

Aus dem Anatomischen Institut II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Kommissarischer Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. S. G. Haider

**IMMUNHISTOCHEMISCHE DARSTELLUNG  
DES PROKOLLAGENS TYP I  
UND DER CASPASE-3  
ZUR KLÄRUNG DES ZELLTODS DER FETALEN  
LEYDIG-ZELLEN IM RATTENHODEN**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Roland Diesel

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Prof. Dr. Syed G. Haider

Korreferent: Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>7</b>
2.1 Untersuchungsmaterial	7
2.1.1 Versuchstiere und Gewebeentnahme	7
2.1.2 Gewebeaufbereitung	7
2.2 Beschreibung der angewandten Methoden	<b>8</b>
2.2.1 Schnittschema	8
2.2.2 Immunhistochemie	9
2.2.2.1 Nachweis von Caspase-3	9
2.2.2.2 Nachweis von Prokollagen Typ I	11
2.2.3 Perjodsäure-Schiff-Reaktion	13
2.2.4 Quantifizierung und statistische Methoden	14
2.2.4.1 Zellzählung	14
2.2.4.2 Statistische Auswertung	15
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>16</b>
3.1 Prokollagen Typ I	<b>16</b>
3.1.1 Immunhistochemische Reaktion des Prokollagens	16
3.1.2 Quantitative Auswertung der Prokollagenreaktion	25
3.2 Caspase-3	<b>27</b>
3.2.1 Immunhistochemische Reaktion der Caspase-3	27
3.2.2 Quantitative Auswertung der Caspase-3-Reaktion	32
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>36</b>
4.1 Herkunft und Entwicklung der FLZ	36
4.2 Apoptose und Caspase-3	39
4.3 Prokollagen Typ I	43
<b>5 LITERATUR</b>	<b>47</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>56</b>
<b>7 ANHANG: DATENBLÄTTER DER ANTIKÖRPER</b>	<b>57</b>
<b>8 DANKSAGUNG</b>	<b>59</b>
<b>9 LEBENS LAUF</b>	<b>60</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

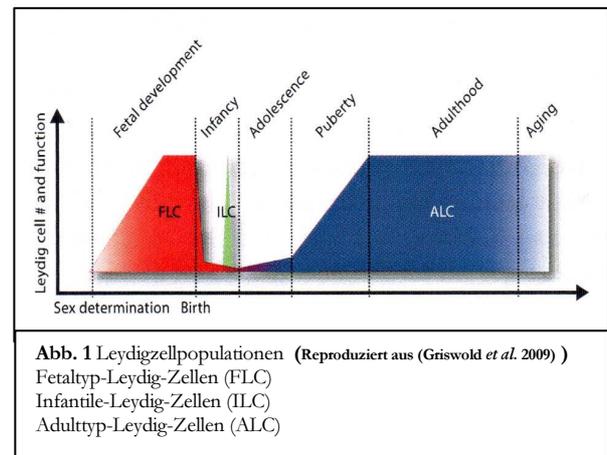
ALZ	Adulttyp-Leydig-Zelle
bc	Blutkapillare
DAB	3,3' - Diaminobenzidin
DePex	Einschlussmittel
EDS	Ethan-Dimethan-Sulfonat
fd	Fetaltag
FLZ	Fetaltyp-Leydig-Zelle
HCl	Salzsäure
HRP	Horse-radish-peroxidase
PAS	Periodic-Acid-Schiff-Reaction
PJS	Periodsäure-Schiff-Reaktion
Pnd	Postnataltag
SF-1	Steroidogenic factor 1
ST	Tubuli seminiferi
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline Tween

## 1 EINLEITUNG

Bei der histologischen Untersuchung des Hodens findet man im Interstitium, außerhalb der Tubuli seminiferi, Zellen, die im Jahre 1850 erstmals der Zoologe und Anatom Franz von Leydig beschrieben hat. Die nach ihm benannten Leydig-Zellen sind Ort der Produktion von Androgenen und anderen Hormonen, die entscheidend für die Entwicklung und Funktion des männlichen Reproduktionssystems sind (Haider 2004; Griswold *et al.* 2009).

Bei der Ratte können aufgrund morphologischer sowie funktioneller Kriterien zwei Populationen dieser Zellen unterschieden werden: **Fetaltyp-Leydig-Zellen (FLZ)** und **Adulttyp-Leydig-Zellen (ALZ)** (Haider *et al.* 1986; Hardy *et al.* 1989; Kuopio *et al.* 1989; Majdic *et al.* 1998; Ariyaratne *et al.* 2000). Während die Herkunft und die Entwicklung von ALZ sehr gut untersucht sind (Haider *et al.* 1997; Ge *et al.* 2005), liegen für die FLZ diesbezüglich sehr wenige empirische Daten vor (Ge *et al.* 2005; Griswold *et al.* 2009). Die Leydigzellen von Ratten und anderen Nagern zeigen einen typischen zweiphasigen Verlauf in ihrer Entwicklung (**Abb. 1**). Infantile-Leydigzellen findet man beim Menschen und Primaten, ihr Vorkommen ist charakteristisch für einen dreiphasischen Entwicklungsverlauf der Leydigzellen (Prince 2001). FLZ können bei der Ratte ab dem 16. Fetaltag (fd) anhand ihrer Ultrastruktur (runder Zellkern; reichlich glattes endoplasmatisches Retikulum; tubulovesikuläre Mitochondrien; eine Vielzahl von Lipidtröpfchen) und immunhistochemischer Merkmale (positiv für  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase), welche charakteristisch für FLZ sind, identifiziert werden (Ziegler *et al.* 1983; Huhtaniemi *et al.* 1992; Haider 2004). Die Herkunft der FLZ ist nach wie vor nicht hinreichend geklärt. Als Quelle einer Vorläufer-FLZ kommen verschiedene Zellen in Betracht: Zellen der Neuralleiste, des Mesonephros, des Coelomepithels, sowie des adreno-gonadalen Primordiums (Byskov 1986; Merchant-Larios *et al.* 1998; Haider 2004; Griswold *et al.* 2009). Genetische Untersuchungen zeigen Gemeinsamkeiten im Genexpressionsmuster mit adrenalen Vorläufer-Zellen. So

exprimieren beide Zellreihen SF-1 (steroidogenic factor 1) und Dax1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1), dessen hemizygoten Vorkommen sowohl zu testikulären Entwicklungsstörungen mit verzögertem Exprimieren von FLZ-Markern als auch zu Entwicklungsverzögerungen der Nebenniere führt (Zazopoulos *et al.*



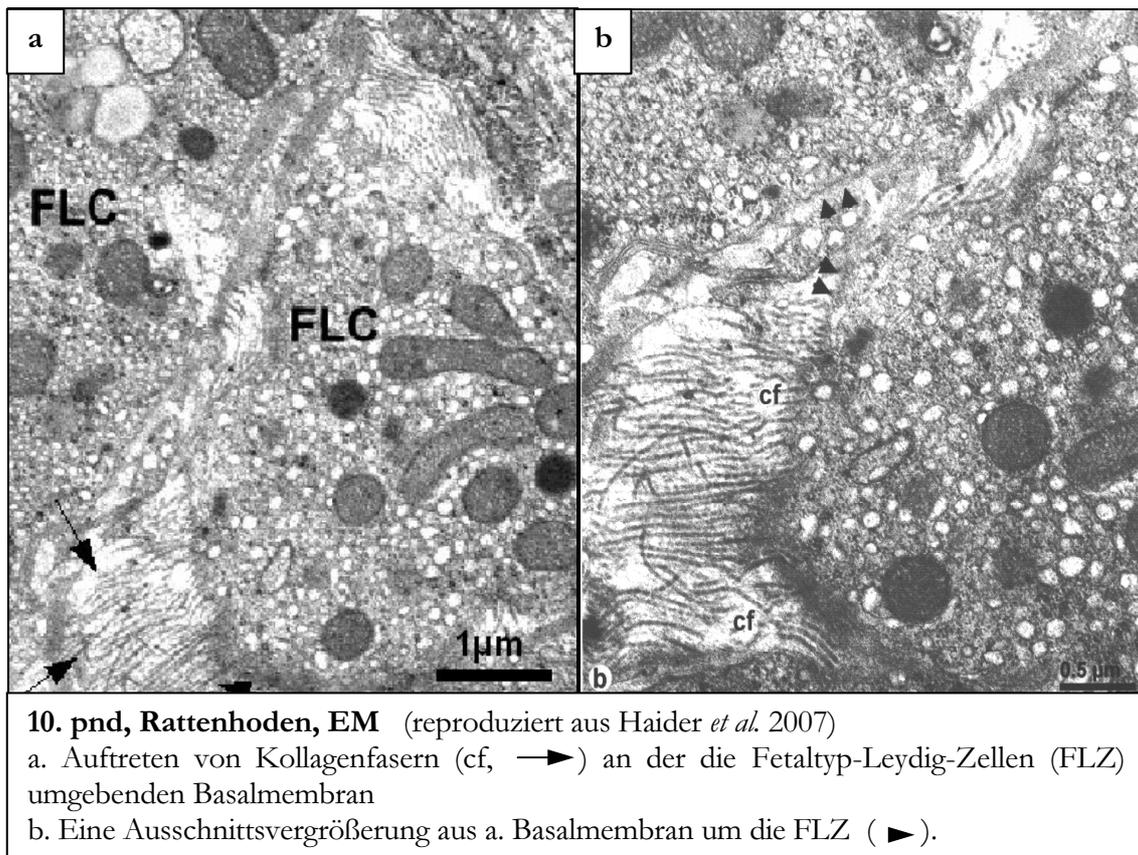
**Abb. 1** Leydigzellpopulationen (Reproduziert aus (Griswold *et al.* 2009) )  
 Fetaltyp-Leydig-Zellen (FLC)  
 Infantile-Leydig-Zellen (ILC)  
 Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC)

1997; Lalli *et al.* 1998; Nachtigal *et al.* 1998; Yu *et al.* 1998; Jeyasuria *et al.* 2004).

Die Anzahl der FLZ nimmt nach der Geburt stetig ab, einige wenige Zellen sind bis zum 30. Postnataltag (pnd) lichtmikroskopisch nachweisbar, ihr weiteres Schicksal wird kontrovers diskutiert (Haider *et al.* 1983; Haider *et al.* 1986; Kuopio *et al.* 1989; Prockop *et al.* 1995). So berichten einige Autoren über das Vorkommen der FLZ auch noch zu späteren Zeitpunkten, z.B. bis zum 90. pnd (Kerr *et al.* 1988; Ariyaratne *et al.* 2000).

Yokoi *et al.* (1998) konnten zeigen, dass FLZ in der Postnatalphase einem apoptotischen Zelluntergang unterliegen, wodurch sich ihre Zahl reduziert (Yokoi *et al.* 1998), andere Autoren konnten dies nicht beobachten (Faria *et al.* 2003). Die Beobachtung von Kollagenfasern in unmittelbarer Nähe zu FLZ, insbesondere ihr in den ersten 15 Postnataltagen zunehmendes Auftreten (Haider *et al.* 2007), ließ die Frage nach der Herkunft dieser Kollagenfasern aufkommen, und ob ihr Auftreten in Zusammenhang mit dem Untergang der FLZ im postnatalen Rattenhoden stehen könnte. Auffällig war ein massives Auftreten der Kollagenfasern an der Außenmembran der FLZ an einem Cluster. Eine stärkere Vergrößerung dieser EM-Aufnahmen zeigte das Vorkommen dieser Kollagenfasern direkt an der Außenmembran der FLZ (**Abb. 2**) (Tran *et al.* 2006; Haider 2007).

## Abbildung 2



Ziel der hier vorliegenden immunhistochemischen Arbeit war es, neue Erkenntnisse über den postnatalen Untergang der FLZ zu gewinnen.

Hierbei interessierten insbesondere die Fragen:

1. Bilden FLZ in zeitlichem Zusammenhang mit ihrem Untergang vom 1. bis zum 35. pnd Prokollagen Typ I?
2. Spielt das Enzym Caspase-3 bei dem apoptotischen Zelltod der FLZ eine Rolle?

## **2 MATERIALIEN UND METHODEN**

### **2.1 Untersuchungsmaterial**

#### **2.1.1 Versuchstiere und Gewebeentnahme**

Als Versuchstiere dienten je fünf männliche Wistar-Ratten der Altersgruppen 1., 5., 10., 15., 20., 25., 35. und 90. Postnataltag (pnd), welche unter standardisierten Bedingungen in einer pathogenfreien Zone, bei einer Temperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 5 \%$  und einem zwölfstündigen Licht-Dunkel-Zyklus in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf aufgezogen wurden. Trinkwasser und Rattenfutter standen ad libitum zur Verfügung. Die Gewebegewinnung fand jeweils vormittags, immer in der Zeit von 10:00 bis 12:00 Uhr, statt.

Die Tiere wurden einzeln in einer Kammer mit Diethylether betäubt und anschließend in tiefster Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Auf einer Korkplatte in Rückenlage an den vier Extremitäten fixiert, wurde mittels einer medianen Laparotomie von der Symphyse bis zum Xiphoid das Abdomen eröffnet, die Hoden aufgesucht und diese nach Mobilisation und Durchtrennung der Samenstränge einzeln entnommen.

#### **2.1.2 Gewebeaufbereitung**

Die so gewonnenen Präparate wurden dann für eine Dauer von 24 Stunden in Bouinscher Lösung fixiert. Die Bouinsche Lösung wurde jeweils unmittelbar vor der Gewebeentnahme hergestellt.

Bouinsche Lösung:	- heiß gesättigte Pikrinsäure	150 ml
	- Formaldehydlösung 37%ig	50 ml
	- Eisessig 98%ig	10 ml

Als Vorbereitung auf die Paraffineinbettung wurden die Hoden nach folgendem Schema in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und dann in Methylbenzoat als Zwischenmedium überführt:

1. 70 % Isopropanol 6 Std. (3 x Austausch des Alkohols)
2. 80 % Isopropanol 12 Std. (3 x Austausch des Alkohols)
3. 90 % Isopropanol 12 Std. (3 x Austausch des Alkohols)
4. 100 % Isopropanol 12 Std. (3 x Austausch des Alkohols)
5. Methylbenzoat I 3 Std.
6. Methylbenzoat II 20 Std.
7. Methylbenzoat III 24 Std.

Die Präparate wurden anschließend einzeln in Paraffin eingebettet.

## **2.2 Beschreibung der angewandten Methoden**

### **2.2.1 Schnittschema**

Von jedem der Tiere wurden vom rechten Hoden je 30 Serienschritte mit einer Dicke von 4  $\mu\text{m}$  in Nähe der Äquatorebene mit einem Mikrotom des Typs „Leica SM 2000R“ angefertigt, zur Streckung in ein Wasserbad überführt und auf je einen Glasobjektträger aufgezogen. In einem Wärmeschrank wurden die Schnitte 24 Stunden bei 37°C getrocknet.

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und dann in Aqua dest. gespült.

Der erste der insgesamt 30 Schnitte jeder Serie wurde zur lichtmikroskopischen Darstellung der Histomorphologie mit der PAS-Reaktion (= **P**eriodic-**A**cid-**S**chiff-Reaktion) gefärbt.

Die Schnitte mit den Nummern 3, 13 und 23 wurden für die immunhistochemische Darstellung von Caspase-3 verwendet; die Schnitte 7, 17 und 25 für die immunhistochemische Darstellung von Prokollagen. So wurden an drei

unterschiedlichen Schnitten jeweils unterschiedliche Zellen erfasst (z.B. Abstand zwischen Schnitt Nr.3 und Nr. 13 = 40 µm).

### **2.2.2 Immunhistochemie**

Für die immunhistochemische Darstellung wurde die *indirekte Methode* angewandt. Hierbei wird nach Inkubation mit dem Primärantikörper ein Sekundärantikörper verwendet, welcher gegen die Spezies von der der Primärantikörper stammt, gerichtet ist, und der mit Horseradish-Peroxidase konjugiert ist (Heyderman 1979). Bei jeder Immunreaktion wurden Negativ-Kontrollen vorgenommen. Hierbei wurde jeweils der Primärantikörper weggelassen.

#### **2.2.2.1 Nachweis von Caspase-3**

Der verwendete Primärantikörper der Firma Biocarta (Anti-Caspase-3, Human) ist ein hochspezifischer polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der sowohl mit der inaktiven 32-kD Caspase-3 als auch mit der aktiven 17-kD Untereinheit reagiert.

1. Entparaffinierung und Rehydrierung
2. Antigen-Retrieval (Shi *et al.* 1997) bei 95 – 99°C in TBS-T-Puffer<sup>1</sup> für 20 Min., anschließend 20 Min. abkühlen lassen
3. Schnitte mit DakoPen® einkreisen und für 5 Min. in TBS-Puffer<sup>2</sup> einlegen
4. Flüssigkeit abschleudern
5. Aufbringen von 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und für 5 Min. einwirken lassen zur Inaktivierung von Gewebeperoxidasen
6. Spülung mit Aqua dest.
7. für 5 Min. in TBS-Puffer<sup>2</sup> einlegen
8. Flüssigkeit abschleudern

9. BACKGROUND*SNIPER*® der Firma Biocare aufbringen und 10 Min. einwirken lassen
10. Mit TBS-Puffer<sup>2</sup> spülen
11. Primär-AK Anti-Caspase-3 (Human) der Firma BIOCARTA (Cat. #12-01-16361), polyklonaler Kaninchen-AK, Verdünnung 1:1800, bei 4°C für 16 Std. einwirken lassen
12. Schnitte mit TBS-Puffer<sup>2</sup> spülen und 5 Min. darin einlegen
13. Flüssigkeit abschleudern
14. DakoCytomation EnVision® + Labelled Polymer–HRP Anti-Rabbit, bei 20°C für 30 Min.
15. Schnitte mit TBS-Puffer<sup>2</sup> spülen und 5 Min. darin einlegen
16. Flüssigkeit abschleudern
17. DAB 0,1 % von Dako bei 20°C für 10 Min.
18. Spülen mit Aqua dest.
19. Kernfärbung mit Hämalaun für 1 Min.
20. Unter fließendem Wasser „Bläuen“
21. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe, dann Xylol, mit DePex eindecken.

### 2.2.2.2 Nachweis von Prokollagen Typ I

Der verwendete Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. ist ein polyklonaler Ziegen-Antikörper, der gegen die  $\alpha 2$ -Kette des Prokollagen Typ I der Maus gerichtet ist. Er ist kreuzreagibel mit Prokollagen Typ I der Ratte und des Menschen.

1. Entparaffinierung und Rehydrierung
2. Antigen-Retrieval bei 95 – 99°C in TBS-T-Puffer<sup>1</sup> für 20 Min., anschließend 20 Min. abkühlen lassen
3. Schnitte mit DakoPen® einkreisen und für 5 Min. in TBS-Puffer<sup>2</sup> einlegen
4. Flüssigkeit abschleudern
5. Aufbringen von 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und für 5 Min. einwirken lassen zur Inaktivierung von Gewebeperoxidasen
6. Spülung mit Aqua dest.
7. für 5 Min. in TBS-Puffer<sup>2</sup> einlegen
8. Flüssigkeit abschleudern
9. Primär-AK Anti-Procollagen  $\alpha 2$  Type I der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. (sc-8787), polyklonaler Ziegen-AK, Verdünnung 1:100, bei 4°C für 16 Std. einwirken lassen
10. Schnitte mit TBS-Puffer<sup>2</sup> spülen und 5 Min. darin einlegen
11. Flüssigkeit abschleudern
12. Sekundär-AK Rabbit Anti-Goat/HRP der Firma Dako (Code-Nr. P 0449), Verdünnung 1:50, bei 20°C, 60 Min. einwirken lassen

13. Schnitte mit TBS-Puffer<sup>2</sup> spülen und 5 Min. darin einlegen
14. Flüssigkeit abschleudern
15. DAB 0,1 % von Dako bei 20°C für 10 Min.
16. Spülen mit Aqua dest.
17. Kernfärbung mit Hämalaun für 1 Min.
18. Unter fließendem Wasser „Bläuen“
19. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe, dann Xylol, mit DePex eindecken.

<sup>1</sup> TBS-T-Puffer (0,05M TBS, 0,05% Tween 20, pH 7,6)

- |                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| - Trishydroxymethylaminomethan        | 6,1 g   |
| - NaCl                                | 9,0 g   |
| - Tween 20                            | 0,5 ml  |
| - Aqua dest.                          | 1000 ml |
| - mit konz. HCl auf pH 7,6 einstellen |         |

<sup>2</sup> TBS-Puffer (0,05M TBS, pH 7,4)

- |                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| - Trishydroxymethylaminomethan        | 6,1 g   |
| - NaCl                                | 9,0 g   |
| - Aqua dest.                          | 1000 ml |
| - mit konz. HCl auf pH 7,4 einstellen |         |

### 2.2.3 Perjodsäure-Schiff-Reaktion

1. Entparaffinierung und Rehydrierung
2. Einlegen in 0,5 % Perjodsäure für 5 Min.
3. Spülung mit Aqua dest.
4. Einlegen in Schiffs-Reagenz für 20 Min.
5. Einlegen in wässrige Disulfid-Lösung<sup>3</sup> für 2 Min.
6. Spülung mit fließendem Leitungswasser für 10 Min.
7. Kernfärbung mit Hämalaun für 5 Min.
8. Unter fließendem Wasser „Bläuen“
9. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe, dann Xylol, mit DePex eindecken.

#### <sup>3</sup> Disulfid-Lösung

6 ml 10 % Kaliumdisulfidlösung

+ 5ml 1M HCl

+ H<sub>2</sub>O ad 100 ml

## 2.2.4 Quantifizierung und statistische Methoden

### 2.2.4.1 Zellzählung

Für die quantitative Auswertung wurde ein Lichtmikroskop der Firma Leitz verwendet. Von jedem Tier jeder Altersgruppe wurden je drei Schnitte pro AK-Reaktion ausgewertet, wobei der Abstand dieser Serienschnitte mindestens je 35  $\mu\text{m}$  betrug, um Mehrfachzählungen einer Zelle auszuschließen.

Zuerst wurde mit einem Mess-Okular der jeweils größte und kleinste Durchmesser des ovalen Schnitts bestimmt, dann wurde mit der Flächenformel für elliptische Figuren die Fläche des Präparates errechnet.

Nach histomorphologischer Identifizierung der FLZ wurden alle pro Schnitt vorhandenen FLZ erfasst. Bei der Prokollagen-Reaktion wurde eine qualitative Unterscheidung in Prokollagen-positive und Prokollagen-negative Zellen vorgenommen. Bei der Caspase-3-Reaktion wurde nach der Lokalisation der Immunreaktion unterschieden. Folgende vier Reaktionsmuster wurden differenziert: Keine Reaktion, ausschließlich nukleäre Reaktion, ausschließlich zytoplasmatische Reaktion und nukleäre kombiniert mit zytoplasmatischer Reaktion. Die Ergebnisse dieser Zählungen wurden in einer Excel-Tabelle gespeichert.

#### 2.2.4.2 Statistische Auswertung

Ausgewertet wurden die Ergebnisse der Zellzählungen für folgende Altersgruppen: 1., 5., 10., 15. und 20. pnd.

Für die Prokollagen- und die Caspase-3-Reaktion wurden pro Altersgruppe je 15 Schnitte ausgewertet, insgesamt 75 Schnitte für den jeweiligen Antikörper. Die erhobenen Daten wurden mit der Software *Microsoft® Office Excel 2003 SP2* ausgewertet. Hierbei wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der gezählten Zellen berechnet und in Diagrammen dargestellt. Die Unterschiede der Zellzahlen zwischen den verschiedenen Altersgruppen wurden mit Hilfe des *Zweistichproben t-Test für unverbundene Stichproben* auf Signifikanz überprüft. Als Signifikanzniveau wurde ein Alpha-Fehler von  $p < 0,05$  angenommen.

### **3 ERGEBNISSE**

Unter lichtmikroskopischen Bedingungen erkennt man FLZ als große, rund bis oval geformte Zellen mit einem deutlich sichtbaren runden Kern, der sehr häufig einen Nukleolus aufweist. Sie befinden sich im interstitiellen Raum zwischen den Tubuli seminiferi und sind in Clustern unterschiedlicher Größe angeordnet. Häufig findet man sie in direkter Nachbarschaft zu interstitiellen Blutgefäßen. Alle intakten Cluster sind von Fibrozyten ummantelt. Die Anzahl der Cluster nimmt ab dem 5. pnd stetig ab, so erkennt man am 10. pnd 5 - 7 Cluster pro Schnittfläche, am 15. pnd sind es noch 3 - 4, und am 25. pnd findet man nur noch 1 - 2 Cluster.

#### **3.1 Prokollagen Typ I**

##### **3.1.1 Immunhistochemische Reaktion des Prokollagens**

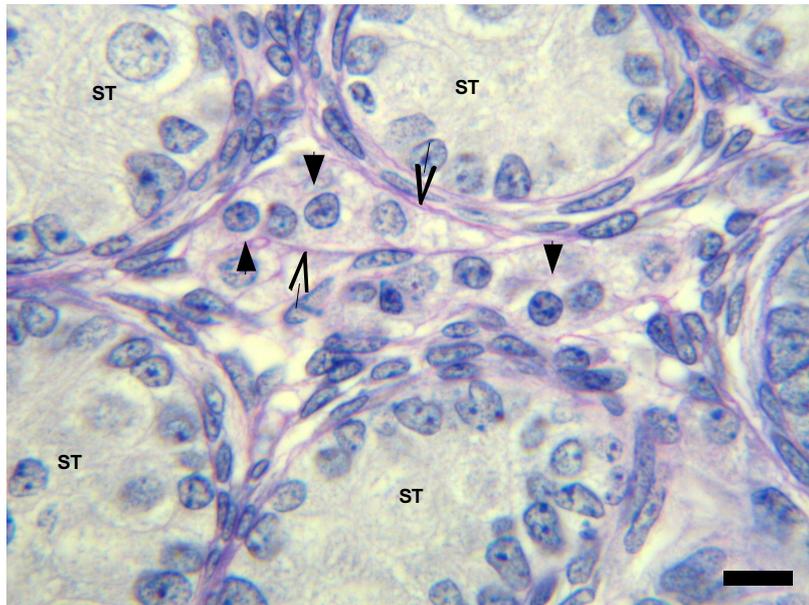
Am 1. pnd sind die FLZ im intertubulären Raum in Clustern angeordnet, die von einer PAS-positiven Basallamina umgeben sind. Die Tubuli seminiferi besitzen noch kein sichtbares Lumen und enthalten neben reichlich unreifen Sertolizellen, welche einen ovalen Zellkern mit deutlichem Nukleolus beinhalten, einige Gonozyten (Prospermatogonien Typ I) (**Abb. 3**). Die meisten FLZ zeigen keine positive Immunreaktion für Prokollagen Typ I (**Abb. 8**). Das typisch braune Reaktionsprodukt der Immunhistochemie weisen lediglich einige sowohl peritubulär liegende als auch an die Cluster angrenzende Fibrozyten im Zytoplasma auf (**Abb. 8b**). Am 10. pnd sind die Cluster deutlich runder als am 1. pnd und sie befinden sich häufig in unmittelbarer Nachbarschaft zu kleinen Blutgefäßen. Sie sind weiterhin von einer Basallamina sowie von Fibrozyten umgeben. Auch zu diesem Zeitpunkt besitzen die Tubuli seminiferi kein erkennbares Lumen (**Abb. 4**). Einige FLZ zeigen eine deutliche zytoplasmatische Immunreaktion. Sie lassen sich gut von den ihnen direkt angrenzenden FLZ ohne Immunreaktion abgrenzen (**Abb. 9**).

Bei den Tubuli seminiferi kann man am 20. pnd ein Lumen umgeben von einem zellreichen, jedoch noch unreifen Keimepithel erkennen, dessen Zellbild durch verschiedene Stadien der Spermatogenese dominiert ist, reife Spermatiden fehlen (**Abb. 5a**). Die Anzahl der FLZ hat deutlich abgenommen, man erkennt zunehmend Cluster mit inkonstanter bzw. fehlender Basallamina (**Abb. 5b**). Die noch vorhandenen FLZ zeigen mehrheitlich eine positive zytoplasmatische Immunreaktion (**Abb. 10**). Am 35. pnd befinden sich in den intertubulären Räumen viele unreife ALZ (**Abb. 6**) die keinerlei Immunreaktion aufweisen (**Abb. 12**). FLZ sind zu diesem wie auch zu späteren Zeitpunkten nicht nachweisbar. Am 90. pnd sind im reifen Keimepithel alle Stadien der Spermatogenese erkennbar, im tubulären Lumen sind reichlich elongierte Spermatiden vorhanden. Im intertubulären Dreieck sind ALZ in unmittelbarer Nähe von Blutgefäßen abgrenzbar (**Abb. 7**).

Als auffälliger Nebenbefund sei hier erwähnt, dass die immunhistochemische Reaktion von Prokollagen am 35. pnd in den Akrosomenbläschen, in der Übergangsphase zur Kappenbildung und in der fertigen Akrosomenkappe in distinkter Form mit mäßig bis starker Intensität vorhanden ist (**Abb. 12**). Bei den elongierten Spermatiden kann hingegen keine positive Immunreaktion beobachtet werden.

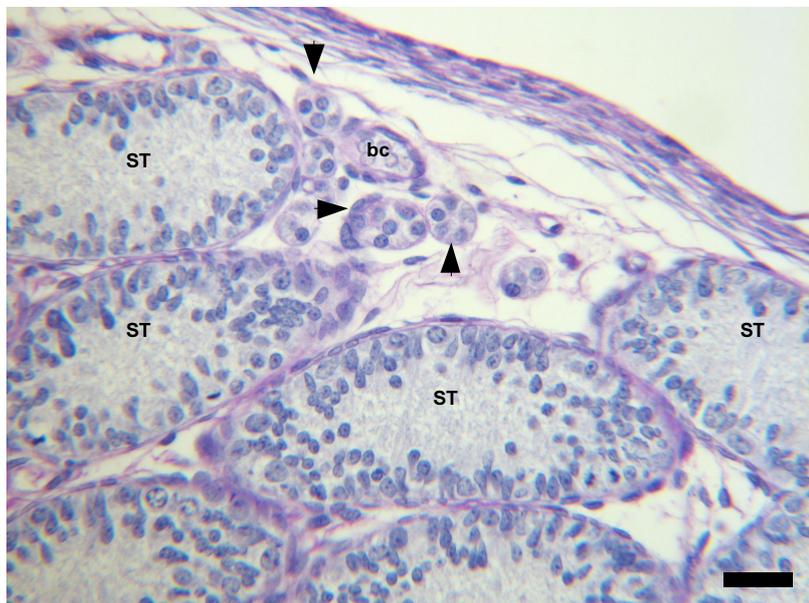
Die jeweiligen Negativkontrollen der Immunhistochemie zeigen keinerlei Immunreaktion (**Abb. 11, 13**).

### Abbildung 3



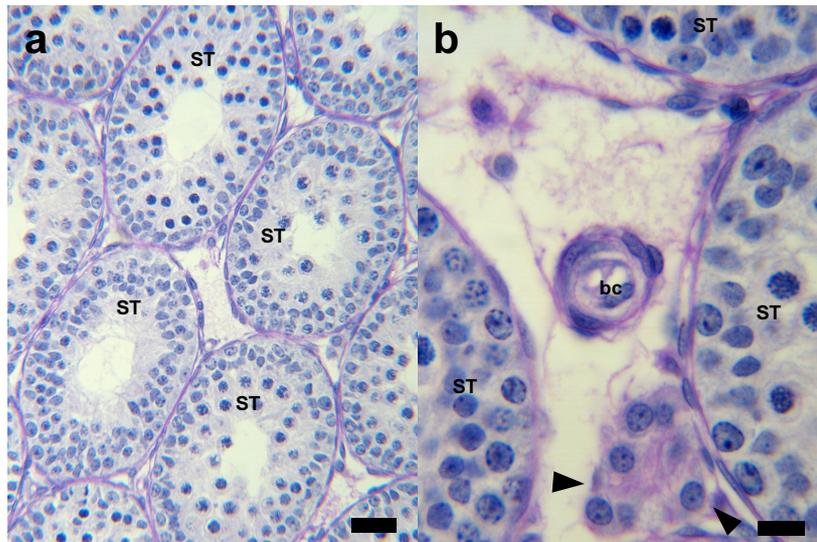
1. pnd, Rattenhoden, PJS-Färbung  
FLZ (▶) sind in Clustern angeordnet und von einer  
Basallamina (▶) umgeben. Die Tubuli seminiferi (ST)  
lassen keine Lumina erkennen.  
Bar = 10 µm

### Abbildung 4



10. pnd, Rattenhoden, PJS-Färbung  
Mehrere Cluster von FLZ (▶) mit Basallamina, in direkter  
Nachbarschaft einer kleinen Kapillare (bc). Tubuli seminiferi  
(ST) ohne erkennbare Lumina.  
Bar = 25 µm

## Abbildung 5



20. pnd, Rattenhoden, PJS-Färbung

**a.** Mehrere Tubuli seminiferi (ST) mit kleinen Lumina und einem noch unreifen Keimepithel.

Bar = 40  $\mu$ m

**b.** Ein sich in Auflösung befindlicher FLZ-Cluster (▶) mit inkonstanter Basallamina, in Nachbarschaft einer Kapillare (bc).

Bar = 10  $\mu$ m

## Abbildung 6



35. pnd, Rattenhoden, PJS-Färbung

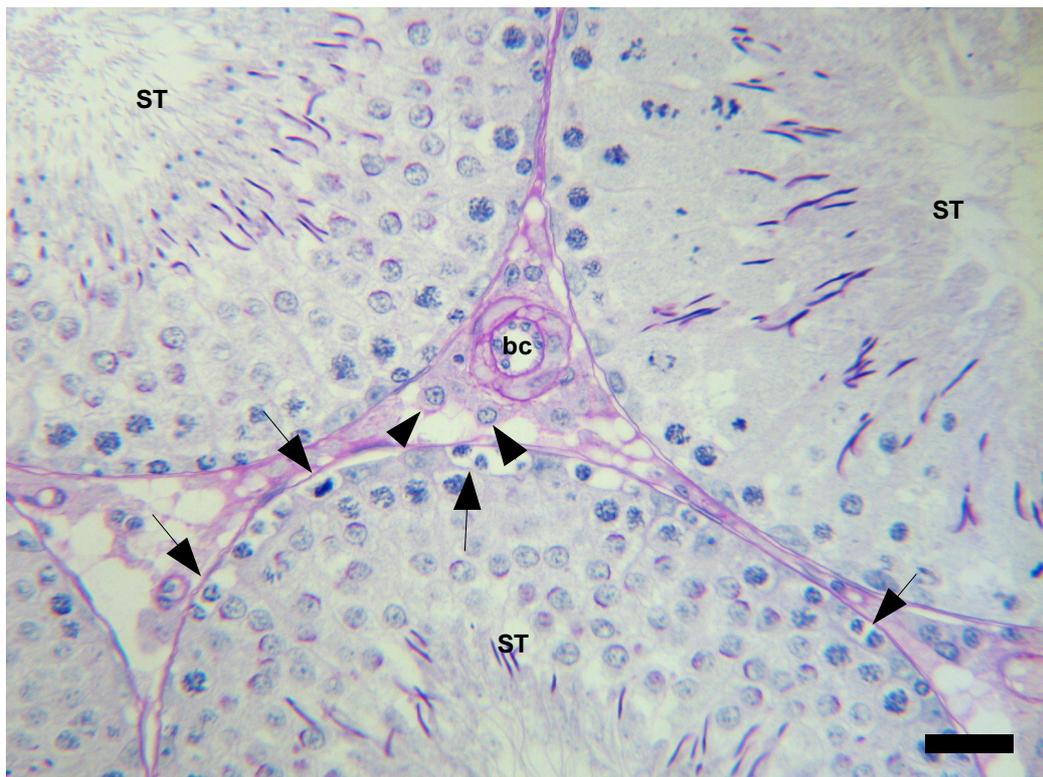
**a.** Tubuli seminiferi (ST) mit hoch aufgebautem Keimepithel, der interstitielle Raum erscheint deutlich zellreicher als am 20. pnd

Bar = 40  $\mu$ m

**b.** Mehrere ALZ (▶) zusammen mit einer Kapillare (bc) in einem intertubulären Dreieck

Bar = 10  $\mu$ m

## Abbildung 7

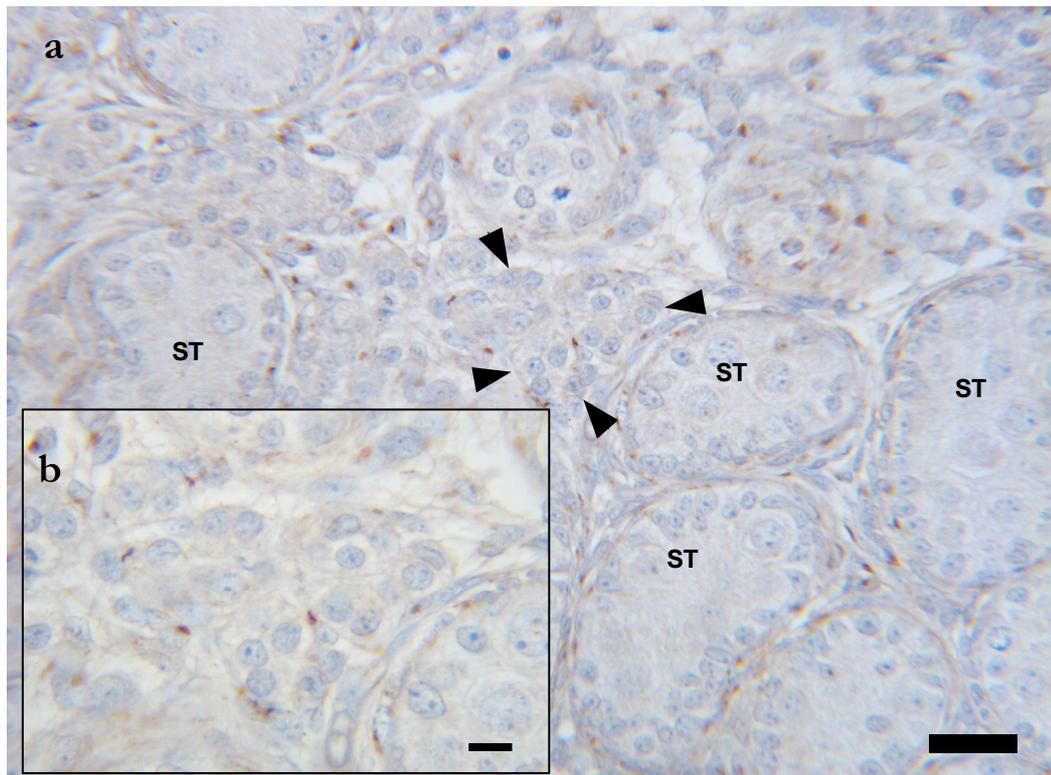


90. pnd, Rattenhoden, PJS-Färbung

Alle Stufen der Spermatogenese-Zellen sind innerhalb der Tubuli seminiferi (ST) vorhanden. Die Akrosomenkappe ist in den runden und elongierten Spermatisden violett dargestellt. Man erkennt zahlreiche Mitosen (→). Einzelne ALZ (▶) in direkter Nachbarschaft einer Kapillare (bc).

Bar = 25 µm

## Abbildung 8



1. pnd, Rattenhoden, Prokollagen Typ-I

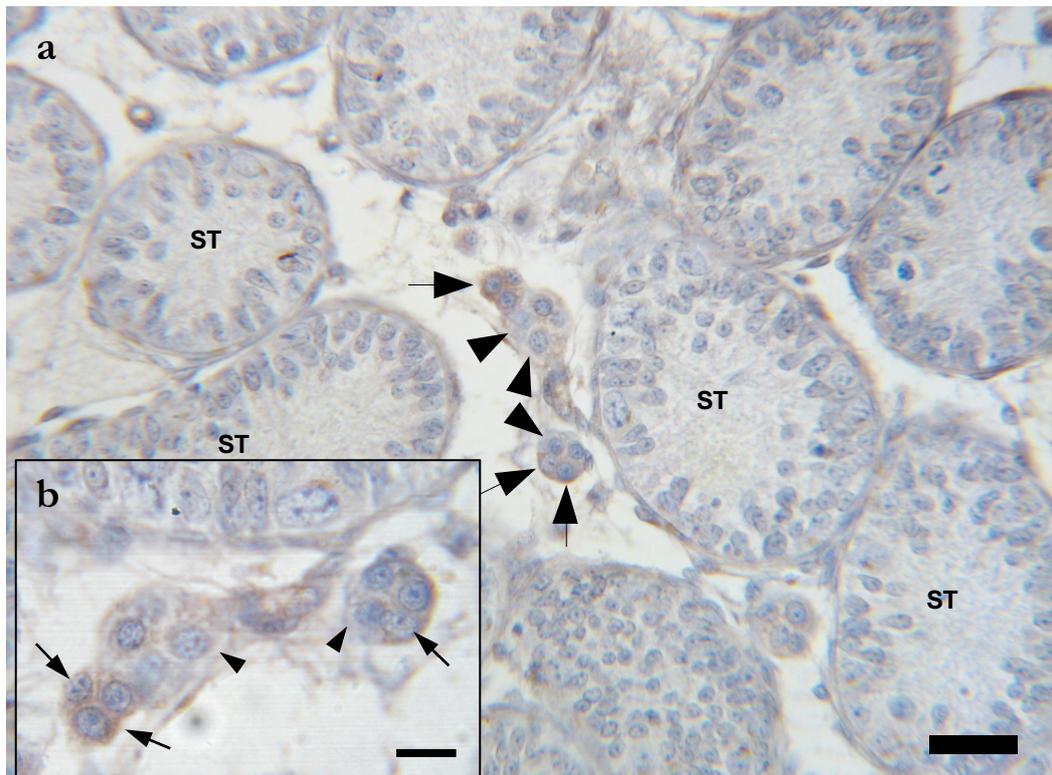
**a.** Mehrere in großen Clustern angeordnete FLZ (►), sie zeigen keine positive Immunreaktion. Tubuli seminiferi (ST)

Bar = 25 µm

**b.** Vergrößerung von a. Einige Fibroblasten zeigen eine positive Immunreaktion.

Bar = 10 µm

## Abbildung 9



10. pnd, Rattenhoden, Prokollagen Typ-I

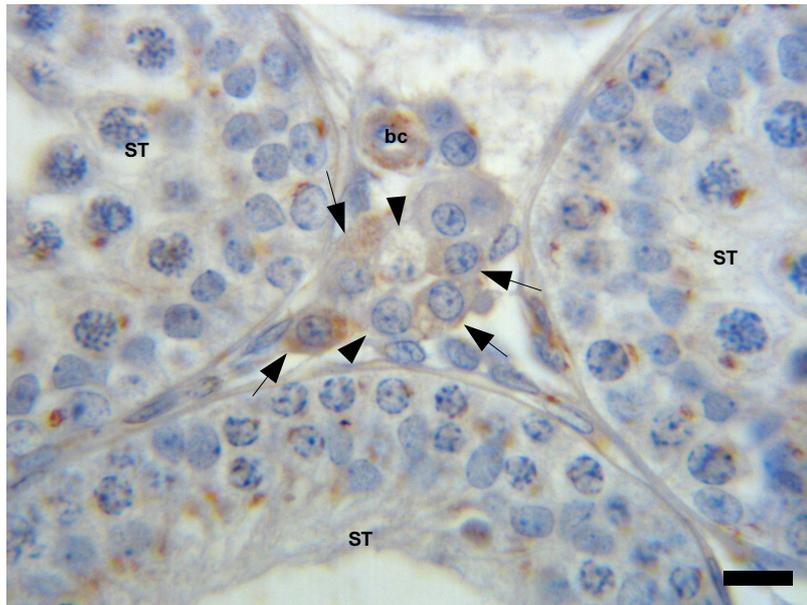
**a.** Mehrere Cluster von FLZ , einige zeigen eine starke zytoplasmatische Immunreaktion (  $\rightarrow$  ), andere FLZ innerhalb der Cluster sind negativ (  $\blacktriangleright$  ).  
Tubuli seminiferi (ST)

Bar = 25  $\mu$ m

**b.** Vergrößerung von a.

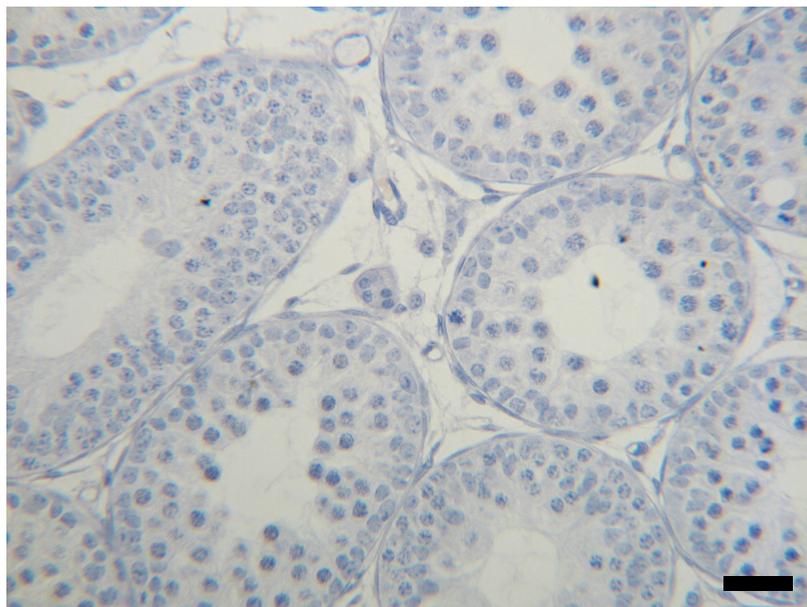
Bar = 10  $\mu$ m

## Abbildung 10



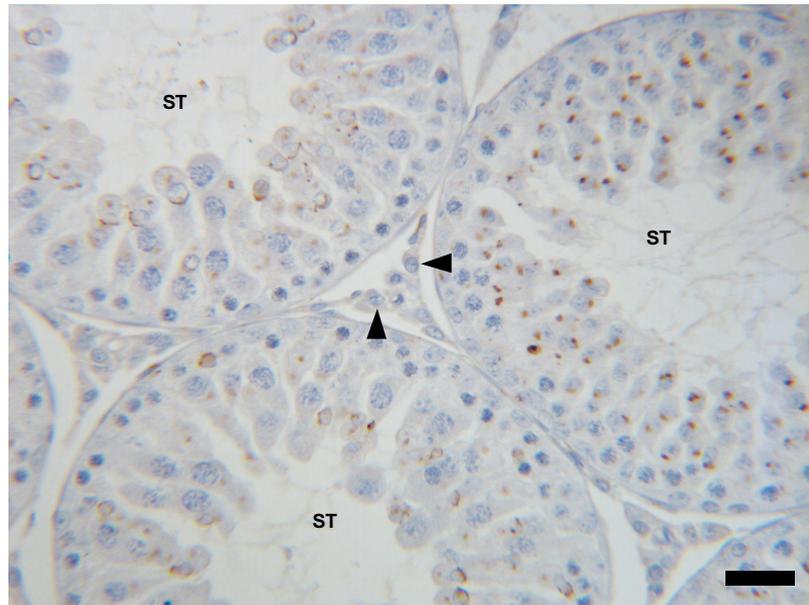
20. pnd, Rattenhoden, Prokollagen Typ-I  
Ein sich in Auflösung befindlicher Cluster von FLZ, die  
überwiegende Anzahl der FLZ zeigen eine positive  
Immunreaktion (—▶), wenige zeigen keine Reaktion( ▶).  
Tubuli seminiferi (ST), Kapillare (bc)  
Bar = 10 µm

## Abbildung 11



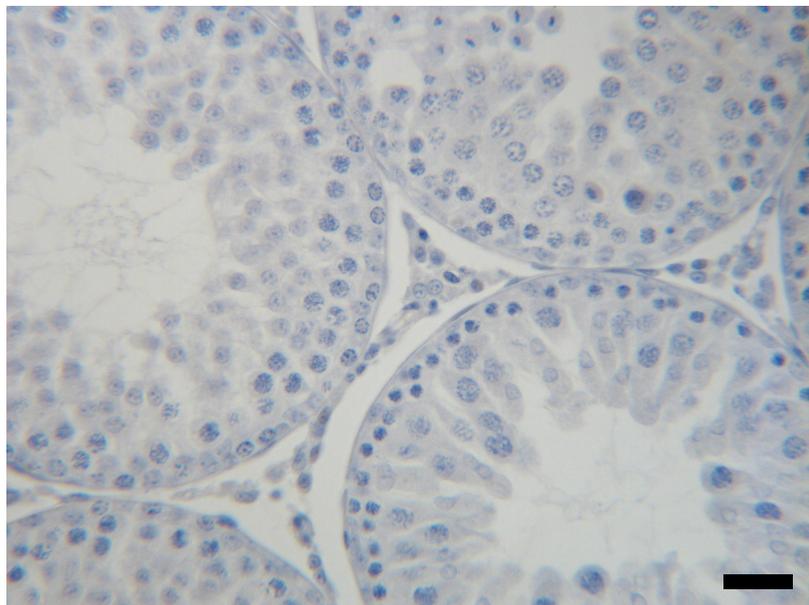
20. pnd, Rattenhoden, Prokollagen Typ-I Negativkontrolle  
Keine Immunreaktion sichtbar  
Bar = 25 µm

## Abbildung 12



35. pnd, Rattenhoden, Prokollagen Typ-I  
ALZ ohne Immunreaktion (▶), Tubuli seminiferi (ST)  
Bar = 25 µm

## Abbildung 13



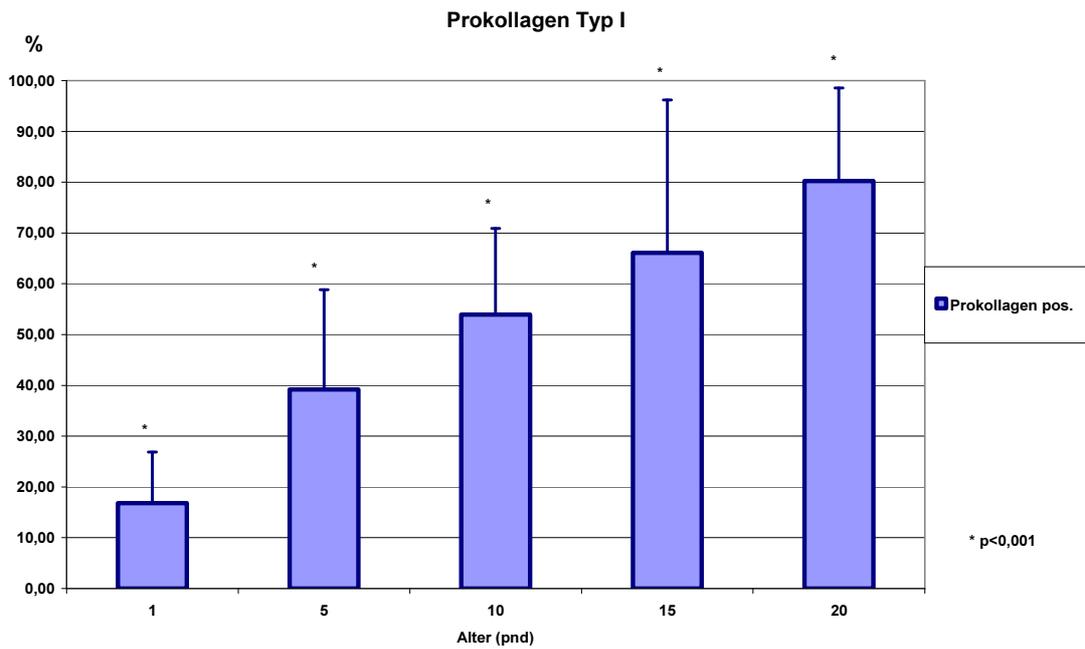
35. pnd, Rattenhoden, Prokollagen Typ-I Negativkontrolle  
Keine Immunreaktion sichtbar  
Bar = 25 µm

### 3.1.2 Quantitative Auswertung der Prokollagenreaktion

Das Diagramm (**Abb. 14**) zeigt den Mittelwert des prozentualen Anteils der FLZ mit positiver Immunreaktion für Prokollagen Typ I an der Gesamtzahl der FLZ pro mm<sup>2</sup> Schnittfläche. Die Abszisse zeigt das Alter der Tiere, auf der Ordinate ist der prozentuale Anteil aufgetragen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Am 1. pnd sind rund 17 % der gezählten FLZ positiv für Prokollagen Typ I. Am 5. pnd hat sich dieser Anteil mehr als verdoppelt und beträgt nun rund 40 %. Der 10. pnd zeigt einen weiteren Anstieg der Anzahl an FLZ mit positiver Immunreaktion auf 54 %. Dieser Trend setzt sich weiter fort, so dass am 15. pnd bereits 66 % der FLZ positiv sind. Am 20. pnd ist mit 80 % positiver FLZ das Maximum innerhalb der untersuchten Altersgruppen erreicht. Die Unterschiede sind in allen Altersgruppen hoch signifikant mit einem  $\alpha$ -Fehler von  $p < 0,001$ .

Die Gesamtzahl der FLZ nimmt mit zunehmendem Alter des Tieres ab (**Abb. 15**). Am 1. pnd können durchschnittlich 235 FLZ pro mm<sup>2</sup> Schnittfläche gezählt werden, am 5. pnd sind es 88 FLZ. Damit nimmt die Anzahl zwischen 1. pnd und 5. pnd um mehr als die Hälfte ab. Dieser Trend setzt sich fort, die Anzahl der FLZ halbiert sich zwischen dem 1. pnd und dem 15. pnd alle 5 Tage, bis auf durchschnittlich 15 FLZ am 20. pnd. Am 35. und am 90. pnd sind keine FLZ mehr nachweisbar.

**Abbildung 14**

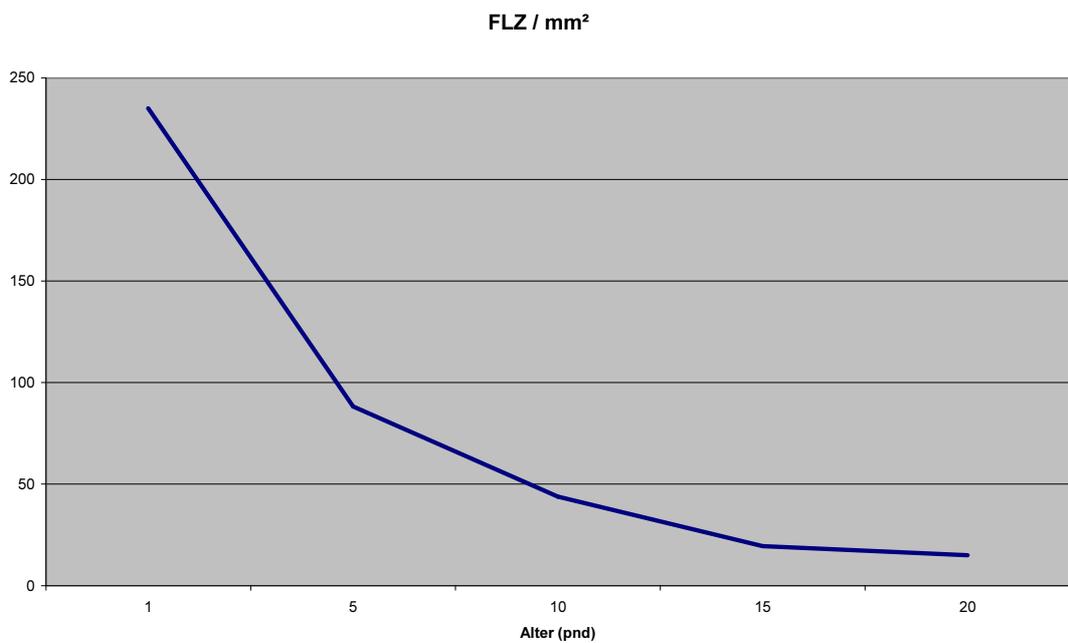


Prozentualer Anteil an Prokollagen-positiven FLZ an der Gesamtzahl von FLZ pro mm<sup>2</sup>.

Abszisse: Alter der Tiere in pnd.

Ordinate: Durchschnitt  $\pm$  Standardabweichung.

**Abbildung 15**



Quantifizierung der FLZ im Rattenhoden.

Abszisse: Alter der Tiere in pnd.

Ordinate: Durchschnittliche Anzahl der FLZ pro mm<sup>2</sup>

## 3.2 Caspase-3

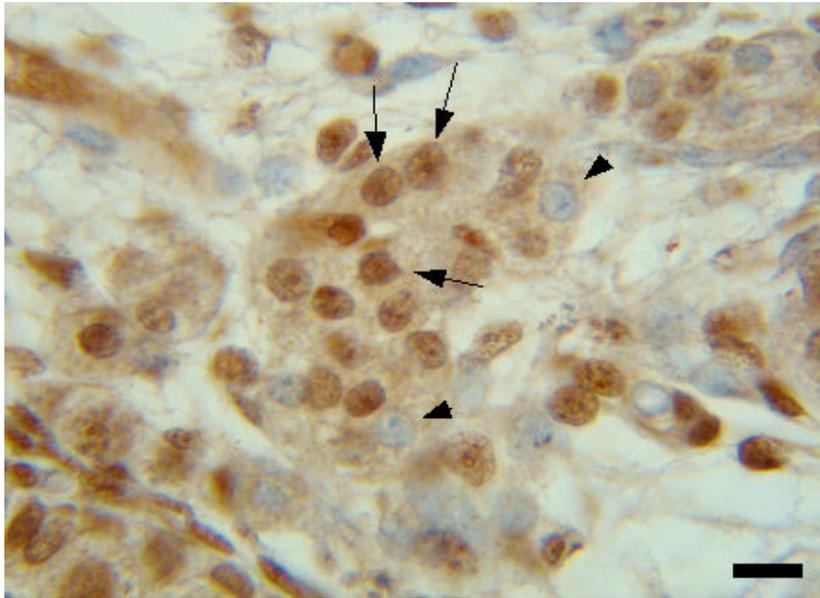
### 3.2.1 Immunhistochemische Reaktion der Caspase-3

Das Reaktionsprodukt der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper gegen Caspase-3 ist braun. Bei der Auswertung der Immunhistochemie wurden drei Reaktionsmuster unterschieden. Eine positive Immunreaktion ist bei den FLZ entweder nur nukleär, nur zytoplasmatisch, oder auch nukleär in Kombination mit einer zytoplasmatischen Reaktion zu erkennen.

Am 1. pnd zeigt der überwiegende Teil der in großen Clustern angeordneten FLZ eine rein nukleäre Immunreaktion. Sie sind gut von den FLZ ohne Reaktion zu unterscheiden, welche einen durch die Gegenfärbung mit Hämalalaun blau angefärbten Nukleus besitzen (**Abb. 16**). Am 10. pnd kann man alle drei Reaktionsmuster innerhalb eines Clusters erkennen. Die zytoplasmatische Immunreaktion ist teilweise unterschiedlich stark vorhanden. Zudem ist sie innerhalb des Zytoplasmas nicht immer homogen verteilt, so gibt es FLZ, bei denen die Reaktion vor allem peripher, also nukleusfern, zu erkennen ist (**Abb. 18**). Am 20. pnd sind nur noch wenige kleine FLZ Cluster vorhanden. Hier dominieren die FLZ mit deutlicher zytoplasmatischer Reaktion, ebenso wie die mit einer kombinierten zytoplasmatischen und nukleären Reaktion (**Abb. 19**). Am 35. pnd kann man keine FLZ mehr identifizieren. Man erkennt ALZ, von denen einige eine positive zytoplasmatische Immunreaktion aufweisen. Als Nebenbefund sieht man eine Reihe von Spermatogonien, die eine deutlich positive nukleäre Reaktion zeigen (**Abb. 21**).

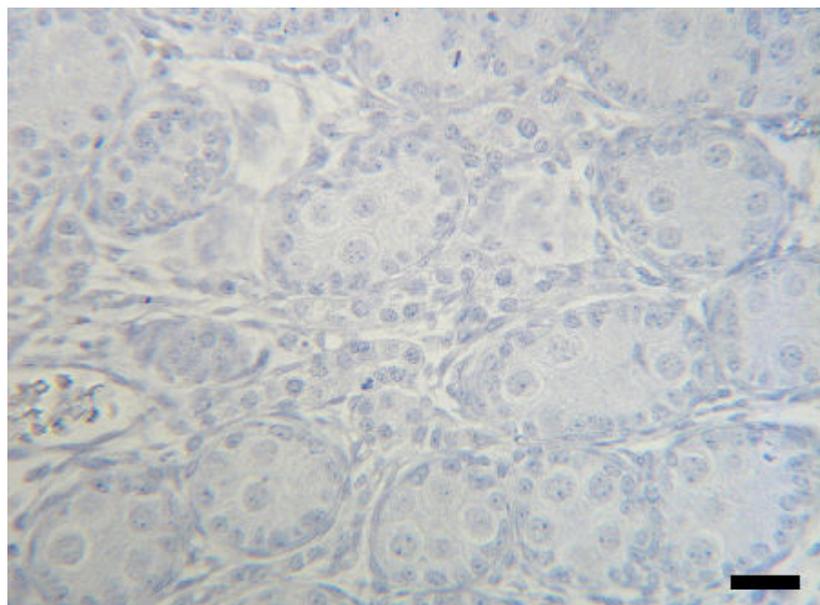
Alle Negativkontrollen (**Abb. 17, 20**), zeigen keinerlei Immunreaktion.

### Abbildung 16



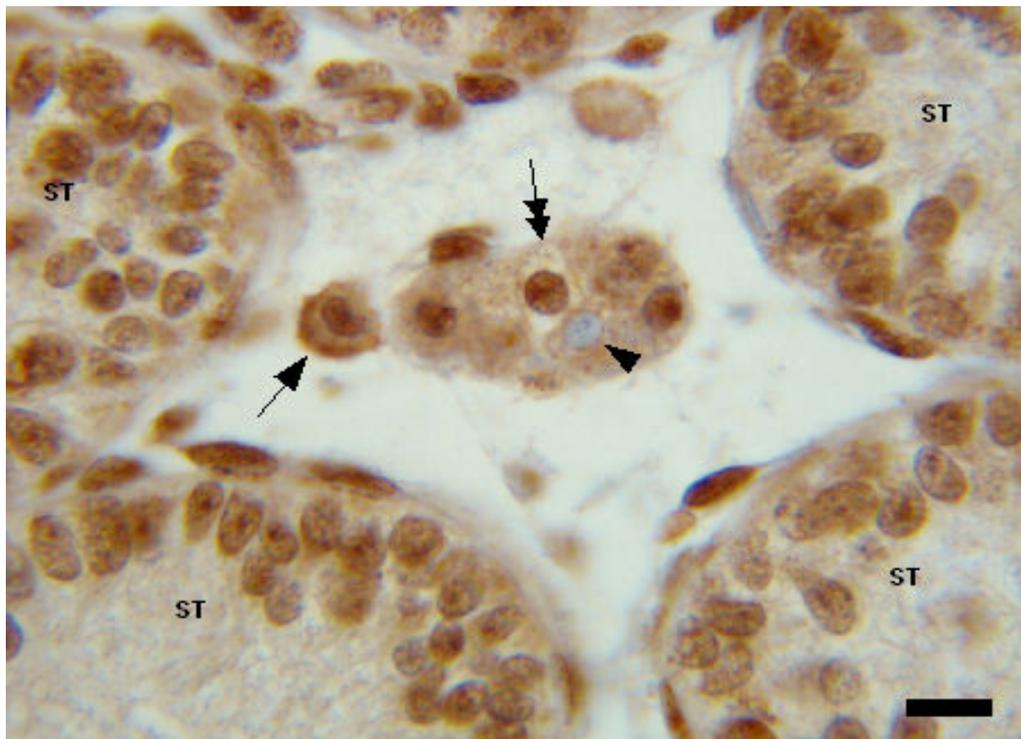
1. pnd, Rattenhoden, Caspase-3  
Cluster von FLZ, der überwiegende Teil zeigt eine positive nukleäre Immunreaktion (—▶), einige Zellen sind negativ (▶)  
Bar = 10  $\mu$ m

### Abbildung 17



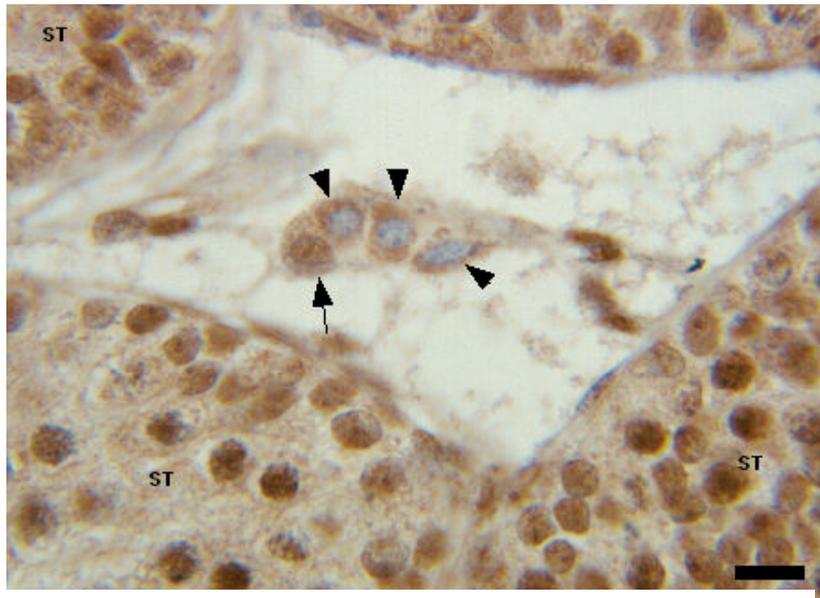
1. pnd, Rattenhoden, Caspase-3-Negativkontrolle  
Keine Immunreaktion sichtbar  
Bar = 25  $\mu$ m

## Abbildung 18



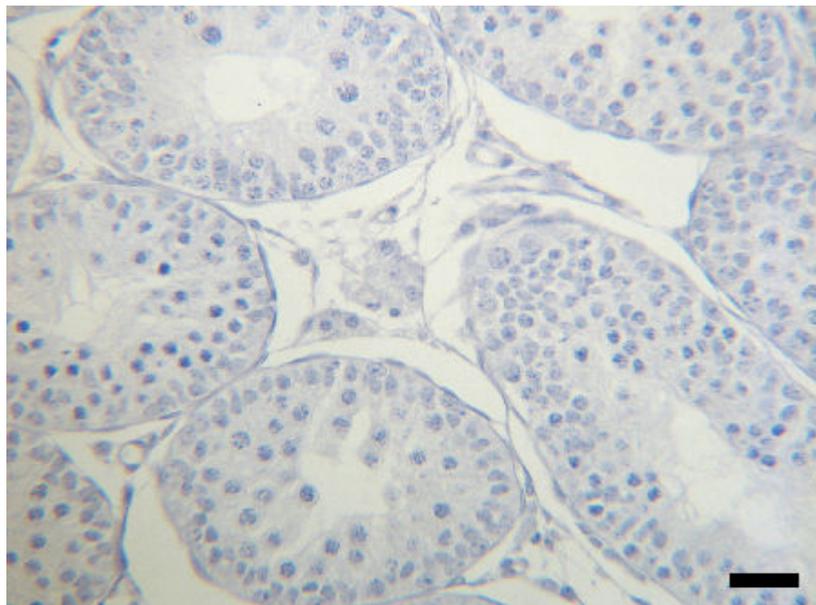
10. pnd, Rattenhoden, Caspase-3  
nukleär positive (→), zytoplasmatisch positive (▶), sowie nukleär +  
zytoplasmatisch positive (↗) FLZ in einem Cluster. Tubuli seminiferi (ST)  
Bar = 10 µm

### Abbildung 19



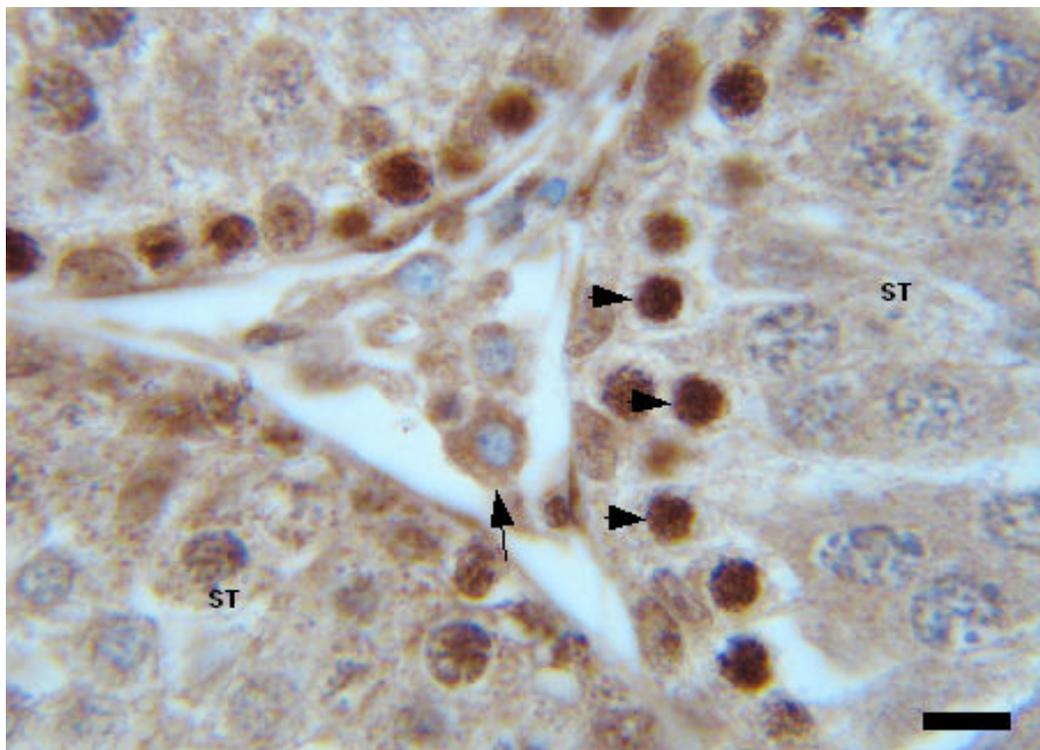
20. pnd, Rattenhoden, Caspase-3  
FLZ mit zytoplasmatischer Immunreaktion ( ►) neben einer  
FLZ mit zytoplasmatischer + nukleärer Immunreaktion ( →►)  
Tubuli seminiferi (ST)  
Bar = 10 µm

### Abbildung 20



20. pnd, Rattenhoden, Caspase-3-Negativkontrolle  
Keine Immunreaktion sichtbar  
Bar = 25 µm

Abbildung 21



35. pnd, Rattenhoden, Caspase-3  
ALZ mit deutlicher zytoplasmatischer Immunreaktion (→)  
Spermatogonien mit starker nukleärer Immunreaktion (▶)  
Tubuli seminiferi (ST)  
Bar = 10 µm

### 3.2.2 Quantitative Auswertung der Caspase-3-Reaktion

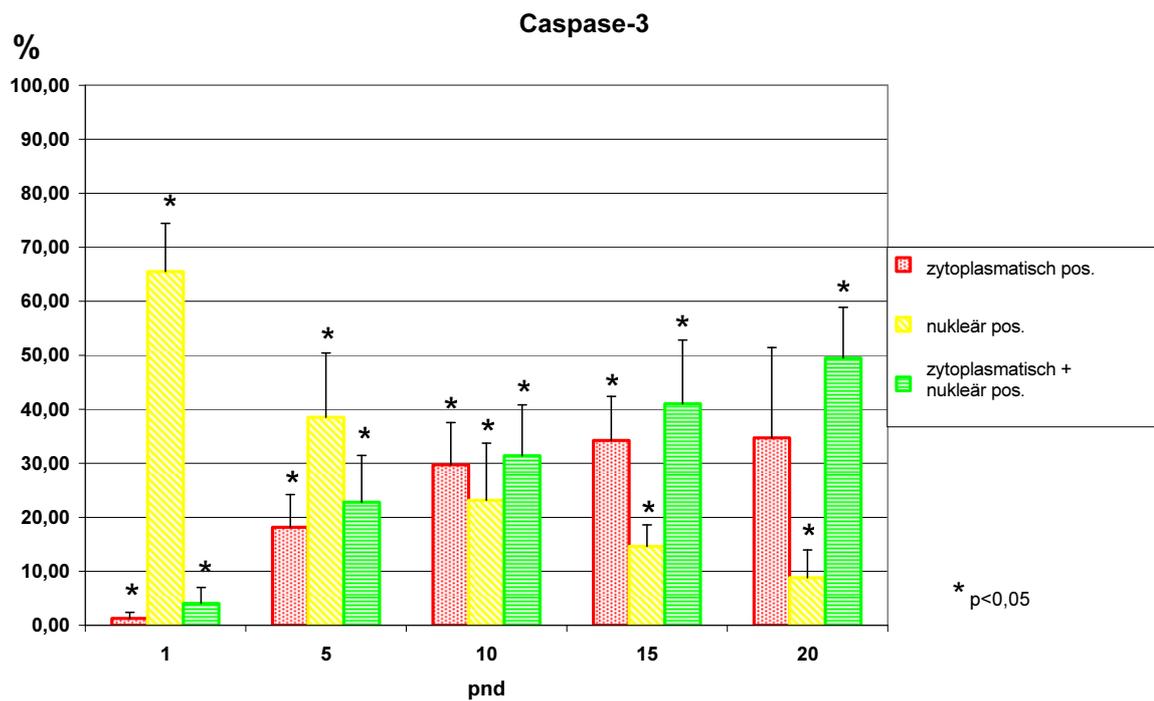
Das Diagramm (**Abb. 22**) zeigt die prozentualen Anteile der FLZ mit positiver Immunreaktion für Caspase-3 pro mm<sup>2</sup> Schnittfläche an den pnd 1, 5, 10, 15 und 20. Hierbei werden die drei Reaktionsmuster *nukleär positiv*, *zytoplasmatisch positiv* sowie *nukleär + zytoplasmatisch positiv* unterschieden.

Am 1. pnd zeigen rund 66 % der FLZ eine isolierte nukleäre Immunreaktion für Caspase-3, rein zytoplasmatische und kombinierte nukleär-zytoplasmatische Reaktionen treten nur sporadisch auf. Am 5. pnd bietet sich bereits ein deutlich anderes Verteilungsmuster als am 1. pnd. Der Anteil mit rein nukleärer Reaktion ist auf knapp 40 % gesunken, dafür lassen jetzt jeweils rund 20 % der FLZ eine rein zytoplasmatische sowie eine kombinierte nukleäre + zytoplasmatische Immunreaktion erkennen. Der 10. pnd stellt, bezogen auf das Verteilungsmuster, einen Wendepunkt dar. Die Reaktionsmuster zytoplasmatisch positiv, sowie kombiniert nukleär + zytoplasmatisch positiv kommen mit jeweils rund 30 % gleich häufig vor. Eine rein nukleäre Reaktion ist jetzt mit einem Anteil von rund 20 %, deutlich seltener zu beobachten als am 1. und 5. pnd. Dieser Trend setzt sich fort. Eine rein nukleäre Reaktion weisen am 15. pnd nur noch 15 %, am 20. pnd nur noch knapp 10 % der FLZ auf. Am 15. und am 20. pnd dominiert die kombinierte nukleäre + zytoplasmatische Reaktion mit 41 % am 15. pnd bzw. 49 % am 20. pnd. Die Unterschiede für die jeweiligen Reaktionsmuster zwischen den verschiedenen Altersgruppen sind signifikant mit einem  $\alpha$ -Fehler von  $p < 0,05$ . Lediglich zwischen dem 15. und dem 20. pnd ist bei dem rein zytoplasmatischen Reaktionsmuster kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Das Liniendiagramm (**Abb. 23**) beinhaltet die Ergebnisse der Immunhistochemie für Caspase-3 wie auch für Prokollagen Typ I. Die Linie für die Prokollagen positiven FLZ zeigt einen nahezu linear ansteigenden Verlauf. Annähernd parallel hierzu verläuft die Linie für die FLZ mit einer nukleären +

zytoplasmatischen Immunreaktion. Dieses gilt auch für den 1., 5. und 10. pnd der rein zytoplasmatischen Immunreaktion für Caspase-3; nach dem 10. pnd nimmt die Linie dagegen einen eher waagerechten Verlauf. Die Linie für die rein nukleäre Immunreaktion für Caspase-3 verläuft konträr. Sie hat am 1. pnd ihr Maximum, schneidet die Linie für Prokollagen am 5. pnd und erreicht ihr Minimum am 20. pnd.

**Abbildung 22**

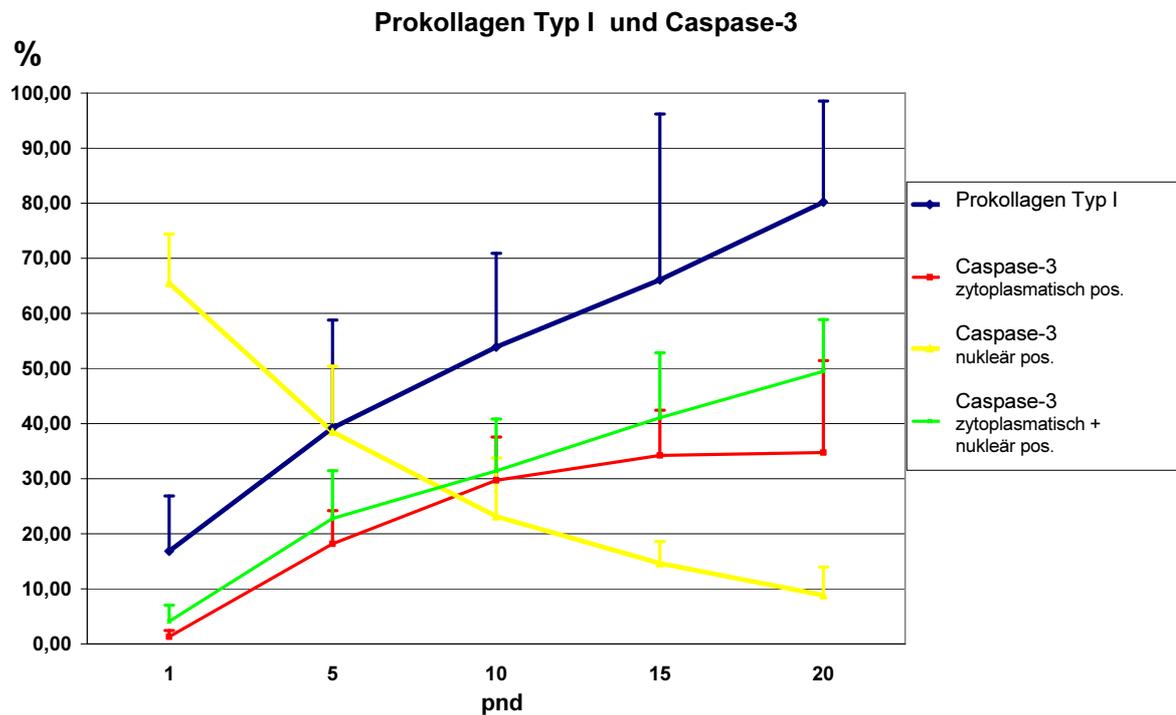


Prozentualer Anteil von Caspase-3-positiven FLZ, differenziert nach verschiedenen Reaktionsmustern, an der Gesamtzahl von FLZ / mm<sup>2</sup>

Abszisse: Alter der Tiere in pnd.

Ordinate: Durchschnitt  $\pm$  Standardabweichung

**Abbildung 23**



Prozentualer Anteil von Prokollagen-Typ-I-positiven und Caspase-3-positiven FLZ (differenziert nach verschiedenen Reaktionsmustern) an der Gesamtzahl von FLZ / mm<sup>2</sup>

Abszisse: Alter der Tiere in pnd.

Ordinate: Durchschnitt ± Standardabweichung

## 4 DISKUSSION

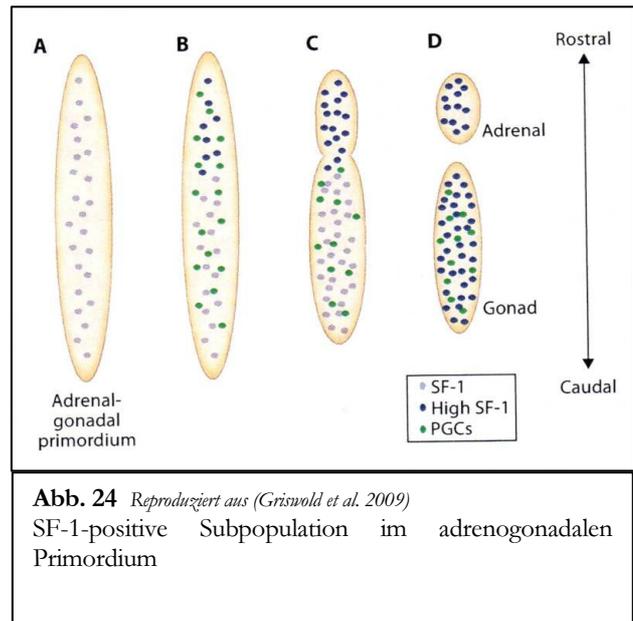
### 4.1 Herkunft und Entwicklung der FLZ

Es ist jetzt unbestritten, dass es sich bei FLZ und ALZ um unterschiedliche Zellpopulationen handelt, die aus verschiedenen Vorläuferzellen entstehen (Roosen-Runge *et al.* 1959; Lording *et al.* 1972; Nef *et al.* 1999; O'Shaughnessy *et al.* 2003). Die Herkunft sowie die Entwicklung von ALZ ist gut untersucht. Im Gegensatz hierzu ist das Wissen über die FLZ immer noch sehr lückenhaft, und das, obwohl sie in der sexuellen Differenzierungsphase von Säugetieren die primäre Quelle für Androgene und andere virilisierende Hormone darstellen und ihnen damit eine Schlüsselrolle zuteil wird. Einer der Hauptgründe für die mangelnde Evidenz könnte sein, dass der größte Teil der FLZ-Entwicklung in utero stattfindet, was ein kontinuierliches Beobachten dieser Population erschwert. Das Rattenmodell ist gut geeignet, ontogenetische Studien durchzuführen, da Ratten eine kurze Generationsdauer haben und ihre sexuelle Entwicklung bis hin zur Geschlechtsreife relativ schnell abläuft. Dies bedeutet allerdings auch, dass Veränderungen sehr schnell eintreten, wodurch bestimmte Details eventuell nicht wahrgenommen werden können.

Die Phase, in der FLZ im Rattenhoden vorkommen, beginnt mit dem 14.5. fd und endet um den 25. pnd (Haider *et al.* 2007). Manche Autoren berichten allerdings das Vorkommen der FLZ auch noch zu späteren Zeitpunkten, z.B. bis zum 90. pnd (Kerr *et al.* 1988; Ariyaratne *et al.* 2000).

Der Ursprung ihrer Vorläuferzellen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es wird hierüber viel spekuliert und es gibt verschiedene Theorien. Eine mögliche Quelle stellen Zellen der Neuralleiste dar. Diese Hypothese basiert auf der Beobachtung, dass FLZ eine Reihe neuraler Marker wie Nestin, NCAM, S-100 und neurofilament protein 200 exprimieren (Mayerhofer *et al.* 1996; Davidoff *et al.* 2002; Lobo *et al.* 2004). Andere Autoren berichten, dass Coelomepithelzellen geringe Mengen von SF-1 (steroidogenic factor 1) produzieren, welcher typisch für steroidproduzierende

Zellen ist, was darauf hinweisen soll, dass diese Zellen als Vorläufer-Zellen für FLZ dienen könnten (Brennan *et al.* 2003). Als eine weitere Möglichkeit werden Mesenchym- bzw. Epithelzellen des Mesonephros in Betracht gezogen. Hier findet bei der männlichen Maus am 12.5 fd eine Migration von Zellen des angrenzenden Mesonephros statt,



welche nur durch eine männliche Gonadenanlage induziert wird (Buehr *et al.* 1993; Merchant-Larios *et al.* 1993; Merchant-Larios *et al.* 1998). Bleibt dieser Prozess aus, findet keine normale Hodenentwicklung statt. Unterstützt wird diese Theorie durch den Nachweis einer gemeinsamen NCAM-Expression durch Epithelien des Mesonephros sowie von interstitiellen Zellen an der Grenze zwischen Mesonephros und Gonade. Das Auftreten dieses gemeinsamen Markers macht es wahrscheinlicher, dass Epithelien des Mesonephros als Quelle für FLZ in Frage kommen (Mayerhofer *et al.* 1996). Sowohl die Leydigzellen als auch die Zellen der Nebennierenrinde gehören zu den sog. steroidproduzierenden Zellen. Diese besitzen die Gemeinsamkeit, in frühen Stadien ihrer Entwicklung SF-1 zu exprimieren, was für die spätere Expression von Enzymen der Steroidogenese erforderlich ist (Jeyasuria *et al.* 2004). So kann man SF-1-positive Zellen noch vor der Entwicklung der Gonaden, in einer Region zwischen Coelomepithel und dorsaler Aorta nachweisen (Hatano *et al.* 1996; Morohashi 1997), welche später als Urogenitalleiste identifiziert werden kann. Hier wandern primordiale Keimzellen ein und verteilen sich zwischen den SF-1-positiven Zellen (**Abb. 24 B**). Die SF-1-positiven Zellen expandieren und bilden eine zylindrische Formation entlang der späteren Genitalleiste (**Abb. 24 C**), um sich dann in zwei Gruppen aufzuteilen: Eine beinhaltet zusätzlich primordiale Keimzellen und exprimiert zunehmend stärker SF-1; eine andere Gruppe befindet sich näher der dorsalen Aorta und

enthält keine primordialen Keimzellen (**Abb. 24 D**). Erstere entwickelt sich später zur Gonade, letztere zur Nebennierenrinde (**Abb. 24 D**). SF-1- knockout-Mäuse entwickeln weder Nebennieren, noch Gonaden (Luo *et al.* 1994; Ikeda *et al.* 1995; Luo *et al.* 1995). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Entdeckung sog. „adrenal-like cells“ im fetalen Hoden (Val *et al.* 2006; Hu *et al.* 2007). Diese Zellen exprimieren Gene, die für die zur Steroidbildung erforderlichen Enzyme P450c17 und P450scc kodieren, welche auch von Leydigzellen exprimiert werden. Im Gegensatz zu Leydigzellen fehlt allerdings die Expression des Leydigzell-Peptid-Hormons Insl3. Die adrenal-like cells reagieren auf ACTH und tragen wahrscheinlich zur Produktion von Corticosteron bei.

Ab dem 16. fd sind die FLZ in Clustern angeordnet. Die Cluster sind von einer Basallamina und spindelförmigen Fibroblasten umgeben. Die Basallamina enthält Laminin und Kollagen Typ 4 (Kuopio *et al.* 1989). Sie verliert postnatal zunehmend an Kontinuität und verschwindet wahrscheinlich zusammen mit den FLZ. Um den 18. bis 19. fd erreicht die Proliferationsrate der FLZ ihren Höhepunkt (Ziegler *et al.* 1983). Danach nimmt die Anzahl bis zum Verschwinden der FLZ stetig ab. Auch im untersuchten Zeitraum der vorliegenden Arbeit kann dieser Trend bestätigt werden. So sind am 1.pnd durchschnittlich 235 FLZ pro mm<sup>2</sup> Schnittfläche vorhanden, am 20. pnd sind es dagegen nur noch durchschnittlich 15 FLZ. Am 35. pnd sowie am 90. pnd sind lichtmikroskopisch keine FLZ mehr erkennbar. Die Mechanismen, die dem Verschwinden zugrunde liegen, sind noch nicht abschließend aufgeklärt. Die Bildung von Caspase-3 durch die FLZ könnte ein Hinweis auf einen apoptotischen Zelltod sein. Dieses wird im Folgenden erörtert.

## 4.2 Apoptose und Caspase-3

Der Ausdruck Apoptose wurde zum ersten Mal in einer Arbeit von Kerr et al. (1972) benutzt, um eine morphologisch eigenständige Form des Zelltodes zu beschreiben, wobei einzelne Aspekte der Apoptose bereits viele Jahre zuvor beschrieben wurden (Kerr *et al.* 1972; Paweletz 2001). Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der normalerweise während Entwicklungs- und Alterungsprozessen auftritt und der Homöostase von Zellen in verschiedenen Geweben dient. Sie kann auch im Rahmen von Immunreaktionen als Abwehrmechanismus fungieren, und kann durch verschiedene Noxen, die auf die betroffene Zelle einwirken, induziert werden (Norbury *et al.* 2001). Solche Noxen sind zum Beispiel ionisierende Strahlen, aber auch Medikamente wie Zytostatika, die infolge von DNA-Schäden die Apoptose auslösen. Andererseits kann aber auch das Fehlen von antiapoptotisch wirksamen Faktoren wie bestimmter Hormone oder Wachstumsfaktoren den programmierten Zelltod initiieren.

Apoptose ist ein komplexer, energieverbrauchender Vorgang, bei dem eine Kaskade molekularer Ereignisse abläuft. (Elmore 2007). Eine Schlüsselrolle spielen hierbei sog. Caspasen (englisch: cysteinyl-aspartate specific protease). Es sind proteolytische Enzyme, die Peptidbindungen am C-terminalen Ende von Aspartat spalten. Caspasen liegen in den meisten Zellen als inaktive Proenzyme vor, welche durch anderen Caspasen, aber auch durch „Autoaktivierung“ aktiviert werden können. Bisher sind zehn Haupt-Caspasen bekannt, sie werden nach ihrer Funktion in Initiator- (Caspase-2, -8, -9, -10), Effektor- (Caspase-3, -6, -7) und inflammatorische Caspasen (Caspase-1, -4, -5) gruppiert (Cohen 1997; Rai *et al.* 2005).

Apoptose wird über zwei Hauptwege initiiert: den extrinsischen oder Todesrezeptor- Weg und den intrinsischen oder mitochondrialen Weg. Zusätzlich gibt es noch einen dritten Weg, bei dem zytotoxische T-Zellen die Aktivierung von „granzyme A“ bzw. „granzyme B“ auslösen. Gemeinsame Endstrecke dieser Wege, mit Ausnahme des „granzyme A“ – Weges, ist die Aktivierung von Caspase-3.

Diese führt zur Fragmentation von DNA, Abbau von zytoskelettalen und nukleären Proteinen, Quervernetzung von Proteinen, Ausbildung von Apoptosekörperchen, Expression von Liganden für Rezeptoren von phagozytären Zellen und letztlich Phagozytose der apoptotischen Zelle (Elmore 2007). Die Effektor-Caspasen -3, -6, und -7 spalten diverse Substrate wie Zytokeratine, PARP (Poly [ADP-ribose] polymerase), das Plasmamembranprotein „alpha fodrin“, das nukleäre Protein „NuMA“ und andere, was letztlich zu den morphologischen und biochemischen Veränderungen führt, die man bei apoptotischen Zellen beobachten kann (Slee *et al.* 2001).

Caspase-3 gilt als die wichtigste Effektor-Caspase. Sie liegt innerhalb der Zelle als inaktive Pro-Caspase-3 vor und wird von den Initiator-Caspasen-8, -9, oder -10 durch proteolytische Spaltung aktiviert (Faleiro *et al.* 1997; Porter *et al.* 1999).

Mehrere Autoren konnten zeigen, dass auch ALZ einem apoptotischen Zelltod unterliegen können, der durch verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel durch die Substanz Ethan-Dimethan-Sulfonat (EDS) induziert werden kann (Tapanainen *et al.* 1993; Henriksen *et al.* 1995; Morris *et al.* 1997). Bei diesem Prozess konnte die Beteiligung von Caspase-3 nachgewiesen werden. Kim *et al.* (2000) untersuchten adulte Ratten, die mit EDS behandelt wurden. Ihre immunhistochemischen Untersuchungen zeigten verschiedene Lokalisationen von Pro-Caspase-3 und aktivierter Caspase-3 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Apoptose. So stieg zuerst die Konzentration von Pro-Caspase-3, die vor allem im Zytoplasma von ALZ nachgewiesen werden konnte. Zu späteren Zeitpunkten zeigte sich eine starke nukleäre Immunreaktion für aktivierte Caspase-3 (Kim *et al.* 2000). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen eine Dynamik im Reaktionsmuster von Caspase-3 im Zusammenhang mit dem Alter des untersuchten Tieres. Während am 1. pnd eine rein nukleäre, wenn auch relativ schwache Immunreaktion dominiert, zeigte sich ab dem 5. pnd bis hin zum 20. pnd ein deutlicher Anstieg der rein zytoplasmatischen sowie der kombinierten zytoplasmatischen und nukleären Reaktion. Die Häufigkeit des rein nukleären

Reaktionsmusters nahm in diesem Zeitraum hingegen stetig ab. Da der verwendete Caspase-3-Antikörper nicht selektiv mit aktivierter Caspase-3 reagiert, sondern auch mit inaktiver Pro-Caspase-3, lässt sich hier keine Aussage machen über eine mögliche Aktivierung von Pro-Caspase-3 im Zusammenhang mit einem apoptotischen Zelltod der FLZ. Zudem ist auch der nukleäre Nachweis von aktivierter Caspase-3 alleine kein sicherer Marker für Apoptose. So konnte bei Ratten aktivierte Caspase-3 im Nukleus von Bergmann-Glia-Zellen, einer Subpopulation von Astrozyten, nachgewiesen werden, ohne dass diese Zellen Apoptose aufwiesen. Die Autoren vermuten, dass die Bindung von aktivierter Caspase-3 an bestimmte Kernstrukturen den Zugang zu ihren Substratproteinen verhindern könnte. Als Funktion der aktivierten Caspase-3 im Zellkern erwägen sie eine mögliche Beteiligung an der Prozessierung von Transkriptionsfaktoren (Noyan-Ashraf *et al.* 2005). Ob dies auch für Leydigzellen zutrifft, ist unklar. Interessant sind in diesem Zusammenhang jedoch die Ergebnisse von Davidoff *et al.* (2002). Sie untersuchten menschliche Hoden von Erwachsenen und Embryonen auf die Expression von gliazellspezifischen Antigenen wie GFAP, GalC, CNPase, A2B5 und O4. Sie konnten diese u.a. im Zytoplasma von Leydigzellen beider Altersgruppen nachweisen. Hiermit konnten die Autoren Gemeinsamkeiten der Leydigzellen zu Astrozyten und Oligodendrozyten zeigen (Davidoff *et al.* 2002). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen unterschiedlichen Reaktionsmuster für Caspase-3 könnten also auch auf eine andere Funktion der Caspase-3 in FLZ hindeuten als nur die eines Apoptose-Enzyms.

Einige Autoren vermuten, dass Caspasen durch aktiven Transport in den Nukleus transloziert werden und dass dieser Vorgang für die Apoptose benötigt wird (Yasuhara *et al.* 1997; Kuwana *et al.* 1998; Kohler *et al.* 1999). Andere Autoren halten es für möglich, dass Caspase-3 durch Kernporen in den Nukleus diffundiert und sie durch aktiven Transport aus dem Zellkern hinaus transportiert wird (Faleiro *et al.* 1997). Die vorliegenden Ergebnisse der Immunhistochemie für Caspase-3 sind mit denen anderer Autoren insofern vereinbar, als dass Caspase-3 zu verschiedenen Zeitpunkten sowohl im Zytoplasma einer Zelle als auch im

Nukleus nachgewiesen werden kann. Die beschriebenen Veränderungen im Reaktionsmuster für Caspase-3 könnten durch Translokation des Enzyms zwischen Nukleus und Zytoplasma hervorgerufen werden. Typische morphologische Korrelate einer Apoptose wie zum Beispiel Apoptosekörperchen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden. Diese Beobachtung ist vereinbar mit den Ergebnissen von Faria *et al.* (2003). Sie untersuchten Hoden von Mäusen in der Postnatalperiode auf den immunhistochemischen Nachweis von fragmentierter DNA hin, welche als Marker für Apoptose anerkannt ist. Sie konnten diese in Keimzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nachweisen, jedoch zu keinem Zeitpunkt in Leydigzellen. Zudem fanden sie auch bei ultrastrukturellen Untersuchungen keine morphologischen Hinweise auf einen apoptotischen Zelltod bei Leydigzellen (Faria *et al.* 2003). Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse von Yokio *et al.* (1998). Sie wiesen immunhistochemisch bei Ratten Einzelstrang-DNA (ssDNA) bei einigen FLZ an verschiedenen Prä- und Postnataltagen nach und vermuteten, dass durch Apoptose und Proliferation die Anzahl der Leydigzellen in der Perinatalphase konstant gehalten wird.

Bei der Interpretation der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde muss berücksichtigt werden, dass die Lokalisation der Antigene innerhalb einer Zelle dem Einfluss von Gewebeentnahme, Fixierung und Bearbeitung unterliegen. Im Paraffinschnitt findet man eine positive Immunreaktion von Caspase-3 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma der FLZ. Aktuelle, bislang unveröffentlichte Daten, die im Rahmen einer anderen Dissertation erhoben wurden, zeigen übrigens eine positive Immunreaktion für aktivierte Caspase-3 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma und stehen daher im Einklang mit den hier vorliegenden Ergebnissen. Um zu klären, ob FLZ durch Apoptose untergehen, sind noch weitere Untersuchungen erforderlich, insbesondere könnte durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen aktivierte Caspase-3 in Kombination mit einem Antikörper gegen ssDNA deren Rolle im Zusammenhang mit dem Verschwinden der FLZ näher beleuchtet werden.

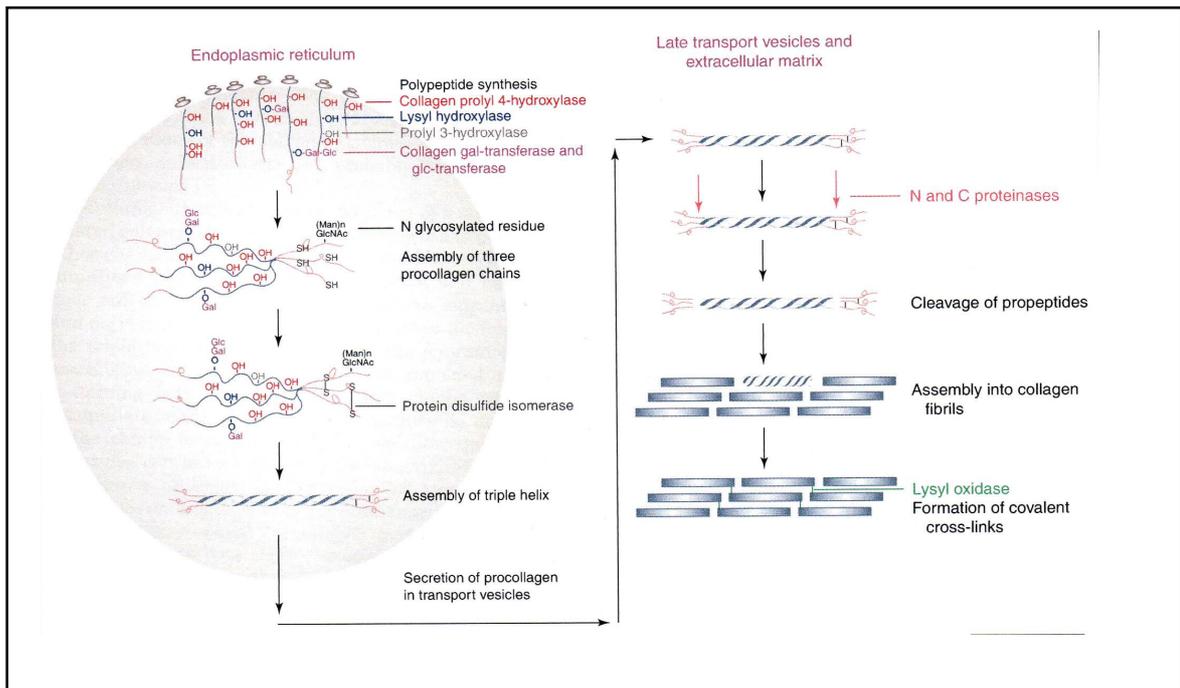
### 4.3 Prokollagen Typ I

Kollagene sind extrazelluläre Matrixproteine, die eine wichtige Rolle bei Entwicklungsprozessen spielen, und sind darüber hinaus auch obligate Strukturkomponenten von Geweben und Organen wie Lunge, Haut, Knochen und Blutgefäßen (Arden *et al.* 1993; Koch *et al.* 2003; Boland *et al.* 2004). Im menschlichen Körper nehmen sie rund 30 % der gesamten Proteinmasse ein und sind damit deren häufigster Vertreter. Bei Vertebraten findet man mindestens 27 verschiedene Kollagentypen mit 42 unterschiedlichen Polypeptidketten. Kollagene sind an wichtigen Vorgängen während Entwicklung und Differenzierung wie Zelladhäsion, Chemotaxis und Migration sowie Gewebe-Remodeling beteiligt, aber spielen auch bei Wundheilung und im Rahmen vieler Pathologien eine wichtige Rolle (Prockop *et al.* 1995; Myllyharju *et al.* 2004).

Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist Kollagen Typ I. Dieses konnte bei ultrastrukturellen Untersuchungen von Rattenhoden in der Postnatalperiode indirekt auf Grund der morphologischen Charakteristika im peritubulären Raum identifiziert werden (Tran *et al.* 2006).

Kollagen Typ I wird wie auch die anderen fibrillenbildenden Kollagene Typ II, III, V, XI, XXIV und XXVII als Prokollagen-Moleküle synthetisiert und durch bestimmte enzymatische Vorgänge zu Kollagenfasern vernetzt. **Abbildung 25** zeigt die wesentlichen Schritte der Kollagensynthese.

Prokollagen Typ I ist die Vorstufe von Kollagen Typ I. Es ist ein Trimer, welches aus zwei  $\alpha 1$ -Ketten und einer  $\alpha 2$ -Kette besteht. Die beiden Ketten werden von unterschiedlichen Genen kodiert, Col1a1 und Col1a2. He *et al.* (2005) untersuchten Mäusehoden der Altersgruppen 6. pnd und 60. pnd. Sie konnten durch Microarray-Analysen die Expression von Col1a1 und Col1a2 in den Tubuli seminiferi nachweisen, wobei die Expression am 6. pnd deutlich höher war als am 60. pnd.



**Abb. 25** (reproduziert aus (Myllyharju et al. 2004))

Die Synthese der Polypeptidketten findet an membrangebundenen Ribosomen innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums statt. Hydroxylierung einiger Prolin- und Lysin-Reste zu 4-Hydroxyprolin, 3-Hydroxyprolin und Hydroxylysin => Glykosylierung von einigen der Hydroxylysin-Reste zu Galaktosylhydroxylysin und Glykosylgalaktosylhydroxylysin => Glykosylierung einiger Asparagin-Reste in den C-Propeptiden, oder in beiden, den N- und C-Propeptiden => Verbindung dreier C-Propeptide und Ausbildung von intra- und intermolekularen Disulfid-Brücken => Bildung einer Triple-Helix => Transport in Vesikeln und Ausschüttung nach extrazellulär => Abspaltung der N- und C- Propetide und Formierung von Kollagenfibrillen und Bildung von Kollagenfasern (Prockop et al. 1995) (Kadler 1995) (Myllyharju et al. 2001)

Bei Mäusen am 6. pnd befinden sich in den Tubuli nur Typ A Spermatozoen und Sertolizellen (Dettin et al. 2003). In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigten am 6. pnd Typ A Spermatozoen, nicht aber Sertolizellen eine positive Immunreaktion. Außerhalb der Tubuli, im interstitiellen Raum, fanden sie auch Prokollagen-Typ-I-positive Zellen, die jedoch von den Autoren nicht näher spezifiziert wurden (He et al. 2005). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper ist gegen die  $\alpha 2$ -Kette des Prokollagens Typ I gerichtet, er reagiert also nicht mit vernetztem Kollagen. Hierdurch ist es möglich, die Zellen zu identifizieren, die selbst Prokollagen synthetisieren. Die vorliegenden Ergebnisse der Immunhistochemie zeigen erstmalig, dass FLZ Prokollagen Typ I synthetisieren und dass der Anteil der prokollagenbildenden FLZ an der Gesamtzahl der FLZ in den ersten 20 Postnataltagen kontinuierlich zunimmt, bei

gleichzeitiger Abnahme der Gesamtzahl. Die Funktion der Prokollagenbildung der FLZ ist bislang ungeklärt.

Es ist jedoch denkbar, dass ein ähnlicher Mechanismus wie die sog. Epitheliale-Mesenchymale-Transformation (EMT) hierbei involviert ist. Bei der EMT handelt es sich um eine wesentliche Komponente verschiedener morphogenetischer und organogenetischer Vorgänge. So laufen Gastrulation, die Emigration von Neuralleistenzellen aus dem Neuralrohr, sowie die Bildung von Herzklappen durch EMT-Vorgänge ab (Duband *et al.* 1995; Hay 1995; Viebahn 1995). Zahlreiche zelluläre Veränderungen sind mit der EMT assoziiert. Fibroblasten, die mittels EMT aus Epithelzellen entstanden sind, schalten Gene ab, die für Zelladhäsionsmoleküle kodieren und beginnen in einigen Fällen, extrazelluläre Matrixmoleküle wie Fibronectin und verschiedene Typen von Kollagen zu synthetisieren. Zudem ist die EMT immer mit dem Verlust von Zell-zu-Zell-Kontakten verbunden, was zur Verstreuung von Zellen führt (Boyer *et al.* 2000). Neben dem Beginn der Bildung von Prokollagen durch die FLZ ist mit dem Verlust des Zellverbundes und der Auflösung der Cluster eine weitere Analogie zur EMT offensichtlich. Tran *et al.* (2006) beschrieben bei Ratten am 1. und 5. pnd die Existenz von interzellulären Zellbrücken aus Zytoplasma, sowie gap junctions zwischen FLZ innerhalb eines Clusters. Diese Beobachtung war auf die frühe Postnatalperiode beschränkt. Zum 20. pnd hin beobachteten sie reichlich Kollagenfasern im interstitiellen sowie im peritubulären Raum. Bei den nur noch sporadisch vorkommenden FLZ-Clustern konnten sie zu diesem Zeitpunkt keine Zell-zu-Zell-Kontakte mehr nachweisen.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit über das Prokollagen deuten darauf hin, dass die zwei Vorgänge während des Abbaus der FLZ höchstwahrscheinlich gleichzeitig in diesen Zellen stattfinden: apoptotischer Zelltod und die Vorbereitung der Kollagen-Fibrillogenese.

Es scheint, als stelle der 5. pnd einen wichtigen Zeitpunkt für den Vorgang des Zelltods der FLZ dar: Zunahme des Kollagens und Abnahme der nukleär lokalisierten Caspase-3.

Die Signale des Zelltods werden offenbar vor dem 5. pnd festgelegt. Die Fibrillogenese des Kollagens erfolgt zeitlich verzögert danach. Diese Auslegung muss experimentell noch geprüft werden.

Ob die Bildung von Prokollagen durch die FLZ der Erhaltung der Gewebe- bzw. Organintegrität dient, oder für Migrationsvorgänge im Rahmen der Entstehung von ALZ-Progenitor-Zellen erforderlich ist, bedarf ebenfalls der Klärung durch weitere Studien.

## **5 LITERATUR**

- ARDEN, M. G., SPEARMAN, M. A. AND ADAMSON, I. Y. R. (1993). "DEGRADATION OF TYPE-IV COLLAGEN DURING THE DEVELOPMENT OF FETAL-RAT LUNG." AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY **9**(1): 99-105.
- ARIYARATNE, H. B. S., MENDIS-HANDAGAMA, SMLC, HALES, D. B. AND MASON, J. I. (2000). "STUDIES ON THE ONSET OF LEYDIG PRECURSOR CELL DIFFERENTIATION IN THE PREPUBERTAL RAT TESTIS." BIOLOGY OF REPRODUCTION **63**(1): 165-171.
- BOLAND, E. D., MATTHEWS, J. A., PAWLOWSKI, K. J., SIMPSON, D. G., WNEK, G. E. AND BOWLIN, G. L. (2004). "ELECTROSPINNING COLLAGEN AND ELASTIN: PRELIMINARY VASCULAR TISSUE ENGINEERING." FRONT BIOSCI **9**: 1422-32.
- BOYER, B., VALLES, A. M. AND EDME, N. (2000). INDUCTION AND REGULATION OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITIONS, PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD.
- BRENNAN, J., TILMANN, C. AND CAPEL, B. (2003). "PDGFR-ALPHA MEDIATES TESTIS CORD ORGANIZATION AND FETAL LEYDIG CELL DEVELOPMENT IN THE XY GONAD." GENES DEV **17**(6): 800-10.
- BUEHR, M., GU, S. AND MCLAREN, A. (1993). "MESONEPHRIC CONTRIBUTION TO TESTIS DIFFERENTIATION IN THE FETAL MOUSE." DEVELOPMENT **117**(1): 273-81.
- BYSKOV, A. G. (1986). "DIFFERENTIATION OF MAMMALIAN EMBRYONIC GONAD." PHYSIOLOGICAL REVIEWS **66**(1): 71-117.
- COHEN, G. M. (1997). "CASPASES: THE EXECUTIONERS OF APOPTOSIS." BIOCHEMICAL JOURNAL **326**: 1-16.

- DAVIDOFF, M. S., MIDDENDORFF, R., KOFUNCU, E., MULLER, D., JEZEK, D. AND HOLSTEIN, A. F. (2002). "LEYDIG CELLS OF THE HUMAN TESTIS POSSESS ASTROCYTE AND OLIGODENDROCYTE MARKER MOLECULES." ACTA HISTOCHEM **104**(1): 39-49.
- DETTIN, L., RAVINDRANATH, N., HOFMANN, M. C. AND DYM, M. (2003). "MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE SPERMATOGONIAL SUBTYPES IN THE NEONATAL MOUSE TESTIS." BIOL REPROD **69**(5): 1565-71.
- DUBAND, J. L., MONIER, F., DELANNET, M. AND NEWGREEN, D. (1995). "EPITHELIUM-MESENCHYME TRANSITION DURING NEURAL CREST DEVELOPMENT." ACTA ANAT (BASEL) **154**(1): 63-78.
- ELMORE, S. (2007). "APOPTOSIS: A REVIEW OF PROGRAMMED CELL DEATH." TOXICOLOGIC PATHOLOGY **35**(4): 495-516.
- FALEIRO, L., KOBAYASHI, R., FEARNHEAD, H. AND LAZEBNIK, Y. (1997). "MULTIPLE SPECIES OF CPP32 AND MCH2 ARE THE MAJOR ACTIVE CASPASES PRESENT IN APOPTOTIC CELLS." EMBO J **16**(9): 2271-81.
- FARIA, M. J. S., SIMOES, Z. L. P., LUNARDI, L. O. AND HARTFELDER, K. (2003). "APOPTOSIS PROCESS IN MOUSE LEYDIG CELLS DURING POSTNATAL DEVELOPMENT." MICROSCOPY AND MICROANALYSIS **9**(1): 68-73.
- GE, R. S., DONG, Q., SOTTAS, C. M., CHEN, H. L. AND HARDY, M. P. (2005). "GENE EXPRESSION IN RAT LEYDIG CELLS DURING DEVELOPMENT FROM THE PROGENITOR TO ADULT STAGE: A CLUSTER ANALYSIS." BIOLOGY OF REPRODUCTION **72**(6): 1405-1415.
- GRISWOLD, S. L. AND BEHRINGER, R. R. (2009). "FETAL LEYDIG CELL ORIGIN AND DEVELOPMENT." SEX DEV **3**(1): 1-15.
- HAIDER, S. G. (2004). "CELL BIOLOGY OF LEYDIG CELLS IN THE TESTIS." INT REV CYTOL **233**: 181-241.
- HAIDER, S. G. (2007). "LEYDIG CELL STEROIDOGENESIS: UNMASKING THE FUNCTIONAL IMPORTANCE OF MITOCHONDRIA." ENDOCRINOLOGY **148**(6): 2581-2.

- HAIDER, S. G. , SERVOS, G. AND TRAN, N. (2007). STRUCTURAL AND HISTOLOGICAL ANALYSIS OF LEYDIG CELL STEROIDOGENIC FUNCTION. IN: CONTEMPORARY ENDOCRINOLOGY: THE LEYDIG CELL IN HEALTH AND DISEASE, EDS.: A. H. H. PAYNE, M. P. HARDY, HUMANA PRESS INC. NEW JERSEY USA: 33-45.
- HAIDER, S. G., PASSIA, D. AND OVERMEYER, G. (1986). "STUDIES ON THE FETAL AND POSTNATAL DEVELOPMENT OF RAT LEYDIG CELLS EMPLOYING 3 BETA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE ACTIVITY." ACTA HISTOCHEM SUPPL **32**: 197-202.
- HAIDER, S. G., SERVOS, G., TAJTARAGHI, S., BERTHOLD, G., MUKHOPADHYAY, A. K., KILIC, N. AND ERGUN, S. (1997). "FUNCTIONAL MARKERS FOR FETAL AND POSTNATAL DIFFERENTIATION OF RAT LEYDIG CELLS." ADV EXP MED BIOL **424**: 143-4.
- HAIDER, S. G., URBAN, A., HILSCHER, B., HILSCHER, W. AND PASSIA, D. (1983). "CYPROTERONE ACETATE INDUCED CHANGES IN THE BEHAVIOUR OF HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASES IN RAT LEYDIG CELLS DURING PERINATAL DEVELOPMENT." ANDROLOGIA **15**(5): 498-506.
- HARDY, M. P., ZIRKIN, B. R. AND EWING, L. L. (1989). "KINETIC-STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF THE ADULT-POPULATION OF LEYDIG-CELLS IN TESTES OF THE PUBERTAL RAT." ENDOCRINOLOGY **124**(2): 762-770.
- HATANO, O., TAKAKUSU, A., NOMURA, M. AND MOROHASHI, K. (1996). "IDENTICAL ORIGIN OF ADRENAL CORTEX AND GONAD REVEALED BY EXPRESSION PROFILES OF AD4BP/SF-1." GENES CELLS **1**(7): 663-71.
- HAY, E. D. (1995). "AN OVERVIEW OF EPITHELIO-MESENCHYMAL TRANSFORMATION." ACTA ANAT (BASEL) **154**(1): 8-20.
- HE, Z. P., FENG, L. X., ZHANG, X. D., GENG, Y. X., PARODI, D. A., SUAREZ-QUIAN, C. AND DYM, M. (2005). "EXPRESSION OF COL1A1, COL1A2 AND PROCOLLAGEN I IN GERM CELLS OF IMMATURE AND ADULT MOUSE TESTIS." REPRODUCTION **130**(3): 333-341.

- HENRIKSEN, K., HAKOVIRTA, H. AND PARVINEN, M. (1995). "TESTOSTERONE INHIBITS AND INDUCES APOPTOSIS IN RAT SEMINIFEROUS TUBULES IN A STAGE-SPECIFIC MANNER: IN SITU QUANTIFICATION IN SQUASH PREPARATIONS AFTER ADMINISTRATION OF ETHANE DIMETHANE SULFONATE." ENDOCRINOLOGY **136**(8): 3285-91.
- HEYDERMAN, E. (1979). "IMMUNOPEROXIDASE TECHNIQUE IN HISTOPATHOLOGY: APPLICATIONS, METHODS, AND CONTROLS." J CLIN PATHOL **32**(10): 971-8.
- HU, L., MONTEIRO, A., JOHNSTON, H., KING, P. AND O'SHAUGHNESSY, P. J. (2007). "EXPRESSION OF CYP21A1 AND CYP11B1 IN THE FETAL MOUSE TESTIS." REPRODUCTION **134**(4): 585-91.
- HUHTANIEMI, I. AND PELLINIEMI, L. J. (1992). "FETAL LEYDIG CELLS: CELLULAR ORIGIN, MORPHOLOGY, LIFE SPAN, AND SPECIAL FUNCTIONAL FEATURES." PROC SOC EXP BIOL MED **201**(2): 125-40.
- IKEDA, Y., LUO, X., ABBUD, R., NILSON, J. H. AND PARKER, K. L. (1995). "THE NUCLEAR RECEPTOR STEROIDOGENIC FACTOR 1 IS ESSENTIAL FOR THE FORMATION OF THE VENTROMEDIAL HYPOTHALAMIC NUCLEUS." MOL ENDOCRINOL **9**(4): 478-86.
- JEYASURIA, P., IKEDA, Y., JAMIN, S. P., ZHAO, L., DE ROOIJ, D. G., THEM MEN, A. P., BEHRINGER, R. R. AND PARKER, K. L. (2004). "CELL-SPECIFIC KNOCKOUT OF STEROIDOGENIC FACTOR 1 REVEALS ITS ESSENTIAL ROLES IN GONADAL FUNCTION." MOL ENDOCRINOL **18**(7): 1610-9.
- KADLER, K. (1995). "EXTRACELLULAR MATRIX 1: FIBRIL-FORMING COLLAGENS." PROTEIN PROFILE **2**(5): 491-619.
- KERR, J. B. AND KNELL, C. M. (1988). "THE FATE OF FETAL LEYDIG CELLS DURING THE DEVELOPMENT OF THE FETAL AND POSTNATAL RAT TESTIS." DEVELOPMENT **103**(3): 535-44.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. AND CURRIE, A. R. (1972). "APOPTOSIS: A BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE-RANGING IMPLICATIONS IN TISSUE KINETICS." BR J CANCER **26**(4): 239-57.

- KIM, J. M., LUO, L. AND ZIRKIN, B. R. (2000). "CASPAE-3 ACTIVATION IS REQUIRED FOR LEYDIG CELL APOPTOSIS INDUCED BY ETHANE DIMETHANESULFONATE." ENDOCRINOLOGY **141**(5): 1846-53.
- KOCH, M., LAUB, F., ZHOU, P. H., HAHN, R. A., TANAKA, S., BURGESSON, R. E., GERECKE, D. R., RAMIREZ, F. AND GORDON, M. K. (2003). "COLLAGEN XXIV, A VERTEBRATE FIBRILLAR COLLAGEN WITH STRUCTURAL FEATURES OF INVERTEBRATE COLLAGENS - SELECTIVE EXPRESSION IN DEVELOPING CORNEA AND BONE." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **278**(44): 43236-43244.
- KOHLER, C., HAKANSSON, A., SVANBORG, C., ORRENIUS, S. AND ZHIVOTOVSKY, B. (1999). "PROTEASE ACTIVATION IN APOPTOSIS INDUCED BY MAL." EXP CELL RES **249**(2): 260-8.
- KUOPIO, T., PARANKO, J. AND PELLINIEMI, L. J. (1989). "BASEMENT-MEMBRANE AND EPITHELIAL FEATURES OF FETAL-TYPE LEYDIG-CELLS IN RAT AND HUMAN TESTIS." DIFFERENTIATION **40**(3): 198-206.
- KUOPIO, T., TAPANAINEN, J., PELLINIEMI, L. J. AND HUHTANIEMI, I. (1989). "DEVELOPMENTAL STAGES OF FETAL-TYPE LEYDIG-CELLS IN PREPUBERTAL RATS." DEVELOPMENT **107**(2): 213-220.
- KUWANA, T., SMITH, J. J., MUZIO, M., DIXIT, V., NEWMeyer, D. D. AND KORNBLUTH, S. (1998). "APOPTOSIS INDUCTION BY CASPAE-8 IS AMPLIFIED THROUGH THE MITOCHONDRIAL RELEASE OF CYTOCHROME C." J BIOL CHEM **273**(26): 16589-94.
- LALLI, E., MELNER, M. H., STOCCO, D. M. AND SASSONE-CORSI, P. (1998). "DAX-1 BLOCKS STEROID PRODUCTION AT MULTIPLE LEVELS." ENDOCRINOLOGY **139**(10): 4237-43.
- LOBO, M. V., ARENAS, M. I., ALONSO, F. J., GOMEZ, G., BAZAN, E., PAINO, C. L., FERNANDEZ, E., FRAILE, B., PANIAGUA, R., MOYANO, A. AND CASO, E. (2004). "NESTIN, A NEUROECTODERMAL STEM CELL MARKER MOLECULE, IS EXPRESSED IN LEYDIG CELLS OF THE HUMAN TESTIS AND IN SOME SPECIFIC CELL TYPES FROM HUMAN TESTICULAR TUMOURS." CELL TISSUE RES **316**(3): 369-76.

- LORDING, D. W. AND DEKRETSE, D.M. (1972). "COMPARATIVE ULTRASTRUCTURAL AND HISTOCHEMICAL STUDIES OF INTERSTITIAL-CELLS OF RAT TESTIS DURING FETAL AND POSTNATAL-DEVELOPMENT." JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY **29**(2): 261-269.
- LUO, X., IKEDA, Y. AND PARKER, K. L. (1994). "A CELL-SPECIFIC NUCLEAR RECEPTOR IS ESSENTIAL FOR ADRENAL AND GONADAL DEVELOPMENT AND SEXUAL DIFFERENTIATION." CELL **77**(4): 481-90.
- LUO, X., IKEDA, Y., SCHLOSSER, D. A. AND PARKER, K. L. (1995). "STEROIDOGENIC FACTOR 1 IS THE ESSENTIAL TRANSCRIPT OF THE MOUSE FTZ-F1 GENE." MOL ENDOCRINOL **9**(9): 1233-9.
- MAJDIC, G., SAUNDERS, P. T. K. AND TEERDS, K. J. (1998). "IMMUNOEXPRESSION OF THE STEROIDOGENIC ENZYMES 3-BETA HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE AND 17 ALPHA-HYDROXYLASE, C17,20 LYASE AND THE RECEPTOR FOR LUTEINIZING HORMONE (LH) IN THE FETAL RAT TESTIS SUGGESTS THAT THE ONSET OF LEYDIG CELL STEROID PRODUCTION IS INDEPENDENT OF LH ACTION." BIOLOGY OF REPRODUCTION **58**(2): 520-525.
- MAYERHOFER, A., LAHR, G., SEIDL, K., EUSTERSCHULTE, B., CHRISTOPH, A. AND GRATZL, M. (1996). "THE NEURAL CELL ADHESION MOLECULE (NCAM) PROVIDES CLUES TO THE DEVELOPMENT OF TESTICULAR LEYDIG CELLS." JOURNAL OF ANDROLOGY **17**(3): 223-230.
- MERCHANT-LARIOS, H. AND MORENO-MENDOZA, N. (1998). "MESONEPHRIC STROMAL CELLS DIFFERENTIATE INTO LEYDIG CELLS IN THE MOUSE FETAL TESTIS." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH **244**(1): 230-238.
- MERCHANT-LARIOS, H., MORENO-MENDOZA, N. AND BUEHR, M. (1993). "THE ROLE OF THE MESONEPHROS IN CELL DIFFERENTIATION AND MORPHOGENESIS OF THE MOUSE FETAL TESTIS." INT J DEV BIOL **37**(3): 407-15.
- MOROHASHI, K. (1997). "THE ONTOGENESIS OF THE STEROIDOGENIC TISSUES." GENES CELLS **2**(2): 95-106.

- MORRIS, A. J., TAYLOR, M. F. AND MORRIS, I. D. (1997). "LEYDIG CELL APOPTOSIS IN RESPONSE TO ETHANE DIMETHANESULPHONATE AFTER BOTH IN VIVO AND IN VITRO TREATMENT." J ANDROL **18**(3): 274-80.
- MYLLYHARJU, J. AND KIVIRIKKO, K. I. (2001). "COLLAGENS AND COLLAGEN-RELATED DISEASES." ANN MED **33**(1): 7-21.
- MYLLYHARJU, J. AND KIVIRIKKO, K. I. (2004). "COLLAGENS, MODIFYING ENZYMES AND THEIR MUTATIONS IN HUMANS, FLIES AND WORMS." TRENDS GENET **20**(1): 33-43.
- NACHTIGAL, M. W., HIROKAWA, Y., ENYEART-VANHOUTEN, D. L., FLANAGAN, J. N., HAMMER, G. D. AND INGRAHAM, H. A. (1998). "WILMS' TUMOR 1 AND DAX-1 MODULATE THE ORPHAN NUCLEAR RECEPTOR SF-1 IN SEX-SPECIFIC GENE EXPRESSION." CELL **93**(3): 445-54.
- NEF, S. AND PARADA, L. F. (1999). "CRYPTORCHIDISM IN MICE MUTANT FOR INSL3." NAT GENET **22**(3): 295-9.
- NORBURY, C. J. AND HICKSON, I. D. (2001). "CELLULAR RESPONSES TO DNA DAMAGE." ANNUAL REVIEW OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY **41**: 367-401.
- NOYAN-ASHRAF, M. H., BRANDIZZI, F. AND JUURLINK, B. H. (2005). "CONSTITUTIVE NUCLEAR LOCALIZATION OF ACTIVATED CASPASE 3 IN SUBPOPULATIONS OF THE ASTROGLIAL FAMILY OF CELLS." GLIA **49**(4): 588-93.
- O'SHAUGHNESSY, P. J., FLEMING, L. M., JACKSON, G., HOCHGESCHWENDER, U., REED, P. AND BAKER, P. J. (2003). "ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE DIRECTLY STIMULATES TESTOSTERONE PRODUCTION BY THE FETAL AND NEONATAL MOUSE TESTIS." ENDOCRINOLOGY **144**(8): 3279-3284.
- PAWELETZ, N. (2001). "WALTHER FLEMMING: PIONEER OF MITOSIS RESEARCH." NAT REV MOL CELL BIOL **2**(1): 72-5.
- PORTER, A. G. AND JANICKE, R. U. (1999). "EMERGING ROLES OF CASPASE-3 IN APOPTOSIS." CELL DEATH DIFFER **6**(2): 99-104.

- PRINCE, F. P. (2001). "THE TRIPHASIC NATURE OF LEYDIG CELL DEVELOPMENT IN HUMANS, AND COMMENTS ON NOMENCLATURE." J ENDOCRINOL **168**(2): 213-6.
- PROCKOP, D. J. AND KIVIRIKKO, K. I. (1995). "COLLAGENS: MOLECULAR BIOLOGY, DISEASES, AND POTENTIALS FOR THERAPY." ANNU REV BIOCHEM **64**: 403-34.
- RAI, N. K., TRIPATHI, K., SHARMA, D. AND SHUKLA, V. K. (2005). "APOPTOSIS: A BASIC PHYSIOLOGIC PROCESS IN WOUND HEALING." INT J LOW EXTREM WOUNDS **4**(3): 138-44.
- ROOSEN-RUNGE, E. C. AND ANDERSON, D. (1959). "THE DEVELOPMENT OF THE INTERSTITIAL CELLS IN THE TESTIS OF THE ALBINO RAT." ACTA ANAT (BASEL) **37**: 125-37.
- SHI, S. R., COTE, R. J. AND TAYLOR, C. R. (1997). "ANTIGEN RETRIEVAL IMMUNOHISTOCHEMISTRY: PAST, PRESENT, AND FUTURE." JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY **45**(3): 327-343.
- SLEE, E. A., ADRAIN, C. AND MARTIN, S. J. (2001). "EXECUTIONER CASPASE-3, -6, AND-7 PERFORM DISTINCT, NON-REDUNDANT ROLES DURING THE DEMOLITION PHASE OF APOPTOSIS." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **276**(10): 7320-7326.
- TAPANAINEN, J. S., TILLY, J. L., VIHKO, K. K. AND HSUEH, A. J. (1993). "HORMONAL CONTROL OF APOPTOTIC CELL DEATH IN THE TESTIS: GONADOTROPINS AND ANDROGENS AS TESTICULAR CELL SURVIVAL FACTORS." MOL ENDOCRINOL **7**(5): 643-50.
- TRAN, N., SERVOS, G. AND HAIDER, S. G. (2006). "ULTRASTRUCTURE OF CELL CONTACTS OF FETAL AND ADULT LEYDIG CELLS IN THE RAT: A SYSTEMATIC STUDY FROM BIRTH TO SENIUM." ANAT EMBRYOL (BERL) **211**(4): 273-82.
- VAL, P., JEAYS-WARD, K. AND SWAIN, A. (2006). "IDENTIFICATION OF A NOVEL POPULATION OF ADRENAL-LIKE CELLS IN THE MAMMALIAN TESTIS." DEV BIOL **299**(1): 250-6.

- VIEBAHN, C. (1995). "EPITHELIO-MESENCHYMAL TRANSFORMATION DURING FORMATION OF THE MESODERM IN THE MAMMALIAN EMBRYO." ACTA ANAT (BASEL) **154**(1): 79-97.
- YASUHARA, N., EGUCHI, Y., TACHIBANA, T., IMAMOTO, N., YONEDA, Y. AND TSUJIMOTO, Y. (1997). "ESSENTIAL ROLE OF ACTIVE NUCLEAR TRANSPORT IN APOPTOSIS." GENES CELLS **2**(1): 55-64.
- YOKOI, H., YAMAMA, Y., TSURUO, Y., KAWARADA, Y., MIURA, N., SUGIYAMA, T. AND ISHIMURA, K. (1998). "LEYDIG CELLS UNDERGOING APOPTOSIS IN THE PERINATAL RAT TESTIS." ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA **31**(4): 355-361.
- YU, R. N., ITO, M., SAUNDERS, T. L., CAMPER, S. A. AND JAMESON, J. L. (1998). "ROLE OF AHCH IN GONADAL DEVELOPMENT AND GAMETOGENESIS." NAT GENET **20**(4): 353-7.
- ZAZOPOULOS, E., LALLI, E., STOCCO, D. M. AND SASSONE-CORSI, P. (1997). "DNA BINDING AND TRANSCRIPTIONAL REPRESSION BY DAX-1 BLOCKS STEROIDOGENESIS." NATURE **390**(6657): 311-5.
- ZIEGLER, H. G., HAIDER, S. G., PASSIA, D. AND HILSCHER, W. (1983). "ENZYMISTOCHEMICAL AND MORPHOMETRICAL STUDIES ON DELTA 5-3 BETA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE DURING THE FETAL AND NEONATAL DEVELOPMENT OF RAT LEYDIG CELLS." ANDROLOGIA **15**(4): 392-7.

## **6 ZUSAMMENFASSUNG**

**Name des Doktoranden: Roland Diesel**

**Titel: Immunhistochemische Darstellung des Prokollagens Typ I und der Caspase-3 zur Klärung des Zelltods der fetalen Leydig-Zellen im Rattenhoden**

Im Hoden von Ratten kommen zwei verschiedene Populationen von Leydig-Zellen vor: die Fetaltyp-Leydig-Zellen (FLZ), welche vom 14. Fetaltag bis zum 25. Postnataltag (pnd) nachweisbar sind und die Adulttyp-Leydig-Zellen (ALZ), die ab dem 10. pnd entstehen und bis zum Senium aktiv sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ob FLZ in zeitlichem Zusammenhang mit ihrem apoptotischen Zelltod (Marker: Caspase-3) auch Prokollagen Typ I bilden. Für die vorliegende Arbeit wurden immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen Prokollagen Typ I und Caspase-3 durchgeführt. Hierzu wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte aus den Hoden von Wistar-Ratten der Altersgruppen 1., 5., 10., 15., 20., 25., 35. und 90. pnd angefertigt, welche dann immunhistochemisch bzw. mit der PAS-Reaktion gefärbt wurden. Die FLZ wurden nach ihrer Identifizierung gezählt und die Ergebnisse der immunhistochemischen Reaktionen semiquantitativ bzw. nach Reaktionsmustern ausgewertet.

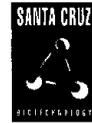
Die Gesamtzahl der FLZ pro mm<sup>2</sup> Schnittfläche besitzt ihr Maximum mit durchschnittlich 235 FLZ pro mm<sup>2</sup> am 1. pnd, um dann bis zu ihrem Verschwinden kontinuierlich abzunehmen. Am 35. und 90. pnd sind lichtmikroskopisch keine FLZ nachweisbar. Die Ergebnisse der Immunhistochemie für Prokollagen Typ I zeigen für den 1. pnd einen Anteil an Prokollagen-positiven FLZ mit einer rein zytoplasmatischen Immunreaktion von durchschnittlich 17 % und damit das Minimum für die untersuchten Altersgruppen. Nach annähernd linearer Zunahme wird am 20. pnd mit 80 % positiver FLZ das Maximum erreicht. Bei der Immunreaktion für Caspase-3 wurden die Reaktionsmuster *nukleär positiv*, *zytoplasmatisch positiv* sowie kombiniert *nukleär + zytoplasmatisch* unterschieden. So zeigen durchschnittlich 66 % der FLZ am 1. pnd eine rein nukleäre Reaktion, nach stetiger Abnahme bis zum 20. pnd sind es nur noch 9 %. Im Gegensatz dazu steigt die Anzahl an FLZ mit rein zytoplasmatischer Immunreaktion für Caspase-3 von einem Minimum mit <5 % am 1. pnd bis zu einem Plateau mit rund 35% am 15. und 20. pnd an, wie auch die Anzahl der FLZ mit kombinierter zytoplasmatischer + nukleärer Reaktion mit einem Maximum von 49 % am 20. pnd.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die zwei Vorgänge während des Abbaus der FLZ höchstwahrscheinlich gleichzeitig in diesen Zellen stattfinden: apoptotischer Zelltod und die Vorbereitung der Kollagen-Fibrillogenese. Die Bildung von Caspase-3, insbesondere die deutliche Abnahme der rein nukleär vorhandenen Caspase-3 zugunsten der zytoplasmatisch lokalisierten, verbunden mit einer starken Zunahme der Prokollagenbildung um den 5. pnd herum, deuten auf eine Apoptoseinitiierung der FLZ in der frühen Postnatalphase hin.

## 7 Anhang: Datenblätter der Antikörper

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

### Pro-COL1A2 (Y-18): sc-8787



The Power is Question

#### BACKGROUND

The extensive family of COL gene products (collagens) is composed of several chain types, including fibril-forming interstitial collagens (Types I, II, III and V) and basement membrane collagens (Type IV), each type containing multiple isoforms. Collagens are fibrous, extracellular matrix proteins with high tensile strength and are the major components of connective tissue, such as tendons and cartilage. All collagens contain a triple helix domain and frequently show lateral self-association in order to form complex connective tissues. Several collagens also play a role in cell adhesion, important for maintaining normal tissue architecture and function.

#### REFERENCES

1. Bellamy, G., et al. 1971. Evidence for procollagen, a biosynthetic precursors of collagen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 1138-1142.
2. Church, R.L., et al. 1971. Collagen biosynthesis: synthesis and secretion of a high molecular weight collagen precursor (procollagen). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 2638-2642.
3. Bornstein, P., et al. 1972. Procollagen: conversion of the precursor to collagen by a neutral protease. Science 175: 544-546.
5. McCarthy, J.B., et al. 1996. Cell adhesion to collagenous matrices. Biopolymers 40: 371-381.
6. Engel, J. 1997. Versatile collagens in invertebrates. Science 277: 1785-1786.
7. Cremer, M.A., et al. 1998. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. J. Mol. Med. 76: 275-288.
8. Boskey, A.L., et al. 1999. Collagen and bone strength. J. Bone Miner. Res. 14: 330-335.
9. Alberio, L., et al. 1999. Platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signaling pathways. Eur. J. Clin. Invest. 29: 1066-1076.

#### CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: COL1A2 (human) mapping to 7q22.1; Col1a2 (mouse) mapping to 6 A1.

#### SOURCE

Pro-COL1A2 (Y-18) is an affinity purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping at the N-terminus of Procollagen  $\alpha 2$  Type I of mouse origin.

#### PRODUCT

Each vial contains 200  $\mu$ g IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Blocking peptide available for competition studies, sc-8787 P, (100  $\mu$ g peptide in 0.5 ml PBS containing < 0.1% sodium azide and 0.2% BSA).

#### APPLICATIONS

Pro-COL1A2 (Y-18) is recommended for detection of Collagen  $\alpha 2$  Type I precursor of mouse, rat and, to a lesser extent, human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1–2  $\mu$ g per 100–500  $\mu$ g of total protein (1 ml of cell lysate)], immunofluorescence and immunohistochemistry (including paraffin-embedded sections) (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and solid phase ELISA (starting dilution 1:30, dilution range 1:30-1:3000); non cross-reactive with mature form.

Suitable for use as control antibody for COL1A2 siRNA (h): sc-72156 and COL1A2 siRNA (m): sc-43061.

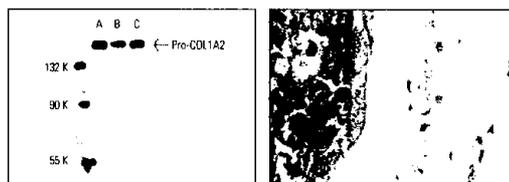
Molecular Weight of Pro-COL1A2: 140-210 kDa.

Positive Controls: 3611-RF whole cell lysate: sc-2215, 3T3-L1 cell lysate: sc-2243 or A-10 cell lysate: sc-3806.

#### RECOMMENDED SECONDARY REAGENTS

To ensure optimal results, the following support (secondary) reagents are recommended: 1) Western Blotting: use donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020 (dilution range: 1:2000-1:100,000) or Cruz Marker™ compatible donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2033 (dilution range: 1:2000-1:5000), Cruz Marker™ Molecular Weight Standards: sc-2035, TBS Blotto A Blocking Reagent: sc-2333 and Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048. 2) Immunoprecipitation: use Protein A/G PLUS-Agarose: sc-2003 (0.5 ml agarose/2.0 ml). 3) Immunofluorescence: use donkey anti-goat IgG-FITC: sc-2024 (dilution range: 1:100-1:400) or donkey anti-goat IgG-TR: sc-2783 (dilution range: 1:100-1:400) with UltraCruz™ Mounting Medium: sc-24941. 4) Immunohistochemistry: use ImmunoCruz™: sc-2053 or ABC: sc-2023 goat IgG Staining Systems.

#### DATA



Pro-COL1A2 (Y-18): sc-8787. Western blot analysis of Pro-COL1A2 expression in A-10 (A), 3611-RF (B) and 3T3-L1 (C) whole cell lysates.

Pro-COL1A2 (Y-18): sc-8787. Immunoperoxidase staining of formalin fixed, paraffin-embedded human skin tissue showing extracellular localization.

#### STORAGE

Store at 4° C, \*\*DO NOT FREEZE\*\*. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

#### RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

## BIOCARTA

**BIOCARTA US**  
6827 Nancy Ridge Dr  
San Diego, CA 92121  
Tel 858-200-2037  
Fax 858-200-2038  
info@biocarta.com  
www.biocarta.com

**BIOCARTA Europe GmbH**  
Borsteler Chaussee 53  
D-22453 Hamburg, Germany  
Tel +49-40-5257030  
Fax +49-40-52570377  
info.europe@biocarta.com

**BIOCARTA Japan KK**  
Technical Support 0120 810 723  
info@biocarta.co.jp  
**Wako Pure Chemical  
Industries, Ltd.**  
Tel 0120 052 099  
Fax 0120 052 806  
www.wako-chem.co.jp

### Anti-Caspase3 (Human)

Hodgkin's disease specific cysteine protease  
Cat. #12-01-16361 (0.1 ml)

#### **Background:**

Programmed cell death, or apoptosis, plays a critical role in tissue homeostasis and is of fundamental importance for embryogenesis and development of the immune system. A family of cell death proteins have been recently discovered to encode cysteine proteases with homology to the interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE). To date, at least 10 members of the ICE family of cysteine proteases have been identified in humans, most of which induce apoptosis when overexpressed in mammalian cells. Among the ICE family proteases identified in humans thus far, Caspase-3, is probably best correlated with PCD. Activation of Caspase-3 has been described in a number of settings in which apoptosis occurs, such as T cells stimulated through Fas (APO 1/CD 95). Furthermore, antiapoptotic viral proteins, such as crm A from cowpox, have been found to bind to and inhibit Caspase-3. Expression of Caspase-3 was detected in 92% of Hodgkin's disease (HD) having a classical immunophenotype, which increases the possibility that this protein may be involved in the pathogenesis of HD or may influence the response to treatment. (1, 3, 4, 5).

#### **Species Reactivity:**

human, mouse, rat, dog, gerbil

#### **Immunogen:**

By using full-length recombinant human Caspase-3 protein, a highly specific polyclonal rabbit (New Zealand White, s.c. 200 $\mu$ g 1:1 Freund, boosted six times) antiserum was prepared and was shown by immunoblotting to react with both the inactive 32-kD Caspase-3 zymogen and the 17-kD active subunit (2,3).

#### **Supplied As:**

Full Serum, Rabbit anti-serum with 15mM sodium azide.

#### **Concentration:**

Typical anti-Caspase-3 dilutions used are 1:1500 (v/v)

#### **Storage and Stability:**

Store vial at 4°C. When stored at 2-8°C, this antibody is stable for 24 months.

#### **Applications and Suggested Dilutions:**

- **Western blotting;** 1:1500 - 3000; ECL after SG quenching according to: **Krajewski S, Zapata JM, Reed JC: (1996) Analytical Biochem 236:221-228**
- **Immunoprecipitation;** 1:50
- **Immunocytochemistry;** Paraffin sections: 1:600 - 1500 Detection: 4plus™ HRP<sub>500</sub> Universal Kit

**Controls:** Incubations with normal rabbit IgG/serum 1:2000 + NSS (normal species serum) 1:8000.

The optimal dilution for a specific application under a given set of experimental conditions should be determined by the investigator.

**Positive Control:** spleen and other lymphoid organs, Jurkat cells

#### **Limitations:**

This Ab is available for research use only and is not approved for use in humans or in clinical diagnosis.

#### **Warranty:**

There are no warranties, expressed or implied, which extend beyond this description. Biocarta is not liable for property damage, personal injury, or economic loss caused by this product.

#### **Custom Service:**

Please contact us if you require this product in a special format.

#### **References:**

1. Chanabhai, M, et al., (1997) *Blood*. 90:2451 -5,
2. Krajewska M, et al., (1997) *Cancer Res* 57:1605,
3. Krajewski S, et al., (1997) *Blood* 89:3817,
4. Fernandes-Alnemeri T, et al., (1995) *Cancer Res* 55:6045, .
5. Krajewska M, et al., (1997) *Cancer Res* 57:1605.

## **8 DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. Syed G. Haider danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und die stets hervorragende Betreuung.

Ich danke Frau Gabriele Berthold und Frau G. Servos für die allzeit kompetente technische Unterstützung und Erläuterung der Methodik.

Für alle nützlichen Ratschläge danke ich vielmals Herrn Alexander Moll.

Ganz besonders danke ich meiner lieben Ehefrau Suzan und meiner Familie für das Verständnis und für ihre großzügige Unterstützung.

## **9 LEBENS LAUF**

Name	Roland Diesel
Geburtsdatum/-ort	24.01.1980 in Düsseldorf
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Verheiratet
Konfession	Evangelisch

### **Schullaufbahn**

1986 – 1990	Grundschule (Gemeinschaftsgrundschule Dormagen/Rheinfeld)
1990 – 1999	Gymnasium (Leibniz-Gymnasium-Dormagen)

### **Wehrdienst**

09/99 – 06/00	Grundwehrdienst bei der Bundeswehr
---------------	------------------------------------

### **Studium**

10/2000 – 10/2006	Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09/2002	Physikum
09/2003	Erstes Staatsexamen
09/2005	Zweites Staatsexamen
10/2006	Drittes Staatsexamen
11/2006	Approbation als Arzt

### **Berufliche Tätigkeit**

Seit 01/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Klinik für Anästhesiologie Universitätsklinik Düsseldorf
--------------	---