Aus dem Institut für Anatomie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Universitäts-Professorin Dr. Ch. von Gall

Morphologische und immunhistochemische Untersuchung zur Entwicklung der Urniere (Mesonephros) in fetalen männlichen Ratten

Dissertation

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

vorgelegt von

Anke Schlüter
2014

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

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

Referent: Prof. Dr. Haider

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

Zusammenfassung

Morphologische und immunhistochemische Untersuchung zur Entwicklung der Urniere (Mesonephros) in fetalen männlichen Ratten

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Morphogenese der verschiedenen Strukturen der Urniere (Mesonephros) fetaler männlicher Wistar-Ratte mit Hilfe der immunhistochemischen Reaktion von Androgenrezeptor, Fibronektin, Hepatocyte growth factor (HGF-α) und dessen Rezeptor c-Met zu untersuchen.
Material und Methoden: Insgesamt wurden 22 männliche Feten untersucht. Es wurde der Bereich des Situs und Retrosinus abdmoninis von fetalen männlichen Wistar Ratten zwischen dem Fetaltag (fd) 16 bis Fetaltag 19 täglich entnommen und mit Hilfe der immunhistochemischen Reaktion von Androgenrezeptor, Fibronektin, HGF-α und dessen Rezeptor c-Met in Paraffin-Serienschitten lichtmikroskopisch untersucht und ausgewertet.
Befunde: Die Intensität der immunhistochemischen Reaktion des Androgenrezeptors zeigt sich in den Strukturen Tubuli mesonephrici, Wolff-Gang und Ureter progredient bei fortschreitender Altersstufe, wobei im Ureter die Reaktion am schwächsten ist und die Epithelzellkerne hier stärker reagieren als das Stroma/Myofibroblasten. Die Intensität der immunhistochemischen Reaktion des Androgenrezeptors im Müller-Gang hingegen zeigt einen regredienten Verlauf mit fortschreitender Entwicklung des Ratten-Fetus.
Die Intensität der immunhistochemischen Reaktion von Fibronektin zeigt heterogene Muster: Im Müller-Gang zeigt sich kaum eine Reaktion, die Reaktion in den Tubuli mesonephrici ist mit steigendem Alter rückläufig, ebenso wie die im Ureter. Im Wolff-Gang ist ein schwankender Verlauf zu verzeichnen, welcher die stärkste Farbintensität am fd 16 und fd 18 zeigt und die schwächste am fd 19.
Der Rezeptor c-Met zeigt keine Reaktion vor dem fd 18. An fd 18 jedoch auch insgesamt am stärksten in allen Strukturen. Während in dem Zytoplasma der Tubuli mesonephrici HGF-α eine stetige Zunahme der Farbintensität zeigt, reagiert c-Met in den Epithelzellkernen an fd 16 und fd 17 nicht, die höchste Reaktion ist am fd 18, während sie am fd 19 schwächer wird. Analog reagieren auch das Zytoplasma und die Epithelzellkerne des Wolff-Gangs. Die Intensität der immunhistochemischen Reaktion in der mesenchymalen Hülle des Wolff-Gang zeigt jedoch eine stetige Zunahme von HGF-α im Zytoplasma während c-Met in den Zellkernen nur am fd 18 reagiert. Auch im Ureter zeigt das Zytoplasma eine parallel zum Alter steigende Farbintensität der Immunhistochemischen Reaktion von HGF-α, während bei c-Met in den Epithelzellkernen am stärksten am fd 18 eine immunhistochemische Reaktion verzeichnet werden konnte. Das Zytoplasma des Müller-Gangs reagiert leicht auf den Antikörper von HGF-α während er gar nicht auf c-Met reagiert.
Schlussfolgerung: Die qualitative und semiquantitative Auswertungen führten zu folgenden Schlussfolgerungen:

1. Hier wurde erstmalig das Verteilungsmuster der Reaktion von Androgenrezeptor, Fibronektin, HGF-α und dessen Rezeptor c-Met im Mesonephros beschrieben.
2. Nicht nur der Wolff-Gang sondern auch die Tubuli mesonephrici unterliegen dem Androgen gesteuerten System. Bei den Tubuli mesonephrici zeigt sich jedoch wahrscheinlich eine frühere Ausdifferenzierung als bei den Strukturen des Wolff-Gangs.
3. Die Signale aus den Zellen des Mesenchyms scheinen sowohl nach den Befunden über den Androgen-Rezeptor, als auch in Bezug auf die HGF-α Reaktion wichtig für den Erhalt und die Differenzierung des Wolff-Gangs und der Tubuli mesonephrici zu sein.
4. Die Basalmembran ist nach der Reaktion von Fibronektin und HGF-α in erster Linie vermutlich ein wichtiger Baustein für die Neuentwicklung der Gangstrukturen.
5. Der Androgen-Rezeptor hingegen ist eher wichtig für die Ausdifferenzierung der Gangstrukturen, die das männliche Genital bilden, weniger für die Neubildung.
6. Der Ureter reagiert als sich entwickelnde Gangstruktur zwar auf Fibronektin und das HGF-α /c-Met System, entwickelt sich jedoch nach seiner Ausdifferenzierung wahrscheinlich am ehesten unabhängig vom Androgenrezeptor System. Dies steht in sinnvollem Zusammenhang mit seiner Funktion als Harnableitendes Organ und nicht als Teil des männlichen Genitaltraktes.

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
AR	Androgenrezeptor
BMZW	Basalmembran des Zölomepithels des Wolff-Gang
BMZM	Basalmembran des Zölomepithels des Müller-Gang
CO_2	Kohlenstoffdioxid
DAB	Diaminobenzidin
Fd	Fetaltag
FN	Fibronektin
H	Hülle
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
Häm	Hämalaun
HCL	Chlorwasserstoff
HGF	Hepatocyte growth factor
K	Kontrolle
NK	Negativkontrolle
PBS	Phosphate buffered saline
PJS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung
TBS	Trishydroxymethylaminomethan buffered saline
TVA	Tierversuchsanstalt, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung II
Inhaltsverzeichnis IV
1. Einleitung 1
1.1. Die embryonale Entwicklung des Geschlechts bei Säugetieren 1
1.2. Der Wolff-Gang und seine Entwicklung 2
1.3. Fragestellungen 6
1.3.1. Androgen-Rezeptor und die erste Fragestellung der Arbeit 6
1.3.1.1. Erste Fragestellung der Arbeit 8
1.3.2. Fibronektin und die zweite Fragestellung der Arbeit 8
1.3.2.1. Die zweite Fragestellung der Arbeit 10
1.3.3. HGF-α , sein Rezeptor c-Met und die dritte Fragestellung der Arbeit 10
1.3.3.2. Die dritte Fragestellung der Arbeit 13
2. Material und Methoden 14
2.1. Versuchstiere und Behandlung 14
2.1.1. Versuchstiere 14
2.1.2. Präparation 14
2.2. Histologische Aufarbeitung 15
2.2.1. Fixierung und Einbettung 15
2.2.2. Anfertigung der Serienschnitte 15
2.3. Histochemische Methoden 17
2.3.1. Perjodsäure-Schiff-Reaktion 17
2.4. Immunhistochemische Methoden 17
2.4.1. Einführung 17
2.4.2. Nachweis von Androgen-Rezeptor 18
2.4.3. Nachweis von Fibronektin 19
2.4.4. Nachweis von c-Met 20
2.4.5. Nachweis von HGF-α 21
2.5. Auswertung der Antikörper Reaktionen 22
2.6. Statistik 22
3. Ergebnisse 23
3.1. Androgen-Rezeptor 23

3.2. Fibronektin 42
3.3. HGF-α und C-Met 60
4. Diskussion 88
4.1. Androgen-Rezeptor 88
4.2. Fibronektin 91
4.3. HGF-α und c-Met 94
4.4. Schlussfolgerung 97
Literaturverzeichnis 99
Danksagung: .....

1. Einleitung

1.1. Die embryonale Entwicklung des Geschlechts bei Säugetieren

Die pränatale Entwicklung und Differenzierung des Geschlechts ist geprägt durch viele komplexe Prozesse. Das innere und äußere Genital ist bipotenziell angelegt (Muntau 2009). Es liegt entweder ein Chromosomensatz mit zwei X-Chromosomen vor, woraus sich ein weibliches Geschlecht entwickeln würde, oder ein Chromosomensatz mit einem X und einem Y-Chromosom. Obwohl das Geschlecht demnach genetisch bereits angelegt ist, kann man während der Frühentwicklung der Gonaden ein indifferentes Stadium beobachten (Christ et al. 1998). Die Anlagen für die Entstehung des Geschlechts sind also im Grundsatz identisch (Frojdman et al. 1989). Durch die Aktivierung der endokrinen Funktion des Körpers werden auf Grund des Genotyps die Gonaden differenziert (Wilson 1980). Der weibliche oder männliche Phänotyp entsteht.

Hierfür werden während der fetalen Entwicklung in der Urniere (Mesonephros) zwei paarige Strukturen angelegt: Zum einen entstehen die Wolff-Gänge für die Ausprägung der Nebenhodengänge und somit für die Entwicklung des männlichen Geschlechts (Moore et al. 2007; Joseph et al. 2009; Haider, 2010;), zum anderen die Müller-Gänge unter anderem für die Entwicklung des Uterus und somit für die Entwicklung des weiblichen Geschlechts (Moore et al. 2007; Haider, 2010). Die Müller-Gänge entstehen durch eine Invagination des Serosaepithels lateral des Wolff-Gangs (Christ et al. 1998). Für kurze Zeit werden beide Gänge von einer gemeinsamen Basalmembran umschlossen (Christ et al. 1998).

Während sich bei den Männchen durch den Einfluss des Anti-Müller-Hormons, welches von den Sertoli-Zellen produziert wird, der Müller-Gang fast vollständig zurück bildet, bleibt der Wolff-Gang bei den Weibchen vorhanden (Moore et al. 2007; Haider, 2010). Aus diesem entstehen sowohl Teile der Ureter-Anlage (Moore et al. 2007; Haider, 2010), als auch der Vagina (Bok und Drews 1983; siehe auch Abb. 1).

Die Differenzierung des Geschlechts, und im hier dargestellten Zusammenhang vor allem im männlichen Geschlecht, kann durch verschiedene Mechanismen gestört werden.

Hier wäre zum einen eine genetische Aberration zu nennen, die beispielsweise durch Geschlechtschromosomenmosaike oder Translokationen des Y-Chromosoms auf Autosomen oder auf das X-Chromosom entstehen kann. Ein Hermaphrodismus verus würde entstehen,

bei dem ein gleichzeitiges Vorhandensein von Ovar und Testes Gewebe unabhängig vom genetischen Geschlecht vorliegt (Muntau 2009). Auch während der Meiose kann eine Störung der Geschlechtsentwicklung entstehen. So zum Beispiel beim Klinefelter Syndrom, bei dem eine Non-Disjunktion des X-Chromosoms einen XXY Genotyp zur Folge hat (Nieschlag und Behre 1997). Zum anderen kann neben chromosomaler Aberrationen auch endokrines Fehlverhalten zu einer Fehldifferenzierung führen. Dabei kann unterschieden werden zwischen Störungen im Hypothalamus oder im Hoden selber (Nieschlag und Behre 1997). Unter anderem sind Androgene und somit auch der Androgen Rezeptor hierfür verantwortlich. So kann bei dem autosomal rezessiv vererbten Adrenogeniateln Syndrom eine phänotypische Virilisierung des weiblichen Genotyps entstehen oder eine Isosexualität beim männlichen Genotyp. Hierbei handelt es sich um einen Defekt eines Enzyms der Androgenentstehung, meist der 21-Hydroxylase (Haag et al. 2008; Herold 2012). Klinisch äußert sich das Syndrom beim männlichen Geschlecht durch einen Hypogonadismus und eine Pseudopubertas praecox, beim weiblichen Geschlecht durch einen Pseudohermaphrodismus femininus (Herold 2012).

Darüber hinaus kann bei weiblichen Embryos, bei denen eine pränatale Androgenisierung stattfindet, im erwachsenen Alter ein so genanntes polyzystisches Ovar entstehen (Connolly et al.2013).

Desweiteren kann auch der Androgenrezeptor defekt sein, so dass eine Androgenresistenz entsteht. Diese Störung wird X-chromosomal rezessiv vererbt und kann partiell oder komplett ausgeprägt sein (Muntau 2009). Die Androgenresistenz führt zur testikulären Feminisierung. Das äußere Genital ist bei der Geburt weiblich, jedoch endet die Vagina blind und Uterus und Tuben fehlen auf Grund des Anti-Müller-Hormons. Das innere Genital ist jedoch männlich. Die Hoden liegen oft inguinal, in den Labien oder in der Leiste. Auf Grund der Gefahr der malignen Entartung sollten diese entfernt werden und mit Hilfe einer Östrogentherapie ein weiblicher Habitus erhalten bleiben (Muntau 2009).

1.2. Der Wolff-Gang und seine Entwicklung

Das Urogenitalsystem entwickelt sich zum größten Teil aus dem intermediären Mesoderm (Moore et al. 2007). Hieraus entstehen in zeitlicher Abfolge zunächst Pronephros (Vorniere), am kaudalen Ende des Pronephros das Mesonephros (Urniere) und aus einem Teil der

Ureterknospe sowie aus dem metanephrogenen Blastem das Metanephros (Nachniere). Diese bilden dann ihre weiteren Bestandteile.

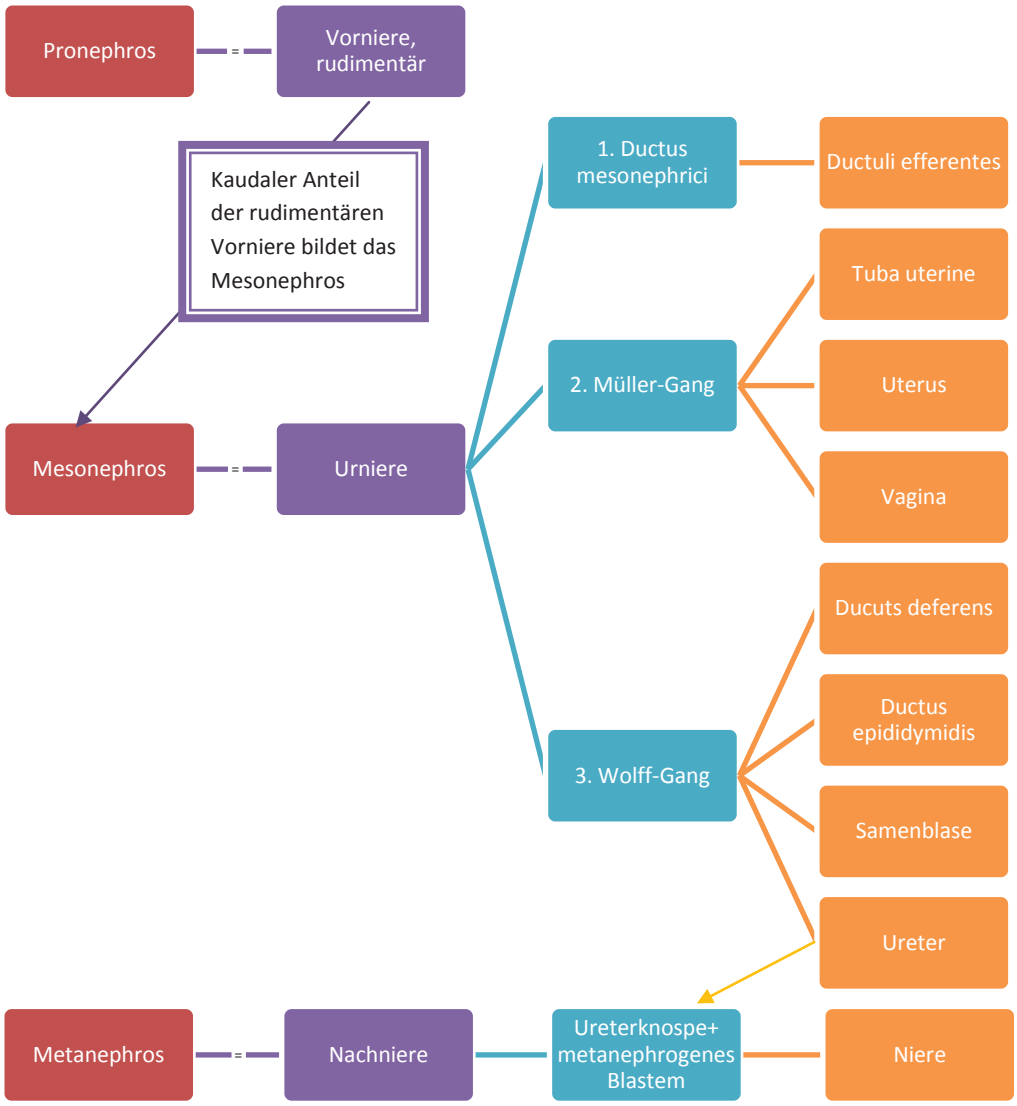


Abbildung 1
Übersicht über die Entwicklung des Urogenitalsystems. Während die Vorniere bis auf einen kaudalen Anteil, aus dem das Mesonephros entsteht, rudimentär wird, bilden Urniere und Nachniere die Strukturen des Urogenitalsystems.

Die genaue Entwicklung des Wolff-Gangs zeigt Abbildung 2. Der Wolff-Gang entwickelt sich aus dem Urnierengang. Dieser entsteht, wie der Rest des Urogenitalsystems, aus dem intermediären Mesoderm in kranio-kaudaler Abfolge (Hannema und Hughes 2007). Während der embryonalen Entwicklung bildet sich aus dem intermediären Mesoderm die Urogenitalleiste (Moore et al. 2007). Aus dem lateralen Teil der Urogenitalleiste gehen die

Harnorgane hervor, aus dem medialen Teil die Geschlechtsorgane (Moore et al. 2007). Während der Entwicklung entstehen drei Generationen von Nierenstrukturen, die durch einen einheitlichen Nierengang miteinander verbunden sind (Christ et al. 1998). Zunächst entwickelt sich die Vorniere mit dem Vornierengang (Ductus pronephricus), der sich nach kaudal auswächst und als Urnierengang (= Wolff-Gang) die Kloake erreicht (Moore et al. 2007). Der Wolff-Gang ist demnach aus dem intermediären Mesoderm des Halsabschnitts entstanden (Christ et al. 1998). Unmittelbar kaudal der sich zurückbildenden Vorniere entsteht die Urniere (siehe Abb. 1).
Diese bildet sich ebenfalls zurück, erhält jedoch ihren kranialen Anteil, der später die Ductuli mesonephrici ausbildet, welche sich zu den Ductuli efferentes des Nebenhodens entwickeln (Hannema und Hughes 2007) (siehe Abb. 2).

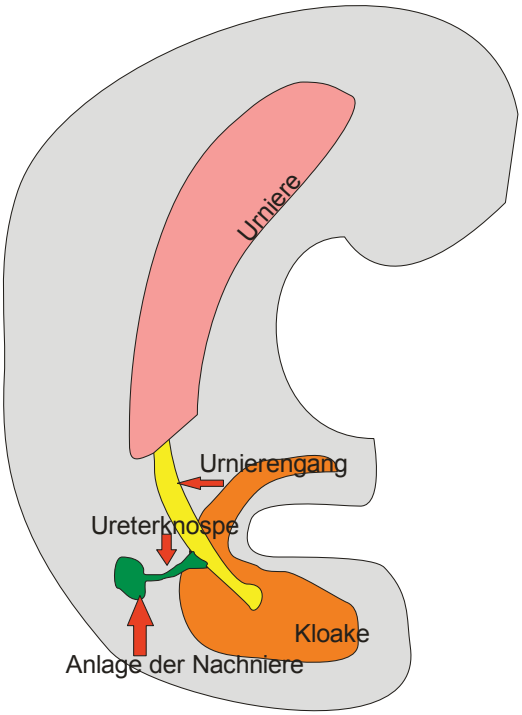


Abbildung 2
Schematische Darstellung der Entstehung des Urogenitaltraktes. Aus dem intermediären Mesoderm des Halsabschnitts wächst aus der Vorniere die Urniere (Mesonephros) in kraniokaudaler Richtung zur Kloake. Aus der Urniere wächst der Urnierengang oder auch Wolff-Gang genannt. Hieraus wachsen sich die Ureterknospe und die Nebenhodengänge aus. (modifiziert nach Moore et al. 2007)

Unter dem Einfluss von Testosteron wächst sich der Urnierengang, oder auch Wolff-Gang in proximaler Richtung aus und bildet den Nebenhodengang (Moore et al. 2007).

Aus dem sich auswachsenden Wolff-Gang entsteht der Ductus deferens, der Ductus epididymidis, die Samenblase und der Ureter (siehe Abb. 1) (Haider, 2010). Die Ductuli efferentes entstehen aus den Urnierentubuli, deren Ursprung der sich sonst zurückbildende Vornierengang ist (Abb.3) (Hannema und Hughes, 2007).

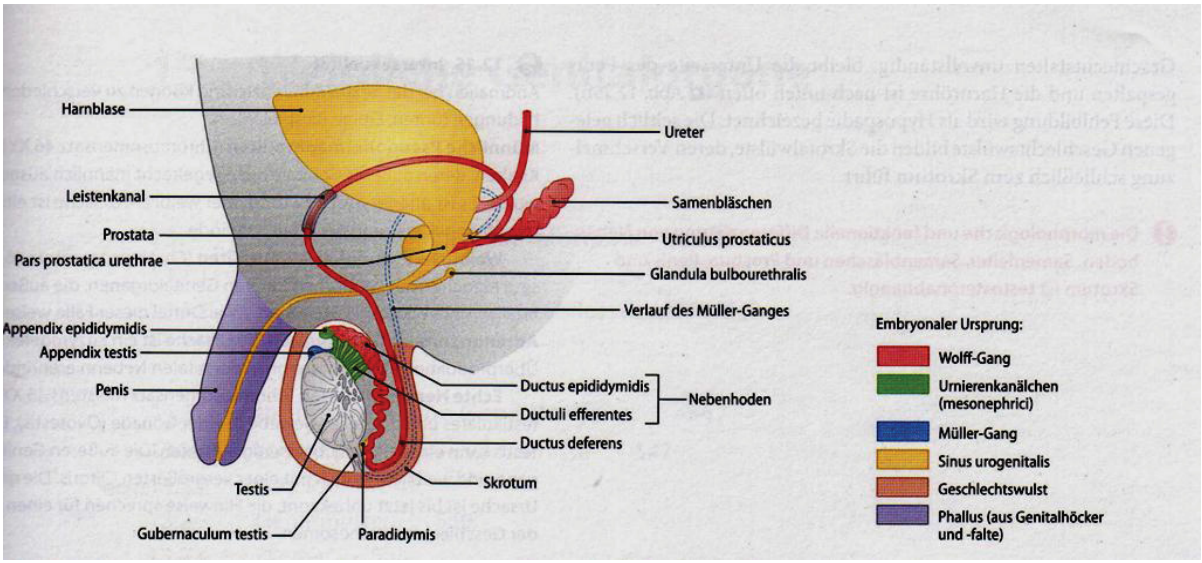


Abbildung 3
Entwicklung des männlichen Geschlechts nach der Geburt. Hier können im adulten Zustand die Strukturen ihrem Ursprung zugeordnet werden.
Aus dem Wolff-Gang im Mesonephros entsteht der Ductus deferens, der Ductus epididymidis, der Ureter und die Samenblase. Die Ductuli efferentes im Nebenhoden entstehen aus den Urnierenkanälchen (Tubuli mesonephrici). Selten bleibt der Müller-Gang als Appendix testis vorhanden. (entnommen aus Haider, 2010)

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit besteht darin morphologisch und immunhistochemisch die Entwicklung des Mesonephros in männlichen fetalen Ratten vom Fetaltag (fd) 16 bis fd 19 zu beschreiben. Dieses Zeitfenster umfasst folgende morphologischen Vorgänge: den Abbau des Müller-Gangs und den Aufbau des Wolff-Gangs sowie die Veränderungen in den Tubuli mesonephrici. Hierbei wurden die zellulären Veränderungen anhand des Androgen-Rezeptors, die Veränderungen der extrazellulären Matrix mit Hilfe von Fibronektin und die Signalveränderungen durch den Wachstumsfaktor HGF-α und seinen Rezeptor c-Met beschrieben.

1.3. Fragestellungen

1.3.1. Androgen-Rezeptor und die erste Fragestellung der Arbeit

Im Folgenden werden Aufbau und Funktion des Androgenrezeptors kurz erläutert. Androgene sind Steroidhormone, die bei beiden Geschlechtern in der Nebennierenrinde sowie in den Gonaden synthetisiert werden (Rassow et al. 2006). Beim männlichen Geschlecht werden die Androgene durch Stimulation mit LH (luteinisierendes Hormon) in den Leydig-Zellen synthetisiert (Haider 2007a). LH wird im Hypophysen-Vorderlappen produziert. Verschiedene angeborene oder erworbene Störungen können die Ausschüttung des LH´s stören und zu einer fehlenden Ausbildung des männlichen Geschlechts oder zu einer Infertilität führen. Hierzu gehören beispielsweise Tumore, Adenome, das Kallmann Syndrom, eine genetische Fehlbildung mit GnRH Mangel, oder das Pasqualini Syndrom, ein isolierter LH-Mangel, (Nieschlag und Behre, 1997).
Bei beiden Geschlechtern sorgen die Androgene gemeinsam mit Östrogenen für das Knochenwachstum. Beim männlichen Geschlecht sind sie zusätzlich für die Entwicklung der Geschlechtsorgane zuständig. Bei den Androgenen des Hodens sind die wichtigsten Testosteron und Dihydrotestosteron (Rassow et al. 2006).
Verschiedene Defekte in der Testosteronbiosynthese können klinische Auswirkungen zeigen. So zum Beispiel der 5α-Reduktase-Defekt. Hierbei handelt es sich um einen autosomal-rezessiv vererbten Defekt in der Metabolisierung von Testosteron zu Dihydrotestosteron, der somit zu einer Störung der Maskulinisierung führt (Muntau 2009). Zunächst besteht hierbei ein weibliches äußeres Geschlecht. Während der Pubertät kann durch verstärkte Testosteron Ausschüttung eine Maskulinisierung entstehen. Bei diesem Syndrom kann eine Fertilität vorhanden sein (Muntau 2009).
Der Androgen-Rezeptor bindet sowohl Testosteron als auch Dihydrotestosteron und gehört zur Gruppe der Ligand-aktivierten Steroid Hormon Rezeptoren (siehe Datenblatt) (Rassow et al. 2006). Als Steroidrezeptor zeigt er eine nukleäre Reaktion (Majdic et al. 1995) in den Epithelzellen, sowie in den mesenchymalen Myofibroblasten.

Der Androgen-Rezeptor ist essentiell für die Androgen-Funktion und somit für die Differenzierung des männlichen inneren und äußeren Genitals (Barbaro et al. 2007). Er ist in zwei Formen vorhanden: der verkürzte Androgen-Rezeptor-A und der längere Androgen-Rezeptor-B (Barbaro et al. 2007). Es ist jedoch nur die AR-B Form in der Lage, die Entwicklung des männlichen Genitals in Feten zu fördern (Barbaro et al. 2007).

Die Expression des Androgen Rezeptors wird durch die Androgene reguliert (Hannema SE und Hughes IA 2007).

Die Sekretion des Testosterons beginnt bei den männlichen fetalen Ratten am fd 15,5 und erreicht einen Höchstwert am fd 19,5 (Warren et al. 1972; Majdic et al. 1995). Wichtig für die spätere Differenzierung des Wolff-Gangs ist die Anwesenheit von Androgenen besonders im Zeitfenster des fd 15,5-17,5 (Welsh et al. 2007). Dies ist auch der Zeitpunkt, an dem der Wolff-Gang sich im männlichen Mesonephros stabilisiert (Welsh et al. 2007; Welsh et al. 2009). In weiblichen fetalen Ratten ist der Wolff-Gang am fd 18,5 vollständig zurück gebildet (Welsh et al. 2009). Der Androgen Rezeptor wird in den Zellen der embryonalen Ratte zum ersten Mal am fd 16,5 exprimiert (Majdic et al. 1995). Darum beginnen die in dieser Arbeit dargelegten Versuche mit fetalen Ratten ab dem fd 16.
Zu diesem Zeitpunkt konnte er in den mesenchymalen Zellen um den Wolff-Gang herum nachgewiesen werden, nicht jedoch um den Müller-Gang herum (Majdic et al. 1995).
Der Androgen Rezeptor wird zunächst in den mesenchymalen Zellen exprimiert und erst anschließend in den epithelialen Zellen des Mesonephros (Hannema und Hughes, 2007). Dies lässt vermuten, dass die Androgene ihre Effekte über Signale im Mesenchym ausführen (Hannema, und Hughes, 2007), die mit dem Epithel interagieren (Archambeault et al. 2009). Diese Erkenntnis erklärt die unterschiedliche Entwicklung des Wolff-Gangs in den Ductus deferens, die Ductuli epedidymidi, die Samenblase und den Ureter, trotz des Wolff-Gangs als gleiches Grundgerüst. Es konnte gezeigt werden, dass das Epithel sowohl vom Ureter als auch vom oberen Teil des Wolff-Gangs Charaktereigenschaften der Samenblase annahmen, wenn sie eine Verbindung mit deren Mesenchym aufnehmen (Cunha et al. 1991; Higgins et al. 1989).
Bei einer Mutation des Androgen Rezeptors ist es möglich, dass sich ein weibliches Genital ausbildet (Quigley et al. 1995), ebenso verhält es sich bei einer Resistenz (Muntau 2009). Er ist demnach ein wichtiger Bestandteil der Entwicklung des männlichen Geschlechts.
Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Testosteron, und somit auch sein Rezeptor, vor allem für die Ausdehnung und Differenzierung des Wolff-Gangs zuständig ist, weniger für die Stabilisation (Welsh et al. 2006).
Es konnte gezeigt werden, dass der Androgen-Rezeptor essentiell für die postnatale Entwicklung und Funktion des Nebenhodens ist und dass eine Störung dieses Signals eine obstruktive Azoospermie zur Folge haben kann (O'Hara et al. 2011).

1.3.1.1. Erste Fragestellung der Arbeit

Beobachtungen des Androgen-Rezeptors sind bisher vor allem am Hoden vorgenommen worden weniger jedoch im fetalen Mesonephros. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Expression des Androgen-Rezeptors in den Strukturen des Mesonephros zwischen fd16 und fd19. Die Befunde sollen die Frage klären welchen Einfluss Androgene auf die Entwicklung der Strukturen des Mesonephros ausüben.

1.3.2. Fibronektin und die zweite Fragestellung der Arbeit

Zunächst wird hier auf den Aufbau und die Funktion des Fibronektin eingegangen. Fibronektin ist ein dimeres Glykoprotein der extrazellulären Matrix (Lüllmann-Rauch 2009), dass über Disulfidbrücken verbunden ist (Kadler et al. 2008). Es ist zusammengesetzt aus zwei Monomeren, die jeweils aus mehreren Domänen bestehen (siehe Abb. 4) (Rassow et al. 2006).

Es gibt zwei Formen des Fibronektin: das lösliche und das unlösliche Fibronektin. Das unlösliche Fibronektin wird unter anderem von Fibroblasten, Retikulumzellen, Makrophagen und Endothelzellen gebildet (Lüllmann-Rauch 2009). Das lösliche Fibronektin wird in der Leber gebildet (Lüllmann-Rauch 2009).

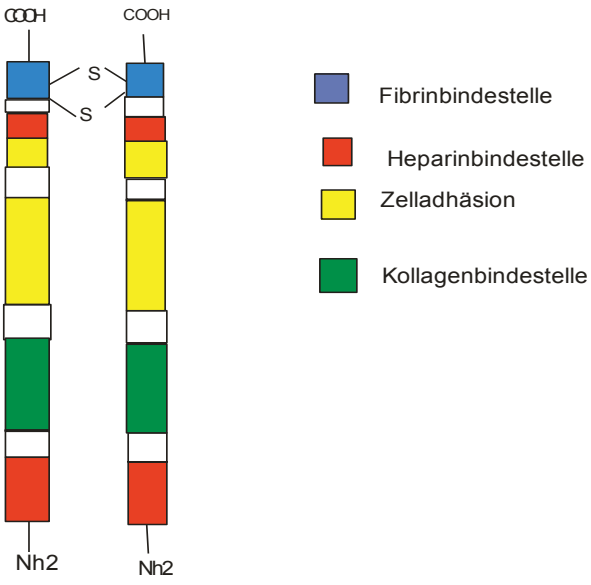


Abbildung 4
Die beiden Fibrinogen-Monomere sind über Disulfidbrücken am C-Terminus miteinander verbunden. Die beiden Monomere bestehen jeweils aus verschiedenen Domänen, die unterschiedliche Funktionen erfüllen. (modifiziert nach Rassow et al. 2006)

Fibronektin fungiert als universales Adhäsionsmolekül, dient der Organisation von Mikrofilamenten (Inoue et al. 1989), unterstützt das Zytoskelett (Pearlstein et al. 1980) und hilft während der Embryogenese bei der Wegfindung der Zellen (Rassow et al. 2006). Desweiteren unterstützt seine im Blut gelöste Form die Blutgerinnung (Rassow et al. 2006). Als Adhäsionsmolekül bindet es Zellen an Kollagen oder Proteoglykane (Rassow et al. 2006) und integriert die Zellen in die extrazelluläre Matrix. Dies geschieht, indem Fibronektin die Zellen mit verschiedenen Integrinen und membranständigen Proteoglykanen über seine Bindungsdomänen (siehe Abb 4) mit den Bestandteilen der extrazellulären Matrix verknüpft. Somit vermittelt es zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix (Lüllmann-Rauch 2009).
Die Fibronektin produzierenden Zellen liegen in der Nähe der zu verbindenden Strukturen und stoßen es in Form von Fasern aus (Pearlstein et al. 1980). In vielen Studien konnte es in der Basalmembran nachgewiesen werden (Pearlstein et al. 1980; Francavilla et al. 1983; Hedman et al. 1978), lokalisiert in der Lamina fibroreticularis (Lüllmann-Rauch 2009), in der Lamina densa (Laurie et al. 1982) und beispielsweise am Glomerulum der Niere auch in der Lamina rara interna und externa (Courtoy et al. 1980; Laurie et al. 1982). In embryonalen Basalmembranen konnte es bislang stets nachgewiesen werden (Brownell et al. 1981), so dass es zum Teil sogar als Marker für die Entstehung und Formation der Basalmembran gefunden wurde (Nagano et al. 1997). Andere Studien konnten Fibronektin nicht in der Basalmembran nachweisen (Madri et al. 1980). Es wurde diskutiert, ob es an der Gewebeart und der Altersstufe liegt in welchem Teil der Basalmembran es sich befindet oder ob es überhaupt zu finden ist (Laurie et al. 1982; Madri et al. 1980).
Neben der Funktion als Adhäsionsmolekül spielt es eine Rolle in der Organisation von Mikrofilamenten. Hierbei bildet es eine Verbindung zwischen parallel gelegenen Mikrofibrillen über seine spezifischen Bindungsdomänen (Inoue et al. 1989); (siehe Abb.4). Außerdem bindet es an Kollagen und kann somit eine Brücke zwischen Integrinen und Kollagen schaffen, die die Zellen der extrazellulären Matrix miteinander verankert (Rassow et al. 2006). Eine weitere Rolle des Fibronektin ist in der Embryonalentwicklung die Wegfindung der Zellen bei der Zellwanderung (Rassow et al. 2006).
Fibronketin hilft unterstützend im Zytoskelett in Bereichen, die starke Spannung aufweisen, konnte jedoch nicht in geschädigten Bereichen gefunden werden (Pearlstein et al. 1980). Es wird angenommen, dass Fibronektin auch eine unterstützende Funktion in der Entwicklung von Organen hat sowie in der Morphogenese im Allgemeinen (Pearlstein et al. 1980).
Es konnte gezeigt werden, dass im frühen embryonalen Nierengewebe Fibronektin vor allem in undifferenzierten mesenchymalen Zellen zu finden ist, nicht jedoch in ausdifferenzierten

Epithelzellen (Pearlstein et al. 1980). Postnatal konnte Fibronektin zwar noch in den Gangstrukturen der neugeborenen Ratten nachgewiesen werden, nahm dann jedoch ab, je älter das Tier wurde (Francavilla et al. 1987).
Bei der Rückbildung des Müller-Gangs konnte eine Abnahme des Fibronektins gekoppelt mit der Ablösung der Basalmembran nachgewiesen werden, welche somit eine Veränderung in der Stabilität des Epithels und der mesenchymalen Zellen hervorruft (Ikawa et al. 1984). Es folgt darauf die Kondensation der mesenchymalen Zellen und die Aufspaltung der Epithelzellen, was charakteristisch für die Rückbildung des Müller-Gangs ist (Ikawa et al. 1984).
Desweiteren gibt es das lösliche Fibronektin, welches im Blut gelöst vorliegt. Dort unterstützt es die Blutgerinnung (Rassow et al. 2006). Dies geschieht indem es die Bindung von Thrombozyten und Fibroblasten an Fibrin vermittelt (Rassow et al. 2006); Abb. 4).

1.3.2.1. Die zweite Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, Fibronektin mittels eines spezifischen Antikörpers im Mesonephros nachzuweisen und sein Vorkommen in undifferenziertem Gewebe und seine Lokalisation in der Basalmembran zu beschreiben. Das Verhalten von Fibronektin bei der Rückbildung des Müller-Gangs wird in der vorliegenden Arbeit in Zusammenhang mit der Stabilisierung des Wolff-Gangs untersucht.

1.3.3. HGF-α , sein Rezeptor c-Met und die dritte Fragestellung der Arbeit

HGF-α (= hepatocyte growth factor) ist ein multifunktionales Zytokin, das die Zell-Proliferation, die Motilität und die Differenzierung vieler verschiedener Zelltypen beeinflusst (Catizone et al. 2006; Somerset et al. 1997; Weidner et al. 1993). Er hat sowohl parakrine als auch endokrine Funktionen und ist ubiquitär im Körper vorhanden (Somerset et al. 1997).
HGF konnte zum einen in vielen sich entwickelnden Organen nachgewiesen werden, so auch als morphogenetischer Faktor im Mesonephros (Sonnenberg et al. 1993; Karp et al. 1994). Zum andern konnte er aber auch in adulten Zellen, den so genannten MDCK (Madin-Darby-Canine-Kidney) Epithel Zellen nachgewiesen werden (Defrances et al. 1992; Williams und Clark 2003).
HGF wird von mesenchymalen Myoidzellen sezerniert (Catizone et al. 1999) und konnte in der Nähe von Epithelzellen gefunden werden, die den Rezeptor c-Met exprimieren (Zachow

und Uzumcu 2007; Sonnenberg et al. 1993; Weidner et al. 1993). Dieser konnte als sein Rezeptor definiert werden (Naldini et al. 1991; Defrances et al. 1992).

C-Met ist ein Rezeptor der Tyrosin-Kinase-Familie (Zachow und Uzumcu 2007; Ricci et al. 2002) und in seiner Funktion ein Teil der interzellulären Kommunikation (Catizone et al. 1999). Er kontrolliert Zellwachstum, Differenzierung und die embryonale Morphogenese (Catizone et al. 1999). Der Rezeptor c-Met wird durch ein MET Protoonkogen kodiert (Del et al. 2007; Latimer und Jessen, JR 2008). Er ist in zwei unterschiedlichen, am C-Terminalen Ende verkürzten Formen vorhanden (Prat et al. 1991). C-Met besteht aus einer alpha (50 Kilo Dalton) und einer beta Untereinheit (145 Kilo Dalton), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Somerset et al. 1997; Weidner et al. 1993) (siehe Abb. 5). HGF bindet an c-Met, was eine Dimerisierung und Autophosphorylierung (Latimer und Jessen, JR 2008) zur Folge hat und den Rezeptor somit aktiviert (Somerset et al. 1997).

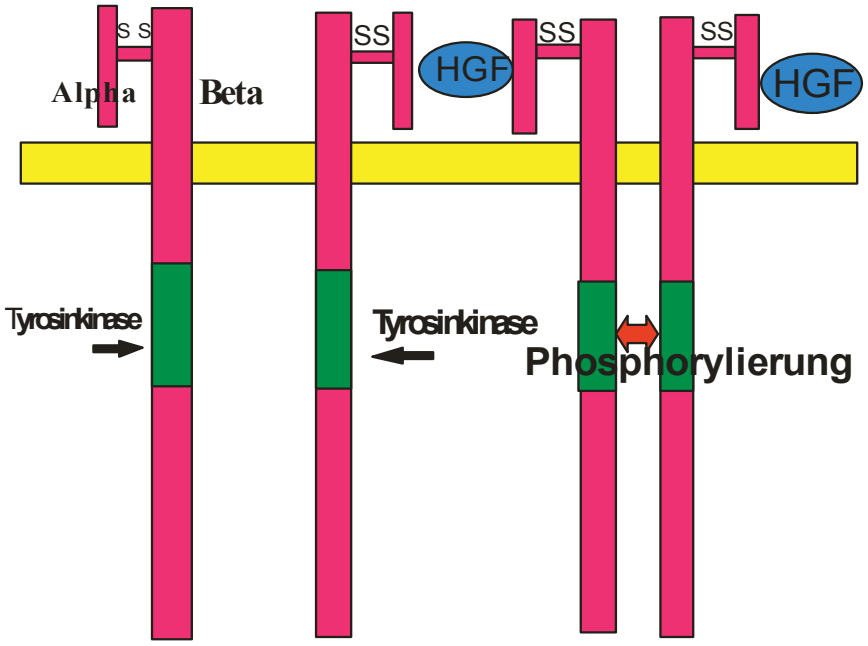


Abbildung 5
c-Met ist ein membranständiger Rezeptor. Er ist ein Dimer, bestehend aus einer alpha und eine beta Untereinheit, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es hat eine Tyrosinkinase Domäne, die durch Bindung des HGF-α phosphoryliert und die beiden c-Met Anteile dimerisiert. Dies aktiviert den Rezeptor. (modifiziert nach J.P. Herveg, Journal of Biol. Chem., Vol. 278, Issue 31, 28921-28929, 2003)

Die Entdeckung von HGF und die Zuordnung von C-Met als seinen Rezeptor hatten einige Studien zur Folge und das hepatocyte-growth-factor-system wurde definiert (Zachow und

Uzumcu 2007). Es beinhaltet HGF selber, seinen Rezeptor c-Met, sowie sein aktivierendes (HGFA) und inhibierendes (HAI) Protein (Zachow und Uzumcu 2007).
In der fetalen Entwicklung hat HGF die Aufgabe die Morphogenese des Embryos zu regulieren (Sonnenberg et al. 1993). Im Mesonephros wurde HGF mit seinem Rezeptor zum einen im Bereich der Niere und im Ureter beobachtet (Sonnenberg et al. 1993). Hier spielt es eine wichtige Rolle in der Ausbildung und Differenzierung der Organe. So konnte bei der Verwendung von Anti-HGF Antikörpern beobachtet werden, dass die Differenzierung der Mesenchymzellen des Mesonephros in Epithelzellen der Nephrone ausblieb (Woolf et al. 1995).
Desweiteren konnte er als Faktor ermittelt werden, der die Koordination der Einwanderung von Mesenchymzellen in die sich entwickelte männliche Gonade vorantreibt (Ricci et al. 2002). Dies beeinflusst die Bildung der prä-Sertolizellen und hilft somit der Ausdifferenzierung des männlichen Geschlechts (Ricci et al. 2002). Er wurde demnach als Faktor definiert, der die Hodenentwicklung während der Embryonalphase essentiell beeinflusst (Ricci et al. 2002).
In der adulten Ratte unterstützt HGF die Regulation von tight-junctions zwischen den Sertoli-Zellen und hilft so die Blut-Hoden-Schranke aufrecht zu erhalten (Catizone et al. 2008).
Im Hoden wird HGF in interstitiellen Zellen exprimiert (Ricci et al. 2006), nicht jedoch in Leydig Zellen (Ricci et al. 2006).
C-Met ist unter Anderem ein Produkt der Geschlechtszellen (Catizone et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass HGF postnatal über den anwesenden Rezeptor c-Met die Duplikation und Apoptose der Geschlechtszellen beeinflusst (Catizone et al. 2006). HGF und c-Met beeinflussen also die Spermatogenese.
Das Expressionsmuster des Rezeptors c-Met außerhalb der Geschlechtszellen verändert sich entwicklungsabhängig (Ricci et al. 2006). In der frühen Phase der Morphogenese wird er vor allem in den Zellen des Hodens exprimiert, während er in den letzten Tagen der pränatalen Entwicklung fast ausschließlich in den Leydig-Zellen zu finden ist (Ricci et al. 2006). Diese produzieren Testosteron (Haider 2007) und sind ein Reaktionsort für HGF (Ricci et al. 2006). Es konnte nachgewiesen werden, dass HGF die Apoptose von Leydig-Zellen verhindert (Del et al. 2007). Dies bedeutet, dass HGF die Testosteron Produktion fördert und auch auf diesem Weg die Spermatogenese positiv beeinflusst (Del et al. 2007).
Die Expression von HGF ist für männliche Embryonen spezifisch (Ricci et al. 2002). Bei weiblichen Embryonen konnte HGF nicht nachgewiesen werden, so dass es keine Rolle in der Entstehung der Ovarien zu spielen scheint (Ricci et al. 2002). In männlichen Mausembryonen

konnte man den Beginn der Expression von HGF im Mesonephros und Zölomepithel des undifferenzierten Urogenitalwulstes bereits am fd 11,5 nachweisen (Ricci et al. 2002). C-Met konnte in fetalen Mäusen ab dem fd 12,5 nachgewiesen werden (Ricci et al. 2002). In der fetalen Ratte konnten HGF und c-Met in der Leber ab dem fd 14 nachgewiesen werden (Defrances et al. 1992).
Desweiteren hat das HGF/c-Met System Einfluss auf die Morphogenese verschiedener Epithelzellen und die Rekonstruktion von extrazellulärer Matrix (Brinkmann et al. 1995). Heute gelangte der HGF/c-Met Signalweg als bedeutende Rolle in der Angiogenese und dem Tumor Wachstum ins Rampenlicht (You und McDonald 2008; Nakamura und Mizuno 2010). Der c-Met Rezeptor wurde als ein aktives Onkogen entdeckt (Furge et al. 2000). Bei einer abnormen Aktivität des Rezeptors c-Met kann Wachstum, Invasion und Metastasierung von vielen Tumoren die Folge sein (Tolbert et al. 2010; Furge et al. 2000). Es ist möglich, durch seine Inhibition den Wachstum von Tumoren und die Ausbildung von Metastasen zu verhindern (You und McDonald 2008). Ein solches Medikament könnte eine wichtige Rolle in der Tumortherapie spielen (Yap und de 2010). Es kann zukünftig eine wichtige Brücke zwischen der Biologie und der klinischen Medizin bilden (Nakamura und Mizuno 2010).

1.3.3.2. Die dritte Fragestellung der Arbeit

Die bisherigen Studien über c-Met und HGF bezogen sich auf verschiedene Organogenesen und speziell auch auf ihre Rolle im Hoden. Es wurden auch Untersuchungen des Mesonephros durchgeführt, die sich jedoch hauptsächlich auf die Entstehung des Ureters und der Niere bezogen. Die vorliegende Arbeit untersucht, wie sich die Tubuli mesonephrici, der Wolff-Gang und seine entstehenden Strukturen mit dem HGF/c-Met Komplex zeitlich und morphologisch verhalten. Es wird auch geprüft, ob diese Studie Hinweise auf den Einfluss dieser beiden Substanzen auf die Morphogenese des Mesonephros liefert.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere und Behandlung

2.1.1. Versuchstiere

Die Versuchstiere, Wistar-Ratten, wurden aus der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen **(TVA-Projekt-Nummer 0/21/1988, Professor Haider, Anatomie II; Zweck: Organentnahme)**. Ihre Aufzucht erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einer spezifiziert pathogen freien Zone bei Temperaturen von durchschnittlich 22° Celsius und Beleuchtung von 6.00 bis 18.00 Uhr. Wasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung.
Die Tiere wurden gegen 15:00 Uhr zur Paarung zusammen gesetzt. Dieser Tag wird als Fetaltag 0 bezeichnet. Der erste Tag nach Paarung wird als fd 1 bezeichnet.
Untersucht wurden fetale Tiere in den Altersstufen fd 16, fd 17, fd 18 und fd 19. Hierfür wurden Rattenweibchen, die in den entsprechenden Altersstufen trächtig waren, getötet und die Feten heraus präpariert. Pro Altersstufe wurden mindestens fünf männliche Feten verwendet.

2.1.2. Präparation

Die Tiere wurden von einer fachkundigen Person des Instituts für Anatomie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, getötet und die Organe wurden ebenfalls von dieser Person entnommen. Die Doktorandin dieser Arbeit erhielt diese Organe für die weitere Bearbeitung.
Die Ratten wurden durch CO2-Asphyxie getötet, danach in Rückenlage fixiert und eine Inzision von Fell und Haut median vom Xyphoid bis zur Symphyse durchgeführt. Haut und Muskeln wurden getrennt und die Haut lateral fixiert. Im Anschluss wurde die Bauchdecke eröffnet, so dass der Uterus zugänglich war. Der bicorne Uterus wurde in toto in ein Gefäß mit physiologischer Kochsalzlösung gegeben, eröffnet und die Feten wurden heraus präpariert. Bei den Feten erfolgte eine Halbierung unterhalb des Xyphoids, und die untere

Körperhälfte wurde in frisch angesetzte Bouin´sche Lösung (Mulisch und Welsch 2009) zum Fixieren gegeben. Die Präparation fand stets morgens zwischen 10:00 und 12:00 Uhr statt.

2.2. Histologische Aufarbeitung

2.2.1. Fixierung und Einbettung

Die Präparate wurden zunächst 24 Stunden bei Raumtemperatur in der Bouin´schen Lösung fixiert, wobei die Bouin´sche Lösung zweimal gewechselt wurde (nach jeweils vier Stunden). Die Entwässerung wurde über eine aufsteigende Alkoholreihe (Isopropylalkohol 70%, 80%, 90%, 100%) durchgeführt, sowie Methylbenzoat und Toluol. Danach erfolgte eine Durchtränkung der Gewebsstücke mit mehreren Chargen Paraffin (Schmelzpunkt 57°C-60°C). Nach 24 Stunden wurden die Proben in Silikonwännchen mit frischem Paraffin eingebettet.

2.2.2. Anfertigung der Serienschnitte

Nach dem Auskühlen der Paraffinblöcke wurden von jedem Tier Serienschnitte in 5µm Dicke am Schlittenmikrotom angefertigt. Von allen Tieren fd 16-fd 19 wurden im Abstand von mindestens 35µm je zwei Schnitte für die Immunhistochemie verwendet. Durch diesen Abstand von 35µm wurde sichergestellt, dass nicht eine und dieselbe Zelle zweimal angeschnitten wurde. Somit standen 3-4 verschiedene Schnitte für die Auswertung zur Verfügung.

Nach der mikroskopischen Untersuchung der Schnitte aller Tiere standen insgesamt für den

Fd 16: 4 männliche Feten

Fd 17: 7 männliche Feten

Fd 18: 5 männliche Feten

Fd 19: 6 männliche Feten

zur Verfügung (insgesamt 22 männliche Feten).

Die Zuteilung der Schnitte zu den folgenden Immunhistochemischen Reaktionen erfolgte folgendermaßen:

Fetaltag (Fd)16 (insgesamt 20 Serienschnitte pro Tier):

1) Negativ Kontrolle (NK)+Häm	11) AR+Häm
2)	12)
3) Androgenrezeptor(AR)+Häm	13) HGF+Häm
4)	14)
5) HGF+Häm	15) c-Met+Häm
6)	16)
7) c-Met+Häm	17) FN+Häm
8)	18)
9) Fibronektin (FN)+Häm	19)
10)	20) PJS

Fd 17/18/19 (insgesamt 40 Serienschnitte pro Tier):

1) NK AR+Häm	11) AR	21) FN+Häm	31) c-Met+Häm
2) NK FN+Häm	12)	22)	32) HGF+Häm
3) NK HGF+Häm	13)	23) AR	33) HGF +Häm
4) NK c-Met+Häm	14)	24) AR+Häm	34)
5)	15) c-Met+Häm	25)	35) FN+Häm
6)	16) c-Met+Häm	26)	36) FN+Häm
7)	17) HGF+Häm	27)	37)
8) AR	18) HGF+Häm	28)	38)
9) AR+Häm	19)	29)	39) PJS
10)	20) FN+Häm	30) c-Met+Häm	40) PJS

2.3. Histochemische Methoden

2.3.1. Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Pro Tier wurden 2 Schnitte der Perjodsäure-Schiff-Reaktion unterzogen. Nach dem Entparaffinieren durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte in aqua bidest. verbracht, danach für 5 Minuten in 0,5% Perjodsäure, mit aqua bidest sorgfältig gespült und dann für 20 Minuten in Schiff' Reagenz gestellt. Während dieser Reaktionszeit wurde folgende Lösung frisch angesetzt, in der die Schnitte ohne Abspülen für 2 Minuten verblieben:

6ml 10% Kaliumdisulfit

5ml 1M HCL

mit Leitungswasser auffüllen auf 100ml

Danach wurden die Schnitte 10 Minuten lang mit fließendem Leitungswasser gewässert und im Anschluss für fünf Minuten mit Hämalaun zur Darstellung der Zellkerne gefärbt. Die Schnitte wurden dann über die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert und mit DePeX® eingedeckt.

2.4. Immunhistochemische Methoden

2.4.1. Einführung

Alle Schnitte wurden über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und 2x mit aqua bidest.gespült. Daraufhin wurden die farblosen Schnitte mit einem Spezialstift umkreist (Fa. Dako, Hamburg) um ein Auslaufen der Inkubationsflüssigkeiten zu vermeiden. Im Anschluss wurden sie je nach Antikörper wie unten beschrieben behandelt.

<u>Negativkontrolle:</u>

In jedem Versuchsansatz wurde mindestens eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der der Primärantikörper durch Puffer ersetzt wurde. Die weitere Behandlung erfolgte analog dem unten genannten Verfahren.

2.4.2. Nachweis von Androgen-Rezeptor

Der Antikörper Androgenrezeptor (AR (N-20): sc-816) wurde von der Firma Santa Cruz® Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, bezogen. Der Antikörper wird im Kaninchen hergestellt (Anti Human).

Vorgehensweise:

1. Die Schnitte wurden bei ca. 99°C für 20 min in einer auf ca. 99°C vorgeheizten 0,01 M Zitronensäure-Natriumzitrat Pufferlösung, pH 6.0 in den Dampfgarer gegeben. Danach wurden die Schnitte auf 20°C abgekühlt.
2. Sorgfältiges Spülen mit aqua bidest 2x.
3. 3% H_2O_2 zum Blockieren der endogenen Peroxidase für 10 min bei RT (Raumtemperatur)
4. Spülen in aqua bidest. 2x
5. Waschen in 0,05 M TBS-Puffer, pH 7,4 (TBS = Trishydroxymethylaminomethan buffered saline).
6. Blockieren unspezifischer Bindungen durch 10% Ziegenserum in 0,05 M TBS, pH 7,4 für 60 min bei RT
7. Inkubation mit **Primärantikörper AR, 1:1000** verdünnt mit TBS für 60 min bei RT
8. Waschen mit TBS-Puffer, 2x
9. Inkubation mit Sekundärantikörper Envision® Rabbit (Fa. Dako®) 30 min bei RT
10. Waschen mit TBS-Puffer, 2x
11. Inkubation mit Chromogen DAB (Diaminobenzidin) für 10 min bei RT
12. Spülen mit aqua bidest., 2x
13. Kernfärbung mit Hämalaun, aufsteigende Alkoholreihe (s.o.) Xylol, Eindecken mit DePeX®

2.4.3. Nachweis von Fibronektin

Der Antikörper Fibronektin (ab2413) wurde bezogen von der Firma abcam®, Cambridge, hergestellt im Kaninchen.

Vorgehensweise:

1. Die Schnitte wurden bei ca. 99°C für 20 min in einer Citratpufferlösung in den Dampfgarer gegeben. Daraufhin wurden sie auf 20° C abgekühlt.
2. Die Schnitte wurden zweimal sorgfältig mit aqua bidest gespült.
3. Nun wurden sie für 10 min bei RT (=Raumtemperatur) mit 3% H_2O_2 zum Blockieren der endogenen Peroxidase behandelt
4. Zweimaliges Waschen in aqua bidest für je 5 Minuten
5. Sorgfältiges Waschen in 0,1M PBS-Puffer (= phosphate bufferd saline) für 1000ml PBS-Puffer benötigt man folgende Substanzen: 18g NaCl; 13,6g KH_2PO_4; 17,8g Na_2HPO_4 x 2 H_2O_2. Hieraus werden zwei Lösungen hergestellt: Lösung **A**: 9g NaCl in 1000ml aqua bidest. lösen, 13,6g KH_2PO_4 hinzugeben und lösen. Lösung **B**: 9g NaCl in 100ml aqua bidest. lösen und 17,8g Na_2HPO_4 x 2 H_2O_2 hinzugeben und lösen. 200ml Lösung **A** + 800ml Lösung **B**; pH 7,4
6. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde mit 10% Ziegenserum in PBS für 60 Minuten bei RT inkubiert
7. **Primärantikörper Fibronektin, 1:1500** verdünnt mit PBS für 60 min bei RT inkubiert. Diese Verdünnung wurde nach mehreren Vorversuchen ermittelt.
8. Sorgfältiges Waschen mit PBS-Puffer
9. Sekundärantikörper En Vision® Rabbit (Fa. Dako®) 30 min bei RT
10. Sorgfältiges Waschen mit PBS
11. Chromogene Lösung DAB (Diaminobenzidin) gemischt mit aqua bidest wurde für 10 min bei RT inkubiert
12. Zweimaliges Spülen mit aqua dest
13. Kernfärbung mit Hämalaun, aufsteigende Alkoholreihe (s.o.) Xylol, Eindecken mit DePeX®

2.4.4. Nachweis von c-Met

Der Antikörper polyklonale c-Met (Met (C-28): sc-161) wurde bezogen von der Firma Santa Cruz®, Santa Cruz, Kalifornien, hergestellt im Kaninchen.

Vorgehensweise:

1. Die Schnitte wurden sie für 10 min bei RT (=Raumtemperatur) mit 3% H_2O_2 zum Blockieren der endogenen Peroxidase behandelt
2. Zweimaliges Spülen in aqua bidest.
3. Sorgfältiges Waschen in TBST-Puffer (=TRIS bufferd saline Tween), hergestellt wie TBS-Puffer, dem vor der pH-Einstellung 2ml Tween20 pro 2000ml TBS hinzugesetzt wurde.
4. 5% Ziegenserum in 0,5% TBST-Puffer als Blockierungsserum für 60 min bei RT
5. Sorgfältiges Waschen in TBST-Puffer,
6. **Primärantikörper Fibronektin, 1:1500** verdünnt mit TBST für 60 min bei RT inkubiert. Diese Verdünnung wurde nach mehreren Vorversuchen ermittelt.
7. Sorgfältiges Waschen mit TBST-Puffer
8. Mit Sekundärantikörper Dual Link (Fa. Dako®) 30 min bei RT inkubiert
9. Sorgfältiges Waschen mit TBST
10. Mit chromoger Lösung DAB (Diaminobenzidin) gemischt mit aqua bidest. für 10 min bei RT inkubiert.
11. Zweimaliges Spülen mit aqua bidest.
12. Kernfärbung mit Hämalaun, aufsteigende Alkoholreihe (s.o.) Xylol, Eindecken mit DePeX®

2.4.5. Nachweis von HGF-α

Der polyklonale Antikörper HGF-α (HGF-α (H-145): sc-7949) wurde bezogen von der Firma Santa Cruz®, Santa Cruz, Kalifornien, hergestellt im Kaninchen.

Vorgehensweise:

1. Die Schnitte wurden bei ca. 99°C für 20 min in einer Citratpufferlösung in den Dampfgarer gegeben. Daraufhin wurden sie auf 20° C abgekühlt.
2. Die Schnitte wurden zweimal sorgfältig mit aqua bidest gespült.
3. Nun wurden sie für 10 Minuten bei RT (=Raumtemperatur) mit 3% H_2O_2 zum Blockieren der endogenen Peroxidase behandelt
4. Zweimaliges Waschen in aqua bidest für je 5 min
5. Sorgfältiges Waschen in 0,1M PBS-Puffer (= phosphate bufferd saline(Rezept s.o.)
6. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde mit 10% Ziegenserum in PBS für 60 Minuten bei RT inkubiert
7. **Primärantikörper HGF-α 1:50** verdünnt mit PBS für 60 min bei RT inkubiert. Diese Verdünnung wurde nach mehreren Vorversuchen ermittelt.
8. Sorgfältiges Waschen mit PBS-Puffer
9. Sekundärantikörper Dual Link (Fa. Dako®) 30 min bei RT inkubiert.
10. Sorgfältiges Waschen mit PBS
11. Chromogene Lösung DAB (Diaminobenzidin) gemischt mit aqua bidest wurde für 10 min bei RT inkubiert
12. Zweimaliges Spülen mit aqua dest
13. Kernfärbung mit Hämalaun, aufsteigende Alkoholreihe (s.o.) Xylol, Eindecken mit DePeX®

2.5. Auswertung der Antikörper Reaktionen

Die Antikörper Reaktionen wurden qualitativ ausgewertet und in vier Kategorien unterteilt.

-	=	keine Immunreaktion
+	=	schwache Immunreaktion
++	=	mäßige Immunreaktion
+++	=	starke Immunreaktion

Anhanddessen wurde von drei unabhängigen Beobachtern ermittelt, welche Farbintensität die jeweilige Reaktion an den Strukturen ergab.

2.6. Statistik

Der ermittelten Farbintensität (-/+/++/+++) der Strukturen wurden Zahlen zugewiesen:

_	0
+	1
++	2
+++	3

Aus diesen Zahlen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Androgen-Rezeptor

Der Androgen-Rezeptor zeigt in den untersuchten Strukturen ausschließlich eine nukleäre Reaktion. Im Mesonephros kann man ihn in den Epithelzellkernen des Wolff-Ganges, in den Zellkernen der Myofibroblasten im Stroma des Wolff-Ganges, sowie in den Epithelzellkernen der Tubuli mesonephrici erkennen. In den Epithelzellen des Müller-Ganges ist kaum eine Reaktion feststellbar. Die Farbintensität variiert innerhalb der Altersstufen Fetaltag (fd) 16-19.

3.1.1. Die Reaktion des Androgen-Rezeptors in den Zellen im Mesonephros am *fd 16*

***Tabelle 1*:**
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion des Androgen-Rezeptors im Mesonephros am fd 16

	Schnitte (n) Gesamt	Reaktion Vorhanden (n)	Mittelwert	SA
Tubuli mesonephrici Epithelzellkerne	8	8	1,25	0,71
Wolff-Gang Epithelzellkerne	8	8	1	0
Wolff-Gang Stroma/Myofibroblasten	8	8	2	0
Müller-Gang Epithelzellkerne	8	8	0,5	0,53
Müller-Gang Stroma/Myofibroblasten	8	8	0	0
Ureter Epithelzellkerne	8	0	x	X
Ureter Stroma/Myofibroblasten	8	0	x	X

SA = Standardabweichung

Insgesamt wurden acht Schnitte aus den vier Feten ausgewertet. Hieraus wurde ein Mittelwert gebildet, der die Farbintensität im Durchschnitt wiedergibt. Die Standardabweichung zeigt, ob die Schnitte untereinander starke Unterschiede aufweisen.

Am fd 16 ist der Wolff-Gang noch nicht differenziert, so dass der Ureter noch nicht vorhanden ist. Da der Androgen-Rezeptor sich innerhalb des Zellkerns befindet, ist das Zytoplasma stets frei von einer Reaktion.
Die *Tubuli mesonephrici* sind auf allen der acht Schnitten erkennbar. Im Mittel zeigt sich eine relativ geringe Farbintensität von 1,25. Die Standardabweichung von 0,71 lässt deutliche Unterschiede zwischen den Schnitten erkennen. Die Zellkerne der Tubuli mesonephrici färben sich zum Teil gar nicht an und zum Teil relativ stark mit einer Farbintensität von 2.

Der *Müller-Gang* liegt lateral im Nebenhodengewebe. Er ist auf allen acht Schnitten vorhanden. Die Epithelzellkerne zeigen im Mittel eine Farbintensität von 0,5. Die Standardabweichung von 0,53 zeigt, dass es auch hier Unterscheide zwischen den Schnitten gibt. Auf vier Schnitten zeigt sich eine schwache Reaktion von einer Stärke von 1, während bei den anderen Schnitten keine Reaktion zu ermitteln war. Die Zellkerne der Myofibroblasten im Stroma des Müller-Ganges jedoch zeigen in keinem Schnitt eine Reaktion.

Der *Wolff-Gang* liegt unmittelbar medial des Müller-Ganges. Er ist ebenfalls auf allen acht Schnitten zu sehen. Die Epithelzellkerne zeigen durchschnittlich eine Farbintensität von 1. Da die Standardabweichung bei 0 liegt, kann man erkennen, dass diese Reaktion gleichmäßig ist. Hier wird in geringem Maße Androgen-Rezeptor exprimiert.
Die Zellkerne der Myofibroblasten im Stroma des Wolff-Ganges zeigen in jedem Schnitt eine Farbintensität von 2. Dies ist in dieser Altersstufe die stärkste Reaktion.

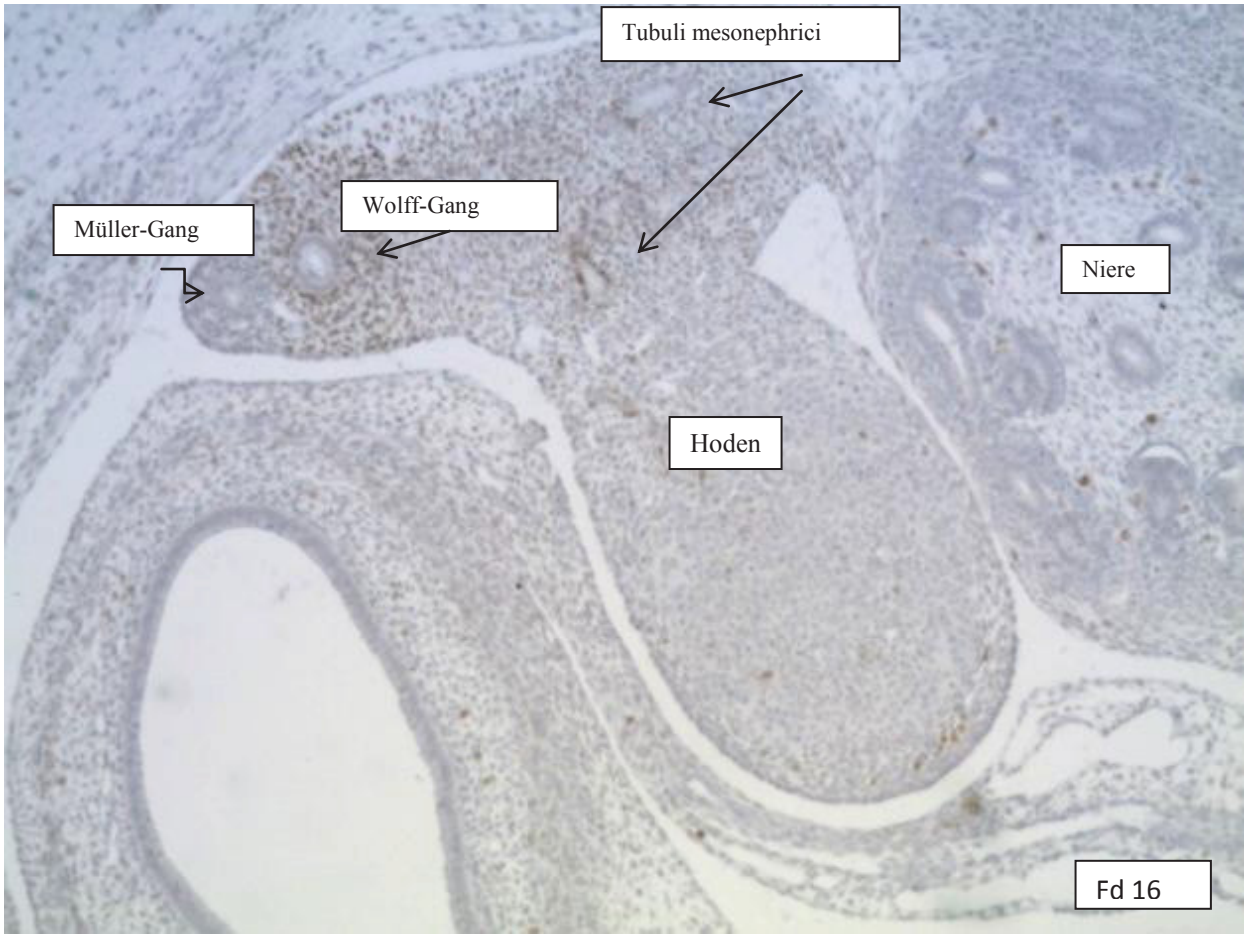
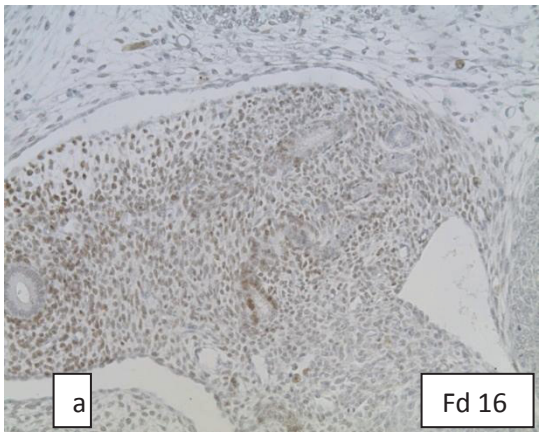


Abbildung 6

Fetaltag (Fd) 16. Androgen-Rezeptor -Reaktion.
Übersichtsaufnahme des fetalen Rattenhodens mit Mesonephros (Tubuli mesonephrici, Wolff-Gang und Müller-Gang). Hier mit Reaktion des Androgenrezeptors (braun), Kernfärbung mit Hämalaun. Endvergrößerung 114x, 1cm d. Abb. = 88µm.



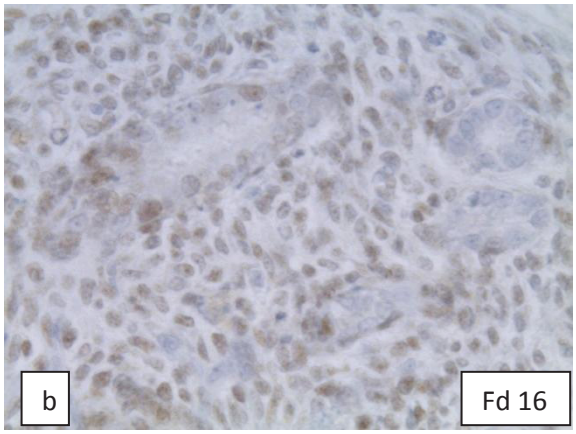


Abbildung 7 a+b

Fetaltag (Fd) 16. Androgen-Rezeptor -Reaktion.
Abbildung 7a = Ausschnitt aus Abb. 6, Endvergrößerung 390x, 1cm d. Abb. = 26µm.; Abb. 7b = Ausschnitt aus 7a, Endvergrößerung 415x, 1cm d. Abb. =24µm. Tubuli mesonephrici im Mesonephros mit leichter Reaktion des Androgen-Rezeptors in den Epithelzellkernen der Gänge.

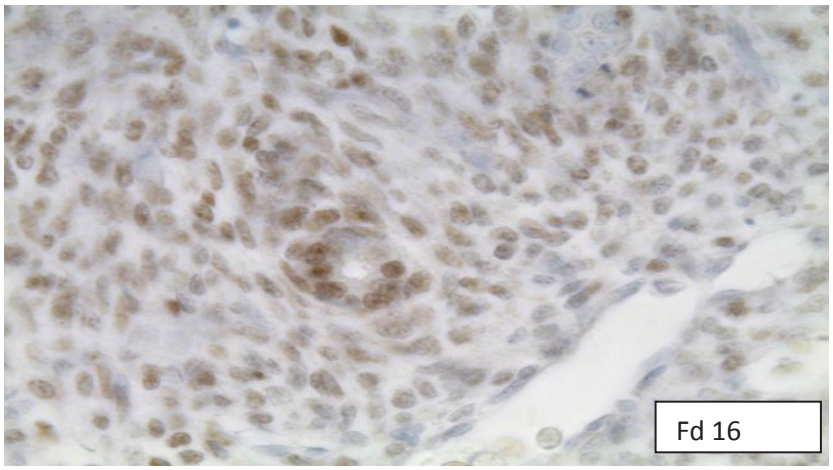


Abbildung 8
Fetaltag (Fd) 16. Androgen-Rezeptor Reaktion.
Tubuli mesonephrici im Mesonephros mit stärkerer Reaktion des Androgen-Rezeptors (braun), Kernfärbung (blau) mit Hämalaun. in den Epithelzellkernen der Gänge. Endvergrößerung 954x, 1cm d. Abb. = 10µm.

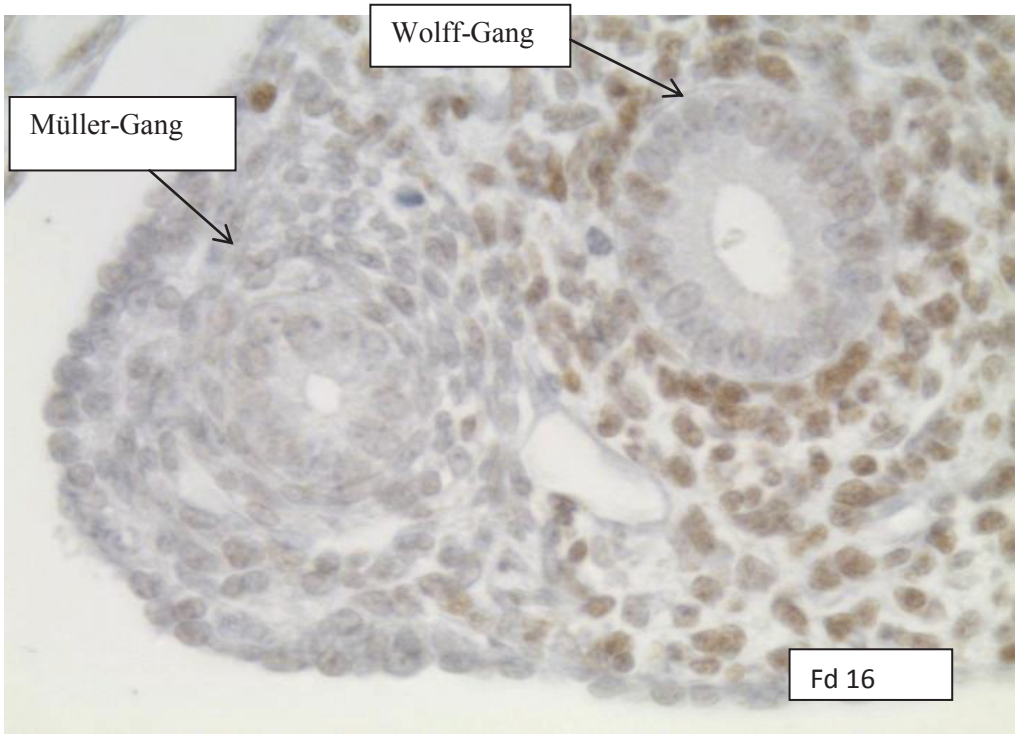


Abbildung 9
Fetaltag (Fd) 16. Androgen-Rezeptor Reaktion.
Müller-Gang (links) mit kaum einer Reaktion des Antikörpers des Androgen-Rezeptors (braun). Wolff-Gang (rechts) mit deutlicher Reaktion des Androgen-Rezeptors vor allem in den Zellkernen der Myofibroblasten. Mäßige Reaktion des Androgen-Rezeptor Antikörpers in den Epithelzellkernen des Wolff-Gang. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 1164x, 1cm d. Abb. = 9µm..

3.1.2. Die Reaktion des Androgen-Rezeptors in den Zellen im Mesonephros am *fd 17*

Tabelle 2:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion des Androgen-Rezeptors im Mesonephros am fd17

	Schnitte (n) Gesamt	Reaktion Vorhanden (n)	Mittelwert	SA
Tubuli mesonephrici Epithelzellkerne	14	10	1,2	0,63
Wolff-Gang Epithelzellkerne	14	13	0,92	0,28
Wolff-Gang Stroma/Myofibroblasten	14	13	1,84	0,55
Müller-Gang Epithelzellkerne	14	13	0,23	0,48
Müller-Gang Stroma/Myofibroblasten	14	13	0	0
Ureter Epithelzellkerne	14	0	0	0
Ureter Stroma/Myofibroblasten	14	0	0	0

SA = Standardabweichung

Insgesamt wurden 14 Schnitte aus den sieben Feten ausgewertet. Hieraus wurde ein Mittelwert gebildet, der die Farbintensität im Durchschnitt wiedergibt. Die Standardabweichung zeigt, ob die Schnitte untereinander starke Unterschiede aufweisen.
Am fd17 ist der Wolff-Gang noch nicht differenziert, so dass der Ureter noch nicht vorhanden ist.

Die *Tubuli mesonephrici* sind auf zehn von 14 Schnitten zu sehen. Bei einem Mittelwert von 1,2 lässt eine Standardabweichung von 0,63 auf starke Schwankungen zwischen den Schnitten schließen. Die Farbintensität liegen zwischen 0 und 2, wobei ein Schnitt eine Stärke 0 aufweist, sechs Schnitte eine Stärke von 1 und drei Schnitte eine von 2.

Der *Müller-Gang* ist auf 13 von 14 Schnitten zu sehen. Die durchschnittliche Farbintensität der Epithelzellen liegt bei 0,23, schwankt jedoch bei einer Standardabweichung von 0,48 ebenfalls zwischen den Schnitten. Drei Schnitte weisen eine leichte Reaktion mit einer Signalstärke von 1 auf. Die zehn anderen Schnitte zeigten alle keine Reaktion.
Die Zellkerne der Myofibroblasten des Stromas zeigten keine Reaktion

Der *Wolff-Gang* ist ebenfalls auf 13 von 14 Schnitten zu erkennen.
Die Epithelzellen zeigten im Durchschnitt eine Farbintensität von 0,92. Die Standardabweichung beträgt 0,28 und lässt auf leichte Schwankungen zwischen den Schnitten schließen. Einer der Schnitte zeigte keine Reaktion während die anderen zwölf eine Stärke von 1 aufwiesen.
Die Zellkerne der Myofibroblasten des Stromas zeigten eine durchschnittliche Farbintensität von 1,84. Abweichungen konnten auch hier bei einer Standardabweichung von 0,55 gefunden werden. Der Schnitt, bei dem die Zellkerne des Epithels nicht reagierten, zeigte auch bei den Zellkernen der Myofibroblasten keine Reaktion. Alle anderen Schnitte zeigten eine Farbintensität von 2.

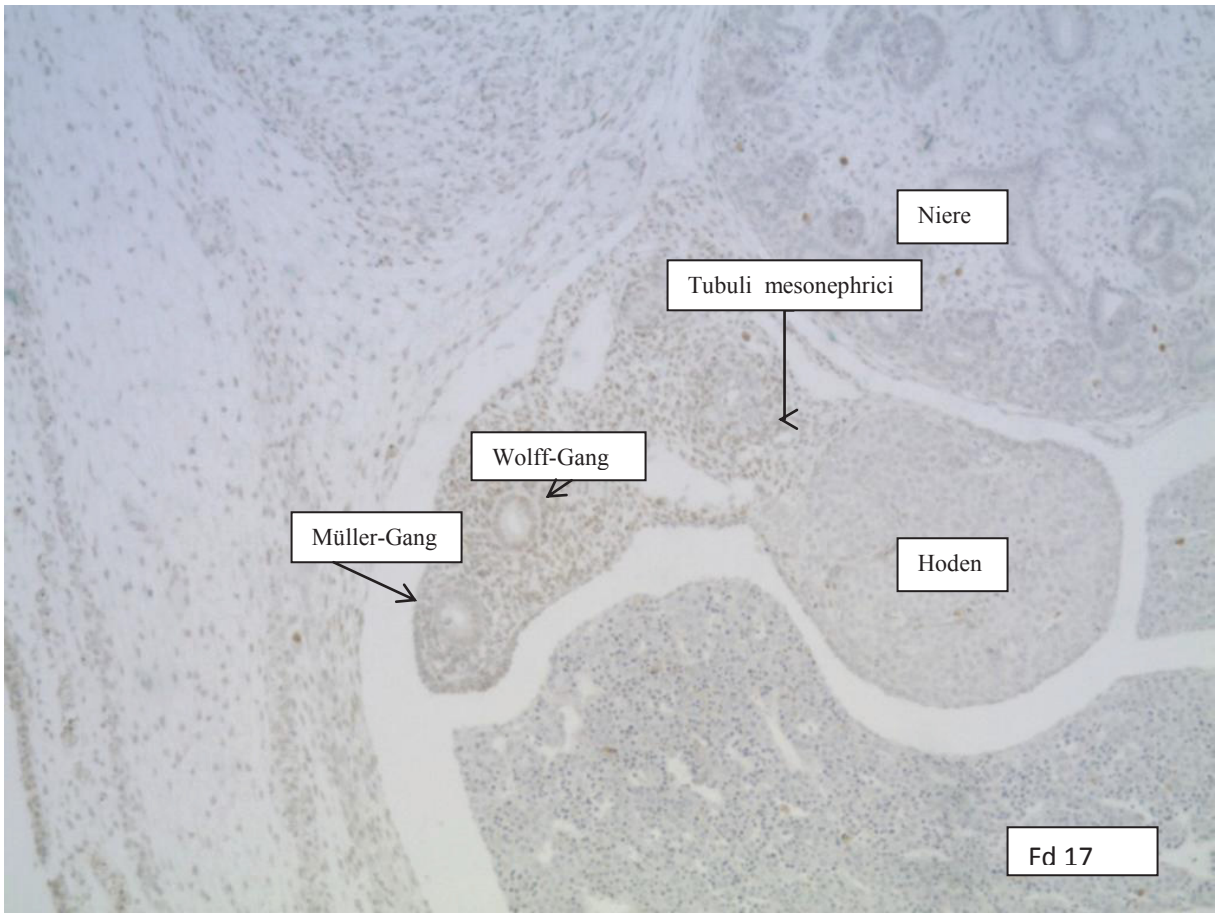


Abbildung 10
Fetaltag (Fd) 17. Androgen-Rezeptor Reaktion (braun).
Übersicht über Testis und Mesonephros (Tubuli mesonephrici, Wolff-Gang, Müller-Gang) am fd17. Müller-Gang und Wolff-Gang sind deutlich sichtbar. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 118x, 1cm d. Abb. = 85µm.

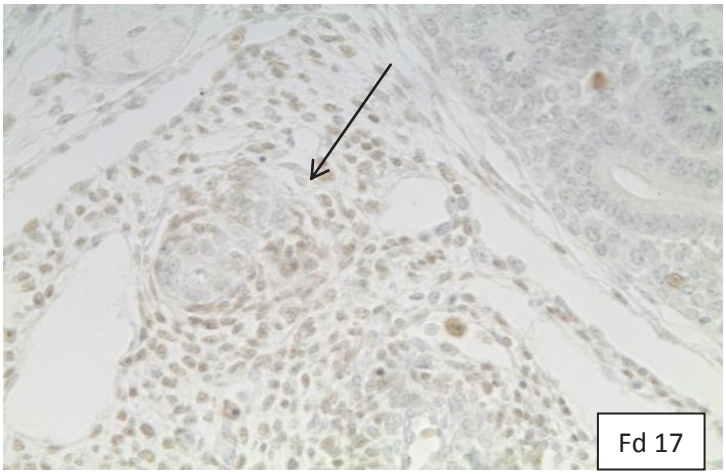


Abbildung 11
Fetaltag (Fd) 17. Androgen-Rezeptor Reaktion (braun).
Tubuli mesonephrici hier in der Mitte des Bildes. Sie zeigen eine leichte Reaktion des Androgen-Rezeptor (braun) Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 875x, 1cm d. Abb. = 11µm..

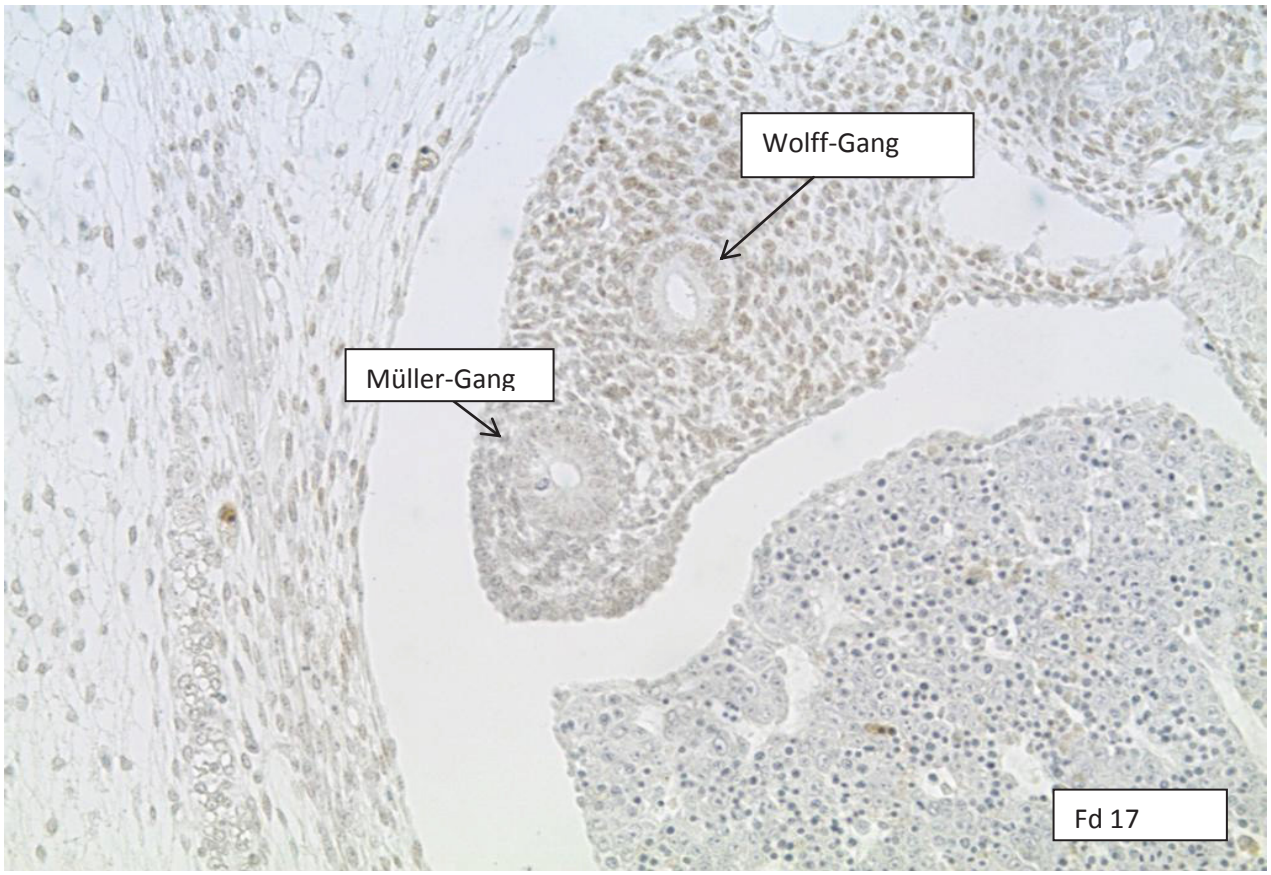


Abbildung 12
Fetaltag (Fd) 17. Androgen-Rezeptor Reaktion (braun).
Müller-Gang und Wolff-Gang deutlich sichtbar. Während der Müller-Gang gar keine Reaktion auf den Androgen-Rezeptor zeigt, reagiert der Wolff-Gang leicht. Auch hier sind es besonders die Mesenchymzellkerne, die auf den Androgen-Rezeptor reagieren. Im Wolff-Gang ist sowohl in den Epithelzellen also auch in den Kernen der mesenchymalen Zellen die Reaktion auf den Androgen-Rezeptor deutlich sichtbar. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 464x, 1cm d. Abb. = 22µm.

3.1.3. Die Reaktion des Androgen-Rezeptors in den Zellen im Mesonephros am *fd 18*

Tabelle 3:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion des Androgen-Rezeptors im Mesonephros am fd18

	Schnitte (n) Gesamt	Reaktion Vorhanden (n)	Mittelwert	SA
Tubuli mesonephrici Epithelzellkerne	10	10	1,9	0,57
Wolff-Gang Epithelzellkerne	10	8	1,38	0,74
Wolff-Gang Stroma/Myofibroblasten	10	8	2,25	0,46
Müller-Gang Epithelzellkerne	10	0	0	0
Müller-Gang Stroma/Myofibroblasten	10	0	0	0
Ureter Epithelzellkerne	10	2	1	0
Ureter Stroma/Myofibroblasten	10	2	0	0

SA = Standardabweichung

Insgesamt wurden 10 Schnitte aus den fünf Feten ausgewertet. Hieraus wurde ein Mittelwert gebildet, der die Farbintensität im Durchschnitt wiedergibt. Die Standardabweichung zeigt, ob die Schnitte untereinander starke Unterschiede aufweisen.
Am fd18 ist der Wolff-Gang noch nicht in allen Schnitten differenziert, so dass der Ureter noch nicht in jedem Schnitt vorhanden ist. Der Müller-Gang hat sich am fd18 bereits zurückgebildet, so dass er auf keinem der Schnitte zu sehen ist.

Die *Tubuli mesonephrici* sind auf jedem der zehn Schnitte zu erkennen. Im Mittel beträgt die Farbintensität ihrer Epithelzellen 1,9. Die Standardabweichung von 0,57 zeigt eine Differenz zwischen den Schnitten. Sieben der Schnitte weisen eine Stärke von 2 auf, zwei eine Stärke von 1 und einer ein Stärke von 3.

Aus dem *Wolff-Gang* haben sich am fd 18 in einem Teil der Tiere folgende Strukturen differenziert:

1) Ductus deferens
2) Ductus epididymidis
3) Ureter
4) Samenblase (nicht sichtbar auf den Bildausschnitten)

Die Epithelzellkerne im Ductus deferens und Ductus epididymidis reagieren stets mit gleicher Farbintensität. Da dies für die Auswertung der Farbintensität nicht wichtig ist, wurden sie hier unter dem Oberbegriff Wolff-Gang in der Tabelle gefasst. Bei einem der Feten, also auf zwei Schnitten hat sich der Ureter bereits ausgebildet. Dieser wird nun differenziert beschrieben. Auf zwei weiteren Schnitten ist kein Teil des Wolff-Gangs zu erkennen. Die Epithelzellkerne des Wolff-Gangs zeigen im Mittel eine Stärke von 1,38 und eine Standardabweichung von 0,74. Dieser hohe Wert lässt auf Schwankungen zwischen den Schnitten schließen: Auf sechs Schnitten beträgt die Farbintensität 1, auf einem 2 und auf einem 3. Die beiden letzten Schnitte entstammen beide dem gleichen Präparat. Es sind die beiden Schnitte, die auch einen Ureter aufweisen. Die Zellkerne der Myofibroblasten im Stroma des Wolff-Ganges haben durchschnittlich eine Farbintensität von 2,25 bei einer Standardabweichung von 0,46. Letztere erklärt sich dadurch, dass sechs Schnitte eine Signalstärke von 2 aufweisen, während die beiden oben erläuterten Schnitte Stärke 3 zeigen. Die Myofibroblasten weisen also auch hier eine deutlich stärkere Reaktion auf, als die Epithelzellen.

Im Ureter ist es bei den beiden erläuterten Schnitten anders. Die Myofibroblasten im Stroma weisen keine Reaktion auf. Die Epithelzellen hingegen haben bei beiden Schnitten eine Signalstärke von 1. Der Androgen-Rezeptor ist hier also nur schwach exprimiert und im Stroma gar nicht.

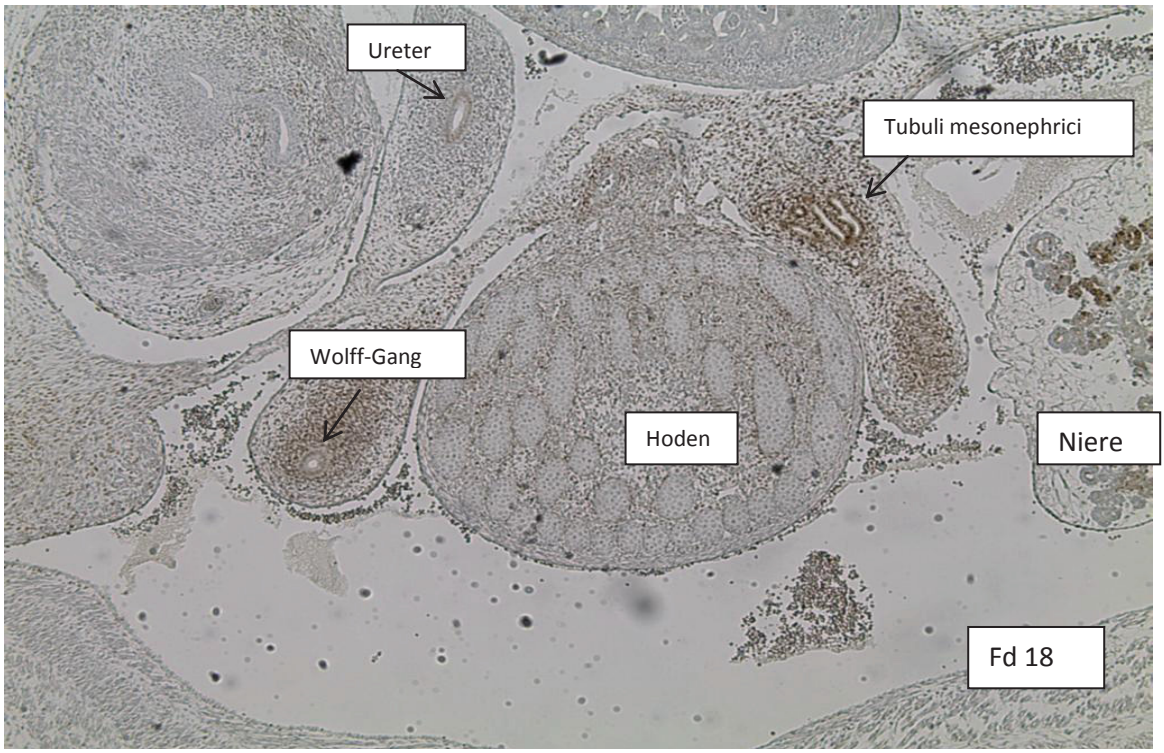


Abbildung 13
Fetaltag (Fd) 18. Androgen-Rezeptor Reaktion (braun).
Hoden mit bereits ausdifferenziertem Mesonephros in der Übersicht. Das Mesonephros legt sich um den Hoden herum. Deutliche Reaktion des Androgen-Rezeptors (braun) in den Tubuli mesonephrici, sowie an dem Anteil des Ductus deferens am Wolff-Gang. Kernfärbung mit Hämalaun (blau) Endvergrößerung 105x, 1cm d. Abb. = 95µm.

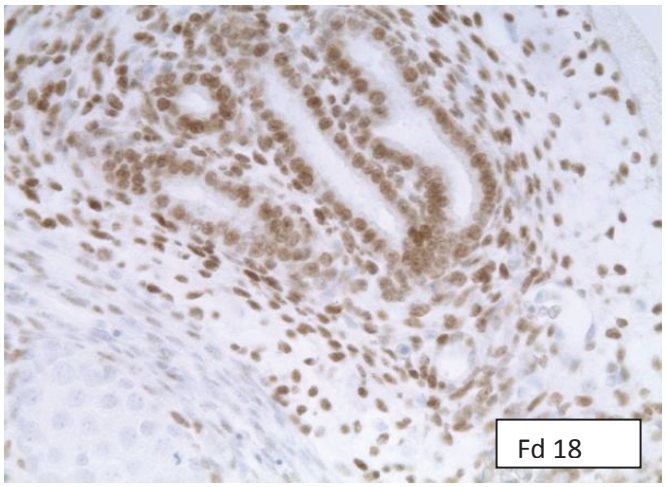


Abbildung 14
Fetaltag (Fd) 18. Androgen-Rezeptor Reaktion (braun). Eine Ausschnitts-Vergrößerung aus Abb. 13.
Die Tubuli mesonephrici liegen hier im Mesonephros räumlich deutlich differenziert von dem sich entwickelnden Ductus deferens (vgl. auch Übersicht). Sie zeigen eine deutliche Reaktion auf den Androgen-Rezeptor in ihren epithelialen Zellkernen. Endvergrößerung 761x, 1cm d. Abb. = 13µm.

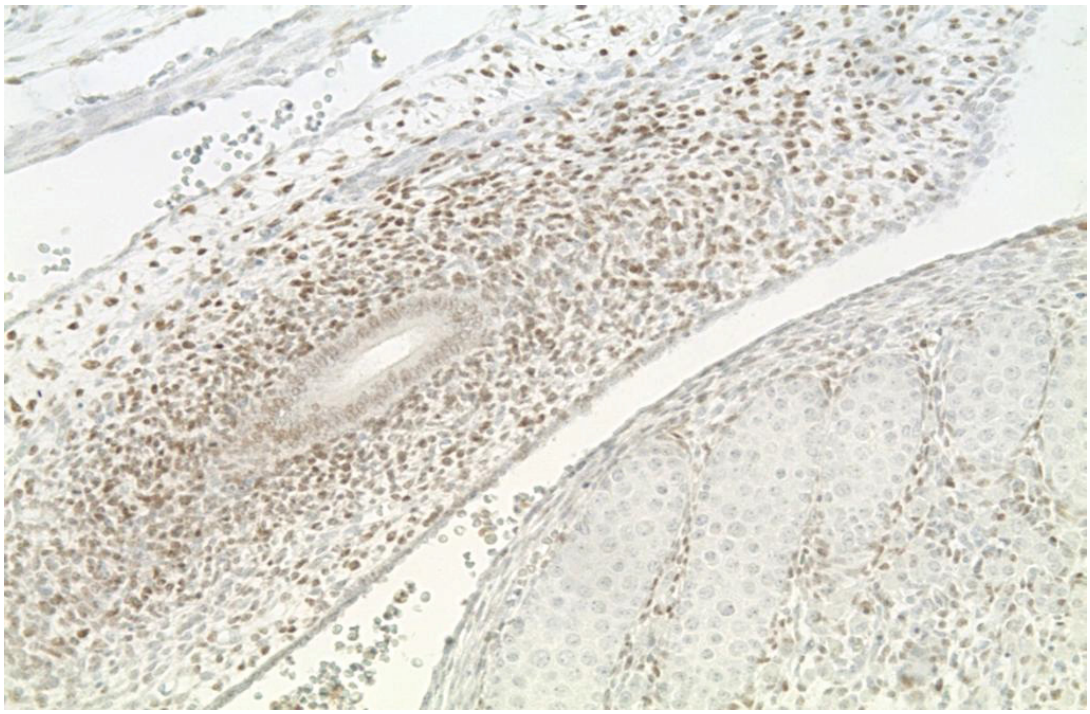


Abbildung 15
Fetaltag (Fd) 18. Androgen-Rezeptor Reaktion (braun). Eine Ausschnitts-Vergrößerung aus Abb. 13.
Der sich entwickelnde Ductus deferens liegt durch Bindegewebe getrennt nun räumlich entfernt von dem sich ausbildenden Ureter vor (vgl. auch Übersicht). Eine leichte Reaktion ist in den Epithelzellkernen des Ductus deferens zu erkennen. Kräftiger ist die Reaktion der Zellkerne der Mesenchymzellen (= späteres Stromagewebe des Samenleiters). Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 397x, 1cm d. Abb. = 25µm.

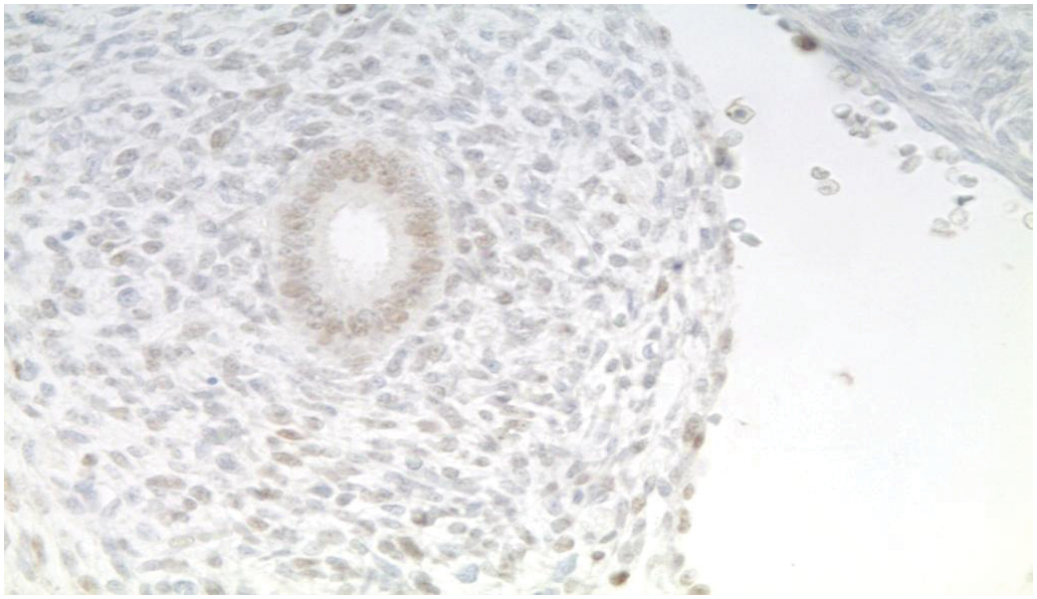


Abbildung 16
Fetaltag (Fd) 18. Androgen-Rezeptor Reaktion (braun). Eine Ausschnitts-Vergrößerung aus Abb. 13.
Der deutlich vom Ductus deferens abzugrenzende Ureter (vgl. auch Übersicht) zeigt eine leichte Reaktion in den Epithelzellkernen. Die ihn umgebenden mesenchymalen Zellen haben keine Reaktion des Androgen-Rezeptors vorzuweisen. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 378x, 1cm d. Abb. = 26µm.

3.1.4. Die Reaktion des Androgen Rezeptors in den Zellen im Mesonephros am *fd19*

Tabelle 4:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion des Androgen-Rezeptors im Mesonephros am fd 19

	Schnitte (n) Gesamt	Reaktion Vorhanden (n)	Mittelwert	SA
Tubuli mesonephrici Epithelzellkerne	12	7	2,43	0,55
Wolff-Gang Epithelzellkerne	12	10	1,6	0,93
Wolff-Gang Stroma/Myofibroblasten	12	10	2,4	1,39
Müller-Gang Epithelzellkerne	12	0	0	0
Müller-Gang Stroma/Myofibroblasten	12	0	0	0
Ureter Epithelzellkerne	12	8	2	0
Ureter Stroma/Myofibroblasten	12	8	0,25	0,46

SA = Standardabweichung

Insgesamt wurden 12 Schnitte aus den 6 Feten ausgewertet. Hieraus wurde ein Mittelwert gebildet, der die Farbintensität im Durchschnitt wiedergibt. Die Standardabweichung zeigt, ob die Schnitte untereinander starke Unterschiede aufweisen.
Am fd19 hat sich der Wolff-Gang in die drei oben genannten Strukturen aufgeteilt. Der Müller-Gang hat sich am fd18 bereits zurück gebildet, so dass er auf keinem der Schnitte zu sehen ist.

Die *Tubuli mesonephrici* sind auf sieben der zwölf Schnitte zu sehen. Ihre Epithelzellkerne erreichen eine durchschnittliche Farbintensität von 2,43. Die Standardabweichung von 0,55 erklärt sich daraus, dass drei Schnitte eine Stärke von 3 aufweisen, während vier Schnitte eine Stärke von 2 zeigen. Dies zeigt eine stetige Zunahme der Farbintensität vom fd16 bis fd19.

Der *Wolff-Gang* ist hier schon unterteilt in Ureter und Nebenhodengang, bestehend aus Ductus deferens und Ductus epididymidis. Die Ductuli sind in der Tabelle weiter geführt als Wolff-Gang, während der Ureter differenziert betrachtet wird.
Der Wolff-Gang ist in fünf der sechs Feten vorhanden, also in zehn von zwölf Schnitten zu erkennen.

Die Epithelzellen des Wolff-Gangs haben einen Mittelwert von 1,6. Sie haben jedoch eine sehr hohe Standardabweichung von 0,93. Dies wird dadurch verursacht, dass bei den beiden Schnitten eines Präparates keine Reaktion stattgefunden hat. Die Myofibroblasten des Wolff-Ganges zeigen eine Signalstärke von 2,4. Jedoch ist hier die Standardabweichung ebenfalls enorm hoch, da die zwei oben genannten Schnitte wieder keine Reaktion aufweisen. Alle anderen Schnitte zeigen die höchste Signalstärke 3.

Der Ureter ist in acht von zwölf Schnitten zu erkennen. Die Epithelzellen des Ureters weisen alle eine Farbintensität von 2 auf. Die Myofibroblasten des Ureter-Stromas hingegen haben nur eine durchschnittliche Farbintensität von 0,25 bei einer Standardabweichung von 0,46. Zwei der Schnitte zeigen eine leichte Signalstärke von 1, während alle anderen Schnitte keine Reaktion zeigen.
Während die Myofibroblasten im Stroma des Wolff-Ganges die höchste Reaktion zeigen, ist sie im Ureter Stroma sehr niedrig.

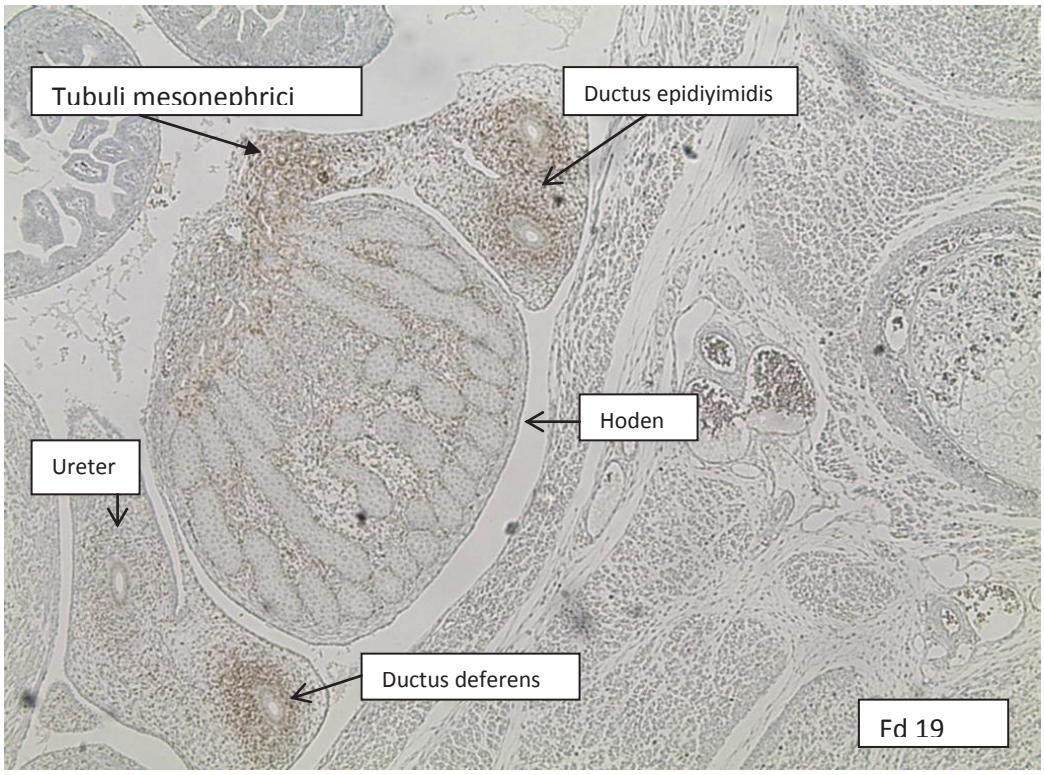


Abbildung 17
Fetaltag (Fd) 19. Androgen-Rezeptor Reaktion (braun).
Übersicht des sich entwickelnden Hodens am fd19. Deutlich abgrenzbar sind hier der Ureter, Ductus deferens, Tubuli mesonephrici und Ductus epididymidis (oben rechts). Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 95x, 1cm d. Abb. = 105µm..

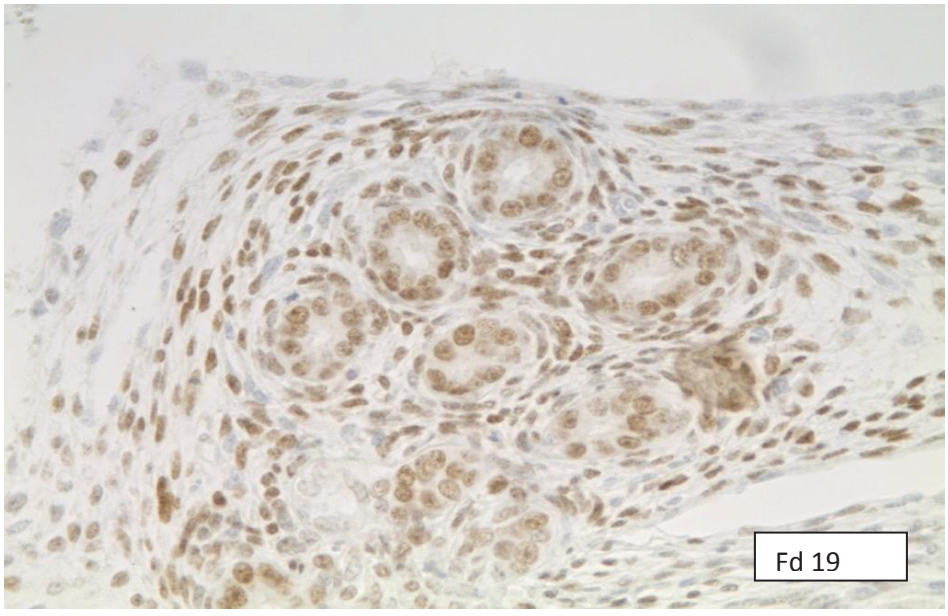


Abbildung 18
Fetaltag (Fd) 19. Androgen-Rezeptor Reaktion (braun). Ausschnitts-Vergrößerung aus Abb. 17. Die Tubuli mesonephrici liegen räumlich differenziert von den Strukturen des Wolff-Gangs im Mesonephros (vgl. auch Abb. 17) sie zeigen eine deutliche Reaktion in den Zellkernen der Epithelzellen. Die ersten Tubuli efferenti sind erkennbar. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 690x, 1cm d. Abb. = 15µm.

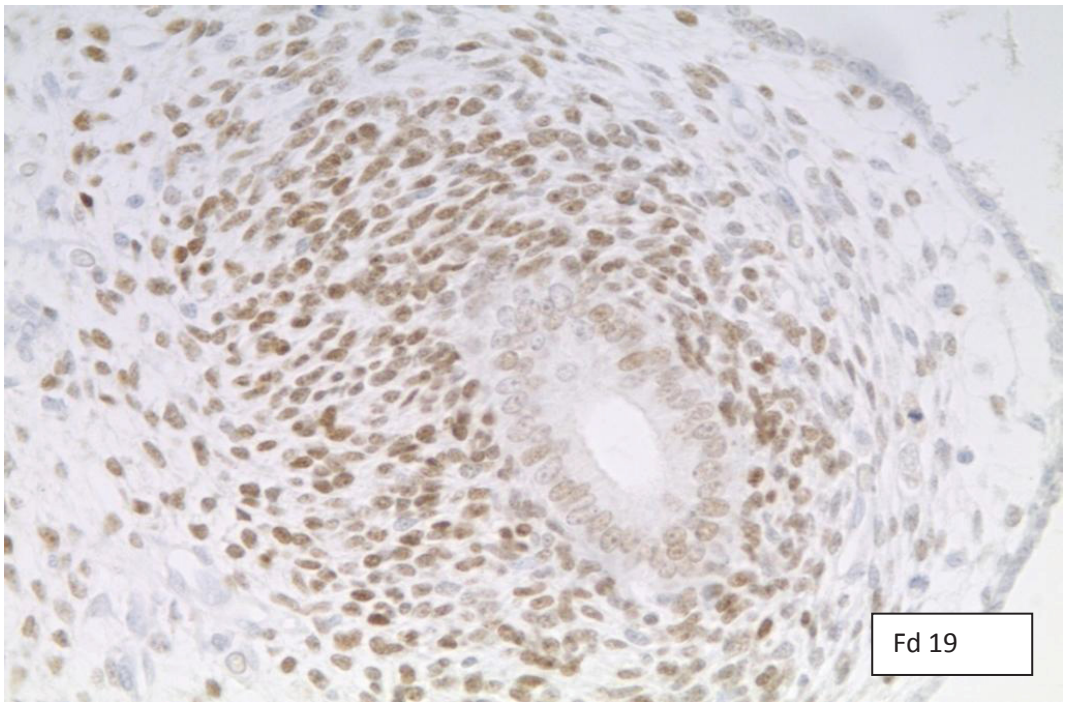


Abbildung 19
Fetaltag (Fd) 19. Androgen-Rezeptor Reaktion (braun). Ausschnitts-Vergrößerung aus Abb. 17. Dies ist ein Ausschnitt des Wolff-Gangs der sich zum Ductus deferens differenziert. In den Epithelzellkernen lassen sich deutliche Reaktionen des Androgen-Rezeptors erkennen. Kräftiger ist diese Reaktion in den Zellkernen der Myofibroblasten. Kernfärbung mit Hämalaun (blau) Endvergrößerung 778x, 1cm d. Abb. = 13µm..

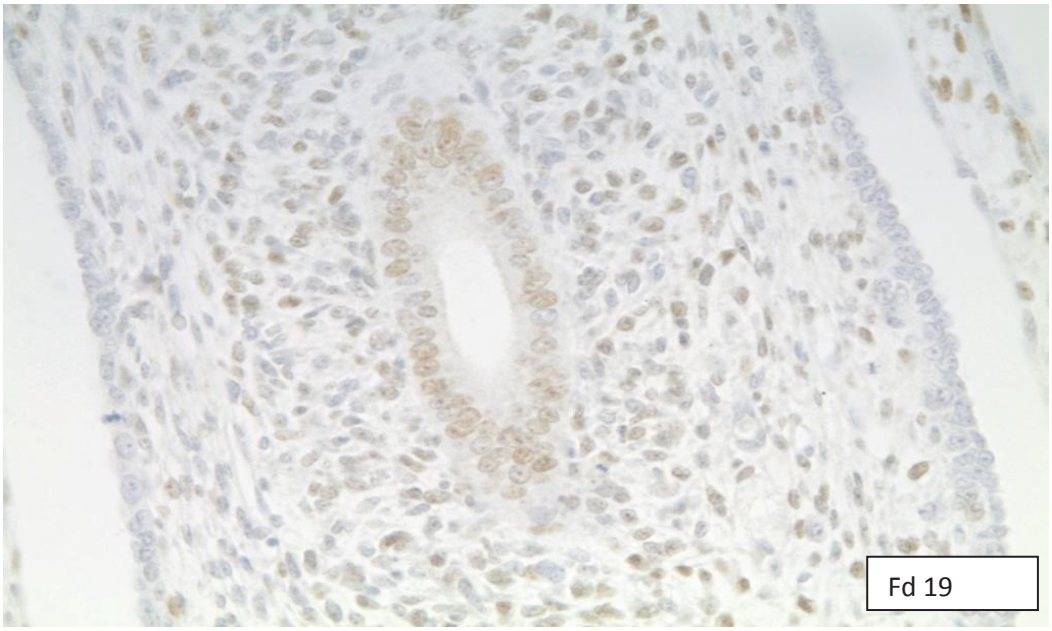


Abbildung 20
Fetaltag (Fd) 19. Androgen-Rezeptor Reaktion (braun). Ausschnitts-Vergrößerung aus Abb. 17. Der räumlich deutlich vom restlichen Wolff-Gang abgegrenzte Ureter (vgl. auch Abb. 17) zeigt in den Epithelzellkernen eine Reaktion des Androgen-Rezeptors. Die beim Ductus deferens so deutlich dargestellte Reaktion in den Zellkernen der Myofibroblasten bleibt jedoch völlig aus. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 778x, 1cm d. Abb. = 13µm.

3.1.5. Zusammenfassung der Befunde über die Intensität der Androgen-Rezeptor-Reaktion

Bei den *Tubuli mesonephrici* ist eine deutliche Steigung der Farbintensität zu erkennen.

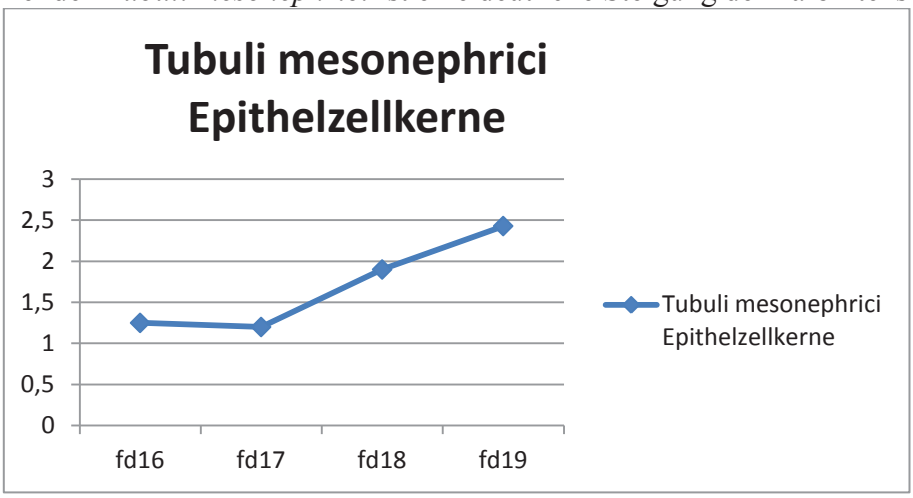


Abbildung 21
Zusammenfassung der Intensität der immunhistochemischen Reaktion der Epithelzellkerne der Tubuli mesonephrici von Fetaltag (fd) 16 - fd 19 mit dem Androgen-Rezeptor. (für Standardabweichung siehe Tabelle 1-4)

Der *Müller-Gang* ist ab dem fd18 nicht mehr zu erkennen und liegt somit am fd18 und fd19 bei 0. Auch an den Tagen fd16 und fd17 ist die Signalstärke sehr gering und übersteigt den Wert von 0,5 nicht.

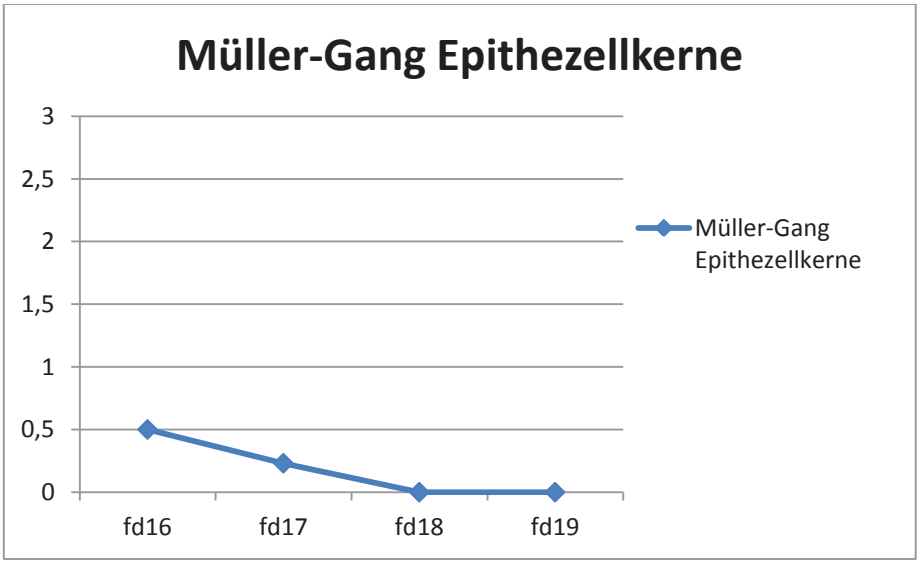


Abbildung 22
Zusammenfassung der Intensität der immunhistochemischen Reaktion der Epithelzellkerne des Müller-Gang von Fetaltag (fd) 16 - fd 19 mit dem Androgen-Rezeptor. (für Standardabweichung siehe Tabelle 1-4)

Der *Wolff-Gang* weist einen Unterschied der Farbintensität zwischen den Epithelzellkernen und den Myofibroblasten im Stroma auf. Beide sind am fd16 höher als am fd17 und steigen dann parallel bis zum fd19 an. Die Farbintensität der Myofibroblasten ist jedoch wie in der Abbildung deutlich zu sehen wesentlich höher als in den Epithelzellkernen.

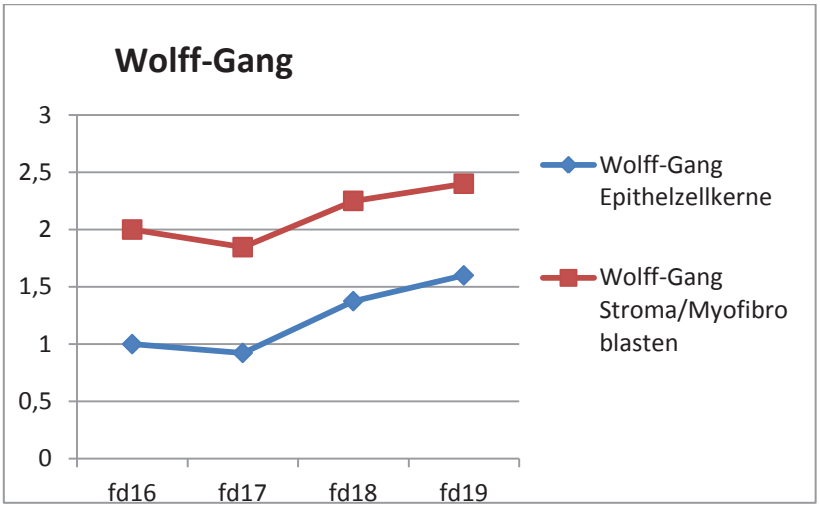


Abbildung 23
Zusammenfassung der Intensität der immunhistochemischen Reaktion der Epithelzellkerne des Wolff-Gang von Fetaltag (fd) 16 - fd 19 mit dem Androgen-Rezeptor. (für Standardabweichung siehe Tabelle 1-4)

Der *Ureter* ist erst ab dem fd18 vorhanden. Hier zeigt sich ein Unterschied zwischen der Farbintensität der Epithelzellkerne und der Myofibroblasten im Stroma. Während die Farbintensität der Epithelzellkerne von fd18 bis fd19 sich von 1 auf 2 verdoppelt, zeigen die Myofibroblasten am fd18 noch gar keine Reaktion und am fd19 nur eine sehr leichte. Die Epithelzellkerne des Ureters zeigen eine höhere Expression an Androgen-Rezeptor als im restlichen Wolff-Gang. Auf der anderen Seite haben sie jedoch keine Expression im Stroma.

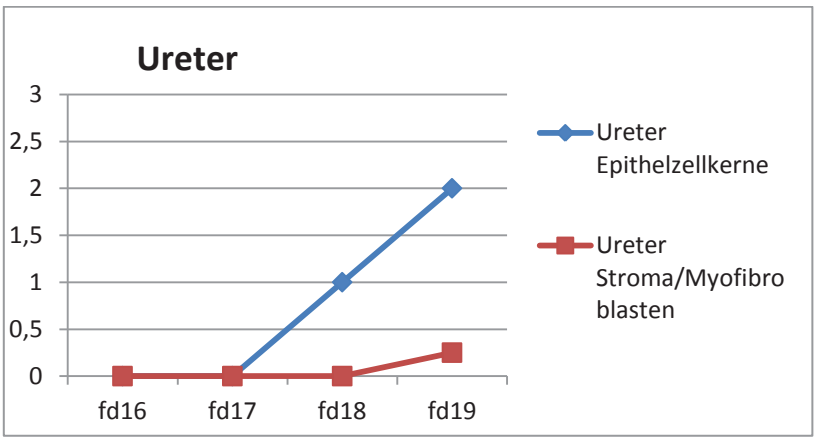


Abbildung 24
Zusammenfassung der Intensität der immunhistochemischen Reaktion der Epithelzellkerne des Ureter von Fetaltag (fd) 16 - fd 19 mit dem Androgen-Rezeptor. (für Standardabweichung siehe Tabelle 1-4)

3.2. Fibronektin

3.2.3. Die Reaktion von Fibronektin auf die Strukturen im Mesonephros *fd 16*

Tabelle 5:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion von Fibronektin im Mesonephros am fd16

	Schnitte (n) Gesamt	Reaktion (n) vorhanden	Mittelwert	SA
Basalmembran, Tubuli mesonephrici + Stroma	8	8	2	0
Basalmembran, Wolff-Gang	8	8	2,88	0,35
Basalmembran, Müller-Gang	8	8	0,38	0,52
BMZW	8	8	2,5	0,53
BMZM	8	8	0,5	0,53
Basalmembran, Ureter	8	0	0	0

BMZW= Basalmembran des Zölomepithel Nähe Wolff-Gang
BMZM= Basalmembran des Zölomepithel Nähe Müller-Gang
SA = Standardabweichung

Insgesamt wurden acht Schnitte aus den vier Feten ausgewertet. Aus den Ergebnissen wurde ein Mittelwert gebildet, der die Farbintensität im Durchschnitt wiedergibt. Die Standardabweichung zeigt, ob die Reaktionen untereinander starke Unterschiede aufweisen. Die zu bewertenden Strukturen sind auf allen acht Schnitten vorhanden.
Am fd16 ist wie bereits erläutert der Ureter noch nicht differenziert. Die übrigen Strukturen sind auf acht der zehn Schnitte zu erkennen.

Die Basalmembran der *Tubuli mesonephrici* hat in allen Schnitten eine Farbintensität von 2.

Die Basalmembran des *Müller-Gangs* hat im Mittel eine Farbintensität von 0,38 bei einer Standardabweichung von 0,53. Diese zeigt einen Unterschied zwischen den Schnitten, der sich wie folgt darstellt: drei der acht Schnitte haben eine leichte Reaktion von 1, während alle anderen Schnitte keine Reaktion zeigen.
Die gesamte Struktur von Testes und von Mesonephros ist peripher von einem Zölomepithel umgeben, welches eine Basalmembran besitzt. Diese wird mit der Fibronektin-Antikörper Reaktion angefärbt. Man kann diese Basalmembran entlang des Nebenhodens verfolgen und

Unterschiede feststellen, ob man sich auf Höhe des Wolff-Ganges oder des Müller-Ganges befindet. Auf Höhe des Müller-Ganges zeigt sich eine Farbintensität von 0,5 bei einer Standardabweichung von 0,53. Vier der acht Schnitte zeigen hier eine leichte Reaktion mit einer Farbintensität von 1 während die anderen vier keine Reaktion zeigen.

Der *Wolff-Gang* liegt medial des Müller-Gang. Die Basalmembran des Wolff-Gang hat durchschnittlich eine Farbintensität von 2,88 bei einer geringen Standardabweichung von 0,35. Abgesehen von einem Schnitt bei dem die Farbintensität mit 2 bewertet wurde, wurde sie bei allen anderen Schnitten als 3 bewertet.
Die Basalmembran des äußeren Zölomepithels des Nebenhodens auf Höhe des Wolff-Gang zeigt eine Farbintensität von 2,5 bei einer Standardabweichung von 0,53. Vier der Schnitte wurden mit einer Farbintensität von 3 bewertet, während die anderen vier Schnitte mit 2 bewertet wurden.

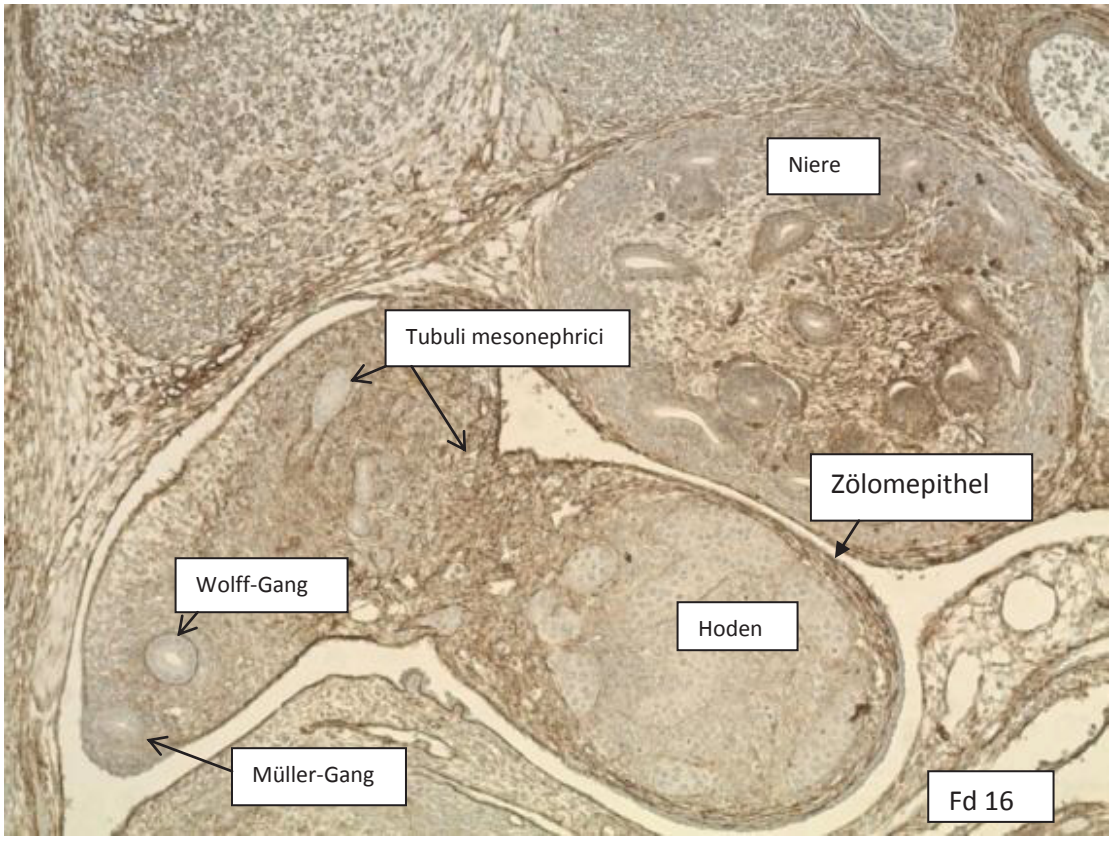


Abbildung 25

Fetaltag (Fd) 16. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun).
Übersicht über einen Schnitt am fd 16 mit der Reaktion des Antikörpers von Fibronektin. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 101x, 1cm d. Abb. = 95µm.

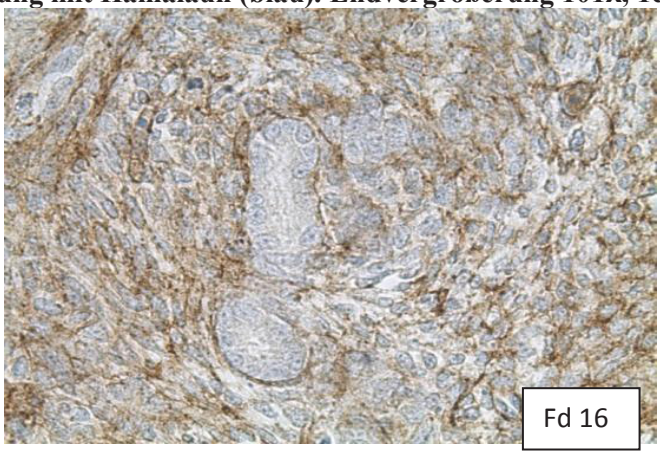


Abbildung 26

Fetaltag (Fd) 16. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 25.
Die Basalmembran der Tubuli mesonephrici zeigt am fd 16 eine deutliche Reaktion auf Fibronektin. Sie umgibt die Epithelzellen der Gänge vollständig und zeigt eine kräftige Farbintensität. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 753x, 1cm d. Abb. = 13µm.

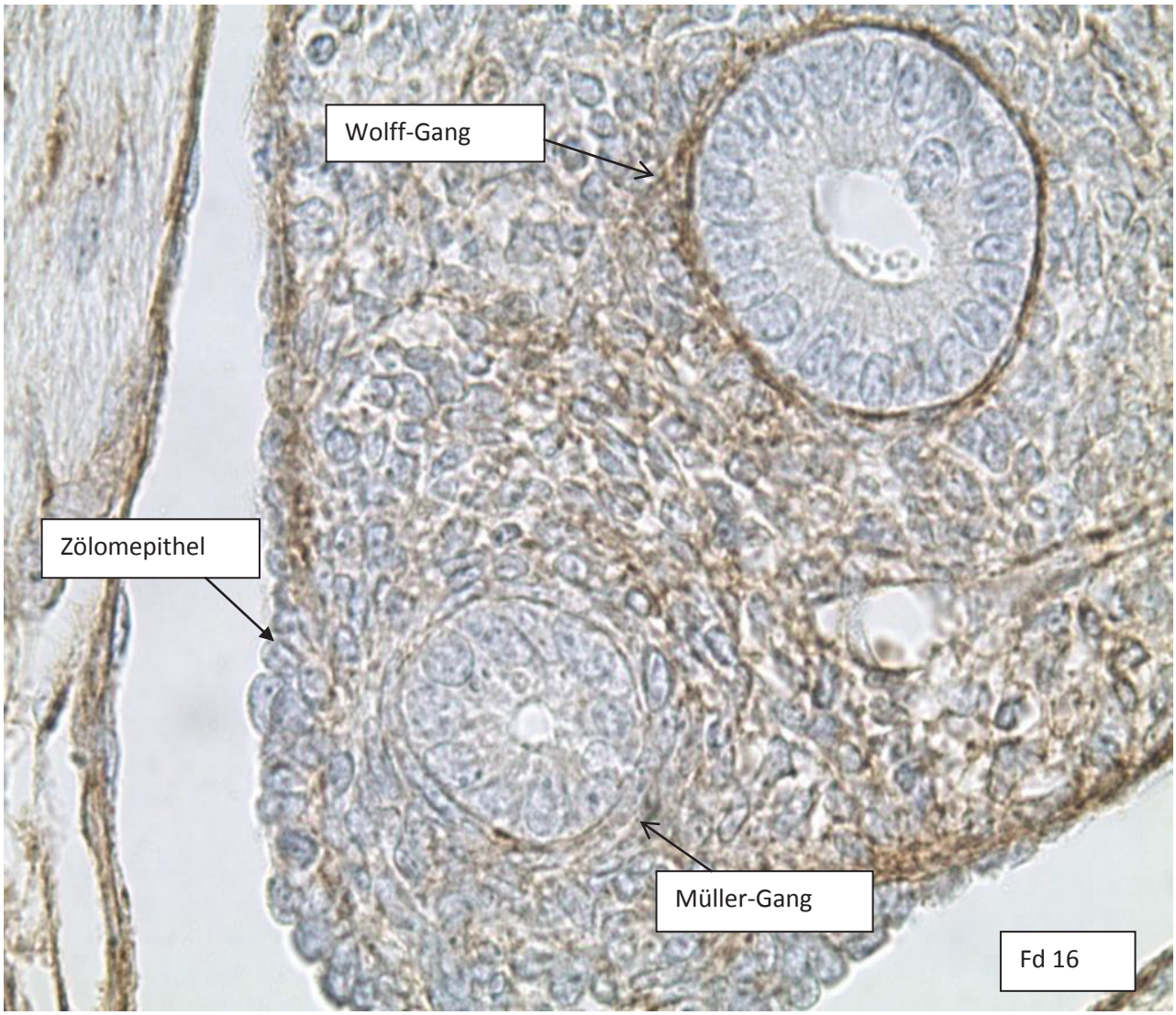


Abbildung 27
Fetaltag (Fd) 16. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 25.
Müller-Gang und Wolff-Gang. Während der Wolff-Gang kräftig von einer auf Fibronektin reagierenden Basalmembran umgeben ist, kann der Müller-Gang kaum eine Reaktion in diesem Bereich aufweisen. Die Basalmembran des Zölomepithels scheint bis zum Ansatz des Müller-Gangs zu reichen. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 1460x, 1cm d. Abb. = 7µm.

3.2.4. Die Reaktion von Fibronektin auf die Strukturen im Mesonephros *fd 17*

Tabelle 6:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion von Fibronektin im Mesonephros am fd17

	Schnitte (n) Gesamt	Reaktion (n) vorhanden	Mittelwert	SA
Basalmembran, Tubuli mesonephrici + Stroma	14	10	1,4	0,52
Basalmembran, Wolff-Gang	14	14	1,43	0,51
Basalmembran, Müller-Gang	14	14	0,14	0,36
BMZW	14	14	1,17	0,39
BMZM	14	14	0,17	0,39
Basalmembran, Ureter	14	0	0	0

BMZW= Basalmembran des Zölomepithel Nähe Wolff-Gang
BMZM= Basalmembran des Zölomepithel Nähe Müller-Gang
SA = Standardabweichung

Insgesamt wurden 14 Schnitte aus den sieben Feten ausgewertet. Aus den Ergebnissen wurde ein Mittelwert gebildet, der die Farbintensität im Durchschnitt wiedergibt. Die Standardabweichung zeigt, ob die Reaktionen untereinander starke Unterschiede aufweisen. Am fd17 ist wie bereits erläutert der Ureter noch nicht differenziert.

Die *Tubuli mesonephrici* sind auf zehn der 14 Schnitte zu sehen. Die Farbintensität beträgt im Mittel 1,4 bei einer Standardabweichung von 0,52. Diese erklärt sich dadurch, dass auf vier der zehn Schnitte eine Farbintensität von 2 bewertet wurde, während die übrigen sechs Schnitte eine Farbintensität von 1 aufweisen.

Der *Müller-Gang* ist zu diesem Zeitpunkt schon deutlich zurückgebildet. Im Durchschnitt zeigt die Basalmembran eine Farbintensität von 0,14 bei einer Standardabweichung von 0,36. Bei zwei Schnitten lässt sich noch eine leichte Intensität von 1 nachweisen, während alle anderen Schnitte als negativ bewertet wurden.
Die Basalmembran des äußeren Zölomepithels des Nebenhodens um den Müller-Gang herum zeigt ein Signal mit der Intensität 0,17 mit einer Standardabweichung von 0,39. Zwei der 14

Schnitte zeigten eine leichte Reaktion mit einer Farbintensität von 1. Die anderen Schnitte zeigten alle keine Reaktion.

Der *Wolff-Gang* ist auf allen 14 Schnitten zu erkennen. Die Basalmembran des Wolff-Gangs wurde mit einer Farbintensität von 1,43 bewertet, wobei die Standardabweichung bei 0,51 berechnet wurde. Sechs Schnitte zeigten eine Reaktion mit der Farbintensität von 2. Die acht anderen Schnitte nur eine Farbintensität von 1. Die Basalmembran des Wolff-Gang Epithels ist noch deutlich zu erkennen, jedoch nicht mehr so stark wie an fd16.
Die Basalmembran des äußeren Zölomepithels des Nebenhodens reagiert auf Höhe des Wolff-Gangs durchschnittlich mit einer Intensität von 1,17. Die Standardabweichung beträgt hier 0,39. Zwei der Schnitte zeigten eine starke Reaktion von 2. Die anderen Schnitte nur eine von 1. Die Basalmembran des Nebenhodens bleibt bestehen, reagiert jedoch nicht mehr so stark wie am fd16.

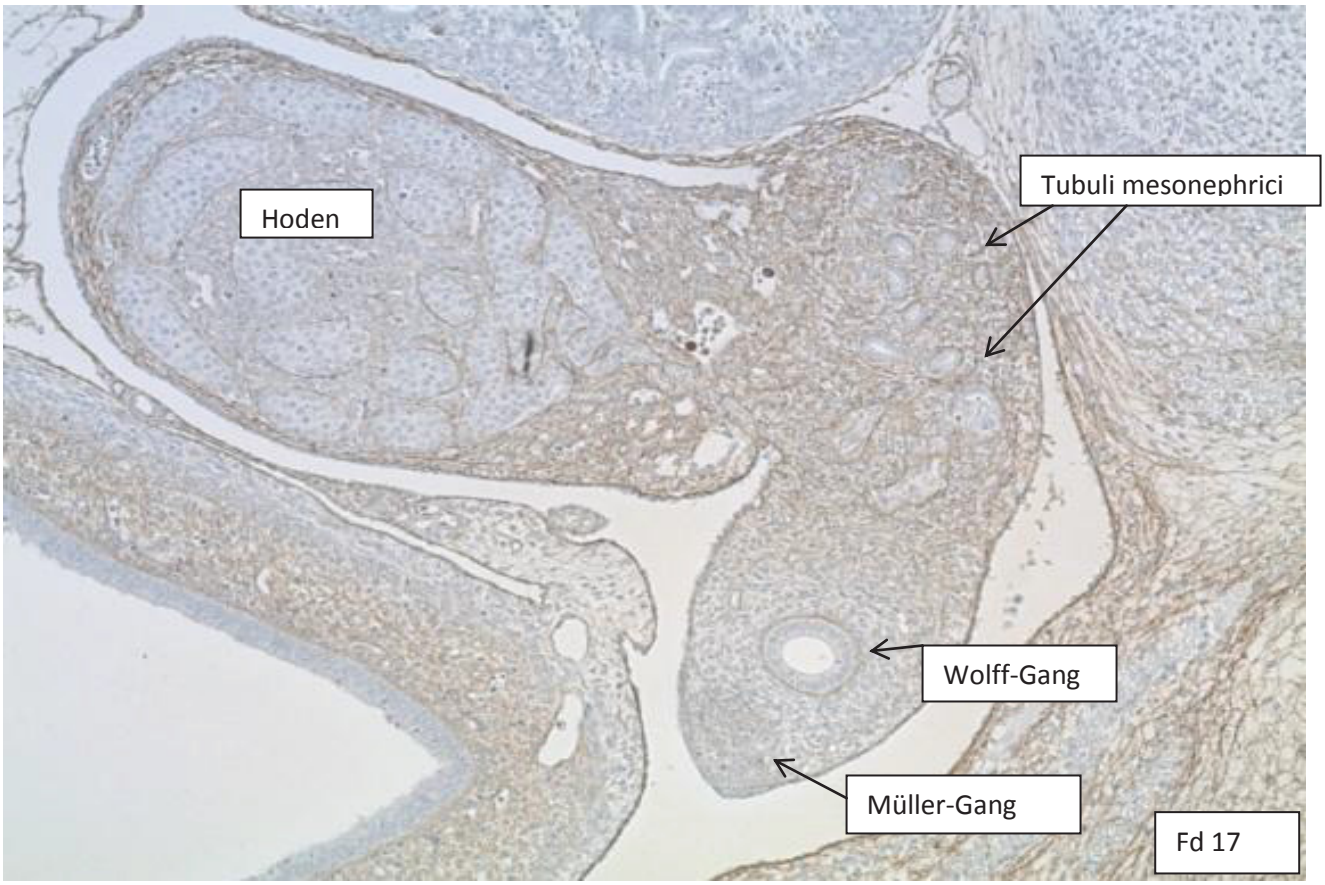


Abbildung 28
Fetaltag (Fd) 17. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun).
Übersicht eines Schnittes am fd 17 mit der Reaktion des Antikörpers von Fibronektin.
Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 114x, 1cm d. Abb. = 88µm.

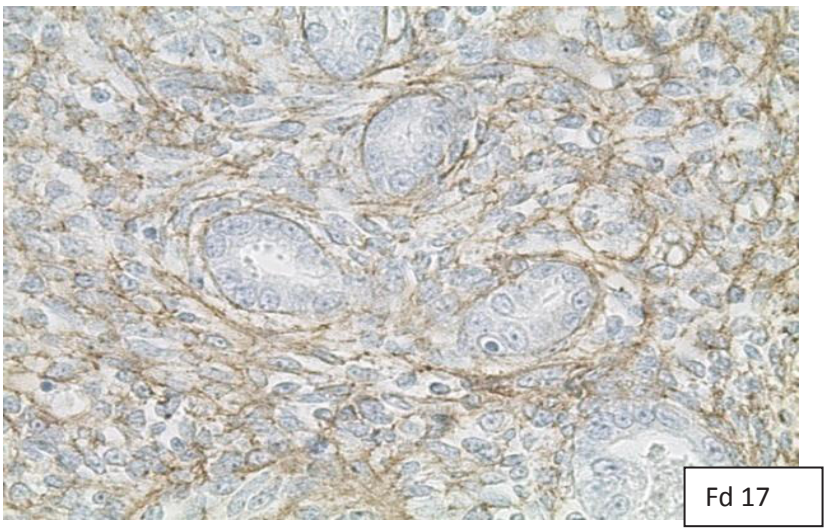


Abbildung 29
Fetaltag (Fd) 17. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 28.
Die Basalmembran der Tubuli mesonephrici zeigt auch am fd17 eine Reaktion auf Fibronektin, jedoch nicht mehr regelmäßig so kräftig wie am fd16. Kernfärbung mit Hämalaun.
Endvergrößerung 919x, 1cm d. Abb. = 11µm.

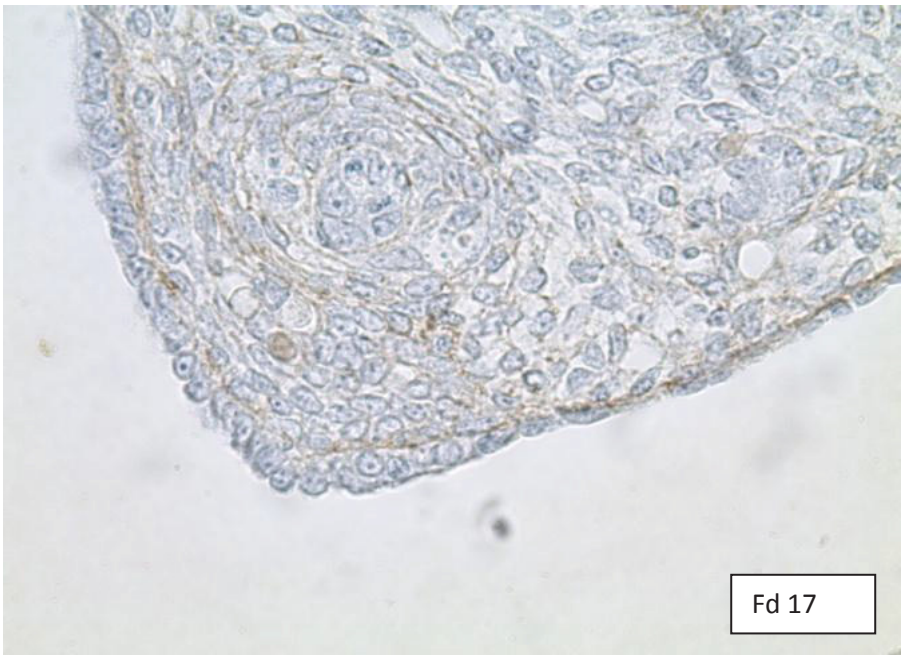


Abbildung 30
Fetaltag (Fd) 17. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 28.
Beim Müller-Gang ist weder ein Lumen zu erkennen noch eine Reaktion mit Fibronektin. Kernfärbung mit Hämalaun. Endvergrößerung 1041x, 1cm d. Abb. = 10µm.

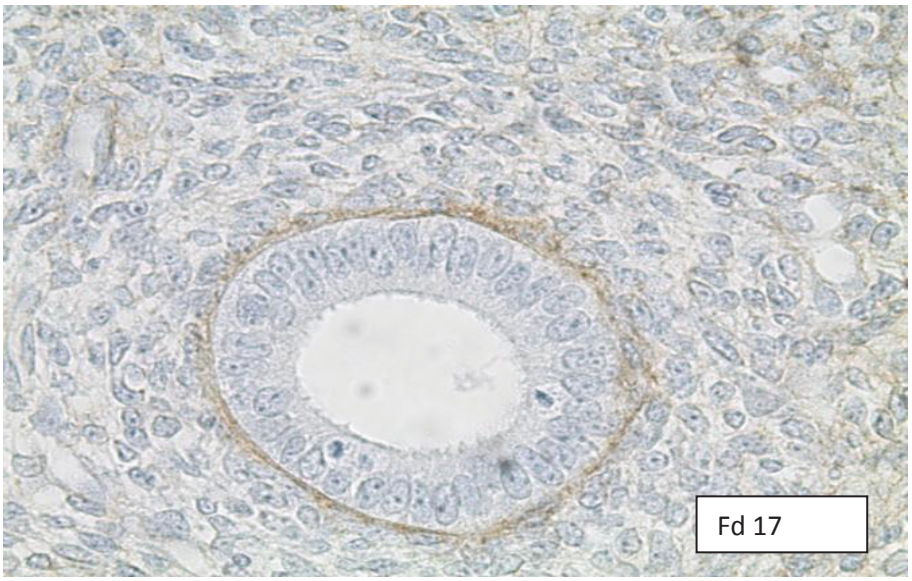


Abbildung 31
Fetaltag (Fd) 17. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 28.
Wolff-Gang ist deutlich ausgeprägt und hat eine Reaktion in seiner Basalmembran. Diese ist schwächer ausgeprägt als am fd 16, aber noch deutlich zu erkennen. Kernfärbung mit Hämalaun. Endvergrößerung 1041x, 1cm d. Abb. = 10µm.

3.2.5. Die Reaktion von Fibronektin auf die Strukturen im Mesonephros *fd 18*

Tabelle 7:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion von Fibronektin im Mesonephros am fd18

	Schnitte (n) Gesamt	Reaktion (n) vorhanden	Mittelwert	SA
Basalmembran, Tubuli mesonephrici + Stroma	10	8	1	0
Basalmembran, Wolff-Gang	10	9	2,56	0,53
Basalmembran, Müller-Gang	10	0	0	0
BMZW	10	10	1,2	0,42
BMZM	10	0	0	0
Basalmembran, Ureter	10	1	3	0

BMZW= Basalmembran des Zölomepithel Nähe Wolff-Gang
BMZM= Basalmembran des Zölomepithel Nähe Müller-Gang
SA = Standardabweichung

Insgesamt wurden 10 Schnitte aus fünf Feten ausgewertet. Aus den Ergebnissen wurde ein Mittelwert gebildet, der die Farbintensität im Durchschnitt wiedergibt. Die Standardabweichung zeigt, ob die Reaktionen starke Unterschiede aufweisen.
Der Müller-Gang ist ab dem fd18 nicht mehr vorhanden. Der Ureter ist auf einem der zehn Schnitte erkennbar. Der Wolff-Gang ist nur dort bereits differenziert zu betrachten.

Die *Tubuli mesonephrici* sind auf acht der zehn Schnitte zu erkennen. Bei allen Schnitten zeigt die Basalmembran eine Farbintensität von 1.

Im Mittel erreicht die Basalmembran des *Wolff-Gang* Epithels eine Farbintensität von 2,56 bei einer Standardabweichung von 0,53. Diese erklärt sich dadurch, dass bei vier Schnitten eine Farbintensität von 2 bewertet wurde, während die anderen sechs Schnitte mit einer Intensität von 3 bewertet wurden.
Die Basalmembran des äußeren Zölomepithels des Nebenhodens ist auf jedem der zehn Schnitte zu sehen und färbt sich nach wie vor an. Im Mittel mit einer Farbintensität von 1,2 bei einer Standardabweichung von 0,42. Bei zwei Schnitten ist die Farbintensität mit 2 stärker als bei den acht anderen Schnitten, bei denen sie bei 1 liegt.
Bei dem einen Schnitt bei dem man den Ureter erkennen kann, zeigt die Basalmembran eine starke Reaktion von 3.

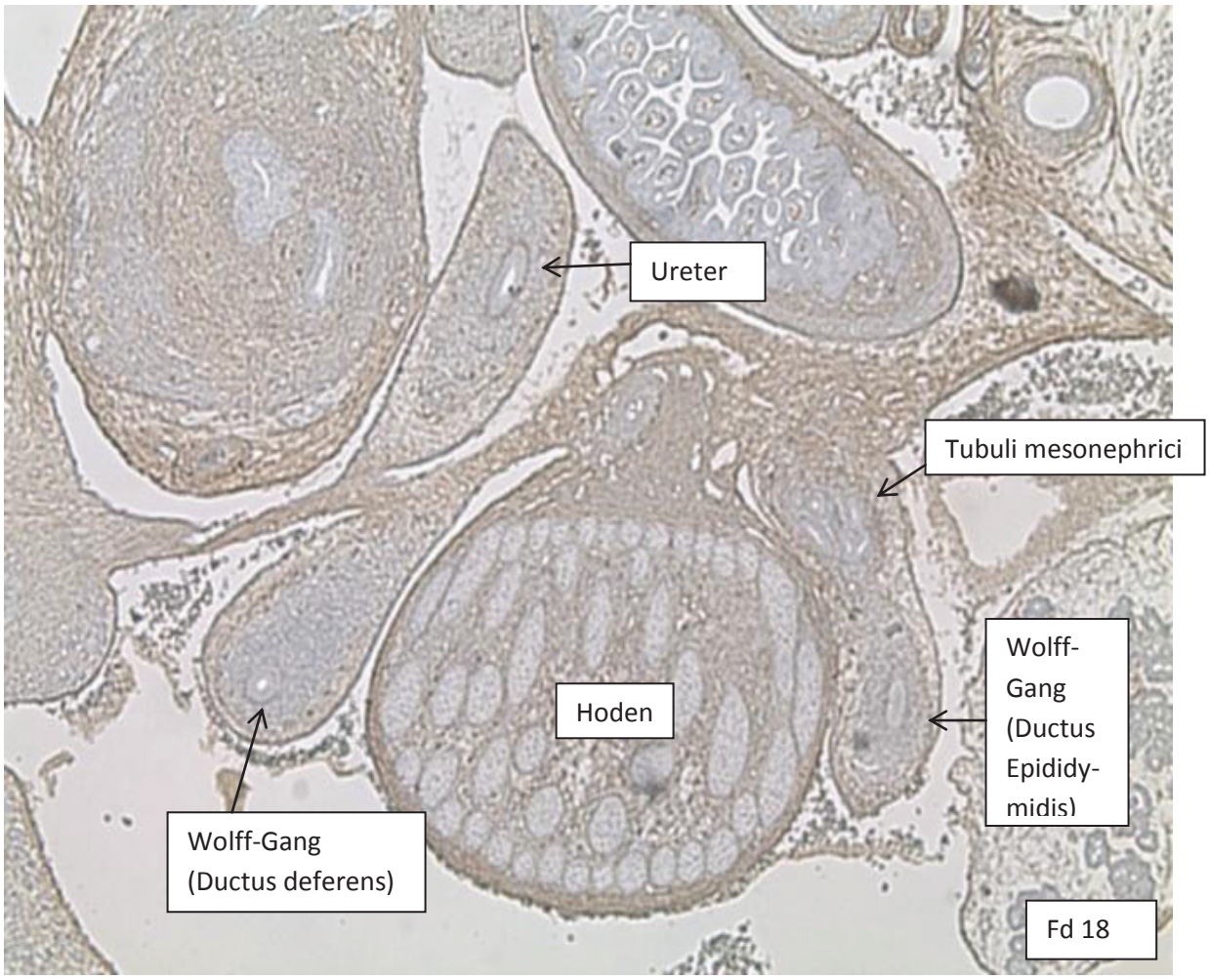


Abbildung 32
Fetaltag (Fd) 18. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun).
Übersicht über Hoden mit Mesonephros. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 110x, 1cm d. Abb. = 91µm.

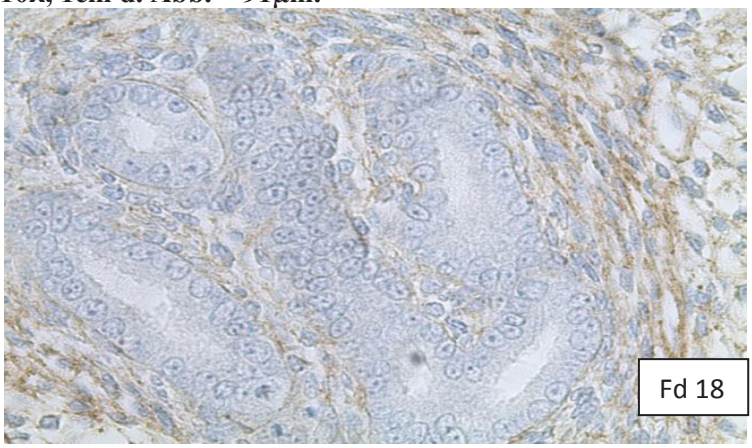


Abbildung 33
Fetaltag (Fd) 18. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 32.
Die Reaktion von Fibronektin in der Basalmembran der Tubuli mesonephrici ist am fd18 schwächer aber immer noch deutlich zu erkennen. Kernfärbung mit Hämalaun. Endvergrößerung 822x, 1cm d. Abb. = 12µm.

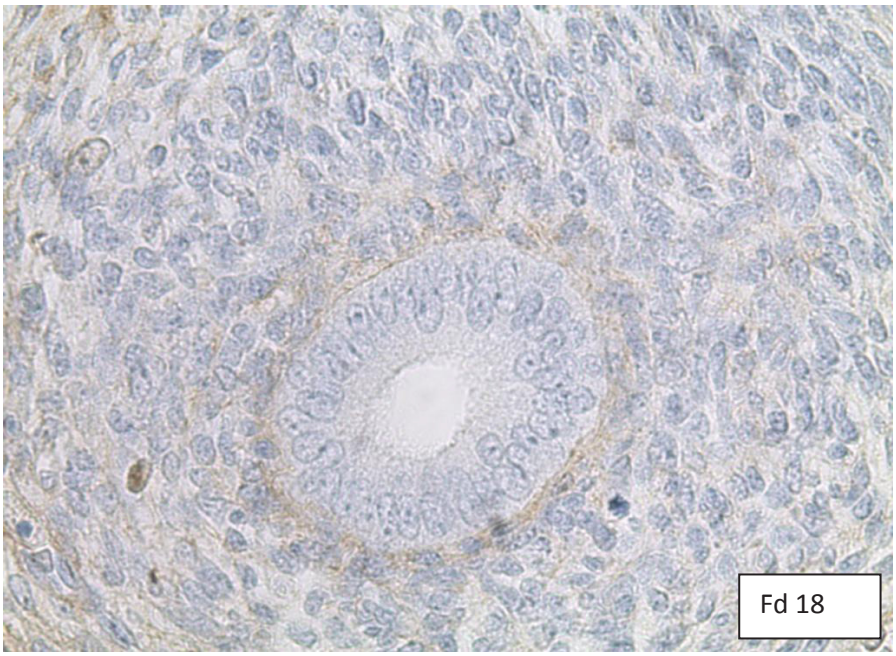


Abbildung 34
Fetaltag (Fd) 18. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 32.
Die Abbildung zeigt den Teil vom Wolff-Gang der sich zum Ductus deferens ausdifferenziert. Bei der hier dargestellten Reaktion der Basalmembran mit Fibronektin wurde eine mäßige Farbintensität erreicht. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 1041x, 1cm d. Abb. = 9µm.

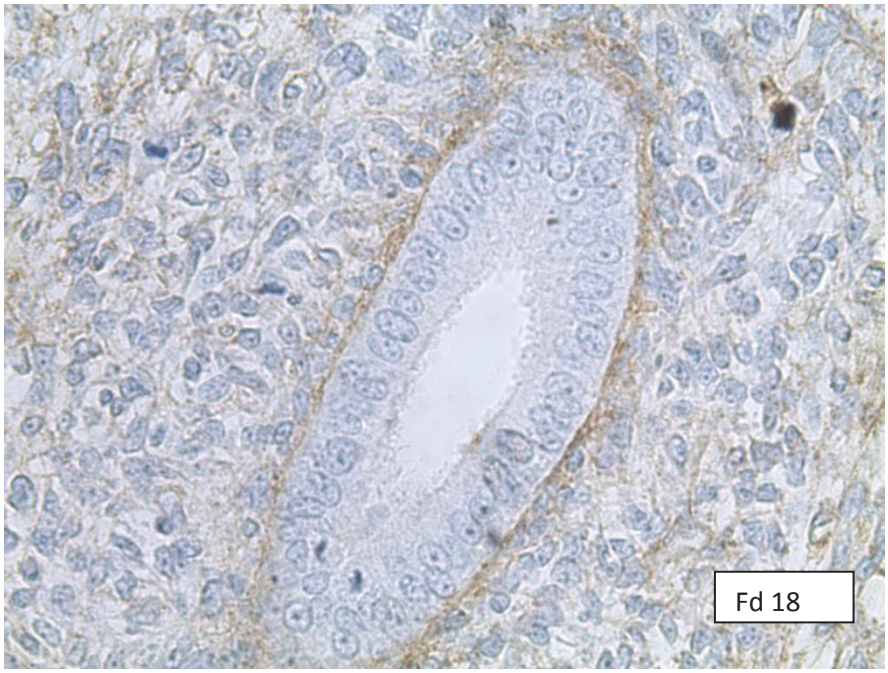


Abbildung 35
Fetaltag (Fd) 18. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 32.
Die Abbildung zeigt den Teil vom Wolff-Gang, der sich zum Ureter ausdifferenziert. Die Basalmembran des Ureters zeigt eine deutliche Reaktion auf den Antikörper von Fibronektin. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 1015x, 1cm d. Abb. = 10µm.

3.2.6. Die Reaktion von Fibronektin auf die Strukturen im Mesonephros *fd 19*

Tabelle 8:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion von Fibronektin im Mesonephros am fd19

	Schnitte (n) Gesamt	Reaktion (n) vorhanden	Mittelwert	SA
Basalmembran, Tubuli mesonephrici + Stroma	10	7	0,86	0,38
Basalmembran, Wolff-Gang	10	9	0,89	0,33
Basalmembran, Müller-Gang	10	0	0	0
BMZW	10	9	0,8	0,42
BMZM	10	0	0	0
Basalmembran, Ureter	10	9	1,89	0,33

BMZW= Basalmembran des Zölomepithel Nähe Wolff-Gang
BMZM= Basalmembran des Zölomepithel Nähe Müller-Gang
SA = Standardabweichung

Insgesamt wurden zehn Schnitte aus fünf Feten ausgewertet. Aus den Ergebnissen wurde ein Mittelwert gebildet, der die Farbintensität im Durchschnitt wiedergibt. Die Standardabweichung zeigt, ob die Reaktionen starke Unterschiede aufweisen.
Der Wolff-Gang ist am fd19 bereits komplett differenziert zu betrachten.

Die *Tubuli mesonephrici* kann man auf sieben der zehn Schnitte finden. Die Basalmembran zeigt im Durchschnitt eine Farbintensität von 0,86 bei einer geringen Standardabweichung von 0,38. Bei einem der sieben Schnitte zeigte die Basalmembran keine Reaktion. Bei den anderen Schnitten eine Reaktion mit einer Farbintensität von 1.

Der *Wolff-Gang* ist hier bereites differenziert in Ductus epididymidis, Ductus deferens und Ureter. Da sich die beiden erst genannten analog verhalten werden sie auch hier im Folgenden als Wolff-Gang bezeichnet. Der Ureter wird separat betrachtet.
Die Basalmembran des Epithels des Wolff-Gang zeigt eine gemittelte Farbintensität von 0,89 bei einer Standardabweichung von 0,33. Ein Schnitt zeigt keine Reaktion, die anderen Schnitte zeigen eine Reaktion mit der Farbintensität von 1.

Die Basalmembran des äußeren Zölomepithels des Nebenhodens zeigt eine durchschnittliche Farbintensität von 0,8 bei einer Standardabweichung von 0,41. Bei zwei Schnitten zeigte sich keine Reaktion, während bei den anderen sieben Schnitten eine Farbintensität von 1 ermittelt wurde. Die Basalmembran des Ureters weist im Mittel eine Farbintensität von 1,89 auf, bei einer geringen Standardabweichung von 0,33. Diese kommt zustande, weil einer der neun Schnitte eine geringere Farbintensität von 1 aufweist, während bei den anderen acht eine Intensität von 2 ermittelt wurde.

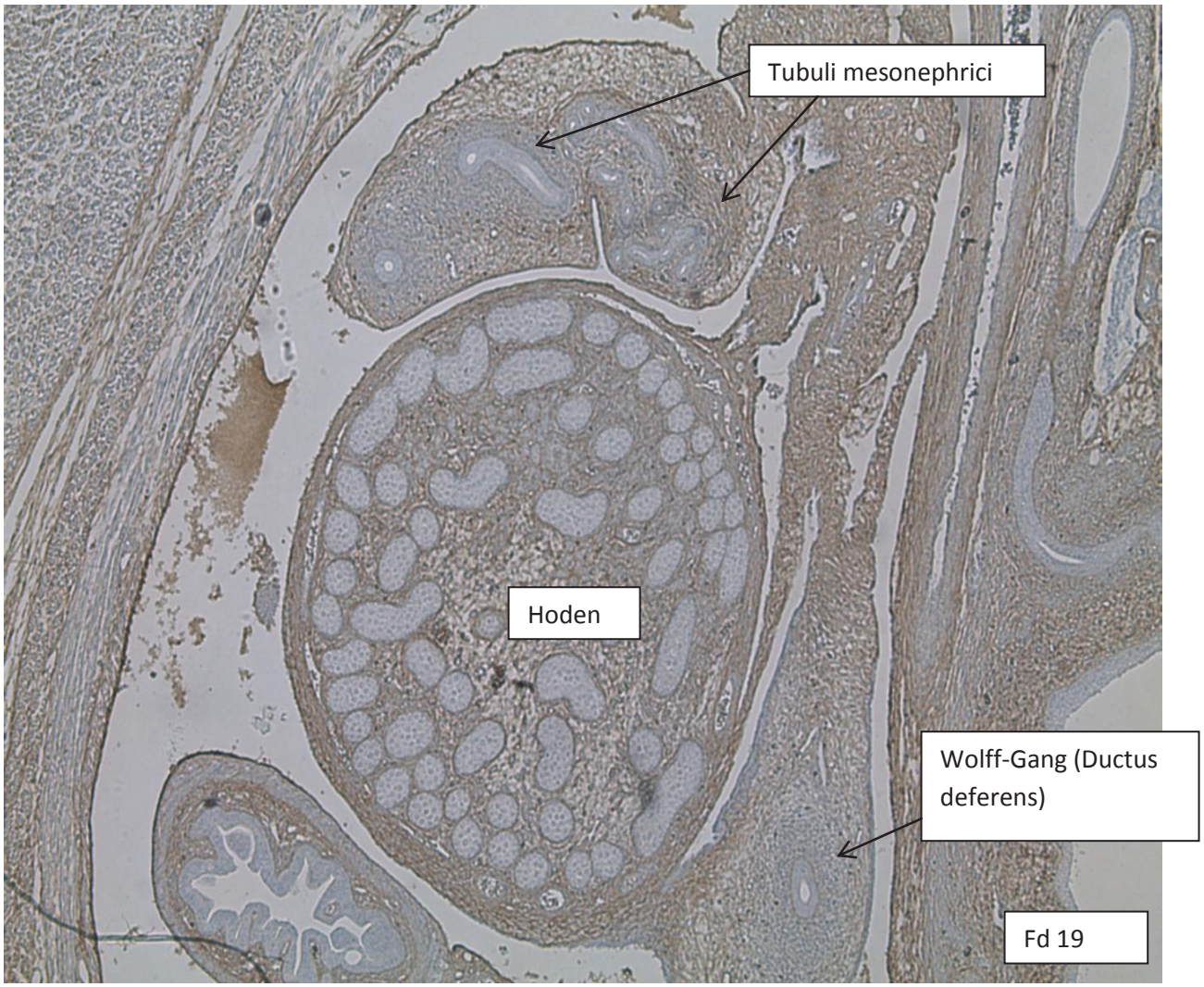


Abbildung 36
Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun). Übersicht über einen Hoden mit Mesonephros am fd 19. Der Ureter ist auf dieser Abbildung nicht zu sehen. Der Ductus deferens ist deutlich räumlich differenziert von den Tubuli mesonephrici. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 115x, 1cm d. Abb. = 87µm.

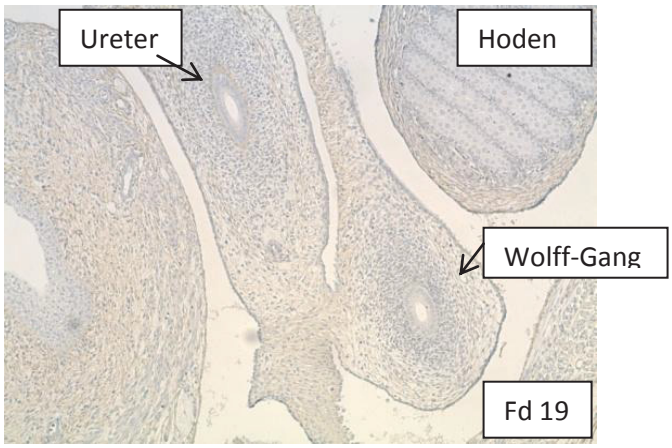


Abbildung 37

Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun).
Bei demselben Tier erkennt man bei einem Schnitt weiter kranial auch den Ureter in dem Bild.
Kernfärbung mit Hämalaun. Endvergrößerung 108x, 1cm d. Abb. = 92µm.

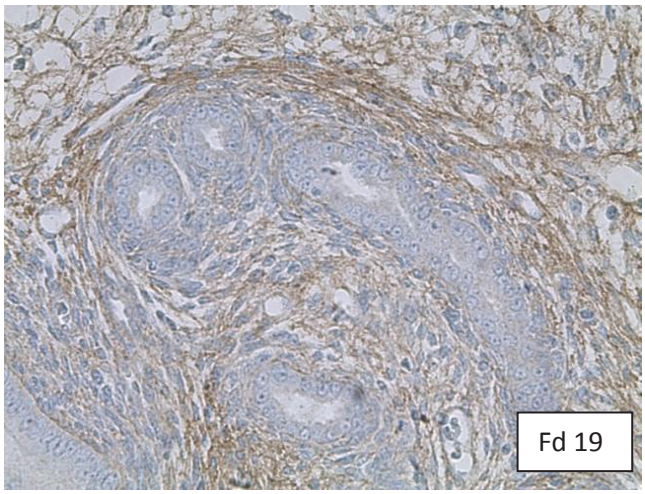


Abbildung 38

Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 36.
Die Basalmembran der Tubuli mesonephrici reagiert sehr leicht mit dem Antikörper von Fibronektin. Kernfärbung mit Hämalaun. Endvergrößerung 467x, 1cm d. Abb. = 21µm..

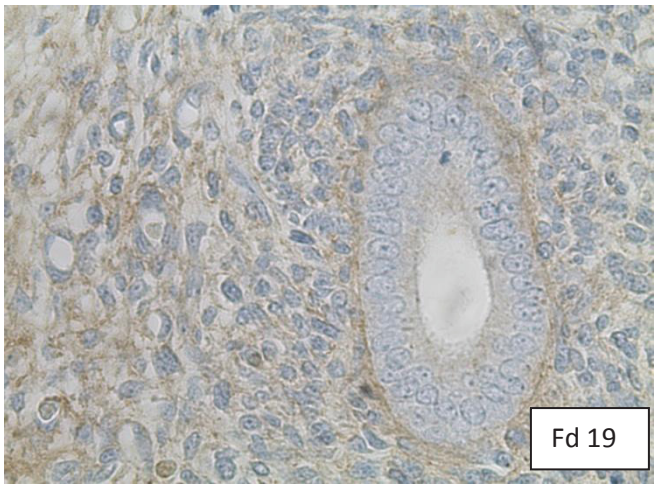


Abbildung 39
Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 36.
Die Abbildung zeigt den Teil des Wolff-Gangs der sich zum Ductus deferens aus differenziert. Die Reaktion des Fibronektins in der Basalmembran ist noch schwach zu erkennen. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 752x, 1cm d. Abb. = 13µm..

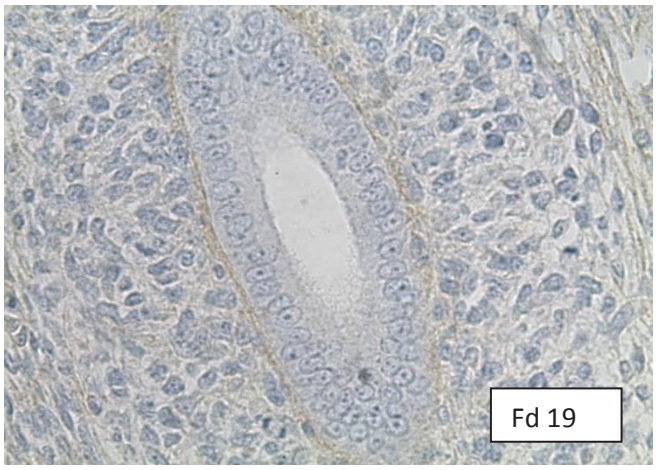


Abbildung 40
Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von Fibronektin (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 37.
Die Abbildung zeigt den Teil des Wolff-Gangs der sich zum Ureter differenziert. Die Reaktion von Fibronektin ist schwach. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 752x, 1cm d. Abb. = 13µm.

3.2.7. Zusammenfassung der Befunde über Fibronektin

Am fd16 ist die Farbintensität von Fibronektin in der Basalmembran der *Tubuli mesonephrici* am höchsten. Im Verlauf der folgenden Tage der fetalen Entwicklung nimmt die Farbintensität stetig ab.

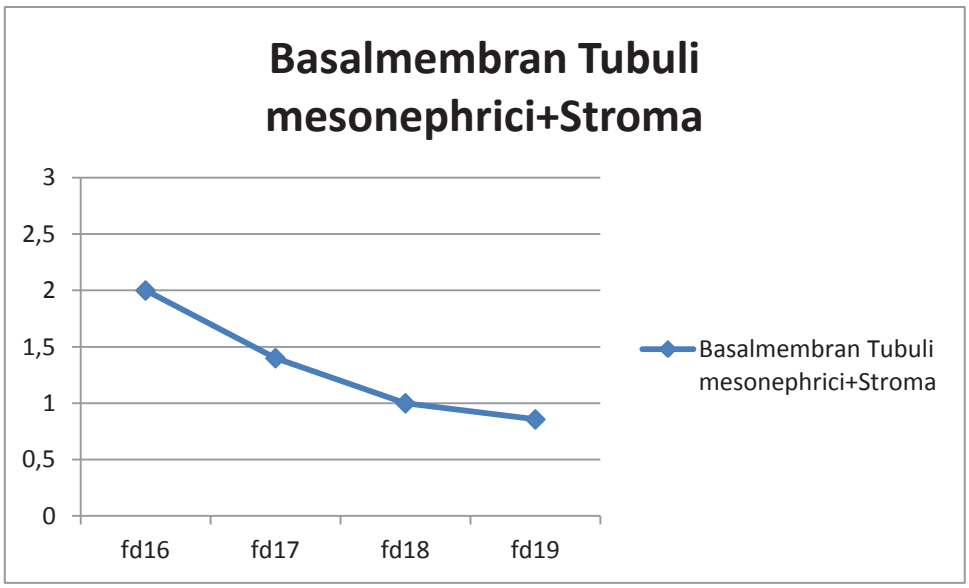


Abbildung 41
Zusammenfassung der Intensität der immunhistochemischen Reaktion von Fibronektin in der Basalmembran und dem Stroma der Tubuli mesonephrici von Fetaltag (fd) 16 - fd 19. (für Standardabweichung siehe Tabelle 4-8)

Der *Müller-Gang* ist nur bis fd18 vorhanden. Er reagiert schwach auf den Antikörper Fibronektin. Den höchsten Wert erreicht er am fd16.
Anders verhält sich die Reaktion des Fibronektin in der Basalmembran des *Wolff-Gang*. Ähnlich wie bei den Tubuli mesonephrici hat die Reaktion ihren höchsten Wert am fd16 und den niedrigsten am fd19. Dazwischen jedoch schwanken die Werte sehr stark. Am fd17 ist die Reaktion relativ gering, während sie am fd18 wieder sehr stark ist.

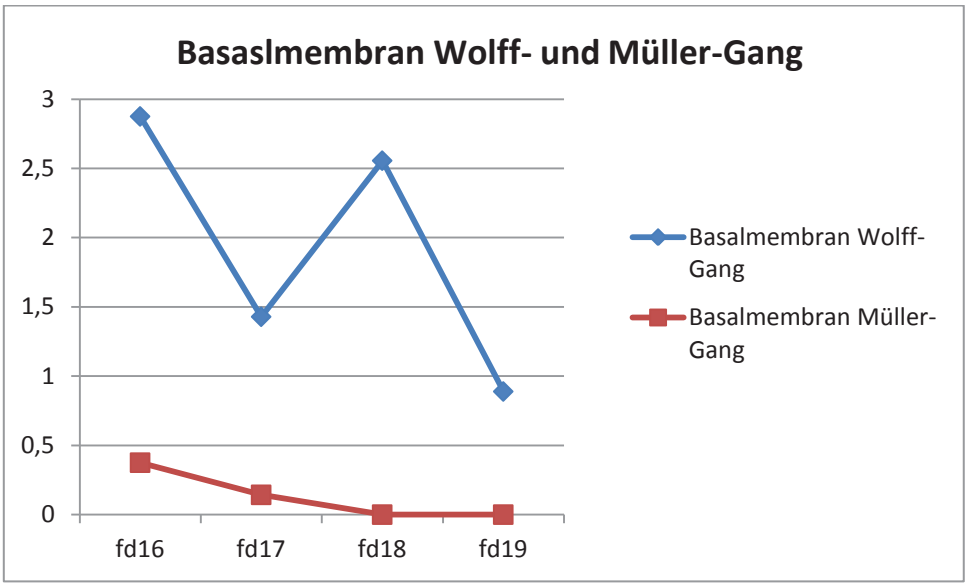


Abbildung 42
Zusammenfassung der Intensität der immunhistochemischen Reaktion von Fibronektin in der Basalmembran des Wolff-Gang und des Müller-Gang von Fetaltag (fd) 16 - fd 19. (für Standardabweichung siehe Tabelle 4-8).

Am fd18 ist die Farbintensität der Reaktion von Fibronektin im *Ureter* am höchsten. Dieses Ergebnis beruht jedoch auf nur einem Schnitt am fd18, auf dem der Ureter vorhanden ist. Die Intensität der Basalmembran am fd19 ist höher als die des Ductus deferens.

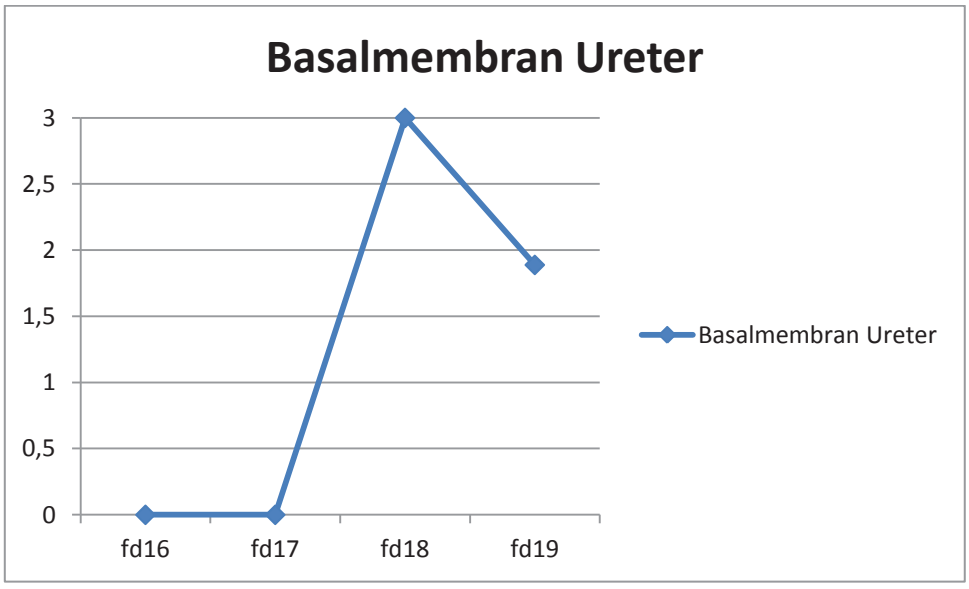


Abbildung 43
Zusammenfassung der Intensität der immunhistochemischen Reaktion von Fibronektin in der Basalmembran des Ureter von Fetaltag (fd) 16 - fd 19. (für Standardabweichung siehe Tabelle 4-8).

3.3. HGF-α und C-Met

3.3.3. Reaktion von c-Met und HGF-α auf die Strukturen im Mesonephros *fd 16*

Am fd 16 wurde im Mesonephros keine Immunreaktion des Rezeptors c-Met festgestellt. HGF-α hingegen zeigte folgende Reaktion:

Tabelle 10:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion von HGF-α im Mesonephros am fd16

		Schnitte (n) Gesamt	Reaktion (n) Vorhanden	Mittelwerte	SA
Tubuli mesonephrici:	Epithelzellkerne	8	8	0	0
	Zytoplasma	8	8	1	0
Wolff-Gang:	Epithelzellkerne	8	8	0	0
	Zytoplasma	8	8	2	0
	Mesenchymale H.	8	8	1	0
Müller Gang:	Epithelzellkerne	8	8	0	0
	Zytoplasma	8	8	1	0
	mesenchymale H.	8	8	0,13	0,35
Ureter:	Epithelzellkerne	8	0	0	0
	Zytoplasma	8	0	0	0
	Mesenchymale H.	8	0	0	0

H. = Hülle
SA = Standardabweichung

Insgesamt waren acht Schnitte aus vier Feten vorhanden. Aus den Ergebnissen wurde ein Mittelwert gebildet, der die Farbintensität im Durchschnitt wiedergibt. Die Standardabweichung zeigt, ob die Reaktionen untereinander starke Unterschiede aufweisen. Am fd16 ist der Ureter noch nicht differenziert. Er ist demnach auf keinem Schnitt zu erkennen.

Das Epithelzytoplasma der *Tubuli mesonephrici* wurde in allen Schnitten mit einer Farbintensität von 1 beschrieben. Es färbt sich insbesondere der basale Teil des Zytoplasmas an.

Im Folgenden die Reaktion des *Müller-Gang*: Sowohl beim Müller- als auch beim Wolff-Gang wurde neben der Reaktion des Epithelzytoplasmas auch die Reaktion in der mesenchymalen Hülle untersucht. Gemeint ist hiermit der Bereich, der das Ende der sich

bildenden Gangstruktur anzeigt und später gemeinsam mit der Basalmembran des Zölomepithels die Adventitia darstellt. Besonders im späteren Stadium kann man diese mesenchymale Hülle deutlich erkennen.
Das Epithelzytoplasma des Müller-Gang zeigt in jedem Schnitt eine leichte Reaktion mit einer Farbintensität von 1. Auch hier ist die Reaktion besonders am basalen Teil der Epithelzellen zu finden. Der Müller-Gang ist hier noch deutlich erhalten.
Die mesenchymale Hülle zeigte eine mittlere Farbintensität von 0,13 bei einer Standardabweichung von 0,35. Diese geringe durchschnittliche Farbintensität kommt zustande, da lediglich ein Schnitt eine leichte Reaktion auf der Höhe zeigte, wo die mesenchymalen Hülle zu erwarten ist. Alle anderen Schnitte zeigten keine Reaktion.

Beim *Wolff-Gang* kann man sehr deutlich sehen, dass sich das Zytoplasma der Epithelzellen anfärbt. Analog zu Fibronektin kann hier eine Reaktion der Basalmembran festgestellt werden. Die Reaktion ist in allen Schnitten mit einer Farbintensität von 2 beurteilt worden. Die mesenchymale Hülle ist in dieser Altersstufe nur schwach ausgeprägt und zeigt eine leichte Reaktion mit einer Farbintensität von 1.

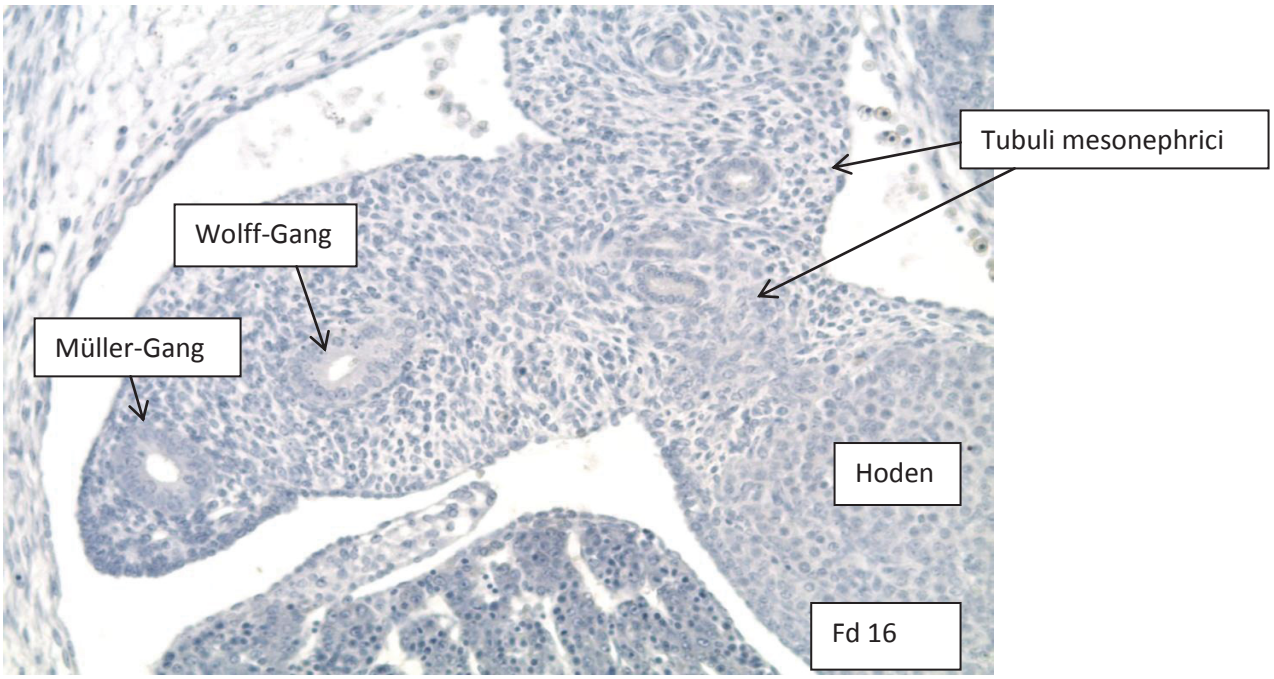


Abbildung 44

Fetaltag (Fd) 16. Immunhistochemische Reaktion von c-Met (braun).
Keine Reaktion des Antikörpers c-Met am fd16. Weder die Zellkerne der Epithelzellen, noch sonstige Zellen reagieren mit dem hier verwendeten Antikörper. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 372x, 1cm d. Abb. = 27µm.

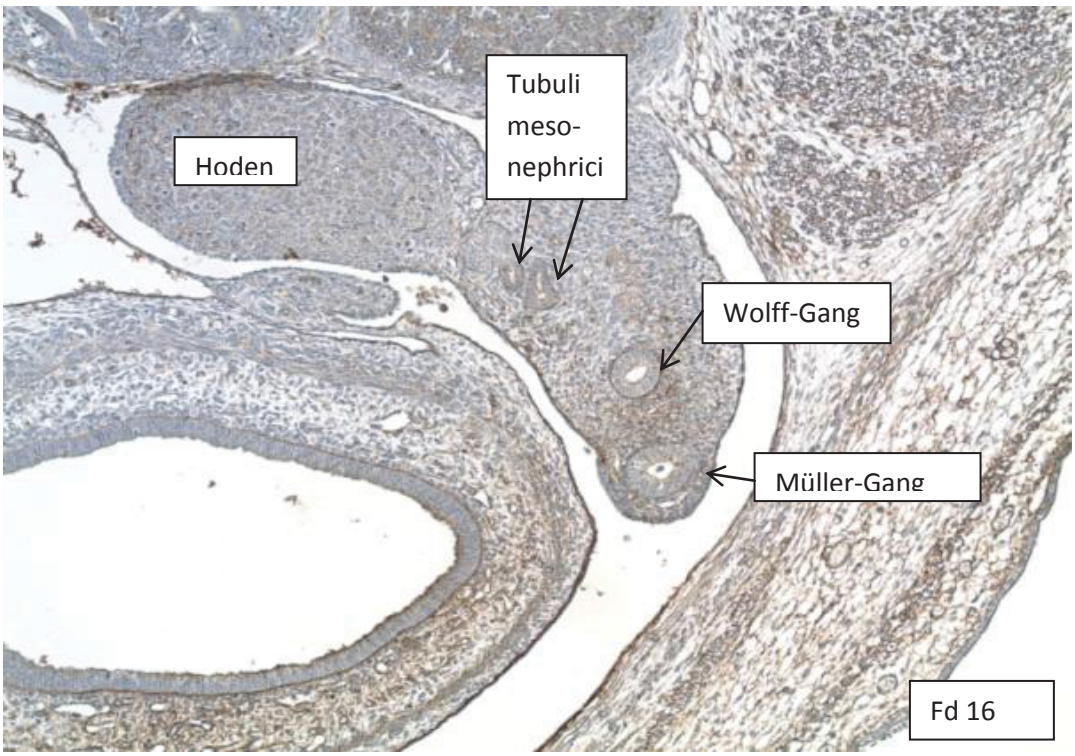


Abbildung 45

Fetaltag (Fd) 16. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun).
Übersicht über einen Hoden mit Mesonephros am fd 16. Dargestellt ist die Reaktion des Antikörpers von HGF-α. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 196x, 1cm d. Abb. = 51µm.

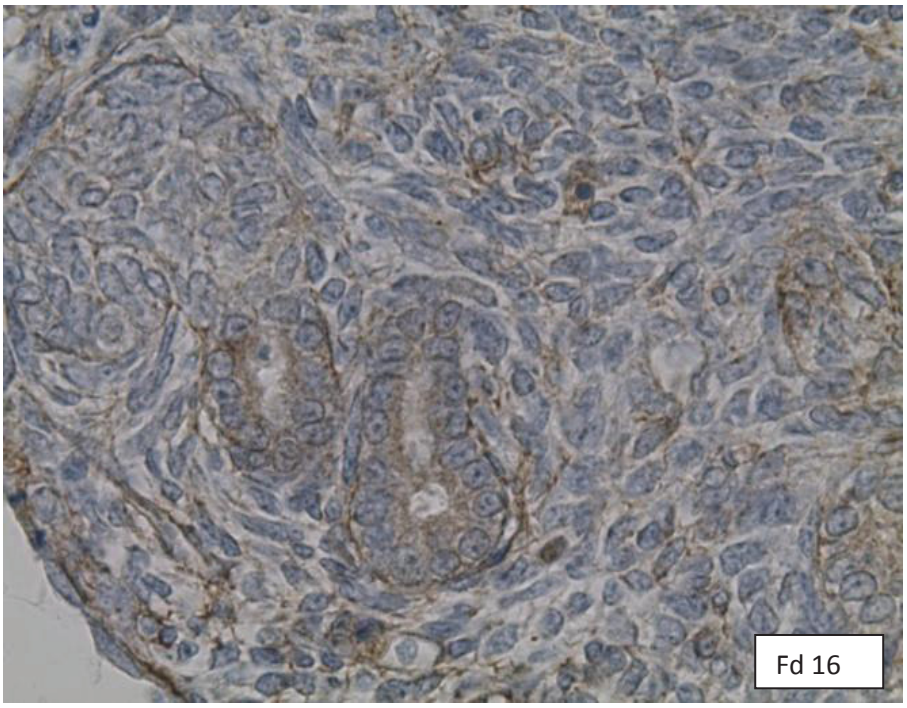


Abbildung 46
Fetaltag (Fd) 16. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 45.
Auf diesem Bild sind die Tubuli mesonephrici mit der Reaktion des Antikörpers von HGF-α zu sehen. Mit einer schwachen Intensität färbt sich das Zytoplasma der Epithelzellen an. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 673x, 1cm d. Abb. = 15µm.

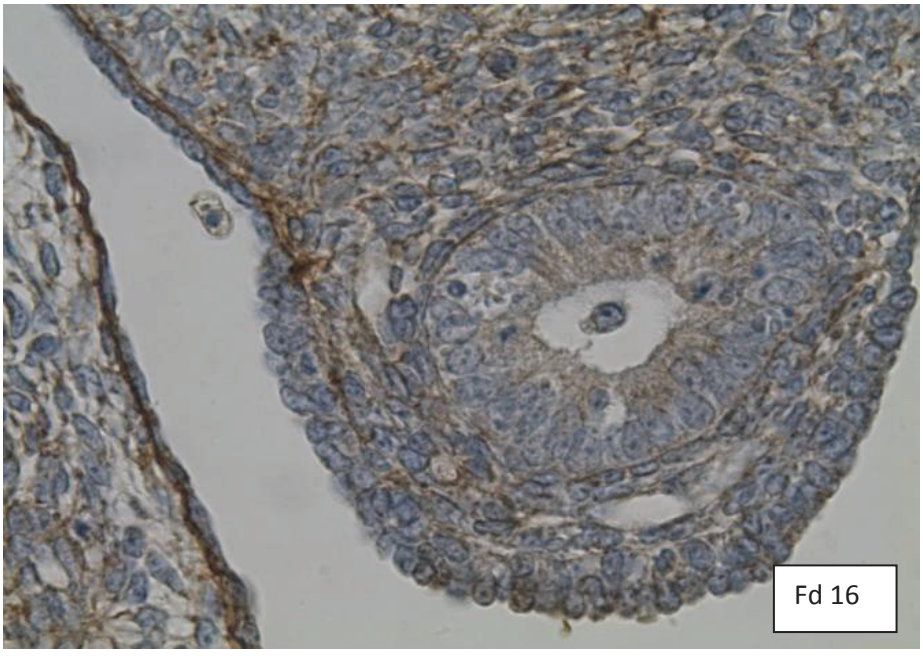


Abbildung 47
Fetaltag (Fd) 16. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 45.
Das Epithelzytoplasma des Müller-Gangs färbt sich schwach an. Die mesenchymale Hülle um den Müller-Gang herum reagiert kaum, während weiter kranial zu erkennen ist, dass die um den Wolff-Gang herum eine deutliche Reaktion zeigt. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 673x, 1cm d. Abb. = 15µm.

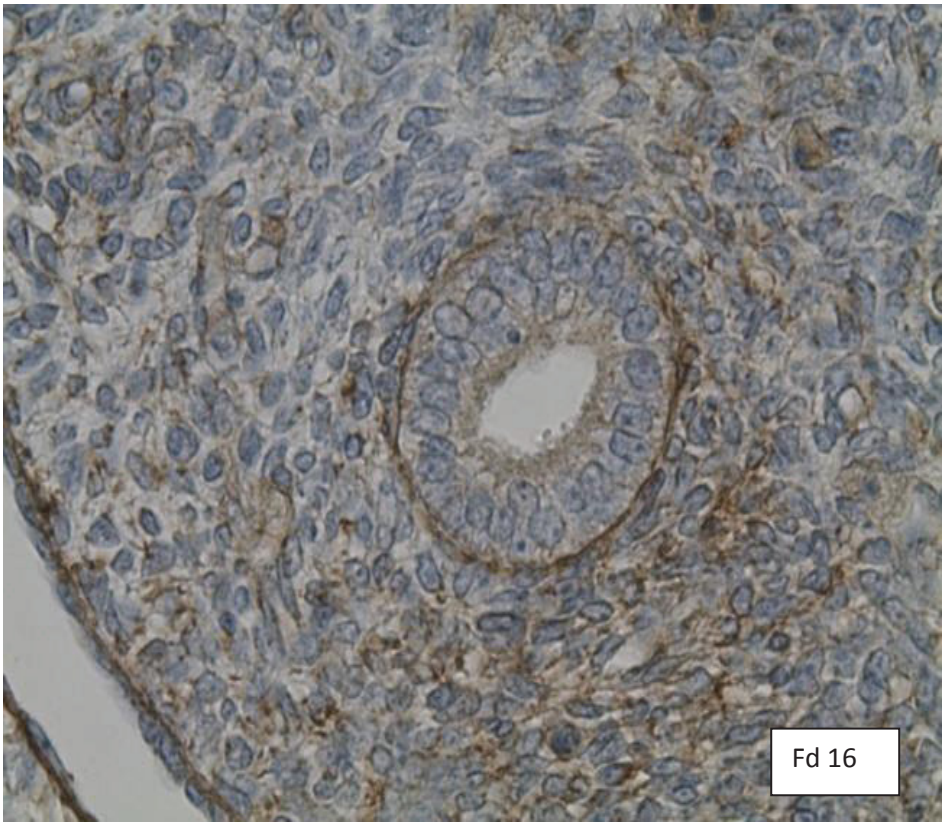


Abbildung 48
Fetaltag (Fd) 16. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 45.
Das Bild zeigt den Wolff-Gang mit der Reaktion des Antikörpers von HGF-α am fd16. Die Reaktion des Zytoplasmas ist vorhanden und die Basalmembran färbt sich ebenfalls an. Die mesenchymale Hülle reagiert nur leicht. Endvergrößerung 656x, 1cm d. Abb. = 16µm.

3.3.4. Reaktion von c-Met und HGF-α auf die Strukturen im Mesonephros fd 17

Am fd 17 wurde im Mesonephros keine Immunreaktion des Rezeptors c-Met festgestellt. HGF-α hingegen zeigt eine Reaktion:

Tabelle 11:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion von HGF-α im Mesonephros am fd17

		Schnitte (n) Gesamt	Reaktion (n) Vorhanden	Mittelwerte	SA
Tubuli mesonephrici:	Epithelzellkerne	12	11	0	0
	Zytoplasma	12	11	1	0
Wolff-Gang:	Epithelzellkerne	12	11	0	0
	Zytoplasma	12	11	2	0
	mesenchymale Hülle	12	11	1	0
Müller Gang:	Epithelzellkerne	12	12	0	0
	Zytoplasma	12	12	0,83	0,39
	mesenchymale Hülle	12	12	0	0
Ureter:	Epithelzellkerne	12	0	0	0
	Zytoplasma	12	0	0	0
	mesenchymale Hülle	12	0	0	0

SA = Standardabweichung

Insgesamt wurden 12 Schnitte ausgewertet. Aus den Ergebnissen wurde ein Mittelwert gebildet, der die Farbintensität im Durchschnitt wiedergibt. Die Standardabweichung zeigt, ob die Reaktionen untereinander starke Unterschiede aufweisen.
Da am fd17 der Ureter noch nicht differenziert ist, ist er auf keinem der Schnitte zu erkennen.

HGF-α zeigt eine Reaktion im Zytoplasma der Epithelzellen der *Tubuli mesonephrici*. Sie sind auf elf von zwölf Schnitten zu sehen. Die Farbintensität des Epithelzytoplasmas ist in jedem Schnitt 1.

Der *Müller-Gang* ist am fd17 nur noch als Rest erhalten. Auch hier zeigt der Antikörper c-Met keine Reaktion.
Der Antikörper HGF-α reagiert nur noch im Epithelzytoplasma, die mesenchymale Hülle um den Müller-Gang herum existiert nicht mehr. Der Müller-Gang ist auf allen zwölf Schnitten zu erkennen. Das Epithelzytoplasma zeigt eine mittlere Farbintensität von 0,83 bei einer

Standardabweichung von 0,39. Auf zwei der Schnitte ist keine Reaktion zu erkennen. Auf den anderen zehn kann man eine leichte Reaktion mit einer Farbintensität von 1 erkennen.
Auch am *Wolff-Gang* zeigt der Antikörper von c-Met keine Reaktion.
HGF-α hingegen zeigt eine deutliche Reaktion, die auch wieder in der Basalmembran des Gangs zu finden ist. Der Wolff-Gang ist auf 13 der 14 Schnitte vorhanden. Er zeigt im Epithelzytoplasma in jedem dieser Schnitte eine Farbintensität von 2. Die mesenchymale Hülle ist schwach und wurde in jedem Schnitt mit einer Stärke von 1 beurteilt.

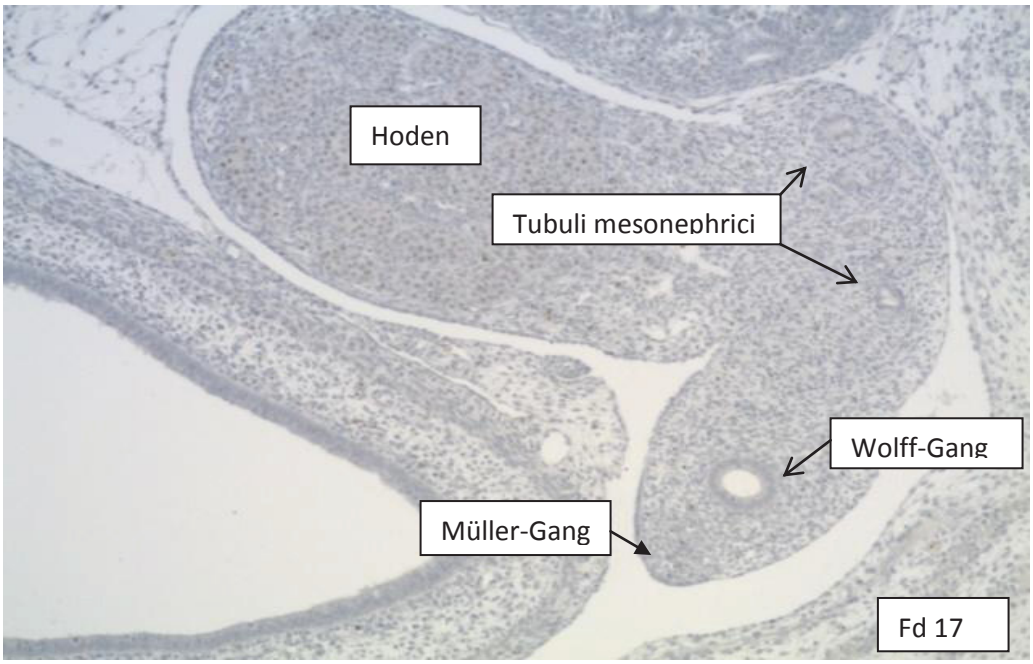


Abbildung 49
Fetaltag (Fd) 17. Immunhistochemische Reaktion von c-Met (braun).
Das Bild des Hodens mit Nebenhoden mit dem Antikörper von c-Met am fd17 zeigt keine Reaktion. Der Müller-Gang ist nicht deutlich sichtbar. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 189x, 1cm d. Abb. = 52µm.

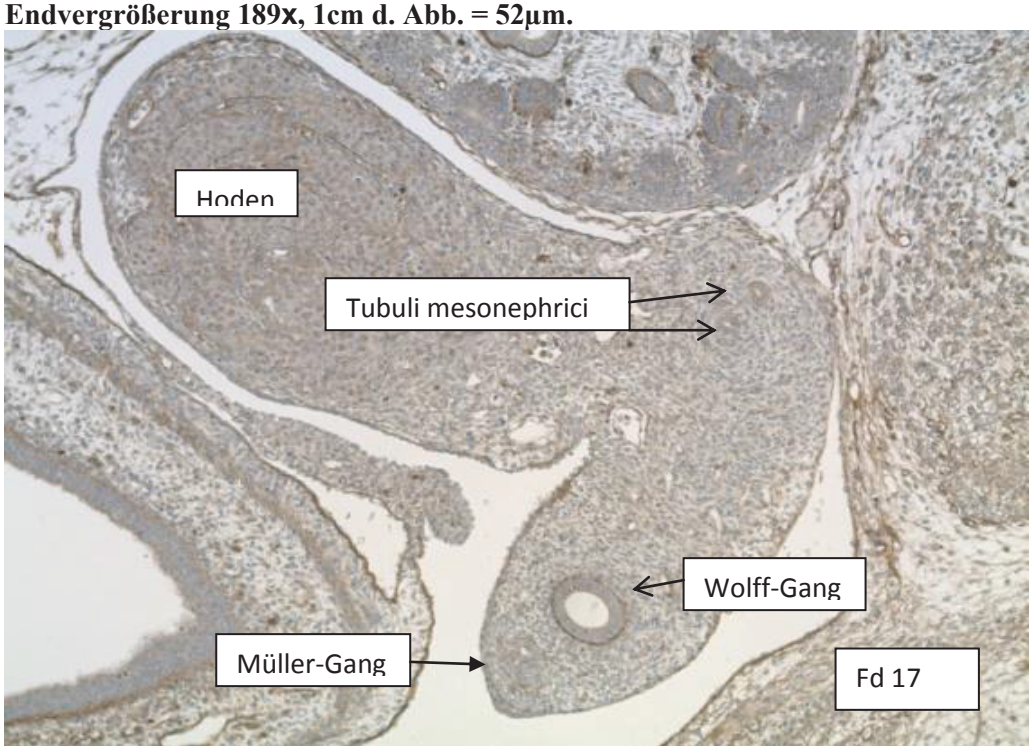


Abbildung 50
Fetaltag (Fd) 17. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun).
Das Bild zeigt eine Übersicht über Hoden mit Mesonephros eines Tieres am fd 17 mit der Reaktion des Antikörpers von HGF-α. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 187x, 1cm d. Abb. = 538µm.

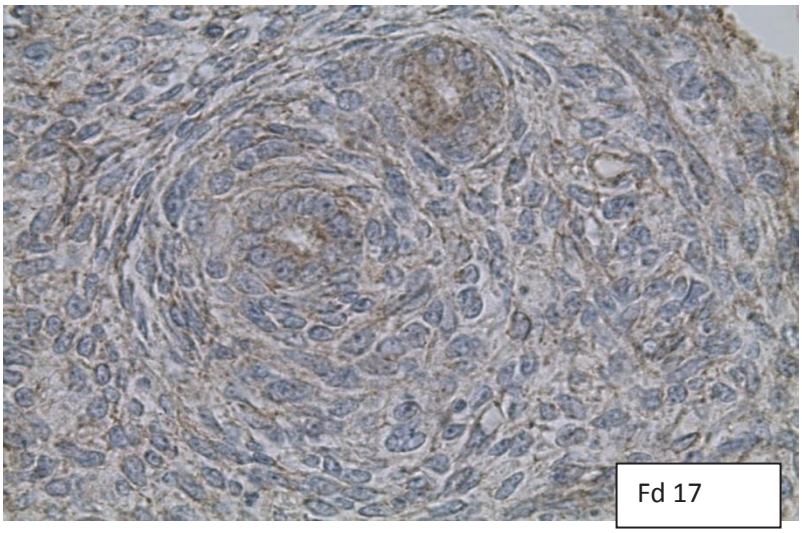


Abbildung 51
Fetaltag (Fd) 17. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Ausschnitts-Vergrößerung aus Abb. 50.
Das Zytoplasma der Tubuli mesonephrici zeigt mit dem Antikörper HGF-α am fd17 eine schwache Reaktion vor allem im Zytoplasma der Zellen. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 910x, 1cm d. Abb. = 11µm.

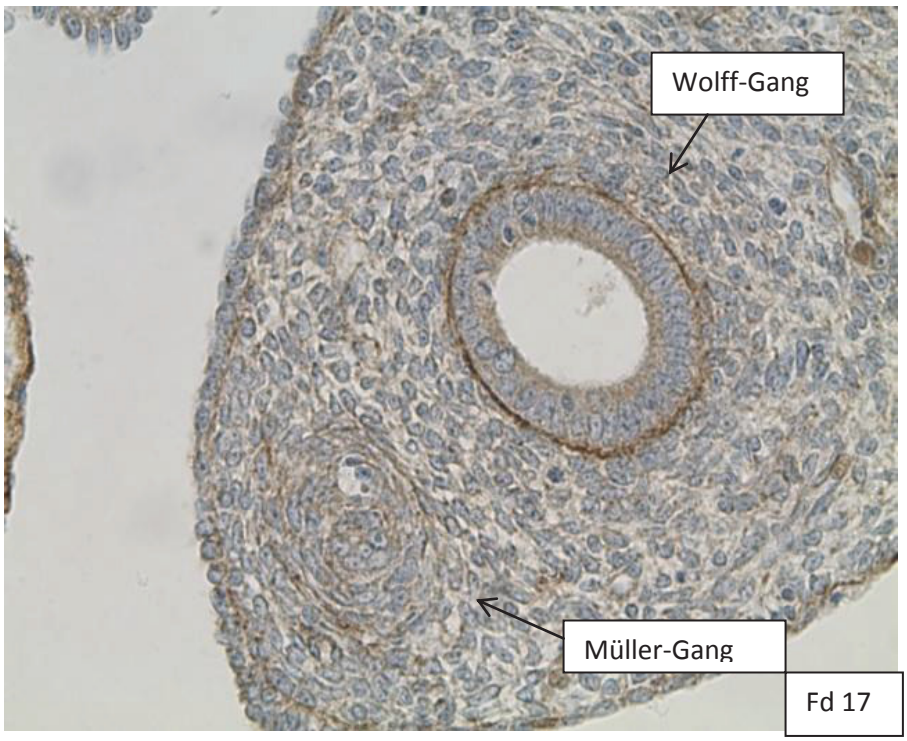


Abbildung52
Fetaltag (Fd) 17. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Ausschnitts-Vergrößerung aus Abb. 50.
Die Abbildung zeigt die Reste des Müller-Gangs und den deutlichen Wolff-Gang am fd17 mit der Reaktion des Antikörpers von HGF-α. Beim Müller-Gang sind nur zum Teil noch Epithelzellen zu erkennen, deren Zytoplasma dann leicht reagiert. Eine mesenchymale Hülle ist nicht zu erkennen.
Beim Wolff-Gang färbt sich vor allem die Basalmembran an, aber auch das Zytoplasma der Epithelzellen zeigt eine deutliche Reaktion. Die mesenchymale Hülle reagiert nur leicht. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 655x, 1cm d. Abb. = 15µm.

3.3.5. Reaktion von c-Met und HGF-α auf die Strukturen im Mesonephros fd 18

Am fd18 ist der Rezeptor c-Met auf jedem Schnitt mit einer deutlichen Reaktion im Zellkern zu erkennen. Auch HGF-α zeigt eine deutliche Reaktion.

Tabelle 12:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion von c-Met im Mesonephros am fd18

	Schnitte (n) Gesamt	Reaktion (n) vorhanden	Mittelwerte	SA
Tubuli mesonephrici: Epithelzellkerne	10		2,43	0,79
Zytoplasma	10	7	0	0
Wolff-Gang: Epithelzellkerne	10	10	2,6	0,52
Zytoplasma	10	10	0	0
mesenchymale Hülle	10		1	0,94
Müller Gang: Epithelzellkerne	10		0	0
Zytoplasma	10	0	0	0
mesenchymale Hülle	10		0	0
Ureter: Epithelzellkerne	10	4	3	0
Zytoplasma	10	4	0	0
mesenchymale Hülle	10	4	1	0,94

SA = Standardabweichung

Tabelle 13:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion von HGF-α im Mesonephros am fd18

	Schnitte (n) Gesamt	Reaktion (n) Vorhanden	Mittelwerte	SA
Tubuli mesonephrici: Epithelzellkerne	10		0	0
Zytoplasma	10	9	1,67	0,5
Wolff-Gang: Epithelzellkerne	10	10	0	0
Zytoplasma	10	10	1,7	0,67
mesenchymale Hülle	10		1,4	0,70
Müller Gang: Epithelzellkerne	10	0	0	0
Zytoplasma	10	0	0	0
mesenchymale Hülle	10		0	0
Ureter: Epithelzellkerne	10	4	0	0
Zytoplasma	10	4	3	0
mesenchymale Hülle	10	4	3	0

SA = Standardabweichung

Insgesamt wurden für beide Antikörper zehn Schnitte von jeweils fünf Feten ausgewertet. Aus den Ergebnissen wurde ein Mittelwert gebildet, der die Farbintensität im Durchschnitt wiedergibt. Die Standardabweichung zeigt, ob die Reaktionen untereinander starke Unterschiede aufweisen.
Am fd18 ist der Wolff-Gang noch nicht in allen Schnitten differenziert, so dass der Ureter noch nicht in jedem Schnitt vorhanden ist.
Der Müller-Gang hat sich am fd18 bereits zurückgebildet, so dass er auf keinem der Schnitte zu sehen ist.

Die *Tubuli mesonephrici* sind auf sieben von zehn Schnitten, die mit dem Antikörper c-Met gefärbt wurden zu erkennen. Bei denen die mit HGF-α gefärbt wurden sind es sogar neun der zehn Schnitte. Die Reaktion von c-Met findet im Kern der Epithelzellen statt.
Durchschnittlich weisen die Epithelzellkerne eine Farbintensität von 2,43 bei einer sehr hohen Standardabweichung von 0,79 auf. Die Reaktion ist zwischen den Schnitten sehr unterschiedlich. Viermal wurde eine Farbintensität von 3 ermittelt, zweimal eine von 2 und in einem Schnitt nur von 1.
Auch HGF-α zeigt eine deutliche Reaktion. Das Epithelzytoplasma wurde mit einer durchschnittlichen Farbintensität von 1,67 bei einer Standardabweichung von 0,5 bewertet. Auf sechs Schnitten ist die Stärke 2, während sie auf den übrigen drei Schnitten nur 1 ist.

Der *Wolff-Gang* ist sowohl bei den mit dem Antikörper c-Met gefärbten Schnitten, als auch bei den mit dem Antikörper von HGF-α gefärbten Schnitten auf allen Schnitten vorhanden. Der Antikörper von c-Met reagiert auch hier im Kern der Epithelzellen. Die durchschnittlich erreichte Farbintensität beträgt 2,6 bei einer Standardabweichung von 0,52. Auch hier sind Unterschiede zwischen den Schnitten zu vermerken. Vier der Schnitte zeigen eine Farbintensität von 2 während die restlichen sechs eine Stärke von 3 zeigen.
Auch die mesenchymale Hülle zeigt Reaktionen in den Zellkernen der Stromazellen und Myofibroblasten. Es zeigt sich im Mittel eine Farbintensität von 1 bei einer Standardabweichung von 0,94. Während bei vier Schnitten keine Reaktion in der mesenchymalen Hülle zu erkennen war, zeigten vier Schnitte eine Reaktion mit der Stärke von 2. Zwei Schnitte zeigten eine Reaktion mit der Stärke von 1.
Der Antikörper von HGF-α reagiert auch hier im Zytoplasma der Epithelzellen und zeigt die definierte mesenchymale Hülle jetzt deutlich. Das Epithelzytoplasma zeigt eine durchschnittliche Farbintensität von 1,7 bei einer Standardabweichung von 0,67. Vier

Schnitte haben eine leichte Farbintensität von 1, fünf Schnitte eine Stärke von 2 und ein Schnitt reagiert etwas stärker mit einer Farbintensität von 3. Die mesenchymale Hülle reagiert im Mittel mit einer Farbintensität von 1,4. Die Standardabweichung ist hier 0,7. Dieselben vier Schnitte, die bei dem Epithelzytoplasma eine leichte Farbintensität von 1 zeigten, zeigen diese auch bei der mesenchymalen Hülle. Fünf Schnitte reagieren mit einer Stärke von 2 und ein Schnitt hat keine Reaktion an der mesenchymalen Hülle.

Der Ureter ist auf vier der zehn Schnitte zu erkennen. Auf diesen gibt es bei der Reaktion mit c-Met keine Unterschiede zwischen den Schnitten. Alle zeigen eine Farbintensität von 3. Die mesenchymale Hülle des Ureters hat bei Ermittlung der Farbintensität dieselbe Reaktion wie der restliche Wolff-Gang.

Der Ureter reagiert mit dem Antikörper von HGF-α im Verhältnis zum Rest des Wolff-Gangs stärker. Er zeigt in jedem Schnitt sowohl bei den Epithelzellen als auch bei der mesenchymalen Hülle eine Farbintensität von 3.

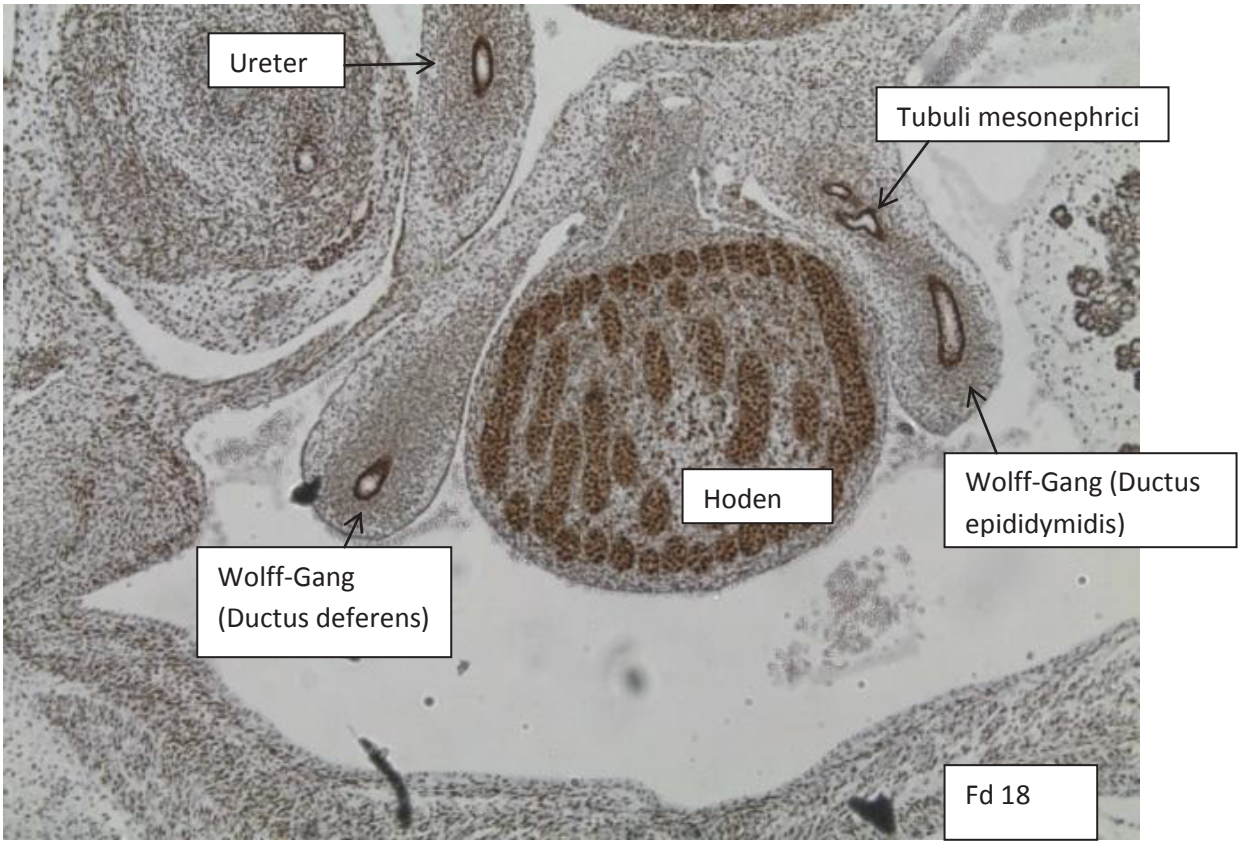


Abbildung 54

Fetaltag (Fd) 18. Immunhistochemische Reaktion von c-Met (braun).
Die Abbildung zeigt eine Übersicht über einen Hoden mit Mesonephros am fd 18 mit der Reaktion von c-Met. Am fd18 ist die Reaktion von c-Met sehr stark. Die Reaktion ist neben den Epithelzellen auch in den Zellen des mesenchymalen Bindegewebes zu erkennen. Hier ist sie jedoch schwächer. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 113x, 1cm d. Abb. = 89µm.

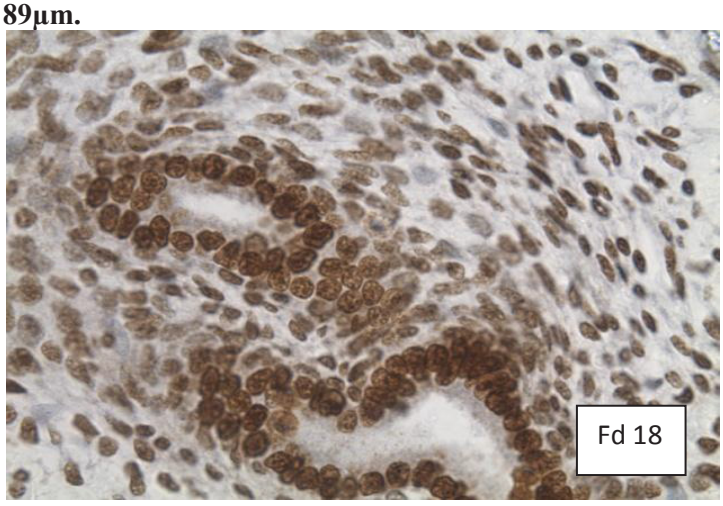


Abbildung 55

Fetaltag (Fd) 18. Immunhistochemische Reaktion von c-Met (braun). Ausschnitts-Vergrößerung aus Abb. 54.
Die Abbildung zeigt die Tubuli mesonephrici mit starker Reaktion auf den Antikörper von c-Met. Auch die Zellkerne der Stromazellen reagieren. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 639x, 1cm d. Abb. = 16µm.

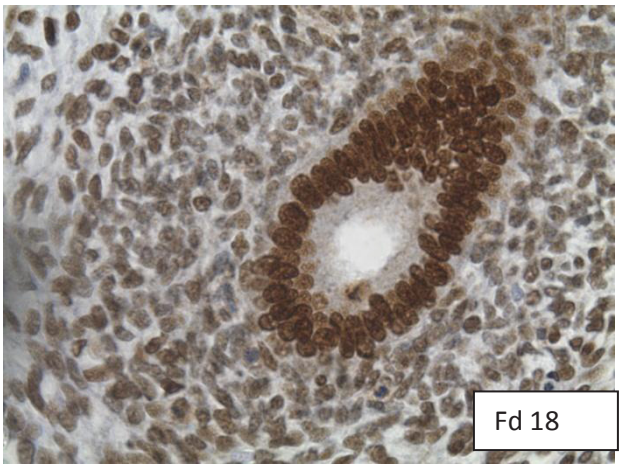


Abbildung 56

Fetaltag (Fd) 18. Immunhistochemische Reaktion von c-Met (braun). Ausschnitts-Vergrößerung aus Abb. 54.

Die Abbildung zeigt die Reaktion des Mesonephros mit dem Antikörper von c-Met am fd18. Die Reaktion der Epithelzellkerne ist sehr ausgeprägt. Die Zellen des mesenchymalen Bindegewebes zeigen ebenfalls eine Reaktion, die jedoch schwächer ist als die der Epithelzellkerne. Auf dem Bild kann man erkennen, dass im Bereich der definierten mesenchymalen Hülle die Zellkerne des Mesenchyms stärker Reagieren und diese somit deutlich abgrenzt. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 708x, 1cm d. Abb. = 14µm.

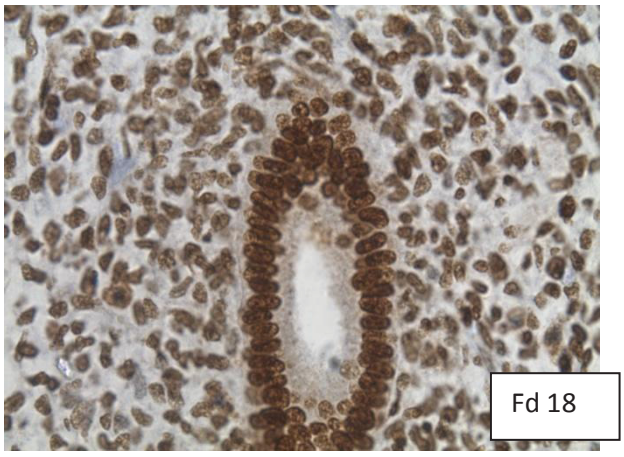


Abbildung 57

Fetaltag (Fd) 18. Immunhistochemische Reaktion von c-Met (braun). Ausschnitts-Vergrößerung aus Abb. 54.

Auf diesem Bild ist die Reaktion von c-Met mit dem Ureter am fd18 zu erkennen. Die Kerne der Epithelzellen reagieren ebenso kräftig wie die des Ductus deferens. Auch hier reagieren die Zellen des mesenchymalen Bindegewebes weniger kräftig als die Zellen des Epithels. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 691x, 1cm d. Abb. = 14,5µm.

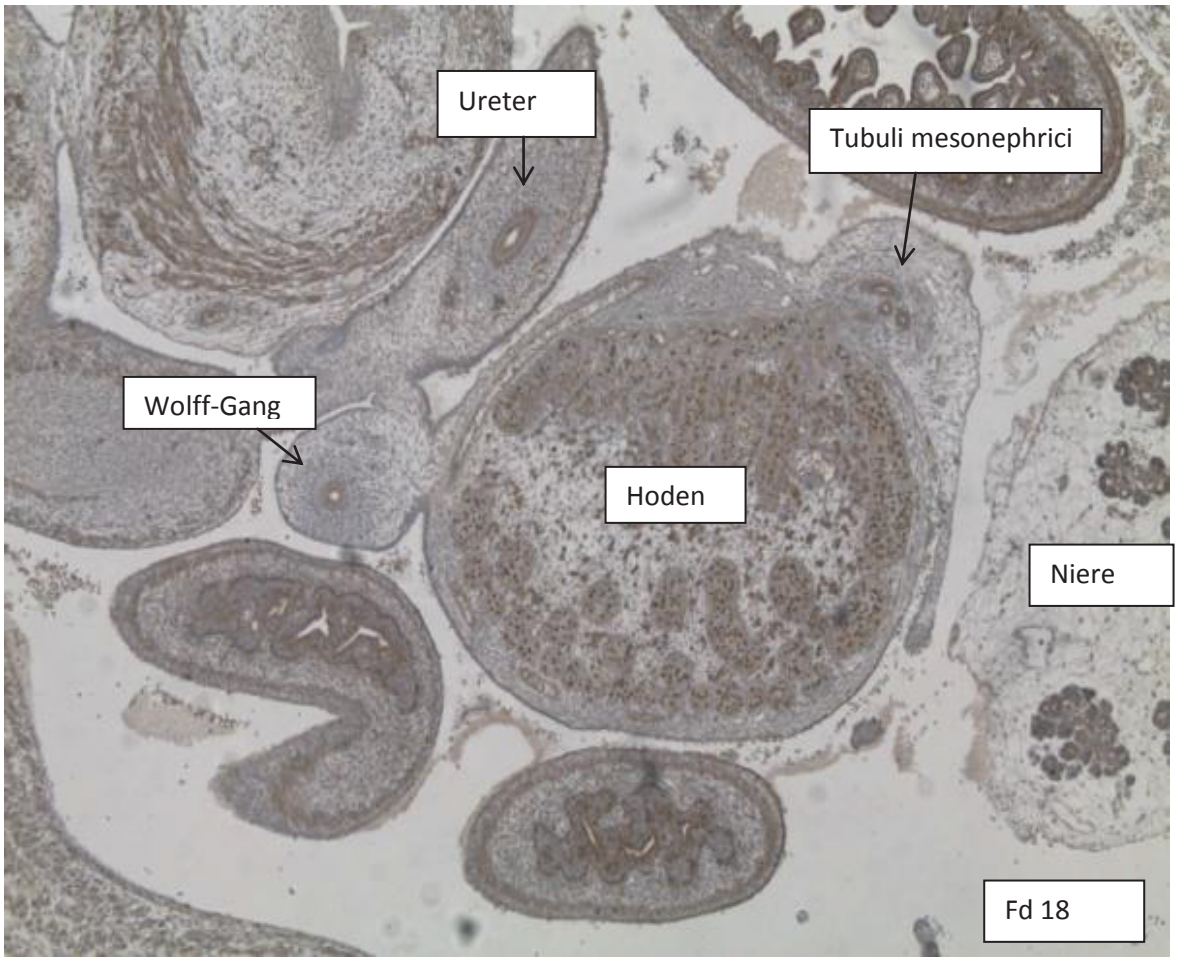


Abbildung58

Fetaltag (Fd) 18. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun).
Die Abbildung zeigt eine Übersicht über einen Hoden mit Mesonephros eines Tieres am fd 18 mit Reaktion auf den Antikörper von HGF-α. Neben dem Mesonephros erkennt man hier, dass auch die Zellen im Hoden reagieren. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 107x, 1cm d. Abb. = 93µm.

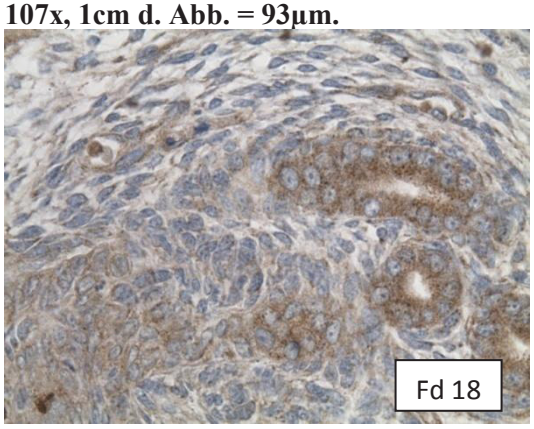


Abbildung 59

Fetaltag (Fd) 18. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 58.
Die Abbildung zeigt die Tubuli mesonephrici bei der Reaktion mit dem Antikörper HGF-α am fd18. Die Reaktion ist sehr deutlich zu erkennen. Die Reaktion ist auch zum Teil im Zytoplasma der mesenchymalen Zellen zu sehen ist. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 603x, 1cm d. Abb. = 17µm.

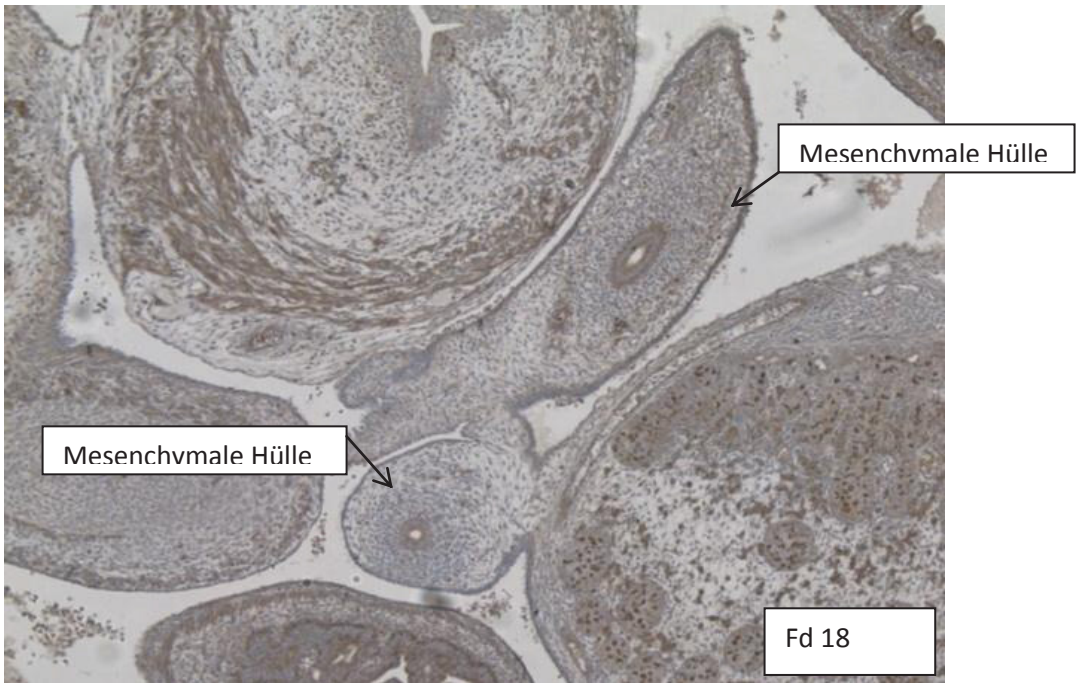


Abbildung 60
Fetaltag (Fd) 18. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 58.
Der Wolff-Gang ist hier auch räumlich bereits deutlich aufgeteilt in Ureter und Ductus deferens. Das Zytoplasma der Epithelzellen zeigt eine klar erkennbare Reaktion. Die Basalmembran reagiert nicht mehr. Man kann durch die Formierung der mesenchymalen Zellen um den Wolff-Gang herum nun deutlich die definierte mesenchymale Hülle erkennen. Sie reagiert hier nur vereinzelt sehr schwach. Um den Ureter herum scheint auf dem Bild stärkere Reaktion der mesenchymalen Hülle zu sein. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 172x, 1cm d. Abb. = 58µm..

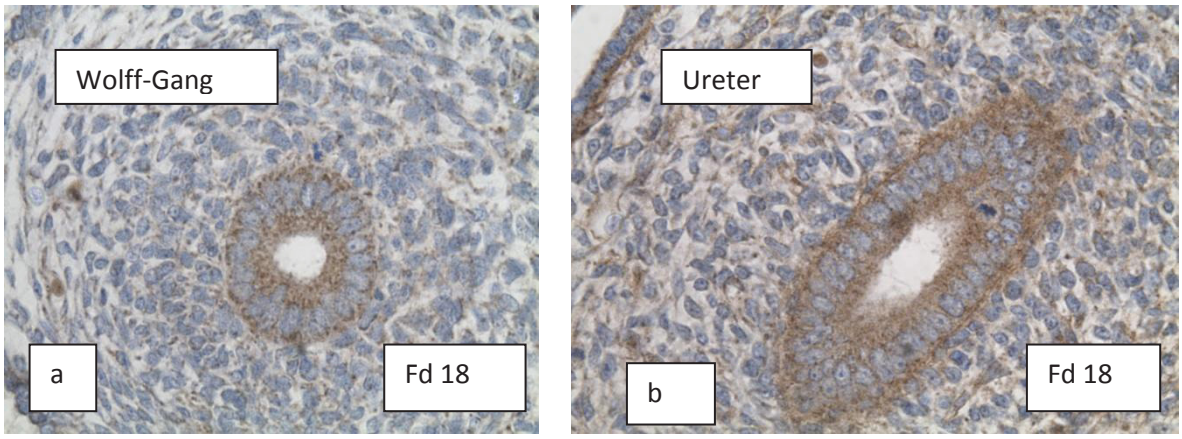


Abbildung 61 a + b
Fetaltag (Fd) 18. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 58.
Der Ureter (b) reagiert im Epithelzytoplasma stärker mit dem Antikörper von HGF als der Ductus deferens (a). Auch die mesenchymale Hülle scheint sich hier stärker abzubilden (s.o.). Vereinzelt kann man auch Reaktionen des Zytoplasmas von Mesenchymzellen erkennen. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 621x, 1cm d. Abb. = 16µm.

3.3.6. Reaktion von c-Met und HGF-α auf die Strukturen im Mesonephros fd 19

Am Fetaltag (fd) 19 ist eine Reaktion von sowohl dem Rezeptor c-Met, als auch von HGF-α zu erkennen.

Tabelle 14:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion von c-Met im Mesonephros am fd19

		Schnitte (n) Gesamt	Reaktion (n) vorhanden	Mittelwert	SA
Tubuli mesonephrici:	Epithelzellkerne	10		0,67	0,5
	Zytoplasma	10	9	0	0
Wolff-Gang:	Epithelzellkerne	10	10	0,9	0,57
	Zytoplasma	10	10	0	0
	mesenchymale Hülle	10		0	0
Müller Gang:	Epithelzellkerne	10		0	0
	Zytoplasma	10	0	0	0
	mesenchymale Hülle	10		0	0
Ureter:	Epithelzellkerne	10	10	0,9	0,57
	Zytoplasma	10	10	0	0
	mesenchymale Hülle	10	10	0	0

SA = Standardabweichung

Tabelle 15:
Zusammenfassung der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion von HGF-α im Mesonephros am fd19

		Schnitte (n) Gesamt	Reaktion (n) Vorhanden	Mittelwerte	SA
Tubuli mesonephrici:	Epithelzellkerne	12	9	0	0
	Zytoplasma	12	9	1,89	0,33
Wolff-Gang:	Epithelzellkerne	12	12	0	0
	Zytoplasma	12	12	2	0
	mesenchymale Hülle	12	12	2,42	0,53
Müller Gang:	Epithelzellkerne	12	0	0	0
	Zytoplasma	12	0	0	0
	mesenchymale Hülle	12	0	0	0
Ureter:	Epithelzellkerne	12	12	0	0
	Zytoplasma	12	12	3	0
	mesenchymale Hülle	12	12	2,17	0,39

SA = Standardabweichung

Insgesamt waren am fd19 bei der Färbung mit dem Antikörper c-Met zehn Schnitte aus sechs Feten vorhanden, während es bei HGF-α zwölf aus sechs Feten waren.
Die beschriebenen Strukturen wurden ausgewertet und aus den Ergebnissen wurde ein Mittelwert gebildet, der die Farbintensität im Durchschnitt wiedergibt. Die Standardabweichung zeigt, ob die Reaktionen untereinander starke Unterschiede aufweisen. Der Müller-Gang ist auf keinem der Schnitte zu sehen, während der Wolff-Gang und der Ureter auf allen Schnitten zu sehen sind. Die Tubuli mesonephrici sind jeweils auf neun der Schnitte zu erkennen.

In den *Tubuli mesonephrici* zeigte der Antikörper c-Met auch am fd19 eine nukleäre Reaktion. Diese ist jedoch deutlich schwächer als am fd18. Die Farbintensität beträgt im Durchschnitt 0,67, die Standardabweichung 0,5. Sechs der neun Schnitte reagieren mit einer Stärke von 1, einer zeigt keine Reaktion. Der Antikörper von HGF-α zeigt ebenfalls eine Reaktion. Im Mittel färbt sich das Epithelzytoplasma der Tubuli mesonephrici mit einer Stärke von 1,89 an. Die Standardabweichung von 0,33 ist sehr gering. Ein Schnitt reagierte mit einer Farbintensität von 1 geringer als alle anderen Schnitte, die eine Stärke von 2 aufweisen.

Der *Wolff-Gang* ist zu diesem Zeitpunkt bereits differenziert und die verschiedenen Anteile sind deutlich zu erkennen. Da wie oben bereits erläutert der Ductus deferens analog zum Ductus epididymidis reagiert, werden diese weiterhin unter dem Begriff Wolff-Gang zusammengefasst. Der Ureter wird differenziert betrachtet.
Der Rezeptor c-Met ist im Kern der Epithelzellen zu finden. Er reagiert am fd19 mit einer mittleren Farbintensität von 0,9 bei einer Standardabweichung von 0,57. Sieben der zehn Schnitte reagieren mit einer Farbintensität von 1. Zwei haben keine Reaktion, während ein Schnitt eine stärkere Reaktion von 2 zeigt.
Der Ureter zeigt eine genau gleiche Reaktion wie der Ductus deferens.

Die Reaktion des Antikörpers HGF- α ist deutlich kräftiger. Das Zytoplasma der Epithelzellen färbt sich in allen Schnitten mit einer Farbintensität von 2 an. Jedoch ist die basal verstärkte Reaktion beim Wolff-Gang nicht mehr zu sehen. Die Mesenchymale Hülle zeigt durchschnittlich eine Farbintensität von 2,42. Die Standardabweichung von 0,53 zeigt Unterschiede zwischen den Schnitten an. Fünf der zwölf Schnitte reagieren mit einer Farbintensität von 3. Bei den anderen sieben ist eine Farbintensität von 2 ermittelt worden.

Der Epithelzellkerne des Ureters reagieren im Zytoplasma stärker mit einer Farbintensität in jedem Schnitt von 3. Hier ist die Reaktion auch wieder in der Basalmembran zu finden. Die mesenchymale Hülle erreicht eine durchschnittliche Farbintensität von 2,83. Die Standardabweichung 0,39 zeigt Unterschiede zwischen den Schnitten. Zehn der zwölf Schnitte reagieren mit einer Farbintensität von 2, während zwei eine Stärke von 3 haben.

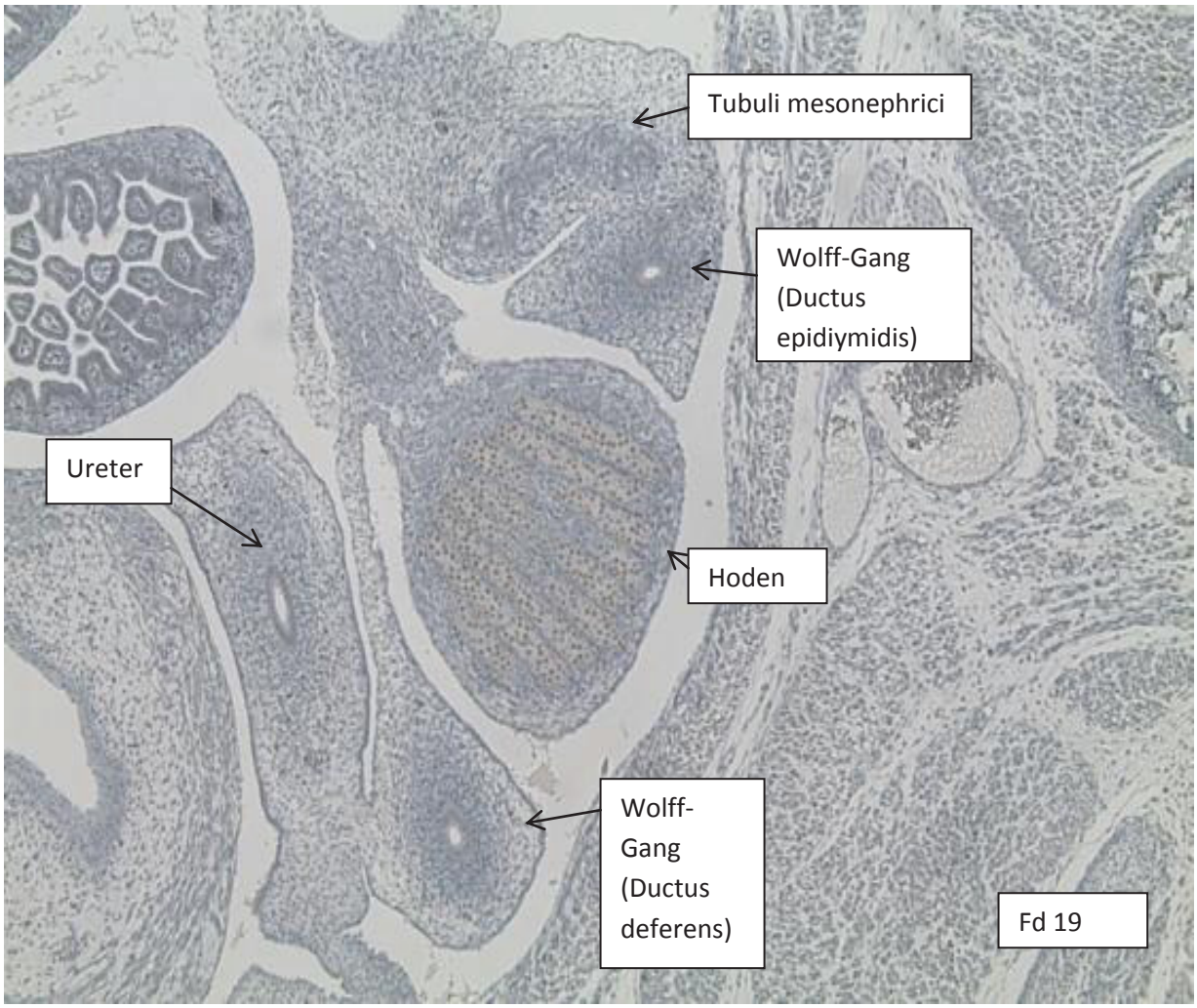


Abbildung 62

Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von c-Met (braun).
Die Abbildung zeigt eine Übersicht über einen Hoden mit Mesonephros am fd 19 mit der Reaktion mit dem Antikörper von c-Met. Der Wolff-Gang ist deutlich ausdifferenziert in Ductus deferens, Ductus epididymidis und Ureter. Auch die Zellen des Hodens reagieren mit c-Met. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 112x, 1cm d. Abb. = 89µm.

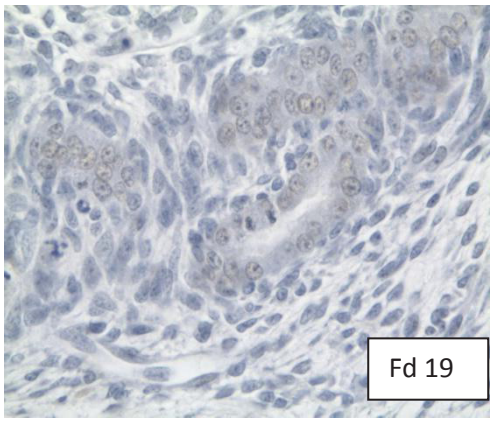


Abbildung 63
Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von c-Met (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 62.
Die Tubuli mesonephrici zeigen am fd19 eine leichte nukleäre Reaktion in den Epithelzellkernen mit dem Antikörpers c-Met. Die mesenchymalen Zellkerne reagieren gar nicht. Eine mesenchymale Hülle ist durch die Zelldichte um den Gang herum abgrenzbar. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 560x, 1cm d. Abb. = 18µm.

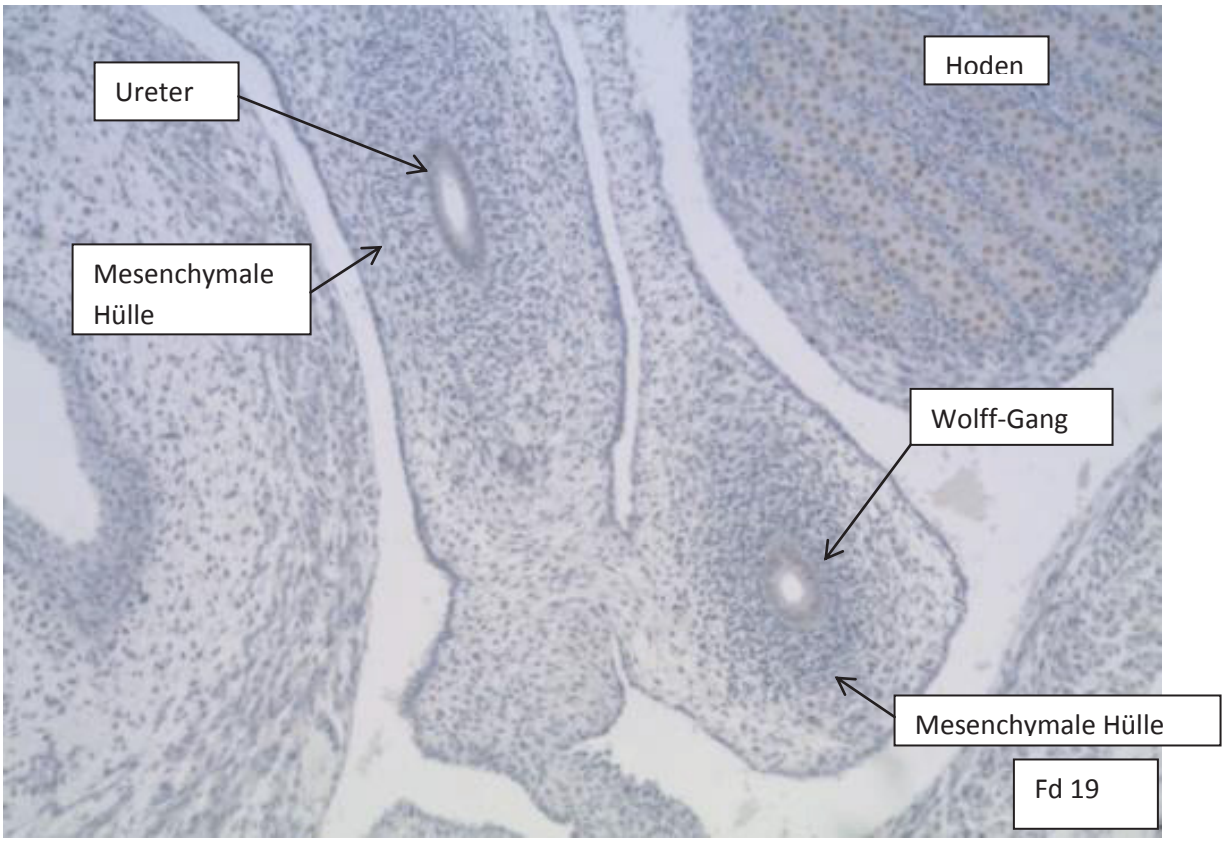


Abbildung 64
Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von c-Met (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 58. Kernfärbung mit Hämalaun (blau) Endvergrößerung 109x, 1cm d. Abb. = 92µm.

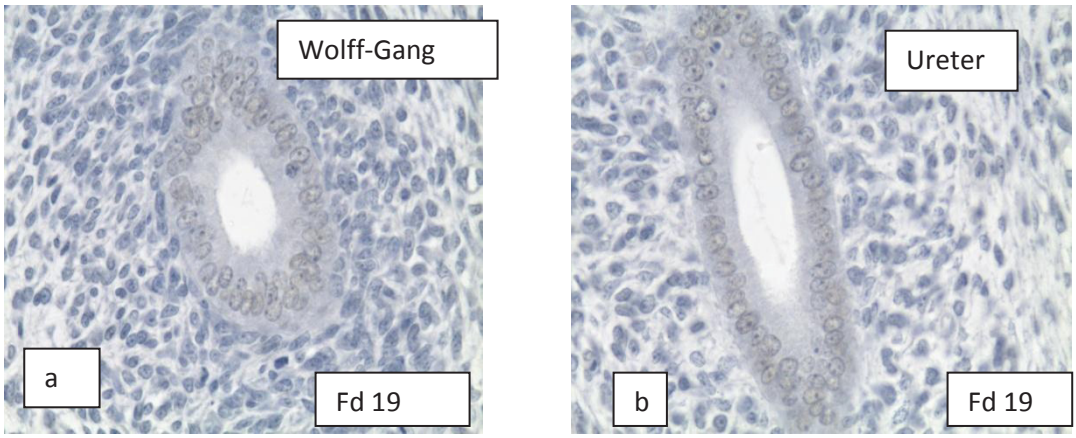


Abbildung 65
Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von c-Met (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 58.
Schwache nukleäre Reaktion mit dem Antikörper von c-Met im Epithel des Ductus deferens (a) und des Ureters (b) am fd19. Auch hier lässt sich wie oben erläutert die mesenchymale Hülle durch Verdichtung der Zellen abgrenzen, die jedoch alle nicht mit c-Met reagieren.
Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 551x, 1cm d. Abb. = 18µm.

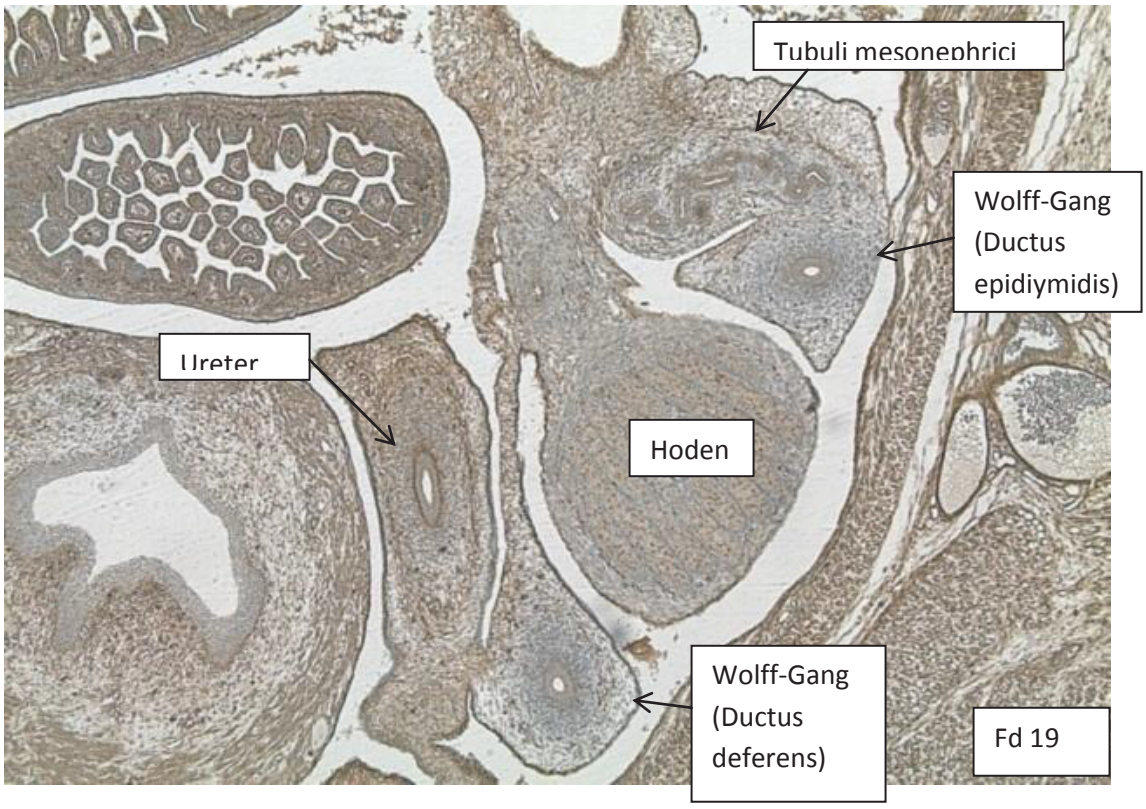


Abbildung 66
Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Übersicht über einen Hoden mit Mesonephros am fd 19 mit der Reaktion des Antikörpers von HGF-α. Der Wolff-Gang ist deutlich differenziert in Ureter, Ductus deferens und Ductus epididymidis.
Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 101x, 1cm d. Abb. = 98µm.

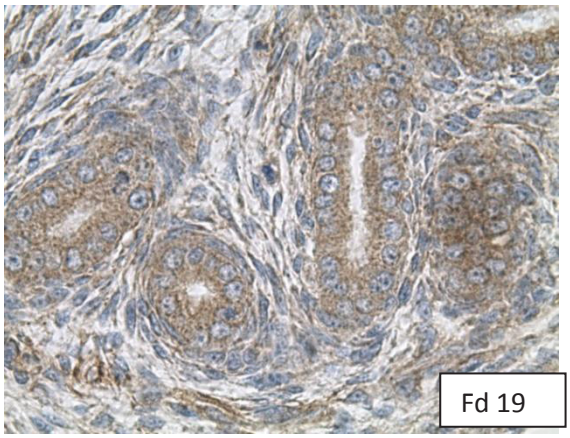


Abbildung 67
Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 66.
Das Epithelzytoplasma der Tubuli mesonephrici reagiert am fd19 deutlich mit dem Antikörper von HGF-α. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 639x, 1cm d. Abb. = 16µm.

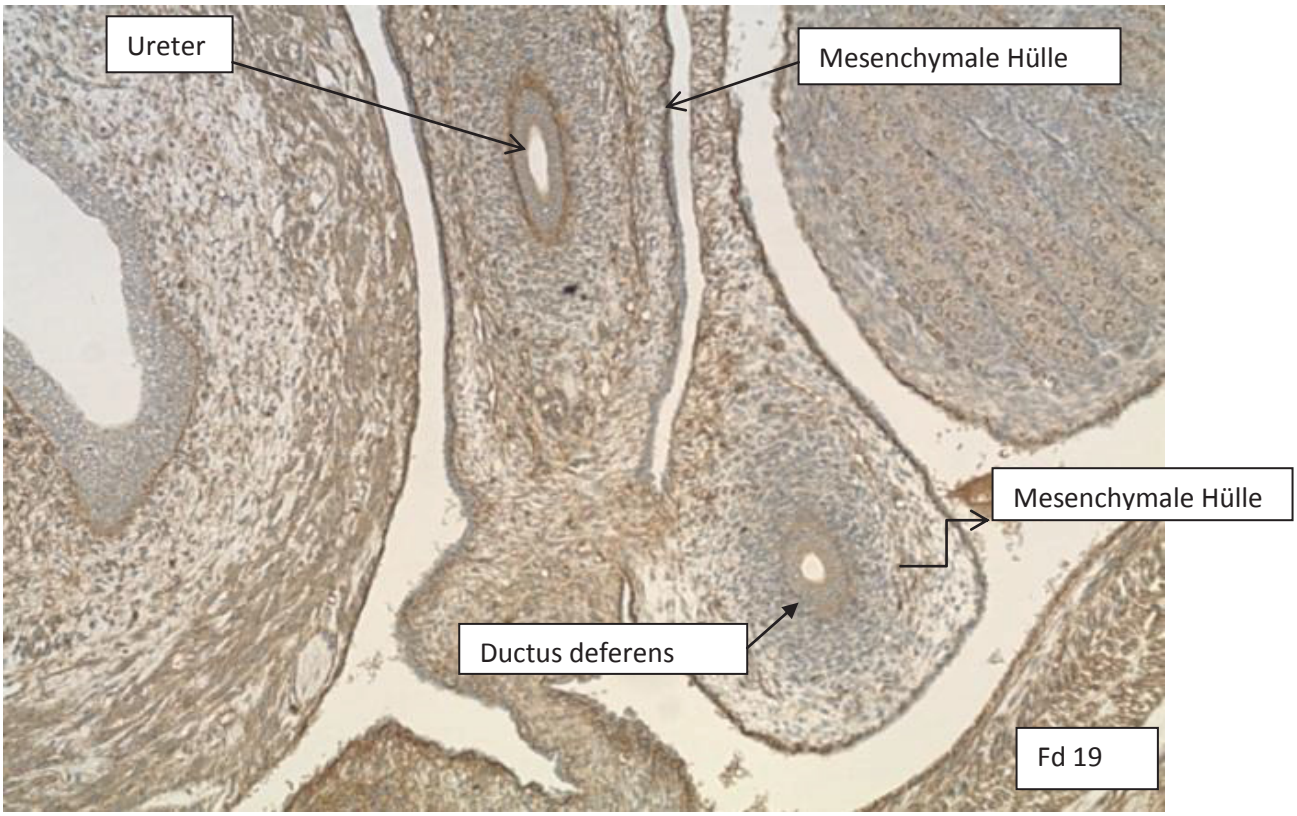


Abbildung 68
Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 66.
Der Ureter zeigt eine kräftigere Reaktion als der Ductus deferens. Auch die mesenchymale Hülle grenzt sich deutlicher ab. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 120x, 1cm d. Abb. = 85µm.

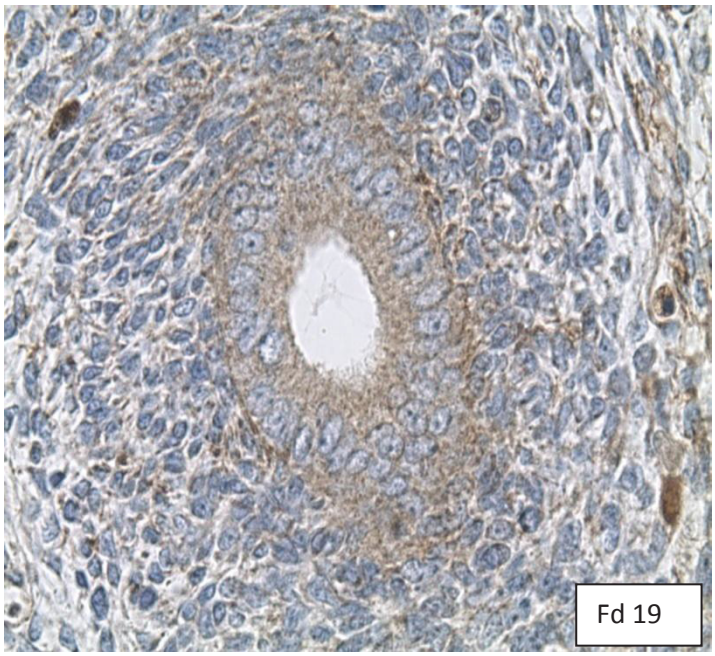


Abbildung 69
Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 66.
Reaktion des Antikörpers von HGF-α am fd19 mit dem Zytoplasma des Ductus deferens. Die Reaktion ist deutlich, jedoch ist auch hier die Basalmembran nicht angefärbt. Die gut abgrenzbare mesenchymale Hülle reagiert im äußeren Bereich deutlich auf den Antikörper von HGF. Auch vereinzelte mesenchymale Zellen zeigen Reaktionen in ihrem Zytoplasma. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 814x, 1cm d. Abb. = 12µm.

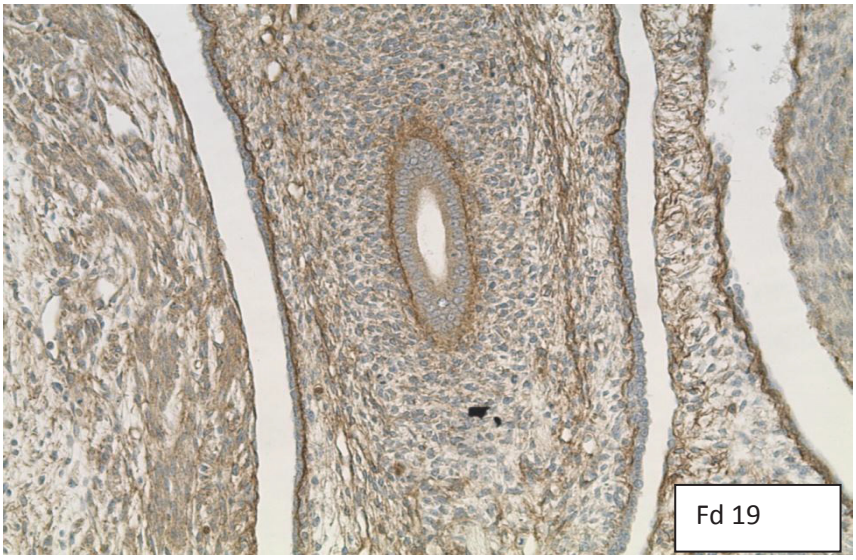


Abbildung 70
Fetaltag (Fd) 19. Immunhistochemische Reaktion von HGF-α (braun). Ausschnitts-Vergrößerung von Abb. 66.
Das Zytoplasma des Ureter reagiert stark mit dem Antikörper HGF-α am fd19. Deutlich zu erkenne ist die Basalmembran, die hier wieder eine starke Reaktion hat. Außerdem ist die mesenchymaler Hülle eindeutig abgrenzbar und reagiert im Randbereich ebenfalls mit dem Antikörper von HGF. Auch hier sind wieder vereinzelte Reaktionen im Zytoplasma der mesenchymalen Zellen zu sehen. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Endvergrößerung 622x, 1cm d. Abb. = 16µm.

3.3.7. Zusammenfassung der Befunde über HGF- α und c-Met

Da bei dem Antikörper c-Met nur die Kerne reagieren und beim Antikörper von HGF- α vor allem das Zytoplasma, werden im Folgenden Diagramme gezeigt, bei denen die Kern-Reaktion von c-Met im Vergleich zu der Zytoplasma-Reaktion von HGF- α steht. Die Reaktion von c-Met wird als blaue Linie dargestellt, die von HGF- α als rote Linie.

Die Reaktion in den Epithelzellkernen der *Tubuli mesonephrici* verändert sich im Lauf der vier Altersstufen wie folgt:

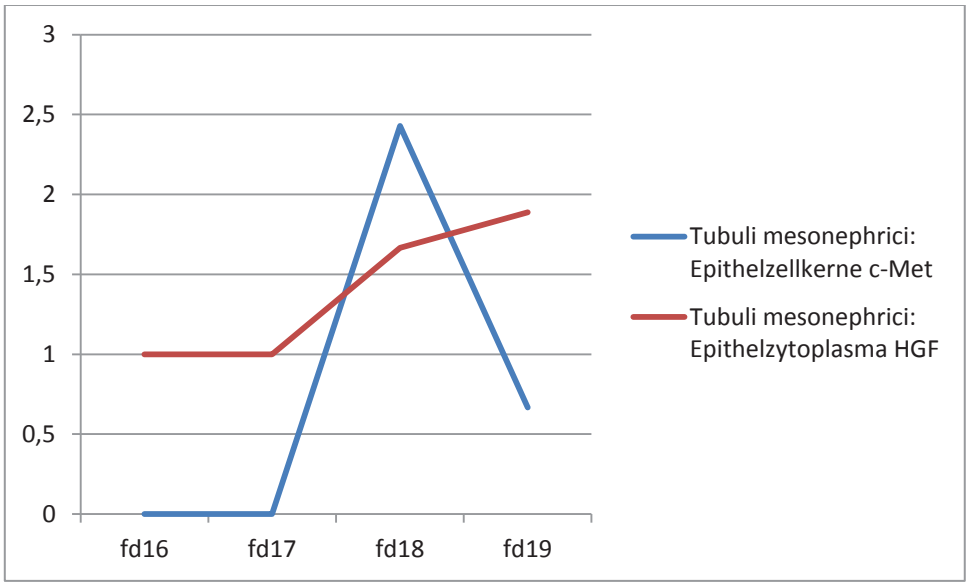


Abbildung 71
Zusammenfassung der Intensität der immunhistochemischen Reaktion von c-Met und HGF-α in den Epithelzellkernen und dem Epithelzytoplasma der Tubuli mesonephrici von Fetaltag (fd) 16 - fd 19. (für Standardabweichung siehe Tabelle 9-15).

Während bei HGF-α eine stetige Zunahme der Farbintensität zu erkennen ist, reagiert c-Met an fd 16 und fd 17 nicht, die höchste Reaktion ist am fd 18, während sie am fd 19 schwächer wird.

Der *Müller-Gang* ist nur bis zum fd 18 erhalten. Bis dahin wurden hier folgende Veränderungen beobachtet:

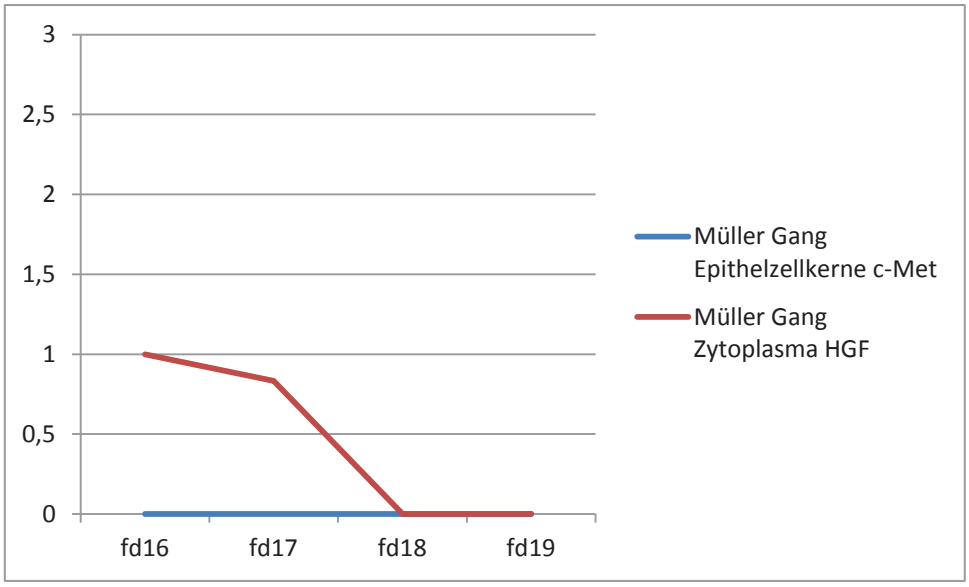


Abbildung 72
Zusammenfassung der Intensität der immunhistochemischen Reaktion von c-Met und HGF-α in den Epithelzellkernen und dem Zytoplasma im Müller-Gang von Fetaltag (fd) 16 - fd 19. (für Standardabweichung siehe Tabelle 9-15).

Der *Wolff-Gang* bildet sich in der Zeit von fd 16-fd 19 aus und differenziert sich zwischen dem fd 18 und fd 19 in seine drei Bestandteile Ureter, Ductus deferens und Ductuli epedidymidi.

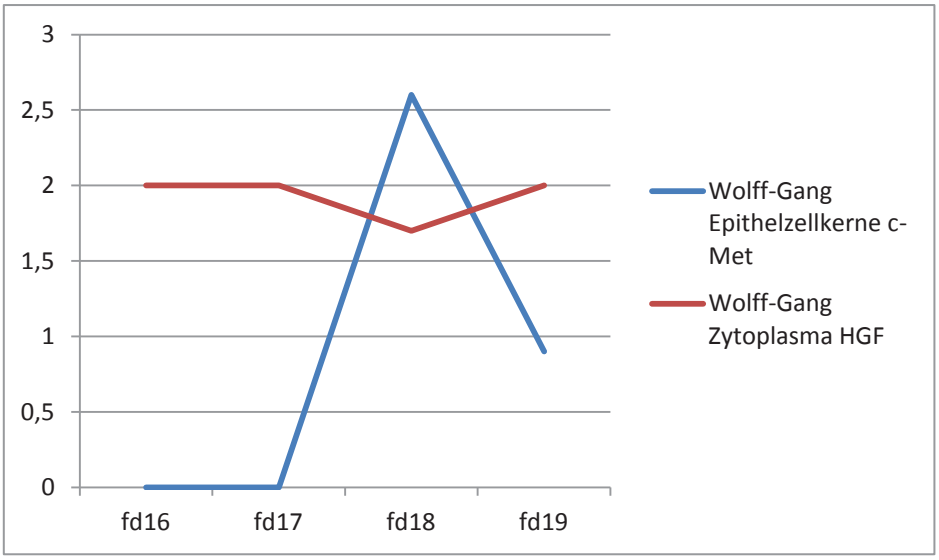


Abbildung 73
Zusammenfassung der Intensität der immunhistochemischen Reaktion von c-Met und HGF-α in den Epithelzellkernen und dem Epithelzytoplasma des Wolff-Gang von Fetaltag (fd) 16 bis fd 19. (für Standardabweichung siehe Tabelle 9-15).

Der Rezeptor c-Met hat seine erste Reaktion am fd 18. Hier regiert er auch am stärksten. Am fd19 nimmt seine Reaktion wieder stark ab.

HGF-α hingegen hat von fd 16 an eine deutliche Reaktion zu vermerken.

Am fd 18, dem Tag der höchsten c-Met Expression hingegen, erreicht HGF-α seine niedrigste Intensität, während diese am fd 19 wieder ansteigt.

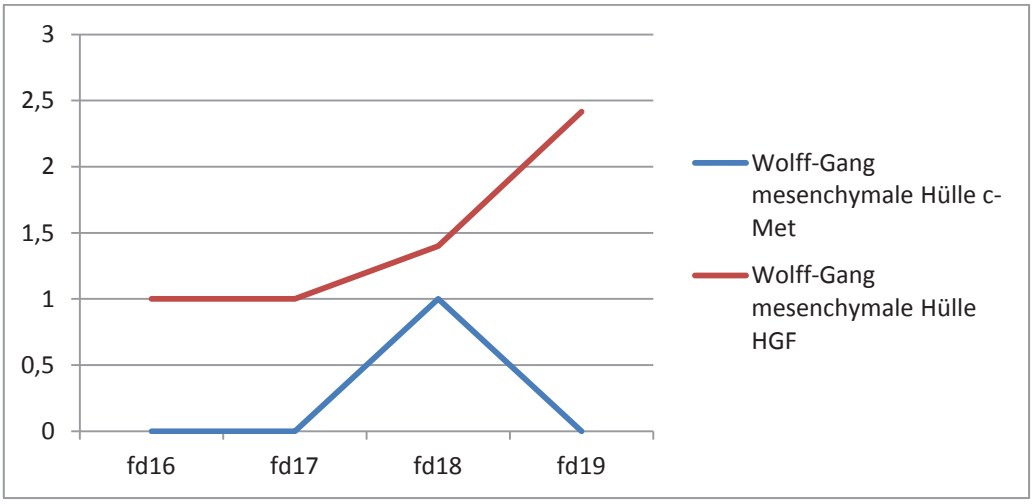


Abbildung 74
Zusammenfassung der Intensität der immunhistochemischen Reaktion von c-Met und HGF-α in der mesenchymalen Hülle des Wolff-Gang von Fetaltag (fd) 16 - fd 19. (für Standardabweichung siehe Tabelle 9-15).

Die mesenchymale Hülle zeigt eine deutliche Reaktion von HGF-α ab dem fd18. C-Met reagiert nur am fd18. Ab diesem ist sie deutlich durch die Formierung der Mesenchymzellen zu erkennen.

Der *Ureter* bildet sich erst zwischen fd 18 und fd 19 aus. Die Reaktion stellt sich wie folgt dar:

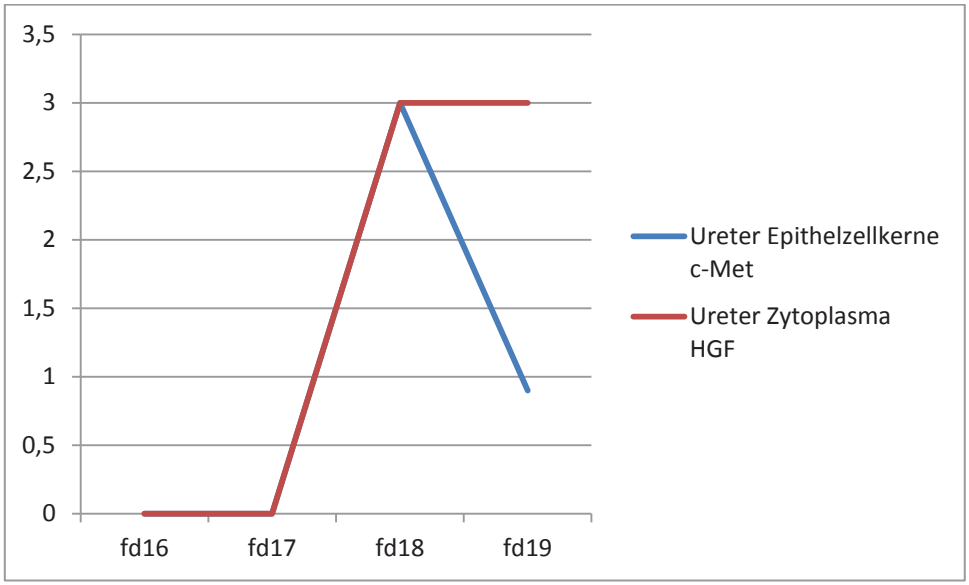


Abbildung 75
Zusammenfassung der Intensität der immunhistochemischen Reaktion von c-Met und HGF-α in den Epithelzellkernen und dem Epithelzytoplasma des Ureters von Fetaltag (fd) 16 - fd 19. (für Standardabweichung siehe Tabelle 9-15).

Der Rezeptor c-Met reagiert im Ureter ebenso wie im restlichen Wolff-Gang. Er zeigt eine starke Reaktion am fd 18, die sich am fd 19 zurückbildet. HGF-α hingegen zeigt sowohl an fd 18 als auch an fd 19 eine sehr starke Reaktion, die eine höhere Farbintensität hat als der übrige Teil des Wolff-Gangs.

4. Diskussion

In den vergangenen Jahrzehnten befassten sich viele Studien mit der Entwicklung der männlichen Geschlechtsorgane (Frojdman et al. 1989; Christ et al. 1998; WILSON 1980). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Androgene, Fibronektin und HGF-α mit seinem Rezeptor c-Met Einfluss auf die Entwicklung des Mesonephros in der Embryogenese haben. Hier wurde zum ersten Mal das Verteilungsmuster der vier Substanzen im Mesonephros beschrieben und erörtert in welchem Zusammenhang sie mit der Entwicklung des Mesonephros stehen.

4.1. Androgen-Rezeptor

In der vorliegenden Arbeit konnte die stärkste Farbintensität der Immunreaktion des Antikörpers vom Androgen-Rezeptor in den Zellkernen im mesenchymalen Bindegewebe um den Wolff-Gang herum gefunden werden. Das mesenchymale Bindegewebe, das den Müller-Gang umgibt, ist hingegen völlig reaktionsarm. Dies entspricht den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Majdic et al. (1995).
Bisher noch nicht beschrieben wurde, dass in der vorliegenden Arbeit auch am Fetal day (fd) 16 schon Reaktionen in den Zellkernen der Epithelzellen des Wolff-Gangs zu sehen sind. Die Arbeitsgruppe von Hannema et al. (2007) hat festgestellt, dass der Androgen-Rezeptor bei menschlichen Embryos zunächst ausschließlich im mesenchymalen Bindegewebe zu finden ist. Dies konnte bei den Rattenembryonen im hier vorliegenden Zeitfenster nicht beobachtet werden.

Beim Wolff-Gang bleibt die Expression in den Myofibroblasten bis zum fd 19 bestehen. Während sie am fd 17 zunächst leicht abnimmt, nimmt sie am fd 18 und 19 an Farbintensität wieder zu. Zwar schwächer, aber parallel dazu verhält sich auch die Reaktion in den Epithelzellkernen. Während sie ebenfalls am fd 17 abnimmt, wird sie im Verlauf bis zum fd19 wieder stärker, jedoch nicht stärker als die der Myofibroblasten. Bis zum fd 19 ist der Androgen-Rezeptor demnach mehr in den Myofibroblasten um den Wolff-Gang herum zu finden als in seinen Epithelzellkernen. Seine Expression nimmt im Allgemeinen tendenziell

zu, was dafür spricht, dass der Wolff-Gang im Verlauf seiner Entwicklung vermehrt die Reaktion des Androgen-Rezeptors benötigt.

In der vorliegenden Arbeit beginnt sich der Wolff-Gang am fd 18 in seine Bestandteile zu differenzieren und ist am fd19 bereits vollständig in die folgenden Strukturen differenziert: Ductus deferens, Ductus epididymidis, Ureter und die Samenblase (Haider, 2010). Dies wurde von Welsh et al. (2007) für das Zeitfenster vom fd 19,5 bis fd 21,5 beschrieben. Hier konnte also eine frühere Ausdifferenzierung beobachtet werden.
Während Ductus deferens und Ductus epididymidis in der vorliegenden Arbeit gemeinsam weiter als Wolff-Gang bezeichnet wurden, wurde der Ureter differenziert betrachtet.

Bezeichnend ist, dass beim Ureter primär die Epithelzellkerne reagieren, wobei diese deutlich schwächer reagieren als beim Ductus deferens. Das Mesenchym reagiert nur sehr vereinzelt auf den Androgen-Rezeptor. Mit fortschreitendem Alter weisen mesenchymale Hülle um Ductus deferens und Ductus epididymidis mehr Androgen-Rezeptor auf. Dies ist nicht der Fall beim Ureter. Es scheint die Entfaltung und Differenzierung sowohl des Ductus deferens als auch des Ductus epididymidis mehr von Androgen abhängig zu sein, im Gegensatz zu der des Ureter.
Dies steht wahrscheinlich in Relation zu der spezifischen Funktion, die die beiden unterschiedlichen Anteile, einerseits Ductus deferens und epididymidis, andererseits Ureter, in der weiteren Entwicklung aufweisen.

Bisher nicht beschrieben wurde die Reaktion des Androgen-Rezeptors in den Tubuli mesonephrici. Deutlich zu erkennen ist eine Zunahme der Farbintensität in den Epithelzellen vom fd 16 bis zum fd 19. Da auch die Tubuli mesonephrici einen Teil des männlichen Genitaltrakts bilden, nämlich die späteren Ductuli efferentes (Christ et al. 1998; Moore et al. 2007; Haider 2010), sind auch sie auf die Androgene angewiesen. Offensichtlich spielt der Androgen-Rezeptor auch für ihre Entwicklung eine wichtige Rolle. Auch hier ist eine Reaktion in den Zellen des mesenchymalen Bindegewebes zu erkennen, die jedoch im Gegensatz zum Wolff-Gang keine Unterschiede in der Farbintensität im Vergleich zu den Epithelzellen aufweist.
Da die Tubuli mesonephrici und der Wolff-Gang einen unterschiedlichen Ursprungsort aufweisen (Haider, 2010), ist möglicherweise auch das zeitliche Entwicklungsstadium unterschiedlich. So könnte die gleichwertig starke Reaktion von Mesenchym und

Epithelzellen bei den Tubuli mesonephrici ein Zeichen für einen anderen, eher weiter fortgeschrittenen Entwicklungszeitraum sein. Somit könnte hier ein Hinweis darauf sein, dass die Tubuli mesonephrici sich früher als der Wolff-Gang entwickeln.
Da die Farbintensitäten im Mesenchym um den Wolff-Gang nicht nachlässt sondern sogar ansteigt, ist es möglich, dass der Androgen-Rezeptor aus dem Mesenchym auch über die Geburt hinaus gemeinsam mit dem Anstieg in den Epithelzellen ebenfalls ansteigend bestehen bleibt.
In Anbetracht der Theorie, dass die Präsenz des Androgen-Rezeptors von den Mesenchymzellen ausgeht (Hannema und Hughes, 2007), könnte eine gleich starke Farbintensität in den Mesenchymzellen und Epithelzellen der Tubuli mesonephrici bereits am fd 16 für eine spätere Entwicklungsstufe sprechen als beim Wolff-Gang am fd 16. Demnach ist es möglich, dass sich auch bei den Strukturen des Wolff-Gang mit der Zeit gleich starke Farbintensitäten entwickeln und somit eine gleich große Menge des Androgen-Rezeptors in den Epithelzellen und den mesenchymalen Zellen zu finden ist.

Auch die Zellkerne der Müller-Gang Epithelzellen reagieren auf den Antikörper des Androgen-Rezeptors. Die Reaktion ist schwächer und nimmt von fd 16 zu fd 17 ab. Demnach könnte also grundsätzlich eine Reaktion des Androgen-Rezeptor Systems auch am Müller-Gang stattfinden, da er zunächst auch in seinen Epithelzellen vorhanden ist. Der Androgen-Rezeptor konnte jedoch, im Gegensatz zum Wolff-Gang, nicht im Mesenchym des Müller-Gangs nachgewiesen werden. Da man vermutet, dass die Androgene ihre Reaktion über Signale im Mesenchym ausführen (Hannema und Hughes, 2007), die dann mit den Epithelzellen interagieren, scheint es so, dass beim Müller-Gang diese Interaktion ausbleibt. Dies könnte die Ausdifferenzierung des Müller-Gang negativ beeinflussen. Ob der Androgen-Rezeptor weniger Einfluss auf die Stabilisierung als auf die Differenzierung der Gänge hat (Welsh et al. 2006), und der Müller-Gang sich durch die fehlende stabilisierende Wirkung des Androgen-Rezeptors aus dem mesenchymalen Bindegewebe zurückbildet, lässt sich nicht nachweisen. Es ist jedoch bekannt, dass die Regression des Müller-Gangs primär durch das Anti-Müller-Hormon ausgelöst wird (Catlin et al. 1992). Der Müller-Gang hat sich in der vorliegenden Arbeit am fd 18 bereits vollständig zurück gebildet.

Es konnte schlussfolgernd gezeigt werden, dass der Androgen-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung der Gänge des Mesonephros spielt. Anhand des Müller-Gangs konnte gezeigt werden, dass nicht nur seine Präsenz in den Epithelzellen von

Bedeutung ist, sondern auch die Signale, die aus dem mesenchymalen Bindegewebe kommen wichtig für die Differenzierung einer Gangstruktur im männlichen Mesonephros zu sein scheinen.
Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die Reaktion des Androgen-Rezeptors im mesenchymalen Bindegewebe an jedem Tag erhalten bleibt, was vermuten lässt, dass diese Signale auch in der weiteren Entwicklung benötigt werden.

4.2. Fibronektin

In der vorliegenden Arbeit konnte Fibronektin in der Basalmembran der Strukturen des Mesonephros gefunden werden. Untersucht worden sind die Basalmembranen der Strukturen Tubuli mesonephrici, Wolff-Gang, Müller-Gang und Ureter. Dies entspricht den Angaben in der Literatur, die Fibronektin ebenfalls in der Basalmembran verschiedener Organstrukturen beschrieben (Francavilla et al. 1983; Courtoy et al. 1980; Laurie et al. 1982; Hedman et al. 1978; Pearlstein et al. 1980) und es sogar als Marker für die Entstehung der Basalmembran sahen (Nagano et al. 1997) Die Arbeitsgruppe von Brownell et al. (1981) konnte durch die vorliegende Arbeit mit dem Mesonephros als Beispiel darin unterstützt werden, dass Fibronektin bislang stets in embryonalen Basalmembranen gefunden wurde. Die Arbeitsgruppe von Madri et al. (1980) konnte Fibronektin jedoch nicht in der Basalmembran nachweisen. Ihren Ausführungen wurde durch die vorliegenden Ergebnisse widersprochen.

In der vorliegenden Arbeit liegt Fibronektin stets in der Basalmembran der Gänge vor und zwar mit einer Farbintensität, die stärker ist je jünger der Fetus ist. Bei den Tubuli mesonephrici, dem Wolff-Gang und dem Müller-Gang wird die höchste Farbintensität am fd 16 erreicht. Der Wolff-Gang hat eine weitere starke Farbintensität am fd 18, die die Farbintensität am fd 16 jedoch nicht übersteigt. Der Abfall am fd 17 kann in der vorliegenden Arbeit nicht zufriedenstellend geklärt werden. Weitere Untersuchungen wären hierfür nötig. Bei den Tubuli mesonephrici nimmt die Stärke der Farbintensität linear bis zum fd 19 ab. Am fd 18 differenziert sich der Ureter aus dem Wolff-Gang heraus und beginnt sich auszuwachsen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Reaktion auf den Fibronektin Antikörper in der Basalmembran des Ureters am höchsten und wird zum fd 19 hin schwächer.
Diese Beobachtung könnte die Theorie, dass Fibronektin ein Marker für die Entwicklung der Basalmembran ist (Nagano et al. 1997), unterstützen. Denn je früher der Fetus in der

Entwicklung ist, desto stärker ist seine Reaktion auf den Fibronektin Antikörper. Je weiter die Entwicklung voranschreitet umso schwächer wird die Reaktion.
In der vorliegenden Arbeit verschwindet die Reaktion des Antikörpers von Fibronektin jedoch nicht vollständig bei den Rattenfeten am fd 19 sondern bleibt erhalten. Da die Ratten bereits um den fd 21 geboren werden ist die Wahrscheinlichkeit gegeben, dass sie auch noch mit einer Fibronektin-Reaktion geboren werden. Dies könnte die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Francavilla et al. (1987) unterstützen, dass auch postnatal in den Gangstrukturen der neugeborenen Ratten noch Fibronektin nachgewiesen werden konnte, dann jedoch bald vollständig verschwand.

Zum anderen kann Fibronektin auch bei der Einwanderung der Epithelzellen von Bedeutung sein. Bei der Wundheilung wurde vermutet, dass Fibronektin eine provisorische Matrix für migrierende Zellen darstellt (Wysocki und Grinnell 1990; Mansfeld 2008). Ähnlich könnte auch bei der Entstehung der Basalmembran Fibronektin eine provisorische Matrix für die migrierenden Epithelzellen darstellen. Auch die Tatsache, dass es während der Embryogenese der Wegfindung der Zellen dient (Rassow et al. 2006) spricht für die Theorie, dass Fibronektin durch seine Lage in der Basalmembran die Histogenese des Epithels fördert.

Im mesenchymalen Nierengewebe konnte Fibronektin vor allem in undifferenzierten Geweben gefunden werden (Pearlstein et al. 1980). In der vorliegenden Arbeit scheint es so, dass auch im Mesonephros Fibronektin vor allem im undifferenzierten Bindegewebe exprimiert wird. Je differenzierter die Gänge im Laufe ihrer embryonalen Entwicklung wurden, desto weniger stark war die Reaktion des Fibronektin Antikörpers. Die Entwicklung des Mesonephros scheint sich demnach analog zu der Entwicklung der Niere zu verhalten.

Abgesehen von der Reaktion in der Basalmembran konnte auch im mesenchymalen Bindegewebe des Mesonephros eine deutlich abnehmende Reaktion des Fibronektins beobachtet werden. Während sie am fd 16 noch eine sehr starke Farbintensität zeigte, kann man am fd 19 nur noch vereinzelte Fibronektin Fasern erkennen.

Deutlich abgrenzbar von dem übrigen Bindegewebe ist die Basalmembran des äußeren Zölomepithels, das den Wolff-Gang umgibt (BMZW), und später die Tunica serosa des Nebenhodens bilden wird. Hier kann man eine stärkere Reaktion des Antikörpers von Fibronektin als im restlichen Bindegewebe erkennen, die sich ebenfalls am stärksten am fd 16

zeigt und linear bis zum fd 19 abnimmt. Auch hier scheint Fibronektin eine fördernde Rolle in der Entwicklung der Gänge des Mesonephros zu spielen.
Es ist bekannt, dass Fibronektin eine unterstützende Funktion in Bereichen hat die starke Spannungen aufweisen (Pearlstein et al. 1980). Bei dem Wachstum der Gänge herrschen im Bindegewebe und in der Basalmembran starke Spannungen, da das Gewebe sich vergrößert und ausdifferenziert. Dies könnte ein weiterer Grund für die starke Präsenz des Fibronektin in der Basalmembran der sich entwickelnden Gänge des Mesonephros sein.
Der Müller-Gang reagiert zwar sehr leicht auf den Antikörper von Fibronektin, aber ebenfalls mit seinem stärksten Wert am fd 16. Am fd 18 ist er nicht mehr vorhanden und kann somit auch nicht reagieren. Es konnte also eine Abnahme des Fibronektins bei der Rückbildung des Müller-Gangs nachgewiesen werden. Die Basalmembran konnte am fd 17 nicht mehr richtig zugeordnet werden, da die Epithelzellen ihren Verbund aufgelöst haben und das Lumen des Müller-Gangs vollständig verschwindet. Dies entspricht der Studie von Ikawa et al.(1984), in der eine Abnahme des Fibronektins gekoppelt mit der Ablösung der Basalmembran nachgewiesen werden konnte, welche somit eine Veränderung in der Stabilität des Epithels und der mesenchymalen Zellen hervorruft (Ikawa et al. 1984).
Der Müller-Gang reagiert im Gegensatz zum Wolff-Gang nur sehr schwach auf den Antikörper von Fibronektin und zeigt am fd 17 einen Verlust seiner Struktur. Während Fibronektin den Wolff-Gang in seiner Stabilität und Morphogenese zu fördern scheint, könnte seine Abwesenheit am Müller-Gang die Rückbildung mit unterstützen.

Von Pearlstein et al. (1980) wurde bereits angenommen, dass Fibronektin eine Funktion in der Entwicklung von Organen hat. Dies konnte anhand der vorliegenden Untersuchungen ebenfalls für die Organe des Mesonephros angenommen werden, da es im Aufbau der Serosa, der Basalmembran und der Einwanderung der Epithelzellen eine Rolle zu spielen scheint. Während die Reaktion des Androgen-Rezeptors im Verlauf eher zunimmt, nimmt die Reaktion des Fibronektin Antikörpers ab. Fibronektin scheint demnach ausschließlich für die Entwicklung der Strukturen benötigt zu werden, während der Androgen-Rezeptor auch in der weiteren Differenzierung eine Rolle spielt. Der Abfall am fd 17 kann in der vorliegenden Arbeit nicht zufriedenstellend geklärt werden. Weitere Untersuchungen wären hierfür nötig.

4.3. HGF-α und c-Met

Es ist bereits beschrieben worden, dass HGF und c-Met die embryonale Morphogenese der Niere und des Ureters regulieren (Sonnenberg et al. 1993). Die vorliegende Arbeit hat sich mit dem immunhistochemischen Verteilungsmuster von HGF und c-Met auf die Tubuli mesonephrici, den Wolff-Gang und seine entstehenden Strukturen beschäftigt. Desweiteren wurde zum Vergleich bisheriger Studien auch der Ureter mit betrachtet.
HGF und c-Met reagieren vor allem zeitlich sehr unterschiedlich auf die Strukturen im Mesonephros.

Der Rezeptor c-Met zeigt während fd 16 und fd 17 keine Reaktion auf den Schnitten, die Querschnittpräparate unterhalb des Diaphragmas darstellen. Dies widerspricht der Studie von DeFrances et al. in denen beide HGF und c-Met in der Ratte bereits ab dem fd 14 in der Leber nachgewiesen werden konnten (Defrances et al. 1992). Dieser Nachweis geschah allerdings mittels PCR. Zwar hat die Arbeitsgruppe ebenfalls Immunhistochemisch gearbeitet, jedoch nur mit dem Antikörper von HGF, nicht mit dem Antikörper von c-Met. Die Arbeitsgruppe von Ricci et al. beschrieb den Rezeptor c-Met im Mesonephros von Mäusen. Auch sie beschrieben c-Met eher in der frühen embryonalen Phase ab dem fd 15,5 (Ricci et al. 2006). In der späteren pränatalen Entwicklung beobachteten sie ihn eher in den fetalen Leydig Zellen (Ricci et al. 2006).
Trotz mehrerer Versuchsansätze und Vergleiche der verschiedenen Altersstufen konnte in der vorliegenden Arbeit keine Reaktion auf den Antikörper von c-Met vor dem fd 18 erzielt werden. An diesem Tag ist seine Reaktion in allen untersuchten Strukturen jedoch sogar überschießend stark, während sie am fd 19 wieder nachlässt, jedoch immer noch vorhanden ist. Am fd 18 ist sie am stärksten in der Struktur des Ureters vorhanden, während die Reaktion am fd 19 im Ureter und im restlichen Wolff-Gang gleich stark ist. Die Tubuli mesonephrici reagieren etwas schwächer. Da der Müller-Gang nur am fd 16 und fd 17 vorhanden ist, der Antikörper von c-Met an diesen Tagen jedoch am Mesonephros nicht reagiert, konnte eine Reaktion des Antikörpers des Rezeptors c-Met nicht herausgearbeitet werden.
Der Ureter hingegen reagiert auf ihn ab dem Tag seiner Entwicklung am fd 18. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass c-Met erst ab dem Zeitpunkt seine Funktion aufnimmt an dem der Wolff-Gang bereits differenziert ist. Er hilft demnach nicht bei der Differenzierung sondern anschließend bei der Ausreifung und Auswachsung der Gänge. Wie

bereits für den Ureter beschrieben spielt der Rezeptor eine wichtige Rolle in der Morphogenese (Sonnenberg et al. 1993). Dies konnte ab dem fd 18 auch in den übrigen Gangsystemen des Mesonephros durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Warum die Reaktion am fd 18 so stark ist, ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht vollständig klären.

Folgende Strukturen sind im Mesonephros mit dem Antikörper von HGF-α betrachtet worden: das Zytoplasma der Epithelzellen und das Zytoplasma der Zellen, die eine mesenchymale Hülle bilden. Sein Antikörper reagiert im Zytoplasma, während der Antikörper von c-Met eine Reaktion im Kern aufweist.
HGF-α ist in der vorliegenden Arbeit bereits am fd 16 in den Strukturen des Mesonephros vorhanden. Dies widerspricht der Studie von Ricci et al in der beschrieben wurde, dass während der Entwicklung des Hodens HGF-α nur außerhalb des sex cord nachgewiesen werden konnte (Ricci et al. 2002).

Bisher nicht beschrieben wurde eine Reaktion des HGF-α in der Basalmembran. Hier sind es keine Zellen die in ihrem Zytoplasma reagieren, sondern es scheint, dass der Antikörper von HGF-α hier Fasern in der Basalmembran anfärbt. Die Reaktion gleicht optisch der von Fibronektin. Auffällig ist, dass diese Reaktion im Wolff-Gang nur am fd 16 und fd 17 zu finden ist. Auch im Ureter kann man sie am fd 18 und fd 19 sehen. Dies könnte dafür sprechen, dass die Reaktion in der Basalmembran nur in sich neu entwickelnden Strukturen zu finden ist. Der Ureter ist erst ab dem fd 18 aus der Ureterknospe des Wolff-Gangs entstanden. Der Wolff-Gang entwickelt sich am fd 16 und fd 17 noch, während er ab dem fd 18 differenziert ist und sich nun nur noch auswächst. HGF-α scheint demnach primär für die Entstehung und weniger für die Ausdifferenzierung zuständig zu sein.
Möglicherweise ist auch hier eine Einwanderung der Mesenchymzellen ursächlich für die Reaktion in der Basalmembran. Vielleicht ist HGF-α neben der Einwanderung der Mesenchymzellen in den Hoden (Ricci et al. 2002) auch für die Einwanderung von Mesenchymzellen in die Epithelien des Ductus deferens, der Ductuli epididymidis und des Ureters wichtig, so dass diese Strukturen sich ebenfalls normal entwickeln können. Hierfür wäre seine Lage in der Basalmembran von Bedeutung.
Zeitlich parallel zu der Anwesenheit von HGF-α in der Basalmembran ist auch die Reaktion von Fibronektin in der Basalmembran besonders stark. Auch bei Fibronektin ist die Reaktion stärker je jünger die jeweilige Struktur in ihrer Entwicklung ist. Wie oben bereits erläutert

könnte dieses Ergebnis dafür sprechen, dass Fibronektin bei der Einwanderung der Epithelzellen hilft.
Diese beiden Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit sprechen schlussfolgernd für eine Einwanderung von mesenchymalen Zellen in das Epithel der sich entwickelnden Strukturen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Zytoplasma der Zellen des Müller-Gang eine rückläufige Farbintensität bei der Reaktion des Antikörpers von HGF-α aufweist. Das Zellzytoplasma der Strukturen, die erhalten bleiben, weist jedoch eine immer stärker werdende Farbintensität auf. Bei dem zugrunde gehenden Müller-Gang ist der Wachstumsfaktor HGF-α also rückläufig, während die wachsenden Strukturen Tubuli mesonephrici, Wolff-Gang und ab dem fd 18 auch der Ureter ihn stark aufweisen. Dies unterstützt die Erkenntnisse von Ricci et al., dass in den sich entwickelnden Gonaden HGF-α spezifisch für das männliche Geschlecht ist (Ricci et al. 2002). HGF-α scheint ein Faktor zu sein, der das Auswachsen der Strukturen im Mesonephros unterstützt.
Fraglich ist wieso sein definierter Rezeptor c-Met keine Reaktion aufweist. Eine Möglichkeit ist, dass dies darauf hinweisen könnte, dass in den frühen Tagen der embryonalen Entwicklung der Ratten HGF-α noch auf einem anderen Weg als über c-Met reagiert. Eine weitere Möglichkeit für das Phänomen, dass hier am fd 16 und fd 17 nur HGF und nicht sein Rezeptor c-Met vorhanden ist könnte sein, dass c-Met für seine Ausbildung sein Substrat benötigt. Ähnliches ist für den Androgen-Rezeptor beschrieben worden, der sich nur ausbildet wenn Testosteron oder Dihydrotestosteron vorhanden sind (Hannema S.E. und Hughes I.A. 2007). Eine dritte Möglichkeit bietet die Erkenntnis, dass während der Hodenentwicklung Zellen vom Mesonephros in den Hoden einwandern, die dann für seine normale Entwicklung verantwortlich sind (Ricci et al. 2002). Dies wird gefördert durch HGF-α und andere Wachstumsfaktoren und ist spezifisch für die Entwicklung des männlichen Geschlechts (Ricci et al. 2002). Die Anwesenheit von HGF-α ohne seinen Rezeptor könnte auch in der vorliegenden Arbeit Hinweis auf die Einwanderung der Zellen in den Hoden darstellen.

Die vorliegenden Befunde deuten darauf hin, dass HGF-α und sein Rezeptor c-Met an der Entwicklung des Mesonephros ebenso wie in anderen sich entwickelnden Strukturen (Sonnenberg et al. 1993) in den fetalen Ratten beteiligt sind. Während der Rezeptor c-Met nur eine Rolle in der Auswachsung der verschiedenen Gänge zu spielen scheint, ist HGF in der vorliegenden Arbeit auch schon früher an der Differenzierung dieser beteiligt.

4.4. Schlussfolgerung

1) *Tubuli mesonephrici und der Wolff-Gang:* Nicht nur der Wolff-Gang sondern auch die Tubuli mesonephrici unterliegen dem Androgen gesteuerten System. Obwohl sie aus einem andern Teil des intermediären Mesoderms entstehen, machen sie dieselben Entwicklungsschritte durch wie der Ductus deferens und der Ductus epididymidis. Die Tubuli mesonephrici reagieren mit ähnlicher immunhistochemischer Reaktionsstärke analog zu den Strukturen des Wolff-Gangs ebenfalls auf den Androgen-Rezeptor. Die Reaktion im mesenchymalen Bindegewebe um die Tubuli mesonephrici herum ist jedoch im Gegensatz zu dem Wolff-Gang in allen Altersstufen fast gleichwertig stark wie in ihren Epithelzellen. Dies steigert sich im restlichen Wolff-Gang erst im Laufe der Entwicklungstage. Hier zeigt sich wahrscheinlich eine frühere Ausdifferenzierung als bei den Strukturen des Wolff-Gangs. Die langwierige Prozedur, durch die aus dem Wolff-Gang die verschiedenen Strukturen werden, spricht ebenfalls für diese Theorie.

2) *Mesenchymale Hülle:* Die Befunde über den Androgen-Rezeptor in Hinblick auf die mesenchymale Hülle deuten darauf hin, dass die Signale aus den Zellen des Mesenchyms wichtig sind für den Erhalt und die Differenzierung des Wolff-Gangs und der Tubuli mesonephrici. Auch die Reaktion des Antikörpers von HGF-α macht die wichtige Rolle des Mesenchyms deutlich. Es wurde bereits beschrieben, dass HGF-α eine wichtige Rolle in der Einwanderung der Mesenchymzellen in den Hoden spielt. Dies konnte auf Grund der vorliegenden Ergebnisse auch für die Einwanderung der mesenchymalen Zellen in die Epithelien von Ductus deferens, Ductuli epididymidis und Ureter angenommen werden. Diese Einwanderung der Epithelzellen wird auch von Fibronektin unterstützt.

3) *Die Basalmembran:* Die Basalmembran scheint nach den hier vorliegenden Ergebnissen ein wichtiger Teil für die Entstehung der Gänge zu sein. Sowohl Fibronektin als auch HGF-α zeigen bei der Reaktion eine deutliche Antwort auf ihre Antikörper bei den gerade entstehenden Gängen. Die Basalmembran scheint also in erster Linie wichtig für die Neuentwicklung der Gangstrukturen zu sein.

4) Im Kontrast dazu nimmt die Reaktion des Antikörpers des Androgen-Rezeptors immer mehr zu je älter die Feten sind. Es scheint, dass der Androgen-Rezeptor also eher wichtig für die Ausdifferenzierung der Gangstrukturen und weniger für die Stabilisierung ist.

5) *Ureter:* Der Ureter differenziert sich in der vorliegenden Arbeit am fd 18 vom Wolff-Gang ab. Ab diesem Zeitpunkt durchläuft er ähnliche Reaktionen durch Fibronektin und das HGF-α /c-Met System wie der junge Wolff-Gang am fd 16 und fd 17, reagiert jedoch deutlich weniger auf den Androgen-Rezeptor. Dies steht wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Funktion als Harnableitendes Organ und nicht als Teil des männlichen Genitaltrakts.

6) Die Reaktion von c-Met, die hier erstmalig beschrieben wurde ist nicht vollständig erklärbar. Sie findet erst ab dem fd 18 statt, aber an diesem Tag sehr überschießend und lässt am fd 19 wieder abrupt nach. Es bedarf weiterer zellbiologischer Untersuchungen, um die Veränderungen zu erklären.

Literaturverzeichnis

Archambeault, DeniseR; Tomaszewski, Jessica; Joseph, Avenel; Hinton, BarryT; Yao, HumphreyHung-Chang (2009): Epithelial-mesenchymal crosstalk in Wolffian duct and fetal testis cord development. *Genesis* 47 (1), S. 40–48.

Barbaro, Michela; Oscarson, Mikael; Almskog, Ingrid; Hamberg, Hans; Wedell, Anna (2007): Complete androgen insensitivity without Wolffian duct development: the AR-A form of the androgen receptor is not sufficient for male genital development. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66 (6), S. 822–826.

Bok; Drews (1983): The role of the Wolffian ducts in the formation of the sinus vagina: an organ culture study. *J Embryol Exp Morphol* 73, S. 275–295.

Brinkmann, V.; Foroutan, H.; Sachs, M.; Weidner, K. M.; Birchmeier, W. (1995): Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J Cell Biol* 131 (6 Pt 1), S. 1573–1586.

Brownell, A. G.; Bessem, C. C.; Slavkin, H. C. (1981): Possible functions of mesenchyme cell-derived fibronectin during formation of basal lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (6), S. 3711–3715.

Catizone, A.; Ricci, G.; Arista, V.; Innocenzi, A.; Galdieri, M. (1999): Hepatocyte growth factor and c-MET are expressed in rat prepuberal testis. *Endocrinology* 140 (7), S. 3106–3113.

Catizone, A.; Ricci, G.; Del, BravoJ; Galdieri, M. (2006): Hepatocyte growth factor modulates in vitro survival and proliferation of germ cells during postnatal testis development. *J Endocrinol* 189 (1), S. 137–146.

Catizone, A.; Ricci, G.; Galdieri, M. (2008): Hepatocyte growth factor modulates Sertoli-Sertoli tight junction dynamics. *J Cell Physiol* 216 (1), S. 253–260.

Catlin, E. A.; Ezzell, R. M.; Donahoe, P. K.; Manganaro, T. F.; Ebb, R. G.; MacLaughlin, D. T. (1992): Mullerian inhibiting substance binding and uptake. *Dev Dyn* 193 (4), S. 295–299.

Christ, Bodo; Wachtler, Franz; unter Mitarbeit von Christian Wilhelm (1998): Medizinische Embryologie. Molekulargenetik, Morphologie, Klinik. Wiesbaden: Ullstein Medical.

Connolly, F; Rae, M.T.; Bittner, L.; Hogg, K.; McNeilly, A.S.; Duncan, W.C. (2013): Excess Androgens in Utero alters fetal Testis development. Endocrinology 154 (5) S. 1921-1933

Courtoy, P. J.; Kanwar, Y. S.; Hynes, R. O.; Farquhar, M. G. (1980): Fibronectin localization in the rat glomerulus. *J Cell Biol* 87 (3 Pt 1), S. 691–696.

Cunha, G. R.; Young, P.; Higgins, S. J.; Cooke, P. S. (1991): Neonatal seminal vesicle mesenchyme induces a new morphological and functional phenotype in the epithelia of adult ureter and ductus deferens. *Development* 111 (1), S. 145–158.

Defrances, M. C.; Wolf, H. K.; Michalopoulos, G. K.; Zarnegar, R. (1992): The presence of hepatocyte growth factor in the developing rat. *Development* 116 (2), S. 387–395.

Del, BravoJessica; Catizone, Angela; Ricci, Giulia; Galdieri, Michela (2007): Hepatocyte growth factor-modulated rat Leydig cell functions. *J Androl* 28 (6), S. 866–874.

Francavilla, S.; De, MartinoC; Scorza, BarcellonaP; Natali, P. G. (1983): Ultrastructural and immunohistochemical studies of rat epididymis. *Cell Tissue Res* 233 (3), S. 523–537.

Francavilla, S.; Moscardelli, S.; Properzi, G.; De, Matteis, M.A.; Scorza, BarcellonaP; Natali, P. G.; De, MartinoC (1987): Postnatal development of epididymis and ductus deferens in the rat. A correlation between the ultrastructure of the epithelium and tubule wall, and the fluorescence-microscopic distribution of actin, myosin, fibronectin, and basement membrane. *Cell Tissue Res* 249 (2), S. 257–265.

Frojdman, K.; Paranko, J.; Kuopio, T.; Pelliniemi, L. J. (1989): Structural proteins in sexual differentiation of embryonic gonads. *Int J Dev Biol* 33 (1), S. 99–103.

Furge, K. A.; Zhang, Y. W.; Vande, Woude G. F. (2000): Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 19 (49), S. 5582–5589.

Haag, Petra; Hanhart, Norbert; Müller, Markus (2008): Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis. Inkl. Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Sexualmedizin, Andrologie u. Venerologie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen - 2008/09. 4. Aufl. Breisach am Rhein: Med. Verl.- und Informationsdienste.

Haider, SyedG (2007a): Leydig cell steroidogenesis: unmasking the functional importance of mitochondria. *Endocrinology* 148 (6), S. 2581–2582.

Haider, SyedG (2007b): Leydig cell steroidogenesis: unmasking the functional importance of mitochondria. *Endocrinology* 148 (6), S. 2581–2582.

Haider, S.G. (2010): Männliche Geschlechtsorgane. In: Anatomie (Hrsg.: K.Zilles, B.N. Tillmann). Springer. Heidelberg. 525-544

Hannema SE; Hughes IA (2007): Regulation of Wolffian duct development. *Horm Res* 67 (3), S. 142–151.

Hedman, K.; Vaheri, A.; Wartiovaara, J. (1978): External fibronectin of cultured human fibroblasts is predominantly a matrix protein. *J Cell Biol* 76 (3), S. 748–760.

Herold, Gerd (2012): Innere Medizin 2012. Eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold.

Higgins, S. J.; Young, P.; Cunha, G. R. (1989): Induction of functional cytodifferentiation in the epithelium of tissue recombinants. II. Instructive induction of Wolffian duct epithelia by neonatal seminal vesicle mesenchyme. *Development* 106 (2), S. 235–250.

Ikawa, H.; Trelstad, R. L.; Hutson, J. M.; Manganaro, T. F.; Donahoe, P. K. (1984): Changing patterns of fibronectin, laminin, type IV collagen, and a basement membrane proteoglycan during rat Mullerian duct regression. *Dev Biol* 102 (1), S. 260–263.

Inoue, S.; Leblond, C. P.; Rico, P.; Grant, D. (1989): Association of fibronectin with the microfibrils of connective tissue. *Am J Anat* 186 (1), S. 43–54.

Joseph, Avenel; Yao, Humphrey; Hinton, Barry T. (2009): Development and morphogenesis of the Wolffian/epididymal duct, more twists and turns. *Developmental Biology* 325 (1), S. 6–14.

Kadler, K. E.; Hill, A.; Canty-Laird, E. G. (2008): Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol* 20 (5), S. 495–501.

Karp, S. L.; Ortiz-Arduan, A.; Li, S.; Neilson, E. G. (1994): Epithelial differentiation of metanephric mesenchymal cells after stimulation with hepatocyte growth factor or embryonic spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (12), S. 5286–5290.

Latimer, A. J.; Jessen, JR (2008): Hgf/c-met expression and functional analysis during zebrafish embryogenesis. *Dev Dyn* 237 (12), S. 3904–3915.

Laurie, G. W.; Leblond, C. P.; Martin, G. R. (1982): Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. *J Cell Biol* 95 (1), S. 340–344.

Lüllmann-Rauch, R. (2009): Taschenlehrbuch Histologie. 3. vollst. überarb. Stuttgart, New York, NY: Thieme.

Madri, J. A.; Roll, F. J.; Furthmayr, H.; Foidart, J. M. (1980): Ultrastructural localization of fibronectin and laminin in the basement membranes of the murine kidney. *J Cell Biol* 86 (2), S. 682–687.

Majdic, G.; Millar, M. R.; Saunders, P. T. (1995): Immunolocalisation of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cells of associated ducts. *J Endocrinol* 147 (2), S. 285–293.

Mansfeld, E. (2008): Einfluss der Mikroangiopathie auf die Expression der extrazellulären Matrixmoleküle bei Patienten mit chronischer venöser Insuffizienz. Dissertation. Hg. v. Medizinischen Fakultät Greifswald. Greifswald.

Moore, Keith L.; Persaud, Trivedi V. N.; Viebahn, Christoph (2007): Embryologie. Entwicklungsstadien : Frühentwicklung ; Organogenese ; Klinik. 5. Aufl. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.

Mulisch, M.; Welsch, U. (2009): Romeis- Mikroskopische Technik: Spektrum Akademischer Verlag

Muntau, Ania (2009): Intensivkurs Pädiatrie. Mit 130 Tabellen. 5. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.

Nagano, R.; Kanai, Y.; Kurohmaru, M.; Hayashi, Y.; Nishida, T. (1997): Distribution of desmin and fibronectin in chick embryo gonad during testicular cord formation. *J Vet Med Sci* 59 (7), S. 581–585.

Nakamura, T.; Mizuno, S. (2010): The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86 (6), S. 588–610.

Naldini, L.; Weidner, K. M.; Vigna, E.; Gaudino, G.; Bardelli, A.; Ponzetto, C. et al. (1991): Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J* 10 (10), S. 2867–2878.

Nieschlag, E.; Behre, H. M. (1997): Andrology. Male reproductive health and dysfunction. Berlin , New York: Springer.

O'Hara, L.; Welsh, M.; Saunders, P.T.K.; Smith, L.B. (2011): Androgen receptor expression in the caput epididymal epithelium is essential for development of the initial segment and epididymal spermatozoa transit. *Endocrinology* 152 (2), S. 718–729.

Pearlstein, E.; Gold, L. I.; Garcia-Pardo, A. (1980): Fibronectin: a review of its structure and biological activity. *Mol Cell Biochem* 29 (2), S. 103–128.

Prat, M.; Crepaldi, T.; Gandino, L.; Giordano, S.; Longati, P.; Comoglio, P. (1991): C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 11 (12), S. 5954–5962.

Quigley, C. A.; De, BellisA; Marschke, K. B.; el-Awady, M. K.; Wilson, E. M.; French, F. S. (1995): Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16 (3), S. 271–321.

Rassow, Joachim; Hauser, Karin; Netzker, Roland; Deutzmann, Rainer (2006): Duale Reihe Biochemie. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Ricci, G.; Catizone, A.; Galdieri, M. (2002): Pleiotropic activity of hepatocyte growth factor during embryonic mouse testis development. *Mech Dev* 118 (1-2), S. 19–28.

Ricci, G.; Catizone, A.; Galdieri, M. (2006): Expression and functional role of hepatocyte growth factor and its receptor (c-met) during fetal mouse testis development. *J Endocrinol* 191 (3), S. 559–570.

Somerset, D. A.; Afford, S. C.; Strain, A. J.; Kilby, M. D. (1997): Fetal growth restriction and hepatocyte growth factor. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 77 (3), S. F244-8.

Sonnenberg, E.; Meyer, D.; Weidner, K. M.; Birchmeier, C. (1993): Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol* 123 (1), S. 223–235.

Tolbert, W.D.; Daugherty-Holtrop, J.; Gherardi, E.; Vande, W.G.; Xu, H.E. (2010): Structural basis for agonism and antagonism of hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (30), S. 13264–13269.

Warren, D. W.; Haltmeyer, G. C.; Eik-Nes, K. B. (1972): Synthesis and metabolism of testosterone in the fetal rat testis. *Biol Reprod* 7 (1), S. 94–99.

Weidner, K. M.; Sachs, M.; Birchmeier, W. (1993): The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol* 121 (1), S. 145–154.

Welsh M.; Saunders P.T.; Marchetti N.I.; Sharpe R.M. (2006): Androgen-dependent mechanisms of Wolffian duct development and their perturbation by flutamide. *Endocrinology* 147 (10), S. 4820–4830.

Welsh M.; Saunders P.T.; Sharpe R.M. (2007): The critical time window for androgen-dependent development of the Wolffian duct in the rat. *Endocrinology* 148 (7), S. 3185–3195.

Welsh M.; Sharpe R.M.; Walker M.; Smith L.B.; Saunders P.T. (2009): New insights into the role of androgens in wolffian duct stabilization in male and female rodents. *Endocrinology* 150 (5), S. 2472–2480.

Williams, M. J.; Clark, P. (2003): Microscopic analysis of the cellular events during scatter factor/hepatocyte growth factor-induced epithelial tubulogenesis. *J Anat* 203 (5), S. 483–503.

Wilson, J. D. (1980): Sexual Differentiation: Early Hormone Synthesis and Action. *Biology of Reproduction* 22 (1), S. 9–17.

Woolf, A. S.; Kolatsi-Joannou, M.; Hardman, P.; Andermarcher, E.; Moorby, C.; Fine, L. G. et al. (1995): Roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and the met receptor in the early development of the metanephros. *J Cell Biol* 128 (1-2), S. 171–184.

Wysocki, A. B.; Grinnell, F. (1990): Fibronectin profiles in normal and chronic wound fluid. *Lab Invest* 63 (6), S. 825–831.

Yap, T.A; Bono J.S. (2010): Targeting the HGF/c-Met axis: state of play. *Mol Cancer Ther* 9 (5), S. 1077–1079.

You, W. K.; McDonald, D. M. (2008): The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep* 41 (12), S. 833–839.

Zachow, R.; Uzumcu, M. (2007): The hepatocyte growth factor system as a regulator of female and male gonadal function. *J Endocrinol* 195 (3), S. 359–371.

Danksagung:

In erster Linie möchte ich von ganzem Herzen Herrn Professor Haider danken, für seine unermüdliche Geduld und seine sehr geschätzte Betreuung über die Zeit meiner Arbeit. Ich danke ihm sehr für die Überlassung dieses interessanten Themas, sowie die vielen anregenden Diskussionen in dem Zusammenhang.

Darüber hinaus möchte ich auch Frau Gabriele Berthold danken, für die unermüdliche und professionelle Einführung in sämtliche immunhistochemische Arbeiten und dafür, dass sie mir stets mit Rat und motivierenden Worten beiseite stand.
Abgesehen davon danke ich ihr und Catharina Schröter sehr dafür, dass sie sich als unabhängige Beobachter zur Auswertung meiner immunhistochemischen Reaktionen zur Verfügung gestellt haben.

Auch den weiteren Mitarbeitern des Instituts für Anatomie II möchte ich danken, für die zur Verfügung gestellten Geräte und Arbeitsplätze.

Abgesehen von oben genannter fachlicher Betreuung danke ich auch meiner Familie und meinen Freunden sehr für ihre Unterstützung.
Insbesondere möchte ich meiner Schwester Eva Schlüter und meiner Mutter Martina Schlüter danken, die mir stets motivierend beiseite standen und mir immer das Gefühl gegeben haben, dass sie stolz auf mich sind.

Eidesstattliche Versicherung:

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

19.03.2014, Anke Schlüter

Unterschrift