

Aus dem Anatomischen Institut II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. S. G. Haider

**Histochemische Untersuchung zur  
Ontogenese des Enzyms 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase  
in den Leydigzellen der Ratte**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Barbara Anne Schäfers

2005

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

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

Dekan

Referent: Prof. Dr. Haider

Koreferent: Univ.- Prof. Dr. Hofmann

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
aqua dest.	Aqua destillata
ALZ	Adulttyp Leydigzellen
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAS no.	Chemical Abstract Service Number
Cyp51	Landosterol 14 $\alpha$ -Demethylase
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMF	Dimethylformamid
fd	Fetaltag
FF - MAS	4,4-Dimethyl 5 $\alpha$ -Cholesta,8,14,24-triene-3 $\beta$ -ol; Follicular fluid meiosis activating sterol
FLZ	Fetaltyp Leydigzellen
GA	Glycyrrhetinic acid
hCG	Human Chorion Gonadotropin
HSD	Hydroxysteroid Dehydrogenase
LH	Luteinisierendes Hormon
LH - R	Rezeptor für das Luteinisierende Hormon
LZ	Leydigzellen
LZ - Felder	Leydigzellfelder
NAD(H)	Nicotinamidadenindinucleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
PBR	Peripheral Benzodiazepin Rezeptor
PK - A	Protein Kinase A
pnd	Postnatahtag
P450scc	P450 side chain cleavage
SCP2	Sterol Carrier Protein 2
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
T-MAS	4,4-Dimethyl 5 $\alpha$ -Cholesta,8,24-diene-3 $\beta$ -ol; Testis meiosis activating sterol
TNBT	Tetranitroblau - Tetrazoliumchlorid
VBS	Visible burrow system

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1 - 3</b>
<b>2. Material-Methode</b>	<b>4 - 10</b>
<b>2.1. Untersuchungsmaterial</b>	<b>4</b>
2.1.1 Versuchstiere und Gonadenentnahme	4
2.1.2 Einfrieren des Hodengewebes und Herstellung der Kryostatschnitte	4
<b>2.2. Beschreibung der angewandten Methoden</b>	<b>5 - 8</b>
<b>2.2.1. Enzymhistochemie</b>	
a) Vorbehandlung der Kryostatschnitte	5
b) Stammlösung (wässrig) für 11 $\beta$ - Hydroxysteroid Dehydrogenase, NADPH- Cytochrom- P450 Reduktase und NADH-/ NADPH- Diaphorase	5
c) Phosphatpuffer für NADPH- Cytochrom- P450 Reduktase und NADH-/ NADPH- Diaphorase	6
2.2.1.1. Nachweis der 11 $\beta$ - Hydroxysteroid-Dehydrogenase	6
2.2.1.3. Nachweis der NADPH – Cytochrom – P 450 Reduktase	6
2.2.1.2. Nachweis der NADH-/ NADPH-Diaphorase	7
2.2.1.4. Nachweis der unspezifischen Esterasen	7
2.2.2. Lipidnachweis mit Sudanschwarz B	8
<b>2.3. Semiquantitative Auswertung der Enzymaktivität der 11<math>\beta</math>- Hydroxysteroid         Dehydrogenase</b>	<b>8 - 9</b>
<b>2.4. Qualitative Beurteilung der NADPH – Cytochrom – P450 Reduktase, NADH-/         NADPH-Diaphorase und der unspezifischen Esterasen</b>	<b>10</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>11 - 40</b>
<b>3.1. 11<math>\beta</math>- Hydroxysteroid Dehydrogenase</b>	<b>11 - 28</b>
<b>3.2. Unspezifische Esterasen</b>	<b>29 - 30</b>
<b>3.3. Lipidnachweis mit Sudanschwarz B</b>	<b>31 - 32</b>
<b>3.4. NADH- und NADPH-Diaphorase</b>	<b>33 - 37</b>
<b>3.5. NADPH – Cytochrom – P450 Reduktase</b>	<b>38 - 40</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>41 - 56</b>
<b>5. Literatur</b>	<b>57 - 66</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>68</b>
<b>8. Curriculum vitae</b>	<b>69</b>

## 1. Einleitung

Die Hydroxysteroid Dehydrogenasen (HSD) sind essentiell für die Biosynthese und den Stoffwechsel der Steroide in den Leydigzellen.

Das Enzym 11 $\beta$ -HSD katalysiert die Oxidation von Corticosteron zum inaktiven Metaboliten 11-dehydrocorticosteron in den Leydigzellen der Ratte (Phillips et al. 1989; Monder et al. 1994a,b; Ge et al. 1997a, 1997b; Ge and Hardy 2000). Es wird davon ausgegangen, dass die Funktion von 11 $\beta$ -HSD darin besteht, durch diese Umwandlung das Organ vor einer Hemmung der Testosteronsynthese durch Glukokortikoide zu schützen. Zwei Isoformen von 11 $\beta$ -HSD wurden bis heute nachgewiesen: Typ I (Monder et al. 1991; Yang and Yu 1994) und Typ II (Rusvai and Naray-Fejes-Toth 1993; Yang and Yu 1994), wobei im Hoden bisher nur Typ I nachgewiesen werden konnte. Die vorliegende histochemische Arbeit beschreibt die ontogenetischen Veränderungen in der Verteilung und der Intensität der oxidativen Aktivität von 11 $\beta$ -HSD (Substrat: Corticosteron) in den Leydigzellen der Ratte vom 1. bis zum 90. Postnataltag (pnd). Die erzielten Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen einer Studie über die ontogenetische Entwicklung von 17 $\beta$ -HSD<sup>1</sup> verglichen. Während 11 $\beta$ -HSD für die Regulation von Androgenen in den Leydigzellen der Ratte wichtig ist, spielt das Enzym 17 $\beta$ -HSD eine Rolle bei deren Synthese. Leydigzellen synthetisieren und enthalten einen hohen Anteil an 17 $\beta$ -HSD Typ 4 (Carstensen et al. 1996; Normand et al. 1995). 17 $\beta$ -HSD Typ 4 oxidiert 5-androstene-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Östradiol zu Östron (Adamski et al. 1995; Carstensen et al. 1996). Um zusätzliche Hinweise über die Kapazität der Androgensynthese zu erhalten wurden in dem untersuchen Zeitraum zusätzlich unspezifische Esterasen, Lipide, NADH- und NADPH- Diaphorase sowie NADPH- Cytochrom- P450- Reduktase in den Leydigzellen untersucht.

Um die Ontogenese der Enzyme in den Leydig – Zellen der Ratte beschreiben zu können, muß berücksichtigt werden, dass man zwischen dem 1. und 90. pnd zwei morphologisch und funktionell verschiedene Populationen von Leydigzellen im Hoden der Ratte unterscheidet: Fetaltyp Leydigzellen und Adulttyp Leydigzellen (Haider et al. 1986; Hardy et al. 1989; Kuopio et al. 1989; Haider and Servos 1998; Majdic et al. 1998; Ariyaratne and Mendis- Handagama 2000).

Die **Fetaltyp Leydigzellen (FLZ)** sind in kompakten, rund bis oval geformten Zellkomplexen angeordnet, die in den interstitiellen Dreiecken zwischen den Tubuli

---

<sup>1</sup> Daten aus der Dissertation B. Schlutius (2004), Med. Fakultät, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

seminiferi liegen. Die Zellen dieser „Cluster“ sowie deren Zellkerne sind gross und rund geformt. Das Zytoplasma ist reich an Lipidtröpfchen. Die FLZ zeigen erstmals am 16. Fetaltag (fd) eine histochemisch positive Reaktion für 3 $\beta$ -HSD (Haider et al. 1997). Lichtmikroskopisch sind sie eindeutig bis zum 25. Postnataltag (pnd) nachweisbar. Das weitere Schicksal der FLZ wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während einige Autoren mit der Beobachtung übereinstimmen, dass die FLZ im Rattenhoden nach dem 25. pnd nicht mehr lichtmikroskopisch nachweisbar sind und möglicherweise eine vollständige Regression erfahren und abgebaut werden (Haider et al. 1983, 1986, Kuopio et al. 1989), berichten andere Autoren über die Existenz von aktiv steroidbildenden FLZ im adulten Hoden, welche keiner Dedifferenzierung unterliegen (Kerr and Knell 1988, Ariyaratne and Mendis-Handagama 2000).

Die **Adulttyp Leydigzellen (ALZ)** können sowohl einzeln als auch gruppiert vorliegen, bilden jedoch keine Cluster aus. Lokalisiert sind sie peritubulär, perivaskulär sowie in den interstitiellen Dreiecken zwischen den Tubuli seminiferi. Die ALZ sind groß und rund oder flach geformt, mit runden oder entsprechend flachen Zellkernen. Das Zytoplasma enthält viele oder wenige oder keine Lipidtröpfchen. Die Größe der vorhandenen Lipidtröpfchen ist vorwiegend klein. ALZ sind zum ersten Mal am 13. pnd nachweisbar, wie es auch mit histochemischen Reaktionen für 3 $\beta$ -HSD und LH-Rezeptoren (LH-R) gezeigt wurde. Es wird davon ausgegangen, dass ALZ von peritubulär- oder perivaskulär gelegenen Fibroblasten abstammen. Ihre Differenzierung kann laut Haider (2004) in vier Phasen unterteilt werden: 1. Transformation peritubulärer und perivaskulärer Fibroblasten (pnd 10 bis 13) 2. ALZ – Vorläufer (pnd 14 bis 28) 3. unreife ALZ (pnd 35) 4. reife ALZ (pnd > 56). Die Vorläufer-ALZ produzieren als vorwiegendes Androgen- Endprodukt Androsteron, in der 2. Phase produzieren die noch unreifen ALZ bereits kleine Mengen an Testosteron, metabolisieren es jedoch zum größten Teil. Das vorwiegende Endprodukt ist 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol. Die reifen ALZ produzieren Testosteron als Androgen-Endprodukt und sind vollständig funktionsfähig im geschlechtsreifen Tier am 90. pnd (Hardy et al 1989, 1990, Mendis-Handagama and Ariyaratne 2001). Die wichtigste Funktion der in den ALZ produzierten Androgene ist, den Prozess der Spermatogenese zu initiieren, aufrecht zu erhalten und zu regulieren (Haider 2004).

### **Fragestellung:**

Um die Reifung der Leydigzellen sowie deren funktionelle Entwicklung besser verstehen zu können, ist das Ziel dieser Studie der Frage nachzugehen wie sich das

Enzym 11 $\beta$ -HSD (Substrat: Corticosteron) in den Leydigzellen der Ratte von der Geburt bis zur Geschlechtsreife (1. bis 90. pnd) histochemisch verhält. Diese Problemstellung gliedert sich in folgende Teilfragen:

1. Ab welchem Zeitpunkt ist 11 $\beta$ -HSD mit histochemischen Methoden nachweisbar und wie entwickelt sich die Ausprägung der oxidativen 11 $\beta$ -HSD- Aktivität über den untersuchten Zeitraum?
2. Gibt es Unterschiede in der Coenzym- Akzeptanz für NAD und NADP ?
3. Gibt es durch die Enzymverteilung Hinweise auf unterschiedliche Reifungs- oder Stoffwechszustände der Leydigzellen ?
4. Wie verhält sich der Verlauf der Enzymaktivität für das Enzym 11 $\beta$ -HSD im Vergleich zum Verlauf für das Enzym 17 $\beta$ -HSD ?
5. Die Lipideinlagerungen im Zytoplasma der Leydigzellen sind Ausdruck des Vorrates an Cholesterin, welches durch unspezifische Esterasen für die Steroidbiosynthese bereitgestellt werden kann. Wie stellen sich die Lipidverteilung und die unspezifischen Esterasen im Zytoplasma der Leydigzellen im Einzelnen dar und inwieweit können diese Aufschluss über Reifung und Funktionszustand der Leydigzellen geben?
6. Die NADPH-Cytochrom-P450 Reduktase spielt eine wichtige Rolle bei der Cholesterinbiosynthese. Wie ist die Enzymverteilung der NADPH-Cytochrom-P450 Reduktase in den Leydigzellen im untersuchten Zeitraum? Welche Unterschiede ergeben sich im ontogenetischen Verlauf im Vergleich zu 11 $\beta$ -HSD?
7. Die NADH- und die NADPH- Diaphorase können Auskunft über die Kapazität der intrazellulären Oxidation der Leydigzellen geben. Wie ist die Enzymverteilung der NADH- und der NADPH-Diaphorase im untersuchten Zeitraum in den Leydigzellen der Ratte? Wie unterscheidet sich die Enzymreaktion der NADH-Diaphorase von der NADPH-Diaphorase? Welche Unterschiede ergeben sich im ontogenetischen Verlauf im Vergleich zu 11 $\beta$ -HSD?

## **2. Material-Methode**

### **2.1. Untersuchungsmaterial**

#### **2.1.1 Versuchstiere und Gonadenentnahme**

Als Untersuchungsmaterial dienten die Hoden von insgesamt 64 männlichen Wistarratten.

Die Aufzucht der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei einem 12 Stunden Licht-Dunkel-Zyklus im zentralen Tierlabor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Wasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung. Die Gewinnung des Untersuchungsmaterials erfolgte im März und April 1998. Das Alter der Tiere erstreckte sich vom ersten bis zum 90. Postnataltag (pnd). Für jeden der folgenden Termine wurden vier Tiere verwendet: 1. pnd, 5. pnd, 10. pnd, 13. pnd, 16. pnd, 19. pnd, 22. pnd, 25. pnd, 28. pnd, 31. pnd, 34. pnd, 37. pnd, 40. pnd, 45. pnd, 50. pnd, 90. pnd. Zwischen dem 10. und 40. pnd wurden kurze Intervalle gewählt da es sich hier um eine wichtige Zeit in der Entwicklung und Reifung der Leydigzellen handelt. Die Tiere wurden am Untersuchungstag zwischen 10.00 und 11.00 Uhr mit Äther narkotisiert und durch zervikale Dekapitation getötet. Sofort im Anschluß wurden die Hoden herauspräpariert.

#### **2.1.2 Einfrieren des Hodengewebes und Herstellung der Kryostatschnitte**

Das frisch entnommene Gewebe wurde auf einen Objektisch mit feuchtem Filterpapier gebracht und mit Klarsichtfolie umhüllt. Derart präpariert wurde es durch zweiminütiges Auf- und Abbewegen in flüssigem Stickstoff bei  $-190\text{ °C}$  schockgefroren. Bis zur Aufarbeitung wurde das Hodengewebe bei  $-70\text{ °C}$  in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Für die verschiedenen enzymhistochemischen Reaktionen wurden im Kryostaten bei  $-20\text{ °C}$   $7\text{ }\mu\text{m}$  dicke Querschnitte des Hodens in Serie angefertigt.

## **2.2. Beschreibung der angewandten Methoden**

### **2.2.1. Enzymhistochemie**

Zur enzymhistochemischen Darstellung der 11 $\beta$ -HSD-Aktivität wurde die Grundmethode von Wattenberg (1958) herangezogen, modifiziert nach Haider (1988). Die Inkubationszeit sowie die Molaritäten der Substrate, der Coenzyme und des Tetranitroblau Tetrazoliumchlorids (TNBT) wurden in Vorversuchen optimiert.

#### **a) Vorbehandlung der Kryostatschnitte**

Um eine optimale Lokalisation der intrazellulären Enzyme zu erreichen (Lojda et al. 1965; Lojda et al. 1979) wurden die Kryostatschnitte vor der Enzymreaktion aufgetaut, drei Minuten in Aceton bei -25 °C fixiert (Passia und Haider 1980) und anschließend an der Luft getrocknet.

#### **b) Stammlösung (wässrig) für 11 $\beta$ - Hydroxysteroid Dehydrogenase, NADPH-Cytochrom-P450 Reduktase und NADH-/ NADPH- Diaphorase**

Für die Stammlösung (Lojda et al. 1979) wurden folgende Substanzen in der angegebenen Reihenfolge zusammengefügt, die Lösung anschließend auf pH 7,4 eingestellt und filtriert:

- 100 ml eines 0,1 M Phosphatpuffers (pH 7,4):
  - 20 g Polyvinylalkohol als Diffusionsschutz in einer Mischung von 20 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Lösung (1,361g / 100ml aqua dest.) und 80 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O – Lösung (1,780g / 100ml aqua dest.) gelöst.
- 100 ml einer 2,5 mM Tetranitroblau Tetrazoliumchlorid (TNBT)- Lösung als H-Akzeptor:
  - 225 mg TNBT in 5ml Dimethylformamid (DMF) lösen und mit aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und anschließend filtriert.
- 40 ml einer 0,1 M NaCN – Lösung zur Blockierung der Cytochrome und Cytochrom-oxidasen
- 40 ml einer 0,05 M MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O – Lösung als Stabilisierungsfaktor
- 80 ml aqua dest.

### **c) Phosphatpuffer für NADPH-Cytochrom-P450 Reduktase und NADH-/ NADPH-Diaphorase**

48,75ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – Lösung (1,361g / 100ml aqua dest.) wurde mit 1,25ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – Lösung (1,780g / 100ml aqua dest.) vermischt. Anschließend wurde die Lösung auf einen pH von 5,3 eingestellt und auf 60° C erwärmt.

#### **2.2.1.1. Nachweis der 11 $\beta$ - Hydroxysteroid Dehydrogenase**

Als Inkubationsmedium wurden 20 ml Stammlösung verwendet, welcher die folgenden Substanzen in der angegebenen Reihenfolge zugefügt wurden:

- Coenzym (H-Donator): 2 mM NAD (26 mg) oder 2 mM NADP (31,5 mg)
- Substrat: 1,73 mg (2,5 mM) bzw. 3,46 mg (5 mM) Corticosteron (CAS no. 50-22-6) in 2 ml DMF gelöst.
- Intermediärer Elektronencarrier: 1,23 mg Phenazinmethosulfat (0,2 mM ).

Anschließend wurde der pH auf 7,4 eingestellt, die Kryostatschnitte sofort mit dem Inkubationsmedium bedeckt und dann bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 75 Minuten wurde die Reaktion durch gründliches Abspülen mit aqua dest. gestoppt und die Schnitte mit Glyzeringelatine eingedeckt.

Parallel dazu wurden Negativ- und Positivkontrollen unter denselben Versuchsbedingungen angefertigt. Als Negativkontrolle wurden jeweils vier Schnitte der gleichen Altersgruppe inkubiert, wobei lediglich das Substrat dem Inkubationsmedium nicht zugegeben wurde. Diese dienen dazu, unspezifische Reaktionen des sogenannten „non specific dehydrogenase effect“, im Folgenden als „unspezifischer Dehydrogenase Effekt“ bezeichnet, bei der Auswertung berücksichtigen zu können. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein Schnitt eines adulten Tieres (pnd 90) inkubiert.

#### **2.2.1.3. Nachweis der NADPH – Cytochrom – P 450 Reduktase**

Als Inkubationsmedium wurden 10 ml Stammlösung verwendet, welcher als Substrat 2 mM NADPH (16,67 mg) zugegeben wurde. Anschließend wurde der pH auf 7,4

eingestellt, die Kryostatschnitte sofort mit dem Inkubationsmedium bedeckt und dann bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 20 Minuten wurden die Schnitte gründlich mit aqua dest. gespült und die Reaktion dann durch einminütiges Schwenken in einem 60° C warmen Phosphatpuffer gestoppt. Abschließend wurden die Schnitte mit Glyzeringelatine eingedeckt. Als Negativkontrolle wurden jeweils vier Schnitte der gleichen Altersgruppe inkubiert, wobei lediglich das Substrat NADPH dem Inkubationsmedium nicht zugegeben wurde.

#### **2.2.1.2. Histochemischer Nachweis von NADH-Diaphorase und NADPH-Diaphorase**

Als Inkubationsmedium wurden 10 ml Stammlösung verwendet, welcher die folgenden Substanzen in der angegebenen Reihenfolge zugefügt wurden:

- Substrat: 2 mM NADH (14,19 mg) oder 2 mM NADPH (16,67mg)
- Intermediärer Elektronencarrier: 1 mM Menadion (1,72 mg) gelöst in zwei Tropfen DMF.

Anschließend wurde der pH auf 7,4 eingestellt, die Kryostatschnitte sofort mit dem Inkubationsmedium bedeckt und dann bei 37 °C in einer feuchten Kammer 20 Minuten lang inkubiert. Danach wurden die Schnitte gründlich mit aqua dest. gespült. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte in einem 60° C warmen Phosphatpuffer eine Minute lang geschwenkt. Abschließend wurden die Schnitte mit Glyzeringelatine eingedeckt. Als Negativkontrolle wurden jeweils vier Schnitte der gleichen Altersgruppe inkubiert, wobei lediglich das Substrat NADH bzw. NADPH dem Inkubationsmedium nicht zugegeben wurde.

#### **2.2.1.4. Nachweis der unspezifischen Esterasen**

Als Inkubationsmedium wurden folgende Substanzen in der angegebenen Reihenfolge zusammengefügt:

- 2 mg 1-Naphthylacetat in 0,5 ml DMF gelöst
- 10 ml eines 0,1 M Phosphatpuffers (pH 6,5):

7 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – Lösung (1,361g / 100ml aqua dest.) gemischt mit 3 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  – Lösung (1,780g / 100ml aqua dest.).

- 0,4 ml 4%  $\text{NaNO}_2$  mit 0,4 ml 4% Pararosanilinlösung gemischt.

Zur Herstellung der 4% Pararosanilinlösung wurden 400 mg Pararosanilin in 2 ml 37% Salzsäure unter Rühren gelöst, 8 ml aqua dest. hinzugefügt und die Lösung im Anschluss filtriert.

Abschließend wurde die Lösung auf pH auf 6,5 eingestellt und nochmals filtriert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Nach 9 Minuten wurden die Schnitte mit aqua dest. gespült. Anschließend erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun. Dafür wurden die Schnitte für fünf Minuten mit Hämalaun bedeckt und danach fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Entwässerung erfolgte in Alkohol (70%, 80%, 90%, 95%, 2x 100%) für jeweils mindestens zwei Minuten und abschließend für fünf Minuten in Neo Clear (Firma Merck). Eingedeckt wurden die Schnitte mit Neo Mount (Firma Merck).

### **2.2.2. Lipidnachweis mit Sudanschwarz B**

Zur Herstellung der Sudanschwarz B-Lösung wurde 0,1 g Sudanschwarz B wurde mit 100 ml 70% Ethanol übergossen und in einem Wasserbad bis zum Kochen erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung filtriert. Die Kryostatschnitte wurden zunächst zur Vorbehandlung in 4% Formollösung 5 Minuten im Kühlschrank fixiert und danach mit aqua dest. gespült. Danach wurden die Schnitte für 40 min in die Sudanschwarz B-Lösung gestellt und anschließend mit aqua dest. gespült. Es folgte eine Kerngegenfärbung mit Kernechtrot. Dazu wurden die Schnitte für 20 min in Kernechtrot-Lösung gestellt und erneut mit aqua dest. gespült. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit Glyceringelatine eingedeckt.

## **2.3. Semiquantitative Auswertung der Enzymaktivität der $11\beta$ -Hydroxysteroid**

### **Dehydrogenase**

Die Messung der Reaktionsintensität der  $11\beta$ -HSD in den Leydigzellen erfolgte an dem Mikrospektralphotometer MSPU 80 (ZEISS). Zur Ermittlung der Reaktionsintensität wurde zunächst das Absorptionsmaximum festgestellt. Dazu wurden Hodenschnitte aller Altersgruppen mit dem Software Programm Lambdascan<sup>®</sup> über einen

Wellenbereich von 350 nm bis 700 nm kontinuierlich gemessen. Die Standardabsorptionskurve ergab ein Absorptionsmaximum bei 480 nm. Anschließend wurden die Messungen der Intensitäten der Reaktionsprodukte mit dem Software Programm Photan<sup>®</sup> bei 480 nm durchgeführt. An einer Stelle des Objektträgers unter dem Deckgläschen wurde ein Leerwert ermittelt. Dann wurden zwei aufeinander folgende Messungen vorgenommen: 1. Die Hintergrund-Absorption der Zelle 2. Die Absorption der Leydigzellen. Das Verhältnis der Messungen 1 und 2 ist ein indirekter Ausdruck für die Intensität des Reaktionsproduktes und wurde zur semiquantitativen Auswertung der enzymatischen Reaktion verwendet. In einer Altersgruppe, bestehend aus 12 Schnitten (4 Tiere, 3 Schnitte pro Tier), wurden 12 Leydigzellfelder pro Schnitt gemessen. Um falsch positive bzw. falsch negative Messungen zu vermeiden wurden ein bis zwei Schnitte, die sich in Farbgebung oder Gewebequalität stark von den anderen Schnitten unterschieden bei der Messung vernachlässigt. Außerdem wurden der höchste und der niedrigste gemessene Wert eines jeden Schnittes gelöscht, so dass mindestens 100 Leydigzellfelder pro Altersgruppe ausgewertet wurden. Die Schnitte waren jeweils mindestens 35 µm voneinander entfernt, so dass das Risiko, eine Zelle mehrmals zu erfassen, mit größter Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte. Direkt im Anschluß an die Auswertung eines Untersuchungstages wurden die zugehörige Negativkontrolle (pro Tier ein Schnitt) und Positivkontrolle nach dem gleichen Verfahren gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse entstand unter Einbeziehung der Negativkontrollen.

Mittelwert und Standardabweichung der Ergebnisse wurden berechnet und in Diagrammen graphisch dargestellt. In einem weiteren Diagramm wurden vom 31.pnd bis zum 90.pnd die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über das Enzym 11β-HSD mit den Ergebnissen des Enzyms 17β-HSD<sup>1</sup>, welches mit dem Substrat 5-Androstene-3β,17β-diol nachgewiesen wurde verglichen. Mit dem Student's t- Test wurde die Unterschiedlichkeit der Werte beurteilt. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der einzelnen Messungen des Enzyms 11β-HSD in jeweils 4 Intensitäts-Ranggruppen für schwache, mäßige, starke und sehr starke Reaktionsintensität eingeteilt. Orientiert am höchsten gemessenen Wert für die Reaktion mit NAD, erfolgte die Aufteilung in folgende Ranggruppen: schwach (0-15%), mäßig (15-30%), stark (30-45%), sehr stark (45-60%). Die Ergebnisse werden für

---

<sup>1</sup> Daten aus der Dissertation von B. Schlutius, Med. Fakultät, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

jeden untersuchten pnd, ausgehend von 100% gemessener Leydigzellfelder in Histogrammen dargestellt.

#### **2.4. Qualitative Beurteilung der NADPH-Cytochrom-P450 Reduktase, der NADH-/ NADPH- Diaphorase und der unspezifischen Esterasen**

Zur Auswertung standen pro Termin 4 Tiere mit je 1 Schnitt zur Verfügung. Die Hodenschnitte wurden von mindestens 2 Untersuchern unabhängig und getrennt voneinander lichtmikroskopisch beurteilt. Die Intensität der Enzymreaktion in den Leydigzellen der Hodenschnitte wurde qualitativ nach folgenden Graden beurteilt:

0 = keine, 1 = schwache, 2 = mäßige, 3 = starke, 4 = sehr starke Reaktion.

Waren Abweichungen in der Beurteilung der Untersucher untereinander vorhanden, so wurde der Mittelwert aus den Ergebnissen gebildet. Die Ergebnisse wurden in Diagrammen dargestellt.

### 3. Ergebnisse<sup>1</sup>

#### 3.1. 11 $\beta$ - Hydroxysteroid Dehydrogenase

Die Abbildungen 1, 2 und 3 zeigen einen Überblick über die Entwicklung der Verteilungsmuster und Intensität der histochemischen Reaktion für 11 $\beta$ - HSD in Leydigzellen der Ratte am Beispiel der Versuchsreihe mit 5 mM Substrat und NAD als Coenzym. Das Reaktionsprodukt zeigt sich als grau– schwarze Anfärbung im Zytoplasma welche in ihrer Intensität mit der Stärke der vorhandenen Enzymreaktion korreliert. Die Zellkerne sind dabei ausgespart und imponieren als helle runde bis ovale Areale. Am 25. pnd sind noch alle interstitiellen Felder frei von einer enzymatischen Reaktion (Abb. 1a), d. h. weder FLZ noch ALZ zeigen eine histochemische Reaktion für 11 $\beta$ - HSD. Am 31. pnd (Abb. 1b) kann erstmals eine schwache Reaktion beobachtet werden. Sie zeigt sich in einigen interstitiellen Feldern fokal im Zytoplasma der ALZ. Andere Felder sind weiterhin frei von einer enzymatischen Reaktion. Am 40. pnd finden sich in fast allen Interstitien enzympositive Zellen (Abb. 2a). Die Reaktionsintensität ist dabei sehr heterogen verteilt. Auch am pnd 50 findet sich in den meisten interstitiellen Feldern eine Enzymreaktion (Abb. 2b), welche aber insgesamt etwas schwächer ist als die am pnd 40. Am 90. pnd ist die Enzymreaktion schließlich voll ausgeprägt und findet sich in allen Interstitien (Abb. 3a). Die grauen Präzipitate in den Tubuli seminiferi sowie die Anfärbung der elongierten Spermatozoen findet sich ebenfalls in der Negativkontrolle (Abb. 3b). Da dem Inkubationsmedium der Negativkontrolle kein Substrat sondern nur das entsprechende Coenzym (hier NAD) zugegeben wurde, handelt es sich bei der Farbreaktion um eine nur scheinbar enzympositive Reaktion, den unspezifischen Dehydrogenase Effekt.

In einer höheren Vergrößerung (Abb. 4a) lässt sich die heterogene Verteilung der enzympositiven Leydigzellen innerhalb eines Hodenquerschnittes noch etwas genauer darstellen. Zusätzlich erkennt man die typische Lage der Leydigzellen, die sich peritubulär, perivaskulär und in den interstitiellen Zwickeln befinden. Am 31. pnd finden sich vor allem schwach und mäßig positive Zellen (dicke Pfeile). Andere Zellen sind im Vergleich zur Negativkontrolle als enzymnegativ zu bewerten (kurze Pfeile).

---

<sup>1</sup> Ein Teil der vorliegenden Befunde wurde in der folgenden Publikation veröffentlicht:  
Schäfers BA, Schlutius BG, Haider SG (2001) Ontogenesis of oxidative reaction of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells, a histochemical study.  
*Histochemical Journal* **33**: 585-595

Dagegen sind die beiden dargestellten Blutgefäße (lange Pfeile) als schwach positiv zu bewerten.

Bei den in Abb. 5a,b gezeigten Hodenquerschnitten handelt es sich um die histochemische Reaktion für 11 $\beta$ -HSD mit 2,5 mM Substrat und NAD als Coenzym. Mit dieser Kombination wurden die differenziertesten Ergebnisse erzielt. So repräsentieren diese Bilder sowohl die minimale Reaktionsintensität (Abb. 5a, pnd 31) als auch die maximal erreichte Intensität (Abb. 5b, pnd 90).

Zwischen dem 37. und 40. pnd zeigte sich in allen Versuchsreihen sowohl eine starke Zunahme in der Reaktionsintensität als auch der Anzahl der enzympositiven Zellen in einem Hodenquerschnitt. Abb. 6a,b veranschaulicht diesen Wendepunkt anhand der histochemischen Reaktion für 11 $\beta$ -HSD mit 5 mM Substrat und NADP als Coenzym: Während sich an pnd 37 (Abb. 6a) nur in einigen Interstitien schwach und mäßig positive Zellen finden, ist an pnd 40 (Abb. 6b) in fast allen Interstitien eine Reaktion zu beobachten. Der Anteil der schwach positiven Zellen ist stark zurückgegangen und es finden sich zusätzlich zu den mäßig positiven auch einige stark positive Zellen.

Wenn 5 mM Substrat und NADP als Coenzym verwendet wurden, wurde am pnd 50 kein Rückgang der Intensität gegenüber pnd 40 festgestellt. Im Gegenteil wird schon am pnd 50 (Abb. 7a) die maximale Intensität erreicht und bleibt bis zum pnd 90 (Abb. 7b) erhalten. Im Gegensatz zu den für pnd 90 dargestellten Blutgefäßen können die für pnd 50 dargestellten Gefäße im Vergleich mit der Negativkontrolle als schwach positiv interpretiert werden. Die als graue Präzipitate erkennbaren elongierten Spermatiden stellen sich in der Negativkontrolle ebenso dar. Es handelt sich um den unspezifischen Dehydrogenase Effekt.

Die Diagramme in Abbildung 8 zeigen den Verlauf der enzymatischen Reaktionsintensität von 11 $\beta$ -HSD in Leydigzellen der Ratte zwischen dem 1. und 90. pnd mit den Coenzymen NAD und NADP. Dargestellt sind jeweils die nach einer semiquantitativen Auswertung am Spektralphotometer ermittelten Mittelwerte mit der entsprechenden Standardabweichung. Zum Vergleich sind sich in einem Diagramm jeweils die Ergebnisse für die zwei untersuchten Substratmolaritäten (violette Balken: 2,5 mM, blaue Balken: 5 mM) gegenübergestellt. Vom 1. bis 28. pnd zeigt sich in keiner der Versuchsreihen und weder in FLZ noch in ALZ eine histochemisch positive

Reaktion für 11 $\beta$  – HSD. Im Verlauf zeigt sich dann eine graduelle Zunahme der Reaktionsstärke zwischen pnd 31 (an dem erstmals eine positive Reaktion nachweisbar ist) und pnd 90, an dem ein Intensitätsmaximum erreicht wird. Ein erster signifikanter Höhepunkt ( $p < 0,05$ ) wird mit NAD als Coenzym am pnd 40 erreicht (Abb. 8a). Wird NADP als Coenzym verwendet ist dies am pnd 45 der Fall (Abb. 8b). In beiden Fällen folgt dem Höhepunkt eine signifikante Intensitätsabnahme am pnd 50. Bei einer Substratkonzentration von 5 mM und NADP als Coenzym unterscheidet sich die Reaktivität am pnd 45 nicht signifikant von der am pnd 50 und pnd 90 (Abb. 8b, blaue Balken).

Der Verlauf der Reaktionsintensitäten ist ähnlich, wenn man sie für die Substratmolaritäten 2,5 mM und 5mM vergleicht. Etwas deutlichere Ergebnisse können erzielt werden, wenn 2,5 mM Substrat verwendet werden. Mit dieser Konzentration konnte auch die maximale Intensität ( $p < 0,05$ ) beobachtet werden: Mit NAD als Coenzym am pnd 90 und mit NADP als Coenzym am pnd 45 und 90. In letzterem Falle unterschieden sich die Höhepunkte am pnd 45 und pnd 90 nicht signifikant voneinander.

Das Muster der Reaktionsintensitäten stimmt für die durch NAD bzw. NADP erzielten Reaktionen weitgehend überein.

In Abb. 9 wird der Verlauf der Reaktionsintensitäten von 11 $\beta$ - HSD und 17 $\beta$ - HSD<sup>1</sup> von pnd 31 bis pnd 90 miteinander verglichen. Wenn man den Verlauf der Reaktionsintensitäten für die beiden Enzyme von dem Tag, an dem sich für 11 $\beta$ - HSD erstmals eine positive Reaktion zeigt (pnd 31) bis zum 90. pnd miteinander vergleicht, so zeigen sie ein annähernd inverses Verhältnis zueinander. Alle dargestellten prozentualen Werte der Reaktionsintensität sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ) mit der Ausnahme des 34. pnd und NADP als Coenzym. Sowohl mit dem Coenzym NAD (Abb. 9a), als auch mit NADP (Abb. 9b) kreuzen sich die Kurven zwischen pnd 37 und 40: Während die Intensität der 17 $\beta$ - HSD Reaktion abnimmt, nimmt die Intensität der Reaktion für 11 $\beta$ - HSD zu. Im Falle der NADP- abhängigen Reaktion zeigen die zwei Enzyme danach einen divergenten Verlauf vom pnd 40 bis pnd 90 mit hohen Intensitäten für 11 $\beta$ - HSD und niedrigen Intensitäten für 17 $\beta$ - HSD. Wird NAD als Coenzym verwendet, kreuzen sich die zwei Graphen nochmals zwischen pnd 45 und 50, so dass die Reaktionsintensität für 17 $\beta$ - HSD am pnd 50 ihr Maximum erreicht, während die Aktivität von 11 $\beta$ - HSD nur niedrig ist und erst am pnd 90 ihr Maximum erreicht; die Verlaufskurven der Reaktionsintensität der zwei Enzyme nähern sich

---

<sup>1</sup> Daten aus der Dissertation B. Schlutius (2004), Med. Fakultät, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

einander an und führen am pnd 90 zu fast gleichen Werten für 11 $\beta$ - HSD und 17 $\beta$ - HSD.

Die Reaktionsstärke für 11 $\beta$ - HSD war in den Leydigzellen ein und desselben Hodenquerschnitts nicht immer gleichmäßig verteilt. Dies gilt für alle Altersgruppen vom pnd 31 bis pnd 90. Diese Heterogenität der Enzymreaktion wird in den Histogrammen für die 11 $\beta$ - HSD Reaktion mit NAD (Abb. 10) und mit NADP (Abb. 11) dargestellt. Zur graphischen Darstellung wurden vier Intensitätsranggruppen gebildet. Orientiert am höchsten Messwert erfolgte eine Aufteilung in Intervalle von 0 – 15 % für eine schwache Reaktionsintensität, 15 – 30 % für mäßige Reaktionsintensität, 30 – 45 % für starke und 45 – 60 % für sehr starke Reaktionsintensität.

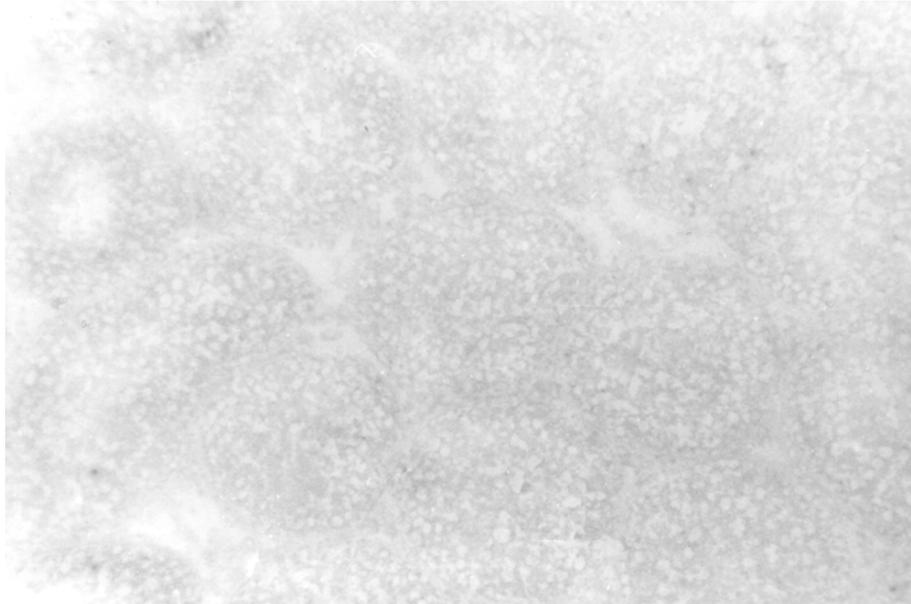
Abb. 10 zeigt die Histogramme für die Versuchsreihen mit NAD als Coenzym. Dabei sind jeweils die Ergebnisse der zwei verschiedenen Substratmolaritäten für die einzelnen Postnataltage nebeneinander dargestellt. Die linke Kolumne (blaue Balken) zeigt die Verteilung der Reaktionsintensitäten bei einer Substratkonzentration von 5 mM, die rechte Kolumne (violette Balken) zeigt die Verteilung der Reaktionsintensitäten bei einer Substratkonzentration von 2,5 mM. Die Ergebnisse für eine Substratkonzentration von 5 mM und 2,5 mM sind annähernd gleich, es zeigen sich jedoch etwas distinguiertere Verhältnisse bei einer Substratkonzentration von 2,5 mM. Von oben nach unten lässt sich jeweils die Entwicklung der Reaktionsintensitäten über die Zeit (pnd 31 bis 90) verfolgen. Betrachtet man die ontogenetische Entwicklung, so beobachtet man einen Übergang zu den höheren Intensitätsgruppen mit zunehmendem Alter bis zum 90. pnd. Eine Ausnahme bildet der pnd 50.

Einen ersten klaren Umbruch erkennt man zwischen pnd 37 und 40. An pnd 40 kommen zahlreiche stark positive Zellen vor und es tauchen erstmals auch sehr stark positive Zellen auf. Der Anteil der schwach- bis mäßig positiven Zellen sinkt von 94% an pnd 37 (95% bei 2,5 mM Substrat) auf 52% an pnd 40. Ein zweiter Umbruch scheint sich um den 50. pnd zu vollziehen. Hier haben die schwach- bis mäßig positiven Zellen wieder einen Anteil von 85 % (89% bei 2,5 mM Substrat). Die stärkste Reaktion kann am pnd 90 beobachtet werden. Sie spiegelt sich in dem hohen Anteil stark positiver und sehr stark positiver Zellen wieder. 57 % der Zellen werden bei einer Substratkonzentration von 5 mM stark- bis sehr stark positiv, bei einer Konzentration von 2,5 mM sind es 92 %.

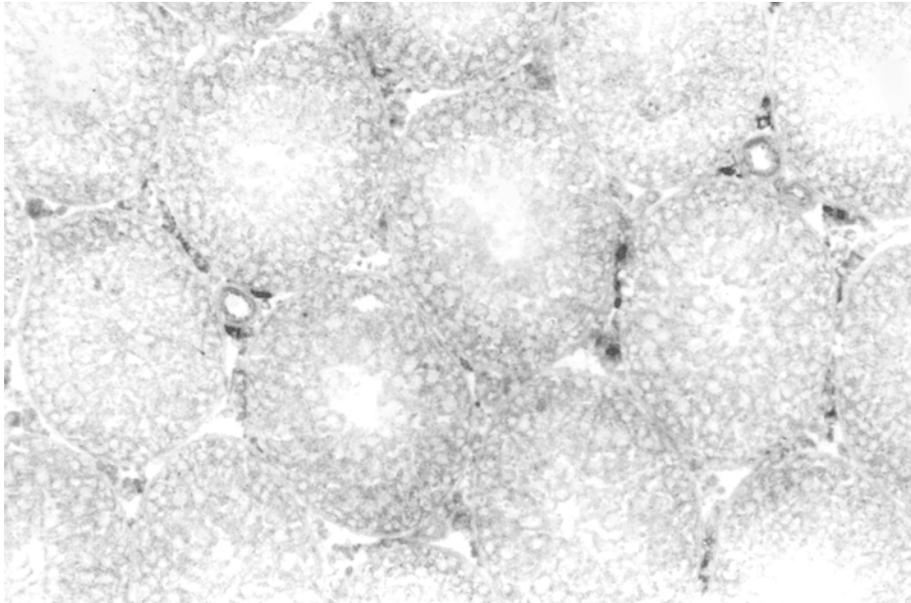
Abb. 11 zeigt die Histogramme für die Versuchsreihen mit NADP als Coenzym. Die Ergebnisse sind weitgehend ähnlich, es zeigt sich jedoch dass dem Ausbleiben des

Absinkens der Intensität am pnd 50 mit 5 mM Substrat ein verstärktes Auftreten von mäßig bis stark positiven Zellen entspricht (97%) während diese Intensität im Falle von 2,5 mM Substratmolarität nur 51% der gemessenen Zellen aufweisen. Insgesamt sind die Ergebnisse für die Versuchsreihen mit NADP als Coenzym etwas weniger differenziert als die mit NAD als Coenzym. Die ontogenetischen Schwankungen der Reaktionsintensitäten, z.B. zwischen pnd 37 und 40 als erstem Höhepunkt der Enzymreaktionsstärke stellen sich nicht so deutlich dar wie in den Versuchsreihen mit NAD. Der Anteil der schwach- bis mäßig positiven Zellen beträgt am pnd 37 91% (96% bei 2,5 mM Substrat) und am pnd 40 noch 73% (79% bei 2,5 mM Substrat). Ebenso wird eine insgesamt schwächere maximale Reaktionsintensität am pnd 90 bzw. 45 erreicht. Der Anteil der stark bis sehr stark positiven Zellen beträgt am pnd 45 41% (58% bei 2,5 mM Substrat) und 35% (50% bei 2,5 mM Substrat) am pnd 90. Es kommen vor allem weniger sehr stark positive Zellen vor als bei der NAD- abhängigen Reaktion.

a)



b)



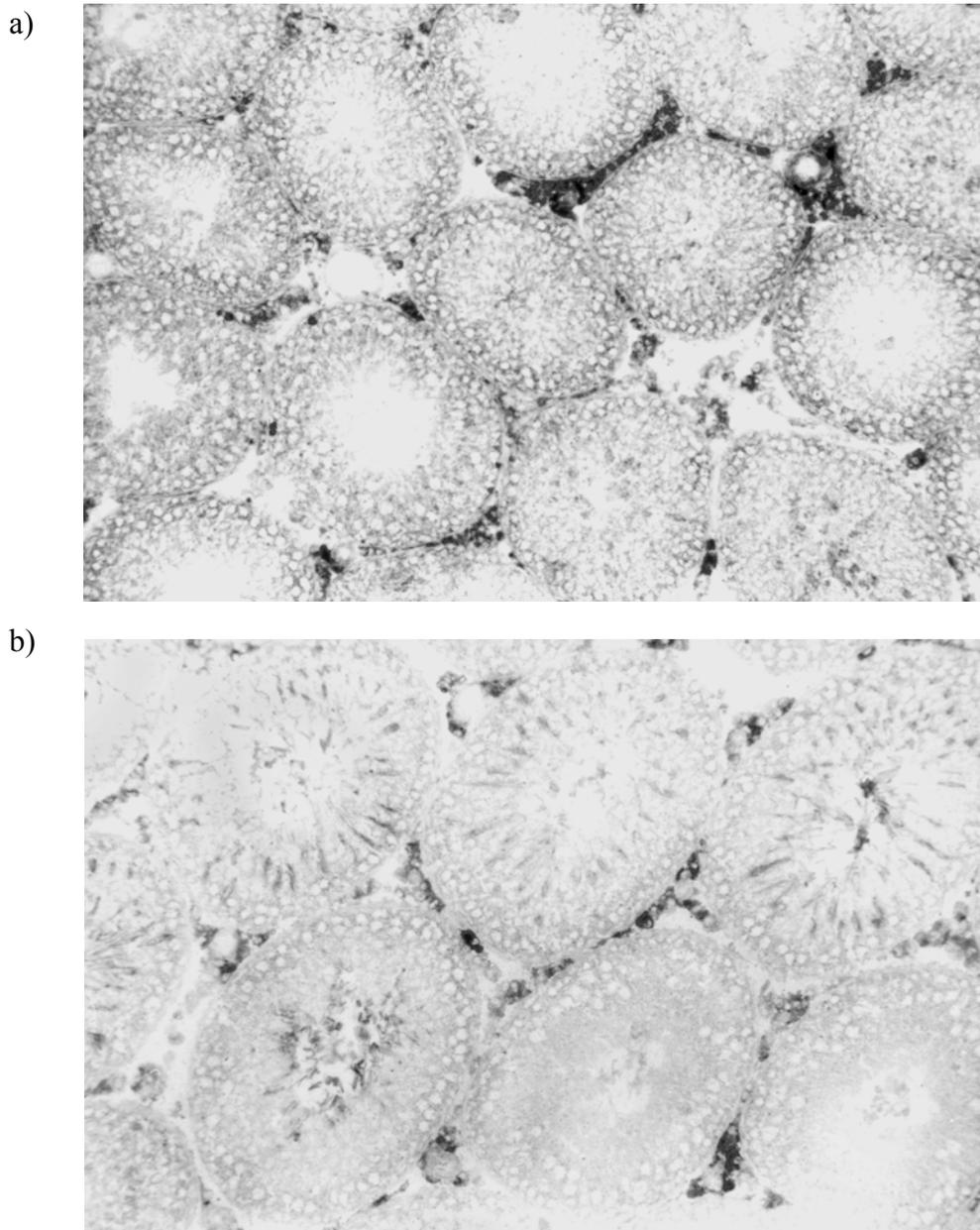
**Abbildung 1.**

Ezymhistochemische Darstellung des Enzyms  $11\beta$  - HSD in Leydigzellen der Ratte  
(**Substrat: 5 mM** Corticosteron, **Coenzym NAD**).

Kryostatschnitte ( $7\mu\text{m}$ ). Vergrößerung: 105:1

a) 25. pnd: Alle interstitiellen Felder sind frei von einer Reaktion

b) 31. pnd: Erstmals weisen fokal einige ALZ eine Reaktion auf,  
welche als dunkel- graue Anfärbung im Zytoplasma zu erkennen ist.

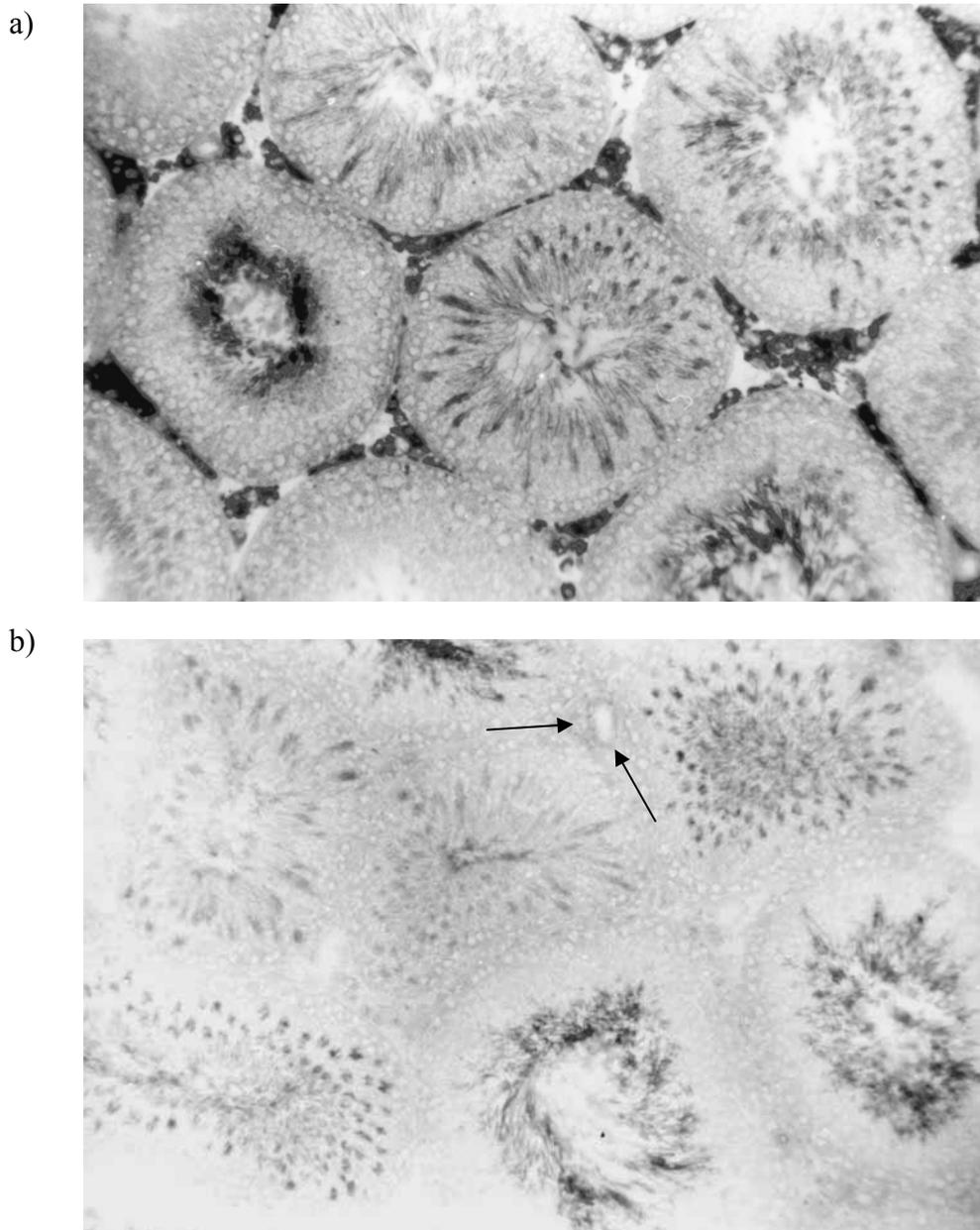


**Abbildung 2.**

Ezymhistochemische Darstellung des Enzyms  $11\beta$  - HSD in Leydigzellen der Ratte  
(**Substrat: 5 mM** Corticosteron, **Coenzym NAD**).

Kryostatschnitte ( $7\mu\text{m}$ ). Vergrößerung: 105:1

- a) 40. pnd: Bei heterogener Verteilung der Reaktionsintensität finden sich in fast allen Interstitien enzympositive Zellen.
- b) 50. pnd: Im Vergleich zum pnd 40 hat die Reaktionsintensität insgesamt abgenommen.

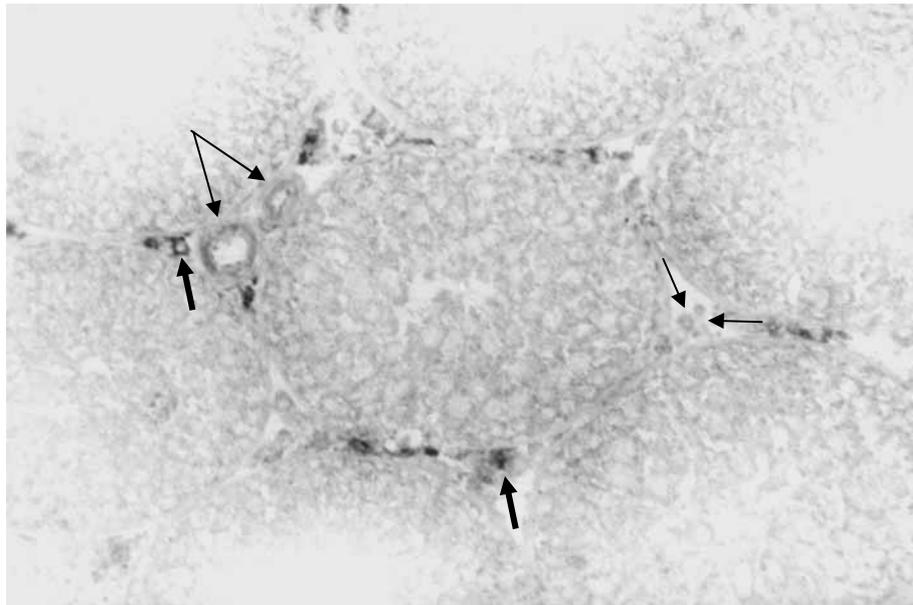


**Abbildung 3.**

Ezymhistochemische Darstellung des Enzyms  $11\beta$  – HSD in Leydigzellen der Ratte (Substrat: 5 mM Corticosteron, Coenzym NAD). Kryostatschnitte ( $7\mu\text{m}$ ). Vergrößerung: 105:1

- a) 90. pnd: Alle Interstitien sind von überwiegend stark positiven Zellen ausgefüllt. Die grauen Präzipitate in den Tubuli seminiferi sowie die starke Anfärbung der elongierten Spermatiden entsprechen dem unspezifischen Dehydrogenase Effekt und sind auch in der Negativkontrolle nachzuweisen.
- b) 90. pnd: Darstellung einer **Negativkontrolle** für die Reaktion des Enzyms  $11\beta$  – HSD mit dem Coenzym NAD. Dem Inkubationsmedium wurde kein Substrat zugegeben. Alle Interstitien sind frei von einer enzymatischen Reaktion. Dagegen stellt sich der unspezifische Dehydrogenase Effekt wie in Abb. 3a dar. Die Pfeile zeigen auf ein ezymnegatives Blutgefäß.

a)



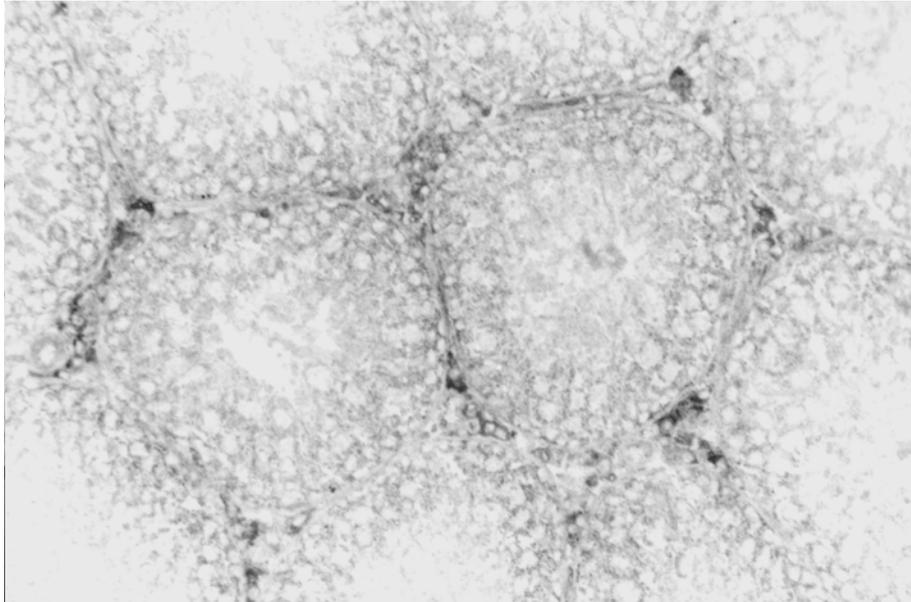
**Abbildung 4.**

Ezymhistochemische Darstellung des Enzyms 11 $\beta$  – HSD in Leydigzellen der Ratte  
(**Substrat: 5 mM** Corticosteron, **Coenzym NAD**).

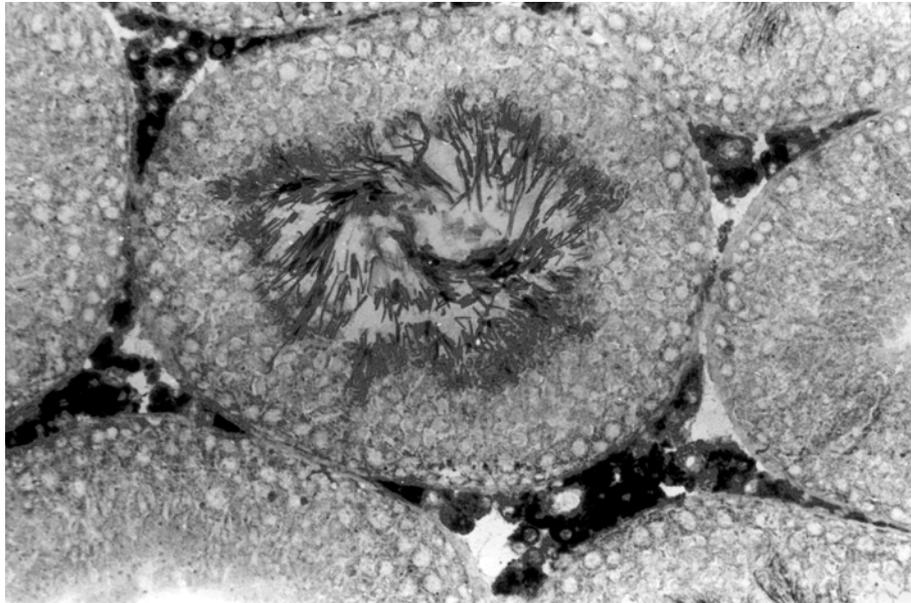
Kryostatschnitte (7 $\mu$ m). Vergrößerung: 170:1

- a) 31. pnd: Während die ALZ in einigen Interstitien noch völlig frei von einer enzymatischen Reaktion sind (kurze Pfeile) weisen andere bereits eine schwach bis mäßige Reaktionsintensität auf (dicke Pfeile). Die dargestellten Blutgefäße sind im Vergleich mit der Negativkontrolle als schwach positiv zu bewerten (lange Pfeile).

a)



b)



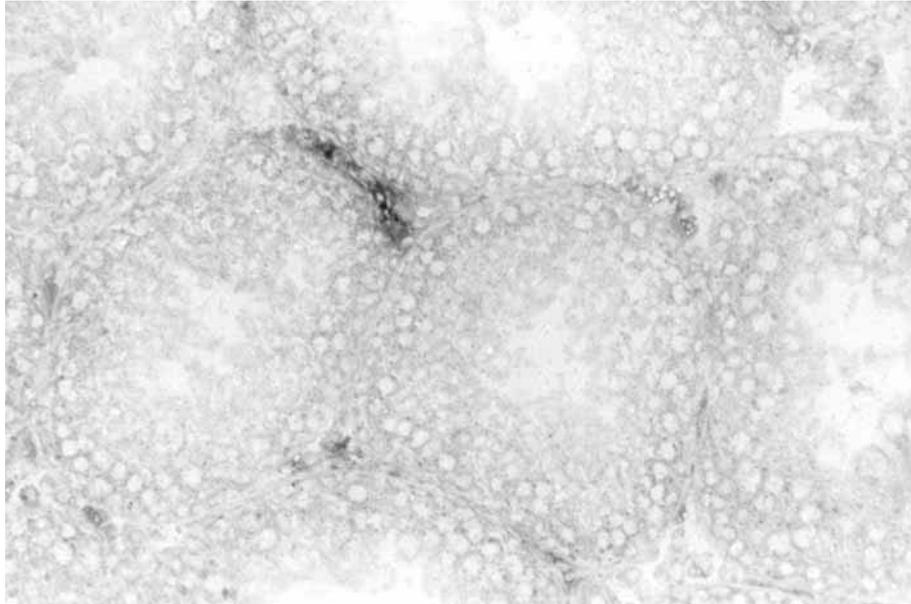
**Abbildung 5.**

Ezymhistochemische Darstellung des Enzyms  $11\beta$  – HSD in Leydigzellen der Ratte (Substrat: 2,5 mM Corticosteron, Coenzym NAD).

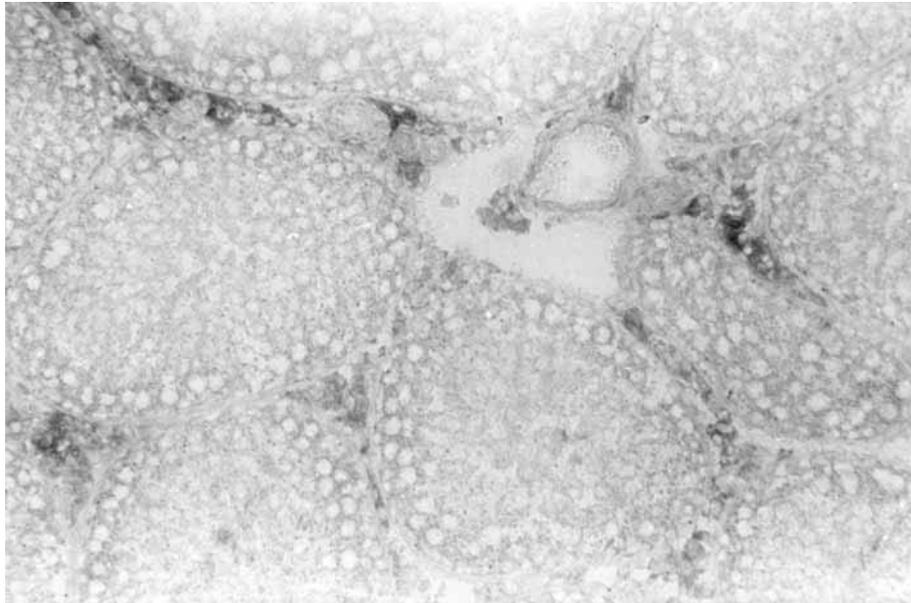
Kryostatschnitte (7 $\mu$ m). Vergrößerung: 170:1

- a) 31. pnd: Die enzympositiven ALZ in diesem Hodenquerschnitt repräsentieren in ihrer Anzahl und Intensität das schwächste positive Ergebnis aller Versuchsreihen.
- b) 90. pnd: Die ALZ in diesem Hodenquerschnitt zeigen die maximal erzielte Intensität in den Versuchsreihen. Es zeigt sich eine starke bis sehr starke Intensität in allen Interstitien.

a)



b)



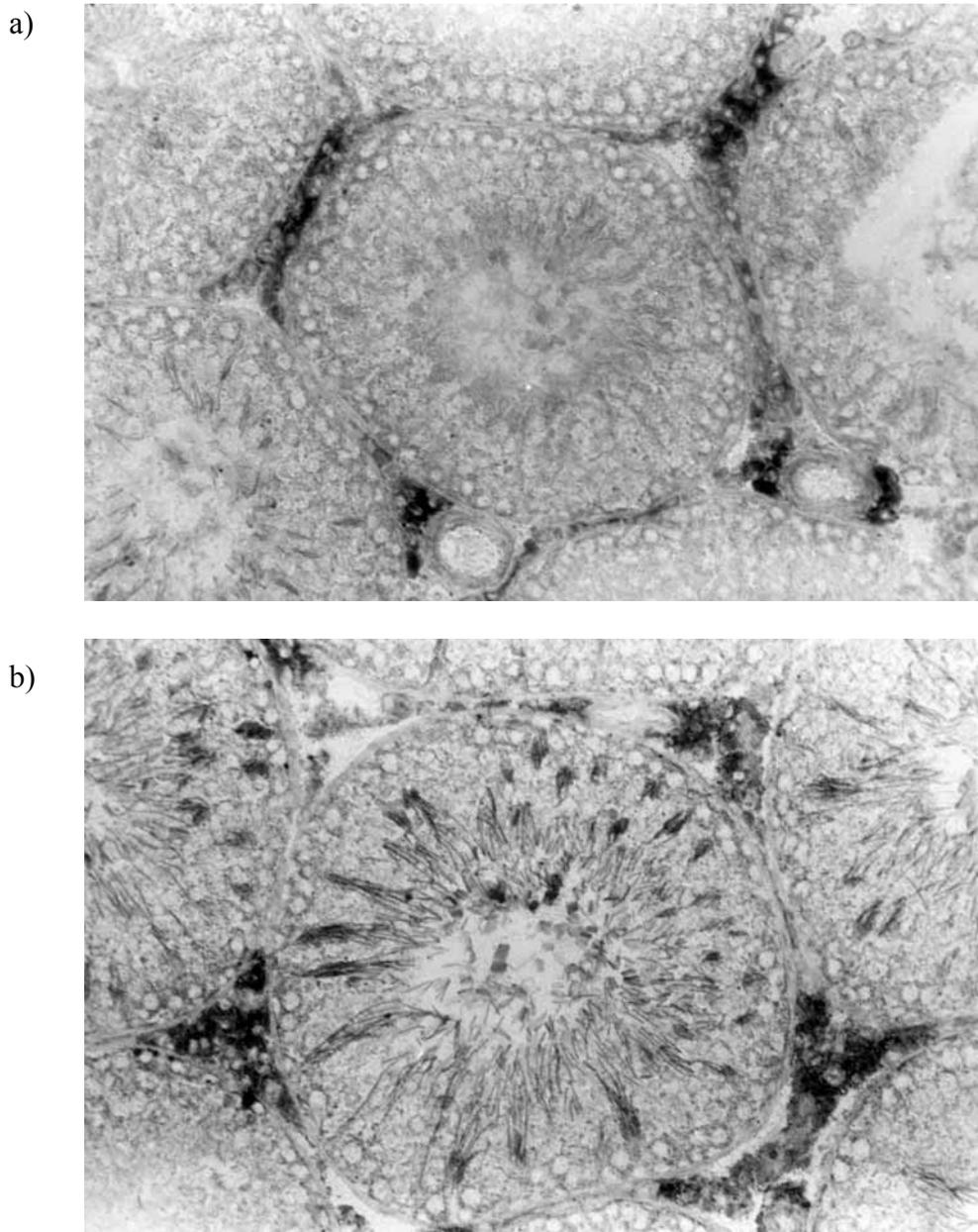
**Abbildung 6.**

Ezymhistochemische Darstellung des Enzyms  $11\beta$  – HSD in Leydigzellen der Ratte  
(**Substrat: 5 mM** Corticosteron, **Coenzym NADP**).

Kryostatschnitte ( $7\mu\text{m}$ ). Vergrößerung: 170:1

a) 37. pnd: In einigen Interstitien zeigt sich eine schwache bis mäßige Reaktion.

b) 40. pnd: Im Vergleich zu pnd 37 zeigt sich ein Zuwachs an Anzahl und Intensität der positiven ALZ.



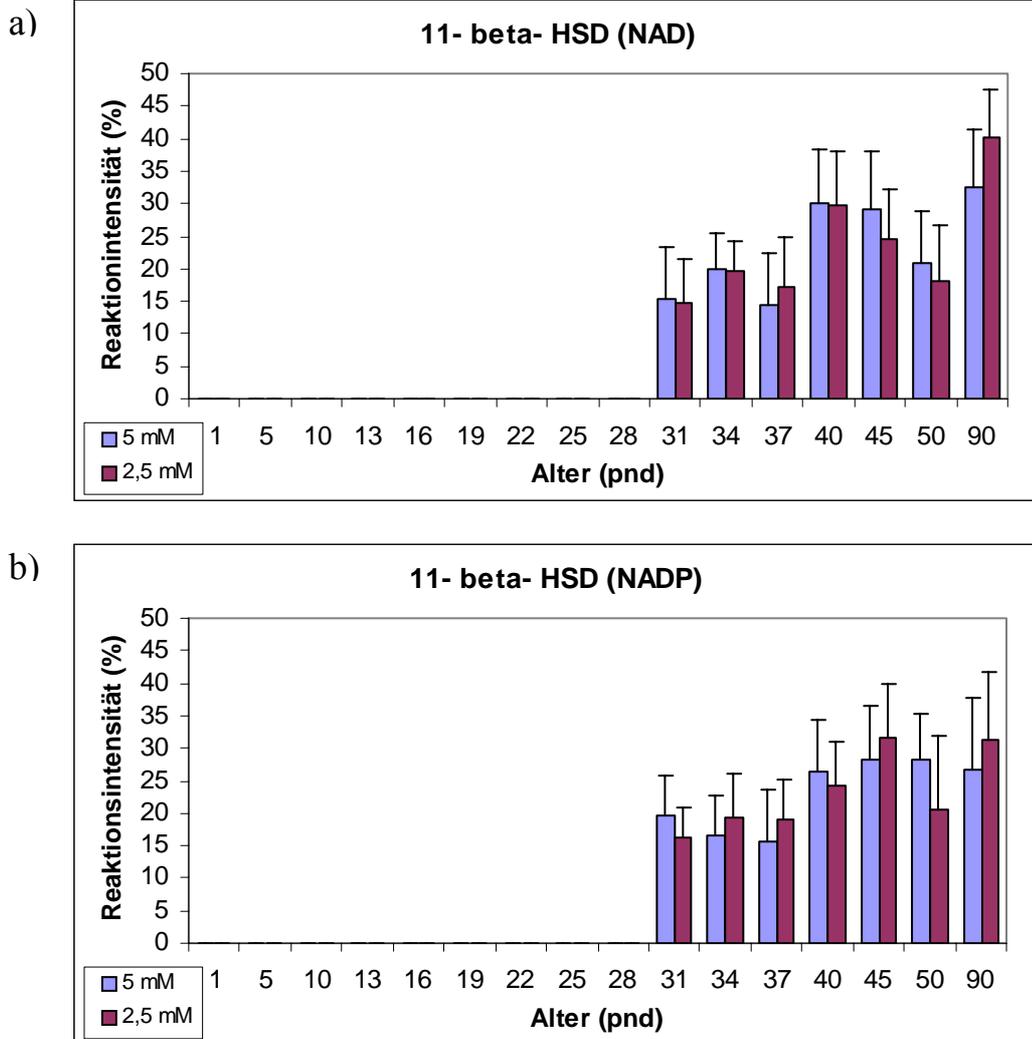
**Abbildung 7.**

Ezymhistochemische Darstellung des Enzyms  $11\beta$  – HSD in Leydigzellen der Ratte  
(**Substrat: 5 mM** Corticosteron, **Coenzym NADP**).

Kryostatschnitte ( $7\mu\text{m}$ ). Vergrößerung: 170:1

a) 50. pnd: Die ALZ zeigen eine mäßige bis starke Reaktion. Die abgebildeten Gefäße sind als schwach positiv zu interpretieren.

b) 90. pnd: Intensität und Anzahl der positiven ALZ sind vergleichbar mit pnd 50.



**Abbildung 8.**

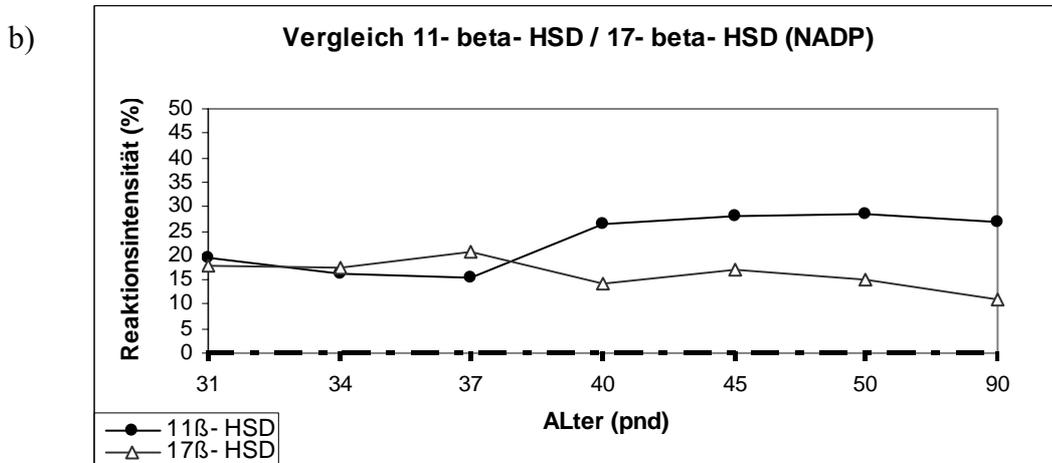
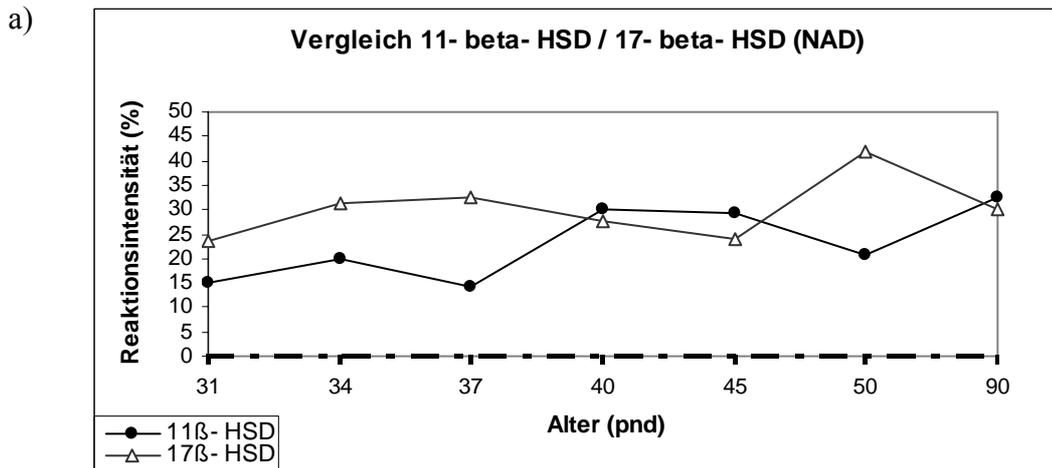
Semiquantitative Auswertung der histochemischen Reaktion für  $11\beta$  – HSD in Leydigzellen der Ratte. Blaue Balken: 5 mM Substrat (Corticosteron). Violette Balken: 2,5 mM Substrat.

Abszisse: Alter der Tiere in pnd.

Ordinate: Mittelwert der Reaktionsintensität und Standardabweichung

a) Dem Inkubationsmedium wurde als Coenzym NAD zugefügt.

b) Dem Inkubationsmedium wurde als Coenzym NADP zugefügt.

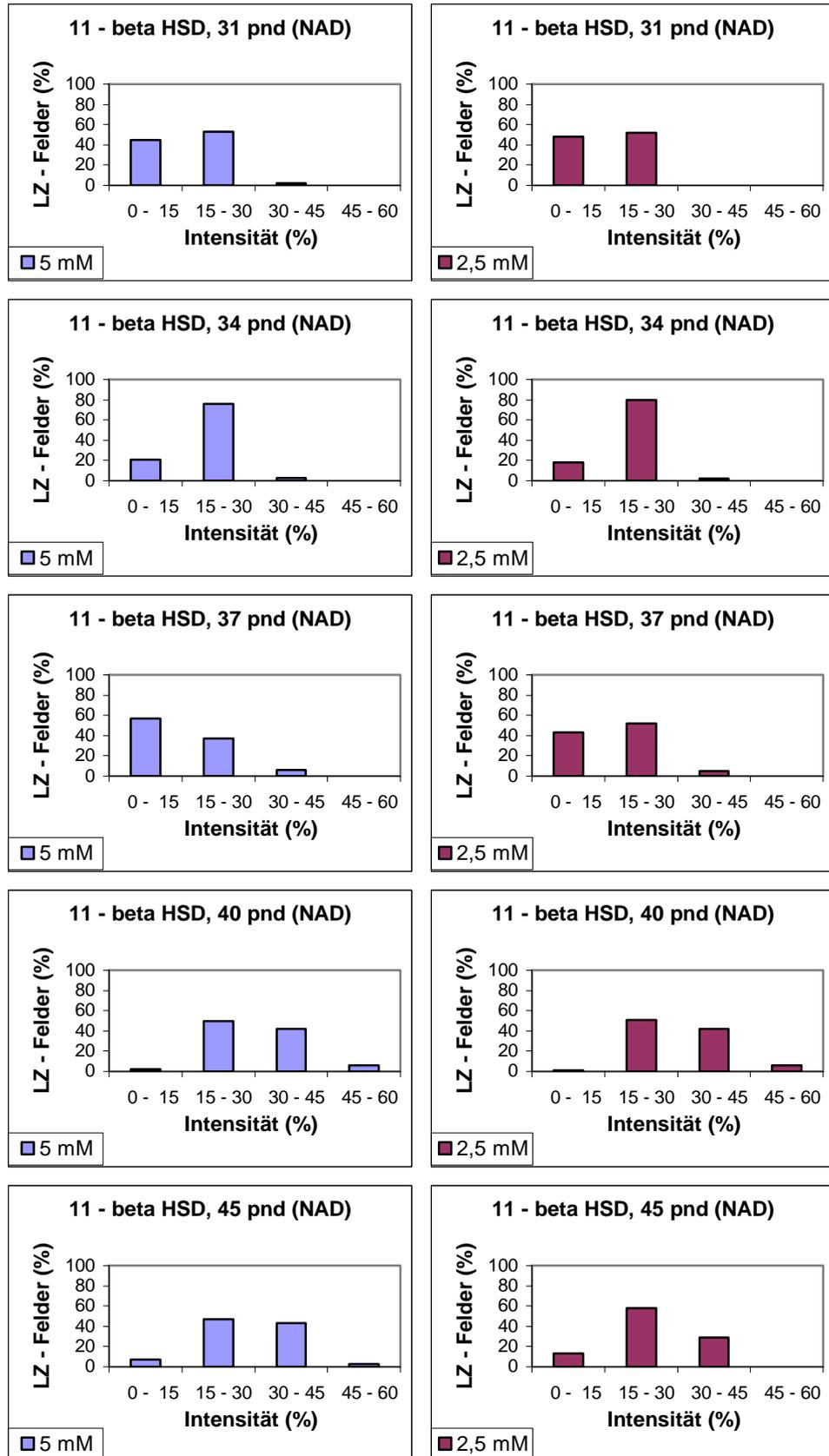


**Abbildung 9.**

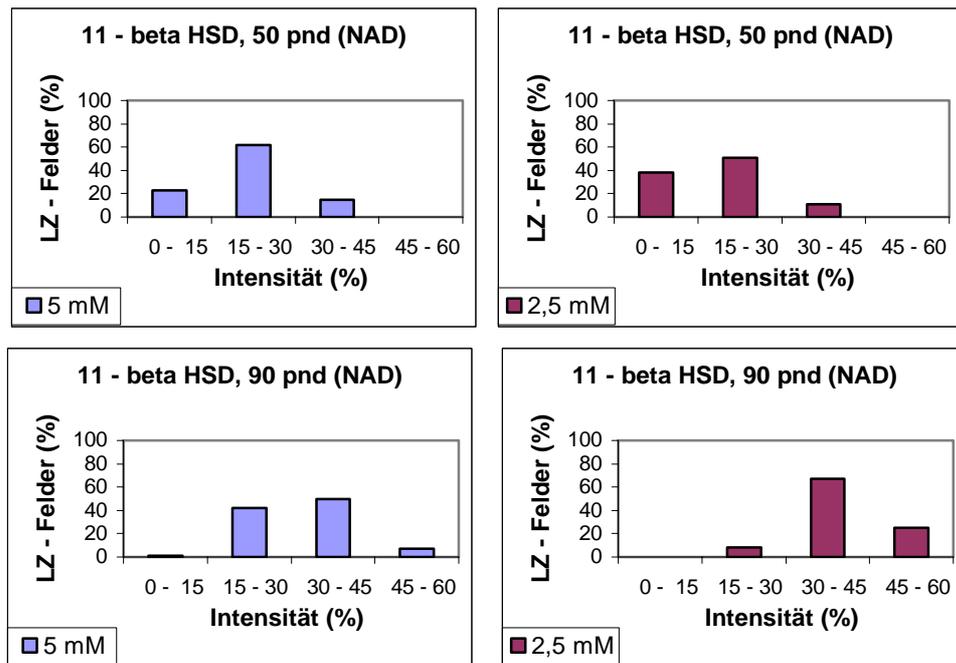
Vergleich der Mittelwerte der Reaktionsintensität des Enzyms 11β- HSD (Substrat: 5mM Corticosteron) und 17β- HSD (Substrat: 5mM 5-androstene-3β,17β-diol) in Leydigzellen der Wistarratte. Dunkle Punkte: 11β – HSD. Helle Dreiecke: 17β - HSD. Abszisse: Alter der Tiere in pnd. Ordinate: Mittelwert der Reaktionsintensität (%)

- a) Dem Inkubationsmedium wurde NAD als Coenzym zugefügt. Die dargestellten Mittelwerte sind an allen Postnataltagen signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ).
- b) Dem Inkubationsmedium wurde NADP als Coenzym zugefügt. Die dargestellten Mittelwerte sind bis auf pnd 34 an allen Postnataltagen signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ).

**Abbildung 10.**



(Abbildung 10. Fortsetzung)



**Abbildung 10.**

Dargestellt sind Histogramme für den 31., 34., 37., 40., 45., 50. und 90. pnd. Sie präsentieren die Ergebnisse der semiquantitativen Messung der 11 $\beta$  – HSD Enzymreaktion (Substrat: Corticosteron) in Leydigzellen des Rattenhodens mit dem Coenzym NAD.

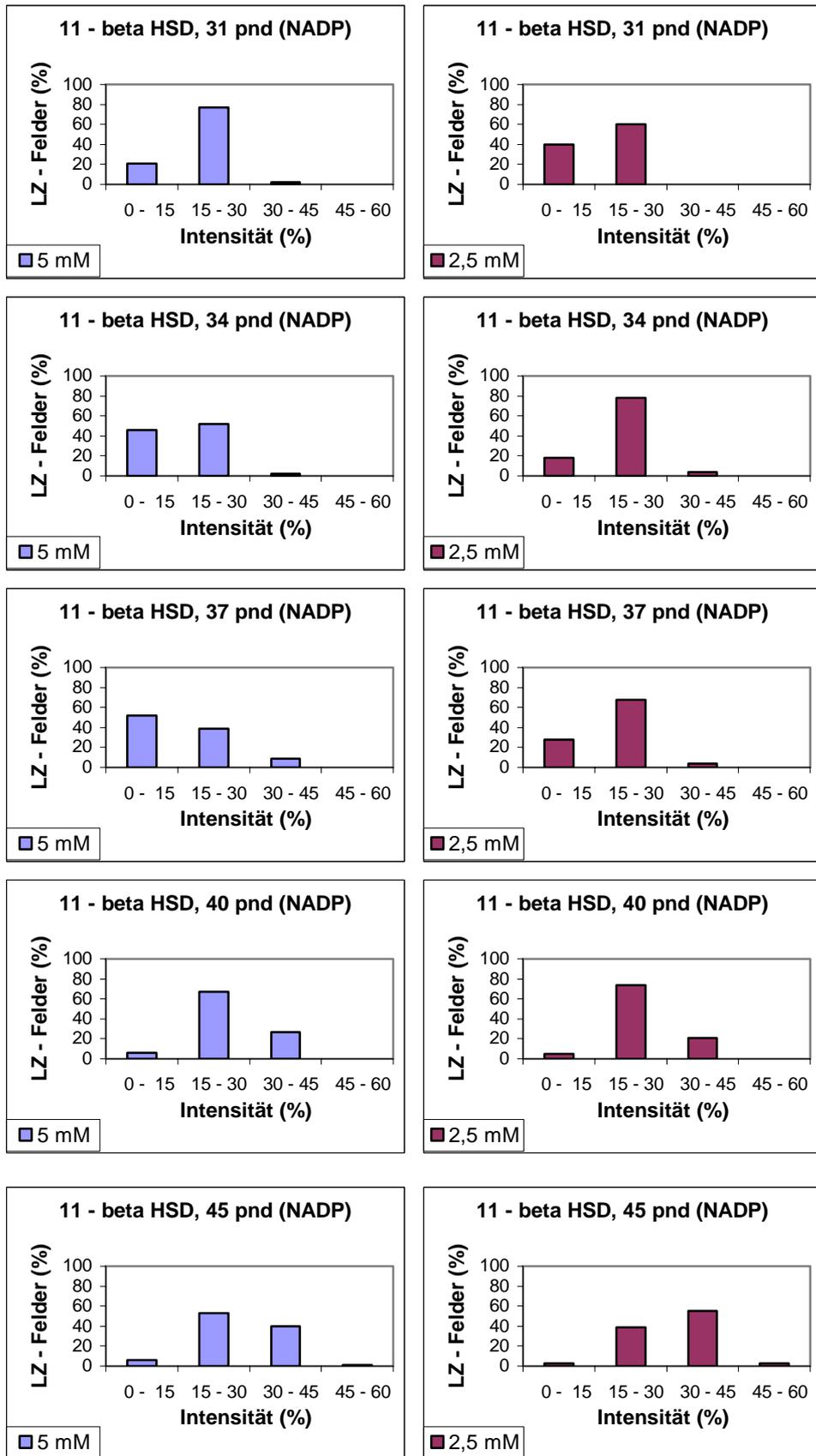
Orientiert am höchsten Messwert erfolgte eine Aufteilung in vier verschiedene Intensitätsranggruppen in Intervalle von 0– 15 % für eine schwache Reaktionsintensität, 15 – 30 % für mäßige Reaktionsintensität, 30 – 45 % für starke und 45 – 60 % für sehr starke Reaktionsintensität in den Leydigzellen.

Einander gegenübergestellt sind die Ergebnisse der zwei verschiedenen Substratkonzentrationen: Die linke Kolumne (blaue Balken) zeigt die Verteilung der Reaktionsintensitäten bei einer Substratkonzentration von 5 mM und dem Coenzym NAD. Die rechte Kolumne (violette Balken) zeigt die Verteilung der Reaktionsintensitäten bei einer Substratkonzentration von 2,5 mM und dem Coenzym NAD. Von oben nach unten lässt sich jeweils die Entwicklung der Reaktionsintensitäten über die Zeit (pnd 31 bis 90) verfolgen.

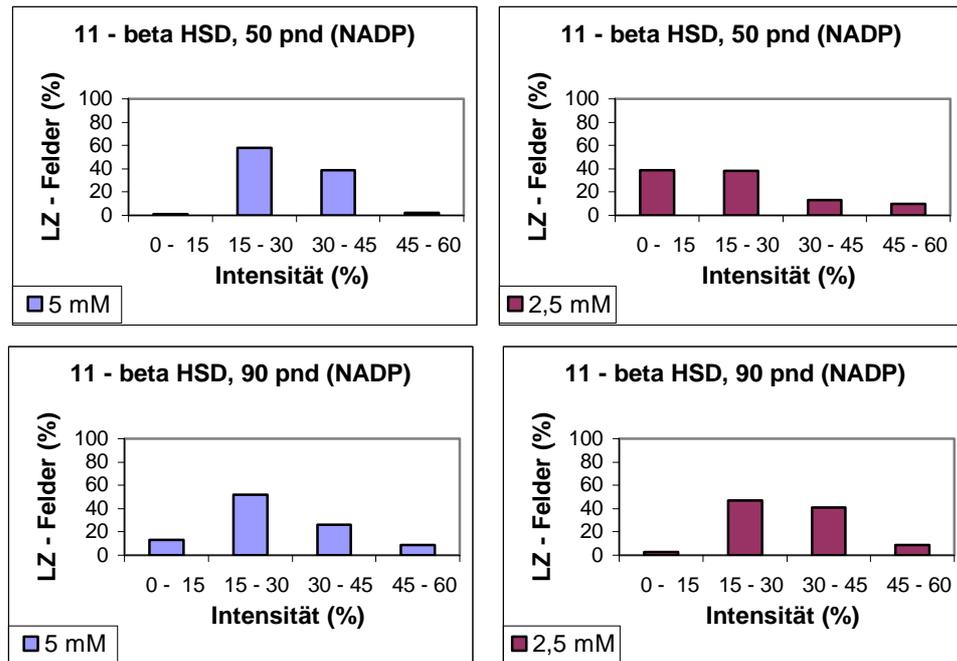
Abszisse: Einteilung der Ranggruppen in vier Reaktionsintensitätsintervalle in Prozent

Ordinate: Anzahl der gemessenen Leydigzellfelder in Prozent

**Abbildung 11.**



(Abbildung 11. Fortsetzung)



**Abbildung 11.**

Dargestellt sind Histogramme für den 31., 34., 37., 40., 45., 50. und 90. pnd. Sie präsentieren die Ergebnisse der semiquantitativen Messung der 11 $\beta$  – HSD Enzymreaktion (Substrat: Corticosteron) in Leydigzellen des Rattenhodens mit dem Coenzym NADP.

Orientiert am höchsten Messwert erfolgte eine Aufteilung in vier verschiedene Intensitätsranggruppen in Intervalle von 0– 15 % für eine schwache Reaktionsintensität, 15 – 30 % für mäßige Reaktionsintensität, 30 – 45 % für starke und 45 – 60 % für sehr starke Reaktionsintensität in den Leydigzellen.

Einander gegenübergestellt sind die Ergebnisse der zwei verschiedenen Substratkonzentrationen: Die linke Kolumne (blaue Balken) zeigt die Verteilung der Reaktionsintensitäten bei einer Substratkonzentration von 5 mM und dem Coenzym NADP. Die rechte Kolumne (violette Balken) zeigt die Verteilung der Reaktionsintensitäten bei einer Substratkonzentration von 2,5 mM und dem Coenzym NADP. Von oben nach unten lässt sich jeweils die Entwicklung der Reaktionsintensitäten über die Zeit (pnd 31 bis 90) verfolgen.

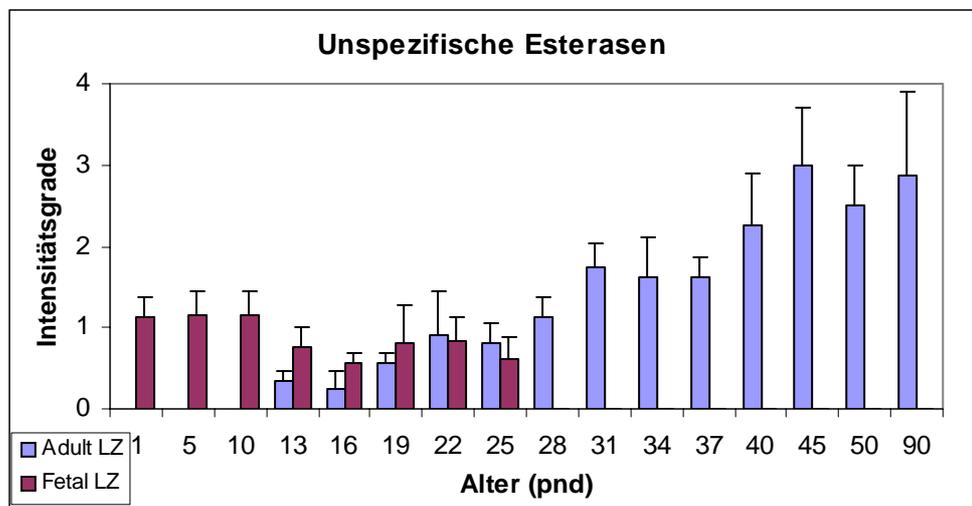
Abszisse: Einteilung der Ranggruppen in vier Reaktionsintensitätsintervalle in Prozent

Ordinate: Anzahl der gemessenen Leydigzellfelder in Prozent

### 3.2. Unspezifische Esterasen

Abb. 12 zeigt die ontogenetische Entwicklung der Enzymreaktion der unspezifischen Esterasen in den Leydigzellen der Ratte vom pnd 1 bis 90. Abb. 13 zeigt die Darstellung der unspezifischen Esterasen in Hodenquerschnitten von Wistarratten an den pnd 1, 16, 31 und 90. Das Reaktionsprodukt zeigt sich als rot- braune Anfärbung des Zytoplasmas. Die Zellkerne sind durch eine Gegenfärbung mit Hämalaun blau dargestellt. Bei der qualitativen Auswertung der Reaktionsintensität zeigen sich für die FLZ und ALZ folgende Verläufe:

Die FLZ sind vom 1. bis 10. pnd schwach positiv (1+). Mit dem Auftreten der ALZ am 13. pnd sinkt ihre Intensität ab und bleibt bis zum 25. pnd annähernd konstant (0 bis 1+). Die ALZ werden ab dem 13. pnd sehr schwach positiv (0 bis 1+). Von diesem Minimum steigt die Ausprägung des dargestellten Farbproduktes fast kontinuierlich an. Am 22. pnd ist die Intensität in den ALZ zum ersten Mal etwas stärker als in den FLZ. Ab dem 31. pnd zeigen die Zellen eine mäßig starke Reaktion (2+), welche bis zum 45. pnd (3+) weiter ansteigt. Eine ebenso hohe Intensität zeigt sich auch am 90. pnd während sie am 50. pnd etwas schwächer ist (2 bis 3+).



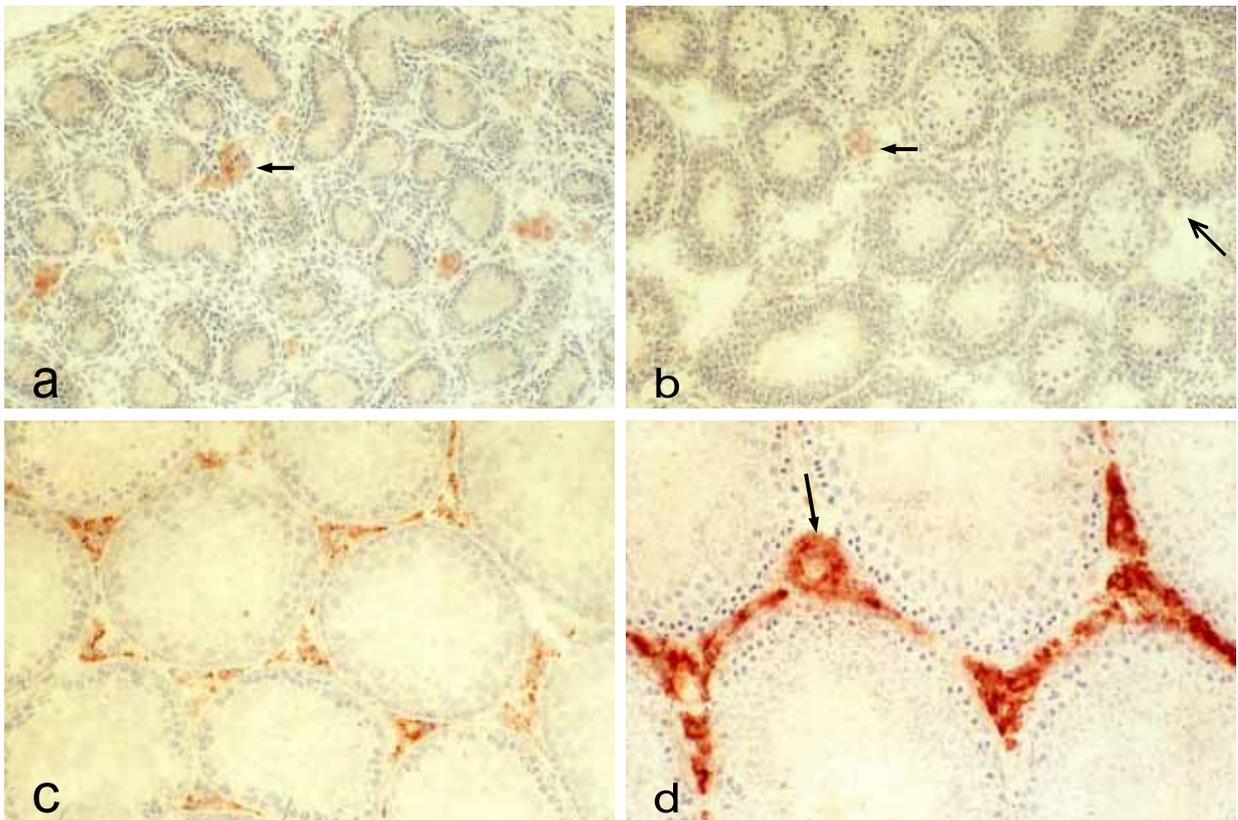
**Abbildung 12.**

Qualitative Auswertung der Intensität von Unspezifischen Esterasen in den Leydigzellen von Wistarratten.

Violette Balken: Fetaltyp Leydigzellen, blaue Balken: Adulttyp Leydigzellen.

Abzisse: Alter der Tiere in pnd. Ordinate: Durchschnitt  $\pm$  Standardabweichung.

Die Intensitätsgrade der Enzymreaktion wurden lichtmikroskopisch beurteilt als 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = mäßig positiv, 3 = stark positiv, 4 = sehr stark positiv.



### **Abbildung 13.**

Rattenhoden, 7 $\mu$ m dicke Kryostatschnitte. Vergrößerung 120:1  
 Darstellung der unspezifischen Esterasen (rot-braun) mit Kerngegenfärbung durch Hämalaun (blau).

- (a) 1. pnd: Die Cluster der FLZ zeigen eine schwach positive Reaktion (1+, Pfeil).
- (b) 16. pnd: Die Intensität in den Clustern der FLZ (kurzer Pfeil) ist noch schwächer (0 bis 1+) als am 1. Postnataltag (Abb. 14a). In den ersten in Erscheinung tretenden ALZ findet sich eine mäßige (2+) Reaktion (langer Pfeil).
- (c) 31. pnd: Der interstitielle Raum ist von mäßig positiven (2+) ALZ ausgefüllt.
- (d) 90. pnd: Maximale Intensität (3+) in den ALZ (Pfeil). Auch das Endothel der Stromagefäße zeigt eine mäßig bis starke Reaktion (2 bis 3+).

### 3.3. Lipidnachweis mit Sudanschwarz B

Im Zytoplasma der FLZ finden sich gehäuft Lipidtropfen. Diese sind überwiegend groß und rund bis oval und stellen sich in der Sudanschwarz B- Färbung schwarz- blau dar, während sich Zellkerne durch eine Gegenfärbung mit Kernechtrot rot darstellen. Die FLZ sind in kompakten runden oder ovalen Clustern angeordnet, welche sich in den interstitiellen Winkeln zwischen den Tubuli seminiferi befinden. Die Zellen und ihre Kerne sind groß und rund.

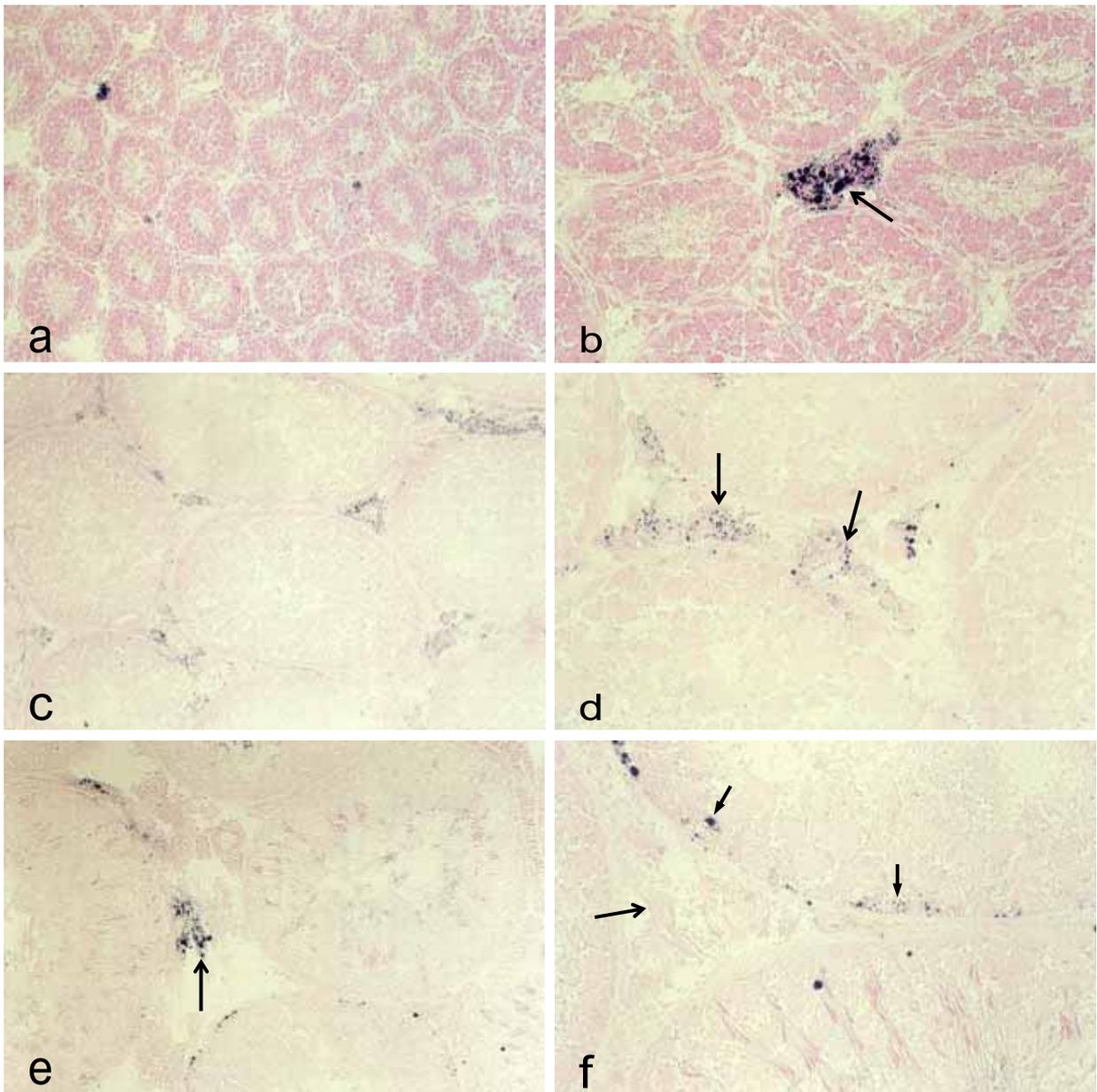
ALZ dagegen können einzeln oder in Gruppen angeordnet sein und befinden sich peritubulär, perivaskulär sowie in den interstitiellen Winkeln zwischen den Tubuli seminiferi. Die Zellen sind groß und rund oder auch flach mit jeweils runden bzw. flachen Zellkernen. Ihr Zytoplasma enthält viele oder wenige oder keine Lipidtropfen.

Am 16. pnd sind in den ALZ noch kaum Lipidtropfen mikroskopisch nachweisbar. Im Laufe der weiteren Entwicklung finden sich häufiger Lipidtropfen in den ALZ, die meist kleiner sind als die in den FLZ. Die Anzahl der Zellen, deren Zytoplasma Fetteinschlüsse enthält, weist einen Gipfel etwa zwischen dem 31. und 45. pnd auf. Danach nimmt deren Anzahl deutlich ab und es treten häufiger Zellen auf, die keine Lipidtropfen enthalten.

Am 90. pnd finden sich nur noch in einigen ALZ Fetttropfen, deren Größe dann von klein bis z.T sehr groß variiert.

Ein Nebeneinander von Zellen mit und ohne Fetteinschlüsse im Zytoplasma konnte in allen Altersstufen beobachtet werden.

In Abb. 14 wird anhand der Lipiddarstellung am 16., 31. und 90. pnd die Verteilung noch etwas detaillierter beschrieben.



**Abbildung 14.** Rattenhoden, 7µm dicke Kryostatschnitte. Lipiddarstellung, Sudanschwarz B mit Kerngegenfärbung (Kernechtrot).

- (a) 16. pnd, Vergrößerung 120:1. Während man in den Clustern der FLZ deutlich Lipidtropfen erkennt, sind solche in den ALZ kaum zu erkennen.
- (b) 16. pnd, Vergrößerung 300:1. In diesem Cluster von FLZ erkennt man zahlreiche große, runde Lipidtropfen (Pfeil).
- (c) 31. pnd, Vergrößerung 120:1. In fast allen Interstitien finden sich lipidhaltige ALZ.
- (d) 31. pnd, Vergrößerung 300:1. Die Lipidtropfen in den ALZ sind kleiner als in den FLZ am 16. pnd (Abb. 15b).
- (e) 90. pnd, Vergrößerung 120:1. Nur einige Leydigzellen enthalten zahlreiche kleine und z.T. sehr große Lipidtropfen (Pfeil).
- (f) 90. pnd, Vergrößerung 300:1. ALZ ohne Lipideinlagerungen (langer Pfeil). Die Sertolizellen in den Tubuli seminiferi enthalten zahlreiche Lipidtröpfchen (kurze Pfeile).

### 3.4. NADH- und NADPH- Diaphorase

Abb. 15 zeigt die Entwicklung der Enzymreaktion der NADH- (Abb. 15a) und NADPH- (Abb.15b) Diaphorase in FLZ und ALZ der Ratte vom 1. bis 90. pnd.

In den FLZ ist für beide Enzyme bereits am 1. pnd ein Intensitätsmaximum nachzuweisen. Im Falle der NADH- Diaphorase zeigt sich eine mäßig bis stark positive (2 bis 3+) und für die NADPH- Diaphorase eine sehr stark positive (4+) Enzymreaktion. Während in der Versuchsreihe für die NADH- Diaphorase die Reaktionsstärke in den FLZ bis zum 22. pnd annähernd konstant bleibt und erst am pnd 25 auf schwach bis mäßig positiv abfällt (1 bis 2+), sind bei der NADPH- Diaphorase die Werte in den FLZ bis zum 16. pnd konstant, fallen bereits ab dem 19. pnd kontinuierlich ab und erreichen am 25. pnd mit einer mäßig starken Reaktion (2+) ihr Minimum. Für beide Enzyme ist der 1. pnd der Zeitpunkt der stärksten und der 25. pnd der Zeitpunkt der schwächsten Ausprägung der Enzymreaktion in den FLZ. Insgesamt zeigt sich in den FLZ für die NADPH- Diaphorase eine stärkere Ausprägung der Reaktion als für die NADH- Diaphorase.

Die ersten NADH- Diaphorase positiven ALZ sind am 13. pnd nachzuweisen und zeigen eine schwach bis mäßige Enzymreaktion (1 bis 2+). Bis zum 22. pnd steigt die Reaktionsintensität auf mäßig positiv (2+) an und erreicht damit einen ersten Gipfel. Danach sinkt sie ab bis sie am 31. pnd mit einer nur schwach positiven Reaktion (1+) ein Minimum erreicht um anschließend dann fast kontinuierlich bis zum 90. pnd anzusteigen, an dem eine stark positive Enzymreaktion (3+) erreicht wird, was einem Intensitätsmaximum entspricht. Am 50. pnd ist die Reaktion etwas schwächer (2+).

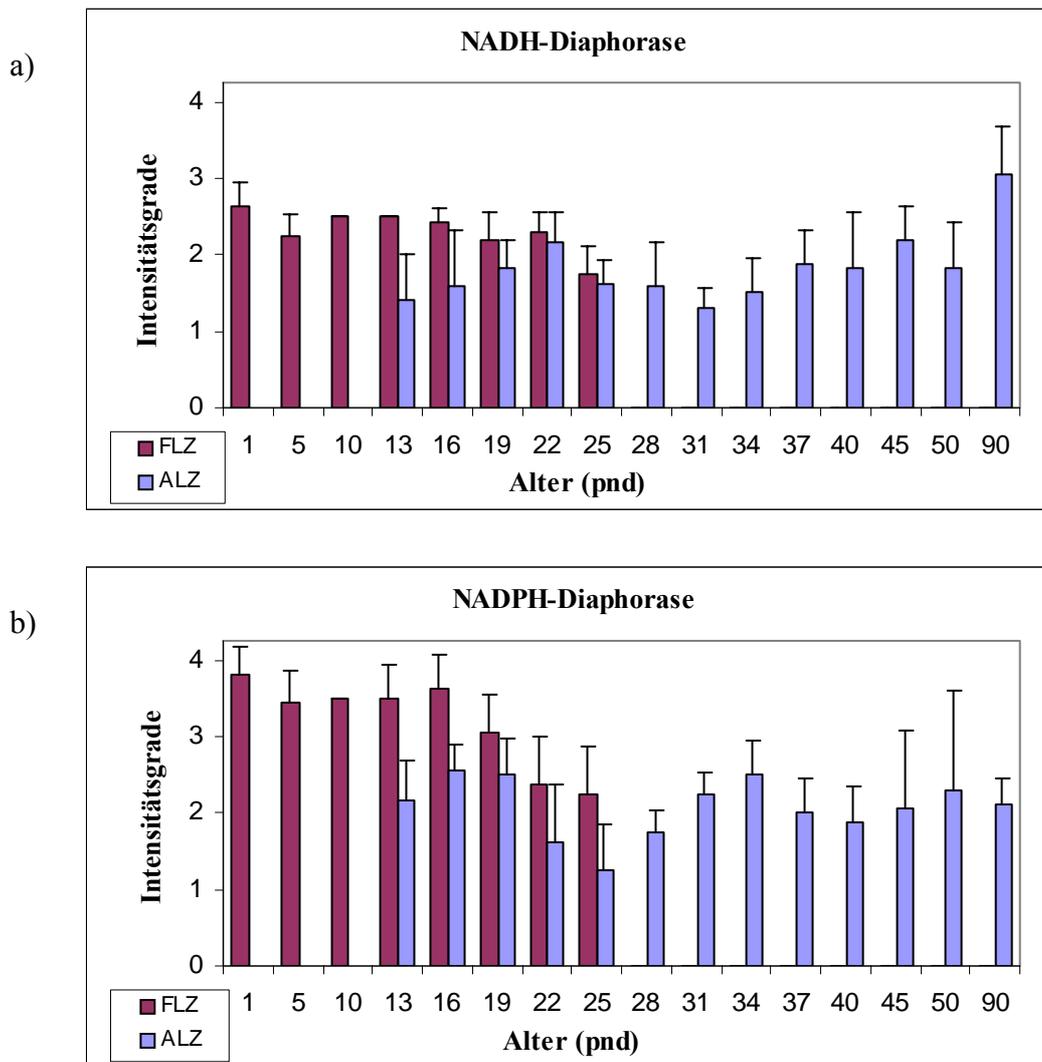
Im Fall der NADPH- Diaphorase wird in den ALZ bereits am 16./19. pnd mit einer mäßig bis stark positiven Enzymreaktion (2 bis 3+) ein Maximum erreicht. Die minimale Intensität zeigt sich am 25. pnd mit einer schwach positiven Reaktion (1+). Danach steigt die Intensität bis zum 34. pnd kontinuierlich an, erreicht dort ein zweites Maximum mit einer mäßig bis stark positiven Reaktion (2 bis 3+) und verläuft ab dem 37. pnd mit etwas niedrigerer Intensität annähernd konstant bis zum 90. pnd, an welchem sich in den ALZ weiterhin eine nur mäßig positive Enzymreaktion (2+) der NADPH- Diaphorase zeigt. Am 50. pnd ist die Intensität etwas stärker, und wie die hohe Standardabweichung zeigt, sind die Schnitte an diesem pnd und dem pnd 45 besonders heterogen in ihrer Reaktionsintensität. Auch in den ALZ zeigt sich für die NADPH- Diaphorase eine etwas stärkere Ausprägung der Reaktionsstärke als für die NADH- Diaphorase. Die ALZ zeigen für die NADPH- Diaphorase überwiegend eine

mäßig positive (2+) und für die NADH- Diaphorase eine schwach bis mäßig (1 bis 2+) ausgeprägte Enzymreaktion.

Vom 13. Bis 25. pnd treten FLZ und ALZ gleichzeitig auf. In diesem Zeitraum weisen die FLZ sowohl für die NADH- Diaphorase als auch für die NADPH- Diaphorase eine stärkere Reaktion auf als die ALZ.

Abb. 16 zeigt im Detail die enzymhistochemische Darstellung der NADH- Diaphorase an den pnd 1, 31, 50 und 90. Die Farbe des Reaktionsproduktes im Zytoplasma der Leydigzellen ist grau- schwarz.

Abb. 17 zeigt die enzymhistochemische Darstellung der NADPH- Diaphorase am pnd 1, 16 und 90 sowie eine Negativkontrolle.



**Abbildung 15.**

Darstellung der qualitativen Auswertung der Intensität von NADH- Diaphorase (a) und NADPH- Diaphorase (b) in den Leydigzellen von Wistarratten.

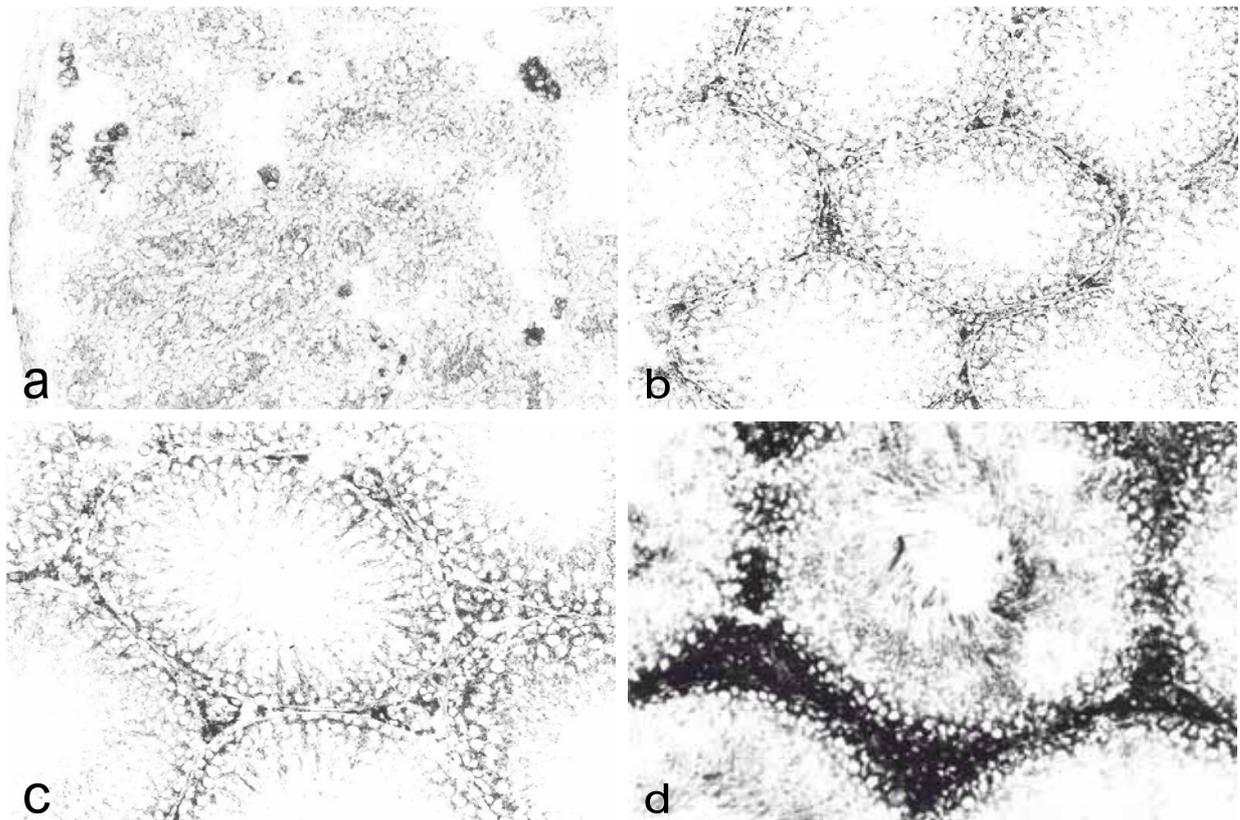
Rote Balken: Fetaltyp Leydigzellen, blaue Balken: Adulttyp Leydigzellen.

Abszisse: Alter der Tiere in Postnataltagen (pnd).

Ordinate: Durchschnitt  $\pm$  Standardabweichung. Die Intensitätsgrade der Reaktion wurden lichtmikroskopisch beurteilt als 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = mäßig positiv, 3 = stark positiv, 4 = sehr stark positiv.

a: Dem Inkubationsmedium wurden 2 mM NADH als Substrat und Menadion als intermediärer Elektronenakzeptor zugefügt.

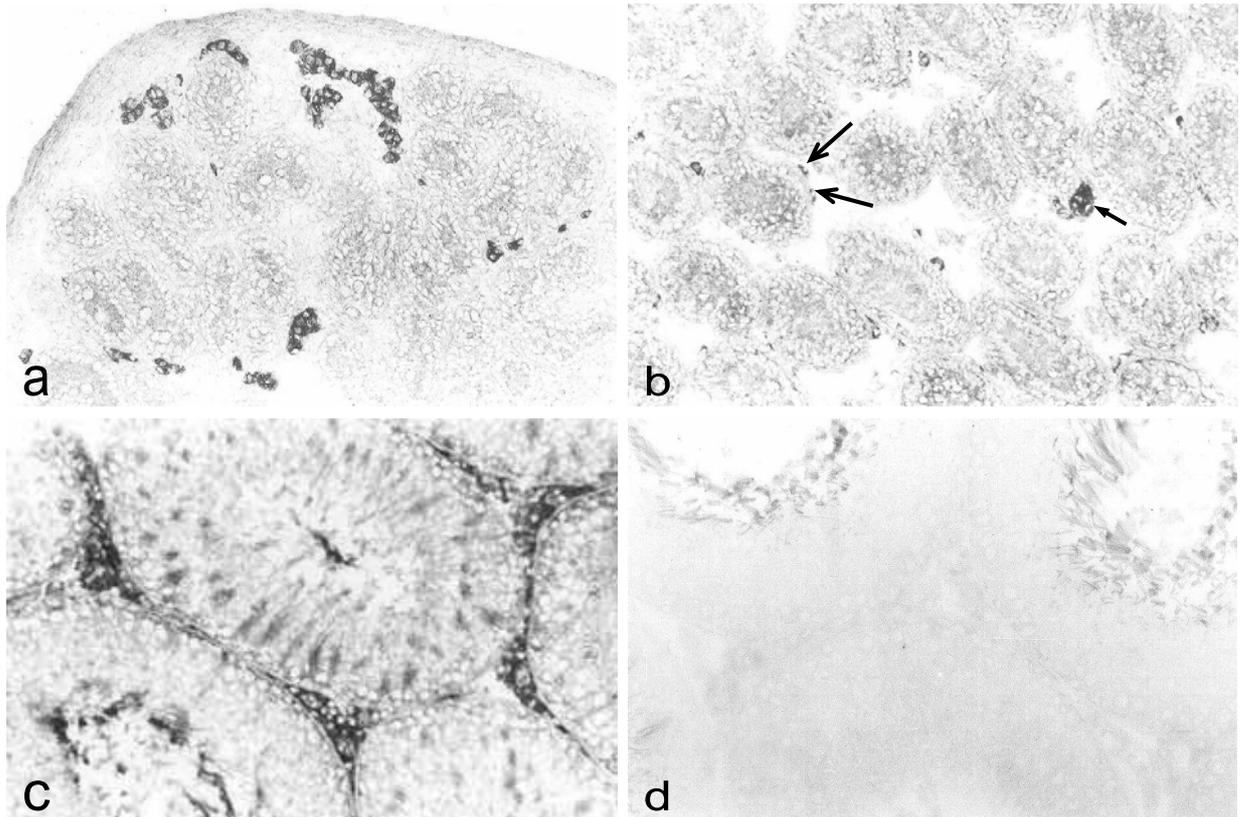
b: Dem Inkubationsmedium wurden 2mM NADPH als Substrat und Menadion als intermediärer Elektronenakzeptor zugefügt.



**Abbildung 16.**

Rattenhoden, Kryostatschnitte (7 $\mu$ m). Vergrößerung 120:1.  
Enzymhistochemische Darstellung des Enzyms NADH- Diaphorase.

- (a) 1. pnd: Die maximale Intensität in den Clustern der FLZ ist hier mäßig bis stark (2 bis 3+).
- (b) 31. pnd: Minimale Intensität der Enzymreaktion in den ALZ, die Zellen sind schwach positiv (1+).
- (c) 50. pnd: Die ALZ zeigen eine mäßig starke Reaktion (2+).
- (d) 90. pnd: Maximale Intensität der ALZ mit einer starken Reaktion in allen interstitiellen Feldern (3+). Die elongierten Spermatozoen zeigen eine nur scheinbar positive Enzymreaktion, denn diese unspezifische Farbreaktion zeigt sich auch in der Negativkontrolle (vergleiche Abb. 17d).



**Abbildung 17.**

Rattenhodentestschnitte (7µm). Vergrößerung 120:1  
 Enzymhistochemische Darstellung des Enzyms NADPH- Diaphorase.

- (a) 1. pnd: Maximale Intensität in den Clustern der FLZ (4+).
- (b) 16. pnd: Hohe Intensität (4+) in den Clustern der FLZ (kurzer Pfeil) und eine schwächere Intensität (2 bis 3+) in den ALZ (lange Pfeile).
- (c) 90. pnd: Die Intensität bleibt annähernd konstant mäßig positiv (2+). Die elongierten Spermatiden zeigen eine nur scheinbar positive Enzymreaktion, wie es die Negativkontrolle (Abb.17d) demonstriert.
- (d) 90. pnd: **Negativkontrolle.** Dem Inkubationsmedium wurde kein Substrat zugefügt. In den Leydigzellen ist keine Reaktion nachweisbar (0+). Die elongierten Spermatiden weisen eine unspezifische Farbreaktion auf.

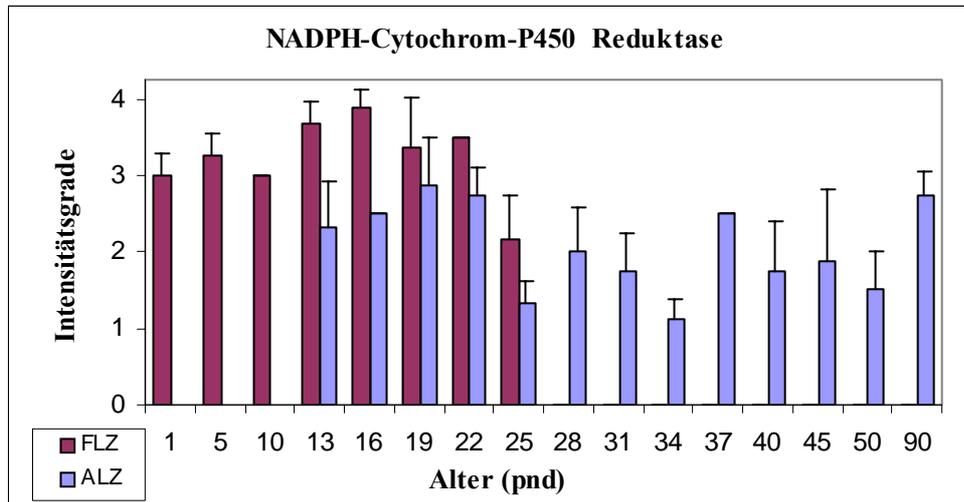
### 3.5. NADPH- Cytochrom- P450 Reduktase

Abb. 18 zeigt die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Auswertung der Reaktionsintensität von NADPH- Cytochrom- P450 Reduktase in Leydigzellen der Ratte im Verlauf vom pnd 1 bis pnd 90. Abb. 19 zeigt die enzymhistochemische Darstellung der NADPH- Cytochrom- P450 Reduktase anhand der pnd 16, 31 und 90 sowie die dazugehörige Negativkontrolle. Die Farbe des Reaktionsproduktes im Zytoplasma der Leydigzellen ist grau- schwarz.

Die FLZ weisen bereits am pnd 1 eine stark positive Enzymreaktion auf (3+). Diese steigt bis zum 16. pnd weiter an, an dem sie mit einer sehr stark positiven Reaktion (4+) ihr Maximum erreicht (siehe auch Abb. 19a). Anschließend lässt die Intensität der Reaktion wieder nach und erreicht am 25. pnd die minimale Reaktionsausprägung in den FLZ mit einer mäßig positiven Enzymreaktion (2+). In der Periode des gemeinsamen Auftretens von FLZ und ALZ (pnd 13 bis 25) ist die Enzymreaktion in den FLZ stärker ausgeprägt als in den ALZ.

Die ALZ werden am pnd 13 erstmals positiv für NADPH- Cytochrom- P450 Reduktase und zeigen eine mäßig starke Reaktion (2+). An den pnd 19 und 22 wird mit einer stark positiven Enzymreaktion (3+) ein Maximum erreicht. Im weiteren Verlauf schwankt die Enzymreaktionsstärke in den ALZ (siehe auch Abb. 19b) zwischen schwach (1+) und mäßig positiv (2+) mit Intensitätsminima an den pnd 25 und 34 mit einer nur schwach positiven Reaktion (1+). Ausnahmen bilden die pnd 37 und 90, an denen eine mäßig bis stark positive Enzymreaktion (2 bis 3+) im Falle von pnd 37 und eine stark positive Reaktion (3+) im Falle von pnd 90 (siehe auch Abb. 19c) vorliegt. Die Intensitätsverteilung ist an den Postnataltagen 40, 45 und 50 besonders heterogen und die Stärke der Reaktion insgesamt etwas schwächer (1 bis 2+) als an den Tagen 37 und 90.

Der Negativkontrolle (Abb. 19d) wurde kein Substrat zugefügt. In den Leydigzellen ist keine Reaktion nachweisbar (0+). Die elongierten Spermatiden stellen sich angefärbt dar, wodurch ersichtlich wird, dass es sich dabei auch in den übrigen Schnitten um eine nur scheinbare Enzymreaktion, also eine unspezifische Färbung handelt.



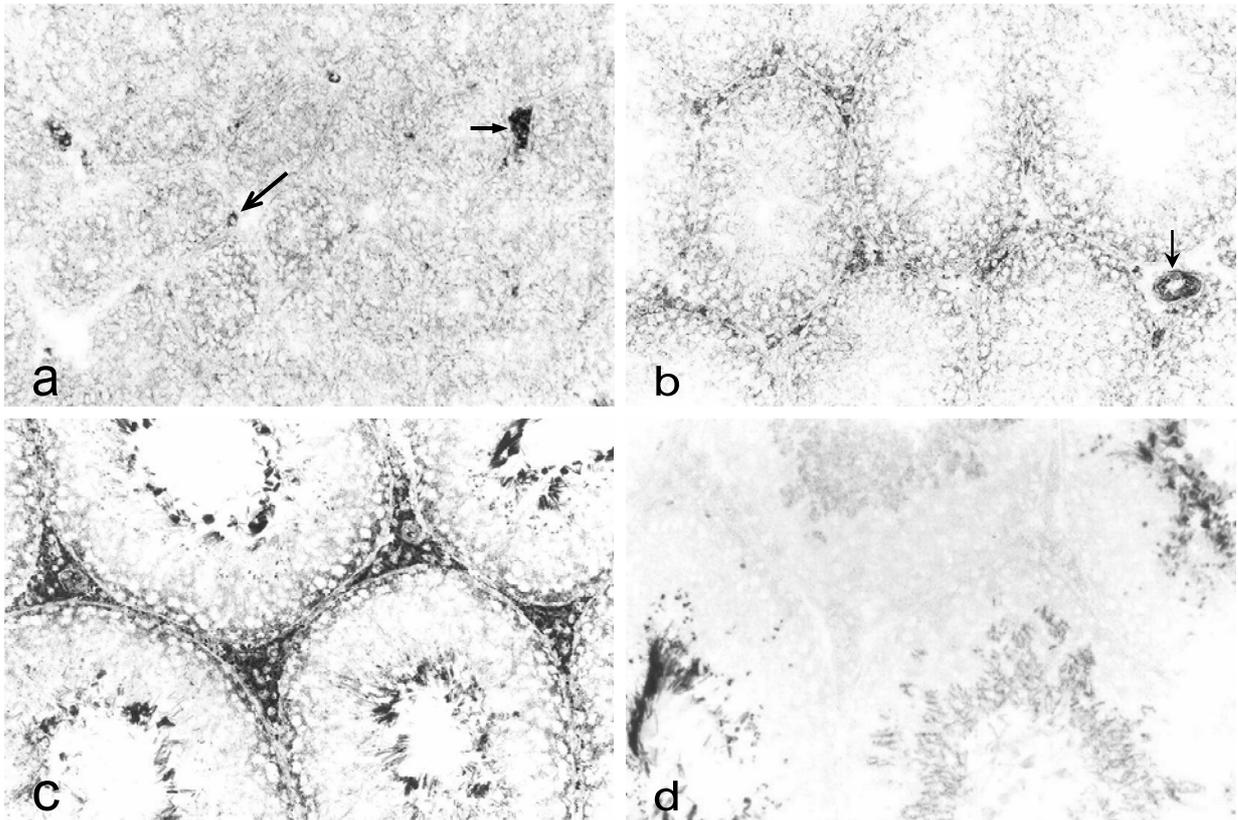
**Abbildung 18.**

Darstellung der qualitativen Auswertung der Intensität von NADPH- Cytochrom- P450 Reduktase in den Leydigzellen von Wistarratten. Dem Inkubationsmedium wurden als Substrat 2 mM NADPH zugefügt.

Rote Balken: Fetaltyp Leydigzellen, blaue Balken: Adulttyp Leydigzellen.

Abszisse: Alter der Tiere in Postnataltagen (pnd).

Ordinate: Durchschnitt  $\pm$  Standardabweichung. Die Intensitätsgrade der Reaktion wurden lichtmikroskopisch beurteilt als 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = mäßig positiv, 3 = stark positiv, 4 = sehr stark positiv.



**Abbildung 19.**

Rattenhoden, Kryostatschnitte (7 $\mu$ m). Vergrößerung 120:1

Enzymhistochemische Darstellung des Enzyms NADPH- Cytochrom- P450 Reduktase.

- (a) 16. pnd: Maximale Intensität (4+) in den Clustern der FLZ (kurzer Pfeil) und eine mäßig bis starke Reaktion (2 bis 3+) in den ALZ (langer Pfeil).
- (b) 31. pnd: In den Interstitien finden sich ALZ mit einer mäßig starken Reaktion (2+). Das Endothel der Stromagefäße (Pfeil) zeigt ebenfalls eine Reaktion mit mäßiger Intensität (2+).
- (c) 90. pnd: Die Leydigzellen weisen eine starke Intensität auf (3+). Die elongierten Spermatiden zeigen eine unspezifische Farbreaktion, welche ebenfalls in der Negativkontrolle (Abb. 19d) sichtbar ist.
- (d) 90. pnd: **Negativkontrolle.** Dem Inkubationsmedium wurde kein Substrat zugefügt. In den Leydigzellen ist keine Reaktion nachweisbar (0+). Die elongierten Spermatiden zeigen eine unspezifische Anfärbung.

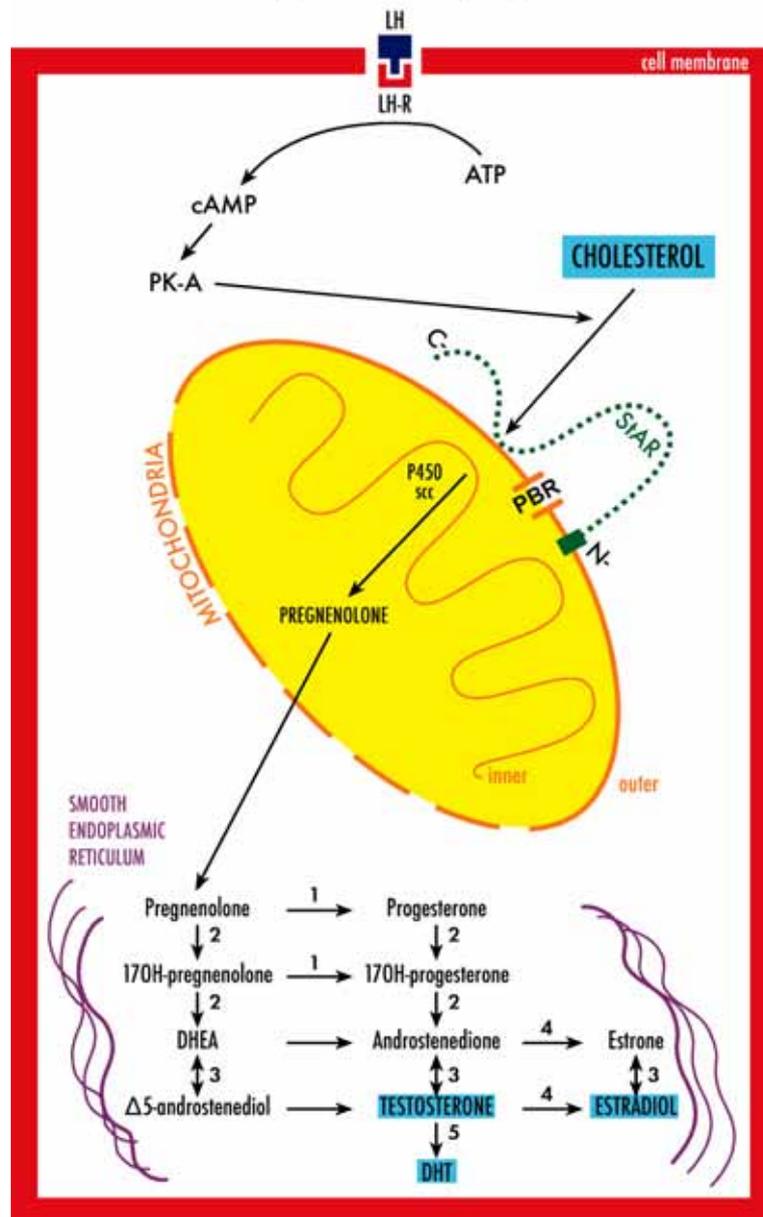
#### **4. Diskussion**

Diese Arbeit beschreibt die ontogenetischen Veränderungen des Enzyms 11 $\beta$ -HSD in den Leydigzellen der Ratte anhand histochemischer und spektralfotometrischer Methoden.

Es werden erstmals systematisch die ontogenetischen Veränderungen in den Verteilungsmustern und Intensitäten der histochemischen Reaktion von 11 $\beta$ -HSD in Leydigzellen der Ratte beschrieben. Die Hydroxysteroid Dehydrogenasen (HSD) sind von essentieller Bedeutung für die Biosynthese und den Stoffwechsel von Steroiden in den Leydig-Zellen (LZ). Abbildung 20 stellt in vereinfachter Weise die wichtigen Schritte der Steroidogenese in den Leydigzellen dar. Bindung des luteinisierenden Hormons (LH) an seinen Rezeptor (LH-R) induziert die Synthese von cAMP aus ATP. Das cAMP katalysiert die Synthese von Proteinkinase A (PK-A), welche für den Transport von Cholesterin aus dem zytoplasmatischen Pool zu den Mitochondrien benötigt wird. Das Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) transportiert Cholesterin von der äusseren zur inneren mitochondrialen Membran, wo das Enzym P450<sub>scc</sub> lokalisiert ist. Dabei ist das N-terminale Ende von StAR verbunden mit den mitochondrialen Importmechanismen an der äusseren mitochondrialen Membran. P450<sub>scc</sub> wandelt Cholesterin in Pregnenolon um, welches zum glatten Endoplasmatischen Retikulum transportiert wird, wo die Testosteronsynthese stattfindet. Corticosteroide haben einen hemmenden Einfluß auf die Testosteronsynthese (Hales and Payne 1989). Die Wirkung von Corticosteroiden wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst: Blutspiegel des Hormons, Plasmabindung, unterschiedliche Dichte von Rezeptoren in den Zielgeweben sowie prärezeptoriellen Metabolismus von Liganden durch gewebspezifische Enzyme. 11 $\beta$ -HSD ist ein Schlüsselenzym für den prärezeptoriellen Metabolismus von Glukokortikoiden (Seckl and Walker 2001). Dabei wird durch die oxidative Aktivität von 11 $\beta$ -HSD bei der Ratte Corticosteron in 11-dehydrocorticosteron überführt und durch die reduktive Aktivität 11-dehydrocorticosteron in Corticosteron (siehe Abb. 21). Beim Menschen erfolgt eine Umwandlung von Cortison in Cortisol und umgekehrt.

Bisher sind zwei Isoformen von 11 $\beta$ -HSD identifiziert worden. 11 $\beta$ -HSD Typ 1, ursprünglich aus der Leber isoliert, und 11 $\beta$ -HSD Typ 2, lokalisiert z.B. in den Nieren. 11 $\beta$ -HSD Typ 1 ist eine NADP(H)-abhängige Oxidoreduktase mit einer  $K_m$  im mikromolaren Bereich und in der Leber überwiegend reduktiver Aktivität (Monder and Lakshmi 1990, Gao et al. 1997, Jamieson et al. 2000).

## Steroidogenesis in Leydig Cells

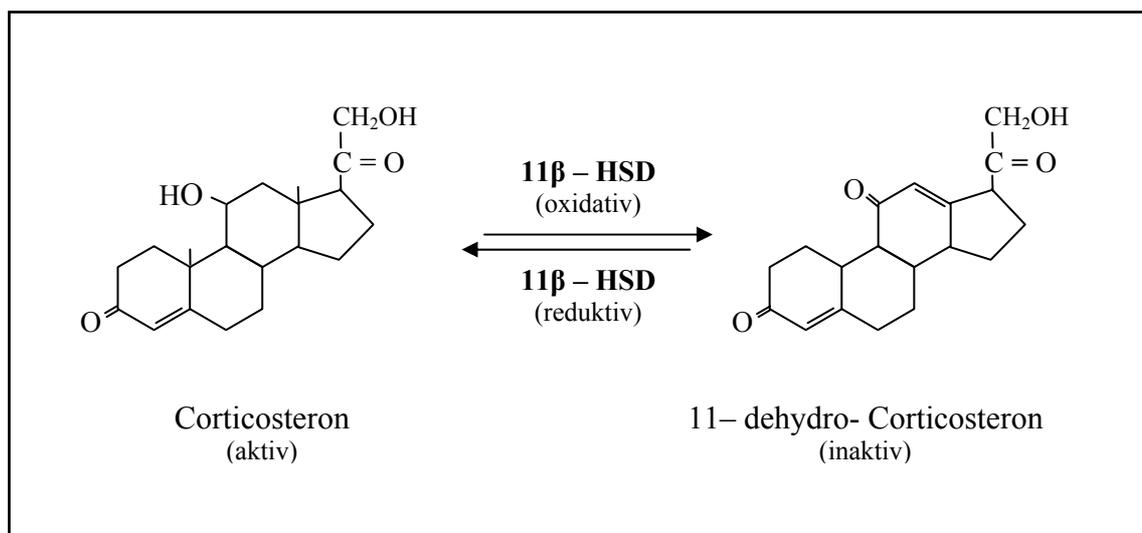


**Abbildung 20.** Vereinfachte Darstellung der wichtigen Stufen der Steroidogenese in Leydigzellen (Haider 2004).

LH = Luteinisierendes Hormon, LH-R = Rezeptor für das Luteinisierende Hormon,  
 ATP = Adenosin-triphosphat, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat,  
 PK-A = Protein Kinase A,  
 StAR = Steroidogenic Acute Regulatory Protein,  
 PBR = Peripheral Benzodiazepin Rezeptor,  
 P450scc = P450 side chain cleavage,  
 DHEA = Dehydroepiandrosteron,  
 DHT = Dihydrotestosteron;  
 1 =  $3\beta$  - Hydroxysteroid Dehydrogenase, 2 = Cytochrom P 450  $17\alpha$  - Hydroxylase,  
 3 =  $17\beta$  - Hydroxysteroid Dehydrogenase; 4 = Cytochrom P450 Aromatase,  
 5 =  $5\alpha$  - Reduktase

11 $\beta$ -HSD Typ 2 ist NAD-abhängig und eine unidirektionale Dehydrogenase mit einer  $K_m$  im nanomolaren Bereich (Rusvai and Naray-Feyes-Toth 1993; Yang and Yu 1994). Verschiedene biochemische und endokrinologische Berichte zeigen, dass die Leydigzellen von Ratten 11 $\beta$ -HSD Typ 1 mRNA sowie das korrespondierende Enzym enthalten, während Typ 2 dort nicht nachweisbar ist (Phillips et al. 1989; Ge et al. 1997b; Leckie et al. 1998; Brereton et al. 2001).

In der Leber ist 11 $\beta$ -HSD Typ 1 überwiegend eine Reduktase. Sie überführt 11-dehydrocorticosteron in Corticosteron. Dadurch wird dort die Glukokortikoid-Wirkung verstärkt (Monder et al. 1991; Monder and White 1993; Gao et al. 1997; Jamieson et al. 2000; Seckl and Walker 2001). Die Glukokortikoidwirkung wirkt in der Leber der Wirkung von Insulin entgegen, z.B. indem die Expression der Glukoneogeneseenzyme hochreguliert wird.



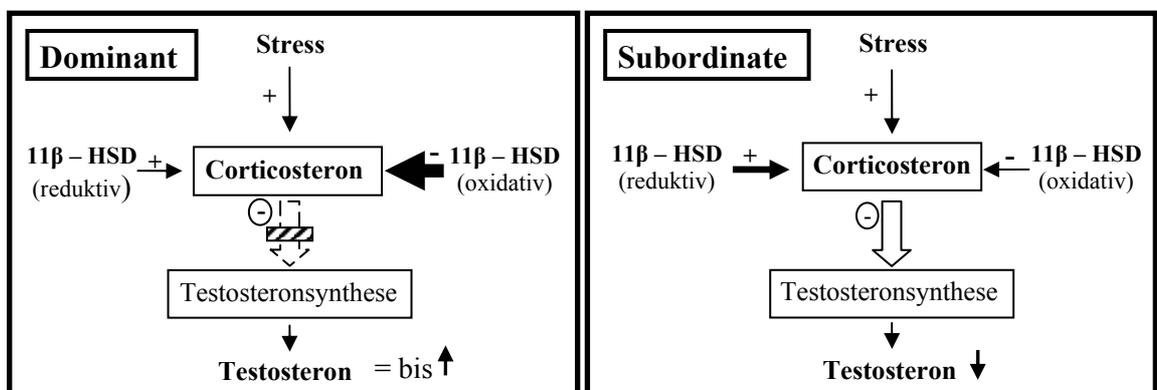
**Abbildung 21.** Vereinfachte Darstellung der Enzymaktivität von 11 $\beta$ -HSD

Im Hoden bewirken Glukokortikoide eine Hemmung der Testosteronsynthese und -sekretion; eine Verstärkung der Glukokortikoidwirkung wäre während der geschlechtlichen Reifung also von Nachteil. In verschiedenen Studien wurde untersucht, ob im Hoden die reduktive oder die oxidative Aktivität von 11 $\beta$ -HSD überwiegt. Leckie et al. (1998) berichteten, daß 11 $\beta$ -HSD in den Leydigzellen der Ratte überwiegend reduziert. Im Gegensatz dazu haben andere Autoren betont, 11 $\beta$ -HSD sei in Leydigzellen überwiegend eine Oxidase (Monder et al. 1994b; Ge et al. 1997a).

Monder et al. (1994b) gehen davon aus, dass 11 $\beta$ -HSD im Rattenhoden Corticosteron zu dem inaktiven Metaboliten 11-dehydrocorticosteron oxidiert und so die Funktion von 11 $\beta$ -HSD im Schutz des Organs vor der Glukocortikoid-induzierten Hemmung der Testosteronsynthese und -sekretion liegt. Ge et al. (1997a) haben entdeckt, dass in ALZ (pnd 90) die Oxidation bevorzugt wurde, während die Reduktion lediglich in mesenchymalen Vorläuferzellen (pnd 21) und in unreifen Leydigzellen (pnd 35) überwog. Ge und Hardy (2000) stellten fest, dass 11 $\beta$ -HSD in Leydigzellen adulter Ratten in vivo vorwiegend oxidativ agiert. Hardy (2002) fasst zusammen, dass eine überwiegend oxidative Aktivität in frisch isolierten, intakten, adulten Leydigzellen und in Gegenwart physiologischer Substratkonzentrationen nachzuweisen ist, während in unreifen Leydigzellen, Leydigzellen nach prolongierter Kultur in vitro oder in Gegenwart hoher Substratkonzentrationen das Verhältnis von oxidativer zu reduktiver Aktivität typischerweise zu Gunsten der reduktiven Aktivität variiert. In der vorliegenden Studie wurden zwei Substratmolaritäten verglichen. Der Verlauf der Reaktionsintensitäten war ähnlich, wenn man sie für die Substratmolaritäten 2,5 mM und 5mM verglich. Etwas distinguiertere Ergebnisse konnten allerdings mit 2,5 mM Substrat erzielt werden.

In einem sogenannten „visible burrow system“ (VBS) untersuchten Hardy et al. (2002) die Auswirkungen von psychosozialen Stress u.a. auf die Serumtestosteron- und Corticosteronspiegel, sowie die 11 $\beta$ -HSD Oxidase- und Reduktaseaktivität von Long - Evans Ratten. Das VBS ist ein Gruppenbehausungssystem, welches es möglich macht, die Ratten psychosozialen Stress auszusetzen und dies in einem Labor beobachtbar und erfassbar zu machen. Es werden jeweils vier Männchen und zwei Weibchen in einem geschlossenen Käfigsystem zusammen gehalten, welches durch Plexiglasabdeckungen und -tunnel für eine Videobeobachtung zugänglich ist (Monder et al. 1994c). Die Long - Evans Ratten bilden in diesem System eine Hierarchie aus. Dominante und untergeordnete (im Folgenden als „Subordinates“ bezeichnet) Männchen wurden nach folgenden Kriterien unterschieden: Wunden, Offensives Verhalten (Beißen), Flucht- und Verteidigungsverhalten, beanspruchte Fläche, auf der sich die Tiere frei bewegen konnten. Dabei wiesen die dominanten Tiere insgesamt weniger Wunden und diese vorwiegend im Schnauzenbereich auf. Sie wurden häufig durch Angriffe auffällig, während sie kein Flucht- oder Verteidigungsverhalten zeigten, und sich als Konsequenz ihrer Dominanz frei in dem Käfigsystem bewegen konnten. Die Subordinates hingegen wiesen mehr Wunden und diese vor allem am Rücken auf. Sie zeigten kein aggressives Angriffsverhalten und dagegen überwiegend Flucht- und Verteidigungsverhalten. Die

von Ihnen eingenommene Fläche im Behausungssystem war klein, sie hielten sich vorwiegend am Rand und in den Ecken der freien Flächen auf. Als Kontrolltiere wurden den Tieren Männchen zugeordnet, die ihnen in Gewicht und Alter entsprachen, jedoch in einem konventionellen Käfig zusammen mit einem Weibchen gehalten wurden. Die dominanten Tiere wiesen trotz z.T. erhöhter Corticosteronspiegel gegenüber den Kontrolltieren erhöhte oder gleich bleibende Testosteronwerte auf, während diese bei den Subordinates sanken. Bei den dominanten Männchen konnte eine erhöhte Oxidase-Aktivität von 11 $\beta$ -HSD nachgewiesen werden, auch immunhistochemisch zeigte sich vermehrt 11 $\beta$ -HSD Typ 1 Protein in den Leydig – Zellen. Dagegen entsprach den erniedrigten Testosteronspiegeln der Subordinates eine im Vergleich mit den Kontroll-Tieren gleichbleibende oxidative Aktivität von 11 $\beta$ -HSD; z.T. wurde sogar eine relativ erhöhte reduktive Aktivität nachgewiesen, was den Spiegel an aktivem Corticosteron noch erhöhen würde. Hardy et al. (2002) schlussfolgern, dass das Versagen der Leydigzellen untergeordneter Tiere, die erhöhte Glukokortikoidwirkung unter Streß durch Erhöhung der 11 $\beta$ -HSD Oxidase- Aktivität zu kompensieren, zur streßinduzierten Reduktion der Testosteronspiegel führt. Die Abb. 22 soll diese Mechanismen verdeutlichen.



**Abbildung 22.** Schematische Darstellung der Rolle der oxidativen Reaktion von 11 $\beta$ -HSD als Schutz vor einer Stress-induzierten Hemmung der Testosteronsynthese durch Corticosteron. Links: Modell für dominante Rattenmännchen. Rechts: Modell für untergeordnete Rattenmännchen.

In der vorliegenden Studie wurde ausschließlich die oxidative Aktivität des Enzyms 11 $\beta$ -HSD untersucht, welche von pnd 31 an klar nachweisbar war und mit fortschreitendem Alter kontinuierlich zunahm. Eine mögliche Interpretation der im folgenden dargestellten Daten wäre, dass je nach den gewebspezifischen Ansprüchen

entweder die Reduktaseaktivität oder die Oxidaseaktivität von 11 $\beta$ - HSD Typ 1 überwiegt und dass diese darüber hinaus im Hoden speziell je nach den komplexen Anforderungen der Reifung, z.B. den verschiedenen Stadien der Spermatogenese reguliert werden.

Verschiedene Autoren schlagen 11 $\beta$ - HSD als Marker für die funktionelle Reife von ALZ in Rattenhoden vor (Phillips et al. 1989, Haider et al. 1990, Monder et al. 1994a, b). Neumann et al. (1993) zeigten eine zeitliche Koinzidenz des ersten Erscheinens von elongierten Spermatischen in den Tubuli seminiferi und der erstmöglichen histochemischen Darstellung von 11 $\beta$ - HSD in den Leydigzellen von Ratten. Zusätzlich korreliert das Auftreten des Enzyms mit der postnatalen Zunahme der Anzahl von Leydigzellen, des Hodengewichts, der Gesamtfläche intrazellulärer Membranen und des Testosterongehaltes sowie der Testosteronsekretion der Leydigzellen (Phillips et al. 1989). Die vorliegende Studie zeigt, dass 11 $\beta$ - HSD erstmals an pnd 31 histochemisch nachweisbar ist und dass der Gehalt an oxidativ aktivem 11 $\beta$ - HSD im Verlauf der Ontogenese kontinuierlich bis zum Erreichen der Geschlechtsreife zunimmt.

Desweiteren soll auch der Frage nach einer funktionellen Heterogenität der Leydigzellen nachgegangen werden, über die verschiedene Studien berichten (Ziegler et al. 1983, Haider et al. 1986, Shan et al. 1993). Contreras und Ronco (1994) haben Leydigzellen nach ihrem Durchmesser in Gruppen eingeteilt und eine unterschiedliche Regulation von 3 $\beta$ - HSD durch LH/hCG in kleinen und großen LZ festgestellt. In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass die Reaktionsintensität in einem Hodenquerschnitt nicht in allen Leydigzellen homogen verteilt ist, sondern dass Leydigzellen mit einer stark positiven Enzymreaktion neben Leydigzellen mit schwach positiver Enzymreaktion zum gleichen Zeitpunkt vorkommen. Dies ist in den Histogrammen (Abb. 10 und 11) dargestellt und deutet möglicherweise auf einen unterschiedlichen Reife – oder Funktionszustand der Leydigzellen hin. Dies unterstützt die Vermutung einer lokalen parakrinen oder autokrinen Regulation der Leydigzellen im Rattenhoden, abhängig von den Stadien der Spermatogenese, auf die verschiedene Autoren hingewiesen haben (Parvinen et al. 1981, Bergh und Damber 1984).

Die kontinuierliche Zunahme der Reaktionsintensität von 11 $\beta$ - HSD bis zum pnd 90 entspricht in den Histogrammen einem Übergang zu den höheren Ranggruppen. Im ontogenetischen Verlauf wurden zwei signifikante Höhepunkte ( $p < 0,05$ ) der Reaktionsintensität beobachtet: Am pnd 40 und 90 mit NAD als Coenzym und am pnd 45/90 wenn NADP verwendet wurde. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Ariyaratne und Mendis-Handagama (2000), welche einen signifikanten Anstieg in der

totalen Testosteronproduktion pro Hoden in vitro an pnd 40 und 90 zeigten. Ein nahezu sprunghafter Anstieg der Intensität zeigt sich zwischen pnd 37 und pnd 40. In den Histogrammen (Abb. 10 und 11) zeigt sich erstmals eine deutliche Abnahme der schwach und mäßig positiven Zellen und ein Übergang zu den höheren Intensitätsranggruppen. Ein weiterer Wendepunkt der Enzymaktivität zeigte sich an pnd 50. Hier sind die Reaktionsintensitäten innerhalb eines Hodenquerschnittes sehr heterogen und es zeigt sich im Gegensatz zu pnd 45 und pnd 90 eine insgesamt schwächere oxidative Aktivität von 11 $\beta$ -HSD.

Daß sich an diesen Postnataltagen wichtige Umstellungen vollziehen, welche z.B. mit den Stadien der Spermatogenese korrelieren, verdeutlicht auch ein Vergleich der ontogenetischen Kurven von 11 $\beta$ -HSD und 17 $\beta$ -HSD<sup>1</sup>. Das Enzym 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase spielt eine Rolle bei der Synthese von Androgenen in den Leydigzellen der Ratte (siehe Abb. 20). Leydigzellen synthetisieren und enthalten einen hohen Anteil an 17 $\beta$ -HSD Typ 4, welches 5-androstene-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Östradiol zu Östron oxidiert. Beim Vergleich der beiden Kurven zeigt sich ein inverser Verlauf in der ontogenetischen Entwicklung für 11 $\beta$ -HSD und 17 $\beta$ -HSD, wobei sich die Graphen zwischen dem 37. und 40. pnd, dem 45. und 50. pnd und am 90. pnd kreuzen. Dies korreliert mit der Bildung elongierter Spermatiden, die nach pnd 35 beginnt sowie dem ersten Auftreten von Spermatozoen an pnd 48 (Haider 1988). Die Zeit zwischen pnd 35 und 45 wird als Wendepunkt zwischen reifen und unreifen LZ angesehen (Haider et al. 1990). Ariyaratne und Mendis – Handagama (2000) haben einen signifikanten Anstieg der totalen Testosteronproduktion pro Hoden in vitro an pnd 40 und pnd 90 festgestellt. Desweiteren beschrieben Vreeburg et al. 1988 ein Maximum der 5- $\alpha$ -Reduktase-Aktivität zwischen dem 35. und 45. pnd. Mit Hilfe des Enzyms 5- $\alpha$ -Reduktase geschieht eine Umwandlung von Testosteron in Dihydrotestosteron (Haider 1988). Diese Umwandlung ist eine Voraussetzung für die Entfaltung der Testosteronwirkung in Hoden, Nebenhoden, Samenleiter, Samenbläschen, Prostata, Penis und Haut (Liao 1976).

Insgesamt könnte der Verlauf der ontogenetischen Kurven von 11 $\beta$ -HSD und 17 $\beta$ -HSD, sowie deren inverse Beziehung zueinander ebenfalls auf den präzisen Kontrollmechanismus der endokrinen Regulation der Spermatogenese hinweisen.

Diese Studie beschäftigt sich des Weiteren mit der Coenzym- Akzeptanz von 11 $\beta$ -HSD gegenüber NAD und NADP. Da 11 $\beta$ -HSD Typ 1 NADP- abhängig ist, war es

---

<sup>1</sup> Daten aus der Dissertation B. Schlutius (2004), Med. Fakultät, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

überraschend, dass in den vorliegenden Untersuchungen die Reaktionsintensitäten keine markanten Unterschiede aufwiesen wenn NAD anstelle von NADP als Coenzym verwendet wurde. Die starke Reaktion mit NAD kann nicht 11 $\beta$ -HSD Typ 2 zugeschrieben werden, da dieses Isoenzym in den Hoden nicht nachgewiesen wurde. Vielmehr könnte sie aus der Existenz eines weiteren Isoenzym von 11 $\beta$ -HSD neben 11 $\beta$ -HSD Typ 1 resultieren. Gomez – Sanchez et al. (1996), Gao et al. (1997), Ge et al. (1997b) and Nwe et al. (2000) haben ebenfalls über die Existenz eines weiteren Isoenzym von 11 $\beta$ -HSD zusätzlich zu Typ 1 und 2 diskutiert.

Die folgenden Überlegungen reflektieren die kontroverse Debatte über die Existenz eines weiteren Isoenzym von 11 $\beta$ -HSD:

11 $\beta$ -HSD Typ 1 hat eine  $K_m$  im mikromolaren Bereich (Monder et al. 1991; Monder et al. 1994a,b; Yang and Yu 1994). Zusätzlich zu den zu erwartenden hohen  $K_m$  Aktivitäten wiesen Ge et al. (1997b) in Leydigzellen eine niedrige  $K_m$  oxidativer Aktivität (42nM) nach, ähnlich der NADP- abhängigen unidirektionalen 11 $\beta$ -HSD Oxidase, die von Gomez-Sanchez et al. (1996) in der Chorion Karzinom Zelllinie JEG 3 gefunden wurde. Ge et al. (1997a) wiesen nach, dass sowohl eine oxidative als auch eine reduktive Aktivität zu jeder Entwicklungsstufe im Hoden besteht und dass sich deren Netto- Verhältnis zueinander ändert, so dass zu einem Zeitpunkt die Oxidation und zu einem anderen die Reduktion überwiegt. Während die reduktive Aktivität kontinuierlich und parallel zu den Konzentrationen von 11 $\beta$ -HSD Typ 1 mRNA und Protein anstieg, zeigte sich mit zunehmendem Alter ein starker Zuwachs der oxidativen Aktivität, so dass diese bei den adulten Tieren überwog. Der starke Anstieg der oxidativen Aktivität konnte keiner der zwei bekannten Isoformen zugeteilt werden, so dass Ge et al. schlussfolgerten, dieser könne aus der Existenz einer dritten Isoform resultieren.

Nwe et al. (2000) beobachteten unterschiedliche Effekte auf die oxidative Aktivität von 11 $\beta$ -HSD in den Hoden und der Leber nach Gabe von u.a. verschiedenen Steroidhormonen an normale Ratten. Beispielsweise führte eine einwöchige Gabe von Dexamethason, Progesteron, Desoxycorticosteron, sowie die fünföchige Gabe von Thyroxin zu einer Zunahme der oxidativen Aktivität von 11 $\beta$ -HSD im Hoden, verminderten jedoch die Enzymaktivität in der Leber, bzw. ließen diese unbeeinflusst im Falle von Desoxycorticosteron. Corticosteron und Testosteron führten zu einer Abnahme der testikulären Enzymaktivität, während diese in der Leber unverändert blieb. Nwe et al. (2000) führen auch dies auf Unterschiede in den gewebsspezifischen Regulationsmechanismen zurück oder aber die mögliche Gegenwart einer zusätzlichen

Isoform von 11 $\beta$ -HSD im Hoden. Glycyrrhetinic acid (GA) ist ein ausgiebig untersuchter Hemmstoff des Enzyms 11 $\beta$ -HSD. Untersuchungen von Monder et al. (1994a,b) zeigten, dass eine Hemmung der oxidativen Aktivität von 11 $\beta$ -HSD in Leydigzellen durch GA zu einer Zunahme der Unterdrückung des „Testosteronoutputs“ durch Glukokortikoide führte. Die reduktive Aktivität von 11 $\beta$ -HSD hingegen könnte die Glucocorticoidwirkungen verstärken, indem sie den inaktiven Metaboliten 11-dehydrocorticosteron in das aktive Corticosteron zurück umwandelt.

Einige endogen synthetisierte 11 $\beta$ -hydroxylierte Steroidderivate, wie z.B. 11 $\beta$ -OH-Progesteron können ebenfalls die Aktivität von 11 $\beta$ -HSD hemmen, und zwar spezifisch entweder die oxidative oder die reduktive Aktivität. Wang et al. (2002) haben 11 $\beta$ -Hydroxylase in den Leydigzellen der Ratte nachgewiesen. Dieses Enzym katalysiert die 11 $\beta$ -Hydroxylierung von Steroiden und produziert so 11 $\beta$ -OH-Steroidderivate. Lokal produzierte 11 $\beta$ -HSD-hemmende Substanzen könnten so einen signifikanten Effekt auf die Glucocorticoid-gesteuerte Regulation der Testosteronsynthese haben. Es wird angenommen, dass auch Testosteron selbst die oxidative Aktivität von 11 $\beta$ -HSD hemmt (Nwe et al. 1999). Es könnte sich also um ein lokales „negative Feedback“-System handeln, welches die Testosteronproduktion im Hoden über eine gesteigerte hemmende Aktion von Glucocorticoiden auf die Testosteron-Biosynthese reguliert. Da ACTH bei Stress erhöht ist und den Spiegel von 11 $\beta$ -Hydroxylase in der Nebenniere steigert, wäre es interessant zu wissen, ob ACTH auch die Aktivität von 11 $\beta$ -Hydroxylase im Hoden steigert, und die lokale Synthese von 11 $\beta$ -HSD hemmenden Substanzen zum stressbedingten Abfall der Testosteronproduktion beiträgt. Dies könnte einen Kontrollmechanismus stressbedingter reproduktiver Dysfunktion darstellen und des weiteren erklären, warum 11 $\beta$ -HSD den Hoden im Falle des Cushing Syndroms oder unter schwerem Stress den Hoden nicht vollständig vor den Effekten des Glucocorticoidüberschusses schützen kann.

Um weitere indirekte Hinweise über unterschiedliche Funktionszustände der Leydigzellen und über die Kapazität der Androgenbiosynthese zu erhalten wurden parallel zu den Versuchsreihen für 11 $\beta$ -HSD die ontogenetische Entwicklung und Verteilung von Lipiden, unspezifischen Esterasen, NADPH-Cytochrom-P450 Reduktase und der NADH-/NADPH-Diaphorase in den Leydigzellen der Ratte untersucht.

Das Auftreten von Lipidtropfen ist an das Vorhandensein morphologisch und funktionell intakter Leydigzellen gebunden (Hensel 1991). Es wird angenommen, daß

die im Zytoplasma vorkommenden grob- und feintröpfigen Fetteinlagerungen Cholesterinester enthalten; diese Ester werden von Esterasen im Zytoplasma gespalten, dabei entsteht freies Cholesterin für die Steroidbiosynthese (Haider 1988). Die Verteilung der Lipideinlagerungen im Zytoplasma der Leydigzellen ist sehr heterogen: Die Größe der Fetttropfen im Zytoplasma der Leydigzellen variiert stark, darüber hinaus kann man in allen Altersstufen, besonders am 90. pnd, ein Nebeneinander von Leydigzellen mit und ohne Lipideinlagerungen beobachten. Dies kann als weiterer Hinweis auf unterschiedliche Funktionszustände der Leydigzellen gedeutet werden. In der Zeit zwischen dem pnd 31 und pnd 45 wies die Anzahl der Leydigzellen deren Zytoplasma Fetteinschlüsse enthält einen Gipfel auf. Haider et al. (1990) haben den Zeitraum zwischen dem 35. und 40. pnd als einen Wendepunkt zwischen unreifen und reifen Leydigzellen bezeichnet. Nach pnd 45 nimmt die Anzahl der Zellen, die Fetteinschlüsse enthalten deutlich ab. Haider et al. (1985) deuten dies folgendermaßen: Lipide seien Ausdruck des Cholesterinvorrates der Leydigzellen. Da das adulte Tier verstärkt Cholesterin zu Pregnenolon und Testosteron umwandelt, nehmen der Cholesterinvorrat in den Leydig – Zellen ab.

Die unspezifischen Esterasen sind ein Enzymgemisch aus Arylesterasen (A-Esterasen), Aliesterasen (B-Esterasen) und Acetylesterasen (C-Esterasen). Diese Enzyme kommen im Zytoplasma, endoplasmatischen Retikulum, in den Lysosomen und wahrscheinlich auch in den Mitochondrien vor (Lojda et al. 1979). Im Hodengewebe wurden Typ A und Typ B- Esterasen nachgewiesen (Niemi et al. 1962). Es wird vermutet, daß diese Enzyme bei der Bereitstellung des Cholesterins für die Steroidbiosynthese in den Leydigzellen benötigt werden. Ab dem 31. pnd, an dem erstmals histochemisch eine Reaktion für 11 $\beta$ -HSD nachweisbar war, verlaufen die Mittelwert- Diagramme für 11 $\beta$ -HSD und die unspezifischen Esterasen annähernd gleich. Es zeigt sich auch hier eine Intensitätszunahme mit maximalen Intensitäten an pnd 45 und 90. Dieser Reaktionsanstieg mit fortschreitendem Alter stimmt mit den Befunden anderer Autoren überein, welche die Enzyme als "Marker" der Leydigzellen verwendet sowie zur Reifebeurteilung vorgeschlagen haben (Meyer et al. 1974, Hensel et al. 1991). Auch die unspezifischen Esterasen weisen eine erste deutliche Zunahme an Intensität zwischen dem 37. und 40. pnd sowie eine Intensitätsabnahme an pnd 50 gegenüber pnd 45 und 90 auf.

Es ist davon auszugehen, dass sich an diesen Postnaltagen Entwicklungsprozesse innerhalb des Hodens vollziehen, die eine sehr fein abgestimmte Regulierung der verschiedenen Hormonwirkungen erfordern.

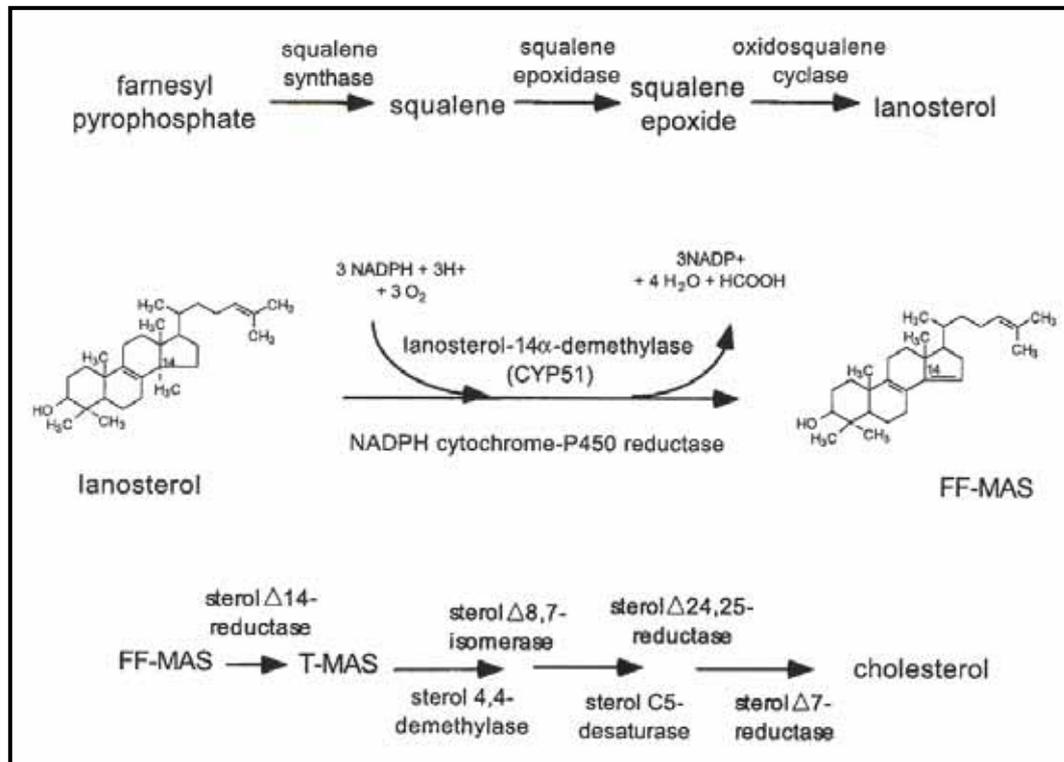
Begleitend zu den Untersuchungen von 11 $\beta$ -HSD wurden an denselben Postnaltagen auch die am Elektronentransport der Zelle beteiligten Enzyme NADPH-P450-Reduktase sowie NAD- und NADPH-Diaphorase untersucht. Die Diaphorasen werden als Enzyme definiert, welche die Oxidation von NADH oder NADPH in Gegenwart von artifiziellen Elektronenakzeptoren, z.B. Farbstoffen, Ferricyaniden und Chinonen (Menadion bzw. Vit K3), katalysieren können. Es handelt sich um einen Zweielektronentransport (Raap and Van Duijn 1983, Straatsburg et al. 1989, Van Noorden and Frederiks 1992). Der Zusatz von einem exogenen intermediären Elektronencarrier ist die Voraussetzung für die histochemische Demonstration von Diaphorasen in histologischen Schnitten (Van Noorden and Butcher 1986). In histochemischen Untersuchungen kann die Diaphoraseaktivität Auskunft über die Kapazität der intrazellulären Oxidation geben (Lojda et al. 1979). Subzellulär ist die NADPH-Diaphorase in vielen Geweben anders lokalisiert als die NADH-Diaphorase. Während die NADH-Diaphorase oft auf die Mitochondrien beschränkt ist, ist die NADPH-Diaphorase im Zytoplasma lokalisiert (Nachlas et al. 1958 a und b, Lee-Flang-de-Pijper und Hülsmann 1974). Schor et al 1976 stellten im fest, dass im interstitiellen Gewebe der Hoden von Fischer Ratten die Aktivität der NADPH-Diaphorase etwas höher ist als die der NADH-Diaphorase. Auch in dem hier vorliegenden histochemischen Nachweis zeigt sich die NADH-Diaphorase mit einer insgesamt etwas schwächeren Intensität als die NADPH-Diaphorase. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass NADPH in Abwesenheit von  $\beta$ -Glycerophosphat oder p-Nitrophenylphosphat durch unspezifische Phosphatasen in NADH umgewandelt werden kann (Lee-Flang-de-Pijper und Hülsmann 1974). Dies schränkt die Deutung dieses Befundes ein, da mit histochemischen Methoden unter Umständen die NADPH- und die NADH-Diaphorase-Aktivität gleichzeitig gemessen werden. Der Immunologische Nachweis von Diaphorasen im menschlichen Hoden erfolgte mit monoclonalen Antikörpern (IgG1) und zeigte eine negative Reaktion (0) in den Tubuli seminiferi, eine starke bis sehr starke (3-4+) Reaktion in dem Endothel von Gefäßen und eine sehr starke (4+) Reaktion in den Leydigzellen (Zappa et al. 2001). Dies entspricht auch der Lokalisation der in dieser Studie nachgewiesenen Reaktionsprodukte (Abb.16 und 17). Der Verlauf der NADH-Diaphorase entspricht ab pnd 31 weitestgehend dem Verlauf von 11 $\beta$ -HSD mit einer graduellen Zunahme der Reaktionsintensität bis zu einem

Maximum am pnd 90 und einer leichten Intensitätsminderung am pnd 50. Die NADPH-Diaphorase zeigt ab pnd 31 fast konstant hohe Werte für die ALZ mit besonders heterogenen Ergebnissen an pnd 45 und 50. Auch für die Diaphorasen zeigte sich also eine Heterogenität der Enzymverteilung in einem Hodenschnitt, was wiederum als Hinweis auf unterschiedliche Funktionszustände der Leydigzellen gedeutet werden kann. Ebenfalls zeigte sich, dass im Zeitraum vom 13. bis zum 25. pnd, dem gemeinsamen Auftreten von FLZ und ALZ, die Enzymreaktion beider Diaphorasen in den FLZ deutlich stärker war. Dies deutet darauf hin, dass das Gesamtpotential zur intrazellulären Oxidation der FLZ in diesem Zeitraum stärker ausgeprägt ist als in den ALZ.

Die NADPH- P450- Reduktase (auch NADPH- Ferrihemoprotein Reduktase genannt, E.C. 1.6.2.4.) ist ein Flavoprotein, welches für den Elektronentransfer von NADPH zu Cytochrom P450 im endoplasmatischen Retikulum verschiedener Gewebe benötigt wird (Masters und Okita 1980, Strobel et al. 1980, Straatsburg et al. 1989). Es handelt sich bei der Reaktion um einen Einelektronentransport. In Abwesenheit eines exogenen intermediären Elektronencarriers sind es die zelleigenen Elektronentransportwege, auf denen Reduktionsequivalente von reduzierten Coenzymen auf Tetrazoliumsälze übertragen werden (Van Noorden und Butcher 1986). In dieser Studie wurde die Aktivität von NADPH- P450- Reduktase nachgewiesen indem der Stammlösung lediglich NADPH als Substrat jedoch kein intermediärer Elektronencarrier (z.B. Menadion) zugegeben wurde.

Einerseits wird NADPH- P450 Reduktase als Elektronentransportenzym für die Aktivität von Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase (Cyp 51) benötigt (Majdič et al. 2000) (siehe Abb. 23). Cyp 51 ist ein Mitglied der Cytochrom P450 Familie. Es ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Trzaskos et al. 1986) und ist an der Cholesterinbiosynthese beteiligt (Nelson 1999). Es wandelt in der Gegenwart von NADPH, molekularem Sauerstoff und NADPH-Cytochrom P450 Reduktase Lanosterol in 4,4 -dimethyl 5 $\alpha$ -cholesta,8,14,24-diene-3 $\beta$ -ol um, welches auch als Follicular Fluid meiosis activating sterol (FF-MAS) bekannt ist (Fischer et al. 1991, Shyadehi et al. 1996). Es folgen noch mindestens sechs weitere enzymatische Schritte nach Cyp 51 bis zur Produktion von Cholesterin (Majdič et al. 2000). Die von Majdič mit Antikörpern ermittelte Aktivität von CYP 51 war am stärksten in den Leydigzellen der Testes adulter Ratten, sowie in haploiden Keimzellen, besonders in den elongierten Spermatozyten (step 19). Ein ähnliches Bild zeigte sich beim immunhistochemischen Nachweis von NADPH- Cytochrom P450 Reduktase mit hohen Konzentrationen in den Leydigzellen

und den Residualkörpern innerhalb der Tubuli seminiferi sowie in den elongierten Spermatischen (step 19). Diese Verteilung zeigt sich auch in der hier vorliegenden histochemischen Darstellung des Enzyms (siehe Abb.19).



### **Abbildung 23.**

Darstellung enzymatischer Schritte der Umwandlung vom Farnesyl Pyrophosphat zum Cholesterin (Majdič et al. 2000).

Desweiteren nimmt die NADPH- P450 Reduktase als obligatorischer Redoxpartner von P450c17 Einfluss auf die Steroidbiosynthese. P450c17 ist ein Schlüsselenzym für die Kontrolle der Glucocorticoid- und Sexualhormonbiosynthese (Lin et al. 1993, Kostić et al. 1998, Soucy and Luu-The 2000) und besitzt zwei Enzymaktivitäten:

17 $\alpha$ - hydroxylase, welche die Transformation von Pregnenolon in 17 $\alpha$ -Hydroxy-Pregnenolon und von Progesteron in 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron katalysiert und 17,20-lyase, welche 17 $\alpha$ -Hydroxy-Pregnenolon in DHEA bzw. 17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron in 4-Androstendion umwandelt. Die 17 $\alpha$ - Hydroxylierung erfolgt zuerst, danach kann die Umwandlung in DHEA bzw. Androstendion durch 17,20- lyase erfolgen oder auch ausbleiben. Das Verhältnis von 17 $\alpha$ - hydroxylase zur 17,20- lyase Aktivität wird durch die Menge an verfügbarer NADPH- Cytochrom P450- Reduktase bestimmt. Bei steigender Konzentration von NADPH- Cytochrom P450- Reduktase steigt die Lyaseaktivität relativ zur Hydroxylaseaktivität stärker an, bis sich die Aktivitätsraten angleichen (Yanagibashi and Hall 1986). Außerdem kann die Aktivität von 17,20- lyase

durch Phosphorylierung von Serin und Threonin, was die Affinität zum Redoxpartner erhöht, gesteigert werden (Miller et al. 1997). Die Aktivität von NADPH- Cytochrom P450- Reduktase ist in testikulären Mikrosomen 3-4 fach stärker als in Mikrosomen der Nebennierenrinde, was dafür verantwortlich sein mag, dass die 17,20- lyase Aktivität in den Testes höher ist als in der NNR (Yanagibashi and Hall 1986). In den Leydigzellen ist die 17,20- lyase Aktivität sehr hoch, so dass praktisch alle steroidalen Vorläufer zu C19 Steroiden umgewandelt werden (Miller et al. 1997).

Damit beeinflusst die NADPH- Cytochrom P450- Reduktase über Cyp 51 die Cholesterinbiosynthese, sowie über P450c17 direkt die Steroidsynthese. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Studie. Der Fetaltyp der Leydig – Zellen produziert pro Zelle wesentlich mehr Steroidhormone, als der Adulttyp (Haider 1988). In den hier vorliegenden Versuchsreihen zeigten sich im Allgemeinen wesentlich höhere Reaktionsintensitäten für die NADPH- Cytochrom P450- Reduktase in den FLZ als in den ALZ. Ab dem 31. pnd zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der ontogenetischen Kurve wie für 11 $\beta$ - HSD mit einer maximalen Intensität der ALZ am pnd 90 sowie einer niedrigeren Intensität an pnd 50. Ebenfalls vollzieht sich ein Umbruch zwischen dem pnd 37 und 40 allerdings mit hohen Intensitäten am pnd 37 und niedrigeren Werten an pnd 40.

### **Abschließende Bemerkungen**

Die vorliegenden Daten verdeutlichen die engen Zusammenhänge zwischen den ontogenetischen Veränderungen der 11 $\beta$ - HSD Enzymaktivität und der Reifung und Entwicklung der Leydigzellen im Hoden der Ratte, sowie den verschiedenen Stadien der Spermatogenese. Als Ausblick auf zukünftige Untersuchungen seien hier folgende Anmerkungen erwähnt:

1. In dieser Studie wurde die Entwicklung der Enzymaktivität des Enzym 11 $\beta$ - HSD in Leydigzellen der Ratte von der Geburt bis zum adulten Tier dargestellt. Um die Entwicklung und Reifung der Leydigzellen noch besser erfassen zu können, wäre es sinnvoll die Ontogenese des Enzyms 11 $\beta$ -HSD bis zum Senium zu beobachten.
2. Da der enzymhistochemische Nachweis von 11 $\beta$ -HSD nur eine indirekte Auskunft über die Menge an Enzym zulässt, wäre es sinnvoll parallel dazu einen Nachweis mit Antikörpern anzustreben. Zu einer genaueren Analyse der Reaktionsprodukte könnten auch elektronenmikroskopische Bilder beitragen.

3. Um weitere Aufschlüsse über die fein abgestimmte Regulation der Testosteronsynthese, bzw. deren Hemmung zu erhalten, wäre es interessant, das Verhältnis der oxidativen zur reduktiven Aktivität von  $11\beta$ -HSD, bzw. deren Veränderungen im Verlauf der Ontogenese zu beobachten.
4. Für die Klärung der Fragen um welche Isoform von  $11\beta$ -HSD es sich handelt, könnte ebenfalls eine Untersuchung mit speziellen Antikörpern oder z.B. RNA-Analysen dienen.
5. Der Vergleich zwischen  $11\beta$ -HSD und  $17\beta$ -HSD demonstriert das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Enzyme der Steroidbiosynthese. Um das Zusammenwirken der verschiedenen Enzyme noch besser beurteilen zu können, wäre es interessant den Verlauf von  $11\beta$ -HSD auch mit anderen Enzymen der Steroidbiosynthese zu vergleichen wie z.B. mit  $3\beta$ -HSD.
6. Es wäre sicherlich interessant, den Einfluss von genetischen Defekten des Enzyms  $11\beta$ -HSD auf die Entwicklung und Reifung der Leydigzellen hin zu untersuchen, in diesem Zusammenhang könnten auch Untersuchungen mit  $11\beta$ -HSD- Hemmstoffen und von „Knock out“ Tieren aufschlussreich sein. Aus diesen Untersuchungen könnten auch genauere Erkenntnisse über die Rolle von  $11\beta$ -HSD bei reproduktiver Dysfunktion resultieren, die dann wiederum auch in anderen Spezies, vor allem beim Menschen untersucht werden sollte.
7. Ebenfalls wäre es sehr interessant, die Bedeutung von  $11\beta$ -HSD für andere Organsysteme genauer zu untersuchen. In diesem Zusammenhang hat sich  $11\beta$ -HSD1 beispielsweise in der neueren Literatur als wichtiger endokriner Faktor der Kontrolle der Fettgewebsproliferation, -differenzierung und -hypertrophie hervorgerufen. Eine Dysregulation von  $11\beta$ -HSD in Leber und Fettgewebe wird mit dem metabolischen Syndrom in Zusammenhang gebracht (Masuzaki et al. 2001, Paterson et al. 2004) Eine Untersuchung von  $11\beta$ -HSD1 Sequenzvarianten von gesunden übergewichtigen und normalgewichtigen Kindern zeigte, dass die Kinder, die homozygot für einen  $11\beta$ -HSD1-Genpolymorphismus waren, einen höheren BMI, veränderte Körperform sowie Insulinresistenz aufwiesen (Gelernter-Yaniv et al. 2003). Die Autoren vermuten,  $11\beta$ -HSD1 könne eines der Gene sein, die wichtig für in der Kindheit beginnende Adipositas sind. Weitere Arbeiten, die sich mit einer hypothalamischen Form der Fettsucht beschäftigen zeigten ebenfalls eine verstärkte Aktivität von  $11\beta$ -HSD bei den Patienten: Patienten, die sich einer

operativen Entfernung eines Craniopharyngeoms unterzogen hatten und „hypothalamic obesity“ aufwiesen zeigten eine Veränderung der 11 $\beta$ -HSD Aktivität durch die die Umwandlung von Cortison zu Cortisol verstärkt wurde. Die Autoren schlussfolgern, dass ein Mangel an hypothalamischen Messengersubstanzen nach dem operativen Eingriff zu einer verstärkten Glucocorticoid Aktivität aufgrund einer verstärkten 11 $\beta$ -HSD1 Aktivität führt (Tiosano et al. 2003, Hochberg et al. 2004).

## **5. Literatur**

- Adamski J, Normand T, Iffnders F, Monté D, Begue A, Stehelin D, Jungblut PW, de Launoit Y (1995) Molecular cloning of a novel widely expressed human 80kDa 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase IV. *Biochem J* **311**: 437-443.
- Ariyaratne HBS and Mendis-Handagama SMLC (2000) Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol of Reproduction* **62**: 680-690.
- Bergh A and Damber JE (1984) Local regulation of Leydig cells by the seminiferous tubules. Effect of short – term cryptorchidism. *Int J Androl* **7**: 409-418.
- Brereton PS, van Driel RR, Suhaimi FB, Koyama K, Dilley R, Krozowski Z (2001) Light and electron microscopy localization of the 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase type I enzyme in the rat. *Endocrinology* **142**: 1644 – 1651.
- Carstensen JF, Tesdorpf JG, Kaufmann M, Markus MM, Husen B, Leenders F, Jakob F, de Launoit Y, Adamski J (1996) Characterization of 17 $\beta$ - hydroxysteroid dehydrogenase IV. *J of Endocrinology* **150**: S3-S12.
- Contreras H and Ronco AM (1994) Leydig cell heterogeneity as judged by quantitative cytochemistry of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in individual rat Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **51**: 73-79.
- Fischer RT, Trzaskos JM, Magolda RL, Ko SS, Brosz CS, Larsen B (1991) Lanosterol 14 $\alpha$ -methyl demethylase. *J Biol Chem* **266**: 6124-6132.
- Gao HB, Ge RS, Lakshmi V, Marandici, Hardy MP (1997) Hormonal regulation of oxidative and reductive activities of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Endocrinology* **138**: 156-161.

- Ge RS, Hardy DO, Catterall JF, Hardy MP (1997a) Developmental changes in glucocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase oxidative and reductive activities in rat Leydig cells. *Endocrinology* **138**: 5089-5095.
- Ge RS, Gao HB, Nacharaju VL, Gunsalus GL, Hardy MP (1997b) Identification of a Kinetically distinct activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Endocrinology* **138**: 2435-2442.
- Ge RS and Hardy MP (2000) Initial predominance of the oxidative activity of type I 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in primary rat Leydig cells and transfected cell lines. *J of Andrology* **21**: 303-310.
- Gelernter-Yaniv L, Feng N, Sebring NG, Hochberg Z, Yanovski JA (2003) Associations between a polymorphism in the 11 $\beta$ -HSD type 1 gene and body composition *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**: 983-986
- Gomez-Sanchez EP, Cox D, Foecking M, Ganjam V, Gomez-Sanchez CE (1996) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases of the choriocarcinoma cell line JEG - 3 and their inhibition by glycyrrhetic acid and other natural substances. *Steroids* **61**: 110-15.
- Haider SG, Urban A, Hilscher B, Hilscher W and Passia D (1983) Cyproterone acetate induced changes in the behaviour of hydroxysteroid dehydrogenases in rat Leydig cells during perinatal development. *Andrologia* **15**: 498-506.
- Haider SG, Passia D, Hilscher B (1985) Experimentelle Untersuchung zur perinatalen Entwicklung der Leydigzellen bei der Ratte: Experimentelle Urologie Springer Verlag Berlin pp.253-260
- Haider SG, Passia D, Overmeyer G (1986) Studies on fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Acta Histochem* **32**: 197-202.
- Haider SG (1988) Leydigzellen. Funktionelle Morphologie und Enzymhistochemie bei Ratte und Mensch. Stuttgart: Thieme Verlag, pp. 23-65

- Haider SG, Passia D, Rommert FFG (1990) Histochemical demonstration of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase as a marker for Leydig cell maturation in rat. *Acta Histochem Suppl.* **38**: 203-207.
- Haider SG, Servos G, Tajtaraghi S, Berthold G, Mukhopadhyay AK, Kilic N, Ergun S (1997) Functional markers for fetal and postnatal differentiation of rat Leydig cells. *Adv Exp Med Biol (United States)* **424**:143-144.
- Haider SG and Servos G (1998) Ultracytochemistry of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. *Anat Embryol* **198**: 101–110.
- Haider SG (2004) Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int. Rev. Cytology* **233**: 181-241
- Hales DB and Payne AH (1989) Glucocorticoid-mediated repression of P450<sub>scc</sub> mRNA and de novo synthesis in cultured Leydig cells. *Endocrinology* **124**: 2099-2104.
- Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL (1989) Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* **124**: 762-770.
- Hardy MP, Kelce WR, Klinefelter GR, Ewing LL (1990) Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: a role for androgen. *Endocrinology* **127(1)**: 488-90.
- Hardy MP, Sottas CM, Ge RS, McKittrick CR, Tamashiro KL, Mc Ewen BS, Haider SG, Markham CM, Blanchard RJ, Blanchard DC, Sakai RR (2002) Trends of reproductive hormones in male rats during psychosocial stress: role of glucocorticoid metabolism in behavioral dominance. *Biol. Reprod.* **67**: 1750-1755.
- Hensel FJ (1991) Histologische und histochemische Untersuchung zur Wirkung von Ethylendimethylsulfonat auf das interstitielle Gewebe des Hodens präpuberaler und adulter Ratten. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
pp. 36-39.

- Hochberg Z, Friedberg M, Yaniv L, Bader T, Tiosano D (2004) Hypothalamic Regulation of Adiposity: The role of 11 $\beta$ -HSD Type 1. *Horm Metab Res* **36**: 365-369
- Jamieson PM, Wlaker BR, Hapman KE, Andrew R, Rossiter S, Seckl JR (2000) 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is a predominant 11 beta-reductase in the perfused rat liver. *J Endocrinol* **165**: 685-692.
- Kerr JB and Knell CM (1988) The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* **103**: 535-544.
- Kostić T, Andrić S, Marić D, Kovačević (1998) The effect of acute stress and opioid antagonist on the activity of NADPH-p450 reductase in rat Leydig cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* **66**: 51-54
- Kuopio T, Tapanainen J, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I (1989) Development stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development* **107**: 213-220.
- Leckie CM, Welberg LAM, Seckel JR (1998) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase is a predominant reductase in intact rat Leydig cells. *J Endocrinol* **159**: 233-238.
- Leefflang-de-Pijper AM and Hülsmann WC (1974) Pitfalls in histochemical localization studies of NADPH generating enzymes or enzyme systems in rat small intestine. *Histochemistry* **39**: 143-153.
- Liao S, Hung S.C., Tymoczko J.L., Liang T. (1976) Active forms and biodynamics of the androgen-receptor in various target tissues. *Curr Top Mol Endocrinol* **4**: 139-51.
- Lin D, Black SM, Nagahama Y, Miller WL (1993) Steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-lyase activities of P450c17: Contributions of serine<sup>106</sup> and P450 reductase. *Endocrinology* **132**: 2498-2506.

- Lojda Z (1965) Fixation in histochemistry. *Folia morph (Praha)* **13**: 65-84.
- Lojda Z, Gossrau R, Schiebler TH (1979): Enzyme histochemistry. A laboratory manual. Springer Verlag, Berlin
- Majdič G, Saunders PTK, Teerds KJ (1998) Immunoexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17 $\alpha$ -hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (lh) in the fetal rat testis suggests that the onset of leydig cell steroid production is independent of lh action. *Biol of Reproduction* **58**: 520-525.
- Majdič G, Parvinen M, Bellamine A, Harwood Jr HJ, Ku WW, Waterman MR, Rozman D (2000) Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51), NADPH-cytochrome P450 reductase and squalene synthase in spermatogenesis: late spermatids of the rat express proteins needed to synthesize follicular fluid meiosis activating sterol. *J Endocrinol* **166**: 463-474.
- Masters BSS and Okita RT (1980) The history, properties and function of NADPH-cytochrome P450 reductase. *Pharmac Ther* **9**: 227-244.
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. (2001) A transgenic model of visceral obesity and metabolic syndrome. *Science* **294**: 2166-2170.
- Mendis-Handagama SM and Ariyaratne HB (2001) Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol. Reprod.* **65**: 660-671.
- Meyer EHH, Forsgren K, Deimling von O, Engel W (1974) Induction of nonspecific carboxyl esterase in the immature rat testis by human chorionic gonadotropine. *Endocrinology* **95**: 1737-1739.
- Miller WL, Auchus RJ and Geller DH (1997) The regulation of 17,20-lyase activity. *Steroids* **62**: 133-142

- Monder C and Lakshmi V (1990) Corticosteroid 11 $\beta$ -dehydrogenase of rat tissues: immunological studies. *Endocrinology* **126**: 2435-2443.
- Monder C, Lakshmi V, Miroff Y (1991) Kinetic studies on rat liver 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem Biophys Acta* **1115**: 23-29.
- Monder C, White PC (1993) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm* **47**: 187–271.
- Monder C, Hardy MP, Blanchard RJ, Blanchard DC (1994a) Comparative aspects of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Testicular 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: development of a model for the mediation of Leydig cell function by corticosteroids. *Steroids* **59**:69-73.
- Monder C, Mirhoff Y, Marandici A, Hardy MP (1994b) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase alleviates glucocorticoid-mediated inhibition of steroidogenesis in rat Leydig cells. *Endocrinology* **134**: 1199-1204.
- Monder C, Sakai RR, Miroff Y, Blanchard DC, Blanchard RJ (1994c) Reciprocal changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: evidence for a mediating role of testicular 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* **134(3)**: 1193 – 1198.
- Nachlas MM, Walker DG, Seligman AM (1958a) A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J biophys biochem Cytol* **4**: 29-43.
- Nachlas MM, Walker DG, Seligman AM (1958b) The histochemical localization of triphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J biophys biochem Cytol* **4**: 467-473.
- Nelson DR (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* **369**: 1-10.

- Neumann A, Haider SG, Hilscher B (1993) Temporal coincidence of the appearance of elongated spermatids and of histochemical reaction of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Andrologia* **25**: 263–269.
- Niemi M, Harkonen M, Kokko A (1962) Localization and identification of testicular esterases in the rat. *J Histochem Cytochem* **10**: 186-193
- Noorden van CJF and Butcher RG (1986) A quantitative histochemical study NADPH ferrihaemoprotein reductase activity. *Histochem J* **18**: 364-370.
- Noorden van CJF and Frederiks WM (1992). Enzyme Histochemistry. Oxford University Press. Royal Microscopy Society, pp. 48-109.
- Normand T, Husen B, Leenders F, Pelczar H, Baert J, Begue A, Flourens A, Adamski J, de Launoit Y (1995) Molecular characterization of mouse 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Molec Biol* **55**: 541-548.
- Nwe KH, Morat PB, Hamid A, Fadzilah S, Khalid BA (1999) Novel effects of deoxycorticosterone on testicular 11 $\beta$ -HSD activity and plasma testosterone levels in normal and adrenalectomized rats *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **107(5)**: 288-94
- Nwe KH, Hamid A, Morat PB, Khalid BA (2000) Differential regulation of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in testis and liver. *Steroids* **65**: 40-45.
- Parvinen M, Ritzen EM, Hansson F, Ruokonen A (1981) Testosterone and follicle stimulating hormone have different preferential sites of action during the spermatogenic cycle in the rat. In: Byskov AG and Peters H eds. *Development and function of reproductive organs*. Excerpta Medica, International Congress Series 559, Copenhagen, pp. 199-205.
- Passia D and Haider SG (1980) Die Bedeutung der Gewebepreparation (Gefriertrocknung und Fixation) zur Darstellung der Enzyme. *Der Präparator* **26**: 299-306.

- Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, Seckl JR, Mullins JJ. (2004) Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101(18)**: 7088-93
- Phillips DM, Lakshmi V, Monder C (1989) Corticosteroid 11 $\beta$ - dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology* **125**: 209-216.
- Raap AK and Duijn van P (1983) Studies on the phenazine methosulphate tetrazolium salt capture reaction in NAD(P)-dependent dehydrogenase cytochemistry. II. A novel hypothesis for the mode of action of PMS and the study of the properties of reduced PMS. *Histochem J* **15**: 881-891
- Rusvai E and Naray-Fejes-Toth A (1993) A new isoform of 11 $\beta$ - hydroxysteroid dehydrogenase in aldosterone target cells. *J Biol Chem* **268**: 10717-10720.
- Schäfers BA, Schlutius BG, Haider SG (2001) Ontogenesis of oxidative reaction of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells, a histochemical study. *Histochem J* **33**: 585-595
- Schlutius B. (2004) Histochemische Untersuchung zur Ontogenese des Enzyms 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in den Leydigzellen der Ratte. *Dissertation*, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Schor NA, Rice BF, Huseby RA (1976) Dehydrogenation of reduced pyridine nucleotides by Leydig cell tumors of the rat testis. *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine* **151**: 418-421
- Seckl JR and Walker BR (2001) Minireview: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* **142**: 1371-1376.

- Shan LX, Phillips DM, Bardin CW, Hardy MP (1993) Differential regulation of steroidogenic enzymes during differentiation optimizes testosterone production by adult rat Leydig cells. *Endocrinology* **133**: 2277-2283.
- Shyadehi AZ, Lamb DC, Kelly SL, Kelly DE, Schunk W-H, Wright JN, Corina D, Akhtar M (1996) The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 $\alpha$ -demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase, P-45014DM and CYP51). *J Biol Chem* **271**: 12445-12450.
- Soucy P and Luu-The V (2000) Conversion of pregnenolone to DHEA by human 17 $\alpha$ -hydroxylase/ 17,20-lyase (P450c17). Evidence that DHEA is produced from released intermediate, 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone. *Eur J Biochem* **267**: 3243-3247.
- Straatsburg IH, Graaf de F, Noorden van CJF, Raamsdonk van W (1989) Enzyme reaction rate studies in electromotor neurons of the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *Histochem J* **21**: 609-617
- Strobel HW, Dignam JD, Gum JR (1980) NADPH cytochrom P450 reductase and its role in the mixed function oxidase reaction. *Pharmac Ther* **8**: 525-537.
- Tiosano D, Eisenstein I, Militianu D, Chrousos GP, Hochberg Z (2003) 11 $\beta$ -HSD activity in hypothalamic obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 379-384
- Trzaskos J, Kawara S and Gaylor JL (1986) Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* **261**: 14651-14657
- Vreeburg J.T., Ooms M.P., Rommerts F.F., Teerds K.J. (1988) Functional properties of developing rat Leydig cells after treatment with ethylene dimethanesulphonate (EDS). *J Reprod Fertil* **84(1)**: 63-9.
- Wang G.M., Ge R.S., Latif S.A., Morris D.J. and Hardy M.P. (2002) Expression of 11 $\beta$ -Hydroxylase in Rat Leydig Cells. *Endocrinology* **143(2)**: 621-626.

- Yanagibashi K and Hall PF (1986) Role of electron transport in the regulation of the lyase activity of C21 side-chain cleavage P-450 from porcine adrenal and testicular microsomes. *J Biol Chem* **261**: 8429-8433.
- Yang K and Yu M (1994) Evidence for distinct isoforms of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the ovine liver and kidney. *J Steroid Biochem Mol Biol* **49**: 245-250.
- Zappa F, Ward T, Butler J, Pedrinis E, McGown A (2001) Overexpression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 human reproductive system. *J Histochem Cytochem* **49**: 1187-1188.
- Ziegler HG, Haider SG, Passia D and Hilscher W (1983) Enzymohistochemical and morphometrical studies on  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase during the fetal and neonatal development of rat Leydig cells. *Andrologia* **15**: 392-397.

## **6. Zusammenfassung**

Name der Doktorandin: Barbara Schäfers

Titel : Histochemische Untersuchung zur Ontogenese des Enzyms

11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in den Leydigzellen der Ratte

Die vorliegende histochemische Studie beschreibt erstmals die ontogenetischen Veränderungen in der Verteilung und Intensität von 11 $\beta$ -HSD in Leydigzellen der Ratte vom ersten bis zum 90. Postnataltag (pnd). Für jede der folgenden Altersstufen standen vier Wistar-Ratten zur Verfügung, aus deren Hoden 7  $\mu$ m dicke Kryostatschnitte hergestellt wurden: 1., 5., 10., 13., 16., 19., 22., 25., 28., 31., 34., 37., 40., 45., 50., 90. pnd. Zur enzymhistochemischen Darstellung des Enzyms 11 $\beta$ -HSD diente Corticosteron als Substrat und NAD bzw. NADP als Coenzym. Es wurde die oxidative Aktivität des Enzyms untersucht, welche die Oxidation von Corticosteron zu dem inaktiven Metaboliten 11- Dehydrocorticosteron katalysiert. Die Messung der Reaktionsintensität erfolgte an einem Mikrospektralphotometer MSPU 80 (Zeiss). Ergänzend zu 11 $\beta$ -HSD wurden in der gleichen Entwicklungsperiode die NADPH-Cytochrom-P450 Reduktase, NADH-/ NADPH-Diaphorase und die unspezifischen Esterasen histochemisch dargestellt. Ebenfalls erfolgte ein Lipidnachweis in den Leydigzellen mit Sudanschwarz B. Anschließend wurden die hier erzielten Ergebnisse der 11 $\beta$ -HSD Reaktion mit den Befunden einer Studie über das Enzym 17 $\beta$ -HSD verglichen.

Die 11 $\beta$ -HSD Reaktion war erst ab dem 31. pnd nachweisbar und nahm bis zum Erreichen der Geschlechtsreife zu. Im ontogenetischen Verlauf wurden zwei signifikante Höhepunkte ( $p < 0,05$ ) der Reaktionsintensität beobachtet: Am pnd 40 und 90 mit NAD als Coenzym und am pnd 45/90 wenn NADP verwendet wurde. Dies steht in zeitlichem Zusammenhang mit wichtigen Ereignissen der Spermatogenese und korreliert mit den Befunden anderer Autoren, dass es im Hoden erst ab dem 40. pnd zu einem Anstieg der Testosteronproduktion kommt. Indirekt kann hier die Hypothese unterstützt werden, dass 11 $\beta$ -HSD im Hoden eine protektive Rolle für die Testosteronproduktion übernimmt. Es wird davon ausgegangen, dass die Funktion von 11 $\beta$ -HSD im Schutz des Hodens vor einer Glukocortikoid- induzierten Hemmung der Testosteronsynthese und -sekretion liegt. Es zeigten sich weitgehend ähnliche Verteilungsmuster, wenn NAD oder NADP als Coenzym verwendet wurden, sowie für die beiden untersuchten Substratmolaritäten (2,5 mM und 5 mM), wobei mit 2,5 mM Substrat etwas distinguiertere Ergebnisse erzielt werden konnten.

Im Zytoplasma der Leydigzellen war die Verteilung der Enzymreaktion von 11 $\beta$ -HSD, NADPH-Cytochrom-P450 Reduktase und der NADH-/ NADPH-Diaphorase sowie auch die Anzahl und Größe der Lipidtropfen innerhalb eines Hodenquerschnittes nicht homogen, was möglicherweise auf unterschiedliche Reifungs-/ oder Funktionszustände der Leydigzellen hinweist und eine parakrine oder autokrine Regulation dieser Zellen vermuten lässt. Beim Vergleich der 11 $\beta$ -HSD mit der 17 $\beta$ -HSD Enzymreaktion zeigten die beiden ontogenetischen Kurven einen inversen Verlauf. Die Kreuzungsstellen der Graphen fanden sich zwischen dem 37. und 40., 45. und 50., und am 90. pnd. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie verdeutlichen im Ganzen die engen Zusammenhänge zwischen den ontogenetischen Veränderungen der 11 $\beta$ -HSD Enzymaktivität und der Reifung und Entwicklung der Leydigzellen, sowie der verschiedenen Stadien der Spermatogenese.

Desweiteren deuten die vorliegenden Befunde und der Vergleich mit den Studien anderer Autoren darauf hin, dass möglicherweise neben 11 $\beta$ -HSD Typ 1 und 2 noch eine dritte Isoform von 11 $\beta$ -HSD existiert.

## **7. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. S. G. Haider danke ich für die freundliche Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und die überaus hervorragende Betreuung.

Frau Britta Schlutius danke ich für die gute und fruchtbare Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch Frau G. Servos für ihre Hilfe bei der fotografischen Dokumentation sowie Frau G. Berthold und Herrn R. Fassbender für ihre technische Unterstützung.

Mein herzlicher persönlicher Dank gilt meinen Eltern Heidemarie und Gerhard Schäfers, meinem Bruder Marc Schäfers, meiner Freundin Tina Kreutzer, und Mirko Siebler für ihre geduldige und liebevolle Begleitung.

## **8. Curriculum vitae**

### **Angaben zur Person**

**Name:** Barbara Anne Schäfers  
**Geburtsdatum:** 19.10.1976  
**Geburtsort:** Böblingen



### **Schulbildung**

1983 – 1987 Eduard- Dietrich Grundschule, Ratingen- Lintorf  
1987 – 1990 Städtische Gesamtschule Ratingen West  
1990 – 1996 Else – Lasker – Schüler Gesamtschule Wuppertal  
1996 : Abitur

### **Berufsausbildung**

April 1997 bis Dezember 2004	Studium der Humanmedizin, Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf
Frühjahr 1999	Physikum
Frühjahr 2001	1. Staatsexamen
Frühjahr 2003	2. Staatsexamen
April 2003 – März 2004	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Düsseldorf (Gynäkologie und Geburtshilfe) sowie am Hospital Central, Mendoza, Argentinien (Innere Medizin und Chirurgie)
Dezember 2004	3. Staatsexamen
Mai 2005	Assistenzärztin, Abteilung für Neurochirurgie, Bethesda Krankenhaus Wuppertal

### **Auslandsaufenthalte**

1993/94 Eaton Rapids Highschool, Michigan, USA  
2000 Gil Hospital Inchon, Süd Korea (Famulatur; Gynäkologie, Kinderkardiologie)  
2003/04 Hospital Central, Mendoza, Argentinien (Praktisches Jahr)

### **Sprachen**

Deutsch  
Englisch  
Spanisch  
Französisch