

Aus dem Anatomischen Institut II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. Charlotte von Gall

**Immunhistochemische Untersuchungen über den
Hepatocyte Growth Factor (HGF) im Rattenhoden
unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklung
der Leydig-Zellen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Christian Smits

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. Syed G. Haider

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. med. Anja Lorch

Für Annika

Zusammenfassung

Titel

Immunhistochemische Untersuchungen über den Hepatocyte Growth Factor (HGF) im Rattenhoden unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklung der Leydig-Zellen

Ziel: Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mittels histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen das morphologische Korrelat des HGF im *Testis* der Wistarratte zu beschreiben. Die Arbeit soll ebenfalls Schwankungen in der Expression von HGF im Hodengewebe zwischen den fetalen, postnatalen, pubertären und adulten Phasen der Entwicklung sowie eine mögliche zeitliche Korrelation zwischen den Entwicklungen der fetalen bzw. der adulten Leydig-Zelle und der Expression von HGF untersuchen.

Material und Methoden: Ca. 35 männliche und 6 weibliche (trächtige) Wistarratten aus den folgenden ausgewählten Altersstufen: 17. Fetaltag (fd), 18. fd, 1. Postnataltag (pnd), 5. pnd, 10. pnd, 15. pnd, 25. pnd, 35. pnd sowie adulte Tiere (100. pnd) wurden verwendet. Nach der Hodenentnahme wurden ca. 5 µm dünne Paraffinschnitte angefertigt und nach einem bestimmten Schema den Färbemethoden HE, PJS sowie der immunhistochemischen Reaktion mittels Antikörper (HGF α 145) unterzogen.

Befunde: Die Befunde zeigten einen sowohl quantitativen als auch qualitativen Peak der HGF-Immunreaktion im Zytoplasma der fetalen Leydig-Zellen (18. fd) und wiesen einen positiven immunhistochemischen Befund der *Tubuli seminiferi* auf. Dabei zeigte sich in den *Tubuli seminiferi* eine distinkte kappenförmige Immunreaktion im Zytoplasma der T1-Prospermatogonien sowie mit zunehmendem Alter auch in Spermatogonien und Spermatozyten. Die Spermatogenesestadien VII und VIII der adulten Ratte wiesen dabei die stärkste Immunreaktion im Zytoplasma der pachytänen Spermatozyten und runden Spermatiden auf. Eine Immunreaktion in den fetalen Leydig-Zellen (FLZ) war nachweisbar bis zum 25. pnd. Die adulten Leydig-Zellen (ALZ) - am 10. pnd stets ohne eine Immunreaktion - zeigten beginnend vom 15. pnd bis hin zum 100. pnd eine konstante distinkte Immunreaktion im Zytoplasma unter Aussparung des Nukleus, mit einem quantitativen Peak am 35. pnd. Weiter zeigte sich eine stets positive Immunreaktion der *Tunica Media* der arteriellen Gefäße ab dem 5. pnd unter klarer Aussparung der übrigen Gefäßschichten.

Schlussfolgerungen:

1. Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal die Expression von HGF in Leydig-Zellen, angefangen von der fetalen bis zur adulten Entwicklungsstufe. Hier zeigt sich eine klare distinkte Immunreaktion im Zytoplasma unter Aussparung des Nukleus.
2. Die vorliegende Dissertation beschreibt zum ersten Mal eine distinkte Immunreaktion, kappenförmig, perinukleär in den T1-Prospermatogonien. Höchstwahrscheinlich findet diese Immunreaktion in den Mitochondrien statt.
3. Eine Immunreaktion für HGF ist ab dem 18. fd in fetalen Leydig-Zellen nachweisbar. Die Anzahl der HGF-positiven FLZ nimmt nach der Geburt rapide ab und ist bis zum 25. pnd nachweisbar.
4. Die Expression von HGF in Leydig-Zellen begleitet die Differenzierung der ALZ während der puberalen Phase. Die Immunreaktion für HGF in den ALZ ist ab dem 15. pnd nachweisbar. Die Anzahl der immunpositiven ALZ nimmt danach zu. Mit einem leichten Abfall am 25. pnd erreicht die HGF-Expression am 35. pnd einen Peak, wenn die ersten runden Spermatiden gebildet werden. Danach erfolgt eine Abnahme. Ca. 10% der ALZ zeigen keine Immunreaktion für HGF.
5. Die stärkste Immunreaktion von HGF wird in den pachytänen Spermatozyten und in den runden Spermatiden während der Spermatogenese-Stadien VII und VIII beobachtet.

Abkürzungsverzeichnis

| Abb. | Abbildung |
|-----------------------------------|--|
| ALC | adult Leydig cells |
| ALZ | adulte Leydig-Zellen |
| AS | Aminosäure |
| bFGF | Basic Fibroblast Growth Factor |
| C-Met | Tyrosin-Kinase Receptor für Hepatocyte Growth Factor |
| DAB | Diaminobenzidin, 3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dpc | day post conception |
| Fa. | Firma |
| fd | Fetaltag |
| FLC | fetal Leydig cells |
| FLZ | fetale Leydig-Zellen |
| H₂O₂ | Wasserstoffperoxid |
| HAI | Hepatocyte Growth Factor activator inhibitor |
| HCl | Salzsäure |
| HE | Hämalaun-Eosin Färbung |
| HGF | Hepatocyte Growth Factor |
| HGFR | Hepatocyte Growth Factor Receptor |
| Kd | Dissoziationskonstante |
| kDa | kilodalton |
| LH | luteinisierendes Hormon |
| MDCK | Mandin Darby Canine Kidney |
| MIMP | Met-Induced Mitochondrial Protein |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| NaCl | Natriumchlorid |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PI3-Kinase | Phosphoinositid- 3-Kinase |
| PJS | Perjodsäure-Schiff-Reaktion |
| pnd | Postnatahtag |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion |
| SO₂ | Schwefeldioxid |
| Spg. | Spermatogonie |
| T1-Pro-Spg. | primary transitional Prospermatogonia |
| T2-Pro-Spg. | secondary transitional Prospermatogonia |
| TBS | tris buffered saline |
| TRIS | Tris (hydroxymethyl)-aminomethan |
| TVA | Tierversuchsanstalt |
| ü.N. | über Nacht |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Leydig-Zellen im Rattenhoden | 1 |
| 1.2 Vorkommen und Bedeutung vom Hepatocyte Growth Factor (HGF) | 3 |
| 1.3 Fragestellung | 7 |
| | |
| 2. Material und Methodik | 8 |
| 2.1 Versuchstiere | 8 |
| 2.2 Versuchsdurchführung | 8 |
| 2.2.1 Narkose/ Tötung | 8 |
| 2.2.2 Organentnahme | 8 |
| 2.3 Histologische Aufarbeitung der Präparate | 9 |
| 2.3.1 Fixierung | 9 |
| 2.3.2 Entwässerung | 10 |
| 2.3.3 Paraffineinbettung | 10 |
| 2.3.4 Anfertigung von Serienschnitten | 11 |
| 2.3.5 Histochemische Methodik | 12 |
| 2.4 Qualitative und quantitative Auswertung | 16 |
| 2.4.1 Auswertung der Leydig-Zellen | 16 |
| 2.4.2 Qualitative Auswertung | 17 |
| 2.4.3 Quantitative Auswertung | 17 |
| | |
| 3. Ergebnisse | 19 |
| 3.1 Immunreaktion des HGF α am 17. Fetaltag | 19 |
| 3.2 Immunreaktion des HGF α am 18. Fetaltag | 19 |
| 3.2.1 <i>Tubuli seminiferi</i> | 19 |
| 3.2.2 Interstitium | 19 |
| 3.3 Immunreaktion des HGF α am 1. Postnataltag | 20 |
| 3.3.1 <i>Tubuli seminiferi</i> | 20 |
| 3.3.2 Interstitium | 20 |
| 3.4 Immunreaktion des HGF α am 5. Postnataltag | 21 |
| 3.4.1 <i>Tubuli seminiferi</i> | 21 |
| 3.4.2 Interstitium | 21 |
| 3.5 Immunreaktion des HGF α am 10. Postnataltag | 22 |
| 3.5.1 <i>Tubuli seminiferi</i> | 22 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.5.2 | Interstitium | 22 |
| 3.6 | Immunreaktion des HGF α am 15. Postnataltag | 23 |
| 3.6.1 | <i>Tubuli seminiferi</i> | 23 |
| 3.6.2 | Interstitium | 23 |
| 3.7 | Immunreaktion des HGF α am 25. Postnataltag | 24 |
| 3.7.1 | <i>Tubuli seminiferi</i> | 24 |
| 3.7.2 | Interstitium | 25 |
| 3.8 | Immunreaktion des HGF α am 35. Postnataltag | 25 |
| 3.8.1 | <i>Tubuli seminiferi</i> | 25 |
| 3.8.2 | Interstitium | 26 |
| 3.9 | Semiquantitative Analyse der Immunreaktion in den Leydig-Zellen | 40 |
| 3.9.1 | Fetale Leydig-Zellen | 40 |
| 3.9.2 | Adulte Leydig-Zellen..... | 42 |
| 3.10 | Verteilung von HGF α bezogen auf die Spermatogenesestadien der adulten Ratte..... | 45 |
| 3.10.1 | Erläuterung mittels Beispielen am 100. Postnataltag | 45 |
| 4. | Diskussion | 50 |
| 4.1 | Besprechung der Befunde über HGF | 50 |
| 4.1.1 | Leydig-Zellen | 50 |
| 4.1.2 | Spermatogenese-, peritubuläre- und interstitielle Zellen..... | 52 |
| 4.2 | Befundvergleich mit der C-Met Studie von Quinkert (in Vorbereitung)..... | 58 |
| 4.3 | Schlussfolgerung..... | 61 |
| 4.4 | Ausblick..... | 61 |
| 5. | Literaturverzeichnis | 62 |

1. Einleitung

1.1 Leydig-Zellen im Rattenhoden

Die Leydig-Zellen wurden zum ersten Mal im Jahre 1850 von Franz Leydig im Hoden der Säugetiere beschrieben (Leydig, 1850). Die Leydig-Zellen befinden sich im Zwischenraum (Interstitium) zwischen den Hodenkanälchen (*Tubuli seminiferi*) und bilden das männliche Geschlechtshormon Testosteron, das u.a. den Vorgang der Spermatogenese im Hoden steuert (Nieschlag, 1997).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der immunhistochemischen Verteilung des Hepatocyte Growth Factor (HGF) im Rattenhoden unter besonderer Berücksichtigung des Vorkommens von HGF in den Leydig-Zellen.

Es gibt im Rattenhoden zwei morphologisch und funktionell unterschiedliche Populationen von Leydig-Zellen: die vom fetalen Typ und solche vom adulten Typ (Haider und Servos, 1998, Haider et al., 1986, Siril Ariyaratne et al., 2000, Hardy et al., 1989, Kuopio et al., 1989, Lording und De Kretser, 1972, Majdic et al., 1998). Fetale Leydig-Zellen (FLZ) sind sowohl immunhistochemisch (3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase positiv) als auch ultrastrukturell frühestens ab dem 16. Fetaltag (fd) nachweisbar (Ziegler et al., 1983, Majdic et al., 1998, Huhtaniemi und Pelliniemi, 1992, Haider et al., 1997, Haider, 2004). Adulte Leydig-Zellen (ALZ) treten zum ersten Mal am 10. Postnataltag (pnd) im Rattenhoden auf (Siril Ariyaratne et al., 2000) bzw. am 13. pnd (Haider et al., 1995). Die postnatale Differenzierung der adulten Leydig-Zelle der Ratte wird nach Hardy et al. (1989) in 3 Stadien eingeteilt: Stadium I, das Progentitor-Stadium, in dem die Leydig-Zellen vom 14. bis zum 18. pnd von Mesenchym-ähnlichen Fibroblasten heraus entstehen und vorherrschend das androgene Endprodukt Androsteron produzieren. Im Stadium II, auch unreifes Stadium genannt, produzieren die Leydig-Zellen um den 35. pnd kleine Mengen von Testosteron, welches überwiegend zum androgenen Endprodukt 5α -Androstan- 3α , 17β - diol, einem Metaboliten von Testosteron, metabolisiert wird. Im dritten und reifen Stadium produzieren die Leydig-Zellen als androgenes Endprodukt aktiv Testosteron und sind in ihrem sexuellen Reifegrad um den 90. pnd voll funktionsfähig (Hardy et al., 1990, Shan et al., 1995, Shan und Hardy, 1992, Shan et al., 1997). Dies ist auch gleichzeitig die wichtigste Funktion der Leydig-Zellen und dient der Initiierung, Aufrechterhaltung und Regulation der Spermatogenese nach Stimulation

mit dem luteinisierenden Hormon (LH) aus der Hypophyse (Haider, 2004). Ferner stimuliert LH die späten Stadien der ALZ-Entwicklung, nämlich die Entwicklung der unreifen in reife ALZ (Haider, 2004). LH alleine bewirkt keine Testosteronproduktion, aber LH zusammen mit Androgen induziert in den ALZ-Vorläufern eine Testosteronproduktion (Hardy et al., 1990). Außerdem werden Androgene für die Differenzierung der ALZ-Vorläufer benötigt (O'Shaughnessy et al., 2002). Die Vorläufer der ALZ, die Fibroblasten, befinden sich in der äußeren peritubulären Schicht der *Tubuli seminiferi* bzw. perivaskulär (Haider und Servos, 1998). Der Übergang von Leydig-Zell-Vorläufern zu ALZ ist verbunden mit Größen- und Formänderungen: Die Vorläuferzellen („precursors“) sind dünn und spindelförmig, die Reifen groß und rund. Außerdem sind sie um den 30. pnd sowohl homogen um die *Tubuli seminiferi* als auch perivaskulär in der Nähe von interstitiellen Blutkapillaren lokalisiert (Haider, 2004).

Ricci et al. veröffentlichten im Jahre 2006 erste endokrinologische Hinweise über das Vorkommen von HGF in der Leydig-Zelle der Ratte (Ricci et al., 2006). Diese Publikation warf mehrere Fragen auf: Beispielsweise wo liegt der HGF topografisch im Rattenhoden, welche anderen Zellen exprimieren den HGF im Hoden, was ist die funktionelle Bedeutung von HGF im Hodengewebe, wird der HGF im Hodengewebe konstant gebildet oder bestehen Schwankungen in der Expression in Abhängigkeit der Phasen der fetalen, postnatalen, pubertären und adulten Entwicklung. Im Folgenden werden zunächst allgemein die Aspekte des Vorkommens und der Bedeutung von HGF beschrieben.

1.2 Vorkommen und Bedeutung vom Hepatocyte Growth Factor (HGF)

HGF bzw. Hepatotropin, ein pleiotropes Zytokin, wurde erstmals von Nakamura et al. (1984) am Rattenhepatozyten nachgewiesen. Dieser fand sich im Serum von 70%ig hepatektomierten Ratten und stimulierte die DNA-Synthese sowie Proliferation von adulten Hepatozyten. Das auch als *Scatter Factor* bekannte Protein, welches auch die Motilität von renalen Tubuluszellen (MDCK) der Niere verstärkt und erstmals als solches beschrieben wurde, (Stoker et al., 1987) ist mit HGF völlig identisch und als Synonym zu verwenden (Konishi et al., 1991, Furlong et al., 1991). HGF ist ein dimeres Molekül mit einer Molmasse von 84 kDa und mit einer α -Untereinheit von 69 kDa sowie β -Untereinheit von 34 kDa, die jeweils über eine Disulfidbrücke miteinander chemisch gebunden sind (Nakamura et al., 1987). Die α -Kette besteht aus 440 Aminosäuren, die β -Kette aus 233 und wird als pre-pro-prekursor synthetisiert. Ferner ist die AS-Sequenz von menschlichem HGF zu 90 Prozent identisch mit der der Ratte (Tashiro et al., 1990). Die β -Kette hat eine serinproteaseähnliche Struktur und die α -Untereinheit hat eine vier Kringel Domäne (Tashiro et al., 1990), wobei die α -Kette der heterodimeren Serinprotease Plasminogen eine fünf Kringel Domäne besitzt und somit eine starke strukturelle Homologie zu Plasminogen aufweist (Nakamura et al., 2011). Es ist ein hitzelabiles Protein, das bei einer 30-minütigen Erhitzung auf 56° C seine Aktivität zusehens verliert, bzw. nach 90 sekundigem Sieden komplett verliert (Nakamura und Mizuno, 2010). Außerdem wird HGF als pro HGF mit 728 Aminosäuren synthetisiert, wonach die reife Form durch proteolytische Spaltung gebildet wird (Nakamura und Mizuno, 2010). Bottaro et al. (1991) fanden heraus, dass C-Met (Tyrosin-Kinase Receptor für HGF) mit 145 kDa der Rezeptor für HGF ist und als p190 C-Met protoonkogen zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase gehört. Darüber hinaus erbrachten Higuchi et al., (1992) den Beweis, dass C-Met mit HGF mit einer hohen Affinität ($K_d \triangleq 30 \text{ pm}$) gebunden wird. Nach HGF-Bindung erfolgt die C-Met-Autophosphorylierung an zwei Tyrosinresten (Y1234 und Y1235) inklusive der Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne, die die Tyrosinkinaseaktivität reguliert: Die Phosphorylierung an zwei Tyrosin-Enden (Y1349 und Y1356) nahe des Carboxyendes bildet eine funktionelle Anbindungsstelle für eine Vielzahl von Signalkaskaden (Peruzzi und Bottaro, 2006), (Abb.1, modifiziertes Übersichtsschema nach Nakamura und Mizuno, 2010).

Beispiele hierfür sind Pi3-Kinase, Proteinkinase C, Calcium Phospholipid, Januskinase/ Signaltransducer, Aktivator der Transkription, usw. (Lail-Trecker et al., 1998, Liu, 1999, Zachow und Woolery, 2002, Makondo et al., 2004). Die HGF-Bindung induziert eine Phosphorylierung an einer am C-Terminus angehängten Tyrosinkinase mit dem Ergebnis einer biologischen Aktivität von sehr großer Breite. Diese umfasst mitogene, motogene und morphologische Aktivitäten (Tashiro et al., 1990, Matsumoto und Nakamura, 1992, Birchmeier und Gherardi, 1998) sowie durch seine spezifische Bindung, Zellproliferation und Differenzierung (Birchmeier und Gherardi, 1998, Abb.1, modifiziertes Übersichtsschema nach Nakamura und Mizuno, 2010). Die Signalübertragungswege sind gekoppelt an die Regulation der Zellzyklusprogression, Morphogenese und das Zellüberleben und abhängig von der Kontrolle des HGF-C-Met-Signalwegs (Peruzzi und Bottaro, 2006).

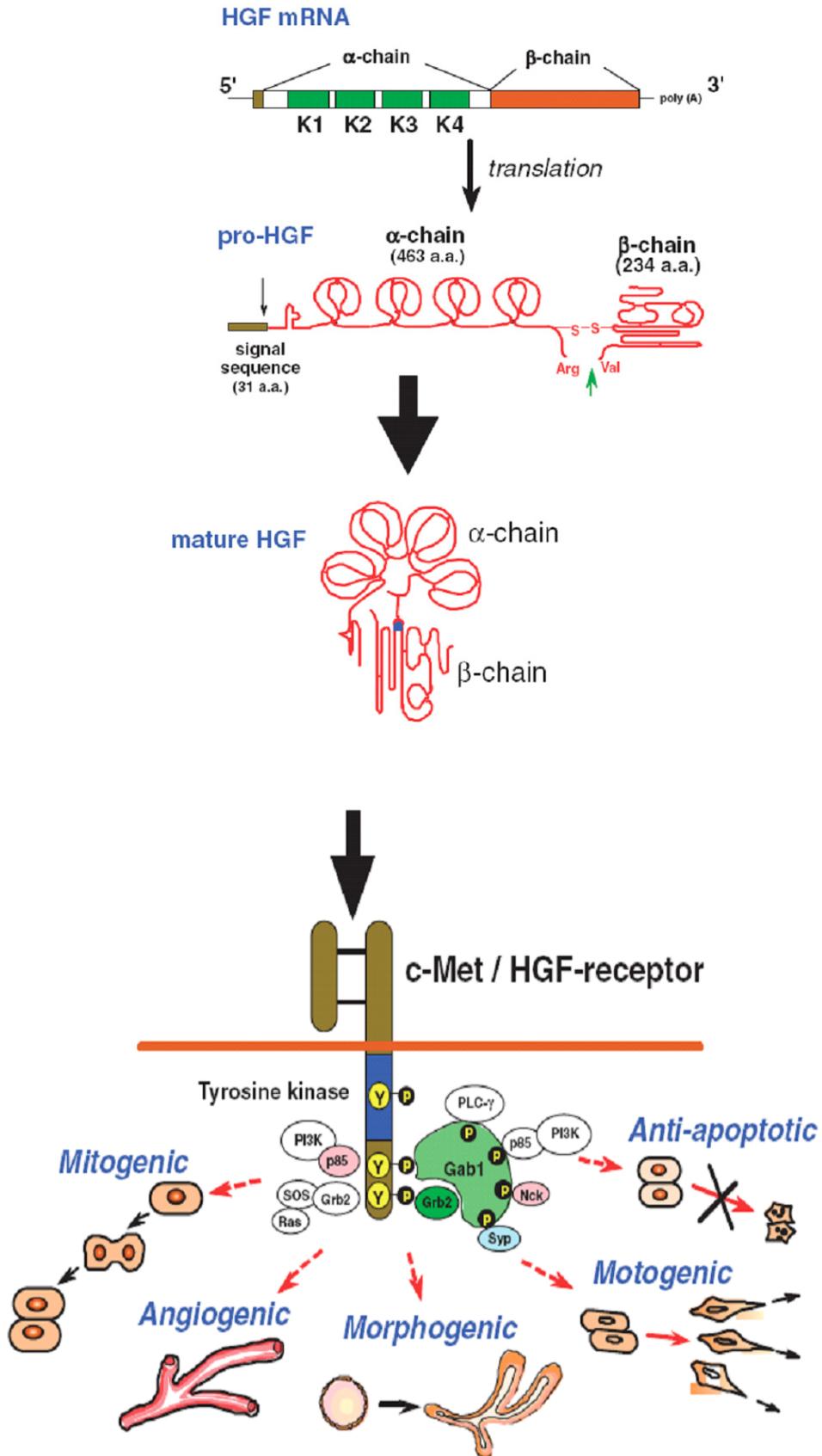


Abb.1: Übersichtsschema modifiziert nach Nakamura und Mizuno, (2010) über den Hepatocyte Growth Factor (HGF) und C-Met (Rezeptor für HGF).

HGF wurde schon in verschiedenen Organen und Geweben nachgewiesen (Bhargava et al., 1991, Di Renzo et al., 1991, Naldini et al., 1991, Lail-Trecker et al., 1998). HGF ist einer der Wachstumsfaktoren, der die Regulierung und funktionelle Aktivität während der Hodenentwicklung in den Myoid- und Sertolizellen beeinflusst und reguliert so indirekt die Spermatogenese der Säugetiere (Catizone et al., 2001). Außerdem wird er als inaktive pro HGF-Form sezerniert und in der Extrazellulärmatrix von verschiedenen Enzymen, beispielsweise dem Urokinase-Typ und Gewebe-Typs-Plasminogenaktivator (Naldini et al., 1995, Naldini et al., 1992, Mars et al., 1993) sowie durch Koagulationsfaktor XII in die biologisch aktive Form umgewandelt (Shimomura et al., 1995). Das HGFA Protein, eine Serinprotease, ist ebenfalls ein Aktivator der HGF-Vorstufe und wandelt diese in die biologisch aktive Form um (Miyazawa et al., 1993). HGFA wurde allerdings bis jetzt nur im Rattenovar nachgewiesen (Uzumcu et al., 2006). Der Gegenspieler des HGFA ist das zugehörige Inhibitorprotein HAI (Kunitz Typ Serinprotease), welches die Aktivierung des HGFA blockiert (Shimomura et al., 1997), dessen Funktion allerdings nicht im Hoden nachgewiesen wurde (Zachow und Uzumcu, 2007). Dass HGF und C-Met im Rattenhoden exprimiert werden, wurde von Catizone et al. (1999) beschrieben. Sie berichten zum ersten Mal, dass HGF im *Tubulus seminiferus* exprimiert wird und es ist weiterhin bekannt, dass HGF und C-Met im Genitaltrakt männlicher Säugetiere vorkommt (Catizone et al., 2002).

1.3 Fragestellung

Die Übersicht der Literatur ergab, dass eine systematische Beschreibung der Verteilung von HGF in verschiedenen testikulären Zellen fehlt.

Daher geht die vorliegende Dissertation folgenden Fragen nach:

- 1) *Wo und in welcher Intensität erscheinen die immunhistochemischen Reaktionen in testikulären Zellen?*
- 2) *Gibt es Schwankungen in der Expression von HGF im Hodengewebe zwischen den fetalen, postnatalen, pubertären und adulten Phasen der Entwicklung?*
- 3) *Gibt es eine zeitliche Korrelation zwischen den Entwicklungen der fetalen bzw. der adulten Leydig-Zelle und der Expression von HGF im Hodengewebe?*

Aus diesem Grunde wurden die Untersuchungstermine so ausgewählt, dass sie die wichtigsten Etappen der Leydig-Zellentwicklung (17. fd, 18. fd, 1. pnd, 5. pnd, 10. pnd, 15. pnd, 25. pnd, 35. pnd, 100. pnd) erfassen.

2. Material und Methodik

2.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich sowohl um männliche als auch trüchtige weibliche Wistarratten bzw. deren Feten. Diese wurden jeweils aus der zentralen Tierversuchsanstalt (TVA) der Heinrich Heine Universität bezogen (TVA-Projekt-Nr. 0/21/1988, Prof. Haider, Anatomie II; Zweck: Organentnahme). Dort erfolgte ihre Aufzucht jeweils unter Standardbedingungen in einer pathogen freien Zone jeweils bei Raumtemperatur. Außerdem unterlagen sie einem zirkadianem Hell-Dunkel-Zyklus von je zwölf Stunden. *Ad libitum* standen Rattenfutter der Fa. Sniff® sowie Wasser zur Verfügung.

Es wurden bei den männlichen Ratten jeweils fünf Tiere pro Altersstufe untersucht, wobei sich hier folgende Staffelung der Altersstufen ergab:

1. Postnataltag, 5. Postnataltag, 10. Postnataltag, 15. Postnataltag, 25. Postnataltag, 35. Postnataltag, sowie 100. Postnataltag (adulte Ratte). Zur Untersuchung der fetalen (18. fd, 17.f.d) Altersstufen wurden je drei schwangere weibliche Wistarratten ausgewählt, die jeweils eine unbekannte Anzahl an Feten, jedoch mit Sicherheit Nachkommen im Alter vom 18. und 17. Fetaltag in sich trugen.

2.2 Versuchsdurchführung

Die Tötung der Tiere und Organentnahme wurde durch eine fachkundige Person des Instituts für Anatomie II der Heinrich Heine Universität Düsseldorf vorgenommen. Der Doktorand erhielt jeweils das Hodengewebe zur weiteren Aufarbeitung.

2.2.1 Narkose/ Tötung

Die Tiere wurden schmerzfrei in eine CO₂-Asphyxie versetzt und getötet.

2.2.2 Organentnahme

Die Versuchstiere wurden an allen vier Extremitäten mittels Kanülen aufgespannt und somit sicher in Rückenlage auf dem Präparationstisch fixiert, sodass jetzt die bestmögliche Position zur Hodenpräparation bestand. Nach erfolgreicher Fellrasur

des gesamten Abdomens erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle mittels medianer Laparotomie: Inzision der Haut und des subkutanen Fettgewebes vom Xyphoid bis zur Symphyse in der Mittellinie. Durchtrennung der Muskelschichten sowie des Peritoneums. Nach nochmaligem Fixieren der Bauchdeckenschichten am Präparations-tisch und Verlagerung der Organe des Oberbauchs mittels atraumatischer anatomi-scher Pinzette erfolgte das Auffinden und Herauslösen der *Testes* im kleinen Becken. Mit feiner Präparierschere und Splitterpinzette erfolgte jetzt die eigentliche filig-rane Präparation des rechten *Testis*. Hierbei wurde zunächst der *Epididymis* scharf mittels Skalpell vom *Testis* getrennt, so dass dieser jetzt noch vom überschüssigen Fett- und Bindegeweberesten befreit werden konnte.

Die Präparation der fetalen Altersstufen war im Verlauf ähnlich, jedoch mit dem Un-terschied, dass nach der Tötung der Muttertiere die wie in Ketten aufgereihten Feten jeweils einzeln unter dem Präparationsmikroskop begutachtet und nach scharfer Ab-trennung der oberen Thoraxhälfte, der Hemikorpus *in toto* fixiert wurde. Dies war insofern notwendig, da in jener Altersstufe der *Deszensus Testis* noch nicht oder nur unvollständig auf unbekannter Höhe stattgefunden hatte.

2.3 Histologische Aufarbeitung der Präparate

2.3.1 Fixierung

Unmittelbar nach erfolgreicher Präparation, die im Übrigen stets am frühen Vormittag stattfand, wurden die *Testes* in zuvor frisch angesetzter Bouinscher Lösung fixiert:

150 ml Pikrinsäure, heiß gesättigt und filtriert

50 ml 37%ige Formaldehydlösung filtriert

10 ml 100%iger Eisessig

Nach einigen Stunden wurde die Lösung nochmals frisch angesetzt und ausgetauscht. Den *Testes* der adulten (100. pnd) Ratten wurden nach ca. drei Stunden die Pole gekappt und nach weiteren drei Stunden noch einmal in der Mitte quer durchtrennt, um eine noch bessere Fixierung zu erreichen. Sämtliche Präparate wurden dann über Nacht (ü.N.) in der Bouinschen Lösung belassen und so optimal fixiert (maximal 24 h).

2.3.2 Entwässerung

Zwei Tage nach der Präparation erfolgte die Entwässerung der Präparate mittels aufsteigender Alkoholkonzentrationsreihe. Hierzu wurden die Präparate zunächst vorsichtig aus der Bouinschen Lösung abgeschüttet, mit 70%igem Isopropylalkohol gespült und für jeweils drei mal vier Stunden in diesem belassen, um ü.N. in 80%igem Isopropylalkohol verweilen zu können. Am nächsten Morgen erfolgte die gleiche Vorgehensweise mit dreimaligem Wechsel von 90%igem Isopropylalkohol, um schließlich ü.N. in 100%igem Isopropylalkohol zu verbleiben.

Zum Schluss erfolgte eine mehrstufige Überführung in das Intermedium Methylbenzoat (Fa. MERCK), in welchem die Präparate für wenigstens zwei Tage, längstens jedoch zwei Wochen verblieben, um dann letztlich der Paraffinierung zugeführt zu werden.

2.3.3 Paraffineinbettung

Ca. 24h vor der Paraffinierung wurden drei Chargen (I, II, III) Paraffinpellets (Histosec Pastillen der Fa. Merck Schmelzpunkt 58°C - 60°C,) im Brutschrank (Fa. Memmert) auf 60°C erwärmt und verflüssigt. Die in Methylbenzoat befindlichen Präparate wurden abgegossen und für zweimal 10min in Toluol überführt. Es folgte die dreistufige (jeweils ca. drei Stunden) sowie eine ü. N. Einlagerung im flüssigen Paraffin, um schließlich am nächsten Morgen die Einbettung in vorgesehene Förmchen mittels frischem Paraffin vorzunehmen. Nach entsprechender Codierung wurden diese dann noch einmal zur endgültigen Aushärtung für ca. eine Stunde im kalten Wasserbad belassen und waren nach anschließendem Trimmen der Blöcke optimal für die Aufbereitung am Mikrotom (Fa. Leica) vorbereitet.

2.3.4 Anfertigung von Serienschnitten

Mittels Schlittenmikrotom wurden für die unten aufgeführten Färbungen pro Tier 30-mal 5µm dünne Serienschnitte angefertigt, die wie im nachstehenden nummeriert und mittels nachfolgenden Färbemethoden bearbeitet wurden:

| | | | |
|----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|
| 1 | HE | 16 | Immunreaktion von HGF + Hämalaun |
| 2 | HE | 17 | |
| 3 | PJS | 18 | |
| 4 | PJS + Hämalaun | 19 | |
| 5 | Immunreaktion von HGF | 20 | |
| 6 | Immunreaktion von HGF + Hämalaun | 21 | |
| 7 | Negativ Kontrolle + Hämalaun | 22 | |
| 8 | | 23 | PJS |
| 9 | | 24 | PJS + Hämalaun |
| 10 | | 25 | Immunreaktion von HGF |
| 11 | | 26 | Immunreaktion von HGF + Hämalaun |
| 12 | | 27 | |
| 13 | PJS | 28 | |
| 14 | PJS + Hämalaun | 29 | |
| 15 | Immunreaktion von HGF | 30 | |

Tabelle 1: Übersicht der Serienschnitt Färbereihen

Um bei der späteren mikroskopischen Auswertung Fehler in Form von Mehrfach Zählungen zu vermeiden, wurde zwischen Schnitten mit jeweils der gleichen Färbung ein Mindestabstand von 30 µm belassen. Somit ergaben sich pro Altersstufe insgesamt zehn Mal HE, 30-mal PJS sowie insgesamt 35 immunhistochemische Färbungen. Eine Modifizierung dieser Vorgehensweise war lediglich bei den fetalen Tieren nötig. Hier wurde der Paraffinblock so lange mit dem Mikrotom in Serie bis auf Höhe der Gonadenanlage heruntergeschnitten, bis mittels Toluidin-Blaufärbung eine Geschlechtsidentifizierung möglich war. Nur bei erfolgreicher männlicher Identifizierung erfolgte das gleiche Prozedere wie oben beschrieben. Nach anschließender zweitägiger Lagerung im Brutschrank bei 38°C waren die Serienschnitte nun ideal vorbereitet für die oben aufgeführte Färbeplanung.

2.3.5 Histochemische Methodik

2.3.5.1 Entparaffinierung

Die Entparaffinierung erfolgte standardmäßig vor jeglicher histologischen Färbung wie folgt: Nach 20-minütiger Erwärmung im Brutschrank (Fa. Memmert) bei 60°C erfolgte die zweimalige, 10-minütige Xylolbehandlung (Fa. Merck), um dann nach absteigender Alkoholkonzentrationsreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70% Isopropylalkohol) mit jeweils 2-minütiger Verweildauer nochmals zweimal 2min im aqua bidest zu verbleiben.

2.3.5.2 Hämalaun-Eosin-Färbung (HE)

Pro Tier wurden dieser zur Übersicht dienenden Färbung jeweils zwei Schnitte unterzogen.

Auf die Entparaffinierung folgte eine 5-minütige Kernfärbung mit saurem Hämalaun (nach Mayer), mit anschließendem 5-minütigem „Bläuen“ unter fließendem Leitungswasser. Darauf folgte eine 3-minütige Plasmafärbung mit 0,3%igem wässrigem Eosin. Nach kurzem Spülen in Leitungswasser schloss sich jetzt erneut eine Alkoholspülung an, diesmal in aufsteigender Konzentration (70%, 80%, 90%, 96% Isopropylalkohol), in kurzen Intervallen, mit zweimal 2min 100 %igem Isopropylalkohol sowie zweimal

2min Xylol. Jetzt konnten die Schnitte mittels DePeX (Fa. VWR international Ltd.) und Deckgläschen (1x1 cm) eingedeckt werden.

Der Schritt des Eindeckens findet nach jeglichen hier aufgeführten Färbemethoden Anwendung. Die aufsteigende Alkoholkonzentrationsreihe hatte stets ein Intervall von 2min.

2.3.5.3 Perjodsäure- Schiff- Reaktion (PJS)

Pro Tier wurden, wie oben beschrieben, sechs Schnitte dieser Prozedur unterzogen, wobei jeweils drei hiervon eine zusätzliche Kernfärbung mittels Hämalaun erhielten.

Jeweils unmittelbar vor Gebrauch wurde 100 ml frisches SO₂-Wasser angesetzt:

6 ml 10%ige Kaliumsulfid-Lösung

5 ml 1 mol/l HCl-Lösung

ad 100 ml Leitungswasser

Nach Entparaffinierung und absteigender Isopropylalkohol-Konzentrationsreihe wurden die Schnitte für 7min in 0,5%ige Perjodsäure getaucht, um nach anschließendem reichlichen Spülen mit aqua bidest 30min im Schiffs-Reagenz zu verbleiben. Danach erfolgte ohne zu spülen die Überführung in das, wie das oben beschriebene, frisch angesetzte SO₂-Wasser. Auf die sich anschließende, teilweise stattfindende 30sec Kernfärbung mit Hämalaun, fand noch eine 15min Wässerung mit Leitungswasser statt. Hierauf folgte dann schließlich eine Entwässerung in den 2min-Intervallen mit aufsteigender Isopropylalkohol-Konzentrationsreihe und anschließender Eindeckung mit DePeX (Fa. VWR international Ltd.).

2.3.5.4 Immunhistochemischer Nachweis von HGF

Im Folgenden wird der Nachweis des *polyklonalen Kaninchen Primärantikörpers HGF α (H-145): sc-7949* beschrieben. Bezogen wurde der Antikörper von der *Fa. Santa Cruz Biotechnology, Inc., Hauptsitz in Kalifornien, U.S.A..*

Pro Tier wurden jeweils sechs immunhistochemische Reaktionen, die Hälfte davon mit Hämalaun-Kernfärbung, sowie eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Innerhalb der Serienschnitte lag pro Tier zwischen zwei immunhistochemischen Reaktionen immer ein Abstand von ca. 40 µm. In Vorversuchen konnte die bestmögliche Verdünnung des Primärantikörpers ermittelt werden. Diese lag bei einer Verdünnung im Verhältnis 1:50 (10 µl Anti-HGF: 490 µl Antibodydiluent, Dako Real, Fa. Dako) sowie einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) im Optimum.

Vorgehensweise

Für die Inkubation der verschiedenen Agenzien wurden mit Deckel verschließbare Diakästen benutzt, in die jeweils acht Schnitte passten, so dass eine feuchte Kammer entstand und die Schnitte somit vor Austrocknung geschützt waren. So konnten pro Versuchsreihe maximal 16 Schnitte behandelt werden. Zur Vermeidung von unspezifischen Hintergrundfärbungen wurden sowohl für die Entparaffinierung mit absteigender Alkoholkonzentrationsreihe, als auch für die Entwässerung mit aufsteigender Alkoholkonzentrationsreihe das Xylol und der Alkohol nach 100 behandelten Schnitten ausgetauscht.

Vor Versuchsbeginn wurde der Puffer TBS (tris buffered saline, 0,05 M, pH 7,4) jedesmal frisch hergestellt und auf den eben genannten pH-Wert mittels pH-Meter (Inlab Routine Pro, Fa. Mettler Toledo) eingestellt. Für die Herstellung von 2000 ml der Pufferlösung waren folgende Komponenten notwendig:

12,2 g TRIS [Tris (hydroxymethyl)-aminomethan]

18 g NaCl

74 ml 1mol/l HCl

ad 2000 ml aqua bidest

Dann wurde wie folgt vorgegangen:

- Entparaffinierung durch Xylol sowie absteigende Alkoholkonzentrationsreihe in Isopropylalkohol (wie oben beschrieben). Der Erfolg der Verdünnungsreihe zeigte sich bei völligem Verlust der durch die Pikrinsäure gebildeten, gelblichen Farbe.

- Sorgfältiges Spülen der Schnitte mittels aqua bidest mit anschließendem Umkreisen der Präparate mittels Spezialstift, dem Dako Pen (Fa. Dako, Hamburg)
- Blockieren der endogenen Peroxidase mittels frisch angesetztem 3%igem H_2O_2 für jeweils 10min.
- 5min Waschen in aqua bidest
- 5min Waschen in Pufferlösung (TBS)
- 60min Inkubation mit 5%igem Ziegenserum der Fa. Dako (Dako Goat serum normal), (vorheriges Verdünnen von 500 μ l konzentriertem Ziegenserum auf 10 ml Aqua bidest)
- 60min Inkubation des Primärantikörpers (HGF α), 1:50 verdünnt mit Antikörper Diluent (Fa. Dako) bei RT. Hier ging keine Spülung mit dem Puffer TBS voraus.¹
- Zwei mal 5min Waschen mittels Pufferlösung (TBS)
- 30min Inkubation mit Sekundärantikörper EnVision+ Dual Link HRP, einem konjugierten Polymer der Fa. Dako bei RT
- Zwei mal 5min Waschen mittels Pufferlösung (TBS)
- 5min Inkubation bei RT mittels des Farbgebers DAB Chromogen-Lösung (Diaminobenzidin, 3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid, Fa Dako)
- 5min Waschen mittels aqua bidest
- 30sec Kernfärbung mittels Hämalaun mit anschließendem 5min Bläuen der Reaktion
- Entwässern mit aufsteigender Alkoholkonzentrationsreihe (Isopropylalkohol) und Xylol im 2-min-Intervall (s.o.).
- Eindecken mittels DePeX-Eindeckmittel (Fa. VWR international Ltd.), s.o.

¹ gilt nicht für Negativkontrolle

2.3.5.5 Negativkontrolle

Zum Nachweis der Spezifität der Immunreaktion wurde pro Inkubationscharge je eine Negativkontrolle parallel gefahren. Hierzu erfolgte eine zur oben beschriebenen identische Vorgehensweise mit dem Unterschied, dass pro Charge anstelle des Primärantikörpers HGF α , ein weiteres Präparat für 60min (explizit ohne Primärantikörper) mittels 5%igem Ziegenserum inkubiert wurde.

2.3.5.6 Positivkontrolle

In Vorversuchen wurde zum Nachweis einer tatsächlichen Immunreaktion des Primärantikörpers HGF α eine stark positive Reaktion in den Hepatozyten von Leberschnitten (ebenfalls von der Wistar ratte) befundet. Die Färbemethoden der Immunreaktion entsprachen hierbei exakt den oben beschriebenen.

2.4 Qualitative und quantitative Auswertung

2.4.1 Auswertung der Leydig-Zellen

Die Auswertung der Immunreaktion (Immunreaktion Färbung von HGF α) erfolgte lichtmikroskopisch (Fa. Leica), sowohl quantitativ als auch qualitativ, bei 40-facher und 100-facher Objektivvergrößerung. Für die Zählung der Zellen wurde ein Messraster im Okular (Mess-Strichplatte Fa. Leitz, Köln) mit einer Fläche von 100 mm² mit 100 Kästchen à 1 mm² verwendet, so dass sich pro Raster eine Zählfläche von 40000 mm² ergab. Die Durchmusterung der *Testes* erfolgte für die adulten Leydig-Zellen (ALZ) einheitlich mittels dieses Messrasters (Gundersen, 1977, Gundersen und Jensen, 1987) jeweils für 20 Raster pro Präparat. Bei Durchmusterung der immaturren Tiere wurde für die Zählung der fetalen Leydig-Zellen (FLZ), die überwiegend in Clustern vorlagen, in ähnlicher Weise verfahren. Der einzige Unterschied bestand darin, dass in den Altersstufen 10, 15 und 25 pnd auf Grund des teilweise seltenen Vorkommens der FLZ, der gesamte *Testis* ausgewertet werden musste und später am Lichtmikroskop (Fa. Leica) eine Messung der gesamten Fläche vorgenommen wurde. Mittels jener eben genannten Verfahren war es nun möglich, das Vorkommen der ALZ und FLZ pro mm² zu berechnen und somit statistisch auszuwerten.

2.4.2 Qualitative Auswertung

Bei der Analyse der immunhistochemischen Reaktionen wurden folgende Areale der *Testes* qualitativ befundet: Die *Tubuli seminiferi* sowie deren Inhalt (Sertoli-Zellen, Spermatogonien Typ A und B, Spermatozyten in ihren verschiedenen Stadien, Spermatisden bzw. die jeweiligen Vorläuferzellen) und peritubuläre (Myoidzellen). Dabei wurden bei jedem Tier mindestens 50 *Tubuli* begutachtet. Des Weiteren erfolgte die Sichtung des Interstitiums inklusive Gefäßen. Hierbei wurde eine Unterscheidung zwischen dem *Intimaendothel*, der *Tunica media* und *Adventitia* der Arterien, Venen und Blutkapillaren sowie Grenzstrukturen wie *Tunica albuginea* vorgenommen. Es resultierte jeweils eine Unterscheidung in eine sehr stark positive, stark positive, schwach positive sowie negative Reaktion. Bei den adulten Tieren (100 pnd) wurden zusätzlich die Spermatogenesestadien I-XIV nach Leblond und Clermont (1952) sowie Hess (1990) herangezogen. Zur Vereinfachung wurden die Stadien auf insgesamt neun Paare/ Einzelne Stadien (Stadium I+II; Stadium III+IV; Stadium V; Stadium VI-VII; Stadium VIII, Stadium IX; Stadium X-XI; Stadium XII-XIII; Stadium XIV) zusammengefasst. Es wurden im Mittel ca. 100 *Tubuli* (ca. 25 *Tubuli* pro Tier) zunächst in der PJS-Färbung identifiziert, um schließlich in der Immunreaktion Färbung befundet zu werden. Die Identifizierung der intratubulären Zellen bei den Jungtieren gelang mit Hilfe der Kriterien von Hilscher und Makoski (1968) sowie Hilscher et al. (1972).

2.4.3 Quantitative Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte über Tabellenkalkulationen und Diagramme mit Hilfe des Programms Microsoft Excel. Besonders für die Auswertung der Leydig-Zellen wurden mit Hilfe des Programms PAWS Statistics (SPSS) Boxplots angefertigt, die die Anzahl der jeweiligen positiven oder negativen Reaktionen des Zytoplasmas der Leydig-Zellen in Relation zu den verschiedenen Altersstufen setzten. Außerdem wurden die Gruppen „positive ALZ“ und „negative ALZ“ auf signifikante Differenzen getestet. Dabei wurden die ordinal skalierten Daten in die Kategorien positive und negative Immunreaktion aufgeteilt und die entstehende Kreuztabelle mit dem Chi-Test getestet. Mit der Immunreaktion ist in der vorliegenden Arbeit im Übrigen stets die Reaktion des Zytoplasmas jeglicher Zellen gemeint, da sich die Nuklei stets negativ darstellten und somit nicht mehr im

Zusammenhang der Immunreaktion erwähnt werden sollen. Da die FLZ-Kurven keinerlei Vergleichbarkeit aufwiesen, erübrigte sich hier ein statistischer Test bezogen auf Signifikanz.

3. Ergebnisse

3.1 Immunreaktion des HGF α am 17. Fetaltag

In dieser Altersstufe wurden keine spezifischen Immunreaktionen festgestellt. Auf Grund des unregelmäßigen Färbeverhaltens wurde bei dieser Altersstufe auf eine statistische Auswertung verzichtet.

3.2 Immunreaktion des HGF α am 18. Fetaltag

3.2.1 *Tubuli seminiferi*

In dieser Altersstufe waren der vorherrschende Zelltyp Sertolizellvorläufer, die nie eine Immunreaktion zeigten, wogegen die T1-Pro-Spermatogonien eine extrem starke Reaktion hervorriefen. Diese Reaktion äußerte sich als kappenförmige, homogen scharf begrenzte Anfärbung am Pol des Nukleus. Die Reaktion in diesen Mitochondrienkappen tritt in dieser Altersstufe gehäuft auf und übertrifft von der Intensität noch die der FLZ. Die peritubulären Zellen (Myofibroblasten) zeigten keine Reaktion (Abb. 2 und 3).

3.2.2 Interstitium

Die fetalen Leydig-Zellen wiesen eine kräftige, grob schollenartige bis homogen positive Immunreaktion im Zytoplasma auf. Die Zellkerne zeigten jeweils keine Immunreaktion (Abb.4).

Die Fibroblasten und Perizyten des Interstitiums wiesen keine Immunreaktion auf (Abb. 2, 3 und 4). Eine Ausnahme bildete hier lediglich die den fetalen *Testis* umgebende, äußere Schicht. Hier war der mesenchymale Fibroblastenpool zwar auch stets ohne eine Immunreaktion, jedoch wies das basale Zytoplasma des embryonalen Zölomepithels ein inhomogenes Verteilungsmuster bezüglich der Immunreaktion auf. Dabei war dieses überwiegend sehr stark positiv angefärbt (nahezu der Reaktion an den T1-Pro-Spermatogonien entsprechend), zeigte aber auch fokal normal starke, schwache bzw. keine Immunreaktionen (Abb. 2).

Pränatal zeigten sich in Gefäßen insgesamt eine schwächere Immunreaktion als bei älteren Altersstufen, wobei der *Adventitia* und der *Tunica media* der Arterien sowie Venen und Lymphgefäßen hier stets eine Immunreaktion fehlte. Dagegen zeigte sich regelmäßig eine starke Immunreaktion im Zytoplasma der arteriellen Intimaendothelzellen. Bei den Blutkapillaren gab es in unsteter Häufigkeit im Zytoplasma gänzlich fehlende oder auch mittelstarke Immunreaktionen zu beobachten.

3.3 Immunreaktion des HGF α am 1. Postnataltag

3.3.1 *Tubuli seminiferi*

Zahlenmäßig waren hier die Sertolizellvorläufer den T1-Pro-Spermatogonien noch weit überlegen und wiesen, bis auf wenige Ausnahmen, keine Immunreaktion auf, wo hingegen die T1-Pro-Spermatogonien -wie auch schon am 18. fd- stets eine sehr starke Immunreaktion verzeichneten. Hier stellte sich jedoch die Immunreaktion weniger kappenförmig begrenzt auf einen Pol des Nukleus, sondern mehr distinkt saumartig den gesamten Nukleus umgebend dar. Die Immunreaktion entsprach von der Intensität etwa der der FLZ. Dabei war außerdem eine sehr starke Immunreaktion in den zu Grunde gehenden T1-Pro-Spermatogonien zu beobachten, die jeweils ein Konglomerat in der Tubulusmitte ausbildeten. Die peritubulären Zellen, die jeweils eine innere Schicht für die späteren Myofibroblasten und eine äußere Schicht für die späteren adulten Leydig-Zellen bilden, waren bis auf wenige Ausnahmen ohne eine Immunreaktion (Abb. 5).

3.3.2 Interstitium

Die FLZ zeigten eine kräftige Immunreaktion im Zytoplasma, wieder ohne Beteiligung der Nuklei, und die Fibroblasten wiesen keine Immunreaktion auf (Abb. 5 und 6).

Eine Immunreaktion fehlte sowohl in der *Tunica media* als auch in der *Adventitia* der Arterien sowie in den Venen und den Lymphgefäßen. Das zuvor bei den fetalen Tieren komplett stark positive Zytoplasma des *Intimaendothels* wies hier schon einige negative Anteile auf. Bei den Blutkapillaren, bei denen zuvor die Immunreaktion noch teils positiv, teils negativ war, hat sich das Verhältnis zugunsten

der ausbleibenden Reaktion verschoben. Die *Tunica albuginea* war frei von einer Immunreaktion.

3.4 Immunreaktion des HGF α am 5. Postnataltag

3.4.1 *Tubuli seminiferi*

Der hier noch vorherrschende Zelltyp von Präsertolizellen war überwiegend ohne eine Immunreaktion, wobei der Anteil der positiv reagierenden, im Vergleich zu den jüngeren Altersstufen, ein wenig zugenommen hatte. Nach wie vor hatten hier die T1-Pro-Spermatogonien im zum überwiegenden Teil stark positiv reagiert, zeigten jedoch auch teilweise keine Immunreaktion. Frühe A-Spermatogonien wiesen ebenfalls eine sehr starke Immunreaktion auf, reagierten aber teilweise auch nicht. Morphologisch entsprach das Bild der Immunreaktion der T1-Pro-Spermatogonien am 1. pnd (saumartig im Zytoplasma). Ebenso waren auch hier wieder stark reagierende Zelltrümmerkonglomerate in der Tubulusmitte zu beobachten. Die Myofibroblasten waren hier immer noch ohne eine Immunreaktion, zeigten aber schon erheblich mehr positive Anteile als in jüngeren Altersstufen. Vereinzelte Megalospermatozyten zeigten eine ringförmige positive Immunreaktion randständig im Zytoplasma (Abb.7-10).

3.4.2 Interstitium

Die FLZ zeigten, wie schon in den jüngeren Altersstufen, eine kräftige Immunreaktion im Zytoplasma, wieder ohne Beteiligung der Nuklei, und die Fibroblasten wiesen erneut keine Immunreaktion auf (Abb. 7-10).

Bei Betrachtung der Gefäße stellte sich jetzt jedoch eine entscheidende Veränderung der Immunreaktion dar. So hatte etwa die *Tunica media* der Arterien jetzt leicht positiv reagiert (vereinzelt jedoch ohne eine Immunreaktion), wohingegen das *Intimaendothel* sich überwiegend frei von Immunreaktionen zeigte. Die *Adventitia* war hier, wie in allen Altersstufen, stets ohne eine Immunreaktion. Bei den Blutkapillaren zeigten sich ca. 50% positive Immunreaktionen. Verglichen mit den FLZ waren die Reaktionen in den Gefäßen jedoch insgesamt weniger intensiv zu bewerten. Auch in

dieser Altersstufe zeigte sich erneut ein völliges Fehlen einer Immunreaktion in den Venen, den Lymphgefäßen sowie in der *Tunica albuginea*.

3.5 Immunreaktion des HGF α am 10. Postnataltag

3.5.1 *Tubuli seminiferi*

Die Präsertolizellen hatten jetzt im Verhältnis zu den Spermatogonien zahlenmäßig abgenommen und waren mehrheitlich ohne eine Immunreaktion. Eine positive Reaktion spielte sich hier teilweise fokal in einigen Zellen ab.

Am 10. pnd hat die Vielfalt der Zellen innerhalb der *Tubuli seminiferi* schon erheblich zugenommen. Neben den frühen A-Spermatogonien, die hier größtenteils eine positive kappenförmige Immunreaktion zeigten, waren hier auch positive reagierende Stammspermatonien A, sowie differenzierte A- und B-Spermatogonien zu beobachten. Die Immunreaktion war bei diesen differenzierten Zellen eher schwach ausgeprägt und befand sich teilweise in einigen Zellen unspezifisch und unregelmäßig grob schollenartig im Zytoplasma. Sie füllten dabei maximal 20% des Tubulus aus.

Die Myofibroblasten waren überwiegend ohne positive Immunreaktion. Etwa ein Drittel reagierte positiv im Zytoplasma. Die hier außerdem zum ersten Mal vorkommenden präleptotänen und leptoänen Spermatozyten waren stets ohne eine Immunreaktion (Abb. 11 und 12).

3.5.2 Interstitium

Am 10. pnd war in den fetalen Leydig-Zell-Clustern, wie schon in den jüngeren Altersstufen, zytoplasmaseitig eine positive, grob schollenartige Immunreaktion ohne Kernbeteiligung zu beobachten. Die hier erstmalig vorkommenden adulten Leydig-Zellen (ALZ) wiesen ebenso wie die Fibroblasten keine Immunreaktion auf (Abb. 11 und 12).

Ab dem 10. pnd kippte das Verhältnis der positiven Immunreaktion jetzt völlig zu Gunsten der *Tunica media* von großen und kleinen Arterien. Diese hatte hier im

vorherrschenden Teil stark positiv reagiert (und war nur vereinzelt schwach positiv bis ohne eine Immunreaktion). Das *Intimaendothel* war jetzt zwar mehrheitlich frei von einer Immunreaktion, jedoch in ca. einem Drittel der Fälle noch als schwach positiv anzusehen. Blutkapillaren verhielten sich, wie schon in zuvor erwähnten Altersstufen, unspezifisch mit teilweise schwach positiven und fehlenden Immunreaktionen. *Adventitia*, Venen, Lymphgefäße sowie *Tunica albuginea* waren, wie in den anderen Altersstufen, frei von einer Immunreaktion (Abb.11 und 12).

3.6 Immunreaktion des HGF α am 15. Postnataltag

3.6.1 *Tubuli seminiferi*

Die Präsertolizellen reagierten, bis auf wenige Ausnahmen mit kappenförmiger Färbekombination, nicht.

Die frühen A-Spermatogonien, die hier noch spärlich vorhanden waren, beeindruckten nach wie vor mit einer kräftigen, distinkt kappenförmigen Immunreaktion im Zytoplasma am Pol des Nukleus. Ebenso zeigten die Stammspermatogonien A eine recht kräftige kappenförmige positive Immunreaktion. Spermatogonien vom Typ A/B zeigten hier zunehmend auch positive grob schollenartige Immunreaktionen im Zytoplasma. Leptotäne Spermatozyten waren in jeglicher Form frei von einer Immunreaktion, wogegen die zygotänen bzw. frühen pachytänen Spermatozyten jetzt mit deutlichen Immunreaktionen begannen. Das Muster der Immunreaktion stellte sich entweder grob schollenartig oder distinkt bipolar in Nukleus Nähe des Zytoplasmas dar.

Auch hier waren die Immunreaktionen im Zytoplasma der Myofibroblasten, wie schon bei den 10. pnd Tieren, in der Hälfte der Fälle ohne eine Immunreaktion. Die andere Hälfte, die positiv reagierte, zeigte dann aber eine schöne Reaktion im Zytoplasma und nahm im Vergleich zu den zehn Tage alten Tieren zu (Abb.13-15).

3.6.2 Interstitium

Fetale Leydig-Zell-Cluster wiesen nach wie vor ein klares Muster einer positiven Immunreaktion im Zytoplasma ohne Beteiligung der Nuklei auf. Diese war auch im

Vergleich zu allen anderen Zellen dieser Altersstufe die kräftigste (Abb. 15). In dieser Altersstufe offenbarten nun auch die adulten Leydig-Zellen eine beginnende positive Immunreaktion im Zytoplasma unter Aussparung des Nukleus (Abb. 14). Fibroblasten zeigten keine Immunreaktionen (Abb. 13).

In dieser Altersstufe hatte jetzt die *Tunica media* der Arterien in allen Fällen klar und deutlich positiv reagiert, wogegen das *Intimaendothel* stets frei von einer Immunreaktion war. Bei den Blutkapillaren verhielt sich die Immunreaktion wie gewohnt ausgewogen mit positiven und fehlenden Reaktionen. Außerdem waren Venen, Lymphgefäße sowie die *Tunica Adventitia* der Arterien immer frei von einer Immunreaktion. Es war ebenfalls keine Immunreaktion in der *Tunica albuginea* zu erkennen (Abb. 13-15).

3.7 Immunreaktion des HGF α am 25. Postnataltag

3.7.1 *Tubuli seminiferi*

Die Sertolizellen zeigten keine Immunreaktion (Abb. 16).

Am 25. pnd zeigten die leptotänen Spermatozyten nie eine Immunreaktion, wobei die zygotänen Spermatozyten im Vergleich zu den Tieren am 15. pnd ebenfalls komplett ihre Immunreaktion verloren hatten. Dafür hatten jetzt die Immunreaktionen im Zytoplasma der pachytänen bzw. späten pachytänen Spermatozyten enorm zugenommen und ließen sich dadurch eindeutig von den anderen Zelltypen abgrenzen. Das morphologische Muster dieser starken Immunreaktion hatte dabei unterschiedliche Konfigurationen. Diese war entweder ringförmig einseitig, bipolar oder zirkulär um den Nukleus lokalisiert bzw. körnig bis grob schollenartig im gesamten Zytoplasma bei Zellen, die sich in der Reduktionsteilung (Meiose I) befanden. Der Nukleus selbst war, wie bei allen anderen Zellen, in jeglicher Form frei von einer Reaktion. Des Weiteren waren in dieser Altersstufe jegliche Immunreaktionen in den Spermatogonien verschwunden und somit allesamt frei von einer Immunreaktion (Abb. 16). Einzelne Zelltrümmer und Megalospermatozyten waren vorhanden und keiner klaren Immunreaktion zuzuordnen.

Über die Hälfte wies eine deutliche und teilweise auch kräftige Immunreaktion im Zytoplasma der Myofibroblasten auf.

3.7.2 Interstitium

Fetale Leydig-Zell-Cluster tauchten in dieser Altersstufe zum letzten Mal auf und waren nach wie vor von einer starken Immunreaktion im Zytoplasma gekennzeichnet. Die Nuklei waren frei von einer Immunreaktion (Abb. 18). Bei den adulten Leydig-Zellen überwogen jetzt diejenigen mit einer positiven Immunreaktion gegenüber denjenigen, die frei von einer Immunreaktion waren. Diese Immunreaktion äußerte sich ebenfalls als kräftige homogene Anfärbung des Zytoplasmas ohne Beteiligung der Nuklei (Abb. 18 und 19). Fibrozyten und Perizyten zeigten keine Immunreaktionen.

Auch bei den Gefäßen zeigte sich eine deutliche intensive Immunreaktion in der *Tunica media* der Arterien unter Aussparung des *Intimaendothels* und der *Adventitia*. Bei den Blutkapillaren verhielt es sich ähnlich wie oben beschrieben. Auch hier war die *Tunica albuginea* stets frei von einer Immunreaktion (Abb. 17-19).

3.8 Immunreaktion des HGF α am 35. Postnataltag

3.8.1 *Tubuli seminiferi*

Sertolizellen wiesen in dieser Altersstufe ebenfalls keine Immunreaktionen auf (Abb. 20-22).

In dieser Altersstufe tauchten zum ersten Mal runde Spermatozyten auf. Diese imponierten mit einer deutlichen Immunreaktion im Zytoplasma an der Innenseite der Zellmembran bzw. an den Zellgrenzen und erzeugten somit ein gitterartiges Bild (Abb. 23). In jenen Tubuli, wo die runden Spermatozyten nicht der vorherrschende Zelltyp waren, dominierten die mid- bis spät-pachytänen Spermatozyten mit einer kräftigen Immunreaktion, die sich grob schollenartig bis körnig im gesamten Zytoplasma darstellte (Abb. 22). Sehr frühe diplotäne Spermatozyten waren hier dennoch ohne eine Immunreaktion. Megalospermatozyten waren hier zwar spärlich vorhanden, zeigten aber dennoch eine interessante, grob schollenartige, positive Immunreaktion im Zellverband von schwächerem Ausmaß.

Die Myofibrozyten reagierten überwiegend positiv, obgleich jene Immunreaktion überwiegend schwach ausfiel.

3.8.2 Interstitium

Die adulten Leydig-Zellen zeigten überwiegend sehr ausgeprägte Immunreaktionen und waren nur vereinzelt frei von solchen. Dabei war, wie schon in den anderen Altersstufen, das Zytoplasma intensiv angefärbt und der Nukleus frei von einer Immunreaktion (Abb. 20 und 21). Fibro- und Perizyten waren stets frei von jeglicher Immunreaktion.

Im Vergleich zu den 25 Tage alten Tieren hatte sich die Immunreaktion in den Arterien nicht entscheidend verändert. Lediglich die Blutkapillaren waren hier jetzt überwiegend positiv im Sinne der Immunreaktion angefärbt. Des Weiteren waren Venen, Lymphgefäße sowie die *Tunica albuginea* ohne jede Immunreaktion (Abb. 20-22). Wie die Abb. 26 zeigt, war die Immunreaktion von HGF spezifisch, da auf dem Schnitt ohne Primärantikörper keine Reaktionsprodukte entsprechend einer Negativkontrolle festzustellen waren.

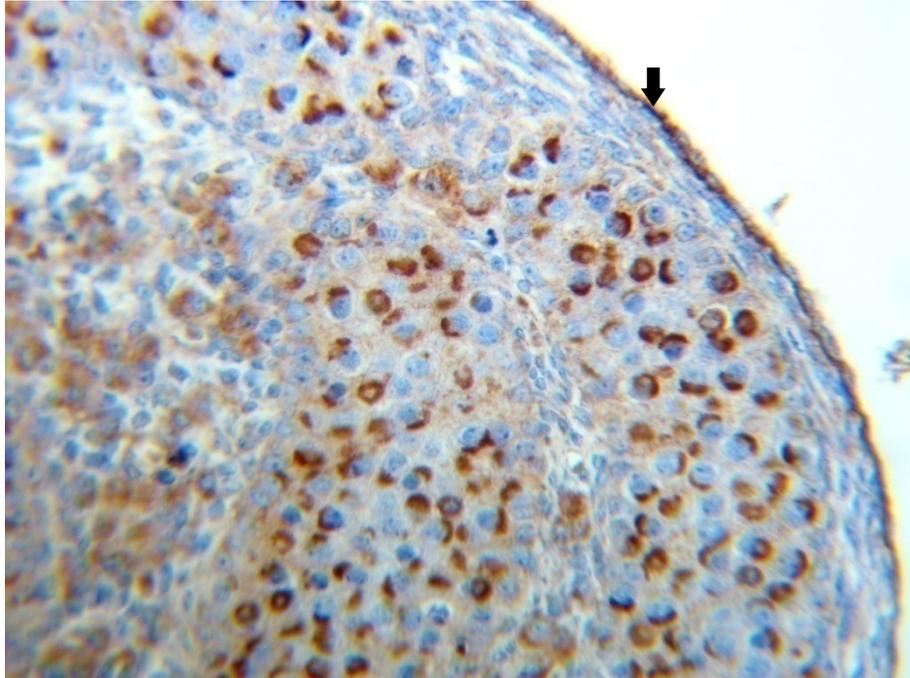


Abb. 2: Rattenhoden 18. fd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x, 1cm d. Abb. = 17µm

Übersicht der sehr stark reagierenden intratubulären Zellen sowie einige Leydig-Zell-Cluster. Der Pfeil markiert die *Tunica albuginea*.

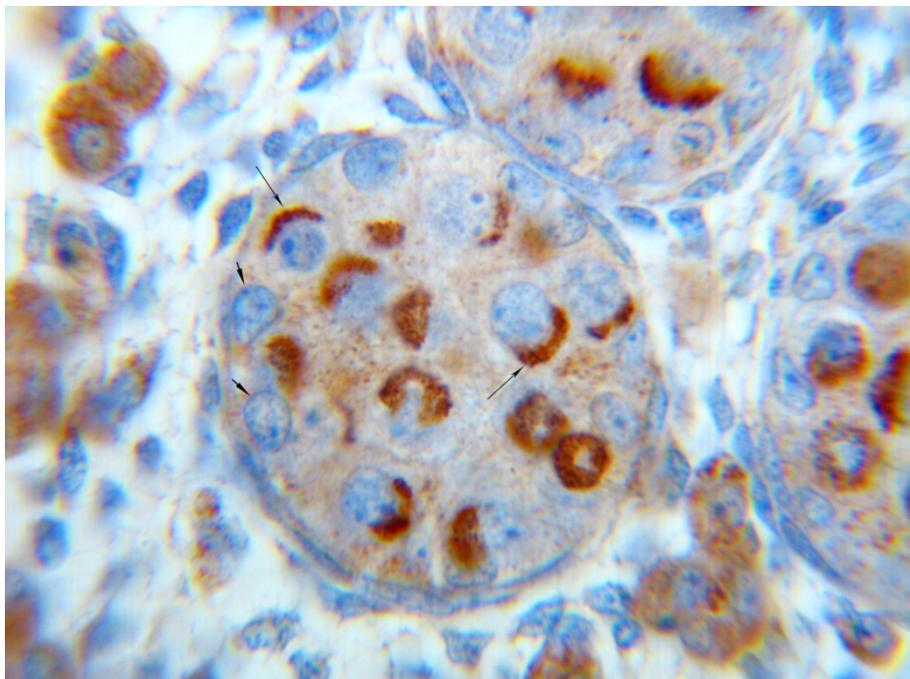


Abb. 3: Rattenhoden 18. fd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7µm

Querschnitt durch einen *Tubulus seminiferus*. Deutliche kappenförmige Immunreaktion an T1-Pro-Spermatogonie (lange Pfeile) und negativ reagierende Sertolizell-Vorläufer (kurze Pfeile). Randständig positive fetale Leydig-Zell-Cluster.

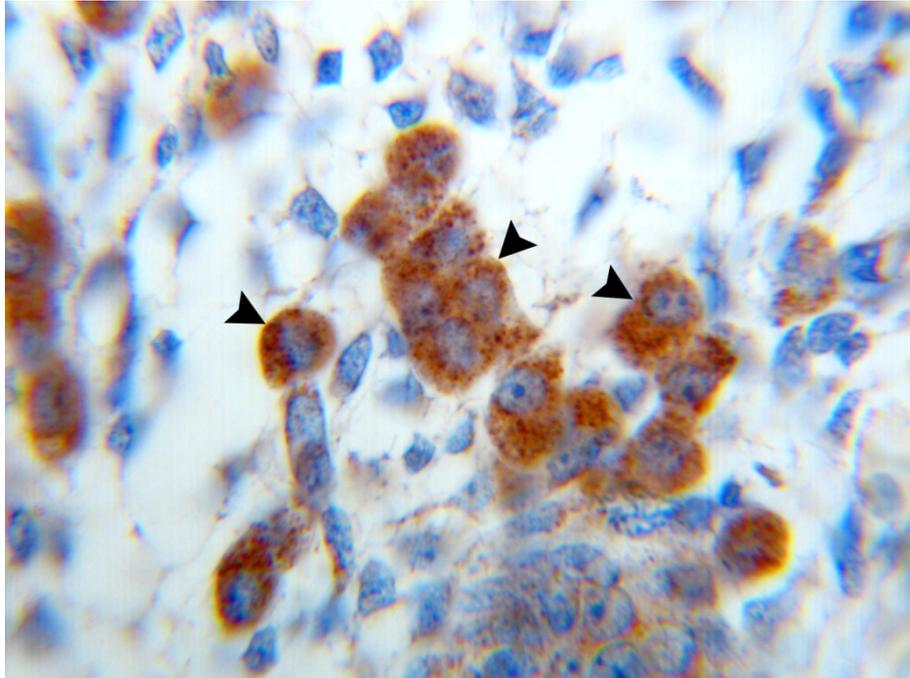


Abb. 4: Rattenhoden 18. fd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7 μ m

Gruppe stark positiv reagierender fetaler Leydig-Zell-Cluster im Interstitium (Pfeile). Die Kerne sowie andere interstitielle Zellen sind frei von einer Immunreaktion.

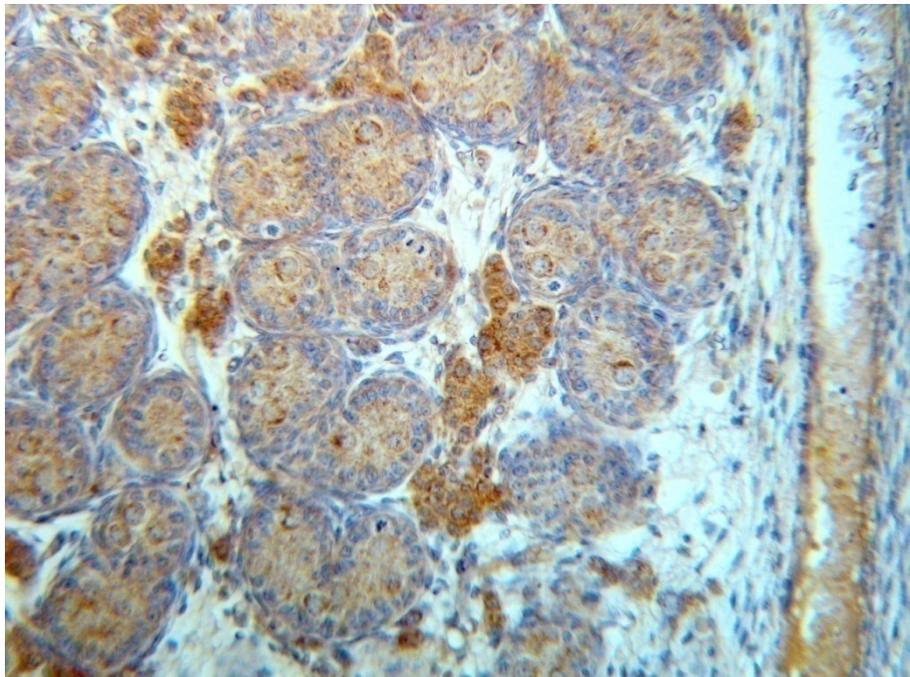


Abb. 5: Rattenhoden 1.pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x, 1cm d. Abb. = 17 μ m

Übersicht, mehrerer *Tubuli seminiferi* im Querschnitt mit zahlreichen fetalen Leydig-Zell-Clustern. Blutgefäß im Längsschnitt, rechts.

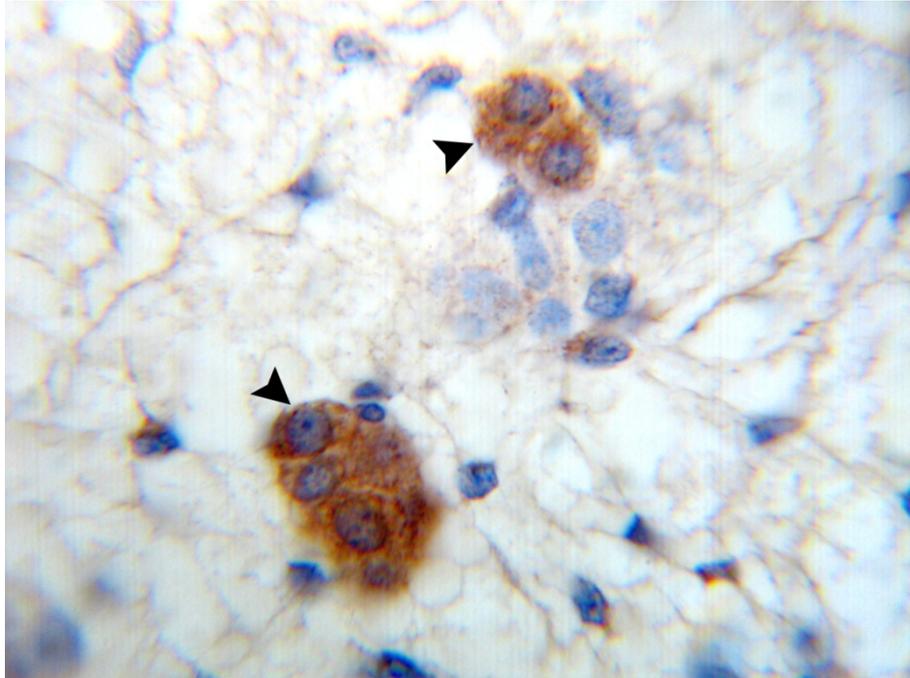


Abb. 6: Rattenhoden **1.pnd**, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7µm

Zwei stark positiv reagierende fetale Leydig-Zell-Cluster im Interstitium (Pfeile). Die Kerne sowie andere interstitielle Zellen sind frei von einer Immunreaktion.

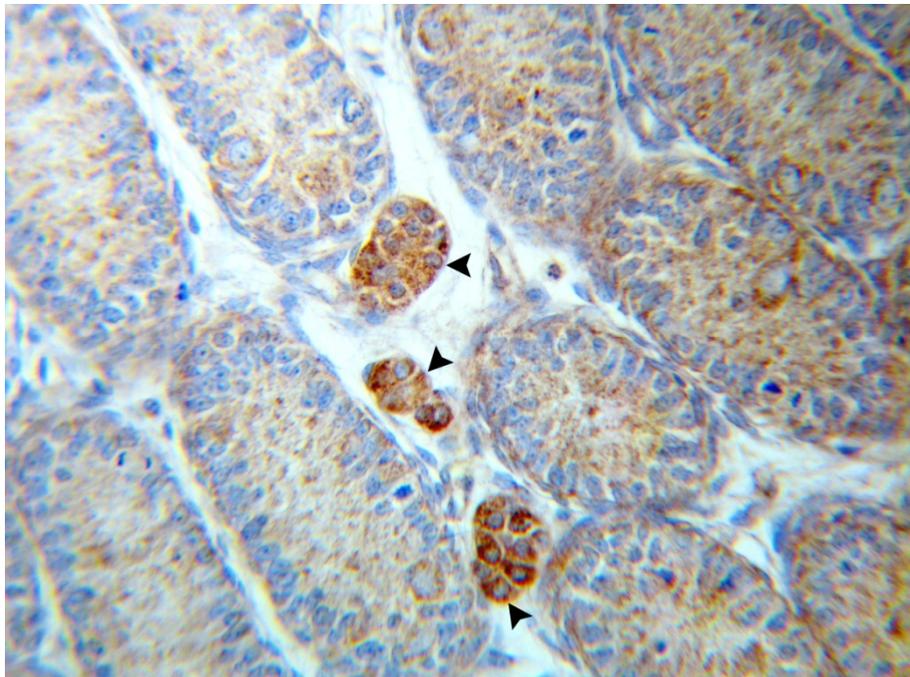


Abb. 7: Rattenhoden **5.pnd**, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x, 1cm d. Abb. = 17µm

Drei stark positiv reagierende fetale Leydig-Zell-Cluster im Interstitium (Pfeile). Vereinzelt Immunreaktionen in den *Tubuli seminiferi*.

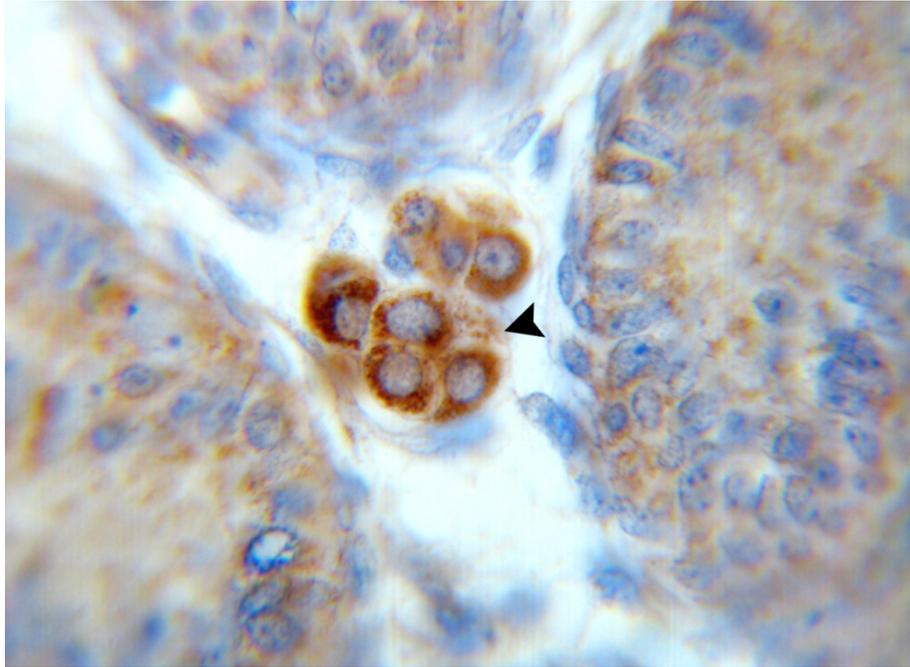


Abb. 8: Rattenhoden 5.pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7µm

Anschnitt eines fetalen Leydig-Zell-Clusters (Pfeil) im Interstitium. Die Immunreaktion ist perinukleär lokalisiert.

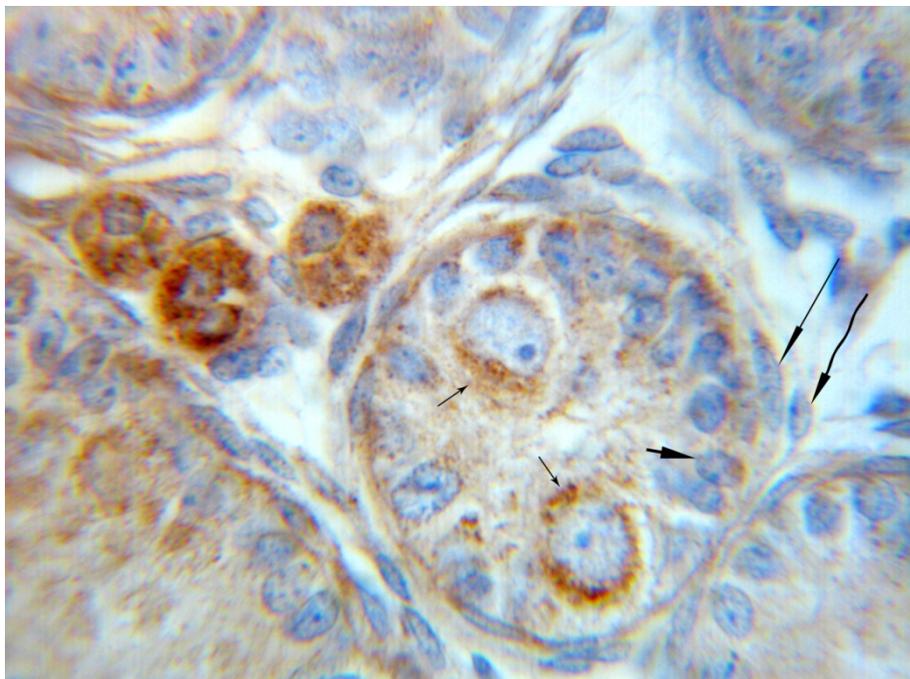


Abb. 9: Rattenhoden 5. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7µm

Querschnitt durch einen *Tubulus seminiferus*. Saumartige Immunreaktion an T1-Pro-Spermatogonien (schmale kleine Pfeile). Keine Immunreaktion in Sertolizell-Vorläufern (kl. dicker Pfeil). Negative peritubuläre Zellen: Innere Schicht (langer Pfeil), äußere Schicht (geschlängelter Pfeil).

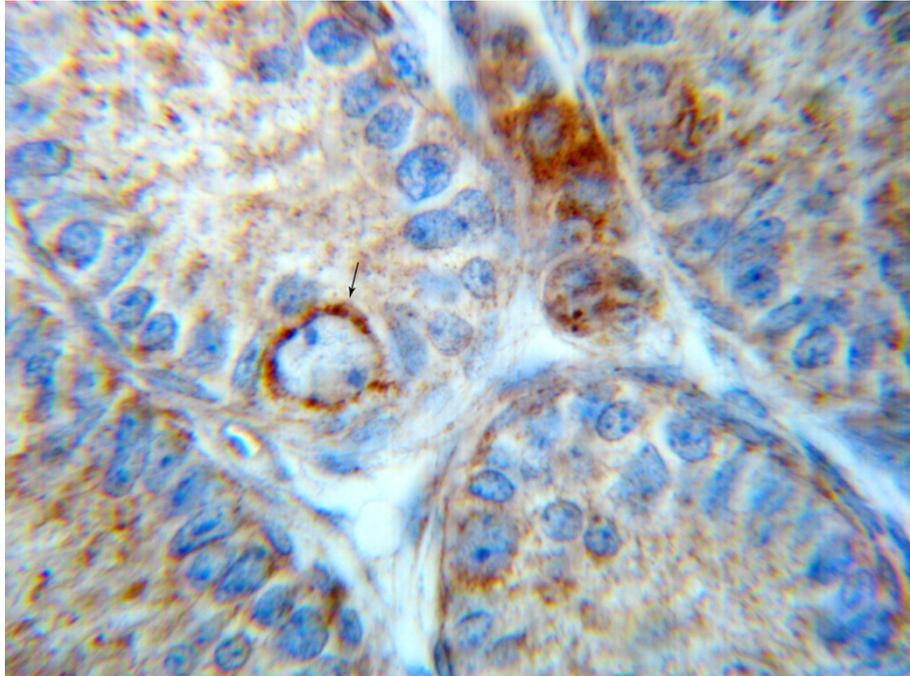


Abb. 10: Rattenhoden 5.pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7 μ m

Übergang von T1-Pro-Spermatogonie zu früher A-Spermatogonie mit saumartiger Immunreaktion im Zytoplasma (Pfeil).

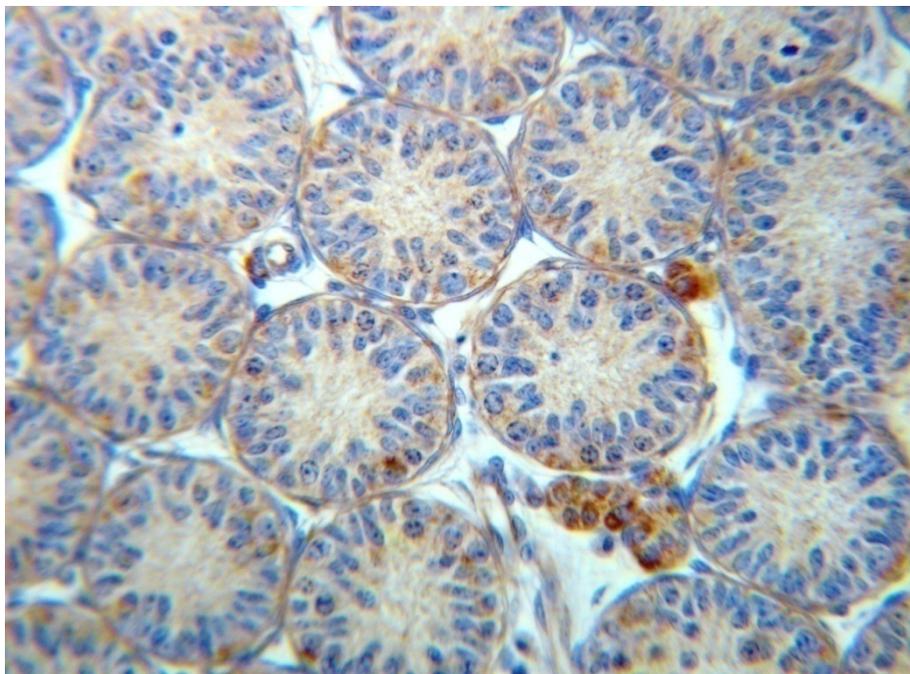


Abb. 11: Rattenhoden 10.pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x, 1cm d. Abb. = 17 μ m

Querschnitt durch mehrere *Tubuli seminiferi*. Vereinzelt positiv reagierende fetale Leydig-Zellen im Interstitium.

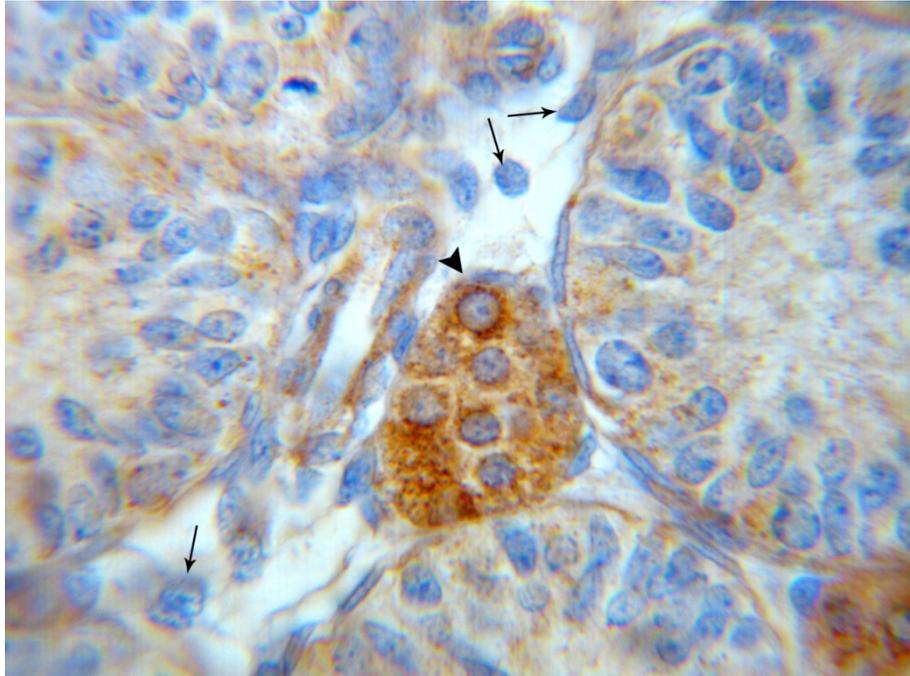


Abb. 12: Rattenhoden 10. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7µm

Stark positiver fetaler Leydig-Zell-Cluster (dicker Pfeil).
Gänzlich negative adulte Leydig-Zellen (dünne Pfeile).
Schwach reagierende Arteriole im Schrägschnitt.

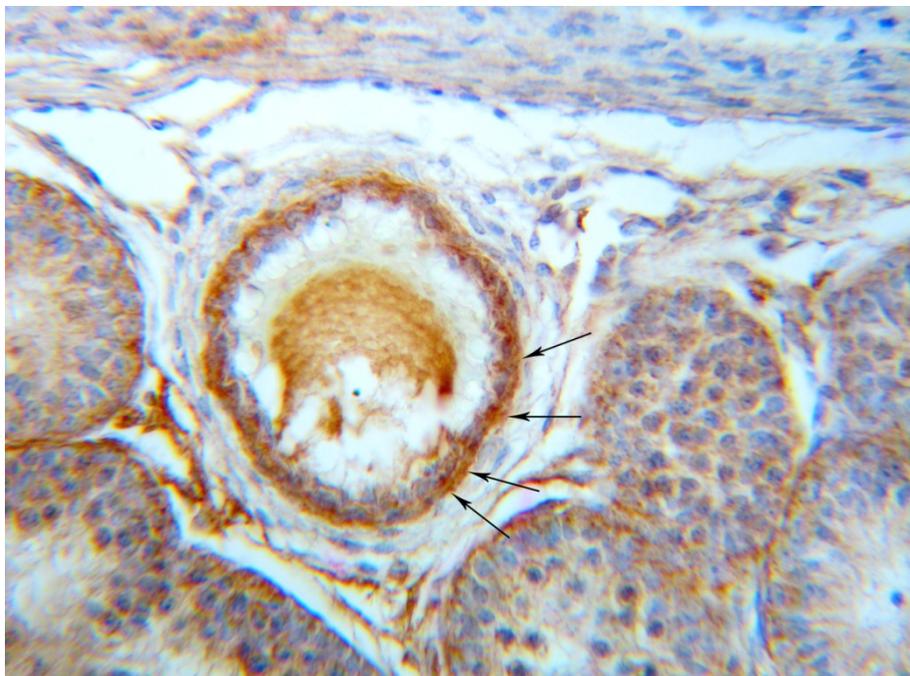


Abb. 13: Rattenhoden 15. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x, 1cm d. Abb. = 17µm

Arteriole im Querschnitt. Positive Immunreaktion in der Tunica media (Pfeile). Intimaendothel und Adventitia ohne Immunreaktion.

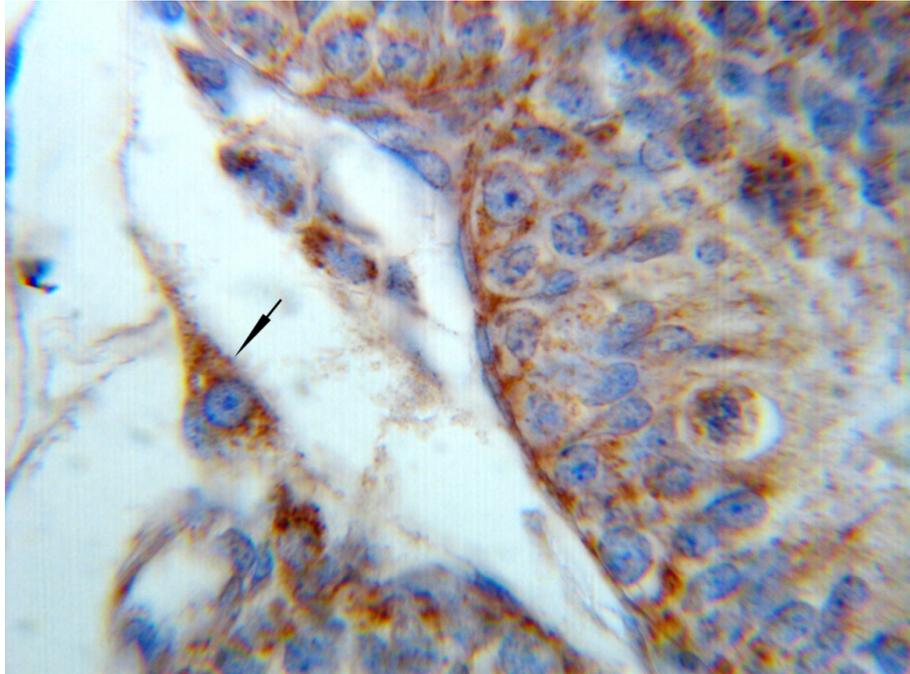


Abb. 14: Rattenhoden 15. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7µm

Solitäre adulte Leydig-Zelle (Pfeil) mit stark positivem Zytoplasma und klar abgrenzbarem Nukleus ohne Immunreaktion.

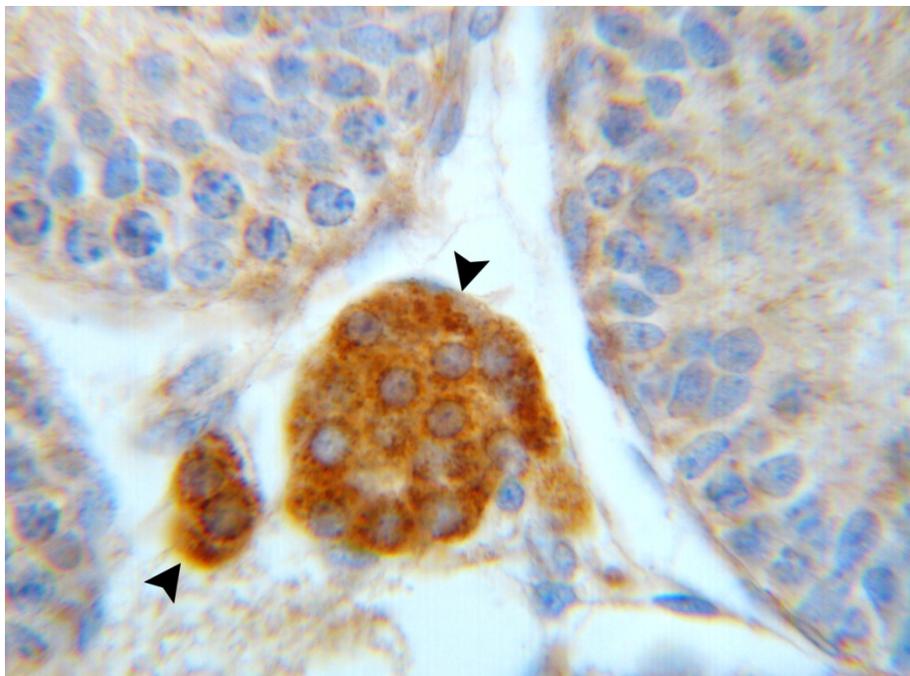


Abb. 15: Rattenhoden 15. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7µm

Zwei fetale Leydigzell-Cluster (Pfeile) mit stark positivem Zytoplasma und klar abgrenzbaren Nuklei ohne Immunreaktion.

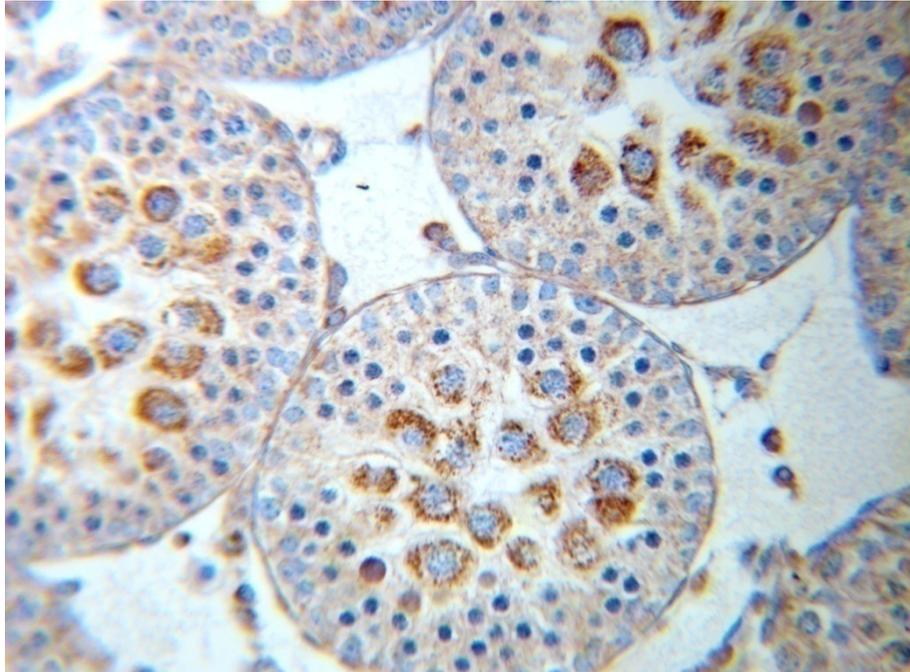


Abb. 16: Rattenhoden 25. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x, 1cm d. Abb. = 17µm

Drei *Tubuli seminiferi* im Querschnitt mit zytoplasmatisch grob schollenartiger positiver Immunreaktion der pachytänen Spermatozyten. Spermato gonien, leptotäne Spermatozyten sowie die Sertolizellen sind ohne eine Immunreaktion.

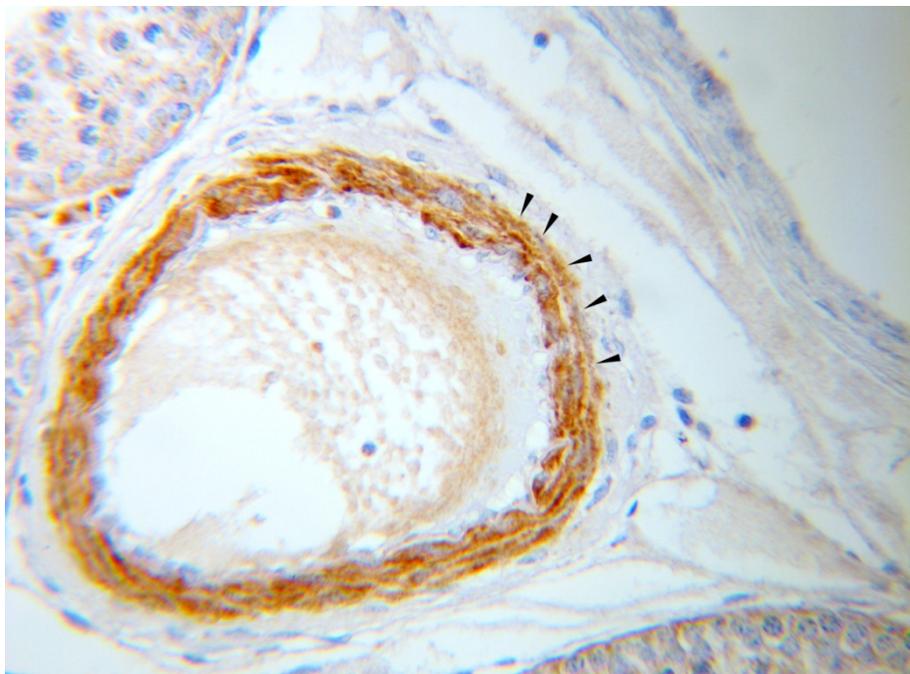


Abb. 17: Rattenhoden 25. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7µm

Arterie im Querschnitt. Komplette positive Immunreaktion der *Tunica media* (Pfeile). *Intimaendothel* und *Adventitia* ohne Immunreaktion.

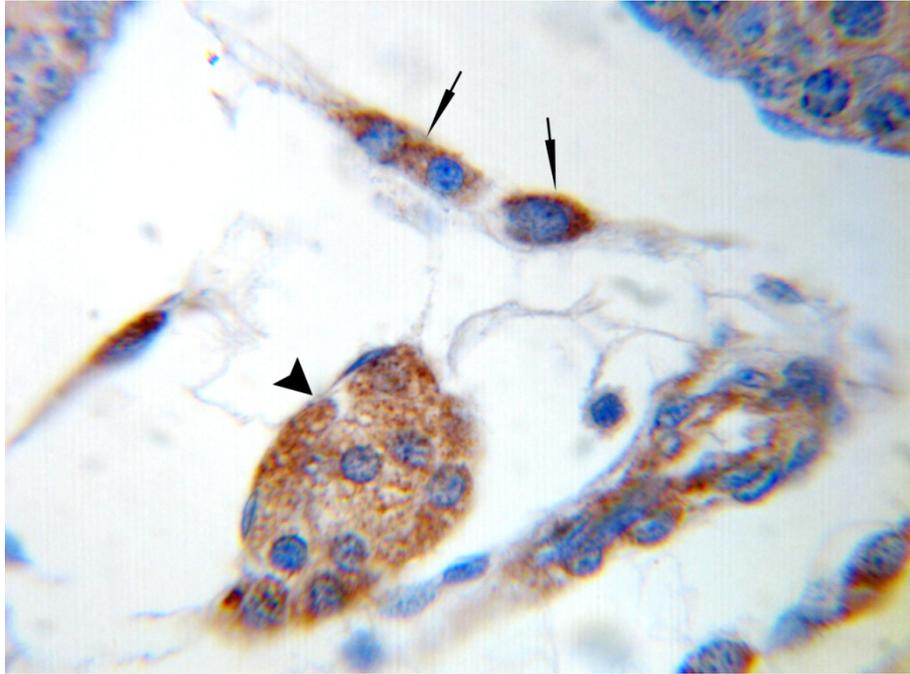


Abb. 18: Rattenhoden 25. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7µm

Positive Immunreaktion der fetalen Leydig-Zellen (dicker Pfeil) und adulte Leydig-Zellen (dünne Pfeile).

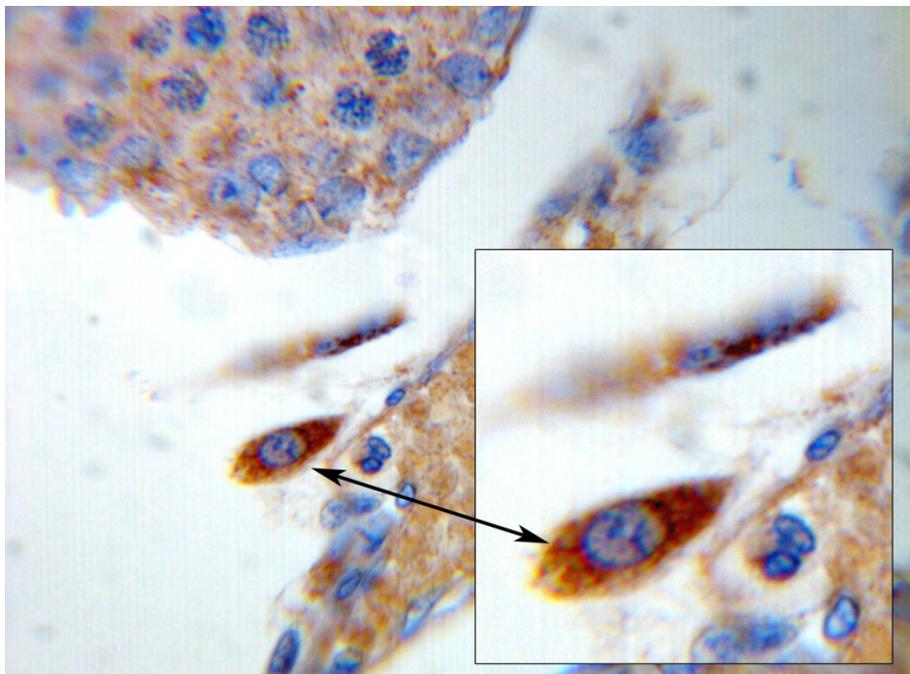


Abb. 19: Rattenhoden 25. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x (Inset 3000 x), 1cm d. Abb. = 7µm

Interstitium mit stark positiver Immunreaktion einer adulten Leydig-Zelle (Inset), neben einer Venole, der eine Immunreaktion fehlt.

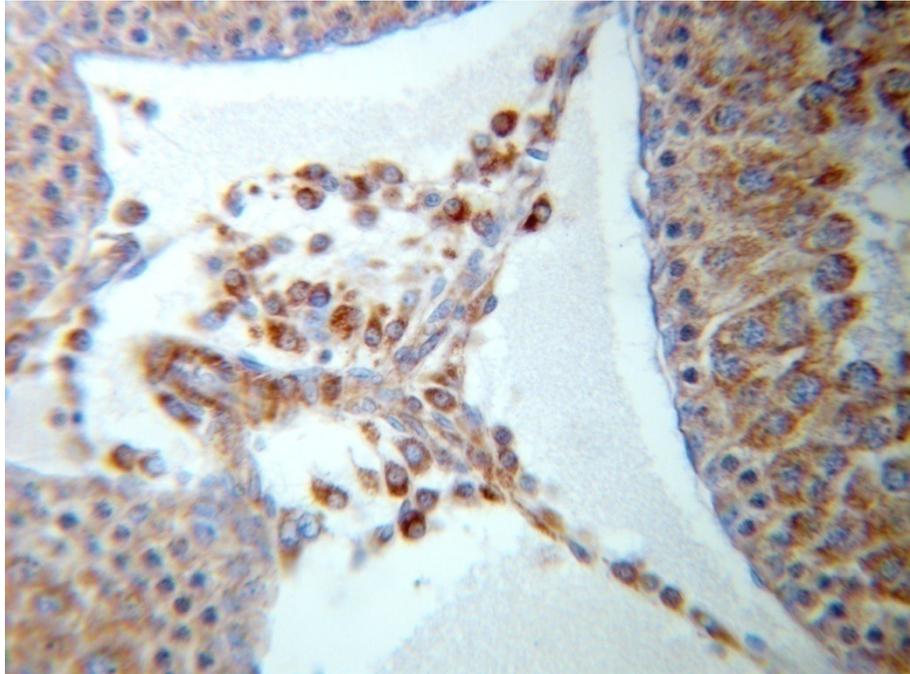


Abb. 20: Rattenhoden 35. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x, 1cm d. Abb. = 17 μ m

Interstitium mit Gruppen stark positiver Immunreaktion der adulten Leydig-Zellen. Vereinzelt Fibroblasten und Makrophagen ohne eine Immunreaktion.

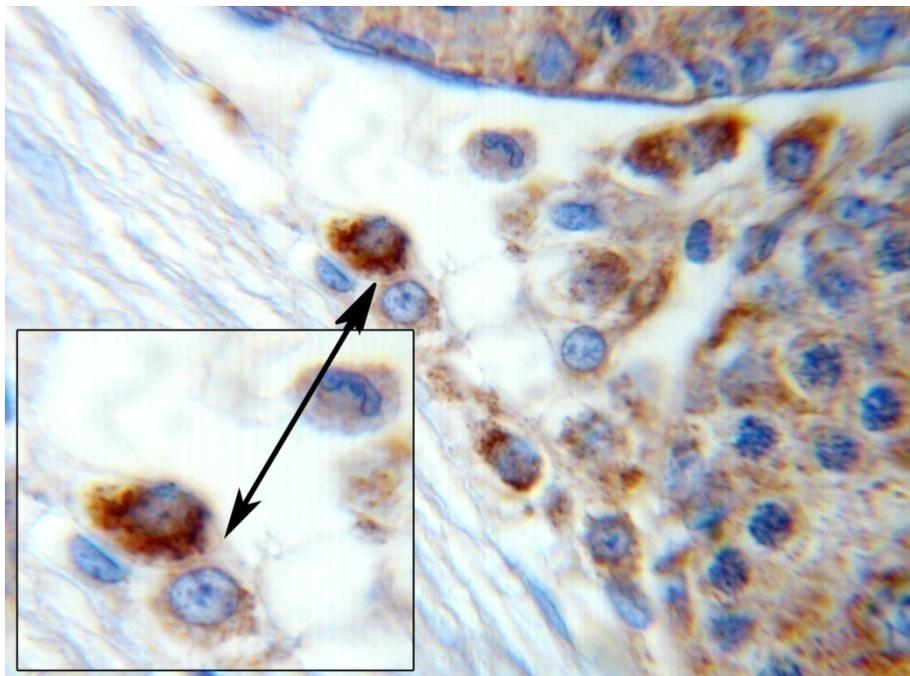


Abb. 21: Rattenhoden 35. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x (Inset 2550 x), 1cm d. Abb. = 7 μ m

Ausschnitt aus Interstitium mit stark positiver Immunreaktion einer adulten Leydig-Zelle, im Vergleich zu einer adulten Leydig-Zelle, die keine Immunreaktion aufweist. Vereinzelt Fibroblasten und Granulozyten, ebenfalls ohne eine Immunreaktion.

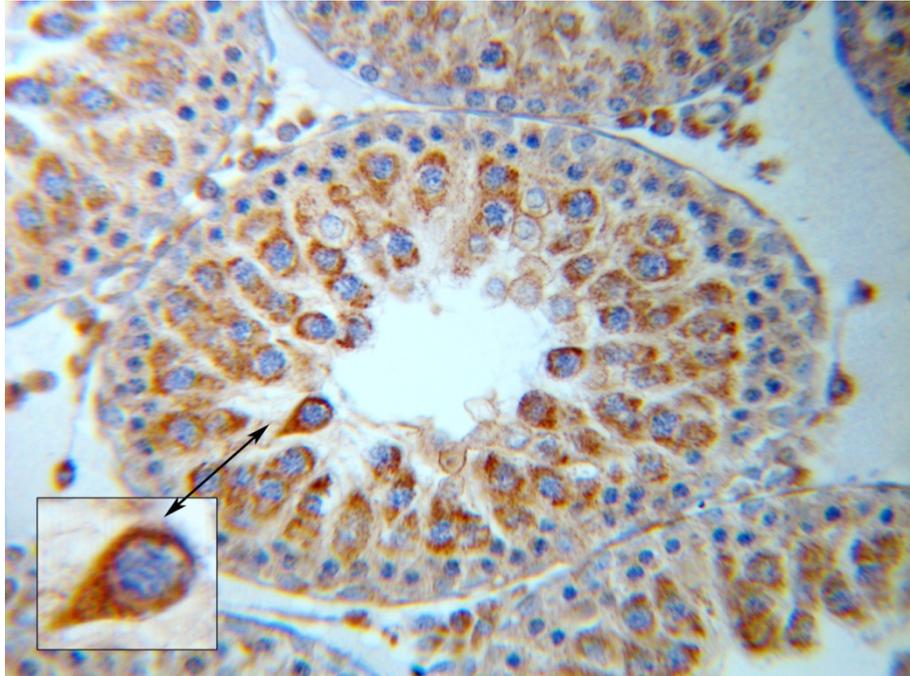


Abb. 22: Rattenhoden 35. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x (Inset 1575 x), 1cm d. Abb. = 17µm

Tubulus seminiferus im Querschnitt. Stark positive Immunreaktion der spät-pachytänen Spermatozyten sowie runden Spermatischen (Inset) grob schollenartig im Zytoplasma. Sertolizellen sowie Spermato gonien ohne Immunreaktion. Vereinzelt positive adulte Leydig-Zellen im Interstitium.

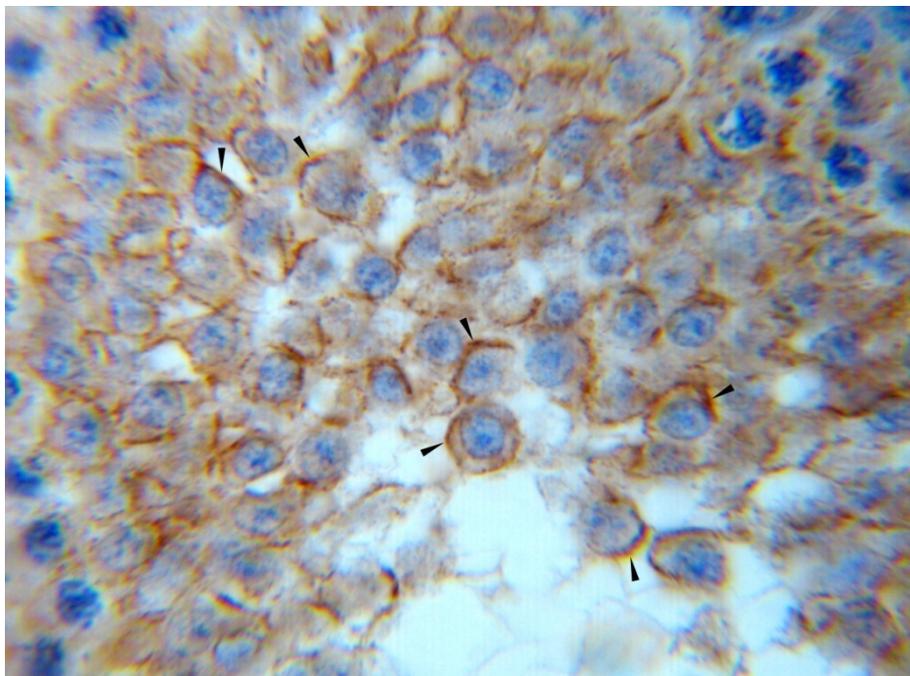


Abb. 23: Rattenhoden 35. pnd, Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7µm

Inhalt eines *Tubulus seminiferus* im Querschnitt. Stark positive Immunreaktion saumartig und membranständig im Zytoplasma der runden Spermatischen mit typischer Gitterstruktur (Pfeile).

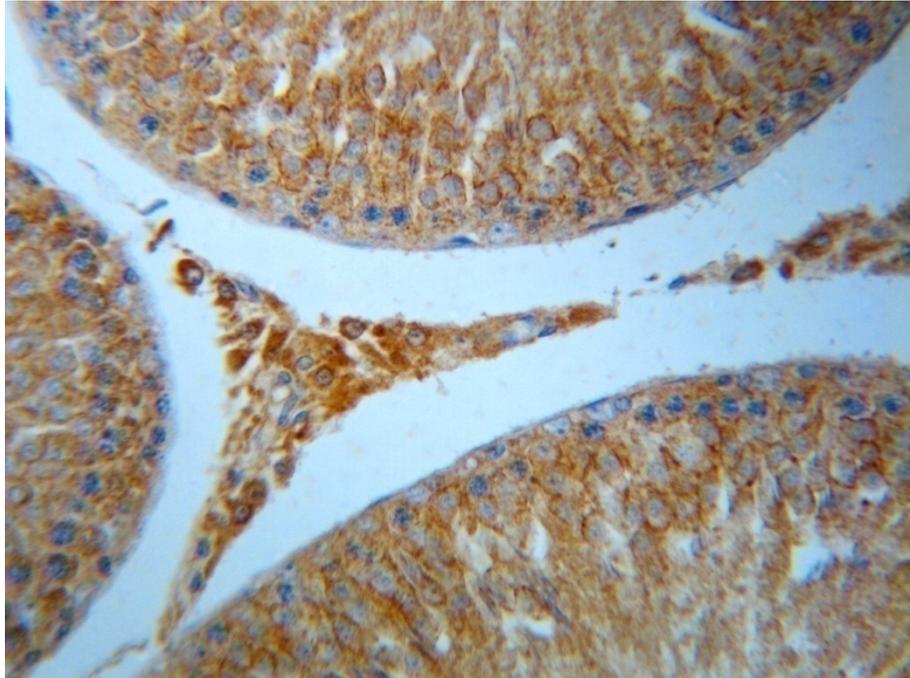


Abb. 24: Rattenhoden, adult (**100.pnd**), Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x, 1cm d. Abb. = 17 μ m

Kräftige positive Immunreaktion grob schollenartig im Zytoplasma der adulten Leydig-Zellen.

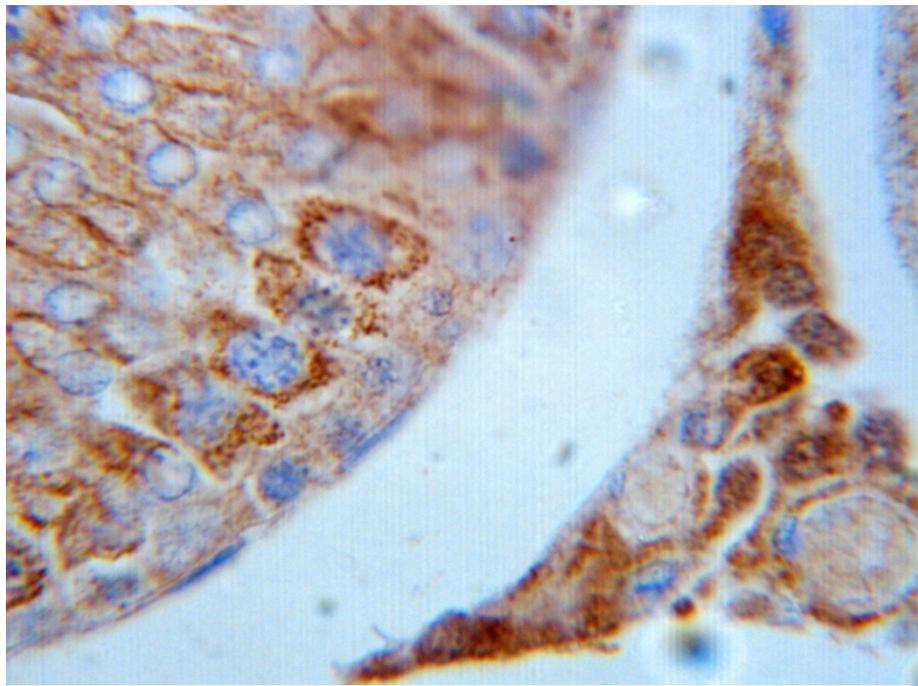


Abb. 25: Rattenhoden, adult (**100.pnd**), Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7 μ m

Kräftige positive Immunreaktion grob schollenartig im Zytoplasma der adulten Leydig-Zellen. Anschnitt *Tubulus seminiferus*, grob schollenartige positive Zytoplasmareaktion in pachytänen Spermatozyten.

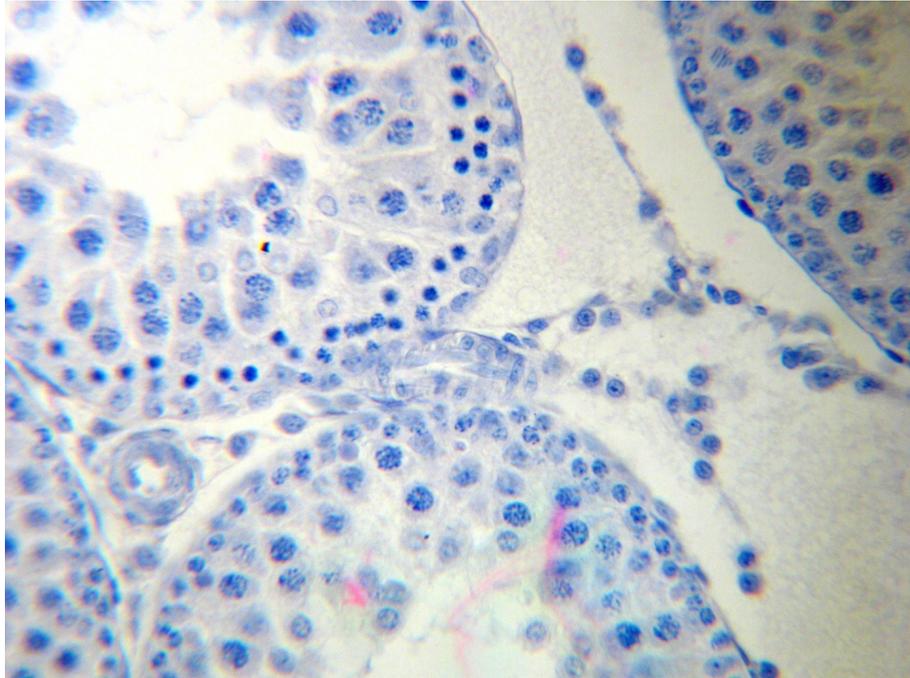


Abb. 26: Rattenhoden, 35.pnd, Paraffinschnitt, *Endvergrößerung 600 x, 1cm d.*
Abb. = 17 μ m. Negativkontrolle.

Immunreaktion ohne Primär-Antikörper und Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Eine Immunreaktion fehlt.

3.9 Semiquantitative Analyse der Immunreaktion in den Leydig-Zellen

3.9.1 Fetale Leydig-Zellen

3.9.1.1 Immunhistochemische Verteilung von HGF- α in fetalen Leydig-Zellen

Morphologisch und qualitativ stellten sich die Immunreaktionen in den einzelnen Clustern als grob schollenartig bis homogen positiv im Zytoplasma dar. Dabei war bei den FLZ am 25. pnd die Immunreaktion im Vergleich zu den kräftigen Reaktionen der ALZ und der *Tunica media* der Arterien insgesamt weniger ausgeprägt, wogegen am 15. pnd die Immunreaktion der FLZ, im Vergleich zu Tubulinhalt und ALZ, als sehr kräftig angesehen werden konnte. Genauso verhielt es sich am 10. pnd mit klar dominierender Immunreaktion der FLZ-Cluster. Ab dem 5. pnd glich die Intensität der Immunreaktion der FLZ denen der Tubulinhalt, vornehmlich der Pro-spermatogonien. Das Verhältnis der Intensität blieb auch bei den Tieren am 1. pnd gleich, jedoch etwas verstärkt, um dann mit der insgesamt kräftigsten Reaktion, sowohl der Pro-spermatogonien als auch FLZ am 18. fd, zu gipfeln (Abb. 2-12; 15 und 18). Am 17. fd zeigte sich keine spezifische Immunreaktion.

3.9.1.2 Zellzählungen fetaler Leydig-Zellen

Die beiden Kurven von positiven und negativen FLZ zeigten auch interpoliert keinerlei Vergleichbarkeit, weshalb sich weitere statistische Tests hier erübrigten. Quantitativ zeigte sich bei den positiven FLZ mit ca. 400/mm² am 18. Fetaltag ein Maximum der Immunreaktion. Das Diagramm mit Skalierung der t-Achse zeigt ab dem 18. fd eine Abnahme entsprechend einer weniger ausgeprägten Immunreaktion mit zunehmendem Alter. Es reagierten sämtliche Immunreaktionen in den FLZ positiv. Das Vorkommen der FLZ war am 15. pnd mit im Median von ca. 6/mm² schon eher mäßig, um dann schließlich, nachdem am 25. pnd vereinzelt (ca. 0,5/mm² FLZ) aber deutlich positive Cluster noch auftauchten, ganz zu verschwinden. Des Weiteren besaßen die jüngeren Tiere eine hohe Streubreite (Abb.27a/ b).

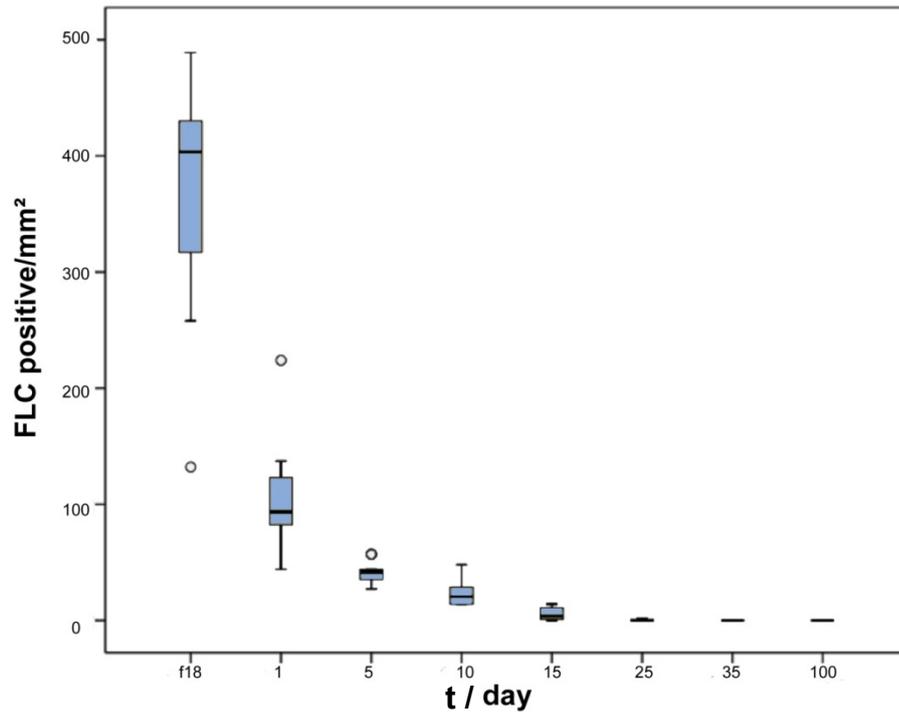


Abb. 27a: Explorative Datenanalyse von positiv und nicht reagierenden fetalen Leydig-Zellen vom 18. Fetaltag bis 25. Postnataltag (quantitativ), Boxplots. t-Achse logarithmisch

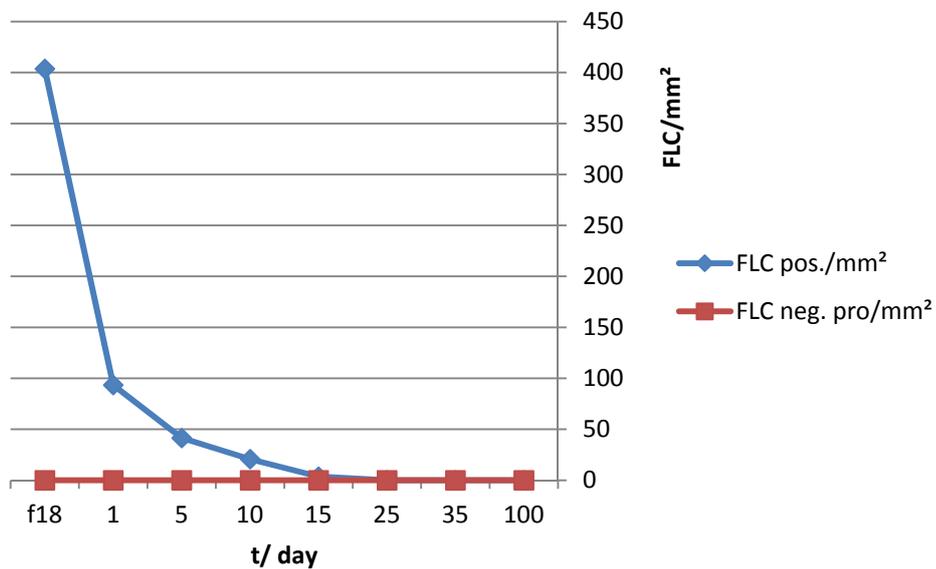


Abb. 27b: Explorative Datenanalyse von positiv und nicht reagierenden fetalen Leydig-Zellen vom 18. Fetaltag bis 25. Postnataltag (quantitativ), logarithmisch, interpoliert.

3.9.2 Adulte Leydig-Zellen

3.9.2.1 Immunhistochemische Verteilung von HGF α in adulten Leydig-Zellen

Wie auch schon bei den FLZ stellten sich morphologisch und qualitativ die Immunreaktionen in den ALZ als grob schollenartig bis homogen positiv im Zytoplasma dar. Am 100. pnd zeigten sich histomorphologisch kräftigste Reaktionen (Abb. 27 und 28), die oft auch von unspezifischen Hintergrundfärbungen überlagert wurden. Von der Intensität her waren sie jedoch in etwa mit den Tubuliinhalten (v. a. den pachytänen Spermatozyten) in Stadien der mittleren Spermatogenesestadien vergleichbar, insb. Stadium VII–VIII. Am 35. pnd dominierten die ALZ sowohl wie oben beschrieben zahlenmäßig als auch von der Intensität der Immunreaktion (Abb. 20-22). Hier zeigte sich ein klares homogenes Bild von stark reagierendem Zytoplasma der ALZ und wenig unspezifischer Hintergrundfärbung. Dabei fand zwar in den *Tubuli seminiferi* ebenfalls eine kräftige Immunreaktion statt, diese wurde aber von den adulten Leydig-Zellen eindeutig übertroffen. Am 25. pnd verhielt es sich ähnlich (Abb. 16, 18 und 19). Am 15. pnd jedoch, wo letztmalig positive ALZ auftraten, tauchten zwar vereinzelt kräftig reagierende ALZ auf, wurden aber dennoch von der Intensität der FLZ übertroffen (Abb. 14 und 15). Ab dem 10. pnd reagierten sämtliche ALZ negativ (Abb. 12).

3.9.2.2 Zellzählungen adulter Leydig-Zellen

Im vorliegenden Diagramm (Abb. 28 a/b) lässt sich eindeutig erkennen, dass am 10. pnd noch sämtliche ALZ negativ reagieren und mit zunehmendem Alter, in diesem Falle ab dem 15. pnd von der Anzahl zunehmen, aber v. a. positiv werden. Über die Stufe des 25. pnd erreichen die ALZ schließlich am 35. pnd einen zahlenmäßigen und auch immunreaktiven Peak mit ca. 120 Zellen pro mm², um dann mit zunehmender Reife bis zum 100. pnd zahlenmäßig wieder abzunehmen.

Die Kurve der negativen ALZ zeigt einen analogen Anstieg mit starker Streubreite. Trotz der hohen Streubreite liegen die Mediane nicht überlappend. Hier ist ein zahlenmäßiger Peak beim 25. pnd zu erkennen mit im Median ca. 30 Zellen pro mm², der mit zunehmender Reife wieder abflacht. Im Alter von 100 Tagen finden sich immer noch ca. 10 negative ALZ pro mm². Aufgrund der eben beschriebenen

statistischen Tests, sind die Kurven der adulten Leydig-Zellen hoch signifikant verschieden. Dabei sind beim Chi-Test laut 0-Hypothese die Kurven verschieden. Das Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson weist eine asymptotische zweiseitige Signifikanz bei $P=0$ auf. Damit sind die Gruppen ALZ positiv und negativ hoch signifikant verschieden.

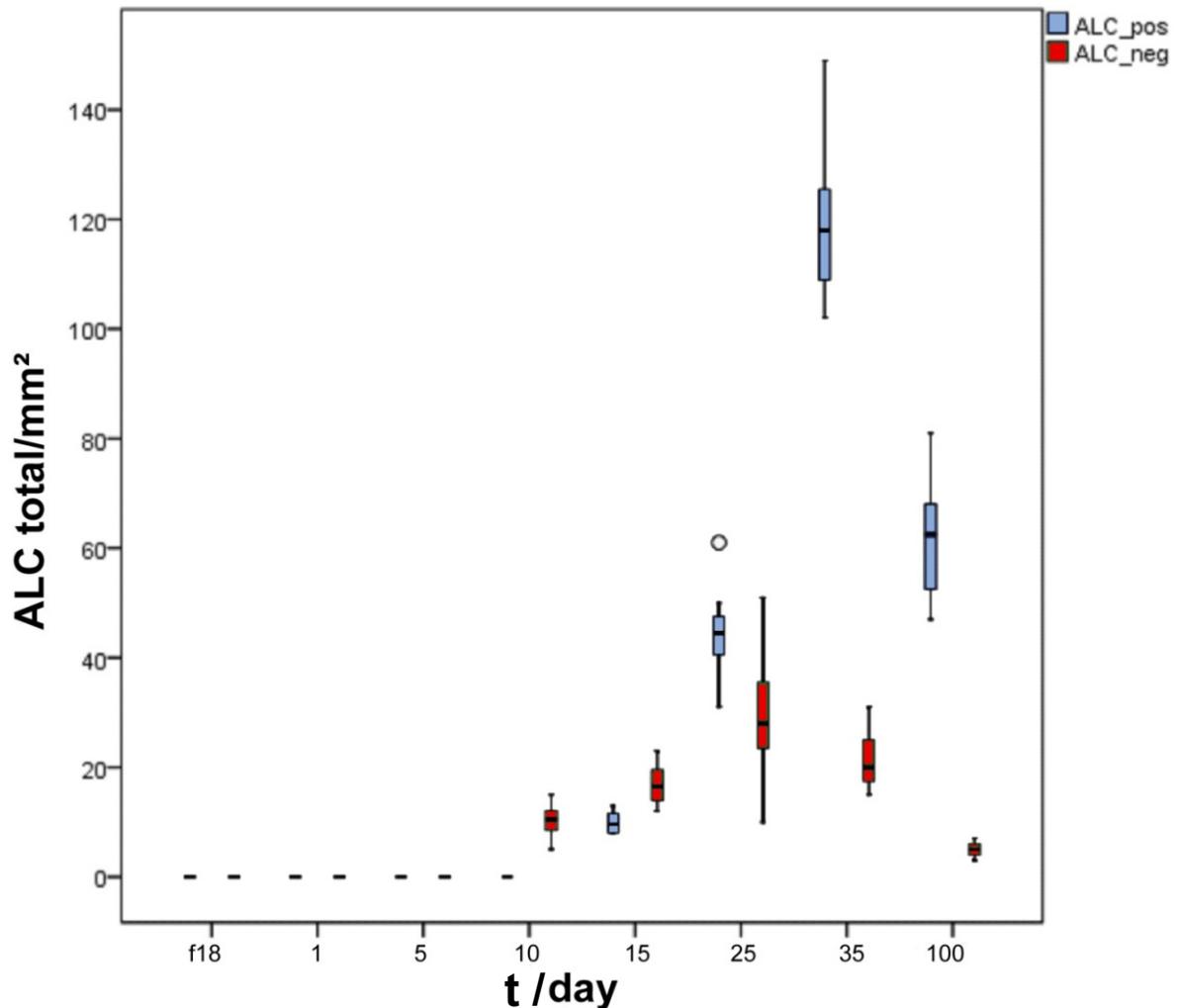


Abb. 28a: Explorative Datenanalyse von positiven und nicht reagierenden adulten Leydig-Zellen vom 10. - 100. Postnataltag (quantitativ), Übersichtsdiagramm, Boxplots.

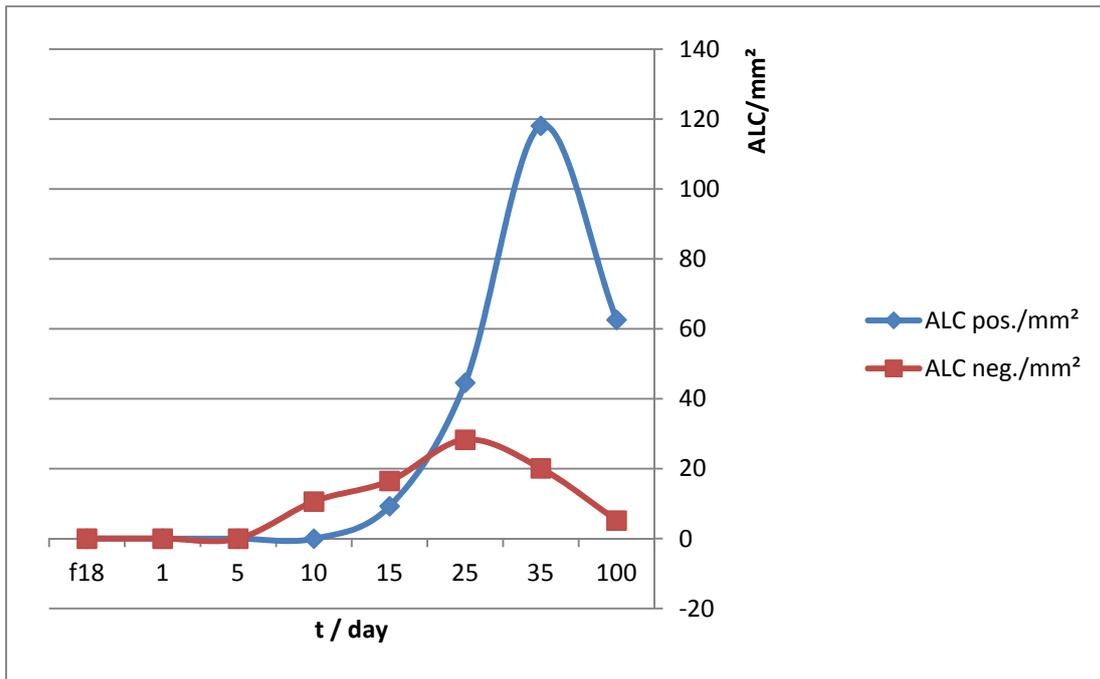


Abb. 28b: Explorative Datenanalyse von positiven und nicht reagierenden adulten Leydig-Zellen vom 10. - 100. Postnataltag (quantitativ), Übersichtsdiagramm, logarithmisch, interpoliert.

3.10 Verteilung von HGF α bezogen auf die Spermatogenesestadien der adulten Ratte

3.10.1 Erläuterung mittels Beispielen am 100. Postnataltag

Die Beurteilung der Spermatogenesestadien erfolgte auf der Grundlage von Hess (1990), in der die folgenden Stadien I-XIV beschrieben wurden. Zur Vereinfachung wurden die Stadien teilweise zusammengefasst.

Insgesamt kann man sagen, dass sich die Immunreaktion in einer aufsteigenden Reihe bezogen auf die Intensität, Färbeverhalten und Klarheit der Reaktion, mit einem Höchstmaß an Immunreaktion und wieder beginnender absteigender Reihe darstellte. Sämtliche Immunreaktionen fanden dabei im Zytoplasma statt. Die Nuklei wurden von der Immunreaktion stets ausgespart und reagierten allesamt negativ.

Hierbei waren im Stadium I und II der Spermatogenese die Immunreaktionen sämtlicher Tubuliinhalte stets ohne eine solche und wiesen lediglich eine unspezifische Hintergrundfärbung auf. Im Stadium III und IV waren erstmals Immunreaktionen zu beobachten. Dabei zeigten die runden Spermatiden eine beginnende schwache Immunreaktion, randständig im Zytoplasma bzw. genau an den Zellgrenzen. Vereinzelt waren auch die pachytänen Spermatozyten grob schollenartig mit einer positiven Immunreaktion versehen, im engeren Sinn jedoch frei von einer Reaktion. Ab hier begann die Immunreaktion mit höheren Stadien immer stärker zuzunehmen. Stadium V zeichnete sich dadurch aus, dass die runden Spermatiden in ca. der Hälfte der Fälle schwach bis mittelstark an der Zytoplasma-Zellmembrangrenze reagierten, also allesamt positiv reagierten, wogegen sich die pachytänen Spermatozyten zwar auch überwiegend schwach positiv zeigten (wieder grob schollenartig im Zytoplasma), jedoch auch einige Zellen ohne eine Immunreaktion waren. Stadium VI-VII ergab, bezogen auf die Immunreaktion, ein insgesamt bunteres Bild (Abb. 29a/b). Die Immunreaktion zeigte ab hier ein distinktes Bild. Die negativ reagierenden Sertolizellen sind ebenfalls gut zu erkennen (Abb. 29b). Die pachytänen Spermatozyten reagierten allesamt in gleichen Teilen normal bis mittelstark positiv im gesamten Zytoplasma, so dass sich morphologisch basal ein radiärer Wall von stark gefärbten pachytänen Spermatozyten zeigte, der zum Zentrum hin von einer gitterartigen Darstellung (randständige Zytoplasmareaktion) von überwiegend positiv

reagierenden runden Spermatiden gesäumt wurde. Jedoch waren diese nicht immer positiv (29a/b).

Ab Stadium VIII ergab sich ein schönes homogenes Reaktionsmuster und gipfelte sogleich mit der Intensität der Immunreaktion (Abb. 30a/b). Pachytäne Spermatozyten wiesen hier die kräftigste Immunreaktion von körnerartiger Struktur im Zytoplasma auf. Dabei lässt sich gut die nicht stattgefundene Immunreaktion der Nuklei beobachten. Ebenso zeigten die runden Spermatiden gänzlich kräftigste Immunreaktionen in der Peripherie des Zytoplasmas der Zellgrenzen und stellten hier wieder, wie schon oben beschrieben, ein klares gitterartiges Bild dar (Abb. 30a/b). In Stadium IX nahm die gerade beschriebene Immunreaktion bei den runden Spermatiden etwas ab, sie war ansonsten aber der in Stadium VIII befindlichen sehr ähnlich. Anders verhielt es sich in Stadium X. Da hier fast ausschließlich elongierte Spermatiden vorzufinden waren, zeigte sich eine insgesamt schwache, diffuse, körnerartige Immunreaktion im Zytoplasma, wogegen die pachytänen Spermatozyten nach wie vor sehr stark wie in beschriebener Weise von körnerartiger Struktur im Zytoplasma reagierten. Die Tendenz der wieder nachlassenden Immunreaktionen mit zunehmenden Spermatogenesestadien wurde dadurch bekräftigt, dass sich in den Stadien XI und XII die pachytänen Spermatozyten überwiegend ohne eine Immunreaktion darstellten, wogegen die diplotänen Spermatozyten jetzt schwach bis mittelstark grob schollenartig im Zytoplasma reagierten. Die elongierten Spermatiden zeigten ebenfalls noch eine sehr schwache Zytoplasmaimmunreaktion (Abb. 31). In Stadium XIII schwächte sich diese Reaktion noch mehr ab, um sich dann schließlich in Stadium XIV gänzlich zu verlieren (Abb. 32).

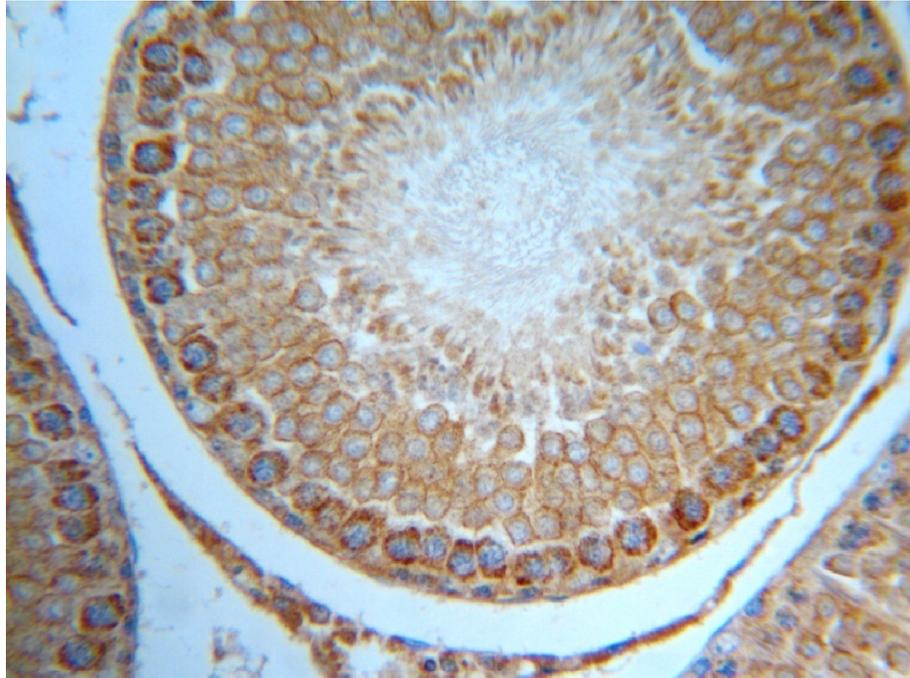


Abb. 29a: Rattenhoden, adult, 100. pnd, Tubuli seminiferi und Interstitium **Spermatogenesestadien VI-VII** Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x, 1cm d. Abb. = 17µm

Querschnitt durch einen *Tubulus seminiferus* mit positiver Immunreaktion, sowie randständige positive adulte Leydig-Zellen im Interstitium.

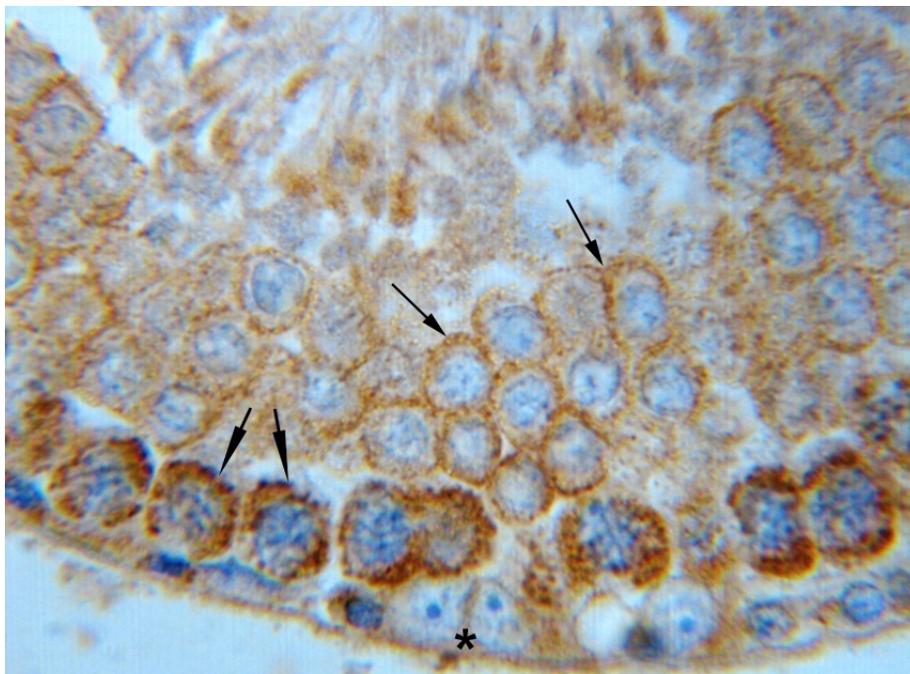


Abb. 29b: Rattenhoden, adult, 100. pnd, Tubuli seminiferi und Interstitium **Spermatogenesestadien VI-VII** Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7µm

Ausschnitt aus 29a, eine distinkte Immunreaktion im Zytoplasma der pachytänen Spermatozyten (dicke Pfeile) sowie in den runden Spermatischen (dünne Pfeile) mit beginnender „Gitterstruktur“. Keine Immunreaktion der Sertolizellen (Sternchen).

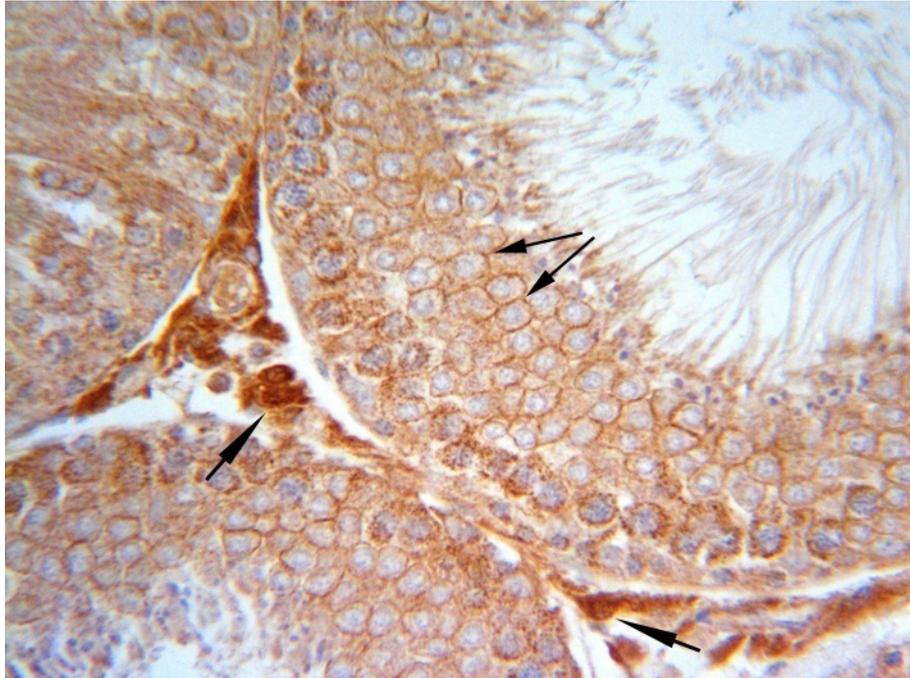


Abb. 30a: Rattenhoden, adult, 100. pnd, Tubuli seminiferi und Interstitium Spermatogenesestadium VIII Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x, 1cm d. Abb. = 17 μ m

Übersicht der sehr intensiven Immunreaktionen in den *Tubuli seminiferi* (dünne Pfeile) und den adulten Leydig-Zellen (dicke Pfeile).

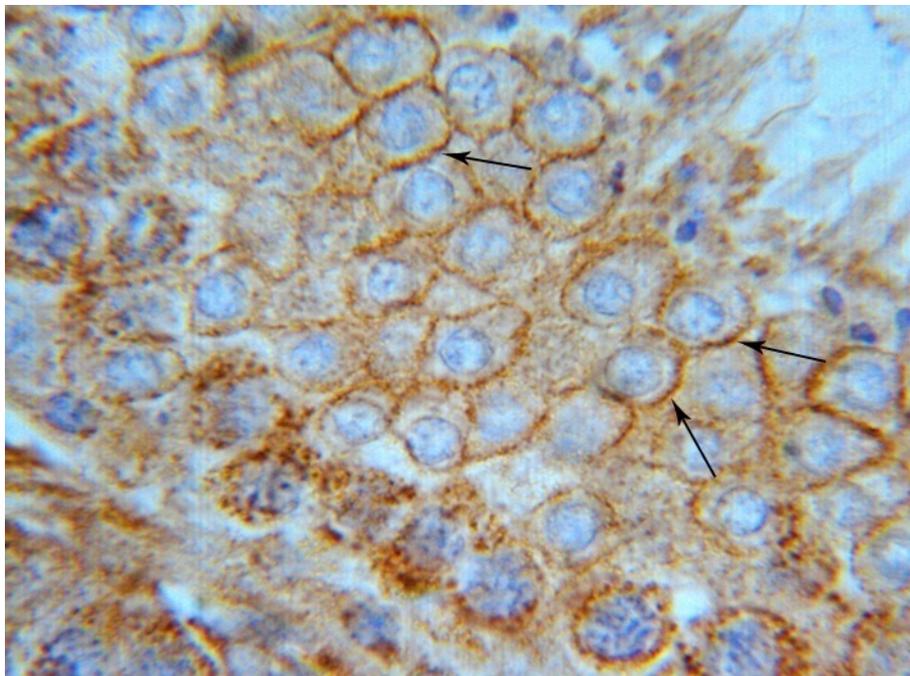


Abb. 30b: Rattenhoden, adult, 100. pnd, Tubuli seminiferi und Interstitium Spermatogenesestadium VIII Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 1500 x, 1cm d. Abb. = 7 μ m

Distinkt positive Immunreaktion im Zytoplasma der runden Spermatozoen mit „Gitterstruktur“ (Pfeile).

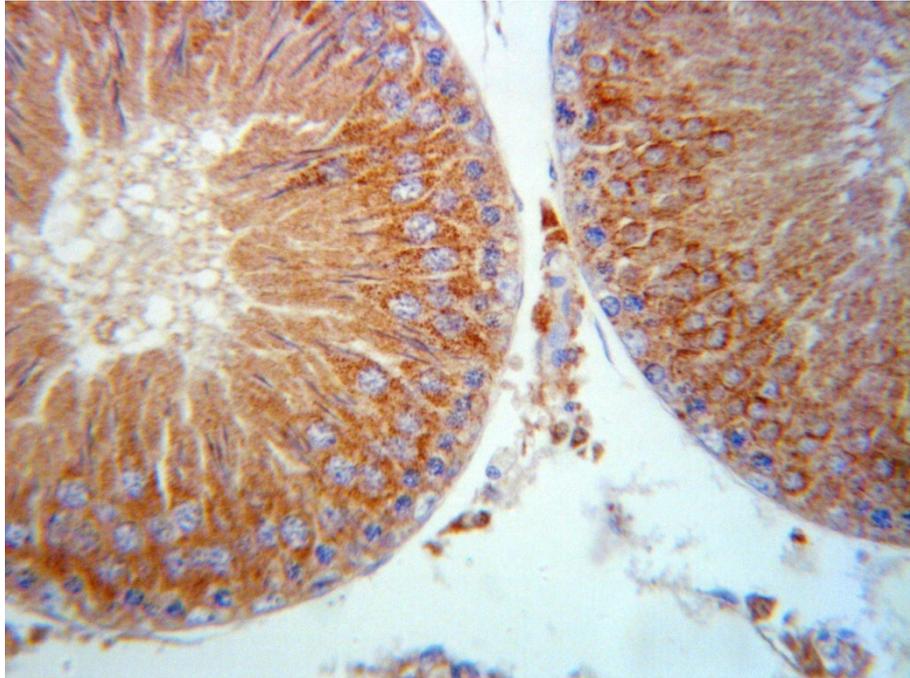


Abb. 31: Rattenhoden, adult, 100. pnd, Tubuli seminiferi und Interstitium Spermatogenesestadien XI-XII Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x, 1cm d. Abb. = 17µm

Abnehmende Immunreaktion in den *Tubuli seminiferi* mit pachytänen Spermatozyten ohne Immunreaktion und positiven diplotänen Spermatozyten.

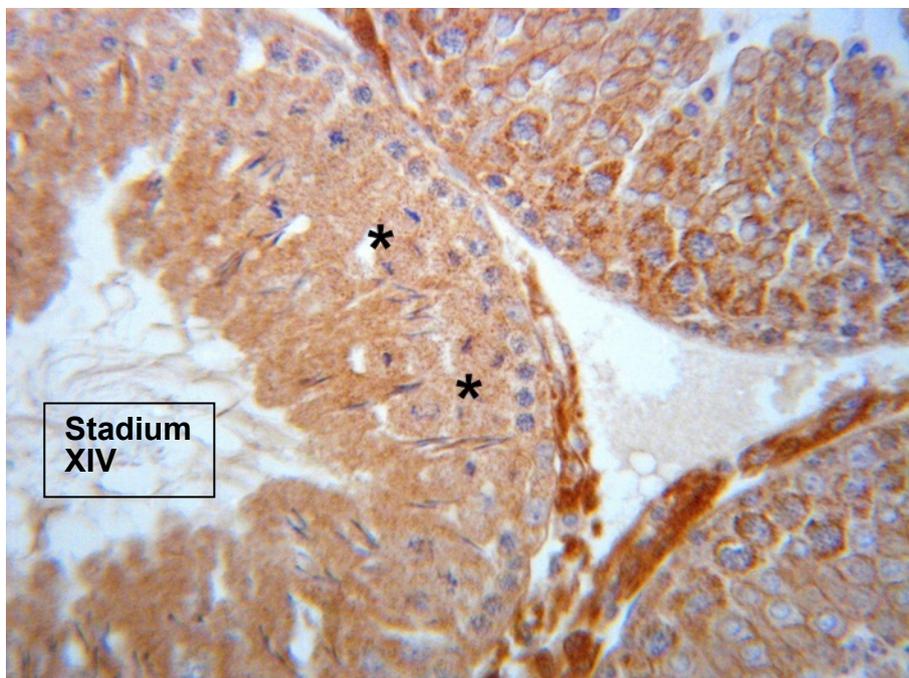


Abb. 32: Rattenhoden, adult, 100. pnd, Tubuli seminiferi und Interstitium Spermatogenesestadien XIII-XIV Paraffinschnitt. Immunhistochemische Reaktion von HGF (braun), Kernfärbung mit Hämalaun (blau), Endvergrößerung 600 x, 1cm d. Abb. = 17µm

Keine Immunreaktion in den *Tubuli seminiferi* (Sternchen) mit Mitosen (Tubulus links im Bild).

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt zum ersten Mal das immunhistochemische Verteilungsmuster von HGF α und seine altersabhängigen Veränderungen in den verschiedenen testikulären Zellen der Wistarratte.

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit bei den Leydigzellen lag, wurde hier bei der Auswahl der Untersuchungstermine die Entstehung, Differenzierung und Entwicklung der FLZ und ALZ berücksichtigt (17. fd, 18. fd, 1., 5., 10., 15., 25., 35., 100. pnd).

4.1 Besprechung der Befunde über HGF

4.1.1 Leydig-Zellen

Verschiedene Autoren haben den HGF im *Testis* biochemisch schon nachgewiesen, bislang fehlte jedoch eine systematische Studie bezogen auf Morphologie und Vorkommen von HGF. In einer immunhistochemischen Studie über den HGF im Hoden (Wolf et al., 1991) wurde im Gegensatz zu dieser Studie lediglich eine moderate Immunreaktion in den Leydig-Zellen nachgewiesen. Außerdem zeigte das Epithel des menschlichen *Tubulus seminiferus* nur eine schwache, aber bei der Ratte keinerlei Immunreaktion, was sich ebenfalls in dieser vorliegenden Studie vollkommen anders darstellte. Vielleicht liegt dieses unterschiedliche Ergebnis aber auch daran, dass bei Wolf et al. (1991) eine modifizierte Nachweismethode vorlag. So wurde bei dieser Studie beispielsweise anstelle PBS der Puffer TBS benutzt. Ferner wichen sowohl die Inkubationszeiten als auch die Verdünnungsparameter voneinander ab. Mit ansteigenden Altersstufen kam es zahlenmäßig zu einem deutlichen Abfall der FLZ mit einem asymptotischen logarithmischen Verlauf. Trotzdem die Zellen zahlenmäßig abnahmen, waren die FLZ am 15. pnd noch deutlich vorhanden und konnten histomorphologisch bis zum 25. pnd nachgewiesen werden. Obwohl es Berichte über das Vorkommen von FLZ bis zum 90. pnd gibt (Siril Ariyaratne et al., 2000, Kerr und Knell, 1988), postulierten Haider et al. (1983, 1986) und Kuopio et al. (1989), dass fetale Leydig-Zellen nur bis zum 30. pnd lichtmikroskopisch identifiziert werden konnten. Das Ergebnis dieser Studie bekräftigt diese Aussage. Der Übergang von Leydig-Zell-Progenitoren zu ALZ ist mit Größen- und Formänderungen verbunden. Die Prekursorzellen sind dünn und spindelförmig, die reifen Zellen groß und rund. Um den 30. pnd sind sie sowohl homogen um die *Tubuli seminiferi* verteilt als auch perivaskulär in der Nähe von interstitiellen Blutkapillaren lokalisiert (Haider, 2004).

Diese Feststellung untermauert das Ergebnis dieser Studie sowohl mit einer Häufung der positiv auf HGF reagierenden Zellen am 35. pnd als auch in dieser Altersstufe ausgeprägteste sonstiger Immunreaktionen. So wie eine LH-Stimulation im späten Stadium der ALZ Entwicklung, nämlich von unreifen in reife ALZ, eine entscheidende Rolle spielt (Haider, 2004), könnte auch HGF schon früher eine Rolle in der Testosteronproduktion spielen. Ricci und andere berichten, dass HGF im Interstitium des Hodens exprimiert wird, aber nicht in den Leydig-Zellen (Ricci et al., 2006). Diese Dissertation zeigt, dass HGF gerade in den Leydig-Zellen exprimiert wird, da sich durch alle Altersstufen hindurch ein klares morphologisches Bild, bezogen auf die positiv auf HGF reagierenden Leydig-Zellen ergibt und auch deutlich von den anderen interstitiellen Zellen abhebt. Anhand von Northernblotanalysen und RT-PCR-Analysen wurden signifikante Anstiege der Expression von HGF im Alter von 18, 5 dpc im Vergleich zu 15,5 dpc gefunden (Ricci et al., 2006). Sie kamen zu dem Schluss, dass HGF die Testosteronproduktion in fetalen Leydig-Zellen reguliert und das Vorkommen der Testosteronproduktion in *In-vitro* Kulturen steigert. Diese Tatsache deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit hinsichtlich einer morphologisch starken Expression am 18. dpc. Allerdings zeigten Ricci et al. (2006) in ihren Ergebnissen die Immunreaktion von HGF mit einem positiven Ergebnis in der *Tunica albuginea*, im Interstitium und den flachen peritubulären Zellen. Danach scheint HGF nicht in den Leydig-Zellen exprimiert zu werden und sie suggerieren ebenfalls, dass HGF nicht von den Leydig-Zellen produziert wird, sondern von einem anderen Zelltyp. Dieser scheint eine parakrine Rolle auf die Leydig-Zellen zu spielen. Die vorliegende Studie zeigt allerdings, dass die Leydig-Zellen, abgesehen von ihrer funktionellen Hauptaufgabe, der Testosteronproduktion, die schon während der Embryonalentwicklung am 12,5 dpc mit Beginn der Leydig-Zelldifferenzierung beginnt (Taketo et al., 1991), selbst HGF produzieren und eben nicht parakrin durch diesen beeinflusst werden. Die Untersuchungen dieser Studie, die rein immunhistologischer Natur waren, zeigten am 18. fd wie schon oben beschrieben, sehr deutliche Immunreaktionen in den Leydig-Zell-Clustern. Sowohl die in diesem Alter stattgefundenen kräftigsten Immunreaktionen als auch ein zahlenmäßiger Peak am 18. Fetaltag, bestätigen die Auffassung von Ziegler et al. (1983), dass der Peak der FLZ-Proliferation zwischen dem 18. und 19. Fetaltag liegt. Das Muster der positiven Immunreaktionen ist dabei einheitlich, im Gegensatz zu den anderen interstitiellen Zellen, die nur eine sporadische Immunreaktion aufwiesen. Gestützt wird diese

Theorie dadurch, dass mit zunehmendem Alter sämtliche Immunreaktionen sowohl für FLZ als auch ALZ distinkt positiv verliefen und lediglich in ihrer Intensität variierten. Eine weitere Bestätigung, dass HGF von den Leydig-Zellen selbst produziert wird, ist die Tatsache, dass Leydig-Zellen durch HGF vor Apoptose geschützt werden- also einen antiapoptotischen Effekt haben- indem die Aktivierung vom Caspase-3-Enzym unter HGF Einfluss signifikant reduziert war (Del Bravo et al., 2007). Ebenso postulieren jene Autoren (Del Bravo et al., 2007), auch im Widerspruch zu Ricci et al. (2006), dass nicht bekannt ist, welche Zellen des Interstitiums HGF produzieren. In dieser Studie lässt sich anhand des klaren Musters und der deutlich positiven Reaktion von HGF in den Leydig-Zellen erkennen, dass hier unabhängig von der tubulären Sekretion, der Ursprung der interstitiellen HGF Produktion zu finden ist und somit das HGF-C-Met-System eine Schlüsselrolle sowohl in der Testosteronproduktion, als auch in der gesamten Hodenentwicklung der Säugetierhoden spielt.

4.1.2 Spermatogenese-, peritubuläre- und interstitielle Zellen

Diese Arbeit beschreibt erstmals die morphologische Darstellung des HGF am 18. fd in den *Tubuli seminiferi*, der sich als kappen- bis halbmondförmige, homogen scharf begrenzte Anfärbung am Pol des Nukleus darstellte. Am 17. fd zeigte sich keine Immunreaktion von HGF, dafür aber am 18. fd ein Maximum. Vielleicht unterstützt die Theorie auch die These von Kaya und Harrison (1976), dass Spermatogonien und Spermatozyten abhängiger von Sertolizellen sind als sich entwickelnde Spermatiden und so vielleicht über engen Kontakt zu diesen ihren Nährstoffhaushalt und Metabolismus regeln. Sie beschreiben eine Junctionszone (Macula adhaerens) zwischen Sertolizellen und Spermatogonien bei adulten Ratten. Der HGF könnte also eine wesentliche Rolle spielen bei der Einleitung der Spermatogenese. Es ist dabei jedoch widersprüchlich, dass sich die T1-Prospermatogonien zu diesem Zeitpunkt in der G1-Phase befinden (Hilscher et al., 1974) und somit biologisch eigentlich nicht aktiv sein dürften. Vielmehr gehen die T1-Pro-Spermatogonien in dieser Altersstufe eher zu Grunde und haben mit der Proliferation bis zum 17. fd abgeschlossen (Hilscher und Makoski, 1968, Hilscher et al., 1972). Dass aber der HGF gerade in dieser fetalen Altersstufe (fd. 18) in höchstem Maße und sehr spezifisch exprimiert wird, zeigt einerseits, dass hier eine Art Wendepunkt anzutreffen ist und wirft andererseits die Frage auf, was HGF genau in diesen Zellen zu dieser Zeit am 18. fd bewirkt oder induziert. Es entsteht der Eindruck, dass die Proliferation der M-Prospermatogonien in

den Tagen zuvor die HGF-Expression hemmt. Ab dem 1. pnd können die Keimstränge fortan als Hodenkanälchen bezeichnet werden, wobei sich die Sertolizellvorläufer als pallisadenartiger Wall an die Basalmembran zum Inneren des *Tubulus seminiferus* gerichtet haben und die T1-Pro-Spermatogonien überwiegend zentral und mit deutlich verringerter Zahl anzutreffen sind (Hilscher und Makoski, 1968). Die bereits beschriebene Immunreaktion in den T1-Pro-Spermatogonien hat von der Intensität etwas abgenommen. Die Tatsache, dass bis auf den stark positiven Befund in den FLZ keinerlei andere Reaktion zu erkennen ist, wirft die Frage nach dem Grund der frühen Tubulus-Expression auf. Ab dem 4. pnd liegen die Pro-Spermatogonien jetzt nicht mehr nur zentral, sondern teilweise in der Peripherie, um dann am 5. pnd erstmalig Im-Spermatogonien hervorzubringen, die aber nicht sicher von A-Spermatogonien unterschieden werden können (Hilscher und Makoski, 1968). Während in den ersten drei Lebenstagen keine große Lageänderung von den Pro-Spermatogonien zu erwarten ist, so ist zwischen dem 3.- 5. pnd die Wanderung von zentral nach peripher weitgehend abgeschlossen (Hilscher et al., 1972). Nach der Definition von Clermont, (1962) heißen die Tochterzellen der T2-Pro-Spermatogonien A-Spermatogonien und werden als „Paare“ bezeichnet. Neben der hier ebenfalls noch deutlich vorkommenden randwallartigen Immunreaktionen im Zytoplasma der Pro-Spermatogonien, beginnt hier jetzt die Expression des HGF in der *Tunica media* der Arterien. Besteht also hier ein Zusammenhang zwischen Spermatogenese Beginn und Gefäßexpression? Welchen protektiven oder proliferierenden Effekt genau dem starken Gefäßvorkommen im Hoden zuzuschreiben ist, müsste in weiteren Studien genauer untersucht werden. Im Gegensatz zu Wolf et al. (1991), die keine Korrelation zwischen einer HGF Immunreaktion und Gefäßtyp bzw. Größe gefunden haben und die im Endothel eine breite Streubreite hinsichtlich der Immunreaktion von HGF zu verzeichnen hatten, stellt es sich in dieser Studie etwas anders dar: In den frühen Altersstufen war zwar im Endothel noch eine sporadische Immunreaktion zu beobachten, jedoch zeigte sich mit zunehmendem Alter ein deutlicheres Muster. So begann beispielsweise ab dem 5. pnd die *Tunica media* der Arterien/Arteriolen positiv zu reagieren, wobei das *Intimaendothel* stets ohne eine Immunreaktion war. Die klare, regelmäßige und deutliche Immunreaktion in der *Tunica media* der Gefäße vom arteriellen Typ unter klarer Aussparung des *Intimaendothels* sowie der *Adventitia*, lassen sich mit zunehmendem Alter eindeutig beobachten und werfen erneut die Frage auf, warum der HGF gerade in der *Tunica*

media exprimiert wird und welcher Zusammenhang mit der Hodenentwicklung oder der Fertilität besteht. Die Expression aus den Gefäßen könnte eine vorläufige parakrine Wirkung auf die Tubulogenese haben, da die Immunreaktion im Tubuluslumen bis zu diesem Alter stark abgenommen hat. Sie könnte sogar auch eine vorübergehende Ammenfunktion für die Tubulogenese haben, da diese in den Altersstufen 10. und 15. pnd eine eher schwache Immunreaktion aufweisen. Am 10. pnd entstehen die ersten leptotänen und zygotänen Spermatozyten, am 15. pnd können die ersten pachytänen Spermatozyten beobachtet werden (Hilscher und Makoski, 1968). So postulieren jene Autoren ebenfalls, dass bis zum 15. pnd die erste Spermatozytenschicht entsteht, die den ersten Schub sich differenzierender Keimzellen darstellt. Da dies ein wichtiger Entwicklungsschritt ist, scheint es wahrscheinlich, dass falls der HGF mit der Spermatogenese assoziiert ist, parakrin entweder aus den Arterien oder den Leydig-Zellen, diese voran treibt. Des Weiteren könnte es sich dabei um eine Art Triggermechanismus handeln, da ab dem 25. pnd wieder eine kräftige Immunreaktion in den pachytänen Spermatozyten zu beobachten war, die auch mit steigendem Alter kräftiger wurde. Außerdem sind ab dem 35. pnd erstmals elongierte Spermatisden anzutreffen und die Sertoli Vorläuferzellen sind jetzt in mature Sertolizellen umgewandelt (Hilscher und Makoski, 1968). Trotz der kräftigsten Reaktion am 35. pnd sowohl im Zytoplasma der pachytänen Spermatozyten als auch randwallartig innenseitig der Zellmembran der Spermatisden, die eine klassische Gitterstruktur aufweisen, findet sich weiterhin eine starke Expression des HGF in den Arterien. Dass dieser Altersstufe ein besonderes Augenmerk gelten sollte, wird auch daran deutlich, dass hier einerseits sämtliche Immunreaktionen am kräftigsten von allen ausfallen und bezogen auf die Leydig-Zellen ein quantitativer Peak festgestellt wurde. Die postnatale Reifung der *Ductuli efferentes* des *Epididymis* ist am 35. pnd ebenfalls fast komplett (Francavilla et al., 1986) und HGF ist in die Induktion der Spermienmotilität involviert (Naz et al., 1994). Vielleicht besteht hier ein direkter Zusammenhang zwischen bevorstehendem Pubertätseintritt der Ratte ca. um den 50. pnd und einer HGF Expression.

HGF wird lokal von beiden somatischen Zellen des *Tubulus seminiferus* sezerniert und der Faktor sorgt für eine steigende Expression von C-Met in den Sertolizellen und ist damit einer der Wachstumsfaktoren, der die Entwicklung der Säugetierhoden reguliert (Catizone et al., 2005). Wolf et al. (1991) und Catizone et al. (2001) untersuchten Rattenhoden vom 10., 20., 35. und 60. pnd und fanden heraus, dass HGF

eine funktionelle Rolle bei der C-Met-Expression in Sertolizellen hat, sowie eine tubulogenetische Rolle im Rattenhoden spielt. HGF ist ebenfalls fähig, die Tubulusformation während der embryonalen Differenzierung zu induzieren (Ricci et al., 1999) und könnte eine Schlüsselrolle dieser Zellbewegungen spielen, in Form von Positionierung der Sertolizellen (Catizone et al., 2001). Dies bekräftigt auch die Feststellung dieser Studie, dass HGF in hohem Maße im Tubuluslumen am 18. fd exprimiert wird. Dazu passt auch, dass Ricci et al. (1999) in ihren Untersuchungen von Mäuseembryonen Hoden im Alter von 11,5, 13,5, und 15,5 dpc mittels *Northern-Blot-Analysen* HGF-mRNA nachgewiesen haben, deren Level mit zunehmendem Alter abnahmen. Immunhistochemisch wurde HGF im Alter von 13,5 und 15,5 dpc in der *Tunica albuginea*, im Interstitium und in den flachen peritubulären Zellen nachgewiesen. In der undifferenzierten männlichen Urogenitalleiste von 11, 5 dpc Embryonen war HGF im Coelomepithel positiv. Sie zeigten, dass HGF die Zellproliferation von embryonalen Hodenzellen induziert, die letztendlich für das Größenwachstum der Mäusehoden verantwortlich sind. Diese Studie zeigt ebenfalls ein HGF positives Coelomepithel am 18. fd. Catizone et al (1999) zeigten zum ersten Mal, dass im Hoden von präpupertalen Ratten (18.-20. pnd), HGF und C- Met mRNA als biologisch aktive Form in den Myoidzellen vorkommt. Diese Ergebnisse wurden mittels RNA-Isolation, *Northern-Blot-Analysen* und Zellkulturen gestützt. Sie schlussfolgerten, dass HGF und C-Met von der gleichen somatischen Zelle exprimiert werden und die HGF Sekretion aus den Myoidzellen einen autokrinen Effekt andeutet. Diese Studie bekräftigt dieses Ergebnis und zeigt in einer Versuchsreihe, dass die Myoidzellen im fetalen Alter allesamt negativ auf HGF reagierten und mit zunehmendem Alter positiver reagierten. Am 10. pnd waren ca. ein Drittel aller Myoidzellen, am 15. pnd ca. die Hälfte positiv. Am 25. pnd zeigte sich eine kräftige, deutliche Reaktion und gipfelte schließlich am 35. pnd, wo alle Myoidzellen positiv reagierten, allerdings etwas schwächer als am 25. pnd. Die Immunreaktion fand jeweils im Zytoplasma statt. Obwohl das Ergebnis dieser Studie auch überwiegend negative Immunreaktionen für Sertolizellen bezogen auf HGF aufwies, waren im Interstitium deutliche Immunreaktionen von HGF zu verzeichnen. Catizone et al. (2005) wiesen HGF in peritubulären Myoidzellen im Alter von 10. pnd bis 35. pnd nach und wiesen mittels *Northern-Blot* HGF in den Sertolizellen ab dem 25. pnd und mittels *Western-Blot* am 35. pnd nach. Sie schlussfolgerten eine hohe Expression und Synthese von HGF in allen untersuchten Altersstufen und ein

Persistieren der HGF-Expression für die gesamte postnatale Lebensperiode in den Sertolizellen ab dem 25. pnd. Die morphologischen Untersuchungen dieser Studie zeigten, bezogen auf das Vorkommen von HGF in Sertolizellen, eine Abweichung. So reagierten am 18. fd gänzlich keine Präsertolizellen. Am 1. pnd zeigte sich jedoch eine schwach und vereinzelt Immunreaktion von HGF an den Sertolizellen und mit zunehmendem Alter ein deutliches Vorkommen teilweise fokal in einigen Zellen. Ab dem 25. pnd zeigte sich histomorphologisch keinerlei Reaktion bezogen auf HGF und die Sertolizellen. So könnte HGF bezogen auf die Sertolizellen eher eine Rolle der frühen Lebensphase der Rattenhodenentwicklung spielen. Dagegen spricht allerdings, dass laut Catizone et al. (2006) die Anzahl der proliferierenden Sertoli und peritubulären Zellen durch HGF nicht modifiziert werden. Dafür scheint HGF ausschließlich die Spermatogonien-Proliferation zu stimulieren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Dissertation, dass v. a. in der Embryonalperiode bzw. im frühen präpupertalen Stadium HGF stark positiv an Spermatogonien und Vorläufern reagierte. Außerdem wiesen Catizone et al. (2006) nach, dass HGF die metabolischen Aktivitäten der Keimzellen *In-vitro* moduliert, indem es sowohl die Keimzellproliferation positiv reguliert als auch die Abnahme der Apoptosezellen. Die Untersuchungen dieser Studie ergaben eine kräftige Immunreaktion von HGF sowohl zytoplasmatisch an den Kernpolen der Prospermatogonien als auch im Zytoplasma der fetalen Leydig-Zellen.

Während Clermont und Leblond (1953) und Clermont (1972) fünf Mitose-Peaks in den Stadien IX, XII, XIV-I, IV und VI beschrieben, zeigt sich in der vorliegende Arbeit gerade in den Stadien XII-IV eine äußerst schwache Immunreaktion, besonders in Stadium I und XIV. Dafür existiert ein Peak bei Stadium VI-VIII. Interessanterweise beginnt eine positive Immunreaktion in den runden Spermatiden eindeutig in Stadium V. In jenem Stadium haben die Sertolizellen eine Ammenfunktion und ernähren die Spermatiden. Dabei ist auch zu beobachten, dass die Spermatiden sehr tief in das Zytoplasma der Sertolizellen eintauchen. Es könnte also möglicherweise so sein, dass HGF im Zusammenhang mit der Ernährung und Interaktion von Spermatiden und Sertolizellen eine wichtige Rolle spielt. Über Stadium V kommt es schließlich im Stadium VI-VIII zu einem Peak der Immunreaktion sowohl in den runden Spermatiden als auch in den pachytänen Spermatozyten. Dies ist insofern interessant, da sowohl in Stadium V als auch im Stadium VIII die reifen Spermien zur Ablösung kommen und in den *Epididymis* gelangen. So kann dem HGF einerseits

eine ernährende Funktion sowie eine proliferations- und motilitätsfördernde Wirkung bezogen auf die Spermatogenese zugeschrieben werden. Elektronenmikroskopisch wurden bereits Interzellularbrücken zwischen Spermatozyten und Spermatischen (Fawcett et al., 1959, Fawcett und Ito, 1958, Nicander, 1967) sowie offene Zytoplasmabrücken zwischen Spermatogonien nachgewiesen (Dym und Fawcett, 1971). Fawcett et al. (1959) zeigten bereits, dass diese Verbindungen die Diffusion von intrazellulären Substanzen kontrollieren und somit die Transformation der Keimzellentwicklung synchronisieren könnten. Hier könnte der HGF eine entscheidende Rolle spielen. Falls allerdings ein Zusammenhang besteht, so bleibt immer noch die Frage, ob HGF diese zellulären Verbindungen nutzt oder etwa parakrin interagiert. Dies kann lichtmikroskopisch jedoch nicht geklärt werden. Sehr interessant ist auch, dass man verglichen mit Dym und Fawcett (1971) davon ausgehen kann, dass die in den Spermatischen stattgefundenene Immunreaktion (randständig an der inneren Zellmembran) sich überwiegend in den Mitochondrien abspielt und somit diese distinkte Immunreaktion hervorruft. Diese Reaktion äußerte sich als kappenförmige, homogen scharf begrenzte Anfärbung am Pol des Nukleus. In dieser Region befindet sich eine starke Ansammlung von zytoplasmaseitigen Mitochondrien (Franchi und Mandl, 1964). Die deutliche Immunreaktion in der Mitochondrien Gegend wurde schon am 18. fd in Form von sich stark anfärbenden „Kappen“ in Nukleus Nähe der T1-Prospermatogonien deutlich. Bei männlichen Ratten beginnen sich die Mitochondrien ab dem 15. fd an einem Zellpol zu aggregieren, wobei diese Polarisation am besten zwischen dem 16,5. fd und 18,5. fd zu erkennen ist (Franchi und Mandl, 1964). So postulieren jene Autoren elektronenmikroskopische Aufnahmen, die eben diese Mitochondrienansammlungen widerspiegeln. Außerdem beschreiben sie beginnende ultrastrukturelle Veränderungen der Mitochondrien ab dem 19,5. fd und stellen dem ein Anschwellen des endoplasmatischen Retikulums gegenüber, was ein Zeichen der Degeneration der Prospermatogonien sein könnte. Da HGF gerade in diesem Zellkompartiment (Mitochondrien) beginnend am 18. fd stärkstens exprimiert wird und sich diese Expression bis zum 5. pnd fortführt, könnte dem HGF eine weitere Funktion in der tubulären Entwicklung zugeschrieben werden. Dies würde folglich bedeuten, dass HGF bei der Degeneration der Prospermatogonien ein Schlüsselzytokin sein könnte und evtl. sogar diese degenerativen Prozesse initiiert. Dass HGF in irgendeiner Form mit Mitochondrien assoziiert ist, zeigen Hu et al. (2009) mit der Feststellung, dass HGF einen

protektiven Effekt bezüglich der Inhibition des mitochondrialen Apoptoseweges und der Unterdrückung der Caspase-3-Aktivität hat. Außerdem könnte ein Zusammenhang mit dem von Yerushalmi et al. (2002) beschriebenen Gen MIMP bestehen, welches hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert ist und durch das C-Met-HGF Signal hochreguliert wird.

4.2 Befundvergleich mit der C-Met Studie von Quinkert (in Vorbereitung)

Im Rahmen einer parallel zur vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie für eine medizinische Dissertation aus demselben Institut wurde das immunhistochemische Verteilungsmuster für C-Met (=Tyrosin-Kinase Rezeptor für HGF) im Rattenhoden untersucht (Quinkert, in Vorbereitung). Im Folgenden werden die vorliegenden Befunde mit den Resultaten von Quinkert (in Vorbereitung) über den C-Met-Rezeptor verglichen und besprochen.

Im Direktvergleich der Immunreaktionen von HGF und C-Met in den Leydig-Zellen waren in beiden Studien bestimmte Termine mit Wendepunktcharakter zu beobachten. Der entscheidende Unterschied der Immunreaktionen war, dass bei HGF stets nur das Zytoplasma positiv reagierte - ohne jegliche Beteiligung des Nukleus - wogegen sich bei C-Met die Immunreaktion überwiegend im Nukleus abspielte. Allerdings gab es bei der C-Met-Studie noch einen weiteren Reaktionstypus: Hier reagierte das Zytoplasma und nicht der Zellkern. Diese Zellen werden fortan als gemischt reagierende Leydig-Zellen bezeichnet. Bei beiden Antikörpern war die intensivste Immunreaktion in fetalen Leydig-Zellen am 18. fd zu beobachten. Bei diesem Termin war auch gleichzeitig mit 400 FLZ/mm² die größte Population von FLZ anzutreffen. Allerdings waren bei der HGF-Studie sämtliche FLZ positiv, wogegen es bei der C-Met Studie zusätzlich ein Maximum von FLZ ohne eine Immunreaktion gab. Ab einem Alter von 1. pnd tauchten bei der C-Met Studie zum ersten Mal vereinzelte gemischt reagierende FLZ auf, die bei diesem Termin auch gleichzeitig ihren Peak erreichten und danach nur noch vereinzelt auftraten. Ob HGF die Expression von C-Met in fetalen Leydig-Zellen triggert, konnte nicht geklärt werden, ist aber ein interessanter Ansatzpunkt. In wieweit hier ein Zusammenhang besteht, müsste in genaueren Studien allerdings weiter untersucht werden.

Bei den adulten Leydigzellen sieht es so aus, als würde C-Met vor HGF exprimiert werden. So zeigten sich bei der C-Met Studie zum ersten Mal am 10. pnd positive ALZ und wiesen mit zunehmender Tendenz einen Peak am 35. pnd auf. Dieser quantitative und qualitative Peak zeigte sich auch beim HGF. Allerdings waren bei der HGF-Studie sämtliche ALZ am 10. pnd ohne eine Immunreaktion und fingen erst am 15. pnd an positiv zu reagieren. Dies ist ein Hinweis dafür, dass bei den adulten Leydig-Zellen -im Gegensatz zu den fetalen Leydig-Zellen- C-Met vor HGF exprimiert werden zu scheint. Dies müsste ebenfalls in anderen Studien genauer untersucht werden. Am 25. pnd (in beiden Studien noch vereinzelte positive FLZ Cluster zu finden) präsentierte sich in der HGF-Studie ein Peak von ALZ ohne eine Immunreaktion, während sich bei der C-Met Studie ein Minimum solcher nicht reagierender ALZ zeigte. Auffällig war bei der C-Met Studie genau hier ein maximales Vorkommen von gemischt reagierenden ALZ zu beobachten. Diese Tatsache ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei dem 35. pnd möglicherweise um einen Wendepunkt sowohl für HGF als auch für C-Met handelt und dass C-Met bei den adulten Leydig-Zellen ein Trigger für die HGF-Expression ist.

Bezogen auf die Tubulogenese präsentierten sich zwischen HGF und C-Met erhebliche Unterschiede. So zeigten beispielsweise auf HGF bezogen die T1-Pro-Spermatogonien ab dem 18. fd stärkste Immunreaktionen fortan bis zum Übergang in A-Spermatogonien bis zum 15. pnd, wonach fortan bis zur adulten Phase (100. pnd) eine solche gänzlich fehlte. Dagegen verhält es sich bei C-Met eher so, dass diese T1-Pro-Spermatogonien lediglich am 18. fd eine positive Immunreaktion aufwiesen, aber postnatal ab 1 pnd stets ohne eine Immunreaktion waren und erst als A-Spermatogonien ab dem 15. pnd wieder positiv reagierten. Mit zunehmendem Alter reagierten dann die A- und B-Spermatogonien bis zur adulten Phase (100. pnd) stets stark positiv für C-Met, wobei es sich für HGF genau umgekehrt verhielt. Demnach könnte am 15. pnd eine Art Wendepunkt bezogen auf die Spermatogenese liegen. Dass der HGF-Rezeptor einmal kurz am 18. fd exprimiert wird, könnte ihm eine Art Triggerfunktion zukommen lassen. Dazu passt auch, dass die Sertolizell-Vorläufer bzw. reifen Sertolizellen bei der HGF Studie -bis auf wenige Ausnahmen am 10. und 15. pnd- gänzlich ohne Immunreaktion waren. Dagegen waren bei der C-Met Studie die Sertolizell-Vorläufer kurzzeitig am 18. fd mit einer positiven Immunreaktion zu beobachten, dann zunächst postnatal von 1.-10. pnd frei von einer Reaktion, aber ab dem 15. pnd inklusive der basalen Zellen sehr stark positiv. Ganz besonders deutlich

wurden jene positiven Immunreaktionen bezogen auf C-Met ab dem 25. pnd, v. a. in den A- und B-Spermatogonien sowie Sertolizellen. So könnte bezogen auf die Spermatogenese dem HGF-Rezeptor (C-Met) eher eine Rolle in den frühen Stadien zugewiesen werden, während der HGF scheinbar eher mit den späten Zellen der Spermatogenese assoziiert ist. Dies gilt ab einem Alter um circa den 15. pnd. Bei jüngeren Tieren bzw. bei den fetalen verhält sich dieser Sachverhalt reziprok. Diese Theorie wird ebenfalls in der Reihe der Spermatozyten widergespiegelt. So sind in beiden Studien die leptotänen Spermatozyten frei von einer Immunreaktion (beginnend ab dem 10. pnd), wobei sich ab dem 15. pnd zunächst bei der HGF Studie in den frühpachytänen Spermatozyten eine positive Immunreaktion abzeichnet. Erst ab dem 25. pnd reagierten auch bei der C-Met Studie die pachytänen Spermatozyten positiv. Bei den adulten Tieren (100. pnd) zeigten sowohl bei der HGF als auch bei der C-Met Studie die pachytänen Spermatozyten und die runden Spermatischen positive Immunreaktionen. Der entscheidende Unterschied war hier erneut eine deutliche Immunreaktion in den Sertolizellen und Spermatogonien bei der C-Met Studie, wohin gegen diese Zellen bei der HGF Studie stets ohne eine Reaktion waren.

4.3 Schlussfolgerung

1. Die bisherige Literatur weist das Vorkommen von HGF in verschiedenen Zellen nach, nicht jedoch in den Leydig-Zellen. Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal die Expression von HGF in Leydig-Zellen, angefangen von der fetalen bis zur adulten Entwicklungsstufe. Hier zeigt sich eine klare distinkte Immunreaktion im Zytoplasma unter Aussparung des Nukleus.
2. Die vorliegende Dissertation beschreibt zum ersten Mal eine distinkte Immunreaktion, kappenförmig, perinukleär in den T1-Prospermatogonien. Höchstwahrscheinlich befindet sich diese Immunreaktion in den Mitochondrien.
3. Eine Immunreaktion für HGF ist ab dem 18. fd in fetalen Leydig-Zellen nachweisbar. Die Anzahl der HGF positiven FLZ nimmt nach der Geburt rapide ab und ist bis zum 25. pnd nachweisbar.
4. Die Expression von HGF in Leydig-Zellen begleitet die Differenzierung der ALZ während der puberalen Phase. Die Immunreaktion für HGF in den ALZ ist ab dem 15. pnd nachweisbar. Die Anzahl der immunpositiven ALZ nimmt danach zu. Mit einem leichten Abfall am 25. pnd erreicht die HGF Expression am 35. pnd einen Peak, wenn die ersten runden Spermatozyten gebildet werden. Danach erfolgt eine Abnahme. Ca. 10% der ALZ zeigen keine Immunreaktion für HGF.
5. Die stärkste Immunreaktion von HGF wurde in den pachytänen Spermatozyten und in den runden Spermatozyten während der Spermatogenesestadien VII und VIII beobachtet.

4.4 Ausblick

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es Schwankungen in der Expression von HGF im Hodengewebe zwischen den fetalen, postnatalen, pubertären und adulten Phasen der Entwicklung sowie eine zeitliche Korrelation zwischen den Entwicklungen der fetalen bzw. der adulten Leydig-Zelle und der Expression von HGF im Hodengewebe gibt. Möglicherweise triggert C-Met die HGF-Expression in adulten Leydigzellen und dafür umgekehrt HGF die C-Met Expression in fetalen Leydig-Zellen. Für einen genauen Zusammenhang dieser These sind allerdings weitere Studien mit alternativen Methoden notwendig.

5. Literaturverzeichnis

- BHARGAVA, M. M., LI, Y., JOSEPH, A., PENDERGAST, M., HOFMANN, R., ROSEN, E. M. & GOLDBERG, I. D. (1991) Purification, characterization and mechanism of action of *scatter factor* from human placenta. *EXS*, 59, 63-75.
- BIRCHMEIER, C. & GHERARDI, E. (1998) Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*, 8, 404-10.
- BOTTARO, D. P., RUBIN, J. S., FALETTO, D. L., CHAN, A. M., KMIETIK, T. E., VANDE WOUDE, G. F. & AARONSON, S. A. (1991) Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*, 251, 802-4.
- CATIZONE, A., RICCI, G., ARISTA, V., INNOCENZI, A. & GALDIERI, M. (1999) Hepatocyte growth factor und c-MET are expressed in rat prepuberal *testis*. *Endocrinology*, 140, 3106-13.
- CATIZONE, A., RICCI, G., DEL BRAVO, J. & GALDIERI, M. (2006) Hepatocyte growth factor modulates in vitro survival and proliferation of germ cells during postnatal *testis* development. *J Endocrinol*, 189, 137-46.
- CATIZONE, A., RICCI, G. & GALDIERI, M. (2001) Expression and functional role of hepatocyte growth factor receptor (C-MET) during postnatal rat *testis* development. *Endocrinology*, 142, 1828-34.
- CATIZONE, A., RICCI, G. & GALDIERI, M. (2002) Functional role of hepatocyte growth factor receptor during sperm maturation. *J Androl*, 23, 911-8.
- CATIZONE, A., RICCI, G. & GALDIERI, M. (2005) HGF and postnatal *testis* development. *Mol Cell Endocrinol*, 241, 32-40.
- CLERMONT, Y. (1962) Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. *American Journal of Anatomy*, 111, 111-29.
- CLERMONT, Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 52, 198-236.
- CLERMONT, Y., C. P. LEBLOND (1953) Renewal of Spermatogonia in the rat. *Am J Anatom*, 93, 475-502.
- DEL BRAVO, J., CATIZONE, A., RICCI, G. & GALDIERI, M. (2007) Hepatocyte growth factor-modulated rat Leydig cell functions. *J Androl*, 28, 866-74.
- DI RENZO, M. F., NARSIMHAN, R. P., OLIVERO, M., BRETTI, S., GIORDANO, S., MEDICO, E., GAGLIA, P., ZARA, P. & COMOGLIO, P. M. (1991) Expression

- of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene*, 6, 1997-2003.
- DYM, M. & FAWCETT, D. W. (1971) Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian *testis*. *Biol Reprod*, 4, 195-215.
- FAWCETT, D. W. & ITO, S. (1958) Observations on the cytoplasmic membranes of testicular cells, examined by phase contrast and electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol*, 4, 135-42.
- FAWCETT, D. W., ITO, S. & SLAUTTERBACK, D. (1959) The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J Biophys Biochem Cytol*, 5, 453-60.
- FRANCAVILLA, S., MOSCARDELLI, S., BRUNO, B., BARCELLONA, P. S. & DE MARTINO, C. (1986) The postnatal maturation of efferent tubules in the rat: a light and electron microscopy study. *J Embryol Exp Morphol*, 96, 51-63.
- FRANCHI, L. L. & MANDL, A. M. (1964) The ultrastructure of germ cells in foetal and neonatal male rats. *J Embryol Exp Morphol*, 12, 289-308.
- FURLONG, R. A., TAKEHARA, T., TAYLOR, W. G., NAKAMURA, T. & RUBIN, J. S. (1991) Comparison of biological and immunochemical properties indicates that *scatter factor* and hepatocyte growth factor are indistinguishable. *J Cell Sci*, 100 (Pt 1), 173-7.
- GUNDERSEN, H. J. & JENSEN, E. B. (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, 147, 229-63.
- GUNDERSEN, H. J. G. (1977) Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc*, 111, 219-223.
- HAIDER, S. G. (2004) Cell biology of Leydig cells in the *testis*. *International Review of Cytology*, 233, 181-241.
- HAIDER, S. G., LAUE, D., SCHWOCHAU, G. & HILSCHER, B. (1995) Morphological studies on the origin of adult-type Leydig cells in rat *testis*. *Italian Journal of Anatomy und Embryology*, 100 Suppl 1, 535-541.
- HAIDER, S. G., PASSIA, D. & OVERMEYER, G. (1986) Studies on the fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Acta Histochemica Supplementband*, 32, 197-202.

- HAIDER, S. G. & SERVOS, G. **(1998)** Ultracytochemistry of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors und vascular endothelial cells of the postnatal rat *testis*. *Anatomy und Embryology (Berl)*, 198, 101-110.
- HAIDER, S. G., SERVOS, G., TAJTARAGHI, S., BERTHOLD, G., MUKHOPADHYAY, A. K., KILIC, N. & ERGUN, S. **(1997)** Functional markers for fetal und postnatal differentiation of rat Leydig cells. *Adv Exp Med Biol*, 424, 143-4.
- HAIDER, S. G., URBAN, A., HILSCHER, B., HILSCHER, W. & PASSIA, D. **(1983)** Cyproterone acetate induced changes in the behaviour of hydroxysteroid dehydrogenases in rat Leydig cells during perinatal development. *Andrologia*, 15, 498-506.
- HARDY, M. P., KELCE, W. R., KLINEFELTER, G. R. & EWING, L. L. **(1990)** Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: a role for androgen. *Endocrinology*, 127, 488-90.
- HARDY, M. P., ZIRKIN, B. R. & EWING, L. L. **(1989)** Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in *testes* of the pubertal rat. *Endocrinology*, 124, 762-70.
- HESS, R. A. **(1990)** Quantitative and qualitative characteristics of the stages und transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed und plastic-embedded *testes*. *Biol Reprod*, 43, 525-42.
- HIGUCHI, O., MIZUNO, K., VANDE WOUDE, G. F. & NAKAMURA, T. **(1992)** Expression of c-met proto-oncogene in COS cells induces the signal transducing high-affinity receptor for hepatocyte growth factor. *FEBS Lett*, 301, 282-6.
- HILSCHER, B., HILSCHER, W., BULTHOFF-OHNOLZ, B., KRAMER, U., BIRKE, A., PELZER, H. & GAUSS, G. **(1974)** Kinetics of gametogenesis. I. Comparative histological und autoradiographic studies of oocytes und transitional prospermatogonia during oogenesis und prespermatogenesis. *Cell Tissue Res*, 154, 443-70.
- HILSCHER, B., HILSCHER, W., DELBRUCK, G. & LEROUGE-BENARD, B. **(1972)** Autoradiographic determination of the duration of S-phase of the gonocytes of wistar albino rat by single and double labeling. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 125, 229-51.

- HILSCHER, W. & MAKOSKI, H. B. (1968) Histological and autoradiographical studies on the "prespermatogenesis" and "spermatogenesis" of the rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 86, 327-50.
- HU, Z. X., GENG, J. M., LIANG, D. M., ZHOU, Y. P. & LUO, M. (2009) Protection of hepatocyte growth factor against hydrogen peroxide-induced mitochondria-mediated apoptosis in rat cortical neurons. *Sheng Li Xue Bao*, 61, 247-254.
- HUHTANIEMI, I. & PELLINIEMI, L. J. (1992) Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med*, 201, 125-40.
- KAYA, M. & HARRISON, R. G. (1976) The ultrastructural relationships between Sertoli cells und spermatogenic cells in the rat. *J Anat*, 121, 279-90.
- KERR, J. B. & KNELL, C. M. (1988) The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal und postnatal rat *testis*. *Development*, 103, 535-44.
- KONISHI, T., TAKEHARA, T., TSUJI, T., OHSATO, K., MATSUMOTO, K. & NAKAMURA, T. (1991) Scatter factor from human embryonic lung fibroblasts is probably identical to hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 180, 765-73.
- KUOPIO, T., TAPANAINEN, J., PELLINIEMI, L. J. & HUHTANIEMI, I. (1989) Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development*, 107, 213-20.
- LAIL-TRECKER, M., GULATI, R. & PELUSO, J. J. (1998) A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in regulating normal und neoplastic cells of reproductive tissues. *J Soc Gynecol Investig*, 5, 114-21.
- LEBLOND, C. P. & CLERMONT, Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci*, 55, 548-73.
- LEYDIG, FRANZ VON (1850) *Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Anldrüsen der Säugetiere. Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 2, 1-57.
- LIU, Y. (1999) Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanisms. *Am J Physiol*, 277, F624-33.
- LORDING, D. W. & DE KRETZER, D. M. (1972) Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat *testis* during fetal and postnatal development. *J Reprod Fertil*, 29, 261-9.
- MAJDIC, G., SAUNDERS, P. T. & TEERDS, K. J. (1998) Immunoexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase und 17 alpha-

- hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat *testis* suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biol Reprod*, 58, 520-5.
- MAKONDO, K., KIMURA, K., KITAMURA, T., YAMAJI, D., DONG JUNG, B., SHIBATA, H. & SAITO, M. (2004) Hepatocyte growth factor/scatter factor suppresses TNF-alpha-induced E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1644, 9-15.
- MARS, W. M., ZARNEGAR, R. & MICHALOPOULOS, G. K. (1993) Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA und tPA. *Am J Pathol*, 143, 949-58.
- MATSUMOTO, K. & NAKAMURA, T. (1992) Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, und other biological functions. *Crit Rev Oncog*, 3, 27-54.
- MIYAZAWA, K., SHIMOMURA, T., KITAMURA, A., KONDO, J., MORIMOTO, Y. & KITAMURA, N. (1993) Molecular cloning und sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J Biol Chem*, 268, 10024-8.
- NAKAMURA, T. & MIZUNO, S. (2010) The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) und its significance for cell biology, life sciences und clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86, 588-610.
- NAKAMURA, T., NAWA, K. & ICHIHARA, A. (1984) Partial purification und characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 122, 1450-9.
- NAKAMURA, T., NAWA, K., ICHIHARA, A., KAISE, N. & NISHINO, T. (1987) Purification und subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett*, 224, 311-6.
- NAKAMURA, T., SAKAI, K. & MATSUMOTO, K. (2011) Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol*, 26 Suppl 1, 188-202.
- NALDINI, L., TAMAGNONE, L., VIGNA, E., SACHS, M., HARTMANN, G., BIRCHMEIER, W., DAIKUHARA, Y., TSUBOUCHI, H., BLASI, F. & COMOGLIO, P. M. (1992) Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is

- required for activation of hepatocyte growth factor/*scatter factor*. *EMBO J*, 11, 4825-33.
- NALDINI, L., VIGNA, E., BARDELLI, A., FOLLENZI, A., GALIMI, F. & COMOGLIO, P. M. (1995) Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem*, 270, 603-11.
- NALDINI, L., WEIDNER, K. M., VIGNA, E., GAUDINO, G., BARDELLI, A., PONZETTO, C., NARSIMHAN, R. P., HARTMANN, G., ZARNEGAR, R., MICHALOPOULOS, G. K. & ET AL. (1991) *Scatter factor* and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J*, 10, 2867-78.
- NAZ, R. K., JOSEPH, A., LEE, Y., AHMAD, K. & BHARGAVA, M. M. (1994) Expression of *scatter factor*/hepatocyte growth factor is regionally correlated with the initiation of sperm motility in murine male genital tract: is *scatter factor*/hepatocyte growth factor involved in initiation of sperm motility? *Mol Reprod Dev*, 38, 431-9.
- NICANDER, L. (1967) An electron microscopical study of cell contacts in the seminiferous tubules of some mammals. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 83, 375-97.
- NIESCHLAG, E., BEHRE, H.M. (1997) *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- O'SHAUGHNESSY, P. J., JOHNSTON, H., WILLERTON, L. & BAKER, P. J. (2002) Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *J Cell Sci*, 115, 3491-6.
- PERUZZI, B. & BOTTARO, D. P. (2006) Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 12, 3657-60.
- QUINKERT, U. (in Vorbereitung) Immunhistochemische Untersuchungen über den Hepatocyte Growth Factor Rezeptor (C-Met) im Rattenhoden während der fetalen, postnatalen und adulten Phase; *Dissertation Medizinische Fakultät, Heinrich Heine Universität Duesseldorf (wird voraussichtlich 2013 eingereicht)*.
- RICCI, G., CATIZONE, A. & GALDIERI, M. (2006) Expression and functional role of hepatocyte growth factor and its receptor (c-met) during fetal mouse *testis* development. *J Endocrinol*, 191, 559-70.

- RICCI, G., CATIZONE, A., INNOCENZI, A. & GALDIERI, M. **(1999)** Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression and role of HGF during embryonic mouse *testis* development. *Dev Biol*, 216, 340-7.
- SHAN, L. X., BARDIN, C. W. & HARDY, M. P. **(1997)** Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology*, 138, 1259-66.
- SHAN, L. X. & HARDY, M. P. **(1992)** Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. *Endocrinology*, 131, 1107-14.
- SHAN, L. X., ZHU, L. J., BARDIN, C. W. & HARDY, M. P. **(1995)** Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization. *Endocrinology*, 136, 3856-62.
- SHIMOMURA, T., DENDA, K., KITAMURA, A., KAWAGUCHI, T., KITO, M., KONDO, J., KAGAYA, S., QIN, L., TAKATA, H., MIYAZAWA, K. & KITAMURA, N. **(1997)** Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor. *J Biol Chem*, 272, 6370-6.
- SHIMOMURA, T., MIYAZAWA, K., KOMIYAMA, Y., HIRAOKA, H., NAKA, D., MORIMOTO, Y. & KITAMURA, N. **(1995)** Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem*, 229, 257-61.
- SIRIL ARIYARATNE, H. B., CHAMINDRANI MENDIS-HANDAGAMA, S., BUCHANAN HALES, D. & IAN MASON, J. **(2000)** Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat *testis*. *Biology of Reproduction*, 63, 165-171.
- STOKER, M., GHERARDI, E., PERRYMAN, M. & GRAY, J. **(1987)** Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*, 327, 239-42.
- TAKETO, T., SAEED, J., ROBERGE, S., MATSUO, N. & KOIDE, S. S. **(1991)** Regulation of testicular differentiation and testosterone production in the fetal mouse gonad in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 38, 523-31.
- TASHIRO, K., HAGIYA, M., NISHIZAWA, T., SEKI, T., SHIMONISHI, M., SHIMIZU, S. & NAKAMURA, T. **(1990)** Deduced primary structure of rat hepatocyte growth factor and expression of the mRNA in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 3200-4.

- UZUMCU, M., PAN, Z., CHU, Y., KUHN, P. E. & ZACHOW, R. **(2006)** Immunolocalization of the hepatocyte growth factor (HGF) system in the rat ovary and the anti-apoptotic effect of HGF in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Reproduction*, 132, 291-9.
- WOLF, H. K., ZARNEGAR, R. & MICHALOPOULOS, G. K. **(1991)** Localization of hepatocyte growth factor in human and rat tissues: an immunohistochemical study. *Hepatology*, 14, 488-94.
- YERUSHALMI, G. M., LEIBOWITZ-AMIT, R., SHAHARABANY, M. & TSARFATY, I. **(2002)** Met-HGF/SF signal transduction induces mimp, a novel mitochondrial carrier homologue, which leads to mitochondrial depolarization. *Neoplasia*, 4, 510-22.
- ZACHOW, R. & UZUMCU, M. **(2007)** The hepatocyte growth factor system as a regulator of female and male gonadal function. *J Endocrinol*, 195, 359-71.
- ZACHOW, R. J. & WOOLERY, J. K. **(2002)** Effects of hepatocyte growth factor on cyclic nucleotide-dependent signaling and steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Biol Reprod*, 67, 454-9.
- ZIEGLER, H. G., HAIDER, S. G., PASSIA, D. & HILSCHER, W. **(1983)** Enzymehistochemical and morphometrical studies on delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase during the fetal and neonatal development of rat Leydig cells. *Andrologia*, 15, 392-307.

Danksagung

Ganz besonders danke ich meiner Ehefrau Annika Smits. Ihr ist diese Doktorarbeit gewidmet! Sie hat mir die Universitätsausbildung ermöglicht, mir jederzeit und in jeder Hinsicht voll zur Seite gestanden und ein Höchstmaß an Unterstützung zukommen lassen. Ohne die zahlreichen Stunden an Geduld, Aufmerksamkeit und Unterstützung wäre es unmöglich gewesen, dieses Studium erfolgreich zu absolvieren. Danke!

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Syed G. Haider für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas sowie für die sehr freundliche und äußerst kompetente Betreuung.

Für eine großartige Zusammenarbeit im Labor danke ich meiner Kommilitonin und Freundin Frau Ute Quinkert.

Ich danke weiterhin Frau L. Wesbuer, Herrn R. Fassbender und insbesondere Frau G. Berthold für die nette Betreuung und die stets guten Ratschläge.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. med. Timm J. Filler für seine Unterstützung.

Ganz herzlich danke ich auch meinem Schwiegervater Herrn Georg Herrmann, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ferner danke ich meinen Eltern, Geschwistern und Großeltern.

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.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift