

Aus dem Institut für Anatomie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Kommissarischer geschäftsführender Direktor: Professor Dr. T. Filler

**Immunhistochemische Untersuchungen
zur Ontogenese von Apoptose-Marker
Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2
in den Leydigzellen der Ratten**

Dissertation

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

vorgelegt von

Yanan Shen
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

Korreferent: Prof. Dr. Albers

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung.....	4
2. Material und Methode.....	9
2.1 Versuchstiere	
2.2 Präparation	
2.3 Fixierung, Entwässerung, Einbettung und Schnittherstellung	
2.4 Entparaffinierung	
2.5 Immunhistochemische Methoden (Cleaved-Caspase-3, Bcl-2)	
2.6 Perjodsäure-Schiff-Reaktion	
2.7 Lichtmikroskopische Auswertung	
3. Ergebnisse.....	14
3.1 Immunhistochemische Darstellung von Cleaved-Caspase-3	
3.2 Immunhistochemische Darstellung von Bcl-2	
3.2.1 Immunhistochemische Darstellung von Bcl-2 in Leydigzellen	
3.2.2 Immunhistochemische Darstellung von Bcl-2 in den Akrosomkappen und im Gefäß	
4. Diskussion.....	51
4.1 Besprechung der Befunde über Cleaved-Caspase-3	
4.2 Besprechung der Befunde über Bcl-2	
4.3 Ausblick	
5. Literaturverzeichnis	57
6. Zusammenfassung (Abstract)	61
7. Anhang: Datenblätter für Antikörper	62
8. Danksagung	64
Lebenslauf.	65

Abkürzungen

AIF	apoptosis-inducing factor
ALZ	Adulttyp-Leydigzellen
Bcl-2	Apoptose-Marker: B-cell lymphome 2
Caspase	Apoptose-Marker: cysteinylaspartate specific protease
DFF	DNA-Fragmentierungs-Faktor
EDS	ethane dimethanesulfonate
FLZ	Fetaltyp-Leydigzellen
LZ	Leydigzellen
PBST-Puffer	phosphate buffered saline + Tween 20
pnd	Postnataltag

1. Einleitung

Ziel dieser Arbeit ist es, einen morphologischen Beitrag zur Aufklärung der apoptotischen Vorgänge von Leydigzellen im Hoden der Wistarratten zu leisten. Dazu dienen die immunhistochemischen Nachweise von zwei apoptotischen Markern: Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2.

Leydigzellen (LZ) wurden erstmalig von Franz von Leydig (1821-1908), ein Zoologe und Anatom aus Deutschland, beschrieben (Leydig, 1850). Die in dieser Arbeit verwendeten Rattenhoden sind vom 1. Postnataltag (pnd), 5.pnd, 10 pnd, 15 pnd, 20 pnd, 25 pnd, 30 pnd, 50 pnd und 100 pnd. Im Hoden der Ratte unterscheidet man zwischen zwei morphologisch und funktionell verschiedene Population von LZ: 1. Fetaltyp-Leydigzellen (FLZ) und 2. Adulttyp-Leydigzellen (ALZ) (Lording und de Kretser, 1972; Haider et al., 1986; Hardy et al., 1989; Kuopio et al., 1989; Haider und Servos, 1998; Majdic et al., 1998; Ariyaratne et al., 2000; Haider, 2004).

Die **Fetaltyp-Leydigzellen (FLZ)** sind ausschließlich in kompakten, runden bis ovalen Clustern angeordnet, die sich in den interstitiellen Dreiecken zwischen den Tubuli seminiferi befinden. Die Zellen und deren Zellkerne sind gross und rund geformt. Nach einigen Autoren sind FLZ nach dem 30. Postnataltag (pnd) nicht mehr lichtmikroskopisch nachweisbar (Haider et al., 1983, 1986; Kuopio et al., 1989). Andere Literaturstellen verweisen auf die Existenz von FLZ in Ratten bis zum 90. pnd (Kerr und Knell, 1988; Ariyaratne et al., 2000).

Die **Adulttyp-Leydigzellen (ALZ)** können sich peritubulär, perivaskulär, sowie in den interstitiellen Dreiecken befinden. Sie kommen sowohl vereinzelt, als auch in Gruppen (=„Cluster“) vor. Die Zellen sind groß und rund oder flach geformt, mit runden oder flachen Kernen. Nach Ariyaratne et al. (2000) können ALZ ab dem 10.pnd und nach Haider et al. (1995) ab dem 13. pnd nachgewiesen werden. Laut Haider (2004) kann die Differenzierung von ALZ in vier Phasen unterteilt werden: 1. Transformation von peritubulären und perivaskulären Fibroblasten (pnd 10 - 13), 2. Vorläufer der ALZ (pnd 14 – 28), 3. unreife ALZ (pnd 35) und 4. reife ALZ (pnd > 56).

Unter **Apoptose** (griechisch, „apo“= „weg“ und „ptosis“=„Fall“) versteht man einen programmierten Zelltod. Der Vorgang der Apoptose wurde erstmalig 1972 von Kerr beschrieben (Kerr et al., 1972). James Cormack (Professor für griechische Sprache an der Universität von Aberdeen) hat den Prozess der Apoptose wie das Fallen der Blätter im Herbst beschrieben. Im Gegensatz zur Nekrose wird die Apoptose von der betroffenen Zelle selbst eingeleitet und ist damit ein Teil des Stoffwechsels der Zelle. Die Apoptose ist essentiell für die Entwicklung und den Fortbestand des Organismus. Der Prozess der Apoptose wird von einer Reihe von Enzymen schrittweise eingeleitet. Die Cystein-Familie der „Caspasen“ und die Bcl-2-Familie stellen den zentralen Teil des Apoptose-Prozesses dar (Nicholson und Thornberry, 1997).

Caspasen sind eine Familie von Cystein-Proteasen, die spezifisch Peptidbindungen C-Terminal von Aspartat abspalten (=„ cleave“). Deswegen wurden sie als Caspasen bezeichnet (cysteiny-l-aspartate specific protease). Die meisten Caspasen entstehen als inaktive Pro-Enzyme, die im Vorgang der Apoptose durch Autoproteolyse oder durch Einwirkung von

anderen Proteasen zu aktiven (cleaved) Formen umgewandelt werden (Villa et al., 1997). Caspasen nehmen an einem kaskadenartigen Vorgang teil, welcher durch proapoptotische Signale ausgelöst wird und sich in eine Teilung einer Anzahl von Proteinen äußert. Das führt schlussendlich zur Auflösung der Zelle (Thornberry und Lazebnik, 1998). Man unterteilt Caspasen in zwei Gruppen: Initiator-Caspasen (Caspasen 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 und 12), sowie Effektor-Caspasen (Caspasen 3, 6, 7). Initiator-Caspasen sind in der Lage, durch kaskadenartige Proteolyse die Effektor-Caspasen zu aktivieren (Nunez et al., 1998). Diese Aktivierung von Effektor-Caspasen führt schließlich zum Zelltod durch die Spaltung wichtiger Zellproteine, von denen bisher 280 bekannt sind. (Fischer et al., 2003).

Von allen Caspasen tritt **Caspase-3** als Schlüsselprotease in der Apoptose auf (Porter und Janicke, 1999). Aktivierte (=cleaved) Caspase-3 kann den DNA-Fragmentierungs-Faktor (DFF; engl.: DNA fragmentation factor) durch Proteolyse aktivieren, der weiter zur DNA-Fragmentierung führt (Liu et al., 199). Die in Vitro-Untersuchungen zeigen, dass die Caspase-3- Inhibitoren eine hemmende Wirkung auf die Aktivität der Caspase-3 ausüben. Dadurch wird die Apoptose verhindert (Nicholson et al., 1995). Auch in der Apoptose der LZ spielt Caspase-3 eine wesentliche Rolle. Bereits einige Studien zeigten, dass EDS (ethane dimethanesulfonate) die Apoptose der LZ verursacht. Laut Jong-Min Kim et al. (2000) scheint diese Wirkung von EDS auf einer Aktivierung der Procaspase-3 zur cleaved-Caspase-3 (aktivierte Form) und auf einer Translokalisierung der cleaved-Caspase-3 vom Zytoplasma in den Zellkern, zu basieren. Der Transport der Cleaved-Caspase-3 erfolgt aktiv durch nukleare Poren, deren Diffusionslimit durch passiven Transport der vorzeitig aktivierten Caspase-9 erweitert werden kann (Lavina Faleiro und Yuri Lazebnik, 2000).

Die Proteine der **Bcl-2-Famile** sind wichtige Regulatoren der Apoptose, die zum Teil proapoptotisch und zum Teil antiapoptotisch wirken (Adams und Cory 1998; Green und Reed 1998; Tsujimoto und Shimizu 2000a, Tsujimoto und Shimizu 2000b). Das Auftreten von maximal vier Domänen hoher Sequenzhomologie (Bcl-2 homology, BH) BH 1 – 4 ist typisch für alle Mitglieder dieser Genfamilie (Tsujimoto und Shimizu 2000a). Die Bcl-2-Familie besteht aus drei Untergruppen (= Subfamilie): a) Die Bcl-2-Gruppe, die antiapoptische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xl enthält, b) Die Bax-Gruppe, welche proapoptische Proteine wie Bax und BAK enthält und c) Die BH3-Gruppe, die proapoptische Proteine wie Bid, Bik und Bim enthält und die Sequenzhomologie nur in BH 3 hat. Die antiapoptischen Mitglieder der Familie, wie Bcl-2 und Bcl-xl, verhindern die Apoptose entweder durch Absonderung von Vorläufer der Caspasen, oder durch Vermeidung der Freisetzung apogenetischer Faktoren, wie Cytochrom-C und AIF (apoptosis-inducing factor) in das Zytoplasma. Im Gegenteil hierzu fördern die proapoptischen Mitglieder, wie Bax und BAK die Apoptose durch Auslösung der Freisetzung von Caspasen, als auch durch Erhöhung der Membran-Permiabilität der Mitochondrien, die zur Freisetzung mitochondrialer apoptotischer Faktoren wie Cytochrom c und AIF in das Zytoplasma führen, die wiederum Caspasen aktivieren (Tsujimoto, 1998).

Bcl-2 (Abkürzung für „B-cell lymphoma 2“) ist ein wichtiges Mitglied und Namensgeber dieser Proteinfamilie. Das Protein wirkt antiapoptotisch unter oben genanntem Mechanismus. Bcl-2 wurde in späten Spermatozyten und Spermatiden beobachtet und der Spiegel von Bcl-2 wurde durch eine Dosis von 4 Gy X-Strahlung hoch reguliert (Beumer et al., 2000). Im Gegensatz zur Caspase-3 ist Bcl-2 nicht in der EDS induzierten Apoptose der LZ beteiligt (Taylor et al., 1998).

Fragestellung:

Bisher liegen nur spärliche Informationen über den Vorgang der Apoptose der LZ in der Literatur vor. Aus morphologischen Untersuchungen ist es bekannt, dass die LZ sowohl vor der Pubertät als auch in der adulten Phase zu Grunde gehen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zwei bekannte Apoptosemarkern ausgewählt, um die Expression dieser Markern in den LZ zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit folgenden Fragestellungen bzw. Aspekten:

1. Wie verhält sich das immunhistochemische Verteilungsmuster von Apoptose-Marker Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2 in LZ von der Geburt (1. pnd) bis zur adulten Phase (100. pnd)?
2. Beschreibung der genauen Topographie der Immunreaktion in der Zelle (z.B. Kern, Zytoplasma oder Zellmembran)
3. Semiquantitative Studie über die Anzahl der immunpositiven Zellen in Paraffinschnitten des Hodens

2. Material und Methode

2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Wistarratten aus dem Zentralen Tierlabor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Aufzucht der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Wasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung.

Es wurden jeweils 5 Hoden von 9 unterschiedlichen Altersgruppen untersucht: 1. pnd, 5. pnd, 10. pnd, 15. pnd, 20. pnd, 25. pnd, 30. pnd, 50. pnd, 100. pnd. Zur Darstellung der Fetaltyp-Leydigzellen (FLZ) wurden die Altersgruppen vom 1., 5. und 10. pnd herangezogen. Bei den Altersgruppen vom 15., 20. und 25. pnd wurden sowohl die FLZ als auch die Adulttyp-Leydigzellen (ALZ) erfasst. Zur Darstellung der ALZ wurden die Altersgruppen vom 30., 50. und 100. pnd ausgewählt.

2.2. Präparation

Die Ratten wurden gewogen und mit Diethylether betäubt. In tiefer Narkose erfolgte die Tötung durch zervikale Dekapitation. Unmittelbar danach erfolgte die Präparation der Hoden.

2.3. Fixierung, Entwässerung, Einbettung und Schnittherstellung

Fixierung:

Die linken Hoden wurden direkt nach der Entnahme in frisch zubereiteter Bouin-Lösung (Pikrinsäure, Formalin, Eisessig) für 18 Std. (Wechsel nach 6 Std.) fixiert.

Entwässerung und Einbettung:

erfolgte in 10 Schritten, in dem die Präparate in die nachfolgend aufgelisteten Lösungen eingelegt wurden:

1. 70% Isopropylalkohol für 8 Std. (Wechsel nach 4 Std.)
2. 80% Isopropylalkohol für 12 Std.
3. 90% Isopropylalkohol für 8 Std. (Wechsel nach 4 Std.)
4. 100% Isopropylalkohol für 12 Std.
5. Methylbenzoat für 6 Std.
6. Frisches Methylbenzoat für 24 Std.
7. Toluol für 20 Min. (Wechsel nach 10 Min.)
8. Paraffin (Schmelzpunkt 60°C) für 9 Std. (Wechsel nach jeweils 3 Std.)
9. frisches Paraffin für 18 Std.
10. Einbettung in frischem Paraffin

Schnittherstellung:

Anfertigung von ca. 4 µm dicken Paraffinschnitten auf einem Schnittenmikrotom.

Sorgfältiges Trocknen der Schnitte bei 50°C für mindestens 12 Std.

2.4. Entparaffinierung

Die Schnitte wurden für ca. 20 Minuten bei 60°C im Brutschrank erwärmt und danach ohne Abkühlen in Xylol für 10 Min. entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte in eine absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70% Isopropylalkohol) für je 2 Min. gebracht, dann 2 Min. in Aqua bidest. gewässert. Diese Entparaffinierungsreihe wurde nach Durchlauf von 50 Schnitten erneuert, um unspezifische Hintergrundanfärbungen bei der Durchführung der Immunreaktion zu vermeiden.

2.5. Immunhistochemische Methoden

Zum immunhistochemischen Nachweis von Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2 wurde jeweils ein monoklonaler Antikörper verwendet .

1. Der Cleaved-Caspase-3-Antikörper stammte von der Firma Cell Signalling (USA, Produkt-Nr. 9664) und wurde aus Kaninchen hergestellt (Datenblatt des Herstellers im Anhang, S. 61).

2. Der Bcl-2-Antikörper stammte von der Firma DAKO (Deutschland, Produkt-Nr. N1587). Dieser Antikörper wurde aus Mäusen hergestellt und war gebrauchsfertig verdünnt (Datenblatt des Herstellers im Anhang, S. 62).

Die folgenden Schritte der Nachweismethode wurden durchgeführt:

1. Demaskierungslösung („Retrieval-Lösung“): 0,01 M Zitronensäure-Na-Zitratpuffer, pH 6,0

für die Reaktion mit dem Cleaved-Caspase-3-Antikörper; high pH 9,0 Puffer von der Firma

Dako (Deutschland) 1:10 verdünnt für die Reaktion mit dem Bcl-2-Antikörper. Nach dem Erhitzen der jeweiligen Demaskierungslösungen auf eine Temperatur von 95°C in einem Dampfgerat, wurden die entparaffinierten Schnitte in die entsprechende Demaskierungslösung gestellt und nach Wiedererreichen von 95°C bei dieser Temperatur für 20 Min. inkubiert.

2. Abkühlen der Schnitte in der Demaskierungslösung auf Raumtemperatur.

3. Aqua bidest. 3 mal je 5 Min.

4. Umkreisen der Schnitte mit Dako Pen (sparsamer Umgang mit Reagenzien)

5. Alle nachfolgenden Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt.

6. Blockieren der endogenen Peroxidase mit 3% H₂O₂ für 10 Min. bei Raumtemperatur.

7. Abspülen mit Aqua bidest. und Einstellen in frisches Aqua bidest. für 2 mal je 5 Min.

8. Einstellen in 0.15 M (mol/L) PBST-Puffer (phosphate buffered saline + Tween 20), pH 7,4 für 5 Min.

9. Blockierung unspezifischer Bindungen durch 5% Ziegen Serum (nur für die Reaktion mit dem Cleaved-Caspase-3-Antikörper) für 60 Min bei Raumtemperatur.

10. Ziegen Serum abschleudern, nicht abspülen.

11. Primärantikörper aufbringen: Der Cleaved-Caspase-3-Antikörper wurde 1:75 mit 5% Ziegen Serum verdünnt. Der Bcl-2-Antikörper wurde ohne Verdünnung verwendet.

12. Die Inkubation für beide Antikörper erfolgte im Kühlschrank (ca. 7°C) für 16 Stdn.

13. Abspülen der Antikörper mittels einer Spritzflasche mit PBST-Puffer, einstellen in PBST-Puffer für 3 mal je 5 Min.

14. Inkubation mit EnVision für 30 Min. Für den Nachweis von Cleaved-Caspase-3 wurde „EnVision + System-HRP Anti-Rabbit“ verwendet, für den Nachweis von Bcl-2 wurde „EnVision + Dual Link System-HRP“ (beide Firma Dako, Deutschland) verwendet.

15. Abspülen mit PBST-Puffer, einstellen in PBST-Puffer für 3 mal je 5 Min.

16. Chromogen (=Farbgeber): Diaminobenzidin Lösung (DAB, Firma Dako, Deutschland)

Eine Tablette DAB wurde in 10 ml PBST-Puffer aufgelöst. Von dieser Lösung wurde 2 ml unmittelbar vor Gebrauch mit 15 µl 3% H₂O₂ aktiviert und die Schnitte wurden für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

17. Abspülen mit Aqua bidest. und einstellen in Aqua bidest. für 5 Min. bei Raumtemperatur.

18. Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer für 30 Sekunden.

19. Fließendes Wasser für 5 Min.

20. Entwässern über aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100% Isopropylalkohol) und Xylol (2Mal) für je 2 Min.

21. Eindecken mit DePeX[®] (Firma Serva, Deutschland)

2.7. Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Immunreaktionen in den LZ wurde mit einem Leitz Orthoplan Mikroskop bei 40er Objektiv und mit Hilfe eines Messrasters im Okular durchgeführt. Das Messraster (Abb. 1) bestand aus 25 kleinen Quadraten mit einer gesamten Quadratfläche von 4 mm². Bei jedem Schnitt wurde das Messraster 8 mal angelegt und die LZ pro mm² ermittelt.

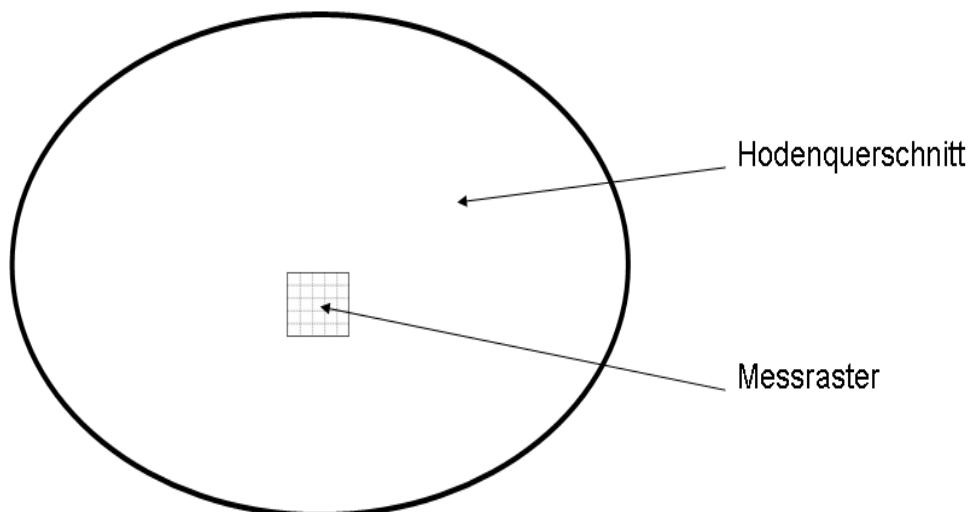


Abb.1

3. Ergebnisse

Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Immunreaktion in den FLZ und ALZ lag, wird im Folgenden hauptsächlich die Verteilung von Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2 in den FLZ und ALZ beschrieben. Die Immunreaktion in den Keimepithelzellen und Sertolizellen wird in dieser Arbeit nicht besprochen (Ausnahme: Reaktion in den Akrosomkappen)..

Die FLZ kommen ausschließlich in Gruppen oder „Cluster“ von 5 bis 10 Zellen vor und sind daher in einem histologischen Schnitt leicht erkennbar. Die FLZ sind meistens rund mit einem großen runden Kern und einem Kernkörperchen. Die Cluster von FLZ sind von einem Saum von Fibrozyten umgeben.

Die reifen ALZ im Interstitium wurden aufgrund der folgenden morphologischen Charakteristika als Leydigzellen identifiziert: große runde Zellen, ein runder Kern mit 1 oder 2 Kernkörperchen und helles Zytoplasma.

Die unreifen ALZ können sowohl rund als auch oval sein.

3.1. Immunhistochemische Darstellung von Cleaved-Caspase-3

Die spezifische immunhistochemische Darstellung mit einem apoptotischen Marker Cleaved-Caspase-3 konnte sowohl in den ALZ als auch in den FLZ nachgewiesen werden.

Die Abb. 2-5 zeigen die Immunreaktion bei FLZ im Alter von 1. und 5. pnd. Während die Immunreaktion bei einigen FLZ nur im Zytoplasma stattfindet, kann man die Immunreaktion

bei anderen FLZ sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern beobachten. Bei einigen FLZ fehlt eine Immunreaktion.

Im Alter von 15. und 25. pnd (Abb. 6-9) beobachtet man eine mäßige bis starke Immunreaktion sowohl in den FLZ als auch in den ALZ. Die Verteilung der Immunreaktion bei FLZ folgt dem gleichen Schema wie bereits in Abb. 2-5 nachgewiesen wurde. Die Immunreaktion befindet sich bei ALZ teilweise nur im Zytoplasma und teilweise sowohl im Zytoplasma und auch im Zellkern. ALZ mit ausbleibender Immunreaktion sind auch vorhanden.

In der Abbildung 10 sieht man eine starke Immunreaktion bei ALZ am 50. pnd. Die Immunreaktion befindet sich wie in Abb. 6-9 bei ALZ teilweise nur im Zytoplasma, teilweise sowohl im Zytoplasma und auch im Zellkern, teilweise fehlt eine Reaktion.

Bei der Negativkontrolle für die Immunreaktion Cleaved-Caspase-3 wurde der Schnitt ohne Primärantikörper von Cleaved-Caspase-3 inkubiert. Hierbei wurde keine Immunreaktion in LZ nachgewiesen (Abb. 11).

Die Graphik in Abb. 12 zeigt die topographische Verteilung der Immunreaktion für Cleaved-Caspase-3 in den LZ. Eine Immunreaktion, die sich auf den Zellkern beschränkt, ist am 1. pnd und 5. pnd praktisch nicht nachweisbar. Hiernach steigt der Wert stetig bis auf 7% aller LZ am 100 pnd an.

- LZ, in denen eine Reaktion sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern auftritt, stellen vom 1. pnd bis zum 15. pnd ca. die Hälfte aller LZ mit Reaktionen dar. Im weiteren Verlauf sinkt die Auftretenswahrscheinlichkeit stetig bis auf 8% am 100. pnd.

- LZ mit einer Immunreaktion, die sich auf den Bereich des Zytoplasmas beschränkt, stellen zwischen 1. und 20. pnd die Hälfte aller LZ dar. Die Proportion steigt bis auf 83% am 100. pnd hiernach stetig an.
- Die Immunreaktion verteilt sich in über 95% der LZ bis zum 20. pnd fast gleichmässig auf LZ, in denen diese Reaktion im Zytoplasma und Zellkern stattfindet, und auf LZ, wo die Immunreaktion auf das Zytoplasma beschränkt ist. Hiernach hingegen, tritt eine auf das Zytoplasma beschränkte Reaktion sukzessive deutlich in den Vordergrund und wird nach dem 50. pnd deutlich dominant.
- Addiert man den Anteil der LZ mit positiver Immunreaktion im Zytoplasma und den Anteil der LZ mit positiver Immunreaktion sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zusammen, stellt man fest, dass am 30. pnd der höchste Anteil der LZ eine positive Immunreaktion aufweist.

Die Verteilung der Immunreaktion in FLZ in Abb. 13a folgt dem in Abb. 12 dargestellten Muster: eine beinahe gleiche Anzahl der Zellen weist eine Immunreaktion in Zellkern und Zytoplasma, oder nur im Zytoplasma bis 15. pnd auf. Danach wächst der Anteil der FLZ mit Reaktion nur im Zytoplasma stetig bis auf 70% am 25. pnd zu Lasten der mit einer Reaktion sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern an, bis auf ein Niveau von ca 20% am 25. pnd.

Die Verteilung der Immunreaktion in ALZ in Abb. 13b zeigt vom 15. bis zum 20. pnd einen ca. 20% höherer Anteil von Zellen, in denen sich die Reaktion auf das Zytoplasma beschränkt, verglichen mit den Zellen mit einer Immunreaktion in Zellkern und Zytoplasma; dieser Anteil steigt auf ein Niveau von über 80% am 100. pnd. Der Anteil der ALZ, in denen die Immunreaktion in Zytoplasma und Zellkern auftritt, sinkt bis 100. pnd auf ca 9% ab.

Die zuvor beschriebenen Verläufe der Immunreaktionen für verschiedene Altersgruppen generieren sich aus den Histogrammen der Abb. 14-16. Die darin dargestellten Abweichungen beweisen die statistische Zuverlässigkeit der gemachten Aussagen.

3.2. Immunhistochemische Darstellung von Bcl-2

3.2.1. Immunhistochemische Darstellung von Bcl-2 in Leydigzellen

Wie die Abb. 17-19 zeigen, fehlt eine Immunreaktion für Bcl-2 in den FLZ im Alter von 1. und 5. pnd.

Bei dem in Abb. 20 gezeigten Ratten-Hodenquerschnitt des 25. pnd sind sowohl FLZ als auch ALZ zu sehen. Die ALZ weisen im Gegensatz zu FLZ eine mäßige Immunreaktion im Zytoplasma auf. In FLZ bleibt die Immunreaktion aus.

In Abb. 21-24 sind nur ALZ zu sehen. Bei diesen kann eine mäßige bis starke Immunreaktion im Zytoplasma festgestellt werden.

Die Durchführung der Negativkontrolle ohne Verwendung des Primärantikörpers bestätigt, dass sowohl in Tubuli als auch in LZ keine Immunreaktion stattfindet (Abb.25).

Die Grafik in der Abb. 26 zeigt den Verlauf der Immunreaktion für Bcl-2 in den ALZ von Altersstufen 15., 20., 25., 30., 50., und 100. pnd. Die Anzahl der ALZ mit Reaktion im Zytoplasma ist über den gesamten Verlauf, insbesondere zwischen 25. und 50. pnd, größer als die Anzahl jener Zellen, in denen keine Reaktion auftritt.

- Die Anzahl der ALZ ohne Immunreaktion ist weitestgehend konstant, beginnend mit 3500 ALZ mit Negativreaktion zum 15. pnd, hiernach stagnierend auf einem Niveau von ca 2500 /mm² bis zum 50. pnd und final langsam stetig sinkend bis auf ca. 1500 ALZ mit einer ausbleibenden Reaktion zum 100. pnd.

- Die ALZ, bei denen die Immunreaktion sich auf das Zytoplasma beschränkt, haben zum 15. pnd eine ähnliche Größenordnung wie die ALZ ohne Immunreaktion: 4300 /mm². Die Anzahl dieser Zellen steigt rapide bis zum 30. pnd auf ca 9000 /mm² an, und fällt hiernach bis auf 4800 /mm² zum 100. pnd ab.

Die zuvor beschriebenen Verläufe der Bcl-2-Immunreaktionen für verschiedene Altersgruppen generieren sich aus den Histogrammen der Abb. 27a-f. Die darin dargestellten Abweichungen beweisen die statistische Zuverlässigkeit der Befunderhebung.

3.2.2. Immunhistochemische Darstellung von Bcl-2 in den Akrosomkappen und im Gefäß

In Abb. 28 und 29 beobachtet man eine starke Immunreaktion von Bcl-2 in den Akrosomkappen der runden Spermatiden am 30. pnd.

Wie die Abbildung 30 zeigt, fehlt eine Immunreaktion für Bcl-2 in der Gefäßwand, wobei die zu sehenden ALZ eine starke Immunreaktion im Zytoplasma aufweisen.

Abb. 2-5 Immunhistochemische Darstellung von Cleaved-Caspase-3 in FLZ

Abb. 2

Hoden der Wistarratte, 1. pnd. Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Cleaved-Caspase-3 in FLZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x10.

Übersicht von Hodengewebe mit mäßiger Immunreaktion in nur einem Cluster von FLZ (Pfeil).

Abb. 3

Hoden der Wistarratte, 1. pnd. Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Cleaved-Caspase-3 in FLZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x100.

Es findet sich eine mäßige Immunreaktion im Zytoplasma von FLZ. Bei einigen FLZ fehlt eine Immunreaktion.

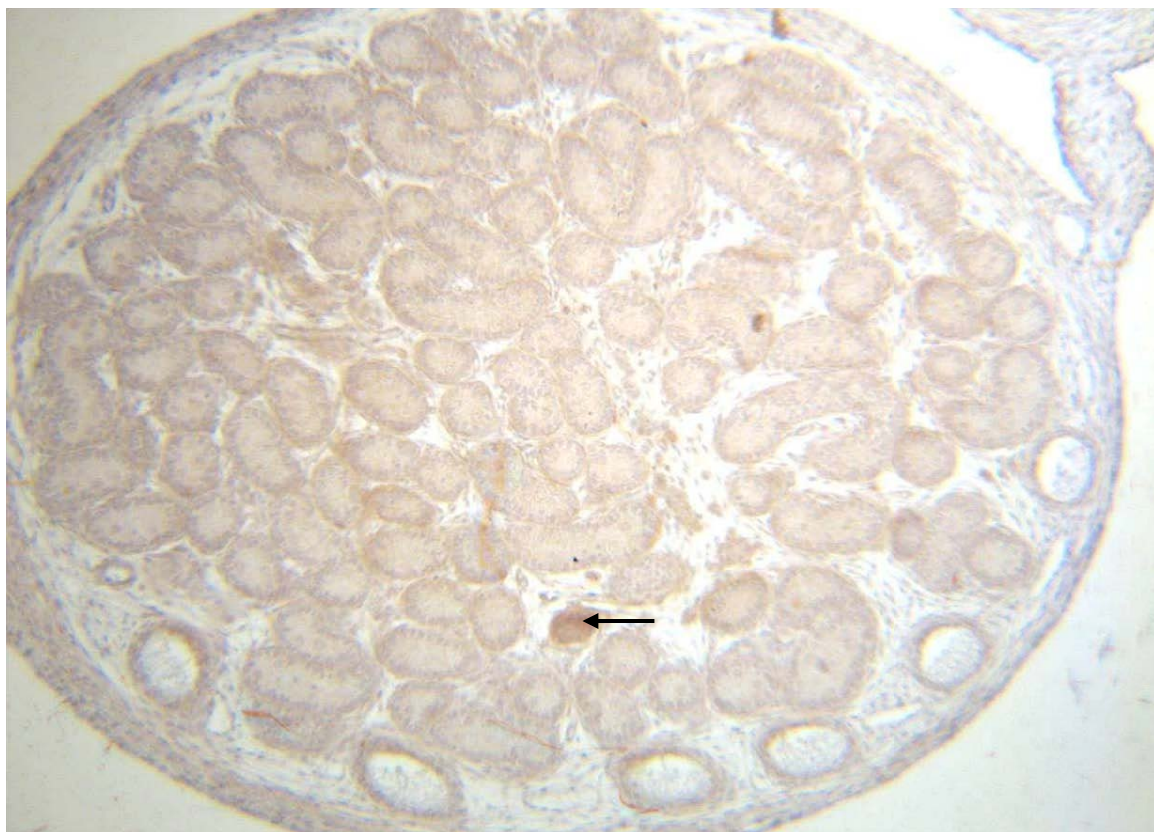


Abb. 2

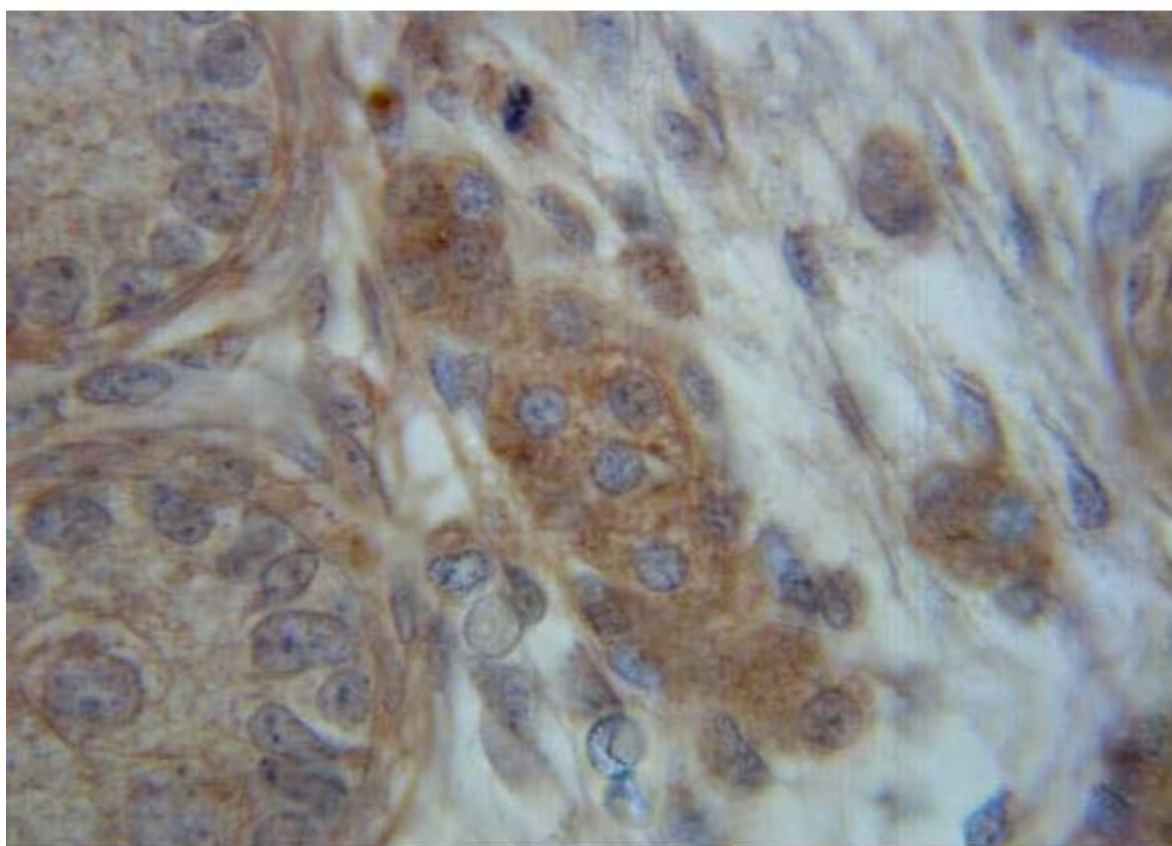


Abb. 3

Abb. 4

Hoden der Wistarratte, 5. pnd. Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Cleaved-Caspase-3 in FLZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x40.

Die Immunreaktion in den Clustern von FZL ist mäßig bis stark.

Abb. 5

Hoden der Wistarratte, 5. pnd. Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Cleaved-Caspase-3 in FLZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x100.

Während die Immunreaktion bei einigen FLZ nur im Zytoplasma (a) stattfindet, kann man die Immunreaktion bei anderen FLZ sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern (b) beobachten. Die Immunreaktion ist mäßig bis stark.

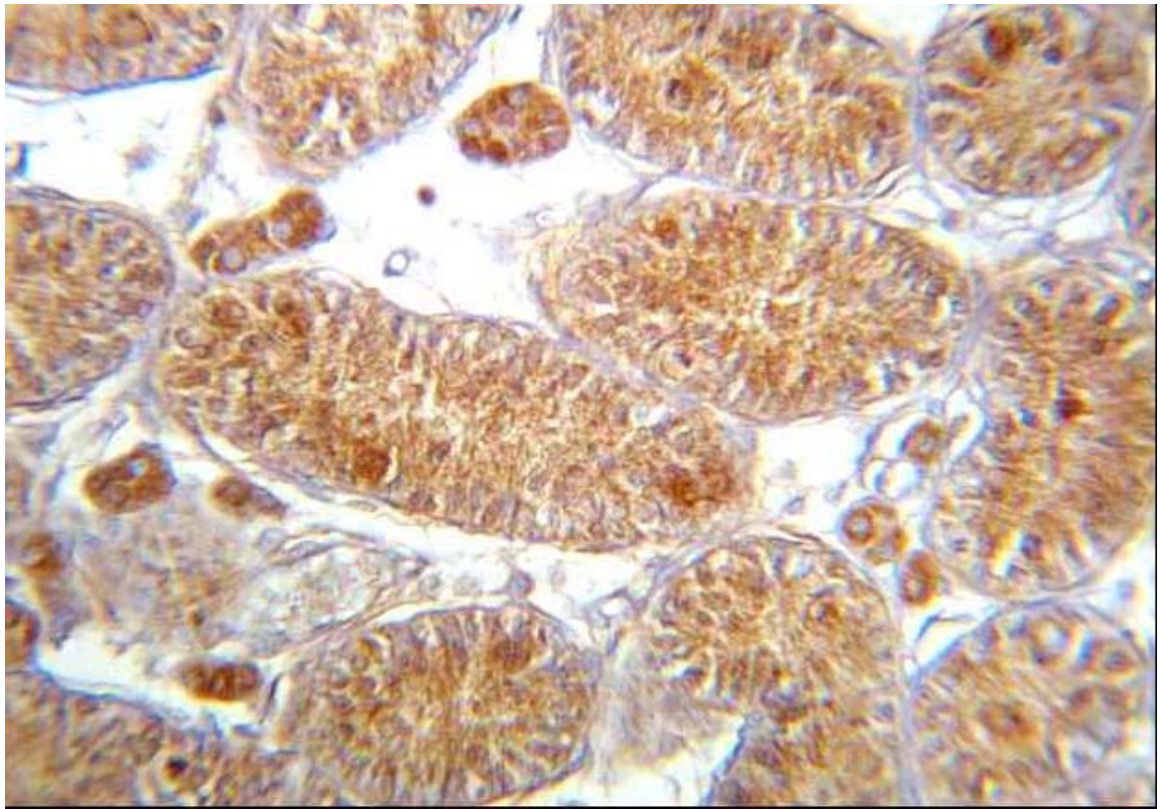


Abb. 4

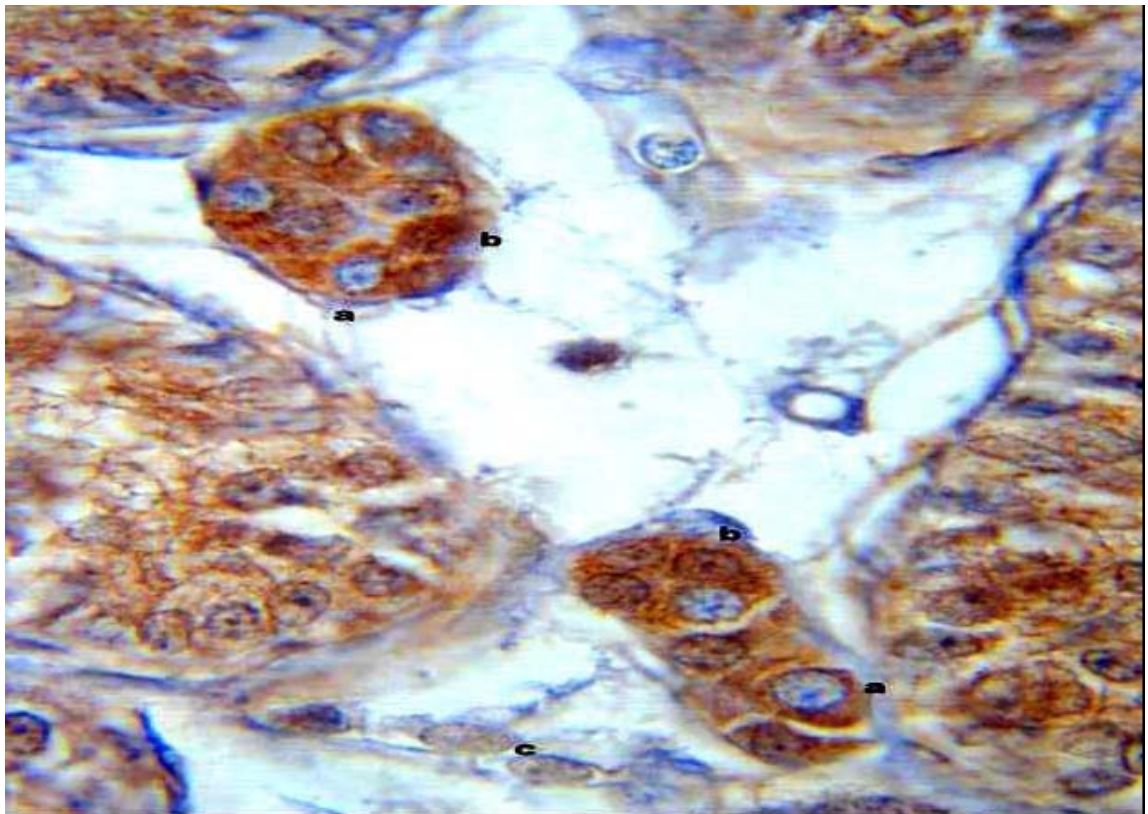


Abb. 5

Abb. 6-9 Immunhistochemische Darstellung von Cleaved-Caspase-3 in ALZ und FLZ

Abb. 6

Hoden der Wistarratte, 15. pnd. Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Cleaved-Caspase-3 in LZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x100.

Eine ALZ (A) weist im Zytoplasma eine mäßige bis starke Immunreaktion auf.

Die Immunreaktion im Cluster von FLZ (F) ist mäßig und befindet sich sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern.

Abb. 7

Hoden der Wistarratte, 15. pnd. Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Cleaved-Caspase-3 in LZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x100.

Eine ALZ (A) weist eine starke Immunreaktion sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern auf.

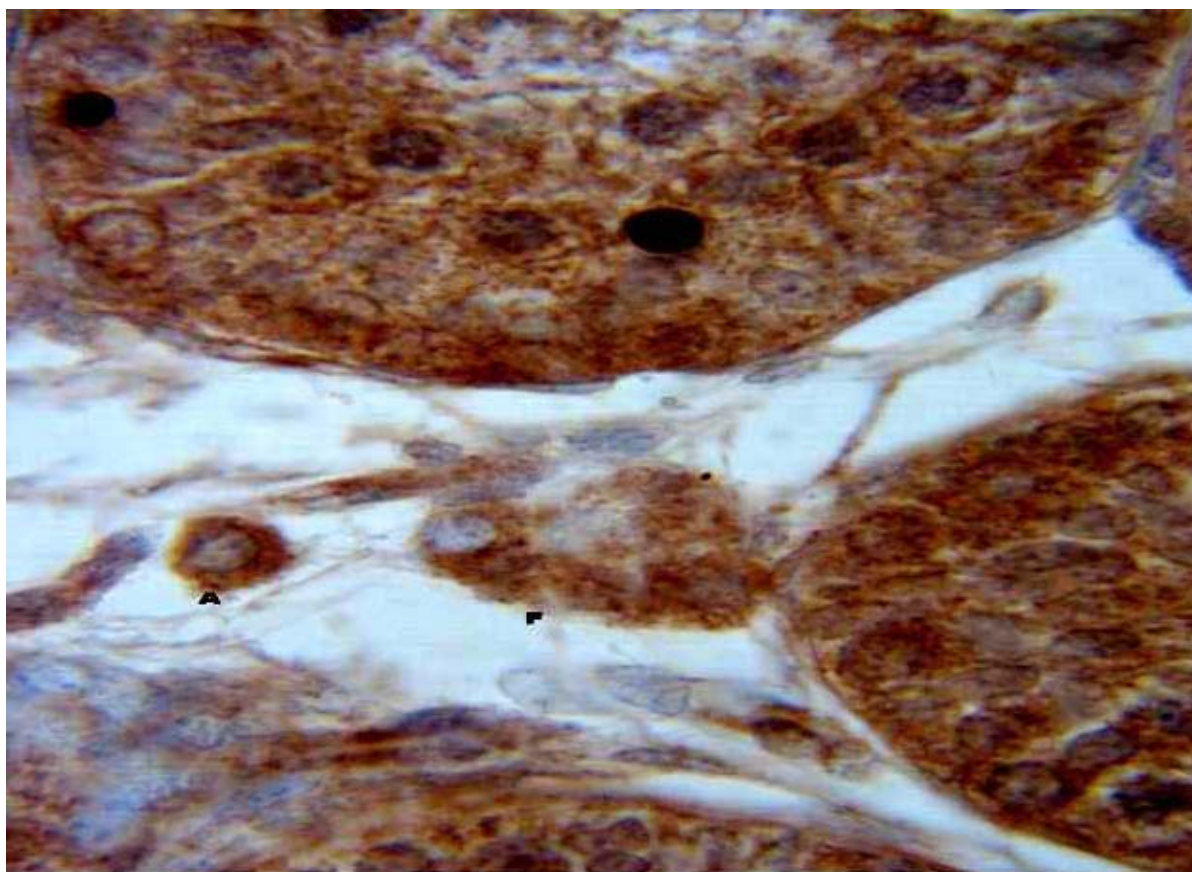


Abb. 6

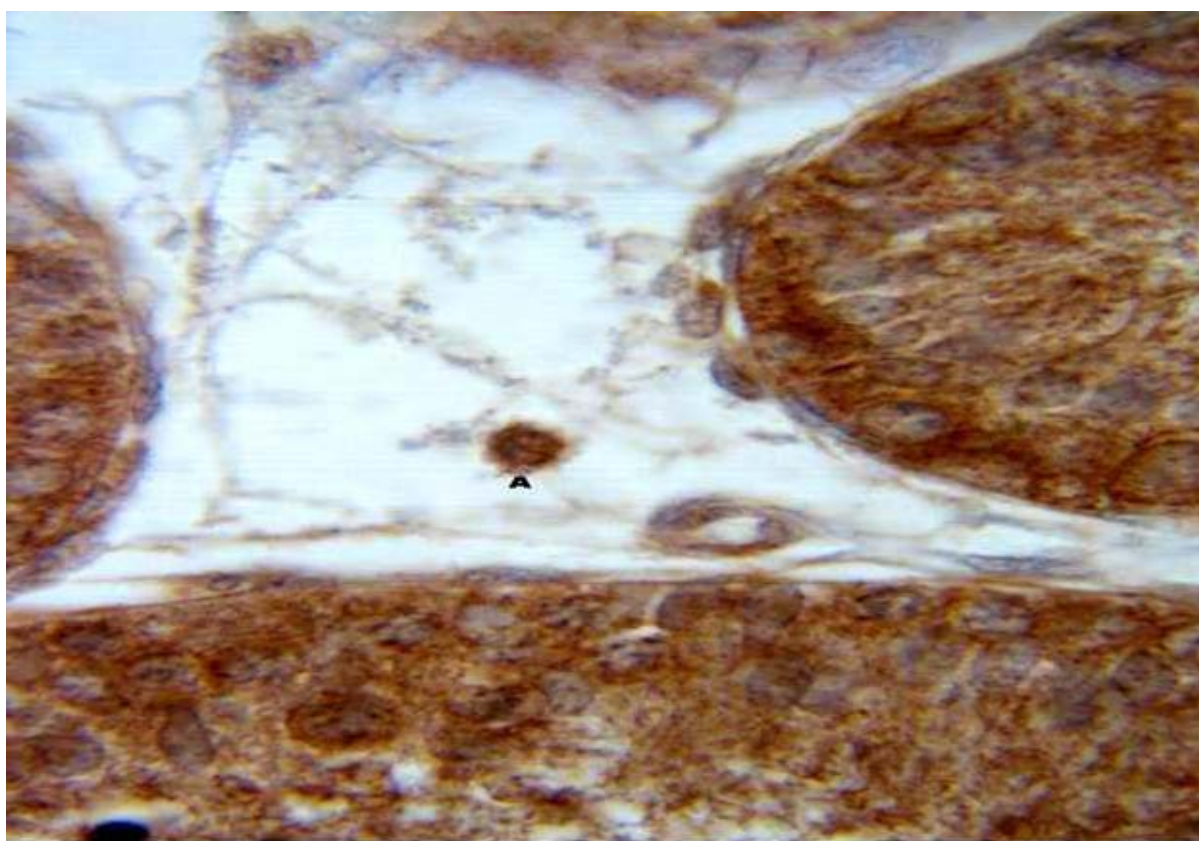


Abb. 7

Abb. 8

Hoden der Wistarratte, 25. pnd. Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Cleaved-Caspase-3 in LZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x40.

Die ALZ (A) und FLZ (F) weisen eine mäßige Immunreaktion auf.

Abb. 9

Hoden der Wistarratte, 25. pnd. **Eine Ausschnittvergrößerung aus der Abb. 8.**

Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Cleaved-Caspase-3 in LZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x100.

Im Bild sind sowohl FLZ (F) als auch eine ALZ (A) zu sehen. Die FLZ weisen eine Immunreaktion sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern auf. Die Immunreaktion in den ALZ befindet sich im Zytoplasma.

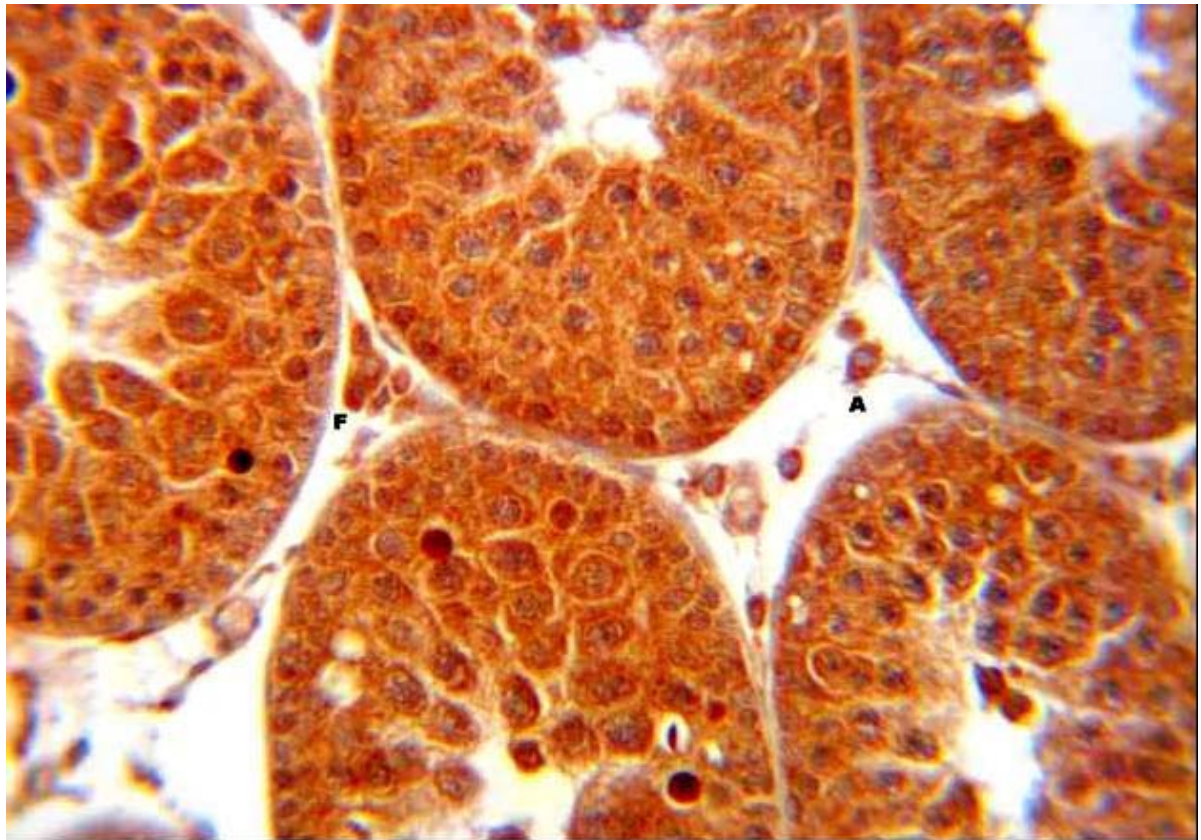


Abb. 8

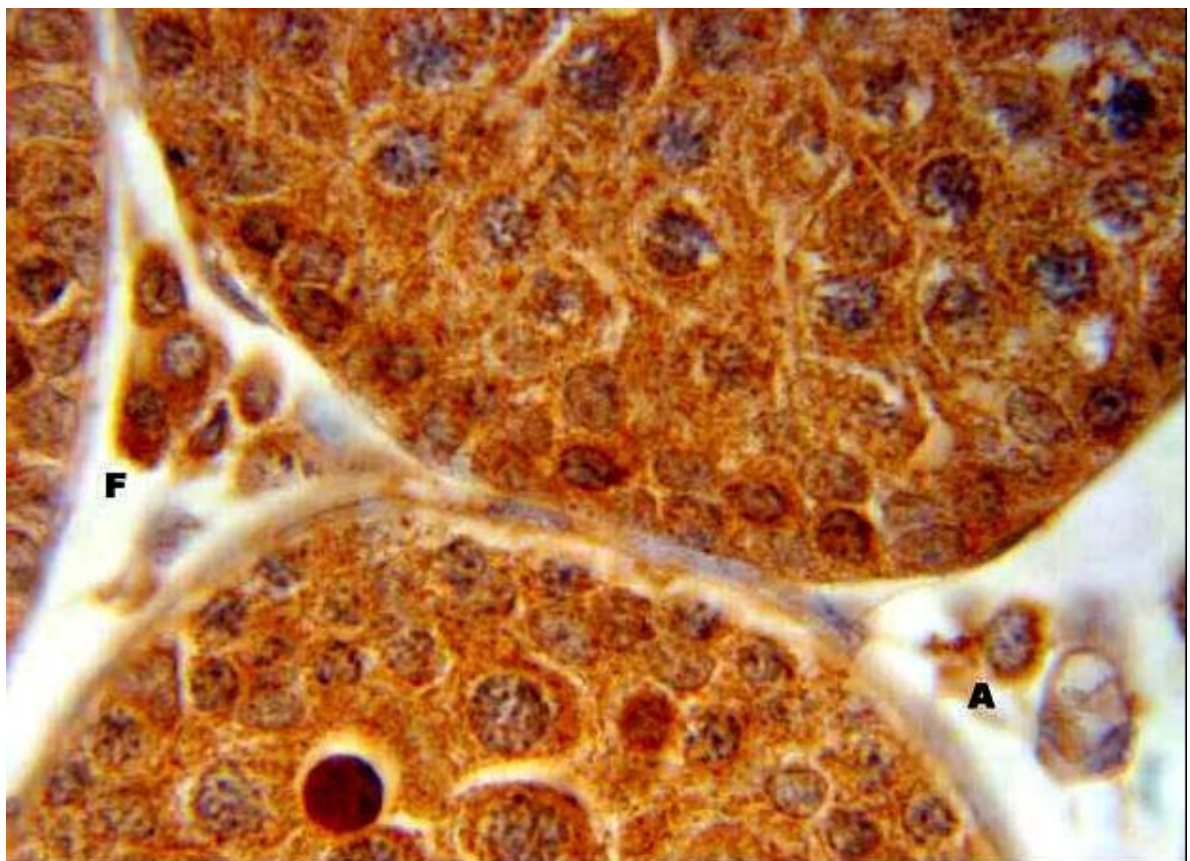


Abb. 9

Abb. 10 Immunhistochemische Darstellung von Cleaved-Caspase-3 in ALZ

Hoden der Wistarratte, 50. pnd. Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Cleaved-Caspase-3 in ALZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm.

Vergrößerung: x100.

Im Bild ist eine mäßige bis starke Immunreaktion in ALZ zu sehen. Die Immunreaktion befindet sich teilweise nur im Zytoplasma (a) und teilweise sowohl im Zytoplasma und auch im Zellkern (b). Es gibt nur vereinzelt ALZ ohne eine Immunreaktion (c).

Abb. 11 Negative Kontrolle für die Immunreaktion Cleaved-Caspase-3

Hoden der Wistarratte, 20. pnd. Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x40.

Diese negative Kontrolle stammte aus einem Schnitt, der nur mit Pufferlösung ohne Primärantikörper von Cleaved Caspase-3 inkubiert wurde. Hier sind keine braunen Präzipitate vorhanden.

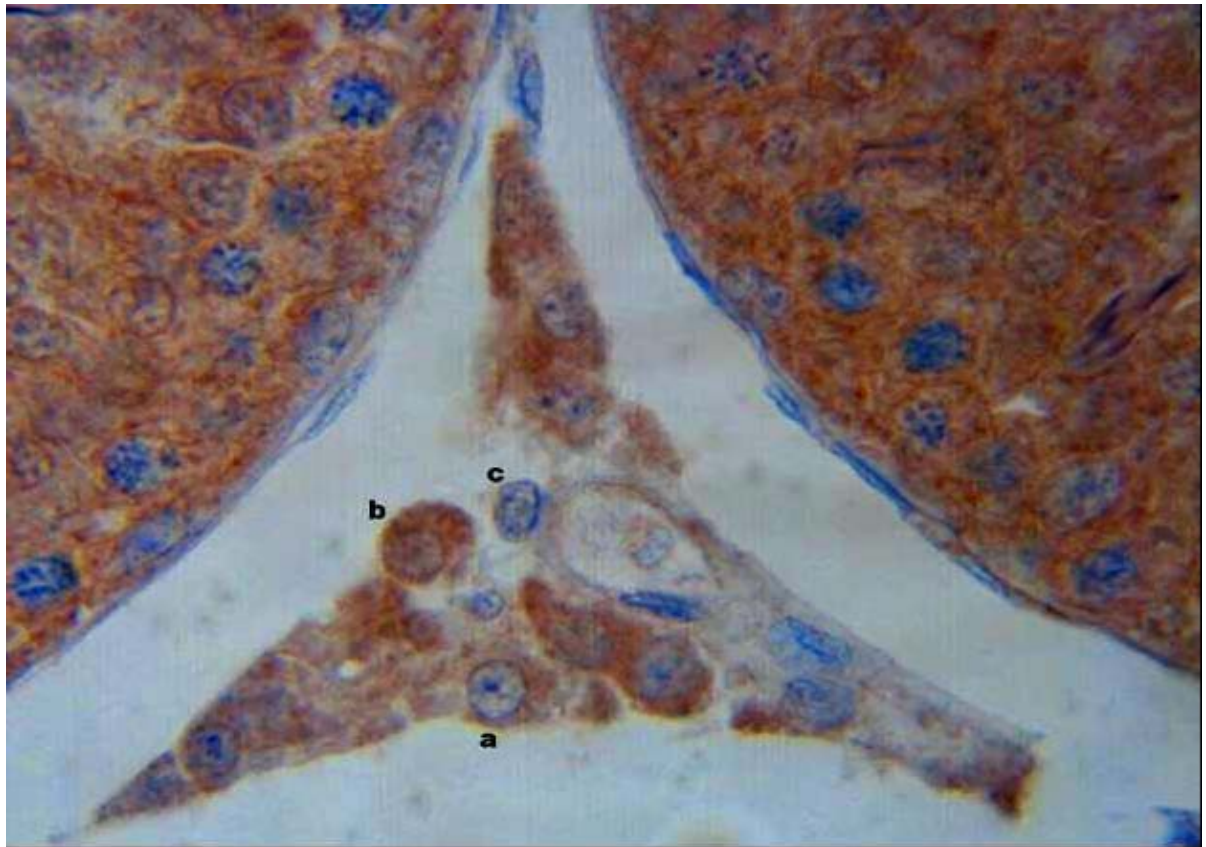


Abb. 10

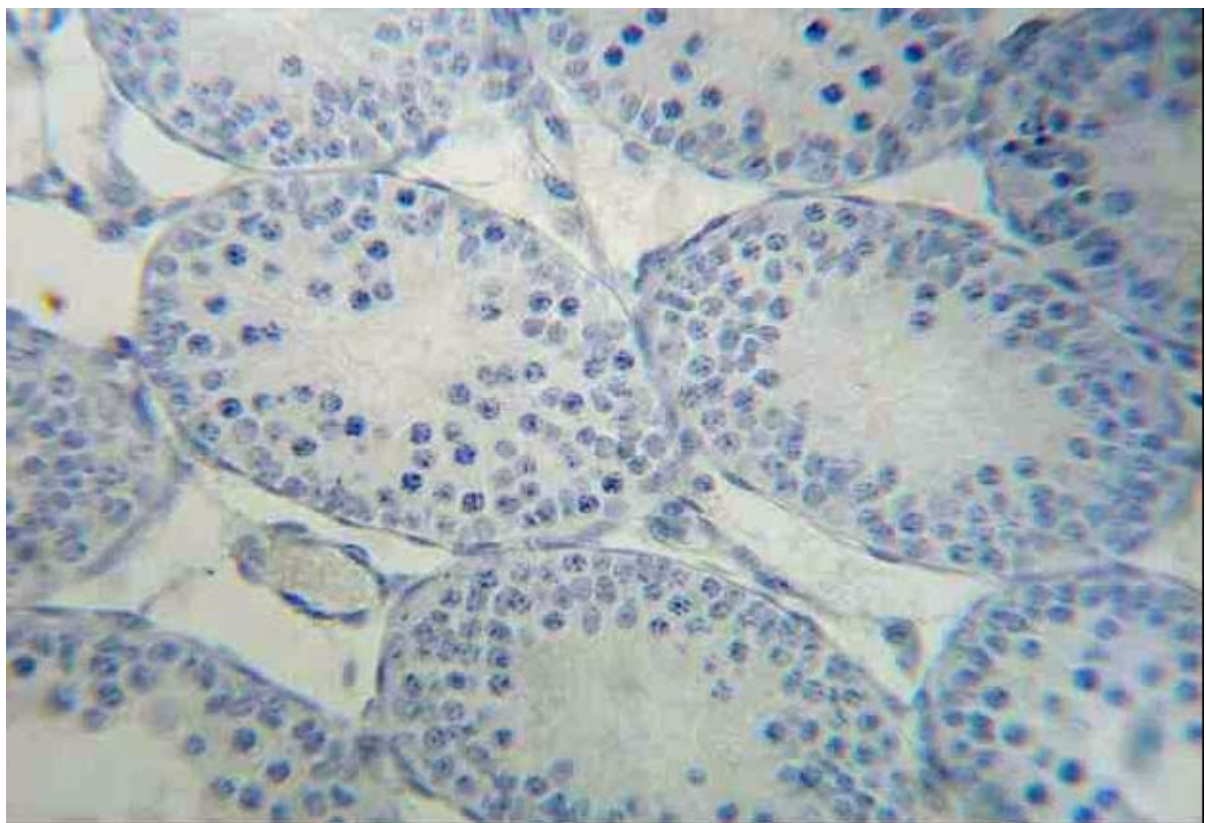


Abb. 11

Abb. 12

Dargestellt ist eine Grafik für den Verlauf der Immunreaktion für Cleaved-Caspase-3 in verschiedenen Reaktionsorten (Zytoplasma, Zellkern, gleichzeitig in Zytoplasma und Zellkern) der Leydigzellen (LZ = FLZ + ALZ) der Ratte bei verschiedenen Altersstufen.

Abszisse: Alter der Tiere in pnd.

Ordinate: Mittelwert der Prozentzahl der LZ mit Immunreaktion.

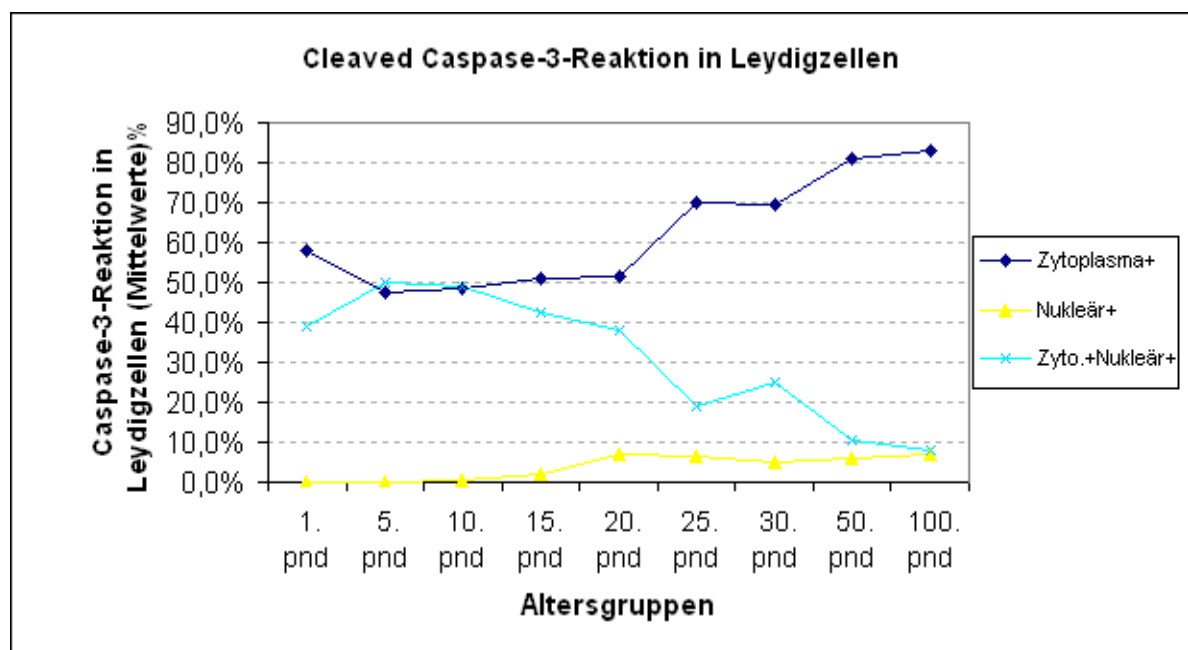


Abb.12

Abb. 13

Die Grafiken zeigen den Verlauf der Immunreaktion für Cleaved-Caspase-3 in FLZ und ALZ der Ratte bei verschiedenen Altersstufen.

Abszisse: Alter der Tiere in pnd.

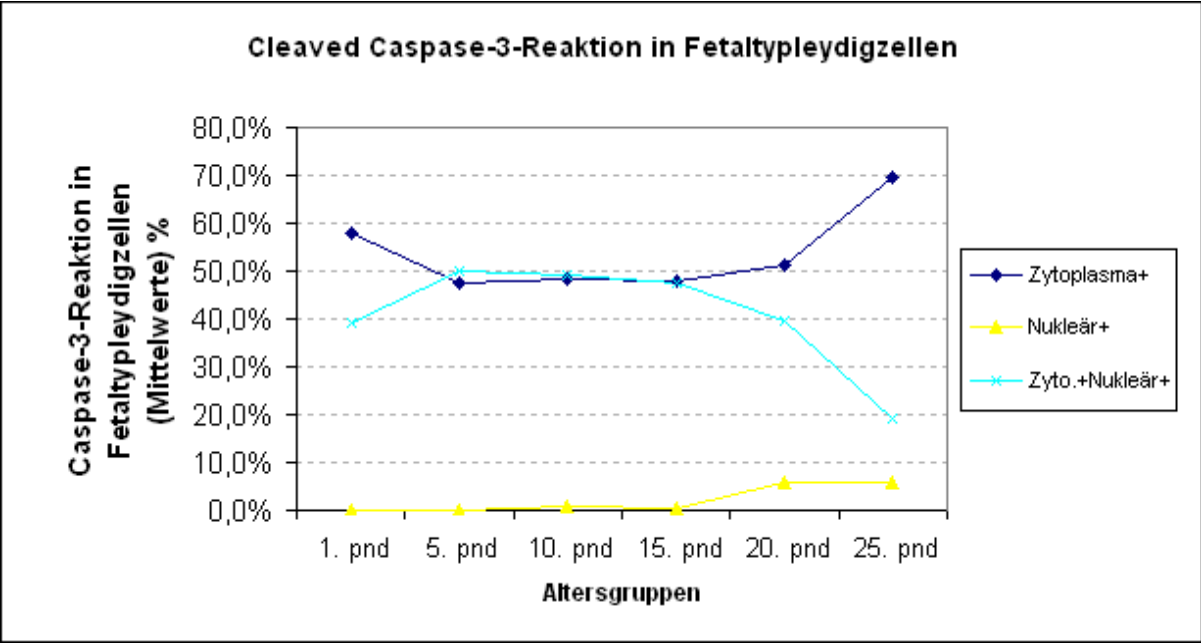
Ordinate: Mittelwert der Prozentzahl der LZ mit Immunreaktion.

a) Fetaltypyleydigzellen. Dargestellt ist der Verlauf der Immunreaktion in verschiedenen Reaktionsorten (Zytoplasma, Zellkern, gleichzeitig in Zytoplasma und Zellkern) der FLZ.

b) Adulttypyleydigzellen. Dargestellt ist der Verlauf der Immunreaktion in verschiedenen Reaktionsorten (Zytoplasma, Zellkern, gleichzeitig in Zytoplasma und Zellkern) der ALZ.

Abb.13

a)



b)

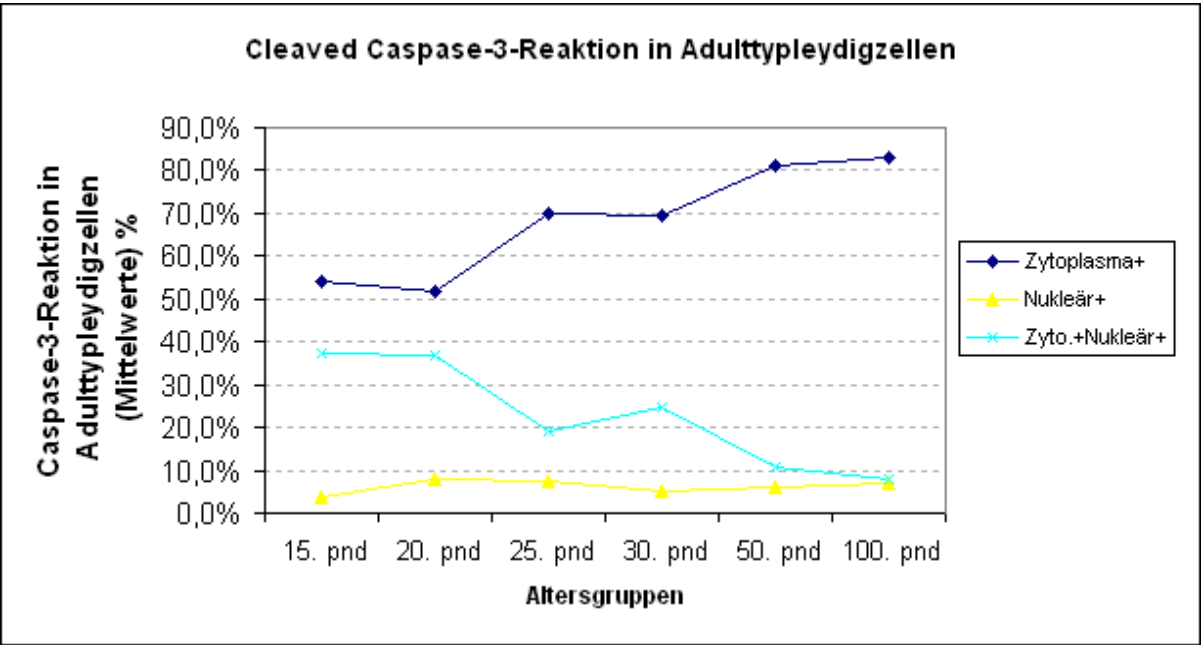


Abb. 14

Dargestellt sind Histogramme für den 1., 5. und 10. pnd.. Sie zeigen die Immunreaktion für Cleaved- Caspase-3 in FLZ der Ratte.

Ordinate: Mittelwert der Prozentzahl der LZ mit und ohne Immunreaktion sowie die Standardabweichung

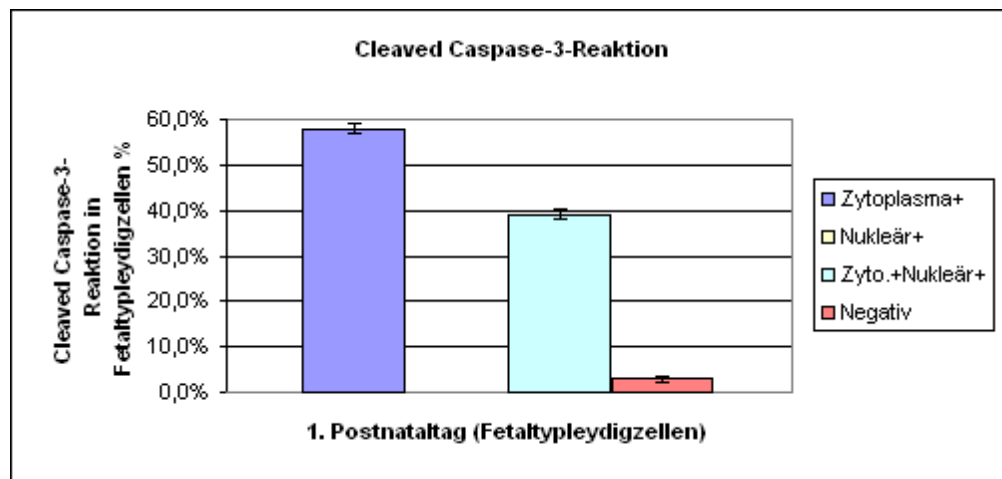
a) Das Histogramm ist dargestellt für den 1. pnd..

b) Das Histogramm ist dargestellt für den 5. pnd..

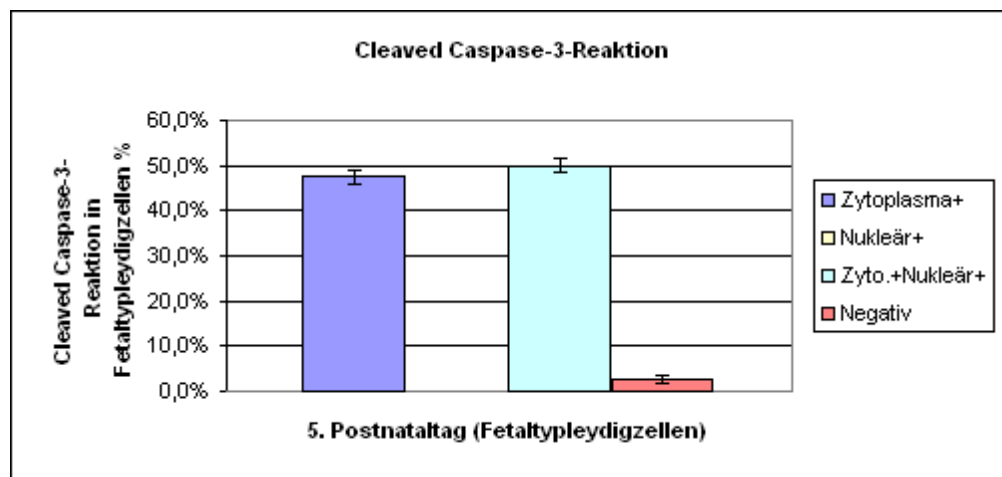
c) Das Histogramm ist dargestellt für den 10.pnd.

Abb.14

a)



b)



c)

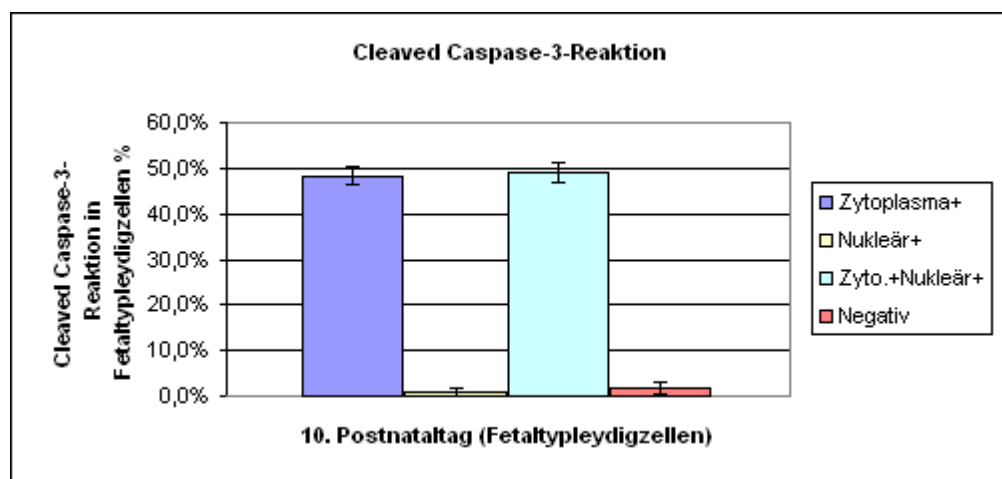


Abb. 15

Dargestellt sind Histogramme für den 15., 20. und 25. pnd. Sie präsentieren die Immunreaktion für Cleaved-Caspase-3 sowohl in FLZ als auch in ALZ der Ratte. Ordinate: Mittelwert der Prozentzahl der LZ mit und ohne Immunreaktion sowie die Standardabweichung

a)-c) Die Histogramme sind dargestellt für den 15. pnd.

a) Immunreaktion in Leydigzellen (LZ = FLZ + ALZ)

b) Immunreaktion in FLZ.

c) Immunreaktion in ALZ.

d)-f) Die Histogramme sind dargestellt für den 20. pnd.

d) Immunreaktion in LZ

e) Immunreaktion in FLZ.

f) Immunreaktion in ALZ

g)-i) Die Histogramme sind dargestellt für den 25. pnd.

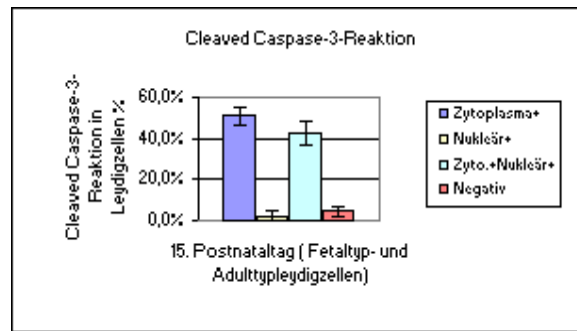
g) Immunreaktion in LZ

h) Immunreaktion in FLZ

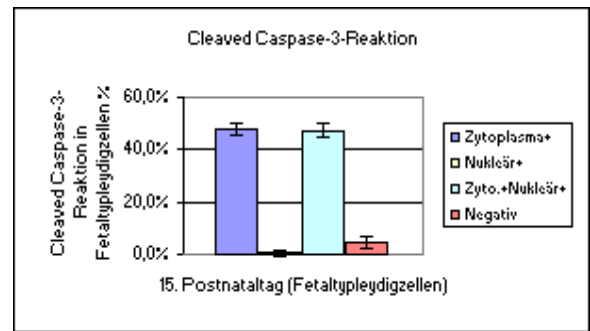
i) Immunreaktion in ALZ

Abb. 15

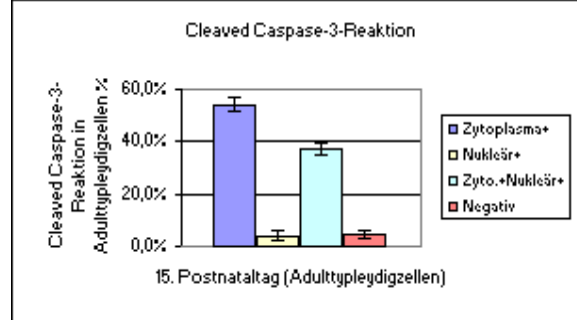
a)



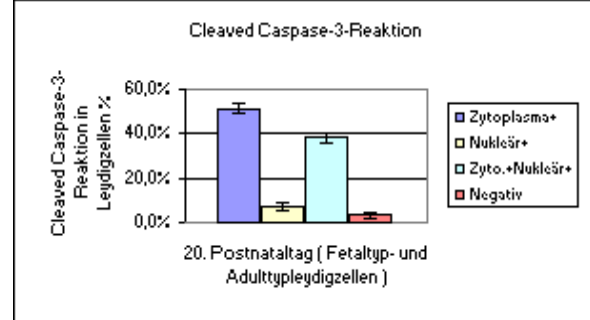
b)



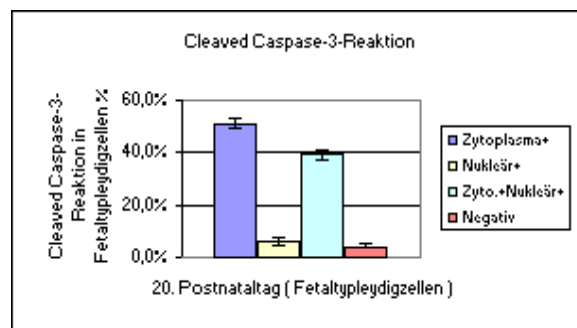
c)



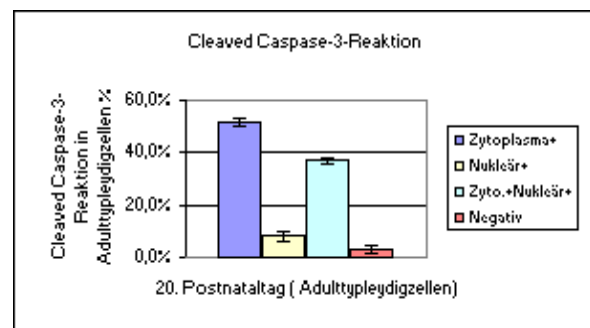
d)



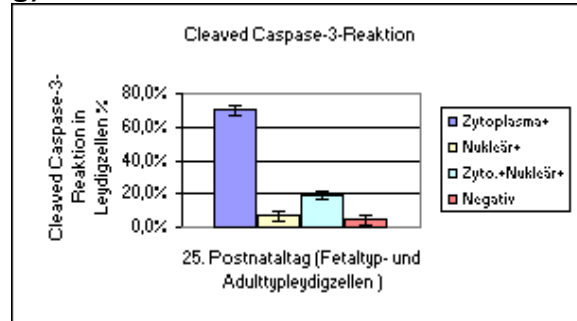
e)



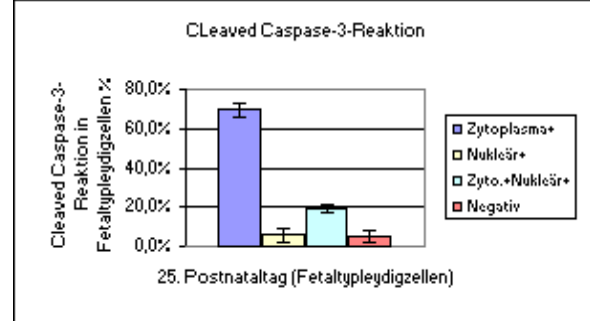
f)



g)



h)



i)

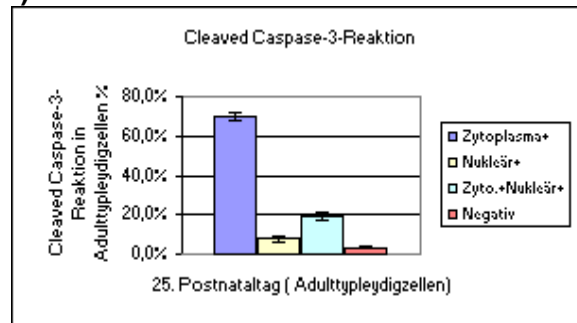


Abb. 16

Dargestellt sind Histogramme für den 30., 50. und 100. pnd. Sie zeigen die Immunreaktion für Cleaved-Caspase-3 in ALZ der Ratte.

Ordinate: Mittelwert der Prozentzahl der LZ mit und ohne Immunreaktion sowie die Standardabweichung

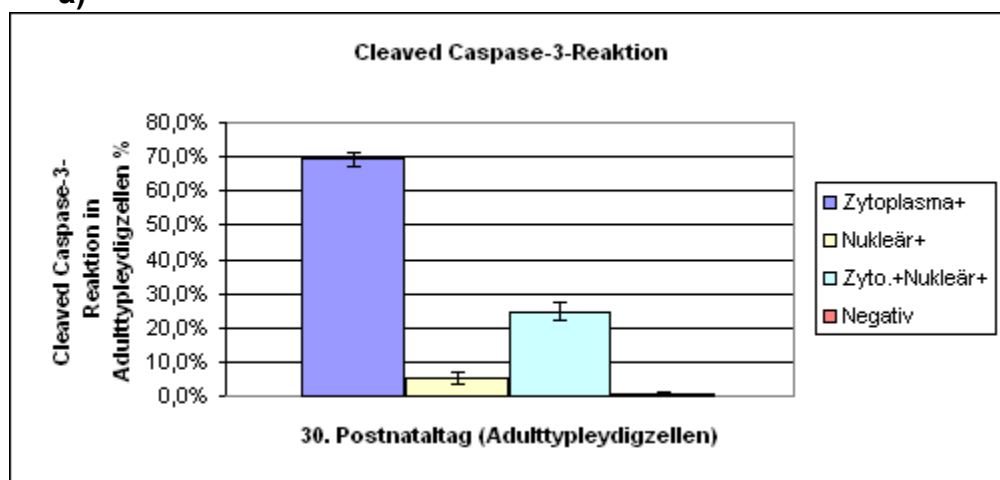
a) Das Histogramm ist dargestellt für den 30. pnd.

b) Das Histogramm ist dargestellt für den 50. pnd.

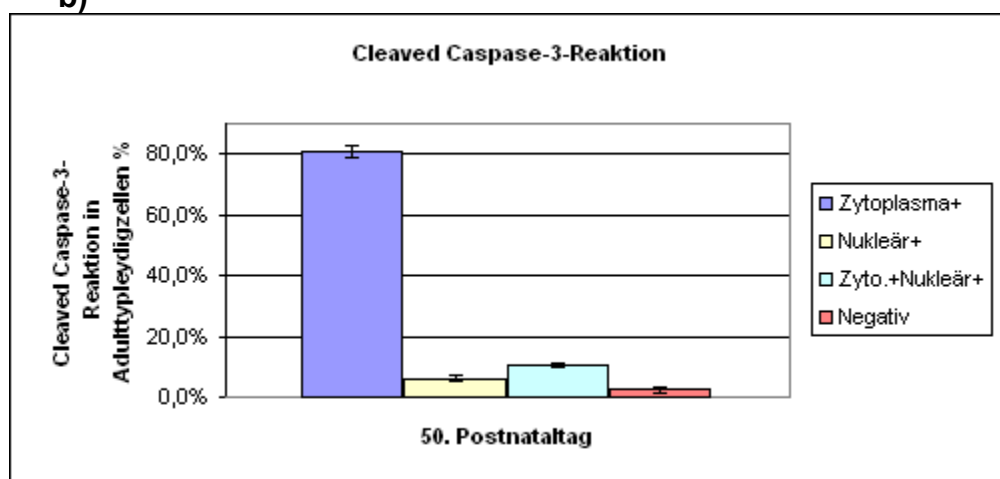
c) Das Histogramm ist dargestellt für den 100.pnd.

**Abb.
16**

a)



b)



c)

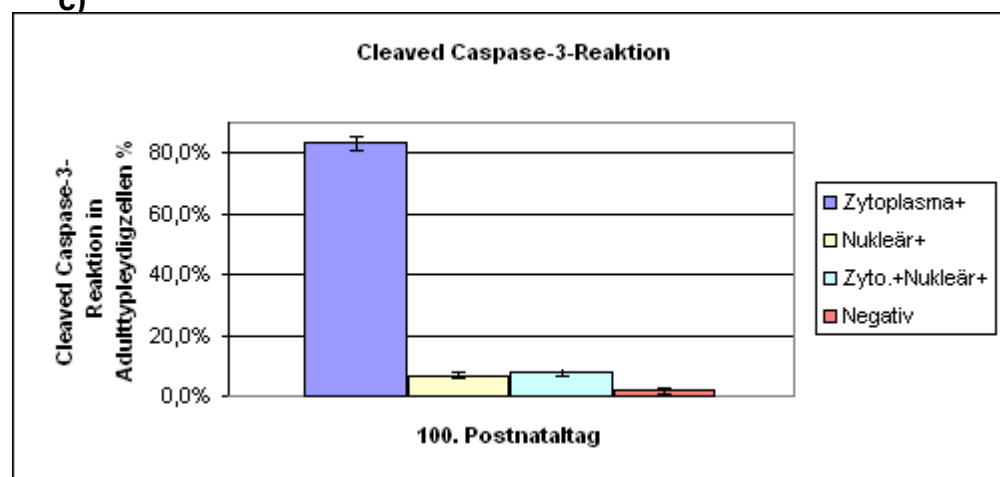


Abb. 17-19 Immunhistochemische Darstellung von Bcl-2 in FLZ

Abb. 17

Hoden der Wistarratte, 1. pnd Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Bcl-2 in FLZ. Blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x10. Übersicht von Hodengewebe. Die braune Immunreaktion fehlt.

Abb. 18

Hoden der Wistarratte, 1. pnd Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Bcl-2 in FLZ. Blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x40. Es findet keine Immunreaktion in den Clustern von FLZ statt.

Abb. 19

Hoden der Wistarratte, 5. pnd Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Bcl-2 in FLZ. Blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x40. Eine braune Immunreaktion in den Clustern von FLZ fehlt.

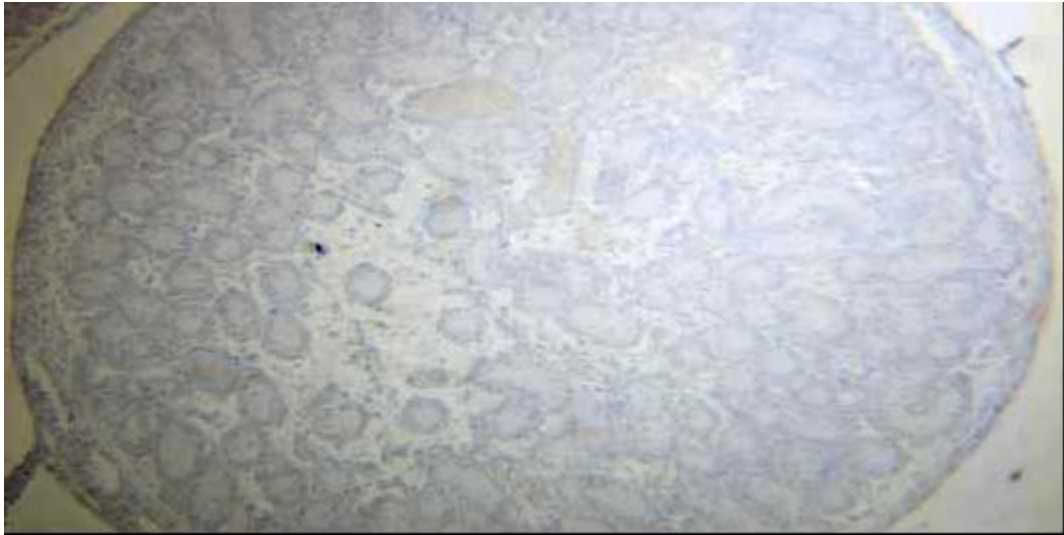


Abb. 17

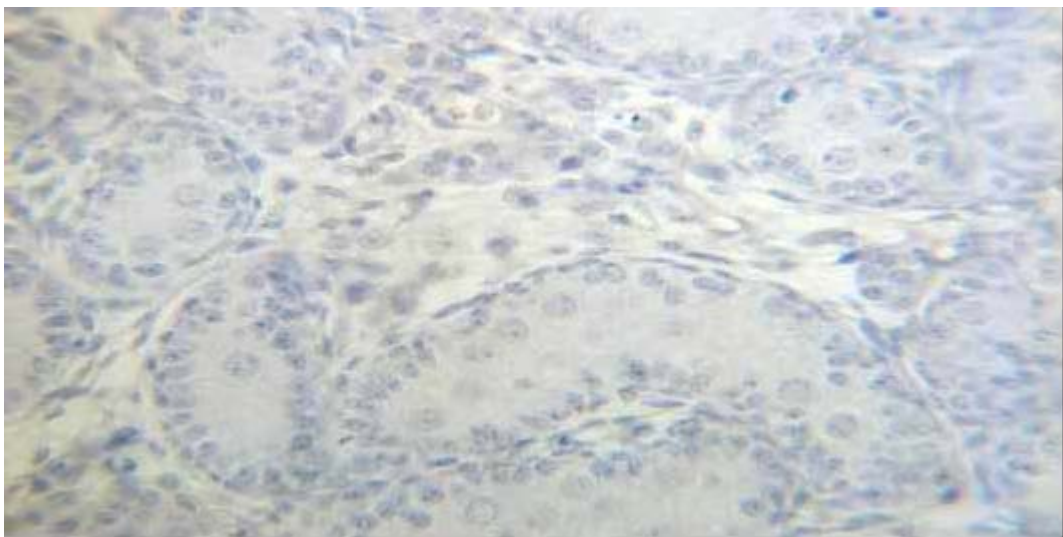


Abb. 18

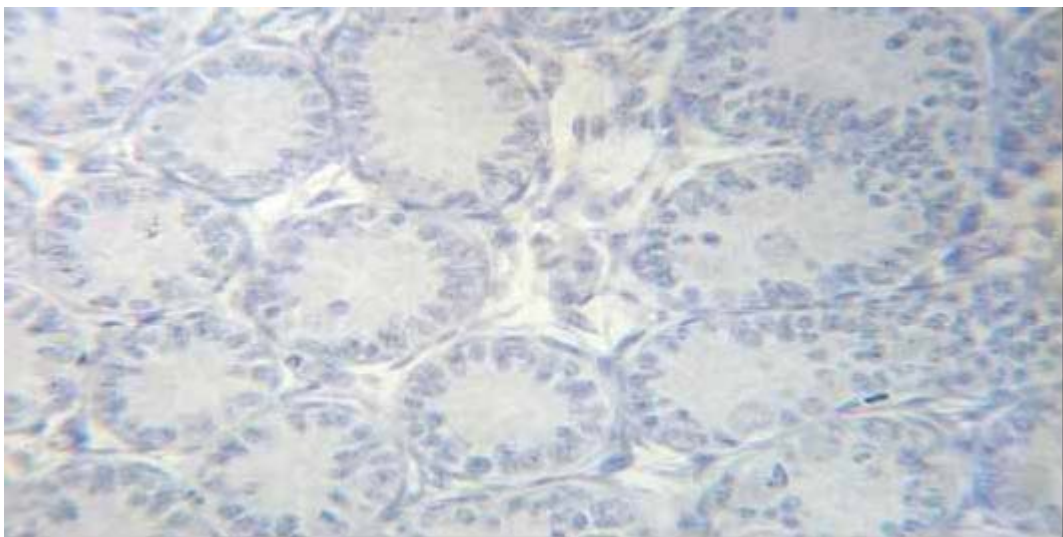


Abb. 19

Abb. 20 Immunhistochemische Darstellung von Bcl-2 in FLZ und ALZ

Abb. 20

Hoden der Wistarratte, 25. pnd Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Bcl-2 in LZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x100.

Im Bild sind sowohl FLZ als auch ALZ zu sehen. Die ALZ (A) weisen eine mäßige Immunreaktion im Zytoplasma auf, wohingegen die Immunreaktion in den FLZ (F) fehlt.

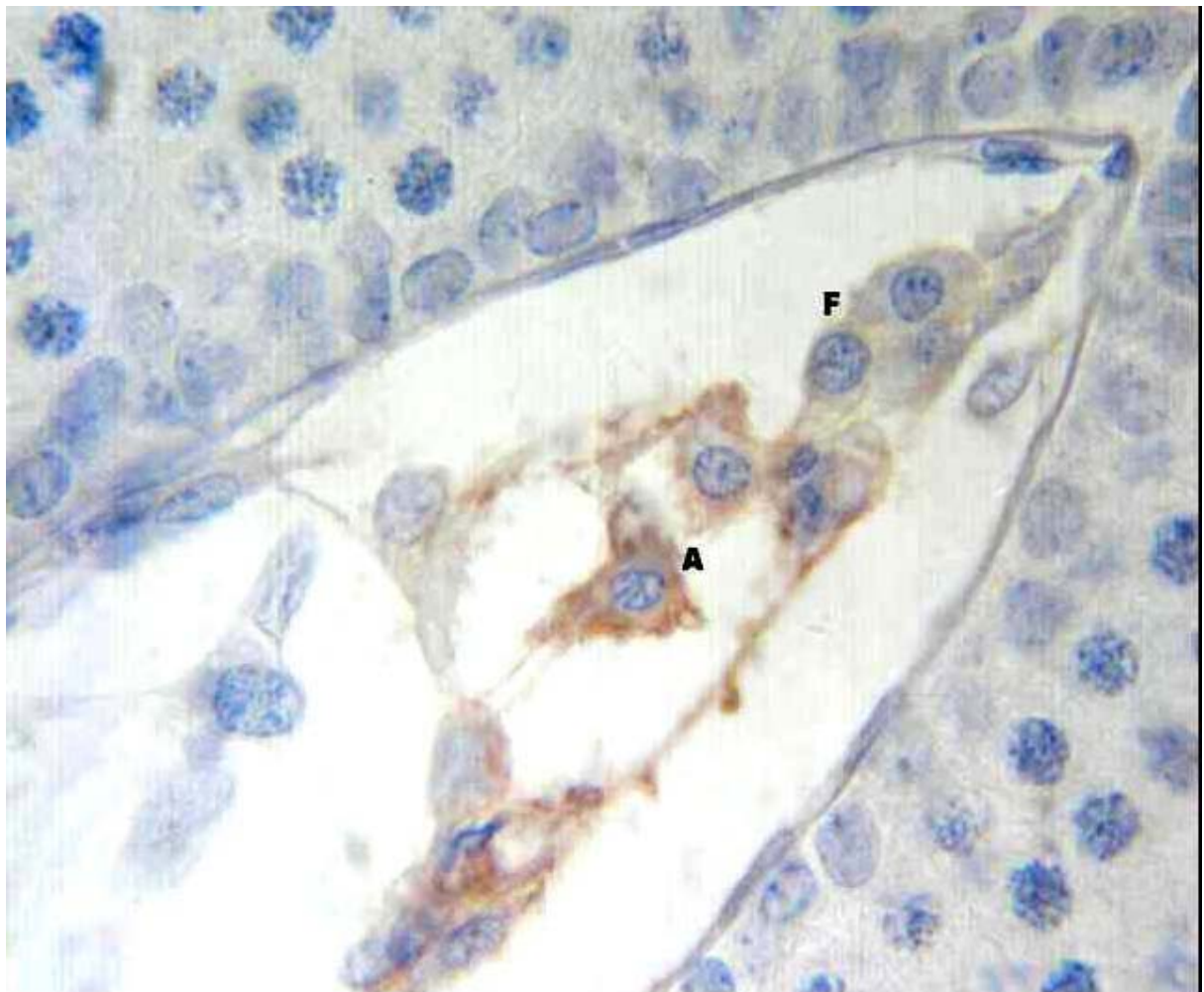


Abb. 20

Abb. 21-24 Immunhistochemische Darstellung von Bcl-2 in ALZ

Abb. 21

Hoden der Wistarratte, 30. pnd Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Bcl-2 in ALZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x40.

Die ALZ zeigen eine mäßige bis starke Immunreaktion. Zusätzlich beobachtet man eine distinkte starke Reaktion in den Akrosomkappen der runden Spermatiden.

Abb. 22

Hoden der Wistarratte, 30. pnd **Eine Ausschnittvergrößerung aus der Abb. 20.**

Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Bcl-2 in ALZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x100.

Die Immunreaktion befindet sich nur im Zytoplasma der ALZ.

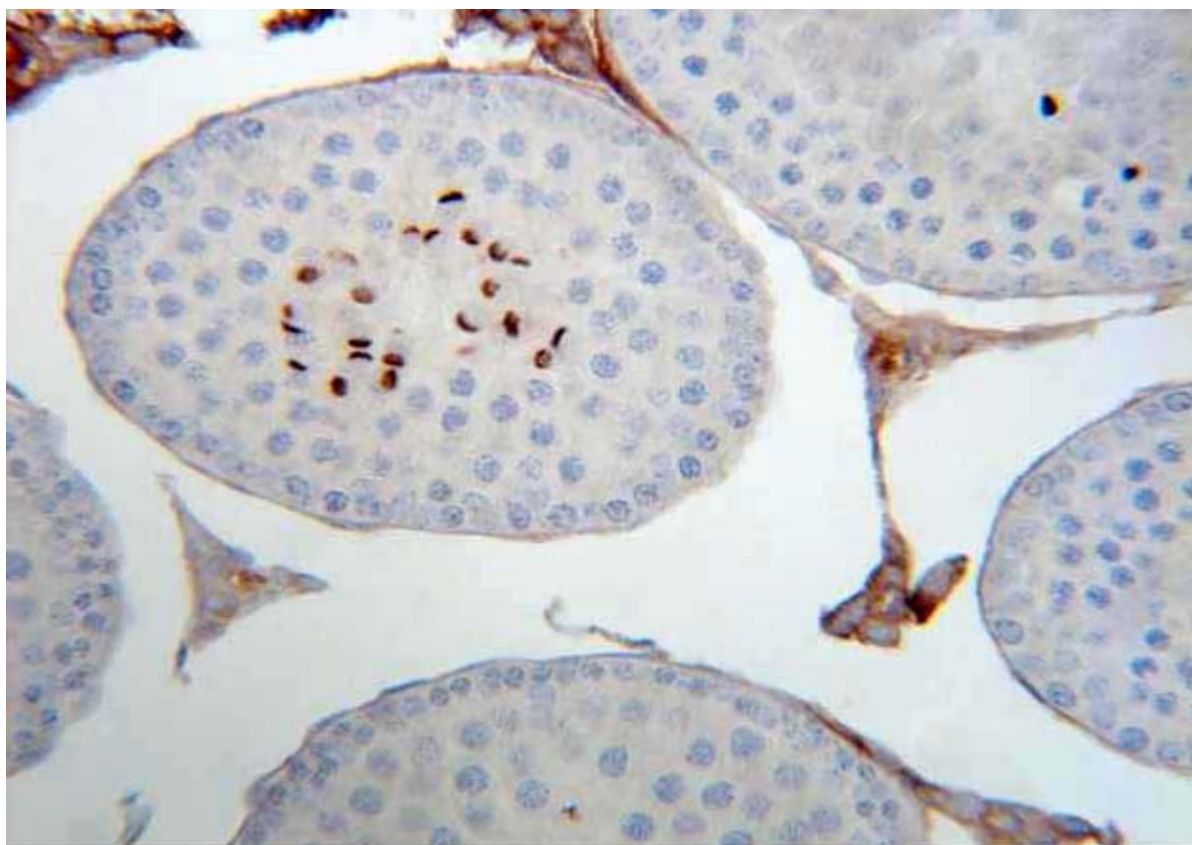


Abb. 21

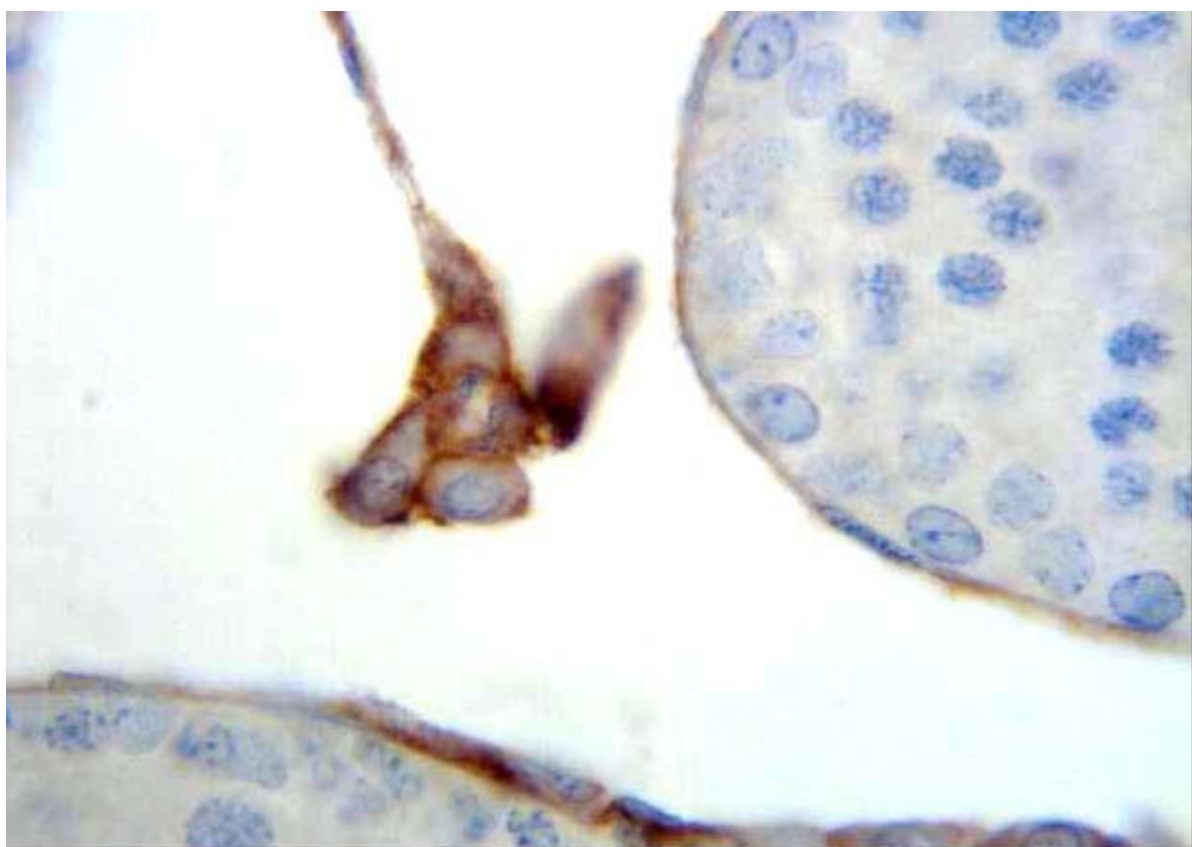


Abb. 22

Abb. 23

Hoden der Wistarratte, 50. pnd Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Bcl-2 in ALZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x40.

Die ALZ weisen eine mäßige bis starke Immunreaktion im Zytoplasma auf.

Abb. 24

Hoden der Wistarratte, 50. pnd **Eine Ausschnittvergrößerung aus der Abb. 23.**

Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Bcl-2 in ALZ. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x100.

Die Immunreaktion befindet sich nur im Zytoplasma der ALZ.

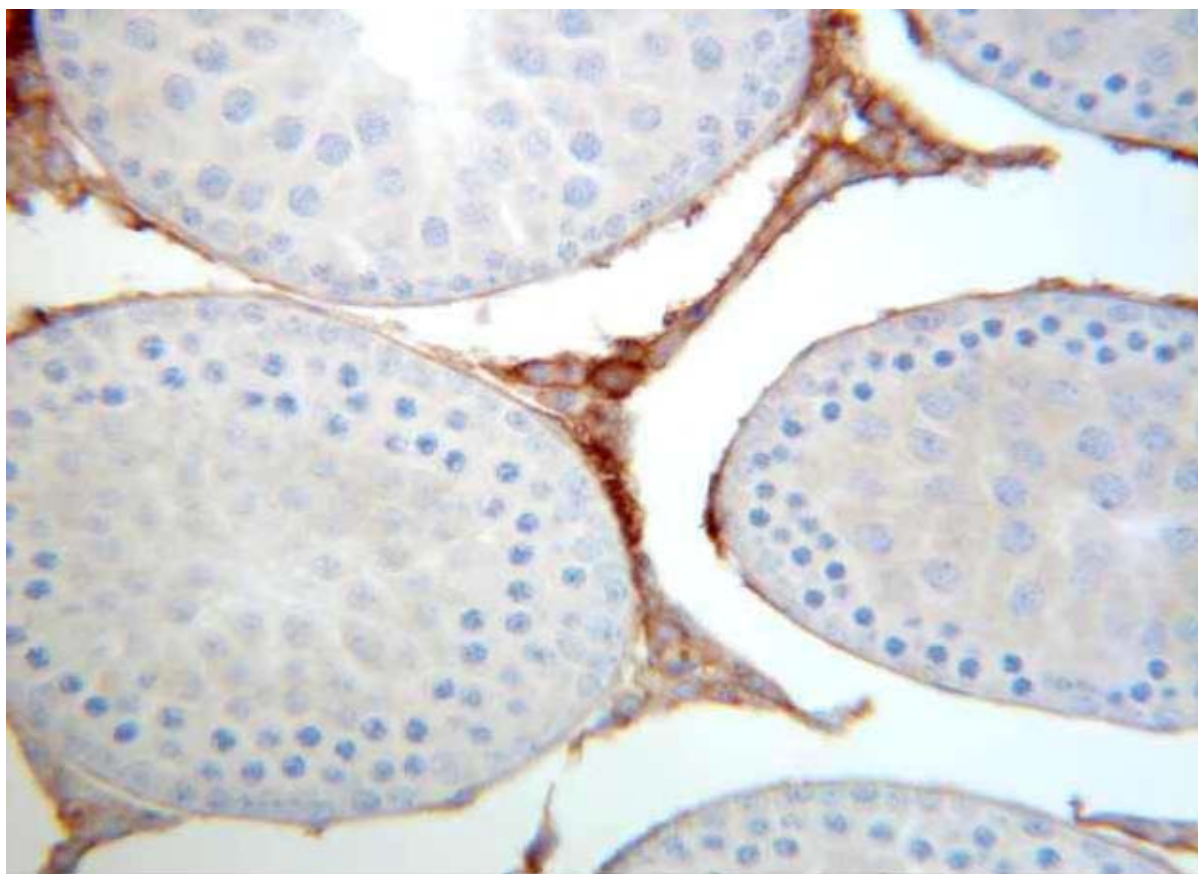


Abb. 23

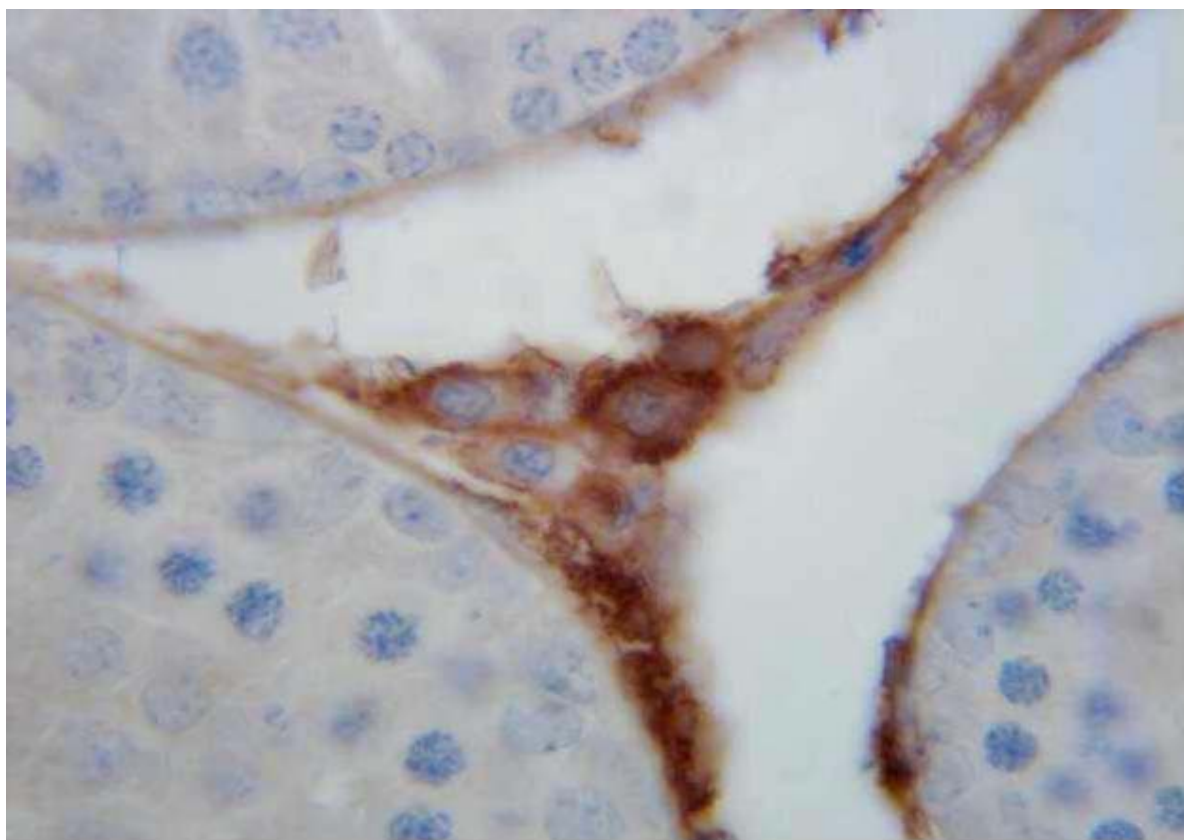


Abb. 24

Abb. 25 Negative Kontrolle für die Immunreaktion Bcl-2

Hoden der Wistarratte, 30. pnd Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes. Blau:

Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x40.

Diese negative Kontrolle stammte aus einem Schnitt, der ohne Primärantikörper von Bcl-2 inkubiert wurde.

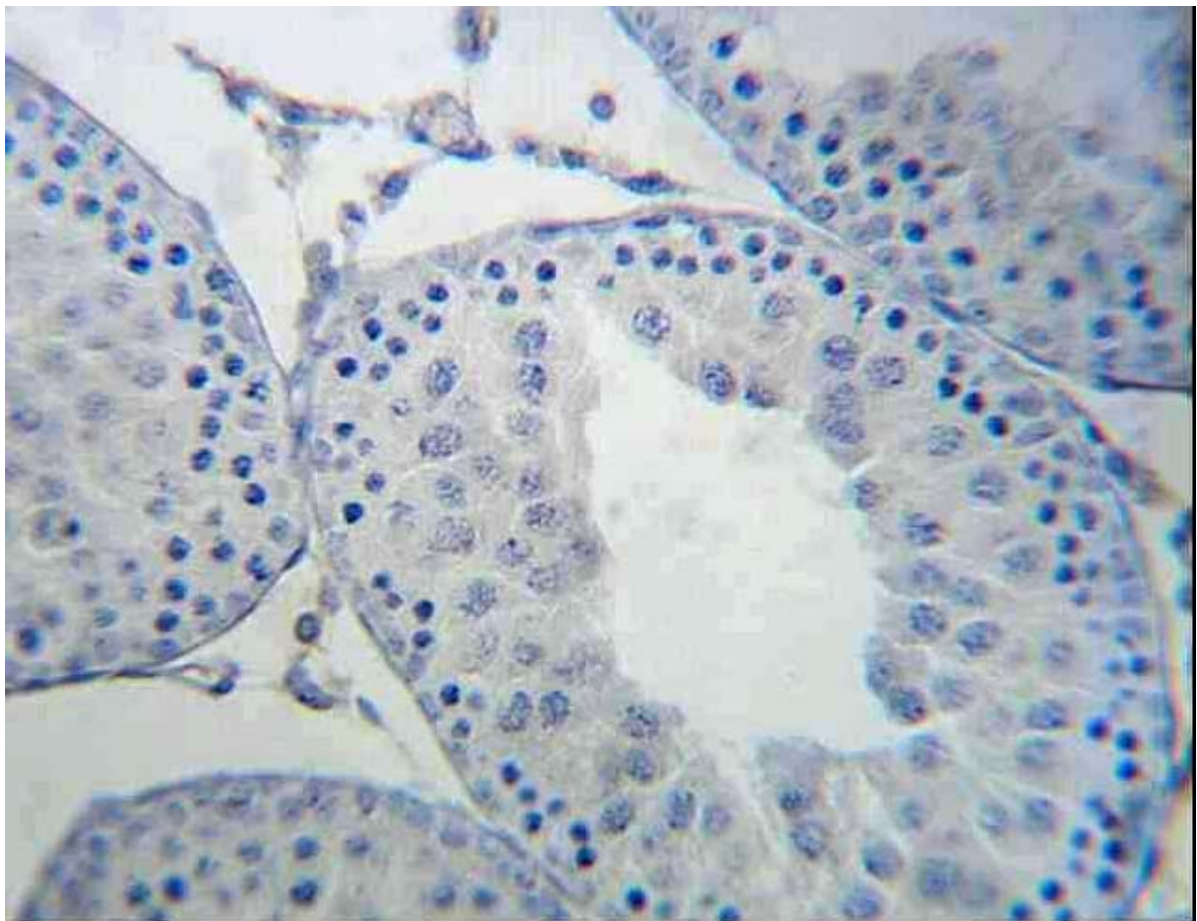


Abb. 25

Abb. 26

Die Grafik zeigt den Verlauf der Immunreaktion für Bcl-2 in Adulttyp-Leydigzellen (ALZ) der Ratte bei verschiedenen Altersstufen.

Abszisse: Alter der Tiere in pnd

Ordinate: Zahl der ALZ pro mm²

Zytoplasma+ = ALZ, die im Zytoplasma eine Immunreaktion zeigen.

Negativ = ALZ ohne Immunreaktion

Abb. 27 a)-f)

Dargestellt sind Histogramme für den 15., 20., 25., 30., 50. und 100. pnd. Sie zeigen die Immunreaktion für Bcl-2 in ALZ der Ratte. Die Immunreaktion befindet sich nur im Zytoplasma der ALZ.

Abszisse: Alter der Tiere in pnd

Ordinate: Zahl der ALZ pro mm² und die Standardabweichung

Zytoplasma+ = ALZ, die im Zytoplasma eine Immunreaktion zeigen.

Negativ = ALZ ohne Immunreaktion

Abb. 26

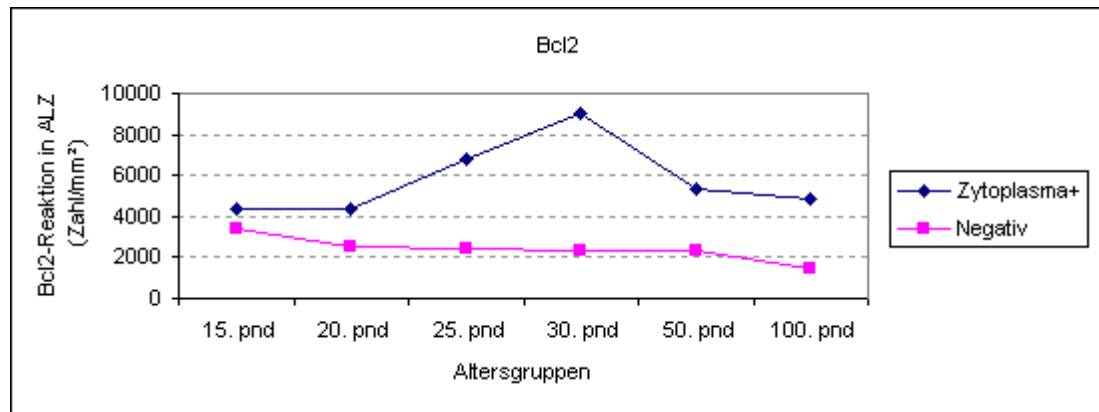


Abb. 27

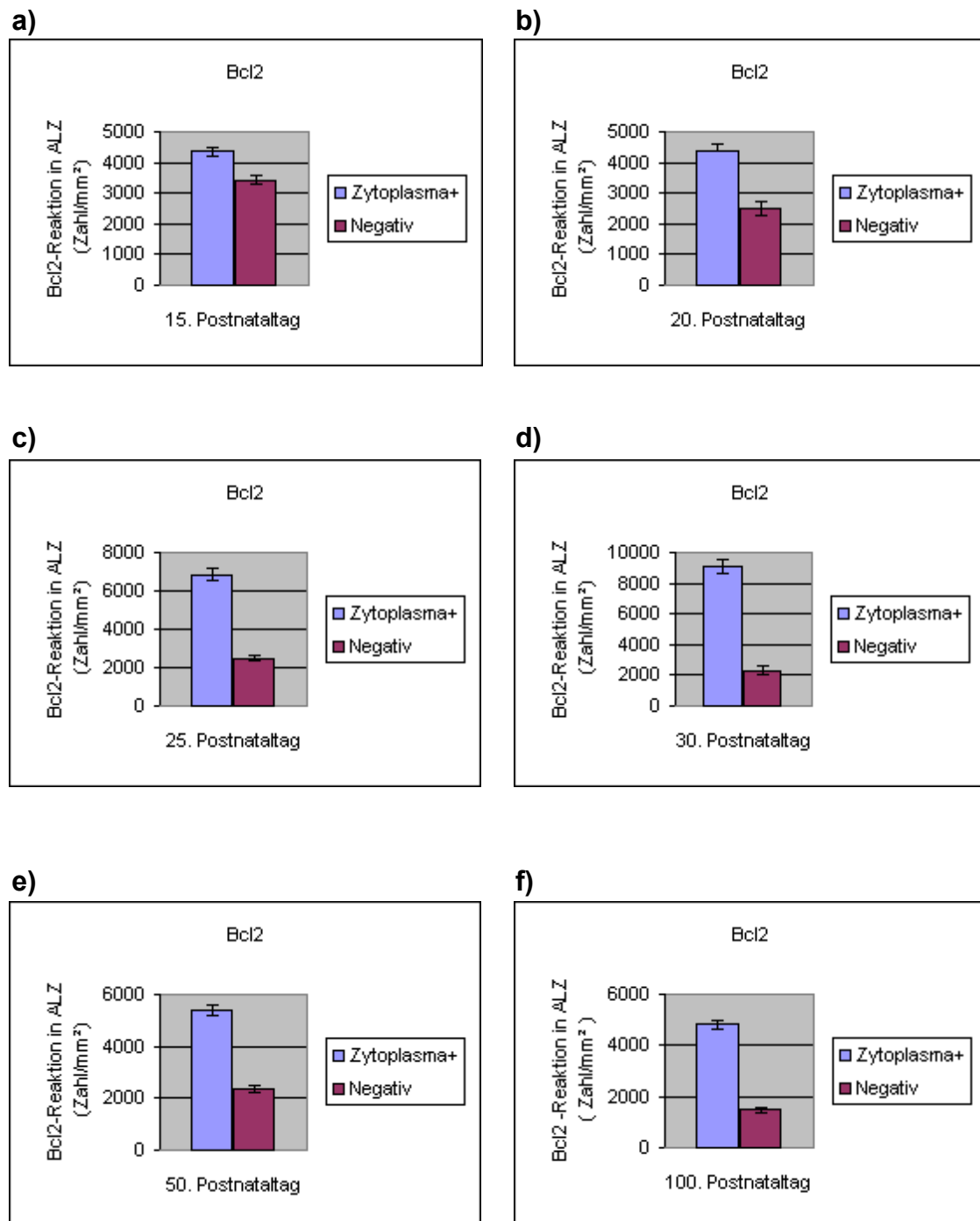


Abb. 28 Immunhistochemische Darstellung von Bcl-2 in den Akrosomkappen

Hoden der Wistarratte, 30. pnd **Eine Ausschnittvergrößerung aus der Abb. 21.**

Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes mit immunhistochemischer Darstellung von einem apoptotischen Marker Bcl-2 in Akrosomkappen. Braun: Immunreaktion, blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x100.

Eine starke Immunreaktion befindet sich spezifisch supranukleär in den Akrosomkappen der runden Spermatiden.

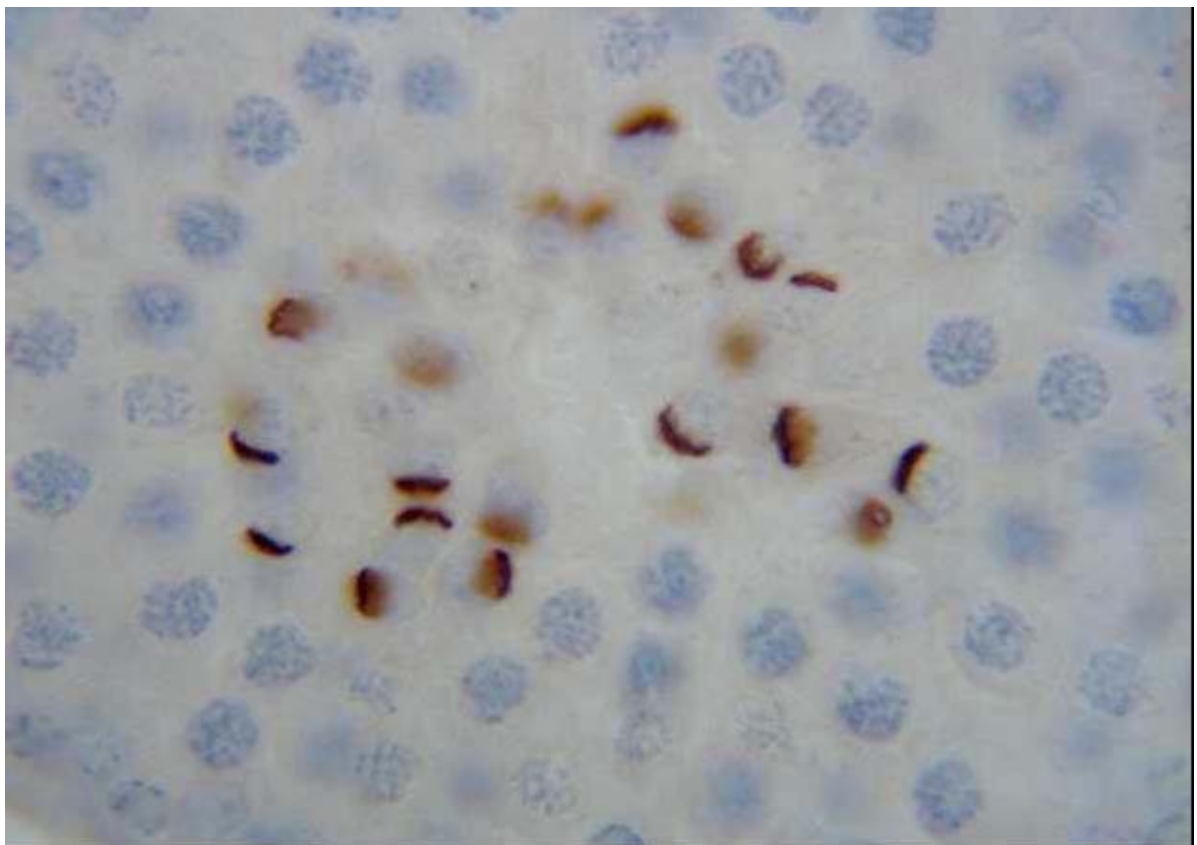


Abb. 28

Abb. 29 Immunhistochemie von Bcl-2 im Blutgefäß

Hoden der Wistarratte, 30. pnd Lichtmikroskopisches Bild eines Paraffinschnittes. Braun: Immunreaktion, Blau: Kernfärbung durch Hämalaun. Schnittdicke: 4 µm. Vergrößerung: x100.

In der Gefäßwand fehlt eine Immunreaktion. Dagegen zeigen die ALZ (A) eine starke Immunreaktion im Zytoplasma.

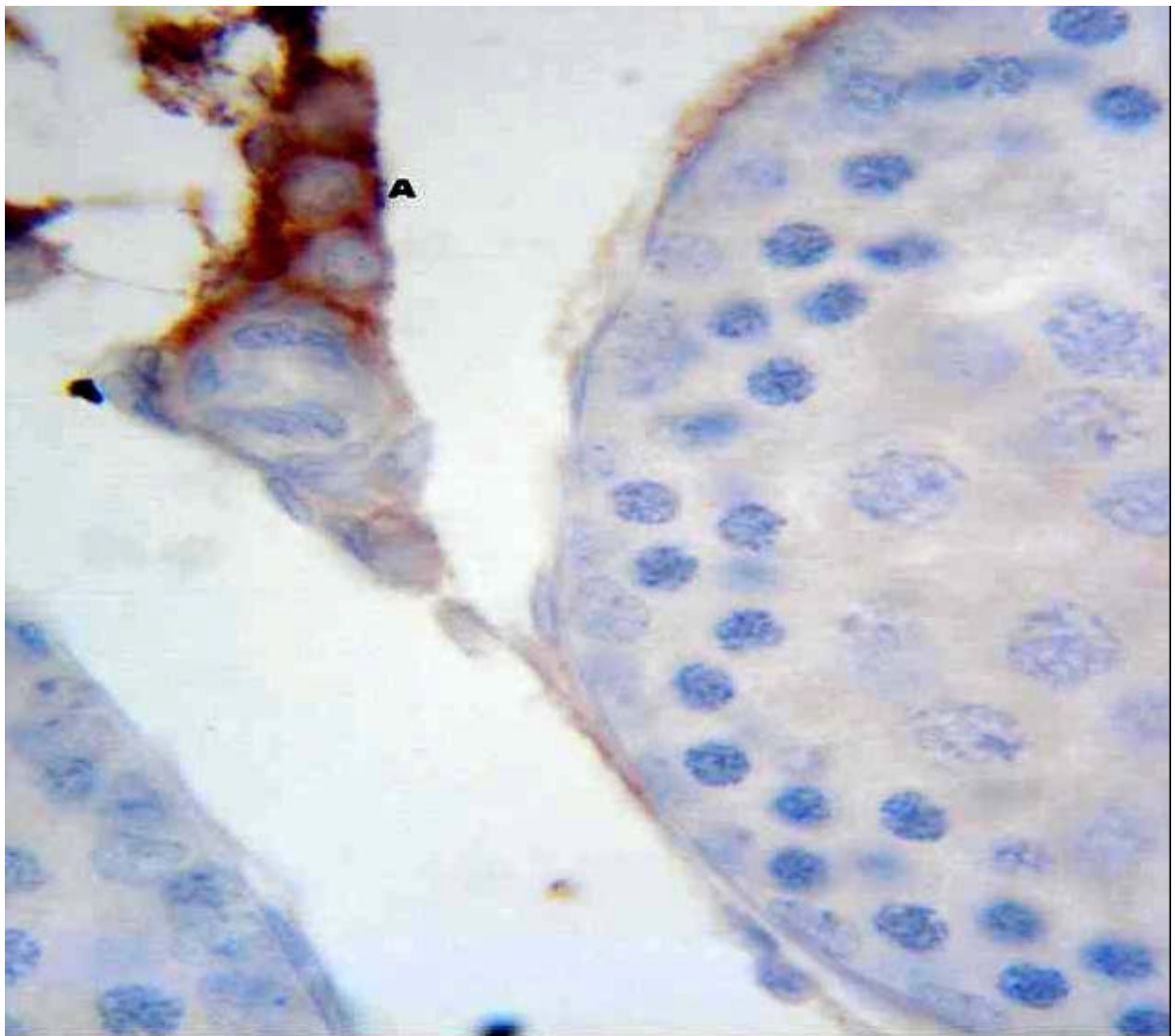


Abb. 29

4. Diskussion

Diese Arbeit beschreibt die ontogenetische Entwicklung von Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2 in Rattenhoden zwischen 1. Postnataltag (pnd) und 100. pnd mit Hilfe immunhistochemischer Methoden. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Verteilung der Immunreaktion in den Fetaltyp-Leydigzellen (FLZ) und Adulttyp-Leydigzellen (ALZ).

Die Bedeutung von Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2 für die Vorgänge der Apoptose wurde bereits im Kapitel „Einleitung“ erläutert. Im Folgenden werden die Befunde besprochen und diskutiert, die bei den Untersuchungen für die vorliegende Arbeit erhoben worden sind.

4.1. Besprechung der Befunde über Cleaved-Caspase-3

Das Ergebnis der immunhistochemischen Darstellung von Cleaved-Caspase-3 zeigt eine Aktivität sowohl in den ALZ, als auch in den FLZ, d.h. die Cleaved-Caspase-3 ist am Zelluntergang der FLZ und der ALZ beteiligt. Von allen Altersgruppen (zwischen 1. pnd und 100. pnd), die in dieser Arbeit untersucht wurden, scheint der 30. pnd der wichtigste Termin für den Abbau der Leydigzellen (LZ) zu sein, weil am 30. pnd der größte Anteil der LZ eine positive Immunreaktion zeigt (Anteil der LZ mit positiver Immunreaktion im Zytoplasma plus Anteil der LZ mit positiver Immunreaktion sowohl im Zytoplasma als auch im

Zellkern). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der 30. pnd ein wichtiger Zeitpunkt für die Umwandlung der unreifen ALZ in die reifen ALZ ist (Haider, 2004).

In der Literatur gibt es bereits einige Hinweise über die Rolle von Caspase-3 für die Apoptose der LZ. Laut Kim et al. (2000) basiert die apoptotische Wirkung von EDS (Ethandimethylsulfat) in LZ auf einer Aktivierung der Procaspase-3 zur cleaved- Caspase-3 (aktivierte Form) und auf einer Translokalisierung der cleaved-Caspase-3 vom Zytoplasma in den Zellkern. Faleiro und Lazebnik (2000) haben gefunden, dass der Transport der Cleaved-Caspase-3 aktiv durch nukleare Poren erfolgt, deren Diffusionslimit durch passiven Transport der vorzeitig aktivierten Caspase-9 erweitert werden.

Es wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass die Immunreaktion von Cleaved-Caspase-3 in LZ (FLZ+ALZ) sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern stattfindet. Anhand der topographischen Verteilung dieser Immunreaktion kann man vier Gruppen von LZ unterscheiden: Gruppe A: LZ, in denen die Immunreaktion sich auf das *Zytoplasma* beschränkt. Gruppe B: LZ, in denen die Immunreaktion sowohl im *Zytoplasma* als auch im *Zellkern* auftritt. Gruppe C: LZ, in denen sich die Immunreaktion auf den *Zellkern* beschränkt. Gruppe D: LZ mit ausbleibender Immunreaktion. Die Immunreaktion verteilt sich in über 95% der LZ zwischen 1. pnd und 20. pnd fast gleichmässig auf LZ mit Zytoplasma-Reaktion und LZ mit Zytoplasma- + Zellkern-Reaktion. Ab dem 20. pnd nimmt der Anteil der LZ mit Zytoplasma-Reaktion kontinuierlich zu und spiegelartig nimmt der Anteil der LZ mit Zytoplasma- + Zellkern-Reaktion mit fast gleicher Menge ab. Diese Erscheinung hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass ab dem 20. pnd viel mehr Caspase-3 im Zytoplasma gebildet wird. Hiervon wird der größere Teil nach der Aktivierung als

Cleaved-Caspase-3 im Zytoplasma (Ribosomen oder Mitochondrien) verbleiben; ein kleiner Teil wird vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert. Die LZ mit nur Zellkern-Reaktion können wegen des sehr geringen Anteils bei allen Altersgruppen nahezu vernachlässigt werden.

Wenn man die FLZ allein betrachtet, erkennt man, dass der 15. pnd ein wichtiger Zeitpunkt in der Apoptose der FLZ ist. Bis zu dem 15. pnd ist die Anzahl der FLZ mit Zytoplasma-Reaktion und mit Zytoplasma- + Zellkern-Reaktion fast gleich. Danach wächst der Anteil mit Zytoplasma-Reaktion stetig, während der Anteil mit Zytoplasma- + Zellkern-Reaktion mit fast gleicher Anzahl abnimmt. Der Grund dafür könnte sein, dass ab dem 15. pnd die Bildung von Cleaved-Caspase-3 im Zytoplasma aktiviert wird, um die Apoptose von FLZ zu fördern.

Die Verteilung der Immunreaktion in den ALZ zeigt folgende Charakteristik: Die Anzahl von ALZ mit Zytoplasma-Reaktion nimmt ab dem 20. pnd in der Menge zu, wie die ALZ mit Zytoplasma- + Zellkern-Reaktion abnimmt. Es muss hier betont werden, dass auch das Verfahren der Einbettung (aufsteigende Alkoholreihe, Toluol, Paraffin) zu einer Diffusion der Antigene aus dem Zellkern in das Zytoplasma führen kann. Man kann daher nicht ausschliessen, dass diese Zunahme des Anteils der ALZ mit Zytoplasma-Reaktion ab dem 20. pnd mindestens teilweise auf diese intrazelluläre Diffusion zurückzuführen ist.

4.2. Besprechung der Befunde über Bcl-2

Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung von Bcl-2 in den LZ zeigt, dass die Immunreaktion in den ALZ sich nur auf das Zytoplasma beschränkt und im Vergleich mit Cleaved-Caspase-3 eine Immunreaktion in den FLZ fehlt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass der Vorgang der Apoptose für die FLZ einen Weg einnimmt, der die Expression von Bcl-2 nicht benötigt. Hingegen scheint Bcl-2 eine wichtige Rolle bei der Apoptose der ALZ zu spielen.

Wenn man den Verlauf der Immunreaktion für Bcl-2 in den ALZ der Altersgruppen vom 15. pnd bis zum 100 pnd beobachtet, kann man feststellen, dass die Anzahl der ALZ mit positiver Immunreaktion das Maximum am 30. pnd erreicht. Gleich wie bei Cleaved-Caspase-3, scheint der 30. pnd ein wichtiger Zeitpunkt in der Apoptose mit Beteiligung der Bcl-2 zu sein. Der Grund dafür könnte der gleiche wie bei Cleaved-Caspase-3 sein, nämlich, dass der 30. pnd ein kritischer Zeitpunkt für die Umwandlung der unreifen ALZ in die reifen ALZ ist (Haider, 2004). Der Zeitraum zwischen dem 30. pnd und dem 35. pnd ist ebenfalls ein Wendepunkt für die erstmalige Entstehung der elongierten Spermatiden in Hodenkanälchen der Ratten (Neumann et al., 1993). Die Immunreaktion von Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2 in den LZ am 30. pnd, wie hier berichtet wurde, ist wahrscheinlich ein Ausdruck auf die parakrine Bedürfnisse der Spermatogenese. Dadurch wird die Testosteronsynthese in den LZ zwischen dem 30. pnd und dem 40. pnd umgestellt, wie die Untersuchungen von Hardy et al. (1990) zeigen (siehe auch Haider, 2004).

Die Immunreaktion von Bcl-2 ist auch in den Akrosomkappen der runden Spermatiden zu erkennen. Dieser Befund steht in Einklang mit den Daten von Beumer et al. (2000), wo ebenfalls Bcl-2 in späten Spermatozyten und Spermatiden beobachtet wurden. Das deutet darauf hin, dass Bcl-2 bei der Entstehung von Akrosom aus dem Golgi-Apparat eine bestimmte Rolle spielt. Die genaue funktionelle Bedeutung dieses Befundes kann nicht endgültig erklärt werden. Ferner war die Immunreaktion von Bcl-2 in den Akrosomkappen nur bei Ratten am 30. und 50. pnd zu sehen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Immunreaktion von Bcl-2 in den Akrosomkappen wahrscheinlich mit einem in der Entwicklung befindlichen Vorgang der Spermatogenese zusammenhängt, der zwischen dem 30. pnd und 50. pnd einen relativ instabilen Zustand aufweist. Laut Leblond und Clermont (1952) ist der Vorgang der Spermatogenese in Rattenhoden erst ab dem 60. pnd soweit stabilisiert, dass in allen Hodenkanälchen die Stadien der Spermatogenese eindeutig identifiziert werden können.

4.3. Schlussfolgerungen und Ausblick

Aus den erhobenen Befunden können folgende **Schlussfolgerungen** gezogen werden:

1. Die Cleaved-Caspase-3 ist am Zelluntergang der FLZ und der ALZ beteiligt.
2. Der 30. pnd scheint der wichtigste Zeitpunkt für die Apoptose der ALZ mit Beteiligung der Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2 zu sein. Es hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass der 30. pnd eine wichtige Etappe für die Umwandlung der unreifen ALZ in die reifen ALZ ist.
3. Bcl-2 beteiligt sich höchstwahrscheinlich nicht an der Apoptose der FLZ.

4. Bcl-2 in den Akrosomkappen der runden Spermatiden zwischen 30. und 50. pnd deutet auf eine Rolle der Bcl-2 bei der Entstehung der Akrosomkappen während der puberalen Phase hin.

Ausblick: Die vorliegende Arbeit liefert wichtige Daten über die apoptotischen Vorgänge von LZ durch die immunhistochemischen Darstellungen von zwei apoptotischen Markern: Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2. Die Immunreaktion von Cleaved-Caspase-3 ist sowohl in den FLZ als auch in den ALZ nachzuweisen, während die Immunreaktion von Bcl-2 nur in den ALZ stattfindet, hingegen in den FLZ fehlt. Topographisch ist die Immunreaktion von Cleaved-Caspase-3 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu sehen. Im Gegensatz dazu beschränkt sich die Immunreaktion von Bcl-2 nur auf das Zytoplasma. Um die genaue Lokalisierung von der Immunreaktion in den Zellorganen nachweisen zu können, wäre in Zukunft die elektromikroskopische Untersuchung einschliesslich Ultrazytochemie sehr hilfreich. Zur Quantifizierung der Intensität der Immunreaktion von verschiedenen Altersgruppen der Ratten können die biochemischen Untersuchungsmethoden (z.B. Spektralphotometrie) herangezogen werden. Es wäre auch interessant für die Zukunft, die anderen apoptotischen Marker zu untersuchen, wie z.B. BAK-Enzyme oder Tunnel-Methode für DNA-Fragmentierung. Aus diesen Daten können eventuell Unterschiede zwischen den Mechanismen der Apoptose der FLZ und der ALZ ausgearbeitet werden.

5. Literaturverzeichnis

Adams, J.M., Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family arbiters of cell survival. *Science* **281**: 1322–1326

Ariyaratne, H. B., Mendis-Handagama, S. M. C., Hales, D. B., and Mason, J. I. (2000). Studies of the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. *Biol. Reprod.* **63**, 165-171

Beumer T.L., Roepers-Gajadien H.L., Gademan I.S., Lock T.M., Kal H.B., De Rooij D.G. (2000). Apoptosis regulation in the testis: involvement of bcl-2 family members. *Mol Reprod* **56(3)**: 353-9

Faleiro L. and Lazebnik Y. (2000). Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *The Journal of Cell Biology*, volume 151, Number 5, 951-960.

Fischer U., Jänicke R.U., & Schulze-Osthoff K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death.Differ* **10**, 76-100

Green D.R., Reed J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**:1309-1312

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**, 498-506

- Haider, S. G., Passia, D., and Overmeyer, G. (1986).** Studies on fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Acta Histochem.* **32**, 197-202
- Haider, S. G., Laue, D., Schwochau, G., and Hilscher, B. (1995).** Morphological studies on the origin of adult-type Leydig cells in rat testis. *It. J. Anat. Embryol.* **100(Suppl.1)**, 535-541
- Haider, S. G., and Servos, G. (1998).** Ultracytochemistry of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. *Anat. Embryol.* **198**, 101-110.
- Haider, S. G. (2004).** Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int. Rev. Cytology* **233**: 181-241.
- 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**, 762-770.
- Hardy, M. P., Kelce, W. R., Klinefelter, G. R., and Ewing, L. L. (1990).** Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: A role for androgen. *Endocrinology* **127**, 488-490.
- Kim J.M., Luo L., and Barry R. Zirkin (2000).** Caspase-3 activation is required for leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate. *Endocrinology* 0013-7227.
- 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**:239-257
- 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**, 535-544.

Kuopio, T., Tapanainen, J., Pelliniemi, L.J., and Huhtaniemi, I. (1989). Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development* **107**, 213-220.

Leblond, C. P. and Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **55**, 548-573.

Leydig, F. (1850). Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane and Analdrüsen der Säugethiere. *Z. Wissenschaftliche Zool.* **2**, 1-57.

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**: 175-184.

Lording, D. W., and de Kretser, D. M. (1972). Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of rat testis during fetal and postnatal development. *J. Reprod. Fertil.* **29**, 261-269.

Majdic, G., Saunders, P. T. K., and Teerds, K.J. (1998). Immunoexpression of the steroidogenic enzymes 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and 17 α -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. *Biol. Reprod.* **58**, 520-525.

Neumann, A., Haider, S. G., and Hilscher, B. (1993). Temporal coincidence of the appearance of elongated spermatids and of histochemical reaction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Andrologia* **25**, 263-269.

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M.,

- Smulson, M.E., Yamin, T.T., Yu, V.L., Miller, D.K. (1995).** Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43
- Nicholson, D.W., Thornberry, N.A. (1997).** Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 299-306.
- Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., and Inohara, N. (1998).** Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**: 3237-3245.
- Porter, A.G., Janicke, R.U. (1999).** Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**: 99-104.
- Taylor, M.F., Woolveridge, I., Metcalfe, A.D., Streuli, C.H., Hickman, J.A., Morris, I.D. (1998).** Leydig cell apoptosis in the rat testes after administration of the cytotoxin ethane dimethanesulphonate: role of the Bcl-2 family members. *J Endocrinol* **157(2)**: 317-26
- Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998).** Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-1316.
- Tsujimoto, Y., (1998).** Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* **3**: 697–707.
- Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2000a).** Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* **466**:2000, 6–10.
- Tsujimoto, Y., Shimizu, S. (2000b).** VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* **7**:2000, 1174–1181.
- Villa, P., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C. (1997).** Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* **22**: 388-393.

6. Zusammenfassung (Abstract)

Name der Doktorandin: **Yanan Shen**

Titel der Arbeit: **Immunhistochemische Untersuchungen zur Ontogenese von Apoptose-Marker Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2 in den Leydigzellen der Ratten**

Die vorliegende immunhistochemische Studie beschreibt die ontogenetische Entwicklung von Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2 in den Leydigzellen (LZ) der Ratten zwischen dem 1. Postnataltag (pnd) und dem 100. pnd. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Verteilung der Immunreaktion in den Fetaltyp-Leydigzellen (FLZ) und Adulttyp-Leydigzellen (ALZ).

Als Untersuchungsmaterial dienten Hoden der männlichen Wistarratten von 9 unterschiedlichen Altersgruppen: 1. pnd, 5. pnd, 10. pnd, 15. pnd, 20. pnd, 25. pnd, 30. pnd, 50. pnd, 100. pnd. Daraus wurden ca. 4 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Zum immunhistochemischen Nachweis von zwei apoptotischen Markern Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2 in den LZ wurde jeweils ein monoklonaler Antikörper verwendet. Die Auswertung der Immunreaktionen in den LZ wurde mit einem Leitz-Orthoplan-Mikroskop und mit Hilfe eines Messrasters im Okular durchgeführt.

Die immunhistochemische Darstellung von Cleaved-Caspase-3 zeigte eine Aktivität sowohl in den ALZ, als auch in den FLZ. Topographisch konnte man die Immunreaktion sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern beobachten. Der 30. pnd scheint der wichtigste Termin für den Abbau der LZ zu sein, weil am 30. pnd der höchste Anteil der LZ eine positive Immunreaktion von Cleaved-Caspase-3 zeigte (Anteil der LZ mit positiver Immunreaktion im Zytoplasma plus Anteil der LZ mit positiver Immunreaktion sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern).

Im Vergleich mit Cleaved-Caspase-3 war die Immunreaktion von Bcl-2 nur im Zytoplasma der ALZ nachweisbar, nicht aber in den FLZ. Gleich wie bei Cleaved-Caspase-3 scheint der 30. pnd ein kritischer Zeitpunkt in der Apoptose mit Beteiligung der Bcl-2 zu sein, da die Anzahl der ALZ mit positiver Immunreaktion das Maximum am 30. pnd erreicht. Die Immunreaktion von Bcl-2 war auch in den Akrosomkappen der runden Spermatozyten am 30. und 50. pnd zu erkennen.

Aus den erhobenen Befunden können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Die Cleaved-Caspase-3 ist am Zelluntergang der FLZ und der ALZ beteiligt.
2. Der 30. pnd scheint der wichtigste Zeitpunkt für die Apoptose der ALZ mit Beteiligung der Cleaved-Caspase-3 und Bcl-2 zu sein. Es hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass der 30. pnd eine wichtige Etappe für die Umwandlung der unreifen ALZ in die reifen ALZ ist.
3. Bcl-2 beteiligt sich höchstwahrscheinlich nicht an der Apoptose der FLZ.
4. Bcl-2 in den Akrosomkappen der runden Spermatozyten zwischen 30. und 50. pnd deutet auf eine Rolle von Bcl-2 bei der Entstehung der Akrosomkappen während der puberalen Phase hin.

7. Datenblätter

#9664 Store at -20°C

Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1) Rabbit mAb

- ☐ Small 100 µl
(10 Western mini-blot)
- ☒ Large 300 ml
(30 Western mini-blot)

rev 09/21/06



Cell Signaling
TECHNOLOGY®

Orders ■ 877-616-CELL (2355)
orders@cellsignaling.com

Support ■ 877-678-TECH (8324)
info@cellsignaling.com

Web ■ www.cellsignaling.com

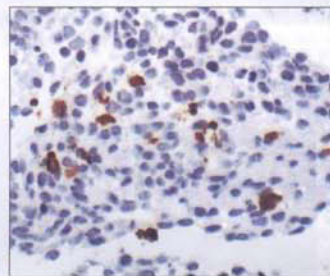
This product is for *in vitro* research use only and is not intended for use in humans or animals.

Applications	Species Cross-Reactivity	Molecular Wt.	Source
W, IP, IHC-P, IF-IC, F	H, M, R	17, 19 kDa	Rabbit*

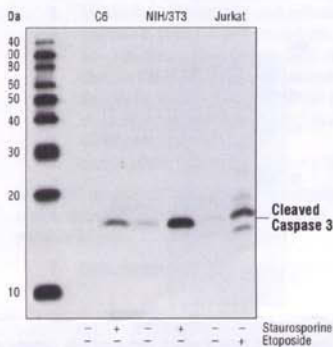
Background: Caspase-3 (CPP-32, Apoptain, Yama, SCA-1) is one of the key executioners of apoptosis, as it is either partially or totally responsible for the proteolytic cleavage of many key proteins such as the nuclear enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (1). Activation of caspase-3 requires proteolytic processing of its inactive zymogen into activated p17 and p12 fragments. Cleavage of caspase-3 requires aspartic acid at the P1 position (2).

Specificity/Sensitivity: Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1) Rabbit mAb detects endogenous levels of the large fragment (17/19 kDa) of activated caspase-3 resulting from cleavage adjacent to Asp175. This antibody does not recognize full length caspase-3 or other cleaved caspases.

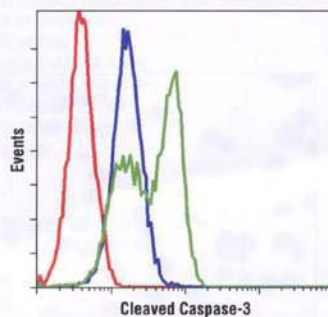
Source/Purification: Monoclonal antibody is produced by immunizing rabbits with a synthetic peptide (KLH-coupled) corresponding to amino-terminal residues adjacent to Asp175 of human caspase-3.



Immunohistochemical staining of paraffin-embedded mouse embryo, showing cytoplasmic localization in apoptotic cells, using Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1) Rabbit mAb.



Western blot analysis of extracts from C6 (rat), NIH/3T3 (mouse), and Jurkat (human) cells, untreated or treated with staurosporine or etoposide as indicated, using Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1) Rabbit mAb.



Flow cytometric analysis of Jurkat cells, untreated (blue) or etoposide-treated (green), using Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1) Rabbit mAb compared to a nonspecific negative control antibody (red).

Background References:

- (1) Fernandes-Alnemri, T. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 30761-30764.
- (2) Nicholson, D.W. et al. (1995) *Nature* 376, 37-43.

Storage: Supplied in 10 mM sodium HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA and 50% glycerol. Store at -20°C. Do not aliquot the antibody.

***Anti-rabbit secondary antibodies must be used to detect this antibody**

Recommended Antibody Dilutions:

Western blotting	1:1000
Immunoprecipitation	1:100
Immunohistochemistry (Paraffin)	1:100
IHC Protocol	Citrate/PBST
Immunofluorescence (IF-IC)	1:100
Flow Cytometry	1:100

Companion Products:

Phototope®-HRP Western Blot Detection System, Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7072

Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074

Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076

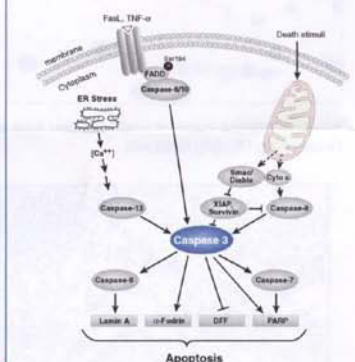
Prestained Protein Marker, Broad Range (Premixed Format) #7720

Biotinylated Protein Ladder Detection Pack #7727

20X LumiGLO® Reagent and 20X Peroxide #7003

Cleaved Caspase-3 (Asp175) Blocking Peptide #1050

Cleaved PARP (Asp214) Antibody (Human Specific) (Fluorescein Conjugate) #9547



Apoptosis/Caspase Signaling Pathway

F—Flow cytometry E—ELISA D—DELIA®
Z—zebra fish B—bovine All—all species expected

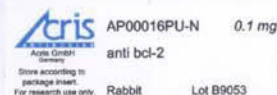
© 2006 Cell Signaling Technology, Inc. Rabbit Monoclonals Produced Using Technology from Epitomics, Inc. Under U.S. patent No. 5,675,063.

IMPORTANT: For Western blots, incubate membrane with diluted antibody in 5% w/v nonfat dry milk, 1X TBS.

Applications Key: W—Western IP—Immunoprecipitation IHC—Immunohistochemistry IC—Immunocytochemistry IF—Immunofluorescence

Species Cross-Reactivity Key: H—human M—mouse R—rat Hm—hamster Mk—monkey MI—mink C—chicken X—Xenopus Z—zebra fish B—bovine All—all species expected

Species enclosed in parentheses are predicted to react based on 100% sequence homology.



Acris Antibodies GmbH
Im Himmelreich 11
D-32120 Hiddenhausen
Phone: +49-5221-34606-0
Fax: +49-5221-34606-11
info@acris-online.de

Polyclonal Antibody to Bcl-2

Catalog No.: AP00016PU-N

Quantity: 0.1 mg

Concentration: 0.2 mg/ml

Background: Bcl-2 and its homologs belong to a family of proteins that either promotes or prevent apoptosis. Bcl-2 alpha and beta are the alternatively spliced isoforms of 25 kDa and 22 kDa mitochondrial integral membrane proteins that inhibit apoptosis. Bcl-2 was identified as a gene translocated from chromosome 18 to the immunoglobulin (Ig) heavy chain locus on chromosome 14 in B lymphocytes, a condition that is associated with the onset of human follicular B cell lymphomas. This interchromosomal translocation leads to constitutive expression of Bcl-2, which results in increased survival and expansion of follicular center cell population.

Host / Isotype: Rabbit

Immunogen: Synthetic peptide corresponding to the N-terminus of human Bcl-2

Format: State: Liquid
Purification: Affinity-purified
Buffer System: PBS, pH 7.2, containing 30 % glycerol, 0.5 % BSA, 0.01% thimerosal

Applications: Western blot analysis (0.5-4 µg/ml).
Immunoprecipitation (4-8 µg/ml).
Immunohistochemistry (10-20 µg/ml).
Other applications not tested. Optimal dilutions are dependent on conditions and should be determined by the user.

Specificity: Detects a 25 kDa protein, corresponding to the apparent molecular weight of the α isoform of Bcl-2 on SDS-PAGE immunoblots.
Species: Human, mouse, rat

Storage: Store at -20°C. For long-term storage, aliquot and freeze at -70°C.
Avoid repeated freeze/thaw cycles. Shelf life: one year from despatch.

References: Giuliani, D., et al. (2005) Endocrinology 10-1210/en.2005-0692

8. Danksagungen

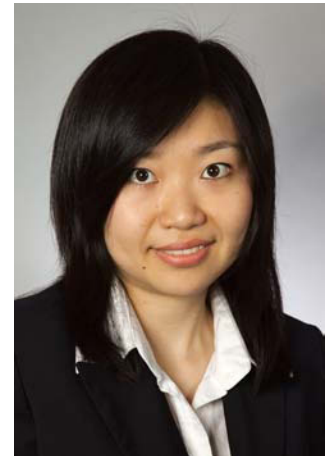
Ich danke Herrn Prof. Dr. S. G. Haider für die Überlassung des Themas und für die gute Betreuung.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Anatomischen Instituts II der Universitätsklinik Düsseldorf danke ich für die freundliche Zusammenarbeit. Mein Dank gilt besonders für Frau Gabriele Berthold für Ihre hilfreiche und engagierte Unterstützung.

Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Yanan Shen
Anschrift: Petrinistr. 25
97080 Würzburg
Geburtsdatum: 19.01.1982
Geburtsort: Shanghai, VR China
Familienstand: ledig



■ Akademischer Werdegang

09/1988 – 07/1994 Grundschule (Shanghai)
09/1994 – 07/2000 Gymnasium (Shanghai) mit Abitur
09/2000 – 07/2002 Medizinstudium, Fudan-Universität in Shanghai
07/2002 – 10/2003 Sprachkurs Deutsch und Sprachprüfung (Shanghai, Peking)
10/2003 – 09/2009 Medizinstudium, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09/2005 1. Staatsexamen
11/2009 2. Staatsexamen

■ Nebentätigkeiten

04/2006 – 07/2006 Anatomie-Kursassistentin in der Universität Düsseldorf
09/2006 – 08/2008 Studentische Hilfskraft im Koordinierungszentrum für klinische Studien in Universität Düsseldorf

■ Beruflicher Werdegang

seit 02/2010 Assistenzärztin, Universitäts-Augenklinik Würzburg

■ Sonstiges

Sprachkenntnisse Chinesisch (Muttersprache)
Deutsch (Verhandlungssicher)
Englisch (Schulkenntnisse)
Hobbys Reisen, Literatur, Kochen