretende Zellorganellen zu erkennen, die auf eine gesteigerte Synthese- und Stoffwechselaktivität schließen lassen (z.B. Keratohyalin granula). Zudem bildet sich auch erstmals ein Stratum corneum unter einem ein- oder zweischichtigen Periderm. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: auch in den hier untersuchten Präparaten kann man gut die Entwicklung eines undifferenzierten, wenig geordneten, 2 – 3-schichtigen Epithels am 16. SST zu einem spezialisierten, mehrschichtigen, verhornten Epithel ab dem 20. SST erkennen. Ein Stratum granulosum ist ab dem 18. SST zu sehen.

Sulfhydryloxidase

Über Sulfhydryloxidasen im Allgemeinen und die SOX in der Epidermis im Speziellen sind schon viele Arbeiten publiziert worden, so dass es zunehmend Hypothesen über die Funktion, biochemischen Eigenschaften und Lokalisation dieses Enzyms in der Haut gibt (siehe zusammenfassend Tabelle 1). Es wird vermutet, dass die SOX in der Haut zum Keratinisierungsprozess beiträgt, indem sie während der Synthese und posttranslationalen Modifizierung der Strukturproteine freie SH-Gruppen zu Disulfidbrücken verknüpft (Hashimoto et al. 2000; Hashimoto et al. 2001; Kodali and Thorpe 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde neben der Lokalisation auch erstmals das zeitliche Auftreten dieses Enzyms während der fetalen Entwicklung der Rattenhaut vom 16. SST bis einen Tag nach Geburt untersucht, das heißt während der ersten Entwicklung von einem undifferenzierten, nicht spezialisierten und unverhornten Epithel zu einem differenzierten, spe-

zialisierten und verhornten Epithel. Es konnte gezeigt werden, dass das SOX-Antigen zum ersten Mal am 18. SST detektierbar ist, und zwar diskontinuierlich in oder an den obersten Zellschichten. Im weiteren Verlauf der fetalen Entwicklung zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung des Enzyms in der Epidermis mit dezenter Betonung ebenfalls der obersten Zellschichten (Periderm, beginnendes Stratum granulosum, Stratum corneum). Diese Erkenntnisse sind vereinbar mit der hauptsächlich von Hashimoto et al. aufgestellten Hypothese, dass die SOX bei dem Keratinisierungsprozess eine wichtige Funktion einnimmt (Hashimoto et al. 2001), denn wie weiter oben ausgeführt ist der 18. SST ein entscheidender Zeitpunkt der ersten Keratinisierung in der Fetogenese.

Bei der neugeborenen Ratte war eine Markierung des Stratum granulosum zu sehen. Dies deckt sich auch mit den meisten der bisherigen Veröffentlichungen über die SOX der Haut: Die Arbeitsgruppen sowohl um Hashimoto (Ratte) als auch Tury (Ratte) und Park (menschliche Haut) haben mit immunhistologischen Methoden zeigen können, dass die SOX in der Epidermis spezifisch im Stratum granulosum detektierbar ist, also genau dort, wo die Produktion der Keratine und anderer Strukturproteine im Rahmen der Keratinisierung stattfindet (Park et al. 1992; Hashimoto et al. 2000; Hashimoto et al. 2001; Tury et al. 2006). Auch an der Haut von Reptilien wurden ähnliche Ergebnisse gefunden (Alibardi 2015).

Es liegen aber auch Unterschiede in den Ergebnissen, sowohl zwischen den bisher publizierten Arbeiten als auch zur vorliegenden Arbeit, vor. So haben z.B. Tury et al. gefunden, dass in der Rattenhaut auch Zellen in Haarfollikeln und seborrhischen Drüsen SOX-positiv waren (Tury et al. 2006), was vorliegende Arbeit und die anderen bisher vorgestellten Untersuchungen nicht nachweisen konnten. Als Erklärung könnte hier die Tatsache eine Rolle spielen, dass Tury et al. ihre Versuchsreihen mit adulten Ratten durchgeführt haben. Es ist vorstellbar, dass sich erst nach der Geburt im Laufe der Entwicklung zur Haut des adulten Tieres zusätzlich spezialisierte Zellen in der Subcutis entwickeln, die dann auch SOX in nachweisbaren Mengen synthetisieren.

Park et al. haben bisher die einzige Studie publiziert, in der ein polyklonaler Antikörper gegen die SOX aus der humanen Haut benutzt wurde (Park et al. 1992). Mit diesem Antikörper ließ sich die SOX nicht in den seborrhischen Drüsen oder Haarfollikeln nachweisen, was durch die vorliegende Arbeit bestätigt wird, aber im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studien von Tury et al. steht. Parks Arbeitsgruppe beschrieb jedoch als einzige eine positive Immunreaktion für SOX in den Schweißdrüsen. Dass dies weder von den anderen Autoren noch von vor-

liegender Arbeit beobachtet wurde, ist wohl darauf zurückzuführen, dass bei Ratten und Mäusen im Gegensatz zum Menschen die Schweißdrüsen überwiegend an den Fußballen zu finden sind und nicht im Bereich der behaarten Epidermis (Römer 1896; Hayashi and Nakagawa 1963). Die Haut der Füße bzw. Fußballen von Ratten und Mäusen ist in keiner der aktuell bekannten Arbeiten explizit untersucht worden.

Ein ganz anderes Ergebnis zeigte dagegen die Studie von Portes et al., welche ebenfalls immunhistologische Untersuchungen zur Haut-SOX durchgeführt haben (Portes et al. 2008). Sie beschrieben bei Mäusefeten und neugeborenen Mäusen an der Haut eine selektive Darstellung der SOX nur in der Dermis ohne jegliche Änderung der Lokalisation im Laufe der Histogenese. Epidermale Strukturen waren in dieser Arbeit nie SOX-positiv, was im völligen Gegensatz zu allen anderen Publikationen und auch zu vorliegender Arbeit steht. Portes Arbeitsgruppe begründete diese offensichtliche Diskrepanz damit, dass die untersuchten Tiere unterschiedlich alt gewesen waren und postulierte eine von der Gewebereifung abhängige Regulierung der SOX-Expression. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass bereits pränatal die SOX in der Epidermis darstellbar ist, so dass diese Erklärung durch die hier vorgestellten Ergebnisse nicht gestützt wird.

Zu bemerken ist, dass die Ergebnisse von Portes et al. auch in Bezug auf die Detektion der SOX in Zellen des zentralen Nervensystems von denen anderer Autoren abweichen. Mairet-Coello et al. beschrieben für Ratten-Feten eine entwicklungsabhängige zunehmende Expression der QSOX in bestimmten Regionen des Ratten-Gehirns bis über die Geburt hinaus (Mairet-Coello et al. 2005). Portes et al. hingegen fanden eine gleichbleibende, nur schwache Expression bei den Mäusefeten und dann eine Zunahme beim neugeborenen Tier. Portes et al. machten hierfür methodische Probleme verantwortlich und vermuteten, dass es sich evtl. um einen Unterschied in der Sensitivität der verwendeten Mikroskopietechnik (Immunfluoreszenz bei Mairet-Coello et al. vs. Lichtmikroskopie bei Portes et al.) oder einen Einfluss der Fixiermethode (Gefrierschnitte bei Mairet-Coello et al. vs. Formalin-Paraffin-Fixierung bei Portes et al.) handeln könnte. Zusätzlich vermuteten Portes et al., dass eventuell ihr verwendeter Antikörper nicht die selben Epitope erkannte wie der von Mairet-Coello et al., da beide Forschergruppen unterschiedliche Methoden zur Antikörperherstellung verwendet haben. Mairet-Coello et al. hatten einen Antikörper benutzt, der durch Injektion eines QSOX-Antigens aus der Bläschendrüse der Ratte in Kaninchen erzeugt worden war (Mairet-Coello et al. 2004), so wie auch vorliegende Arbeit. Portes et al. hatten hingegen als Antigen ein rekombinant hergestelltes Protein verwendet. Die verschiedenen Antigenquellen müssen immer

auch zur Erklärung von unterschiedlichen Ergebnissen immunhistologischer Arbeiten berücksichtigt werden. Dass es durchaus große Unterschiede geben kann in der Spezifität von Antikörpern, je nachdem ob bei deren Herstellung ein gereinigtes Protein oder ein synthetisches, rekombinant hergestelltes Protein verwendet wurde, ist hinlänglich bekannt (Ramos-Vara 2005). Während ein synthetisches Protein als Antigen den Vorteil bietet, dass die Aminosäure-Sequenz genau definiert ist, fehlt jedoch in der Regel der antigene Einfluss der post-translationalen Modifizierungen und der 3D-Struktur, die ein natives Protein besitzt. So kann es vorkommen, dass ein Antikörper gegen ein rekombinantes Protein das Originalprotein zwar in denaturiertem Zustand bei einer Western-Blot-Analyse erkennt, in immunhistologischen Untersuchungen an Gewebeschnitten jedoch das mehr oder weniger intakte Protein nur schwach oder gar nicht bindet (Bordeaux et al. 2010).

Neben diesen methodischen Unterschieden kann die Ursache für die differente Detektierbarkeit natürlich auch an Varianten des Enzymmoleküls selbst liegen. Für die QSOX-Familie sind mehrere unterschiedliche Isoformen beschrieben worden, die z.B. durch alternatives Spleißen aus überwiegend identischen Gensequenzen entstehen (Coppock et al. 1993; Mairet-Coello et al. 2002; Wittke et al. 2003; Coppock and Thorpe 2006; Radom et al. 2006; Chakravarthi et al. 2007; Limor-Waisberg et al. 2013). So wäre es prinzipiell denkbar, dass trotz der beschriebenen hoch-homologen Gensequenz der Haut-QSOX bei verschiedenen Spezies (hier Ratte, Maus und Mensch, gezeigt bei Matsuba et al. 2002) unterschiedliche Isoformen existieren, die in Folge auch unterschiedliche immunologisch bedeutsame Epitope aufweisen und somit nach der Erzeugung von Antikörpern zu unterschiedlichen immunhistologischen Ergebnissen führen (Kosloff and Kolodny 2008). Gleiche Überlegungen könnten eine Erklärung sein für die von Tury et al. beschriebenen SOX-positiven Zellen in den Haarfollikeln und seborrhischen Drüsen, die von anderen Autoren und vorliegender Arbeit nicht gefunden werden konnten (siehe oben, Tury et al. 2006).

Tabelle 8 fasst die Ergebnisse der diskutierten immunhistologischen Arbeiten über die SOX der Haut zusammen.

Ein bemerkenswertes Ergebnis der eigenen Untersuchungen war auch eine deutlichere Nachweisbarkeit der SOX an den dorsalen im Gegensatz zu ventralen Partien der Rattenhaut. Ein Erklärungsansatz hierfür ist nicht in der Literatur zu finden, da vergleichende Untersuchungen zur Unterscheidung von verschiedenen Hautpartien der Ratte, insbesondere bezüglich der Differenzierung und Keratinisierung, bisher fehlen. Bekannt ist, dass sich verschiedene Hautpartien der Ratte prinzipiell histologisch unterscheiden können (Hanson 1947). Gibbs konnte

nachweisen, dass die Dicke der dorsalen Haut von Mäusen im Zusammenhang mit der Entwicklung der Haarfollikel die Dicke der ventralen Haut übertrifft (Gibbs 1941). Ebenso weiß man, dass die Stärke der Verhornung je nach mechanischer Beanspruchung in den unterschiedlichen Hautpartien differiert. Ob dies eine Erklärung für die unterschiedliche Detektierbarkeit der SOX an unterschiedlichen Partien der Rattenhaut liefert, können vorliegende Ergebnisse nicht eindeutig beantworten.

Table 8: Unterschiede der bisher publizierten immunhistologischen Arbeiten zur SOX der Haut, eingeteilt je nach verwendetem Antikörper. + = SOX nachgewiesen; - = SOX nicht nachgewiesen; (-) = nicht als nachgewiesen beschrieben.

| Nachgewiesene Lokalisation der SOX: | Park et al. 1992 | Hashimoto et al. 2000 ¹ | Tury et al. 2005 | Portes et al. 2008 | Alibardi 2015 |
|-------------------------------------|------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|
| Epidermis: | + | + | + | - | + |
| Stratum granulosum | + | + | + | | + |
| (Stratum lucidum) | | + | | | |
| Schweißdrüsen | + | - | (-) | | |
| Gl. seborrh. | (-) | - | + | | |
| Haarfollikel | (-) | - | + | | |
| Dermis: | - | - | - | + | - |
| SOX-Antigen aus...: | humanen Haut | Ratten-Bläschendrüse | Ratten-Bläschendrüse | Mäuse-Kleinhirn rekombinant | QSOX2 Mensch Reptilien |
| Hautgewebeproben aus...: | Mensch | Ratte | Ratte | Maus | |

¹ und vorliegende Arbeit

Katalase

Über die Katalase der Rattenhaut ist bekannt, dass sie immunhistologisch im Stratum granulosum lokalisiert werden kann, ebenso wie ihr Substrat H₂O₂ (Grabenbauer et al. 2001; Sander et al. 2002; Muramatsu et al. 2005). Da die Haut-SOX während ihrer katalytischen Reaktion auch H₂O₂ produziert, stellten Muramatsu et al. 2005 die Hypothese auf, dass die Katalase unter anderem auch das von der Haut-SOX produzierte Wasserstoffperoxid abbaut und diese beiden Enzyme somit während der Keratinisierung funktionell zusammenarbeiten (Muramatsu et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb neben der SOX-Lokalisation auch die Verteilung der Katalase während der fetalen Differenzierung der Rattenhaut untersucht. Letztere konnte schon ab dem 16. SST nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich, ähnlich wie bei der SOX-Detektion, am 19. SST eine deutliche Veränderung der Lokalisation des Enzyms in der Epidermis. Es kam zu einem diskontinuierlichen Auftreten der Katalase am Stratum granulosum, ähnlich wie bei der SOX am 18. SST. Am 20. SST verteilte sich das Antigen homogen in der

Epidermis mit Betonung der apikalen Zellschichten und war nach der Geburt nahezu spezifisch im Stratum granulosum nachzuweisen.

Das erste Auftreten der Katalase während der epidermalen Differenzierung wurde an Mäusen bereits von Grabenbauer et al. untersucht (Grabenbauer et al. 2001). Grabenbauers Arbeitsgruppe zeigte mittels In-Situ-Hybridisierung, dass die Katalase-mRNA schon ab dem 14. SST nachweisbar war. Mittels Immunhistochemie wurde das Antigen am 18. SST erstmals detektiert, wobei vorher ebenfalls eine diffuse Verteilung beschrieben wurde.

Nardacci et al. haben ähnlich wie vorliegende Arbeit die Verteilung der Katalase in Rattenfetten während unterschiedlicher Entwicklungsstadien immunhistochemisch untersucht (Nardacci et al. 2004). Sie haben hier die Katalase in der Epidermis schon ab dem Tag 11,5 mit schwacher Anfärbbarkeit beschrieben mit leichter Verstärkung des Signals vom Tag 14,5 bis 16,5. Leider wird weder die genaue Lokalisation und Verteilung des Antigens näher erläutert, noch wurden Feten älter als Tag 17,5 p.c. untersucht. Erst ab diesem Zeitpunkt zeigten jedoch die vorliegenden Ergebnisse eine deutliche Änderung bzgl. der Nachweisbarkeit und Lokalisation der Katalase an der pränatalen Rattenhaut.

Vorausgesetzt, die von Muramatsu et al. aufgestellte Hypothese ist korrekt, dass die Katalase und die SOX der Haut zusammen am Verhornungsprozess beteiligt sind (Muramatsu et al. 2005), muss man postulieren, dass beide Enzyme während der Histogenese sowohl örtlich als auch zeitlich gemeinsam nachgewiesen werden können. Die vorliegende Arbeit konnte nun erstmals zeigen, dass dies zwar bzgl. der Lokalisation der Fall war, dass zeitlich aber die Katalase erst einen SST später als die SOX detektiert werden konnte. Letzteres könnte man damit erklären, dass während des beginnenden Verhornungsprozesses um den 18. SST das von der SOX produzierte H_2O_2 allmählich vermehrt anfällt, so dass nun auch die diese Verbindung abbauende Katalase in einer für einen immunhistologischen Nachweis ausreichenden Menge exprimiert wird.

Allerdings lässt sich die Katalase bereits vor dem Beginn der Keratinisierung detektieren, und zwar homogen und schwach in allen Schichten der Epidermis verteilt (ähnlich wie bei Nardacci et al.). Dies lässt sich damit erklären, dass die Katalase als peroxisomales Enzym schon zu einem früheren Zeitpunkt in vielfältige andere Stoffwechselwege involviert ist und in der Epidermis somit nicht speziell als Schutz vor dem beim Keratinisierungsprozess entstehenden H_2O_2 von Bedeutung ist.

Hierfür spricht auch das Vorkommen der Katalase-positiven Zellen an den Haarfollikeln. Es scheint hier ein spezieller, Katalase exprimierender Zelltypus vorzuliegen, der möglicherweise bei der Haarbildung eine besondere Rolle spielt. Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Arbeit keine SOX-positiven Zellen im Bereich der Haarfollikel entdeckt werden. Über die Rolle der SOX im Haarwachstum gibt es aktuell nur wenige Daten. Hamada und Suzuki konnten 1996 keine Steigerung der SOX-Aktivität in der Haut von depilierten C3H-Mäusen nachweisen (Hamada and Suzuki 1996). Erst jüngst jedoch konnte Alibardi elektronenmikroskopisch zeigen, dass die SOX mit SH-reichen Keratinen im Haar assoziiert ist (Alibardi 2017). Er sah darin eine Bestätigung der These, dass die SOX auch bei der Prozessierung von Keratinen im Haar mitwirkt. In diesem Zusammenhang muss nochmals erwähnt werden, dass auch Tury et al. immunhistologisch SOX-positive Zellen an den Haarfollikeln beschrieben haben (Tury et al. 2006). Jedoch wird in dieser Publikation weder eine genauere Erklärung dieser Zellen gegeben, noch sind die von Tury et al. dargelegten Ergebnisse auf den publizierten Bildern nachvollziehbar.

Das Ösophagusepithel

Im Gegensatz zur menschlichen Speiseröhre besitzt der Rattenösophagus ebenfalls ein verhorntes Epithel. In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeschnitte aus dem sich entwickelnden Ösophagusepithel als weiteres Beispiel für ein verhorntes Epithel daraufhin untersucht, wann und wo das SOX-Antigen zum ersten Mal nachzuweisen ist. Das Ziel war, die so gewonnenen Ergebnisse mit denen an der Haut zu vergleichen. Auch für das Ösophagusepithel ist bekannt, dass um den 19. SST erste Zeichen einer Keratinisierung erkennbar sind, wobei in diesem Zusammenhang Keratohyalin granula und kernlose Epithelzellen in der Literatur beschrieben wurden (Kober 1975). Die vorliegende Untersuchung zur Detektion des SOX-Antigens im Ösophagus zeigte im Wesentlichen gleiche Ergebnisse wie bei der Epidermis. Am 18. SST werden erstmals lokal begrenzte, deutlich SOX-positive Strukturen in der obersten Zellschicht erkennbar.

Bei der neugeborenen Ratte fand sich diese Immunreaktion ebenfalls in den obersten Zellschichten (entsprechend dem Stratum granulosum). Die Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen von Tury et al., welche ebenfalls eine starke Färbung im Stratum granulosum des Ösophagus zeigen konnten (Tury et al. 2006). Park et al. wiesen auch beim Menschen die SOX im Ösophagusepithel nach (Park et al. 1992), allerdings mit einer stärkeren Intensität im

submuköses Gewebe als am Epithel. Zwar zeigen vorliegende Daten im Verlauf der Fetalentwicklung auch eine submuköse Lokalisation des SOX-Antigens, jedoch sind die Reaktionen des SOX-Antikörpers in den epithelialen Schichten deutlich spezifischer (vgl. z.B. Abbildung 23 und Abbildung 24).

Portes et al. zeigten dagegen bezüglich der SOX-Verteilung im Ösophagusepithel gänzlich andere Ergebnisse als in der vorliegenden Arbeit und in anderen publizierten Studien zu sehen sind (Portes et al. 2008). Laut Portes et al. sind während der Fetogenese der Maus nur mesenchymale und Muskelzellen des Ösophagus SOX-positiv, erst bei der neugeborenen Maus reagiert auch das Epithel positiv. Ein möglicher Einfluss des zur Immunisierung verwendeten SOX-Antigens wie auch der Fixierungstechnik wurde schon weiter oben bei der Diskussion der Daten im Epithel aufgeführt.

Auffallend sind bei den eigenen Daten außerdem einzelne, im epithelialen Zellverband des Ösophagus liegende, kräftig SOX-positive Zellen, die sich deutlich von den umliegenden Zellen abheben. Diese Zellen sind in den Publikationen anderer Autoren bisher nicht beschrieben worden. Entsprechende speziell Katalase-positive Zellen fanden sich im Ösophagus nicht. Da die SOX u.a. in sekretorischen Organen zu finden ist (siehe Einleitung), könnte das Vorkommen von einzelnen SOX-positiven Zellen im Epithelverband des Rattenösophagus auf entsprechende sekretorische Funktionen dieser Zellen hindeuten.

7. Zusammenfassung

Der Keratinisierungsprozess der Haut ist ein hochkomplexer Vorgang, bei dem aus den sich ständig teilenden und weiter ausdifferenzierenden basalen Stammzellen ein mechanisch und chemisch stabiler, gegen zahlreiche Umwelteinflüsse und Mikroorganismen schützender Zellverband entsteht. Für die Integrität der Epidermis sind unter anderem Strukturproteine zuständig, die aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften und der zahlreichen Quervernetzungen untereinander und mit anderen Zellbestandteilen der Haut Festigkeit und eine fast vollständige Dichtigkeit gegenüber hydrophilen Substanzen verleihen. Ein wichtiges strukturelles Element bei der Quervernetzung und Verknüpfung der Proteine sind Disulfidbrücken, die zwischen Cysteinresten in den Proteinketten gebildet werden. Die Katalyse der Disulfidbrückenbildung in der Epidermis wird der Sulphydroxidase (SOX) zugeschrieben, die zu einer Gruppe von Enzymen gehört, die in vielfältiger Form in nahezu allen Organismen zu finden sind.

Die Hypothese, dass die Haut-SOX in den Keratinisierungsprozess involviert ist, basiert bisher auf Ergebnissen, die bei Untersuchungen an neugeborenen oder adulten Versuchstieren gewonnen worden sind. Die Evidenz hierfür ist jedoch nicht eindeutig, da einzelne Studien z.B. von fehlendem Nachweis der SOX in der Epidermis bzw. von überwiegendem Vorkommen der SOX in der Dermis oder anderen Hautschichten berichten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, wo und wann das Enzym in der pränatalen Epidermis zum ersten Mal nachzuweisen ist. Hierzu wird die Haut von pränatalen (ab dem 16. SST) und neugeborenen Ratten mit immunhistologischen bzw. Immunfluoreszenz-Techniken untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die SOX zeitgleich mit den ersten histologischen Anzeichen für eine Keratinisierung (18. SST) in den obersten Schichten der Epidermis nachweisbar ist. In der Epidermis der neugeborenen Tiere war die SOX spezifisch im Stratum granulosum detektierbar.

Ferner wurde auch der Ösophagus der Ratte als ein weiteres Beispiel eines verhornenden Epithels mit den gleichen Methoden untersucht. Auch hier war die SOX erstmals mit dem Beginn der Keratinisierung am 18. SST nachweisbar, ebenfalls in den Zellschichten, in denen der Verhornungsprozess stattfindet.

Bei dem von der SOX katalysierten Stoffwechselweg fällt H_2O_2 als Endprodukt an. Andere Autoren stellten zuvor die Hypothese auf, dass u.a. die Katalase auch außerhalb von Peroxisomen an dem Abbau dieses H_2O_2 beteiligt ist. Basierend auf dieser Hypothese wurden in der vorliegenden Arbeit an den gleichen Präparaten und mit den gleichen Techniken wie oben beschrieben auch das zeitlich erste Auftreten und die genaue Lokalisation der Katalase erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass die Katalase in den gleichen Zellschichten wie die SOX auftritt, jedoch mit einer zeitlichen Verzögerung von einem Tag. Zusätzlich war sie unabhängig von der gemeinsamen Lokalisation mit der SOX schon vor dem 18. SST in Peroxisomen schwach detektierbar.

Die vorliegenden Untersuchungen konnten somit erstmals zeigen, dass die SOX tatsächlich in zeitlichem Zusammenhang mit dem Keratinisierungsprozess am 18. SST der fetalen Differenzierung der Rattenhaut auftritt. Die zuvor durch andere Autoren aufgestellte Hypothese eines möglichen Zusammenspiels zwischen der Aktivität der SOX und der der Katalase konnte ebenfalls durch die vorliegenden Ergebnisse bekräftigt werden.

Literaturverzeichnis

- Alibardi, L. (2015). "Immunolocalization of sulfhydryl oxidase in reptilian epidermis indicates that the enzyme participates mainly to the hardening process of the beta-corneous layer." Protoplasma **252**: 1529–1536.
- Alibardi, L. (2017). "Ultrastructural localization of hair keratins, high sulfur keratin-associated proteins and sulfhydryl oxidase in the human hair." Anatomical Science International **92**(2): 248–261.
- Arican, O. and E. B. Kurutas (2008). "Oxidative stress in the blood of patients with active localized vitiligo." Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat **17**(1): 12-6.
- Aumuller, G., M. Bergmann, et al. (1991). "Immunohistochemical distribution of sulfhydryl oxidase in the human testis." Cell Tissue Res **266**(1): 23-8.
- Bankier, A. (1995). "Menkes disease." J Med Genet **32**(3): 213-5.
- Bauer, F. W. (1972). "Differentiation and keratinization of fetal rat skin. II. Ultrastructural study of the epidermis in vivo and in vitro." Dermatologica **145**(1): 17-36.
- Becher, D., J. Kricke, et al. (1999). A mutant for the yeast scERV1 gene displays a new defect in mitochondrial morphology and distribution. Yeast. England, 1999 John Wiley & Sons, Ltd. **15**: 1171-81.
- Beier, K., A. Volkl, et al. (1988). "Selective induction of peroxisomal enzymes by the hypolipidemic drug bezafibrate. Detection of modulations by automatic image analysis in conjunction with immunoelectron microscopy and immunoblotting." Eur J Cell Biol **46**(3): 383-93.
- Benayoun, B., A. Esnard-Feve, et al. (2001). "Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family." J Biol Chem **276**(17): 13830-7.
- Bertini, I. and A. Rosato (2008). "Menkes disease." Cell Mol Life Sci **65**(1): 89-91.
- Bihlmaier, K., N. Mesecke, et al. (2007). The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. J Cell Biol. United States. **179**: 389-95.
- Bonneville, M. A. (1968). "Observations on epidermal differentiation in the fetal rat." Am J Anat **123**(1): 147-64.
- Bordeaux, J., A. Welsh, et al. (2010). "Antibody validation." Biotechniques **48**(3): 197-209.
- Broekaert, D., K. Cooreman, et al. (1982). "A quantitative histochemical study of sulphhydryl and disulphide content during normal epidermal keratinization." Histochem J **14**(4): 573-84.

- Chakravarthi, S., C. E. Jessop, et al. (2007). "Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1." Biochem J **404**(3): 403-11.
- Chance, B., H. Sies, et al. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev **59**(3): 527-605.
- Chang, T. S. and B. Morton (1975). "Epididymal sulfhydryl oxidase: a sperm-protective enzyme from the male reproductive tract." Biochem Biophys Res Commun **66**(1): 309-15.
- Chen, H. (2006). Menkes Disease. Atlas of Genetic Diagnosis and Counseling, Humana Press Inc.: 639-46.
- Codding, J. A., B. A. Israel, et al. (2012). "Protein Substrate Discrimination in the Quiescinsulfhydryl Oxidase (QSOX) Family." Biochemistry **51**(20): 4226–4235.
- Cook, K. M. and P. J. Hogg (2013). "Post-Translational Control of Protein Function by Disulfide Bond Cleavage." Antioxidants & Redox Signaling **18**(15): 1988-2015.
- Coons, A. H. and M. H. Kaplan (1950). "Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody." J Exp Med **91**(1): 1-13.
- Coppock, D. L., D. Cina-Poppe, et al. (1998). "The Quiescin Q6 Gene (QSCN6) Is a Fusion of Two Ancient Gene Families: Thioredoxin and ERV1." Genomics **54**(3): 460–468.
- Coppock, D. L., C. Kopman, et al. (1993). "Preferential Gene Expression in Quiescent Human Lung Fibroblasts." Cell Growth & Differentiation **4**: 483-493.
- Coppock, D. L. and C. Thorpe (2006). "Multidomain Flavin-Dependent Sulfhydryl Oxidases." Antioxidants & Redox Signaling **8**(3-4): 300-311.
- Cross, C. E., A. van der Vliet, et al. (1998). "Oxidative stress and antioxidants at biosurfaces: plants, skin, and respiratory tract surfaces." Environ Health Perspect **106 Suppl 5**: 1241-51.
- Danks, D. M., P. E. Campbell, et al. (1972). "Menkes' kinky-hair syndrome." Lancet **1**(7760): 1100-2.
- De Duve, C. (1973). "Biochemical studies on the occurrence, biogenesis and life history of mammalian peroxisomes." J Histochem Cytochem **21**(11): 941-8.
- de la Motte, R. S. and F. W. Wagner (1987). "Aspergillus niger sulfhydryl oxidase." Biochemistry **26**(23): 7363-71.
- Dorsett-Martin, W. A. (2004). "Rat models of skin wound healing: a review." Wound Repair Regen **12**(6): 591-9.
- Eckert, R. L., J. F. Crish, et al. (1997). "The epidermis: genes on - genes off." J Invest Dermatol **109**(4): 501-9.

- Foster, C. A., J. F. Bertram, et al. (1988). "Morphometric and statistical analyses describing the in utero growth of human epidermis." Anat Rec **222**(2): 201-6.
- Fraser, D. A. (1928). "The development of the skin of the back of the albino rat until the eruption of the first hairs." The Anatomical Record **38**(2): 203-23.
- Friemel, H. (1984). Immunologische Arbeitsmethoden. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Fritsch, H. and W. Kühnel (2001). Innere Organe. Stuttgart New York, Georg Thieme Verlag.
- Fritsch, P. (1998). Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas. Berlin, Springer Verlag.
- Fuchs, E. (1990). "Epidermal differentiation: the bare essentials." J Cell Biol **111**(6 Pt 2): 2807-14.
- Gibbs, H. F. (1941). "A study of the post-natal development of the skin and hair of the mouse." The Anatomical Record **80**: 61-82.
- Gibbs, R. C. (1967). "Fundamentals of dermatoglyphics." Arch Dermatol **96**(6): 721-5.
- Goldsmith, L. A. (1987). "Sulfhydryl oxidase from rat skin." Methods Enzymol **143**: 510-5.
- Grabenbauer, M., H. D. Fahimi, et al. (2001). "Detection of peroxisomal proteins and their mRNAs in serial sections of fetal and newborn mouse organs." J Histochem Cytochem **49**(2): 155-64.
- Hamada, K. and K. Suzuki (1996). "Evaluation of biochemical indices as a hair cycle marker in C3H mice." Exp Anim **45**(3): 251-6.
- Hanson, J. (1947). "The histogenesis of the epidermis in the rat and mouse." J Anat **81**(Pt 2): 174-97.
- Hashimoto, K., B. G. Gross, et al. (1966). "The ultrastructure of the skin of human embryos. IV. The epidermis." J Invest Dermatol **47**(4): 317-35.
- Hashimoto, Y., Y. Suga, et al. (2000). "Immunohistochemical localization of sulfhydryl oxidase correlates with disulfide crosslinking in the upper epidermis of rat skin." Arch Dermatol Res **292**(11): 570-2.
- Hashimoto, Y., Y. Suga, et al. (2001). "Inquiry into the role of skin sulfhydryl oxidase in epidermal disulfide bond formation: implications of the localization and regulation of skin SOx as revealed by TPA, retinoic acid, and UVB radiation." J Invest Dermatol **117**(3): 752-4.
- Hayashi, H. and T. Nakagawa (1963). "Functional activity of the sweat glands of the albino rat." J Invest Dermatol **41**: 365-7.
- Hebel, R. and M. W. Stromberg (1986). Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat. Wörthsee, BioMed Verlag.

- Heckler, E. J., P. C. Rancy, et al. (2008). "Generating disulfides with the Quiescin-sulfhydryl oxidases." Biochim Biophys Acta **1783**(4): 567-77.
- Hellemans, L., H. Corstjens, et al. (2003). "Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery." J Invest Dermatol **120**(3): 434-9.
- Holbrook, K. A., R. A. Underwood, et al. (1989). "The appearance, density and distribution of melanocytes in human embryonic and fetal skin revealed by the anti-melanoma monoclonal antibody, HMB-45." Anat Embryol (Berl) **180**(5): 443-55.
- Hooper, K. L., N. M. Glynn, et al. (1999a). "Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases." J Biol Chem **274**(45): 31759-62.
- Hooper, K. L., S. L. Sheasley, et al. (1999b). "Sulfhydryl oxidase from egg white. A facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides." J Biol Chem **274**(32): 22147-50.
- Isaacs, C. E., T. Pascal, et al. (1984). "Sulfhydryl oxidase in human milk: stability of milk enzymes in the gastrointestinal tract." Pediatr Res **18**(6): 532-5.
- Janolino, V. G. and H. E. Swaisgood (1975). "Isolation and characterization of sulfhydryl oxidase from bovine milk." J Biol Chem **250**(7): 2532-8.
- Jung, E. G. and I. Moll (2005). Dermatologie, Georg Thieme Verlag.
- Junqueira, L. C., J. Carneiro, et al. (2004). Histologie. Berlin, Springer Verlag.
- Kobayashi, T., M. Matsumoto, et al. (1991). "Superoxide dismutase in psoriasis, squamous cell carcinoma and basal cell epithelioma: an immunohistochemical study." Br J Dermatol **124**(6): 555-9.
- Kober, H. J. (1975). "Über die Ultrastruktur des Rattenoesophagusepithels während der Ontogenese." Z mikr-anat Forsch (Leipzig) **89**(3): 563-86.
- Kodali, V. K. and C. Thorpe (2010). "Oxidative protein folding and the Quiescin-sulfhydryl oxidase family of flavoproteins." Antioxid Redox Signal **13**(8): 1217-30.
- Kosloff, M. and R. Kolodny (2008). "Sequence-similar, structure-dissimilar protein pairs in the PDB." Proteins **71**(2): 891-902.
- Kostovic, K., Z. Pastar, et al. (2007). "Treatment of vitiligo with narrow-band UVB and topical gel containing catalase and superoxide dismutase." Acta Dermatovenerol Croat **15**(1): 10-4.
- Kühnel, W. (1999). Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie, Georg Thieme Verlag.
- Kumari, M., G. Aumuller, et al. (1990). "Stage-dependent appearance of sulfhydryl oxidase during spermatogenesis in the testis of rat and hamster. An immunohistochemical study." Histochemistry **94**(4): 365-71.

- Kusakabe, H., A. Kuninaka, et al. (1982). "Purification and Properties of a New Enzyme, Glutathione Oxidase from *Penicillium* sp. K-6-5." *Agricultural and Biological Chemistry* **46**(8): 2057-67.
- Lash, L. H. and D. P. Jones (1983). "Characterization of the membrane-associated thiol oxidase activity of rat small-intestinal epithelium." *Arch Biochem Biophys* **225**(1): 344-52.
- Lee, J., G. Hofhaus, et al. (2000). Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulfhydryl oxidase. *FEBS Lett.* Netherlands. **477**: 62-6.
- Limor-Waisberg, K., S. Ben-Dor, et al. (2013). "Diversification of Quiescin sulfhydryl oxidase in a preserved framework for redox relay." *BMC Evolutionary Biology* **13**(70).
- Magalhaes, T., D. E. Brackney, et al. (2008). "Silencing an *Anopheles gambiae* catalase and sulfhydryl oxidase increases mosquito mortality after a blood meal." *Arch Insect Biochem Physiol* **68**(3): 134-43.
- Maier, S. (2006). Analyse der Expression und Funktion von SMOC-1 und SMOC-2. Universität Köln, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät.
- Mairet-Coello, G., A. Tury, et al. (2004). "FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system." *J Comp Neurol* **473**(3): 334-63.
- Mairet-Coello, G., A. Tury, et al. (2002). "Expression of SOx-2, a member of the FAD-dependent sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family, in rat brain." *Neuroreport* **13**(16): 2049-51.
- Mairet-Coello, G., A. Tury, et al. (2005). "Ontogenesis of the Sulfhydryl Oxidase QSOX Expression in Rat Brain." *The Journal of Comparative Neurology* **484**: 403– 417.
- Matsuba, S., Y. Suga, et al. (2002). "Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells." *J Dermatol Sci* **30**(1): 50-62.
- McElwee, K. J., D. Boggess, et al. (1998). "Comparison of alopecia areata in human and non-human mammalian species." *Pathobiology* **66**(2): 90-107.
- Menefee, E. (1977). "Physical and chemical consequences of keratin crosslinking, with application to the determination of crosslink density." *Adv Exp Med Biol* **86A**: 307-27.
- Muramatsu, S., Y. Suga, et al. (2005). "Differentiation-specific localization of catalase and hydrogen peroxide, and their alterations in rat skin exposed to ultraviolet B rays." *J Dermatol Sci* **37**(3): 151-8.
- Nakane, P. K. and G. B. Pierce, Jr. (1967). "Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens." *J Cell Biol* **33**(2): 307-18.
- Nardacci, R., I. Falciatori, et al. (2004). "Immunohistochemical localization of peroxisomal enzymes during rat embryonic development." *J Histochem Cytochem* **52**(4): 423-36.

- Nemes, Z. and P. M. Steinert (1999). "Bricks and mortar of the epidermal barrier." Exp Mol Med **31**(1): 5-19.
- Ogawa, H., A. Taneda, et al. (1979). "The histochemical distribution of protein bound sulfhydryl groups in human epidermis by the new staining method." J Histochem Cytochem **27**(5): 942-6.
- Ogura, R., J. M. Knox, et al. (1962). "The concentration of sulfhydryl and disulfide in human epidermis, hair and nail." J Invest Dermatol **38**: 69-75.
- Ojha, R. and A. N. Prasad (2016). "Menkes disease: what a multidisciplinary approach can do." Journal of Multidisciplinary Healthcare **9**: 371-385.
- Ostrowski, M. C. and W. S. Kistler (1980). "Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion." Biochemistry **19**(12): 2639-45.
- Ostrowski, M. C., W. S. Kistler, et al. (1979). "A flavoprotein responsible for the intense sulfhydryl oxidase activity of rat seminal vesicle secretion." Biochemical and Biophysical Research Communications **87**(1): 171-176.
- Pappas, P. W. (1971). "The use of a chrome alum-gelatin (subbing) solution as a general adhesive for paraffin sections." Stain Technol **46**(3): 121-4.
- Park, S.-C., H.-M. Seo, et al. (1992). "Purification of Sulfhydryl Oxidase from Human Foreskin Tissue and Immunohistochemical Localisation." The Seoul Journal of Medicine **33**(4): 239-46.
- Parry, D. A. and A. C. North (1998). "Hard alpha-keratin intermediate filament chains: substructure of the N- and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domains of type I and type II chains." J Struct Biol **122**(1-2): 67-75.
- Pena, A.-M., M. Strupler, et al. (2005). "Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy." Opt Express. **13**(17): 6268-74.
- Portes, K. F., C. M. Ikegami, et al. (2008). "Tissue distribution of quiescin Q6/sulfhydryl oxidase (QSOX) in developing mouse." J Mol Histol **39**(2): 217-25.
- Presland, R. B. and B. A. Dale (2000). "Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease." Crit Rev Oral Biol Med **11**(4): 383-408.
- Proksch, E., J. M. Brandner, et al. (2008). "The skin: an indispensable barrier." Exp Dermatol **17**(12): 1063-72.
- Radom, J., D. Colin, et al. (2006). Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain. Biochim Biophys Acta. Netherlands. **1759**: 225-33.
- Ramos-Vara, J. A. (2005). "Technical aspects of immunohistochemistry." Vet Pathol **42**(4): 405-26.

- Römer, F. (1896). "Studien über das Integument der Säugetiere. I. Die Entwicklung der Schuppen und Haare am Schwanz und an den Füßen von *Mus domesticus* und einigen anderen Muriden." Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft **30**: 604-623.
- Rony, H. R., G. J. Schieff, et al. (1958). "Sulfhydryl oxidase activity in skin homogenates." J Invest Dermatol **30**(2): 43-50.
- Sadler, T. W. (1998). Medizinische Embryologie. Stuttgart New York, Georg Thieme Verlag.
- Salem, M. M., M. Shalbaf, et al. (2009). "Enhanced DNA binding capacity on up-regulated epidermal wild-type p53 in vitiligo by H₂O₂-mediated oxidation: a possible repair mechanism for DNA damage." Faseb J **23**(11): 3790-807.
- Sander, C. S., H. Chang, et al. (2002). "Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo." J Invest Dermatol **118**(4): 618-25.
- Schallreuter, K. U., J. M. Wood, et al. (1991). "Low catalase levels in the epidermis of patients with vitiligo." J Invest Dermatol **97**(6): 1081-5.
- Schiebler, T. H., W. Schmidt, et al. (1997). Anatomie. Berlin Heidelberg New York, Springer Verlag.
- Schon, M. P. (1999). "Animal models of psoriasis - what can we learn from them?" J Invest Dermatol **112**(4): 405-10.
- Seitz, J., U. Enderle-Schmitt, et al. (1989). "Immunological relationships between specific sperm proteins and secretory polypeptides from seminal vesicles." Acta Histochem Suppl **37**: 231-3.
- Shindo, Y., E. Witt, et al. (1994). "Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin." J Invest Dermatol **102**(1): 122-4.
- Sravani, P. V., N. K. Babu, et al. (2009). "Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin." Indian J Dermatol Venereol Leprol **75**(3): 268-71.
- Stern, I. B., L. Dayton, et al. (1971). "The uptake of tritiated thymidine by the dorsal epidermis of the fetal and newborn rat." Anat Rec **170**(2): 225-34.
- Sun, T. T. and H. Green (1978). "Keratin filaments of cultured human epidermal cells. Formation of intermolecular disulfide bonds during terminal differentiation." J Biol Chem **253**(6): 2053-60.
- Takamori, K., J. M. Thorpe, et al. (1980). "Skin sulfhydryl oxidase. Purification and some properties." Biochim Biophys Acta **615**(2): 309-23.
- Thiele, J. J., C. Schroeter, et al. (2001). "The antioxidant network of the stratum corneum." Curr Probl Dermatol **29**: 26-42.
- Thorpe, C., K. L. Hooper, et al. (2002). "Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes." Arch Biochem Biophys **405**(1): 1-12.

- Tury, A., G. Mairet-Coello, et al. (2006). "Cell-specific localization of the sulphhydryl oxidase QSOX in rat peripheral tissues." Cell Tissue Res **323**(1): 91-103.
- Utrecht, J. (2005). "Role of drug metabolism for breaking tolerance and the localization of drug hypersensitivity." Toxicology **209**(2): 113-8.
- Williams, J. (1928). "The Decomposition of Hydrogen Peroxide by Liver Catalase." J Gen Physiol **11**(4): 309-337.
- Wittke, I., R. Wiedemeyer, et al. (2003). "Neuroblastoma-Derived Sulphydryl Oxidase, a New Member of the Sulphydryl Oxidase/Quiescin6 Family, Regulates Sensitization to Interferon gamma-Induced Cell Death in Human Neuroblastoma Cells." CANCER RESEARCH **63**: 7742-7752.
- Wu, Y. and J. Y. Qu (2006). "Autofluorescence spectroscopy of epithelial tissues." Journal of Biomedical Optics **11**(5).
- Yamada, H. (1989). "[Localization in skin, activation and reaction mechanisms of skin sulphhydryl oxidase]." Nippon Hifuka Gakkai Zasshi **99**(8): 861-9.
- Yamada, H., Y. Suga, et al. (1989). "[Reaction mechanism catalyzed by skin sulphhydryl oxidase]." Nippon Hifuka Gakkai Zasshi **99**(4): 499-502.
- Yamada, H., Y. Suga, et al. (1994). "Stoichiometry of the reaction catalyzed by skin sulphhydryl oxidase." J Dermatol **21**(6): 394-6.
- Yamada, H., K. Takamori, et al. (1987a). "Effect of divalent cations and proteases on skin sulphhydryl oxidase activity." J Dermatol **14**(3): 212-7.
- Yamada, H., K. Takamori, et al. (1987b). "Localization and some properties of skin sulphhydryl oxidase." Arch Dermatol Res **279**(3): 194-7.
- Yokota, S. and H. D. Fahimi (1981). "Immunocytochemical localization of catalase in rat liver." J Histochem Cytochem **29**(7): 805-12.
- Zheng, W., Y. Wu, et al. (2008). "Autofluorescence of epithelial tissue: single-photon versus two-photon excitation." Journal of Biomedical Optics **13**(5).

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren: Herr Prof. Arnold, Herr Prof. Aumüller, Herr Prof. Barth, Herr Prof. Basler, Frau Prof. Baum, Herr PD Becker, Herr Prof. Christiansen, Herr Prof. Czubayko, Herr Prof. Daut, Herr Prof. Eilers, Frau Dr. Feuser, Frau Prof. Fuchs, Herr Prof. Geus, Herr Prof. Gotzen, Herr Prof. Griss, Herr Prof. Gudermann, Herr Prof. Hasilik, Herr Prof. Hertl, Herr Prof. Hofmann, Herr Prof. Jungclas, Herr Prof. Kann, Herr Prof. Klenk, Herr Prof. Koolman, Herr Prof. Krause, Herr Prof. Krieg, Herr Prof. Kroll, Herr Prof. Lang, Herr Prof. Lill, Herr Prof. Maisch, Herr Prof. Moll, Herr Prof. Moosdorf, Herr Dr. Müller, Herr Prof. Mueller, Herr Prof. Mutters, Herr Prof. Neubauer, Herr Prof. Oertel, Herr Prof. Remschmidt, Herr Prof. Renz, Herr Prof. Röhm, Herr Prof. Rothmund, Herr Prof. Schmidt, Herr Prof. Seitz, Herr Prof. Studer, Herr Prof. Weihe, Herr Prof. Werner, Herr Prof. Wulf

Danksagung

Mein besonderer Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht vor allem an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Seitz, der sogar im Ruhestand mit Kritik, Rat und Ideen für das Gelingen dieser Doktorarbeit sorgte.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe des Instituts, insbesondere bei Herrn Jennemann für die nette Aufnahme in das Team in einer sehr familiären Arbeitsatmosphäre, in der ich mit tatkräftiger Unterstützung die Methoden erlernen durfte.

Meiner Familie, allen voran meinen Eltern und Schwiegereltern, danke ich von tiefem Herzen für die geistliche, mentale und finanzielle Unterstützung. Sie haben mich mit Motivation und Zuspruch während des Studiums und darüber hinaus mit viel Gebet begleitet.

Ein unendlicher Dank gilt meiner großen Liebe, meinem Ehemann und besten Freund für dessen ständige Motivation, konstruktive Kritik, emotionale und tatkräftige Unterstützung, insbesondere in den vielen dunklen Stunden im Labor vor dem Mikroskop. Ohne seinen enormen Rückhalt in jeder Hinsicht wäre diese Doktorarbeit nicht beendet worden.