

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

**Ultrastruktur der Zellkontakte
der Fetaltyp- und Adulttyp-Leydig-Zellen in der Ratte:
Eine systematische Untersuchung von der Geburt bis zum Senium**

Dissertation

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

vorgelegt von

Hien Nicole Tran

2007

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Prof. Dr. Syed G. Haider

Korreferent: Prof. Dr. Werner Hilscher

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALC	Adulttyp-Leydig-Zelle
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
EDS	Ethylendimethansulfonat
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
FLC	Fetaltyp-Leydig-Zelle
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
IL-1	Interleukin-1
irVEGF	immunoreactive Vascular Endothelial Growth Factor
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	Leukemia inhibitory factor
mRNA	Matrizen-Ribonukleinsäure
OsO ₄	Osmiumsäure
P Mod-S	Faktor der peritubulären Zelle, der die Funktion der Sertoli-Zellen modifiziert
pnd	Postnataltag
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1 – 3
2. Material und Methodik	4 – 6
3. Ergebnisse	7 – 34
Zellkontakte am 1. und 5. Postnataltag	8 – 14
Zellkontakte am 10., 15. und 25. Postnataltag	15 – 17
Zellkontakte am 30. und 50. Postnataltag	18 – 25
Zellkontakte am 100. Postnataltag	26 – 29
Zellkontakte im Senium	30 – 34
4. Diskussion	35 – 46
Abschließende Bemerkungen und Ausblick	45 – 46
5. Literatur	47 - 54
6. Zusammenfassung	55
7. Danksagung	56
8. Lebenslauf	57

1. Einleitung

Im Jahre 1850 entdeckte Franz von Leydig die nach ihm benannten Zwischenzellen im interstitiellen Hodengewebe. Im Rattenhoden sind zwei morphologisch und funktionell unterschiedliche Populationen erkennbar: Fetaltyp-Leydig-Zellen (FLCs) und Adulttyp-Leydig-Zellen (ALCs) (Kuopio et al. 1989b, Haider et al. 1997, Handagama und Ariyaratne 2001, Ge et al. 2006). FLCs können ultrastrukturell und immunhistochemisch (3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase positiv) erstmalig am 16. Fetaltag identifiziert werden (Ziegler et al. 1983, Huhtaniemi und Pelliniemi 1992, Haider et al. 1997, Majdic et al. 1998). Lichtmikroskopisch sind sie eindeutig bis zum 25. Postnataltag nachweisbar (Haider 2004). Ihr weiteres Schicksal wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die postnatale Differenzierung der ALCs in Rattenhoden erfolgt in drei Stadien (Tab. 1) nach Hardy et al. (1989) und Haider (2004), die jeweils unterschiedliche Androgen-Endprodukte synthetisieren.

Postnataltag	Stadium	Androgen-Endprodukt
14. – 28.	Vorläufer-Stadium (progenitor stage)	Androsteron
28. – 56.	Unreifes Stadium (immature stage)	5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol (=Metabolit von Testosteron)
> 56.	Reifes Stadium (mature stage)	Testosteron

Tab. 1 Postnatale Differenzierung der adulten Leydig-Zellen nach Hardy et al. (1989) und Haider (2004). Weitere Quellen: Hardy et al. 1990, Shan und Hardy 1992, Shan et al. 1997.

Die wichtigste Funktion der Leydig-Zellen liegt in der Synthese von Androgenen für die Initiierung, Aufrechterhaltung und Regulation der Spermatogenese (Haider 2004): Das wichtigste testikuläre Androgen, Testosteron, synthetisieren die Leydig-Zellen nach Stimulation mit luteinisierendem Hormon (LH) aus der Hypophyse. Über die Blutbahn gelangt Testosteron zur Hypophyse und zum Hypothalamus, wo es eine negative Rückkopplung der Produktion von LH bzw. von Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) bewirkt. Unter dem Einfluss von Testosteron und dem Follikel-stimulierenden-Hormon (FSH) der Hypophyse erfolgt die Spermatogenese in den Tubuli seminiferi. Die Differenzierung, Entwicklung und Funktion der Leydig-Zellen wird beeinflusst von Endothelzellen,

Makrophagen, Fibroblasten/Fibrozyten und peritubulären Zellen im Interstitium (Skinner 1991, Hales 1996, Ergün et al. 1997, Handagama und Ariyaratne 2001, Anand et al. 2003, Haider 2004). Abb. 1 zeigt ein vereinfachtes Schema der Interaktionen der Leydig-Zellen mit anderen interstitiellen Zellen. Zwischen Leydig-Zellen und Endothelzellen liegt eine gegenseitige Stimulation vor: In Anwesenheit von Endothelzellen produzieren Leydig-Zellen mehr Testosteron als ohne (Setchell und Palombi 2004). Leydig-Zellen produzieren den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), welcher die Proliferation von Endothelzellen im Rattenhoden reguliert (Anand et al. 2003, Rudolfsson et al. 2004). Endothelzellen bilden eine Barriere für Testosteron zwischen der interstitiellen Flüssigkeit und der systemischen Blutzirkulation, sowie für LH zwischen der interstitiellen Flüssigkeit und der Oberfläche der Leydig-Zellen (Setchell et al. 2002, Setchell 2004). Auch Leydig-Zellen und Makrophagen beeinflussen sich gegenseitig: Ortsständige Makrophagen produzieren Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche die Differenzierung von ALCs steuern (Gaytan et al. 1994a,b,c, 1996). Aktivierte Makrophagen sezernieren pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1(IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), welche die Testosteron-Produktion der Leydig-Zellen hemmen (Hales 1996, 2002). Die Testosteron-Produktion der Leydig-Zellen und die 25-Hydroxycholesterol-Sekretion der Makrophagen sind ebenfalls voneinander abhängig (Lukyanenko et al. 2001, 2002; Chen et al. 2002). Außerdem reguliert Testosteron die Proliferation von Fibroblasten mit über Expression von Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2): Der Spiegel an FGF-2 Matrizen-Ribonukleinsäure (mRNA) sinkt in Abwesenheit von Testosteron und wird nach Testosterongabe wiederhergestellt (Yoshimura et al. 1994, Gonzalez-Herrera et al. 2006). Testosteron bewirkt die Zunahme des von peritubulären Zellen produzierten P Mod-S, welches die Sertoli-Zellen stimuliert, mehr Androgen-bindendes-Protein zu produzieren (Skinner und Fritz 1985, Risbridger und Skinner 1992). Dadurch wird eine normale Progression von Keimzellen ermöglicht (Sharpe et al. 1990). Leukemia inhibitory factor (LIF) aus der Familie von Interleukin-6 wird von peritubulären Zellen

produziert (Huleihel und Lunenfeld 2004) und hemmt über parakrine Mechanismen die Testosteron-Produktion der Leydig-Zellen (Mauduit et al. 2001).

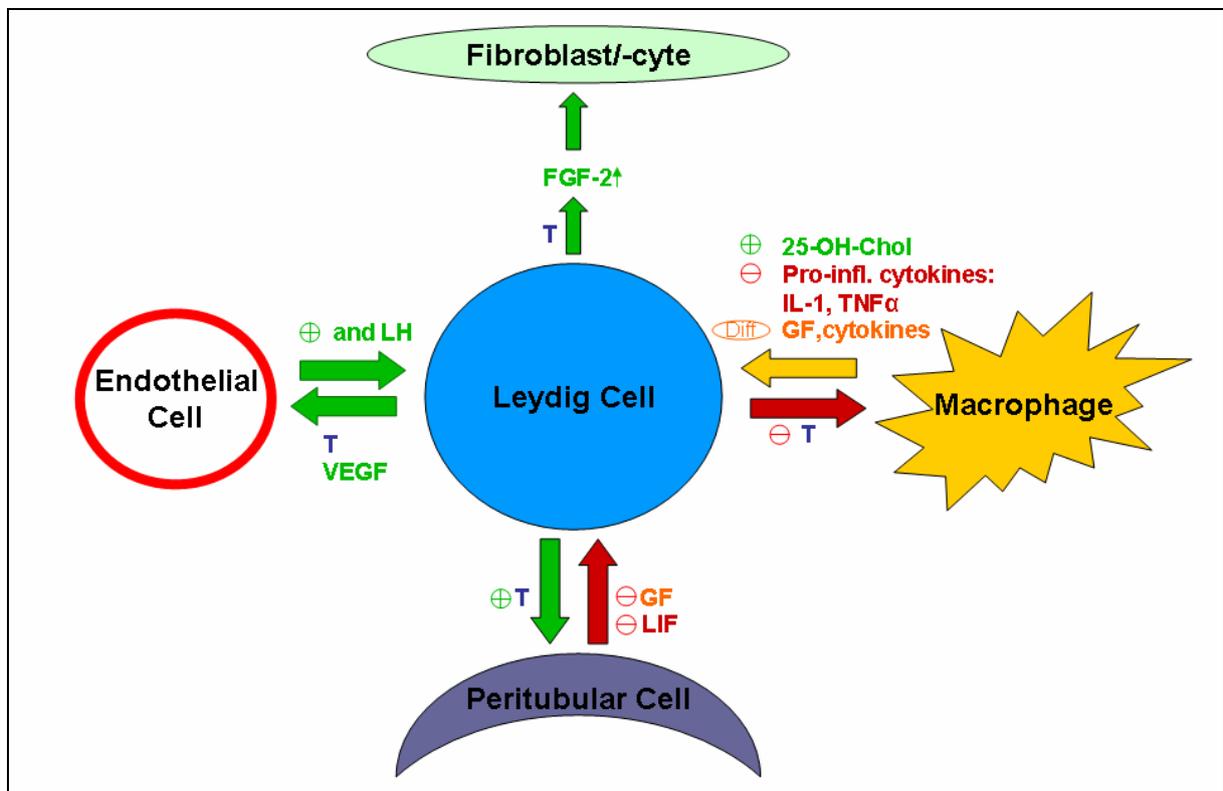


Abb. 1 Schema über die Interaktionen der Leydig-Zelle mit anderen interstitiellen Zellen.
FGF-2, Fibroblast-Growth-Factor-2. *GF*, Growth Factors. *IL-1*, Interleukin-1. *LIF*, Leukemia Inhibiting Factor. *25-OH-Chol*, 25-Hydroxy-Cholesterol. *Pro-infl.*, Pro-inflammatorisch.
T, Testosteron. *TNF α* , Tumor-Nekrose-Faktor α . *VEGF*, Vascular Endothelial Growth Factor.
 +, Stimulation. -, Hemmung. Diff, Differenzierung.

Voraussetzung für die oben beschriebenen engen funktionellen Interaktionen zwischen Leydig-Zellen mit den benachbarten interstitiellen Zellen, sowie zwischen den Leydig-Zellen untereinander, ist eine präzise regulierte Kommunikation zwischen den beteiligten Zellen. Eine mögliche Form der interzellularen Kommunikation stellen Zellkontakte dar. Bisher liegen nur wenige Untersuchungen über Zellkontakte, z.B. gap junctions zwischen Leydig-Zellen (Wrobel et al. 1981, Russel 1996), und Oberflächenmerkmale, z.B. coated pits (Ghinea et al. 1992, 1994; Ghinea und Milgrom 1995), von Leydig-Zellen vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die möglichen morphologischen Korrelate für die interzellulare Kommunikation in Rattenhoden systematisch von der Geburt bis zum Senium ultrastrukturell zu untersuchen.

2. Material und Methodik

2.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere, männliche Wistarratten, wurden aus dem Zentralen Tierlabor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen. Ihre Aufzucht erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einer spezifiziert pathogenfreien Zone bei Temperaturen von 22 ± 2 °C, 55 ± 5 % relativer Luftfeuchte sowie Beleuchtung von 6.00 bis 18.00 Uhr. Tränkwasser (ozonisiert, angesäuert mit Salzsäure (HCl) pH 2,6 bis 3,0) und Futter (Rattenfutter der Firma ssniff®) standen ad libitum zur Verfügung.

Untersucht wurden Tiere von der Geburt bis zur adulten Phase zu ausgewählten Terminen:

1. Postnataltag, 5. Postnataltag, 10. Postnataltag, 15. Postnataltag, 20. Postnataltag, 30. Postnataltag, 50. Postnataltag, 100. Postnataltag, nach Abschluss des 2. Lebensjahres.

Zur Darstellung der Fetaltyp-Leydig-Zellen, deren gesamte Anzahl und Gesamtvolumen besonders zwischen dem 3. und dem 11. Postnataltag zunimmt (Kuopio 1989b), wurden die ersten drei Termine gewählt. Die Auswahl der weiteren Termine erfolgte unter der Berücksichtigung der Unterteilung der postnatalen Differenzierung der adulten Leydig-Zellen nach Hardy et al. (1989) und Haider (2004) in 3 Stadien: 15. und 20. Postnataltag für das Vorläufer-Stadium (progenitor stage: 14.-28. Postnataltag), 30. und 50. Postnataltag für das unreife Stadium (immature stage: 28.-56. Postnataltag), 100. Postnataltag und 2 Jahre alt für das reife Stadium (mature stage:> 56. Postnataltag).

2.2 Betäubung

Betäubungsmittel: Diethylether

Applikationsart: Etherkammer

In einer Etherkammer wurden die Ratten jeweils in eine tiefe Narkose versetzt. Sobald die Atmung der Ratte sistierte und sie nicht mehr auf äußere Reize reagierte, wurde sie aus der Etherkammer entnommen. Der Exitus letalis wurde durch Dekapitation herbeigeführt.

2.3 Präparation

Die Versuchstiere wurden in Rückenlage fixiert. Zunächst wurde eine Inzision des Fells und der Haut median von der Symphyse bis zum Xyphoid vorgenommen. Die Haut wurde von der muskulären Rumpfwand nach lateral gelöst. Anschließend wurde die Bauchdecke eröffnet und die linken Hoden herauspräpariert. Die Präparation fand stets zwischen 10.00 Uhr und 12.00 Uhr statt.

2.4 Fixierung

Unmittelbar nach der Entnahme der Hoden wurden sie in einer frisch angesetzten modifizierten Karnovsky-Lösung fixiert:

4% Paraformaldehyd

5 % Glutaraldehyd in 0,1M Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,4)

4mM Calciumchlorid (CaCl₂)/ 100 ml Lösung wurden zugesetzt

Nach 4 Stunden wurde die Lösung gewechselt. Die Proben verblieben für 12 Stunden bei 4°C in der Fixierung. Danach wurden sie mit 0,05 M Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,4) in 3 Durchgängen zu je 20 Minuten gespült. Sie wurden zunächst in runde ca. 3 mm dicke Scheiben geschnitten und dann in schmale Stücke (im Winkel von ca. 35-45 °) zerteilt.

Anschließend erfolgte die Überführung der Proben in eine 2%iger Osmiumsäure (OsO₄) in 0.1 M Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,4) für 3 Stunden bei 4°C auf einem Rotator.

Nach der Fixierung wurden die Proben entwässert:

10 min in 70% Ethanol bei Raumtemperatur

1 h in 70 % Ethanol + 1% Phosphorwolframsäure bei Raumtemperatur

1 h in 80% Ethanol + 0,5% Uranylacetat bei Raumtemperatur

1 h in 90% Ethanol bei Raumtemperatur

1 h in 100% Ethanol bei Raumtemperatur

12 h in 100% Isopropanol bei 4°C

Die Zugabe der Phosphorwolframsäure und der Uranylacetats bei der Entwässerung erfolgte zur Steigerung des Kontrastes des Gewebes und damit zur besseren Darstellung der Zellkontakte.

Die Entwässerung wurde durch 3 Spülungen à 20 Minuten mit Toluol abgeschlossen.

2.5 Einbettung

Die Proben wurden in Epon 812 (3 x 1 Stunde bei 40°C) in Beem-Kapseln eingebettet, für 12 Stunden bei Raumtemperatur abgedeckt und für 72 Stunden bei 60°C polymerisiert. Nach der Polymerisation wurden sie für 12 Stunden bei Raumtemperatur ausgekühlt. Nun konnten die Beem-Kapseln entfernt und die Proben getrimmt werden.

Ultradünnschnitte wurden von ausgewählten Bereichen (Auswahl-Kriterien: vollständiges und gut erhaltenes Gewebe, repräsentative Interstitien mit Leydig Zellen und deren Umgebung) mittels eines Reichert-Jung Ultramikrotoms angefertigt. Die Kontrastierung erfolgte mit gesättigter Uranylacetat- und Bleicitrat-Lösung. Die Ultradünnschnitte wurden mit dem Elektronenmikroskop (HITACHI H-600) betrachtet und mit der integrierten Kamera (GATAN Bio Scan 792) fotografiert.

3. Ergebnisse ¹

Die fetale und adulten Leydig-Zellen wurden anhand charakteristischer ultrastruktureller Merkmale von steroidbildenden Zellen wie Lipidtropfen, glattes endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat sowie tubulovesikuläre Mitochondrien identifiziert. Tab. 2 stellt nach Haider (2004) die elektronenmikroskopischen Merkmale von FLCs und ALCs gegenüber:

Merkmal	In FLC	In ALC	In FLC und ALC
Zellkern	Rund	Elliptisch oder rund	Dichtes Euchromatin, zahlreiche Kernporen
Glattes endoplasmatisches Retikulum			Reichlich
Mitochondrien			Tubulovesikulär
Golgi-Apparat	Klein bis mäßig groß	Groß und gut differenziert	
Lipidtropfen	Zahlreich; Durchmesser: 0,9µm	Wenige; Durchmesser: 0,5µm	
Anordnung	In Clustern	Nicht ausschließlich in Clustern	

Tab.2: Elektronenmikroskopische Merkmale von Fetaltyp- und Adulttyp-Leydig-Zellen reproduziert aus Haider (2004). Fetaltyp-Leydig-Zelle (*FLC*). Adulttyp-Leydig-Zelle (*ALC*).

Die Definition der Unterstufen der ALCs wurde von Hardy et al. (1989) und Haider (2004) übernommen: Vorläufer von ALCs (14.-28. Postnaltag), unreife ALCs (28.-56. Postnaltag) und reife ALCs (ab 56. Postnaltag).

¹ Die hier vorgelegten Befunde wurden in der folgenden Veröffentlichung publiziert: Tran N, Servos G, Haider SG (2006) Ultrastructure of cell contacts of fetal and adult Leydig cells in the rat: a systematic study from birth to senium. *Anat Embryol* 211: 273-82.

3.1 Zellkontakte am 1. und 5. Postnataltag

Am 1. Postnataltag zeigten sich bei der Untersuchung der FLCs folgende Befunde: Zellkontakte lagen in Form von gap junctions, Zellkontakte mit Fibroblasten, Nachbarschaft zu Blutkapillaren sowie Interzellularbrücken vor.

Die FLCs am 1. und 5. postnatalen Tag waren nahezu ausschließlich in Clustern angeordnet. Bisweilen konnten gap junctions zwischen zwei FLCs eines Clusters beobachtet werden (Abb. 2a). Häufig wurden die Cluster von Fibroblasten und deren Ausläufern umgeben. Fibroblasten bildeten mit FLCs Zellkontakte aus, wobei die Zellmembran des Fibroblasten die Zellmembran der Leydig-Zelle berührte (Abb. 2b).

Die FLC-Cluster befanden sich regelmäßig in der Umgebung von Blutgefäßen. Eine kranzartige Anordnung der Leydig-Zellen um eine fenestrierte Blutkapillare konnte beobachtet werden (Abb. 3a). Abstände von ca. 60 nm wurden zwischen der Basalmembran einer Endothelzelle und der einer FLC gemessen (Abb. 3b).

Am 1. Postnataltag wurden zwischen FLCs innerhalb eines Clusters gelegentlich Interzellularbrücken beobachtet (Abb. 4a). Das Zytoplasma dieser Interzellularbrücken zwischen zwei FLCs war kontinuierlich und wurde von einer Basalmembran umhüllt (Abb. 4b). In dem Interzellularraum befanden sich zahlreiche Kollagenfaserbündel.

Auch am 5. Postnataltag konnten Interzellularbrücken gefunden werden: Zwischen zwei mehr als 2µm entfernten FLCs lag kontinuierliches Zytoplasma, das Zellorganellen wie glattes endoplasmatisches Retikulum und tubulovesikuläre Mitochondrien enthielt, vor (Abb. 5a und b). Auch hier fanden sich Kollagenfasern im Interzellularraum.

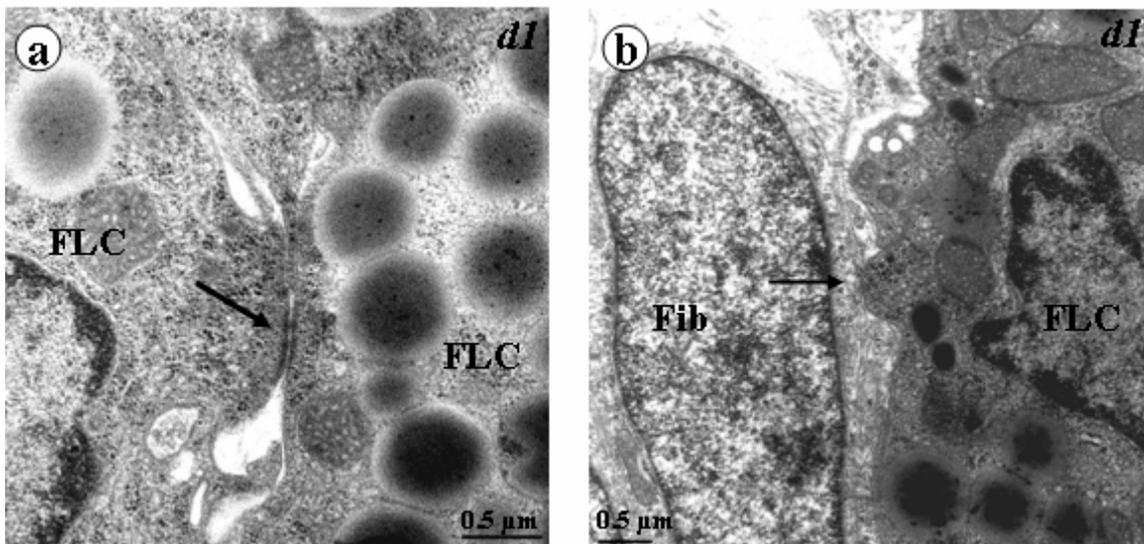


Abb. 2: Fetaltyp-Leydig-Zellen am 1. Postnataltag (d1).

Vergrößerung *siehe Maßstab*.

- a) Hohe Vergrößerung von zwei Fetaltyp-Leydig-Zellen (FLC), deren aneinandergrenzende Zellmembranen eine gap junction (*Pfeil*) aufweisen.
- b) Hohe Vergrößerung von einem Fibroblasten (*Fib*) und einer Fetaltyp-Leydig-Zelle (FLC). Die Zellmembranen der beiden Zellen berühren sich (*Pfeil*).

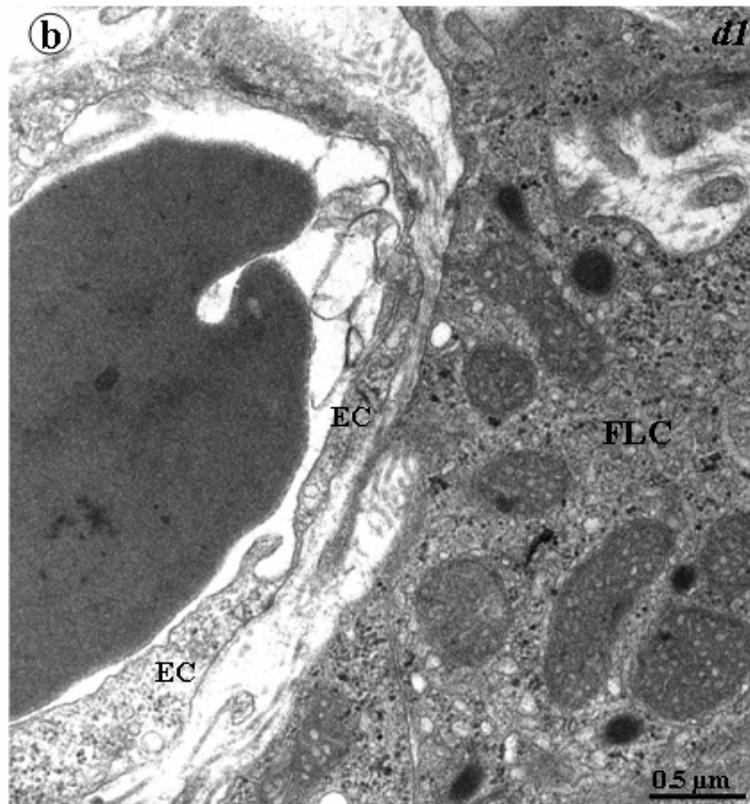
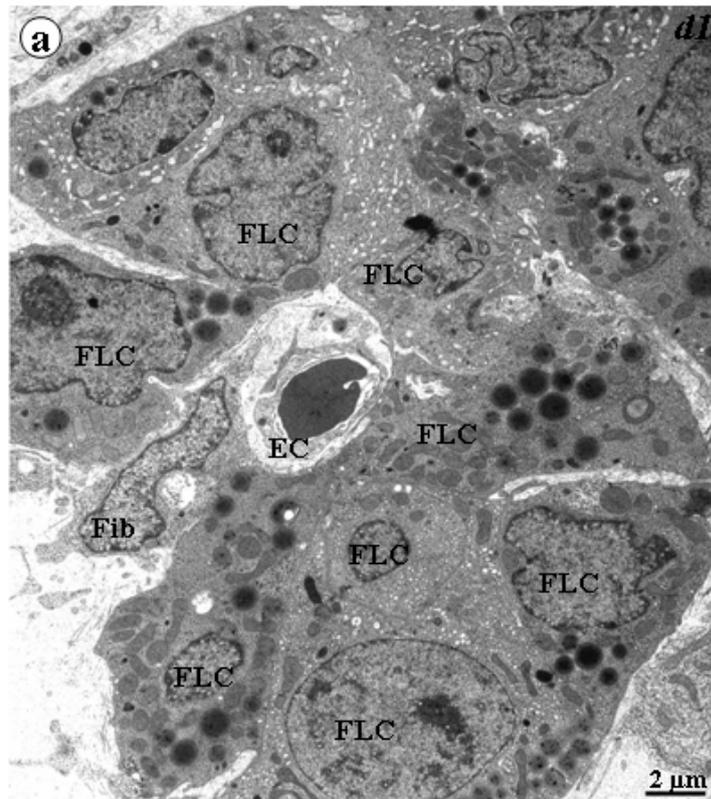


Abb. 3: Fetaltyp Leydig-Zellen am 1. Postnatahtag (d1).

Vergrößerung siehe Maßstab.

- a) Übersicht über einen Fetaltyp-Leydig-Zell-Cluster, der eine Blutkapillare umgibt. Fetaltyp-Leydig-Zelle (FLC). Fibroblast (Fib). Endothelzelle (EC).
- b) Ausschnitt aus a) zwischen der Leydig-Zelle und der fenestrierten Blutkapillaren. Der Abstand zwischen der Basalmembran der Fetaltyp-Leydig-Zelle (FLC) und der Endothelzelle (EC) beträgt ca. 60 nm.

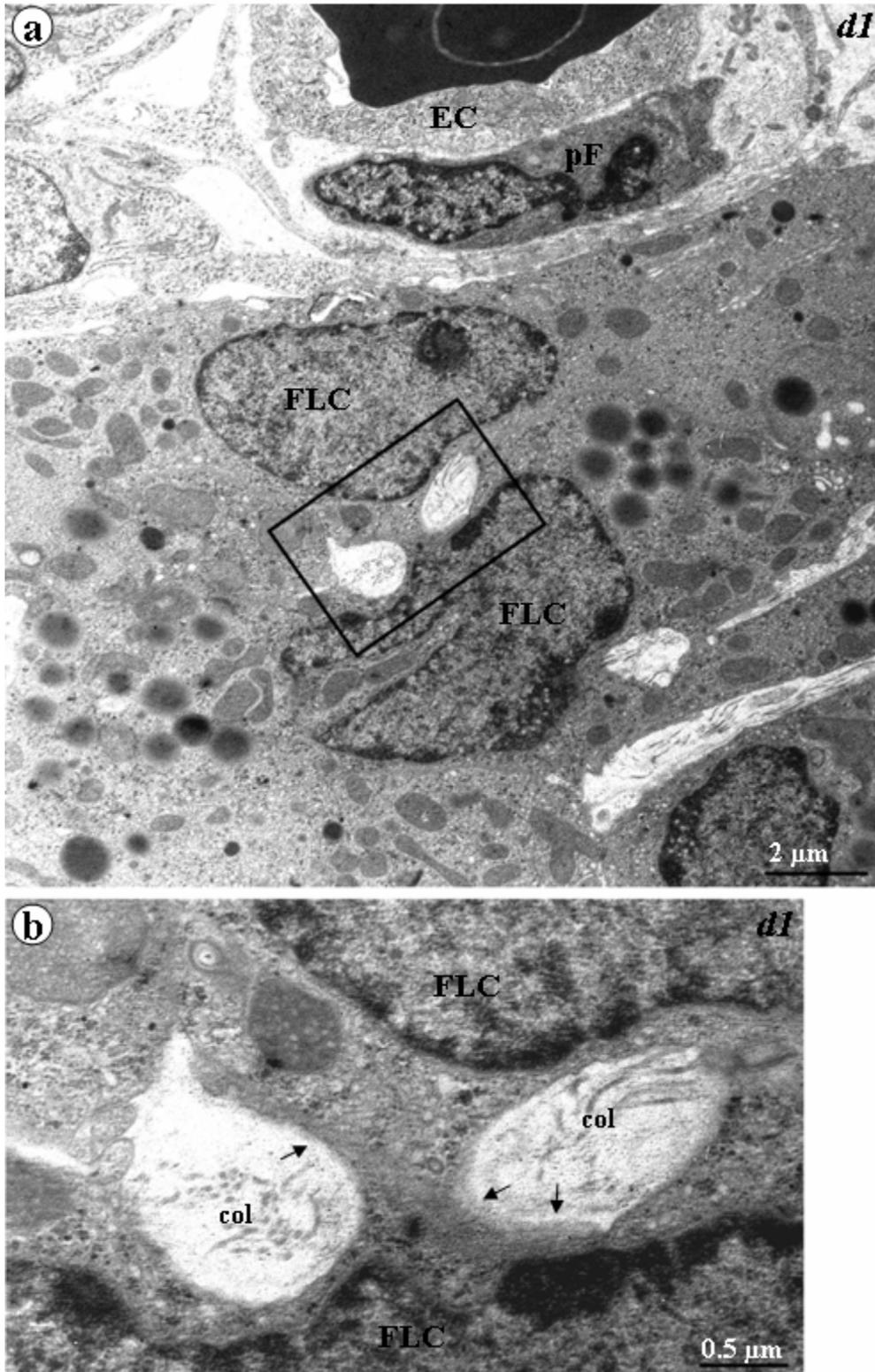


Abb. 4: Fetaltyp-Leydig-Zellen am 1. Postnataltag (d1).

Vergrößerung *siehe Maßstab*.

- a) Übersicht über einen Fetaltyp-Leydig-Zell-Cluster. Oberhalb des Clusters sieht man ein kleines Blutgefäß. Innerhalb des Clusters befindet sich zwischen zwei Fetaltyp-Leydig-Zellen (FLC) eine Interzellularbrücke (Kasten). Perivaskulärer Fibrozyt (pF). Endothelzelle (EC).
- b) Vergrößerung der in a) hervorgehobenen Interzellularbrücke. Das Zytoplasma zwischen den zwei Fetaltyp-Leydig-Zellen (FLC) ist kontinuierlich. Auf beiden Seiten der zytoplasmatischen Brücke ist die Basalmembran (Pfeile) sichtbar. Der Interzellularraum zwischen den beiden Leydig-Zellen ist mit Kollagenfasern (col) gefüllt.

Zusätzlich zu der Interzellularbrücke konnten in wenigen Fällen auch weitere Ausläufer zwischen zwei FLCs beobachtet werden (Abb. 6a). In dem mit Kollagen gefüllten Interzellularraum befanden sich außerdem aufeinander zulaufende Zellausläufer zweier FLCs (Abb. 6b). Die beschriebenen Interzellularbrücken wurden lediglich in der frühen postnatalen Periode beobachtet. Nicht alle FLCs in diesem Zeitraum wiesen Interzellularbrücken auf. FLC-Cluster mit locker angeordneten FLCs und vergrößertem Interzellularraum zeigten diese Interzellularbrücken, während die überwiegend vorkommenden dichten kompakten FLC-Cluster keine Interzellularbrücken aufwiesen. Die unterschiedlich geformten FLC-Cluster konnten gemeinsam in demselben Interstitium beobachtet werden.

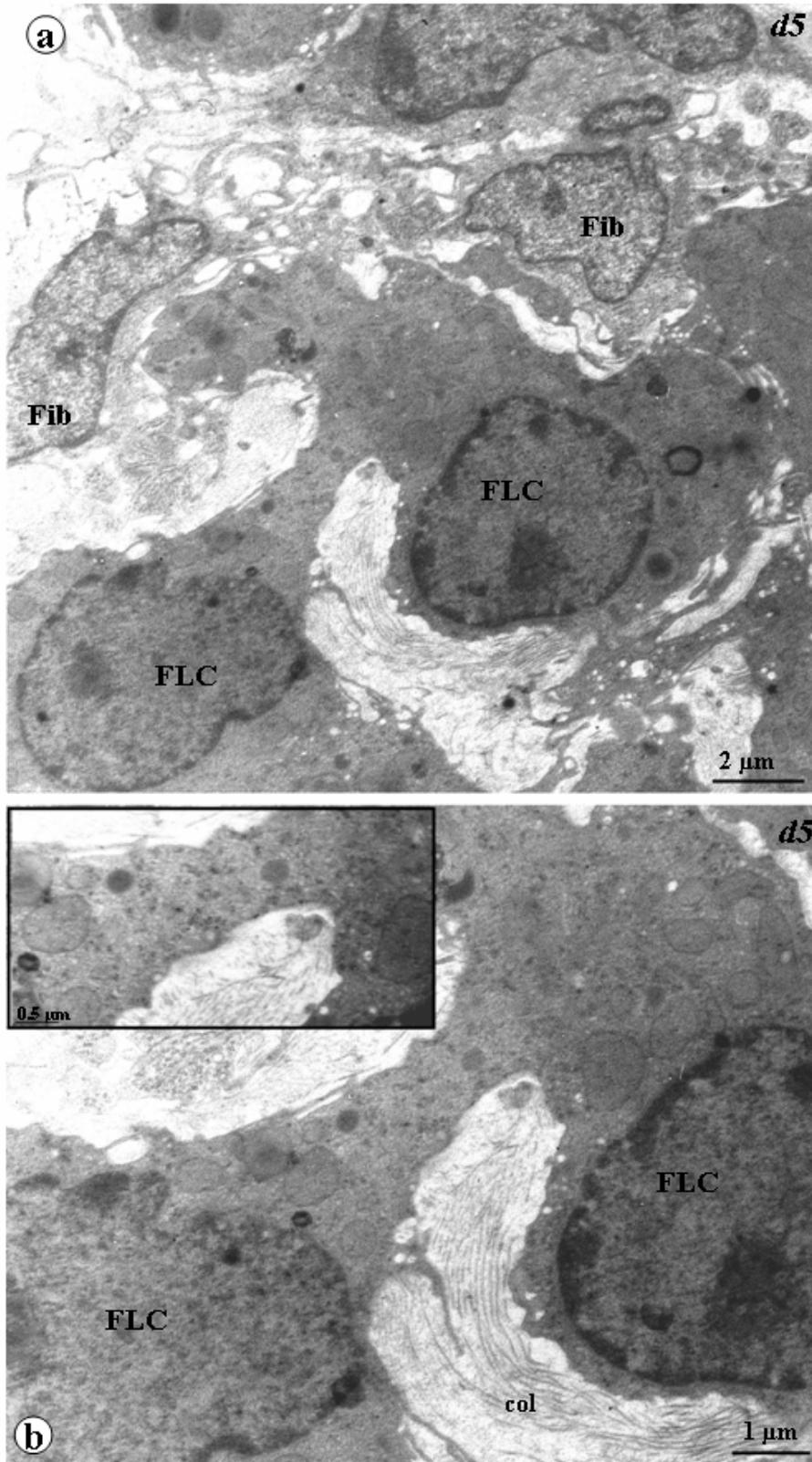


Abb. 5: Fetaltyp-Leydig-Zellen am 5. Postnataltag (d5).

Vergrößerung *siehe Maßstab*.

- a) Interzellularbrücke zwischen zwei Fetaltyp-Leydig-Zellen (FLC) eines Clusters. Fibroblasten (Fib) umgeben den Cluster in dem oberen Teil des Bildes.
- b) Vergrößerung der Interzellularbrücke zwischen den zwei Fetaltyp-Leydig-Zellen (FLC) aus a). Der Interzellularraum enthält zahlreiche Kollagenfasern (col). Oben links abgebildet ist ein vergrößerter Ausschnitt der Brücke, deren kontinuierliches Zytoplasma Zellorganellen wie glattes endoplasmatisches Retikulum und tubulovesikuläre Mitochondrien aufweist.

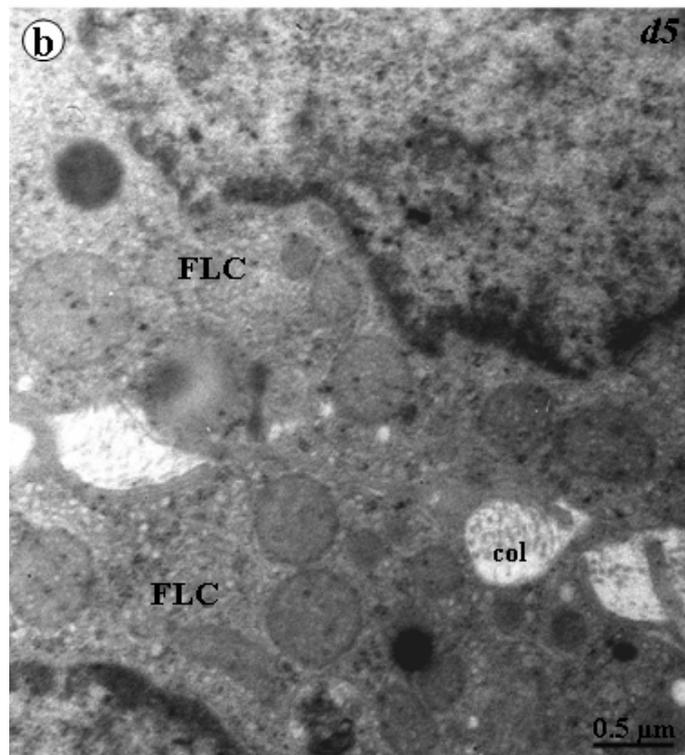
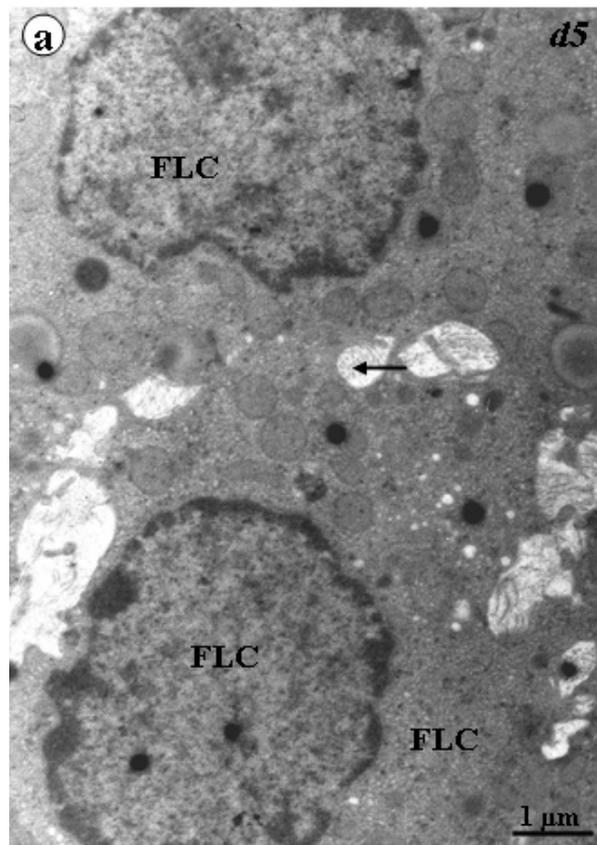


Abb. 6: Fetaltyp Leydig-Zellen am 5. Postnaltag (d5).

Vergrößerung siehe Maßstab.

- a) Zwischen zwei Fetaltyp-Leydig-Zellen (FLC) eines Clusters besteht eine Interzellularbrücke (Pfeil).
- b) Hohe Vergrößerung der Interzellularbrücke aus dem mittleren Bildbereich von a). Das Zytoplasma zwischen den beiden Fetaltyp-Leydig-Zellen ist kontinuierlich. Der Interzellularraum auf der rechten Seite der Brücke ist mit Kollagenfasern (col) gefüllt. Des Weiteren verfügen beide Leydig-Zellen über fingerartige Ausläufer.

3.2 Zellkontakte am 10., 15. und 25. Postnataltag

In dem interstitiellen Gewebe am 10. und 15. Postnataltag dominierten Zelluntergang und Zelltrümmer in den untersuchten Interstitien (Abb. 7). Die Zellmembranen waren aufgelöst und konnten nicht mehr eindeutig abgegrenzt werden. (Abb. 7a und b). Weite Kollagenfelder dehnten sich nicht nur in dem interstitiellen sondern auch in dem peritubulären Raum aus: Neben einigen Fibrozyten bestimmten zahlreiche quer oder längs angeschnittene Kollagenfelder das Bild (Abb. 7b). Reichlich Kollagen umgab die vereinzelt beobachteten Vorläufer von ALCs (Abb. 7c). Ab dem 15. Postnataltag konnte gelegentlich ein intaktes Interstitium mit Vorläufern von ALCs, einer zentralen Blutkapillare und Fibrozyten beobachtet werden (Abb. 7d). Bei den vereinzelt gefundenen FLC-Cluster und ALC-Vorläufer am 10. und 15. Postnataltag konnten keine besonderen Oberflächenmerkmale oder Zellkontakte beobachtet werden. Die untersuchten Interstitien in diesem Zeitraum zeigten sporadisch Makrophagen, Fibroblasten und –zyten, lymphatische Zellen und Gefäßzellen.

Am 20. und 25. Postnataltag wurde das Bild der Interstitien wieder von mehr Zellen gestaltet. Vorläuferzellen („progenitors“ oder „precursors“) von ALCs konnten beobachtet werden. Sie wiesen folgende Zellkontakte auf: gap junctions zwischen ALC-vorläufern und Kontakte von ALC-Vorläufer mit peritubulären Zellen. Zwei benachbarte ALC-vorläufer kamen oft nur in einer gap junction zusammen (Abb. 8a), d.h. ihre Zellmembranen liefen nahezu spitz aufeinander zu und näherten sich dann in der gap junction. Mit peritubulären Zellen bildeten ALC-Vorläufer ebenfalls Zellkontakte aus: An mehreren Stellen berührten sich die Oberfläche eines ALC-Vorläufers und die Zellmembran einer angrenzenden peritubulären Zelle (Abb. 8b). Wie zu den vorigen Terminen wurden gelegentlich Blutgefäße in der Nachbarschaft der ALC-Vorläufer beobachtet, wobei aufgrund der Entfernung keine Zellkontakte beobachtet werden konnten.

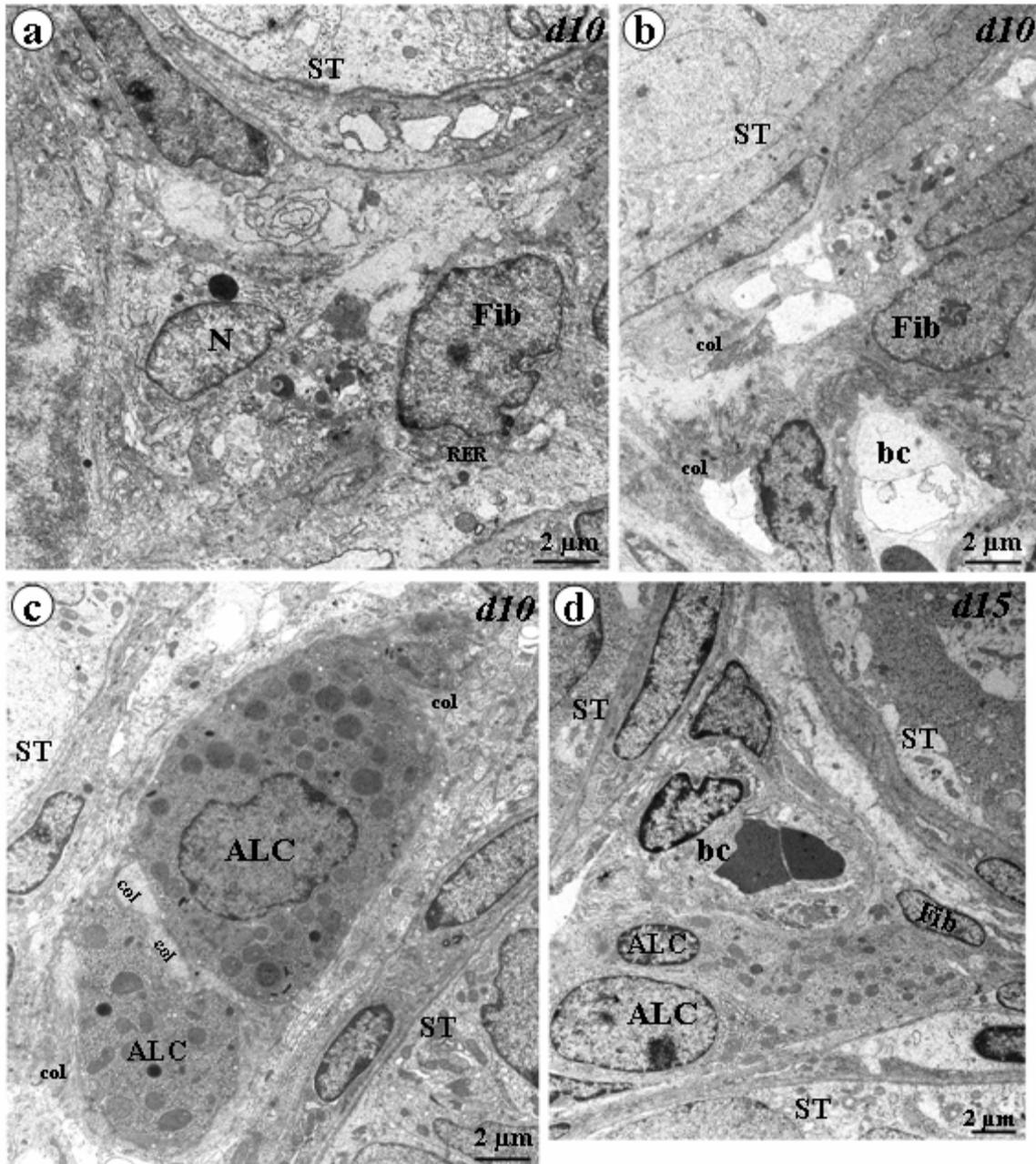


Abb. 7: Interstitien am 10. (d10) und 15. (d15) Postnataltag.

Vergrößerung siehe Maßstab.

- a) In der Mitte des Bildes sind zwei Zellen abgebildet. Die Zellmembran der linken Zelle ist aufgelöst. Die Zellorganellen liegen um den Zellkern (*N*) der untergehenden Zelle verstreut. Bei der Zelle auf der rechten Seite handelt es sich um einen Fibrozyten (*Fib*) mit rauem endoplasmatischem Retikulum (*RER*). Tubulus seminiferus (*ST*).
- b) Ausschnitt aus einem großen Interstitium mit großen Kollagenfeldern (*col*). Tubulus seminiferus (*ST*). Fibrozyt (*Fib*). Blutkapillare (*bc*).
- c) Im Zentrum des Bildes befindet sich eine Vorläuferzelle einer Adulttyp-Leydig-Zelle (*ALC*) zwischen zwei Tubuli seminiferi (*ST*). Unten links ist eine weitere Adulttyp-Leydig-Zelle (*ALC*) ohne angeschnittenen Zellkern abgebildet. Die Leydig-Zellen sind von reichlich Kollagen (*col*) umgeben.
- d) Dreieckiges von drei Tubuli seminiferi (*ST*) umrahmtes Interstitium mit einem kleinen zentralen Blutgefäß (*bc*). Unterhalb des Blutgefäßes sind zwei Vorläufer von Adulttyp-Leydig-Zellen (*ALC*) abgebildet. Fibrozyt (*Fib*).

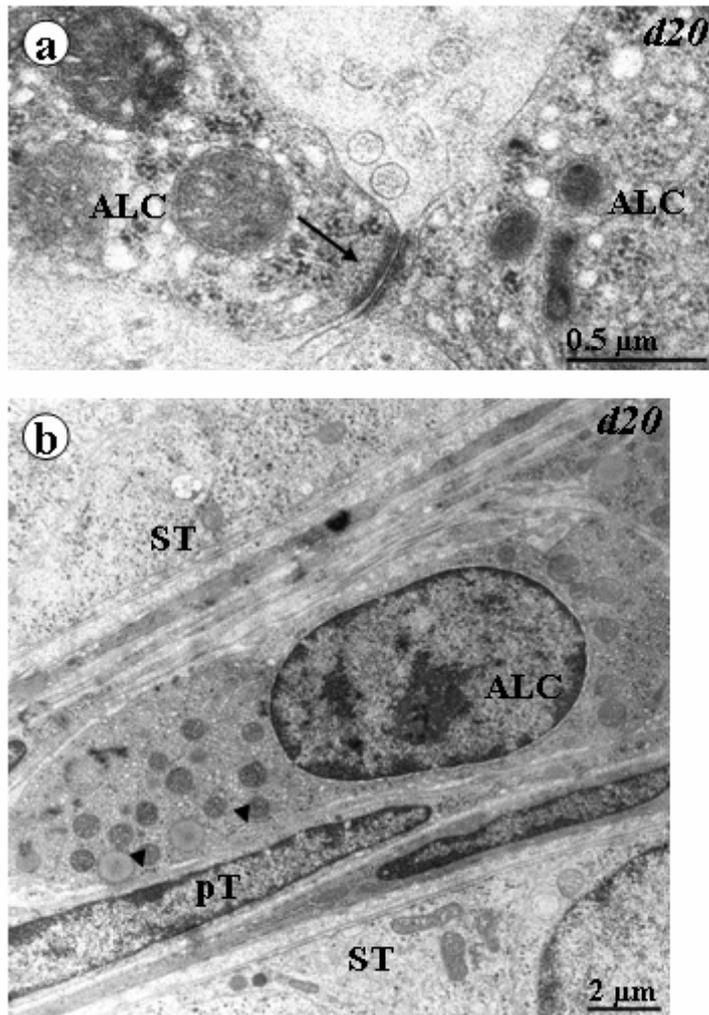


Abb. 8: Vorläufer von Adulttyp-Leydig-Zellen am 20. Postnataltag (d20).

Vergrößerung *siehe Maßstab*.

- a) Gap junction (*Pfeil*) zwischen zwei Vorläufern von Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC).
- b) Der Vorläufer einer Adulttyp-Leydig-Zelle (ALC) liegt zwischen zwei Tubuli seminiferi (ST). Die Unterseite der Leydig-Zelle berührt die peritubuläre Zelle (pT) an zwei Stellen (*Pfeilspitzen*).

3.3 Zellkontakte am 30. und 50. Postnataltag

Am 30. Postnataltag wiesen die unreifen („immature“) ALCs folgende Zellkontakte bzw. Oberflächenmerkmale auf: gap junctions und coated pits. Außerdem fand man die unreifen ALCs regelmäßig in der Umgebung von Blutgefäßen oder Blutkapillaren (Abb. 9a): Dabei konnten die unreifen ALCs häufig in der Nähe von perivaskulären Fibrozyten beobachtet werden. Ferner wiesen benachbarte unreife ALCs jetzt auch häufig gap junctions untereinander auf. Selten lagen aufeinander folgende gap junctions, zwischen denen sich eine kurze Strecke mit regulärem, nicht verdichtetem, Interzellularspalt befand, vor (Abb. 9b). Typischer war jedoch die folgende Beobachtung: Die Zellmembranen der benachbarten unreifen ALCs verliefen über eine lange Strecke beieinander. Schließlich bildeten sie eine gap junction mit dem charakteristischen Wechsel zwischen regulärem Interzellularspalt und den Verdichtungen mit stark verengtem Interzellularspalt (Abb. 9c). Oft befanden sich die unreifen ALCs am 30. Postnataltag in unmittelbarer Nähe voneinander, so dass die Zellmembranen weniger als 20 nm voneinander entfernt waren und kaum ein Extrazellularraum zwischen ihnen vorlag (Abb. 10a). Die Oberflächen der Zellmembranen der unreifen ALCs wiesen regelmäßig coated pits auf. Gelegentlich lagen sich die konkaven Öffnungen der coated pits zweier benachbarter unreifer ALCs nahezu unmittelbar gegenüber (Abb. 10a). Rein morphologisch war die Identifikation der coated pits nicht immer eindeutig möglich. Die untere unreife ALC in Abb. 10a verfügte mit großer Wahrscheinlichkeit über mindestens zwei weitere coated pits, welche nicht hervorgehoben wurden. Die beschrifteten elektronendichten Ω (=omega)-förmigen Figuren zeigten jedoch die typische Gestalt von coated pits.

Coated pits wurden nicht nur an der Oberfläche der Zellmembranen von Leydig-Zellen beobachtet sondern auch von Fibrozyten. Fibrozyten befanden sich wiederholt in der nächsten

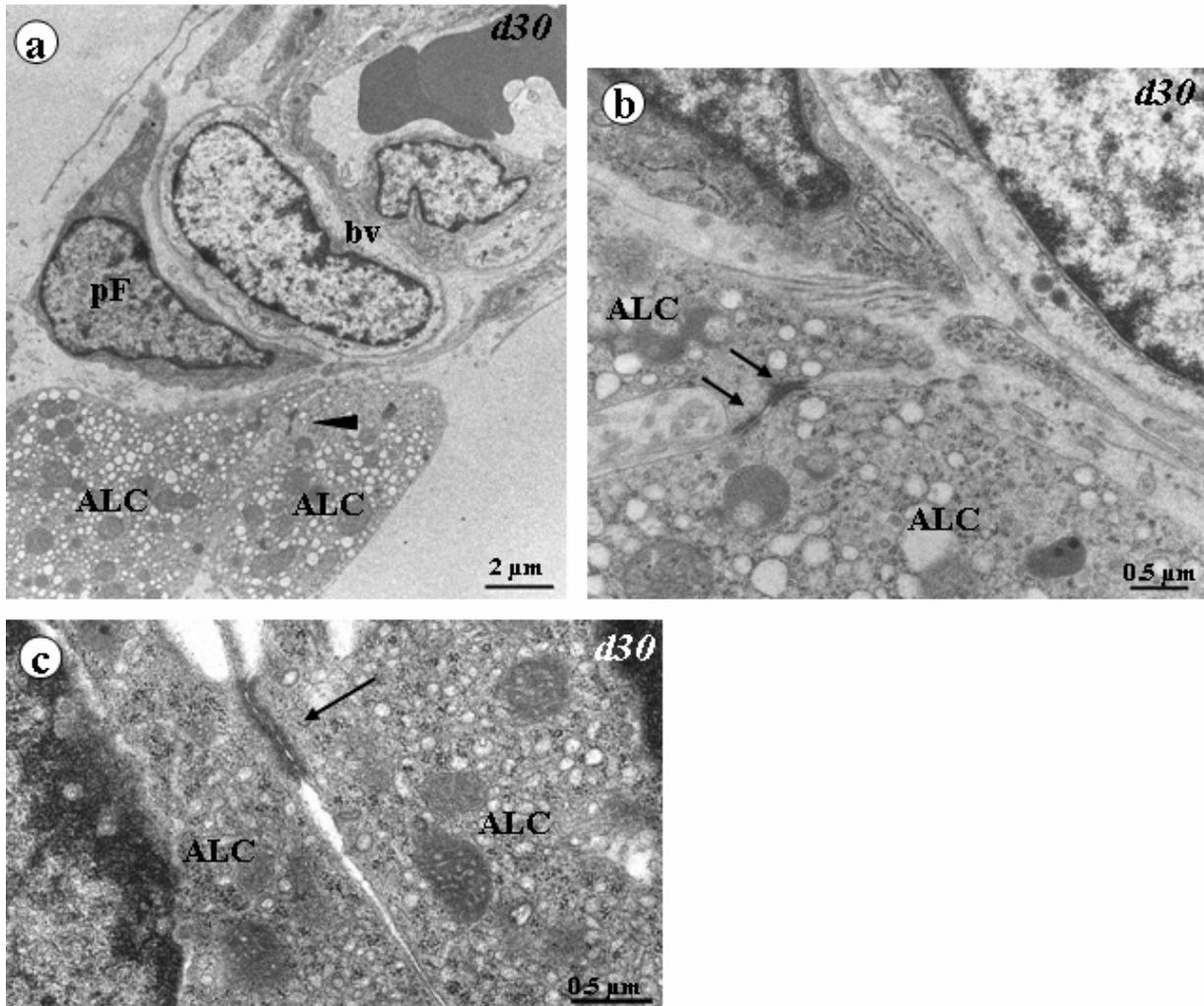


Abb. 9: Unreife Adulttyp-Leydig-Zellen am 30. Postnaltag (d30).

Vergrößerung *siehe Maßstab*.

- a) Übersicht über zwei unreife Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC), die sich unterhalb eines Blutgefäßes (bv) befinden. Zwischen den beiden Leydig-Zellen liegt ein Zellkontakt (Pfeilspitze) vor. Perivaskulärer Fibrozyt (pF).
- b) Vergrößerung des Zellkontaktes zwischen den beiden unreifen Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC) aus a): Es handelt sich um zwei aufeinander folgende gap junctions (Pfeile), zwischen denen sich eine kurze Strecke mit regulärem, nicht verdichtetem, Interzellularspalt befindet.
- c) Typische gap junction (Pfeil) zwischen zwei unreifen Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC). Man erkennt deutlich den charakteristischen Wechsel zwischen regulärem Interzellularspalt und den Verdichtungen, wo der Interzellularspalt stark eingeengt ist.

Nähe von unreifen ALCs, die um sie herum angeordnet waren. Dabei waren die konkaven Öffnungen der coated pits an den Zellmembranen der Fibrozyten den benachbarten unreifen ALCs zugewandt (Abb. 10b). In den Interzellularräumen zwischen Fibrozyten und unreifen ALCs fanden sich zahlreiche unterschiedliche Vesikel. Das Zytoplasma der Vesikel war entweder so hell wie das der Fibrozyten oder so dunkel wie das der unreifen ALCs.

Am 50. Postnataltag wurden folgende Zellkontakte bzw. Oberflächenmerkmale beobachtet: gap junctions zwischen unreifen ALCs, coated pits, Abschnürung von Vesikeln, Kontakte zu Fibrozyten und Makrophagen. Die an diesem Zeitpunkt häufig anzutreffenden gap junctions zwischen unreifen ALCs traten in verschiedenen Variationen auf (Abb. 11). Dabei kamen gap junctions vor, die auf beiden Seiten von regulärem Interzellularraum umgeben waren (Abb. 11a). Andere gap junctions zwischen unreifen ALCs wiesen auf der einen Seite einen regulären Interzellularraum auf, grenzten jedoch auf der anderen Seite bereits an den interstitiellen Extrazellularraum (Abb. 11b). Eine Variation der bereits gezeigten gap junctions wurde ebenfalls am 50. Postnataltag beobachtet: Die gesamte Kontaktfläche zweier Leydig-Zellen wurde von einer besonderen gap junction ausgebildet. Diese gap junction bestand aus einem langen zentral gelegenen Spalt mit kleinen elektronendichten Strukturen an beiden Enden (Abb. 11c).

Neben gap junctions lagen an der Oberfläche der unreifen ALCs wiederholt coated pits vor. Coated pits befanden sich sowohl zwischen benachbarten Leydig-Zellen (Abb. 12a) als auch zwischen Leydig-Zellen und ihrem Extrazellularraum (Abb. 11c). In dem Interzellularraum zwischen zwei unreifen ALCs mit coated pits fanden sich häufig kleine Vesikel, deren Zytoplasma morphologisch genauso aussah wie das der Leydig-Zellen. In einigen Fällen konnte die Abschnürung der Vesikel von den Leydig-Zellen festgehalten werden (Abb. 12b): Die in der Umgebung einer Blutkapillare liegende Leydig-Zelle schleuste drei Vesikel aus. Ein Vesikel war bereits abgeschnürt und der Zytoplasmafaden zwischen Leydig-Zelle und

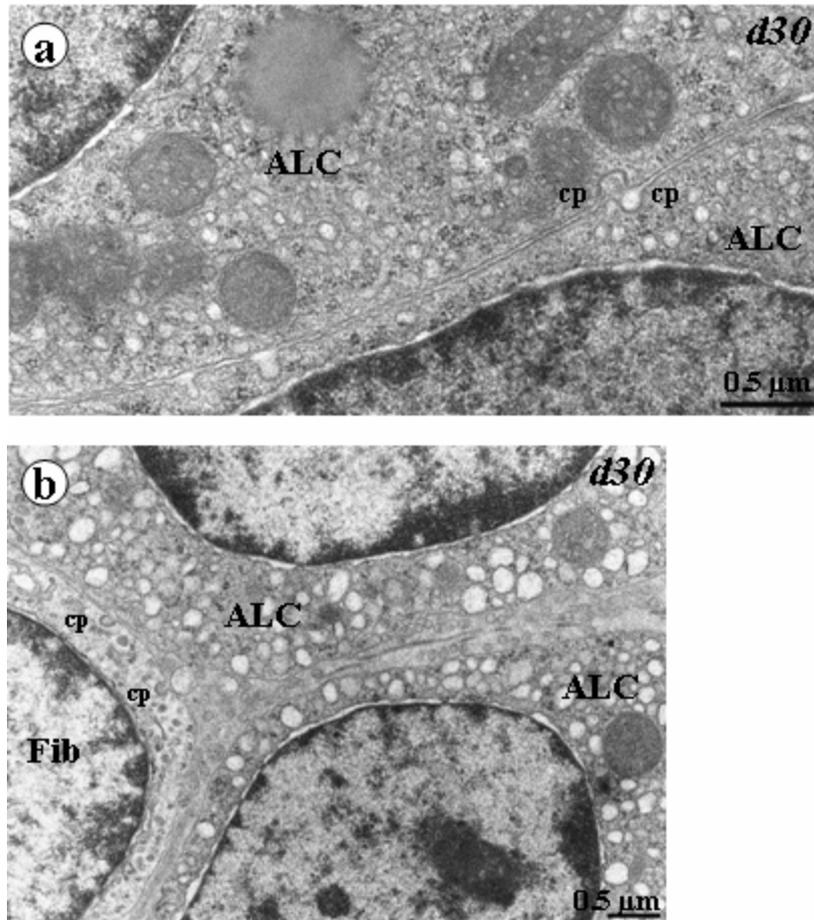


Abb. 10: Unreife Adulttyp-Leydig-Zellen am 30. Postnataltag (d30).

Vergrößerung *siehe Maßstab*.

- a)** Die beiden unreifen Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC) befinden sich so nah beieinander, dass der Abstand ihrer angrenzenden Zellmembranen unter 20 nm liegt. Außerdem weisen sie coated pits (cp), deren Öffnungen sich gegenüberliegen, auf.
- b)** In der Nachbarschaft zweier unreifer Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC) liegt ein Fibrozyt (Fib) mit coated pits (cp) an seiner Oberfläche vor. Des Weiteren befinden sich zahlreiche Vesikel mit unterschiedlicher Morphologie in den Interzellularräumen.

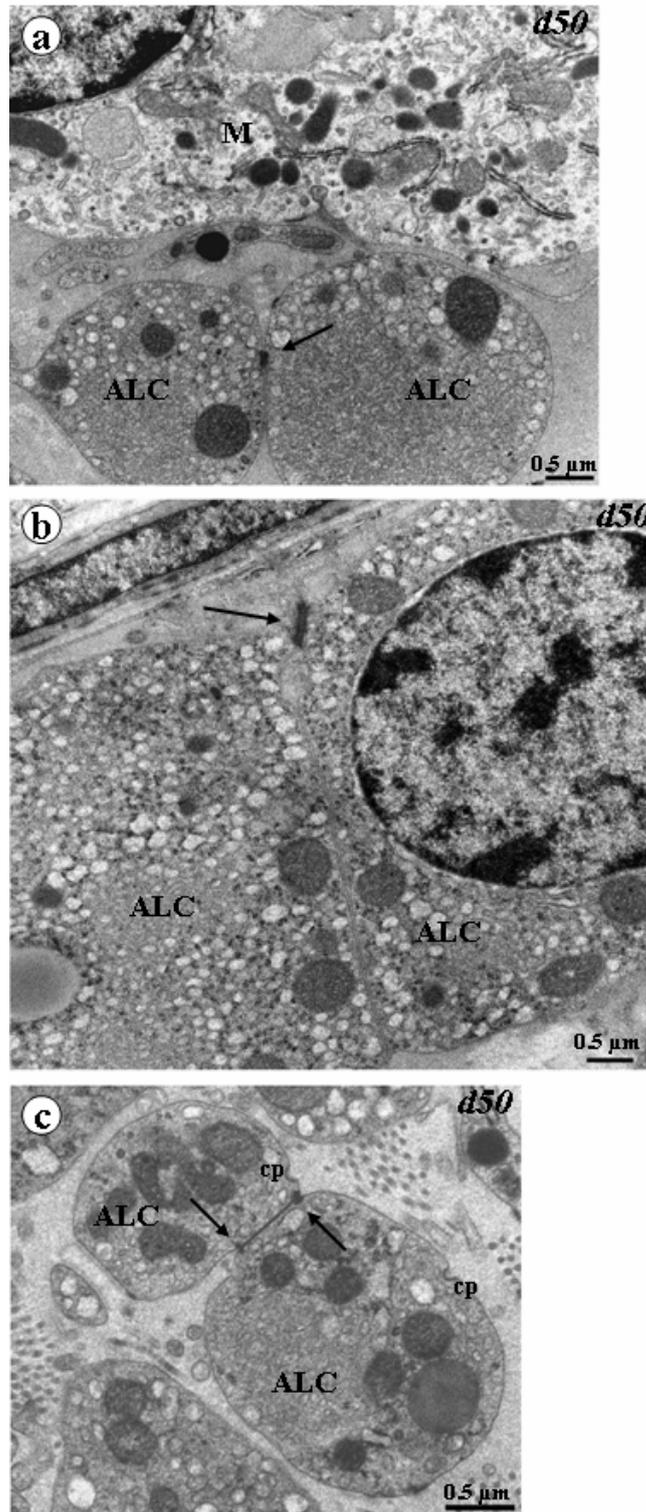


Abb. 11: Unreife Adulttyp-Leydig-Zellen am 50. Postnaltag (d50).

Vergrößerung siehe Maßstab.

- a) Gap junction (*Pfeil*) zwischen zwei unreifen Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC). Des Weiteren ist in der oberen Bildhälfte ein Makrophag (*M*) abgebildet.
- b) Die Zellmembranen zweier unreifer Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC) verlaufen über eine lange Strecke von unten nach oben aneinander grenzend. Oben bilden sie eine gap junction (*Pfeil*) aus.
- c) Diese beiden unreifen Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC) sind nur durch eine variierte gap junction mit einem langen zentralen Spalt und zwei runden elektronendichten Strukturen (*Pfeile*) beidseits getrennt. Die Leydig-Zellen weisen an ihrer Zellmembran außerdem coated pits (*cp*) auf, deren Öffnungen dem interstitiellen Extrazellularraum zugewandt sind.

Vesikel unterbrochen. Ein weiteres Vesikel war noch mit der Leydig-Zelle über einen feinen Zytoplasmafaden verbunden, der in der Mitte verschmälert war.

Eine enge Beziehung zwischen unreifen ALCs und Makrophagen wurde ab dem 50. Postnataltag regelmäßig vorgefunden. Die Zellmembranen der ALCs und Makrophagen lagen einander an, so dass auch ihre Oberflächen sich einander anpassten z.B. die konkave Oberfläche des Makrophagen lag der konvex vorgewölbten Zellmembran der Leydig-Zelle an. Die unreifen ALCs am 50. Postnataltag verfügten häufig über Zellausläufer. Gelegentlich ragte ein solcher fingerartiger Zellausläufer einer Leydig-Zelle in die tiefe Invagination der Zellmembran eines benachbarten Makrophagen hinein (Abb. 13a und b). Neben Makrophagen befanden sich auch Fibrozyten häufig in der näheren Umgebung von unreifen ALCs. Die Fibrozyten befanden sich so nah bei den Leydig-Zellen, dass die Zellmembranen, welche das Zytoplasma der beiden Zellen umhüllten, unmittelbar aneinander lagen (Abb. 13a). Darüber hinaus kam es vor, dass Zellausläufer von Fibrozyten sich einer Leydig-Zelle annäherten und ihre Zellmembran berührten (Abb. 13a). In beiden Fällen war der Interzellularraum reduziert unter 20 nm.

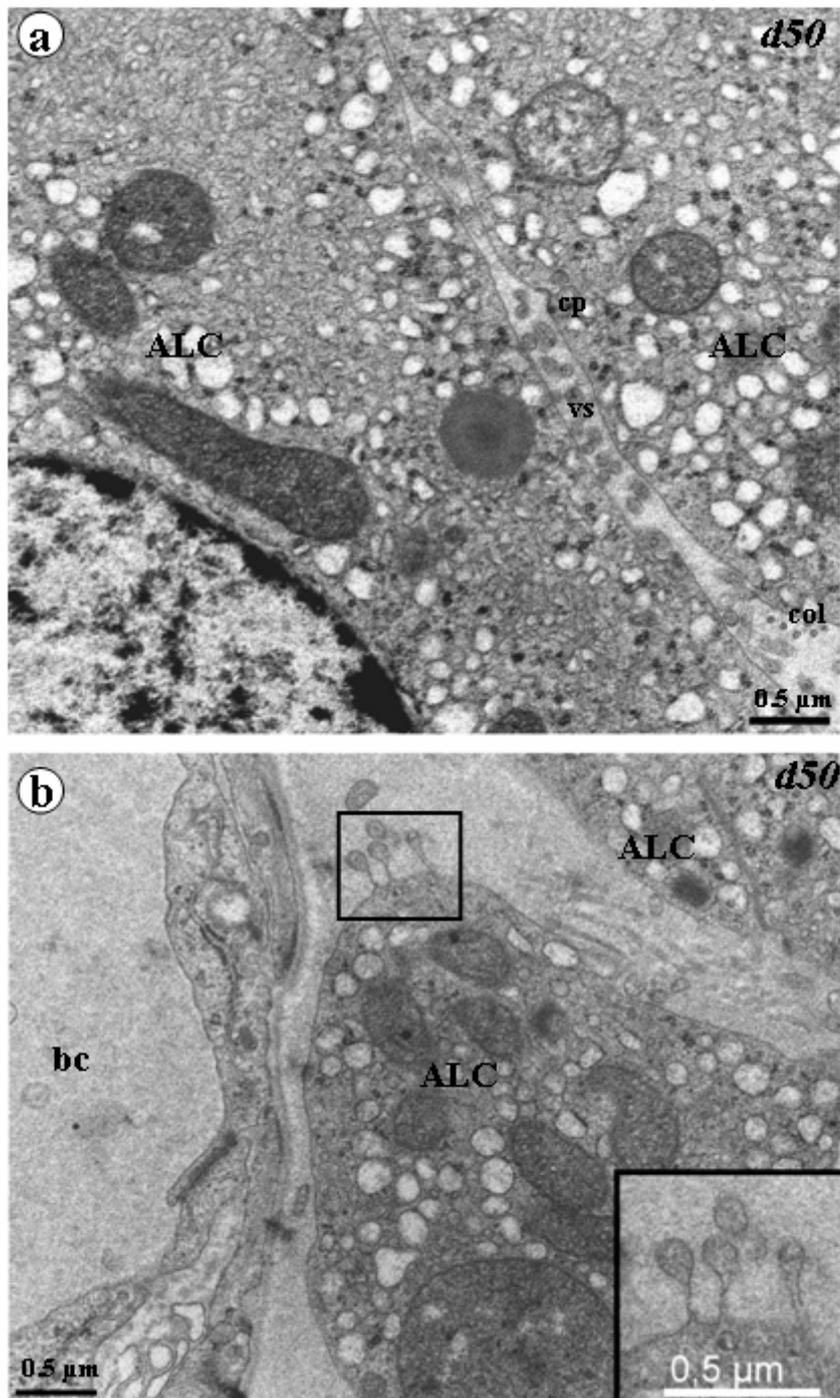


Abb. 12: Unreife Adulttyp-Leydig-Zellen am 50. Postnataltag (d50).

Vergrößerung siehe Maßstab.

- a) In dem Interzellularraum zwischen zwei unreifen Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC) befinden sich kleine Vesikel (vs) und quer angeschnittene Kollagenfasern (col). Die Oberfläche der Zellmembran der Leydig-Zelle oben rechts weist ein coated pit (cp) auf.
- b) Zwei unreife Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC) liegen in der Nähe einer Blutkapillare (bc). Die Leydig-Zelle in der Mitte des Bildes (Kästchen) ist in dem Ausschnitt unten rechts vergrößert.

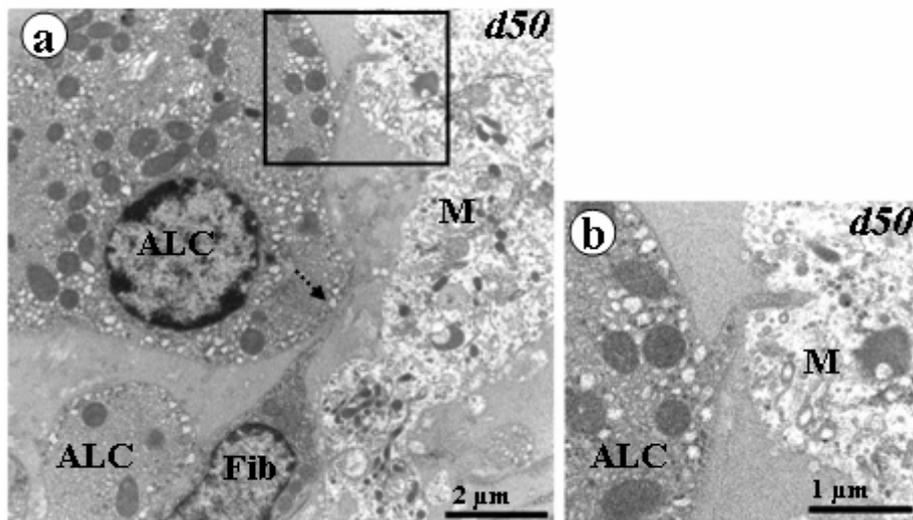


Abb. 13: Unreife Adulttyp-Leydig-Zelle am 50. Postnataltag (d50).

Vergrößerung *siehe Maßstab*.

- a) Die unreife Adulttyp-Leydig-Zelle (ALC) oben links verfügt über einen Zellausläufer (*Kasten*), der in den Makrophagen (*M*) reicht. Der Fibrozyt in der unteren Bildmitte grenzt auf der linken Seite unmittelbar an eine Leydig-Zelle (Abstand < 20 nm). Nach oben rechts verfügt der Fibrozyt über einen Zellausläufer (*gestrichelter Pfeil*), der die obere Leydig-Zelle berührt.
- b) Vergrößerung des fingerartigen Zellausläufers aus a) der unreifen Adulttyp-Leydig-Zelle (ALC) in die tiefe Invagination des Makrophagen (*M*).

3.4 Zellkontakte am 100. Postnataltag

Die reifen („mature“) ALCs am 100. Postnataltag wiesen viele der bereits beschriebenen Zellkontakte auf: enge Beziehung und Kontakte zu Makrophagen, gap junctions zwischen benachbarten Leydig-Zellen, sowie Nähe zu peritubulären und perivaskulären Zellen. Auffällig war das Zytoplasma der reifen ALCs (Abb. 14 und 15): Es war elektronendichter und verfügte über weniger glattes endoplasmatisches Retikulum als die vorher gezeigten unreifen ALCs. In einem typischen Interstitium (Abb. 14a) waren die reifen ALCs oft um ein Blutgefäß angeordnet und lagen in nächster Nähe zu perivaskulären Fibrozyten. Außerdem befanden sich die reifen ALCs häufig in der Umgebung von Makrophagen (Abb. 14a-c). Dabei wurde regelmäßig ein Interzellularraum zwischen der Leydig-Zelle und dem Makrophagen von ca. 20 nm gemessen (Abb. 14b): Die Zellmembranen des Makrophagen und der reifen ALC grenzten unmittelbar aneinander, wobei der Makrophag und einer seiner Zellausläufer entlang der Oberfläche der Leydig-Zelle verliefen. Der Interzellularraum zwischen Makrophag und Leydig-Zelle konnte allerdings auch stark reduziert (weit unter 20 nm) sein, wenn die beiden unterschiedlichen Zelltypen unmittelbar aneinander grenzten (Abb. 14c). Außerdem fiel zwischen den angrenzenden Zellen noch auf: Die kleinen rundlichen Zellausläufer der Leydig-Zelle erstreckten sich bis in die konkaven Öffnungen der coated pits des Makrophagen und füllten sie aus (Abb. 14c). Ein reduzierter Interzellularraum konnte nicht nur zwischen Leydig-Zellen und Makrophagen beobachtet werden, sondern auch zwischen benachbarten Leydig-Zellen: Zwischen zwei reifen ALCs wurden regelmäßig gap junctions ausgebildet (Abb. 15a). Eine weitere häufige Beobachtung war die von reifen ALCs in der Nähe von den Tubuli seminiferi: Dabei war der Interzellularraum zwischen Leydig-Zelle und peritubulärem Zellausläufer oft reduziert unter 20 nm (Abb. 15b). Die Zellausläufer der peritubulären Zellen und der Myoidzellen wiesen wiederholt mehrere coated pits auf. Die beobachteten coated pits der peritubulären Zellen waren den Myoidzellen zugewandt, während

die Myoidzellen über coated pits verfügten, deren Öffnungen den peritubulären Zellen und dem Tubulus seminiferus zugewandt waren (Abb. 15b).

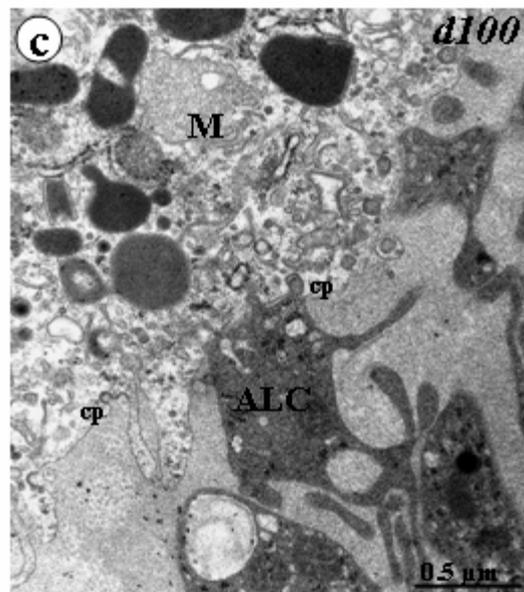
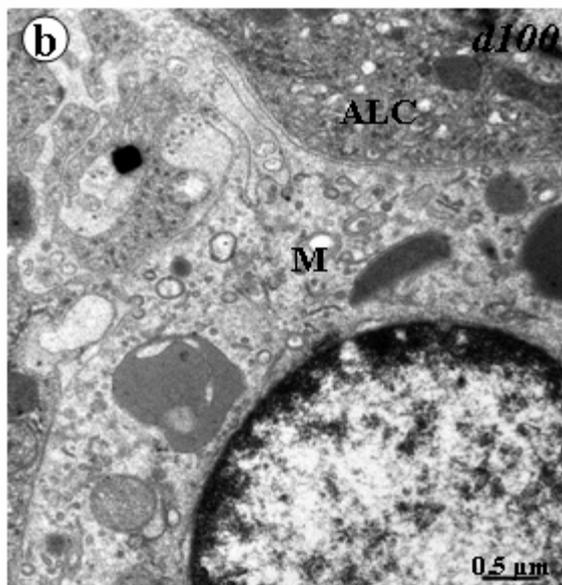
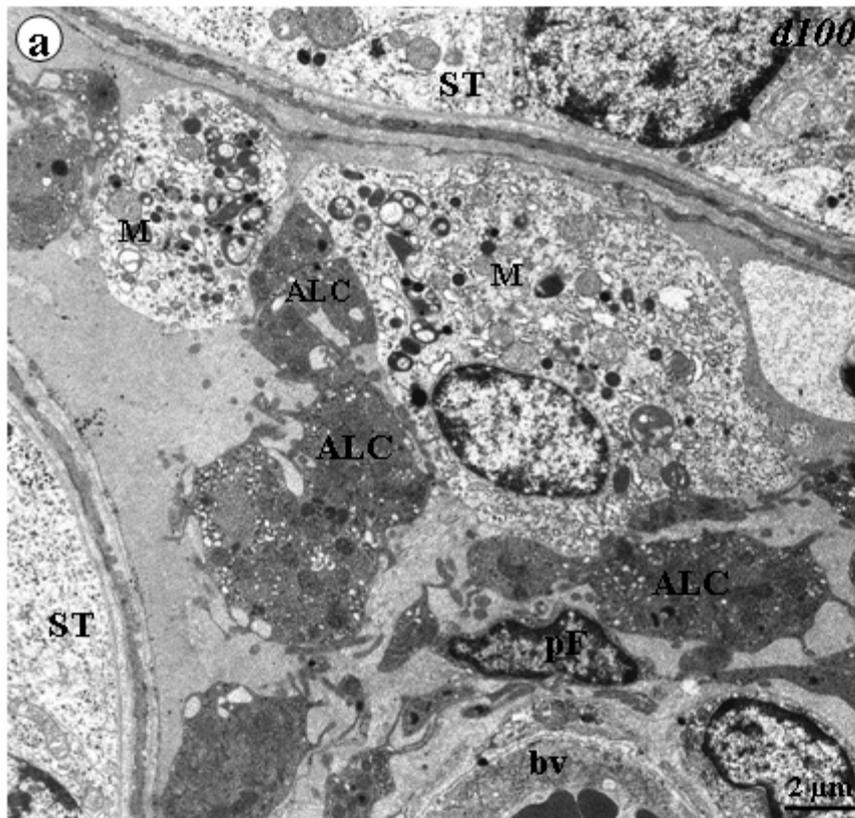


Abb. 14: Reife Adulttyp-Leydig-Zellen am 100. Postnataltag (d100).

Vergrößerung siehe Maßstab.

- a) Übersicht eines Interstitiums: Reife Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC) sind von Makrophagen (M) umgeben. Die Leydig-Zelle unten rechts liegt dem perivaskulären Fibrozyten (pF) des Blutgefäßes (bv) an. Tubulus seminiferus (ST).
- b) Ein Makrophag (M) und eine reife Adulttyp-Leydig-Zelle (ALC) liegen einander an. Der Zellausläufer des Makrophagen verläuft entlang der Unterseite der Leydig-Zelle.
- c) Der Interzellularraum zwischen dem Makrophagen (M) und der reifen Adulttyp-Leydig-Zelle (ALC) ist stark reduziert (<20nm). Der kleine rundliche Zellausläufer der Leydig-Zelle erstreckt sich in die konkave Öffnung eines coated pits (cp) des Makrophagen und füllt diese aus.

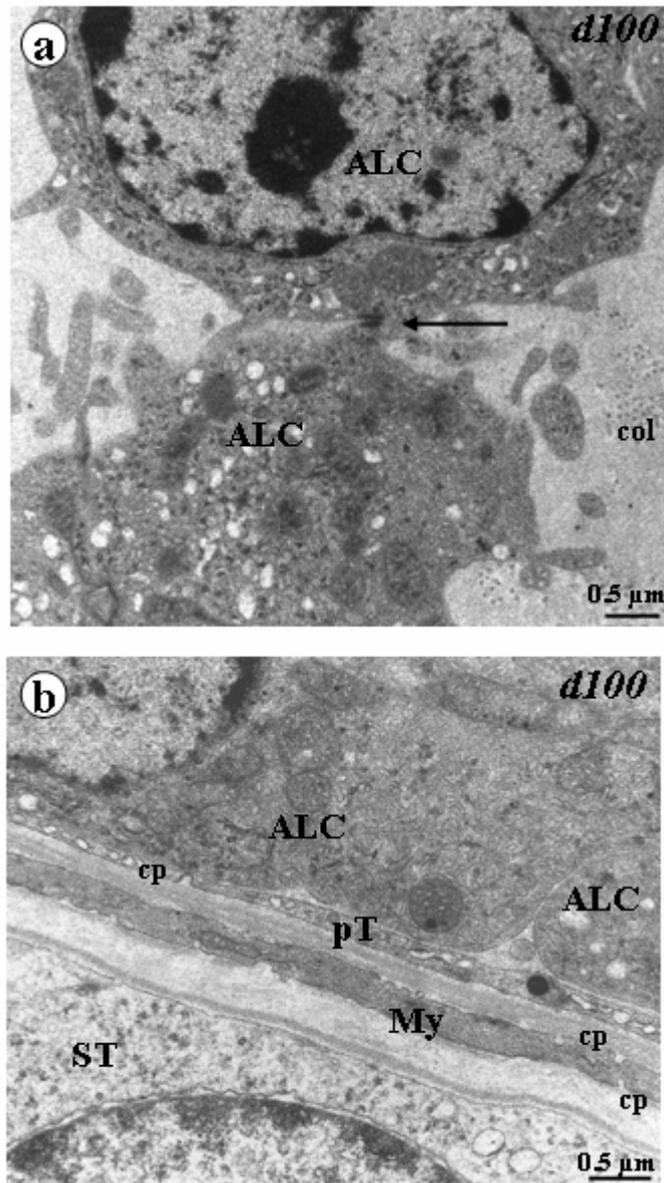


Abb. 15: Reife Adulttyp-Leydig-Zellen am 100. Postnataltag (d100).

Vergrößerung *siehe Maßstab*.

- a)** Gap junction (*Pfeil*) zwischen zwei reifen Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC). Kollagen (*col*).
- b)** Die reife Adulttyp-Leydig-Zelle (ALC), die die obere Bildhälfte ausfüllt, befindet sich in enger Nachbarschaft zu dem Ausläufer einer peritubulären Zelle (*pT*). Die Zellmembranen der darunter liegenden peritubulären Zelle sowie der Myoidzelle (*My*) weisen coated pits (*cp*) auf.

3.5 Zellkontakte im Senium

Im Alter von zwei Jahren (Senium), zeigten die reifen ALCs viele der bereits aufgeführten Beobachtungen auf: Anordnung in der Umgebung von Blutgefäßen, Nähe zu Fibrozyten, Kontakte mit Makrophagen und gap junctions zwischen zwei Leydig-Zellen.

Auch im Senium fand man die reifen ALCs häufig in der Umgebung von Blutgefäßen (Abb. 16a). Dabei fiel auf, dass sich die Form der Leydig-Zelle an die Form des Blutgefäßes anpassen konnte: Die Oberfläche der reifen ALC verlief in einem Abstand von ca. 40 bis 80 nm entlang der Oberfläche der Endothelzelle (Abb. 16b), als würde die Leydig-Zelle die Endothelzelle umgreifen. Die Endothelzelle verfügte über Caveolen, deren Öffnung der Leydig-Zelle zugewandt war. Außer in der Umgebung von Endothelzellen befanden sich Leydig-Zellen im Senium auch in unmittelbarer Nähe von Fibrozyten. Fibrozytenausläufer schoben sich bisweilen in den Interzellularraum zwischen zwei reifen ALCs (Abb. 16b): Die Zellmembran des Fibrozytenausläufers grenzte an die ihn auf beiden Seiten umgebenden ALCs und zeigte ferner ein coated pit, dessen konkave Öffnung einer Leydig-Zelle zugewandt war. Wie am 100. Postnataltag konnte auch hier beobachtet werden, dass Leydig-Zellen an die Zellausläufer von peritubulären Zellen angrenzten (Abb. 16b).

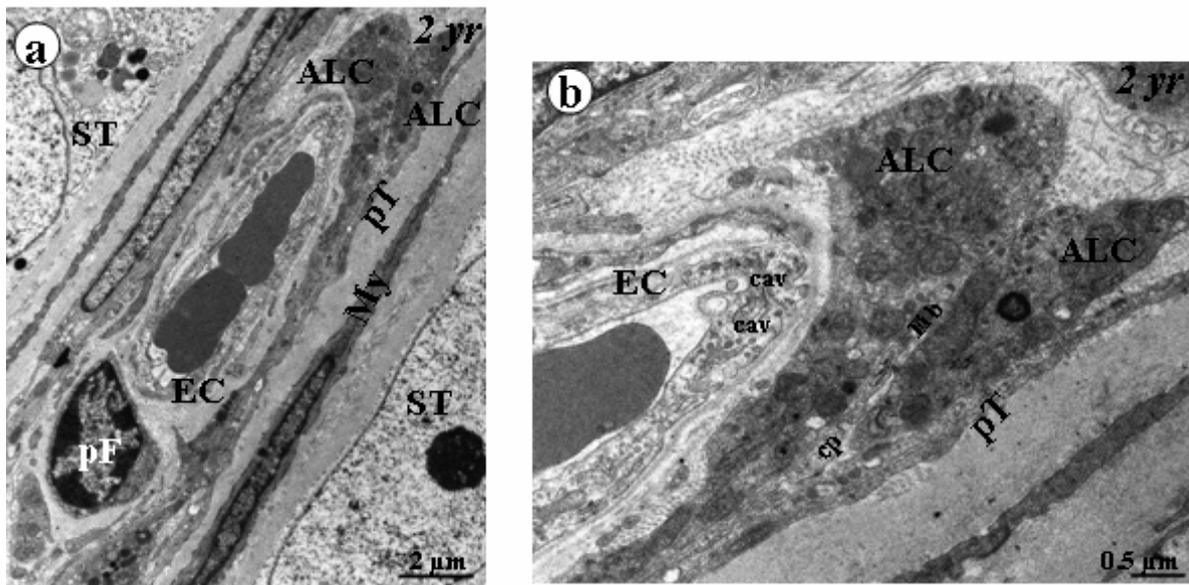


Abb. 16: Reife Adulttyp-Leydig-Zellen im Alter von 2 Jahren (2yr).

Vergrößerung *siehe Maßstab*.

- a) Übersicht über ein Interstitium mit reifen Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC), die um eine Blutkapillare mit Endothelzelle (EC) und perivaskulärem Fibrozyt (pF) angeordnet sind. In den Ecken oben links und unten rechts ist jeweils ein Tubulus seminiferus (ST) abgebildet. Peritubuläre Zelle (pT). Myoidzelle (My).
- b) Vergrößerung des rechten oberen Bildanteils von a): Zwei reife Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC) sind angeschnitten. Die Oberfläche der oberen Leydig-Zelle ist der Endothelzelle (EC) mit ihren Cavolen (cav) zugewandt. Zwischen den beiden Leydig-Zellen befindet sich ein Zellausläufer eines Fibrozyten (Fib) mit einem coated pit (cp). Nach unten hin liegt die untere Leydig-Zelle einem Zellausläufer einer peritubulären Zelle (pT) an.

Die bereits beschriebene enge Beziehung zwischen Leydig-Zellen und Makrophagen konnte ebenfalls im Senium beobachtet werden: Oft lag ein reduzierter Interzellularraum unter 20 nm zwischen einer reifen ALC und einem Makrophag vor (Abb. 17a), so dass die Zellmembranen der Leydig-Zelle und des Makrophagen sich berührten. Die konkaven Öffnungen der coated pits der Makrophagen waren wiederholt den anliegenden Leydig-Zellen zugewandt (Abb. 17a). Weiterhin konnten Makrophagen und Leydig-Zellen so nah beieinander liegen, dass nahezu kein Interzellularraum ausgebildet wurde (Abb. 17b). Zellausläufer von Makrophagen verliefen entlang der Oberfläche der Leydig-Zellen und schmiegteten sich ihnen direkt an. Gleichzeitig füllten kleine rundliche Zellausläufer der reifen ALCs die konkaven Öffnungen der coated pits der Makrophagen aus (Abb. 17b).

Zu den Zellkontakten von reifen ALCs im Senium gehörten ferner noch gap junctions zwischen benachbarten Leydig-Zellen: Zwei Leydig-Zellen lagen nah beieinander mit einem Interzellularraum von ca. 20 nm und bildeten schließlich eine gap junction, die auf der anderen Seite von Extrazellularraum umgeben war (Abb. 18a). Die ungewöhnliche gap junction, die bereits am 50. Postnataltag beobachtet wurde, konnte auch im Senium angetroffen werden (Abb. 18b): Die Zellmembranen der beiden reifen ALCs grenzten aneinander. Der Interzellularraum war ca. 20 nm weit und verdichtete sich in der Mitte zu einer gap junction mit einem langen zentralen Spalt, der an beiden Enden kleine elektronendichte Strukturen aufwies.

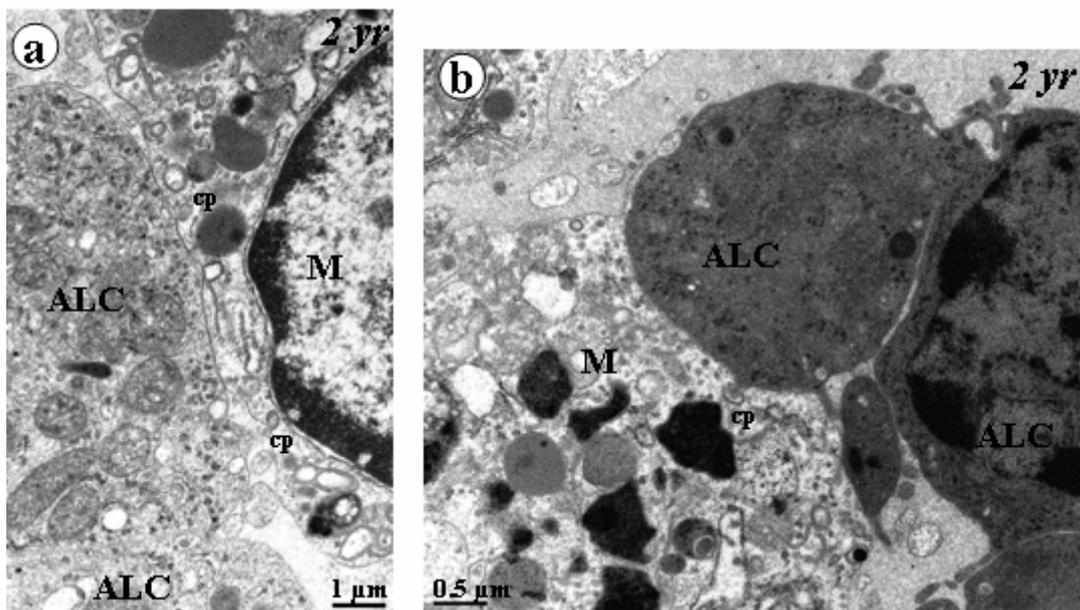


Abb. 17: Reife Adulttyp-Leydig-Zellen im Alter von 2 Jahren (2yr).

Vergrößerung *siehe Maßstab*.

- a) Die obere der beiden abgebildeten reifen Adulttyp-Leydig-Zellen (ALC) grenzt unmittelbar an den Makrophagen (M) auf der rechten Seite an. Der Makrophag weist coated pits (cp) auf, deren Öffnungen der Leydig-Zelle zugewandt sind.
- b) Ein Makrophag (M) umgreift mit seinem Zellausläufer die Oberseite der runden reifen Adulttyp-Leydig-Zelle (ALC). Die Zellmembranen beider Zellen liegen so nah an einander, dass nahezu kein Interzellularraum sichtbar ist. Die Öffnung des coated pits (cp) des Makrophagen in der Bildmitte wird von einem kleinen runden Zellausläufer der Leydig-Zelle ausgefüllt.

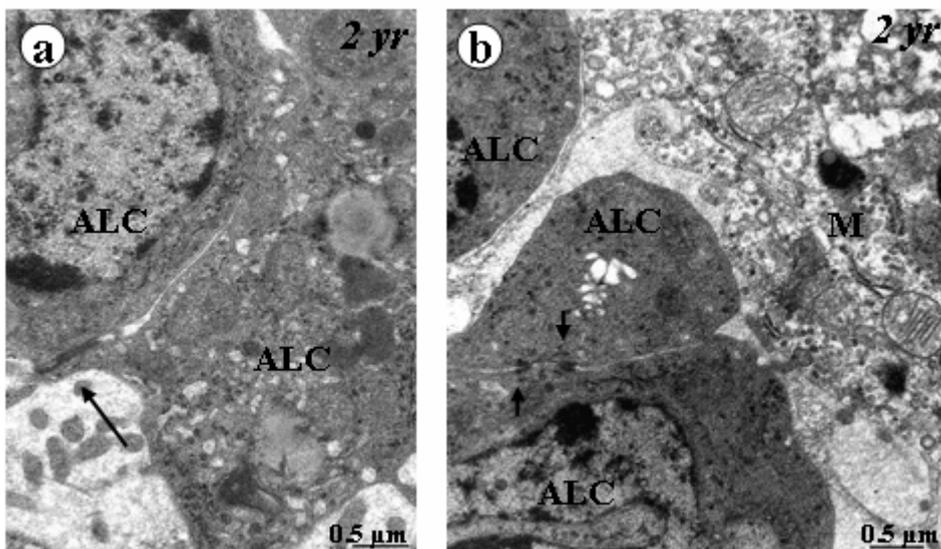


Abb. 18: Reife Adulttyp-Leydig-Zellen im Alter von 2 Jahren (2yr).

Vergrößerung siehe Maßstab.

- a)** Gap junction (*Pfeil*) zwischen zwei benachbarten reifen Adulttyp-Leydig-Zellen (*ALC*).
- b)** Der Makrophag (*M*) auf der rechten Bildhälfte befindet sich in der Nähe von drei reifen Adulttyp-Leydig-Zellen (*ALC*). An die Leydig-Zelle oben links und an die Leydig-Zelle unten links schmiegt sich jeweils ein länglicher Zellausläufer des Makrophagen. Die beiden Leydig-Zellen in der unteren Bildhälfte zeigen als Zellkontakt eine Variation einer gap junction mit einem langen zentralen Spalt und kleinen elektronendichten Strukturen (*Pfeile*) an beiden Enden.

4. Diskussion

Die vergangenen 25 Jahre brachten zahlreiche Veröffentlichungen über Interaktionen zwischen Leydig-Zellen und Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten/Fibrozyten sowie peritubulären Zellen im Interstitium hervor. Leydig-Zellen wirken über verschiedenste Mechanismen auf die Zellen in den Interstitien des Hodens ein und werden umgekehrt auch von ihnen beeinflusst. In Tab. 3 werden verschiedene Faktoren aufgezählt, von welchen berichtet worden ist, dass sie im Hoden produziert werden und/oder in vitro Einfluss auf Leydig Zellen haben (Quellen s. Lejeune et al. 1998). Die Differenzierung der ALCs ausgehend von dem mesenchymalen Precursor (= Vorläufer) bis zur reifen ALC erfolgt unter der Einwirkung von zahlreichen Faktoren (s. Schema von Mendis-Handagama und Ariyaratne 2001 in Abb. 19).

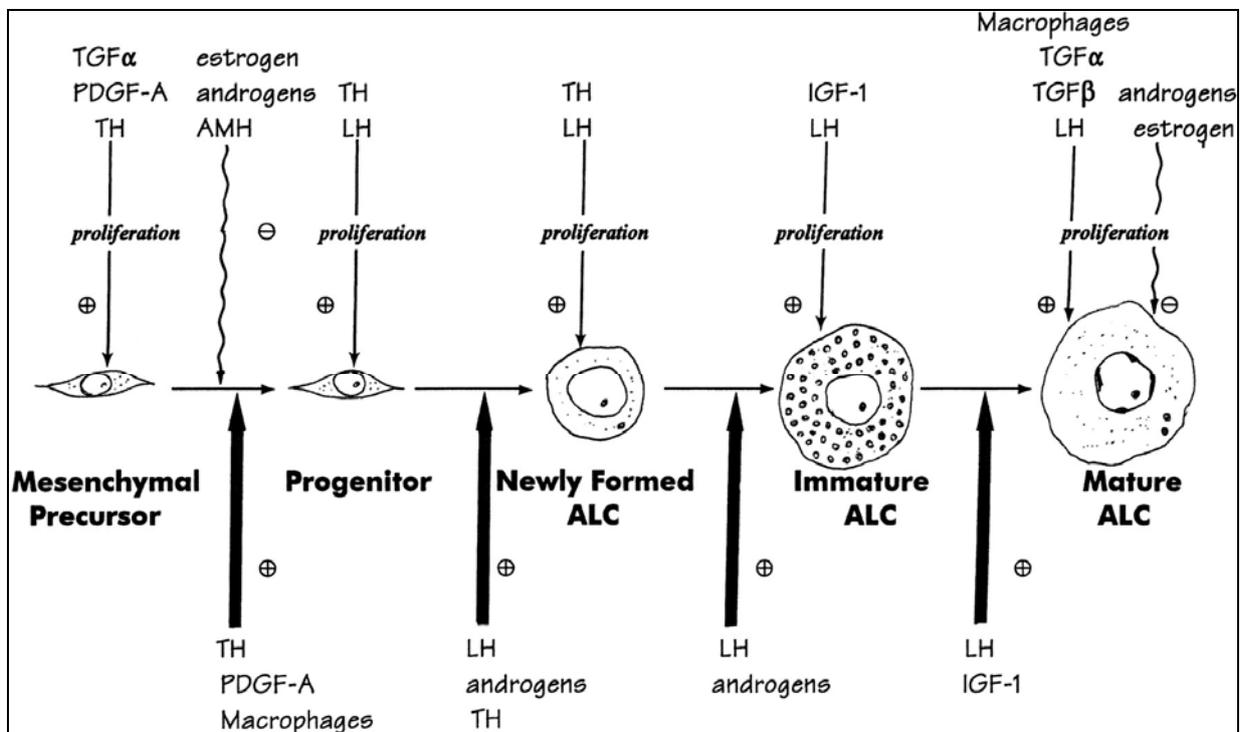


Abb. 19 Regulation der Differenzierung der Adulttyp-Leydig-Zellen im postnatalen Hoden. ALC: Adult Leydig Cell TH: Thyroid Hormones. LH: Luteinizing Hormone. PDGF-A: Platelet-Derived Growth Factor-A. IGF-1: Insuline-Like Growth Factor-1. Entnommen aus Mendis-Handagama und Ariyaratne (2001).

Factor	Site of Production	Regulation	Effect in Leydig Cells
Steroidogenic stimulatory factor	Sertoli Cell	FSH ↑	Steroidogenesis ↑
Steroidogenic inhibitory factor(s)	Sertoli Cell	FSH ↑	Differentiated functions ↓
Mitogenic factor(s)	Sertoli Cell	FSH ↑ in Sertoli Cell	Leydig Cell Progenitor proliferation ↑
IGF-1	Leydig Cell, Sertoli Cell	FSH ↑ in Sertoli Cell hCG ↑ in Leydig Cell	Differentiated functions ↑
TGFβs	Leydig Cell, Sertoli Cell, Peritubular Cell	FSH ↓ in Sertoli Cell	Differentiated functions ↓
EGF/TGFα	Leydig Cell, Sertoli Cell, Germ Cell, Peritubular Cell	?	Steroidogenesis ↑ Differentiated functions ↓
FGF	Leydig Cell, Sertoli Cell, Germ Cell, Peritubular Cell	FSH ↑ in Sertoli Cell	Differentiated functions ↓
PDGF	Leydig Cell	hCG ↑ in Leydig Cell	Differentiated functions ↓
Interleukin-1	Leydig Cell, Sertoli Cell, Macrophage	LPS ↑ in Sertoli Cell hCG ↑ & LPS ↑ in Leydig Cell	Differentiated functions ↓
Interferon (α, γ)	Lymphocyte	?	Differentiated functions ↓
TNF- α	Germ Cell	?	Stimulatory in rat Inhibitory in pig, mouse
Growth Hormone Releasing Factor	Leydig Cell, Sertoli Cell	hCG ↑ in Leydig Cell	Stimulatory or no effect
LH Releasing Hormone	Sertoli Cell	?	Acute ↑ Steroidogenesis only in rat
NO	Macrophage	-	LH-stimulated steroidogenesis ↓

Tab. 3 Diese Tabelle wurde reproduziert aus Lejeune et al. (1998). Im Hoden produzierte Faktoren und deren Einfluss auf Leydig-Zellen. FSH: follicle stimulating hormone. IGF-1: insulin-like growth factor. hCG: human chorionic gonadotropin. TGFα/β: transforming growth factor α/β. EGFβ: epidermal growth factor. FGF: fibroblast growth factor. PDGF: platelet-derived growth factor. LPS: lipopolysaccharide. TNF- α: tumor necrosis factor α. LH: luteinizing hormone. NO: nitric oxide.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Ultrastruktur der Zellkontakte von Leydig-Zellen sowohl untereinander als auch mit den sie umgebenden interstitiellen Zellen im Rattenhoden systematisch von der Geburt bis zum Senium untersucht. Dabei konnten erstmalig folgende Ergebnisse dargestellt werden: 1. das Vorkommen von Interzellularbrücken mit kontinuierlichem Zytoplasma zwischen Leydig-Zellen und 2. drei unterschiedlich strukturierte Muster von gap junctions zwischen benachbarten Leydig-Zellen. Zudem können die Befunde der vorausgegangene Veröffentlichungen über coated pits an den Zellmembranen von Leydig-Zellen, über zytoplasmatische Digitationen zwischen Leydig-Zellen und Makrophagen sowie über eine enge Beziehung zwischen Leydig-Zellen und Blutgefäßen bestätigt werden.

4.1 Interzellularbrücken

Es handelt sich um die erste Beschreibung von Interzellularbrücken zwischen FLCs am 1. und 5. Postnataltag. Das kontinuierliche Zytoplasma der Brücken könnte als Transportweg für den Austausch von Nährstoffen, chemischen Signalen oder Zellorganellen interpretiert werden. Interzellularbrücken zwischen Zellen der Spermatogenese im Hoden bei unterschiedlichen Tierarten sind hinreichend bekannt und gut untersucht. Über die Ultrastruktur dieser Interzellularbrücken zwischen Spermatogonien, zwischen Spermatozyten und zwischen Spermatischen liegen zahlreiche Arbeiten vor (Dym und Fawcett 1971; Weber und Russell 1987; Miething 1991; Rodriguez und Garcia 1999). Strukturen wie membranöse Systeme und Mikrotubuli werden mit den Interzellularbrücken assoziiert. In diesen Brücken vorhandenes Aktin könnte daran beteiligt sein, gewisse Interzellularbrücken aufrecht zu halten (Russell et al. 1987). Aufgrund der faserigen Struktur der hier gezeigten Interzellularbrücken kann man vermuten, dass Aktinfasern ebenfalls involviert waren. Interzellularbrücken im Keimzellepithel des Hodens sichern die synchronisierte Entwicklung der Zellen der

Spermatogenese, die zu einem Klon gehören (Huckins 1978; Ren und Russell 1991). Hamer et al. (2003) zeigte die Degeneration gesunder Spermatogonien durch regulatorische Signale, die zur Apoptose von miteinander verbundenen Spermatogonienreihen führte. Ventelä et al. (2003) zeigten eine direkte Demonstration des Verkehrs von Zellorganellen durch Zytoplasmabrücken in Spermatogenesenzellen der Ratte. Die Interzellulärbrücken zwischen FLCs wurden hauptsächlich in einer Gruppe, innerhalb eines Clusters oder einem bestimmten perivaskulären Feld beobachtet. Dies könnte auf eine funktionelle Synchronisation schließen lassen.

Jedoch muss hervorgehoben werden, dass die Interzellulärbrücken nur in der frühen postnatalen Periode und nicht zwischen allen FLCs in dieser Phase beobachtet wurden. Es ist bekannt, dass FLCs in großen Komplexen in der fetalen Periode angeordnet sind (Haider 2004). Nach der Geburt verteilen sich die FLCs auf relativ kleine Cluster. Während dieser neuen räumlichen Umordnung der FLCs nimmt der Interzellulärraum zwischen den FLCs zu. Dies geschieht in dem Zeitfenster, in welchem die Interzellulärbrücken beobachtet wurden.

4.2 Gap junctions

Bisher liegen nur wenige Untersuchungen über gap junctions zwischen zwei benachbarten Leydig-Zellen vor (Wrobel et al. 1981; Larsen 1983; Russell 1996). Zwischen sowohl benachbarten FLCs als auch benachbarten ALCs sind 25 nm- Zellabstände üblich (Haider et al. 1995; Haider 2004). Da zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Poren der gap junction durchtreten kann, schloss Russell (1996) auf eine koordinierte Sekretion durch über gap junctions elektrisch gekoppelte Leydig-Zellen. Die elektrische und chemische Kopplung von benachbarten ALCs über gap junctions würde ihnen erlauben, als eine Gruppe oder sogar eine gesamte Zellpopulation auf einen bestimmten Stimulus zu antworten. Ferner wurde bereits nachgewiesen, dass cAMP innerhalb von Stunden die Ausbildung von gap

junctions fördern kann (Pollard und Earnshaw 2002). Eine Synchronisation von elektrischen Aktivitäten in Zell-Clustern über Kopplung durch gap junctions wurde von Sivan et al. (2005) beschrieben.

In der vorliegenden Untersuchung wurden gap junctions in den folgenden Alterstufen beobachtet: 1., 5., 20., 25., 30., 50. und 100. Postnataltag, sowie im Senium (2 Jahre). Die Beobachtungen konnten in drei unterschiedlich strukturierte Gruppen unterteilt werden: 1) Gap junctions zwischen zwei FLCs eines Clusters am 1. und 5. Postnataltag sowie zwischen unreifen ALCs am 30. Postnataltag nahmen nur einen Teilabschnitt der über eine lange Strecke angrenzenden Zellmembranen ein. 2) Die Zellmembranen von Vorläufern von ALCs und unreifen ALCs näherten sich nahezu ausschließlich an der gap junction an. 3) Am 50. Postnataltag und im Senium trafen benachbarte Leydig-Zellen in einer ungewöhnlichen gap junction mit einem langen zentral gelegenen Spalt mit kleinen elektronendichten Strukturen an beiden Enden aufeinander. Der unterschiedlichen Morphologie der gap junctions könnten unterschiedliche Funktionen zugrunde liegen. Wenn die gap junction nur einen Teilbereich der angrenzenden Zellmembranen ausmacht, könnten weitere Nährstoffe auch über Diffusion ausgetauscht werden. Die gap junction, die jedoch die einzige Verbindung zwischen zwei gegenüberliegenden Zellen bildet, könnte lediglich einer funktionellen Kopplung dienen (Larsen 1983). Die exakte Interpretation der besonderen gap junction am 50. Postnataltag bleibt noch offen.

Zur Frequenz des Auftretens von gap junctions kann aufgrund der vorliegenden morphologischen Untersuchungen keine signifikante Aussage gemacht werden. Allerdings legen die hier erhobenen Befunde folgende Tendenz nahe: Zwischen ALCs wurden mehr gap junctions ausgebildet als zwischen FLCs, zwischen reifen ALC mehr als zwischen unreifen ALCs.

4.3 Coated pits

Coated pits wurden erstmalig am 30. Postnataltag auf der Oberfläche der Zellmembranen von unreifen ALCs beobachtet. Rezeptor-Liganden-Komplexe wie Low Density Lipoprotein (LDL-) oder Transferrin-Rezeptoren sind in den coated pits konzentriert. (Pollard und Earnshaw 2002). Cholesterol, die Hauptquelle der Androgenbiosynthese in der Leydig-Zelle, wird über coated pits transportiert (Freeman und Rommerts 1996): Cholesterol von der Plasmamembran gelangt als Endosom entweder von coated pits oder Caveolen ausgehend in das Zellinnere. Coated pits auf der Oberfläche von Leydig-Zellen wurden bereits von Ghinea et al. (1992, 1994), and Ghinea and Milgrom (1995) beschrieben: Sie hatten Rezeptormoleküle des Humanen Choriongonadotropin (hCG) in Leydig-Zellen und in der Transzytose durch Endothelzellen beobachtet. Das Hormon wurde über coated pits und Vesikel auf der luminalen Seite des Endothels eingeschleust, bevor es in das endosomale Kompartiment und über glatte Vesikel in den subendothelialen Raum überführt wurde. Das gleiche Transportsystem wurde für die Überführung von anti-LH(Luteinisierendes Hormon)/hCG Rezeptor- Antikörper in den interstitiellen Raum untersucht. Der hCG/LH-Rezeptor ist an der Regulation der Steroidogenese beteiligt. Funktionell besitzen reife Leydig-Zellen eine höhere Anzahl an LH-Rezeptoren und höhere Spiegel an Enzymen, die Testosteron synthetisieren, als unreife Leydig-Zellen (Shan et al. 1993). Dies passt zu den hier gemachten Beobachtungen, dass unreife ALCs die ersten Leydig-Zellen waren, die coated pits aufwiesen, und dass tendenziell die Anzahl von coated pits mit der Reife der ALCs zunahm.

4.4 Leydig-Zellen und Makrophagen

Die funktionelle und strukturelle Kopplung der beiden Zelltypen, Leydig-Zellen und Makrophagen, ist bereits vielfach untersucht und beschrieben worden u.a. von Gaytan et al. (1994a; 1996), Hales (1996, 2002) und Hutson (2006). Ab dem 50. Postnataltag bis zum Senium konnte beobachtet werden, wie die Zellfortsätze der unreifen und reifen ALCs sich in die konkaven Öffnungen der coated pits von Makrophagen erstreckten und diese ausfüllten. Hutson (1992) beschrieb, dass zytoplasmatische Digitationen zwischen Leydig-Zellen und Makrophagen zwischen dem 20. und 30. Postnataltag ausgebildet wurden. Die von Hutson (1992), Kuopio und Pelliniemi (1989a) sowie Ichihara et al. (1993) beschriebenen zytoplasmatischen Digitationen kann durch die vorliegende Untersuchung bestätigt werden. Allerdings stellte die vorliegende Arbeit auch einen neuen Befund vor: fingerartige ALC-Protrusionen in die tiefen Invaginationen von Makrophagen, die in ihrer Form länglich-oval waren im Vergleich zu den runden konkaven Öffnungen der coated pits. Diese besonderen interzellularen Komplexe zwischen Makrophagen und Leydig-Zellen lassen auf eine parakrine Interaktion zwischen diesen beiden verschiedenen Zelltypen schließen, welche bereits von Skinner (1991), Saez (1994) und Gaytan et al. (1994 a-c) untersucht wurden. Die selektive Depletion von Makrophagen verhinderte die Repopulation von Leydig-Zellen in mit Ethylendimethansulfonat (EDS) behandelten Ratten, sowie die Antwort von Leydig-Zellen auf eine Behandlung mit Gonadotropin (Gaytan et al. 1995b). Ortsständige Makrophagen unterbinden die Entzündungsreaktion, die durch EDS induzierten Zelltod der Leydig-Zellen hervorgerufen wird (Gaytan et al. 1995a). Svechnikov et al. (2001) untersuchte die altersabhängige Stimulation der Steroidogenese von Leydig-Zellen mit Interleukin 1 – Isoformen: Interleukin 1 und andere von Makrophagen sezernierte Faktoren konnten die Leydig-Zellen über Diffusion von kleinen Vesikeln, die von Makrophagen abgegeben wurden, erreichen – wie auch hier berichtet wurde. Neuere Arbeiten haben den Effekt von 25-

Hydroxycholesterol, das von testikulären Makrophagen sezerniert wurde, auf Leydig-Zellen sowie die Regulation der 25-Hydroxycholesterol Produktion durch Leydig-Zellen nachgewiesen (Nes et al. 2000; Lukyanenko et al. 2001, 2002; Chen et al. 2002). Der früher als Makrophage-derived Factor bekannte Faktor wurde 1996 von Hutson et al. aus Kulturmedien von testikulären Makrophagen isoliert und von Nes et al. (2000) als 25-Hydroxycholesterol identifiziert. Benachbarte Leydig-Zellen verfügen über die Fähigkeit 25-Hydroxycholesterol in Testosteron zu konvertieren. Die negative Rückkopplung von Testosteron auf testikuläre Makrophagen reguliert die Produktion von 25-Hydroxycholesterol, was auf eine interaktive Beziehung zwischen den beiden unterschiedlichen Zelltypen schließen lässt und das Konzept einer funktionellen Kopplung unterstützt (Lukyanenko et al. 2002).

4.5 Leydig-Zellen und Blutgefäße

Bei den Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden häufig FLC-Cluster und unreife ALCs in der Nachbarschaft von Blutkapillaren beobachtet: Die Leydig-Zellen umgaben die Blutgefäße. Eine parakrine Beziehung zwischen Leydig-Zellen und Endothelzellen wurde von Haider und Servos (1998) diskutiert, als sie die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase nicht nur in Leydig-Zellen (FLCs und Vorläufer von ALCs) sondern auch in vaskulären Endothelzellen in der Umgebung nachwiesen. Sie vermuteten daher eine Beteiligung beider Zelltypen in der akuten Regulation der Steroidogenese über im Blut transportiertes LH. Weitere Untersuchungen von Leydig-Zellen und Endothelzellen ergaben: LH muss durch die oder zwischen den Endothelzellen, die als Barriere des LH zur interstitiellen Flüssigkeit dienen, passieren, um zur Oberfläche der Leydig-Zellen zu gelangen (Setchell et al. 2002, Setchell 2004). Die Untersuchungen von Setchell et al. (2002) und Setchell (2004) ergaben, dass nur ein Zehntel der in der interstitiellen Flüssigkeit gemessenen LH-Konzentration in den

Hodenvenen nachgewiesen werden konnte. Daraus wurde gefolgert, dass Leydig-Zellen entweder sehr empfindlich auf LH-Stimulation reagieren oder dass Endothelzellen die Wirkung von LH auf die Leydig-Zellen modifizieren. Letzteres ist von Setchell und Palombi (2004) in einem Zellkultur-Experiment untersucht worden: Die Produktion von Testosteron durch die Leydig-Zellen war in Abwesenheit der Endothelzellen viel geringer als in ihrer Anwesenheit, was auf einen stimulierenden Effekt der Endothelzellen auf die Testosteron-Produktion hinweisen könnte.

Für Testosteron bilden die Endothelzellen ebenfalls eine Barriere zwischen der interstitiellen Flüssigkeit und der systemischen Zirkulation im Blut (Setchell 2004). Des weiteren scheinen Leydig-Zellen auch einen Einfluss auf Endothelzellen auszuüben. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist von Ergün et al. (1997) sowie von Marti und Risau (1998) im Hodengewebe nachgewiesen worden. Es handelt sich beim VEGF um einen potenten mitogenischen Wachstumsfaktor für Endothelzellen (Gospodarowicz et al. 1989, Senger et al. 1993, Conn et al. 1990). Collin und Bergh (1996) bestätigten die Wechselwirkungen zwischen Leydig-Zellen und Endothelzellen. Sie wiesen ferner den immunoreaktiven VEGF (irVEGF) in Leydig-Zellen und in Makrophagen in Rattenhoden nach. Daraus folgerten sie, dass Leydig-Zellen angiogenetische Faktoren sezernieren und Ausgangspunkt von Entzündungsmediatoren sind, die im Hoden nach Behandlung mit hCG produziert werden. Anand et al. (2003) gelang es, die VEGF Produktion von Leydig Zellkulturen in vitro zu demonstrieren. Die jüngere Studie von Rudolfsson et al. (2004) zeigte einen Anstieg der testikulären Sekretion von VEGF durch hormonelle Stimulation von Leydig-Zellen, sowie die Regulation der Proliferation von Endothelzellen im Rattenhoden durch VEGF.

4.6 Zellkontakte im Senium

Im Senium der Ratte, nach dem Abschluss des zweiten Lebensjahres, fanden sich zahlreiche Beobachtungen aus den vorangegangenen Altersgruppen wieder wie die Anordnung der reifen ALCs in der Umgebung von Blutgefäßen, in der Nähe von Fibrozyten, sowie gap junctions zwischen zwei Leydig-Zellen. Zusätzlich bestand weiterhin die enge räumliche Beziehung zwischen Leydig-Zellen und Makrophagen. Damit bestätigt die vorliegende Arbeit die ultrastrukturellen Daten von Giannessi et al. (2005) auf Leydig-Zellen in alternden Mäusen: Testikuläre Makrophagen verblieben in enger Nachbarschaft von Leydig-Zellen, wobei wie in den hier beschriebenen Befunden Digitationen zwischen testikulären Makrophagen und Leydig-Zellen nicht beobachtet wurden. Giannessi et al. (2005) fanden, dass testikuläre Makrophagen lipidhaltige Vakuolen und Lipofuscingranula enthielten wie die Leydig-Zellen. Alternde Leydig-Zellen unterlaufen eine Involution ihres Inhaltes an Organellen, sowie eine Abnahme in ihrer endokrinen Aktivität (Miquel et al. 1978, Schulze 1984, Paniagua et al. 1986; Chen et al. 1996; Zirkin and Chen 2000).

Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Die oben beschriebenen Zellkontakte zeigen eine enge morphologische Beziehung von Leydig-Zellen mit anderen Leydig-Zellen über Interzellularbrücken, gap junctions und coated pits, sowie mit Makrophagen über Zellausläufer. Diese Strukturen könnten möglicherweise das morphologische Korrelat für eine interzelluläre Kommunikation der interstitiellen Zellen im Rattenhoden darstellen.

Als Ausblick auf zukünftige Untersuchungen seien hier folgende Anmerkungen erwähnt:

- 1) Die Interzellularbrücken zwischen benachbarten Leydig-Zellen sind hier erstmalig beschrieben worden. Ihre möglichen Funktionen wie Transportweg für den Austausch von Nährstoffen, chemischen Signalen oder Zellorganellen (s. Arbeit von Ventelä et al. 2003) können mit Hilfe von immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden erforscht werden.
- 2) Nachdem in der vorliegenden Arbeit gap junctions von unterschiedlicher Morphologie von der Geburt bis zum Senium beobachtet wurden, wäre es interessant, ergänzend und vertiefend mittels immunhistochemischer und molekularbiologischen Methoden nachzuweisen, ob und welche Proteine, z.B. Connexine, der variablen Morphologie zugrunde liegen. Connexine besitzen zell- und differenzierungstypische Sequenzunterschiede mit zum Teil erheblichen Molekulargewichtsunterschieden (Drenckhahn 2003).
- 3) Untersuchungen von coated pits auf der Oberfläche von Leydigzellen wurden von Ghinea et al. (1992, 1994) sowie Ghinea und Milgrom (1995) durchgeführt: Sie beobachteten Rezeptormoleküle des Humanen Choriongonadotropin (hCG) in Leydig-Zellen und in der Transzytose durch Endothelzellen. Dieses Transportsystem fanden sie auch für anti-LH(Luteinisierendes Hormon)/hCG Rezeptor- Antikörper in den interstitiellen Raum. Da der hCG/LH Rezeptor an der Regulation der Steroidogenese

beteiligt ist und Cholesterol, die Hauptquelle der Androgenbiosynthese in der Leydig Zelle, über coated pits transportiert wird (Freeman und Rommerts 1996), wäre es interessant die Steroidogenese unter besonderer Berücksichtigung der coated pits zu untersuchen.

- 4) Über die Interaktionen zwischen Leydig-Zellen und Makrophagen liegen bereits zahlreiche Arbeiten vor. Oft wurden jeweils Makrophagen- und Leydig-Zellkulturen isoliert und die sezernierten Substanzen identifiziert: In vitro konnte dann der Einfluss der von Makrophagen sezernierten Substanzen auf Leydig-Zellen und umgekehrt gezeigt werden (s. Übersichtsarbeit von Hutson 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden wiederholt Vesikel in dem Interzellularraum zwischen Makrophagen und Leydig-Zellen beobachtet. Beide Zelltypen wiesen ferner coated pits auf. Die Aufnahme und der Austausch von Substanzen über coated pits und Vesikel zwischen Makrophagen und Leydig-Zellen bedürfen noch eingehender Untersuchungen.

5. Literatur

- Anand RJK, Paust HJ, Altenpohl K, Mukhopadhyay AK (2003) Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Production by Leydig Cells In Vitro: The Role of Protein Kinase A and Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Biol Reprod* 68: 1663-1673
- Drenckhahn D. Oberflächendifferenzierungen der Zelle. In: Benninghoff A, Drenckhahn D. *Anatomie – Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie* Bd. 1. München, Jena: Urban & Fischer Verlag; 2003: 24-31
- Chen H, Luo L, Zirkin BR. Leydig cell Structure and Function During Aging. In: Payne AH, Hardy MP, Russel LD. *The Leydig Cell*. Vienna, IL: Cache River Press; 1996: 221-230
- Chen JJ, Lukyanenko Y, Hutson JC (2002) 25-Hydroxycholesterol Is Produced by Testicular Macrophages During the Early Postnatal Period and Influences Differentiation of Leydig Cells In Vitro. *Biol Reprod* 66: 1336-1341
- Collin O, Bergh A (1996) Leydig cells secrete factors which increase vascular permeability and endothelial cell proliferation. *Int J Androl* 19: 221-228
- Conn G, Bayne ML, Soderman DD, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM, Hope DA, Thomas KA (1990) Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2628-2632
- Dym M, Fawcett DW (1971) Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod* 4(2):195-215
- Ergün S, Kilic N, Fiedler W, Mukhopadhyay AK (1997) Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol* 131: 9-20
- Freeman DA, Rommerts FFG. Regulation of Leydig Cell Cholesterol Transport In: Payne AH, Hardy MP, Russel LD. *The Leydig Cell*. Vienna, IL: Cache River Press; 1996: 231-240

Gaytan F, Bellido C, Aguilar E, van Rooijen N (1994a) Requirement for testicular macrophages in Leydig cell proliferation and differentiation during prepubertal development in rats. *Reprod Fertil* 102 (2): 393-399

Gaytan F, Bellido C, Morales C, Reymundo C, Aguilar E, van Rooijen N (1994b) Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethylene dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of Leydig cells in the adult rat. *J Androl* 15: 558-564

Gaytan F, Bellido C, Morales C, Reymundo C, Aguilar E, van Rooijen N (1994c) Selective depletion of testicular macrophages and prevention of Leydig cells repopulation after treatment with ethylene dimethane sulphonate (EDS) in rat. *J Reprod Fertil* 101: 171-182

Gaytan F, Bellido C, Morales C, Reymundo C, Aguilar E, Rooijen N (1995a) Response to Leydig cell apoptosis in the absence of testicular macrophages. *J Reprod Immunol* 29: 81-94

Gaytan F, Bellido C, Morales C, van Rooijen N, Aguilar E (1995b) Roles of testicular macrophages in the response of Leydig cells to gonadotrophins in young hypophysectomized rats. *J Endocrinol* 147: 463-471

Gaytan F, Bellido C, Morales C, Garcia M, van Rooijen N, Aguilar E (1996) In vitro manipulation (depletion versus activation) of testicular macrophages: central and local effects. *J Endocrinol* 15: 57-65

Ge, RS, Dong Q, Sottas CH, Papadopoulos V, Zirkin BR, Hardy MP (2006) In search of rat stem Leydig cells: Identification, isolation, and lineage-specific development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8):2719-2724

Ghinea N, Vu Hai MT, Groyer-Picard MT, Houllier A, Schoevaert D, Milgrom E (1992) Pathways of Internalization of the hCG/LH Receptor: Immunoelectron Microscopic Studies in Leydig Cells and Transfected L-Cells. *J Cell Biol* 118(6): 1347-1358

Ghinea N, Vu Hai MT, Groyer-Picard MT, Milgrom E (1994) How Protein Hormones Reach Their Target Cells. Receptor-mediated Transcytosis of hCG through Endothelial Cells. *J Cell Biol* 125(1):87-97

Ghinea N, Milgrom E (1995) Transport of protein hormones through the vascular endothelium. *J Endocrinol* 145 (1):1-9

Giannessi F, Giambelluca MA, Scavuzzo AM, Ruffoli R (2005) Ultrastructure of Testicular Macrophages in Aging Mice. *J Morphol* 263: 39-46

Gonzalez-Herrera IG, Prado-Lourenco L, Pileur F, Conte C, Morin A, Cabon F, Prats H, Vagner S, Bayard F, Audigier S, Prats AC (2006) Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *FASEBJ* 20(3): 476-478

Gospodarowicz D, Abraham JA, Schiling J (1989) Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7311-7315

Haider SG, Laue D, Schwochau G, Hilscher B (1995) Morphological studies on the origin of adult-type Leydig cells in rat testis. *It J Anat Embryol* 100 (Suppl. 1): 535-541

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, Servos G (1998) Ultracytochemistry of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. *Anat Embryol* 198: 101-110

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

Hales DB. Leydig Cell-Macrophage Interactions: An Overview In: Payne AH, Hardy MP, Russel LD. *The Leydig Cell*. Vienna, IL: Cache River Press; 1996: 451-466

Hales DB (2002) Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol* 57: 3-18

Hamer GT, Roepers- Gajadien HL, Gademan IS, Kal HB, Rooij DG (2003) Intercellular bridges and apoptosis in clones of male germ cells. *Int J Androl* 26: 348-353

Handagama SMLCM, Ariyaratne HBS (2001) Differentiation of the Adult Leydig Cell Population in the Postnatal Testis. *Biol Reprod* 65:660-671

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

Huckins C (1978) Spermatogonial intercellular bridges in whole-mounted seminiferous tubules from normal and irradiated rodent testes. *Am J Anat* 153: 97-121

Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ (1992) Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med* 201(2):125-40

Huleihel M, Lunenfeld E (2004) Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl* 6(3):259-68

Hutson JC (1992) Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell Tiss Res* 267: 385-389

Hutson JC (2006) Physiologic Interactions Between Macrophages and Leydig Cells. *Exp Biol Med* 231:1-7

Ichihara I, Kawamura H, Pelliniemi LJ (1993) Ultrastructure and morphometry of testicular Leydig cells and the interstitial components correlated with testosterone in aging rats. *Cell Tiss Res* 271: 241-255

Kuopio T, Pelliniemi LJ (1989a) Patchy basement membrane of rat Leydig cells shown by ultrastructural immunolabeling. *Cell Tiss Res* 256: 45-51

Kuopio T, Tapaniainen J, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I (1989b) Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development* 107:213-220

Larsen WJ (1983) Biological Implications of Gap Junction Structure, Distribution and Composition: a Review. *Tiss Cell* 15: 645-671

von Leydig, F (1850) Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Anldrüsen der Säugetiere. Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie 2: 1-57

Lejeune H, Habert R, Saez JM (1998) Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. J Mol Endocrinol 20: 1-25

Lukyanenko YO, Chen JJ, Hutson JC (2001) Production of 25-Hydroxycholesterol by Testicular Macrophages and Its Effects on Leydig Cells. Biol Reprod 64: 790-796

Lukyanenko YO, Chen, JJ, Hutson JC (2002) Testosterone Regulates 25-Hydroxycholesterol Production in Testicular Macrophages. Biol Reprod 67: 1435-1438

Majdic G, Saunders PT, Teerds KJ (1998) Immunoeexpression 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 Reprod 58(2):520-5

Marti HH, Risau W (1998) Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15809-15814

Mauduit C, Goddard I, Besset V, Tabone E, Rey C, Gasnier F, Dacheux F, Benahmed M (2001) Leukemia inhibitory factor antagonizes gonadotropin induced-testosterone synthesis in cultured porcine Leydig cells: sites of action. Endocrinology 142(6):2509-20

Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB (2001). Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. Biol Reprod 65: 660 - 671

Miething A (1991) Intercellular bridges between megalospermatocytes in the human testis. Androl 23: 91-97

Miquel J, Lundgren PR, Johnson JE Jr. Spectrophotofluorometric and electron microscopic study of lipofuscin accumulation in the testis of aging mice. J Gerontol. 1978; 33:3-19

Nes WD, Lukyanenko YO, Jia ZH, Quidea S, Howald WN, Pratum T, West R, Hutson JC (2000) Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. *Endocrinology* 14: 953-958

Paniagua R, Amat P, Nistal M, Martin A (1986) Ultrastructure of Leydig cells in human ageing testes. *J Anat* 146: 173-183

Pollard TD, Earnshaw WC. Intercellular Junctions In Pollard TD, Earnshaw WC. *Cell Biology*. SAUNDERS An Imprint of Elsevier Science, Philadelphia; 2002: 525-534

Ren HP, Russell LD (1991) Clonal development of interconnected germ cells in the rat and its relationship to the segmental and subsegmental organization of spermatogenesis. *Am J Anat* 192: 121-128.

Risbridger GP, Skinner MK (1992) Evaluation of the effect of peritubular cell secretions and the testicular paracrine factor P-Mod-S on Leydig cell steroidogenesis and immunoreactive inhibin production. *Int J Androl* 15(1): 73-83

Rodriguez JB, Garcia CM (1999) Apoptosis Is Physiologically Restricted to a Specialized Cytoplasmic Compartment in Rat Spermatids. *Biol Reprod* 61:1541-1547

Rudolfsson SH, Wikström P, Jonsson A, Collin O, Bergh A (2004) Hormonal Regulation and Functional Role of Vascular Endothelial Growth Factor A in the Rat Testis. *Biol Reprod*. 70: 340-347.

Russell LD, Vogl AW, Weber JE (1987) Actin localization in male germ cell intercellular bridges in the rat and ground squirrel and disruption of bridges by cytochalasin D. *Am J Anat* 180(1):25-40

Russell LD. Mammalian Leydig Cell Structure. In: Payne AH, Hardy MP, Russel LD. *The Leydig Cell*. Vienna, IL: Cache River Press; 1996: 43-96

Saez JM (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocrine Reviews* 15: 574- 626

Schulze C. Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 1984; 88:1-104.

Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF (1993) Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12: 303-324

Setchell BP, Pakarinen P, Huhtaniemi I (2002) How much LH do the Leydig cells see? *J Endocrinol* 172(2): 375-82

Setchell BP (2004) Hormones what the testis really sees. *Reprod Fertil Dev.* 16(5):535-45

Setchell BP, Palombi F (2004) Isolation of endothelial cells from the rat testis, and their effect of testosterone secretion by interstitial cells. 13th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis in Dunblane, Scotland. Abstract C6.

Shan LX, Hardy MP (1992) Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. *Endocrinology* 131(3):1107-14

Shan LX, Phillips DM, Barding and Hardy MP (1993) Differential regulation of steroidogenic enzymes during differentiation optimizes testosterone production by adult rat Leydig cells. *Endocrinology* 133: 2277-2283

Shan LX, Bardin CW, Hardy MP (1997) Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology* 138(3):1259-66

Sharpe RM, Maddocks S, Kerr JB (1990) Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement. *Am J Anat* 188(1):3-20

Sivan BL, Bloch CL, Gutnick MJ, Fleidervish IA (2005) Electrotonic Coupling in the Anterior Pituitary of a Teleost Fish. *Endocrinol* 146(3): 1048-1052

Skinner MK, Fritz IB (1985) Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen that modulates Sertoli cell functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(1):114-8

Skinner MK (1991) Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev* 12:45-77

Svechnikov KV, Sultana T, Söder O (2001) Age-dependent stimulation of Leydig cell steroidogenesis by interleukin-1 isoforms. *Mol and Cell Endocrinol* 182: 193-201

Ventelä S, Toppari J, Parvinen M (2003) Intercellular Organelle Traffic through Cytoplasmic Bridges in Early Spermatids of the Rat: Mechanisms of Haploid Gene Product Sharing. *Mol Biol Cell* 14: 2768-2780

Tran N, Servos G, Haider SG (2006) Ultrastructure of Cell Contacts of Fetal and Adult Leydig Cells in the Rat: a systematic study from birth to senium. *Anat Embryol* 211: 273-82

Weber JE, Russell LD (1987) A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *Am J Anat* 180:1-24

Wrobel KH, Sinowatz F, Mademann R (1981) Intertubular Topography in the Bovine Testis. *Cell Tissue Res* 217:289-310

Yoshimura K, Kaji H, Kamindono S, Chihara K (1994) Expression of basic fibroblast growth factor (FGF-2) messenger ribonucleic acid is regulated by testosterone in the rat anterior pituitary. *Growth Factors* 10(4):253-8

Ziegler HG, Haider SG, Passia D, Hilscher W (1983) Enzymehistochemical and morphometrical studies on delta5-3 β -hydroxysteroid-dehydrogenase during the fetal and neonatal development of rat Leydig cells. *Andrologia* 15: 392-7

Zirkin BR, Chen H (2000) Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol Reprod* 63: 977-981

6. Zusammenfassung

Name der Doktorandin: Hien Nicole Tran

Titel: Ultrastruktur der Zellkontakte der Fetaltyp- und Adulttyp-Leydig-Zellen in der Ratte: Eine systematische Untersuchung von der Geburt bis zum Senium

Die Differenzierung, die Entwicklung und Funktion von Leydig-Zellen im Hoden werden von vielen Zellen beeinflusst, unter anderem Makrophagen, Gefäßendothelzellen und peritubulären Zellen im Hoden. **Ziel** der vorliegenden Arbeit war es, die möglichen morphologischen Korrelate für interzelluläre Kommunikation in Rattenhoden systematisch von der Geburt bis zum Senium ultrastrukturell zu untersuchen.

Material und Methodik: Dazu wurden Ultradünnschnitte des Hodengewebes von Wistarratten der folgenden ausgewählten Alterstufen hergestellt und elektronenmikroskopisch betrachtet:

1. Postnataltag (pnd), 5. pnd, 10. pnd, 15. pnd, 20. pnd, 30. pnd, 50. pnd, 100. pnd, nach Abschluss des 2. Lebensjahres.

Zur Darstellung der Fetaltyp-Leydig-Zellen (FLCs) wurden die ersten drei Termine gewählt. Die Auswahl der weiteren Termine erfolgte unter der Berücksichtigung der Unterteilung der postnatalen Differenzierung der Adulttyp-Leydig-Zellen (ALCs) in 3 Stadien: 15. und 20. pnd für das Vorläufer-Stadium (progenitor stage: 14.-28. pnd), 30. und 50. pnd für das unreife Stadium (immature stage: 28.-56. pnd), 100. pnd und 2 Jahre alt für das reife Stadium (mature stage: > 56. pnd).

Befunde: Die zum ersten Mal dargestellten Ergebnisse sind: 1. das Vorkommen von *Interzellularbrücken* mit kontinuierlichem Zytoplasma zwischen Leydig-Zellen in der frühen postnatalen Periode und 2. drei unterschiedlich strukturierte Muster von *gap junctions* zwischen benachbarten Leydig-Zellen. *Gap junctions* wurden in den folgenden Alterstufen beobachtet: 1., 5., 20., 25., 30., 50. und 100. pnd, sowie im Senium (2 Jahre). Diese drei Muster sind: **1)** *Gap junctions* zwischen zwei FLCs eines Clusters am 1. und 5. pnd sowie zwischen unreifen ALCs am 30. pnd nahmen nur einen Teilbereich der über eine lange Strecke angrenzenden Zellmembranen ein. **2)** Die Zellmembranen von Vorläufern von ALCs und unreifen ALCs näherten sich nahezu ausschließlich an der *gap junction* an. **3)** Am 50. pnd und im Senium trafen benachbarte Leydig-Zellen in einer besonderen *gap junction* mit einem langen zentral gelegenen Spalt mit kleinen elektronendichten Strukturen an beiden Enden aufeinander. *Coated pits* wurden erstmalig am 30. pnd auf der Oberfläche der Zellmembranen von unreifen ALCs beobachtet. Ab dem 50. pnd, befanden sich Makrophagen und Leydig-Zellen in enger räumlicher Beziehung zu einander: Die Zellausläufer von Leydig-Zellen erstreckten sich bis in die Öffnungen der *coated pits* bzw. der tiefen Invaginationen von benachbarten Makrophagen. Bei den Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden häufig FLC Cluster und unreife ALCs in enger *Nachbarschaft von Blutkapillaren* beobachtet, wobei die Blutgefäße teilweise von den Leydig-Zellen umschlossen wurden..

Schlussfolgerung: Die hier erstmalig vorgestellten Interzellularbrücken zwischen Fetaltyp-Leydig-Zellen lassen eine mögliche funktionelle Synchronisation von miteinander in Kontakt stehenden Leydig Zellen vermuten. Die Funktion der beobachteten Zellkontakte liegt möglicherweise darin, die morphologischen Voraussetzungen für eine präzise Kommunikation zwischen Leydig-Zellen untereinander sowie mit anderen interstitiellen Zellen zu schaffen.

7. Danksagung

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

Frau G. Servos danke ich für die hingebungsvolle Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie und für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Frau G. Berthold danke ich für die technische Unterstützung und die anregenden Gespräche.

Persönlich möchte ich mich herzlich bei meiner Familie bedanken, meinen Eltern, Dung My Tran-Lai und Dr. med. Huu Tho Tran, sowie meinen Schwestern, Gabriele und Stephanie Tran, für ihre geduldige und liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen.

8. Lebenslauf

Hien Nicole Tran

Beruflicher Werdegang

2001 bis 2007	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2003	Physikum
2006 / 2007	Praktisches Jahr
November 2007	2. Ärztliche Prüfung nach neuer Approbationsordnung
seit 1.12.2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Anatomie II, Unversitätsklinikum Düsseldorf

Publikationen

- Tran, N, Servos G, Haider SG: Ultrastructure of cell contacts of fetal and adult Leydig cells in the rat: a systematic study from birth to senium. *Anat Embryol* (2006) 211, 273-282.
- Tran N, Servos G, Haider SG: Existence of intercellular bridges between fetal Leydig cells during early postnatal period in rat. 14th European Testis Workshop (2006) Miniposter 89.
- Haider, SG, Servos G, Tran, N: Histological and structural analysis of steroidogenic function of Leydig cells. In: *Leydig Cell in Health and Disease*. (Hrsg.: Hardy MP, Payne AH), Humana Press, Totowa, New Jersey, 2007: 35-47.