

Aus dem Anatomischen Institut II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Kommissarischer Geschäftsführender  
Direktor: Prof. Dr. Timm Filler

**Immunhistochemische Untersuchungen**  
**zur Identifizierung und Quantifizierung der Vorläufer**  
**der adulten Leydig-Zellen**  
**bei der Wistarratte**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Jun Wang

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez: Univ.-Prof. Dr. Med. Joachim Windolf  
Dekan  
Referent: Prof. Dr. Haider  
Korrekerent: Prof. Dr. Schulz

## Inhaltsverzeichnis

|   | <b>Seite</b> |
|---|--------------|
| <b>1. Einleitung</b>  | 4-7          |
| <b>2. Material-Methode</b>                                  | 8-14         |
| 2.1. Untersuchungsmaterial                                  | 8-9          |
| 2.1.1. Hodengewebe und Schnittherstellung                   | 8-9          |
| 2.2. Histologische und Histochemische Methoden              | 9-13         |
| 2.2.1. Histologische Färbung                                | 10-11        |
| 2.2.1.1. Hämalaun- Eosin- Färbung ( HE)                     | 10           |
| 2.2.1.2. Perjodsäure Schiff Reaktion ( PJS)                 | 10-11        |
| 2.2.2. Immunhistologische Methoden                          | 11-13        |
| 2.3. Lichtmikroskopische Auswertung                         | 13-14        |
| <b>3. Ergebnisse</b>  | 15-53        |
| 3.1. Immunhistochemische Befunde von CYP450scc              | 15-16        |
| 3.1.1. Verteilung des CYP450scc                             | 15           |
| 3.1.2. Quantitative Auswertung der CYP450scc- Reaktion      | 15-16        |
| 3.2. Immunhistochemische Befunde von LH-Rezeptor            | 16-17        |
| 3.2.1. Verteilung des LH-Rezeptors                          | 16-17        |
| 3.2.2. Quantitative Auswertung des LH- Rezeptors            | 17           |
| 3.3. Immunhistochemische Befunde von Androgenrezeptor       | 17-18        |
| 3.3.1. Verteilung des Androgenrezeptors                     | 18           |
| 3.4. Vergleich der Ergebnisse von CYP450scc und LH-Rezeptor | 18-19        |
| 3.5. Abbildungen  | 20-53        |
| <b>4. Diskussion</b>  | 54-62        |
| <b>5. Literatur</b>   | 63-68        |
| <b>6. Zusammenfassung</b>                                   | 69           |
| <b>Danksagung</b>   | 70           |
| <b>Curriculum vitae</b>                                     | 71           |

## Abkürzungen

|                     |  |
|---------------------|--|
| ALC                 | Adulttyp Leydig-Zellen                                   |
| AR                  | Androgenrezeptor   |
| ATP                 | Adenosintriphosphat                                      |
| cATP                | zyklisches Adenosinmonophosphat                          |
| EDS                 | Ethane dimethane sulphonate                              |
| Fd                  | Fetaltag   |
| FLC                 | Fetaltyp Leydig-Zellen                                   |
| hCG                 | Human Chorion Gonadotropin                               |
| HSD                 | Hydroxysteroid-Dehydrogenasen                            |
| irVEGF              | immunoreaktiver vaskulärer endothelialer Wachstumsfactor |
| LC                  | Leydig-Zellen  |
| LH                  | Luteinisierendes Hormon                                  |
| LHR                 | Luteinisierendes-Hormon-Rezeptor                         |
| P450arom            | Cytochrome P450 aromatase                                |
| P450c <sub>17</sub> | Cytochrome 17-alpha hydroxylase                          |
| P450scc             | Cytochrom P450 side-chain-cleavage                       |
| PBR                 | Peripheral Benzodiazepin Rezeptor                        |
| PDGFR $\alpha$      | Platelet-derived growth factor receptor $\alpha$         |
| PK-A                | Protein Kinase A   |
| Pnd                 | Postnataltag   |
| SER                 | Smooth endoplasmic reticulum                             |
| StAR                | Steroidogenic Acute Regulatory Protein                   |

## 1. Einleitung

Leydig-Zellen (LC) befinden sich im interstitiellen Raum des Hodens und bilden das Hormon Testosteron. Es sind zwei morphologisch und funktionell verschiedene Populationen von Leydig-Zellen im Hoden der Ratte zu unterscheiden: Fetaltyp Leydig-Zellen (FLC) und Adulttyp Leydig-Zellen (ALC) (Haider et al., 1986; Hardy et al., 1989; Kuopio et al., 1989; Haider and Servos, 1998; Majdic et al., 1998; Ariyaratne et al., 2000b; Haider, 2004).

Die Fetaltyp Leydig-Zellen (FLC) sind in kompakten, rund bis oval geformten Zellkomplexen angeordnet, die in den interstitiellen Dreiecken zwischen den Tubuli seminiferi liegen. Die Zellen dieser „Cluster“ sowie deren Zellkerne sind groß und rund geformt. Das Zytoplasma ist reich an Lipidtropfen. Die FLC zeigen erstmals am 16. Fetaltag (fd) eine immunhistochemisch positive Reaktion für  $3\beta$ -HSD (Haider et al. 1997). Lichtmikroskopisch sind die FLC eindeutig bis zum 25. pnd nachweisbar. Das weitere Schicksal der FLC wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während einige Autoren mit der Beobachtung übereinstimmen, dass die FLC im Rattenhoden nach dem 25. pnd nicht mehr lichtmikroskopisch nachweisbar sind und möglicherweise eine vollständige Regression erfahren und abgebaut werden (Haider et al., 1983, 1986; Kuopio et al., 1989), berichten andere Autoren über die Existenz von aktiv steroidbildenden FLC im adulten Hoden, welche keiner Dedifferenzierung unterliegen (Kerr and Knell 1988, Ariyaratne et al., 2000b).

Die ALC sind peritubulär, perivaskulär sowie in den interstitiellen Dreiecken zwischen den Tubuli seminiferi lokalisiert. Sie können sowohl einzeln als auch gruppiert vorliegen, bilden jedoch keine Cluster aus. Die ALC sind groß und rund oder flach geformt, mit runden oder entsprechend flachen Zellkernen. Das Zytoplasma enthält wenige bzw. keine Lipidtropfen. Die Größe der vorhandenen Lipidtropfen ist vorwiegend klein. Haider (2004) unterteilt die postnatale Differenzierung von Ratten- ALC in 4 Phasen: *1. Transformation peritubulärer*

*und perivaskulärer Fibroblasten* (pnd 10 bis 13). 2. *Vorläufer Phase* (pnd 14 bis 28) (ALC precursors): Sie produzieren als vorwiegendes Androgen- Endprodukt Androsteron. 3. *unreife Phase* (immature Stage) : Gegen 35. pnd produzieren LC bereits kleine Mengen an Testosteron, metabolisieren es jedoch zum größten Teil. Das vorwiegend Androgenendprodukt ist  $5\alpha$ -Androstane- $3\alpha,17\beta$ -Diol. 4. *reife Phase* (mature stage) (ab 56. pnd): Die reifen ALC produzieren Testosteron als Androgen- Endprodukt und sind vollständig funktionsfähig im geschlechtsreifen Tier am 90. pnd (Hardy et al., 1990; Shan and Hardy, 1992; Shan et al., 1995, 1997). Die wichtigste Funktion der in den ALC produzierten Androgene ist, den Prozess der Spermatogenese zu initiieren, aufrechtzuerhalten und zu regulieren (Haider, 2004; Hardy, 1989).

Die Differenzierung der ALC in den Hoden während der Pubertät ist für die männliche Geschlechtsentwicklung entscheidend. Über den Herkunft der ALC wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass die ALC von den spindelförmigen Zellen in dem testikulären Interstitium stammen (Mendis-Handagama et al., 1987, 1988; Roosen-Runge et al., 1959; de Kretser, 1974; Lordig und de Kretser, 1972; Christesen, 1975; Hardy et al., 1989). Eine genaue Charakterisierung dieser spindelförmigen Zellen fehlt bisher. Im testikulären Interstitium gibt es einige Typen von dieser Morphologie. Sie sind Gefäßendothelzellen, perivaskuläre Fibroblasten (Perizyten), Myoidzellen, peritubuläre Fibroblasten und einzelne im Interstitium verstreute Fibroblasten (in dieser Arbeit ‚interstitielle Fibroblasten‘ genannt). Einige Autoren berichteten, die peritubulären Fibroblasten sind die Vorläufer der ALC (Haider et al., 1986, 1995, 1997; Teerds et al., 1989; Russel et al. 1995; Aryaratene et al., 2000). Dagegen zeigten Davidoff et al. (2004), dass die testikulären Blutgefäße, nämlich, vaskuläre glatte Muskelzellen und Perizyten, die Vorläufer der ALC sind. Haider und Servos (1998) beschreiben, dass die  $3\beta$ -HSD- positiven fibroblastenähnlichen Vorläuferzellen sowohl peritubulär als auch perivaskulär zu finden sind. Einige Autoren vertreten die Hypothese, dass die ALC zuerst von den undifferenzierten

Stammzellen abstammen (Ge et al., 1996; Haider, 2004; Davidoff et al., 2004). Ge et al. (2006) gelang in den letzten Jahren diese Hypothese nachzuweisen. Die vorliegende Arbeit mittels immunhistochemischer Methoden geht der Frage nach, wo die fibroblasten-ähnlichen Vorläufer im interstiellen Raum lokalisiert sind.

### **Fragestellung:**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der biochemischen Marker (**LHR**-Antikörper, **P450scc**-Antikörper und **AR**-Antikörper) die Herkunft der ALC-Vorläufer während der postnatalen Phasen (10. – 20. pnd) zu untersuchen und je nach der Lokalisation zu quantifizieren und zu beurteilen.

Folgende Fragen bilden dabei die Schwerpunkte:

1. Wann sind die Vorläufer von ALC zum ersten Mal lichtmikroskopisch sichtbar?
2. Welche Zellen kommen als Vorläufer der ALC in Frage: die peritubulären Fibroblasten, die perivaskulären Fibroblasten, oder Zellen in den interstitiellen Gefäßen? Wie hoch ist der quantitative Anteil dieser drei Quellen bei der Bildung der ALC?
3. Ändert sich die Lokalisation der Vorläufer mit dem Alter (pnd) ?

### **Begründung der Auswahl der Antikörper:**

1. Der LH-Rezeptor wird in der Literatur übereinstimmend als Marker von Leydig-Zellen bzw. deren Vorläufern, den ALC anerkannt (Übersicht siehe Haider, 2004). LH ist das wichtigste Hormon, das die Differenzierung und Proliferation der ALC aufrechterhält (Berton et al., 1995; Habert et al., 2001; Huhtaniemi et al., 1984). Die LH-Gabe bei den Versuchstieren induzierte eine Mengen- und Größezunahme der LC (Ewing und Zirkin, 1983; Molenaar et al., 1986). Die Hemmung des LHs durch

GnRH-Antagonisten führt zur Atrophie und Apoptose der LC (Prince et al., 1998).

Ohne LH kann keine ALC existieren. Die Wirkung von LH entfaltet sich durch seine Bindung an LHR. Die ALC-Vorläufer besitzen bereits LHR (Ge et al., 1996).

2. Das Enzym P450scc wird von mehreren Autoren übereinstimmend als Marker einer Steroid-produzierenden Zelle – hier für ALC – verwendet. Das Enzym P450scc ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Es wandelt Cholesterin in Pregnenolon um, ist das Schlüsselenzym der Steroidogenese (Haider, 2004). Die Zellen, die P450scc-Aktivität zeigen (dargestellt durch P450scc-AK) besitzen die Fähigkeit Androgen zu synthetisieren. Dies ist die Hauptaufgabe der ALC und seiner Vorläufer.
3. ALC produzieren einerseits Androgen, andererseits sind sie Zielort der Androgenwirkung. Das heißt, Androgen und ihre Rezeptoren tragen bei der autokrinen Regulation der ALC bei. Die Androgenrezeptoren sind intranukleär in LC lokalisiert. In den unreifen ALC werden AR-Konzentration durch die Androgen-Konzentration reguliert (Shan et al., 1997). Wie im Falle vom LHR zeigten bereits die peritubulären und perivaskulären Fibroblasten eine immunhistochemische Reaktion des AR. So bietet sich eine Möglichkeit an, die Steroidogeneseaktivität dieser Zellen zu beurteilen.

## **2. Material-Methode**

### **2.1. Untersuchungsmaterial**

#### **2.1.1. Hodengewebe und Schnittherstellung**

Als Untersuchungsmaterial dienten die Hoden von insgesamt 30 männlichen Wistarratten. Die Aufzucht der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei einem 12 Stunden Licht-Dunkel-Zyklus im zentralen Tierlabor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Wasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung. Die Gewinnung des Untersuchungsmaterials erfolgte vom 23. 8. 2005 bis 26. 08. 2005. Das Alter der Tiere erstreckte sich vom 10. bis zum 20. Postnaltag (pnd). Für jeden der folgenden Termine wurden fünf Tiere verwendet: 10. pnd, 12. pnd, 14. pnd, 16. pnd, 18. pnd, 20. pnd. Die Tiere wurden am Untersuchungstag zwischen 10.00 und 11.00 Uhr mit Äther narkotisiert und durch zervikale Dekapitation getötet. Anschließend wurden die Hoden herauspräpariert. Die linken Hoden wurden in Bouinscher Lösung fixiert, die rechten in Formalin (als Ersatz, falls mit den in Bouin fixierten Hoden keine guten immunhistochemischen Reaktionen zu erwarten wären). Aus folgendem Grund wurden die Untersuchungstermine zwischen 10. und 20. pnd ausgewählt: Nach den Untersuchungen von vielen Autoren sind die Vorläufer von ALC ab dem 10. pnd zu sehen. Die Anzahl der ALC-Vorläufer steigt mit der Zeit an. Ab dem 20. pnd wird in der Literatur über eine stabile Proliferationsrate der ALC berichtet.

Zu jeder Versuchsreihe wurden je drei Schnitte aus verschiedenen Schichten der Hoden entnommen. Der Abstand zwischen zwei ausgewählten Schnitten entsprach dabei mindestens 50 µm. Somit standen für jede Versuchsreihe 30 Präparatschnitte zur Verfügung.

Zur Gewinnung der Paraffinschnitte wurde nach der Präparation von jedem Tier der linke Hoden in Bouinscher Lösung (bestehend aus 150 ml Pikrinsäure, 50 ml 37% Formalin und 10 ml Eisessig) und der rechte Hoden in Formalinlösung (bestehend aus 30 ml Aqua dest und 150 ml 37% Formalin) für 10 Std. fixiert, alle fünf Stunden wurden die Lösungen erneuert. Dann wurden die Hoden über einen Tag einer aufsteigenden Isopropylalkoholreihe (70 bis 100%) zugeführt (zweimal zwei Std. in 70%, über Nacht in 80%, zweimal drei Std. in 90% und in 100%). Danach wurden die Hoden in Methylbenzoat für 12 Std. gehalten, welches einmal gewechselt wurde. Am dritten Tag wurden die Hoden zweimal für 10 Minuten in Toluol gegeben, welches danach durch flüssiges Paraffin ersetzt wurde. Das Paraffin wurde dreimal (etwa alle drei Std.) gewechselt und über Nacht im flüssigen Paraffin belassen. Am nächsten Tag erfolgte dann die Einbettung. Die so in Paraffinblöcken eingebetteten Hoden wurden auf einem Schlittenmikrotom in 5 µm dicke Schichten geschnitten.

## **2.2.Histologische und Histochemische Methoden**

Insgesamt wurden folgende Färbung und immunhistochemische Reaktionen an Paraffinschnitten durchgeführt:

1. Hämalaun- Eosin- Färbung
2. Perjodsäure Färbung
3. Luteinising hormone receptor
4. Cytochrome P 450 side-chain-cleavage-Enzyme
5. Androgen receptor

### **2.2.1. Histologische Färbung**

### 2.2.1.1. Hämalaun- Eosin- Färbung (HE)

|    |   |                                |
|----|---|--------------------------------|
| 1. | 5 µm dünne Paraffinschnitte bei 60 °C in den Brutschrank stellen                          | 20 Min.                        |
| 2. | Entparaffinieren in Xylol (2×),   | Je 10 Min.                     |
|    | absteigende Alkoholreihe (Isopropanol) (2×100%, 1×90%, 1×80%,<br>3×70%)                   | Je<br>5 Min.                   |
|    | und Aqua dest   | 5 Min.                         |
| 3. | Kernfärbung mit Hämalaun  | 8 Min.                         |
| 4. | Bläuen unter fließendem Leitungswasser  | 3 Min.                         |
| 5. | Färbung mit 0,3% Eosin wässrig  | 2 Min.                         |
| 6. | Kurz in Wasser tauchen  |                                |
| 7. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (Isopropanol) (1×70%,<br>1×80%, 1×90%,<br>2×100% | Je 20 Sek.<br><br>Je 2<br>Min. |
|    | und Xylol (2×) .  | Je 5<br>Min.                   |
|    |   |                                |
| 8. | Eindecken mit DePeX (Serva, Heidelberg)   |                                |

### 2.2.1.2. Perjodsäure Schiff Reaktion (PJS)

|    |  |            |
|----|--|------------|
| 1. | 5 µm dünne Paraffinschnitte bei 60 °C in den Brutschrank stellen | 20 Min.    |
| 2. | Entparaffinieren in Xylol (2×),                                  | Je 10 Min. |
|    | absteigende Alkoholreihe (Isopropanol) (2×100%, 1×90%, 1×80%,    | Je 5 Mn.   |

|     |   |          |
|-----|---|----------|
|     | und Aqua dest   | 5 Min.   |
| 3.  | Einstellen in 0,5% Perjodsäure  | 5 Min.   |
| 4.  | Spülen mit Aqua dest  |          |
| 5.  | Einstellen in Schiffsreagenz  | 20 Min.  |
| 6.  | Ohne Spülen in SO <sub>2</sub> Wasser (Kurz vor dem Gebrauch aus 6 ml 10% | 2 Min.   |
| 7.  | Spülen unter fließendem Wasser  | 10 Min.  |
| 8.  | Kernfärbung mit Hämalaun  | 2 Min.   |
| 9.  | Bläuen unter fließendem Leitungswasser                                    | 5 Min.   |
| 10. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (Isopropanol) (1×70%,            | Je 2 Mn. |
|     | und Xylol (2×)  | Je 5 Mn. |
| 11. | Eindecken mit DePeX (Serva, Heidelberg)                                   |          |

### 2.2.2. Immunhistochemische Methoden

Drei Antikörper zum Nachweis von 1. **Luteinising hormone receptor (LHR)**, 2.

**Cytochrome P 450 side-chain cleavage enzyme (P450scc)** und 3. **Androgen receptor (AR)**

sind polyklonal. Sie wurden in Kaninchen hergestellt.

1. LHR- Antikörper (anti human origin) stammt von der Firma Acris (Katalognummer: SP4594P)

2. P450scc- Antikörper (anti rat) stammt von der Firma Chemicon International (Katalognummer: AB1244)

3. AR- Antikörper (anti human origin) stammt von der Firma Santa Cruz Biotechnology (Katalognummer: sc- 816)

Einzelheiten siehe Datenblätter.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Nachweismethode aufgeführt:

|     |  |            |
|-----|--|------------|
| 1.  | 5 µm dünne Paraffinschnitte bei 60 °C in den Brutschrank stellen   | 20 Min.    |
| 2.  | Entparaffinieren in Xylol (2×),  | Je 10 Min. |
|     | absteigende Alkoholreihe (Isopropanol) (2×100%, 1×90%, 1×80%,  | Je 5 Min.  |
|     | und Aqua dest  | 5 Min.     |
| 3.  | Antigen Retrieval mit 0,01M Citratpuffer, pH = 6,0, im Dampfgerar bei 99°C   | 20 Min.    |
| 4.  | Abkühlen   | 10 Min.    |
| 5.  | Spülen und Einstellen mit TBS- Puffer (TRIS buffered saline, 0,05M,  | 5 Min.     |
| 6.  | Blockieren der endogenen Peroxidase mit 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | 20 Min.    |
| 7.  | Spülen und Einstellen mit TBS- Puffer  | 5 Min.     |
| 8.  | Inkubation mit Primärantikörper bei ca. 4°C<br><br>Konzentration für LHR : 1:1500<br><br>Konzentration für P450scc : 1:1200<br><br>Konzentration für AR : 1: 200<br><br>Zusätzlich jeweils einige Negativkontrollen (statt Primärantikörper wurde TBS Puffer benutzt), die bei jeder Reaktion mitgeführt wurden. | 18 Std.    |
| 9.  | Spülen und Einstellen in TBS- Puffer   | 5 Min.     |
| 10. | Inkubation mit EnVision Anti- Rabbit *(Dako, Hamburg)  | 30 Min.    |
| 11. | Spülen und Einstellen in TBS- Puffer   | 5 Min.     |
| 12. | Inkubation mit Chromogen DAB (aktiviert mit 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )   | 10 Min.    |
| 13. | Spülen und Einstellen in Aqua dest   | 5 Min.     |
| 14. | Kernfärbung mit Hämalaun **  | 2 Min.     |
| 15. | Bläuen unter fließendem Leitungswasser   | 5 Min.     |

|     |   |                      |
|-----|---|----------------------|
| 16. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (Isopropanol) (1×70%,<br>und Xylol (2×)) | Je 2 Mn.<br>Je 5 Mn. |
| 17. | Eindecken mit DePeX (Serva, Heidelberg)   |                      |

\* Dako Cytomation EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti- Rabbit: Peroxidase markiertes Polymer konjugiert an Ziegen Anti- Kaninchen Immunglobuline in Tris- HCl- Puffer, das stabilisierendes Protein und eine antimikrobielle Substanz enthält.

\*\* Bei der Reaktion mit dem AR- Antikörper wurde nur 1 Min. mit Hämalaun gefärbt.

### 2.3.Lichtmikroskopische Auswertung

Für die Quantifizierung am Lichtmikroskop wurde ein Messraster im Okular (Mess-Strichplatte der Firma Leitz, Köln) verwendet. Dieser Messraster bestand aus 25 gleich große Quadraten in einem Feld von 100 mm<sup>2</sup>, so dass ein Quadrat in der Strichplatte ein Feld von 4mm<sup>2</sup> (=2 mm×2 mm) repräsentiert.

Für die Zellzählung wurden die immunhistochemisch markierten FLC, perivaskulären Fibroblasten, peritubulären Fibroblasten, interstitiellen Fibroblasten und Gefäße im Gesamthodenquerschnitt (außer Randbereich s. Abb. 1) gezählt und in Mittelwert, +/- Standardabweichung statistisch ausgewertet. Die absolute Anzahl der gezählten Zellen pro Quadratmillimeter wurde durch die Hochrechnung der mittleren Anzahl der gezählten Zellen in einem Messraster auf Zelle berechnet.

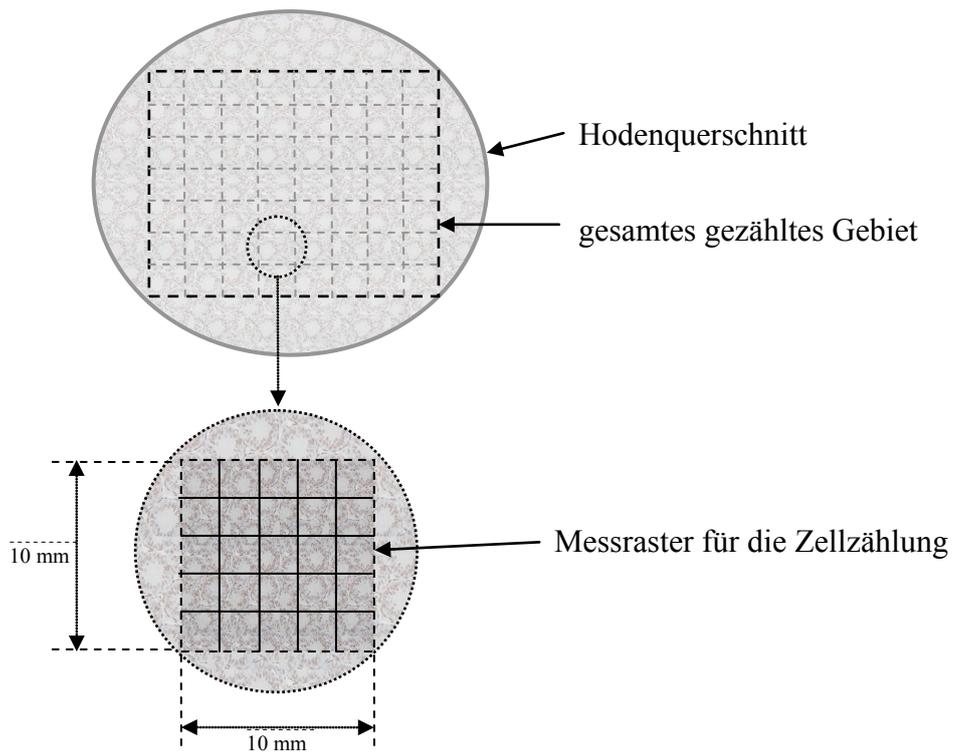


Abb. 1 Dieser Messraster bestand aus 25 gleich große Quadraten in einem Feld von 100 mm<sup>2</sup>, so dass ein Quadrat in der Strichplatte ein Feld von 4mm<sup>2</sup> (=2 mm×2 mm) repräsentiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Immunhistochemische Befunde von P450scc

##### 3.1.1. Verteilung von P450scc

Während des untersuchten Zeitraums (vom 10. pnd bis zum 20. pnd) wurde eine deutliche immunhistochemische Reaktion (graue bis braune Färbung) im Zytoplasma der ALC-Vorläufer und FLC beobachtet. Die Zellkerne waren dabei vollkommen ausgespart und imponierten als helle runde Areale (Abb. 2-7). Während die positiv reagierenden peritubulären und interstitiellen ALC-Vorläufer in allen Altersgruppen zu sehen waren, fehlte die Immunreaktion in den perivaskulären ALC-Vorläufern am 10. und 12. pnd. Erst ab dem 14. pnd wiesen die letztgenannten Zellen vereinzelt eine immunhistochemische Reaktion auf (Abb. 5). Eine schwach bis mäßige Reaktion wurde in den Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen von einigen interstitiellen Gefäßen beobachtet (Abb. 6). Es muss jedoch betont werden, dass ihre Intensität wesentlich schwächer und ihre Anzahl viel geringer war als in der immunhistochemischen Reaktion vom **LH-Rezeptor** (Abb. 11, 18, 20, 21). In einigen Tubuli seminiferi zeigten vereinzelte Keimepithelzellen eine schwach bis mäßige intranukleäre Reaktion (Abb. 3, 4).

Die immunhistochemische Negativkontrolle am Beispiel vom 12. pnd (Abb. 15\*), bei der der Primär-Antikörper durch Puffer ersetzt wurde, wies keine Färbung auf.

##### 3.1.2. Quantitative Auswertung der P450scc- Reaktion

Die Abbildung 9 zeigt den Verlauf der absoluten Anzahl der immunhistochemisch markierten Zellen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) pro Quadratmillimeter zwischen dem 10. pnd und dem 20. pnd. Man erkennt hier einen Anstieg der Anzahl der ALC-Vorläufer und einen Abfall der Anzahl der FLC.

Vergleicht man nun die prozentualen Anteile von den drei Vorläufern in sechs Altersgruppen (Abb. 8), kann folgendes festgestellt werden: Am 10. und 12. pnd stammten ALC-Vorläufer ausschließlich aus den peritubulären und den interstitiellen Fibroblasten. Ab dem 14. pnd beteiligten sich die perivaskulären Fibroblasten auch an der Bildung von ALC mit. Ihr Anteil stieg stetig vom 14. pnd bis zum 18. pnd an. Am 20. pnd war wiederum ein leichter Abfall zu erkennen. Während des gesamten untersuchten Zeitraums erwiesen sich die peritubulären Fibroblasten als die größte Quelle der Vorläufer der ALC.

In der Abbildung 10 wurde die absolute Anzahl der von **P450scc** markierten Blutkapillaren und Blutgefäße pro Quadratmillimeter in Abhängigkeit vom Alter zusammengefaßt. Die Anzahl war während der gesamten Entwicklung auffällig gering. Am 16. pnd erreichte sie ein Maximum mit 16 Blutgefäße pro Quadratmillimeter.

## **3.2. Immunhistochemische Befunde über LH-Rezeptor**

### **3.2.1. Verteilung des LH-Rezeptors**

Die grau-braune Farbe des Reaktionsprodukts ist im Zytoplasma der ALC-Vorläufer und FLC deutlich zu erkennen, die Zellkerne sind dabei vollkommen ausgespart (Abb. 11- 21). Anders als bei **P450scc** erkennt man in diesem Fall, dass die

ALC-Vorläufer sich während des gesamten untersuchten Zeitraums fast ausschließlich peritubulär befinden. Eine mäßig bis starke immunhistochemische Reaktion war altersunabhängig in fast allen Gefäßen zu beobachten. Die Reaktion wurde beobachtet in den glatten Muskelzellen, oder in den Endothelzellen, oder in einigen Fällen sogar in den beiden Zelltype(Abb. 11- 21). Wiederum anders als bei **P450scc** zeigten hier die Sertoli-Zellen und die Keimepithelzellen keinerlei Reaktion.

In Schnitt den Negativkontrolle, bei der das Substrat im Inkubationsmedium durch die Pufferlösung ersetzt wurde, fehlten die Produkte der Immunreaktion vollständig in allen Zellen sowie in den Gefäßen (Abb. 15\*).

### **3.2.2. Quantitative Auswertung des LH- Rezeptors**

Die Abbildung 22 und 23 zeigen jeweils den prozentualen Anteil und die absolute Anzahl der immunhistochemisch positiv reagierenden ALC-Vorläufer. Die absolute Anzahl stieg zunächst an, fiel aber am 20. pnd ab. Der prozentuale Anteil der Vorläuferzellen zeigte keine wesentliche Änderung. Die peritubulären Fibroblasten stellten nach wie vor den größten Anteil dar, nämlich von 94% am 10. pnd bis zu 99% am 16., 18. und 20. pnd. Die perivaskulären Fibroblasten waren in diesem Fall kaum zu finden. Ihr Anteil betrug weitgehend knapp 1%. Stattdessen waren mehr von **LH-Rezeptor** markierte Blutkapillaren und Blutgefäße zu sehen (Abb. 24). Ihre Anzahl betrug am 10. pnd gut 200 Blutgefäße pro Quadratmillimeter, fiel während der Entwicklung allmählich ab, erreichte am 20. pnd ein Minimum von knapp 100 Gefäßen pro Quadratmillimeter. Im Vergleich mit dem gleichen Diagramm von **P450scc** ist die Anzahl an dieser Stelle 100 bis 200 mal höher.

### **3.3. Immunhistochemische Befunde über Androgenrezeptor**

#### **3.3.1. Verteilung des Androgenrezeptors**

Während des untersuchten Zeitraums wurde eine intensive spezifische intranukleäre Immunreaktion des Androgenrezeptors in den Myoidzellen und den Sertoli-Zellen regelmäßig beobachtet. Gelegentlich war diese Reaktion ebenfalls - jedoch abgeschwächt- in den ALC-Vorläufern (peritubulären, perivaskulären, interstitiellen Fibroblasten), den FLC, den vaskulären glatten Muskelzellen, den Perizyten und den Fibroblasten um die FLC-Cluster zu erkennen. Es fehlte eine immunhistochemische Reaktion in den Keimepithelzellen (Abb. 27- 31). In den Präparaten, die ohne Kerngegenfärbung (Hämalaun) behandelt wurden, zeigten die Nuklei von Spermatozyten eine sehr schwache Färbung, was sonst durch Hämalaun überlappt wurde. Das Verteilungsmuster des Androgenrezeptors blieb vom 10. bis zum 20. pnd weitgehend unverändert.

Die immunhistochemische Negativkontrolle, bei der der primär-Antikörper durch Puffer ersetzt wurde, wies keine Reaktion auf (Abb. 15\*).

\* Abb. 15: Für die Negativkontrolle wurde nur eine Abbildung präsentiert, weil die immunhistochemischen Methoden von allen drei Antikörpern identisch waren (siehe auch die Methoden unter 2.2.2).

### **3.4. Vergleich der Ergebnisse von P450scc und LH-Rezeptor**

Folgende Ähnlichkeiten sind bei einem Vergleich der Befunde festzuhalten:

1. Peritubuläre Fibroblasten stellten die größte Quelle der ALC-Vorläufer dar.

2. In den Blutgefäßen waren positiven Reaktionen zu erkennen. Die Reaktion war lokalisiert entweder in den glatten Muskelzellen, oder in den Endothelzellen oder in einigen Fällen in den beiden Zelltypen.

Folgende Unterschiede wurden bei einem derartigen Vergleich auffällig:

1. Bei **P450scc** sieht man ein Wachstum des prozentualen Anteils der perivaskulären Fibroblasten ab dem 14. pnd, was beim **LH-Rezeptor** nicht der Fall war.
2. Beim **LH-Rezeptor** waren deutlich mehr immunhistochemisch markierte Blutgefäße und deutlich weniger immunpositive perivaskuläre Fibroblasten zu erkennen.

### 3.5. Abbildungen

Abb. 2: Rattenhoden **10. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **Cytochrom P450 side chain cleavage (P450scc)** (grau bis braun) mit Kerngegenfärbung (blau durch Hämalaun). Eine FLC (dicker Pfeil), ein peritubulärer fibroblastähnlicher ALC-Vorläufer (dünner Pfeil) zeigen deutlich positive Reaktionen in Zytoplasma. 1:1000

Abb. 3: Rattenhoden **12. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **P450scc** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). In dieser Abbildung sind zwei FLC- Cluster (dicke Pfeile), ein peritubulärer und ein interstitieller Vorläufer der ALC (dünne Pfeile) stark positiv angefärbt. Die Kerne der FLC sind dabei ausgespart, die Reaktion befindet sich im Zytoplasma. Die Zellkerne von einigen Spermatozoen und Sertoli- Zellen (Pfeilköpfe) zeigen ebenfalls positive Reaktionen. 1:1000

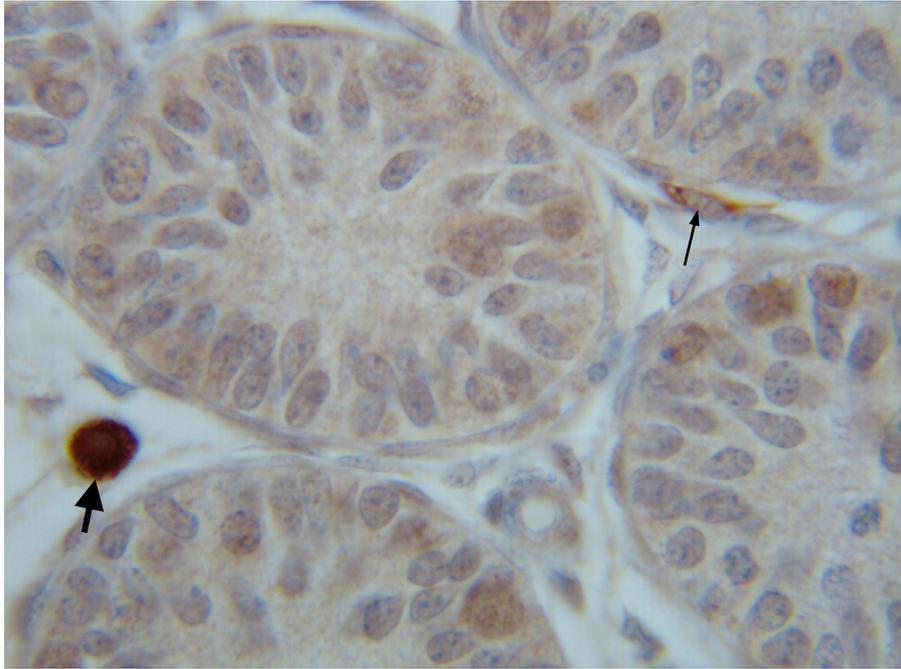


Abb. 2

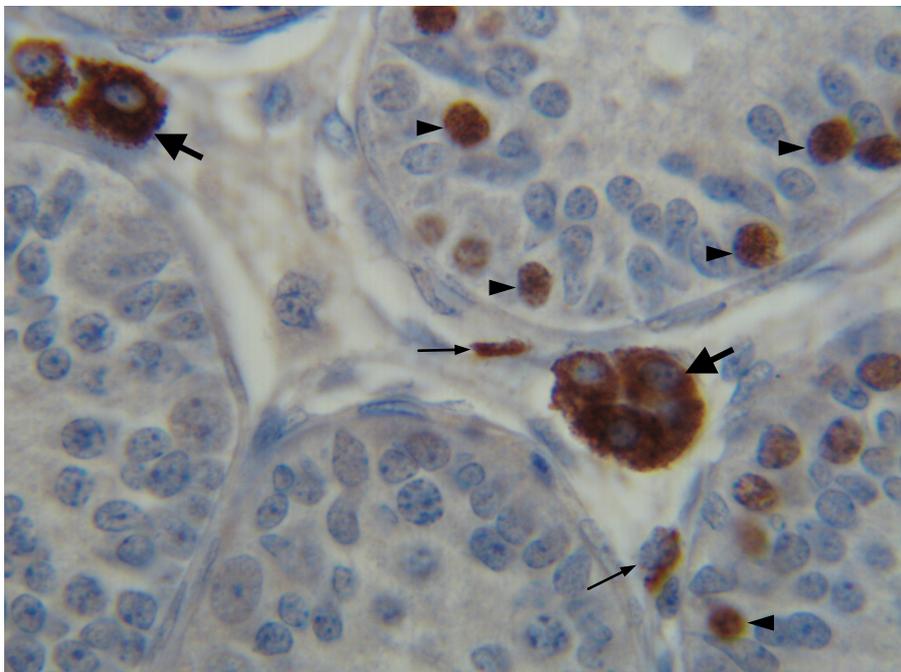


Abb. 3

Abb. 4: Rattenhoden **14. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **P450scc** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). In dieser Abbildung sind drei peritubuläre fibroblastenähnliche Vorläufer der ALC (dünne Pfeile) und die Zellkerne von einigen Spermatozyten bzw. Sertoli- Zellen (Pfeilköpfe) positiv angefärbt. 1:1000

Abb. 5: Rattenhoden **16. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **P450scc** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Ein peritubulärer Vorläufer der ALC (dünner Pfeil) und ein perivaskulärer ALC-Vorläufer (gestrichelter Pfeil) weisen deutlich positive Reaktionen auf. 1:1000

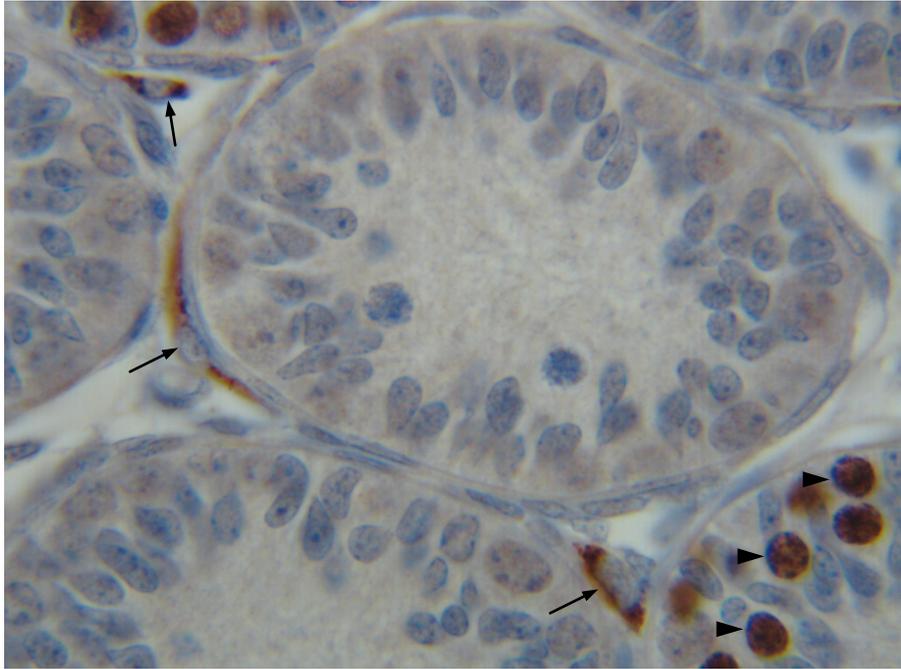


Abb. 4

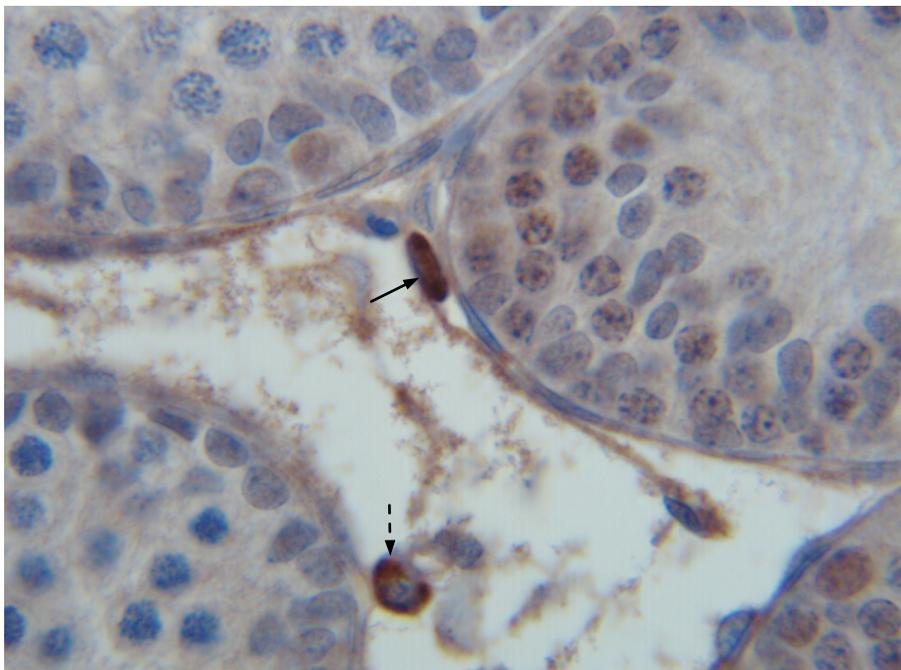


Abb. 5

Abb. 6: Rattenhoden **18. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **P450scc** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). In dieser Abbildung zeigen zwei peritubuläre ALC-Vorläufer (dünne Pfeile) eine immunhistochemische Reaktion. Ein Gefäß (leerer Pfeil) zeigt eine schwache Reaktion in den glatten Muskelzellen.  
1:1000

Abb. 7: Rattenhoden **20. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **P450scc** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Eine Übersicht in schwacher Vergrößerung. Man erkennt zahlreiche positiv reagierende peritubulären Vorläufer (dünne Pfeile) und einige perivaskuläre Vorläufer der ALC (gestrichelte Pfeile). 1:400

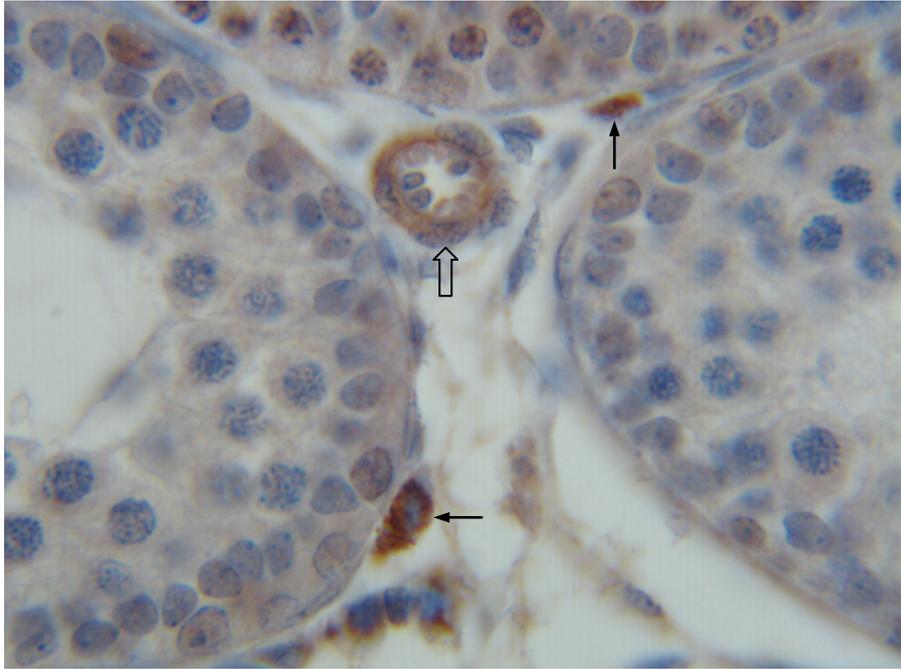


Abb. 6

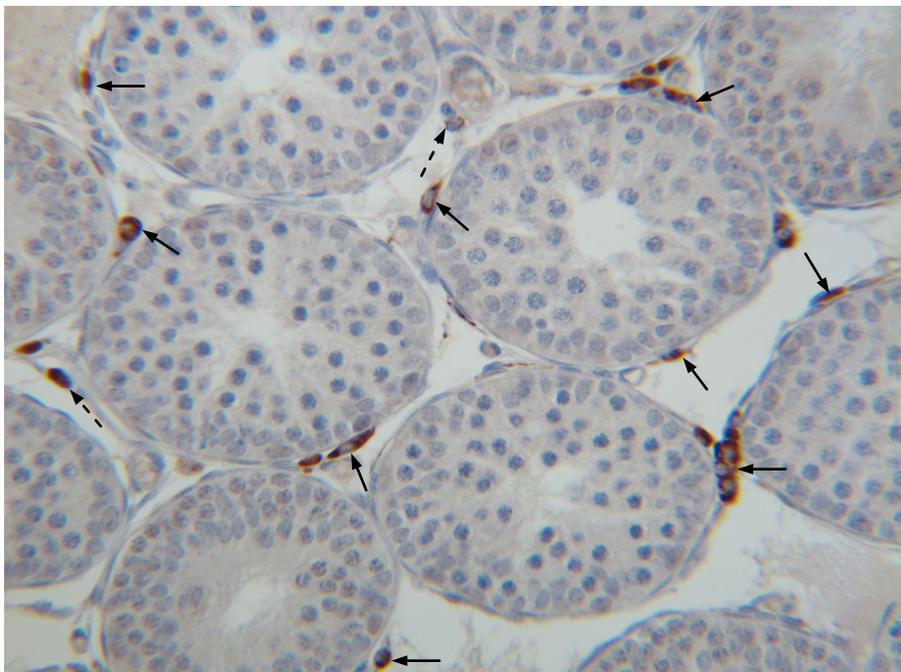


Abb. 7

Abb. 8 : P450scc

Contribution to formation of precursors of adult Leydig cells (pALC in percentage)

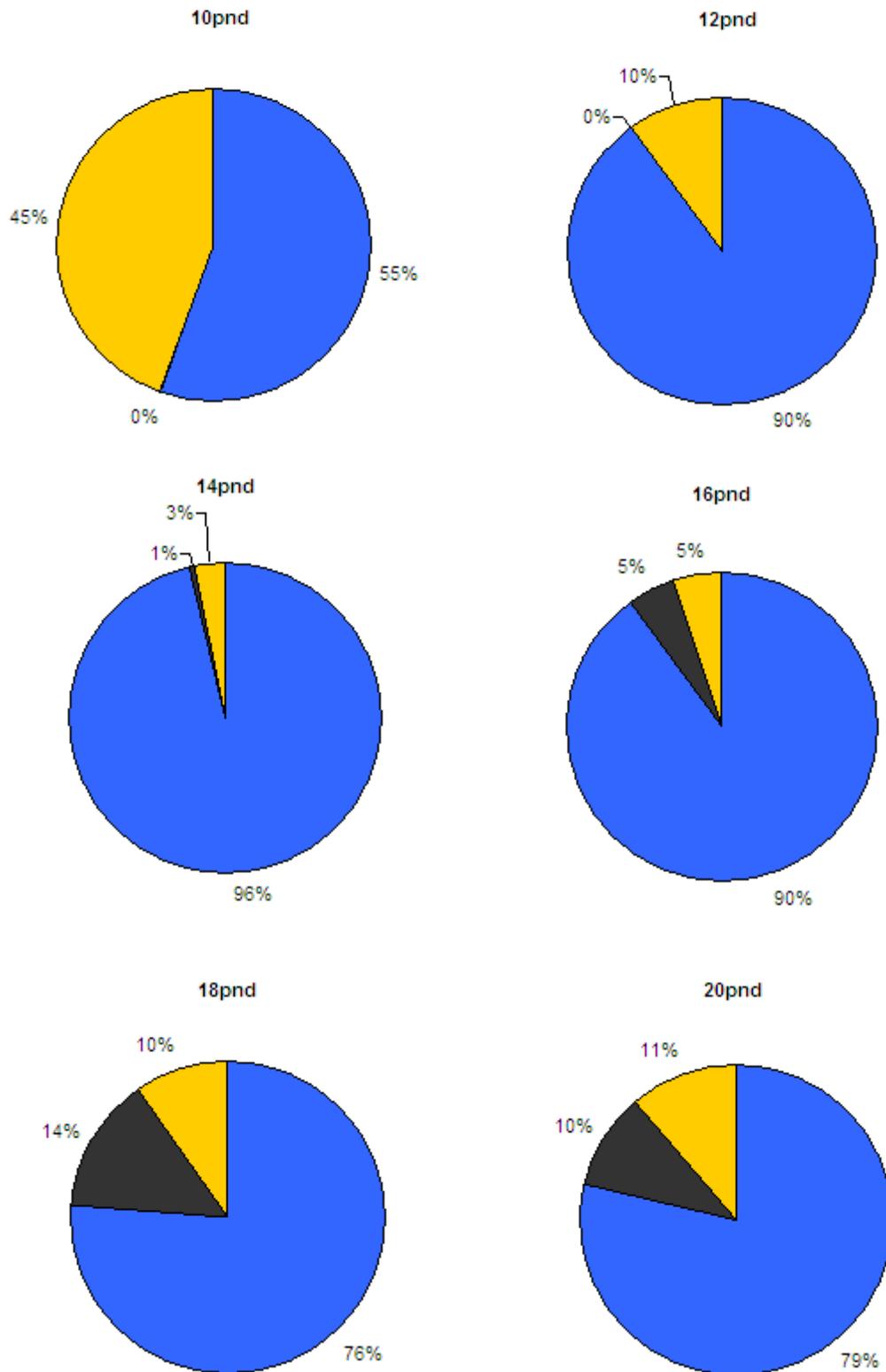
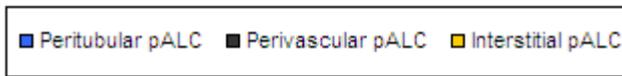
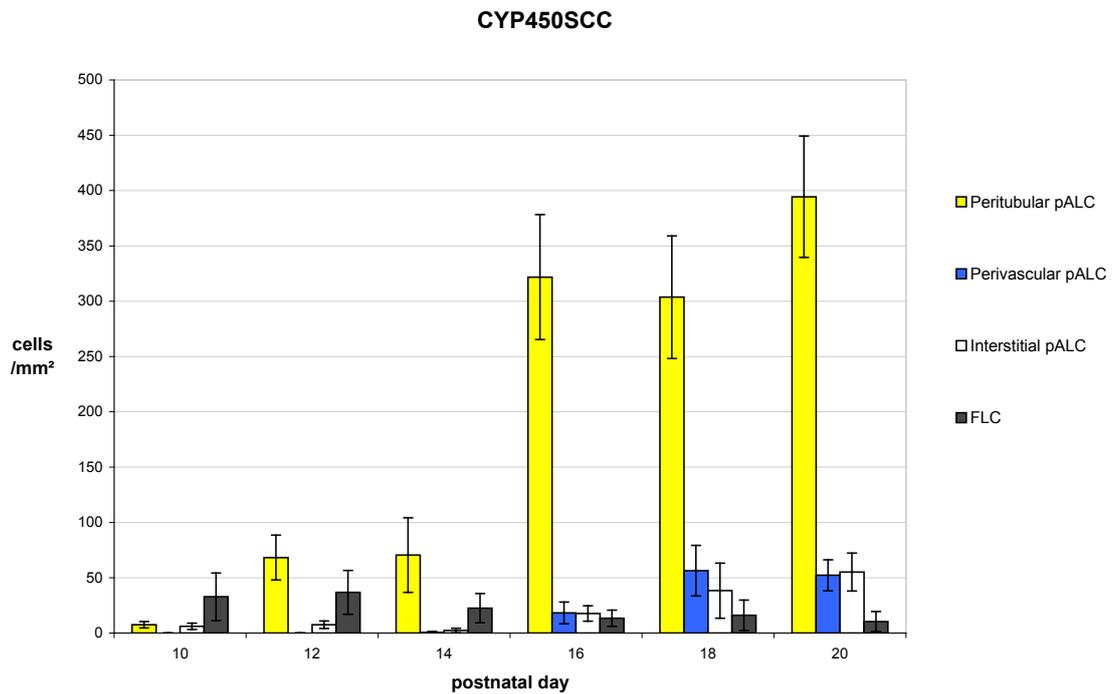


Abb. 8

pALC: Vorläufer (precursors) der adulten Leydig- Zellen.

Quantifizierung der Immunreaktion von **P450sc**. Dargestellt sind Kreisdiagramme vom 10., 12., 14., 16., 18. und 20. Postnataltag. Sie demonstrieren den prozentualen Anteil der peritubulären, den perivaskulären und den interstitiellen ALC- Vorläufern in der gesamten Population von einzelner Altersgruppe. Sie präsentieren auch einen Vergleich zwischen verschiedenen Altersgruppen. Die perivaskulären ALC- Vorläufer fehlen am 10. und 12. pnd, erst ab dem 14. pnd steigt ihr Anteil allmählich an. Die Daten belegen, dass die peritubulären Fibroblasten die größte Quelle der Vorläufer der ALC darstellen.

Abb. 9:



pALC : Vorläufer (precursors) der adulten Leydig - Zellen

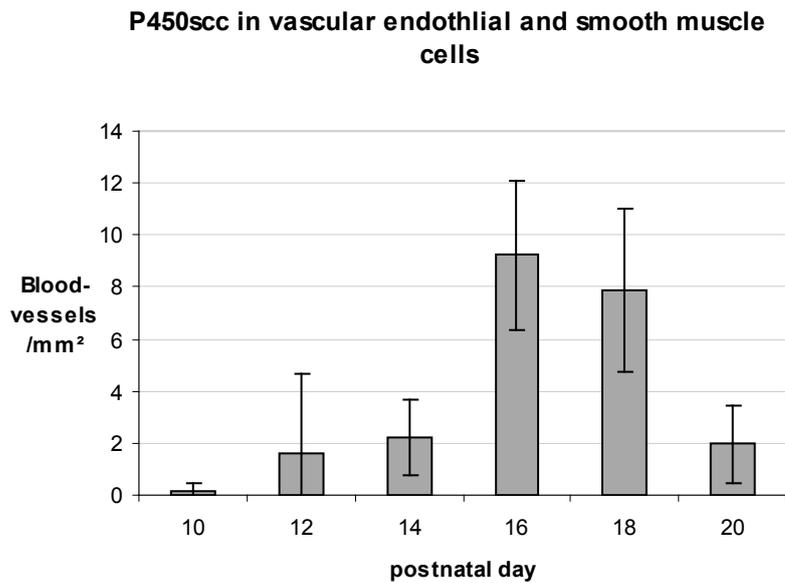
FLC : fetale Leydig – Zellen

Quantifizierung der Immunreaktion von **P450scC**. Diese Grafik präsentiert die Absolute Anzahl der markierten ALC- Vorläufer pro Quadratmillimeter (Mittelwert +/- Standardabweichung). Mann erkennt hier eine Zunahme der Anzahl von den peritubulären, perivaskulären und interstitiellen ALC- Vorläufer mit dem Alter, während die Anzahl der FLC abnimmt.

Abszisse: Alter der Tiere (Postnataltag)

Ordinate: Anzahl der mit **P450scC** – markierten Zellen pro Quadratmillimeter

Abb. 10 :



Quantifizierung der mit Immunreaktion von **P450scc** markierten Blutkapillaren und Blutgefäße im Interstitium. Die Immunreaktion befand sich in den vaskulären Endothelzellen, sowie in den glatten Muskelzellen. Mit steigendem Alter der Tiere erkennt man zuerst eine Zunahme der Anzahl der Blutgefäße, dann eine Abnahme.

Abszisse: Alter der Tiere (Postnaltag)

Ordinate: Anzahl der mit **P450scc** – markierten Blutkapillaren und Blutgefäße

Abb. 11: Rattenhoden **10. Postnaltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **Luteinizing- Hormonrezeptor (LHR)** (grau bis braun) mit Kerngegenfärbung (blau durch Hämalaun). Einige peritubuläre fibroblastenähnliche Vorläufer der ALC (dünne Pfeile) , ein perivaskulärer ALC-Vorläufer (gestrichelter Pfeil), ein Cluster (dicker Pfeil) mit zwei FLC und drei Kapillaren (leere Pfeile) reagieren hier positiv. 1: 1000

Abb. 12: Rattenhoden **10. Postnaltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **LHR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Die FLC in einem Cluster (dicker Pfeil) zeigen unterschiedlich starke Reaktionen. Eine Kapillare (leerer Pfeil) und ein peritubulärer ALC-Vorläufer (dünne Pfeile) weisen auch positive Reaktionen auf. 1: 1000

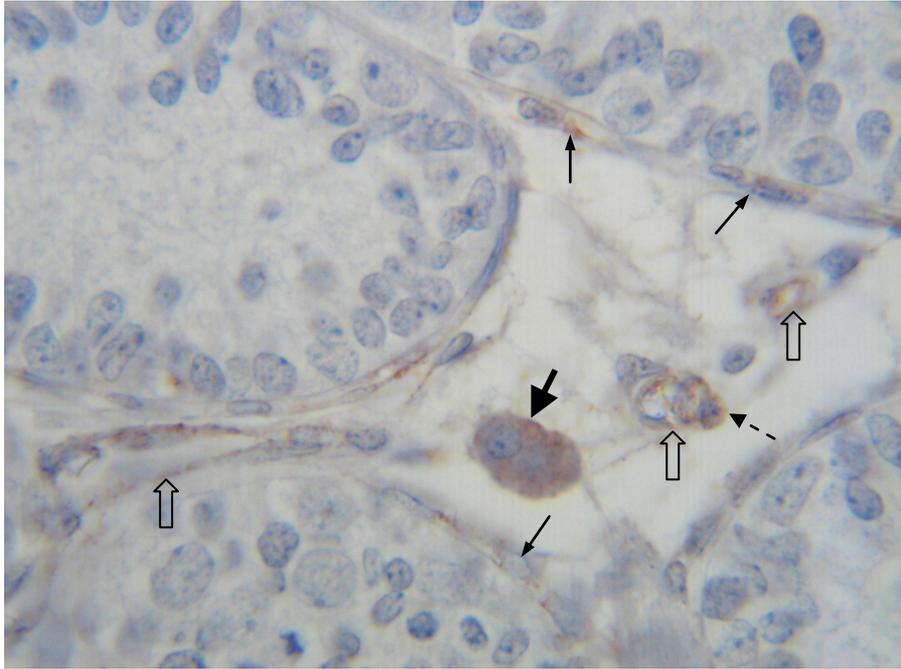


Abb. 11

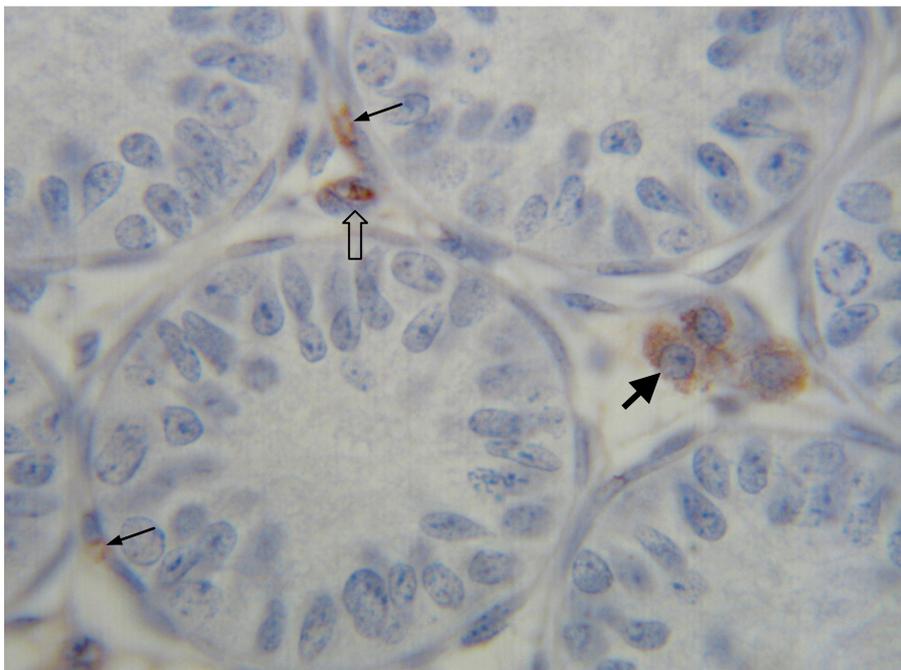


Abb. 12

Abb. 13: Rattenhoden **12. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **LHR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Die unterschiedlich starken zytoplasmatischen Reaktionen sind in einigen peritubulären Vorläufern der ALC (dünne Pfeile) und in der FLC- Cluster (dicker Pfeil) zu beobachten. Zwei Gefäßen (leere Pfeile) zeigen eine intensive Reaktion. 1: 1000

Abb. 14: Rattenhoden **12. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **LHR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Einige FLC (dicker Pfeil) in einem Cluster, einige peritubuläre Vorläufer der ALC (dünne Pfeile) und ein Blutgefäß (leerer Pfeil) weisen hier positive Reaktion auf. 1: 1000

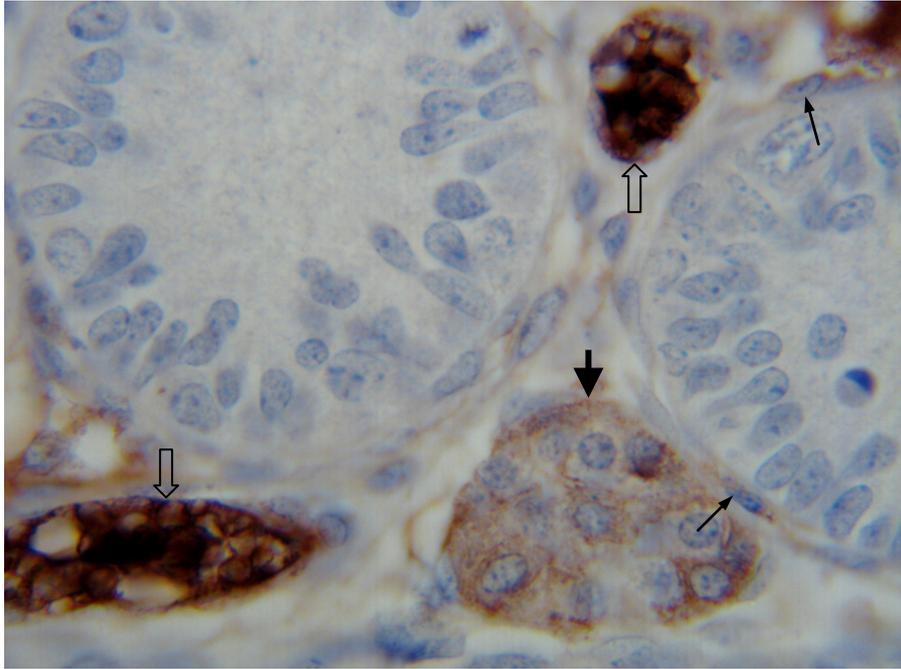


Abb. 13

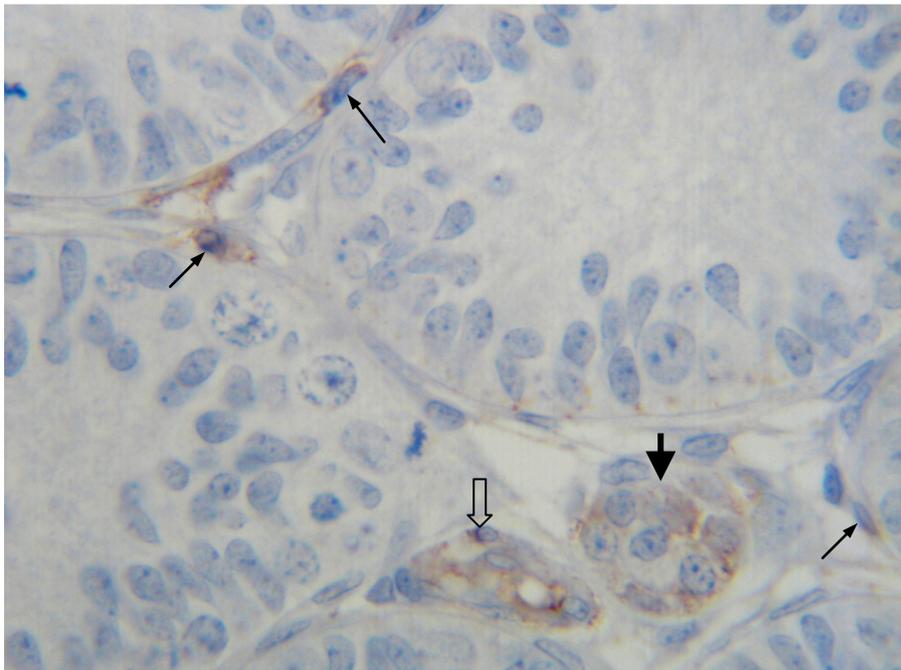


Abb. 14

Abb.15: Rattenhoden **12. Postnataltag**, Paraffinschnitt. **Negativkontrolle**, hier wurde der Primär- Antikörper im Inkubationsmedium durch die Pufferlösung ersetzt. Die Produkte der Immunreaktion fehlen vollständig in allen Zellen sowie in den Gefäßen. Dieses Bild der Negativkontrolle ist repräsentativ für alle drei Immunreaktionen (**P450sc**, **LHR**, **AR**), da die angewandten Methoden – abgesehen von jeweilige Primärantikörper völlig identisch waren. 1: 1000  
Peritubuläre Vorläufer der ALC (dünne Pfeile), FLC Cluster (dicker Pfeil), Gefäß (leerer Pfeil)

Abb. 16: Rattenhoden **14. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **LHR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Es sind zahlreiche positiv reagierende peritubuläre Vorläufer der ALC (dünne Pfeile) zu beobachten. 1: 400

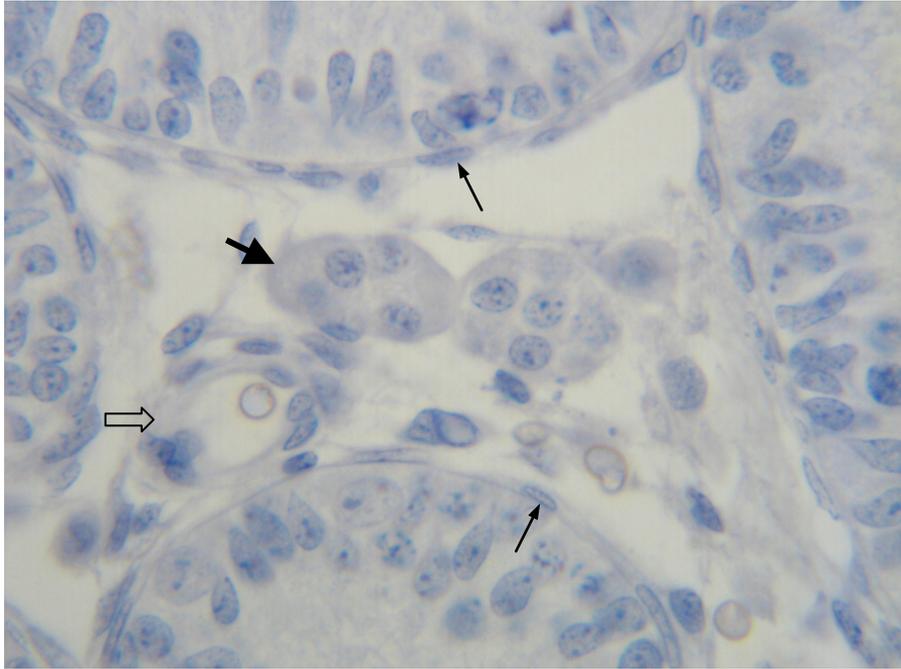


Abb. 15

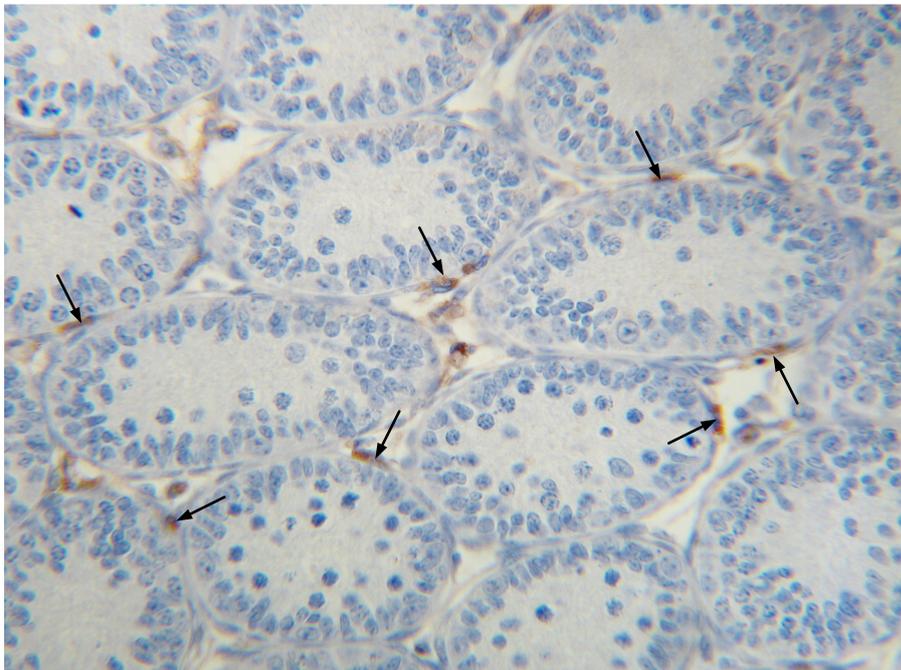


Abb. 16

Abb. 17: Rattenhoden **14. Postnaltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **LHR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Die FLC (dicker Pfeil) im Cluster weisen unterschiedlich starke Reaktionen auf. Einige peritubuläre ALC-Vorläufer (dünne Pfeile) reagieren auch positiv. Die Färbungen (Stern) in den Tubuli sind unspezifisch. 1: 1000

Abb. 18: Rattenhoden **14. Postnaltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **LHR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Eine intensive braune Reaktion ist in einigen peritubulären Vorläufer der ALC (dünne Pfeile) und in zwei Gefäßen (leere Pfeile) zu beobachten. 1: 1000

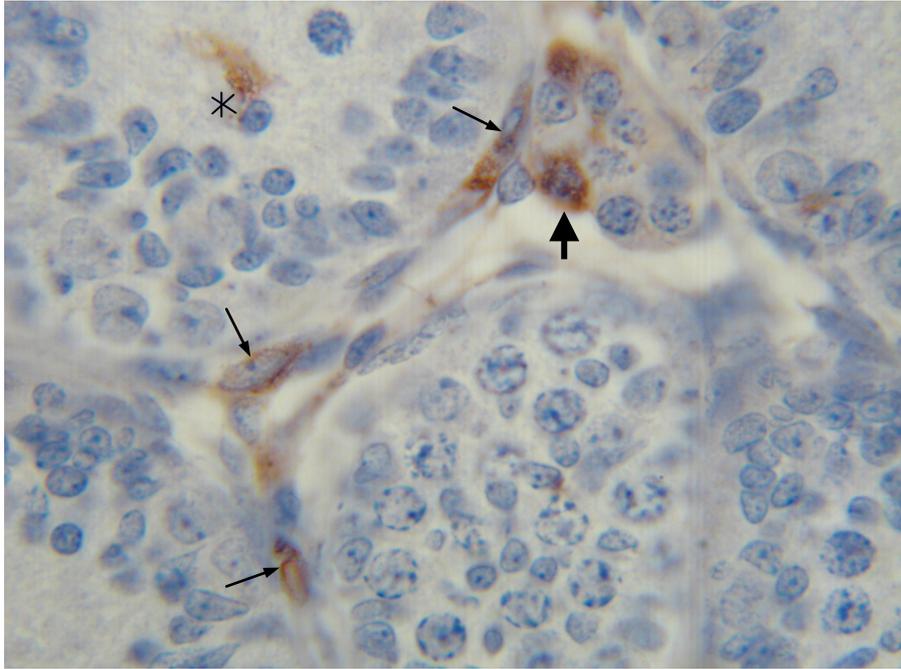


Abb. 17

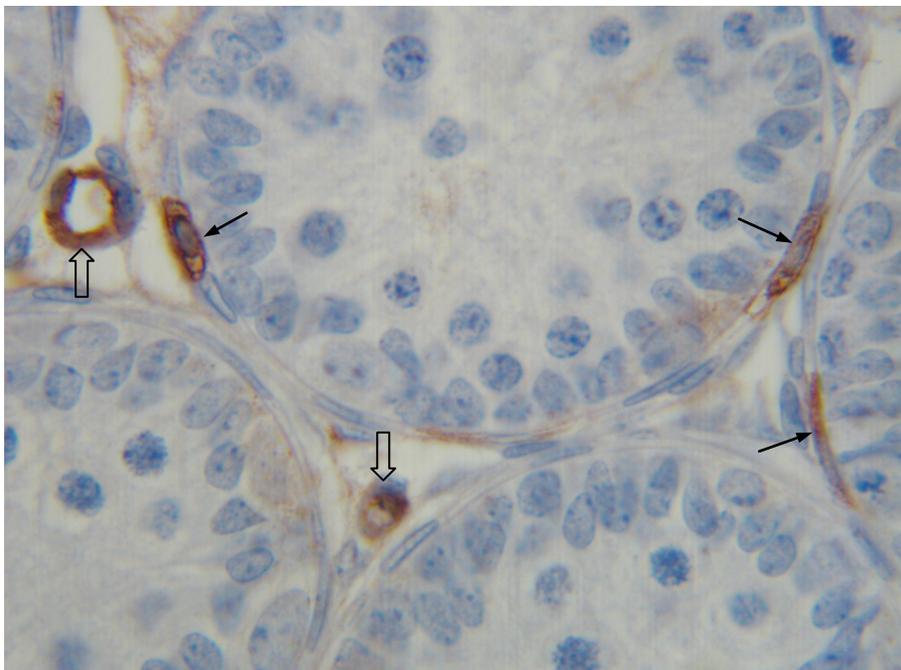


Abb. 18

Abb. 19: Rattenhoden **16. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **LHR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Vier peritubuläre Vorläufer der ALC (dünne Pfeile) und eine Kapillare (leerer Pfeil) weisen positive Reaktionen auf. 1: 1000

Abb. 20: Rattenhoden **18. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **LHR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Einige peritubuläre Vorläufer der ALC (dünne Pfeile) und die FLC (dicker Pfeil) im Cluster zeigen unterschiedlich starke Reaktionen. Eine Kapillare (leerer Pfeil) reagiert auch positiv. 1: 1000



Abb. 19

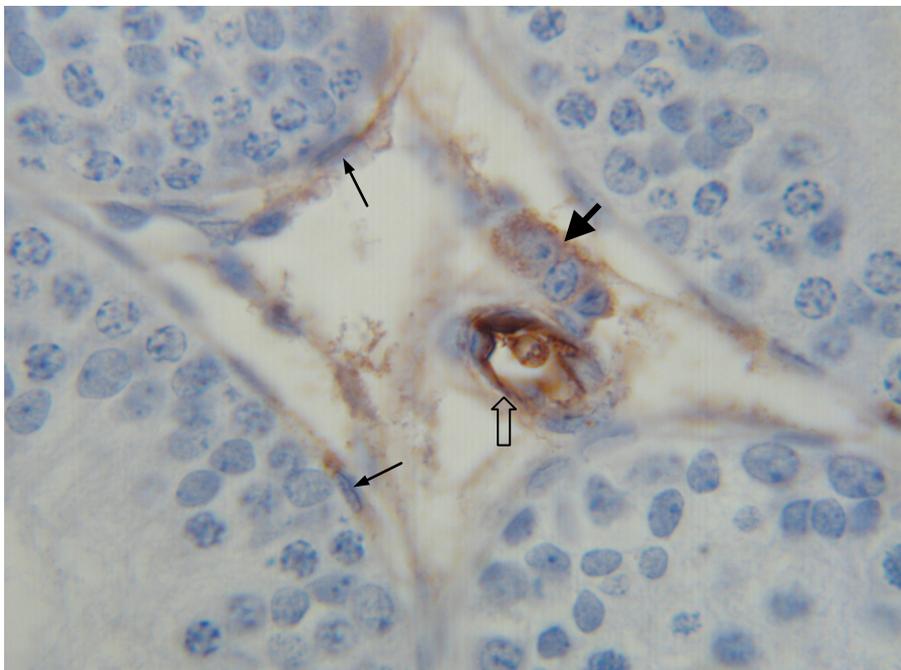


Abb. 20

Abb. 21: Rattenhoden **20. Postnaltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **LHR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Man erkennt hier ein länglich geschnittenes Gefäß (leere Pfeile) mit zwei ALC-Vorläufern (gestrichelte Pfeile), die unterschiedlich starke Reaktionen zeigen. Einige peritubuläre fibroblastenähnliche Vorläufer der ALC (dünne Pfeile) reagieren ebenfalls positiv. 1: 1000

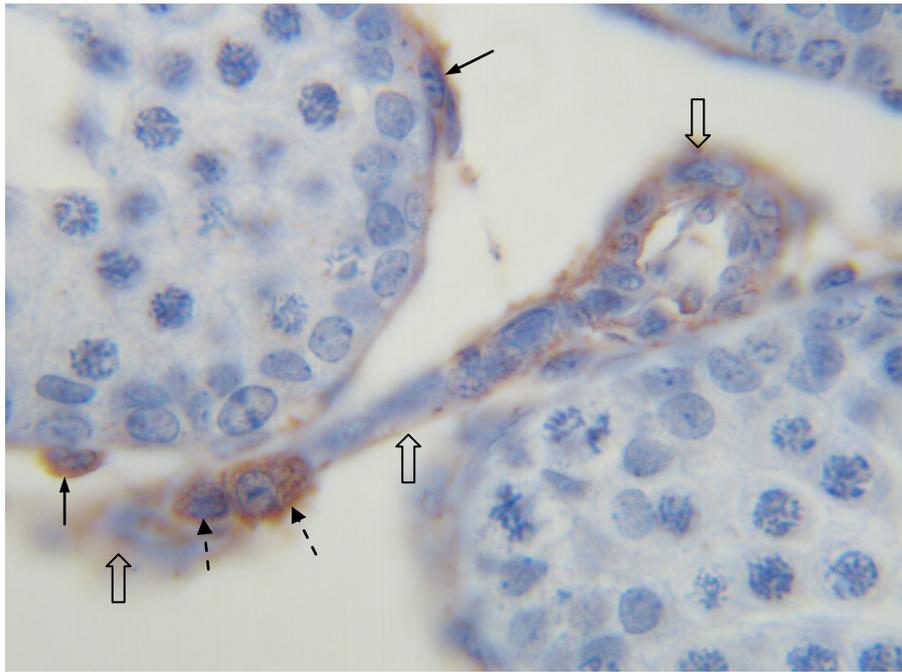


Abb. 21

Abb. 22: LH -- Rezeptor

Contribution to formation of precursors of adult Leydig cells (pALC in percentage)

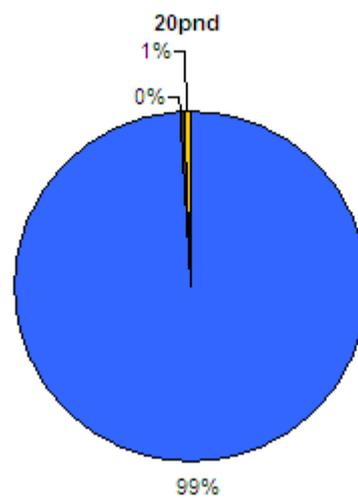
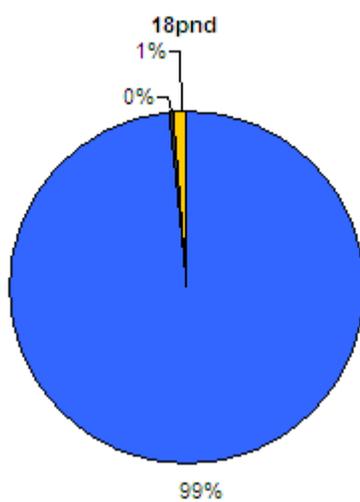
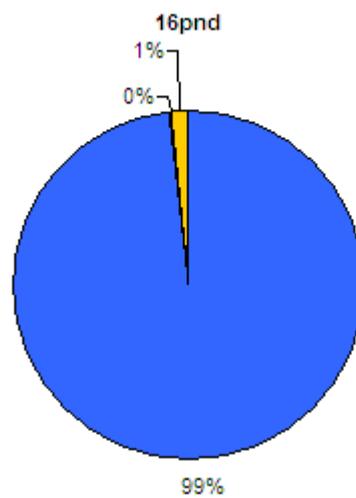
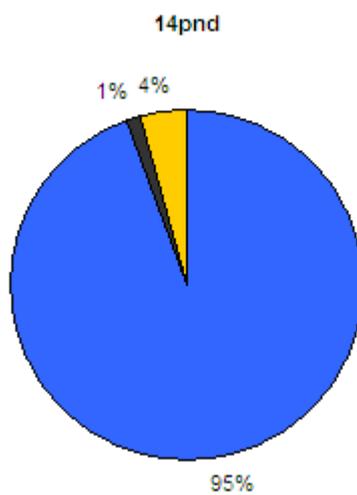
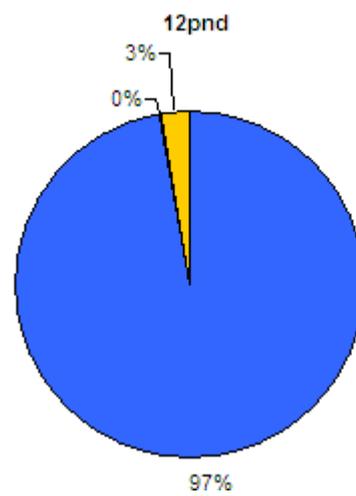
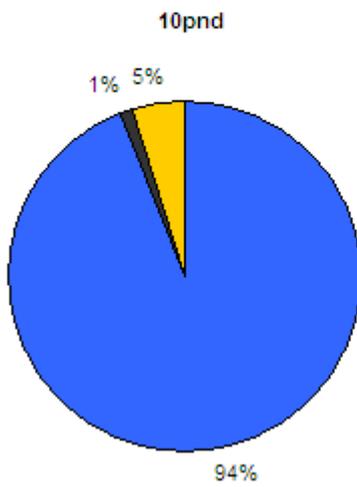
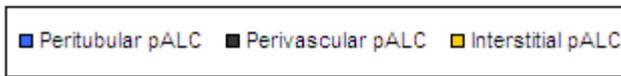
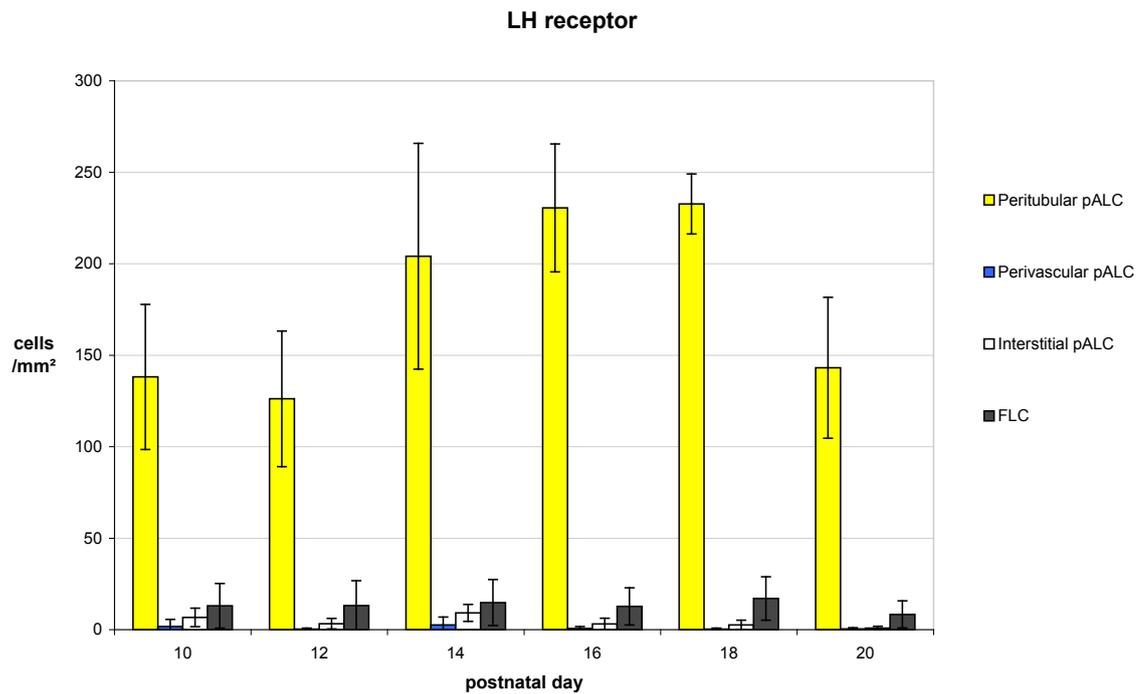


Abb. 22 :

pALC : Vorläufer (precursors) der adulten Leydig – Zellen

Quantifizierung der Immunreaktion von **LH - Rezeptor**. Dargestellt sind Kreisdiagramme vom 10., 12., 14., 16., 18. und 20. Postnataltag. Sie demonstrieren den prozentualen Anteil der peritubulären, den perivaskulären und den interstitiellen ALC-Vorläufern in der gesamten Population von einzelner Altersgruppe. Sie präsentieren auch einen Vergleich zwischen verschiedenen Altersgruppen. Unabhängig vom Alter besitzen die peritubulären ALC- Vorläufer den größten prozentualen Anteil (mehr als 94%). Der Anteil von den perivaskulären ALC- Vorläufer fehlt in den Altersgruppen von 12., 16., 18., 20. pnd. Auch im 10. und 14. pnd ist der Anteil jeweils nur 1 %.

Abb. 23 :



pALC : Vorläufer (precursors) der adulten Leydig - Zellen

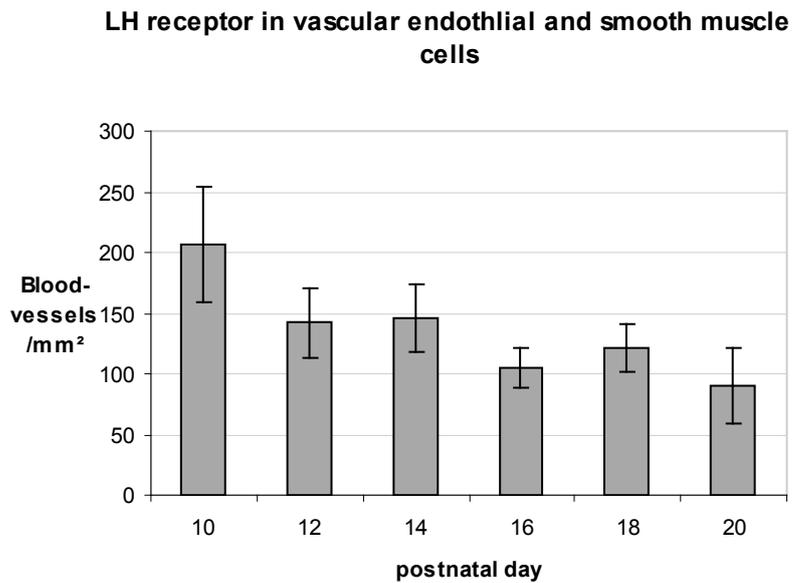
FLC : fetale Leydig – Zellen

Quantifizierung der Immunreaktion von **LH - Rezeptor**. Diese Grafik präsentiert die absolute Anzahl der markierten ALC- Vorläufer pro Quadratmillimeter (Mittelwert +/- Standardabweichung). Man erkennt hier eine Zunahme der Anzahl von peritubulären ALC- Vorläufern zwischen dem 12. und dem 18. pnd. Am 20. pnd kommt zu einer deutlichen Abnahme. Die Anzahl der anderen ALC- Vorläufern bleibt weitgehend unverändert.

Abszisse: Alter der Tiere (Postnataltag)

Ordinate: Anzahl der mit **LH - Rezeptor** – markierten Zellen pro Quadratmillimeter

Abb. 24 :



Quantifizierung der mit Immunreaktion von **LH- Rezeptor** markierten Blutkapillaren und Blutgefäße im Interstitium. Die Immunreaktion befand sich in den vaskulären Endothelzellen, sowie in den glatten Muskelzellen. Man erkennt hier eine Abnahme der Anzahl der Gefäße mit der Zunahme des Alters.

Abszisse: Alter der Tiere (Postnaltag)

Ordinate: Anzahl der mit **LH – Rezeptor** – markierten Blutkapillaren und Blutgefäße

Abb. 25: Rattenhoden **10. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **Androgen-Rezeptor (AR)** (grau bis braun) mit Kerngegenfärbung (blau durch Hämalaun). Die Abbildung zeigt AR- Expression in den Nuklei von Sertolizellen (Pfeilköpfe), peritubulären Myoidzellen (kleinere Pfeile), teilweise auch in den Nuklei von peritubulären Fibroblasten (dünne Pfeile), perivaskulären Fibroblasten (gestrichelte Pfeile), FLC (dicke Pfeile), ALC. 1:400

Abb. 26: Rattenhoden **12. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **AR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Das immunhistochemische Muster ist ähnlich wie am 10. Postnataltag (s. Abb. 12). 1:400

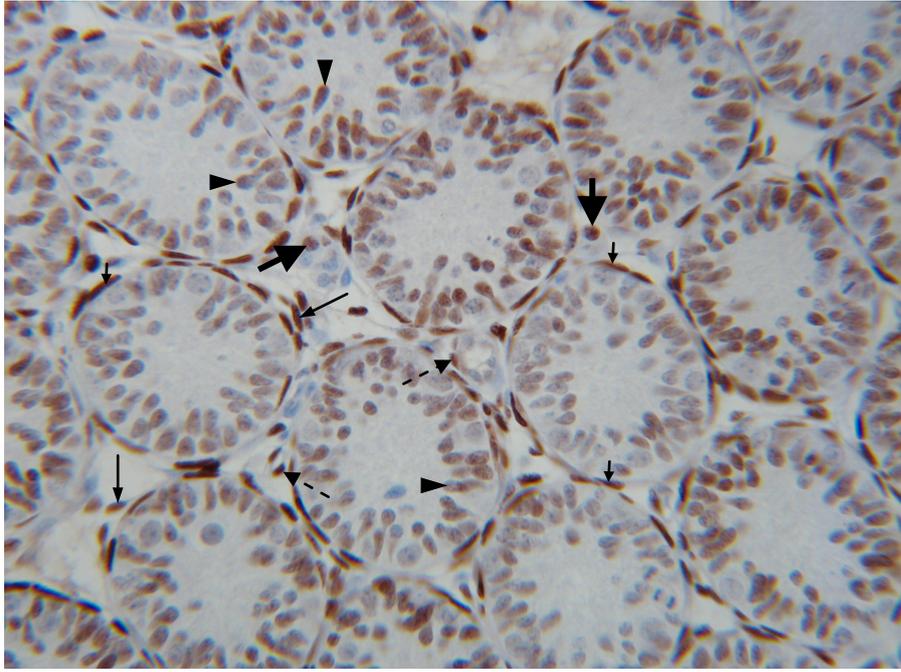


Abb. 25

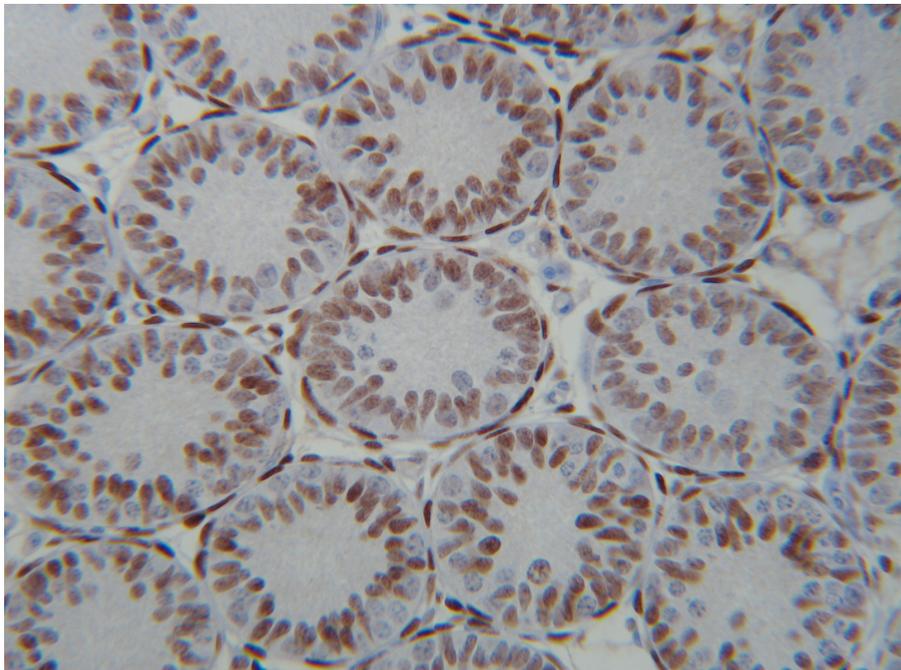


Abb. 26

Abb. 27: Rattenhoden **14. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **AR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Das immunhistochemische Muster ist ähnlich wie am 10. Postnataltag (s. Abb. 12). 1:400

Abb. 28: Rattenhoden **16. Postnataltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **AR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Die Immunreaktion befindet sich im Kern der Sertolizellen (Pfeilköpfe), der Myoidzellen (kleine Pfeile) sowie in einigen adulten Leydigzellen (große Pfeile). 1:400

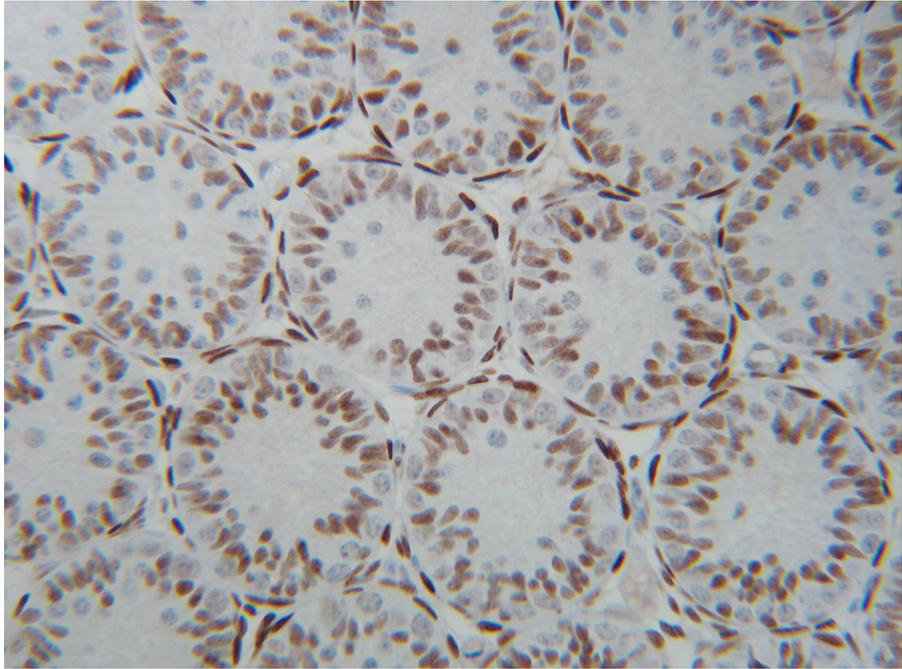


Abb. 27

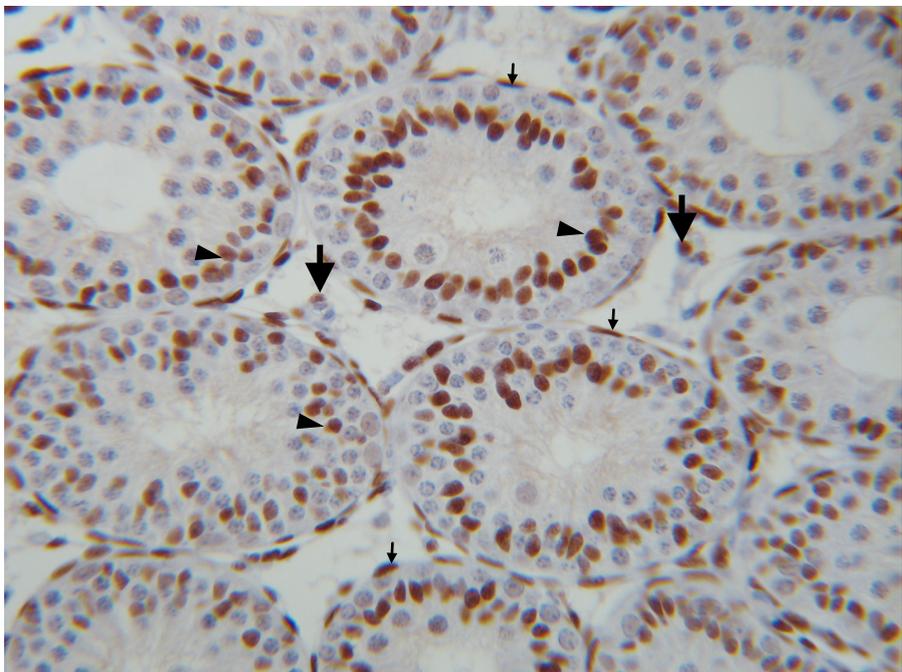


Abb. 28

Abb. 29: Rattenhoden **18. Postnaltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **AR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Eine deutliche Immunreaktion findet sich im Kern der Sertolizellen (Pfeilköpfe), Myoidzellen (kleine Pfeile) sowie in den peritubulären Fibroblasten (dünne Pfeile). 1:400

Abb. 30: Rattenhoden **20. Postnaltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **AR** ohne Kerngegenfärbung (Hämalaun). Man erkennt AR- Expression in den Nuklei von Sertolizellen (Pfeilkopf), Myoidzellen (kleinerer Pfeil), peritubulären Fibroblasten (dünner Pfeil), perivaskulären Fibroblasten (gestrichelter Pfeil), ALC (dicker Pfeil). 1:400

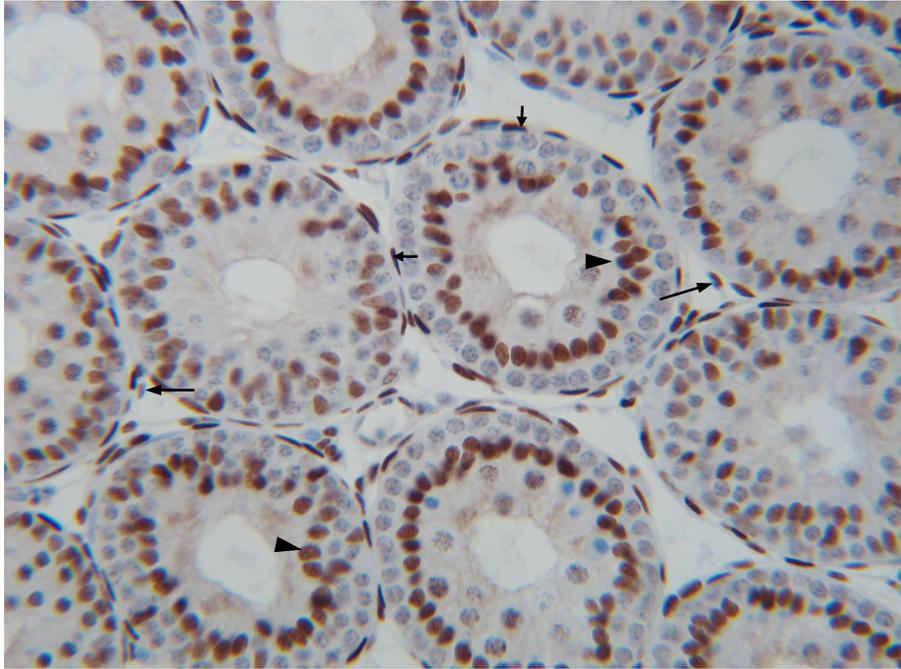


Abb. 29

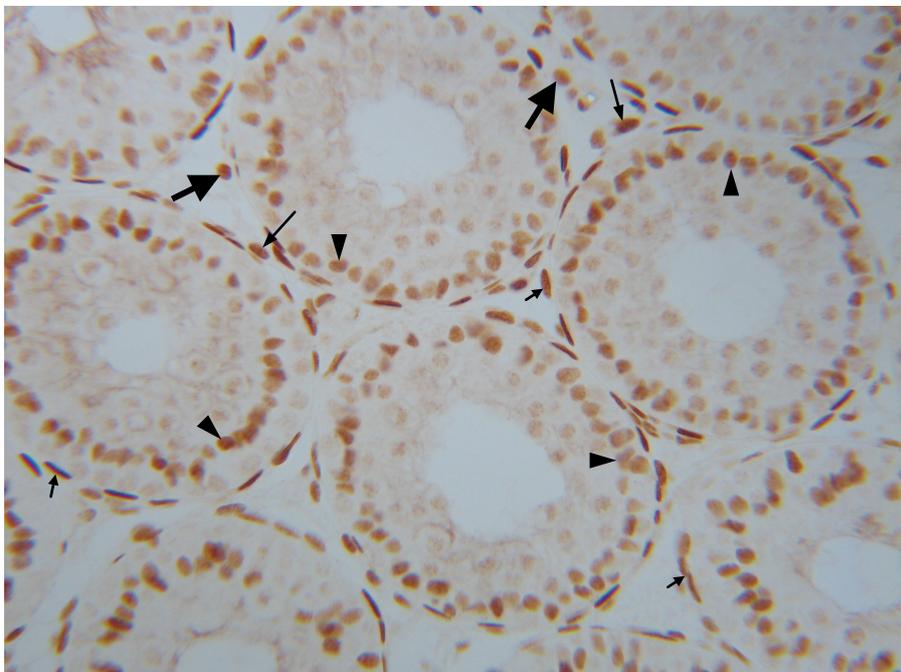


Abb. 30

Abb. 31: Rattenhoden **20. Postnaltag**, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von **AR** mit Kerngegenfärbung (Hämalaun). Man beobachtet hier eine deutliche Immunreaktion im Kern der Sertolizellen (Pfeilköpfe) der Myoidzellen (kleinere Pfeile) in der Lamina propria, in den Glattenmuskelzellen (leere Pfeile) im Gefäß, in den Perizyten (gestrichelter Pfeil) in einer FLC (dicker Pfeil), sowie in den Fibroblasten (dünner Pfeil) um eine FLC- Cluster. 1:1000

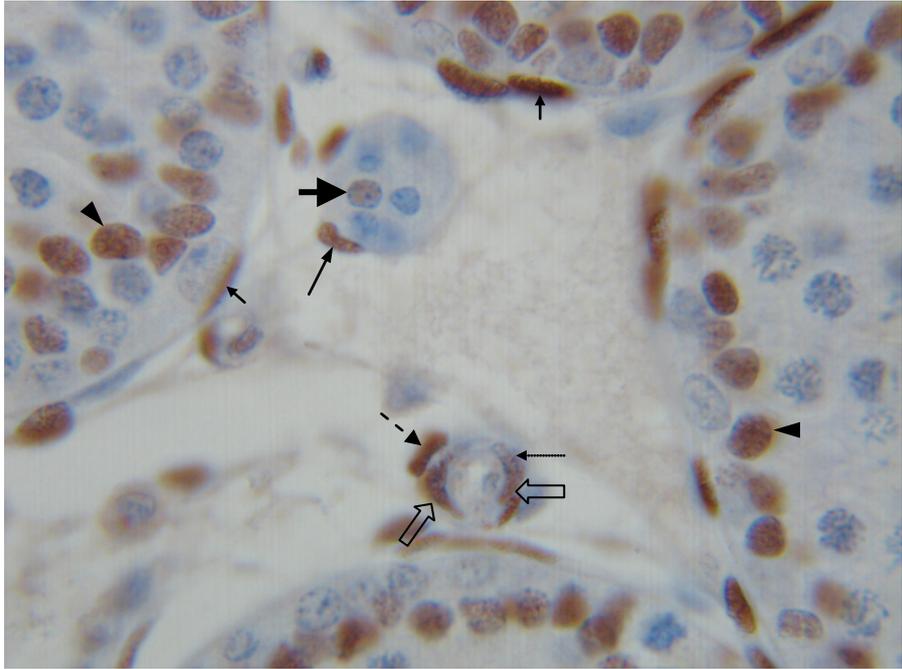


Abb. 31

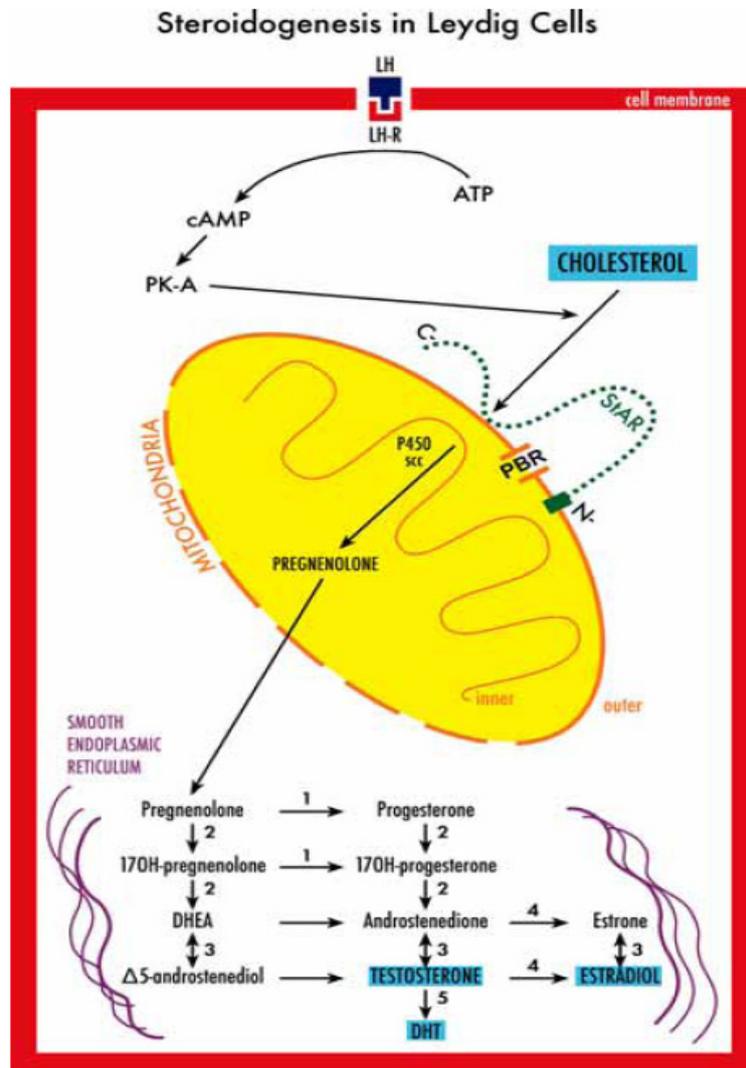
## 4. Diskussion

Die Hauptaufgabe im Rahmen dieser Dissertation war es, anhand immunhistochemischer Methoden Vorläufer von ALC zu identifizieren und zu quantifizieren. Dabei wurden drei Antikörper verwendet: **LHR**-Antikörper, **P450scc**-Antikörper, **AR**-Antikörper. Die Begründung für die Auswahl der Antikörper wurde im Kapitel „Einleitung“ erläutert.

Abbildung 32 - eine Reproduktion aus der Publikation von Haider, 2004 - stellt in vereinfachter Weise die wichtigen Schritte der Steroidogenese in den Leydig-Zellen dar. Die Bindung des luteinisierenden Hormons (LH) an seinen Rezeptor (LHR) induziert die Synthese von cAMP aus ATP. Das cAMP katalysiert die Aktivierung von Proteinkinase A (PK-A), welche für den Transport von Cholesterol aus dem zytoplasmatischen Pool zu den Mitochondrien benötigt wird. Das Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) und der Periphere Benzodiazepin Rezeptor (PBR) transportieren Cholesterol von der äußeren zur inneren mitochondrialen Membran, wo das Enzym P450scc lokalisiert ist. Dabei ist das N-terminale Ende von StAR verbunden mit den mitochondrialen Importmechanismen an der äußeren mitochondrialen Membran. Der PBR Protein funktioniert wahrscheinlich als ein Kanal für Cholesterol. P450scc wandelt Cholesterol in Pregnenolon um, welches zum glatten Endoplasmatischen Retikulum transportiert wird, wo die Androgensynthese stattfindet.

Viele Studien über die LHR und steroidogene Enzyme in den postnatalen Rattenhoden wurden schon veröffentlicht. Die Meinungen über den ersten Tag, wann die Vorläuferzellen der ALC ihr steroidogenetischen Potential gewinnen, sind unterschiedlich: z. B. 13. pnd bei Haider et al. (1995) und 10. pnd bei Ariyaratne et al. (2000a). Die vorliegende Studie zeigte, dass bereits am 10. pnd spindelförmige Zellen vorhanden sind, die P450scc und LHR

Abb.32



**Abbildung 32.** Vereinfachte Darstellung der wichtigen Stufen der Steroidogenese in Leydig-Zellen.

Schema aus: Haider, 2004

LH = Luteinisierendes Hormon, LH-R = Rezeptor für das Luteinisierende Hormon,

ATP = Adenosin-triphosphat, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat,

PK-A = Protein Kinase A,

StAR = Steroidogenic Acute Regulatory Protein,

PBR = Peripheral Benzodiazepin Rezeptor,

P450<sub>sc</sub> = P450 side chain cleavage,

DHEA = Dehydroepiandrosteron,

DHT = Dihydrotestosteron;

1 = 3 $\beta$  - Hydroxysteroid Dehydrogenase, 2 = Cytochrom P 450 17  $\alpha$ - Hydroxylase,

3 = 1  $\beta$  7- Hydroxysteroid Dehydrogenase; 4 = Cytochrom P450 Aromatase,

5 = 5  $\alpha$  - Reduktase

besitzen (Abb. 2, 8, 9, 11, 22, 23). Da wir keine jüngeren Tiergruppen als 10. pnd benutzt haben, können wir hier nicht zu dem Schluss kommen, dass der 10. pnd der erste Tag für die Vorläuferzellen ist. Ariyaratne et al. (2000b) berichtete, dass die ALC-Vorläufer zuerst Immunoreaktionen auf  $3\beta$ -HSD, P450<sub>scc</sub> und P450<sub>C17</sub> präsentieren (am 11. pnd), erst einen Tag danach (d. h. am 12. pnd) auch LHR-Aktivität zeigen. Darauf basierend kommen sie zu dem Schluss, dass das LH nicht für den Beginn der ALC-Differenzierung verantwortlich ist. Das Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widersprechen den Befunde von Ariyatatne et al. (2000b). Es wurden am 10. pnd mehr LHR- positive peritubuläre Fibroblasten (140 Zellen/mm<sup>2</sup>) als P450<sub>scc</sub>- positive peritubuläre Fibroblasten (40 Zellen/mm<sup>2</sup>) beobachtet (Abb. 9, 23).

Die vorliegenden Untersuchung mit dem P450<sub>scc</sub>- Antikörper zeigten, dass bereits am 10. pnd peritubuläre spindelförmige Zellen sichtbar sind. Ihre Anzahl nimmt ständig zu. Besonders zwischen dem 14. und dem 16. pnd ist ihr Wachstum am schnellsten. Der prozentuale Anteil von peritubulären Fibroblasten ist in jeder Altersgruppe am größten. Die perivaskulären Fibroblasten fehlen am 10. und 12. pnd. Sie sind erst ab dem 14. pnd zu sehen. Ihr prozentuale Anteil nimmt zu, bis am 18. pnd das Maximum erreicht ist. Dies führt zu folgender Schlussfolgerung: Die peritubulären Fibroblasten sind der Hauptbestandteil der ALC-Vorläufer. Sie spielen besonders am Anfang der Entstehung der ALC eine Hauptrolle. Die perivaskulären Fibroblasten beteiligen sich auch an der Entstehung der ALC, sind aber vom Anteil her weniger als die peritubulären Fibroblasten, und ihre Rolle tritt erst verzögert auf. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung von Haider und Servos (1998) überein. Sie berichteten, dass die peritubulären und perivaskulären spindelförmigen Zellen zuerst typische Strukturen von einem Fibroblast zeigen. Jedoch, ab dem 13. pnd bekommen diese Zellen mehr und mehr charakteristischen Strukturen für Steroidsynthese, und zwar glattes Endoplasmatisches Retikulum, tubulovesiculäre Mitochondrien und Lipidtropfen.

Anderes als in dieser Studie berichteten Ariyaratne et al. (2000a und 2000b), dass ALC lediglich von den peritubulären Fibroblasten abstammen. Sie verwendeten ebenfalls die Antikörper für ihre immunhistochemischen Reaktionen. Davidoff et al. (2004) berichteten, dass die vaskulären glatten Muskelzellen und die Perizyten die Vorläufer der ALC sind. Basiert auf dem neuroendokrinen Charakter der LC verwendeten sie Nestin, ein intermediäres Filament, und P450<sup>scc</sup> als Marker. Die Untersuchungen wurden an mit EDS behandelten adulten Ratten durchgeführt. Die P450<sup>scc</sup> Aktivität verschwindet vollständig nach der Behandlung, und kommt an dem 14. Tag wieder vor. Die Aktivität von Nestin ist am siebten Tag nach der Behandlung am stärksten, dann nimmt die Intensität ab. Während der Behandlung waren es die glatten Muskelzellen und die Perizyten, die Nestin exprimieren und enorme Zellteilungsaktivität zeigen. Nach Davidoff et al. (2004) ragen die glatten Muskelzellen und die Perizyten von der Gefäßwand hervor, bilden „LC-Cluster“, wandeln sich schließlich in die ALC. Davidoff et al. (2004) übertrugen diese Ergebnisse auf die Postnatalentwicklung von ALC in Rattenhoden, und entdeckten die „LC-Cluster“ an Blutgefäßen während der Reifung (am pnd 27). Ab dem 14. pnd sind auch in dieser Arbeit P450-positive Zellen perivaskulär zu sehen. Sie sind flachoval bis halbkugelförmig. Gelegentlich sind auch kleine Anhäufungen von ihnen zu sehen, die den „LC-Cluster“ an der Gefäßwand entsprechen (Davidoff et al. 2004). Über die Nestin- und P450<sup>scc</sup>-positiven peritubulären Fibroblasten waren Davidoff et al. (2004) der Ansicht, dass sie von der peritubulären Gefäßwand abstammen. Diese Erklärung scheint nicht überzeugend zu sein: 1. an den Stellen, an denen positive peritubuläre Zellen zu sehen sind, sind nicht immer auch peritubuläre Gefäße vorhanden. 2. Positive peritubuläre Zellen kommen 2 Postnataltage früher vor als positive perivaskuläre Zellen. Davidoff et al. (2004) übertrugen ein experimentelles Modell auf die normale Entwicklung. Die Aussagekraft ist daher eingeschränkt.

Die Funktion der Gefäße bei der Entstehung und Differenzierung der LC ist nach wie vor ein umstrittenes Thema. In der vorliegenden Studie kann man sehen, dass sowohl bei der Untersuchung mit P450scc, als auch bei der Untersuchung mit LHR die Gefäße immunhistochemische Reaktion zeigen. Die Endothelzellen, die glatten Muskelzellen und die Perizyten waren betroffen. Die Reaktionen waren oft so stark, dass die einzelnen Zelltypen nicht immer deutlich zu unterscheiden waren. Eine Quantifizierung war nicht möglich. Daher wurde die Gefäßanzahl statt der Zellanzahl für die Bewertung verwendet (Abb. 10, 24). Die positiven reagierenden Gefäße waren bei der Untersuchung mit P450scc viel seltener als bei der Untersuchung mit LHR (Abb. 10, 24), bei der letzteren waren fast alle interstitiellen Gefäße positiv markiert.

Es wurden zwei Hauptfunktionen der Gefäße in der Literatur häufig diskutiert: 1. als Stammort der Vorläufer der ALC, 2. der parakrine Effekt zwischen den LC und den Gefäßen, vor allem den vaskulären Endothelzellen. Setchell et al. (2003) zeigten, dass die LH-Konzentration in der interstitiellen Flüssigkeit in Hoden nur ca. ein Zehntel der Körperzirkulation betragen. Diese Autoren vermuteten, dass die Endothelzellen den Zutritt der Hormone ins Hodeninterstitium einschränken. Es zeigte sich, dass entweder die LC extrem sensibel auf die LH-Stimulation sind oder die testikulären Endothelzellen die Wirkung der LH auf LC modulieren. Ghinea et al. (1994) beschrieben Rezeptor-vermittelten transendothelialen Transport von LH in die Rattentestis. Sie beobachteten die LH/hCG-Rezeptor nicht nur in den LC, sondern auch in den Endothelzellen. Misrahi et al. (1996) untersuchten den hCG-Transport in die testikulären kleinen Gefäße, und berichteten, dass die LH/hCG-Rezeptoren in den Endothelzellen vorhanden sind und den hormonellen Transport durch die Gefäßendothelien beeinflussen.  $3\beta$ -HSD-Reaktion wurde in den Membranen des SER von einigen vaskulären Endothelzellen elektronenmikroskopisch am 15. pnd im interstitiellen Rattenhodengewebe dargestellt (Haider und Servos, 1998). Diese  $3\beta$ -HSD-positive Endothelzellen sind häufig in der Nachbarschaft von  $3\beta$ -HSD-positiven LC

lokalisiert. Es lässt sich vermuten, dass die LH-Übergabe von der Endothelzelle bis zu benachbarten Leydig-Zellen eine Rolle bei der akuten Regulation der Steroidogenese spielt. Collin und Bergh (1996) berichteten das Vorhandensein des immunoreaktiven vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (irVEGF) in den LC und Makrophagen der Rattenhoden. Sie vermuteten, dass LC die angiogenetischen Faktoren freisetzen und in den Hoden nach hCG Behandlung inflammatorische Mediatoren produzieren. Dies bestätigten die Interaktionen zwischen LC und vaskulären Endothelzellen.

Ähnlich wie vaskuläre Endothelzellen besitzen vaskuläre glatte Muskelzellen viele Enzyme und hormonelle Rezeptoren: LHR (Toth et al, 1994), P450<sub>scc</sub>, AR (Vornberger et al., 1994), Trauine (Lobo et al., 2000), Glukokortikoid- Rezeptor (Schultz et al. 1993), Nitric Oxide Synthase (Li et al. 2002), Nestin (Davidoff et al. 2004). Aber, anders als vaskuläre Endothelzellen wurden die Funktion und die Wirkung von vaskulären glatten Muskelzellen und ihre Wechselwirkungen mit den LC sehr wenig untersucht.

Ge et al. (2006) bewiesen erstmal das Vorhandensein der Stammzellen von ALC, welche noch eine Stufe vor den Vorläufern der LC sind. Sie gewannen Fibroblasten vom interstitiellen Gewebe aus 7. pnd alten Rattenhoden. Die Zellen waren 3 $\beta$ -HSD-negativ, LHR-negativ, und platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ )-positiv, und besitzen verschiedene Proteine, die für die LC-Entwicklung bekannt sind, einschließlich GATA4, c-kit Receptor, und Leukemia inhibitory Factor Receptor. Ge et al. (2006) haben drei Eigenschaften von Stammzellen auch bei diesen Zellen nachgewiesen: 1. Proliferation in vitro, 2. Differenzierung, 3. Kolonisieren und Differenzieren im Interstitium nach der Transplantation in die Hostrattenhoden. Die Stammzellen wurden schon für lange Zeit von vielen Autoren hypothetisiert (Ge et al., 1996; Haider, 2004; Davidoff et al., 2004), aber nie nachgewiesen. Diese Entdeckung von Ge et al. 2006 ist sicherlich beeindruckend und eröffnet eine neue Epoche im Gebiet der Entwicklung der LC.

Bei der Untersuchung mit Androgenrezeptor wurden in der vorliegenden Studie Reaktionen in den Zellkernen von den ALC- Vorläufer sowie von den FLC und von den Fibroblasten um die FLC-Cluster beobachtet (Abb. 31). Ähnliche Ergebnisse wurden noch nicht in der vorhergehenden Literatur beschrieben. Es gibt einige Studien, die zeigten, dass Androgen für die Differenzierung der ALC erforderlich ist (Hardy et al. 1990; O'Shaughnessy et al., 2002). Die Wirkung der Androgene auf FLC sind bisher wenig untersucht. O'Shaughnessy et al. (2002) waren der Ansicht, dass die Differenzierung der FLC androgenunabhängig ist, die Wirkung der Androgene auf die unreifen ALC durch Myoidzellen und Sertolizellen vermittelt wird, nur die reiferen ALC Androgenrezeptoren besitzen. In der vorliegende Studie zeigten sich einige AR-positive Fibroblasten um die FLC-Cluster. Es ist höchstwahrscheinlich, dass sie die ALC-Vorläufer sind. Außerdem zeigte sich eine schwache Reaktion in den Kernen der FLC. Die Bedeutung dieses Befundes kann gegenwärtig nicht ausreichend geklärt werden. Welche Rolle die Androgene bei der Leydig-Zellenentwicklung und –differenzierung spielen, ist noch unklar.

#### Schlussfolgerung:

1. In der vorliegenden Studie sind die Vorläufer von ALC bereits ab dem 10. pnd lichtmikroskopisch sichtbar.
2. Sowohl peritubuläre Fibroblasten als auch perivaskuläre Fibroblasten sind die Vorläufer der ALC. Die peritubulären Fibroblasten sind der Hauptbestandteil der ALC-Vorläufer. Sie spielen besonders am Anfang der Entstehung der ALC eine Hauptrolle. Die perivaskulären Fibroblasten beteiligen sich auch an der Entstehung der ALC mit, sind aber vom Anteil her weniger als die peritubulären Fibroblasten, und ihre Rolle tritt erst verzögert auf.
3. Vaskuläre Endothelzellen, glatte Muskelzellen sowie Perizyten sind auch an der Entstehung der ALC beteiligt. In der vorliegenden Studie zeigten die Gefäßen sowohl

bei der Untersuchung mit P450scc, als auch bei der Untersuchung mit LHR mäßig bis starke immunhistochemische Reaktion. Leider waren eine genauere Differenzierung von einzelnen Zelltypen und deren Quantifizierung nicht möglich. Aus welchen Anteilen die einzelnen Zelltypen in den ALC-Vorläufern bestehen, kann daher nicht beantwortet werden.

4. Die Gefäße haben nur einen kleinen Anteil zum Beitrag der Vorläufer der ALC. Bei der Untersuchung mit P450scc war die Anzahl der positiv reagierenden Gefäßen im Vergleich mit positiv reagierenden Fibroblasten sehr klein. Die starke Reaktion der Gefäße bei der Untersuchung mit LHR kann als ein starker parakriner Effekt zwischen den LC interpretiert werden.

### **Abschließende Bemerkungen**

Die vorliegenden Daten verdeutlichen die mögliche Herkunft der ALC und die engen funktionellen Zusammenhänge zwischen Gefäßen und den ALC. Als Ausblick auf zukünftige Untersuchungen seien hier folgende Anmerkungen erwähnt:

1. Der 10. pnd ist bisher der früheste Tag, an dem die steroidosynthesefähigen Vorläufer-LC zu beobachten sind. Aber es lässt sich nicht ausschließen, dass diese Zellen ein oder zwei Tage früher schon vorkommen. Es wäre sinnvoll, noch jüngere Tiergruppen für Studien zu verwenden (z. B. vom 8. und 9. pnd).
2. Bei der P450scc-Reaktion sind stellenweise intratubuläre Zellen (spermatogenetische Zellen und Sertoli-Zellen) mit unterschiedlicher Intensität angefärbt (Abb. 3, 4, 5, 6). Gleiche Erscheinungen wurden auch von Aryaratne et al. (2000b) beobachtet. Sie berichteten allerdings nur, dass die Sertoli-Zellen P450scc-positiv sind. Okano et al. (2003) untersuchten die Androgensynthese-Fähigkeit der testikulären Zellen der japanischen Schwarzbären. Sie benutzten Antikörper gegen P450scc, 3 $\beta$ -HSD, P450c<sub>17</sub> und P450arom. Immunoreaktivität wurden in LC, Sertoli-Zellen und

Keimzellen gezeigt. Sie interpretierten, dass diese Zellen die Androgensynthese-Fähigkeit haben. Das gleiche berichteten Hayakawa et al. (2004) über japanische Waschbär Jagdhunde (Es sind Tiere, die auf die Jagd nach Waschbären abgerichtet sind), Hokkaido Braunbären und amerikanische Schwarzbären, aber interessanterweise nicht bei Hokkaido Sika Rehen. Qiang et al. (2003) untersuchten die saisonalen Änderungen der Spermatogenese und Steroidogenese an Waschbär Jagdhunden. Die mit den steroidosynthetischen Enzymen reagierenden Zellen änderten sich mit der Jahreszeit; z.B. wurden im Februar die P450<sub>scc</sub> und P450<sub>c17</sub> in LC und Spermatozyten identifiziert, jedoch waren diese Enzyme im September nur in LC sichtbar. Dieses Enzymniveau korreliert mit der Größe und dem Gewicht der männlichen Geschlechtsorgane. Diese Studien liefern uns Hinweise, dass die Immunreaktionen in den Keimzellen und Sertoli-Zellen keine unspezifische Färbung sind, sondern ein Hinweis, dass diese Zellen auch zur Steroidenzym-synthese-fähig sind. Je nach der Spezies und Jahreszeit können auch Sertoli-Zellen und Keimzellen Androgen synthetisieren.

3. Ge et al. (2006) entdeckten die Stammzellen der ALC, die zur Bildung der Vorläufer-ALC führen. Können die Stammzellen für klinische therapeutische Anwendung eingesetzt werden?
4. Die vaskulären glatten Muskelzellen verfügen über viele Enzyme und hormonelle Rezeptoren. Leider wurde ihre Wirkung bei der ALC-Entwicklung wenig untersucht. Es wäre sinnvoll, diese näher zu untersuchen. Es wäre von Bedeutung zu ermitteln, welchen quantitativen Anteil die Endothelzelle und die glatten Muskelzellen der interstitiellen Gefäße als Vorläufer der ALC darstellen. Hierzu wäre auch eine immunelektronenmikroskopische Untersuchung sehr empfehlenswert.

## 5. Literatur

- Ariyaratne HBS, Mason JI and Mendis-Handagama SMLC (2000a). Effects of thyroid hormone on Leydig cell regeneration in the adult rat following ethane dimethane sulphonate treatment. *Biol. Reprod.* **63**, 1115-1123
- Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC, Hales DB and Mason (2000b). Studies of the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. *Biol. of Reproduction* **63**, 165-171
- Benton L, Shan LX and Hardy MP (1995). Differentiation of adult Leydig cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**, 61-68
- Christesen AK. Leydig cells. In: Greep RO and Astwood EB (eds.) (1975) Handbook of Physiology, vol. 7. Washington, DC: *American Physiology Society*; 1975, 57–94.
- Collin O and Berhg A (1996). Leydig cells secrete factors which increase vascular permeability and endothelial cell proliferation. *Int. J. Androl.* **19**, 221-228
- Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF and Müller D (2004). Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed *J. Cell Biol.* **167**, 935-944
- de Kretser DM (1974) The fine structure of the testicular interstitial cells in men of normal androgenic status. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **80**, 594–609.
- Ewing LL and Zirkin B (1983). Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Prog. Hormone Res.* **39**, 599-635
- Ge RS, Shan LX and Hardy MP (1996). Pubertal development of Leydig cells. In 'The Leydig Cell', ed. Lussell, D. (Cache River Press, Vienna, IL), pp. 159-173.

- Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Papadopoulos V, Zirkin BR and Hardy MP (2006). In search of rat stem Leydig cells: Identification, isolation, and Lineage-specific development *PNAS*/ February 21, 2006/ vol.103/ no. 8/ 2719-2724
- Ghinea N, Mai TV, Groyer-Picard MT and Milgrom E (1994). How protein hormones reach their target cells? Receptor-mediated transcytosis of HCG through endothelial cells. *J. Cell. Biol.* **125**, 87-97
- Giambanco I, Pula G, Ceccarelli P, Bianchi R and Donato R (1991). Immunohistochemical localization of annexin V (CaBP33) in rat organs. *J Histochem Cytochem* **39**, 1189-98.
- Habert R, Lejeune H and Saez JM (2001). Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **179**, 47-74
- Haider SG, 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**: 498-506.
- Haider Sg, Laue D, Schwochau G and Hilscher B (1995). Morphological studies on the origin of adult-type Leydig cell induced by an antiandrogen (Flutamide) *Fertilität* **10**. 42-47.
- Haider SG, Passia D, Hilscher B (1985) Experimentelle Untersuchung zur perinatalen Entwicklung der Leydig-Zellen bei der Ratte: Experimentelle Urologie Springer Verlag Berlin pp.253-260
- Haider SG, Passia D, Overmeyer G (1986) Studies on fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Acta Histochem* **32**: 197-202.
- Haider SG (1988) Leydig-Zellen. Funktionelle Morphologie und Enzymhistochemie bei Ratte und Mensch. Stuttgart: Thieme Verlag, pp. 23-65
- Haider SG, Laue D, Schwochau G and Hilscher B (1995). Morphological studies on the origin of adult-type Leydig cells in rat testis. *Int. J. Anat. Embryol.* **100** (Suppl.1), 535-541

- Haider SG, Servos G, Tajtaraghi S, Berthold G, Mukhopadhyay AK, Kilic N, Ergun S (1997) Functional markers for fetal and postnatal differentiation of rat Leydig cells. *Adv Exp Med Biol (United States)* **424**:143-144.
- Haider SG and Servos G (1998). Ultracytochemistry of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. *Anat Embryol* **198**: 101–110.
- Haider SG (2004). Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int. Rev. Cytology* **233**: 181-241
- Hardy MP, Zirkin BP and Ewing LL (1989). Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* **124**, 762-770
- Hardy MP, Kelce WR, Klinefelter GR and Ewing LL (1990). Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: A role for androgen. *Endocrinology* **127**, 488-490
- Hayakawa D, Sasaki M, Akabane C, Kitamura N, Tsubota T, Suzuki M and Yamada J (2004). Immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the testis of Hokkaido Sika deer (*Cervus nippon yesoensis*). *J Vet Med Sci* **66**, 1463-6.
- Huhtaniemi IT, Warren DW and Catt KH (1984). Functional maturation of rat testis Leydig cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **438**, 283-303
- Kuopio T, Tapanainen J, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I (1989) Development stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development* **107**: 213-220.
- Li MX, He LP, Guo ZQ, Liu YS and Long ZF (2002). The expression of nitric oxide synthase in testes of male rat. *Zhonghua Nan Ke Xue* **8**, 250-2.
- Lobo MV, Alonso FJ and del Río RM (2000). Immunohistochemical localization of taurine in the male reproductive organs of the rat. *J Histochem Cytochem* **48**, 313-20.
- Lording DW and de Kretser DM (1972). Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J Reprod Fertil* **29**, 261–269.

- Majdic G, Saunders PTK and Teerds KJ (1998). Immunoexpression of the steroidogenic enzymes  $3\beta$ -HSD and  $17\alpha$ -hydroxylase,  $C_{17,20}$  lyase and the receptor for LH in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biol. Reprod.* **58**, 351-355
- Mendis-Handagama SMLC, Risbridger GP and de Kretser DM. (1987) Morphometric analysis of the components of the neonatal and adult rat testis interstitium. *Int J Androl* **10**, 525–534.
- Mendis-Handagama SMLC, Ariyaratne HBS, Teunissen van Manen KR and Haupt RL. (1998) Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biol Reprod* **59**, 351–357.
- Misrahi M, Beau I, Ghinea N, Vannier B, Loosfelt H, Meduri G, Vu- Hai MT and Milgrom E. (1996) The LH/CG and FSH receptors: different molecular forms and intracellular traffic. *Mol Cell Endocrinol* **125**, 161–167.
- Molenaar R, de Rooije DG, Rommerts FFG and van der Molen HJ (1996). Repopulation of Leydig cells in mature rats after selective destruction of the existent Leydig cells with ethylene dimethane sulfonate is dependent on luteinizing hormone and not follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* **118**, 2546-2554
- Okano T, Murase T and Tsubota T (2003). Spermatogenesis, serum testosterone levels and immunolocalization of steroidogenic enzymes in the wild male Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). *J Vet Med Sci* **65**, 1093-9.
- O’Shaughnessy, P. J., Johnsten, H., Willerton, L., and Baker, P., (2002). Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *J. Cell Sci.* **115**, 3491-3496.
- Prince FP, Aann DR and Fraser HM (1998). Blockade of the hypothalamic-pituitary testicular axis with a GnRH antagonist in the neonatal marmoset monkey: Changes in Leydig cell ultrastructure. *Tissue Cell* **30**, 651-661

- Qiang W, Murase T and Tsubota T (2003). Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in wild male raccoon dogs (*Nyctereutes procynoides*). *J Vet Med Sci* **65**, 1087-92.
- Roosen-Runge EC and Anderson D (1959) The development of the interstitial cells in the testis of albino rat. *Acta Anat* **37**, 125–137.
- Russell LD, de Franka LR, Hess R and Cooke P (1995) Characteristics of mitotic cells in developing adult testes with observations on cell lineage. *Tissue Cell* **27**, 105–128.
- Scipioni A, Stefanini S, Santone R and Giorgi M (2005). Immunohistochemical localisation of PDE5 in Leydig and myoid cells of prepuberal and adult rat testis. *Histochem Cell Biol* **124**, 401-7.
- Schultz R, Isola J, Parvinen M, Honkaniemi J, Wikström AC, Gustafsson JA and Pelto-Huikko M. (1993). Localization of the glucocorticoid receptor in testis and accessory sexual organs of male rat. *Mol Cell Endocrinol* **95**, 115-20.
- Setchell BP, Pakarinen P and Hutaniemi I (2003). How much LH do the Leydig cells see? *J. Endocrinol.* **175**, 375-382
- Shan LX and Hardy MP (1992). Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. *Endocrinology* **131**, 1107-1114.
- Shan LX, Zhu LJ, Bardin W and Hardy MP (1995). Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization. *Endocrinology* **136**, 3856-3862
- Shan LX, Bardin W and Hardy MP (1997). Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization. *Endocrinology* **138**, 1259-1266
- Teerds KJ, Closset J, Rommerts FFG, de Rooij DK, Stocco DC, Colenbrander B, Wensing CJG and Hennen G (1989) Effects of pure FSH and LH preparations on the number and

function of Leydig cells in immature hypophysectomized rats. *J Endocrinol* **120**, 97–106.

Toth P, Li X, Rao CV, Lincoln SR, Sanfilippo JS, Spinnato JA 2<sup>nd</sup> and Yussman MA (1994) Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *J Clin Endocrinol Metab* **79**, 307-15.

Vornberger W, Prins G, Musto NA and Suarez-Quian CA (1994). Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* **134**, 2307-16.

## 6. Zusammenfassung

Name der Doktorandin: Jun Wang

Titel : Immunhistochemische Untersuchungen zur Identifizierung und Quantifizierung der Vorläufer der adulten Leydig-Zellen bei der Wistarratte

Das Ziel der vorliegenden Arbeit waren die Identifizierung und Quantifizierung der Vorläufer der Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC) während der postnatalen Phase (10. – 20. pnd) mit Hilfe immunhistochemischer Marker. Als Untersuchungsmaterial dienten die Hoden von Wistarratten. Für jede der folgenden Altersstufen standen fünf Wistarratten zur Verfügung, aus deren Hoden 5 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt wurden: 10. pnd, 12. pnd, 14. pnd, 16. pnd, 18. pnd, 20. pnd. Zur immunhistochemischen Darstellung wurden drei Antikörper verwendet: Luteinisierender Hormon- Rezeptor (LHR)- Antikörper, Cytochrom P450 side chain cleavage (P450scc)-Antikörper und Androgenrezeptor (AR)-Antikörper. Die positiv reagierenden Zellen wurden für die quantitative Beurteilung in fünf Zellgruppen am Lichtmikroskop gezählt: Fetaltyp-Leydigzellen (FLC), perivaskuläre Fibroblasten, peritubuläre Fibroblasten, interstitielle Fibroblasten, Blutgefäße und statistisch ausgewertet.

Die Studie mit P450scc ergaben folgendes: Am 10. und 12. pnd stammten ALC-Vorläufer ausschließlich aus den peritubulären (55%) und den interstitiellen Fibroblasten (45%). Ab dem 14. pnd beteiligten sich die perivaskulären Fibroblasten auch an der Bildung von ALC. Ihr Anteil stieg stetig vom 14. pnd (1%) bis zum 18. pnd (14%) an. Am 20. pnd war wiederum ein leichter Abfall zu erkennen (10%). Während des gesamten untersuchten Zeitraums erwiesen sich die peritubulären Fibroblasten als die größte Quelle der Vorläufer der ALC. Die Studie des LH-Rezeptors zeigte folgendes Bild: Die peritubulären Fibroblasten stellten den größten Anteil der ALC-Vorläufer dar (94% bis 99%). Die perivaskulären Fibroblasten waren in diesem Fall kaum zu finden. Ihrer Anteil betrug weitgehend knapp 1%. Eine mäßig bis starke immunhistochemischen Reaktion des LH-Rezeptors war altersunabhängig in fast allen Gefäßen zu beobachten. Die Reaktion wurde in den glatten Muskelzellen, und/ oder in den Endothelzellen beobachtet. Eine intranukleäre Immunreaktion des Androgenrezeptors wurde während des untersuchten Zeitraums in den Myoidzellen und den Sertoli-Zellen regelmäßig beobachtet. Gelegentlich war diese Reaktion ebenfalls - jedoch abgeschwächt- in den ALC-Vorläufer, den FLC, den vaskulären glatten Muskelzellen, den Perizyten, den Fibroblasten um die FLC-Cluster zu erkennen.

Schlussfolgerung: 1. Die Vorläufer der ALC sind bereits ab dem 10. pnd lichtmikroskopisch sichtbar. 2. Die peritubulären Fibroblasten sind der Hauptbestandteil der ALC-Vorläufer. Sie spielen besonders am Anfang der Entstehung der ALC eine Hauptrolle. 3. Die perivaskulären und interstitiellen Fibroblasten beteiligen sich auch an der Entstehung der ALC mit, sind aber vom Anteil her weniger als die peritubulären Fibroblasten, und ihre Rolle tritt erst verzögert auf. 4. Die Bedeutung von den vaskulären Endothelzellen, glatten Muskelzellen sowie Perizyten bleibt unklar.

## **Danksagung**

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

Frau G. Berthold danke ich für die gute und fruchtbare technische Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Frau G. Servos für ihre Hilfe bei der fotografischen Dokumentation.

Mein herzlicher persönlicher Dank gilt meinen Eltern Changming Wang und Xiudi Ma, meinem Freund Min Chen für ihre geduldige und liebevolle Begleitung.

## **Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten**

Name: Wang, Jun  
Geburtsdatum: 07.11.1979  
Geburtsort: Jiangsu, China  
Staatsangehörigkeit: Chinesisch

### **Ausbildung**

09/1985-07/1991 Grundschule in Chibilu Primaryschool in Nanjing, China  
09/1991-07/1994 Mittelschule in 11th. Middleschool in Nanjing, China  
09/1994-07/1997 Oberschule in Ninghai Middleschool in Nanjing, China, Abschluß  
Abitur  
09/1997-07/2001 Medizinstudium an der Nanjing Medical University in China  
10/2001-03/2002 Deutschkurs an der Christian-Albrechts-Universität Kiel  
04/2002-08/2002 Chemiestudium an der Christian-Albrechts-Universität Kiel  
10/2002-10/2008 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
10/2008-12/2008 der Zweite Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Berufliche Tätigkeit**

Seit 02/2009 Assistenzärztin, Hals-Nasen-Ohren Klinik der Katho. GmbH  
Hagen

### **Auslandserfahrung**

09/1997-07/2001 Auslandsstudium an der Nanjing Medical University, China  
12/2007-03/2008 Praktisches Jahr auf dem Gebiet Chirurgie im Jiangsu Province Hospital  
Nanjing, China

### **Sprachen**

Chinesisch, Deutsch, Englisch