

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

**Vergleichende immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisierung  
der 11  $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1  
im Hodengewebe von Kleinsäugetern**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Christian Heuschkel

2012

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.Schulz

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
3 $\beta$ HSD	3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
11 $\beta$ HSD	11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
17 $\beta$ HSD	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
GR	Glucokortikoidrezeptor
H6PDH	Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase
kDa	Kilodalton
M	molare Masse
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PND	Postnataltag
TBS	Tris buffered Saline (Trishydroxymethyl-aminomethan)
TVA	Tierversuchsanlage

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>I. Einleitung</b>	<b>1 - 4</b>
I.1 Fragestellung	4
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>5 - 14</b>
II.1 Versuchstiere	5
II.2 Gonadenentnahme	5
II.3 Fixierung des Gewebes	6
II.4 Schnittherstellung	8
II.5 Schritte der immunhistochemischen Methode zum Nachweis der 11 $\beta$ HSD Typ 1	10
II.6 Immunhistochemie	11
II.7 Auswertungsmethode	13
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>14 - 31</b>
III.1 Wistarratte	14
III.2 Zwergkaninchen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	14
III.3 Hauskatze ( <i>Felis silvestris catus</i> )	15
III.4 Meerschweinchen ( <i>Cavia porcellus</i> )	15
III.5 Goldhamster ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	16
III.6 Mausstämme	16 – 17
III.6.1 NMRI Maus	16

III.6.2	C57/Black 6 Maus	16
III.6.3	BALB/ C Maus	17
III.6.4	FVB Maus	17
III.7	Ergebnisse Übersicht	18
III.8	Abbildungen	19 -31
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>33 - 43</b>
IV.1	11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase: Biochemie, Vorkommen, Funktion	33
IV.2	11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 im Säugetierhoden	36
IV.3	Phylogenetische Überlegungen	39
<b>V.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>44 – 52</b>
<b>VI.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>VII.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>54</b>
<b>VIII.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>55</b>

## I. Einleitung

Die Enzymgruppe der Hydroxysteroid-Dehydrogenasen spielt eine essentielle Rolle in der Steroidbiosynthese sowie im Steroidmetabolismus der Leydig-Zellen (Haider, 2004). Der erste direkte Beweis, dass testikuläres Androgen primär in den Leydig-Zellen hergestellt wird, wurde 1958 unter Verwendung einer histochemischen Technik erbracht, die das Enzym 3  $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 $\beta$ HSD) im Hoden von Kaninchen lokalisieren konnte (Wattenberg, 1958). Die 3 $\beta$ HSD ist ein notwendiges Schlüsselenzym in der Testosteronbiosynthese und wurde in vielen Studien in den Leydig-Zellen von Ratten nachgewiesen (Dupont et al., 1993; Lording und de Kretser, 1972; Haider et al., 1986). In den Hoden von Nagetieren lassen sich zwei verschiedene Populationen von Leydig-Zellen unterscheiden: 1. fetale und 2. adulte Leydig-Zellen. Diese unterscheiden sich u.a. durch ihre unterschiedliche Topographie, Struktur, Ultrastruktur, Lebensdauer sowie die Fähigkeit zur Androgensynthese. Die fetalen Leydig-Zellen können auf lichtmikroskopischer Ebene ab dem 16. Fetaltag bis zum 25. postnatalen Tag (PND) durch eine positive histochemische Reaktion für 3 $\beta$ HSD identifiziert werden. Die Kinetik der Testosteronsynthese in den fetalen Leydig-Zellen stimmt mit dem ontogenetischen Auftreten der 3 $\beta$ HSD in den histochemischen Studien überein. Die 17  $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 $\beta$ HSD) katalysiert den letzten Schritt in der Biosynthese zum Testosteron und baut Androstendion, ein schwaches Androgen, zum potenten Androgen Testosteron um. Bisher konnten 11 verschiedene Isoenzyme der 17 $\beta$ HSD identifiziert werden (Payne, 2007). Leydig-Zellen synthetisieren und halten ein hohes Level von 17 $\beta$ HSD Typ 4 aufrecht mit einem Peak in den adulten Leydig-Zellen am 19. und 37. PND. Ab dem 31. PND ist eine positive histochemische Reaktion für die 11  $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 $\beta$ HSD) nachweisbar, zunächst

nur in einigen wenigen adulten Leydig-Zellen und ab dem 40. PND homogen in allen adulten Leydig-Zellen. Beim Vergleich der Reaktionsintensitäten der beiden Enzyme ab dem ersten Tag, an dem die 11 $\beta$ HSD eine positive Reaktion zeigt, bis zum 90. PND fällt eine nahezu inverse Beziehung auf mit einer Zunahme der Reaktionsintensität für 11 $\beta$ HSD und Abnahme der 17 $\beta$ HSD Intensität (Schäfers et al., 2001). Das Enzym 11 $\beta$ HSD besetzt eine einmalige Position unter allen Hydroxysteroid-Dehydrogenasen in den Leydig-Zellen. Es ist das einzige Enzym, das histochemisch nicht in den fetalen Leydig-Zellen nachgewiesen werden kann, wogegen die unreifen adulten Leydig-Zellen es ab dem 31. PND exprimieren. Sein erstes Auftreten trifft zeitlich mit der Ausbildung elongierter Spermatozoen im Rattenhoden ab dem 35. PND zusammen (Neumann et al., 1993). Zusätzlich korreliert das Auftreten des Enzyms mit dem postnatalen Anstieg der Zellzahl der Leydig-Zellen, der Zunahme des Hodengewichts, der Gesamtoberfläche der intrazellulären Membranen sowie dem Gehalt und der Sekretion von Testosteron in den Leydig-Zellen (Phillips et al., 1989). Die 11 $\beta$ HSD wurde daher als Markerenzym für die funktionelle Reife der adulten Leydig-Zellen bei Ratten vorgeschlagen (Haider, 2004). Es existieren zwei Isoformen der 11 $\beta$ HSD in den Leydig-Zellen: 11 $\beta$ HSD Typ 1 ist eine NADP abhängige Oxidoreduktase, 11 $\beta$ HSD Typ 2 eine unidirektionale Oxidase. Beide Enzyme kontrollieren die intrazellulären Glucocorticoidspiegel und spielen eine wichtige parakrine Rolle im Sinne einer protektiven Funktion zur Aufrechterhaltung der Testosteronsekretion (Ge et al., 2005). Nach in vitro und in vivo Exposition mit Corticosteron konnte nach 24 Stunden eine deutlich erhöhte Apoptoserate der adulten Leydig-Zellen von Sprague Dawley Ratten neben einer starken Abschwächung der immunocytochemischen Reaktionsintensität für 11 $\beta$ HSD beobachtet werden (Gao et al., 2002). 11 $\beta$ HSD oxidiert Corticosteron zum inaktiven Meta-

boliten 11- Dehydrocorticosteron. Monder et al. (1994) schlußfolgerten, dass die Aufgabe der 11 $\beta$ HSD im Hoden darin besteht, das Organ vor der Glucocorticoid induzierten Hemmung der Testosteronsynthese und -sekretion durch oxidative Inaktivierung zu schützen. In weiteren Studien konnte der Effekt von Stress auf die Serumcorticosteronlevel und die Testosteronsynthese sowie die 11 $\beta$ HSD Aktivität in den Leydig-Zellen von Long-Evans Ratten nachgewiesen werden. In einem durchsichtigen Höhlensystem ausgesetzt, entwickelten die hochaggressiven Ratten innerhalb von wenigen Tagen eine ausgeprägte Hierarchie mit einem defensiven sozialen Rückzugsverhalten der unterlegenen Tiere. Bei den dominanten Tieren konnte eine höhere immunhistochemische Aktivität der 11 $\beta$ HSD Typ 1 nachgewiesen werden bei gleichzeitig erhöhten Serumcorticosteronspiegeln, während die unterlegenen Männchen die stressinduzierte Glucocorticoidexposition der Leydig-Zellen nicht durch eine Steigerung der 11 $\beta$ HSD Aktivität ausgleichen konnten (Monder et al., 1994; Hardy et al., 2002). Brereton et al. (2001) untersuchten verschiedene Gewebe von adulten Sprague Dawley Ratten und konnten mittels Western blot Analyse das Vorhandensein des klassischen 11 $\beta$ HSD Typ 1 Enzyms in größerer Menge in den Hoden nachweisen.

Unser heutiges Verständnis der Leydig-Zellfunktionen und der endokrinologischen Rolle, die sie bei der männlichen Fortpflanzung spielen, basiert im Wesentlichen auf Forschungsergebnissen, die an Nagetieren, hier insbesondere Ratten, gewonnen wurden. Basierend auf dem adulten Nagetier Prototyp kann der Hoden in zwei Kompartimente unterteilt werden: Das eine bilden die in den Tubuli seminiferi gelegene Keimzellschicht sowie die Sertoli-Zellen, das andere die Leydig-Zellen zusammen mit zahlreichen Lymph- und Blutgefäßen in den intertubulären Interstitien. Diese Anatomie ist übereinstimmend mit der Sichtweise, dass die Leydig-Zellen die primären steroidsekre-



torischen Elemente des Hodens sind. Dieses Konzept ist jedoch nicht universell übertragbar auf alle Vertebraten oder Säugetiere. Phylogenetisch sind die Leydig-Zellen relative 'Newcomer' im Zellrepertoire der Hoden der Wirbeltiere. Sie entwickelten sich erst spät als Ursprung zirkulierender Steroide und ersetzten die Sertoli-Zellen als primär steroidbildende Zellen des Hodens. Bei allen Wirbeltierklassen erfordert die männliche Keimzellentwicklung ein androgenreiches Milieu, der Beitrag der Leydig-Zellen versus Sertoli-Zellen hierbei variiert jedoch abhängig von der entwicklungsgeschichtlichen Position der betrachteten Art, dem Entwicklungsalter des Individuums, den Jahreszeiten sowie dem physiologischen Status. Alle höheren Wirbeltiere haben vollentwickelte Tubuli seminiferi und interstitielle Leydig-Zellen mit hochentwickelten steroidbildenden Zellorganellen, die dem Nagetierprototyp ähnlich sind (Callard, 1996).

## **I.1 Fragestellung**

Die 11 $\beta$ HSD Typ 1 wurde bisher immunhistochemisch mit wenigen Ausnahmen vornehmlich im Rattenhoden nachgewiesen. Bisher fehlen Studien, die die Lokalisation des Enzyms im Hoden verschiedener Säugetiere beschreiben. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, mittels einer immunhistochemischen Methode das Vorkommen der 11 $\beta$ HSD Typ 1 im Hodengewebe der folgenden Kleinsäugetiere zu untersuchen und das Verteilungsmuster sowie die Ausprägung der Immunreaktion zu analysieren und so Daten über die phylogenetische Entwicklung des Enzyms in der Gruppe der Mammalia zu sammeln. Im Einzelnen wurden folgende Spezies (adulte Tiere) untersucht: Wistar-ratten, vier verschiedene Mausstämme (NMRI, C57/Black6, FVB, BALB C), Goldhamster, Meerschweinchen, Zwergkaninchen und Hauskatze.

## **II. Material und Methoden**

### **II.1 Versuchstiere**

Es wurde jeweils ein Hoden pro Tier (insgesamt 4 Tiere je Tiergruppe) von folgenden adulten Säugetieren untersucht. Wistarratten (6 Monate alte Tiere). Vier verschiedene Mausstämme : NMRI, C57 / Black 6 , FVB, BALB C (3- 4 Monate alte Tiere). Goldhamster (*Mesocricetus auratus*), (3 Monate alte Tiere). Die vorgenannten Tiere stammen alle aus der Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf. Die Aufzucht der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einer pathogenfreien Zone mit einem Hell-Dunkel-Zyklus von je 12 Stunden im zentralen Tierlabor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Wasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung.

Die Hoden von Zwergkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*), (3-9 Monate alte Tiere), Meerschweinchen (*Cavia porcellus*), (4 Monate alte Tiere), Hauskatze (*Felis silvestris catus*), (6 – 15 Monate alte Tiere), wurden im Rahmen von geplanten Kastrationen in einer Tierarztpraxis unter Ketaminanästhesie gewonnen und freundlicherweise von Dr. med. vet. Pantke, Neuss, in vorbereiteter Fixierlösung zur Verfügung gestellt.

### **II.2 Gonadenentnahme**

Die Tötung der Tiere und die ordnungsgemäße Organentnahme wurde durch eine sachkundige Person des Instituts für Anatomie II der Heinrich-Heine-Universität vorgenommen. Der Doktorand erhielt die Hoden zur weiteren Bearbeitung. Die Ratten, Mäuse und Goldhamster wurden in eine tiefe Äthernarkose versetzt und anschließend durch

$CO_2$  Inhalation in einer Kammer getötet. Nach Fixierung der Tiere in Rückenlage auf einer Korkplatte wurde zunächst das Fell mit einem Medianschnitt von der Symphyse bis zum Processus xiphoideus inzisiert und von der muskulären Rumpfwand nach lateral gelöst, anschließend erfolgte die Eröffnung des Abdomens in gleicher Weise. Die Hoden wurden an ihren Leitstrukturen aus dem Skrotum und dem Abdomen gezogen, von diesen getrennt und anschließend auf einer zweiten Korkplatte freipräpariert. Anschließend wurden die Hoden in Bouin'scher Lösung fixiert. Es wurden alle Vorgaben des Tierschutzgesetzes und der zentralen Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität beachtet bzw. das Einverständnis der TVA eingeholt.

Die Hoden der Zwergkaninchen, Meerschweinchen und Katzen wurden im Rahmen von geplanten Kastrationen gewonnen und ebenfalls in Bouin'scher Lösung fixiert. Diese Tiere wurden vor der Organentnahme durch eine Ketamin-Injektionsnarkose anästhesiert.

### **II.3 Fixierung des Gewebes**

Von jedem Tier wurde jeweils ein Hoden in frisch hergestellter Bouin'scher Lösung (bestehend aus heiß gesättigter Pikrinsäure, 37%igem Formaldehyd sowie Eisessig) getrennt fixiert. Diese Methode hat sich bewährt, da hierdurch ein optimaler Struktur-erhalt erreichbar ist und eine Schrumpfung des Gewebes vermieden wird, die nachfolgend zu Artefakten führen könnte (Bouin, 1897).

Diese Fixierung erfolgte über 24 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe (Isopropylalkohol 70%-80%-90%-100%) für jeweils mindestens drei Stunden. Es folgte eine weitere Fixierung mit Methylbenzoat, je 24 Stunden mit zweimaligem Wechsel des Mediums bei Raumtemperatur. Nach Abgießen des Methylbenzoats erfolgte eine zweimal zehnmütige Behandlung mit Toluol.

Daraufhin wurden die Hoden in Paraffin mit einem Schmelzpunkt von 60° Celsius (mit dreimaliger, jeweils vierstündlicher Erneuerung des Paraffins und einer letzten Erneuerung und Einwirkung über mindestens 12 Stunden) eingebettet.

## II.4 Schnittherstellung

Nach Auskühlung der Paraffinblöcke im Wasserbad (1 Std.) wurden auf einem Schlittenmikrotom (Leica SM2000R) ca. 5µm dicke Serienschnitte angefertigt. Es wurden je Versuchstier drei Schnittsätze hergestellt, numeriert und wie folgt weiter bearbeitet:

1. HE Färbung
2. 11βHSD Typ I
3. 11βHSD Typ I + Hämalan (Kernfärbung)
4. Negativkontrolle (Primärantikörper ersetzt durch Puffer)
5. -
6. -
7. -
8. -
9. -
10. 11βHSD Typ I
11. 11βHSD Typ I + Hämalan (Kernfärbung)
12. Negativkontrolle (Primärantikörper ersetzt durch Puffer)
13. -
14. -
15. -
16. -
17. -
18. 11βHSD Typ I
19. 11βHSD Typ I + Hämalan (Kernfärbung)
20. Negativkontrolle (Primärantikörper ersetzt durch Puffer)

Es wurde insbesondere auf einen Mindestabstand von 35µm zwischen zwei Schnittsätzen des gleichen Hodens geachtet, um bei der mikroskopischen Auswertung eine Mehrfachuntersuchung der gleichen Zellen auszuschließen.

Die folgenden Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt mit Ausnahme der Inkubation mit dem Primärantikörper, die im Kühlschrank bei 4° Celsius stattfand. Alle Inkubationen fanden zur Vermeidung von Verdunstung in einer feuchten Kammer (Diabox) statt.

## II.5 Schritte der immunhistochemischen Methode zum Nachweis der 11 $\beta$ HSD Typ 1

1. TBS- Pufferbad 5 Minuten
2. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zum Blockieren der endogenen Peroxidase 10 Minuten
3. Abspülen mit Aqua dest.
4. TBS-Pufferbad 5 Minuten
5. Eselserum 1:10 mit TBS verdünnt 30 Minuten
6. Primärantikörper: 11  $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ I Nr. PC544 (Fa. Binding Site GB). Der Antikörper wurde mit TBS verdünnt 16 Stunden

Spezies	Verdünnung Primärantikörper
Wistarratte	1:1500
NMRI –Maus	1:3000
C57/ Black 6 Maus	1:4000
FVB Maus	1:5000
BALB C Maus	1:3000
Goldhamster	1:4000
Zwergkaninchen	1:3000
Meerschweinchen	1:2000
Hauskatze	1:2000

7. Abspülen mit TBS, TBS Pufferbad 5 Minuten
8. Brückenantikörper (Rabbit anti goat 1:100 mit TBS verdünnt. Fa. Dako Hamburg Nr. Z0228) 30 Minuten
9. Abspülen mit TBS, TBS Pufferbad 5 Minuten
10. PAP- Komplex (Ziege 1:100 mit TBS verdünnt) 30 Minuten (Fa. Dako Hamburg Nr. B0157)
11. Abspülen mit TBS, TBS Pufferbad 5 Minuten
12. Als Chromogen diente DAB (3,3`Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat) Fa. Dako Hamburg Nr. S3000 10 Minuten
13. Spülen mit Aqua dest.
14. Kernfärbung mit saurem Hämalun nach Mayer 2 Minuten
15. Bläuen unter fließendem Leitungswasser 5 Minuten
16. Aufsteigende Alkoholreihe (70%,80%,90%,100%) Xylol je 2 Minuten
17. Eindecken der Objekte mit DePeX®, Fa. Serva Heidelberg

Die Negativkontrolle wurde mit allen aufgeführten Reagenzien mit Ausnahme des Primärantikörpers durchgeführt. Dieser wurde im entsprechenden Schritt durch TBS ersetzt.

## II.6 Immunhistochemie

Der immunhistochemische Enzymnachweis wurde nach der Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) Methode durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine indirekte Methode. An einen unkonjugierten Primärantikörper (hier vom Schaf) bindet zunächst ein Brückenantikörper (aus dem Kaninchen), welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Nachfolgend bindet der so genannte PAP-Komplex (aus der Ziege gegen Kaninchen gerichtet) an den Brückenantikörper. Der PAP-Komplex besteht gleichzeitig aus dem Enzym Peroxidase und aus einem Antikörper gegen dieses Enzym (Enzym-anti-Enzym-Komplex). Dieser Komplex wird von dem freien Fab-Fragment des Brückenantikörpers gebunden und ist so mit dem Primärantikörper verbunden. Die Vorteile der indirekten Methode im Vergleich zur direkten Methode (der spezifische Antikörper ist direkt mit einem Farbstoff oder einem Markerenzym konjugiert) liegt darin, dass eine stärkere Verdünnung des Primärantikörpers möglich ist, außerdem kann eine starke Hintergrundfärbung vermieden werden. Zur Sichtbarmachung der Enzymreaktion wird DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat) verwendet, das mit der Peroxidase einen Enzym-Substrat-Komplex bildet und zu einem braun gefärbten Reaktionsprodukt oxidiert wird. Diese Reaktion kann nicht unterscheiden, ob die Peroxidase aus dem Gewebe stammt, wo sie z.B. in roten und weißen Blutkörperchen vorkommt oder ob sie nachträglich in Form des PAP-Komplexes zugegeben wurde. Daher ist eine Eliminierung der im Schnitt physiologisch vorhandenen endogenen Peroxidase vor der Immunfärbung erforderlich. Dieses erfolgt durch Inkubation des Gewebsschnittes mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Storjohann, 1998).



Zur weiteren Vermeidung von unspezifischen Anfärbungen werden die Schnitte mit einem Normal – oder Blockierungsserum inkubiert. Hierbei handelt es sich um das Serum einer Tierspezies, die nicht mit den nachzuweisenden Antigenen immunisiert wurde (hier wurde Eselserum verwendet). Mit dem Normalserum sollen elektrostatisch geladene Proteine im untersuchten Gewebe abgesättigt werden, so dass der folgende Primärantikörper nur noch spezifische Bindungen eingehen kann. Eine Verdünnung dieses Serums ist wiederum erforderlich, damit es nicht zu einer unspezifischen Bindung seiner Immunglobuline an das eingesetzte Detektionssystem kommt (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000).

Der Primär Antikörper zum Nachweis der 11 $\beta$ HSD Typ 1, Bezug durch die Firma Binding Site GB, Nr. PC544, ist ein polyklonaler Antikörper, der durch Immunisierung von Schafen mit einem Peptid aus 15 Aminosäuren gewonnen wurde. Kreuzreaktivität zu anderen Spezies wurde nach Angaben des Herstellers nicht getestet. Das Antiserum ist paraffingängig und soll nach Herstellerempfehlung auf humanem Gewebe in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt werden.

Nach Trocknung und Entparaffinierung der Schnitte über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (100%-90%-80%-70%) und Aqua destillata wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Spezialstift (Fa. Dako, Hamburg) umkreist und weiterbehandelt.

Bei der Entparaffinierung wurden das Xylol sowie die Alkohole nach spätestens 100 behandelten Objektträgern ausgetauscht, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren.

Als Pufferlösung diente 0.05 M TRIS, ph 7,4 (Trishydroxymethyl-aminomethan) in 0,9%NaCl gelöst. Dieser Puffer wird im Folgenden TBS (Tris buffered saline) genannt.

Bei jedem Tier wurde zunächst in einem Vorversuch eine Verdünnungsreihe des Primärantikörpers hergestellt, um eine optimale spezifische Antigenanfärbung zu erreichen. Optimale Verdünnungen müssen in jedem Labor unter den eigenen Gegebenheiten ermittelt werden (Storjohann, 1998). Als Verdünnungsmedium wurde TBS verwendet. Ausgehend von den Herstellerangaben erfolgte die Ermittlung des optimalen Antikörpertiters über eine Verdünnungsreihe in 6 Schritten von 1:500 bis 1:6000. Die Verdünnung des Primärantikörpers mit dem optimalen Färbergebnis wurde anschließend im Hauptversuch bei den Serienschnitten angewandt.

## **II.7 Auswertungsmethode**

Die Befunderhebung fand mit Hilfe eines Lichtmikroskopes Leitz- Orthoplan Wetzlar statt. Die Intensität der immunhistochemischen Reaktion in den Schnitten wurde semi-quantitativ nach folgenden Kriterien bewertet, + = schwache Reaktion, ++ = mäßig starke Reaktion, +++ = starke Reaktion. Weiterhin wurde unterschieden zwischen fokaler und homogener Ausprägung der Immunreaktion. Die fotografische Befunddokumentation erfolgte mit einer Leitz Orthomat Kamera (Kodak Ektachrome 200 ASA Film).

### **III. Ergebnisse**

#### **III.1 Wistarratte**

Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigt bei allen vier Versuchstieren ein intaktes Keimepithel in den quergeschnittenen Tubuli seminiferi. Die Leydig-Zellen befinden sich in Gruppen in den peritubulären sowie perivaskulären Feldern sowie in den interstitiellen Dreiecken. Die Abbildungen 1-3 zeigen repräsentativ fotografierte Felder der Immunreaktion.

Die Immunreaktion findet im Zytoplasma der Leydig-Zellen statt, die Kerne der Leydig-Zellen sind dabei ausgespart. Die Intensität der Immunreaktion war in der Regel homogen mäßig bis stark ausgeprägt. Die mitabgebildeten interstitiellen Blutgefäße mit den im Lumen befindlichen Erythrozyten sowie ringförmig darum gelegenen stark angefärbten Leydig Zellen zeigen keine Immunreaktion (Abb.1). In den Negativkontrollschnitten zeigt sich keine Anfärbung (Abb.4).

#### **III.2 Zwergkaninchen (*Oryctolagus cuniculus*)**

In der lichtmikroskopischen Durchsicht aller Schnitte zeigt sich eine homogene mäßig starke bis starke Immunreaktion in den interstitiellen Feldern in allen vier untersuchten Hoden (Abb.5,6,7 und 9). Das Zytoplasma der Leydig-Zellen weist in allen untersuchten Schnitten eine gleichmäßige Anfärbung auf. Auffällig ist, dass die Leydig-Zellen in den interstitiellen Feldern hier eine flächigere Anordnung aufweisen und das Volumenverhältnis Interstitium zu Hodenkanälchen größer ist als bei der Ratte. Am auffälligsten

ist dies bei dem jüngsten (3,5 Monate) der untersuchten Tiere. Die interstitiellen Felder werden hier fast vollständig von immunpositiven Leydig-Zellen eingenommen (Abb.5 und 7). Die Negativkontrollen zeigen keine Enzymreaktion (Abb.8).

### **III.3 Hauskatze (*Felis silvestris catus*)**

In den mit dem Primärantikörper inkubierten Schnitten der Katerhoden ist die Immunreaktion homogen mäßig stark bis stark im Zytoplasma der entlang der Basalmembran gelegenen Sertoli- Zellen ausgeprägt (Abb.12 und 13). Die interstitiellen Felder mit den Leydig-Zellen zeigen keine Reaktion. Die Kerne der Leydig-Zellen sind blau gefärbt (Abb.11). In den Negativkontrollen ist eine Immunreaktion nicht feststellbar (Abb.14).

### **III.4 Meerschweinchen (*Cavia porcellus*)**

Bei allen untersuchten Schnitten der Meerschweinchen findet sich ein intakter Verband des Keimepithels (Abb.15). In den interstitiellen Feldern zeigt sich bei allen Tieren eine mäßig starke zytoplasmatische Immunreaktion in den Leydig-Zellen (Abb.16 und 17). Diese läßt sich homogen in allen beurteilten repräsentativen Feldern nachweisen. Eine Anfärbung des Keimepithels findet nicht statt. In den Negativkontrollen ist keine Farbreaktion nachweisbar (Abb.18).

### **III.5 Goldhamster (*Mesocricetus auratus*)**

In allen mit dem Primärantikörper inkubierten Schnitten des Goldhamsters zeigt sich eine spezifische, homogene mäßig starke bis starke, zytoplasmatische Immunreaktion in den Leydig-Zellen. Das Keimepithel weist einen intakten Zellverband auf. Die Leydig-Zellen mit rundem Zellkern befinden sich überwiegend einlagig in den interstitiellen Dreiecken oder um ein zentrales Blutgefäß gruppiert (Abb.19-21). In den Negativkontrollen ist keine Farbreaktion erkennbar (Abb.22).

### **III.6 Mausstämme**

#### **III.6.1 NMRI Maus**

In der lichtmikroskopischen Auswertung ist die Immunreaktion bei allen mit dem Primärantikörper inkubierten Schnitten der NMRI Mäuse in den Leydig-Zellen homogen schwach bis mäßig stark ausgeprägt. In den Negativkontrollen wurde keine Anfärbung des Gewebes festgestellt .

#### **III.6.2 C57/Black 6 Maus**

Die immunhistochemische Reaktion für 11 $\beta$ HSD Typ I ist in allen beurteilten Schnitten der C57/Black6 Maus in den Leydig-Zellen homogen schwach bis mäßig stark ausgeprägt (Abb.23 und 24). In den Negativkontrollen (Abb.25) ist keine Farbreaktion nachweisbar.

### **III.6.3 BALB/ C Maus**

Bei der BALB/C Maus zeigt sich in der lichtmikroskopischen Übersicht bei drei von vier Versuchstieren eine inhomogene, fokale und schwache Enzymreaktion in den Leydig-Zellen. Nicht alle in den interstitiellen Dreiecken gelegenen Leydig-Zellen sind gleichmäßig angefärbt. Das Chromogen im Zytoplasma der stärker reagierenden Leydig-Zellen ist feingranulär verteilt. Im Keimepithel tritt keine Reaktion auf, die Negativkontrollen sind ohne Farbprodukte der Immunreaktion.

### **III.6.4 FVB Maus**

Die immunhistochemische Reaktion für  $11\beta$ HSD Typ I ist bei den vier Versuchstieren in allen repräsentativen Feldern der Hodenschnitte im Zytoplasma der Leydig-Zellen homogen schwach aber deutlich ausgeprägt. Die Negativkontrollen weisen keine Immunreaktion auf.

### III.7 Ergebnisse Übersicht

Spezies	Intensität	Verteilungsmuster	Besonderheiten
Wistarratte	+++	homogen	Leydig-Zellen zwischen drei Tubuli seminiferi einlagig um zentrales Blutgefäß
NMRI-Maus	+ / +++	homogen	
C57/Black 6 Maus	+ / +++	homogen	
FVB Maus	+ / +++	homogen	
BALB C Maus	+	heterogen	nur fokale schwache Reaktion einzelner Leydig-Zellen
Goldhamster	++ / ++++	homogen	
Meerschwein	++	homogen	Leydig-Zellen mehrlagig in interstitiellen Dreiecken
Zwergkaninchen	++	homogen	Mehrlagige Anordnung der Leydig-Zellen in breiterem Interstitium im Verhältnis zu Hodenkanälchen
Hauskatze	-	keine	Homogene starke Anfärbung im Zytoplasma der Sertoli-Zellen. Keine Reaktion in den Leydig-Zellen.

Tabelle 1: Immunhistochemische Reaktion von 11 $\beta$  HSD Typ 1 in den Leydig-Zellen des adulten Tiers (+ = schwache , ++ = mäßig starke, +++ = starke Immunreaktion)

### III.8 Abbildungen

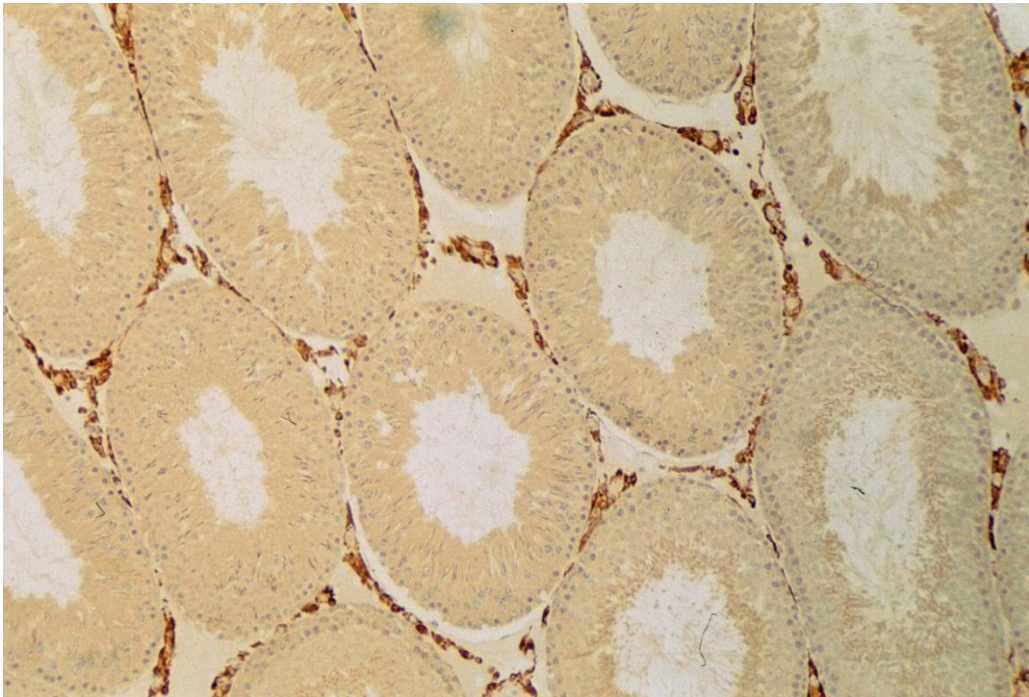


Abbildung 1: Wistarratte, 6 Monate alt, immunhistochemische Reaktion mit 11βHSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalalaun (blau). Vergrößerung: x100. Homogene mittelstarke bis starke zytoplasmatische Enzymreaktion in den im peritubulären Interstitium gelegenen Leydig-Zellen.

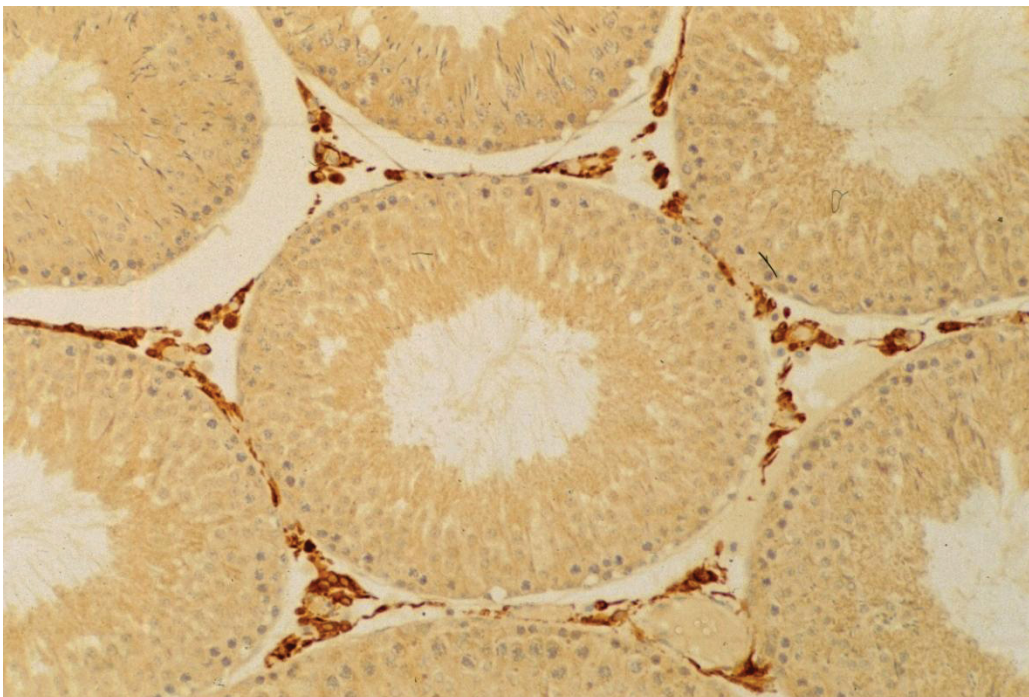


Abbildung 2: Wistarratte, 6 Monate alt, immunhistochemische Reaktion mit 11βHSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalalaun (blau). Vergrößerung: x160. Mittelstarke bis starke zytoplasmatische Immunreaktion in den zwischen den quergeschnittenen Tubuli seminiferi gelegenen Leydig-Zellen.



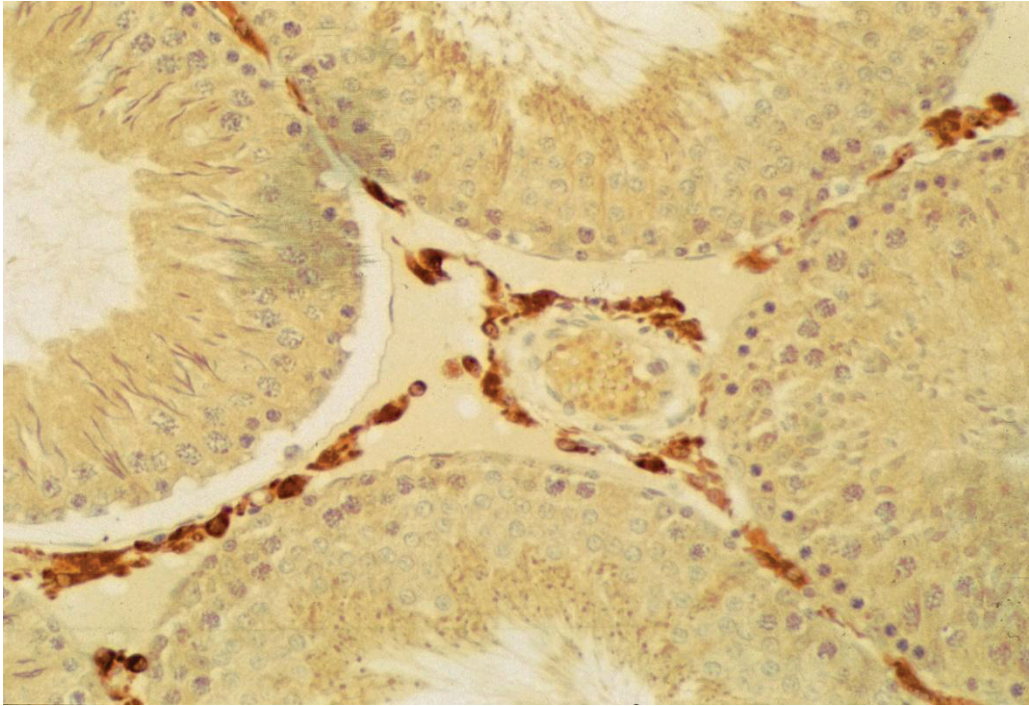


Abbildung 3: Wistarratte, 6 Monate alt, immunhistochemische Reaktion mit 11 $\beta$ HSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalan (blau). Vergrößerung: x250. Mittelstarke bis starke homogene zytoplasmatische Immunreaktion in den interstitiell gelegenen Leydig-Zellen. Keine Anfärbung des zentral gelegenen Blutgefäßes.

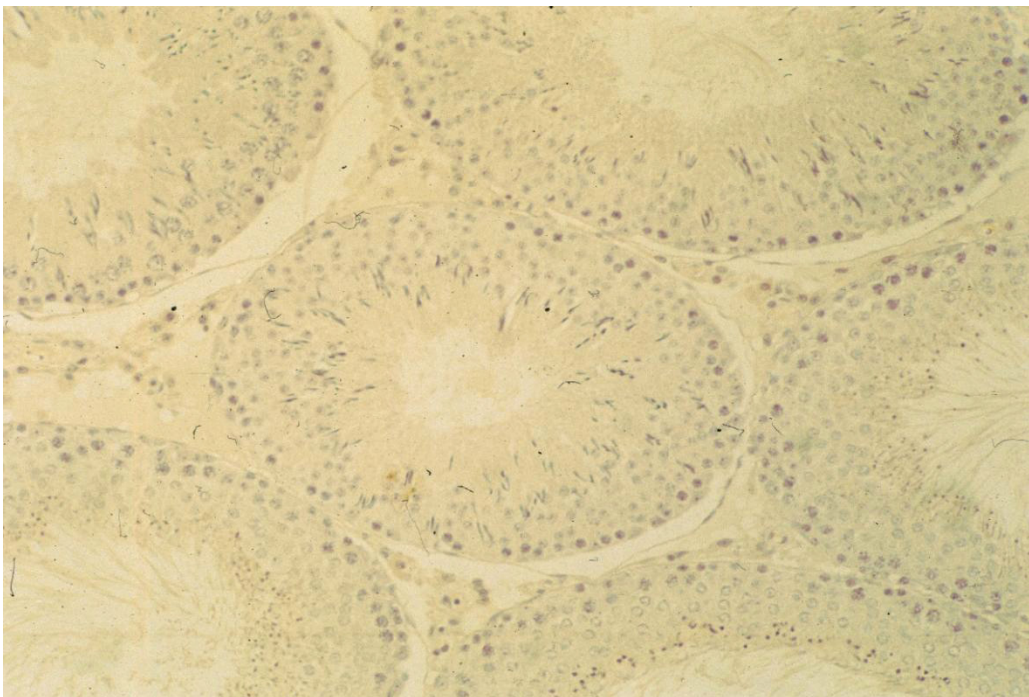


Abbildung 4 Wistarratte, 6 Monate alt, Negativkontrolle, Kernfärbung mit Hämalan (blau). Vergrößerung: x160. Keine Anfärbung.

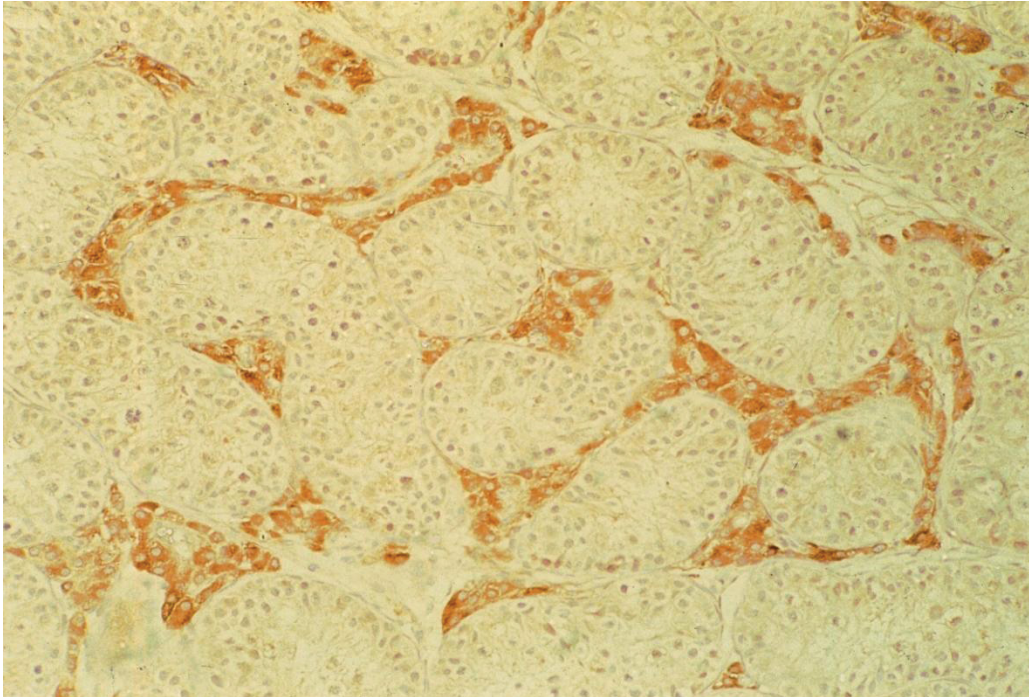


Abbildung 5: Zwergkaninchen, 3,5 Monate alt (Kastration) 1140g, immunhistochemische Reaktion mit 11 $\beta$ HSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x160. Homogene mittelstarke zytoplasmatische Immunreaktion in den interstitiellen Leydig-Zellen. Auffallend ist, dass das interstitielle Feld fast vollständig von immunpositiven Leydig-Zellen eingenommen wird.

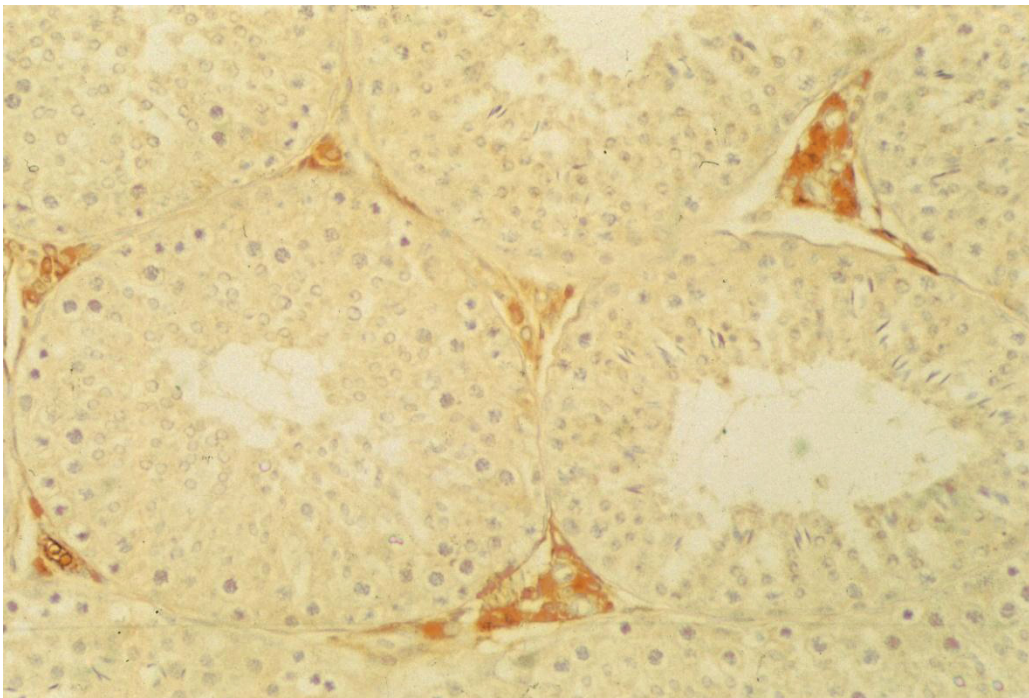


Abbildung 6: Zwergkaninchen, 9 Monate alt (Kastration) 1620g, immunhistochemische Reaktion mit 11 $\beta$ HSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x250. Homogene mittelstarke zytoplasmatische Immunreaktion in den interstitiellen Leydig-Zellen.

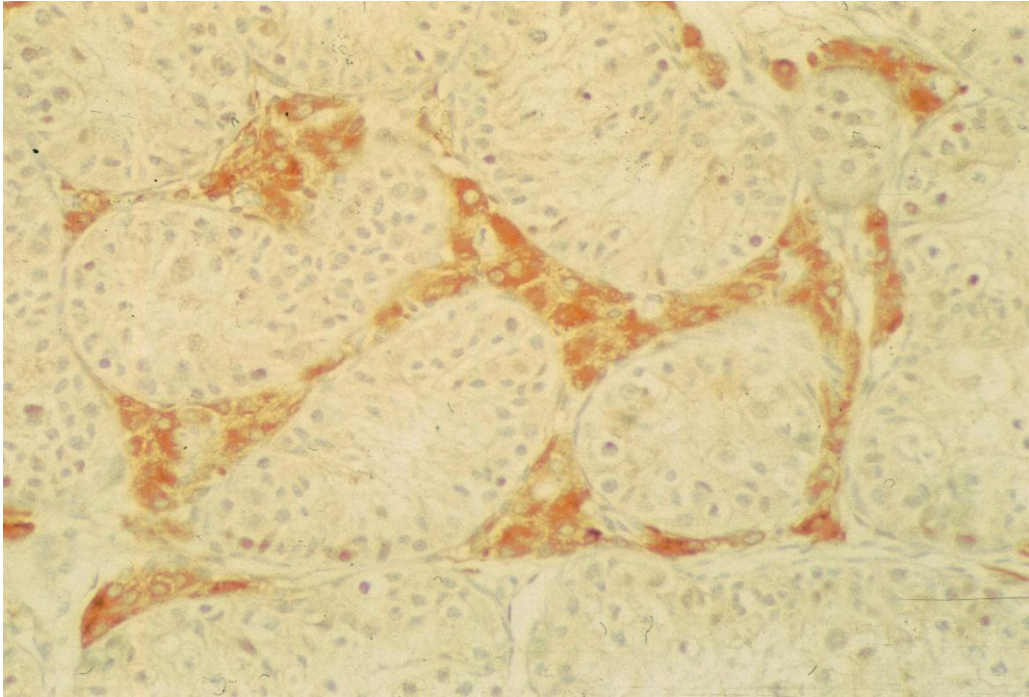


Abbildung 7: Zwergkaninchen, 3,5 Monate alt (Kastration) 1140g, immunhistochemische Reaktion mit 11βHSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x250. Mittelstarke homogene zytoplasmatische Immunreaktion in den interstitiellen Leydig-Zellen.

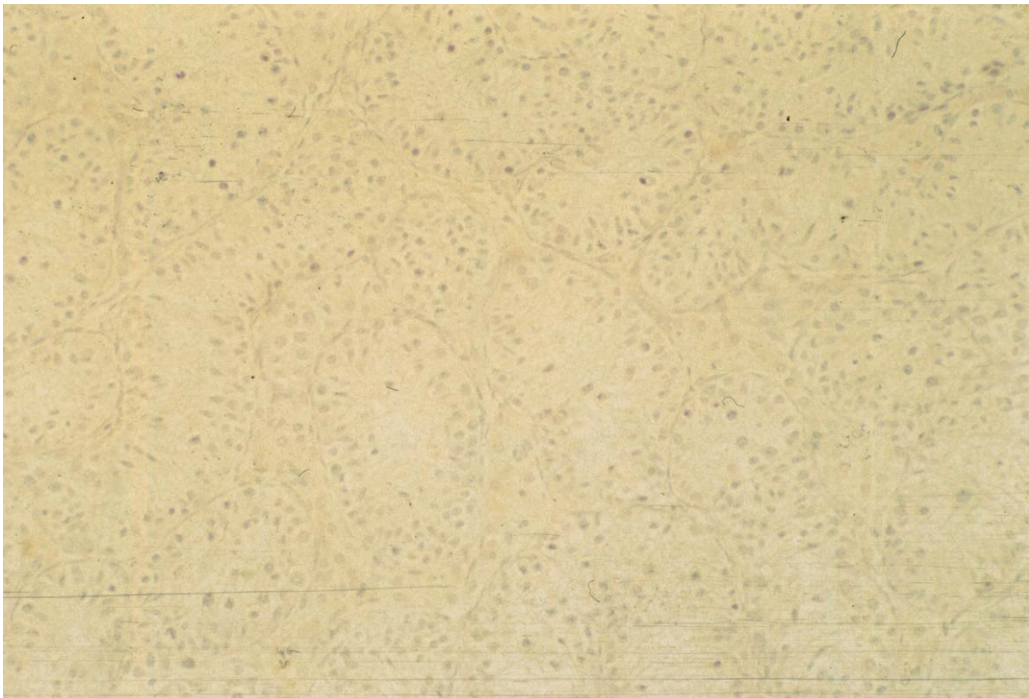


Abbildung 8: Zwergkaninchen, 3,5 Monate alt (Kastration) 1140g, Negativkontrolle, Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x160. Keine Immunreaktion.

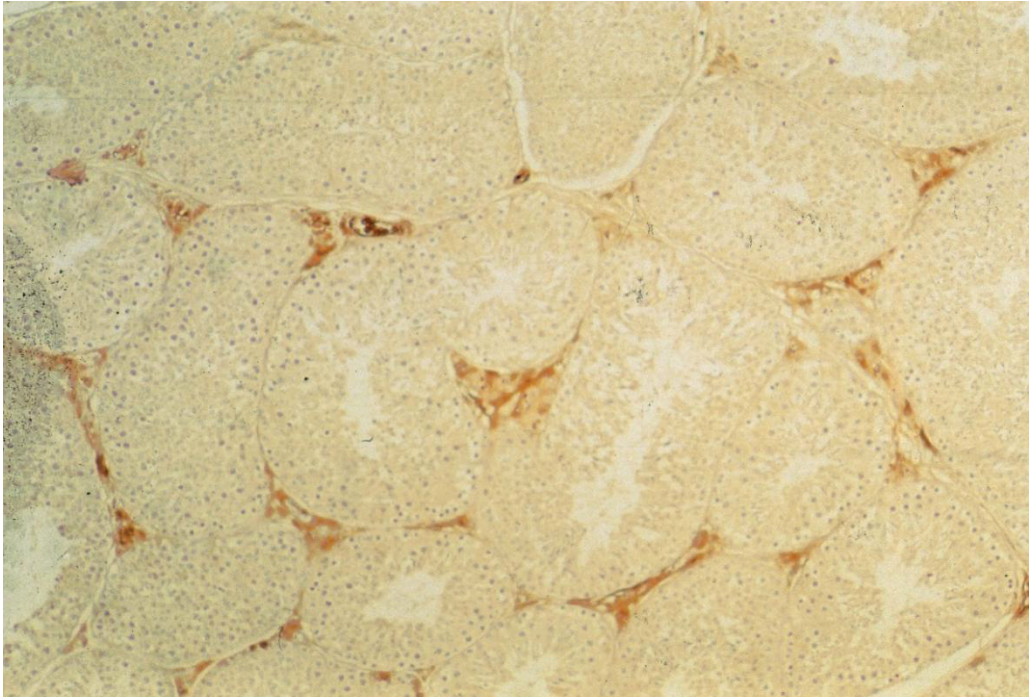


Abbildung 9: Zwergkaninchen, 9 Monate alt (Kastration) 1620g, immunhistochemische Reaktion mit 11 $\beta$ HSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x100. In der Übersicht homogene mittelstarke Enzymreaktion in den um die Tubuli seminiferi gelegenen interstitiellen Leydig-Zellen.

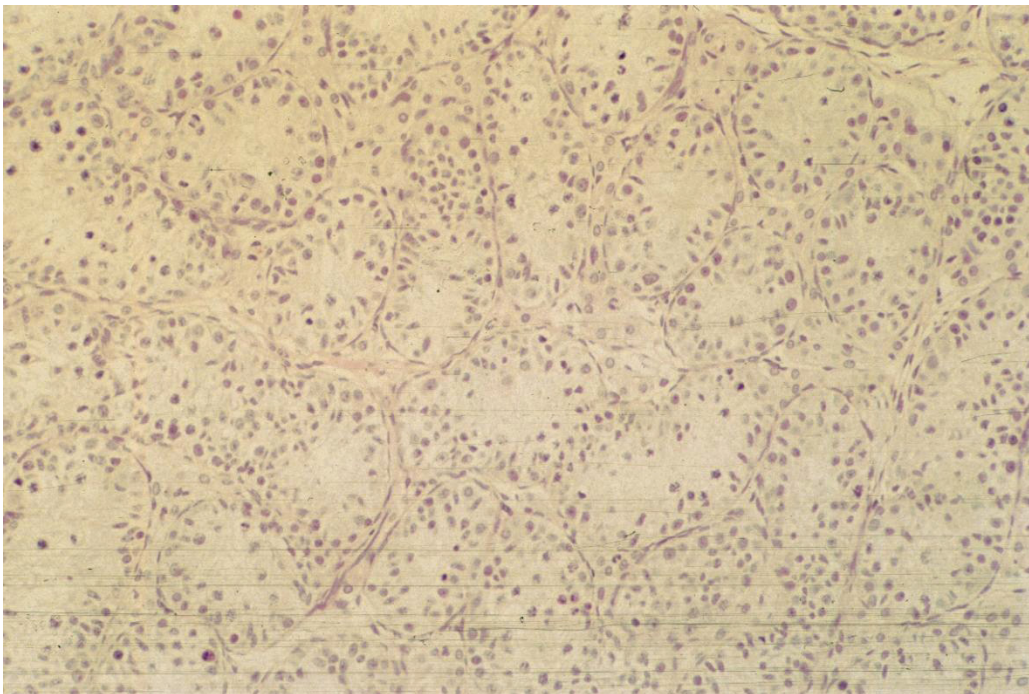


Abbildung 10: Zwergkaninchen, 3,5 Monate (Kastration), Hämatoxylin-Eosin Färbung. Vergrößerung: x160.

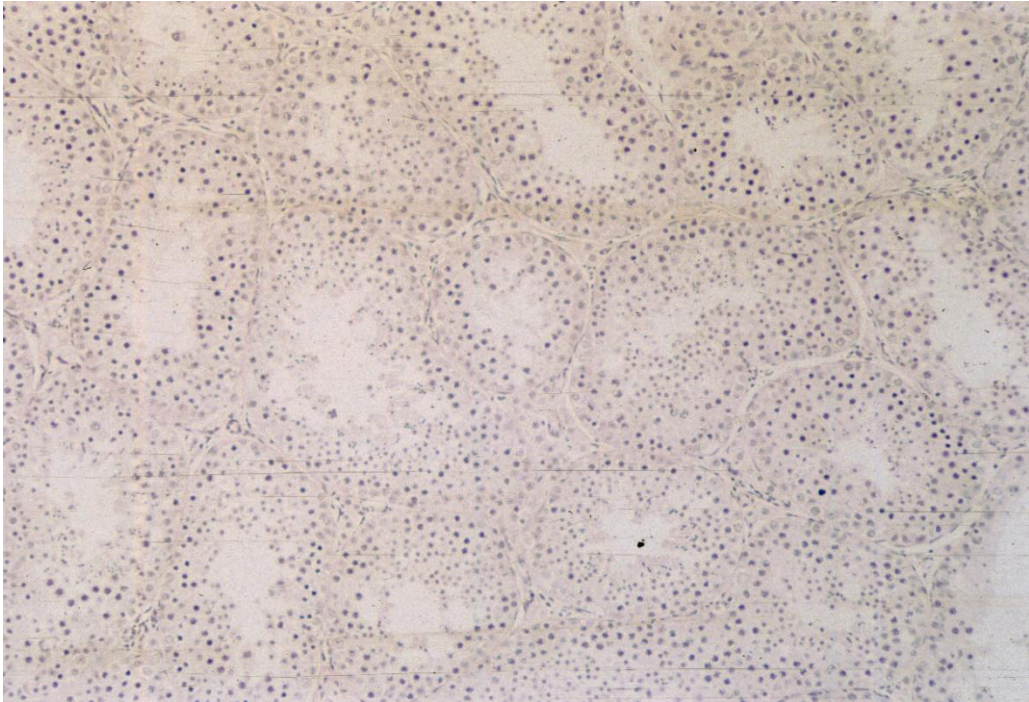


Abbildung 11: Hauskatze, 6 Monate alt (Kastration) 3600g, Hämatoxylin-Eosin Färbung. Vergrößerung: x100. Die Kerne der testikulären Zellen sind blau gefärbt.

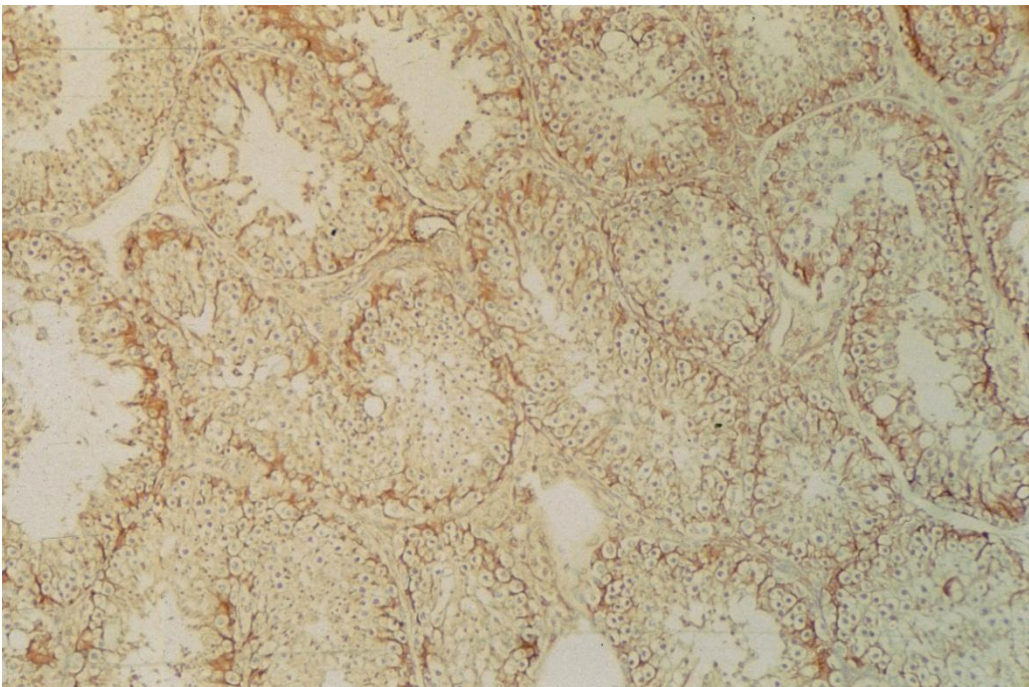


Abbildung 12: Hauskatze, 6 Monate alt (Kastration) 3600g, immunohistochemische Reaktion mit 11 $\beta$ HSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x100. Homogene mäßig starke bis starke Immunreaktion im Zytoplasma der Sertoli-Zellen. Keine Anfärbung in den Leydig-Zellen im Bereich der interstitiellen Felder.

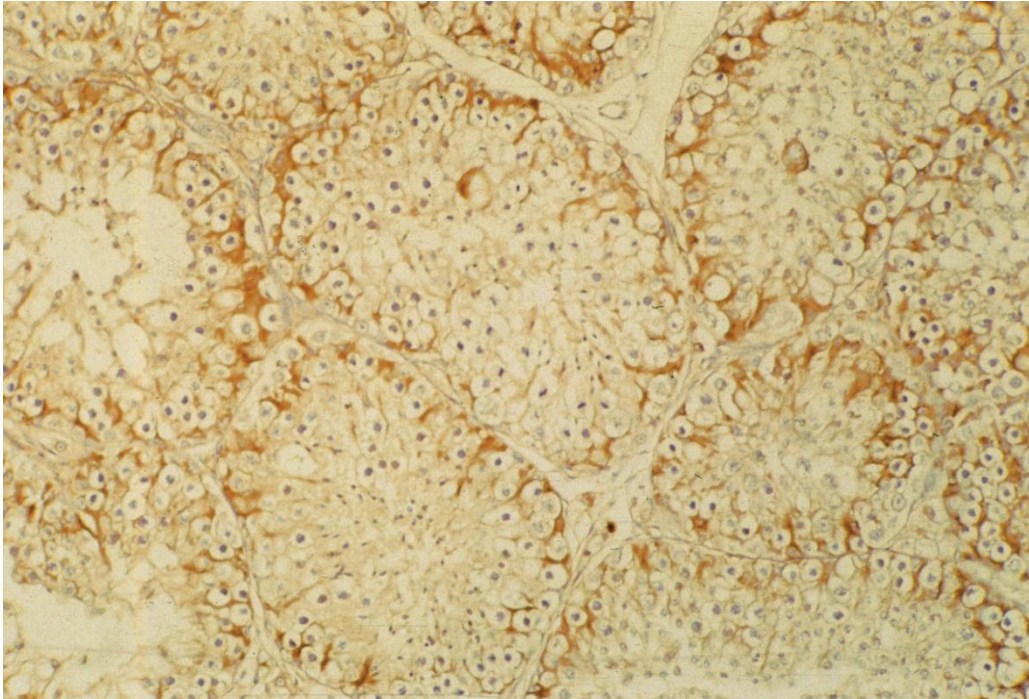


Abbildung 13: Hauskatze, 6 Monate alt (Kastration) 3600g, immunhistochemische Reaktion mit 11 $\beta$ HSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x160. Mäßig starke bis starke Immunreaktion im Zytoplasma der Sertoli-Zellen, keine Reaktion in den Leydig-Zellen im interstitiellen Feld.

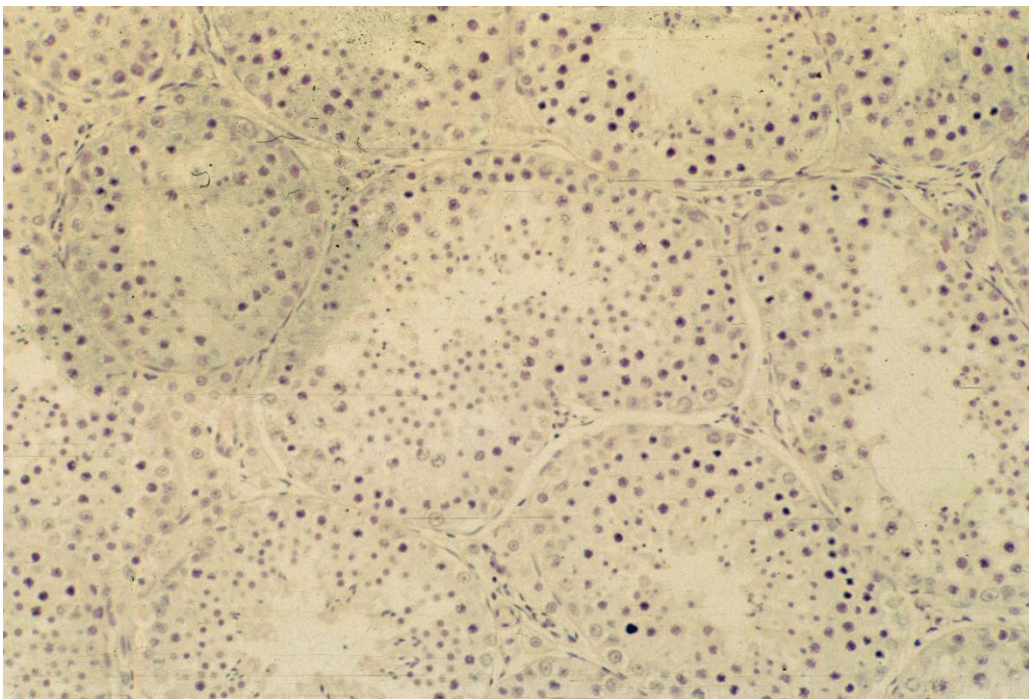


Abbildung 14: Hauskatze, 6 Monate alt (Kastration) 3600g, Negativkontrolle, Kernfärbung mit Hämalaun. Vergrößerung: x160. Eine Immunreaktion ist nicht feststellbar.

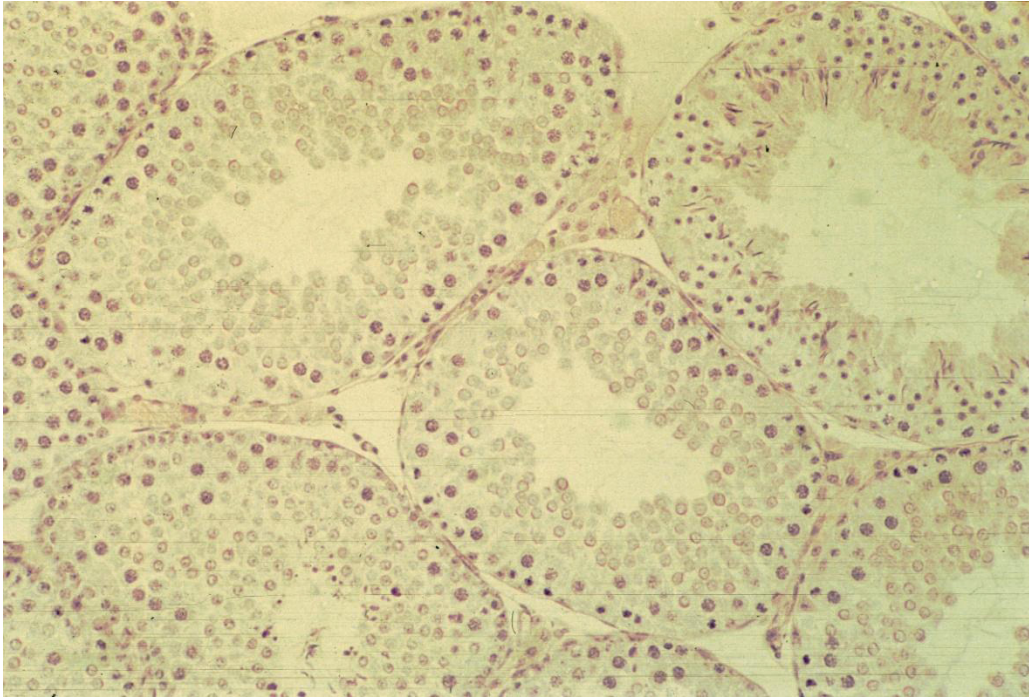


Abbildung 15: Meerschweinchen, 4 Monate alt (Kastration) 690g, Hämatoxylin-Eosin Färbung. Vergrößerung: x 160. Spermatogonien, Spermatozyten (primär und sekundär), Spermatisden, Sertoli-Zellen, peritubuläre Zellen sowie Leydig-Zellen sind deutlich sichtbar.

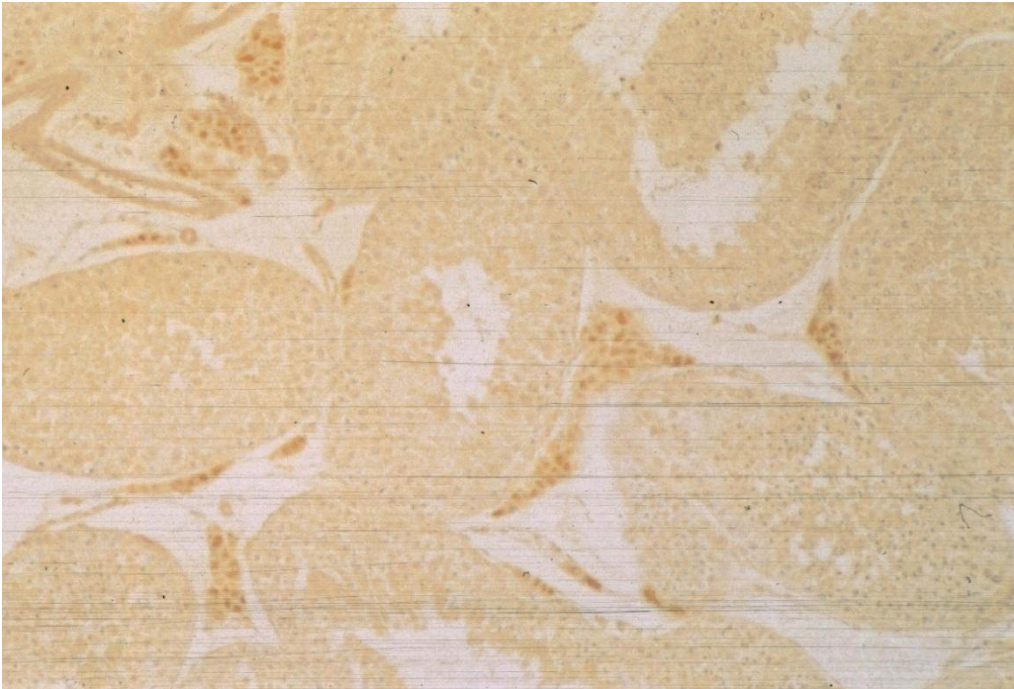


Abbildung 16: Meerschweinchen, 4 Monate alt (Kastration) 690g, immunhistochemische Reaktion mit 11βHSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x100. Homogene, mäßig starke Immunreaktion in allen interstitiellen Feldern.

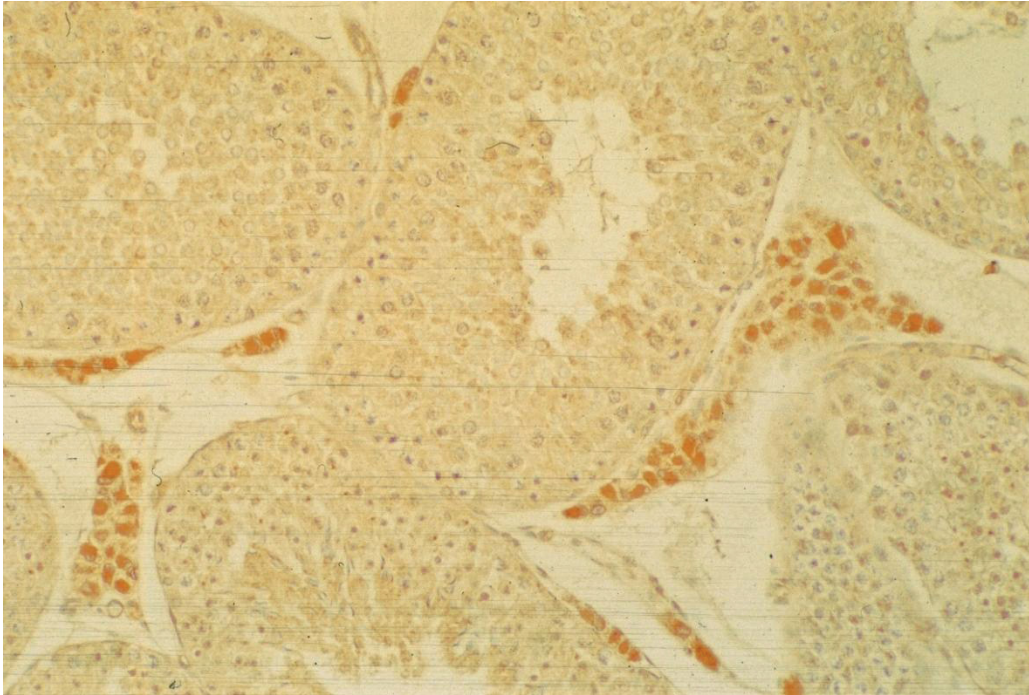


Abbildung 17: Meerschweinchen, 4 Monate Kastration) 690g, immunhistochemische Reaktion mit 11 $\beta$ HSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x160. Homogene, mäßig starke zytoplasmatische Enzymreaktion in den Leydig Zellen.

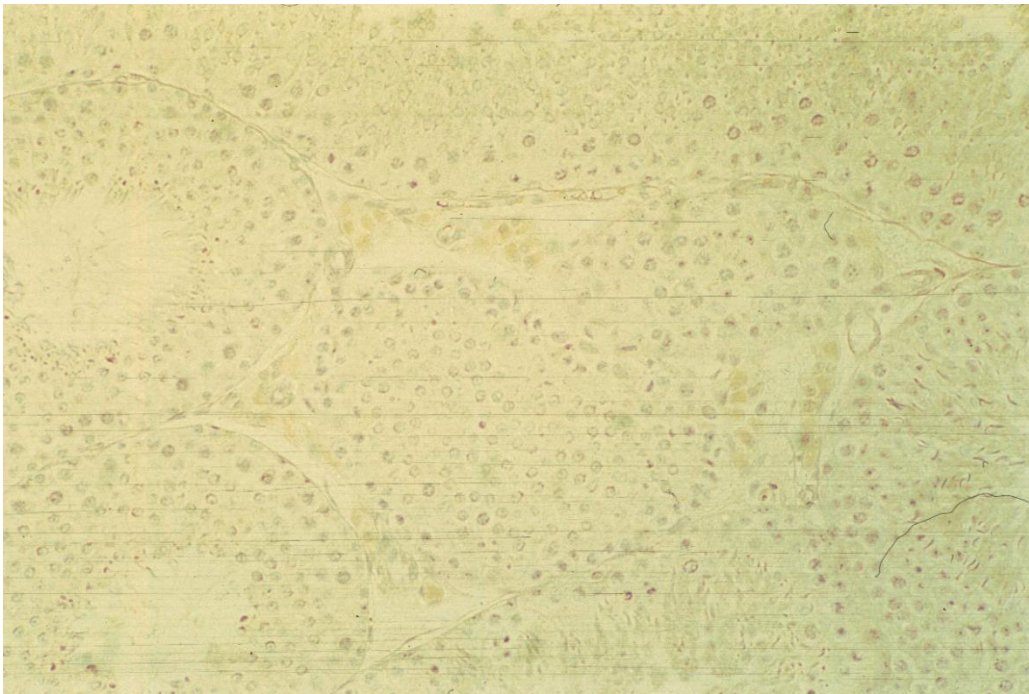


Abbildung 18: Meerschweinchen, 4 Monate alt (Kastration) 690g, Negativkontrolle, Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x160. Keine Reaktion.



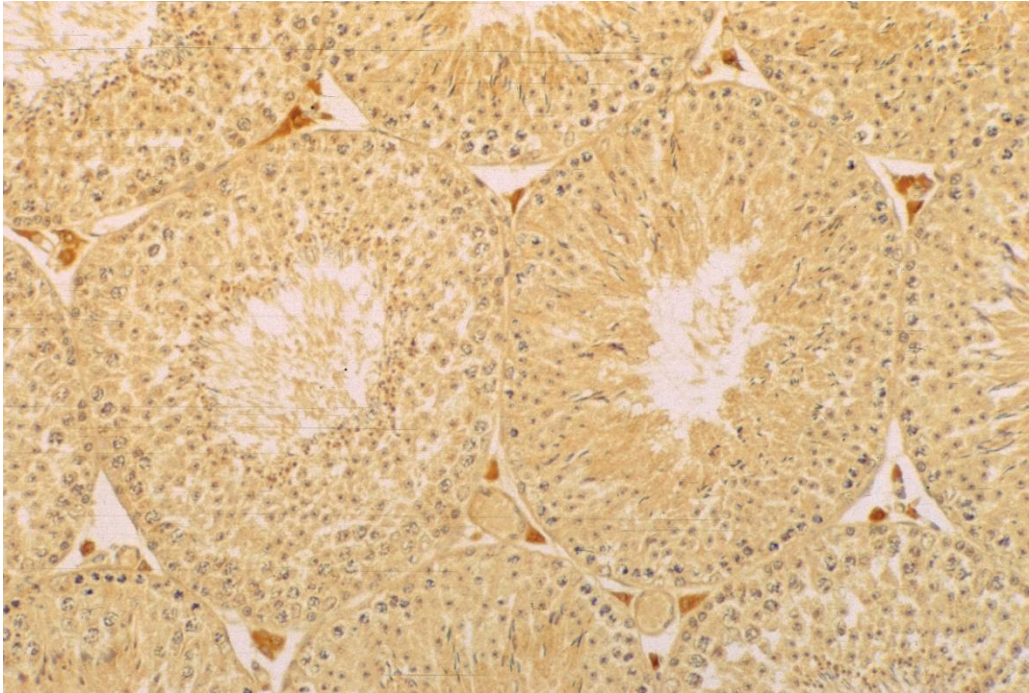


Abbildung 19: Goldhamster, 3 Monate alt, immunhistochemische Reaktion mit 11 $\beta$ HSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalan (blau). Vergrößerung: x160. Mäßig starke Enzymreaktion in den zwischen den querschnittenen Tubuli seminiferi trigonal gelegenen Leydig-Zellen. Angeschnittene Blutgefäße ohne Reaktion.

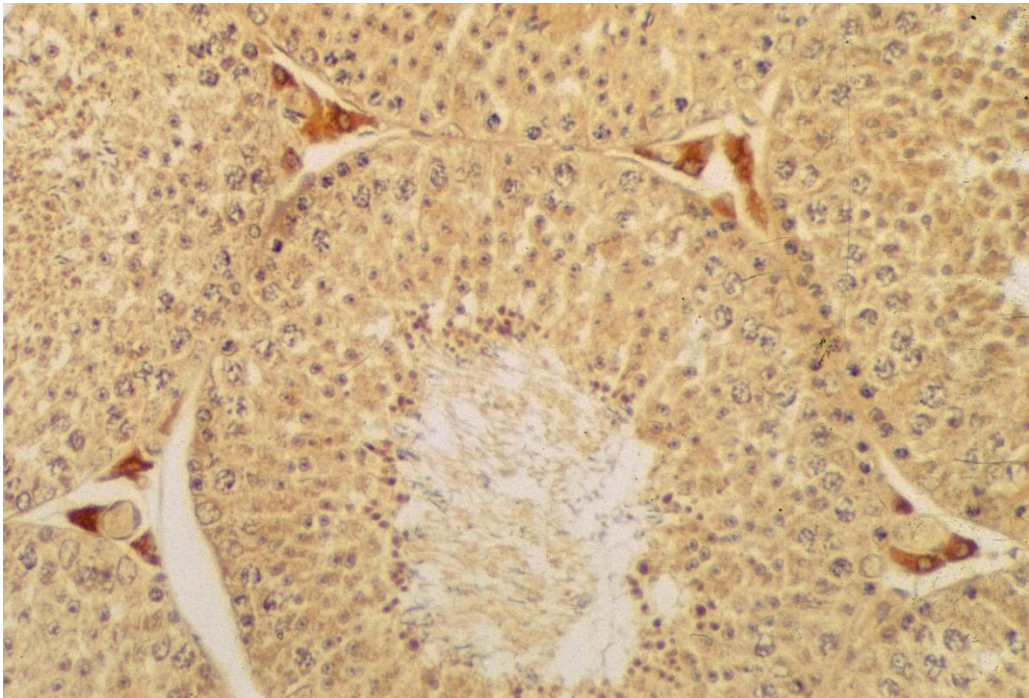


Abbildung 20: Goldhamster, 3 Monate alt, immunhistochemische Reaktion mit 11 $\beta$ HSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalan (blau). Vergrößerung: x250. Mäßig starke bis starke zytoplasmatische Immunreaktion in den trigonal zwischen den querschnittenen Tubuli seminiferi gelegenen Leydig-Zellen.

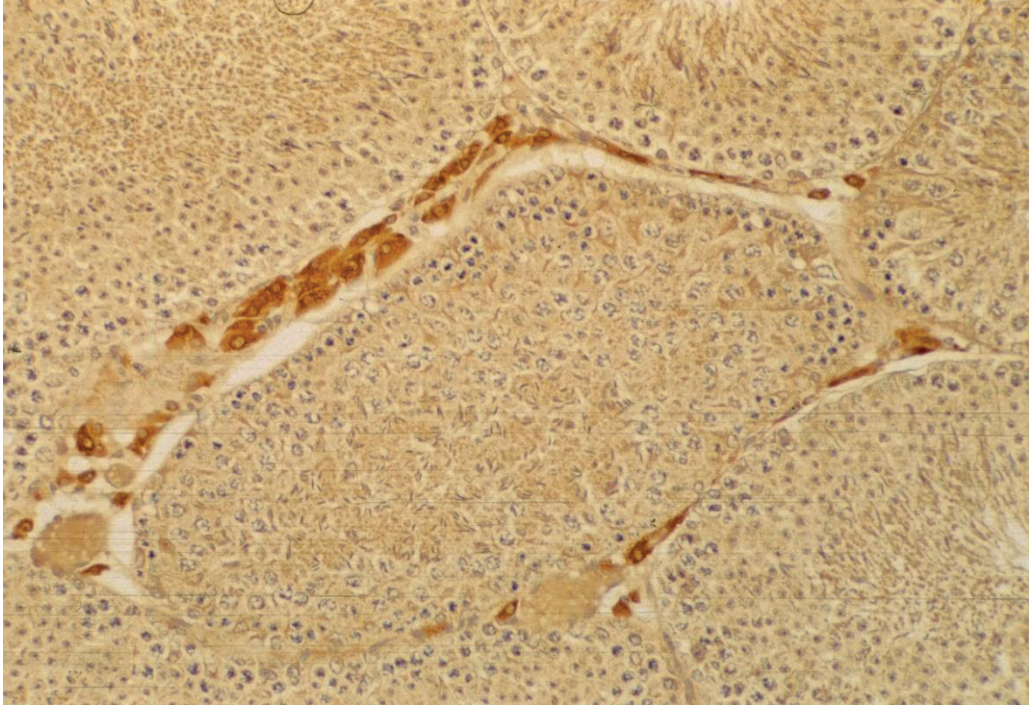


Abbildung 21: Goldhamster, 3 Monate alt, immunhistochemische Reaktion mit 11 $\beta$ HSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x160. Mäßig starke bis starke Immunreaktion in den Leydig-Zellen.

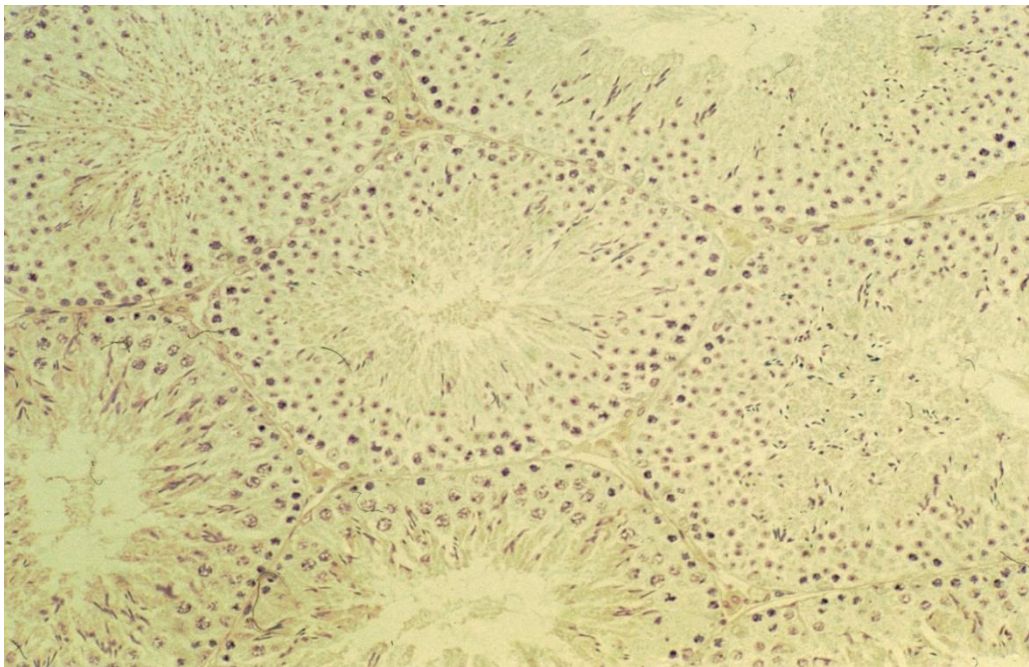


Abbildung 22: Goldhamster, 3 Monate alt, Negativkontrolle. Kernfärbung mit Hämalaun (blau) Vergrößerung: x160. Keine Anfärbung.

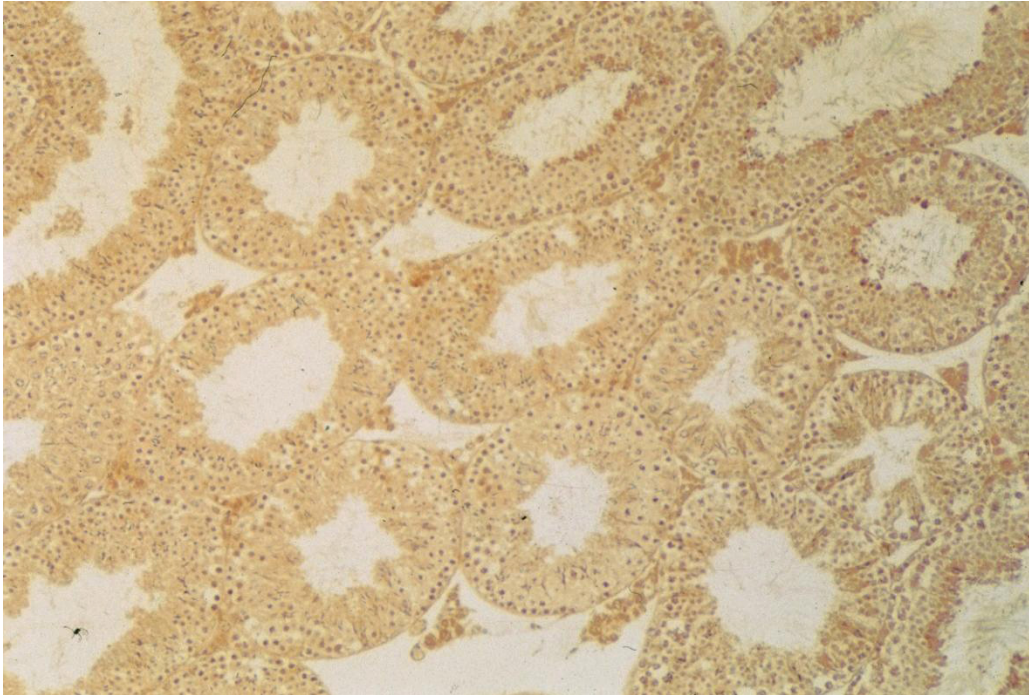


Abbildung 23: C57/Black 6 Maus, 3 Monate, immunhistochemische Reaktion mit 11 $\beta$ HSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x100. Schwache bis mäßig starke homogene Enzymreaktion in den interstitiellen Feldern. In einzelnen Tubuli seminiferi unspezifische Reaktion des inneren Keimepithels.

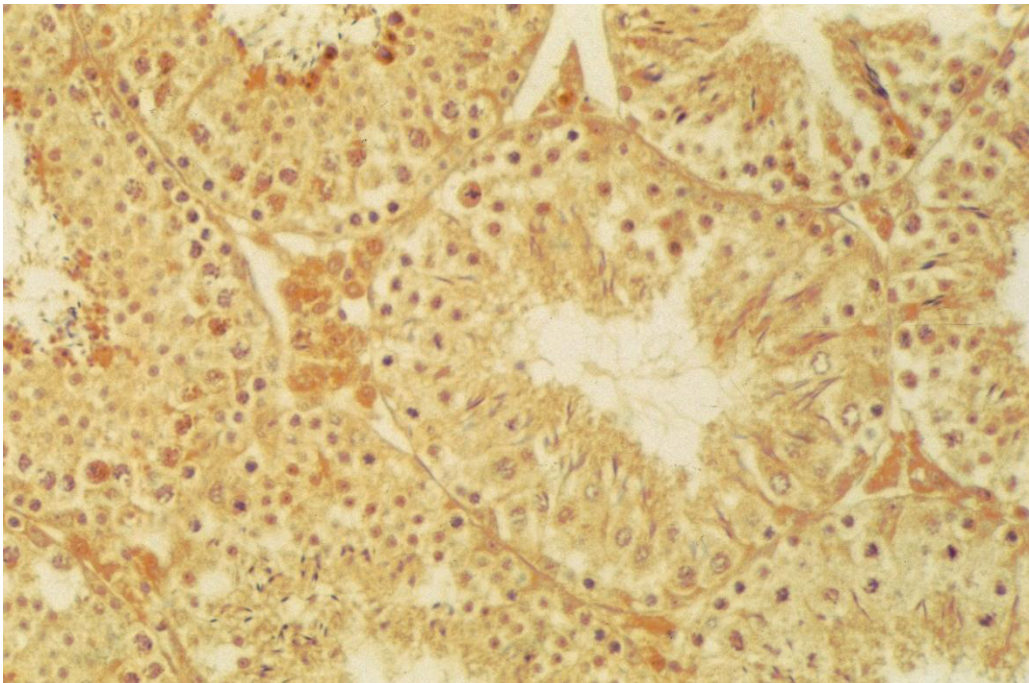


Abbildung 24: C57/Black 6 Maus, 3 Monate, immunhistochemische Reaktion mit 11 $\beta$ HSD Typ I (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Vergrößerung: x250. Schwache bis mäßig starke zytoplasmatische Immunreaktion in den Leydig-Zellen. Relativ starke unspezifische Hintergrundfärbung.

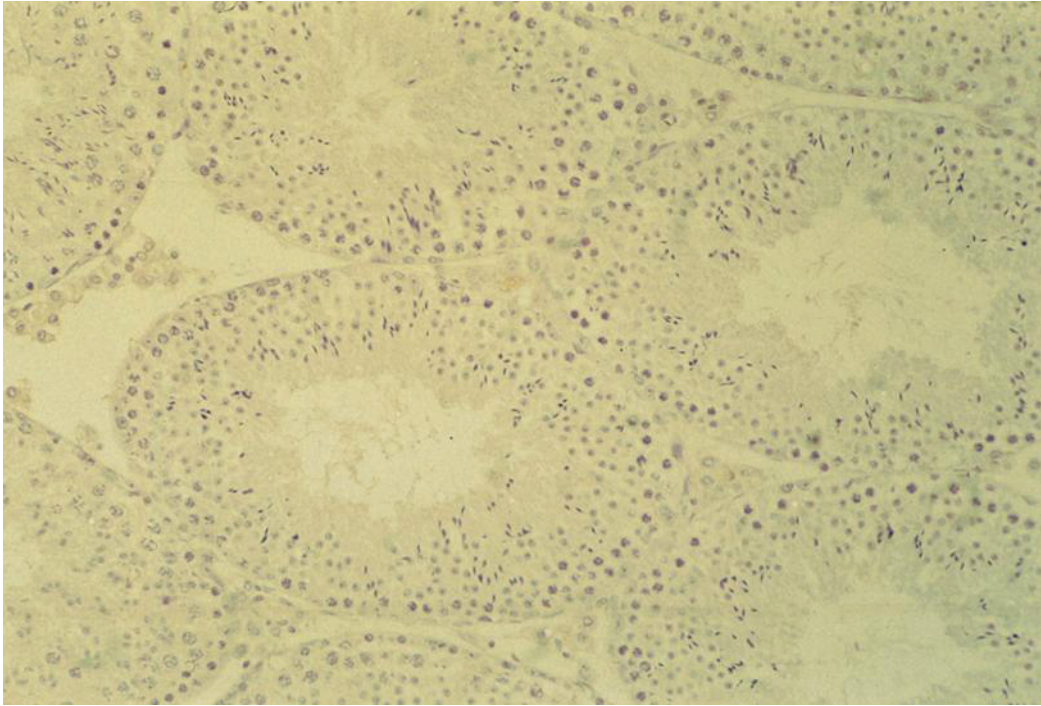


Abbildung 25: C57/Black 6 Maus, 3 Monate, Negativkontrolle. Kernfärbung mit Hämalaun. Vergrößerung: x160. Keine Farbreaktion.

## IV. Diskussion

### IV.1 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase: Biochemie, Vorkommen,

#### Funktion

Die Bioverfügbarkeit von Glucocorticoiden wird hauptsächlich durch zwei mikrosomale Enzyme beeinflusst, die in Steroiden eine Hydroxygruppe an 11-Position zu einer Ketogruppe dehydrieren (Stewart und Krozowski, 1999). Bisher bekannt sind zwei Isoformen der 11 $\beta$ HSD. 11 $\beta$ HSD Typ 1 ist eine Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP<sup>+</sup>) (oxidierte Form) / Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat reduzierte (NADPH) abhängige Oxidoreduktase, 11 $\beta$ HSD Typ 2 eine unidirektionale Oxidase. Bei Nagetieren katalysiert die 11 $\beta$ HSD Typ 1 den Umbau zwischen 11-Dehydrocorticosteron zu Corticosteron. Die 11 $\beta$ HSD Typ 1 ist ein Enzym mit niedriger Affinität und hoher Kapazität mit einer Michaelis-Menten-Konstante (K<sub>m</sub>) von 2  $\mu$ M (Lakshmi und Monder, 1988). Die Katalyserichtung ist unter anderem abhängig vom Zelltyp und dem intrazellulären Milieu (Monder, 1991; Ge und Hardy, 2000). Sie wird bestimmt durch das Redoxpotential, das wiederum durch das Verhältnis von NADP<sup>+</sup> zu NADPH Koenzym festgelegt ist. Dieses Verhältnis wird durch die Aktivität der Hexose-6-Phosphat-Dehydrogenase (H6PDH) reguliert. Sie bildet innerhalb des endoplasmatischen Retikulums NADPH aus oxidiertem NADP (NADP<sup>+</sup>) und steigert so das intrazelluläre Level des Kofaktors (Gomez-Sanchez et al., 2007). Dies begünstigt die in verschiedenen Geweben nachgewiesene Reduktaseaktivität der 11 $\beta$ HSD Typ 1 (Atanasow et al., 2004). In Glucocorticoid Zielgeweben wie der Leber verhält sich die 11 $\beta$ HSD Typ 1 vornehmlich als Reduktase, die lokal aktive Glucocortikoide aus inaktiven 11-Dehydrosteroiden regeneriert (Holmes et al., 2001).

Bei Mäusen mit einer Null-Mutation für H6PDH fungiert die 11 $\beta$ HSD Typ 1 in der Leber als Oxidase (Lavery et al., 2008). 7  $\alpha$ -Hydroxytestosteron, ein Reaktionsprodukt, dass durch Cytochrom P450 2A1 Enzym aus Testosteron gebildet wird, beeinflusst in intakten adulten Leydig-Zellen von Ratten die Katalyserichtung der 11 $\beta$ HSD Typ 1 durch direkte Inhibition der Oxidaseaktivität und indirekte Stimulation der Reduktase durch Steigerung des intrazellulären NADPH Level (Hu et al., 2010). Obwohl die von der 11 $\beta$ HSD Typ 1 katalysierte Enzymreaktion in vitro bidirektional ist, läßt die aktuelle Studienlage den Schluß zu, dass das Enzym in vivo hauptsächlich als Reduktase funktioniert und die intrazellulären Glucocorticoidlevel im Sinne eines Feintunings konstant hält. (Maser et al., 2002). Das Enzym wurde zunächst im Lebergewebe nachgewiesen, später immunhistochemisch licht- und elektronenmikroskopisch auch in zahlreichen anderen Geweben wie Gehirn, Herz, Lunge, Magenfundus, Pankreas, Niere, Nebenniere und Hoden. Westernblot Analysen bei den immunhistochemisch 11 $\beta$ HSD Typ 1 positiven Geweben zeigten ein 34 kDa Proteinband mit positiver Korrelation der Bandintensität zur Ausprägung der Intensität der Immunreaktion. Größere Mengen dieser 34 kDa Fraktion wurden auch im Rattenhoden nachgewiesen und bestätigten die Anwesenheit der 11 $\beta$ HSD Typ 1 (Brereton et al., 2001) .

Inzwischen wurde beobachtet, dass in den Leydig-Zellen von Ratten beide bekannten Isoformen der 11 $\beta$ HSD koexprimiert werden. Mittels Real Time PCR konnte nachgewiesen werden, dass die in den Leydig-Zellen von Ratten gefundenen Level von 11 $\beta$ HSD Typ 1 und 11 $\beta$ HSD Typ 2 sechsfach gegenüber dem im Gesamthoden gefundenen Level erhöht waren. Das Expressionsniveau der 11 $\beta$ HSD Typ 2 war

jedoch, verglichen mit dem der 11 $\beta$ HSD Typ 1, etwa 1000fach niedriger. Die selektive Hemmung beider Enzyme verminderte signifikant die Testosteronproduktion. Beide Enzyme scheinen in Kombination eine wichtige physiologische parakrine Rolle im Corticosteronmetabolismus im Bereich der physiologischen und stressgesteigerten Glucocortikoidkonzentrationen zu haben (Ge et al., 2005).

Erhöhte Glucocortikoidspiegel sind bei allen bisher untersuchten Spezies mit einer verminderten Testosteronbiosynthese der Leydig-Zellen assoziiert. Glucocortikoidrezeptoren (GR) sind im Hoden primär in den Leydig-Zellen lokalisiert (Stalker et al., 1989). Dass die Hemmung der Steroidsynthese direkt durch die GR beeinflusst wird, konnte durch Einsatz eines Glucocortikoidrezeptorantagonisten, RU486, nachgewiesen werden. Dieser hob den oben erwähnten Effekt in isolierten Leydig-Zellen auf. Das Ausmaß, in dem Glucocortikoide die Leydig-Zellfunktion inhibieren, wird durch die Anzahl der GR innerhalb der Zelle, die intrazelluläre Glucocortikoidkonzentration sowie die Aktivität der 11 $\beta$ HSD Enzyme bestimmt. Die 11-dehydro Metaboliten binden nicht an den GR (Hardy und Ganjam, 1997).

Der negative Effekt von psychosozialem Stress auf die Serumcorticosteronspiegel und die Testosteronsynthese, sowie die 11 $\beta$ HSD Aktivität konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Monder et al., 1994; Bernton et al., 1995; Blanchard et al., 1995; Hardy et al., 2002). Die stressinduzierte Erhöhung der Glucocortikoidlevel führt zu einer raschen Verminderung der Testosteronproduktion durch die Leydig-Zellen in den Hoden. Hu et al. (2008) berichten über eine Kopplung zwischen 11 $\beta$ HSD Typ 1 und 17 $\beta$ HSD Typ 3 zur schnellen Anpassung der intrazellulären Glucocortikoidspiegel

zur Aufrechterhaltung der Testosteronbiosynthese. Physiologische Konzentrationen von Androstendion dienen der  $17\beta$ HSD Typ 3 unter Verwendung von NADPH als Substrat zur Testosteronsynthese. Hierbei wird gleichzeitig  $\text{NADP}^+$  generiert, welches die  $11\beta$ HSD Typ 1 in Richtung Oxidase steuert. Gleichzeitig erzeugt die  $11\beta$ HSD Typ 1 wieder NADPH, welches die  $17\beta$ HSD Typ 3 zur Testosteronsynthese stimuliert.

## **IV.2 $11\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 im Säugetierhoden**

Die  $11\beta$ HSD Typ 1 wurde immunhistochemisch bisher mit wenigen Ausnahmen vornehmlich im Rattenhoden nachgewiesen. Hier nimmt sie in den Leydig-Zellen eine Sonderstellung unter den verschiedenen Hydroxysteroid-Dehydrogenasen ein, da sie histochemisch ab dem 31. PND zunächst nur in einigen, später homogen in allen adulten Leydig-Zellen nachweisbar ist und in den fetalen Leydig-Zellen überhaupt keine Reaktion zeigt (Schäfers et al., 2001). Ihr Auftreten korreliert mit dem postnatalen Anstieg der Zahl der Leydig-Zellen, der Gesamtoberfläche der intrazellulären Membranen sowie dem Gehalt und der Sekretion von Testosteron in den Leydig-Zellen neben dem ersten Auftreten von elongierten Spermatozoen in den Hodenkanälchen (Phillips et al., 1989; Neumann et al., 1993). Die  $11\beta$ HSD Typ 1 wird daher als Markerenzym für die funktionelle Reife der adulten Leydig-Zellen bei Ratten angesehen (Haider, 2004).

Im Hoden von Mäusen wurden bereits 1966 niedrige Aktivitätslevel des Enzyms nachgewiesen, wogegen bei der Ratte die Leydig-Zellen die höchsten  $11\beta$ HSD Level aller untersuchten Gewebe aufwiesen (Koerner, 1966; Hardy und Ganjam, 1997). Zuletzt wurde nachgewiesen, dass  $11\beta$ HSD Typ1 und  $11\beta$ HSD Typ 2 mRNA und Protein im Eberhoden exprimiert werden. In Homogenaten von Hoden, Caput



epididymidis und bulbourethralen Drüsen konnte hier eine hohe 11 $\beta$ -Dehydrogenase Aktivität nachgewiesen werden. Weiterhin wurde 11 $\beta$ HSD Typ 1 und Typ 2 Protein in Paraffin- Schnitten dieser Strukturen immunhistochemisch im interstitiellen Gewebe mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Autoren fanden jedoch deutliche Unterschiede in der Kinetik der Cortisoloxidation im Schweinehoden, verglichen mit geklonten 11 $\beta$ HSD Enzymen bei Ratten und Menschen und schlußfolgerten, dass die 11 $\beta$ HSD Enzyme beim Schwein entweder speziesspezifische kinetische Eigenschaften besitzen oder dass die Enzymaffinitäten im Reproduktionstrakt der Eber lokal beeinflusst werden (Sharp et al., 2007).

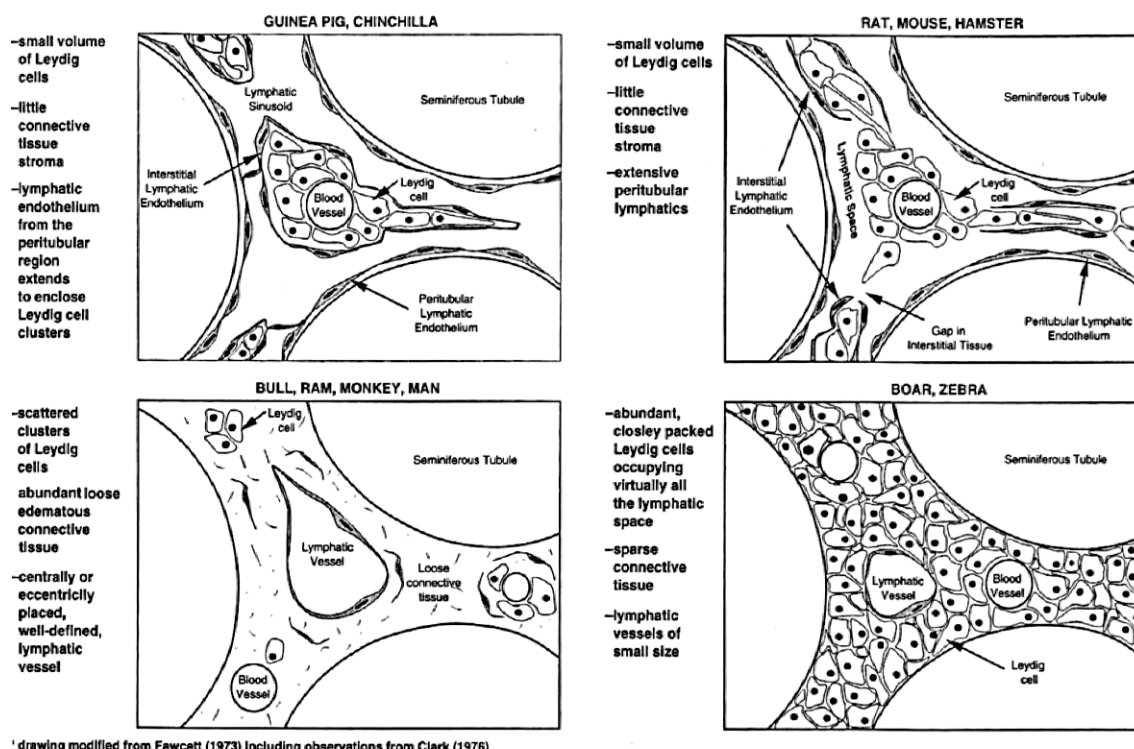


Abbildung 26: Organisation und Häufigkeit der Leydig-Zellen bei verschiedenen Tierarten im Verhältnis zu Blutgefäßen, Lymphgefäßen und Hodenkanälchen. Entnommen aus Russell (1996).

Russell (1996) veröffentlichte eine umfassende Übersichtsarbeit über strukturelle und ultrastrukturelle Aspekte der Leydig-Zellen bei verschiedenen Säugetierarten. Die Studien brachten unterschiedliche Organisationsmuster der interstitiellen Strukturen sowie variierende Häufigkeiten der Leydig-Zellen bei den verschiedenen Arten hervor (Abb.26).

Im rasterelektronenmikroskopischen Längsschnitt erscheinen die interstitiellen Leydig-Zellen bei der Ratte in Form von kontinuierlichen Strängen organisiert bzw. als Zellmantel, der alle Hodenkanälchen umschließt und primär dem Verlauf der Blutgefäße folgt. Hier ist das hauptsächlich aus Leydig-Zellen bestehende interstitielle Gewebe am dicksten, wo sich drei Hodenkanälchen treffen und verdünnt sich dort, wo nur zwei Kanälchen zusammenliegen (Clark, 1976). Die adulten Leydigzellen von Ratten, Mäusen und Hamstern sind ähnlich organisiert, ein großer Teil der Fläche wird von peritubulären lymphatischen Sinusoiden mit wenig Bindegewebsstroma und einem geringen Leydigzellvolumen ausgefüllt (Fawcett et al., 1973).

In der vorliegenden Untersuchung findet sich eine starke zytoplasmatische Immunreaktion für 11 $\beta$ HSD Typ 1 in den in o.g. Mustern, meist um ein zentral gelegenes Blutgefäß angeordneten Leydig-Zellen von adulten Wistarratten. Beim adulten Goldhamster ist die 11 $\beta$ HSD Typ 1 Immunreaktion in den repräsentativen interstitiellen Feldern ebenfalls ausgeprägt. Hier sind die Leydig-Zellen einschichtig um ein zentrales Blutgefäß in den zwischen drei Hodenkanälchen liegenden trigonalen Feldern organisiert. Auch bei den vier verschiedenen adulten Mausstämmen findet sich ein ähnliches topo-

graphisches Muster der Leydig-Zellen mit mäßig starker Immunreaktion für 11 $\beta$ HSD Typ 1 im Zytoplasma.

Bei den adulten Meerschweinchen liegen die 11 $\beta$ HSD Typ 1 positiven Leydig-Zellen mehrschichtig, im Sinne von Zellclustern, zentral in den intertubulären Räumen und sind umgeben von lymphatischen Sinusoiden. Bei den adulten Zwergkaninchen liegen die Leydigzellen ebenfalls mehrlagig in den inter- und peritubulären Räumen. Hier erscheint das Größenverhältnis, Hodenkanälchen zu interstitiellem Raum, zu Gunsten des Interstitiums verschoben.

### **IV.3 Phylogenetische Überlegungen**

Über das gesamte 19. Jahrhundert bis in die 50er Jahre des 20. Jahrhunderts blieb die Leydig-Zelle als Hauptquelle des männlichen Geschlechtshormons höchst umstritten und die Tubuli seminiferi mit ihren Sertoli-Zellen wurden als Hauptort der Produktion von testikulärem Hormon ausgemacht (Christensen, 2007). 1935 konnte erstmalig männliches Hormon aus Stierhodenextrakt isoliert werden und wurde folglich Testosteron genannt (David et al., 1935). Ab 1960 waren auch neue Methoden zur quantitativen chemischen Analyse von Steroiden verfügbar, hierzu gehören die verschiedenen Chromatographie-Verfahren (Papier, Dünnschicht, Gas) sowie der Gebrauch von mit Radioisotopen markierten Steroiden. Mit Hilfe dieser Methodik war es nun möglich nachzuweisen, welche Steroidhormone im menschlichen Hoden, Plasma und Urin vorkamen (Christensen, 2007). Seit den späten 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde auch die Ultrastruktur von Sertoli-, Leydig-, und Keimzellen unter Verwendung des neu entwickelten Elektronenmikroskopes zu einem großen Forschungsgebiet. Die Ley-

dig-Zellen von zwei verschiedenen Knochenfischen (*Lebistes, Oligocottus*) sowie eines Frosches (*Rana*) waren die ersten, die auf ultrastruktureller Ebene analysiert wurden (Callard, 1996).

Der erste direkte Beweis, dass männliches Sexualhormon primär in den Leydig-Zellen produziert wird, wurde von Wattenberg erst 1958 publiziert. Er verwendete eine histochemische Methode an Gefrierschnitten von Kaninchenhoden und konnte damit das Enzym 3 $\beta$ HSD, ein Schlüsselenzym in der Testosteronbiosynthese, in den Leydig-Zellen nachweisen (Wattenberg, 1958). Der erste biochemische Beweis, dass das interstitielle Hodengewebe die primäre Androgenquelle ist, wurde von Christensen und Mason (1965) veröffentlicht. Sie trennten manuell die Tubuli seminiferi und das interstitielle Gewebe aus einem Stück Rattenhoden mit Hilfe einer Juwelierpinzette und inkubierten die beiden Komponenten separat mit radioaktiv markiertem Progesteron. Das Ergebnis zeigte, dass die Hauptenzymaktivität für die Umwandlung von Progesteron zu Testosteron im interstitiellen Gewebe zu finden war. Seither wurde in zahlreichen Studien bei anderen Wirbeltieren, einschließlich Nichtversuchstieren nachgewiesen, dass die Leydig-Zellen die Hauptquelle von Androgen in den Hoden der meisten Vertebraten sind (Pudney, 1996).

Die Erkenntnis, dass die Leydig-Zellen durchweg bei den Vertebraten die überwiegende Quelle von testikulärem Androgen sind, schließt nicht die Möglichkeit aus, dass auch die Sertoli-Zellen Hormon bilden, entweder zusätzlich zu den Leydig-Zellen oder an ihrer Stelle. Phylogenetisch treten ausgereifte Leydig-Zellen mit zahlreichen steroidbildenden Zellorganellen erstmalig auf der Ebene der Knochenfische (Teleostei) auf. Auch bei Fröschen und Kröten finden sich ausdifferenzierte Leydig-Zellen in den tubulären Interstitien (Callard, 1996). Beim Dornhai (*Squalus acanthias*) (Elasmobran-

chii) sind die Leydig-Zellen nur schlecht entwickelt, wogegen die Sertoli-Zellen während der Spermatogenese häufig und prominent sind. Die Sertoli-Zellen zeigen eine positive Reaktion für  $3\beta$ HSD und elektronenmikroskopisch findet sich im Zytoplasma ausgeprägtes glattes endoplasmatisches Retikulum (Simpson und Wardle, 1967; Pudney und Callard, 1984). Generalisierend kann aufgrund der zahlreichen vergleichenden Studien gesagt werden, dass die Leydig-Zellen im Verlauf der Evolution die Sertoli-Zellen als steroidbildendes Element des Hodens ersetzt haben. Der evolutionäre Ursprung der Leydig-Zellen und die Tendenz zu größerer struktureller und funktioneller Komplexität geht parallel mit der Evolution der Tubuli seminiferi und der gleichzeitigen Bildung eines zweiten testikulären Raums, dem Interstitium. Die Hoden aller Vertebraten besitzen, unabhängig vom Vorhandensein oder dem Differenzierungsgrad von Leydig-Zellen, steroidbildende und steroidsekretorische Eigenschaften. Bei der vergleichenden Untersuchung der Hoden der verschiedenen Wirbeltierklassen fällt eine Vielfalt in der jeweiligen Wichtigkeit von verschiedenen Synthesewegen, Endprodukten und Metaboliten auf (Callard, 1996). Die meisten Studien wurden in der Vergangenheit an ganzen Hoden durchgeführt und nur in wenigen konnte der Ursprung eines bestimmten Steroids den Leydig-Zellen oder den Sertoli-Zellen direkt zugeschrieben werden (Sharp et al., 2007). Sogar bei der Ratte, bei der die Sertoli-Zellen als für die Steroidbildung unwesentlich betrachtet werden, blieben gewisse funktionell relevante Transformationen erhalten. Auch bei der Untersuchung von anderen Nagetieren, wie zum Beispiel dem Eichhörnchen, konnte ein substantiell größerer Anteil steroidbildender Aktivität den Tubuli seminiferi zugeordnet werden (Dorrington et al., 1975, 1978; Pudney et al., 1985).

Obwohl viele Steroidprodukte des Hodens vom Fisch bis zu den Säugetieren gleich sind, z.B. Testosteron, 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron, Östradiol, Progesteron, gibt es eine erhebliche Vielfalt in der relativen Bedeutung der bevorzugten Pfade der Biosynthese sowie der sezernierten Endprodukte, Metaboliten und Verbindungen.

11-Ketotestosteron und 11 $\beta$ -Hydroxytestosteron sind nach zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Experimenten die wesentlichen Androgene bei den Knochenfischen. In den Hoden von Knochenfischen findet sich charakteristischerweise hohe 11 $\beta$ -Hydroxylase und 11-Oxidoreduktase Aktivität. Die 11 $\beta$ HSD wurde bisher aus dem Hoden des Nil Tilapia (*Oreochromis niloticus*), einem Buntbarsch, sowie des japanischen Aals (*Anguilla japonica*) geklont. Bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) konnte eine starke Expression des Enzyms in den Leydig-Zellen lokalisiert werden. Diese Tatsache stützt die Annahme, dass die Anwesenheit der 11 $\beta$ HSD ein durch die Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere bis zu den Säugetieren erhaltenes Charakteristikum in der Testosteronbiosynthese darstellt (Engel und Callard, 2007).

In der vorliegenden Untersuchung konnte die 11 $\beta$ HSD Typ 1 immunhistochemisch bei allen untersuchten Kleinsäugetieren mit Ausnahme der Hauskatze im Zytoplasma der Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Die Intensität der Immunreaktion war bei der Wistarratte, dem Zwergkaninchen, Goldhamster und Meerschweinchen am stärksten ausgeprägt. Bei den vier verschiedenen Mausstämmen konnte nur eine schwache bis mäßige Immunreaktion nachgewiesen werden. Dies Ergebnis stimmt mit früheren Arbeiten überein, die niedrige Aktivitätslevel der 11 $\beta$ HSD in den Leydig-Zellen von Mäusen nachgewiesen haben, wogegen in den Leydig-Zellen von Ratten die höchste 11 $\beta$ HSD Aktivität unter allen Geweben gefunden wurde (Koerner, 1966; Monder et al., 1994). Ob die unterschiedliche Ausprägung der Reaktion zwischen den verschiedenen

Kleinsäugetierspezies Unterschiede in der Glucokortikoidsekretion der Nebennieren, Serumkonzentrationen von bindenden Proteinen oder Unterschiede in der Anzahl der GR in den Leydig-Zellen widerspiegelt, ist unbekannt. Hier ergeben sich weitere Fragestellungen, die die Bioaktivität des Enzyms bei den verschiedenen Arten betreffen und die mit der hier angewandten Methode nicht eindeutig beantwortet werden können.

Bei der homogenen starken Immunreaktion im Zytoplasma der Sertoli-Zellen bei allen vier untersuchten Katzenhoden handelt es sich am wahrscheinlichsten um eine Kreuzreaktion des verwandten polyklonalen Primärantikörpers. Nach Angaben des Herstellers (Fa. Binding Site) wurde eine Kreuzreaktivität zu anderen Spezies nicht getestet, wird aber für möglich gehalten. Hauskatzen erreichen die Geschlechtsreife im Schnitt im sechsten bis achten Lebensmonat, ab dem fünften Lebensmonat sind histologisch adulte Leydig-Zellen mit den typischen Charakteristika nachweisbar (Sanchez et al, 1993). Zusätzlich bestehen saisonale Unterschiede bzgl. der Anzahl der Leydig-Zellen und der Sertoli-Zellen im Katerhoden in Abhängigkeit von der natürlichen Photoperiode (Stornelli et al., 2009). Die hier untersuchten Katzenhoden stammen von zwischen sechs und 15 Monaten alten Katern und wurden im Rahmen von geplanten Kastrationen bei gesunden Tieren entnommen. Leydig-Zellen waren lichtmikroskopisch in den intertubulären Interstitien eindeutig nachweisbar. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass es sich bei der homogenen zytoplasmatischen Farbreaktion in den Sertoli-Zellen um eine spezifische Immunreaktion auf die 11 $\beta$ HSD Typ 1 handelt. Hier ist ein methodischer Nachteil der Anwendung des verwendeten polyklonalen Antikörpers mit breiterem Reaktionsspektrum, welches zu Kreuzreaktionen führen kann, anzunehmen.

## V. Literaturverzeichnis

**Ariyaratne HBS, Chamindrani Mendis-Handagama SML.** Changes in the Testis Interstitium of Sprague Dawley Rats from Birth to Sexual Maturity. *Biol Reprod* 2000; 62: 680-690.

**Atanasow AG, Nashev LG, Schweizer RA, Frick C, Odermatt A.** Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of type I 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in primary rat Leydig cells and transfected cell lines. *FEBS Lett* 2004; 571: 129-133.

**Bernton E, Hoover D, Galloway R, Popo K.** Adaptation to chronic stress in military trainees. Adrenal androgens, testosterone, glucocorticoids, IGF-1, and immune function. *Ann NY Acad Sci* 1995; 774: 217-231.

**Bicikova M, Hill M, Hampl R, Starka L.** Inhibition of Rat Renal and Testicular 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase by Some Antihypertensive Drugs, Diuretics, and Epitestosterone. *Horm Metab Res* 1997; 29: 465-468.

**Blanchard DC, Spencer RL, Weiss SM, Blanchard RJ, McEwen B, Sakai RR.** Visible burrow system as a model of chronic social stress: behavioral and neuroendocrine correlates. *Psychoneuroendocrinology* 1995; 20: 117-134.

**Bouin P.** Etudes sur l'évolution normale et l'involution du tube séminifère. 1. Modifications régressives du processus spermatogénétiques provoquées expérimentalement. *Arch d'Anat Microsc* 1897; 1: 225-262.



**Brereton PS, Driel R, Suhaimi FBH, Koyama K, Dilley R, Krozowski Z.** Light and Electron Microscopy Localization of the  $11\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I Enzyme in the Rat. *Endocrinology* 2001; 142: 1644-1651.

**Callard GV.** Endocrinology of Leydig Cells in Nonmammalian Vertebrates. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD. *The Leydig Cell*. Vienna, IL: Cache river press ; 1996:307-332.

**Christensen AK.** A history of Leydig Cell Research. In: Payne AH, Hardy MP. *The Leydig Cell in Health and Disease*. Totowa, NJ: Humana press; 2007: 3-30.

**Christensen AK , Mason NR.** Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testes to synthesize androgens from progesterone- $4\text{-}^{14}\text{C}$  in vitro. *Endocrinology* 1965; 76: 646-656.

**Clark RV.** Three-dimensional organization of testicular interstitial tissue and lymphatic space in the rat. *Anat Rec* 1976; 184: 203-226.

**David K, Dingemans E, Freud J, Laqueur E.** Ueber krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin. *Hoppe- Seyler's Z Physiol Chem* 1935; 233: 281-282.

**Dorrington JH , Armstrong DT.** Follicle stimulating hormone stimulates estradiol- $17\beta$  synthesis in cultured Sertoli cells. *Proc.Natl.Acad.Sci* 1975;72: 2677-2681.

**Dorrington JH, Fritz IB, Armstrong DT.** Control of testicular estrogen synthesis. *Biol.Reprod* 1978; 18: 55-64.

- Dupont E, Labrie F, Luu-The V, Pelletier G.** Ontogeny of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase delta5-delta4 isomerase (3 $\beta$ -HSDH) in rat testis as studied immunocytochemistry. *Anat Embryol* 1993; 187: 583-589.
- Engel KB, Callard GV.** Endocrinology of Leydig Cells in Nonmammalian Vertebrates. In: Payne AH, Hardy MP. *The leydig cell in health and disease*. Totowa, NJ: Humana Press ; 2007: 207-224.
- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN.** Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* 1973; 9: 500-532.
- Ferguson SE, Pallikaros Z, Michael AE, Cooke BA.** The effects of different culture media, glucose, pyridine nucleotides and adenosine on the activity of 11 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 158: 37-44.
- Gao HB, Tong MH, Hu YQ, Guo QS, Ge RS, Hardy MP.** Glucocorticoid Induces Apoptosis in Rat Leydig Cells. *Endocrinology* 2002; 143: 130-138.
- Ge RS, Dong Q, Niu EM.** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 in rat Leydig cells: Its role in Blunting glucocorticoid action at physiological levels of substrate. *Endocrinology* 2005; 146: 2657-2664.
- Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP.** Stimulation of testosterone production in rat Leydig cells by aldosterone ist mineralocorticoid receptor mediated. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 243: 35-42.

**GE RS, Hardy MP.** Initial Predominance of the Oxidative Activity of Type I 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Primary Rat Leydig Cells and Transfected Cell Lines. *J Androl* 2000; 21: 303-310.

**GE RS, Hardy MP.** Protein Kinase C Increases 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Oxidation and Inhibits Reduction in Rat Leydig Cells. *J Androl* 2002; 23: 135-143.

**Gomez-Sanchez EP, Romero DG, Rodriguez de AF, Warden MP, Krozowski Z, Gomez-Sanchez CE.** Hexose-6-Phosphate Dehydrogenase and 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-1 Tissue Distribution in the Rat. *Endocrinology* 2008; 149:525-533.

**Haider SG.** Cell Biology of Leydig Cells in the Testis. *Int Rev Cytol* 2004; 233: 181-241.

**Haider SG, Passia D, Overmeyer G.** Studies on fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenase activity. *Acta Histochem* 1986; 32: 197-202.

**Hardy MP, Kelce WR, Klinefelter GR, Ewing LL.** Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: A role for androgen. *Endocrinology* 1990; 127: 488-490.

**Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL.** Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* 1989; 124: 762-770.

**Hardy MP Ganjam VK.** Stress, 11 $\beta$ -HSD, and Leydig Cell Function Minireview. *J Androl* 1997; 18: 475-479.

**Hardy MP, Sottas CM, Ge RS, McKittrick R, Tamashiro KL, McEwen BS, Haider SG, Markham CM, Blanchard RJ, Blanchard DC, Sakai RR.** Trends of Reproductive Hormones in Male Rats During Psychosocial Stress: Role of Glucocorticoid metabolism in Behavioral Dominance. *Biol Reprod* 2002; 67: 1750-1755.

**Holmes MC, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR.** Phenotypic analysis of mice bearing targeted deletions of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases 1 and 2 genes. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 171: 15-20.

**Hu GX, Lian QQ, Chen BB, Prasad PV, Kumar N, Zheng ZQ, Ge RS.** 7-alpha-Hydroxytestosterone Affects 11beta- Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 Direction in Rat Leydig Cells. *Endocrinology* 2010; 151: 748-754.

**Hu GX, Lian QQ, Lin H, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP, Ge RS.** Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the leydig cell. *Steroids* 2008; 73: 1018-1024.

**Koerner DR.** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase of lung and testis. *Endocrinology* 1966; 79: 935-938.

**Lakshmi V, Monder C.** Purification and characterization of the corticosteroid 11 $\beta$ -dehydrogenase component of the rat liver 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenase complex. *Endocrinology* 1988; 123: 2390-2398.

**Latif SA, Pardo HA, Hardy MP, Morris DJ** Endogenous selective inhibitors of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms 1 and 2 of adrenal origin. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 243: 43-50.

**Lavery GG, Walker EA, Turan N, Rogoff D, Ryder JW, Shelton JM, Richardson JA, Falciani F, White PC, Stewart PM, Parker KL, McMillan DR.** Deletion of hexose-6-phosphate dehydrogenase activates the unfolded protein response pathway and induces skeletal myopathy. *J Biol Chem* 2008; 283: 8453-8461.

**Leckie CM, Welberg LAM, Seckl JR.** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase is a predominant reductase in intact rat Leydig cells. *J Endocrinol* 1998;159: 233-238.

**Leydig F.** Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Anldrüsen der Säugethiere. *Z Wiss Zool* 1850; 2: 1-57.

**Lording DW, de Kretser DM.** Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of rat testis during fetal and postnatal development. *J Reprod Fertil* 1972; 29: 261-269.

**Maser E, Völker B, Friebertshäuser J.** 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 from Human Liver: Dimerization and Enzyme Cooperativity support its postulated Role as Glucocorticoid Reductase. *Biochemistry* 2002; 41: 2459-2465.

**Monder C.** Corticosteroids, receptors, and the organ-specific functions of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *FASEB J* 1991; 5: 3047-3054.

**Monder C, Mirhoff Y, Marandici A, Hardy MP.** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase alleviates glucocorticoid-mediated inhibition of steroidogenesis in rat Leydig cells. *Endocrinology* 1994; 134:1199-1204.

**Monder C, Sakai RR, Miroff Y, Blanchard DC, Blanchard RJ.** Reciprocal Changes in Plasma Corticosterone and Testosterone in Stressed Male Rats Maintained in a Visible Burrow System: Evidence for a Mediating Role of Testicular 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Endocrinology* 1994; 134:1193-1198.

**Monder C, Lakshmi V, Miroff Y.** Kinetic studies on rat liver 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1115:23-29.

**Morris DJ, Brem AS, GE R, Jellinck PH, Sakai RR, Hardy MP.** The functional roles of 11 beta-HSD1: vascular tissue, testis and brain. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 203:1-12.

**Neumann A, Haider SG, Hilscher B.** Temporal coincidence of the appearance of elongated spermatids and of histochemical reaction of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Andrologia* 1993; 25:263-269.

**Noll S, Schaub-Kuhnen S.** Praxis der Immunhistochemie. Hrsg: Höfler H, Müller KM. München: Urban & Fischer; 2000.

**Nwe KHH, Hamid A, Morat PB, Khalid BAK.** Differential regulation of the oxidative 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in testis and liver. *Steroids* 2000; 65:40-45.

**Nwe KHH, Morat PB, Hamid A, Fadzilah S, Khalid BAK.** Novel effects of deoxycorticosterone on testicular 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity and plasma testosterone levels in normal and androgenectomized rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107:288-294.

**Nwe KHH, Norhazlina AW, Hamid A, Morat PB, Khalid BAK.** In vivo effects of stress, ACTH and corticosterone on testicular 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase oxidative activity in rats and the possible mechanism of actions. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108:1-9.

**Parthasarathy C, Yuvaraj S, Ilangovan R, Janani P, Kanagaraj P, Balaganesh M, Natarajan B, Sittadjody S, Balasubramanian K.** Differential response of Leydig cells in expressing 11beta-HSD type I and cytochrome P450 aromatase in male rats subjected to corticosterone deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 311: 18-23.

**Payne AH.** Steroidogenic Enzymes in Leydig Cells. In: Payne AH, Hardy MP. *The Leydig Cell in Health and Disease*. Totowa, NJ: Humana press; 2007: 157-172.

**Phillips DM, Lakshmi V, Monder C.** Corticosteroid 11 $\beta$ -dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology* 1989; 125: 209-216.

**Pudney J, Canick JA, Clifford NM, Knapp JB, Callard GV.** Location of enzymes of androgen and estrogen biosynthesis in the testis of the ground squirrel, *Citellus lateralis*. *Biol Reprod* 1985; 33: 971-980.

**Pudney J, Callard GV.** Development of agranular reticulum in Sertoli cells of the testis in the dogfish *Squalus acanthias* during spermatogenesis. *Anat Rec* 1984; 209: 311-321.

**Pudney J.** Comparative cytology of the Leydig cell. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD. *The Leydig Cell*. Vienna, IL: Cache river press; 1996: 97-142.

**Russell LD.** Mammalian Leydig cell structure. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD. *The Leydig Cell*. Vienna, IL: Cache river press; 1996: 43-96.

**Sanchez B, Pizarro M, Garcia P, Flores JM.** Histological study of Leydig cells in the cat from birth to sexual maturity. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 47: 349-353.

**Sankar BR, Maran RRM, Sudha S, Govindarajulu P, Balasubramanian K.** Chronic Corticosterone Treatment Impairs Leydig Cell  $11\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity and LH-Stimulated Testosterone Production. *Horm Metab Res* 2000; 32:142-146.

**Schäfers BA, Schlutius BG, Haider SG.** Ontogenesis of oxidative reaction of  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells, a histochemical study. *Histochemical J* 2001; 33: 585-595.

**Shan LX, Hardy MP.** Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. *Endocrinology* 1992; 131: 1107-1114.

**Sharp V, Thurston LM, Fowkes RC, Michael AE.**  $11\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the testis and male reproductive tract of the boar (*Sus scrofa domestica*) indicate local roles for glucocorticoids in male reproductive physiology. *Reproduction* 2007; 134: 473-482.

**Simpson TH, Wardle CS.** A seasonal cycle in the testis of the spurdog *Squalus acanthias* and the sites of  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Marine Biol Assoc UK* 1967; 47:699-708.

**Song W, Chen J, Dean WL, Redinger RN, Prough RA.** Purification and Characterization of Hamster Liver Microsomal  $7\alpha$ -Hydroxycholesterol Dehydrogenase. *J Biol Chem* 1998; 26: 16223-16228.



**Stahl K, Lichtenstein I, Siebe H, Hierholzer K.** Interaction of 11 $\beta$ -hydroxysteroid-oxido reductase in different organs of various mammalian species. *Kidney Int* 1996; 49: 156-159.

**Stalker A, Hermo L, Antakly T.** Covalent affinity labeling, radioautography, and immunocytochemistry localize the glucocorticoid receptor in rat testicular cells. *Am J Anat* 1989; 186: 369-377.

**Stewart PM and Krozowski ZS.** 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm* 1999; 57: 249-324.

**Storjohann HE.** Immunhistologie in der täglichen Praxis. *MTA* 1998; 5: 312-315.

**Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, Nunez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM, de la Sota RL.** Seasonal changes in testicular cell morphology in domestic male cats (*Felis catus*). *Reprod Domest Anim* 2009; 44 Suppl 2: 287-290.

**Wagner CR, Lambert T.** Characterization of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in testicular tissue of control and GnRH-immunized boars as a possible regulator of spermatogenesis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005; 113: 262-267.

**Wattenberg LW.** Microscopic histochemical demonstration of steroid 3 $\beta$ -ol dehydrogenase in tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1958; 6: 225-232.

**Xiao-feng Z, Nai-qiang Q, Jing Z, Zi L, Yang Z.** Di (n-butyl) phtalate inhibits testosterone synthesis through a glucocorticoid-mediated pathway in rats. *Int J Toxicol* 2009; 5: 448-456.

## VI. Zusammenfassung

**Name des Doktoranden: Christian Heuschkel**

**Titel: Vergleichende immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisierung der 11  $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 im Hodengewebe von Kleinsäugetern**

**Ziel** der vorliegenden Arbeit war, unter Verwendung einer immunhistochemischen Methode das Vorkommen der 11  $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 $\beta$ HSD) Typ 1 im Hodengewebe verschiedener Kleinsäugetiere zu untersuchen, das Verteilungsmuster sowie die Ausprägung der Immunreaktion zu analysieren und so Daten über die phylogenetische Entwicklung des Enzyms in der Gruppe der Säugetiere zu sammeln.

**Material und Methoden:** Es wurde jeweils ein Hoden pro Tier (insgesamt vier Tiere je Tiergruppe) von folgenden adulten Säugetieren untersucht: Wistarratten, vier verschiedene Mausstämme (NMRI, C57/Black 6, FVB, BALB C), Goldhamster, Zwergkaninchen, Meerschweinchen und Hauskatze. Die Hoden wurden nach Entnahme in Bouin'scher Lösung fixiert, nach Einbettung in Paraffin wurden 5 $\mu$ m dicke Serienschnitte angefertigt. Der immunhistochemische Enzymnachweis wurde nach der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode mit einem polyklonalen Antikörper durchgeführt, die Befunderhebung fand mit Hilfe eines Lichtmikroskopes semiquantitativ nach Ausprägung und Lokalisation der Immunreaktion statt. Die Befunddokumentation erfolgte fotografisch.

**Befunderhebung:** Die 11 $\beta$ HSD Typ 1 konnte immunhistochemisch bei allen untersuchten Kleinsäugetieren mit Ausnahme der Hauskatze im Zytoplasma der Leydig-Zellen nachgewiesen werden. Die Intensität der Immunreaktion zeigte sich bei Wistaratte, Goldhamster, Meerschweinchen und Zwergkaninchen am stärksten ausgeprägt. Bei den vier Mausstämmen konnte nur eine schwache bis mäßig starke Immunreaktion nachgewiesen werden. Die Immunreaktion war in den Leydig-Zellen aller untersuchten Spezien mit Ausnahme des Katerhodens homogen verteilt. Im Katerhoden war diese Reaktion ausschließlich im Zytoplasma der Sertoli-Zellen feststellbar.

**Schlußfolgerung:** Der positive immunhistochemische Nachweis der 11 $\beta$ HSD Typ 1 im Zytoplasma der Leydig-Zellen aller untersuchten Kleinsäugeter stützt die These, dass die 11 $\beta$ HSD Typ 1 ein durch die Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere erhaltenes wichtiges Schlüsselenzym in der Testosteronbiosynthese des Säugetierhodens darstellt. Bei der homogenen starken Immunreaktion im Zytoplasma der Sertoli-Zellen bei allen untersuchten Katerhodens handelt es sich am wahrscheinlichsten um eine unerwünschte Kreuzreaktion des polyklonalen Primärantikörpers.

## **VII. Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. S.G. Haider für die freundliche Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit sowie die geduldige und fachkundige Betreuung in allen Phasen der Entstehung.

Frau G. Berthold danke ich für die wertvollen technischen Ratschläge zur Herstellung der Präparate und zur Durchführung der immunhistochemischen Versuche sowie die immer angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Frau G. Servos danke ich für die kompetente Unterstützung bei der fotografischen Dokumentation.

Herrn Dr. med. vet. Peter Pantke und seinem Praxisteam danke ich für die Überlassung der Kastrationspräparate.

Meinen Eltern, die mich bei der Erstellung der Arbeit in jeder Hinsicht unterstützt haben, gilt mein besonderer Dank.

## **VIII. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

20.03.2012, Christian Heuschkel

---