

Aus dem Institut für Anatomie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Charlotte von Gall

**Zur Ultrastruktur der Zellkontakte der Leydig-Zellen im Maushoden:
Eine systematische Untersuchung von der Geburt bis zum 100. Postnataltag**

Dissertation

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

vorgelegt von

Sevil Özlügedik
2012

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

gez.:

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

Referent: Prof. Dr. Syed G. Haider

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Albers

Meinen Eltern

Abkürzungen

3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
25-HC	25-Hydroxycholesterol
Abb.	Abbildung
ALC	Adulttyp-Leydig-Zelle
Cx43	Connexin 43
Dhh	Desert hedgehog
dpc	days post coitum, Postkoitaltag
EDS	Ethylendimethansulfonat
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FLC	Fetaltyp-Leydig-Zelle
FSH	Follikel-stimulierendes-Hormon, Folitropin
GER	Glattes endoplastmatisches Retikulum
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon, Gonadoliberin
hCG	humanes Choriongonadotropin
LH	Luteinisierendes-Hormon, Lutropin
mRNA	Matrizen Ribonukleinsäure
Pdgfa	platelet-derived growth factor A
pnd	post natal day, Postnataltag
Pod1	Podocyte-expressed 1
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SF1	steroidogenic factor 1
Sox9	Sry-box-containing gene 9
Sry	sex-determining region of the Y chromosome
StAR-Protein	Steroidogenic acute regulatory protein
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TVA	Tierversuchsanlage
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Leydig-Zellen	1
1.2 Funktion der Leydig-Zellen.....	1
1.3 Interaktion der Leydig-Zellen	2
1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	3
2. MATERIAL UND METHODIK	4
2.1 Versuchstiere	4
2.2 Fixierung.....	4
2.3 Einbettung	5
2.4 Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitte	6
3. ERGEBNISSE	7
3.1 Zellkontakte am 1. Postnataltag.....	7
3.2 Zellkontakte am 10. Postnataltag.....	15
3.3 Zellkontakte am 30. Postnataltag.....	22
3.4 Zellkontakte am 50. Postnataltag.....	30
3.5 Zellkontakte am 100. Postnataltag.....	36
4. DISKUSSION	42
4.1 Entstehung und Entwicklung der Leydig-Zellen in der Maus.....	42
4.2 Zellkontakte der Leydig-Zellen.....	43
4.3 Leydig-Zellen und Makrophagen	46
4.4 Leydig-Zellen und Blutgefäße	48
4.5 Weitere Beobachtungen in den Interstitien	49
4.6 Abschließende Bemerkungen und Ausblick	50
5. ZUSAMMENFASSUNG	51
6. LITERATUR	52
7. LEBENS LAUF	60

1. Einleitung

1.1 Leydig-Zellen

Die Leydig-Zellen wurden erstmals im Jahre 1850 von Franz Leydig lichtmikroskopisch im Hoden verschiedener Säugetiere entdeckt und beschrieben. Sie werden in der Literatur auch als interstitielle Zellen oder Leydig'sche Zwischenzellen bezeichnet und liegen im lockeren Bindegewebe zwischen den Tubuli seminiferi contorti. Leydig-Zellen sind einzeln oder in Gruppen, den sog. „Clustern“ in enger Nachbarschaft zu Blutgefäßen angeordnet (Abb. 1) (Russel, 1996).

Die Leydig-Zellen bilden u.a. das männliche Geschlechtshormon Testosteron. Charakteristisch für steroidproduzierende Zellen besitzen Leydig-Zellen einen hohen Volumenanteil an glattem endoplasmatischem Retikulum (GER), Mitochondrien hauptsächlich vom tubulovesikulären Typ, Golgiapparat, Peroxisomen und viele Lipidtröpfchen, die Cholesterolester enthalten (Christensen, 1965; Christensen, 1970; Kerr et al. 1981; Ohata, 1979).

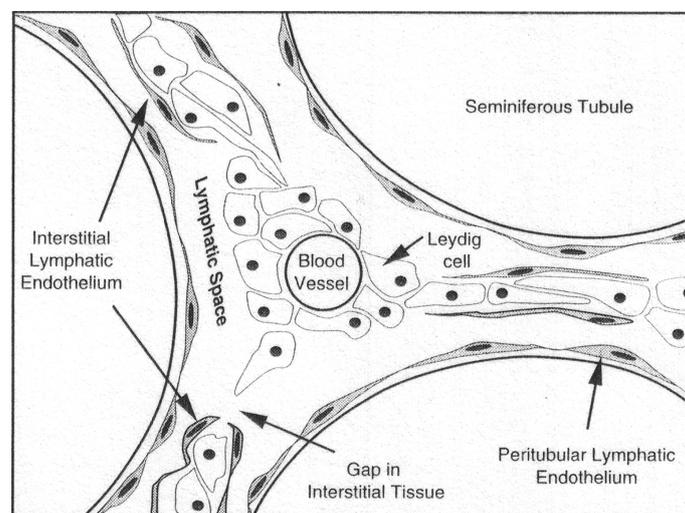


Abb. 1: Anordnung der Leydig-Zellen im testikulären Interstitium der Maus (entnommen aus Russel, 1996).

1.2 Funktion der Leydig-Zellen

Die Leydig-Zellen synthetisieren Androgene, die für die Initiierung, Aufrechterhaltung und Regulation der Spermatogenese erforderlich sind (Haider, 2004). Die Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Freisetzung aus dem Hypothalamus

fördert in der Hypophyse die Sekretion von luteinisierendem Hormon (LH) und Follikel-stimulierendem-Hormon (FSH) ins Blut. Das Testosteron zählt zu den wichtigsten testikulären Androgenen, dessen Synthese erst nach Stimulation der Leydig-Zellen durch LH aus der Hypophyse beginnt. Getriggert durch Testosteron und FSH startet anschließend in den Tubuli seminiferi contorti die Spermatogenese. Die Freisetzung von Lutropin und Gonadoliberin wird u. a. durch Testosteron mittels negativer Rückkopplung gesteuert und regelt so die Samenproduktion mit.

1.3 Interaktion der Leydig-Zellen

Die Leydig-Zellen interagieren mit einer Vielzahl von benachbarten Zellen im Hoden z.B. u.a. Endothelzellen, Makrophagen und Fibrozyten. Neben der Entwicklung und Differenzierung der Leydig-Zellen wird auch deren Funktion sowohl durch diese Zellen und verschiedene Hormone als auch von Leydig-Zellen selbst maßgeblich beeinflusst. Andererseits scheinen die Leydig-Zellen wiederum einen Einfluss auf die Nachbarzellen auszuüben (Haider, 2004). So werden vermutlich benachbarte *Endothelzellen* des intertubulären Gewebes durch parakrine Wirkung des von Leydig-Zellen produzierten Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) in ihrem Wachstum beeinflusst (Ergün et al. 1997 und 1999; Anand et al. 2003; Rudolfsson et al. 2004). Hingegen ist mutmaßlich die Barrierefunktion der Endothelzellen für die Reduzierung der für die Differenzierung der Leydig-Zellen wichtigen LH-Konzentration um etwa eine Zehnerpotenz im Interstitium des Hodens im Vergleich zur Plasmakonzentration verantwortlich (Setchell et al. 2002; Setchell, 2004). Scheinbar reagieren Leydig-Zellen entweder sehr empfindlich auf LH oder die Endothelzellen wirken so regulatorisch auf den LH-Einfluss auf die Leydig-Zellen. Die Zunahme der Testosteron-Produktion der Leydig-Zellen in Gegenwart von Endothelzellen stützt die Aussage von Ghinea (et al. 1994; Setchell und Palombi, 2004).

Die *Makrophagen* repräsentieren etwa 25% der interstitiell lokalisierten Zellen im Hoden der Ratte. Neben ihrer immunologischen Funktion scheinen sie die Entwicklung und Proliferation der Leydig-Zellen zu modulieren. Abhängig der zeitlichen Depletion der testikulären Makrophagen zeigen Leydig-Zellen in Rattenhodens nach Behandlung mit Ethylendimethansulfonat (EDS), welche Adulttyp-Leydig-Zellen (ALCs) abtötet, weder Zellregeneration noch Zelldifferenzierung

(Gaytan et al. 1994 a, b, c).

Obwohl die Leydig-Zellen in Ihrer Entwicklung in Abwesenheit der Makrophagen gestört werden, können ihre Funktionen auch durch aktivierte Makrophagen zytokinvermittelt - wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) durch Hemmung der Genexpression für steroidproduzierende Enzyme - beeinträchtigt werden. Des Weiteren geben Makrophagen immunologisch bedingt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei und setzen Leydig-Zellen unter oxidativen Stress. ROS hemmen die Genexpression des Steroidogenic acute regulatory proteins (StAR-Protein), so dass der Cholesterol-Transport in das Mitochondrium der Leydig-Zelle gestört wird und folglich das Substrat für die Bildung von Steroiden fehlt (Hales, 2002).

Die *Fibroblasten* stehen ebenfalls unter dem Einfluss von Testosteron. Die Proliferation der Fibroblasten kann durch die Expression von Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2), stimuliert durch Testosteron aktivierte Sertoli-Zellen erfolgen (Gonzalez-Herrera et al. 2006). Außerdem konnte in kastrierten Ratten die FGF-2 Matrizen-Ribonukleinsäure (mRNA)-Konzentration in der Hypophyse nach Gabe von Testosteron gesteigert werden (Yoshimura et al.1994).

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

1. Eine Möglichkeit des Informationsaustausches zwischen Zellen erfolgt über Zellkontakte am Zellkörper. Bisher gibt es keine Daten, die diese Kontakte der Leydig-Zellen im Hoden der Maus morphologisch näher beschreiben. Daher sollen in der vorliegenden Arbeit die Zellkontakte zwischen Leydig-Zellen und anderen intertubulären Zellen in Mäusen ab der Geburt bis zum 100. Postnataltag elektronenmikroskopisch näher untersucht werden.
2. Eine systematische Betrachtung der Leydig-Zell-Kontakte in der Ratte wurde bereits unternommen (Tran et al. 2006), dessen Ergebnisse mit den Befunden der vorliegenden Arbeit aus dem Maushoden verglichen werden sollen.

2. Material und Methodik

2.1 Versuchstiere

In der Zentralen Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erfolgte die Aufzucht der Versuchstiere unter standardisierten und sterilen Bedingungen. Bei den Versuchstieren handelte es sich ausschließlich um männliche BALB/c Mäuse.

Tiere vom 1./ 10./ 30./ 50. und 100. Postnataltag wurden ausgewählt, wobei der Tag der Geburt als Tag 0 definiert war. Jeweils fünf Tiere der unterschiedlichen Altersgruppen wurden untersucht.

Alle Vorschriften und Vorgaben des Tierschutzgesetzes und der Zentralen TVA der Heinrich-Heine-Universität wurden beachtet. Die Mäuse wurden mittels Diethylether in Narkose versetzt. Erst nach Erlangung tiefer Bewusstlosigkeit erfolgte die Tötung der Mäuse durch Dekapitation. Nach Fixierung der Mäuse in Rückenlage wurde an ihnen eine mediane Laparotomie durchgeführt. Im Rahmen dieser Operation wurden beide Hoden auf gewebeschonende Weise zügig freipräpariert und anschließend in eine frische Fixierlösung überführt.

2.2 Fixierung

Die Fixierung der Hoden erfolgte in einer modifizierten Karnovsky-Lösung bestehend aus Paraformaldehyd und Glutaraldehyd sowie Calciumchlorid und Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,4).

Nach einer vierstündigen Fixierung der Präparate unter Raumtemperatur wurden die Hodenenden abgetrennt und der verbleibende mittlere Hodenanteil nach Wechsel der Fixierlösung für weitere 12h bei 4°C behandelt. Während der gesamten Dauer der Fixierung wurden die Proben mit Hilfe eines Rotators zur besseren Gewebepfundierung ständig in Bewegung gehalten.

Nach Abschluss der Fixierung wurden die Proben in drei Durchgängen zu je 20 Minuten mit 0,05M Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,4) gespült. Vor dem 2. Spülgang wurden die Hoden in schmale Stücke zerteilt (Kantenlänge ca. 3x3mm).

Im Anschluss an den letzten Spülvorgang wurden die Proben in eine 2%ige Osmiumsäure in 0,1M Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,4) für drei Stunden auf einem Rotator überführt. Bei diesem Arbeitsschritt nahmen die Proben eine schwarze

Farbe an.

Die endgültige Fixierung der Proben wurde durch die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe abgeschlossen. Diese erfolgte im folgenden mehrstufigen Prozess:

- 10 Minuten in 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur im Rotator
- 1 Stunde in 70%igem Ethanol und 1%iger Phosphorwolframsäure bei Raumtemperatur im Rotator
- 1 Stunde in 80%igem Ethanol und 0,5%igem Uranylacetat bei Raumtemperatur im Rotator
- 1 Stunde in 90%igem Ethanol bei Raumtemperatur im Rotator
- 1 Stunde in 100%igem Ethanol bei Raumtemperatur im Rotator
- 1 Stunde in 100%igem Isopropanol bei Raumtemperatur im Rotator
- 12 Stunden in 100%igem Isopropanol bei 4°C im Rotator
- 3 Spülgänge je 20 Minuten in Toluol bei Raumtemperatur im Rotator

2.3 Einbettung

Zur Einbettung der Proben wurde Epon verwendet. Epon setzt sich neben 50 Teilen Glycidether und 30 Teilen Methyladicanhydrid aus 20 Teilen Dodecynilsuccinidanhydrid sowie 1,5 Teilen Tris-Dimethylaminomethylphenol zusammen.

Nach einer Inkubationszeit von insgesamt 3 h in Epon bei 37,1°C wurden die Proben anschließend in kleine Epon gefüllte Kunststoffkapseln eingebettet. Nach einer Verweildauer von 12 h bei Raumtemperatur wurden die Kapseln zur Polymerisierung des Epons 72 h einer Temperatur von 60°C im Brutschrank ausgesetzt. Die zylinderförmigen Probeblöcke konnten nach einer 12-stündigen Abkühlphase zur

Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten weiter verarbeitet werden.

2.4 Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitte

Bevor Semi- und Ultradünnschnitte angefertigt werden konnten mussten die Probenzylinder mittels einer Lupenlampe und einer Rasierklinge getrimmt werden. In diesem Arbeitsschritt wurde die Schnittfläche in eine Trapezform reduziert, in dessen Zentrum sich das Gewebe oberflächlich befand.

Die getrimmten Probenblöcke wurden in ein Ultramikrotom (Fa. Reichert/Jung) eingespannt. Mittels eines Glasmessers wurden Semidünnschnitte mit einer Schichtdicke von ca. 1 μm angefertigt. Diese wurden auf Objektträger überführt und mit Methylenblau angefärbt.

Mithilfe der Semidünnschnitte erfolgte eine lichtmikroskopische Auswahl des Gewebebereichs für die Elektronenmikroskopie. Auswahlkriterien waren quer getroffene Tubuli seminiferi contorti, triangulär geformte Interstitien mit Leydig-Zellen und insgesamt gut erhaltenes, zusammenhängendes Gewebe.

Der ausgewählte Gewebebereich wurde von den Probenblöcken unter Beibehaltung der trapezförmigen Querschnittsfläche mit einer Kantenlänge von ca. 1-1,5 mm erneut getrimmt. Mit einem Diamantmesser wurden dann am Ultramikrotom die Ultradünnschnitte mit einer Schichtdicke von ca. 100nm für die Elektronenmikroskopie hergestellt. Diese wurden mit Hilfe eines Wimpernhaares auf Kupfernetzchen aufgespannt und anschließend luftgetrocknet.

Zur Strukturdarstellung am Elektronenmikroskop mussten die Ultradünnschnitte kontrastiert werden. Dies erfolgte mit gesättigter Uranylacetat- und Bleicitratlösung.

Nach einer Trocknungszeit von mindestens 24 Stunden konnten die Schnitte mit dem Elektronenmikroskop (Fa. HITACHI H-600) untersucht werden. Interessante Bereiche wurden mit der integrierten Kamera (Fa. GATAN Bio Scan 792) dokumentiert und ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Zellkontakte am 1. Postnataltag

Die Leydig-Zellen des 1. Postnataltages, die hauptsächlich in Clustern angeordnet sind, enthalten viele Lipidtropfen. Die Cluster werden häufig von einem Kranz aus Fibroblasten umgeben (Abb. 2). Eine kontinuierliche Basalmembran um einen Cluster herum, lässt sich im Mäusehoden am 1. Postnataltag nicht eindeutig nachweisen. Die Leydig-Zellen innerhalb eines Clusters stehen oftmals in einem sehr engen Kontakt zueinander ohne erkennbaren Interzellularraum.

Daneben finden sich filiforme Zellmembranduplikationen, die ineinander verzahnt erscheinen und sporadisch Zellorganellen beinhalten (Abb. 3). Außerdem lassen sich zwischen Leydig-Zellen wenige Zellmembranverdichtungen beobachten (Abb. 4).

Dagegen ist zwischen direkt angrenzenden Leydig-Zellen unterschiedlicher Cluster häufig ein Interzellularspalt zu erkennen, in denen kleine Vesikel als Folge von abgeschnürten coated pits zu beobachten sind (Abb. 5). Coated pits werden aber auch zwischen Leydig-Zellen innerhalb eines Clusters gesehen (Abb. 6).

Regelmäßig sind die Cluster in der Nähe von Blutgefäße angeordnet (Abb. 5a). Häufig zeigen sich Kollagenfasern, die aus der Basallamina der Gefäße in Richtung Leydig-Zellen verlaufen (Abb. 7).

Die Leydig-Zellen sind jedoch nicht ausschließlich in Clustern angeordnet. Gelegentlich sind Leydig-Zellen vereinzelt im Interstitium aufzufinden. Diese pflegen eine enge Nachbarschaft sowohl zu Fibroblasten als auch zu Endothelzellen und Perizyten ohne einen spezifischen Zellkontakt aufzuweisen (Abb. 8).

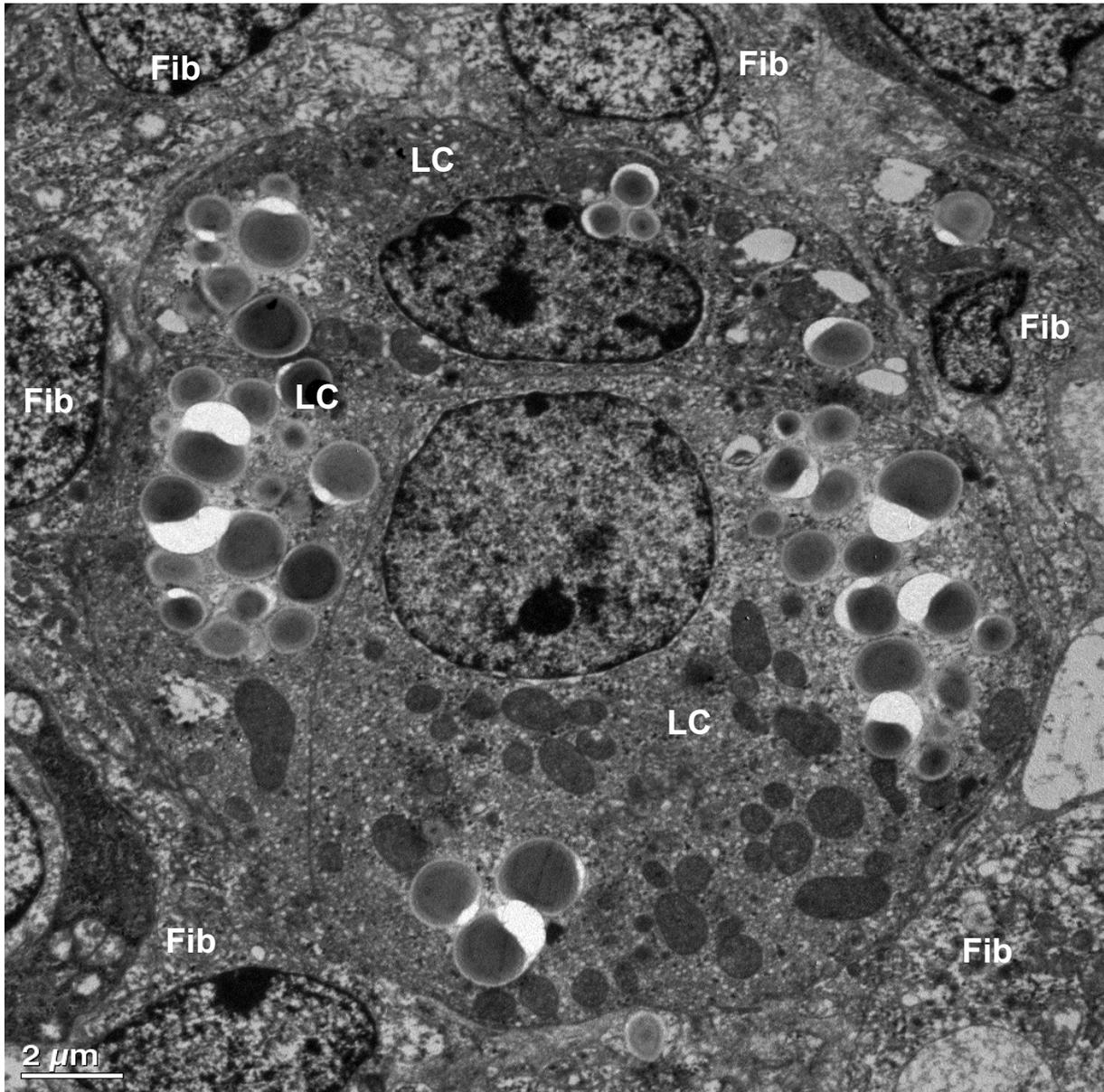


Abb. 2: 1. Postnatahtag – Cluster

Übersichtaufnahme eines Clusters mit drei sehr eng benachbarten Leydig-Zellen (LC) ohne Interzellularraum. Ein Kranz aus Fibroblasten (Fib) umgibt die Leydig-Zellen. Vergrößerung 5000:1



Abb. 3: 1. Postnatahtag – Filiforme Zellmembranordnung

Die Membranen zweier benachbarter Leydig-Zellen (LC) weisen Duplikaturen auf, die filiform miteinander verzahnen (Pfeile). Vergrößerung 15.000:1

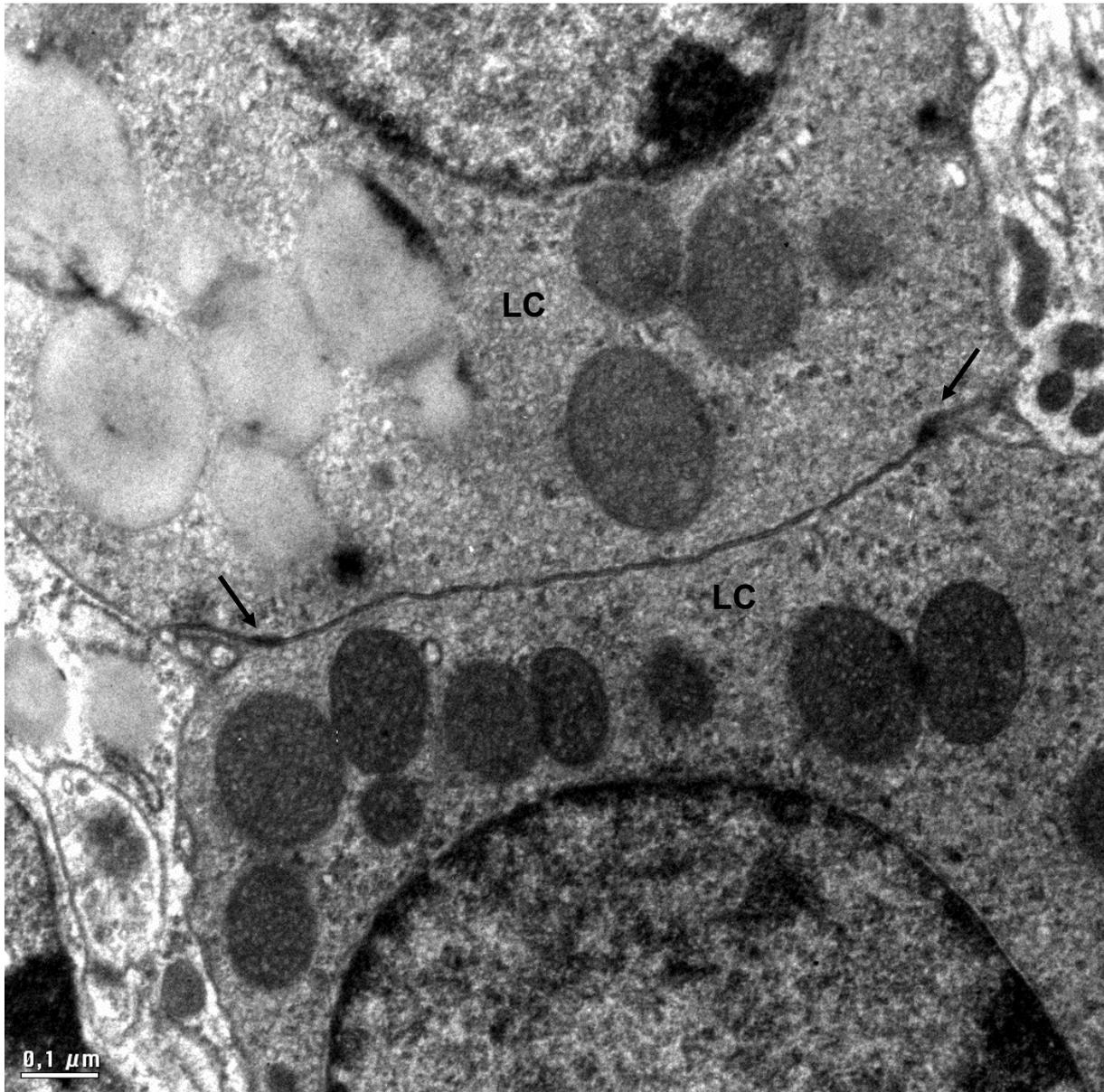


Abb. 4: 1. Postnataltag – Zellmembranverdichtungen

Abbildung zweier Leydig-Zellen (LC), deren Membranen sich eng über eine lange Strecke berühren, ein Interzellularspalt ist nicht zur erkennen. Die zwei Enden dieser Membrangrenze zeigen jeweils eine deutliche Verdichtung (Pfeile). Vergrößerung 17000:1

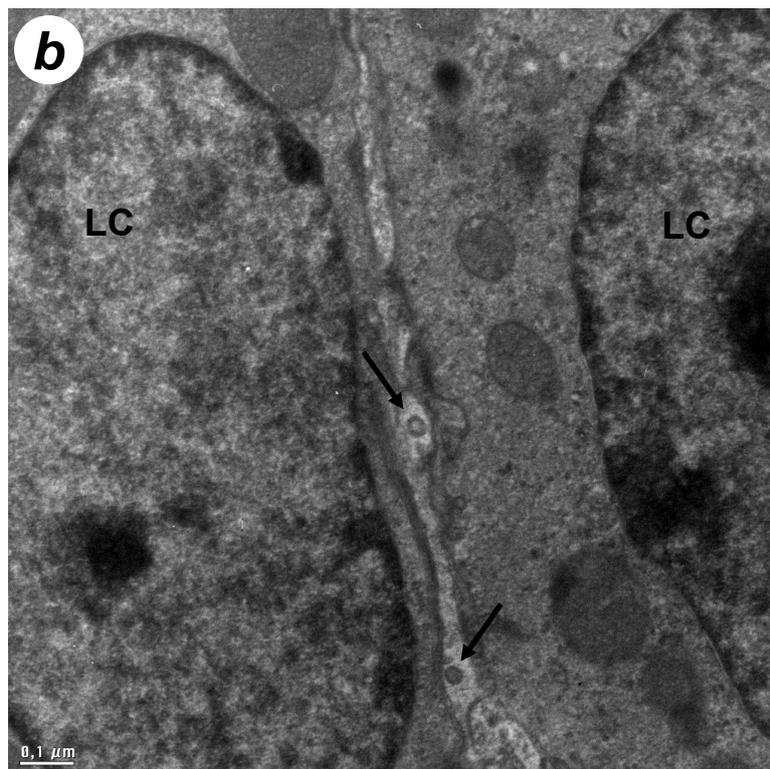
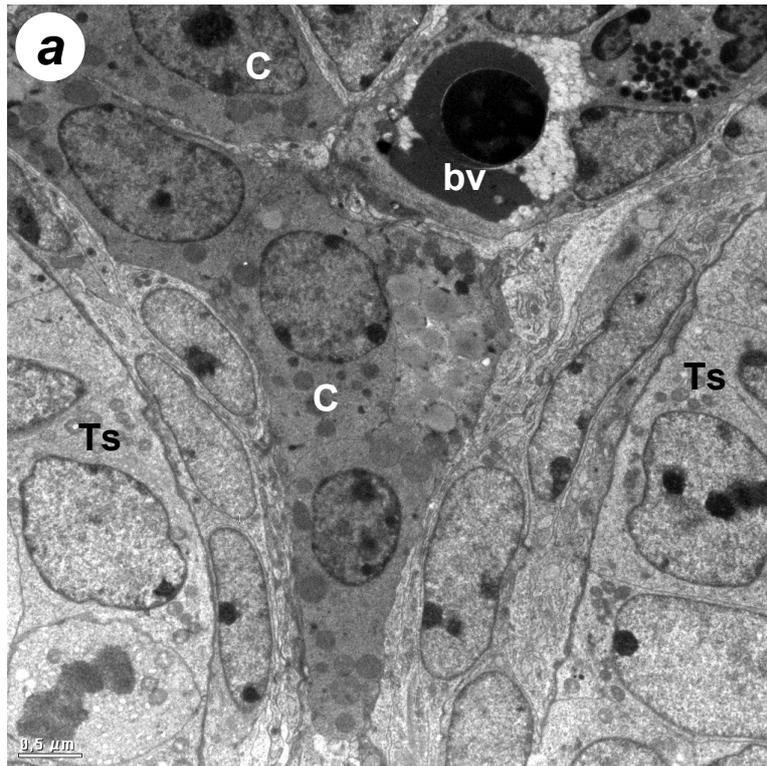


Abb. 5: 1. Postnataltag – Vesikel im Interzellularraum

- a) Übersicht des Interstitiums mit zwei benachbarten Clustern (C) in der Nähe eines Blutgefäßes (bv); Tubuli seminiferi (Ts). Vergrößerung 4000:1
- b) Vergrößerung aus Abb. 5a). Darstellung des Interzellularrumes zwischen zwei Leydig-Zellen in benachbarten Clustern. Im Interzellularraum zeigen sich kleine Vesikel (Pfeile). Vergrößerung 17000:1

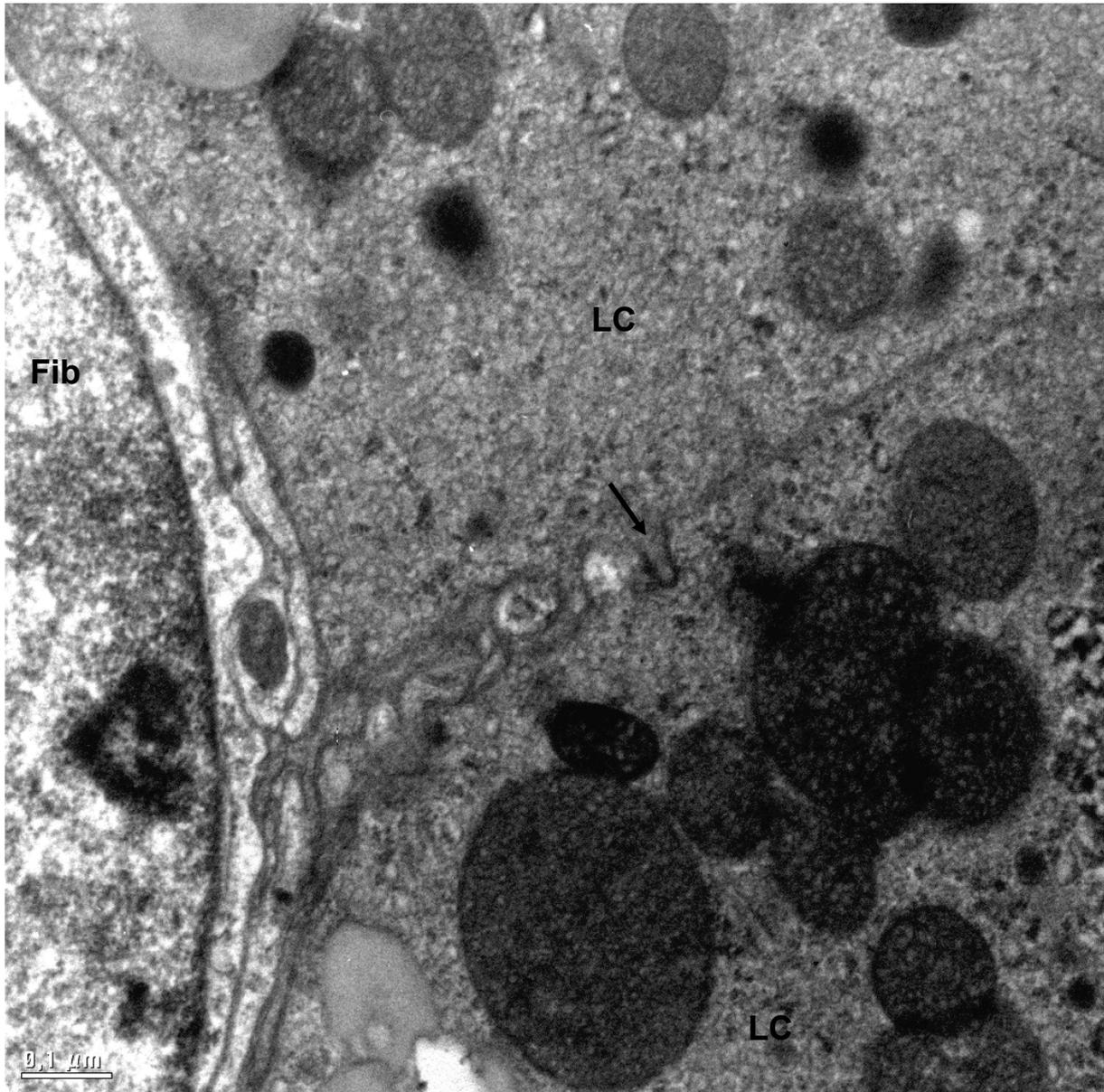


Abb. 6: 1. Postnatahtag – Coated pit

Coated pit (Pfeil) zwischen zwei Leydig-Zellen (LC) im selben Cluster. Fibroblast (Fib). Vergrößerung 20000:1

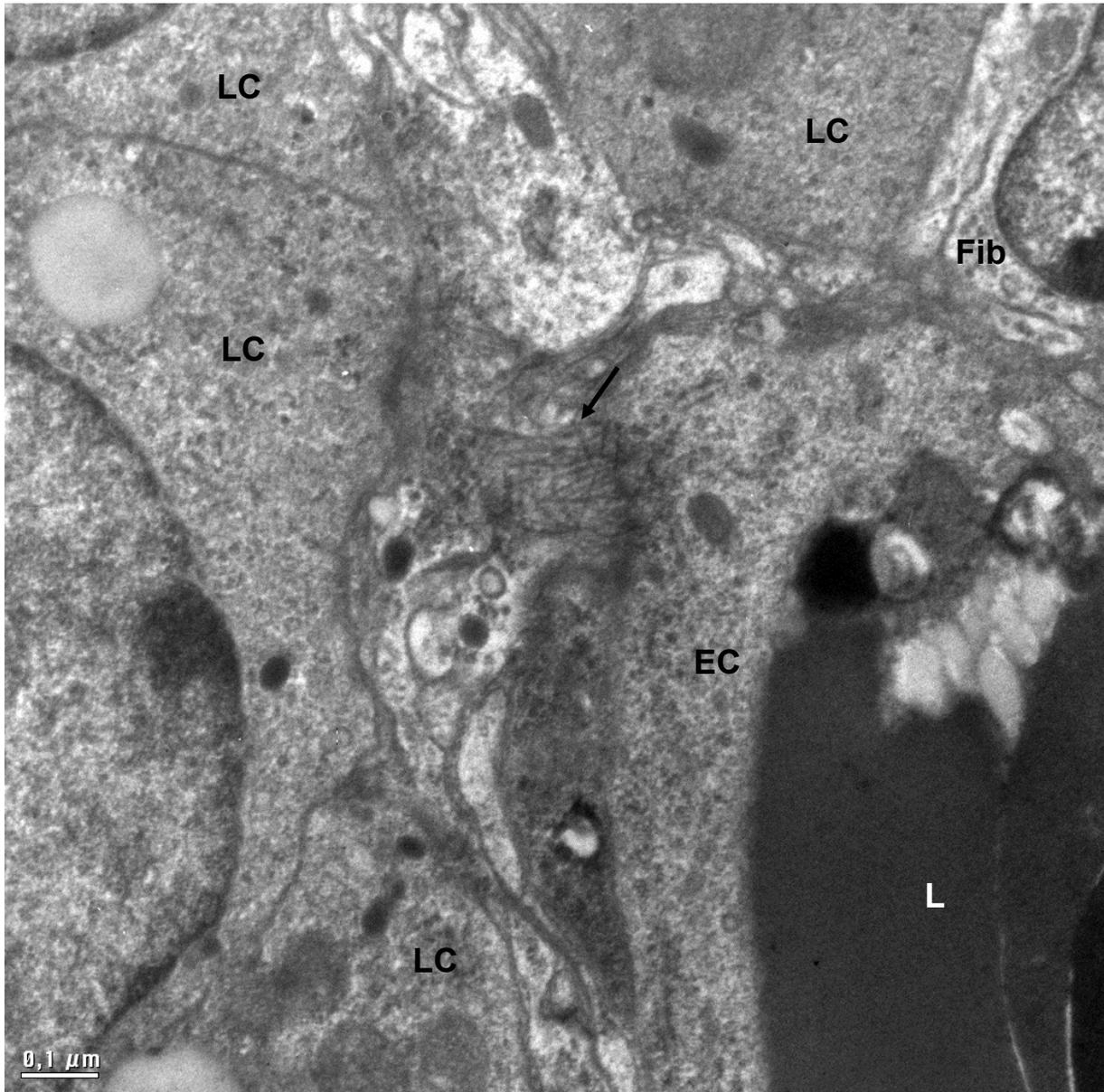


Abb. 7: 1. Postnataltag – Kollagenfasern

Interzellularraum zwischen Leydig-Zellen (LC) und einem Blutgefäß. Kollagenfasern (Pfeil) verlaufen von der Basallamina des Blutgefäßes in Richtung der Leydig-Zellen. Fibroblast (Fib), Endothelzelle (EC), Gefäßlumen (L) Vergrößerung 17000:1

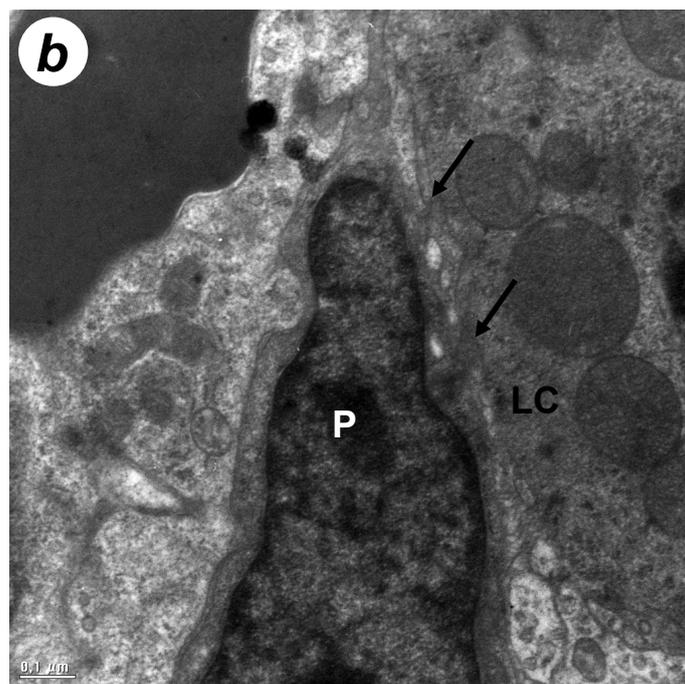
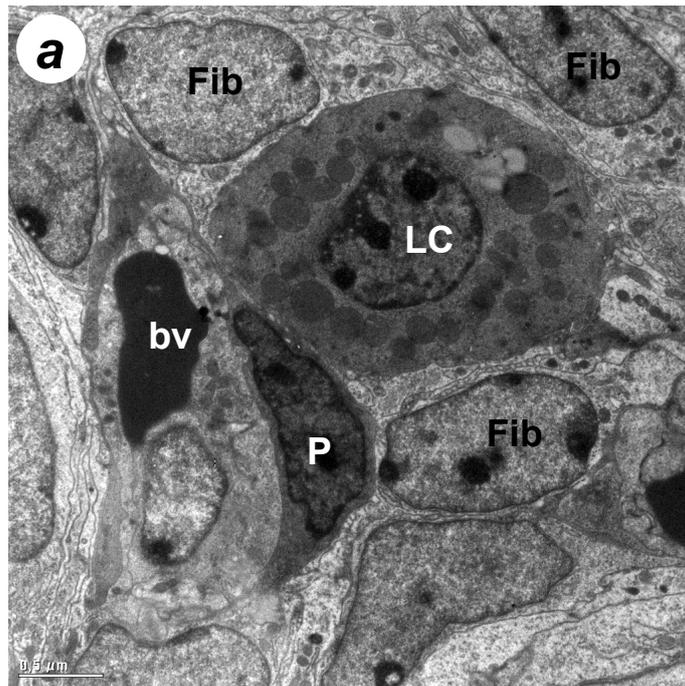


Abb. 8: 1. Postnataltag – Leydig-Zelle, Fibroblast, Blutgefäß

- a) Übersicht einer einzelnen Leydig-Zelle (LC) im Interstitium in Nachbarschaft zu einem Blutgefäß. Blutgefäß (bv), Fibroblasten (Fib) und Perizyten (P). Vergrößerung 6000:1
- b) Vergrößerung aus Abb. 8a. Die Zellmembranen der Leydig-Zelle und des Perizyten (P) berühren sich an zwei Stellen (Pfeile). Vergrößerung 20000:1

3.2 Zellkontakte am 10. Postnataltag

Die interstitiellen Zellen stehen auch am 10. Postnataltag eng beieinander. Die Leydig-Zellen sind weiterhin hauptsächlich in Clustern organisiert und zeigen innerhalb eines Clusters eine enge Nachbarschaft zueinander, ähnlich wie am ersten postnatalen Tag häufig ohne erkennbaren Interzellularraum (Abb. 9).

Abweichend vom einen Tag alten Hoden zeigt sich in dieser Altersklasse eine intakte Basallamina um ein Cluster herum. Diese ist regelmäßig und reichlich von Kollagenfasern umgeben (Abb. 10, Abb. 11), welche außerdem oftmals an der Basallamina von Blutgefäßen aufzufinden sind.

Regelhaft kommen am 10. Postnataltag coated pits an den Membranen der Leydig-Zellen vor. Diese sind sowohl an Clustergrenzen (Abb. 11) als auch zwischen eng benachbarten Leydig-Zellen zu finden.

In der Nähe von Blutgefäßen finden sich ebenfalls häufig Leydig-Zellen. Diese treten über coated pits mit den Endothelzellen in Verbindung (Abb. 12). Kollagene Fasern sind oft in unmittelbarer Umgebung der Blutgefäße lokalisiert.

Ähnlich der Leydig-Zellen untereinander stehen die Myoidzellen mit den Leydig-Zellen ebenfalls mit ineinander greifenden, filiformen Membranausläufern in engem Kontakt (Abb. 13).

Makrophagen, die am 1. Postnataltag nur spärlich beobachtet werden, lassen sich am 10. Postnataltag regelmäßig nachweisen. Sie zeigen sich in einer sehr engen Nachbarschaft zu Leydig-Zellen, sodass nur ein sehr schmaler Extrazellularraum verbleibt (Abb. 14). Coated pits schnüren sich von der Leydig-Zelle in Richtung Makrophagen ab (Abb. 14b).

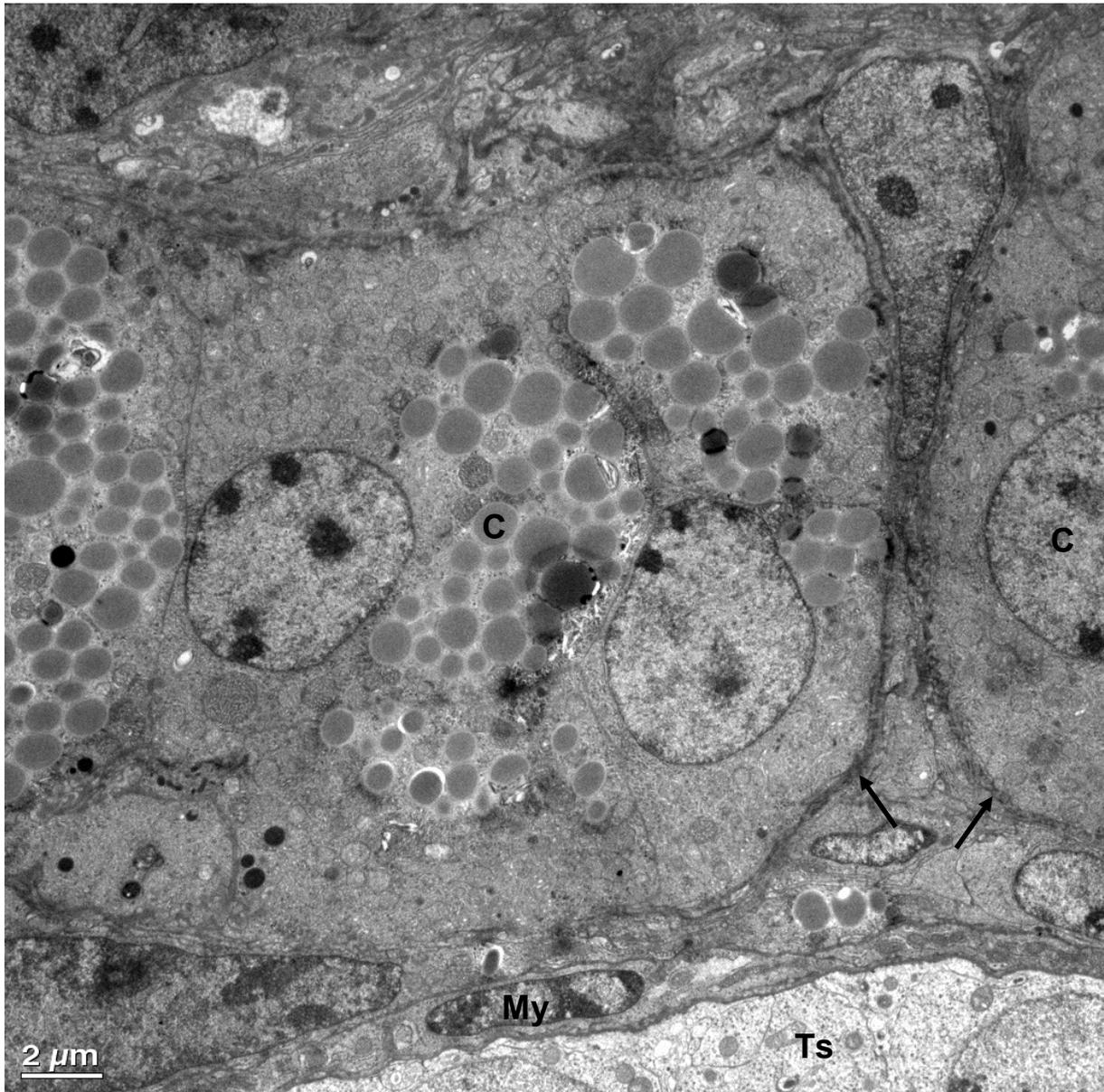


Abb. 9: 10. Postnataltag – Clusterorganisation der Leydig-Zellen

Übersicht eines Interstitiums mit zwei Clustern (C). Die Cluster sind von einer Basallamina (Pfeile) umgeben. Die Leydig-Zellen sind eng benachbart, sodass elektronenmikroskopisch kein Interzellularraum erkennbar ist. Myoidzelle (My), Tubulus seminiferous (Ts). Vergrößerung 4000:1

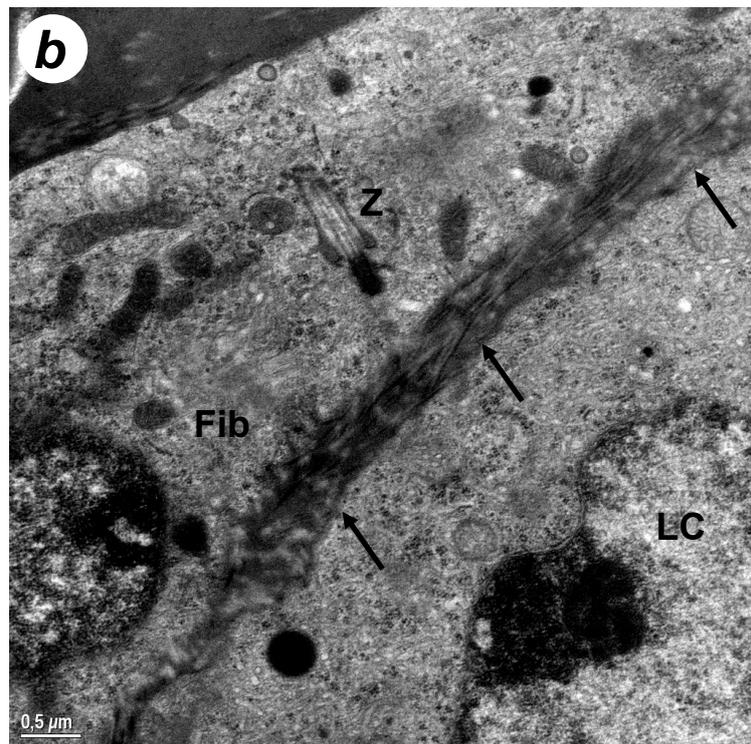
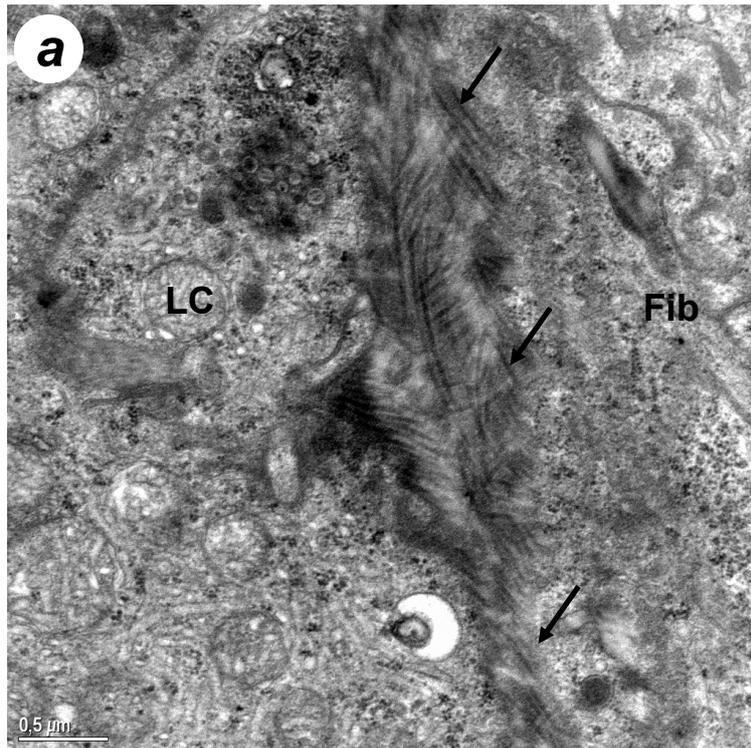


Abb. 10: 10. Postnataltag – Kollagenreiche Basallamina als Clusterbegrenzung

- a) Darstellung einer Clustergrenze, gebildet durch eine kollagenreiche Basallamina (Pfeile). Leydig-Zelle (LC), Fibrozyt (Fib). Vergrößerung 25000:1
- b) Die Basallamina mit reichlich Kollagen (Pfeile) markiert die Grenze zwischen einem Fibrozyten (Fib) sowie einem Cluster. Leydig-Zelle (LC), Zilium (Z). Vergrößerung 17000:1

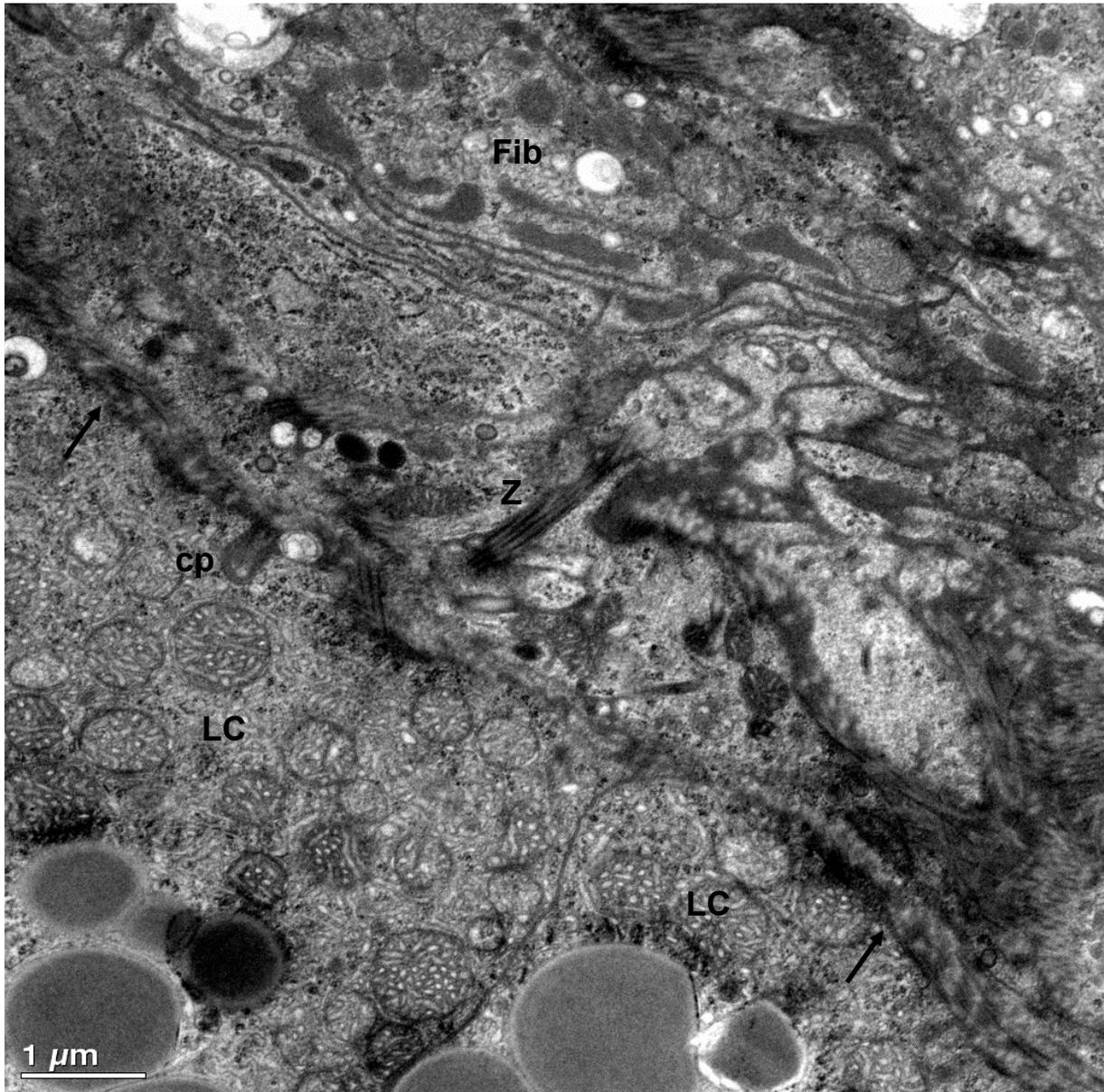


Abb. 11: 10. Postnataltag – Coated pit an einer Clustergrenze

Clustergrenze mit Basallamina und Kollagenfasern (Pfeil). Ein coated pit (cp) schnürt sich in Richtung der Leydig-Zelle (LC) ab. Zilium (Z), Fibrozyt (Fib). Vergrößerung 12000:1

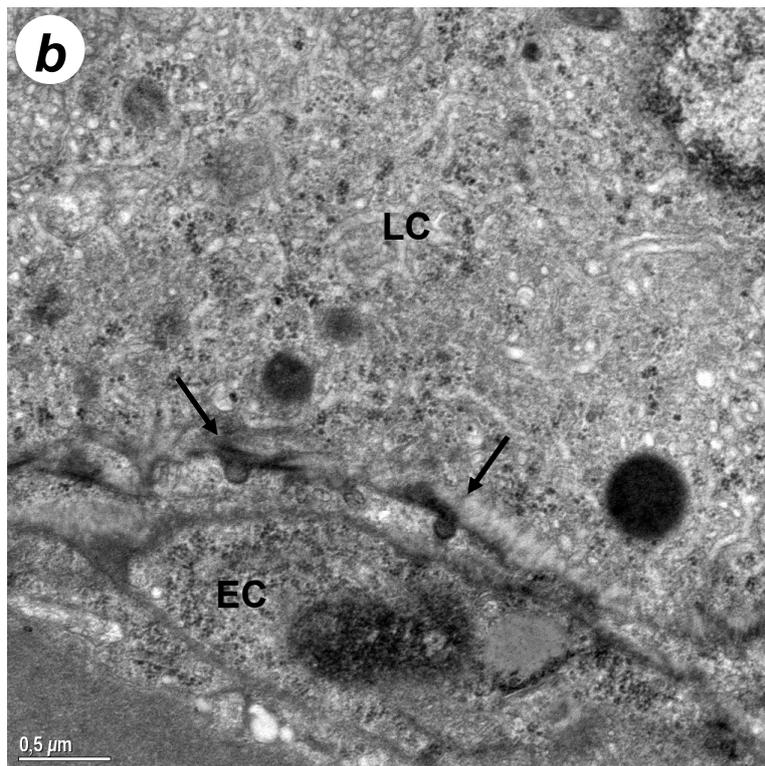
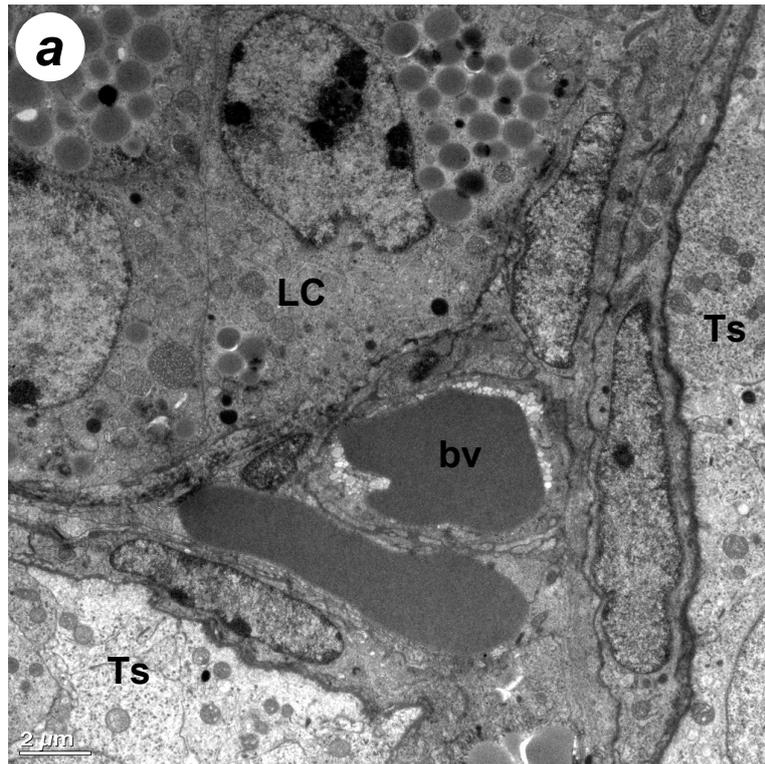


Abb. 12: 10 Postnataltag – Coated pits zu Endothelzellen

- a) Übersicht eines Interstitiums, welches ein Cluster in der Nähe eines Blutgefäßes (bv) zeigt. Leydig-Zelle (LC), Tubuli seminiferi (Ts). Vergrößerung 5000:1
- b) Vergrößerung aus 12a. Coated pits (Pfeile) schnüren sich von der Leydig-Zelle (LC) in Richtung Endothelzelle (EC) ab. Vergrößerung 25000:1

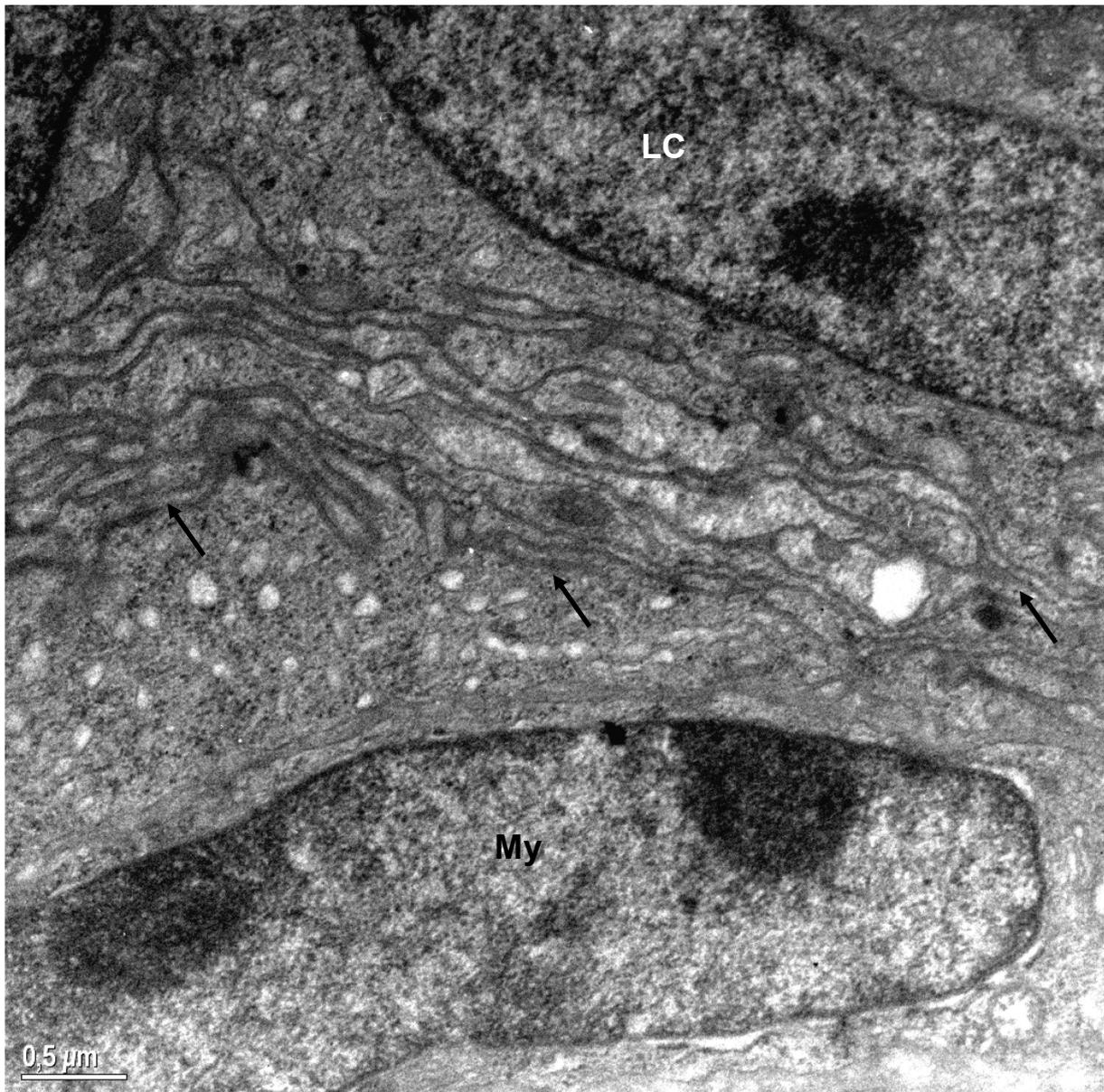


Abb. 13: 10. Postnataltag – Filiforme Membranstruktur Myoidzelle - Leydig-Zelle

Zwischen einer Leydig-Zelle (LC) und einer Myoidzelle (My) zeigen sich flach miteinander verzahnte Membranstapel (Pfeile). Vergrößerung 20000:1

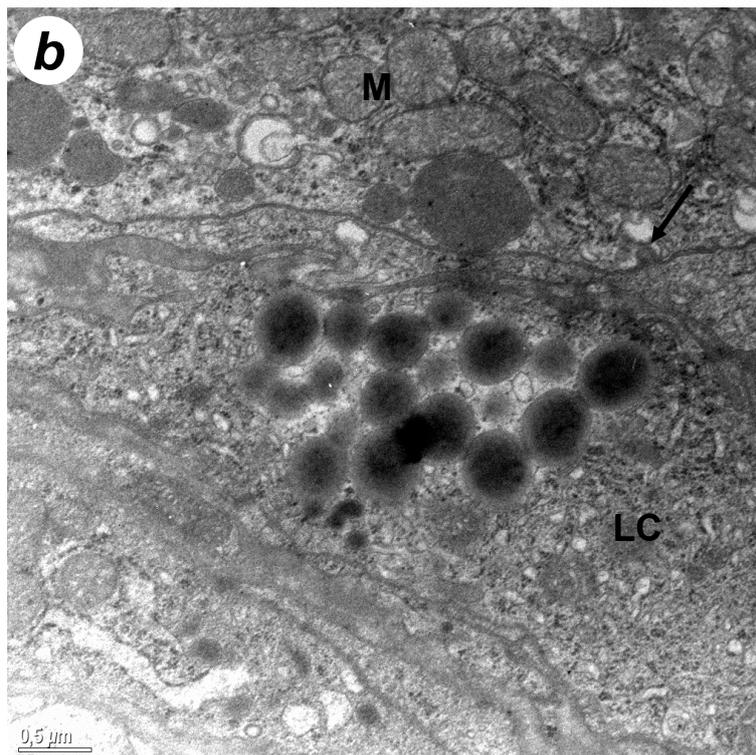
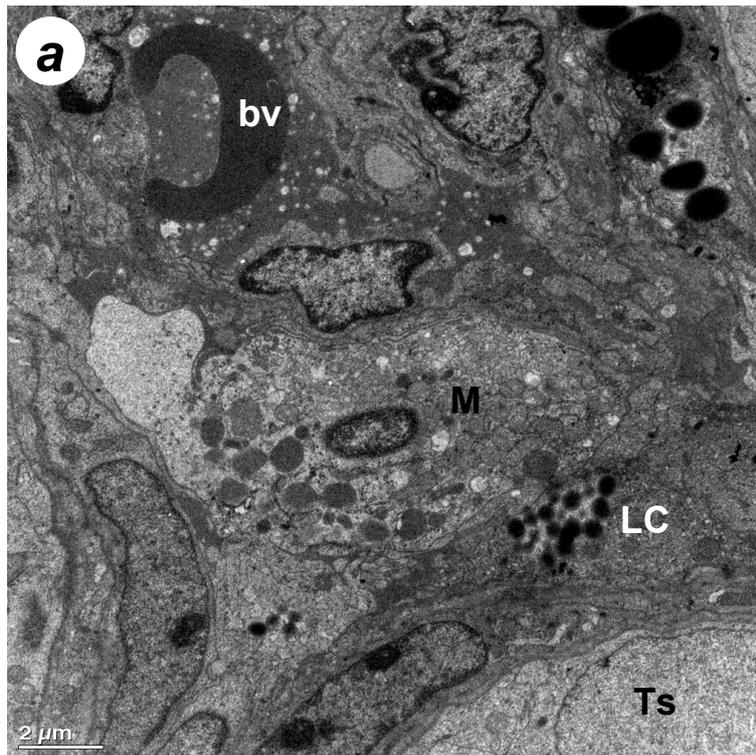


Abb. 14: 10. Postnataltag – Leydig-Zellen - Makrophage

- a) Übersicht eines Makrophagen (M) mit enger Beziehung zu einer Leydig-Zelle (LC). Tubulus seminiferous (Ts), Blutgefäß (bv). Vergrößerung 6000:1
- b) Vergrößerung aus Abb. 14a verdeutlicht die enge Nachbarschaft zwischen der Leydig-Zelle (LC) und des Makrophagen (M). Ein coated pit (Pfeil) schnürt sich von der Leydig-Zelle in Richtung Makrophagen ab. Vergrößerung 20000:1

3.3 Zellkontakte am 30. Postnataltag

Im Vergleich zu den vorherigen Proben zeigen die Interstitien des 30. Postnataltages einen veränderten Aufbau. Die interstitiellen Zellen sind sehr locker organisiert mit weiten Extrazellularräumen. Die Leydig-Zellen sind weiterhin in Gruppen angeordnet, jedoch sind die Grenzen der Cluster vielmehr unscharf umrissen. Die kollagenreiche Basallamina um die Cluster herum fehlt (Abb. 15).

Scharfe und glatte Membrangrenzen, wie sie am 1. und 10. Postnataltag dominieren, werden in diesem Alter eher selten angetroffen. Die Leydig-Zellen zeigen vermehrt zahlreiche kleine und dünne sowie zum Teil verzweigte Ausläufer, die in die Interzellularräume hineinragen, sich untereinander berühren und sich in vielen Fällen auch zu kleinen Vesikeln abschnüren (Abb. 15, Abb. 16, Abb. 17). Gap junctions sind sowohl zwischen Leydig-Zellen untereinander (Abb. 18, Abb. 19) als auch mit Fibrozyten vermehrt ausgebildet (Abb. 20).

Zahlreiche coated pits, die sich zum Teil als interzelluläre coated vesicle zeigen, sind ebenfalls an den Zellgrenzen zweier benachbarter Zellen zu finden. Diese präsentieren sich zwischen zwei angrenzenden Leydig-Zellen, Makrophagen und Fibrozyten, sowie Leydig- und Endothelzellen.

Durch die lockere Anordnung der interstitiellen Zellen in diesem Altersstadium ist eine Vergrößerung des subendothelialen Raums zu erkennen (Abb. 15).

Strickleiterartige Verbindungen aus Membranbestandteilen zwischen Leydig-Zellen und Fibrozyten treten in diesem Stadium gehäuft auf (Abb. 21).

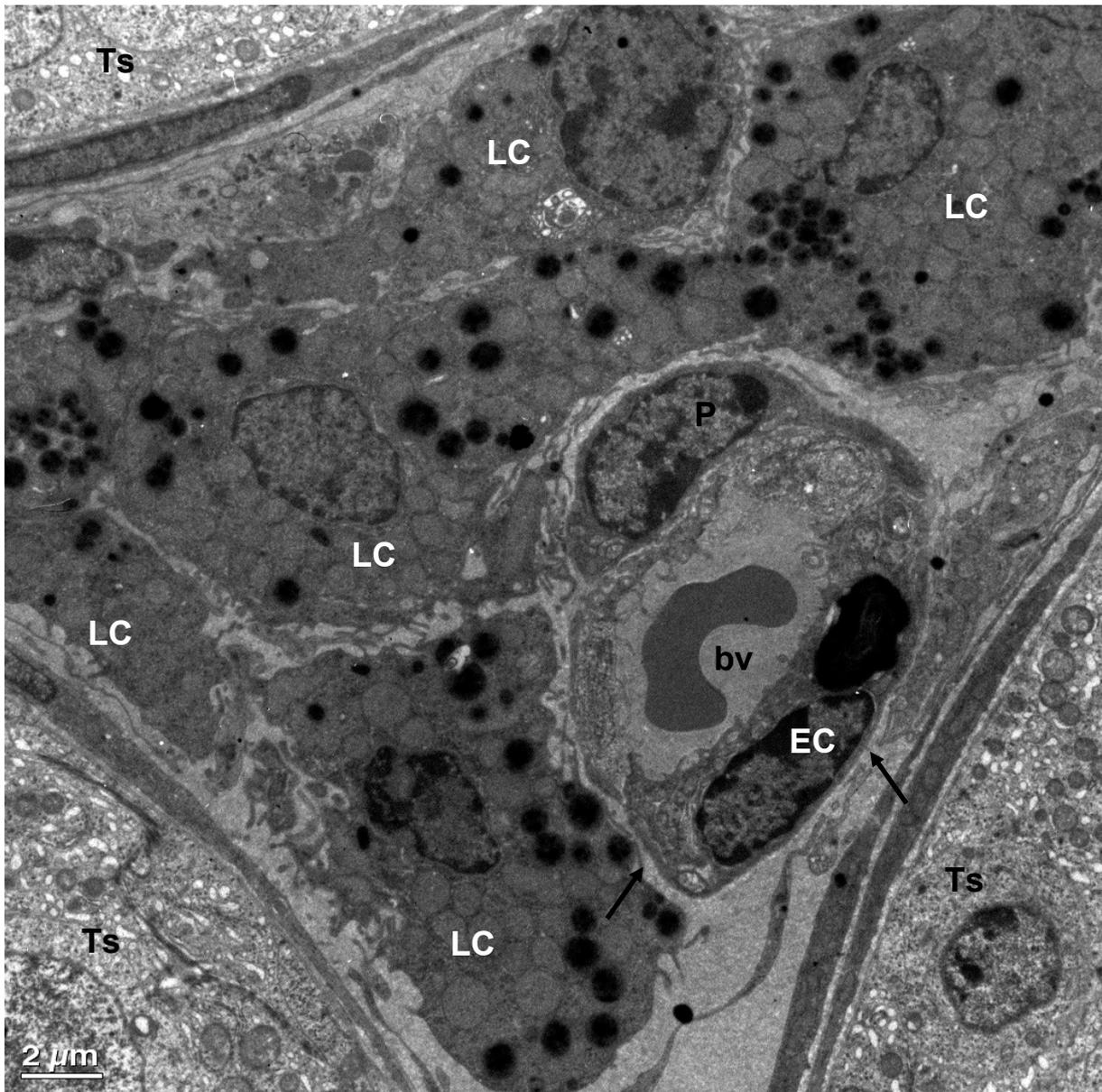


Abb. 15: 30. Postnataltag – Aufbau des Interstitiums

Übersicht eines Interstitiums zwischen drei Tubuli seminiferi (Ts). Das interstitielle Gewebe ist locker organisiert. Die Leydig-Zellen (LC) besitzen zahlreiche Ausläufer. Das Blutgefäß (bv) zeigt einen subendothelialen Raum (Pfeil). Endothelzelle (EC), Perizyt (P). Vergrößerung 4000:1

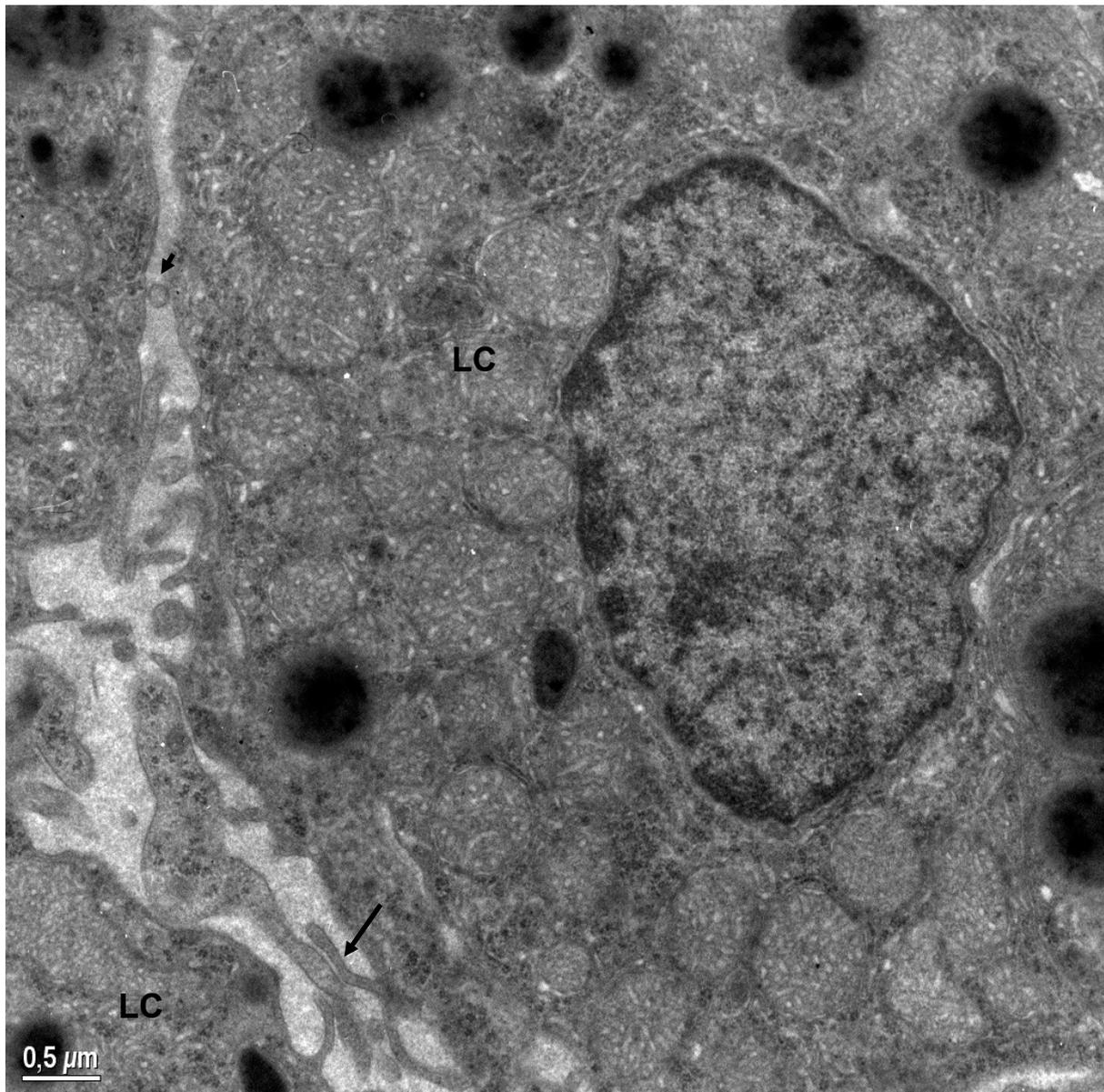


Abb. 16: 30. Postnataltag – Ausläufer und Vesikel der Leydig-Zellen

Benachbarte Leydig-Zellen (LC) mit zahlreichen Ausläufern (Pfeil), die in den Interzellularraum ragen. Zum Teil schnüren sich Vesikel ab (Pfeilspitze) Vergrößerung 15000:1

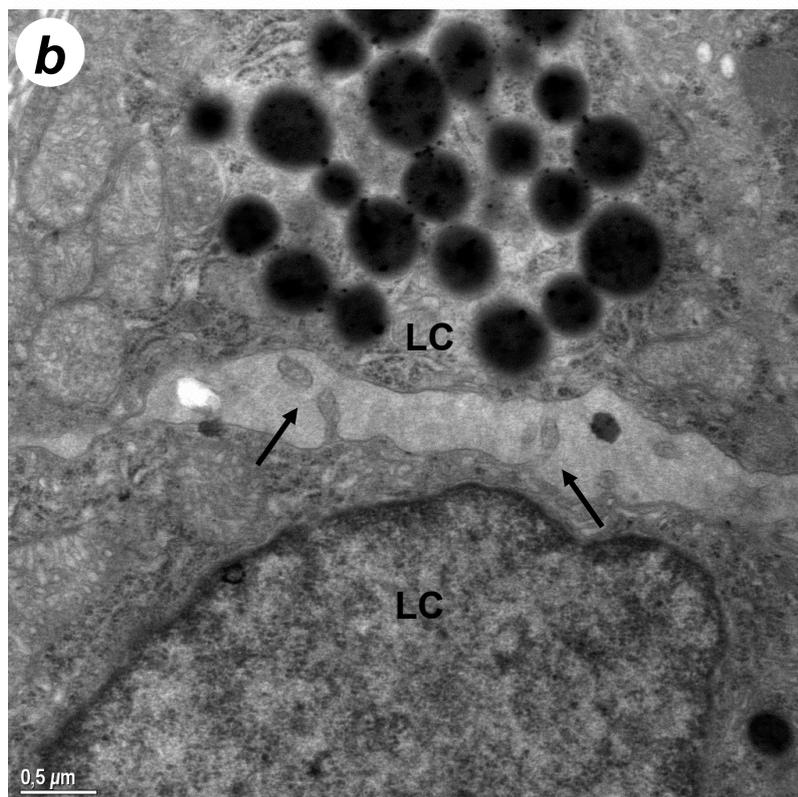
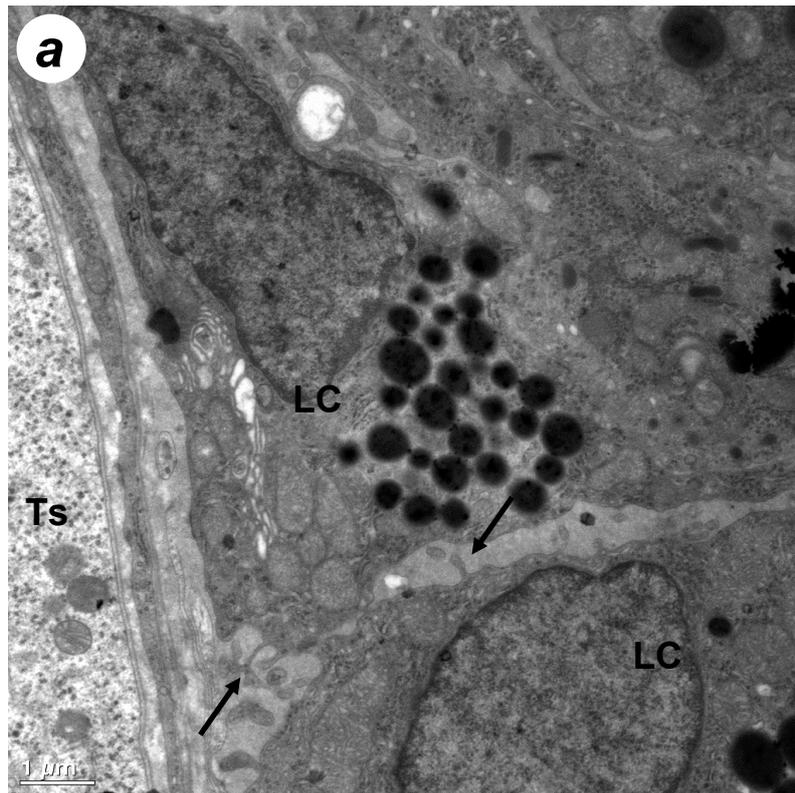


Abb. 17: 30. Postnataltag – Vesikel

- a) Darstellung locker benachbarter Leydig-Zellen (LC) im interstitiellen Gewebe. Die Leydig-Zellen besitzen zahlreiche Ausläufer (Pfeile), die in die Interzellularräume hineinragen. Tubulus seminiferous (Ts). Vergrößerung 10000:1
- b) Vergrößerung aus Abb. 17a. Vesikel (Pfeile) schnüren sich aus den Ausläufern der Leydig-Zellen (LC) in die Interzellularräume ab. Vergrößerung 20000:1

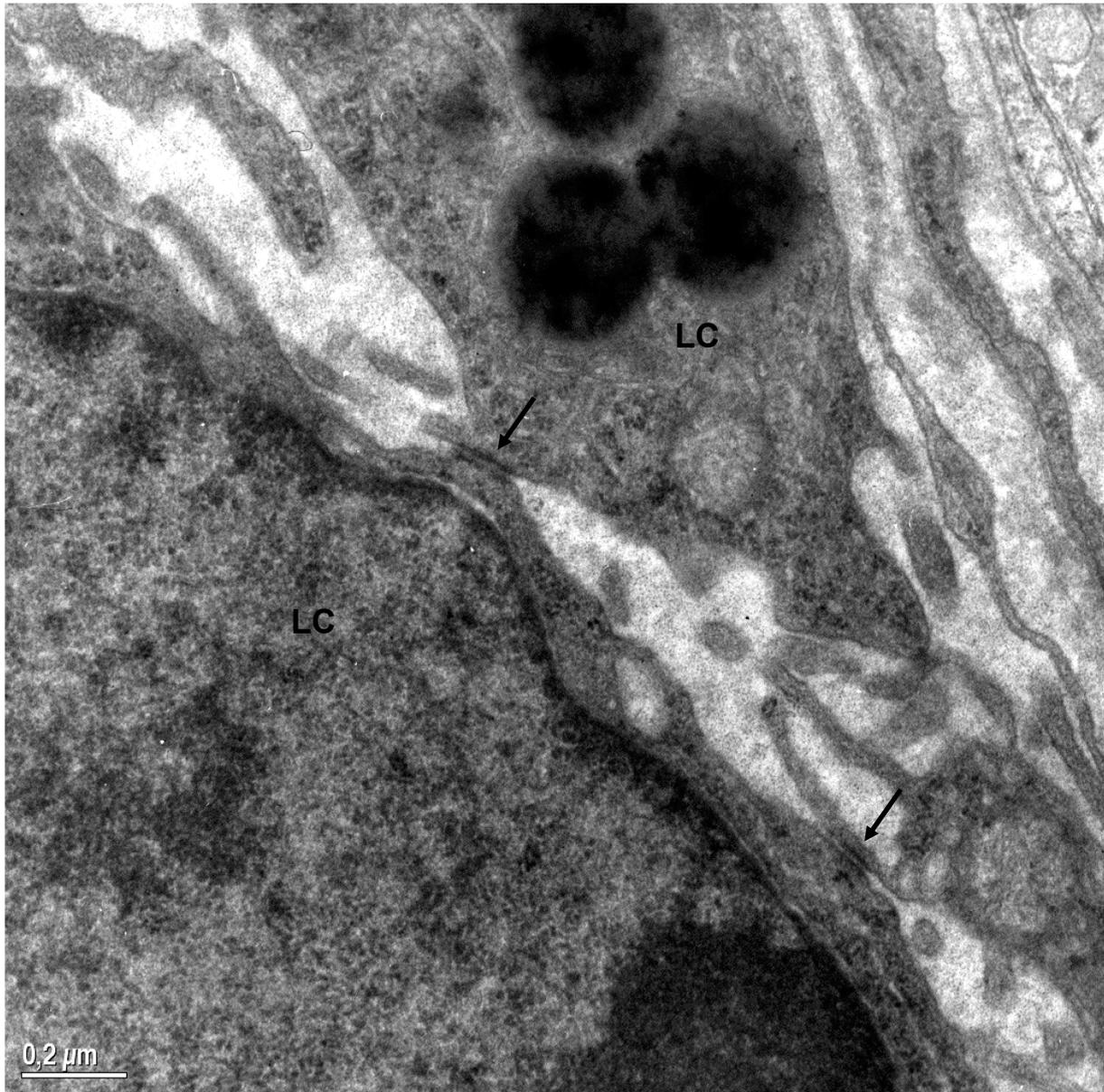


Abb. 18: 30. Postnataltag – Gap junctions der Zellausläufer

Zwei benachbarte Leydig-Zellen (LC) weisen dünne Ausläufer auf, die sich an zwei Stellen in gap junctions (Pfeile) berühren. Vergrößerung 20000:1

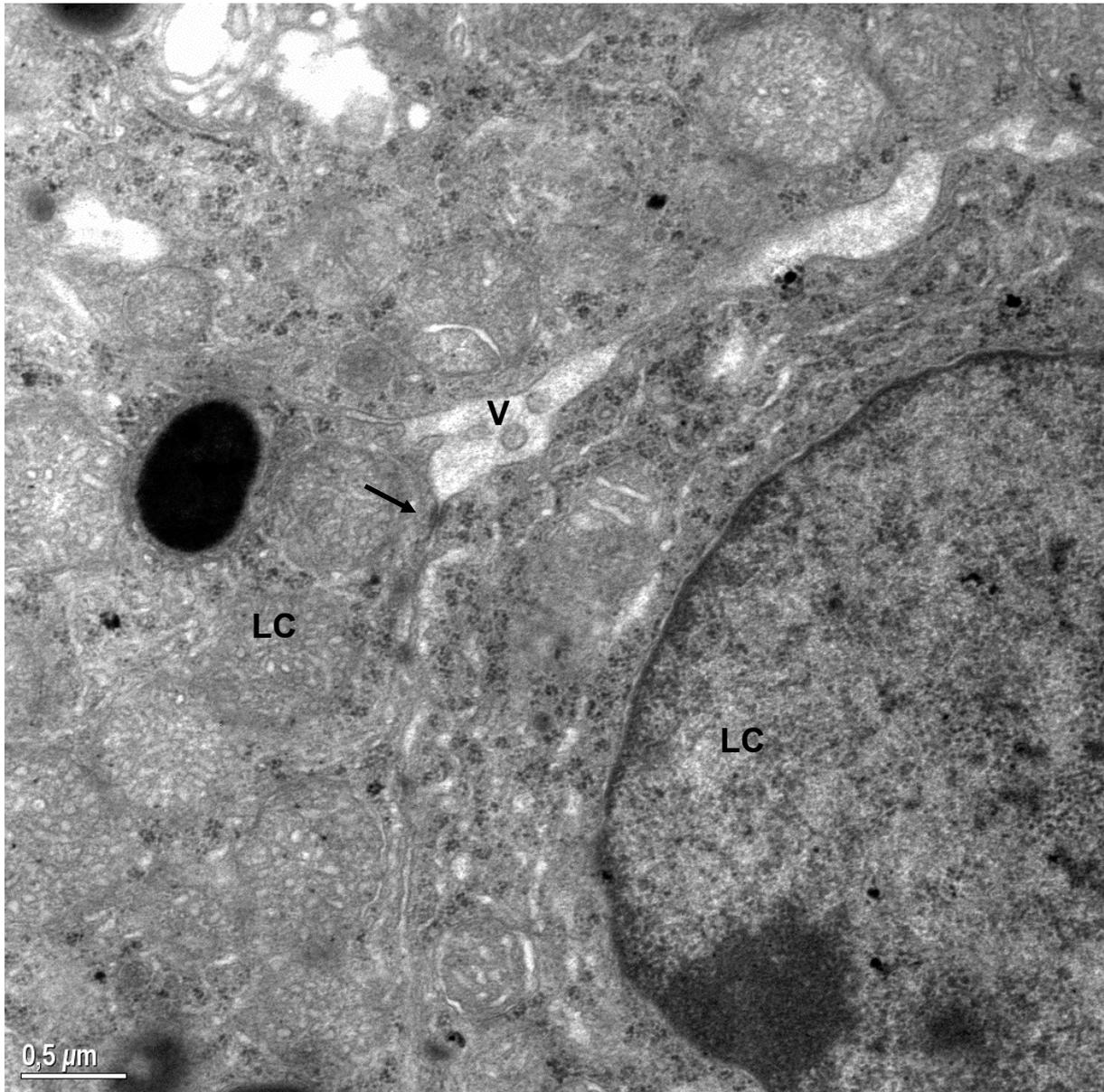


Abb. 19: 30. Postnataltag – Gap junctions der Leydig-Zellen

Zwei benachbarte Leydig-Zellen (LC) stehen durch ein gap junction (Pfeil) in Verbindung. Kleine Vesikel (V) befinden sich im Interzellularraum zwischen den Leydig-Zellen. Vergrößerung 20000:1

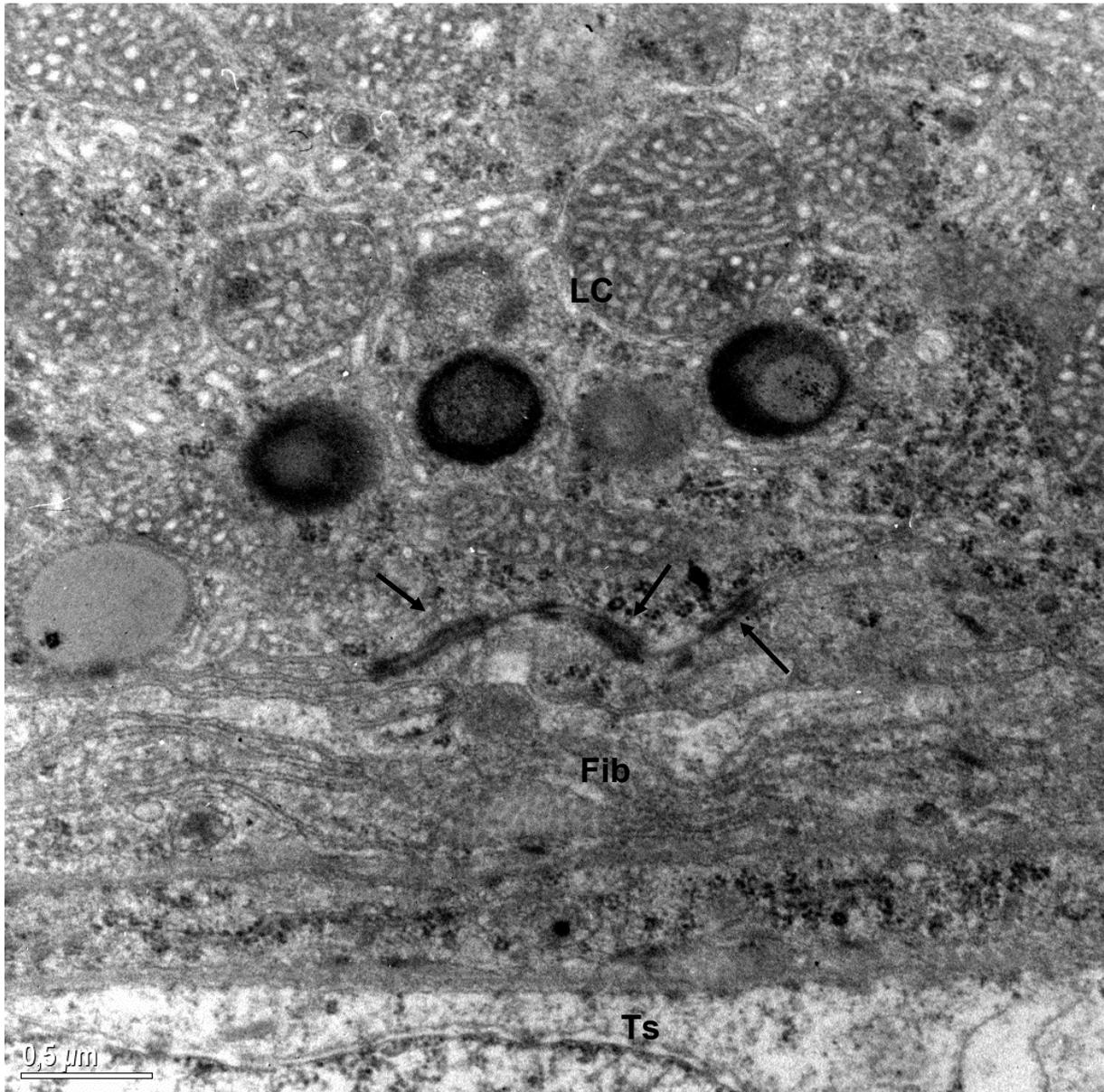


Abb. 20: 30. Postnataltag – Gap junction zwischen Leydig-Zelle und Fibrozyt

Darstellung zeigt gap junctions (Pfeile) zwischen der Leydig-Zelle (LC) und dem Ausläufer eines peritubulären Fibrozyten (Fib). Tubulus seminiferous (Ts) Vergrößerung 25000:1

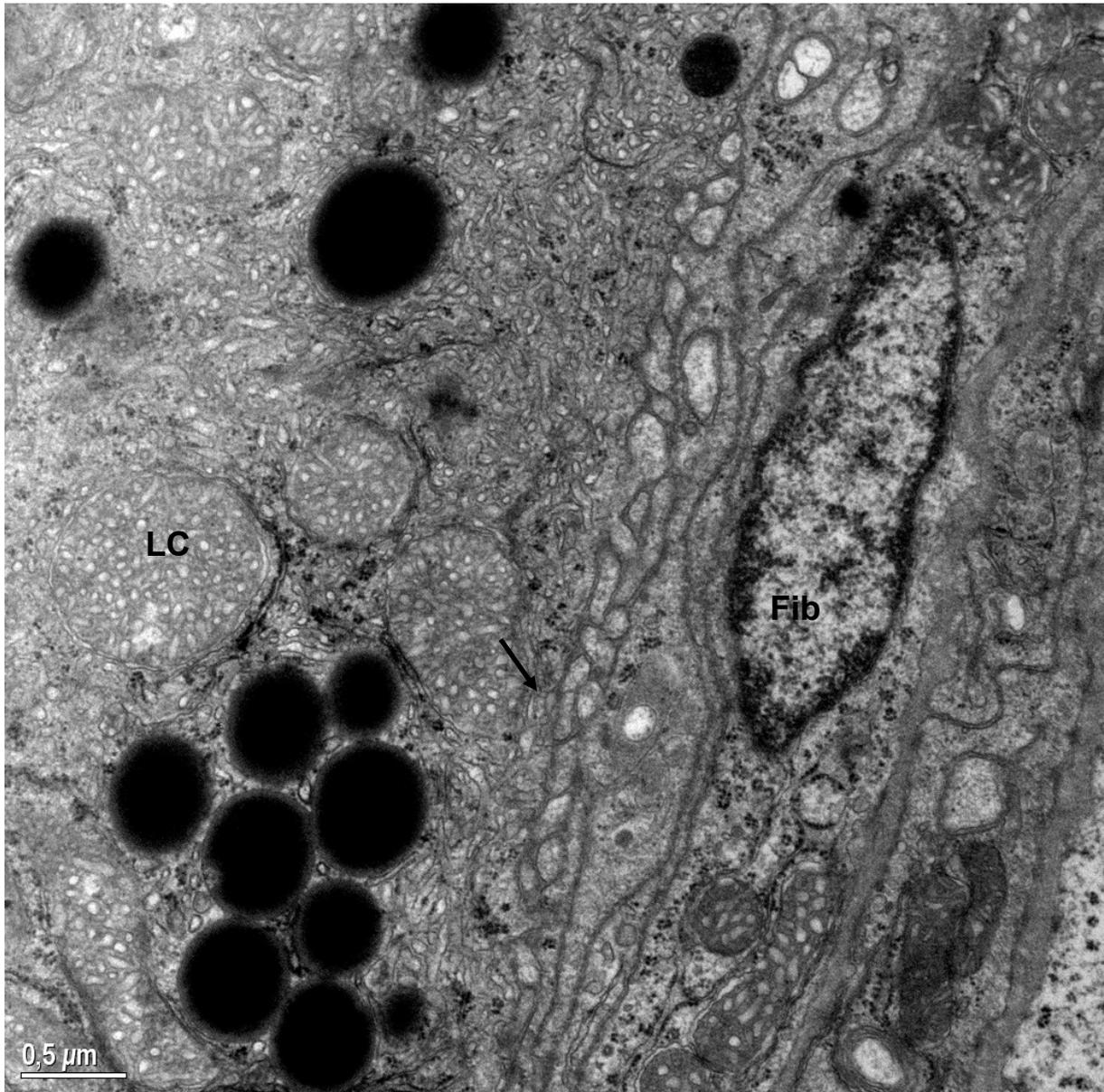


Abb. 21: 30. Postnataltag – Strickleiterartige Membranstrukturen zwischen Leydig-Zelle und peritubulären Fibrozyten

Leydig-Zelle (LC), peritubulärer Fibrozyt (Fib), strickleierähnliche Strukturen aus Membranschläuchen (Pfeil). Vergrößerung 20000:1

3.4 Zellkontakte am 50. Postnataltag

Am 50. Postnataltag zeigen sich die interstitiellen Zellen wieder eng beieinander mit schmalen Extrazellularräumen. Die am 30. Postnataltag noch zahlreichen, dünnen Ausläufer der Leydig-Zellen sind am 50. Postnataltag nur noch spärlich zu beobachten.

In vielen Interstitien des 50. Postnataltages befinden sich in den Leydig-Zellen Phagolysosomen. In der unmittelbaren Umgebung dieser Zellen befinden sich regelmäßig Makrophagen (Abb. 22).

Die Leydig-Zellen weisen untereinander vorzugsweise strickleiterförmige Membranbestandteile auf. Die Räume zwischen den Membranen enthalten einen helleren Inhalt als das Cytoplasma der angrenzenden Zellen (Abb. 22a, Abb. 23). Gelegentlich sieht man solche Areale in ähnlicher Form zwischen Leydig-Zellen und Makrophagen sowie Fibrozyten (Abb. 24). Manchmal folgt auf eine solche Strickleiterformation ein Abschnitt mit mehreren parallel aufeinander gestapelten Membranabschnitten.

In Einzelfällen stehen benachbarte Leydig-Zellen auch über ganz feine und dünne Brücken miteinander in Verbindung (Abb. 25).

Auch zwischen Leydig-Zellen und Blutkapillaren werden zahlreiche Membranverbindungen beobachtet (Abb. 26).

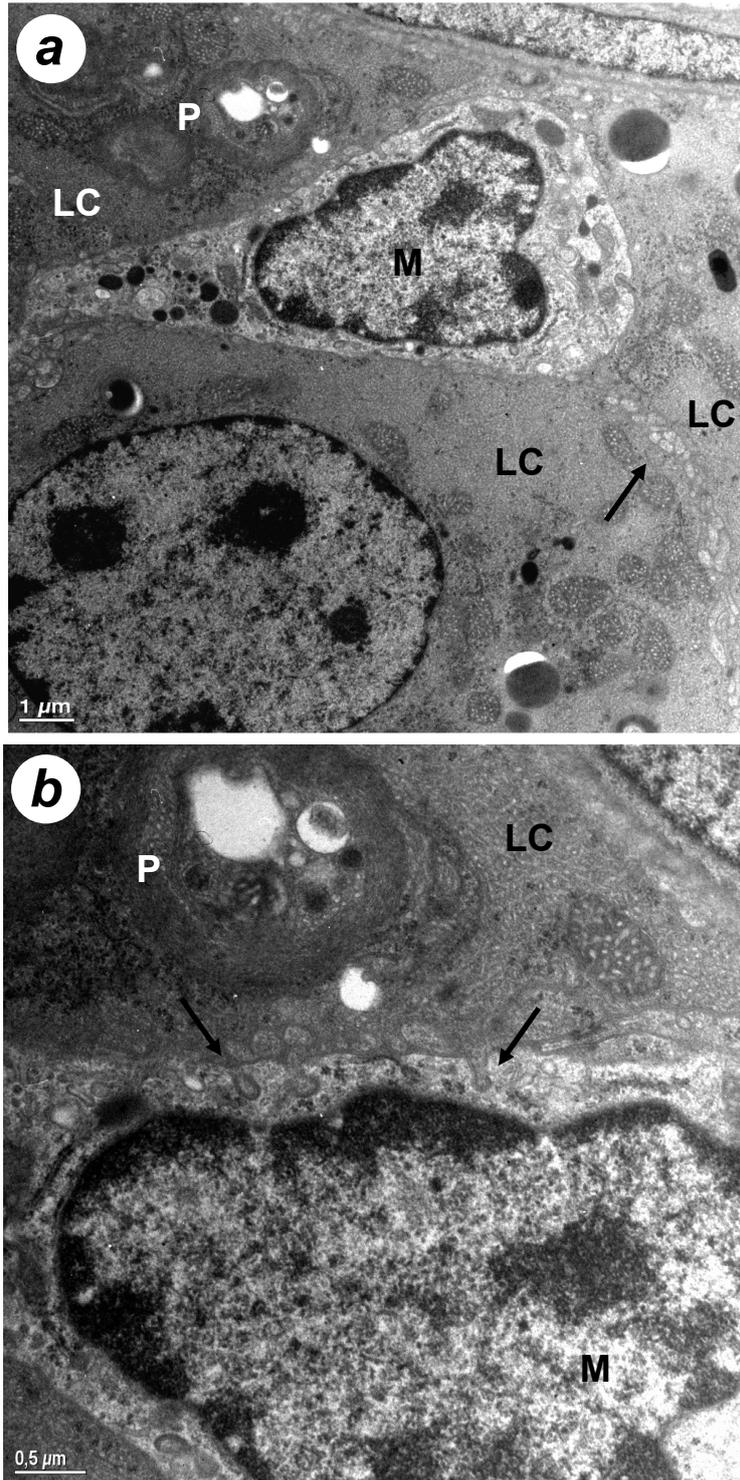


Abb. 22: 50. Postnataltag – Beziehung zwischen Leydig-Zelle und Makrophage

- a) Eine zugrunde gehende Leydig-Zelle (LC) mit zahlreichen Phagolysosomen (P) zeigt sich in der unmittelbaren Nachbarschaft zu einem Makrophagen (M). Membranvernetzungen (Pfeil) zwischen zwei Leydig-Zellen (LC). Vergrößerung 3000:1
- b) Vergrößerung aus Abb. 22a. Coated pits (Pfeile) schnüren sich in das Makrophageninnere (M) ab. Vergrößerung 20000:1

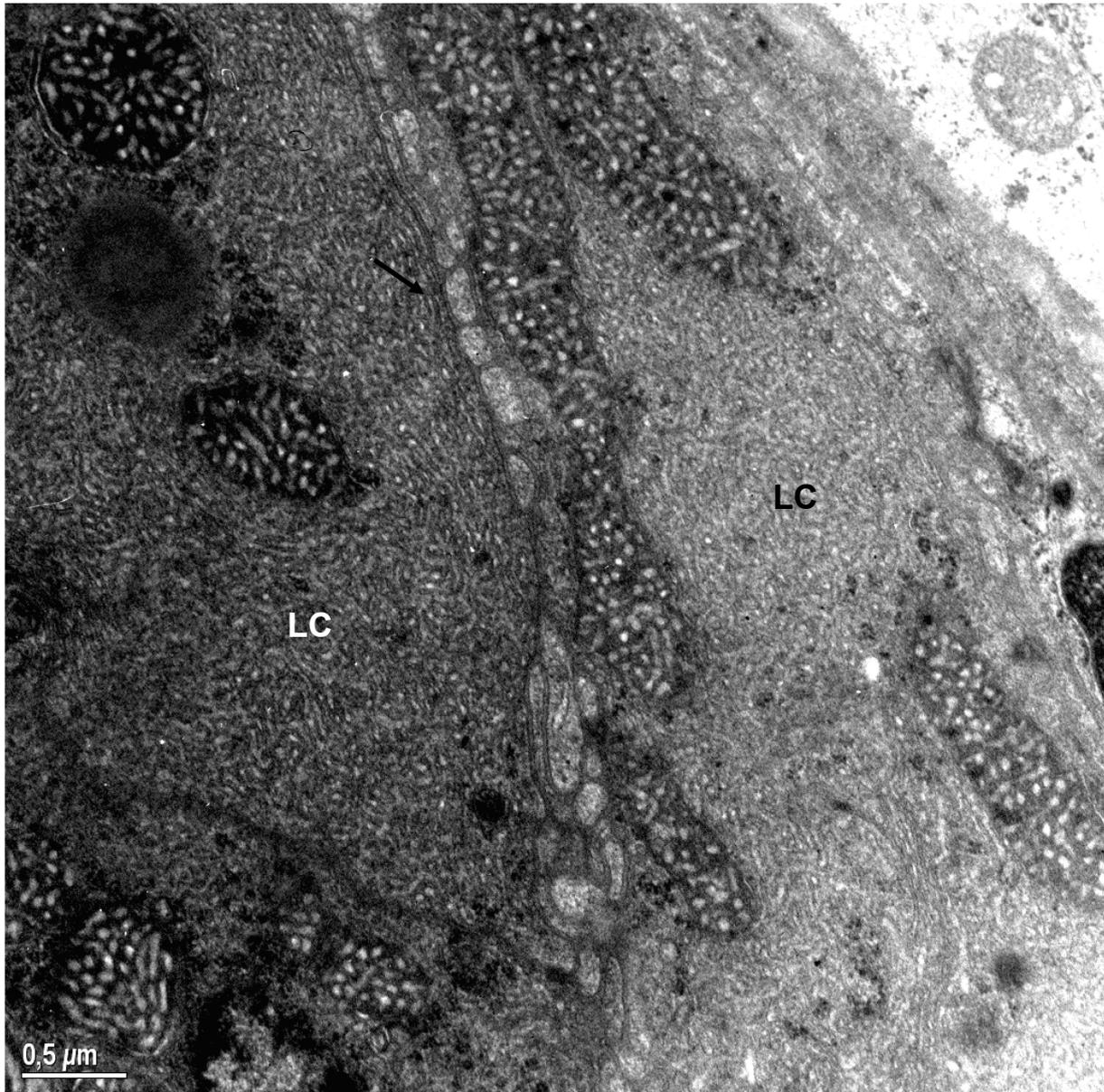


Abb. 23: 50. Postnataltag – Strickleiterförmige Membranbestandteile zwischen Leydig-Zellen

Membranschläuche zwischen Leydig-Zellen (LC) bilden eine strickleiterähnliche Form (Pfeil). Die Zwischenräume sind mit hellerem Inhalt gefüllt, als das Zytoplasma der angrenzenden Zellen. Vergrößerung 20000:1

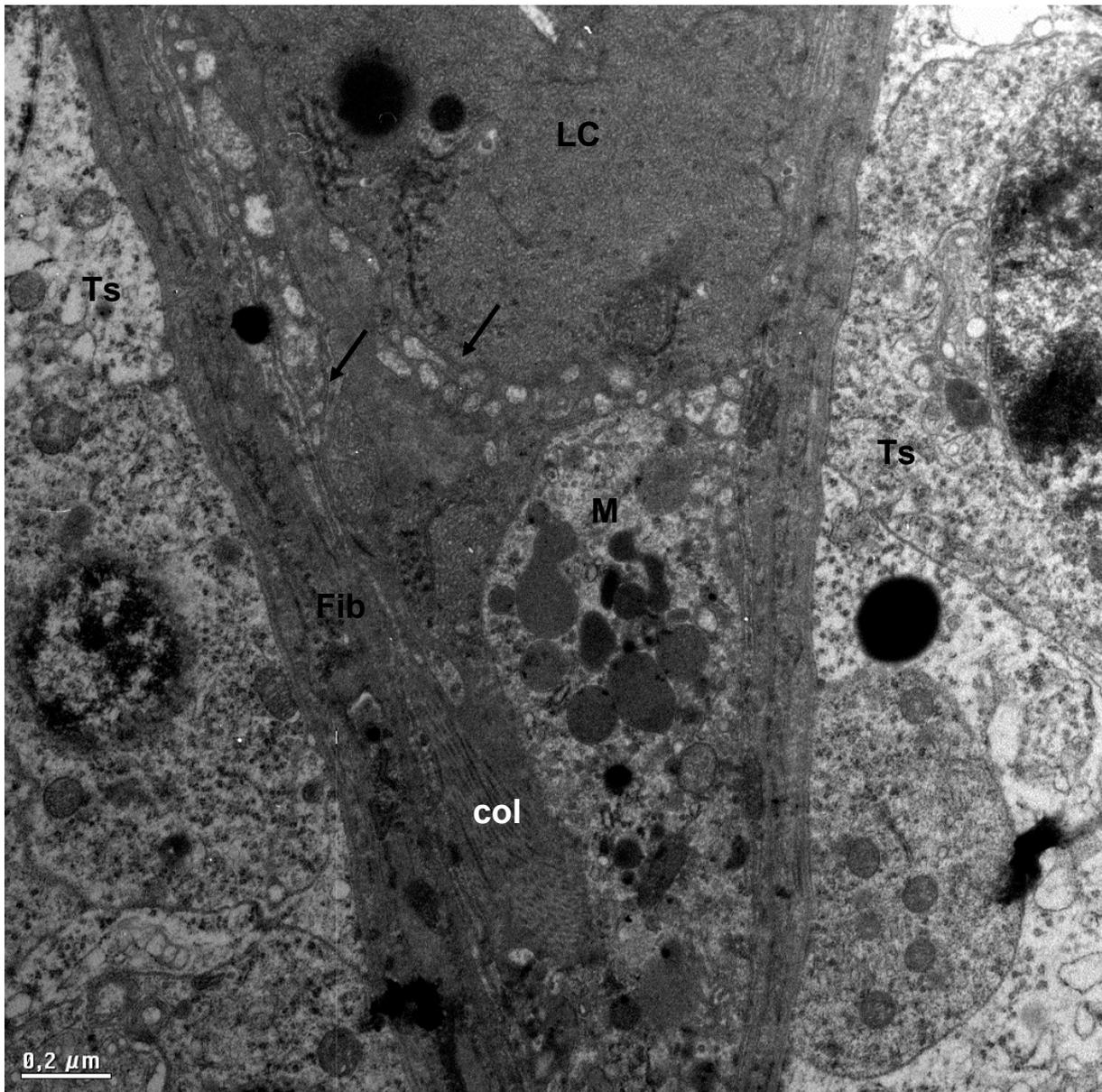


Abb. 24: 50. Postnataltag – Strickleiterförmige Membranbestandteile zwischen Leydig-Zelle und Makrophage sowie Fibrozyt

Übersicht eines Interstitiums, zwischen zwei Tubuli seminiferi (Ts). Zwischen der Leydig-Zelle (LC) und dem peritubulären Fibrozyten (Fib), sowie dem Makrophagen (M) zeigen sich strickleiterähnlich strukturierte Membranschläuche (Pfeile). Kollagenfasern (col). Vergrößerung 10000:1

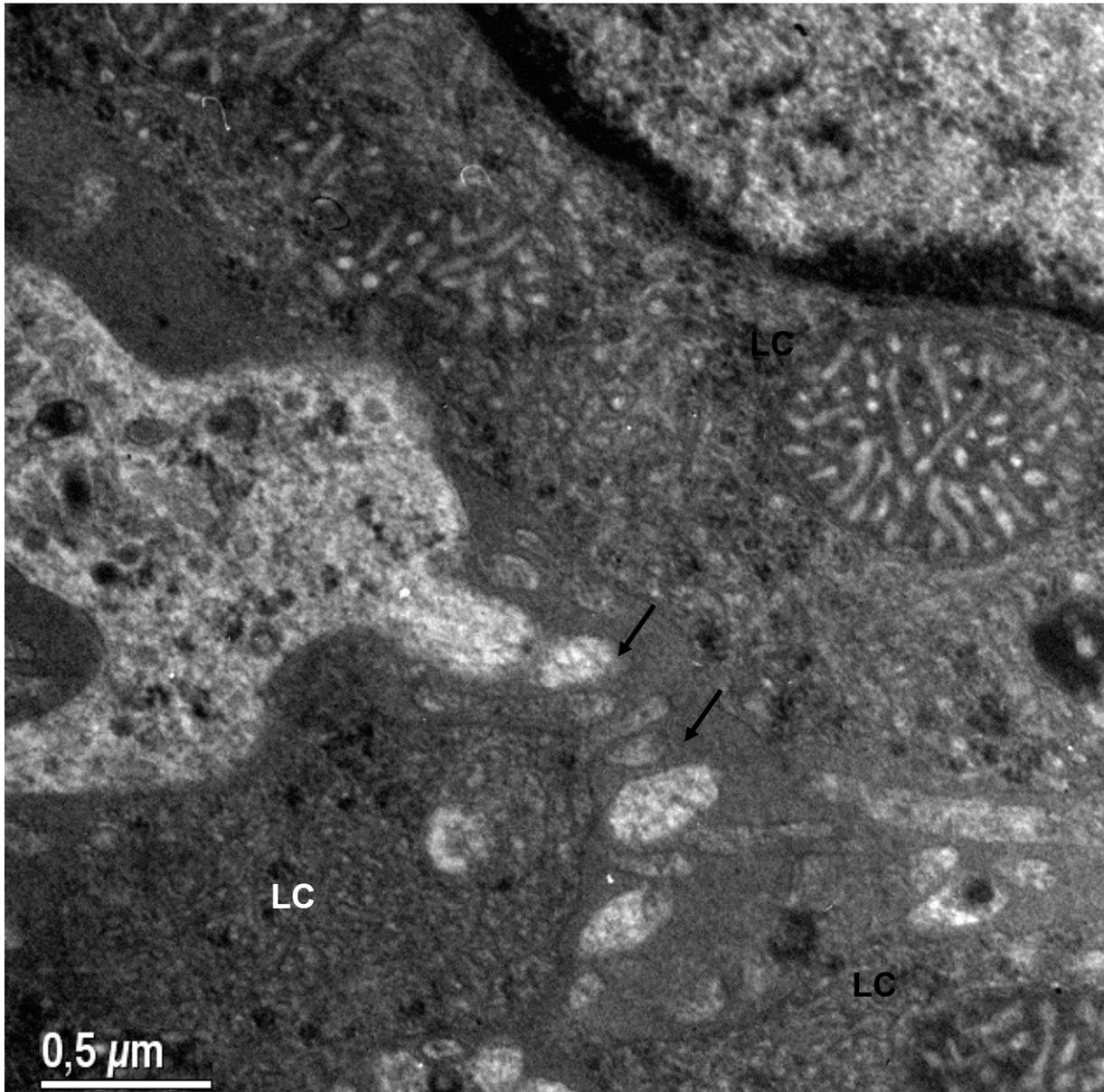


Abb. 25: 50. Postnaltag – Feine interzelluläre Brücken zwischen Leydig-Zellen

Benachbarte Leydig-Zellen (LC) bilden untereinander feine Brücken (Pfeile) aus. Vergrößerung 20000:1

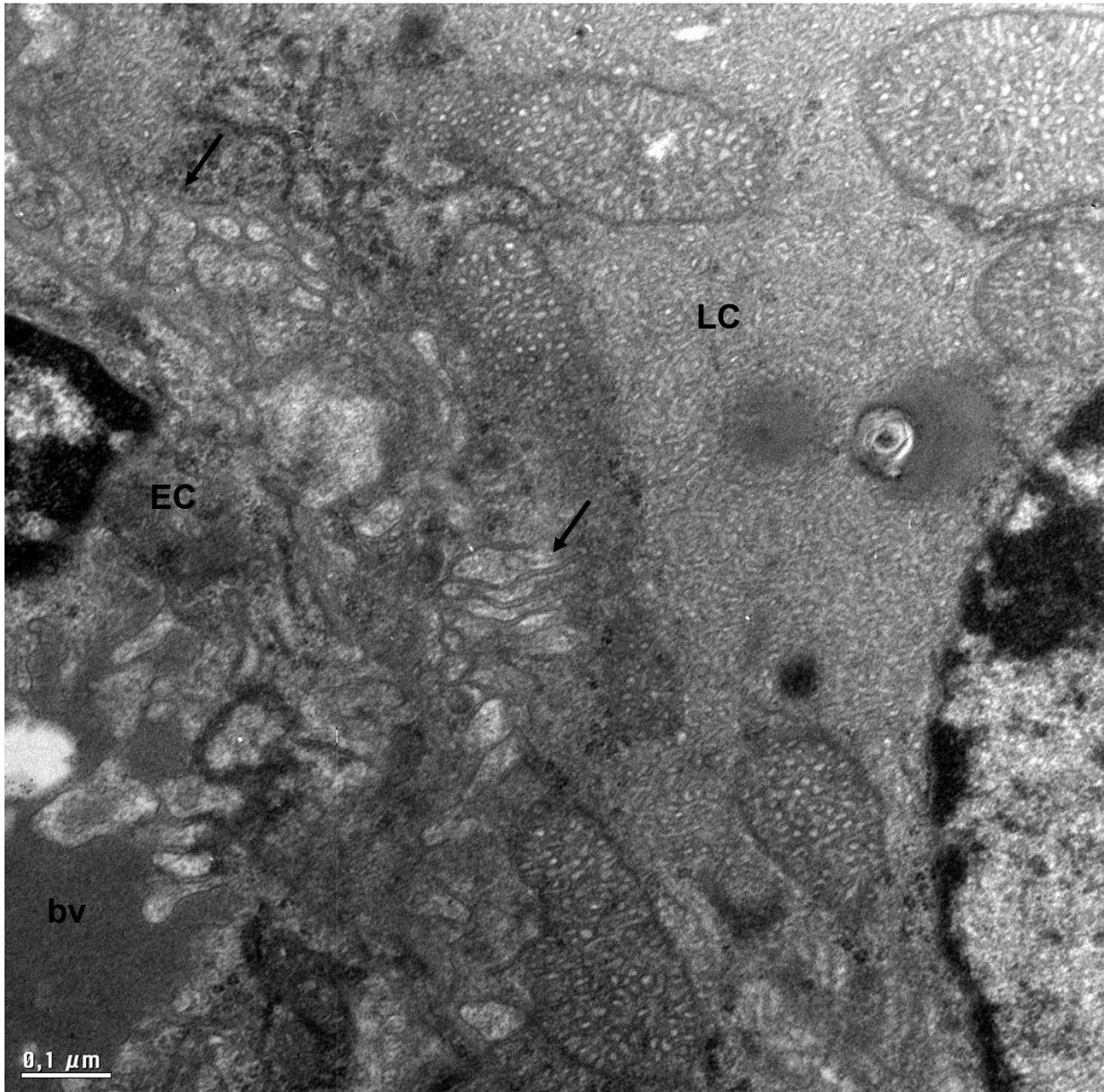


Abb. 26: 50. Postnataltag – Leydig-Zelle und Blutgefäß

Dargestellt ist eine Leydig-Zelle (LC) in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Blutgefäß (bv). Zwischen der Leydig-Zelle und dem Blutgefäß zeigen sich Membranvernetzungen (Pfeile). Endothelzelle (EC). Vergrößerung 20000:1

3.5 Zellkontakte am 100. Postnataltag

Der 100. Postnataltag zeichnet sich durch einen Makrophagenreichtum aus. Nahezu in jedem Interstitium der untersuchten Proben zeigt sich mindestens ein Makrophag in enger topographischer Beziehung zu Leydig-Zellen. Dabei ist zu beobachten, dass von den Leydig-Zellen Einstülpungen sowie coated pits in Richtung der Makrophagen ausgehen (Abb. 27). Außerdem befinden sich zwischen Makrophagen und Leydig-Zellen langstreckige Areale, die reichlich mit Vesikeln gefüllt sind. Der Inhalt der Vesikel gleicht dabei morphologisch dem des Makrophagencytoplasmas (Abb. 28).

Vesikelreiche Bereiche zwischen den intertubulären Zellen sind in dieser Altersklasse häufig anzutreffen. Solche finden sich nicht nur zwischen Makrophagen und Leydig-Zellen, sondern ebenso zwischen Leydig-Zellen und Fibrozyten (Abb. 29), sowie zwischen Leydig-Zellen untereinander. Dabei ist regelmäßig zu beobachten, dass der Vesikelinhalt in den umschriebenen Arealen häufig heller ist als das Cytoplasma der angrenzenden Zellen.

Gelegentlich zeigt sich zwischen zwei benachbarten Leydig-Zellen eine gap junction (Abb. 30).

Die enge Beziehung zu Blutgefäßen kommt auch am 100. Postnataltag über die unmittelbare Nachbarschaft der Leydig-Zellen zu diesen Gefäßen zur Darstellung. An die nicht luminale Seite der Endothelzellen grenzen oftmals unmittelbar die Leydig-Zellen, ohne das eine besondere Kontaktform hervorgeht. Jedoch findet sich in einem Fall eine hufeisenförmige Struktur zwischen einer Leydig-Zelle und einer Endothelzelle (Abb. 31).

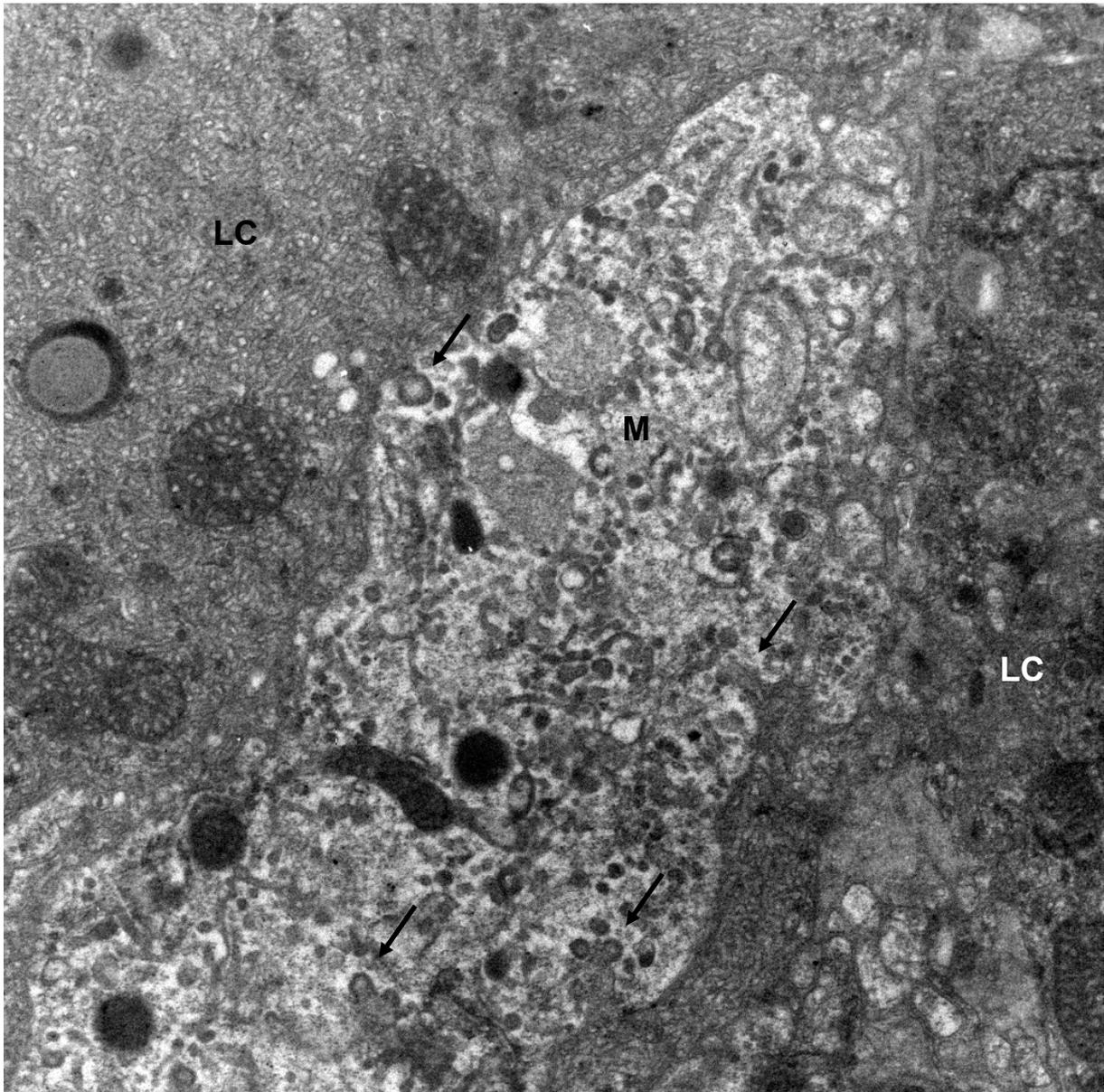


Abb. 27: 100. Postnataltag – Interaktion zwischen Leydig-Zelle und Makrophag

Die Leydig-Zelle (LC) weist Digitationen und coated pits (Pfeile) auf, die sich in den Makrophagen (M) einstülpen. Vergrößerung 17000:1

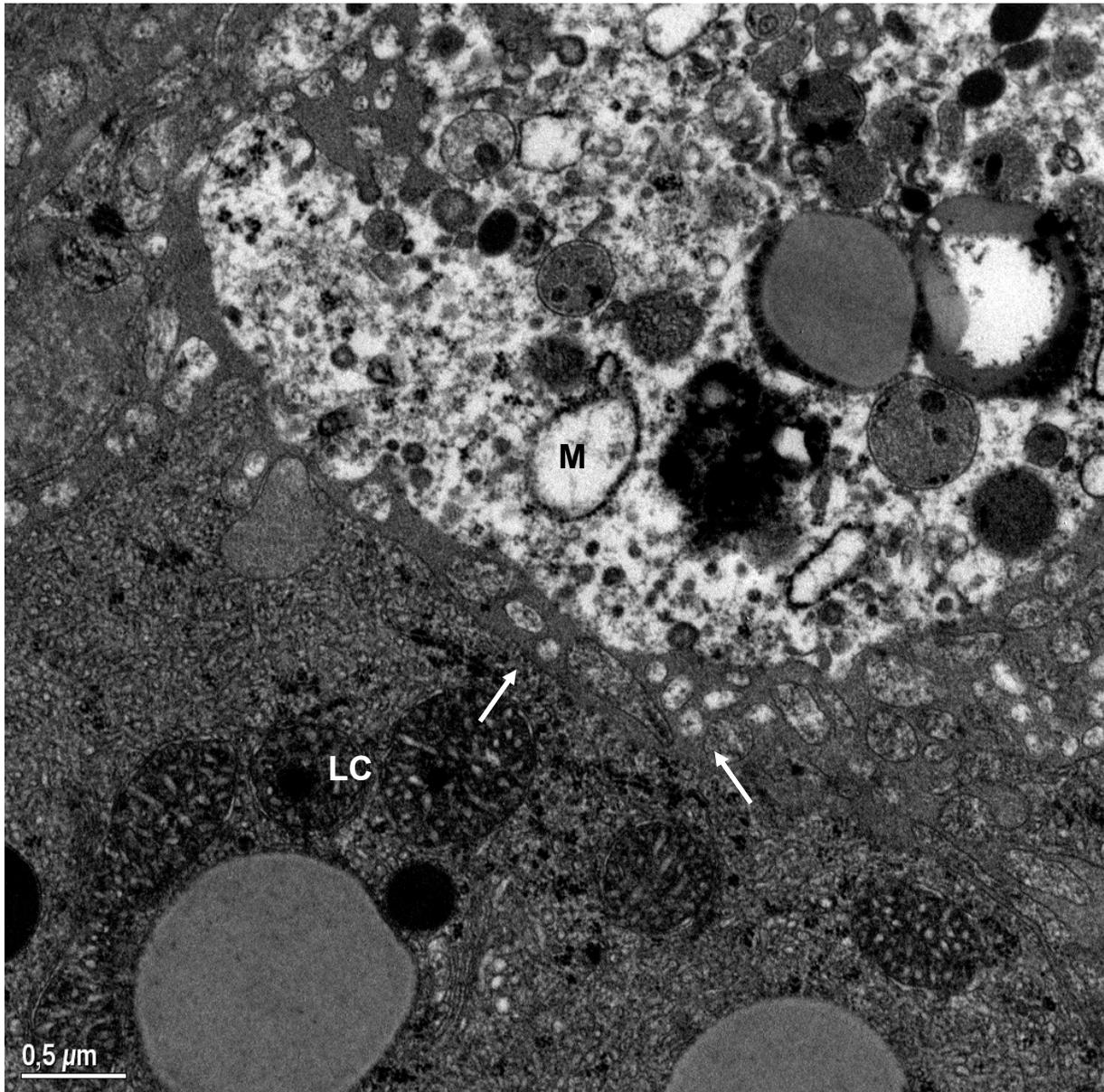


Abb. 28: 100. Postnataltag – Austauschareal zwischen Leydig-Zelle und Makrophage

Langstreckiger Interzellularraum mit vielen Vesikeln (Pfeile) zwischen der Leydig-Zelle (LC) und dem Makrophagen (M). Der Vesikelinhalt gleicht morphologisch dem Makrophagencytoplasma. Vergrößerung 20000:1

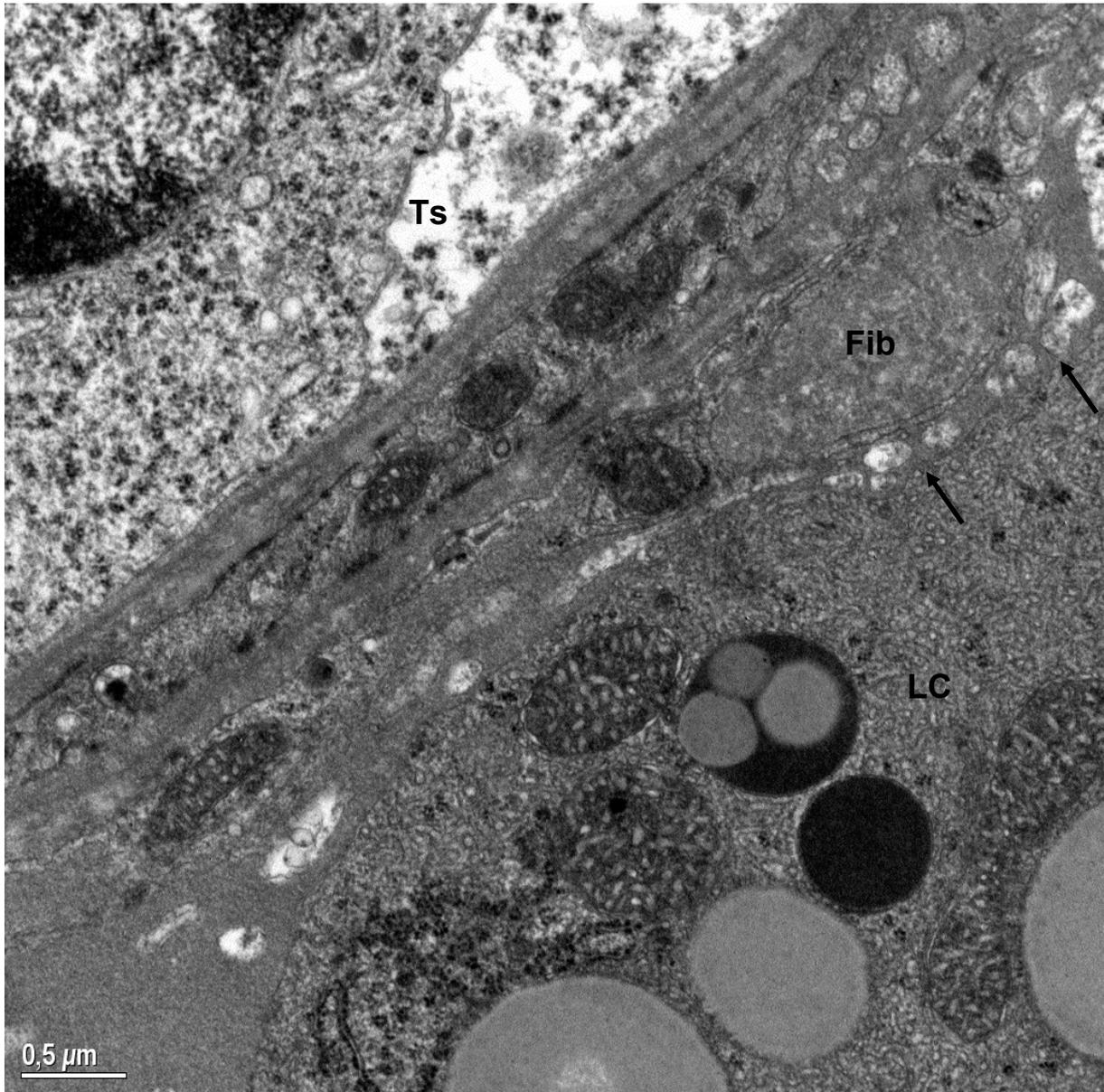


Abb. 29: 100. Postnataltag – Interzellularraum zwischen Leydig-Zelle und Fibrozyt

Ein vesikelhaltiger Interzellularspalt (Pfeil) zwischen einem Fibrozytenausläufer (Fib) und einer Leydig-Zelle (LC). Tubulus seminiferous (Ts). Vergrößerung 20000:1

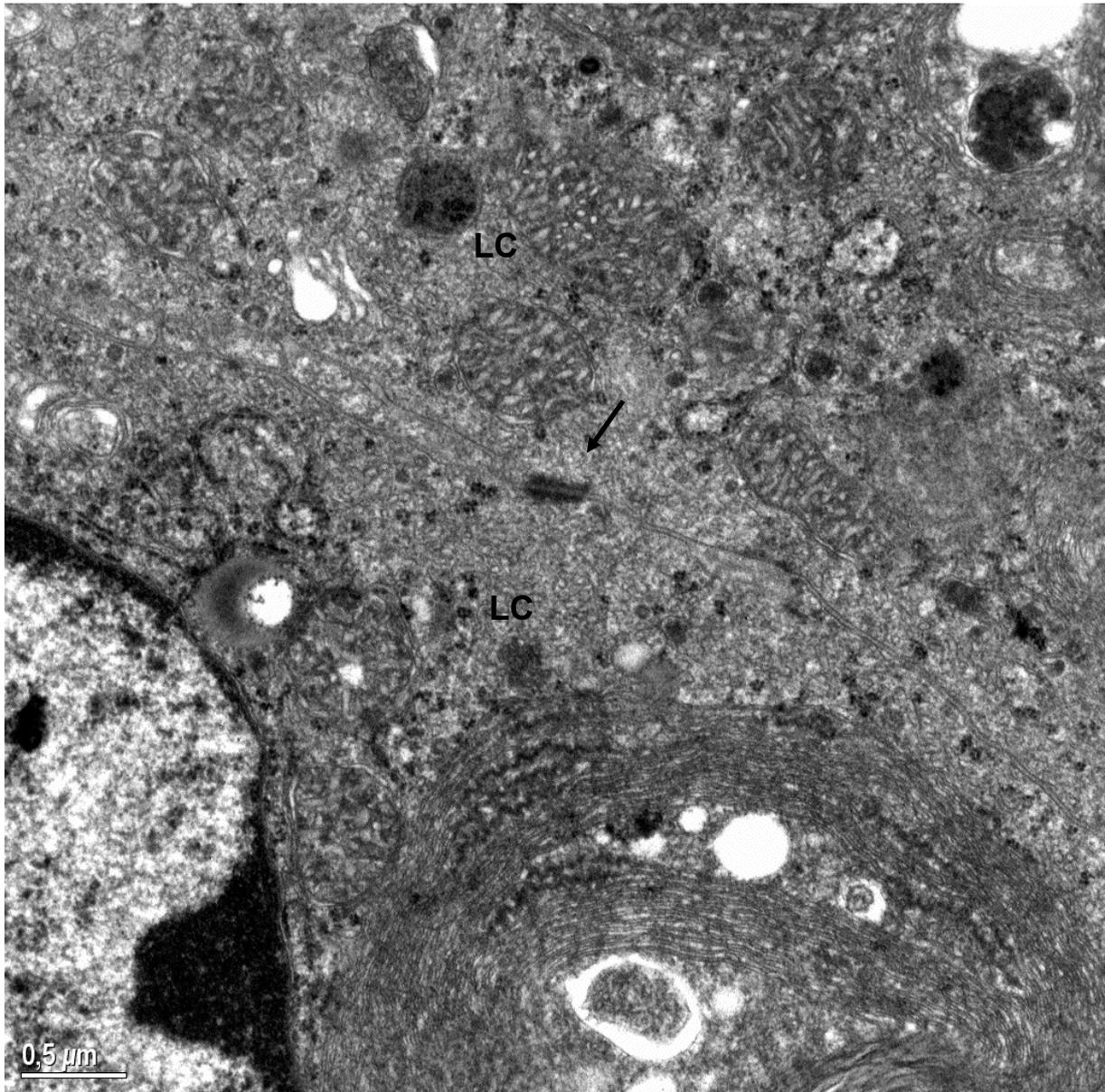


Abb. 30: 100. Postnataltag – Gap junction zwischen Leydig-Zellen
Leydig-Zellen (LC), gap junction (Pfeil). Vergrößerung 20000:1

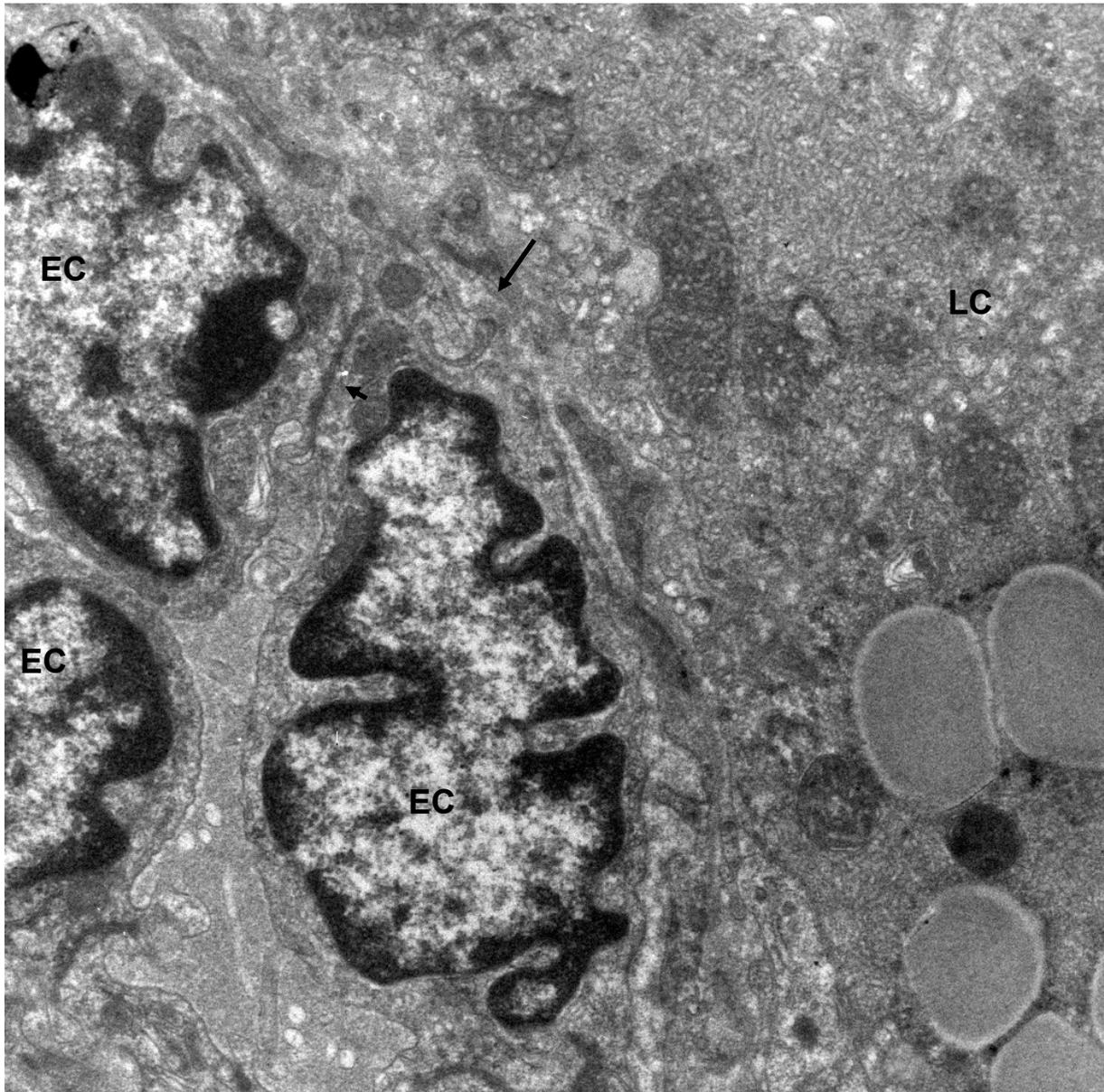


Abb. 31: 100. Postnataltag – Hufeisenförmige Struktur zwischen Endothel- und Leydig-Zelle

Leydig-Zellen (LC) in unmittelbarer Nachbarschaft zu Endothelzellen (EC). Eine hufeisenförmige Struktur (Pfeil) ist zwischen der Leydig-Zelle und der Endothelzelle zu beobachten. Endothelschlussleisten (Pfeilspitze). Vergrößerung 17000:1

4. Diskussion

4.1 Entstehung und Entwicklung der Leydig-Zellen in der Maus

Die Embryonalentwicklung der indifferenten Gonadenanlage in der Maus beginnt etwa ab dem 10,5. Postkoitaltag (dpc- days post coitum) (Karl und Capel, 1998). Ovarien und Hoden können zwischen dem 10,5. und 11,5 dpc morphologisch nicht unterschieden werden. Erst nach der Expression des dominanten Sry-Gens (sex-determining region of the Y chromosome) auf dem Y-Chromosom entwickeln sich die Hoden aus den paarigen Gonadenanlagen (Gubbay et al. 1990; Hacker et al. 1995). Die Deletion des Sry-Gens führt bei männlichen Mäusen zur Ausbildung von Ovarien (Lovell-Badge und Robertson, 1990; Gubbay et al. 1992), wohingegen Sry transgene XX-Embryos Hoden entwickeln. Die Sry-Genexpression findet zwischen dem 10,5 und 12,5. dpc statt. 36 Stunden nach der Genexpression kommt es zu einem rapiden Zell- und Größenwachstum in XY Gonaden, sowie zu strangartigen Strukturen aus Keimzellen und Vorläufer der Sertoli-Zellen (Brennan et al. 1998).

Im embryonalen Hoden der Säugetiere lassen sich zwei Kompartimente, Hodenstränge und dazwischen gelegenes Interstitium unterscheiden. Die unreifen Hodenstränge weisen noch keine Lumina auf. Diese sind erst postnatal beim Eintritt in die Geschlechtsreife enthalten und werden als Tubuli seminiferi bezeichnet. Das Interstitium zwischen den Hodensträngen bildet den Entstehungsort für die Leydig-Zellen (Langman, 1989).

Im Hoden kommen Keimzellen und somatische Zellen vor. Zu den somatischen Zellen zählen peritubuläre Myoidzellen, endotheliale Zellen, Leydig-Zellen sowie Sertoli-Zellen. Die Sertoli-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Geschlechtsbestimmung. Sie exprimieren Sry, also das männliche Geschlecht bestimmende Gen und beeinflussen somit die Geschlechtsentwicklung (Lovell-Badge, 1993; Koopman, 1995; Swain et al. 1998). Aktuelle Erkenntnisse deuten zunehmend aber darauf hin, dass neben den Sertoli-Zellen auch interstitielle Zellen eine essentielle Rolle bei der Hodenentwicklung spielen. So liefern neuere Untersuchungen Hinweise, dass vaskulär-interstitielle Zell-Interaktionen indirekt die Hodenstrangbildung beeinflussen (Cool et al. 2011).

Schon kurz nach testikulären Geschlechtsbestimmung differenzieren sich die Leydig-Zellen aus ihren Vorläufern und erlangen die Fähigkeit für die Androgenbiosynthese (Byskov, 1986; Kerr und Knell, 1988).

Nach neusten Erkenntnissen entwickeln sich die Leydig-Zellen neben steroidogenic factor 1 (SF1) positiven Vorläuferzellen sowohl aus Coelomepithel als auch aus eingewanderten gonadalen Mesonephros-Zellen (Barsoum und Yao, 2010; DeFalco et al. 2011).

Aus den SF1-positiven Vorläuferzellen entwickeln sich unter dem Einfluss von Sry/sry-box containing gene 9 (Sox9) und anderen Transkriptionsfaktoren Sertoli-Zellen. Die übrigen Vorläuferzellen werden mit Hilfe des Desert hedgehog (Dhh) und dem platelet-derived growth factor A (Pdgfa) - 2 Signalmolekülen der Sertoli-Zelle - zu Leydig-Zellen. Dabei wird die Reifung der Leydig-Zellen durch die Inhibierung des Hedghog-Pathways durch Notch und Podocyte-expressed 1 (POD1) ausbalanciert (Abb. 32).

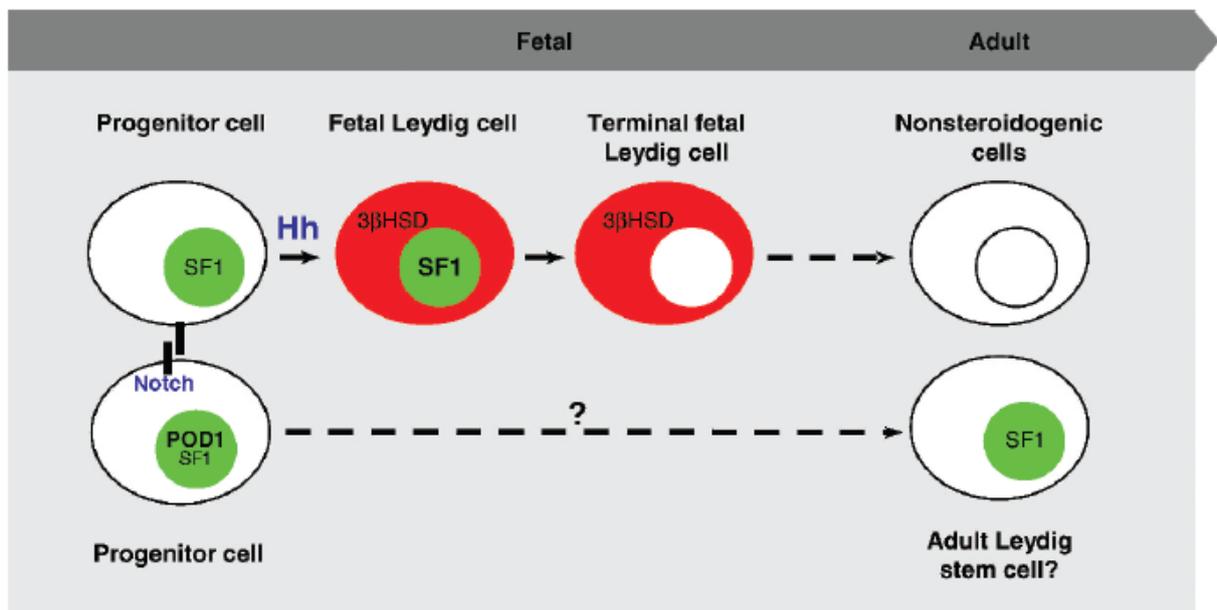


Abb. 32 Modell für die Aufrechterhaltung und Differenzierung von Leydig-Zellen in der Maus (entnommen aus Barsoum und Yao, 2010)

4.2 Zellkontakte der Leydig-Zellen

Wie bereits im Kapitel „Einleitung“ ausgeführt, spielt die interzelluläre Kommunikation eine essentielle Rolle für die Funktionen der Leydig-Zellen. Eine Möglichkeit dieser Kommunikation sind die Zellkontakte, die die Leydig-Zellen mit den benachbarten Zellen bilden. Folgende Zellkontaktformen ließen sich in der vorliegenden Arbeit beobachten:

- gap junctions

- coated pits
- Membranverdichtungen
- Mikroplattypodien
- strickleiterartige Membranverbindungen
- feine Brücken

Eine interzelluläre Kommunikation über *gap junctions* spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung sowie Funktion endokriner Organe (Levin, 2001; Serre-Beinier et al. 2002). Gap junctions erlauben eine direkte Kommunikation benachbarter Zellen über Zellkanäle. Sie bestehen in Säugetieren aus 12 Connexin-Protein Untereinheiten, wobei jede benachbarte Zellmembran an der Kontaktstelle einen Halbkanal (Connexon) bestehend aus sechs Connexin-Proteinen beisteuert (Abb. 33). Metabolite und Ionen, die kleiner als 1000 Dalton Molekularmasse aufweisen, können die Zellkanäle der gap junctions passieren (Söhl und Willecke, 2003). Connexin 43 (Cx43) ist das häufigste gap junction Protein im Mäusehoden, sowie bislang das einzige, das in Leydig-Zellen nachgewiesen wurde (Perez-Armendariz et al. 1994; Bravo-Moreno et al. 2001). In Abwesenheit von Cx43 verlieren mutierte Mäusehoden postnatal ihre Spermatogonien, sodass die Tubuli seminiferi lediglich aus Sertoli-Zellen bestehen. Daher scheint eine interzelluläre Kommunikation über Cx43 Kanäle für die Expansion der Keimzellreihe erforderlich zu sein (Roscoe et al. 2001).

Dagegen wird die Steroidproduktion der Leydig-Zellen durch die Abwesenheit von Cx43 in mutierten Mäusehoden nicht beeinträchtigt. Dies lässt zwei Interpretationen zu: Die Kommunikation über gap junctions ist nicht für die Steroidbiosynthese erforderlich, oder Leydig-Zellen exprimieren kompensatorisch einen oder mehrere weitere Connexine neben Cx43. Da trotz fehlendem Connexin 43 der Nachweis einer interzellulären Kopplung der Leydig-Zellen untereinander mit Hilfe von Luciferingelb-Transfer-Experimenten gelang, scheinen die Leydig-Zellen zusätzlich zu Cx43 zumindest ein weiteres gap junction Protein zu exprimieren (Kahiri et al. 2006). Jedoch wurden in dieser Studie die mutierten Mäusehoden nicht elektronenmikroskopisch auf gap junctions untersucht.

Gap junctions zeigten sich in der vorliegenden Arbeit ab dem 30. Postnataltag zwischen Leydig-Zellen untereinander, sowie zwischen Leydig-Zellen und Fibrozyten und zeigen, dass diese Zelltypen zumindest die Möglichkeit zu einer direkten Zell zu

Zellkommunikation durch den Austausch von Molekülen <1000 Dalton besitzen.

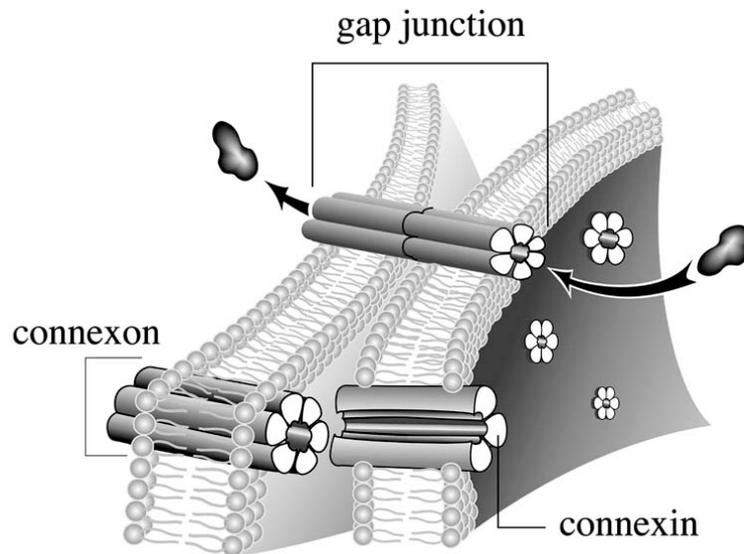


Abb. 33 schematische Darstellung von gap junctions (entnommen aus Echevarria und Nathanson, 2003)

Endo- und Exozytoseprozesse sind membranverlagernde Transportmechanismen. Durch die Stülpung der Zellmembran um Stoffe, die transportiert werden sollen entstehen Vesikel, die entweder in das Zellinnere (Endozytose) oder aus der Zelle heraus (Exozytose) befördert werden. Eine besondere Form der Endozytose stellen *coated pits* dar. Dabei ist die cytoplasmatische Seite der Zellmembran, die die *coated pits* und im weiteren Abschnürungsprozess die *coated vesicles* auskleiden, mit Clathrin-Molekülkomplexen versehen. Gesteuert wird die Aufnahme der Stoffe über Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche befinden (Brodsky, 1988).

Coated pits scheinen für die Leydig-Zellen eine wichtige Rolle als Transportmechanismus zu spielen. So beziehen Leydig-Zellen Cholesterol, die Hauptquelle der Steroidbiosynthese, u.a. über *coated pits* (Freeman und Rommerts, 1996). Das regelmäßige Vorkommen von *coated pits* an Leydig-Zellen in der vorliegenden Arbeit stützt die These, dass es sich um einen Zellkontakt handelt, der möglicherweise die Steroidbiosynthese neben anderen Faktoren (StAR-Protein) beeinflusst.

Jede einzelne Zelle ist ein eigenständiges biologisches System. Dabei wird sie von einer Zellmembran von der Umgebung getrennt. Zugleich bestimmt eine Zellmembran das Ausmaß der Kommunikation zwischen Extra- und Intrazellularraum und schafft somit eine Grundlage der strukturellen und funktionellen Kopplung der

Zellen im Organverband. Beispielsweise ermöglichen gap junctions der Zellmembran der Herzmuskelzellen eine zeitgleiche Kontraktion der Kardiomyozyten.

Die hier beschriebenen *Membranverdichtungen* zwischen zwei Leydig-Zellen am 1. Postnataltag könnten ein mögliches morphologisches Korrelat für eine membranvermittelte Kommunikation darstellen. Desweiteren scheinen die Leydig-Zellen über die am 1. Postnataltag beobachteten *filiformen Membranduplikaturen*, die miteinander verzahnen, zu kommunizieren. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit flachen Füßen haben wir diese Strukturen hier als „Mikroplattypodien“ bezeichnet. Die Mikroplattypodien vergrößern durch ihre Form die Zellmembran um ein vielfaches und damit möglicherweise die Kommunikationsplattform der Zellen. Eine Oberflächenvergrößerung bieten mutmaßlich auch die *strickleiterartigen Membranverbindungen* zwischen Leydig-Zellen untereinander, sowie zwischen Leydig-Zellen und Fibrozyten ab dem 30. Postnataltag. Aufgrund des rein morphologischen Charakters der vorliegenden Arbeit, kann keine Aussage über funktionelle Mechanismen dieser Membranverbindungen gemacht werden.

Tran et al. beschrieb erstmals 2006 das Vorkommen von Interzellularbrücken mit kontinuierlichem Zytoplasma zwischen zwei benachbarten Fetaltyp-Leydig-Zellen am 1. und 5. Postnataltag, die mögliche Transportwege für Nährstoffe, Transmitter und Zellorganellen darstellen könnten. Dieser interessante Befund lies sich aus dem Bildmaterial der vorliegen Arbeit in der Maus nicht erheben. Jedoch zeigten sich vereinzelt am 50. Postnataltag *feine Brücken*, über die vermutlich benachbarte Leydig-Zellen eine Verbindung zueinander aufbauen. Dabei sind diese so zart, dass anders als bei den Beobachtungen von Tran et al. (2006) kein Platz für Zellorganellen bleibt. Denkbar ist hier ein Austausch von Transmittern sowie im Cytoplasma gelösten Substanzen.

4.3 Leydig-Zellen und Makrophagen

Makrophagen entwickeln sich aus der myeloiden Stammzellreihe und kommen hauptsächlich im Bindegewebe zahlreicher Organe vor. Sie besitzen eine besonders ausgeprägte Fähigkeit zur Phagozytose. Zusammen mit den Lymphozyten sind sie in der Lage, maligne oder viral infizierte Zellen zu zerstören. Zusätzlich besitzen sie die Fähigkeit mit Zellen außerhalb des Immunsystems zu kommunizieren. So bilden

Makrophagen und Leydig-Zellen wichtige strukturelle und funktionelle Interaktionen, die vielfach untersucht und beschrieben wurden. Makrophagen machen einen wesentlichen Anteil des interstitiellen Gewebes des Hodens in der Maus aus (Hume et al. 1984). Fast ein Viertel des interstitiellen Hodengewebes der Ratte wird aus Makrophagen gebildet (Niemi et al. 1986). Einige biochemische und morphologische Untersuchungen weisen eindeutig daraufhin, dass für die Differenzierung der Leydig-Zellen die Anwesenheit der Makrophagen notwendig ist, da durch selektive Entfernung der Makrophagen und Abtötung der adulten Leydig-Zellen mit EDS keine Repopulation mit Leydig-Zellen im Hoden der Ratte stattfindet (Gaytan et al. 1994a, b).

Neben der immunreaktiven Wirkung der Makrophagen bilden sie 25-hydroxycholesterol (25-HC). Dieses Molekül wird von benachbarten Leydig-Zellen als Substrat zur Synthese von Testosteron verwendet und beeinflusst zumindest in vitro die Differenzierung der Leydig-Zellen und unterstreicht die Feststellungen von Gaytan et al. (1994a, b,) und Chen et al. (2002). Testosteron wiederum hemmt als Ausdruck eines parakrinen Regelkreises die makrophagozytäre 25-HC-Produktion (Lukyanenko et al. 2002) und zeigt zumindest eine funktionelle Interaktion zwischen diesen beiden Zelltypen.

In der Vergangenheit wurden in zahlreichen Arbeiten die strukturellen Beziehungen zwischen Makrophagen und Leydig-Zellen untersucht. Hauptsächlich wurden coated pits und Digitationen beschrieben (Miller et al. 1983; Hutson, 1992; Hutson, 2006). In einer aktuelleren Arbeit wurde erstmals eine weitere Kontaktform beschrieben (Tran et al. 2006). Aus Leydig-Zellen stülpen sich fingerartige Strukturen aus, die bis in die Makrophagen rein reichen. Möglicherweise ist dies ein weiterer Hinweis für eine parakrine Kommunikation, welche bereits in unterschiedlichen Arbeiten untersucht wurde (Skinner, 1991; Saez, 1994; Gaytan et al. 1994 a, b, c).

In der vorliegenden Arbeit wurden die morphologischen Aspekte systematisch - im Gegensatz zu den meisten anderen Arbeiten über Ratten - an Mäusehoden untersucht. Der bereits nachgewiesene funktionelle Zusammenhang dieser beiden Zelltypen lässt sich in der vorliegenden Untersuchung durch die enge Nachbarschaft zwischen Leydig-Zellen und Makrophagen durch alle Alterstufen hinweg morphologisch nachvollziehen. Auch im Hoden der Maus sind viele coated pits und coated vesicles sowie Digitationen ab dem 10. Postnataltag zwischen Leydig-Zellen und Makrophagen zu beobachten. Eine fingerförmige Kontaktstruktur wie sie von

Tran et. al (2006) beschrieben wurde, konnte in dem vorliegendem Bildmaterial nicht nachgewiesen werden.

4.4 Leydig-Zellen und Blutgefäße

Endothelzellen kleiden die luminal Seite von Blutgefäßen aus und sind durch Haftkomplexe an einer Basallamina verankert. Sie wirken an der Blut-Organschranke mit und erfüllen somit eine ihrer wichtigsten Funktionen als Barriere.

Daneben spielen sie schon früh während der Organogenese eine entscheidende Rolle. So beeinflussen Endothelzellen die Hodenstrang-Morphogenese während der Embryonalentwicklung der Maus (Cool et al. 2008; Combes et al. 2009). Neuere Arbeiten liefern Hinweise, dass der hodenstrangformende Einfluss der eingewanderten Endothelzellen wiederum durch vaskulär-interstitielle Interaktionen vermittelt zu sein scheint (Cool et al. 2011).

Leydig-Zellen synthetisieren die für die Spermatogenese und Ausprägung der männlichen Geschlechtsmerkmale wichtigen Steroidhormone. Die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β -HSD) ist ein wichtiges Schlüsselenzym in der Steroidhormonbiosynthese. Histochemische Untersuchungen lieferten nicht nur den Nachweis 3β -HSD in Leydig-Zellen, sondern auch in Endothelzellen von interstitiellen Blutkapillaren, die sich in unmittelbaren Nachbarschaft von 3β -HSD-positiven Leydig-Zellen befanden (Haider und Servos, 1998). Die Autoren vermuten eine parakrine Beziehung zwischen den beiden eng benachbarten 3β -HSD-positiven Zelltypen, die unter dem Einfluss von systemischem LH an der Regulation der Steroidogenese beteiligt sein könnten.

Zudem scheinen die Endothelzellen die LH Wirkung auf die Leydig-Zellen auch über ihre wichtige Barrierefunktion zu steuern. Die LH Konzentration, die die interstitielle Flüssigkeit erreicht, beträgt nur einen Zehntel der systemischen LH Konzentration. Dies könnte einerseits auf sehr LH-sensible Leydig-Zellen hindeuten. Andererseits könnte dieser Befund aber auch den modulierenden Einfluss der Endothelzellen auf die Leydig-Zellen widerspiegeln (Setchell et al. 2002). Bereits einige Jahre zuvor konnte in verschiedenen Arbeiten die Existenz von endothelialen LH/hCG Rezeptoren und deren Mitwirken in der Transzytose von LH ins Interstitium nachgewiesen werden (Ghinea et al. 1994; Misrahi et al. 1996).

Neben den oben beschriebenen endokrinen und parakrinen Wechselwirkungen im Hoden, ist auch die VEGF-vermittelte testikuläre Mikrozirkulation eine entscheidende

Determinante für die Regulation der Gametogenese in den Tubuli seminiferi sowie der Steroidogenese in den Leydig-Zellen des Interstitiums. VEGF ist ein potenter mitogener Wachstumsfaktor für Endothelzellen und kann durch Leydig-Zellen produziert werden (Setchell, 1994; Ergün et al. 1997 und 1999; Anand et al. 2003; Rudolfsson et al. 2004).

Sämtliche Formen der gegenseitigen Wechselwirkungen zwischen Leydig-Zellen und Endothelzellen bedürfen einer morphologischen Beziehung zueinander. Eine parakrine Interaktion setzt eine enge Nachbarschaft von Zellen voraus. Diese wurde regelmäßig in allen untersuchten Altersklassen zwischen Leydig-Zellen und Endothelzellen beobachtet, ohne dass eine spezielle Zellkontaktform, z.B. gap junction nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung deckt sich mit dem von Tran et al. (2006) beschriebenen Befunden zwischen Leydig-Zellen und Blutgefäßen in der Ratte. Gelegentlich zeigte sich ein coated pit zwischen den beiden Zelltypen, möglicherweise als Ausdruck einer parakrinen Interaktion.

4.5 Weitere Beobachtungen in den Interstitien

Am häufigsten basieren Leydig-Zellbeschreibungen in der Literatur auf Untersuchungen an Ratten. Im Rattenhoden werden zwei Leydig-Zellpopulationen, Fetaltyp-Leydig-Zellen (FLC) und Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC) unterschieden. Diese unterscheiden sich in Ultrastruktur, Lebenszeit, Androgensynthesekapazität und Regulationsmechanismen (Haider, 2004). Das endgültige Schicksal der Fetaltyp-Leydig-Zellen nach dem 25. Postnataltag wird in der Literatur kontrovers diskutiert, da sie danach lichtmikroskopisch nicht mehr zu sehen sind. Unklar ist ob sie eine Involution durchmachen, apoptisch werden oder gar weiter existieren. Eine interessante Beobachtung ist, dass in FLC's sowohl Caspase-3 und Prokollagen als auch Kollagenfasern zu finden sind, welche eine Hyalinisation der Zellen infolge einer Apoptose zeigen (Haider et al. 2007). Analog dazu konnte in der vorliegenden Arbeit im Mäusehoden eine kollagenhaltige Basallamina um die Leydig-Zell-Cluster am 10. Postnataltag beobachtet werden. Diese Begrenzungsform ist in den älteren Stadien nicht mehr zu finden. Hier stellt sich die Frage, ob die mutmaßlichen Fetaltyp-Leydig-Zellen der Maus ein ähnliches Ende mittels einer Hyalinisation schon bereits am 10. Postnataltag erfahren.

Am 30. Postnataltag fällt eine deutliche Wende in den Interstitien im Mäusehoden auf. Die interstitiellen Zellen sind viel lockerer angeordnet, die Extrazellularräume vergrößern sich. Oftmals zeigen sich zahlreiche, kleine fingerartige Membranausstülpungen an der Oberfläche der Leydig-Zellen. Diese ragen in den Interzellularraum hinein und berühren die Membranen von Nachbarzellen. In vielen Fällen schnüren sich von diesen Ausstülpungen Vesikel ab. Manchmal bilden sie auch untereinander eine gap junction aus. Solche fingerförmigen Ausstülpungen an der Oberfläche von Leydig-Zellen werden in der Literatur als Filapodien (Ohata, 1979) und als Mikrovilli (Schulze, 1984) beschrieben. Eine solche Ausbildung von Filapodien/ Mikrovilli an der Zelloberfläche der Leydig-Zelle vergrößert diese um ein vielfaches. Daraus lässt sich eine hohe Aktivitätsphase der Leydig-Zellen am 30. Postnataltag vermuten. Die zahlreichen Abschnürungen aus den Filapodien/ Mikrovilli in den Interzellularraum stellen einen möglichen Transportweg für cytoplasmatische Substanzen dar und könnten möglicherweise die parakrine Wirkung der Leydig-Zellen widerspiegeln. Warum die Leydig-Zellen diese Form ausgerechnet am 30. Postnataltag annehmen um dann in den älteren Stadien wieder zu verschwinden, bleibt ungeklärt. Möglicherweise ist diese Erscheinungsform der Leydig-Zellen, die eine hohe Aktivität dieser Zellen vermuten lässt, das morphologische Korrelat für den Start der Geschlechtsreife der männlichen Balb/c Mäuse.

4.6 Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die rein morphologischen Beobachtungen aus den Interstitien von Mäusehoden mit besonderem Augenmerk auf Zellkontaktformen der Leydig-Zellen mit benachbarten Zellen. Über funktionelle Eigenschaften und Mechanismen können keine Aussagen getroffen werden. Hier könnten molekularbiologische und immunhistochemische Methoden nützliche Daten liefern. Besonders interessant wäre die systematische Untersuchung der Fetaltyp-Leydig-Zellen und Adulttyp-Leydig-Zellen im Mäusehoden. Denn es gibt bisher keine Daten, die das zeitliche Auftreten und Verschwinden der beiden Leydig-Zellpopulationen im Mäusehoden beschreiben, wohingegen diesbezüglich zahlreiche Arbeiten über Rattenhoden existieren.

5. Zusammenfassung

Name der Doktorandin: Sevil Özlügedik

Titel: Zur Ultrastruktur der Zellkontakte der Leydig-Zellen im Maushoden: Eine systematische Untersuchung von der Geburt bis zum 100. Postnataltag

Eine rege interzelluläre Kommunikation ist für die Funktion der Leydig-Zellen im Hoden von essentieller Bedeutung. Eine Form dieser Kommunikation sind die Zellkontakte zwischen den Leydig-Zellen bzw. zwischen Leydig-Zellen und benachbarten interstitiellen Zellen. **Ziel** der vorliegenden Arbeit ist es, die Ultrastruktur der Zellkontakte der Leydig-Zellen im Maushoden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie vom 1. bis zum 100. Postnataltag zu beschreiben.

Material und Methodik: Je zehn Mäusehoden des 1., 10., 30., 50. und 100. Postnataltags wurden für die Elektronenmikroskopie präpariert. Die Befunde über die Ultrastruktur der Zellkontakte der Leydig-Zellen wurden erhoben, fotodokumentiert und ausgewertet.

Befunde: Die systematische Untersuchung der Zellkontakte im Mäusehoden zeigt ein sehr dicht strukturiertes Interstitium am 1. Postnataltag ohne erkennbaren Interzellularraum. Dabei dominieren Membran an Membran verlaufende Zellgrenzen, die zum Teil flache Ausstülpungen ausbilden und miteinander verzahnt sind (*Mikroplatypodien*). Außerdem fallen *Membranverdichtungen* an der Grenze zwischen zwei Leydig-Zellen auf. Am 10. Postnataltag beobachtet man um Cluster regelmäßig eine kollagenreiche Basallamina. *Coated pits* sind in allen der hier untersuchten Altersstufen zu sehen. Am 30. Postnataltag erscheinen die Interstitien aufgelockert. Breite Interzellularräume dominieren. An den Oberflächen der Leydig-Zellen zeigen sich zahlreiche kleine, dünne zum Teil verzweigte Ausläufer, die sich mit denen von Nachbarzellen berühren und in einigen Fällen über *gap junctions* in Kontakt stehen. *Gap junctions* lassen sich auch zwischen Leydig-Zellen und Fibrozyten beobachten. Am 50. Postnataltag zeigen sich gehäuft Phagolysosomen in den Leydig-Zellen. Zwischen Leydig-Zellen untereinander und Leydig-Zellen und Makrophagen sowie Fibrozyten kommen oftmals *strickleiterartig Membranverbindungen* zur Darstellung. Vereinzelt finden sich sehr *feine Brücken* zwischen Leydig-Zellen. Der 100. Postnataltag zeichnet sich durch einen Makrophagenreichtum aus, wobei *coated pits* als häufigste Zellkontaktform zwischen Makrophagen und Leydig-Zellen in Erscheinung treten.

Im Unterschied zu Rattenhoden können im Mäusehoden keine Interzellularbrücken mit kontinuierlichem Cytoplasma nachgewiesen werden. Desweiteren zeigen sich im Gegensatz zum Rattenhoden im Mäusehoden nur spärlich *gap junctions*. Sowohl Mäuse- als auch Rattenhoden weisen zahlreiche *coated pits* und Vesikel im Interzellularspalt auf.

Schlussfolgerung: Folgende Zellkontakte bzw. Strukturen für eine interzelluläre Kommunikation der Leydig-Zellen im Maushoden konnten festgestellt werden: *gap junctions*, *coated pits*, *Membranverdichtungen*, *Mikroplatypodien*, *strickleiterartige Membranverbindungen* und *feine Brücken*.

6. Literatur

Anand RJK, Paust HJ, Altenpohl K, Mukhopadhyay AK (2003) Regulation of vascular endothelial growth factor production by Leydig cells in vitro: The role of protein kinase A and mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol Reprod* 68:1663-1673.

Barsoum IB, Yao HH (2010) Fetal Leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation. *J Androl.* 31:11-5 Review.

Bravo-Moreno JF, Diaz-Sanchez V, Montoya-Flores JG, Lamoyi E, Saez JC, Perez-Armendariz EM (2001) Expression of connexin43 in mouse Leydig, Sertoli, and germinal cells at different stages of postnatal development. *Anatomical Record* 264:13–24.

Brennan J, Karl J, Martineau J, Nordqvist K, Schmahl J, Tilmann C, Ung K, Capel B (1998) Sry and the testis: molecular pathways of organogenesis. *J Exp Zool.* 281:494-500.

Brodsky FM (1988) Living with clathrin: its role in intracellular membrane traffic. *Science.* 242:1396-402. Review

Byskov AG (1986) Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 66:71–117.

Chen JJ, Lukyanenko Y, Hutson JC (2002) 25-Hydroxycholesterol is produced by testicular macrophages during the early postnatal period and influences differentiation of Leydig cells in vitro. *Biol Reprod* 66:1336-1341.

Christensen AK (1965) The fine structure of testicular interstitial cells in guinea pigs. *J. Cell Biol.* 26:911-935.

Christensen AK (1970) Fine structure of testicular interstitial cells in humans. In: *The human testis* edited by E. Rosemberg, C.A. Paulsen. N.Y.: Plenum Press, pp75-93.

Combes AN, Wilhelm D, Davidson T, Dejana E, Harley V, Sinclair A, Koopman P (2009) Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev. Biol.* 326:112–120.

Cool J, Carmona FD, Szucsik JC, Capel B (2008) Peritubular myoid cells are not the migrating population required for testis cord formation in the XY gonad. *Sex. Dev.* 2:128–133.

Cool J, DeFalco TJ, Capel B (2011) Vascular-mesenchymal cross-talk through Vegf and Pdgf drives organ patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:167-172.

DeFalco T, Takahashi S, Capel B (2011) Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev Biol.* 352:14-26.

Echevarria W, Nathanson MH (2003) Gap junctions in the liver. In: Trauner M and Jansen PLM, *Molecular Pathogenesis of Cholestasis*. Kluwer Academic / Plenum Publisher, pp 36-47.

Ergün S, Kilic N, Fiedler W, Mukhopadhyay AK (1997) Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol* 131:9-20.

Ergün S, Harneit S, Paus HJ, Mukhopadhyay AK, Holstein AF (1999) Endothelin and endothelin receptors A and B in the human testis. *Anat Embryol* 199:207-214.

Freeman DA, Rommerts FFG (1996) Regulation of Leydig cell cholesterol transport. In: Payne AH, Hardy MP, Russel LD (eds) *The Leydig cell*. Cache River Press, Vienna, IL, pp 231-240.

Gaytan F, Bellido C, Aguilar E, van Rooijen N (1994a) Requirement for testicular macrophages in Leydig cell proliferation and differentiation during prepubertal development in rats. *J Reprod Fertil* 102(2):393-9.

Gaytan F, Bellido C, Morales C, Reymundo C, Aguilar E, van Rooijen N (1994b)

Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethylene dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of Leydig cells in the adult rat. *J Androl* 15:558-64.

Gaytan F, Bellido C, Morales C, Reymundo C, Aguilar E, van Rooijen N (1994c) Selective depletion of testicular macrophages and prevention of Leydig cell repopulation after treatment with ethylene dimethane sulfonate in rats. *J Reprod Fertil* 101:175-82.

Ghinea N, Mai TV, Groyer-Picard MT, Milgrom E (1994) How protein hormones reach their target cells? Receptor-mediated transcytosis of HCG through endothelial cells. *J. Cell. Biol.* 125:87-97.

Gonzalez-Herrera IG, Prado-Lourenco L, Pileur F, Conte C, Morin A, Cabon F, Prats H, Vagner S, Bayard F, Audigier S, Prats AC (2006) Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *FASEBJ* 20:476-478.

Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-50.

Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson D, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1992) Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 7953-7.

Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development.* 121: 1603-14.

Haider SG, Servos G (1998) Ultracytochemistry of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. *Anat Embryol (Berl).* 198:101-10.

Haider SG (2004) Cell Biology of Leydig Cells in the testis. *Int Rev Cyt* 233:181-241.

Haider SG, Servos G, Tran N (2007) Structural and histological analysis of Leydig cell steroidogenic function. In: Payne AH and Hardy MP, *The Leydig Cell in health and disease*. Humana Press Inc., Totowa, pp 33-45.

Hales DB (2002) Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol* 57:3-18.

Hume DA, Halpin D, Charlton H, Gordon S. (1984) The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4174–4177.

Hutson JC (1992) Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell Tiss Res* 267:385-389.

Hutson JC (2006) Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 231:1-7. Review.

Kahiri CN, Khalil MW, Tekpetey F, Kidder GM (2006) Leydig cell function in mice lacking connexin43. *Reproduction*.132:607-16.

Karl J, Capel B (1998) Sertoli cells of the mouse testis originate from coelomic epithelium. *Dev Biol*. 203:323-33.

Kerr JB, de Kretser DM (1981) The cytology of the human testis. In: *The Testis* edited by Burger H, de Kretser DM. New York: Raven Press, pp 141-170.

Kerr JB, Knell CM (1988) The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 103:535–544.

Koopman, P. (1995) The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:713–722.

Langman J (1989) Urogenitalsystem. In: Langman J, Medizinische Embryologie. Georg Thieme Stuttgart, New York, pp 153-192.

Levin M (2001) Isolation and community: a review of the role of gapjunctional communication in embryonic patterning. *Journal of Membrane Biology* 185:177–192.

Lovell-Badge R, and Robertson E (1990) XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy. *Development*. 109:635-46.

Lovell-Badge R (1993). Sex determining gene expression during embryogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 335:159–164.

Lukyanenko YO, Chen, JJ, Hutson JC (2002) Testosterone regulates 25-Hydroxycholesterol production in testicular macrophages. *Biol Reprod* 67:1435-1438.

Miller SC, Bowman BM, Rowland HG (1983) Structure, cytochemistry, endocytic activity, and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular interstitial-tissue macrophages. *Am J Anat*. 168:1-13.

Misrahi M, Beau I, Ghinea N, Vannier B, Loosfelt H, Meduri G, Vu Hai MT, Milgrom E. (1996) The LH/CG and FSH receptors: different molecular forms and intracellular traffic. *Mol Cell Endocrinol*. 1996 Dec 20;125(1-2):161-7. Review

Niemi M, Sharpe RM, Brown WR. (1986) Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell Tissue Res*. 243:337-44.

Ohata M (1979) Electron microscopic study on the testicular interstitial cells in the mouse. *Arch. Histol. Japan*. 42:51-79.

Perez-Armendariz EM, Romano MC, Luna J, Miranda C, Bennett MV, Moreno AP (1994) Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cells from mouse testis. *American Journal of Physiology* 267:C570–C580.

Roscoe WA, Barr KJ, Mhawi AA, Pomerantz DK, Kidder GM (2001) Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biology of Reproduction* 65: 829–838.

Rudolfsson SH, Wikström P, Jonsson A, Collin O, Bergh A (2004) Hormonal regulation and functional role of vascular endothelial growth factor A in the rat testis. *Biol Reprod* 70:340-347.

Russel LD (1996) Mammalian leydig cell structure. In: Payne AH, Hardy MP, Russel LD (eds) *The Leydig cell*. Cache River Press, Vienna, IL, pp 43-96.

Saez JM (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocrine Reviews* 15:574- 626.

Schulze C (1984) Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 88:1-104.

Serre-Beinier V, Mas C, Calabrese A, Caton D, Bauquis J, Caille D, Charollais A, Cirulli V & Meda P (2002) Connexins and secretion. *Biology of the Cell* 94:477–492.

Setchell BP, Pakarinen P, Huhtaniemi I (2002) How much LH do the Leydig cells see? *J Endocrinol* 172:375-82.

Setchell BP (2004) Hormones what the testis really sees. *Reprod Fertil Dev.* 16:535-45.

Setchell BP, Palombi F (2004) Isolation of endothelial cells from the rat testis, and their effect of testosterone secretion by interstitial cells. 13th European workshop on molecular and cellular endocrinology of the testis in Dunblane, Scotland. Abstract C6.

Skinner MK (1991) Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev* 12:45-77.

Söhl G, Willecke K (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Communication and Adhesion* 10:173–180.

Swain A, Narvaez S, Burgoyne P, Camerino G, and Lovell-Badge R (1998) Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391:761–767.

Tran N, Servos G, Haider SG (2006) Ultrastructure of cell contacts of fetal and adult Leydig cells in the rat: a systematic study from birth to senium. *Anat Embryol* 211:273-82.

Yoshimura K, Kaji H, Kamindono S, Chihara K (1994) Expression of basic fibroblast growth factor (FGF-2) messenger ribonucleic acid is regulated by testosterone in the rat anterior pituitary. *Growth Factors* 10:253-258.

Herzlichen Dank:

Herr Prof. Dr. S. G. Haider, für die Bereitstellung und hervorragende Betreuung der Arbeit.

Frau G. Servos, für die äußerst angenehme Zusammenarbeit von der Gewebefixierung bis zur Elektronenmikroskopie.

Frau Dr. K. Rascher und G. Berthold für die stets freundliche Hilfestellung bei Fragen in allen Angelegenheiten.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sevil Özlügedik, geb. Çakır

beruflicher Werdegang

10/2001-12/2007	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09/2003	Ärztliche Vorprüfung
12/2007	Zweiter Abschluss der ärztlichen Prüfung
12/2007	Erteilung der Approbation als Ärztin
01/2008-03/2012	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Augenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf
seit 04/2012	Tätigkeit als Assistenzärztin am Marien Hospital Düsseldorf