

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

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H.G. Hartwig

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. S.G. Haider

**UNTERSUCHUNGEN ZUR STEROIDOGENESE
UND APOPTOSE IM BALB-C-MAUS-HODEN
WÄHREND DER POSTNATALEN,
PUBERTÄREN UND ADULTEN PHASE.**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Stefan Landgraeber
2004

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

gez.: Univ.-Prof Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Prof. Dr. Haider

Korrefferent: Univ.-Prof. Dr. Hofmann

5 ZUSAMMENFASSUNG	69
6 LITERATURVERZEICHNIS	70
7 DANKSAGUNG	78
8 LEBENSLAUF	79
9 ABSTRACT	81

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

A	Arteriole
ABP	Androgenbindendes Protein
ALZ	Adulte Leydigzellen
AV	Apikale Verteilung
Bcl-X _S	Kurzer Anteil von Bcl-X
Bcl-X _L	Langer Anteil von Bcl-X
BG	Blutgefäß
°C	Grad Celsius
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMF	Dimethylformamid
FLZ	Fetale Leydigzellen
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämalaun-Eosin
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
L	Lipidtropfen
LZ	Leydigzellen
M	Mol
MG	Molekulargewicht
Min.	Minute
ml	Milliliter
NE	Unspezifische-Esterase
µl	Mikroliter
mM	Millimol

NaCl	Natriumchlorid
PMS	Phenazin-Methosulfat
pnd	postnataler Tag
PVA	Polyvinylalkohol, G04/40, Wacker Chemie
SG	Spermatogonien
SpT	Spermatiden
SZ	Sertoli-Zellen
TBS	Tris buffered saline
TNBT	Tetra-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
W	Watt

1 EINLEITUNG

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zur Aufklärung der Ontogenese der Leydigzellen (LZ), in Hoden von ein Tag bis ein Jahr alten Mäusen, zu leisten. Dies soll mit dem immunhistochemischen Nachweis von Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD) geschehen, da ihnen essentielle Teilfunktionen der Steroidogenese und des Steroidmetabolismus zukommen (Reed et al., 1991; Dufort et al., 2001; Pelletier et al., 2001; Haider, 2004). So bedingt 3α -HSD die Konversion von 3-Ketosteroiden zu 3α -hydroxy-Verbindungen, z.B. von Dihydrotestosteron, dem potentesten Androgen, in 5α -androstan- 3α , 17β -diol (3α -diol), einer weit weniger potenten Verbindung (Dufort I. et al. 2001). 3β -HSD katalysiert die Konversion von Progesteronen in Androstenedione (3β -hydroxy-5-ene Steroide zu 3-oxo-4-ene Steroiden) (Pelletier et al. 2001). Man unterscheidet elf verschiedene Isoformen von 17β -HSD in verschiedenen Geweben (Adamski et al. 1995, Andersson et al. 1995, Luu-The et al. 1995, Normand et al. 1995, Carstensen et al. 1996, Biswas & Russell 1997, Fomitcheva et al. 1998, Nokelainen et al 1998, Pelletier et al. 1999, Su et al. 1999, Bereton et al. 2001, He et al. 2001). Das hier untersuchte 17β -HSD Typ IV oxidiert 5α -androstene- 3β , 17β -diol zu Dehydroepiandrosteron (DHEA), dabei zeigt es eine hohe Anreicherung in den Leydigzellen (Carstensen et al. 1996). Beim 11β -HSD unterscheidet man zwei Isoformen, wobei hier der Typ I untersucht wurde (Yang & Yu, 1994). Für alle erwähnten HSD ist eine Lokalisation in den Leydigzellen belegt (O`Shaughnessy & Murphy 1991a).

Bei Ratten wurde die 11β - und 17β -HSD-Expression, und somit die postnatale LZ-Reifung bereits systematisch untersucht (Schäfers et al.,

2001). Es ist nun angebracht die Ontogenese der LZ auch bei Mäusen zu beschreiben, da Mäuse bei der Herstellung monoklonaler Antikörper eine immer bedeutendere Rolle spielen. Zudem werden Mäuse auch als transgene Tiere gezüchtet (Knock-out-Tiere). Für die Auswertung von Versuchen an solchen Tieren ist es essentiell, systematisch Daten von gesunden Tieren zu erfassen. Bislang wurden an Mäusen 17β -HSD und 3β -HSD in ihrer postnatalen Ausprägung untersucht (Baker et al., 1997 und 1999). Bei diesen Studien handelt es sich allerdings um genetische Untersuchungen der m-RNA von HSD, was zwar Rückschlüsse auf das Vorhandensein und die Quantität von HSD zulässt, jedoch nichts über die tatsächliche Funktion aussagt. Somit erfolgt in dieser Arbeit erstmals eine systematische Untersuchung der wichtigsten HSD's in der Maus. Neben den LZ wurden HSD's bereits auch schon in den interstitiellen Gefäßzellen von Rattenhoden fokal nachgewiesen (Haider und Servos, 1998), ein Nachweis wäre somit auch in den interstitiellen Gefäßzellen von Mäusehoden denkbar.

Ein weiteres, bisher wenig erforschtes Thema, ist die Rolle der Apoptose bei der Steroidogenese bzw. Spermatogenese der Keimzellen. Es ist bekannt, dass sich adulte Leydigzellen (ALZ) durch Apoptose zurückbilden, während sich fetale Leydigzellen (FLZ) durch Degenation und Involution zurückbilden (Vergouwen et al., 1991; Faria et al., 2003). FLZ sind nur in kompakten, runden bis ovalen Clustern angeordnet, die sich in den intertestinalen Feldern zwischen den Tubuli befinden. Die Zellen und ihre Kerne sind groß und rund. Das Zytoplasma enthält viele große runde Lipidtropfen. ALZ hingegen findet man peritubulär, im perivaskulären Bereich, sowie in den intertestinalen Feldern. Man findet sie vereinzelt und in Gruppen. Die Zellen sind dabei groß und rund oder flach, mit runden oder flachen Kernen. Das Zytoplasma

enthält keine bis viele Fetttröpfchen, von gewöhnlich kleiner Größe.

Es ist nun wichtig zu erfahren, zu welchem Zeitpunkt der Ontogenese wie viele Zellen durch Apoptose abgebaut werden. Daraus ließe sich herleiten, wann die LZ eine besondere funktionelle Bedeutung erlangen. Gleiches gilt auch für die Keimzellen, hier ist es besonders interessant zu erfahren, welche Keimzellen im Hoden zu welchem Zeitpunkt vor Apoptose geschützt werden, und somit für die Spermatogenese von entscheidender Rolle sind. Dies ist umso interessanter, wenn man es im zeitlichen Vergleich zu bestimmten Eckpfeilern der Ontogenese betrachtet, wie der Pubertät oder dem ersten Auftreten von ausgereiften Spermatozyten. Rodriguez et al. (1997) beschrieben bereits in genetischen Untersuchungen eine frühpostnatale Apoptosewelle bei Keimzellen.

Eine weitere bisher weitgehend ungeklärte Frage ist der Einfluss der Spermatogenesestadien auf die Apoptose der Keim- und Leydigzellen. Dazu soll die Anleitung zur Stadieneinteilung von Hess et al. (1990a, 1990b) herangezogen werden. Yan et al. (2000a) beobachteten in einer genetischen Untersuchung der Apoptose die stärkste Keimzellreaktion im Stadium VIII. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang auch eine genaue Differenzierung der Keimzellen in Bezug auf die Apoptose, also eine Unterscheidung von Spermatogonien, Spermatozyten, runden und elongierten Spermatischen. Auch auf den Nachweis von Apoptose in weiteren Tubulizellen, wie Sertolizellen, Leydigzellen und Gefäßzellen, soll in dieser Arbeit eingegangen werden.

Die Apoptoseempfindlichkeit der jeweiligen Zellen wird unter anderem durch das relative Verhältnis von Mitgliedern der Bcl-2-Familie zueinander reguliert (Reed, 1994; Sato et al., 1994). So führt eine überwiegende Aktivität der

proapoptotischen Proteine zu Apoptose (Oltvai et al., 1993). Durch verschiedenartiges Splicing von Bcl-X entstehen Bcl-X_S (short) und Bcl-X_L (long), welche beide Homo- und Heterodimere mit Bcl-2 bilden. Bcl-X_S hemmt die Wirkung von Bcl-2 und wirkt somit proapoptotisch. Den gewichtigsten Anteil spielt jedoch Bcl-X_L, welches antiapoptotisch wirkt (Boise et al., 1993). In der Studie wird Bcl-X somit als Protein mit überwiegend antiapoptotischer Wirkung betrachtet.

Auch bei BAK handelt es sich um ein Mitglied der Bcl-2-Familie, dass ebenfalls über die Bildung von Homo- und Heterodimeren in die Kommunikation mit den anderen Bcl-2-Familienmitgliedern eingebunden ist (Reed, 1994; Sato et al, 1994). BAK bindet Bcl-X_L und Bcl-2, wodurch es die antiapoptotische Wirkung dieser beiden Proteine verhindert und als direkter Gegenspieler fungiert (Chittenden et al., 1995). BAK wird somit als ein überwiegend proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie betrachtet.

Des Weiteren sollen auch Enzymkomplexe untersucht werden, die für eine Bereitstellung der Cholesterin-Ester zu Testosteronsynthese zuständig sind, die unspezifischen Esterasen (NE) (Haider 2004). Dies ist interessant um zu erfahren ob das Vorkommen der NE mit dem Auftreten der Nachfolgeprodukte, wie HSD, konform geht. Überhaupt wird ein Vergleich der verschiedenen Untersuchungsparameter einen weiteren Erkenntniszugewinn über die Regulierung der Spermatogenese und Steroidgenese während der Ontogenese zulassen. Im Mittelpunkt des Interesses sollen die Ontogenese der steroidbildenden Enzyme und das Muster der Apoptoseproteine in Hoden von Balb-c-Mäusen stehen. Dessen Klärung soll mit der Durchführung immunhistochemischer, enzymhistochemischer und histologischer Versuche gelingen.

2 MATERIAL UND METHODE

2.1 HODENGEWEBE UND SCHNITTHerstellung

Zur Untersuchung wurde Hodengewebe von weißen Balb-c-Mäusen verwendet. Diese wurden von der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen. Die Aufzucht der männlichen Versuchstiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einer spezifiziert pathogenfreien Zone bei einer Temperatur von 21 bis 23 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 53 bis 57% und Licht von 7.00 bis 19.00 Uhr im zentralen Tierlabor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Wasser (entkeimtes Sauerwasser) und Futter (Mäusefutter der Firma Altromin, Lage) standen ad libitum zur Verfügung.

Es wurden insgesamt 53 Tiere untersucht (jeweils fünf Tiere am 1. postnatalen Tag (=pnd), 5. pnd, 15. pnd, 22. pnd, 26. pnd, 30. pnd, 45. pnd, 60. pnd, 75. pnd und 3 Tiere im Alter von einem postnatalen Jahr).

Die Tiere wurden am Untersuchungstag zwischen 9.00 und 11.00 Uhr mit Äther narkotisiert und durch Dekapitation getötet. Im direkten Anschluss wurden die Hoden der Tiere herauspräpariert und je ein Hoden in Bouinscher Lösung fixiert (Paraffinschnitte), der andere in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Kryostatschnitte).

Zu jeder Versuchsreihe wurden je fünf Schnitte aus verschiedenen Schichten der Hoden entnommen. Der Abstand zwischen zwei ausgewählten Schichten entsprach dabei mindestens 50 µm. Somit standen für jede Versuchsreihe 265 Präparatschnitte zur Verfügung.

Zur Gewinnung der Paraffinschnitte wurde nach der Präparation von jedem Tier ein Hoden in Bouinscher Lösung, bestehend aus 150 ml Pikrinsäure,

50 ml Formalin und 10 ml Eisessig) fixiert. Später wurden die Hoden über zwei Tage einer aufsteigenden Isopropylreihe (70 bis 100%) zugeführt (zweimal 2-3 h in 70%, 1-2 h in 80%, über Nacht ebenfalls in 80%, zweimal 2-3 h in 90%, 1-2 h in 100%, über Nacht ebenfalls in 100%). Am dritten Tag wurden die Hoden in Methylbenzoat gegeben, welches dreimal gewechselt wurde.

Am vierten Tag wurden die Hoden zweimal für 10 Minuten in Tuluol gegeben, welches danach durch flüssiges Paraffin ersetzt wurde. Das Paraffin wurde dreimal (etwa alle drei Stunden) gewechselt und über Nacht im flüssigen Paraffin belassen. Am nächsten Tag erfolgte dann die Einbettung. Die so in Paraffinblöcken eingebetteten Hoden wurden in 7 µm dicke Schichten geschnitten.

Bei der Herstellung der Kryostatschnitte wurde folgender Maßen vorgegangen: Das frisch entnommene Hodengewebe wurde mit einem, der Hodenlänge angepassten, Zylinder aus Aluminiumfolie umhüllt und auf eine mit Filterpapier bedeckte Korkplatte gebracht. Dieses Konstrukt wurde dicht mit Frischhaltefolie umschlossen und in flüssigem Stickstoff bei ca. -190 °C für 1-2 Min. auf und ab bewegt und somit schockgefroren. Das gefrorene Gewebe wurde daraufhin bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Später wurden die Hoden mit einem Kryostaten bei -18 °C in 6 µm dünne Schichten geschnitten und auf einen Objektträger gegeben. Wie bei den Paraffinschnitten wurde auch hierbei darauf geachtet, dass für die enzymhistochemischen Reaktionen jeweils Schnitte aus verschiedenen Schichten der Hoden zur Verfügung standen. Die Schnitte wurden entweder sofort verwendet oder bei -70 °C für wenige Tage gelagert.

Vor den einzelnen Versuchsreihen wurden die Kryostatschnitte

folgendermaßen mit Aceton fixiert:

1. 6 µm dünne Schichten auf dem Objektträger trocknen lassen (einige Minuten)
2. Getrocknete Schnitte für 3 Min. in -20 °C kaltes Aceton geben
3. Schnitte erneut für wenige Minuten trocknen lassen

2.2 HISTOLOGISCHE UND HISTOCHEMISCHE METHODEN

2.2.1 IMMUNREAKTION UND FÄRBUNG AM PARAFFINSCHNITT

2.2.1.1 NACHWEIS VON BAK UND BCL-X (APOPTOSEANTIKÖRPER)

Zum Nachweis von BAK wurde ein polyklonaler Antikörper benutzt, der aus Kaninchen gewonnen wurde. Er wurde von der Firma DAKO (Artikelnummer A3538) bezogen.

Der polyklonale Bcl-X-Antikörper stammte ebenfalls von DAKO (Artikelnummer A3535). Er wurde aus Kaninchen gewonnen.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Nachweismethode aufgeführt:

Vorbehandlung:

1. 7 µm dünne Paraffinschnitte bei 60 °C für 20 Minuten in den Brutschrank stellen
2. Entparaffinieren in Xylol, absteigender Alkoholreihe und Aqua dest.
3. Mikrowellenpuffer (0,01 M Zitronensäure-Natriumzitat, pH 6,0) zum Kochen bringen
4. Entparaffinierte Schnitte in heißen Puffer einstellen

5. In der Mikrowelle bei 800 W für 9 Min. kochen
6. Mit Aqua dest. oder Mikrowellenpuffer Flüssigkeitsspiegel auffüllen
7. In der Mikrowelle bei 800 W für weitere 9 Min. kochen
8. Schnitte im Gefäß für 20 Min. bei Raumtemperatur abkühlen lassen
9. Nach diesen 20 Min. zum weiteren Abkühlen mit TBS (= Tris buffered saline = 0,05 M Trispuffer in 0.9%iges NaCl, pH 7,6) auffüllen oder Gefäß in eine Schüssel mit kaltem Wasser stellen
10. Es ist sehr wichtig darauf zu achten, dass die Schnitte immer mit Flüssigkeit bedeckt sind

Reaktion:

1. Schnitte in TBS spülen
2. Inkubation mit 3%igem H₂O₂ 5 Min.
3. Mit Aqua dest und TBS spülen
4. Inkubation mit 3%igem Ziegenserum bei Raumtemp. 60 Min.
5. Ziegenserum abschleudern
6. Beschichten mit Primärantikörper bei 4 °C 18 h
 Konzentration für Bcl-X: 1:50 (in TBS)
 Konzentration für BAK: 1:250 (in TBS)
 Zusätzlich jeweils einige Negativkontrollen (statt Primärantikörpern wurde reines TBS benutzt)
7. Spülen mit TBS
8. Beschichten mit Envision (Rabbit, DAKO) 30 Min.
9. Spülen mit TBS
10. Bei Raumtemp beschichten mit DAB, das mit 15 µl 10 Min.
 3%igem H₂O₂ aktiviert wurde
11. Spülen mit Aqua dest.

12. Jeweils ein Schnitt von jedem Hoden, sowie ein Teil der
 Negativkontrollen: Kurze Kernfärbung mit Hämalaun 3 Min.
 Bläuen unter fließendem Wasser 3 Min.
13. Schnitte in aufsteigende Alkoholreihe und Xylol geben
14. Eindecken mit Depex

2.2.1.2 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON 11 β HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE

Zum Nachweis von 11 β -HSD wurde ein aus Schafen gewonnener Antikörper benutzt, der sich gegen die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ I richtet. Er wurde von der Firma Binding Site (Artikelnummer PC544) bezogen.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Nachweismethode aufgeführt:

1. 7 μ m dünne Paraffinschnitte bei 60 °C in den 20 Min.
Brutschrank stellen
2. Entparaffinieren in Xylol, absteigender Alkoholreihe und
Aqua dest.
3. 3%iges H₂O₂ (zum Blockieren der endogenen Peroxidase) 5 Min.
4. Abspülen mit Aqua dest., spülen mit TBS 5 Min.
5. Eserserum (Binding Sites, BP 0051) 1:10 mit TBS 30 Min.
verdünnen
6. Serum abschleudern. Nicht spülen!
7. Beschichten mit Primärantikörper bei 4 °C:
 11 β -HSD Typ I, 1:1000 mit TBS verdünnt 16 h
 Negativkontrolle: TBS statt 11 β -HSD bei 4 °C 16 h
8. Spülen mit TBS 5 Min.

- | | | |
|-----|---|-----------|
| 9. | Brückenantikörper Rabbit anti goat (DAKO Z0228)
1:100 mit TBS verdünnen
Mauserum (100 µl auf 1 ml) hinzugeben | 30 Min. |
| 10. | Spülen mit TBS | 5 Min. |
| 11. | PAP (Goat 1:100 mit TBS verdünnen (DAKO, B0157)) | 30 Min. |
| 12. | Spülen mit TBS | 5 Min. |
| 13. | Bei Raumtemp beschichten mit DAB, das mit 15 µl
3%igem H ₂ O ₂ aktiviert wurde | 10 Min. |
| 14. | Spülen mit Aqua dest. | 5 Min. |
| 15. | Kernfärbung mit Hämalaun | 3 Min. |
| 16. | Bläuen unter fließendem Leitungswasser | 3 Min. |
| 17. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol | je 2 Min. |
| 18. | Eindecken mit DePeX | |

2.2.1.3 HÄMALAUN-EOSIN-FÄRBUNG (HE)

- | | | |
|----|--|-----------|
| 1. | 7 µm dünne Paraffinschnitte bei 60 °C in den
Brutschrank stellen | 20 Min. |
| 2. | Entparaffinieren in Xylol, absteigender Alkoholreihe und
Aqua dest. | |
| 3. | Kernfärbung mit Hämalaun | 8 Min. |
| 4. | Bläuen unter fließendem Leitungswasser | 3 Min. |
| 5. | Färbung mit Eosin-Rot | 2 Min. |
| 6. | Kurz in Wasser tauchen | |
| 7. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol | je 2 Min. |
| 8. | Eindecken mit DePeX | |

2.2.2 KRYOSTATSCHNITTE

2.2.2.1 NACHWEIS DER HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASEN (HSD)

1. 6 μm dünne Kryostatschnitte für 3 Min. in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Aceton fixieren
2. Anfertigen einer Stammlösung (es wurde immer nur frische Stammlösung verwendet) bestehend aus:

0,1 M Phosphatpuffer ¹ plus PVA ² , pH 7,4	100 ml
2,5 mM TNBT ³	100 ml
0,1. M NaCN, pH 7,2	40 ml
0,05 M $\text{Mg}_2\text{Cl } 6\text{H}_2\text{O}$	40 ml
Aqua dest.	<u>80 ml</u>
	360 ml
3. Abfüllen der Stammlösung in 20 ml Portionen
4. Zugabe von 26 mg NAD (2 mM) als Kofaktor
5. Zugabe von 2 ml des jeweiligen, in DMF auf 5 mM verdünnten, Substrates (Substrate der Firma Sigma):

Nachweis von **3 α -HSD**: 14,6 mg cis Androsteron (MG 290,4) auf 10 ml DMF

Erläuterungen zu 2.2.2.1:

¹ 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer:

A: 1,361 g KH_2PO_4 (MG 136,09) / 100 ml Aqua dest.

B: 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MG 177,99) / 100 ml Aqua dest.

\Rightarrow 20 ml A plus 80 ml B

² PVA:

Man löst 20 g PVA (Polyvinylalkohol, G04/40, Wacker Chemie) in 100 ml Phosphatpuffer bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach dem Erkalten auf einen pH von 7,4 einstellen.

³ TNBT (Tetra-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid):

TNBT in 5 ml DMF (Dimethylformamid) lösen und mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen und filtrieren.

Nachweis von **3 β -HSD**: 14,42 mg Dehydroepiandrosteron (MG 288,4) auf 10 ml DMF

Nachweis von **17 β -HSD**: 14,6 mg Androstenediol (5-Androstene-3 β ,17 β -diol) (MG 290,4) auf 10 ml DMF

Für die **Negativkontrollen** wurde die Stammlösung mit NAD und 2 ml DMF, jedoch ohne Substrat auf den Objektträger gegeben

6. Direkt vor der Benutzung des Inkubationsmediums Zugabe von 1,23 mg (0,2 mM) PMS (Phenazin-Methosulfat) als Elektronenakzeptor
7. PH auf 7,4 einstellen
8. Filtrieren
9. Nun die Gewebsschnitte 90 Min. bei 37 °C im Dunkeln inkubieren
10. Mit Wasser abspülen
11. Eindecken mit Deckgläschen unter Verwendung von Glyceringelatine
12. Präparate im Dunkeln lagern um ein Verblässen zu verhindern

2.2.2.2 UNSPEZIFISCHE-ESTERASE

1. 6 μ m dünne Kryostatschnitte in -20 °C kaltem Aceton fixieren 3 Min.
2. Anfertigen einer Inkubationslösung:

2 mg 1-Naphtylacetat in 0,5 ml DMF (Dimethylformamid) lösen,
 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer¹ plus PVA², pH 6,5 hinzufügen,
 0,4 ml 4% NaNO₂ mit 0,4 ml 4% Pararosanilin³ mischen und
 hinzufügen.

PH auf 6,5 einstellen und sofort verwenden.
3. Inkubation bei Raumtemperatur 5 Min.
4. Mit Aqua dest. spülen
5. Kerngegenfärbung mit Hämalaun 5 Min.

- | | | |
|----|--|-----------|
| 6. | Unter fließendem Wasser bläuen | 5 Min. |
| 7. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol | je 2 Min. |
| 8. | Eindecken mit DePeX | |

2.2.2.3 HÄMALAUN-EOSIN-FÄRBUNG (HE)

- | | | |
|----|--|-----------|
| 1. | Fixierung der Kryostatschnitte in -20 °C kaltem Aceton | 3 Min. |
| 2. | Kernfärbung mit Hämalaun | 5 Min. |
| 3. | Bläuen unter fließendem Leitungswasser | 3 Min. |
| 4. | Färbung mit Eosin-Rot | 11 Min. |
| 5. | Kurz in Wasser tauchen | |
| 6. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol | je 2 Min. |
| 7. | Eindecken mit DePeX | |

2.2.2.4 LIPIDFÄRBUNG MIT SUDAN IV

- | | | |
|----|---|---------|
| 1. | Fixierung der 6 µm dünnen Kryostatschnitte
in 10%igem Formalin | 10 Min. |
| 2. | Mit Aqua dest. spülen | |
| 3. | In 50%igen Iso-Propylalkohol tauchen | 3 Min. |

Erläuterungen zu 2.2.2.2:

¹ 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer:

A: 1,361 g KH_2PO_4 (MG 136,09) / 100 ml Aqua dest.

B: 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MG 177,99) / 100 ml Aqua dest.

⇒ 7 ml A plus 3 ml B und auf pH 6,5 einstellen

² PVA:

Man löst 2 g PVA (Polyvinylalkohol, G04/40, Wacker Chemie) in 10 ml Phosphatpuffer bei 60 °C.

³ Pararosanilin:

400 mg Pararosanilin in 2 ml 37%iger Salzsäure lösen und mit 8 ml Aqua dest. auffüllen, filtrieren

4. In Sudan-IV-Lösung geben 20 Min.
Dazu wurde die Stammlösung wie folgt erstellt:
1g Sudan IV in 100 ml 80%igem Iso-Propylalkohol
bei Siedehitze lösen, abkühlen lassen und filtrieren.
Stammlösung mit Aqua dest. 1:1 mischen und
nach 24 Stunden filtrieren und verwenden
5. Kurz in 70%igem Iso-Propylalkohol spülen
6. Mit Aqua dest spülen
7. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol je 2 Min.
8. Eindecken mit DePeX

3 ERGEBNISSE

3.1 IMMUNREAKTION AM PARAFFINSCHNITT

3.1.1 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON BCL-X

Wie die Tabelle 1 zeigt, ergibt sich zunächst eine vom 1. bis 22. pnd abschwächende Reaktion in den **Leydigzellen** (Grafik 1 und Abb. 1 bis 3). Nach dem 22. pnd zeigt sich wieder eine Zunahme der Bcl-X-Aktivität mit Höhepunkt am 30. pnd (Grafik 1 und Abb. 4). Danach bleibt die Reaktion auf etwas niedrigerem Niveau als am 30. pnd gleichförmig positiv (Grafik 1 und Abb. 5).

An einigen Tagen wurde die Immunreaktion von Bcl-X in den glatten Muskelzellen der Tunica media der interstitiellen **Blutgefäße** beobachtet. Die Intensität schwankte dabei zwischen schwach und mäßig. Dieser Befund wurde insbesondere am 22. und 26. pnd beobachtet (Abb. 3).

Betrachtet man die **Keimzellen**, so kann man ebenfalls eine gewisse altersabhängige Dynamik der Immunreaktion feststellen. Die Spermatogonien sind zunächst im basalen Bereich relativ konstant positiv (Abb. 1). Die fokale Lokalisation ist dabei am 15. pnd kranzförmig (Abb. 2), was an den Tagen zuvor nicht der Fall ist. Ab dem 26. pnd sind Spermatogonien negativ, mit Ausnahme des 30. pnd, hier findet sich sogar die stärkste Reaktion im gesamten Verlauf (Abb. 4). Die Spermatozyten zeigen eine rückläufige Anfärbungstendenz.

Interessant ist auch das stadienabhängige Verhalten der Keimzellen ab dem 45. pnd (Abb. 5 A), welches andeutungsweise schon am 30. pnd zu sehen

ist. Dabei sind die Spermatogonien in allen Stadien negativ, sie spielen also für die unterschiedliche, stadienabhängige Darstellung keine Rolle. Der Unterschied ist vielmehr im Zytoplasma der Spermatozyten sowie runden und elongierten Spermatiden zu finden. Während nämlich in den Stadien I-VI (Abb. 5 B) und IX-XII (Abb. 5 D) nur distinkt lokalisierte Reaktionszonen in der Nähe des Zellkerns zu finden sind, findet man im Stadium VIII (Abb. 5 C) starke punktförmige Anfärbungen. In den Stadien XIII und XIV sind zwar wiederum nur distinkte Reaktionen zu finden, diesmal jedoch nicht punkt- (Stadium I-VI und IX-XII) sondern saumförmig in der Peripherie lokalisiert. Die Spermatiden sind wiederum nur schwach diffus positiv. Eine Zusammenfassung des stadienabhängigen Apoptoseverhaltens in Keimzellen bietet Tabelle 3.

Der Unterschied der Stadien I-VI zu IX-XII liegt in den **Sertolizellen**. Während die schwach diffuse Reaktion der Stadien I-VI apikal lokalisiert ist (gilt auch für die Stadien XIII-XIV) (Abb. 5 A und B), ist sie in den Stadien IX-XII im gesamten Zytoplasma verteilt (wie Stadium VIII) (Abb. 5 C). Vor dem 45. pnd entwickelt sich in den Sertolizellen die apikale Verteilung der ersten 15 Tage (Abb. 2), über eine homogene Verteilung am 22. pnd zu einer Reaktion im basalen Bereich am 30. pnd (Abb. 4).

TABELLE 1: ZUSAMMENFASSUNG DES VORKOMMENS DER BCL-X-REAKTION IM MAUSHODEN

	LEYDIGZELLEN	KEIMZELLEN	SERTOLIZELLEN
1. PND	Regelmäßig positiv	Basale Spermatogonien im Tubulus fokal positiv	
5. PND	Regelmäßig positiv	Basale Spermatogonien im Tubulus fokal positiv	Apikaler Bereich unregelmäßig positiv
15. PND	Kaum positiv	Kranzförmig um die Spermatogonien fokal positiv Sich teilende Spermatozyten zeigen eine starke Reaktion im Zytoplasma, ansonsten schwache Reaktion	Apikaler Bereich unregelmäßig positiv

	LEYDIGZELLEN	KEIMZELLEN	SERTOLIZELLEN
22. PND	Negativ, zudem nimmt die Anzahl im Verhältnis zu den Tubuli ab	Unterschiede zwischen den einzelnen Tubuli (Kanälchen) → Abhängig vom Stadium der Spermatogenese Spindelapparat (Metaphase) und Spermatozyten positiv (am Rand lokalisierte Reaktion ⇒ agluminales Kompartiment)	Homogen positiv
26. PND	Fokal positiv	Runde Spermatiden an der Zellmembran: Saumartige distinkte Reaktion Keine Unterschiede zwischen den einzelnen Tubuli (Kanälchen) Spermatogonien negativ	
30. PND	Stark positiv (beinahe homogen) und wieder häufiger vorhanden ⇒ wie am 1.pnd	Spermatogonien im basalen Bereich positiv Residual-bodys vorhanden und stark positiv Unterschiede zwischen den einzelnen Tubuli	Im basalen Bereich positiv
45. PND	Positiv (unterschiedliche Intensität ⇒ eher heterogen)	Insgesamt sehr heterogenes Bild: Tubuli unterschiedlich angefärbt. Spermatogeneszellen zeigen stadiumabhängiges Verhalten: Stadium I-VI: Punktförmig distinkt lokalisierte Reaktionszone in der Nähe des Zellkernes, sowohl in den Spermatozyten als auch in den runden Spermatiden. Die Spermatogonien sind negativ Stadium VIII: Punktförmige stark intensive Reaktionszone unmittelbar um den Zellkern der runden Spermatiden. Mäßige Reaktion in den Residualbodies der elongierten Spermatiden Spermatogonien sind negativ Stadium IX-XII: Punktförmig distinkt lokalisierte Reaktionszone in der Nähe des Zellkernes, sowohl in den Spermatozyten als auch in den runden Spermatiden. Spermatogonien sind negativ Stadium XIII-XIV: Saumförmige distinkte Lokalisation in der Peripherie der Spermatozyten, die sich in der meiotischen Teilung befinden, und in den pachythenen Spermatozyten Spermatogonien sind negativ	Stadienabhängig: Stadium I-VI: Sertolizellen im apikalen Bereich zeigen eine schwach diffuse Reaktion Stadium VIII: Schwache Reaktion im Zytoplasma der Sertolizellen Mäßige Reaktion im apikalen Bereich der Sertolizellen Stadium IX-XII: Schwache diffuse Reaktion im Zytoplasma der Sertolizellen Stadium XIII-XIV: Diffus schwache Reaktion im apikalen Bereich der Sertolizellen

	LEYDIGZELLEN	KEIMZELLEN	SERTOLIZELLEN
45. PND		Spermatiden schwach diffus positiv	
60. PND	positiv	stadienabhängig wie am 45. pnd	stadienabhängig wie am 45. pnd
75. PND	Positiv	stadienabhängig wie am 45. pnd	stadienabhängig wie am 45. pnd
1. POSTNATALES JAHR	positiv	stadienabhängig wie am 45. pnd	stadienabhängig wie am 45. pnd

3.1.2 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON BAK

Wie Tabelle 2 und Grafik 1 verdeutlichen, zeigt das Reaktionsverhalten der **Leydigzellen** einen fast gegenteiligen Verlauf gegenüber Bcl-X, jedoch auf niedrigem Niveau. Mit Ausnahme des 5. pnd findet man bis zum 26. pnd (Grafik 1, Abb. 6 bis 9) schwach positive Reaktionen. Am 30. pnd, dem Tag der stärksten Bcl-X-Reaktion findet man nur negative Areale. Später findet man wieder schwache bis mäßige Reaktionen (Abb. 10), die ab dem 75. pnd sehr schwach werden. (Grafik 1).

In den **Gefäßzellen** ließ keine gerichtete altersabhängige Reaktionsdynamik feststellen. Mit Ausnahme des 30. Tages fanden sich jedoch immer positive Reaktionen, die mal in den Myoidzellen, mal in den Endothelzellen und mal in beiden lokalisiert waren (Abb. 8).

Betrachtet man die **Keimzellen**, so bemerkt man sowohl bei Spermatogonien als auch Spermatozyten zunächst eine Zunahme der Reaktion vom 1. bis zum 15. pnd (Abb. 6 und 7). Ab dem 22. pnd bemerkt man einen Intensitätsrückgang, der bei den Spermatogonien am 26. pnd (Abb. 8) und bei den Spermatozyten am 30. pnd zu einer negativen Darstellung führt. Lediglich diplotäne und in meiotischer Teilung befindliche Spermatozyten sind noch schwach positiv (Abb. 9). Die Spermatiden treten

ab dem 26. pnd zunächst mäßig positiv in Erscheinung (Abb. 9). Ab dem 45. pnd müssen sie dann stadienabhängig betrachtet werden (Abb. 10 und 11 A bis D). Dabei sind die Spermatiden, genauer gesagt die runden Spermatiden, im Stadium I-VI (Abb. 11 B) zunächst stark positiv (mit saumartiger Lokalisierung in der Peripherie), im Stadium VII-VIII (Abb. 11 C) schwach bis mäßig positiv und im Stadium IX-XII (Abb. 11 D) schließlich nur noch schwach positiv. Demgegenüber sind die elongierten Spermatiden, sowie die Spermatozyten in allen Stadien schwach positiv. Spermatogonien sind stadienunabhängig schwach bis negativ. Die Stadieneinteilung bezieht sich in dem Fall also auf die runden Spermatiden. Eine übersichtliche Zusammenfassung der stadienabhängigen Apoptose in Keimzellen bietet Tabelle 3.

An einigen Tagen wurde die Immunreaktion von BAK in den **Sertolizellen** beobachtet. Die Intensität schwankte dabei zwischen schwach und mäßig, bei meist apikalem Verteilungsmuster. Dieser Befund wurde insbesondere am 5. und 15. pnd beobachtet (Abb. 7).

TABELLE 2: ZUSAMMENFASSUNG DES VORKOMMENS DER BAK-REAKTION IM MAUSHODEN

	LEYDIGZELLEN	GEFÄßE	KEIMZELLEN
1. PND	Schwach positiv	In der Media positiv	Im Tubulus sind einige Spermatogonien positiv, in der Mitte liegende zeigen eine saumartige Reaktion in der Peripherie Einige Spermatogonien im basalen Bereich der Tubuli zeigen eine schwache bis mäßige Reaktion
5. PND	Negativ	Media der Arteriolen positiv	Apikaler Bereich der Spermatogonien mäßig positiv und grobschollig verteilt
15. PND		Endothelzellen positiv	Primäre (pachytene) Spermatozyten positiv Saumartige Grenze zwischen den basalen Spermatogonien und den adluminal liegenden Spermatozyten Diplotäne Spermatozyten positiv

	LEYDIGZELLEN	GEFÄßE	KEIMZELLEN
22. PND	Gelegentlich schwache Reaktion	Mediazellen und Endothelzellen positiv	Allgemein starkes Abnehmen der Reaktion (Verteilung und Intensität) Einige Spermatozyten: Distinkte lokalisierte Reaktionszonen (mäßige Reaktion)
26. PND	Selten und schwach positiv	Myoidzellen positiv	Insgesamt sehr heterogen: Große Unterschiede zwischen den einzelnen Tubuli (stadienabhängiges Verhalten ⇒ 45. pnd) Diplotene und pachytene Spermatozyten, runde Spermatiden positiv Spermatogonien negativ
30. PND	Negativ	Myoidzellen negativ	Punktuell (fokal) in einigen runden Spermatiden schwache bis mäßige Reaktion Spermatogonien sind negativ Diplotene und in meiotischer Teilung befindliche Spermatozyten zeigen distinkt schwache Reaktionen, die übrigen Spermatozyten sind negativ
45. PND	Schwach bis mäßig positiv	Epithelzellen positiv	Insgesamt sehr heterogenes Bild: Tubuli sind unterschiedlich angefärbt und schon bei schwacher Vergrößerung anhand der Färbung zu unterscheiden Stadieneinteilung: Stadium I bis VI (VII) vor Ablösung??: Spermatogonien: Schwach positiv bis negativ Spermatozyten: Schwach positiv Runde Spermatiden: Stark positiv mit Saumartiger Lokalisierung in der Peripherie der Zellen Das Zytoplasma der elongierten Zellen zeigt eine schwache Aktivität Stadium (VII) bis VIII: Spermatogonien: Schwach positiv bis negativ Spermatozyten: Schwach positiv Runde Spermatiden schwach bis mäßig positiv (dunkler Ring wird heller) →Unterschied zu I liegt in den runden Spermatiden Elongierte Spermatiden schwach positiv Stadium IX bis XII: Spermatogonien: Schwach positiv Spermatozyten: Einige stark positive Runde bzw. Elongierte (es gibt nur entweder oder) Spermatiden: Schwach positiv
60. PND	Schwach positiv	Mediazellen positiv	Stadienabhängig wie am 45. pnd
75. PND	Sehr schwach positiv	Mediazellen positiv	Stadienabhängig wie am 45. pnd
1. POSTNATALES JAHR	Sehr schwach positiv	Mediazellen positiv	Stadienabhängig wie am 45. pnd

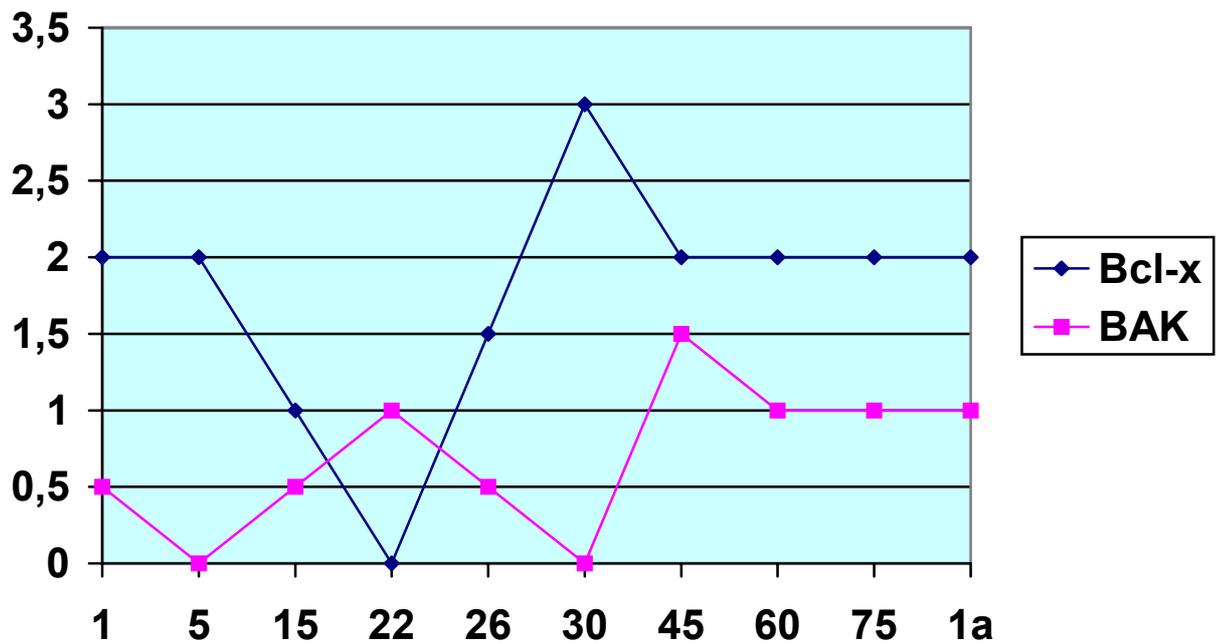
TABELLE 3: STADIENABHÄNGIGES APOPTOSE-VERHALTEN DER KEIMZELLEN IN MÄUSEHODEN

	KEIMZELLART	BAK	BCL-X	APOPTOSEGRAD
STADIUM IX-XII	Spermatogonien	(+)	-	Apoptotisch
	Spermatozyten	++	(+)	Apoptotisch
STADIUM I-VI	Spermatogonien	(+)/-	-	Apoptotisch
	Spermatozyten	(+)	(+)	Ausgeglichen
	Elongierte Spermatiden	(+)		
	Runde Spermatiden	+ / ++	(+)	Apoptotisch
STADIUM VIII	Spermatogonien	(+)/-	-	Apoptotisch
	Spermatozyten	(+)		
	Elongierte Spermatiden	(+)	+	Antiapoptotisch
	Runde Spermatiden	(+)/+	+ / ++	Antiapoptotisch

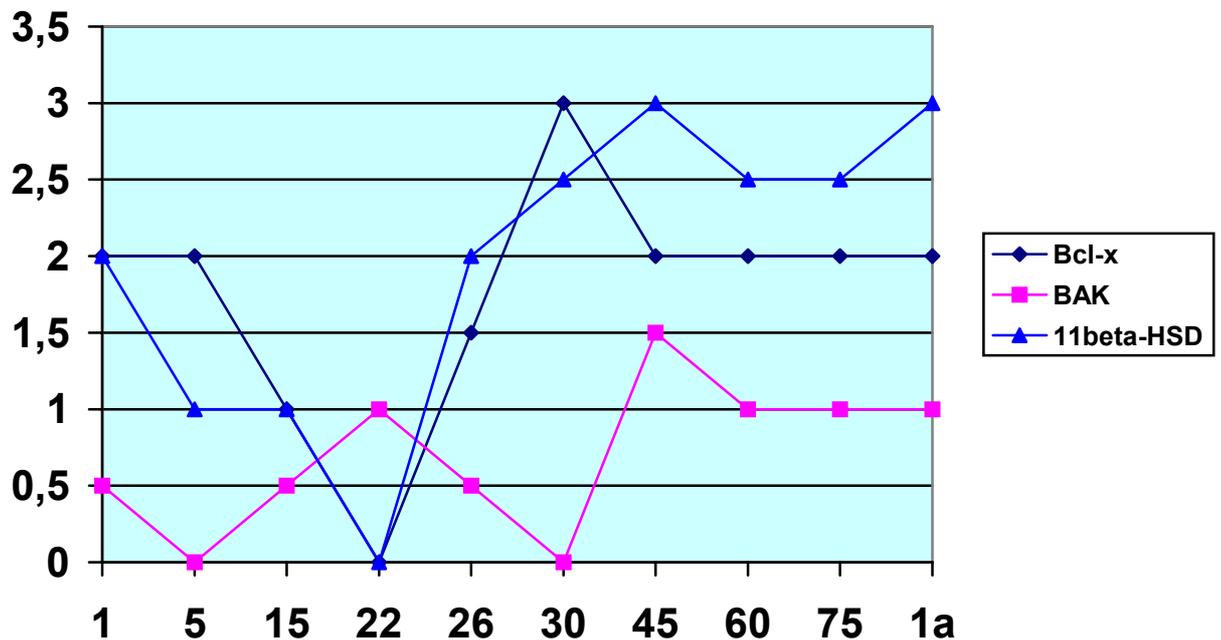
LEGENDE: - = negativ; (+) = schwach positiv; + = positiv, ++ = stark positiv

GRAFIKEN UND FOTOS ÜBER DIE APOPTOSEANTI-KÖRPER BCL-X UND BAK

GRAFIK 1: VERGLEICH DER BEIDEN APOPTOSEANTI-KÖRPER



In Grafik 1 gibt die Ordinate die Reaktionsintensität in den Leydigzellen an. Dabei steht die 0 für eine negative Reaktion, die 1 für eine schwache Reaktion, die 2 für eine mäßige Reaktion, die 3 für eine starke Reaktion und die 4 schließlich für eine sehr starke Reaktion. An der Abszisse ist das jeweilige Alter abzulesen. Mit der Grafik soll die Reaktionsintensität bei verschiedenen Altersstufen in den Leydigzellen verdeutlicht werden. Man erkennt den fast konträren Verlauf von Bcl-X zu BAK bis zum 60. pnd.

GRAFIK 2: VERGLEICH DER BEIDEN ANTIAPOPTOSEANTIKÖRPER MIT 11 β -HSD

In Grafik 2 gibt die Ordinate die Reaktionsintensität in den Leydigzellen an. Dabei steht die 0 für eine negative Reaktion, die 1 für eine schwache Reaktion, die 2 für eine mäßige Reaktion, die 3 für eine starke Reaktion und die 4 schließlich für eine sehr starke Reaktion. An der Abszisse ist das jeweilige Alter abzulesen.

Wie in Grafik 1 erkennt man wiederum den fast konträren Verlauf von BAK zu Bcl-X. Zusätzlich wird die fast analoge Entwicklung von BAK und 11 β -HSD dargestellt.

FOTOS ZUR BCL-X-REAKTION

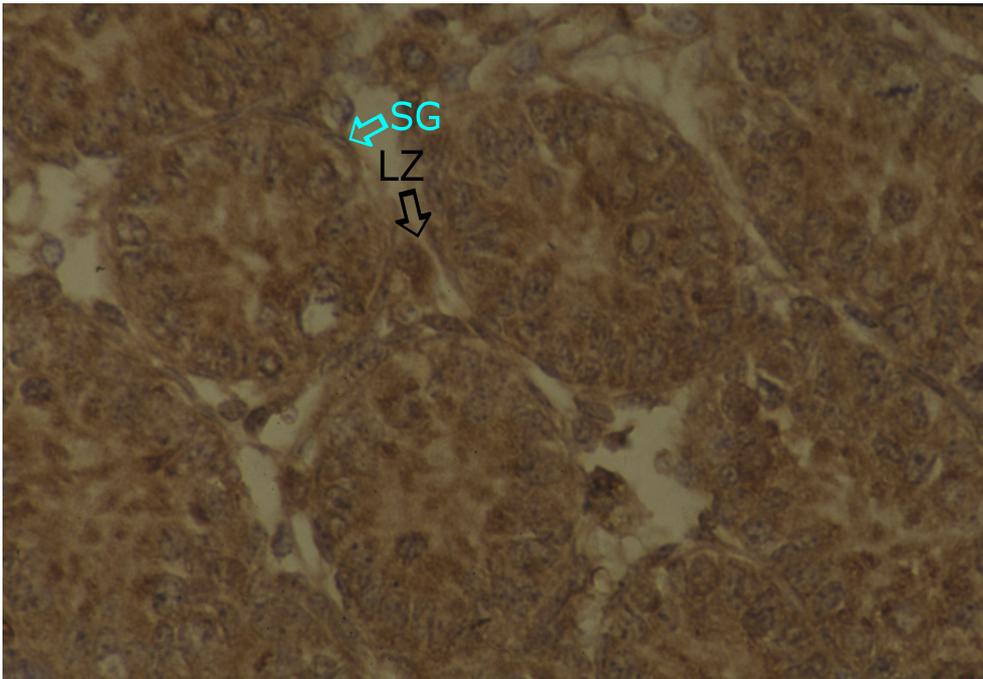


Abb. 1: Maushoden 5 Tage, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von Bcl-X. Die Leydigzellen (LZ⇒) reagieren regelmäßig positiv. Basale Spermatogonien (SG⇒) reagieren fokal positiv. Der apikale Bereich der Sertolizellen reagiert unregelmäßig positiv. x 580.

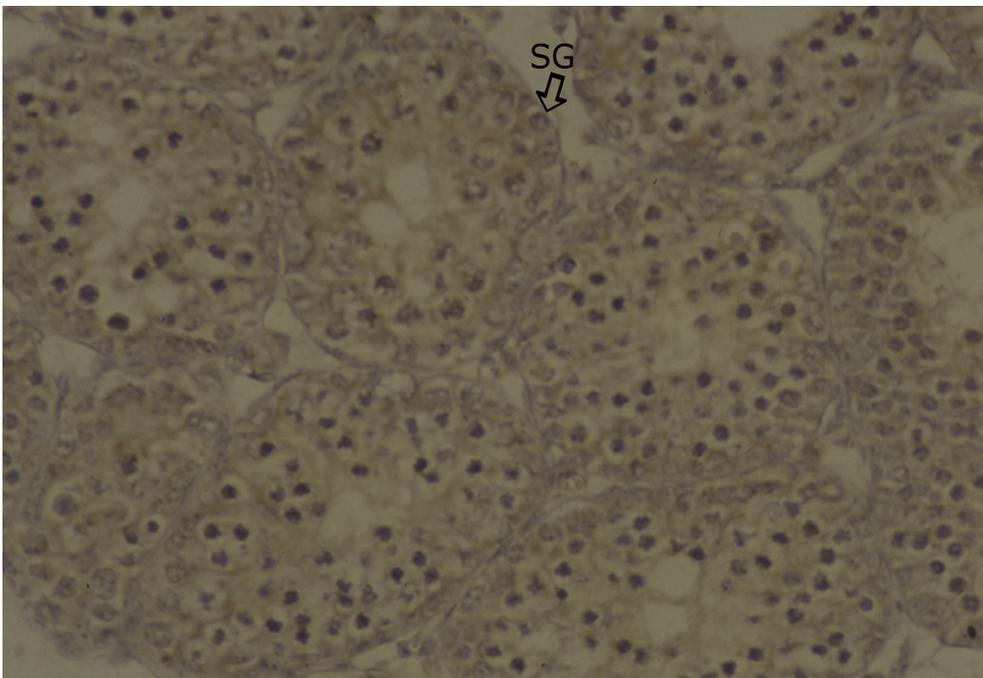


Abb. 2: Maushoden 15 Tage, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von Bcl-X. Man erkennt fokale kranzförmig positive Reaktionen um Spermatogonien (SG⇒). Die Sertolizellen zeigen weiterhin eine unregelmäßige, apikale Verteilung der Reaktion. Die Leydigzellen reagieren kaum positiv. x 580.

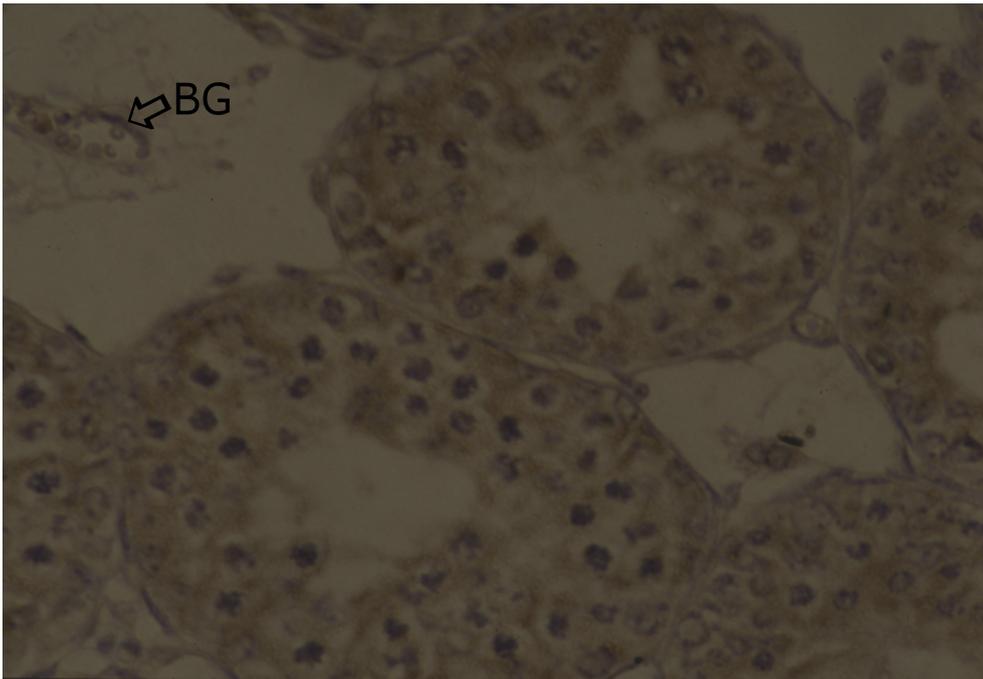


Abb. 3: Maushoden 15 Tage, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von Bcl-X. Hier wird ein Beispiel für die positive Reaktion von Bcl-X in den Muskelzellen der Tunica media, der interstitiellen Blutgefäße (BG), gezeigt. x 580.

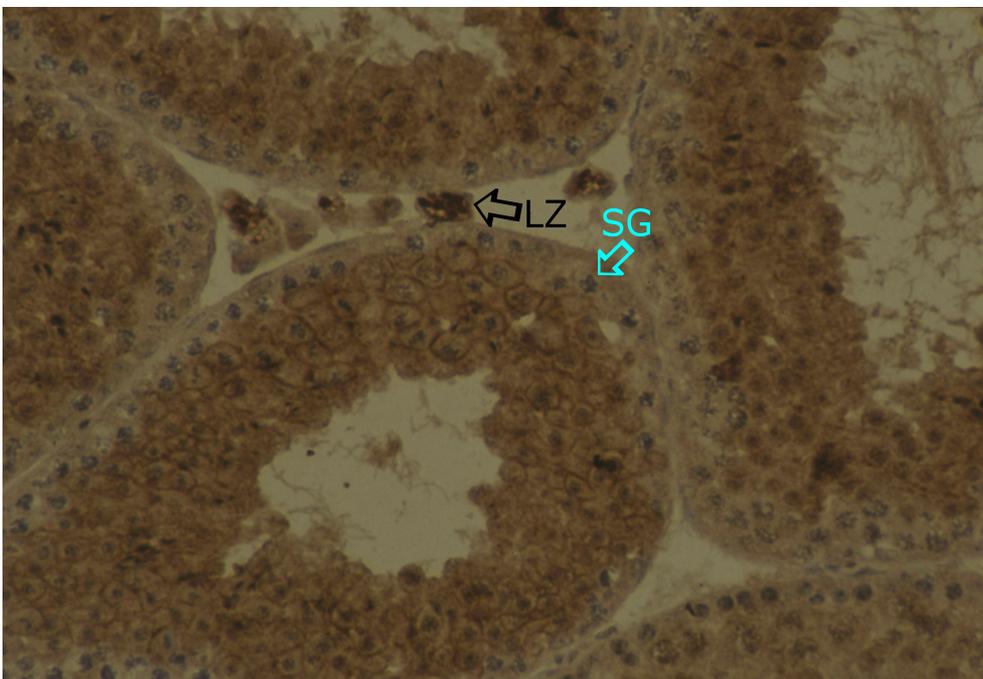


Abb. 4: Maushoden 30 Tage, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von Bcl-X. Basale Spermatogonien (SG⇒) reagieren stark positiv. Die Reaktion in den Leydigzellen (LZ⇒) ist stark positiv und markiert somit einen Höhepunkt im Lebenszyklus des Mäusehodens. Die Reaktion der Residual-bodies ist stark positiv. x 580.

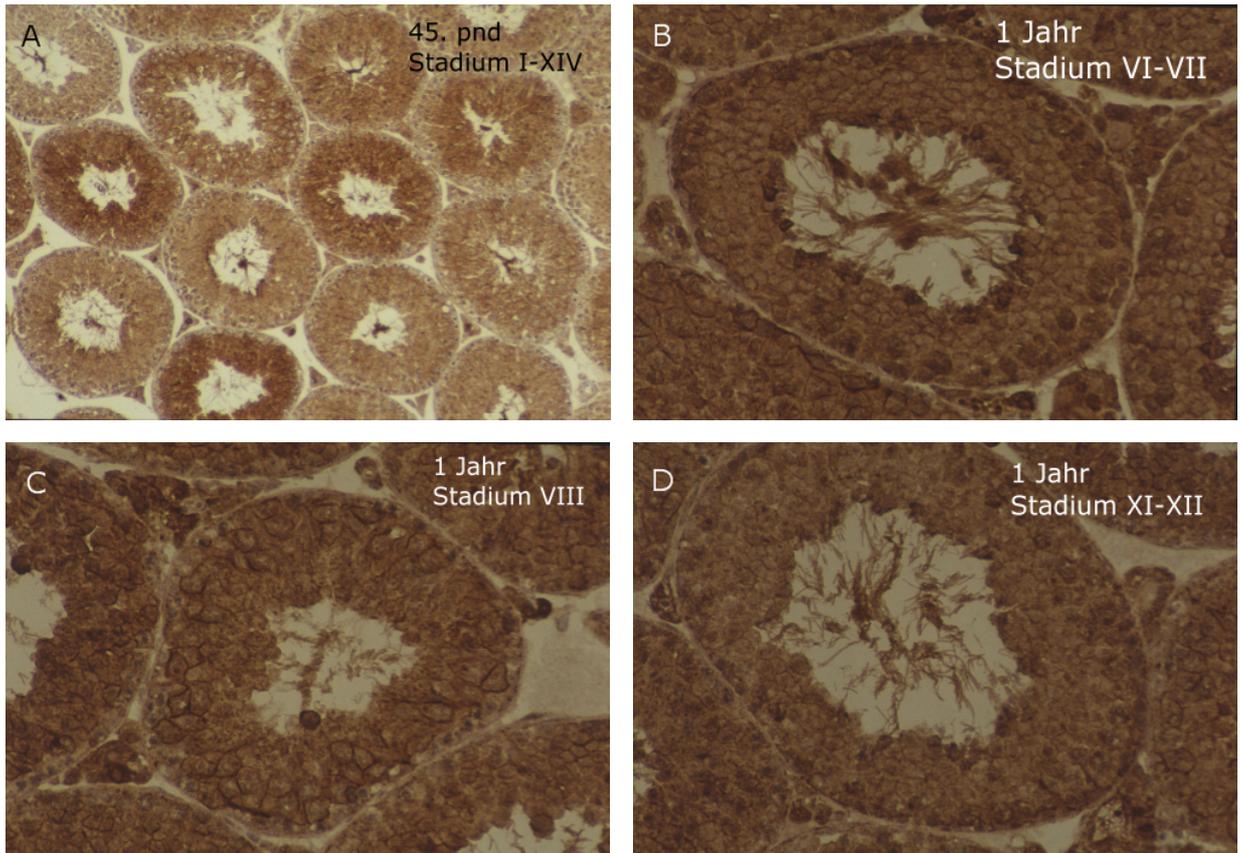


Abb. 5 A-D: Bei den Abbildungen handelt es sich um Paraffinschnitte des Hodens von 45 Tage (A) bzw. 1 Jahr (B-D) alten Mäusen, mit immunhistochemischem Nachweis von Bcl-X. Sie sollen die keimzellyklusstadienabhängigen Reaktionen von Bcl-X verdeutlichen.

A Man erkennt die Tubuli in verschiedenen Stadien (I-XIV) mit entsprechendem Färbeverhalten. **B** Tubulus im Stadium VI-VII. **C** Tubulus im Stadium VIII. **D** Tubulus im Stadium XI-XII. x 150 (A) und x 360 (B-D).

FOTOS ZUR BAK-REAKTION

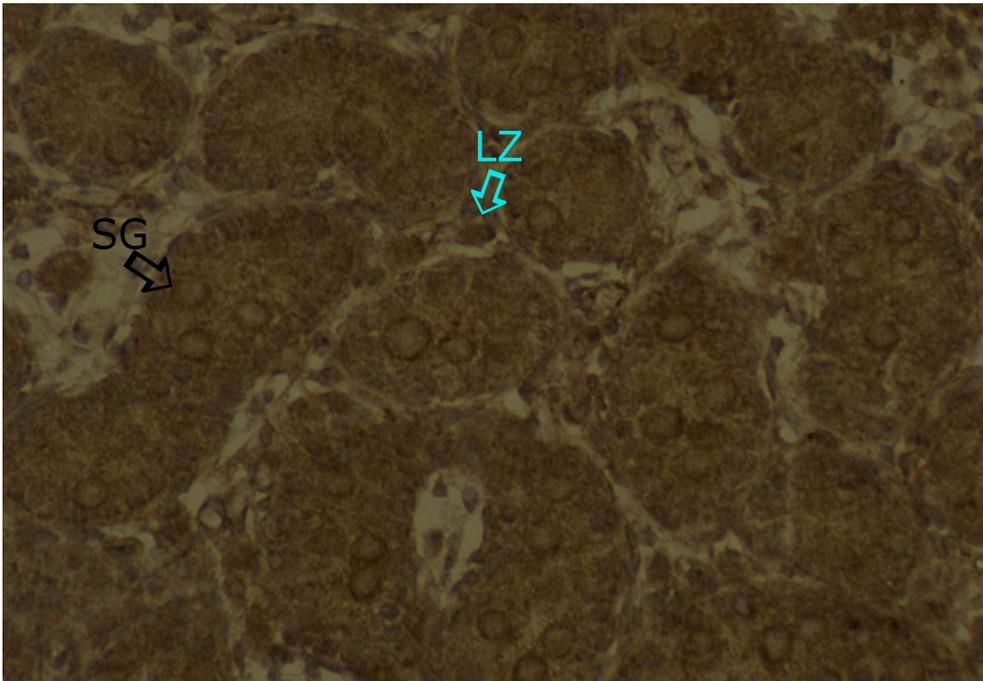


Abb. 6: Maushoden 1 Tag, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von BAK. Die Spermatogonien (SG⇒) zeigen eine saumartige Reaktion. Die Leydigzellen (LZ⇒) zeigen schwache bis mäßige Reaktionen. x 360.

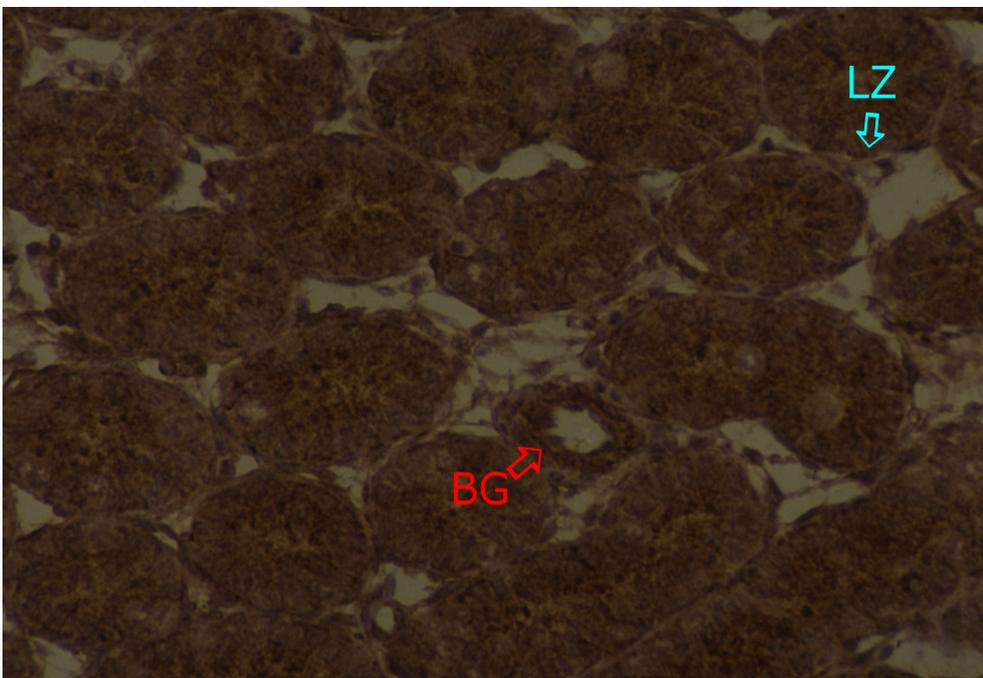


Abb. 7: Maushoden 5 Tage, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von BAK. Man erkennt eine negative Reaktion in den Leydigzellen (LZ⇒). In der Media-Schicht der Blutgefäße (BG⇒) findet man hingegen mäßige Reaktionen. Im apikalen Bereich der Spermatogonien oder Sertolizellen zeigt sich eine grobschollige Reaktion mit mäßiger Intensität. x 360.

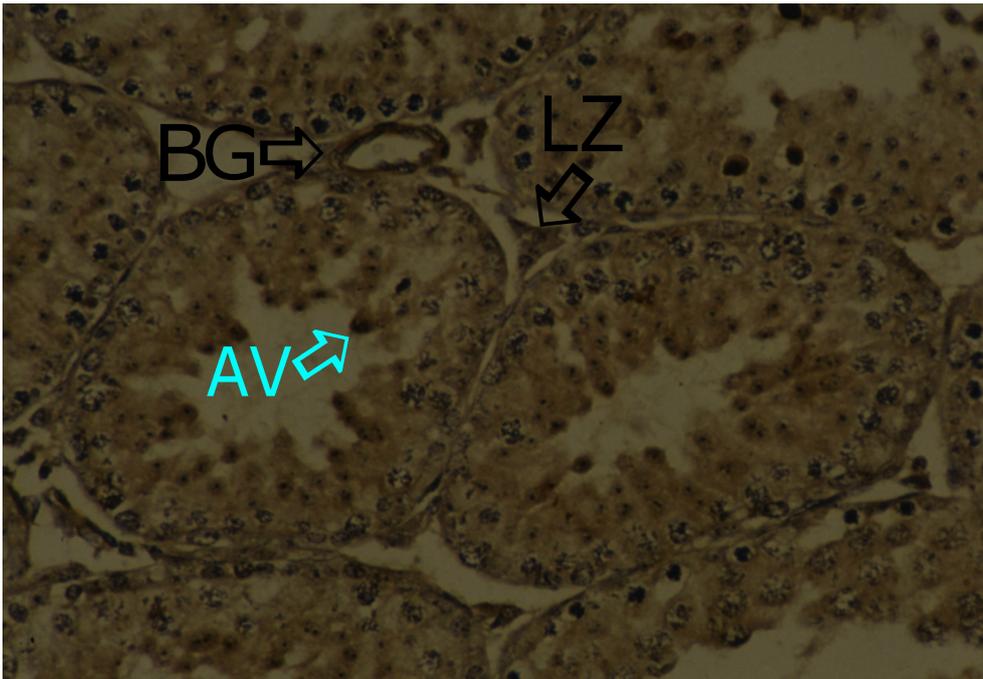


Abb. 8: Maushoden 26 Tage, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von BAK. Man erkennt eine apikale Verteilung (AV⇒) der Reaktion in den Keimzellen, sowie positive Myoidzellen in den Blutgefäßen (BG⇒). In den Leydigzellen zeigt sich eine schwache positive Reaktion. x 360.

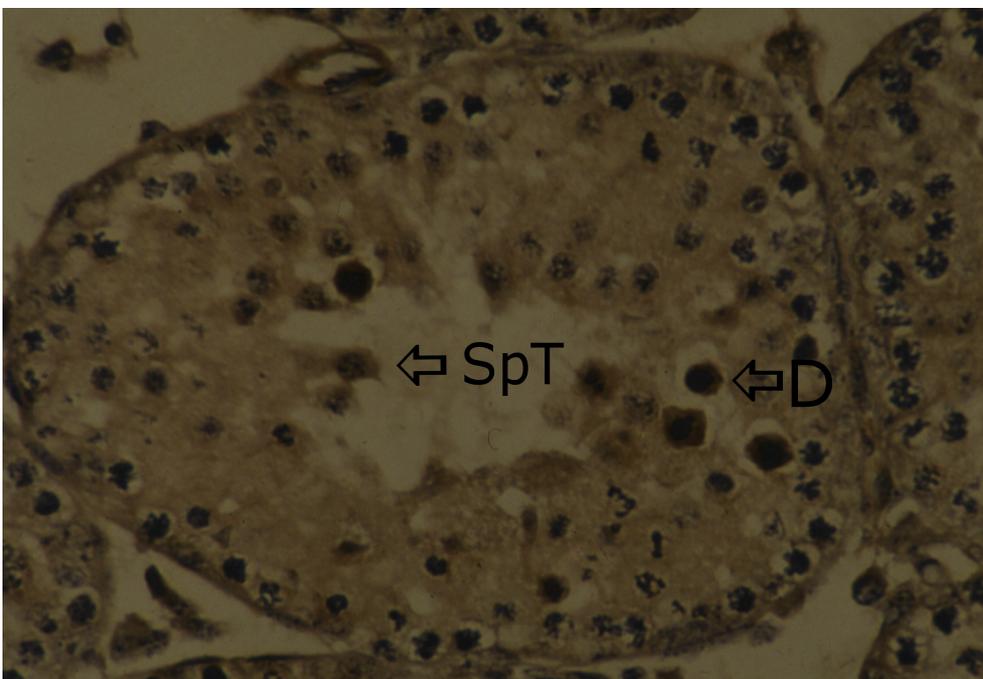


Abb. 9: Maushoden 26 Tage, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von BAK. Die diplotänen Spermatozyten (D⇒) weisen im Zytoplasma eine Immunreaktion auf. Die Spermatisden treten ab dem 26. pnd zunächst mäßig positiv in Erscheinung x 580.

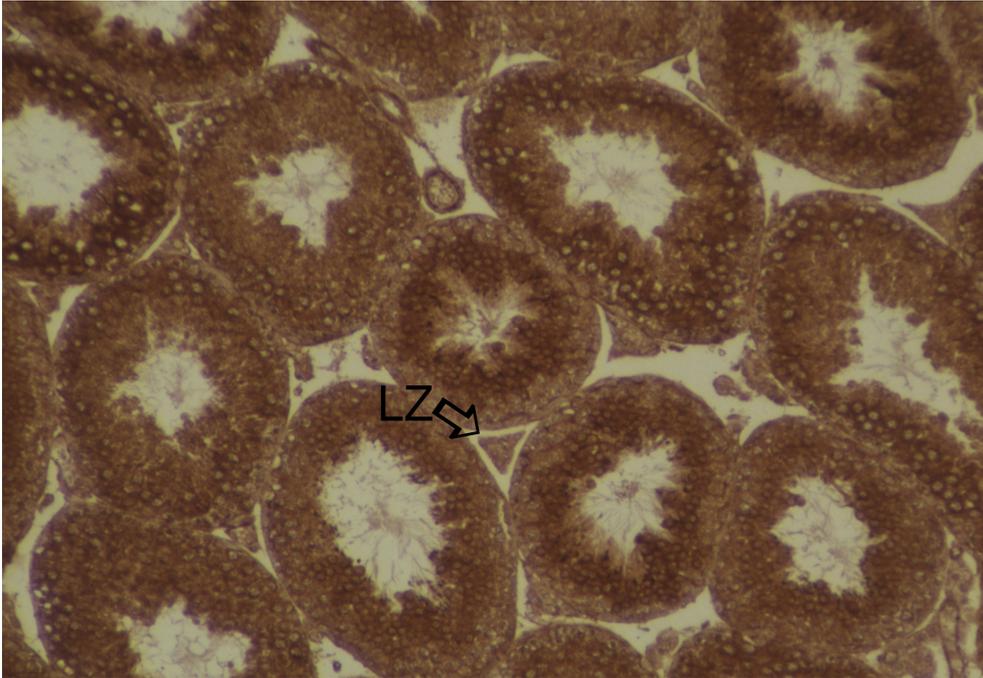


Abb. 10: Maushoden 45 Tage, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von BAK. Man erkennt die je nach Stadium (I-XIII) unterschiedliche Anfärbungen der Keimzellen (genauer Spermatozyten und Spermatiden). Die Leydigzellareale (LZ⇒) sind nur noch schwach bis mäßig positiv. x 150.

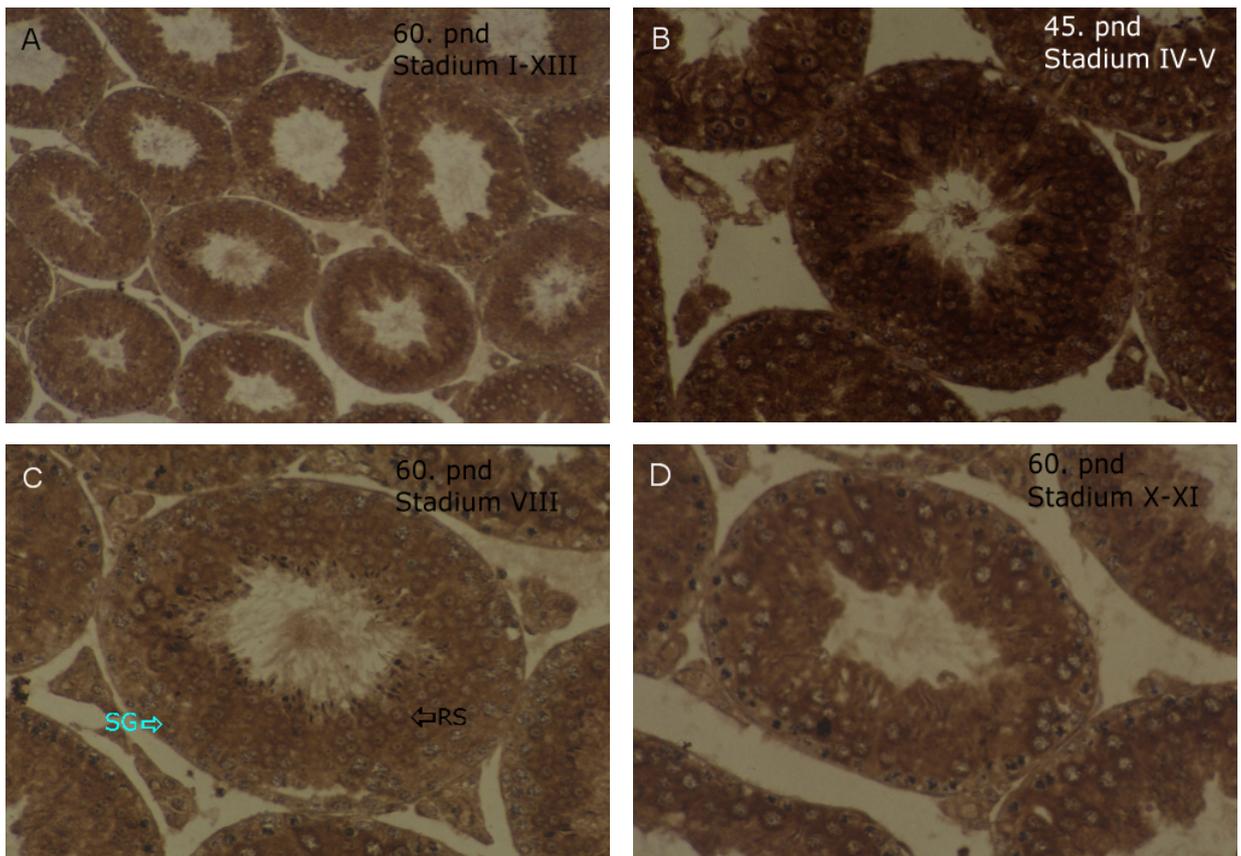


Abb. 11 A-D: Bei den Abbildungen handelt es sich um Paraffinschnitte des Hodens von 45 Tage (B) bzw. 60 Tage (A, C und D) alten Mäusen, mit immunhistochemischem Nachweis von BAK. Sie sollen die Keimzellyklusstadienabhängigen Reaktionen von BAK verdeutlichen.

A Man erkennt die je nach Stadium (I-XIII) unterschiedliche Anfärbungen der Keimzellen (genauer Spermatzyten und Spermatiden). **B** Tubulus im Stadium IV-V. **C** Typische Darstellung eines Tubuli im Stadium VIII mit schwacher Reaktion in den Spermatogonien (SG⇒) und schwach bis mäßig positiver Reaktion in den runden Spermatiden (RS⇒). **D** Tubulus im Stadium X-XI. x 150 (A) und x 360 (B-D)

3.1.3 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON 11 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE

Die **Negativkontrollen** zeigen keine Reaktion in den Tubuli und Leydigzellen. In den Erythrozyten und Makrophagen zeigt sich hingegen eine falsch-positive Reaktion, was in der Auswertung berücksichtigt wurde.

Die **Leydigzellen** zeigen vom 1. bis zum 22. pnd eine tendenzielle Abnahme der Reaktionsstärke (Grafik 3, Abb. 12 A bis C), wobei am 22. pnd kein Reaktionsnachweis mehr stattfindet. Zwar sind am 15. pnd mäßige Reaktionen zu finden, diese sind aber nur sehr vereinzelt, so dass man insgesamt nicht von einer stärkeren Reaktion als am 5. pnd sprechen kann. Im weiteren Verlauf beobachtet man dann wieder eine Zunahme der Intensität, wobei dann am 45. pnd (Abb. 13 und 14) ein Maximum erreicht wird. Danach sind die Reaktionen wieder etwas schwächer. Insgesamt ist der Verlauf dem von Bcl-X also sehr ähnlich (Grafik 2).

Bei den **Gefäßen** findet man an allen Tagen, mit Ausnahme des 1. pnd positive Reaktionen (Abb. 14). Diese sind zunächst am 5. und 15. pnd mäßig positiv, vom 22. bis 30. pnd schwach und schließlich vom 45. Tag an wieder mäßig positiv.

Die **Keimzellen** zeigen keine positiven Reaktionen.

In den **Sertolizellen** ist die Immunreaktion im apikalen Bereich des Zytoplasmas lokalisiert. Die Intensität ist hier vom 1. bis 30. pnd rückläufig, sie nimmt dabei von mäßig-stark auf schwach positiv ab. Auch in diesem Fall erkennt man wieder ein stadienabhängiges Färbeverhalten ab dem 45. pnd (Abb. 13): In den Stadien I-VII zeigt sich dabei eine mäßige, im achten Stadium eine starke Reaktion, jeweils im apikalen Bereich lokalisiert. Die Reaktion im intranukleären Bereich ist in beiden Fällen nur schwach diffus.

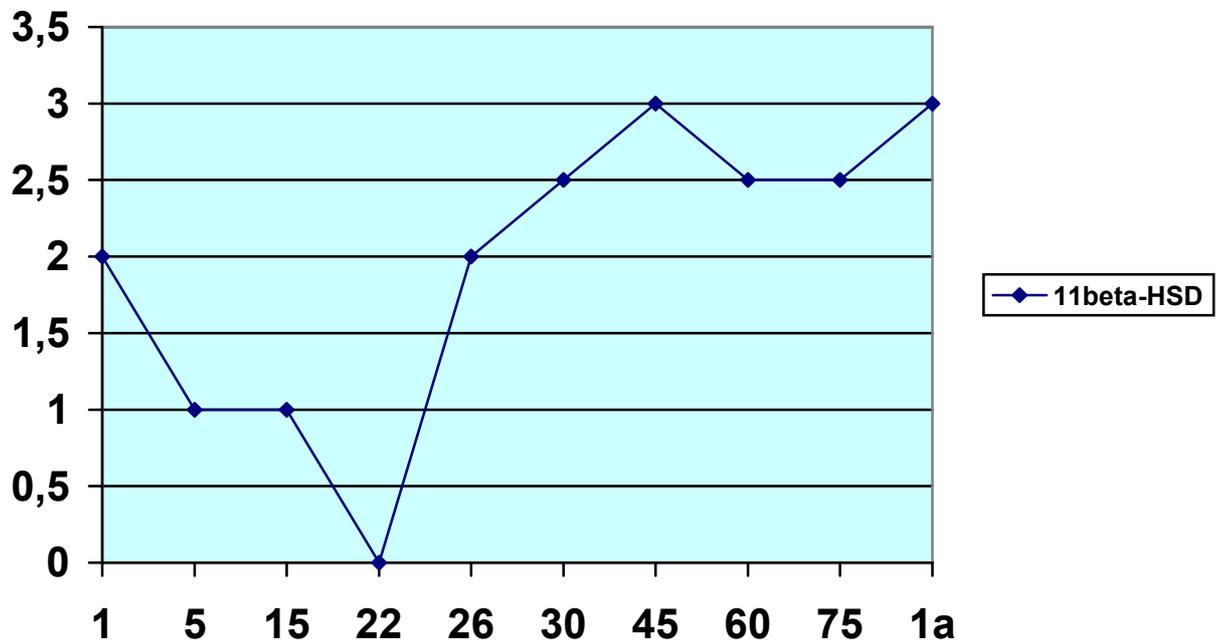
Im Stadium IX-XIII weist die gesamte Zelle nur sehr schwache Reaktionen auf.

TABELLE 4: ZUSAMMENFASSUNG DES VORKOMMENS VON 11 β -HSD IN MÄUSEHODEN

	LEYDIGZELLEN	SERTOLIZELLEN	GEFÄßE
1. PND	In einigen Komplexen „normal“ positiv		negativ
5. PND	Einige interstitielle Bereiche weisen schwach positive Leydigzellen auf	Apikaler Bereich mäßig bis stark positiv	Media mäßig positiv
15. PND	Gelegentlich mäßig positiv	Apikaler Bereich mäßig positiv	Mäßig positiv
22. PND	Negativ		Etwas schwächer positiv als am 1.5. pnd
26. PND	In einigen Komplexen mäßig positiv (ähnlich wie am ersten pnd)		Media positiv
30. PND	Vermehrt mäßig bis stark positiv	Zytoplasma diffus und schwach positiv	Media schwach positiv
45. PND	Starke homogene Reaktion)	Je nach Stadium unterscheidet sich das Färbeverhalten der Sertolizellen: Stadium I-VI (VII): Mäßige Reaktion im apikalen Bereich der Sertolizellen, ansonsten schwach diffus Stadium VIII: Starke Reaktion im apikalen Bereich der Sertolizellen, ansonsten schwach diffus im Zytoplasma der Sertolizellen Stadium IX-XIII: Sehr schwache Reaktion im Zytoplasma der Sertolizellen	Media mäßig positiv
60. PND	Mäßige bis starke homogene Reaktion	stadienabhängig wie am 45. pnd	Media mäßig positiv, Intima negativ
75. PND	Alle positiv, aber Intensität schwach bis stark → heterogene Reaktion	stadienabhängig wie am 45. pnd	Media mäßig positiv
1. POSTNATALES JAHR	Starke homogene Reaktion	stadienabhängig wie am 45. pnd	Media mäßig positiv

GRAFIKEN UND FOTOS ÜBER 11 β -HSD

GRAFIK 3: ENZYMREAKTION VON 11 β -HSD IN LEYDIGZELLEN



In Grafik 3 gibt die Ordinate die Reaktionsintensität von 11 β -HSD in den Leydigzellen an. Dabei steht die 0 für eine negative Reaktion, die 1 für eine schwache Reaktion, die 2 für eine mäßige Reaktion, die 3 für eine starke Reaktion und die 4 schließlich für eine sehr starke Reaktion. An der Abszisse ist das jeweilige Alter abzulesen.

Der Reaktionsstärke von 11 β -HSD in den Leydigzellen nimmt neonatal zunächst ab und nach der Ruhephase um den 22. pnd wieder zu.

FOTOS ZUR 11 β -HSD-REAKTION

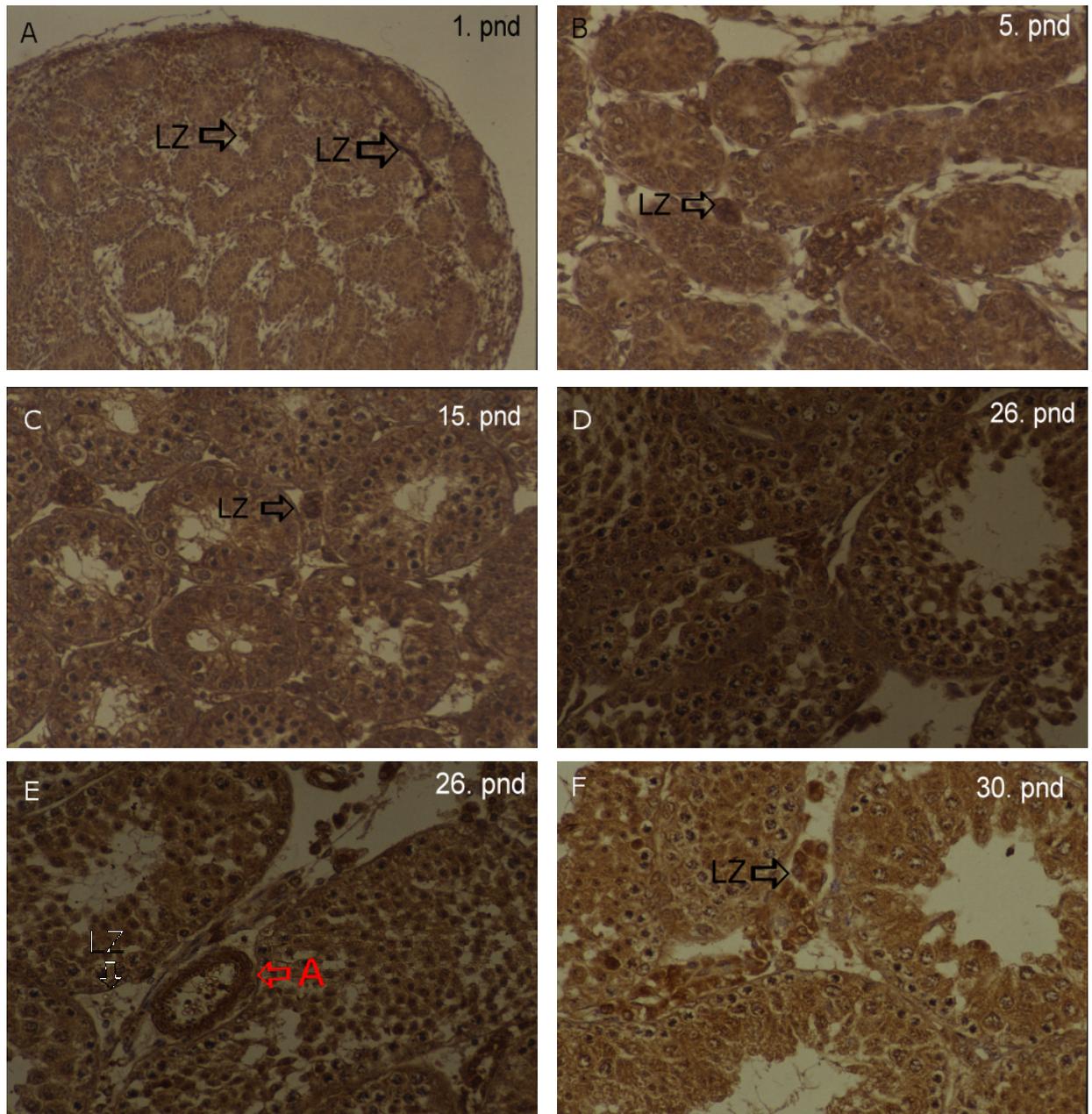


Abb. 12 A-E: Bei den Abbildungen handelt es sich um Paraffinschnitte von Mäusehoden, mit einem Nachweis von 11 β -HSD. Es soll besonders der Verlauf des Reaktionsverhaltens von 11 β -HSD in den Leydigzellen (LZ), in verschiedenen Altersstufen dargestellt werden.

A Am 1. pnd finden sich in einigen Leydigzell-Komplexen mäßige Reaktionen
B Am 5. pnd, sind die Leydigzellen (LZ \Rightarrow) teilweise schwach positiv. Der apikale Teil der Spermatogonien ist mäßig bis stark positiv. **C** Am 15. pnd zeigen sich mäßig positive Leydigzellareale (LZ \Rightarrow). **D** Am 26. pnd sind die Leydigzellen mäßig positiv. Die Keimzellen sind nur diffus und schwach positiv. **E** Neben Leydigzellen (LZ \Rightarrow) mit mäßiger Intensität findet man am 26. pnd Arteriolen (**A** \Rightarrow) mit positiver Media. **F** Am 30. pnd erkennt man interstitielle Leydigzellareale (LZ \Rightarrow) mit mäßiger bis starker Intensität. x 150 (A) und x 360 (B-F).

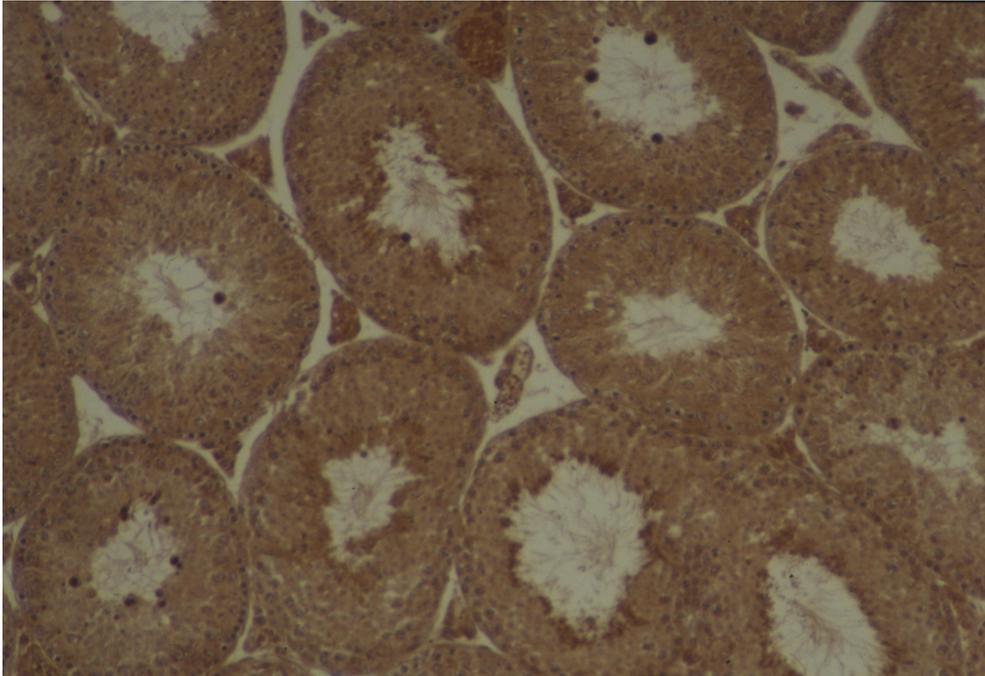


Abb. 13: Maushoden 45 Tage, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von 11β -HSD. Man erkennt die je nach Stadium (I-XIII) unterschiedlichen Reaktionsmuster der Tubuli. Zudem zeigt sich eine starke, homogene Reaktion der Leydigzellen. x 150.

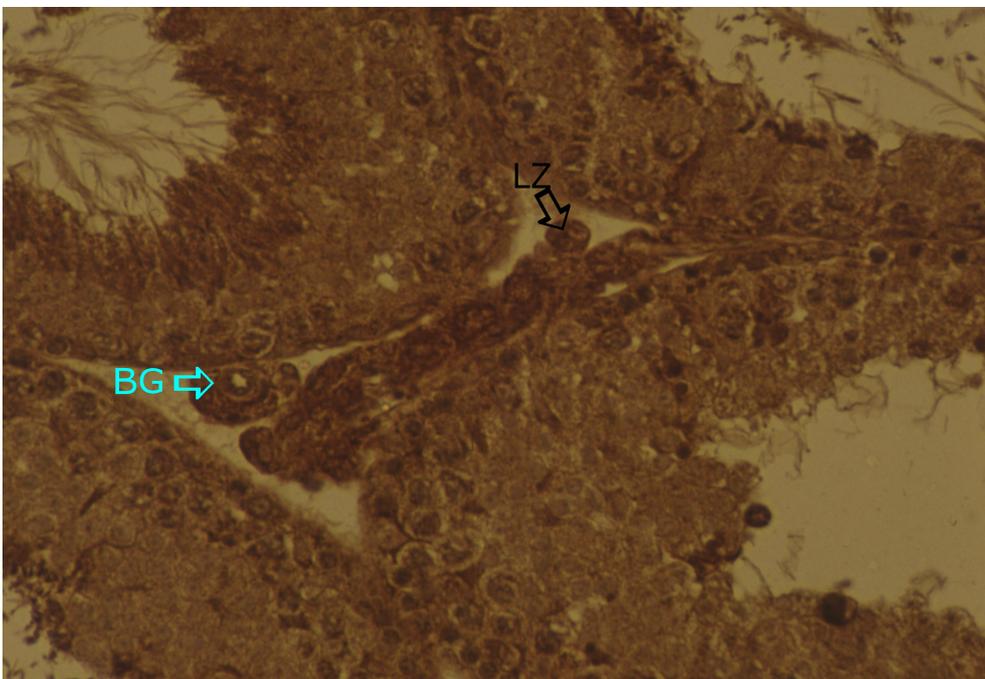


Abb. 14: Maushoden 45 Tage, Paraffinschnitt. Immunhistochemischer Nachweis von 11β -HSD. Man erkennt stark homogen gefärbte Leydigzellareale (LZ) und ein Gefäß (BG⇒) mit mäßig reagierender Media. Die Gefäßreaktion findet man in ähnlicher Form an allen Tagen, mit Ausnahme des 1. pnd. x 360.

3.2 ENZYMREAKTIONEN AM KRYOSTATSCHNITT

3.2.1 3α -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE

Am ersten postnatalen Tag findet sich eine mäßig starke Intensität in Komplexen der fetalen Leydigzellen, im Interstitium (Grafik 4, Abb. 15 A). Dabei bilden die Leydigzellen Cluster. Insgesamt zeigt sich ein eher homogenes Bild. Die Homogenität bleibt zum 5. pnd hin erhalten, jetzt jedoch mit einer starken Intensität im Zytoplasma der Leydigzellen. Nur im Zentrum der Schnitte zeigt sich keine Reaktion. Ab dem 15. pnd ist die Homogenität schon nicht mehr ganz so deutlich (Abb. 15 B): Einige Leydigzellareale in der Peripherie sind positiv. Dabei zeigen Leydigzellen, die als Cluster angeordnet sind, eine starke Intensität im Zentrum. Die übrigen Leydigzellen zeigen eine mäßige Reaktion. Zum 22. pnd hin lässt die Intensität der Enzymreaktion stark nach. Leydigzellen in der Peripherie sind schwach bis mäßig positiv, die in der Mitte des Schnittes schwach positiv (Abb. 15 C). Insgesamt erscheinen die Gewebsschnitte eher heterogen. Die Heterogenität wird zum 26. pnd hin deutlicher. Dabei zeigen sich fokal einige Leydigzellkomplexe mit mäßiger Intensität. Fast Zweidrittel dieser Komplexe reagieren nur schwach. Somit konnte in diesem Zeitabschnitt eine deutliche Abnahme der Reaktion festgestellt werden.

Eine deutliche Zunahme der Intensität zeigt sich erst wieder ab dem 30. pnd. Mehrere Leydigzellareale zeigen eine mäßige bis starke Enzymreaktion, die jedoch weiterhin heterogen bleibt. Gleiches gilt für den 45. und 60. pnd, die Verteilung ist hier jedoch homogen (Abb. 15 D). Auch am 75. pnd zeigt sich keine wesentliche Änderung: Alle Zellen sind positiv. Einige davon stark, die meisten jedoch mäßig. Eine leichte Diskrepanz zwischen Peripherie (= starke

Intensität) und Mitte des Schnittes (= mäßige Intensität) zeigt sich ein Jahr nach der Geburt (Grafik 4, Abb. 15 E).

3.2.2 3 β -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE

Einen Tag nach Ihrer Geburt zeigen die Mäuse in einigen interstitiellen Feldern mäßig positive Reaktionen der Leydigzellen, bei fokaler Verteilung (Grafik 4, Abb. 16 A). Anders am 5. pnd, hier findet sich fast überall eine starke, homogene Anfärbung (Abb. 16 B). Ab dem 15. pnd zeigt nur noch ein Teil der Leydigzellareale eine starke Intensität (Abb. 16 C). Andere Areale zeigen eine schwache bis mäßige Reaktion. Insgesamt handelt es sich also um eine eher heterogene, überwiegend mäßig Darstellung von 3 β -HSD. Wie schon beim 3 α -HSD beobachtet zeigt sich auch hier am 22. pnd eine starke Abnahme der Intensität der Enzymreaktion (Abb. 16 D). Nur 3-4 starke Reaktionen ansonsten schwach bis mäßig positiv. Es handelt sich daher um eine eher heterogene, schwache Reaktion. Ab dem 26. pnd findet man fokal schon wieder etwas häufiger Areale mit starker Intensität (Abb. 16 E). Ansonsten werden weiterhin mäßige, teils auch schwache Reaktionen bei insgesamt heterogener Verteilung beobachtet. Zu einem Angleich, in Bezug auf die Reaktionsstärke, zwischen starken und weniger stark gefärbten Arealen kommt es am 30. pnd. Am 45. pnd sind dann alle Felder positiv. Viele mäßig bis stark, andere sehr stark. Insgesamt zeigt sich ein heterogenes Bild, mäßiger bis starker Intensität. Gleiches gilt für den 60. pnd, wobei die Gewebsschnitte hier jedoch eher homogen wirken, da die sehr starken Reaktionen auf ein bis zwei Areale reduziert wurden. Der Anteil der mäßigen Areale nimmt zum 75. pnd hin zu, so dass man wieder ein heterogenes Bild erhält. Weiterhin bleiben jedoch alle Zellen positiv. Die

einjährigen Tiere bieten hingegen wieder einen homogenen Gesamteindruck, mit starken Reaktionen (Grafik 4, Abb. 16 F).

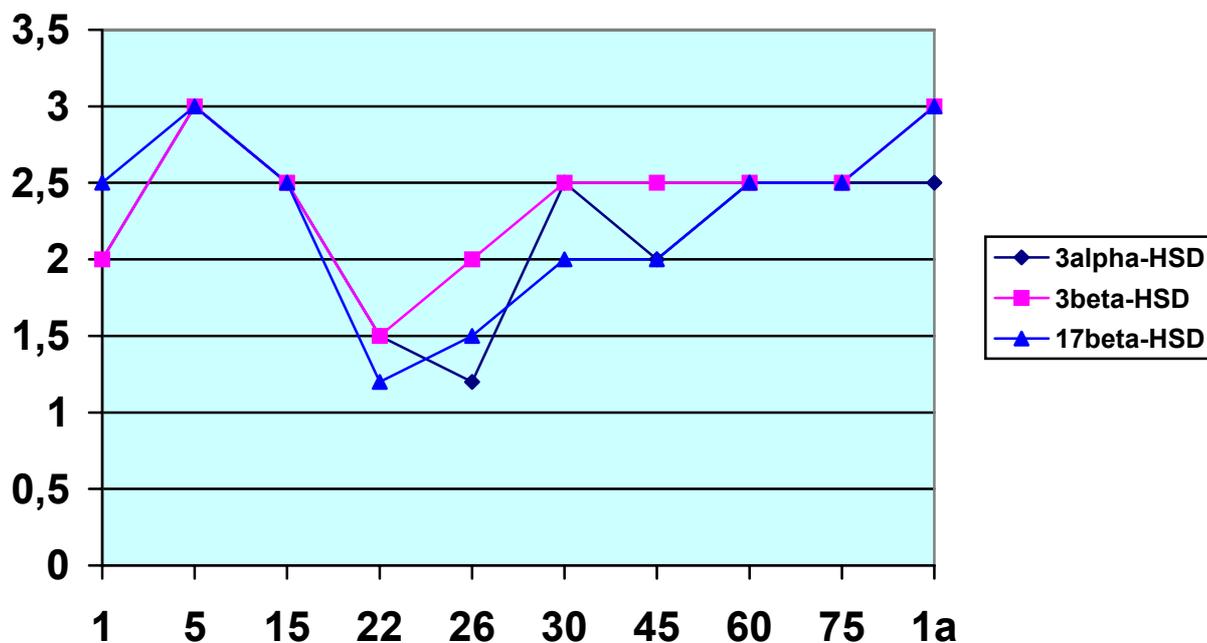
3.2.3 17β -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE

Am 1. pnd zeigt das Hodengewebe eine heterogene Reaktion wobei mehrere Areale von Leydigzellen starke, der Rest jedoch nur mäßige Reaktionen zeigt. Es sind jedoch alle Leydigzellen positiv. Die Heterogenität nimmt zum 5. pnd hin weiter zu (Grafik 4, Abb. 17 A), dabei finden sich mehrere Areale mit sehr starker Intensität im Zytoplasma. Einige andere zeigen jedoch nur mäßige oder keine Reaktionen. Ab dem 15. pnd kommt es insgesamt zu einer Reaktionsabschwächung bei weiterhin deutlicher Heterogenität. Die Anzahl der Komplexe mit starker Reaktion nimmt ab. Einige zeigen nur mäßige oder keine Reaktionen. Der Trend der Reaktionsabschwächung setzt sich zum 22. pnd hin weiter fort (Abb. 17 B), so dass nur vier bis fünf starke Reaktionszonen in einem Schnitt zu finden sind. Etwa Eindrittel der Gewebsareale ist negativ, der Rest nur mäßig positiv. Eine leichte Zunahme zeigt sich zum 26. pnd hin, dabei nimmt die Anzahl der Leydigzellkomplexe mit starker Intensität wieder zu (Abb. 17 C). Die Anzahl der negativen Areale nimmt hingegen ab. Insgesamt also eine heterogene, mäßige Reaktion. Kaum noch negative Leydigzellen finden sich am 30. pnd. Einige starke und mehrere schwache Anfärbungen findet man im restlichen Gewebe. Es kommt also zu einer Angleichung mit Abnahme der Heterogenität. Homogen wird das Gewebe dann ab dem 45. pnd, wobei mäßige Reaktionen in allen Leydigzellen zu finden sind (Abb. 17 D). Am 60. pnd sind alle Areale positiv, einige (7-8 im gesamten Schnitt) davon sehr stark, der Rest mäßig (Grafik 4, Abb. 17 E). Gleiches gilt für den 75. pnd, hier finden sich allerdings fast nur

mäßige Reaktionen. Anders bei den einjährigen Tieren hier zeigt sich überwiegend eine sehr starke Aktivität. Nur hier und da finden sich einige starke bis mäßige Anfärbungen. Insgesamt bietet sich ein eher homogenes Gesamtbild (Grafik 4).

GRAFIKEN UND FOTOS ÜBER DIE HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASEN (3α -, 3β -, 17β -HSD)

GRAFIK 4: VERGLEICH DER VERSCHIEDENEN HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASEN IN DER ENZYMREAKTION



In Grafik 4 gibt die Ordinate die Reaktionsintensität in den Leydigzellen an. Dabei steht die 0 für eine negative Reaktion, die 1 für eine schwache Reaktion, die 2 für eine mäßige Reaktion, die 3 für eine starke Reaktion und die 4 schließlich für eine sehr starke Reaktion. An der Abszisse ist das jeweilige Alter abzulesen.

Man erkennt einen fast analogen Verlauf der verschiedenen Hydrogenasen. Dabei zeigt sich nach anfangs hoher Intensität ein stetiger Rückgang, der bis 22. pnd anhält. Erst danach nimmt die Aktivität wieder zu.

FOTOS ZUR 3α -HSD-REAKTION

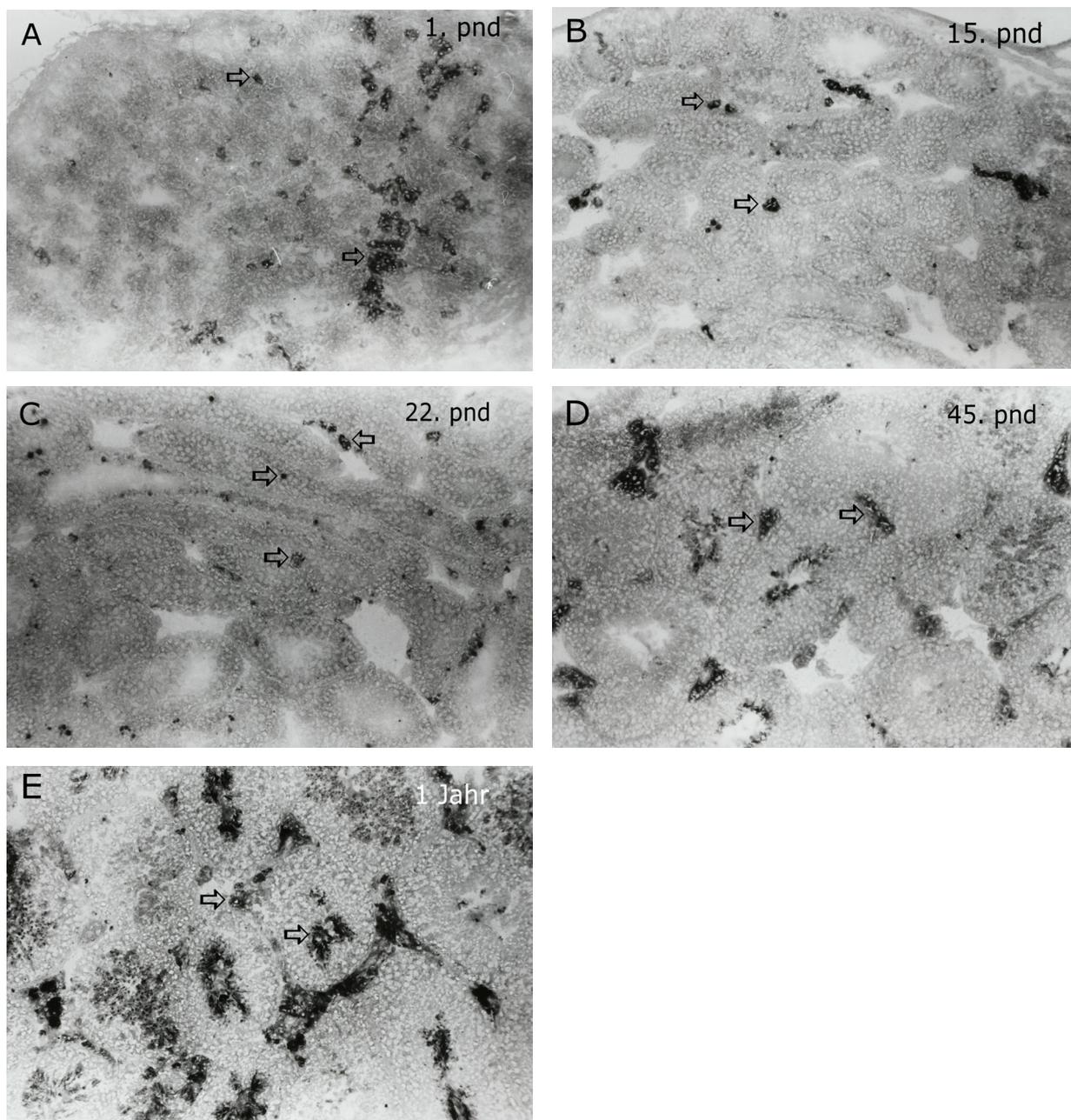


Abb. 15 A-E: Bei den Abbildungen handelt es sich um Kryostatschnitte des Mäusehodens mit enzymhistochemischem Nachweis von 3α -HSD. Sie sollen die altersabhängigen Reaktionen verdeutlichen.

A Am 1. pnd zeigt sich eine homogene, mäßig starke Reaktion, der in Clustern (\Rightarrow) angeordneten fetalen Leydigzellen. **B** Am 15. pnd zeigen sich, verstärkt in der Peripherie lokalisierte, positive Leydigzellen. Dabei zeigen die clusterartig angeordneten Zellen eine starke, die übrigen eine mäßige Reaktion. Die Reaktion ist also insgesamt schwächer als am 1. pnd. **C** Am 22. pnd lässt die Enzymreaktion weiter stark nach (heterogene, schwache bis mäßige Reaktion). **D** Am 45. pnd findet sich eine insgesamt mäßige, homogene Reaktion. **E** Bei einjährigen Mäusen zeigt sich ein Übergang zwischen Peripherie und Zentrum des Schnittes, mit starken Reaktionen im peripheren und mäßigen Reaktionen im mittleren Bereich. x 150.

FOTOS ZUR 3β -HSD-REAKTION

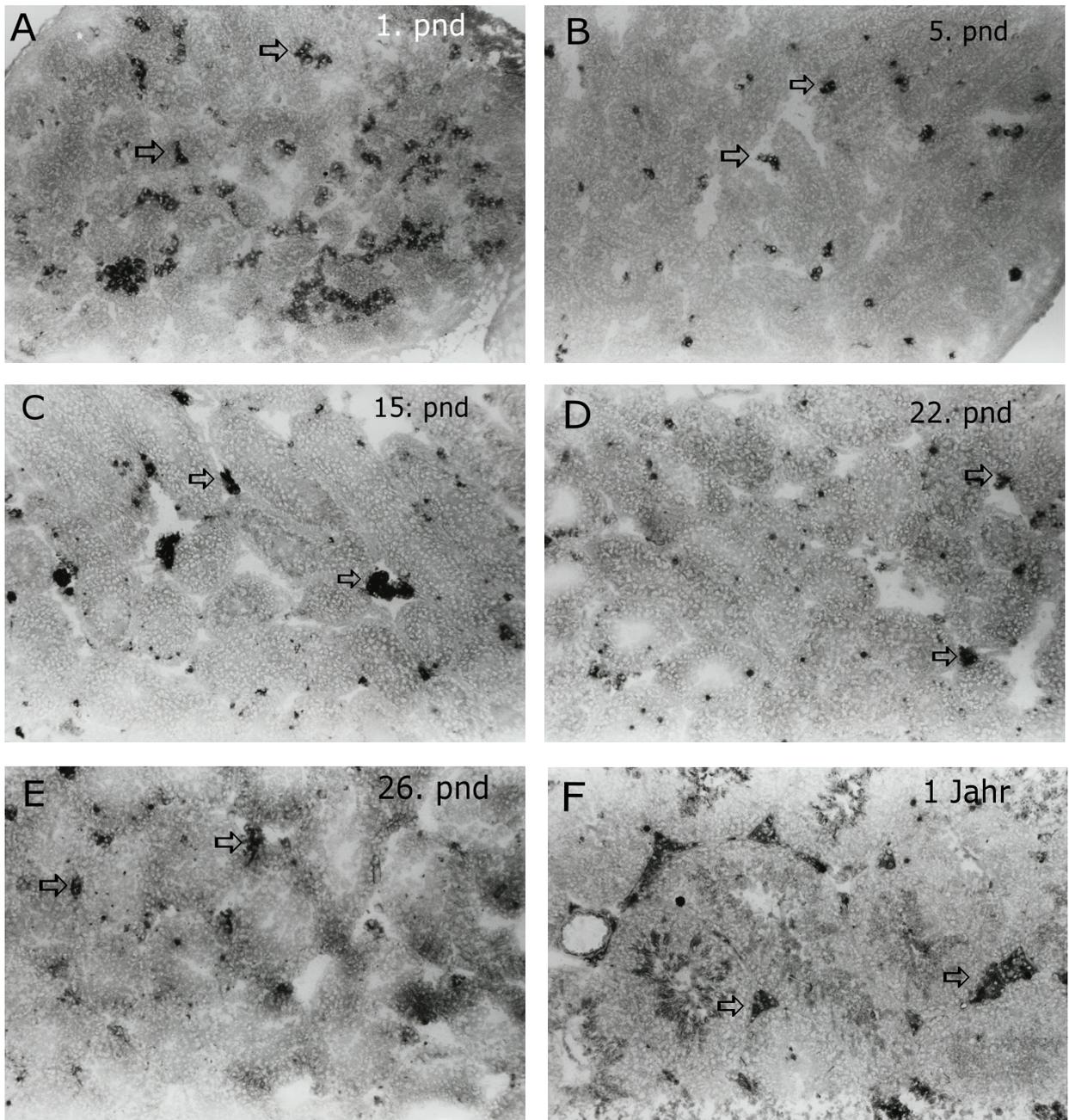


Abb. 16 A-F: Bei den Abbildungen handelt es sich um Kryostatschnitte des Mäusehodens mit enzymhistochemischem Nachweis von 3β -HSD. Sie sollen die altersabhängigen Reaktionen verdeutlichen. **A** Am 1. pnd zeigen einige interstitielle Felder eine mäßig starke Reaktion, bei fokaler Verteilung. **B** Am 5. pnd zeigt sich eine insgesamt starke, homogene Reaktion, somit also eine Zunahme im Vergleich zum 1. pnd. **C** Am 15. pnd zeigt nur noch ein Teil der Leydigzellen eine starke Intensität, die anderen Areale reagieren nur schwach bis mäßig positiv. **D** Am 22. pnd findet man nur noch eine überwiegend schwache Reaktion. **E** Ab dem 26. pnd finden sich dann schon wieder fokal einige stark positiv reagierende Areale. **F** Bei einjährigen Mäusen bietet sich ein homogener Gesamteindruck, mit starken Reaktionen. x 150.

FOTOS ZUR 17β -HSD-REAKTION

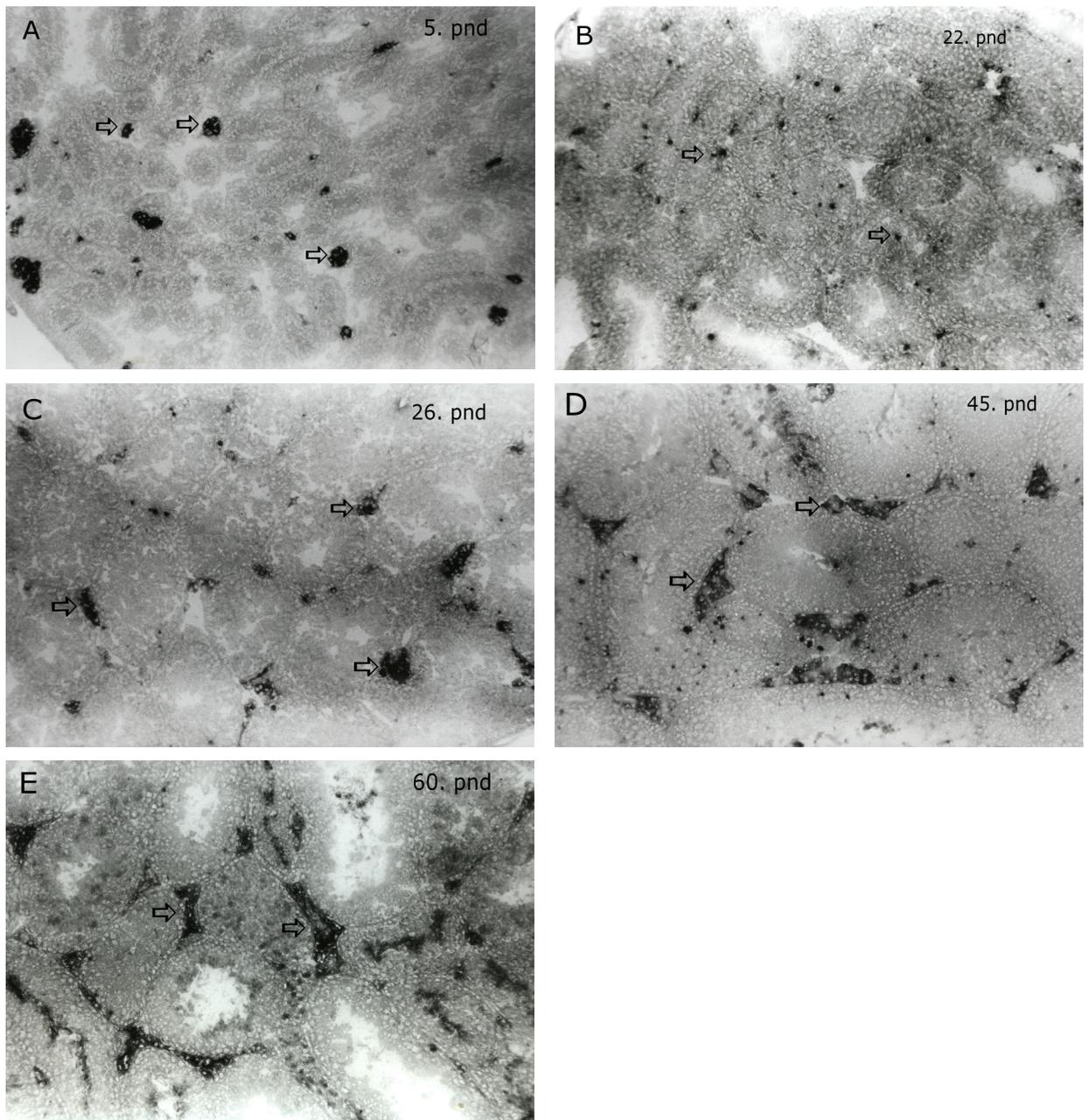


Abb. 17 A-E: Bei den Abbildungen handelt es sich um Kryostatschnitte des Mäusehodens mit enzymhistochemischem Nachweis von 17β -HSD. Sie sollen die altersabhängigen Reaktionen verdeutlichen.

A Am 5. pnd zeigt sich eine sehr heterogene Reaktion mit teils sehr stark reagierenden Arealen, aber auch mäßigen und negativen Reaktionen. **B** Am 22. pnd findet man eine deutliche Reaktionsabschwächung mit nur wenigen stark und einigen mäßig reagierenden Arealen. Eindrittel der Gewebsareal ist sogar negativ. **C** Am 26. pnd zeigt nur noch ein Teil der Leydigzellen eine starke Intensität, die anderen Areale sind nur schwach bis mäßig positiv. **D** Am 45. pnd wird das Gewebe homogen aktiv, wobei man mäßige Reaktionen in allen Leydigzellen findet. **E** Am 60. pnd reagieren alle Areale positiv, einige davon sogar sehr stark. x 150.

3.2.4 UNSPEZIFISCHE-ESTERASE

Während man am ersten postnatalen Tag kaum Reaktionen erkennen kann, zeigt sich ab dem 5. pnd in einigen Arealen des Interstitiums eine mäßige Reaktion in den Leydigzellen (Grafik 5). Diese Reaktionen sind ab dem 15. pnd jedoch nur noch schwach zu erkennen und am 22. pnd weitgehend verschwunden (meist 1-2 Areale positiv). Zum 26. pnd hin sind wieder mehr Reaktionen zu erkennen, der Unterschied zum 22. pnd ist jedoch gering. Erst ab dem 30. pnd lässt sich wieder eine deutlichere Zunahme feststellen (Abb. 18), die Leydigzellen zeigen nun eine mäßige, homogene Intensität. Diese Tendenz setzt sich zum 45. pnd fort (Abb. 19), das Zytoplasma der Leydigzellen ist jetzt mäßig bis stark und ebenfalls homogen positiv. Die Homogenität wird ab dem 60. pnd durch eine ausgeprägte Heterogenität ersetzt, dabei gibt es sowohl Areale ohne Reaktion als auch Areale mit mäßiger bis starker, sowie einige mit schwacher Reaktion. Ab dem 75. pnd findet sich eine mäßige bis starke Intensität, die sich homogen verteilt. Auch ein Jahr nach der Geburt gilt dies für den überwiegenden Teil der Leydigzellen, jedoch findet man hier zusätzlich auch einige schwache Areale (Grafik 5).

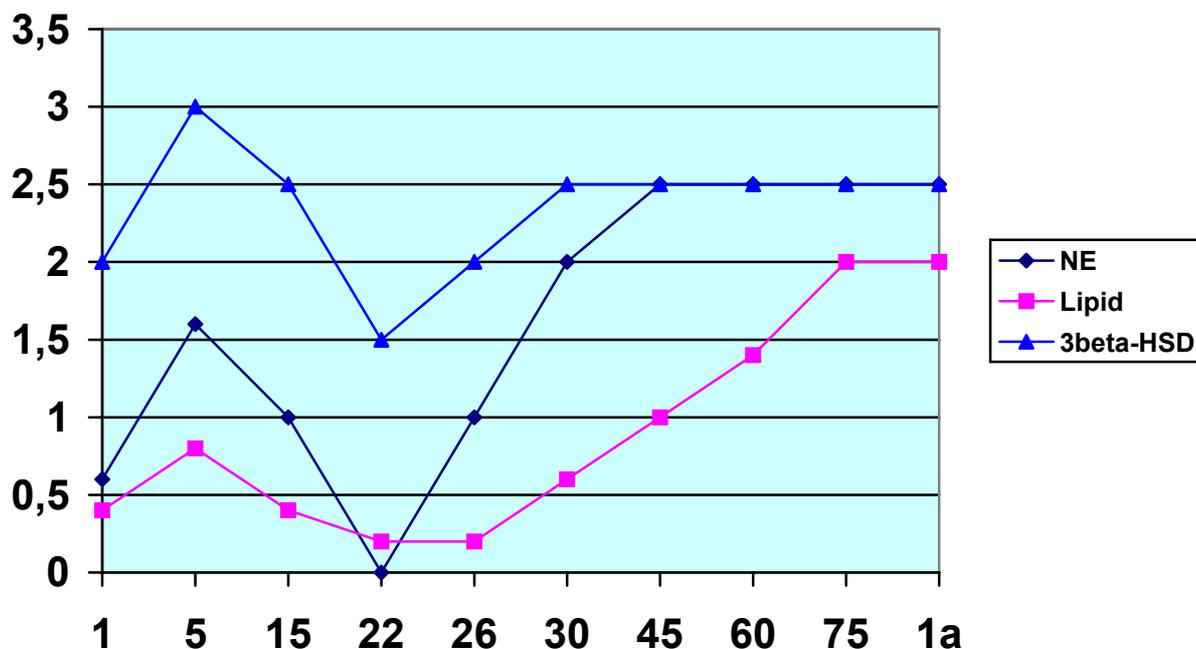
3.2.5 LIPIDFÄRBUNG MIT SUDAN IV

Am ersten postnatalen pnd ist die Reaktion noch weitgehend negativ, nur einige wenige Areale zeigen in den Leydigzellen und im Interstitium kleine Lipidtropfen (Grafik 5). Ab dem 5. pnd sind die Lipidtropfen schon etwas größer (Abb. 20), die Anzahl ist jedoch unverändert gering. Zum 15. pnd hin, nehmen sowohl Anzahl als auch Größe wieder ab. Es zeigen sich nur noch kleine bis mittelgroße Lipideinlagerungen in geringer Anzahl. Dieser Trend

setzt sich im weiteren Verlauf der Hodenentwicklung fort, so dass am 22. und 26. pnd eine fast vollständig negative Reaktion vorliegt. Meist findet man nur ein einziges kleines bis mittelgroßes Areal in einem Schnitt. Einige Areale mehr findet man hingegen ab dem 30. pnd (etwa 3 pro Schnitt), wobei alle Größen vertreten sind. Eine eindeutige Zunahme lässt sich ab dem 45. pnd feststellen (Abb. 21). Meist sind hier über 10 Areale positiv. Die Größe der Lipidtröpfchen liegt dabei im mittelgroßen bis großen Bereich. Entsprechendes gilt für den 60. postnatalen pnd an dem etwa ein Drittel aller Felder positiv ist. Am 75. pnd finden sich gar bei fast der Hälfte mittelgroße bis große Fetteinlagerungen. Zu deutlichen Unterschieden zwischen Peripherie und zentralem Organanteil kommt es bei den einjährigen Tieren (Abb. 22): Während die Peripherie zahlreiche, sehr dicht gepackte Lipidtropfen in den interstitiellen Feldern aufweist, findet man im Zentrum des Hodens nur einige wenige. Die Größe schwankt dabei im Randgebiet zwischen klein bis groß, in der Mitte hingegen findet man mittelgroße bis große Fettanreicherungen.

GRAFIKEN UND FOTOS ÜBER DIE UNSPEZIFISCHE- ESTERASE UND LIPIDFÄRBUNG

**GRAFIK 5: UNSPEZIFISCHE-ESTERASE UND LIPIDFÄRBUNG IM VERGLEICH
MIT 3 β -HSD**



In Grafik 5 gibt die Ordinate die Reaktionsintensität in den Leydigzellen an. Dabei steht die 0 für eine negative Reaktion, die 1 für eine schwache Reaktion, die 2 für eine mäßige Reaktion, die 3 für eine starke Reaktion und die 4 schließlich für eine sehr starke Reaktion. An der Abszisse ist das jeweilige Alter abzulesen.

Während die Unspezifische-Esterase (NE) den schon von den Hydrogenasen und Bcl-X bekannten Verlauf zeigt, weicht das Entwicklungsmuster bei den Lipiden etwas ab. Man erkennt hier ab dem 26. pnd eine Zunahme zum Senium hin. Auch in der Neugeborenenperiode sind die Werte noch etwas höher, jedoch längst nicht so hoch wie in den fortgeschrittenen Altersstufen. Wie bei den anderen Versuchsreihen findet man auch bei der Lipiddarstellung die schwächste Reaktion am 22. pnd.

FOTOS ZUR REAKTION DER UNSPEZIFISCHEN-ESTERASE

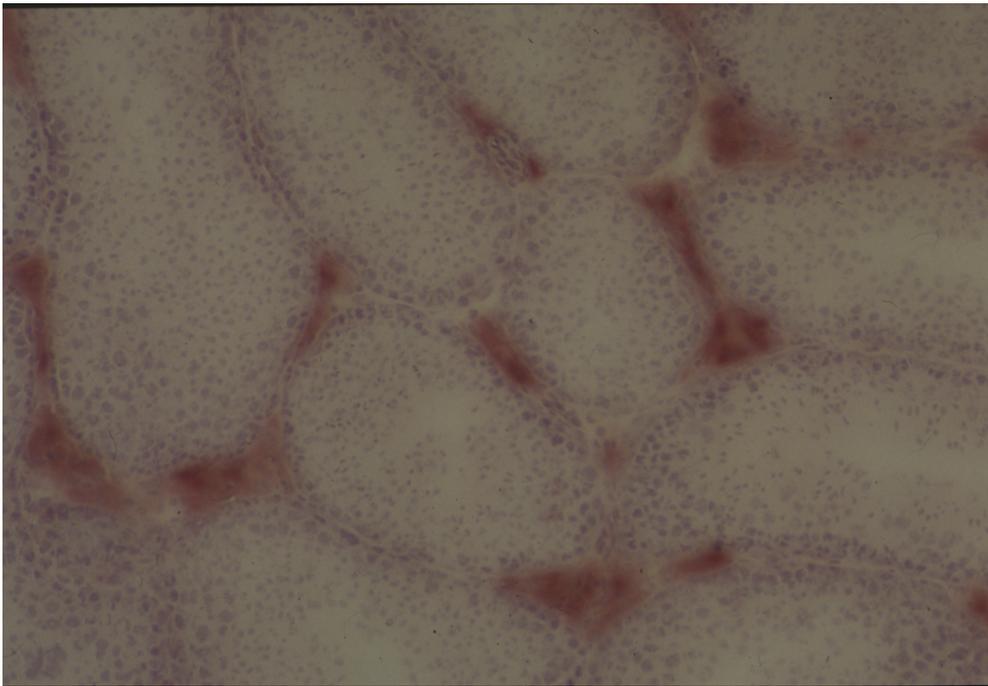


Abb. 18: Maushoden 30 Tage, Kryostatschnitt. Enzymhistochemischer Nachweis von Unspezifischer-Esterase. Darstellung einer mäßigen und homogenen Reaktion im Zytoplasma der Leydigzellen. x 150.

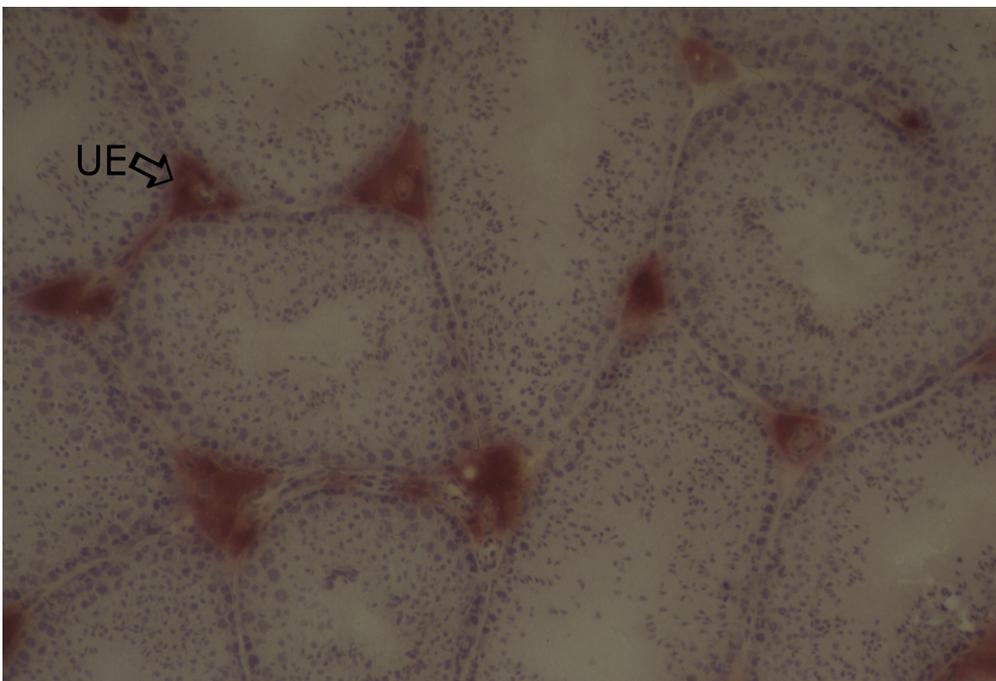


Abb. 19: Maushoden 45 Tage, Kryostatschnitt. Enzymhistochemischer Nachweis von Unspezifischer-Esterase (UE⇒). Darstellung einer mäßigen bis starken und homogenen Reaktion im Zytoplasma der Leydigzellen. x 150.

FOTOS ZUR SUDAN-FÄRBUNG

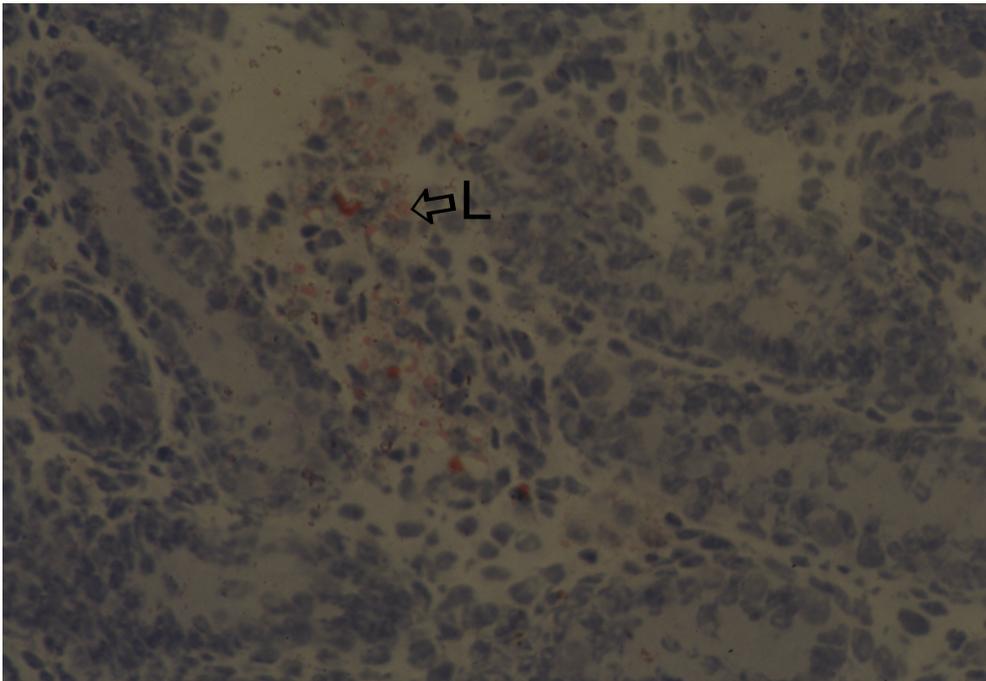


Abb. 20: Maushoden 5 Tage, Kryostatschnitt. Enzymhistochemischer Nachweis von Lipiden mit Sudan IV. Die Anzahl und Größe der Lipidtropfen (L⇒) ist diesem Alter noch eher gering. x 360.

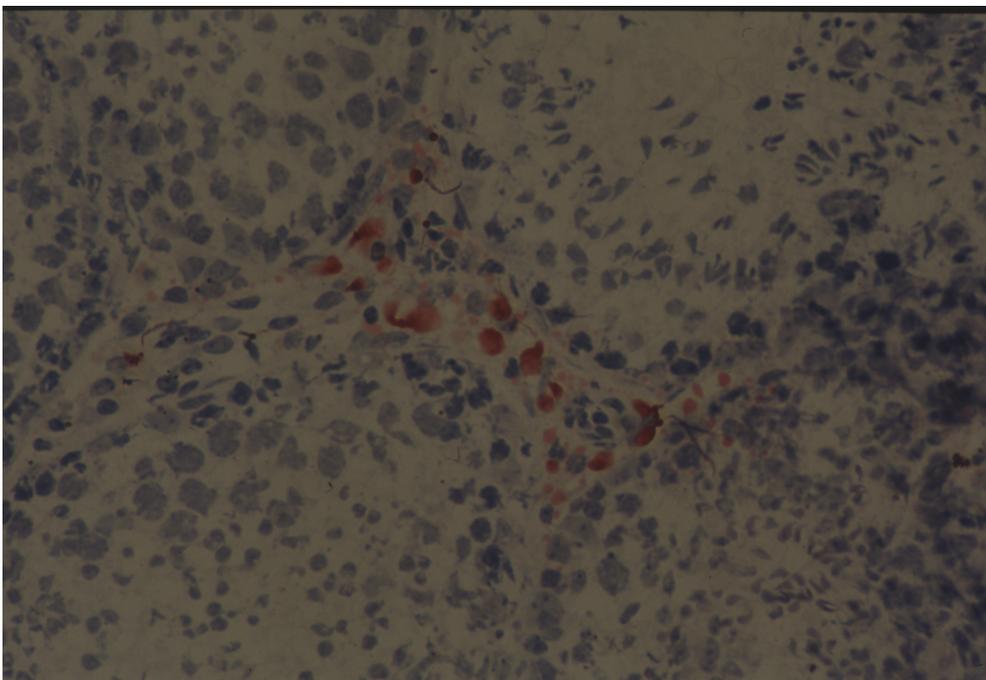


Abb. 21: Maushoden 45 Tage, Kryostatschnitt. Enzymhistochemischer Nachweis von Lipiden mit Sudan IV. Die Größe der Lipidtropfen liegt in diesem Alter im mittelgroßen bis großen Bereich. x 360.

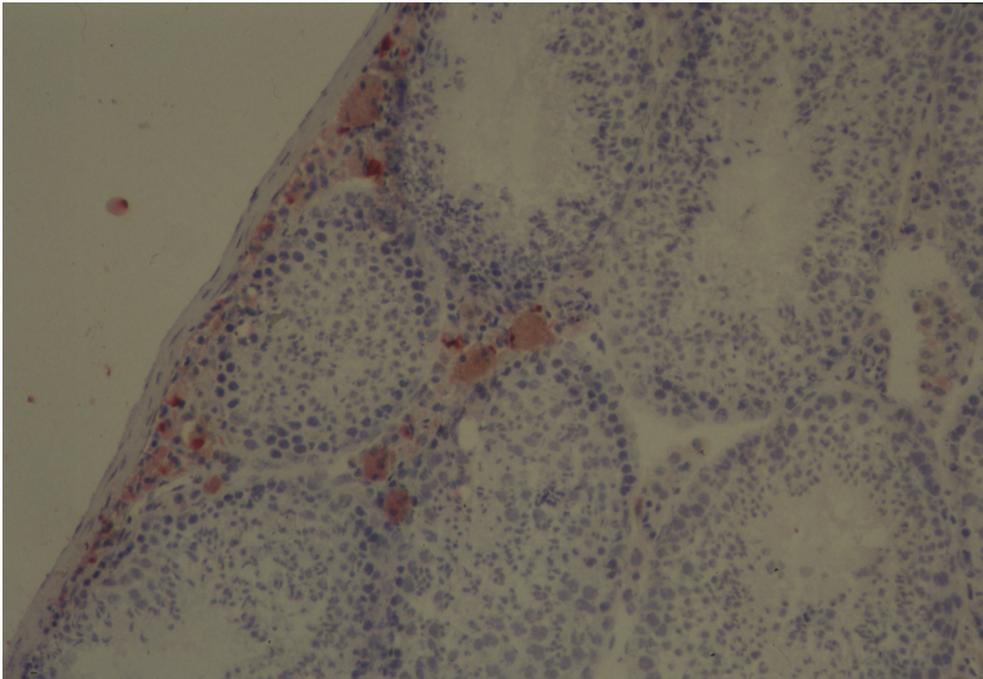


Abb. 22: Maushoden 1 Jahr, Kryostatschnitt. Enzymhistochemischer Nachweis von Lipiden mit Sudan IV. Die Lipidtropfen sind in diesem Alter hauptsächlich in der Peripherie zu finden. Deren Größe schwankt zwischen klein und groß. x 150.

4 DISKUSSION

4.1 APOPTOSE IN TESTIKULÄREN ZELLEN

Zunächst muss erwähnt werden, dass bei allen Proteinen, die die Apoptose regulieren, noch nicht abschließend geklärt ist ob sie eine reine anti- bzw. proapoptotische Wirkung haben (Boise et al., 1993; Reed, 1994; Sato et al., 1994). Im Folgenden wird dann die jeweils, nach heutigem Wissensstand, dominierende Funktion betrachtet.

Bcl-X ist ein Mitglied der Bcl-2-Familie, deren Mitglieder über Homo- und Heterodimere miteinander kommunizieren. Die Apoptosefähigkeit der jeweiligen Zellen wird unter anderem durch das relative Verhältnis von Mitgliedern der Bcl-2-Familie zueinander reguliert (Reed, 1994; Sato et al., 1994). So führt eine überwiegende Aktivität der proapoptotischen Proteine zur Apoptose (Oltvai et al., 1993). Trotz seiner Verwandtschaft zu Bcl-2 kann Bcl-X auch unabhängig von Bcl-2 die Apoptose regulieren (Boise et al., 1993). Durch verschiedenartiges Splicing von Bcl-X entstehen Bcl-X_S (short) und Bcl-X_L (long), welche beide Homo- und Heterodimere mit Bcl-2 bilden. Bcl-X_S hemmt die Wirkung von Bcl-2 und wirkt somit proapoptotisch. Den gewichtigsten Anteil spielt jedoch Bcl-X_L, welches antiapoptotisch wirkt (Boise et al., 1993). Im Folgenden wird Bcl-X somit als Protein mit überwiegend antiapoptotischer Wirkung betrachtet.

Auch bei BAK handelt es sich um ein Mitglied der Bcl-2-Familie, dass ebenfalls über die Bildung von Homo- und Heterodimeren in die Kommunikation mit den anderen Bcl-2-Familienmitgliedern eingebunden ist (Reed, 1994; Sato et al, 1994). BAK bindet Bcl-XL und Bcl-2, wodurch es die antiapoptotische Wirkung dieser beiden Proteine verhindert und als direkter

Gegenspieler fungiert (Chittenden et al., 1995). BAK wird somit als ein überwiegend proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie betrachtet. Ein Überwiegen der apoptotischen Proteine führt zur Apoptose (Oltvai et al., 1993).

4.1.1 LEYDIGZELLEN

In den Leydigzellen zeigt sich zunächst eine Abnahme der Bcl-X-Reaktion vom 5. bis 22. pnd. Nach einem negativen Nachweis von Bcl-X am 22. pnd nimmt die Reaktion bis zum 30. pnd wieder drastisch zu. Nach dem 30. pnd bleibt sie auf etwas niedrigerem Niveau konstant.

Wie aus Grafik 1 zu ersehen ist, ist das Färbeverhalten von BAK im Lebenszyklus von Balb-c Mäusen in etwa gegensätzlich zu Bcl-X. Da BAK, wie schon erwähnt, proapoptotisch wirkt, kommt man zum gleichen Schluss wie bei der Betrachtung der Bcl-X-Versuchsreihe. Nämlich, dass zwischen dem 5. und 22. pnd das relative Verhältnis zwischen proapoptotischer (BAK) und antiapoptotischer (Bcl-X) Wirkung immer mehr in Richtung Apoptose tendiert. Erst danach kommt es zu einer Trendwende in Richtung antiapoptotischer Wirkung mit Höhepunkt am 30. pnd.

Bei den Leydigzellen (LZ) unterscheidet man fetale (FLZ) von adulten Leydigzellen (ALZ), die sich morphologisch und funktionell unterscheiden (Haider et al., 1986). Analysen der DNA von FLZ und ALZ haben gezeigt, dass man Apoptose nicht in den fetalen Leydigzellen findet (Faria et al. 2003). FLZ bilden sich durch Degeneration und Involution zurück. Da man während der ersten postnatalen Tagen zunächst ausschließlich FLZ in den Hoden findet und die ersten periodic acid/Schiff's reagent negativen Leydigzellen, somit adulten LZ, erst um den 10. pnd auftreten, ist so der

anfangs geringe Apoptosegrad der geringen Anzahl an ALZ zu zuschreiben (Roosen-Runge et al., 1959; Vergouwen et al., 1991; Schäfers et al., 2001). Mit dem vermehrten Auftreten von ALZ, nimmt die Apoptose in der Präpubertät (15. pnd) und Pubertät (22. pnd) drastisch zu. Dies deckt sich ebenfalls mit den DNA-Analysen (Faria et al. 2003).

LZ sind in ein komplexes Kommunikationssystem eingebunden: Zum einen werden adulte LZ (ALZ) von der Hypophyse durch das Gonadotropin LH zur Testosteronbildung angeregt (Baker et al., 1997), des Weiteren werden sie von den Sertolizellen (SZ) über Interleukine gesteuert. Das von den LZ gebildete Testosteron wird von den SZ, unter Einfluss von FSH, an ABP (Androgen-Bindendes-Protein) gebunden und zu den Keimzellen gebracht, dies dient der Steuerung der Spermatogenese. Das Androgen aus den FLZ dient dem Aufbau des männlichen Genitaltraktes und der geschlechtlichen Prägung des Gehirns (Haider 2004). Am 22. pnd beginnt nachdrücklich der Abbau der FLZ. Darauf weisen die vorliegenden immunhistochemischen Versuche mit Apoptosemarkern hin. Die These, dass Apoptose in LZ durch SZ reguliert wird, wird unterstützt durch die Ergebnisse von Ross et al. (2001): In Mäusen ohne Bcl-w-Funktion verschwinden LZ erst nach dem SZ-Verlust, woraus geschlossen wurde, dass SZ einen Apoptoseschutz für LZ bilden. Gleiches würde also auch für LZ gelten, die keinen Anschluss an das Regulierungssystem gefunden haben. FSH hat dagegen keinen direkten Einfluss auf LZ, sondern nur über SZ (Krishnamurthy et al., 2001).

4.1.2 SPERMATOGENESE-ZELLEN

In Keimzellen wurde Bcl-X bereits schon häufiger sowohl in Spermatiden als auch in Spermatozyten nachgewiesen (Krajewski et al., 1994; Oldereid et al.,

2001). Der Nachweis in Spermatogonien, wie es in dieser Studie der Fall ist, wird hingegen unterschiedlich bewertet. Während einige Autoren einem Nachweis von Bcl-X in Spermatogonien widersprechen (Krajewski et al., 1994), bestätigen ihn andere (Oldereid et al., 2001). Ein Grund könnte in der etwas unterschiedlichen immunhistochemischen Methodik liegen. Mit Bouinscher-Lösung (wie auch in der vorliegenden Studie durchgeführt) war der Nachweis möglich (Oldereid et al., 2001). Eine andere Ursache könnte in der Aufteilung von Bcl-X in Untergruppen begründet sein. Interessant ist weiterhin, dass Oldereid et al. (2001) die Studie an Menschenhoden durchführten. Somit deuten die, sich mit der vorliegenden Studie gleichenden, Ergebnisse auf eine Übertragbarkeit des Apoptoseverhaltens von der Maus auf den Menschen hin.

Immunhistochemische Reaktionen von BAK in Spermatogonien, primären Spermatozyten und Spermatischen konnten von Oldereid et al. (2001) ebenfalls nachgewiesen werden.

Eine weitere Übereinstimmung beim Vergleich meiner Studie mit der von Oldereid et al. (2001) liegt in der Lokalisation der Reaktionen von BAK und Bcl-X. In beiden Fällen findet man die Reaktionen besonders stark in der Lumennähe der Tubuli. Oldereid et al. (2001) schlossen daraus auf eine Kommunikation der luminalen Umgebung mit Spermatischen und Spermatozyten. Die Befunde der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Schlussfolgerung.

Den schon bei den Leydigzellen beschriebenen Verlauf der Apoptose mit einem Peak am 22. pnd findet sich auch bei den Keimzellen wieder. Die BAK-Reaktion nimmt dabei ab dem 22. pnd wieder ab. Gleiches zeigte sich beim genetischen Nachweis von Apoptosefragmenten in Keimzellen von

Rattenhoden (Yan et al., 2000a). Hier nahm der Apoptosegrad bis zum 30. pnd kontinuierlich zu, was ungefähr einem Mäusealter von 22. pnd entspricht. Danach kam es, wie auch in der hier vorliegenden Studie zu einem deutlichen Rückgang. Auch bei Mäusen wurde dieser Peak bereits beschrieben (Rodriguez et al. 1997, Wang et al. 1998). Zudem zeigten Yan et al. (2000a), dass es sich wirklich um Apoptose und keinesfalls um nekrotische Veränderungen handelt. Weitere Übereinstimmungen liegen im Bcl-X-Nachweis in Spermatogonien, Spermatozyten und Sertolizellen. Schaut man sich die Apoptose in den Rattenhoden, im Laufe der postnatalen Entwicklung, an (Yan et al., 2000a), so erkennt man deutliche Gemeinsamkeiten zum Mäusehoden. Im Rattenhoden zeigte sich am 5. pnd eine eher geringe Apoptoseaktivität (genetischer Fragment Nachweis), und wenn, dann ausschließlich in den Spermatogonien. Gleiches gilt für den hier untersuchten immunhistochemischen Nachweis von BAK und Bcl-X in den Mäusehoden. Ab dem 20. pnd zeigte sich in den Rattenhoden überwiegend eine Reaktion in den Spermatozyten. Auch in den Mäusehoden verlagert sich die Apoptose (BAK und Bcl-X), zwischen dem 15. und 22. pnd aus den Spermatogonien in die Spermatozyten. Gleiches gilt für den 40. pnd bei Ratten, bzw. 45. pnd bei Mäusen, auch hier ist die Apoptose hauptsächlich in den Spermatozyten zu finden. Dies zeigt zum einen die ähnliche Keimzellentwicklung/-funktion bei Ratten und Mäusen, zum anderen die gleichwertige Verwendbarkeit von genetischen und immunhistochemischen Nachweismethoden.

Des Weiteren ist aber auch die Verlagerung der Apoptose aus den Spermatogonien in die Spermatozyten interessant. Es lässt sich vermuten, dass im jüngeren Alter die Spermatogonien die entscheidendere Rolle bei der

Ausdifferenzierung der Hoden spielen, und somit fehlgebildete Zellen abgebaut werden sollten. Im höheren Alter scheinen die Spermatogonien weitgehend stabil und ausgereift zu sein. Für die Bildung der Spermien scheinen zu dieser Zeit intakte Spermatozyten entscheidender zu sein. Das heißt fehlgebildete Spermatozyten würden zu fehlgebildeten Spermien führen und müssten somit verschwinden.

Weiterhin auffällig ist die je nach Stadium unterschiedliche Darstellung der Apoptosenachweisreaktionen. Zur Stadieneinteilung der Spermatogenese diente die Anleitung von Hess et al. (1990 a + b) bei Ratten. Danach findet man im Stadium VIII die ausgereiften Spermatiden, kurz vor Ihrer Ablösung aus dem Zellverband und anschließende Freisetzung.

In diesem Stadium VIII beobachteten Yan et al. (2000a), die ebenfalls ein stadienabhängiges Verhalten der Apoptose feststellten, die stärkste apoptotische Reaktion. Zu diesem Schluss kamen sie aufgrund genetischer Nachweise von Apoptosefragmenten. Bei den hier vorliegenden immunhistochemischen Untersuchungen zeigt sich, dass nicht alle Keimzellen im Stadium VIII gleichmäßig betroffen sind. Runde Spermatiden liegen eher im antiapoptotischen Bereich, da Bcl-X deutlich stärkere Reaktionen als BAK zeigt. Spermatogonien hingegen neigen eher zur Apoptose, da BAK eine schwach positive, und Bcl-X eine negative Reaktion zeigt. Im Stadium VIII werden also nur weitgehend ausgereifte Zellen erhalten. Dies ist sinnvoll, da in diesem Stadium nur noch die ausgereiften Zellen von Bedeutung sind. Eine insgesamt starke Apoptose ist ebenfalls mit dem besonderen Stellenwert dieses Stadiums zu erklären. Hier ist nämlich vorerst letztmalig ein Abbau fehlgebildeter Zellen möglich.

Die Reaktion von Bcl-X in den Tubuli ist am stärksten im Stadium VIII, mit

deutlichem Abstand gefolgt von den Stadien IX-XII. Noch schwächer ist die Reaktion in den Stadien I-VI und XIII und XIV. Die gleiche Reihenfolge der Apoptose stellten Yan et al. (2000a) in den genetischen Untersuchungen fest. Ebenfalls findet man diese Reihenfolge der Reaktionsintensitäten von Bcl-X in den Sertolizellen. Der Nachweis in den Keimzellen ist insgesamt stärker, was sich mit Ergebnissen anderer Autoren deckt, die eine geringere Anfälligkeit von Sertolizellen gegenüber Apoptose als bei Keimzellen beobachteten (Yan et al., 2000a).

4.1.3 SERTOLI-ZELLEN

Beim genetischen Nachweis der m-RNA von Bcl-w waren die Reaktionen in den Sertolizellen und Spermatogonien ausgeprägter als in Spermatozyten (Yan et al., 2000b). Somit ist das Ergebnis entgegengesetzt zu dem von Bcl-X (Spermatogonien waren hier sogar negativ). Auch bei der Stadienverteilung ist die Reihenfolge der Reaktionsstärkeverteilung entgegengesetzt, so ist die Reaktion von Bcl-w in SZ im Stadium II-VI am deutlichsten, gefolgt von Stadium IX-XII und XIII-I, am schwächsten im Stadium VIII. Somit kann vermutet werden, dass in verschiedenen Stadien verschiedene antiapoptotische Mechanismen wirken. Dies ist umso wahrscheinlicher, da gezeigt wurde, dass Bcl-w und Bcl-X unabhängig voneinander eine Apoptose auslösen können (Ross et al., 2001). Aus der Tatsache, dass in Bcl-w-Mangelmäusen erst ab dem 24. pnd eine stärkere Apoptose gegenüber normalen Mäusen festgestellt wurde (Russell et al., 2001), schlossen Ross et al., dass bis zu diesem Zeitpunkt die Apoptose überwiegend durch Bcl-2 und Bcl-X verhindert wird. Mit dem Rückgang von Bcl-X und Bcl-2 ab dem 24. pnd kam es dann zu verstärkten Apoptosen in

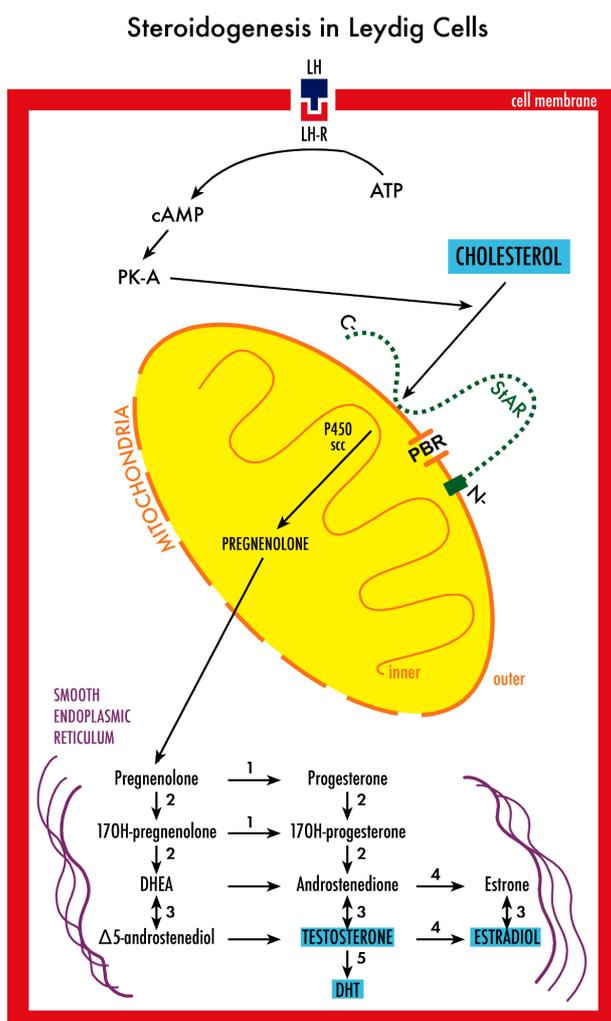
den SZ der Mutanten. Ab diesem Zeitpunkt müsste also Bcl-w die führende Rolle übernehmen, das aber in diesen Mäusen nicht vorhanden ist, BAK überwiegt somit und führt zur verstärkten Apoptose. Den Rückgang von Bcl-X ab dem 24. pnd kann man auch in den hier vorliegenden Ergebnissen nachvollziehen. Ein ähnliches Abwechseln der antiapoptotischen Proteine ist auch in den verschiedenen Stadien der Tubuli vorstellbar. Auch die Befunde von Blanco-Rodriguez et al. (1996 und 1998) deuten daraufhin, dass die Apoptose der Spermatogenezellen stadienabhängig ist. Die Apoptose ist somit assoziiert mit dem Stadium der Spermatogonienproliferation. Wenn es zu einem Absinken der Spermatogonienzahl kommt, werden Zellzyklen mit einer höheren Apoptoserate seltener durchlaufen (Kimura et al. 2003). So ist auch das in dieser Studie stadienabhängige Apoptoseverhalten der Keimzellen zu interpretieren.

Auffällig ist die homogen positive Reaktion von Bcl-X am 22. pnd in den Sertolizellen, die damit wesentlich deutlicher ist als den anderen Tagen. Wahrscheinlich hängt dies mit der besonderen Situation zusammen, dass Spermatozyten erst ab dem 22. pnd den vollen Zellzyklus, und damit die volle Reifung durchlaufen (Miething and Haider, 2000). Gleichzeitig sind Sertolizellen für die Apoptoseinduktion von Keimzellen verantwortlich, um die physiologische Anzahl an Keimzellen zu erhalten (Dunkel et al., 1997). Neben der Steuerung der Apoptose, phagozytieren SZ Zelltrümmer (Pentkainen et al. 1999) von abgestorbenen Keimzellen durch Lysosomen (III). Auch dies ist in dieser Zeit verstärkt nötig und würde ein verstärktes pro- und antiapoptotisches Geschehen induzieren. Ein dritter Grund könnte darin liegen, dass SZ nur in der fetalen und frühen postnatalen Zeit gebildet werden können, und somit besonders geschützt werden müssen.

Apoptotische Reaktionen in SZ wurden bei Menschen auch mit der TUNEL-Methode (Apoptose-Detektions-Kit für apoptotische Zelltrümmer) nachgewiesen (Oldereid et al. 2001). Ein Zeitpunkt an dem diese Reaktionen besonders stark sind wurde bei dieser Studie leider nicht bestimmt.

4.2 HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASEN

Die nachgewiesenen Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (3α -HSD, 3β -HSD und 17β -HSD) sind allesamt als Enzym bei der Bildung von Testosteron beteiligt. Ein Schema von Haider (2004) bringt dies zum Ausdruck:



Die Bindung des luteinisierenden Hormons (LH) an den LH-Rezeptor induziert die Bildung des zyklischen AMP (cAMP) aus ATP. Das cAMP katalysiert die Synthese von Proinkinase-A (PK-A), welches für den Transport von Cholesterol vom zytoplasmatischen Pool zu den Mitochondrien benötigt wird. Das steroidogene akute Regulationsprotein (StAR) und der periphere Benzodiazepinrezeptor (PBR) transportieren Cholesterol von der äußeren zur inneren Membran der Mitochondrien. Das Enzym p450_{scc} wandelt Cholesterol in Pregnelon, welches schließlich zum glatten endoplasmatischen Retikulum transportiert wird, wo die Synthese des Testosterons stattfindet: DHEA = Dihydroepiandrosteron, DHT = Dihydrotestosteron. 1 = 3β -HSD, 2 = Cytochrom p450 17α -Hydroxylase, 3 = 17β -HSD, 4 = Cytochrom p450 Aromatase, 5 = 5α -Reduktase

Für alle erwähnten HSD ist eine Lokalisation in den Leydigzellen belegt (O`Shaughnessy and Murphy 1991a).

Alle durchgeführten Enzymreaktionen zum Nachweis von HSD zeigen zunächst eine Zunahme der Reaktion vom 1. bis 5. pnd. Danach kommt es bis zum 22. Tag zu einer Abschwächung, so dass am 22. pnd ein Tiefpunkt erreicht wird. Erst danach nimmt die Intensität wieder zu, wobei dann eine mäßige bis starke Reaktion vorhanden ist (Grafik 4). Auch bei Betrachtung der Immunreaktion von 11β -HSD erkennt man einen Tiefpunkt am 22. pnd. Hier beginnt der Abwärtstrend jedoch schon am 1. pnd. Der Anstieg ist nach dem 22. pnd ähnlich deutlich wie bei der Enzymreaktion (Grafik 3).

Ein Peak der Hydroxysteroid-Dehydrogenasen am 5. pnd, wie er bei den hier verwendeten Enzymreaktionen auftrat, wurde auch schon bei Nachweisen von 3β -HSD-mRNA (Baker et al., 1999) und 17β -HSD-mRNA (Baker et al., 1997) mittels PCR entdeckt. Der zweite Anstieg ab dem 26. pnd von 17β -HSD deckt sich ebenfalls mit den genetischen Untersuchungen (Baker et al. 1997). Darüber hinaus geht dieser Anstieg auch konform mit einer Zunahme der Testosteronbildung um den 30. pnd (Kerr und Knell, 1988). Betrachtet man die genetischen Untersuchungen von 3β -HSD (Baker et al., 1999) so ergibt sich eine Diskrepanz zu den hier untersuchten Enzymreaktionen. Eine Zunahme der 3β -HSD-mRNA lässt sich nämlich schon ab dem 10. pnd nachweisen, also um einiges eher als 17β -HSD-mRNA. Baker vermutet eine Beeinflussung der anderen Dehydrogenasen durch 3β -HSD. Obwohl 3β -HSD also schon eher vorhanden ist setzt ihre vermehrte Funktion erst zeitgleich mit den anderen Dehydrogenasen ein.

Nun stellt sich die Frage warum es nach der anfänglich recht hohen Enzymfunktion zunächst zu einer Abnahme kommt. Dies ist durch den Ersatz

von fetalen (FLZ) durch adulte Leydigzellen (ALZ) zu erklären:

Bei den Leydigzellen (LZ) unterscheidet man zwei, morphologisch und funktionell unterschiedliche, Leydigzelltypen. Diese wurden bereits von mehreren Autoren bei Ratten beschrieben (Haider et al 1986, Hardy et al 1989, Kuopio et al 1989, Haider & Servos 1998, Majdic et al 1998, Ariyaratne & Mendis-Handagama 2000). In der neonatalen Phase findet man zunächst ausschließlich FLZ (Schäfers und Schlutius 2001). Die ersten periodic acid/Schiff's reagent negativen Leydigzellen, somit adulten LZ (Roosen-Runge, 1959), treten bei Mäusen um den 4.-9. pnd auf (Vergouwen RP, 1991). HSD's wie z.B. 17β -HSD werden in beiden Leydigzelltypen gefunden (Ivell et al. 2003). Somit sind die zunächst hohe Enzymtätigkeit von 3α , 3β und 17β -HSD auf die FLZ zurückzuführen. Ebenso ist der Rückgang der HSD-Enzymreaktionen (Grafik 4) und der 11β -HSD-Immunreaktion (Grafik 3) mit dem Verschwinden der FLZ zu erklären.

Der postpubertäre Anstieg aller HSD-Nachweise ab dem 26. pnd ist allein auf ALZ zurückzuführen, da FLZ zu diesem Zeitpunkt (bei Ratten) nicht mehr zu finden sind (Schäfers et al. 2001). Es wird noch zu klären sein, warum die Dehydrogenasen erst so spät verstärkt ihre Funktion wahrnehmen, obwohl sie teilweise schon vorher verstärkt genetisch nachgewiesen werden können. Einen möglichen Ansatzpunkt bietet die unterschiedliche Regulation der FLZ bzw. ALZ. Es konnte nämlich nachgewiesen werden, dass FLZ unabhängig von LH und anderen Gonadotropinen eine Expression von 17β -HSD zeigen. Dies wurde zum einen an Mäusen ohne entsprechende Rezeptoren gezeigt (Baker et al., 1997), zum anderen ist LH in der neonatalen Phase nicht nachweisbar (Huhtaniemi, 1994). ALZ sind hingegen auf Gonadotropine angewiesen (Baker et al., 1997). Somit wäre es denkbar, dass auch zur

Funktionsaufnahme von Dehydrogenasen in ALZ ein Steuerungsimpuls von Nöten ist. Auch der Abstieg der Hoden ins Skrotum um den 25.pnd könnte eine Rolle spielen, da zur vollen Funktionsaufnahme von LZ ein Abstieg der Hoden nötig ist (O`Shaughnessy und Sheffield 1991b). Der erwähnte Steuerungsimpuls könnte beispielsweise aus den Sertolizellen stammen, von denen bekannt ist, dass sie einen Einfluss auf die LZ-Funktion haben (Krishnamurthy et al., 2001). Zur Steuerung dienen dazu Interleukine. Auch die Beeinflussung der LZ durch FSH benötigt die Zwischenschaltung von Sertolizellen in den Steuerungszyklus (Krishnamurthy et al., 2001). Eine starke Apoptoseverhinderung deutet (höchste Bcl-X Werte in den Sertolizellen am 22.pnd) auf eine wichtige Aufgabe der Sertolizellen am 22.pnd hin. Beispielsweise, dass Sertolizellen über Interleukine das Startsignal zur verstärkten HSD-Bildung (und damit Testosteronbildung) geben und dafür eine möglichst hohe Anzahl an Sertolizellen vorhanden sein sollte.

Der Tiefpunkt am 22. pnd in allen HSD-Nachweisverfahren bietet noch weitere Aspekte: So lässt sich nämlich eine Ruhephase der Dehydrogenasen herleiten, sowohl was das Vorhandensein (Immunreaktion) als auch was den Tätigkeitsgrad (Enzymreaktion) angeht. Somit kann indirekt auch auf eine Ruhephase der LZ geschlossen werden. Eine präpubertäre Ruhephase der Tubuli wurde bereits auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen (Miething und Haider, 2000). Dabei sah man, dass sich die Spermatiden am 22. pnd bis zum Stadium 7/8 nach Russell (Russell et al., 1990), das heißt bis kurz vor die Elongation, entwickelt hatten. Aber trotz normaler Entwicklung der jeweils assoziierten Spermatogonien und Spermatozyten erkannte man keine Elongation der Spermatiden. Erst ab dem 28. pnd, also erst nach dem Wideranstieg von HSD erkannte man Elongationen.

4.3 11 β -HSD IN INTERSTITIELLEN GEFÄßEN

Die Funktion von 11 β -HSD liegt darin eine Minderung der Testosteronbildung durch Glukocorticoide zu verhindern (Monder 1994a, Monder 1994b). Cortison kann nämlich ähnlich gut wie LH (luteinisierendes Hormon) an die LH-Rezeptoren in den Tubuli binden (Phillips et al. 1989), und so eine Stimulation der Testosteronbildung durch LH blockieren. Die Funktion von 11 β -HSD liegt nun in der Katalysierung einer Oxidation von 11-Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron. Dieses kann nicht mehr an die Rezeptoren binden und somit auch die Testosteronbildung nicht verhindern. Somit ist 11 β -HSD ein indirekter Nachweis von Testosteron.

11 β -HSD ist in den Keimzellen nicht zu finden, dies bestätigen auch andere Autoren, z.B. bei Ratten (Phillips et al. 1989).

Die interstitiellen Blutgefäße der Hoden hingegen zeigen an allen Tagen, mit Ausnahme des 1. pnd positive Reaktionen. Diese sind zunächst am 5. und 15. pnd mäßig positiv, vom 22. bis 30. pnd schwach und schließlich vom 45. pnd an wieder mäßig positiv. Von anderen Autoren wurde ein Nachweis von HSD in interstitiellen Hodengefäßen ebenfalls schon beschrieben, z.B. bei Ratten für 3 β -HSD (Haider und Servos 1998). Da sich Leydigzellen und Gefäßzellen im engen Kontakt zueinander befinden, wurde auf eine parakrine Wechselwirkung zwischen den beiden Zellen geschlossen. Diese Wechselwirkungen funktioniert wahrscheinlich unter Einbeziehung des LH-Regelmechanismus (LH = luteinisierendes Hormon), welcher die Testosteronbildung in den ALZ induziert.

Der Nachweis von 11 β -HSD in den Gefäßzellen verläuft neonatal zunächst etwas gegenläufig zu 11 β -HSD in den Leydigzellen. Dies könnte ein Hinweis auf eine Wechselwirkung zwischen den beiden Zelltypen sein. Und zwar

insofern, dass am 1. pnd genügend 11β -HSD in den LZ produziert wird, und erst danach in Gefäßen ein Ausgleich für den rückläufigen 11β -HSD-Gehalt der LZ geschaffen wird. Dies ist insofern möglich, da FLZ, unabhängig von LH, HSD produzieren (Baker et al., 1997). Nach der Ruhephase um den 22. pnd kommt es zu einer deutlicheren Zunahme in den LZ als in den Gefäßzellen. Beide Zellen zeigen jetzt jedoch eine gewisse Analogie, was durch ein Einwirken von LH auf beide Zellarten zu interpretieren ist.

4.4 TESTOSTERONVORSTUFEN (UNSPECIFISCHE-ESTERASE UND LIPIDE)

Als unspezifische Esterasen bezeichnet man Enzymkomplexe die sich an der Bereitstellung der Cholesterin-Ester, zur Synthese des Testosterons, beteiligen. Wie aus Grafik 5 ersichtlich zeigt die Unspezifische-Esterase (=NE) ähnliche, lebenszyklusabhängige Reaktionsstärken wie HSD. So erkennt man zunächst ein Ansteigen zum 5. pnd hin und danach eine Abnahme mit Tiefpunkt am 22. pnd. Bei der NE zeigt sich am 22. pnd sogar eine komplett negative Reaktion. Nach dem 22. pnd zeigen beide Reaktionen wieder eine Zunahme. Zu erklären ist dies damit, dass Cortison zur Bildung von Testosteron benötigt wird, weil Cortison eine Vorstufe von Testosteron darstellt. Da die Unspezifische-Esterase zur Bildung des Cortisons benötigt wird, ist sie indirekt ein Messparameter für den Cortisongehalt. Somit kann man daraus schließen, dass neben der Umstellung von fetalen auf adulte LZ (siehe Kapitel 4.2), auch der Mangel an Testosteronvorstufen, wie z.B. Cortison für die geringe HSD-Aktivität, und damit geringen Testosterongehalt, verantwortlich ist. Somit leitet der Mangel an Testosteronvorstufen die Ruhephase am 22. pnd ein.

Betrachtet man die Fetteinlagerungen in den Hoden einer Maus während des postnatalen Lebenszyklus, so entdeckt man einen Verlauf wie man ihn von HSD und NE kennt (Grafik 5). So erkennt man wiederum einen Anstieg bis zum 5. pnd mit folgender Abnahme und Tiefpunkt am 22. pnd. Danach kommt es wieder zu einer Zunahme der Lipideinlagerungen. Im Fall der Lipide sind die Veränderungen jedoch etwas langsamer. Lipidtropfen in den Leydigzellen stellen einen Pool für Cholesterin dar, das die Ausgangssubstanz für die Steroidgenese ist (Schema von Haider 2004). Somit wird in Grafik 5 deutlich, dass sich der "Cholesterinpool" an den höheren Verbrauch anpasst. Jedoch mit etwas Verzögerung, was daran liegen wird, dass schon Lipide zur Steroidgenese verbraucht werden, während der "Pool" noch aufgefüllt wird.

4.5 RESÜMEE

Die vorliegende histologische, histochemische und immunhistochemische Arbeit liefert wichtige Daten über die Ontogenese der Enzyme und Apoptoseproteine im Maushoden. Diese Erkenntnisse liefern eine Grundlage für zukünftige experimentelle und toxikologische Untersuchungen am Hoden der Balb-c-Maus.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Landgraeber, Stefan

Untersuchungen zur Steroidogenese und Apoptose im Balb-c-Maus-Hoden während der postnatalen, pubertären und adulten Phase.

Ziel dieser Studie ist es mittels histo- bzw. immunhistochemischer Methoden ontogenetische Veränderungen, in Hinblick auf Verteilung und Intensität von Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD), in Hoden von ein Tag bis ein Jahr alten Balb-c-Mäusen zu untersuchen. Des Weiteren wird untersucht inwieweit die Apoptose in die Regulation Steroidgenese, in Form von Abbau verschiedener Tubulizellen, eingreift. Dies geschieht mit Hilfe des Nachweises von überwiegend antiapoptotischen Bcl-X-Proteinen und überwiegend proapoptotischen BAK-Proteinen.

In den Leydigzellen beobachtet man dabei einen zweigipfeligen Verlauf, sowohl der Dehydrogenasen als auch der Antiapoptoseantikörper mit Peaks direkt postnatal (1. bzw. 5. postnataler Tag (pnd)) und postpubertär (30. bzw. 45. pnd). Eine Ruhephase der Dehydrogenasen erkennt man am 22. pnd. Des Weiteren erkennt man ein von Spermatogenesestadien abhängiges Verhalten der Apoptose, in den Keim- und Sertolizellen, ab dem 45. pnd. Dabei findet man das stärkste antiapoptotische Verhalten im Stadium VIII. Gleichzeitig zeigt sich im Stadium VIII die stärkste Reaktion von 11 β -HSD in den Sertolizellen. Der Nachweis von HSD gelingt nicht nur in den klassischen Tubulizellen wie Keim-, Sertoli und Leydigzellen sondern auch in den Endothelzellen der Gefäße. Auch die unspezifischen Esterasen, die der Bereitstellung von Cholesterin-Estern zur Testosternbildung dienen zeigen einen zweigipfeligen Verlauf mit einem Peak am 5. pnd und einem Tiefpunkt am 22. pnd mit nachfolgendem Anstieg. Der präpubertäre Höhepunkt der Apoptose lässt sich damit erklären, dass es zu diesem Zeitpunkt besonders wichtig ist überflüssige Zellen abzubauen.

Darüber hinaus erkennt man eine Verlagerung der Apoptosereaktionen, wobei sich die stärkste Reaktion in den Zellen findet auf deren Entwicklung zum jeweiligen Zeitpunkt die meiste acht gegeben werden muss. In der Frühphase der Entwicklung sind dies die Spermatogonien. Im fortpflanzungsfähigen Alter sind es eher die Spermatozoen und Spermatozyten. Im gleichen Zusammenhang ist auch das stadienabhängige Verhalten zu sehen, auch hier findet man die stärksten Reaktionen in Zellen, die für die folgende Entwicklung die größte Bedeutung haben. Das postpubertäre antiapoptotische Verhalten lässt daraus herleiten, dass fetale Leydigzellen, die zu dieser Zeit den Großteil der Leydigzellen ausmachen durch Degeneration und nicht durch Apoptose abgebaut werden. Der 11 β -HSD-Nachweis in den interstitiellen Gefäßen deutet auf eine parakrine Wechselwirkungen zwischen Leydig- und Sertolizellen hin, in die auch das LH-Hormon der Hypophyse eingebunden ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adamski J., Normand T., Leenders F., Monté D., Begue A., Stehelin D., Jungblut J.W., de Launoit Y.** (1995). Molecular cloning of a novel widely expressed human 80kDa 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase IV. *Biochem. J.* 1995 **311**; 437-443
- Andersson S., Geissler W.M., Patel S., Wu L.** (1995). Molecular biology of androgenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1995 **53**; 37-39
- Ariyaratne H.B.S., Mendis-Handagama S.M.L.C.** (2000). Changes in the testis interstitium of Sprague-Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol. Reprod.* 2000 **62**; 680-690
- Baker P.J., Sha J.H., O`Shaughnessy P.J.** (1997). Localisation and regulation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 mRNA during development in the mouse testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1997 **133**; 127-133
- Baker P.J., Sha J.H., McBride M.W., Peng L., Payne A.H., O`Shaughnessy P.J.** (1999). Expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I and type VI isoforms in the mouse testis during development. *Eur. J. Biochem.* 1999 **260**; 911-916
- Biswas M.G., Russell D.W.** (1997). Expression cloning and characterization of oxidative 17 β - and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases from rat and human prostate. *J. Biol. Chem.* 1997 **272**; 15959-15966
- Blanco-Rodriguez J., Martinez-Garcia C.** (1996). Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif.* 1996 **29**; 13-31

- Blanco-Rodriguez J.** (1998). A matter of death and life: The significance of germ cell death during spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 1998 **21**; 236-248
- Boise L.H., Gonzales-Garcia M., Postema C.E., Ding L., Lindsten T., Turka L.A., Mao X., Nunez G., Thompson C.B.** (1993). Bcl-X, a Bcl-2 related gene that functions as dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993 **74**; 597
- Brereton P., Suzuki T., Sasano H., Li K., Duarte C., Obeyesekere V., Haeseleer F., Palczewski K., Smith I., Komesaroff P., Krozowski Z.** (2001). Pan1b(11 β HSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001 **171**; 111-117
- Carstensen JF, Tesdorpf JG, Kaufmann M, Markus MM, Husen B, Leenders F, Jakob F, de Launoit Y, Adamski J.** (1996). Characterization of 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenase IV. *J. Endocrinol.* 1996 **150**; Suppl.: S3-S12.
- Chittenden T., Harrington E.A., O`Connor R., Flemington C., Lutz R.J., Evan G.I., Guild B.C.** (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue BAK. *Nature* 1995 **374**; 733
- Dufort I., Labrie F., Luu-The V.** (2001). Human types I and 3 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: Differential liability and tissue distribution . *J. clin. Endocrinol. Metab.* 2001 **86**; 841-846
- Dunkel L., Taskinen S., Hovatta O., Tilly J.L., Wikstrom S.** (1997). Germ cell apoptosis after treatment of cryptorchidism with human chorionic gonadotropin is associated with impaired reproductive function in the adult. *J. Clin. Invest.* 1997 **100**; 2341-2346

- Faria M.J., Simoes Z.L., Lunardi L.O., Hartfelder K.** (2003). Apoptosis process in mouse Leydig cells during postnatal development. *Microsc. Microanal.* 2003 **9**; 68-73
- Fomitcheva J., Baker M.E., Anderson E., Lee G.Y., Aziz N.** (1998). Characterization of Ke 6, a new 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and its expression in gonadal tissues. *J. Biol. Chem.* 1998 **273**(35); 22664-22671
- Haider S.G., Passia D., Overmeyer G.** (1986). Studies on fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Acta Histochem.* **32**; 197-202
- Haider S.G.** (1988). *Leydigzellen.* Georg Thieme Verlag (Stuttgart, New York) 1988; 173
- Haider S.G., Servos G.** (1998). Ultracytochemistry of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. *Anat. Embryol.* **198**; 101-110
- Haider S.G.** (2004). Cell biology of Leydig Cells in the testis. *Int. Rev. Cytology.* **233**; 181-241
- Hardy M.P., Zirkin B.R., Ewing L.L.** (1989). Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* **124**; 762-770
- He X.Y., Merz G., Chu C.H., Lin D., Yang Y.Z., Mehta P., Schulz H., Yang S.Y.** (2001) Molecular cloning, modelling, and localization of rat type 10 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Cell Endocrinol.* **171**; 89-98.
- Hess R.A., Schaeffer D.J., Eroschenko V.P., Keen J.E.** (1990a). Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biol. Reprod.* 1990 **43**; 517-524

- Hess R.A.** (1990b). Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: Light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol. Reprod.* 1990 **43**; 525-542.
- Huhtaniemi I.** (1994). Fetal testis – a very special endocrine organ. *Eur. J. Endocrinol.* 1994 **130**; 25-31.
- Ivell R., Balvers M., Anand R.J., Paust H.J., McKinnel C., Sharpe R.** (2003). Differentiation-dependent expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, type 10, in the rodent testis: Effect of aging in Leydig cells. *Endocrinology* 2003 **144**; 3130-3137.
- Ker J.B., Knell C.M.** (1998). The fate of fetal Leydig-cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* **103**; 535-544.
- Kimura M., Itoh N., Takagi S., Sasao T., Takahashi A., Masumori N.; Tsukamoto T.** (2003). Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged man. *J. Androl.* 2003 **24**; 185-191.
- Krajewski S., Krajewska M., Shabaik A., Wang H.G., Irie S., Fong L., Reed J.C.** (1994). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res.* 1994 **54**; 5501-5507
- Krishnamurthy H., Kats R., Danilovich N., Javeshghani D., Sairam M.R.** (2001). Intercellular communication between Sertoli cells and Leydig cells in the absence of follicle-stimulating hormone-receptor signalling. *Biol. Reprod.* 2001 **65**; 1201-1207
- Kuopio T., Tapanainen J., Pelliniemi L.J., Huhtaniemi I.** (1989). Development stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development* **107**; 213-220

- Luu-The V., Zhang Y., Poirier D., Labrie F.** (1995) Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: oxidation/reduction and inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **55**; 581-587.
- Majdic G., Saunders P.T.K., Teerds K.J.** (1998). Immunoexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17 α -hydroxylase, C17, 20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biol. Reprod.* **58**; 520-525
- Miething A., Haider S.G.** (2000). Coincidence of delayed spermatid elongation with changes in 3 β -HSD expression in the Leydig cells of the pubertal mouse testis. 11th European Workshop on Molecular and cellular Endocrinology of the testis, 13-17th May 2000, Saint Malo, Bretagne, France
- Monder C., Sakai R.R., Miroff Y., Blanchard D.C., Blanchard R.J.,** (1994a). Reciprocal changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: Evidence for a mediating role of testicular 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 1994 **134**; 1193-1198
- Monder C., Miroff Y., Marandici A., Hardy M.P.** (1994b). 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase alleviates glucocorticoid-mediated inhibition of steroidgenesis in rat Leydig cells. *Endocrinology* 1994 **134**; 1199-1204
- Nokelainen P., Peltoketo H., Vihko R., Vihko P.** Expression cloning of a novel estrogenic mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase (m17HSD7), previously described as a prolactin receptor-associated protein (PRAP) in rat. (1998) *Mol. Endocrinol.* **12**; 1048-1059.

- Normand T., Husen B., Leenders F., Pelczar H., Baert J.L., Begue A., Flourens A.C., Adamski J., de Launoit Y.** (1995) Molecular characterization of mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **55**; 541-548.
- Oldereid N.B., Angelis P.D., Wiger R., Clausen O.P.** (2001). Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis. *Mol. Hum. Reprod.* 2001 **7**; 403-408
- Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J.** (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo a conserved homologue, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993 **74**; 609-619
- O`Shaughnessy P.J., Murphy L.** (1991a). Steroidogenic enzyme activity in the rat testis following Leydig cell destruction by ethylene-1, 2-dimethanesulphonate and during subsequent Leydig cell regeneration. *J. Endocrinol.* **131**; 451-457
- O`Shaughnessy P.J., Sheffield J.W.** (1991b). Effect of temperature and the role of testicular descent on post-natal testicular androgen production in the mouse. *J. Reprod. Fertil.* 1991 **91**; 357-364
- Pelletier G., Luu-The V., Tetu B., Labrie F.** Immunocytochemical localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human reproductive tissues. (1999) *J. Histochem. Cytochem.* **47**; 731-738.
- Pelletier G., Li S., Luu-The V., Tremblay Y., Belanger A., Labrie F.** (2001). Immunoelectron microscopic localisation of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450_{SCC}, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450_{C17}) in rat adrenal cortex and gonads. *J. Endocrinol.* 2001 **171**; 373-383

- Pentkainen V., Erkkilla K., Dunkel L.** (1999). Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am. J. Physiol.* 1999 **276**; E310-E316
- Phillips D.M., Lakshmi V., Monder C.** (1989). Corticosteroid 11 β -dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology* 1989 **125**; 209-216
- Reed J.C.** (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.* 1994 **124**; 1-6
- Reed M.J.** (1991). Oestradiol-17 β hydroxysteroid dehydrogenase: Its family and function. *J. Endocrinol.* 1991 **129**; 163-165
- Roosen-Runge E.C., Anderson D.** (1959). The development of the intestinal of the albino rat. *Acta Anat.* **37**; 125-137
- Rodriguez I., Ody C., Araki K., Garcia I., Vassali P.** (1997). An early and massive wave germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.* **16**; 2262-2270
- Ross A.J., Amy S.P., Mahar P.L., Lindsten T., Knudson C.M., Thompson C.B., Korsmeyer S.J., MacGregor G.R.** (2001). Bcl-w mediates survival of postmitotic sertoli cells by regulating BAX Activity. *Dev. Biol.* **239**; 295-308
- Russell L.D., Warren J., Debeljuk L., Richardson L.L., Mahar P.L., Waymire K.G., Amy S.P., Ross A.J., MacGregor G.R.** (2001). Spermatogenesis in Bcl-w-deficient mice. *Biol. Reprod.* 2001 **65**; 318-332
- Sato T., Hanada M., Bodrug S., Irie S., Iwama N., Boise L.H., Thompson C.B., Golemis E., Fong L., Wang H.G.** (1994). Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 **92**; 9238

- Schäfers B.A., Schlutius B.G., Haider S.G.** (2001). Ontogenesis of oxidative reaction of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells, a histochemical study. *Histochem. J.* 2001 **33**; 585-595
- Su J., Lin M., Napoli J.L.** (1999) Complementary deoxyribonucleic acid cloning and enzymatic characterization of a novel 17 β -/3 α -hydroxysteroid/-retinoid short chain dehydrogenase/reductase. *Endocrinology.* **140**; 5275-5284
- Vergouwen R.P.F.A., Jacobs S.G.P.M., Huiskamp R., Davids J.A.G., Derooij** (1991). Proliferative activity of gonocytes, sertoli cells and intestinal cells during testicular development in mice. *J. Reprod. Fertil.* **93**, 233-243
- Wang R.A., Nakane P.K., Koji T.** (1998). Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol. Reprod.* **58**; 1250-1256
- Yan W., Suominen J., Samson M., Jegou B., Toppari J.** (2000a). Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cells in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000 **165**; 115-129
- Yan W., Samson M., Jegou B., Toppari J.** (2000b), Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis. *Mol. Endocrinol.* 2000 **14**; 682-699
- Yang K., Yu M.** (1994) Evidence for distinct isoforms of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the ovine liver and kidney. *J Steroid Biochem Mol. Biol.* **49**; 245-250.

7 DANKSAGUNG

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Anatomischen Instituts II der Universitätsklinik Düsseldorf für Ihre engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Versuchsreihen. Mein besonderer Dank gilt Frau Gabriele Berthold und Frau Gisela Servos für Ihre besonders hilfreichen Tipps.

Des Weiteren danke ich Frau Tanja Reuter für die großartige gestalterische Unterstützung.

8 LEBENS LAUF

NAME: Stefan Rudolf Landgraeber

ANSCHRIFT Von-Ossietzky-Ring 6
D-45279 Essen

TELEFON: +49 (0) 2 01 / 53 32 35

GEBURTSDATUM: 14. Januar 1977

GEBURTSORT: Essen

FAMILIENSTAND: Ledig

KONFESSION: römisch-katholisch

SCHULBILDUNG: 1. Juli 1983 bis 30. Juni 1987
kath. Grundschule in Essen-Horst,
1. Juli 1987 bis 30. Juni 1996
Burggymnasium in Essen

SCHULABSCHLUSS: Hochschulreife (Abitur)

GRUNDWEHRDIENST: 1. Juli 1996 bis 30. April 1997
Ableistung des Grundwehrdienstes beim
Fernmelderegiment 990
Lancent

STUDIUM: 1. April 1997 bis 5. Mai 2003 Medizinstudium
an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
März 1999 Physikum
März 2000 Erstes Staatsexamen
März 2002 Zweites Staatsexamen
Mai 2003 Drittes Staatsexamen

FAMULATUREN: August 1999 Phillippusstift, Essen,
Neurologische Station
August 2000 Rennbahnklinik, Basel (CH),
Orthopädische Chirurgie / Sportmedizin
August 2001 Dr. Wallenfang, Bottrop,
Allgemeinmedizin
September 2001 Knappschafts Krankenhaus, Essen,
Gynäkologie

PRAKTISCHES JAHR:

1. Tertial: Evangelisches-Johanniter-Krankenhaus, Duisburg, Radiologie
2. Tertial: Klinik Gut, St. Moritz (CH), Chirurgie
3. Tertial: Evangelisches-Johanniter-Krankenhaus, Duisburg, Innere Medizin

FACHARZTAUSBILDUNG:

Seit dem 1. Juli 2003 Anstellung in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie der Universität Essen im evangelischen Krankenhaus Essen-Werden

ABSTRACT

Name des Doktoranten: Landgraeber, Stefan

Name des Referenten: Prof. Dr. rer. nat. S.G. Haider

Titel: Untersuchungen zur Steroidogenese und Apoptose im Balb-c-Maus-Hoden während der postnatalen, pubertären und adulten Phase.

Ziel dieser Studie ist es mittels histo- bzw. immunhistochemischer Methoden ontogenetische Veränderungen, in Hinblick auf Verteilung und Intensität von Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD), in Hoden von ein Tag bis ein Jahr alten Balb-c-Mäusen zu untersuchen. Des Weiteren wird untersucht inwieweit die Apoptose in die Regulation Steroidgenese, in Form von Abbau verschiedener Tubulizellen, eingreift. Dies geschieht mit Hilfe des Nachweises von überwiegend antiapoptotischen Bcl-X-Proteinen und überwiegend proapoptotischen BAK-Proteinen.

In den Leydigzellen beobachtet man dabei einen zweigipfeligen Verlauf, sowohl der Dehydrogenasen als auch der Antiapoptoseantikörper mit Peaks direkt postnatal (1. bzw. 5. postnataler Tag (pnd)) und postpubertär (30. bzw. 45. pnd). Eine Ruhephase der Dehydrogenasen erkennt man am 22. pnd. Des Weiteren erkennt man ein von Spermatogenesestadien abhängiges Verhalten der Apoptose, in den Keim- und Sertolizellen, ab dem 45. pnd. Dabei findet man das stärkste antiapoptotische Verhalten im Stadium VIII. Gleichzeitig zeigt sich im Stadium VIII die stärkste Reaktion von 11β -HSD in den Sertolizellen. Der Nachweis von HSD gelingt nicht nur in den klassischen Tubulizellen wie Keim-, Sertoli und Leydigzellen sondern auch in den Endothelzellen der Gefäße. Auch die unspezifischen Esterasen, die der Bereitstellung von Cholesterin-Estern zur Testosternbildung dienen zeigen einen zweigipfeligen Verlauf mit einem Peak am 5. pnd und einem Tiefpunkt am 22. pnd mit nachfolgendem Anstieg. Der präpubertäre Höhepunkt der Apoptose lässt sich damit erklären, dass es zu diesem Zeitpunkt besonders wichtig ist überflüssige Zellen abzubauen.

Darüber hinaus erkennt man eine Verlagerung der Apoptosereaktionen, wobei sich die stärkste Reaktion in den Zellen findet auf deren Entwicklung zum jeweiligen Zeitpunkt die meiste acht gegeben werden muss. In der Frühphase der Entwicklung sind dies die Spermatogonien. Im fortpflanzungsfähigen Alter sind es eher die Spermatozoen und Spermatozyten. Im gleichen Zusammenhang ist auch das stadienabhängige Verhalten zu sehen, auch hier findet man die stärksten Reaktionen in Zellen, die für die folgende Entwicklung die größte Bedeutung haben. Das postpubertär eher antiapoptotische Verhalten lässt daraus herleiten, dass fetale Leydigzellen, die zu dieser Zeit den Großteil der Leydigzellen ausmachen durch Degeneration und nicht durch Apoptose abgebaut werden.

Der 11β -HSD-Nachweis in den interstitiellen Gefäßen deutet auf eine parakrine Wechselwirkungen zwischen Leydig- und Sertolizellen hin, in die auch das LH-Hormon der Hypophyse eingebunden ist.

Genehmigt: *Haider, Mai 2004*