Aus dem Institut für Anatomie I: Zelluläre Neurobiologie (Direktor: Prof. Dr. G. M. Rune) Zentrum für Experimentelle Medizin Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Hyperplasie der Leydigzellen. Strukturelle und immunhistochemische Charakterisierung der hyperplastischen Leydigzellen im menschlichen Hoden

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ranja Lüdtke aus Hamburg

Hamburg, 2007

Angenommen von dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 05.11.2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Davidoff

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. A-F. Holstein

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Meiner geliebten Großmutter Mariam, die immer *mein Berg* war und es auf ewig bleiben wird.

الى جدتي مريم، التي أحبها فوق كل قدر أنت مَثلي الأعلى، كنت لي جبلا وستبقين أبدا ً جبلي

Inhaltsverzeichnis

1.	Einl	leitun	g	6
	1.1.	Allge	meine Besonderheiten und Herkunft der Leydigzellen	6
	1.2.	Нуре	erplasie und Tumore der Leydigzellen	8
	1.3.	Prolif	eration der Leydigzellen	13
	1.4.	Leyd	igzelltumore bei Menschen	14
2.	Ziel	der A	Arbeit	18
3.	Mat	erial ı	und Methoden	19
	3.1.	Mate	rial	19
	3.1	.1.	Untersuchungsgut	19
	3.1	.2.	Geräte	20
	3.1	.3.	Puffer und Lösungen	20
	3	3.1.3.2 3.1.3.3	 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie Puffer für die Proteinpräparation aus Gewebe (Homogenisieren) Lösungen für die Proteinbestimmung aus Homogenaten Puffer und Lösungen für die Elektrophorese und Western-Blot-Analyse . Antikörper und Färbekomplexe 	22 22 23
		3.1.4.2	Antikörper und Färbekomplexe für die Immunhistochemie Antikörper und Färbekomplexe für die Western-Blot-Analyse Lösung zur Visualisierung der Peroxidase	32
	3.1	.6.	Röntgen- (X-Ray) Film	34
	3.2.	Meth	oden	34
	3.2	2.1.	Paraffinschnitt	34
		3.2.1.2	Hämalaun-Eosin-Färbung Immunhistochemischer Nachweis von Antigenen Elektronenmikroskopie	35
	3.2	2.3.	Proteinpräparation aus Geweben	38
		3.2.3.1 2.4.	Bestimmung der Proteinkonzentration der Homogenate Elektrophorese und Western-Blot	

3.2.4. 3.2.4.		
4. Ergebnis	sse	43
4.1. Para	affinschnitt-, Semidünnschnitt-Histologie und Elektronenmikroskopie	43
4.2. Hyp	erplasie und Tumore der Leydigzellen	52
4.2.1.	Leichte Hyperplasie	52
4.2.2.	Starke Hyperplasie	57
4.2.3.	Leydigzelltumore	57
4.3. Imm	nunhistochemie der Leydigzellen des menschlichen Hodens	66
4.3.1.	Neuronale und neuroendokrine Markersubstanzen	70
4.3.2.	Neurotrophe Faktoren und Zytokine mit neurotropher Wirkung	76
4.3.3.	Enzyme der Katecholaminsynthese	86
4.3.4.	Calciumbindende Proteine	86
4.3.5.	Proteine der synaptischen Vesikel	92
4.3.6.	Zelladhäsionsmoleküle	92
4.3.7.	Antigene der Gliazellen	92
4.3.8.	Substanzen der Steroidogenese	100
4.4. Wes	stern-Blot Analysen	103
5. Diskuss	ion	107
5.1. Die	normalen-, die hyperplastischen- und neoplastischen Leydigzellen	107
5.1.1.	Vorteile bei der Untersuchung von großen Hodenarealen in Paraffin	schnitten
	und Semidünnschnitten im Vergleich zu Hodenbiopsien	107
5.1.2.	Tierische versus menschliche Leydigzell-Hyperplasien und -Tumore	e107
5.1.3.	Die Leydigzellen: eine heterogene Zellpopulation im Hoden	108
5.1.4.	Wechselwirkungen zwischen der Leydigzellhyperplasie und dem Zu	ıstand der
	Spermatogenese	109
5.1.5.	Hyperplasie oder Hypertrophie der Leydigzellen?	110
5.1.6.	Hyperplasie der Leydigzellen ohne Zellteilung?	112
5.2. Herl	kunft der normalen Leydigzellen und ihre Ähnlichkeit mit den hyperpla	stischen
Forr	men und den Tumoren	113

5.3. lm	munhistochemie der Leydigzellen des menschlichen Hodens	114
5.3.1.	Neuronale und neuroendokrine Markersubstanzen	114
5.3.2.	Neurotrophe Faktoren und Zytokine mit neurotropher Wirkung	116
5.3.3.	Enzyme der Katecholaminsynthese	118
5.3.4.	Calciumbindende Proteine	119
5.3.5.	Proteine der synaptischen Bläschen	121
5.3.6.	Zelladhäsionsmoleküle	122
5.3.7.	Antigene der Gliazellen	122
5.3.8.	Enzyme der Steroidsynthese	122
5.4. Sc	nlußfolgerungen	123
6. Zusamı	nenfassung	125
7. Literatu	ırverzeichnis	128
8. Danksa	gung	142
9. Lebens	lauf	143
10. Erklär	ung	144

Abkürzungsverzeichnis

°C Grad Celsius

µg Mikrogramm

µl Mikroliter

µm Mikrometer

3ß-HSD 3 beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase

A2B5 Antigen A2B5

AADC Aromatische L-Aminosäuredekarboxylase

ABC Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex

BCA Bicinchoninsäure

BMP 6 Bone Morphogenetic Protein 6

BSA Bovine Serum Albumin

CNPase 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase Cyt P 450scc Cytochrom P 450 side chain cleavage enzyme

DAB 3,3'Diaminobenzidin

DBH Dopamine-beta-hydroxylase

DBP Di (n-Butyl) Phtalat

DEHP Di (2-ethylhexyl) Phtalat

DTT Dithiothreitol

EDS Ethane dymethanesulfonate
EDTA Ethylendiamintetraacetat
FGF-beta Fibroblast Growth Factor beta
FSH Follikel stimulierendes Hormon

g Gramm

GAP 43 Growth-associated protein 43

GDNFR alfa Glial cell-derived neurotrophic factors receptor alfa

GFAP Glial fibrillary acidic protein

hCG Humanes Chorion Gonadotropin

kDA Kilo Dalton Ki-67 Antigen Ki-67

LDL Low density lipoprotein
LH Luteinisierendes Hormon

LHRH Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon

mA Milli Amper
mg Milligramm
Min Minute(n)
ml Milliliter
mM Millimol

mm Millimeter

mRNA Messenger RNA

N CAM

Neural cell adhesion molecule

NF 160

Neurofilamentprotein 160 kDA

NF 200

Neorofilamentprotein 200 kDA

NGFRp 75 Nerve growth factor receptor protein 75

nm Nanometer

NOS I Nitric oxide synthase I
NSE Neuron specific enolase

NT 3 Neurotrophin 3 NT 4 Neurotrophin 4

O4 Oligodendrozytenmarker 4
PAP Peroxidase-anti-Peroxidase

PB Phosphatpuffer

PBS Kochsalz-Phosphatpuffer

PCNA Proliferating Cell Nuclear Antigen

PNMT Phenylethanolamin N-Methyltransferase

Rpm Drehungen pro minute

RT-PCR Reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion

S 100 Protein S 100 Sc Score count

SCO Sertoli-cell-only-Syndrom SDS Sodium dodecylsulfat

SHBG Sexualhormonbindendes Globulin

SNAP 25 Synaptosome-associated protein 25 kDA

TBS Kochsalz-Tris Puffer

TEMED N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

TH Tyrosinhydroxylase
TNF Tumor Nekrose Faktor
Trk A Tyrosinkinase-Rezeptor A
Trk B Tyrosinkinase-Rezeptor B
Trk C Tyrosinkinase-Rezeptor C

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Besonderheiten und Herkunft der Leydigzellen

Leydigzellen Die des menschlichen Hodens sind postmitotische Zellen mit neuroendokrinen Eigenschaften. Durch die Produktion der männlichen Geschlechtshormone (Testosteron, Dehydrotestosteron u. a. m.) sind sie für Ablauf und Spermatogenese sowie für die Entwicklung männlichen Geschlechtsmerkmale und des männlichen Verhaltens von entscheidender Bedeutung. Zusätzlich zu den endokrinen Eigenschaften wurden neurale Eigenschaften der Leydigzellen entdeckt. So exprimieren die Leydigzellen im menschlichen Hoden eine große Anzahl von Antigenen, die charakteristisch für Nerven- und Gliazellen sind (Schulze et al. 1987; Davidoff et al. 1993, 1996, 1999, 2002, 2004; Middendorff et al. 1993; Müller et al. 2006). Diese Untersuchungen haben unzweifelhaft gezeigt, dass die Leydigzellen auch neuroendokrine Eigenschaften besitzen und stellen erneut die Frage über ihre Herkunft.

Die Leydigzellen befinden sich in Form von einzelnen oder unterschiedlich großen Gruppen (Aggregate) von Zellen im sogenannten intertubulären Raum des Hodens. Dieser Raum befindet sich zwischen den Hodenkanälchen und wurde früher als interstitieller Raum bezeichnet. Die Leydigzellen liegen häufig in unmittelbarer Nähe von Blutgefäßen. Mehrere Leydigzellen werden von einer besonderen Zellart, den sogenannten Co-Zellen umgeben, die zum Teil Eigenschaften von Gliazellen besitzen (Holstein and Davidoff 1997). Die Leydigzellen des menschlichen Hodens zeigen eine sehr deutliche Heterogenität, die ihre Größe (Mori and Christensen 1980), Form, Gestalt, färberischen Eigenschaften, Organellenbestand, Chemie, Funktionszustand und andere Eigenschaften betrifft.

Grundsätzlich kommen im Leben eines Individuums zwei Typen von Leydigzellen vor. Während der embryonalen Entwicklung entsteht der sogenannte fetale Typ der Leydigzellen und nach der Pubertät der sogenannte adulte Leydigzelltyp (Ge et al. 1996; Chemes 1996; Pelliniemi et al. 1996; Habert et al. 2001; Mendis-Handagama and Ariyaratne 2001; Haider 2004). Dieses Zweiphasenmodell ist typisch für die Leydigzellen der Nagetiere. Beim Menschen wird noch ein dritter Typ (Dreiphasenmodell), der

sogenannte neonatale oder unreife Typ Leydigzellen (neonatal/immature Leydig cell population) beschrieben (Ge et al. 1996; Prince 2001). Der neonatale Typ Leydigzellen wurde früher als infantiler Typ Leydigzellen beschrieben (Nistal et al. 1986). Es besteht die Vorstellung, dass die fetalen und die adulten Leydigzellen sich streng voneinander morphologisch, metabolisch und funktionell unterscheiden und eine unterschiedliche Herkunft haben (Haider et al. 1995; Ge et al. 1996; Haider and Servos 1998).

Die Herkunft der Leydigzellen ist bis zu diesem Zeitpunkt weitgehend ungeklärt. Während die Vorläufer der fetalen Leydigzellen zur Zeit völlig unbekannt sind (es gibt Vermutungen, dass sie vom Mesonephron in den Hoden, oder vom Zölomepithel in das sich entwickelnde Hodenparenchym einwandern), gibt es für die Vorläufer der adulten Leydigzellen diverse Vermutungen, die fast alle Zelltypen im Hoden (mit Ausnahme der Keimzellen und der Sertoli-Zellen) betreffen (Benton et al. 1995; Ge et al. 1996; Davidoff et al. 1996; Ariyaratne et al. 2000; Habert et al. 2001; Brennan and Capel 2004). Dabei kommen mesenchymale, fibroblastische, peritubuläre myoide/fibroblastische Zellen sowie Makrophagen oder perivaskuläre fibroblastische Zellen in Betracht. Um diese Vielfalt zu vermeiden, findet in letzter Zeit ein Konsensus statt, bei welchem die vielen Vorläufer der Leydigzellen auf die undifferenzierten Mesenchymzellen reduziert werden. Da die Mesenchymzellen das embryonale Bindegewebe bilden und aus allen Keimblättern eines Embryos entstehen können, unterliegen sie im Gewebe keiner genauen Zuordnung und Definition (Ge et al. 1996). So ist die Benennung einer undifferenzierten Mesenchymzelle als Vorläuferzelle (Progenitorzelle) für die Leydigzellen ziemlich ungenau.

Neue experimentelle Untersuchungen bei der erwachsenen Ratte haben einen wesentlichen Schritt bei der Bestimmung der Vorläuferzelle des adulten Typs Leydigzellen erzielt (Davidoff et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass nach Zerstörung der vorhandenen Leydigzell-Population durch Ethane dymethanesulfonate (EDS) es zur Regeneration und Bildung einer neuen Population adulter Leydigzellen kommt. Die neuen Zellen entstehen durch einen Transdifferenzierungsvorgang, der sich durch die direkte Umwandlung der stammzellähnlichen Progenitorzellen in Leydigzellen auszeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Progenitorzellen um die Perizyten und die glatten Muskelzellen der Wand der kleinen Hodengefäße (Mikrovaskulatur) handelt. Interessant ist, dass die neugebildeten Leydigzellen sofort nach ihrer Entstehung ihre neuroendokrinen Eigenschaften bekommen (Davidoff et al. 2004). Die Progenitorzellen

der adulten Ratte exprimieren dabei vorübergehend das Filamentprotein Nestin, welches auch von den Stammzellen des Nervensystems während seiner Entstehung produziert wird (Lendahl et al. 1990; Sahlgren et al. 2001). Ähnlich wie im Nervensystem erfolgt in der ersten Woche nach der EDS-Zerstörung der Leydigzellen eine starke Proliferation der Stamm-bzw. Progenitorzellen. Ab dem 14. Tag nach der EDS-Behandlung beginnen die Progenitorzellen sich in Leydigzellen umzuwandeln (transdifferenzieren) und erreichen einen Gipfel am 21. Tag. Einige der neu entstandenen Leydigzellen teilen sich noch einmal. Dadurch wird die notwendige Anzahl dieser Zellen im Hoden erreicht. Nach diesen Ereignissen verlieren die Leydigzellen ihre Fähigkeit sich zu teilen und werden postmitotisch (Hardy et al. 1989; Teerds et al. 1989; Vergouwen et al. 1991; Benton et al. 1995). Die Anzahl der Leydigzellen bleibt dann im Laufe des Lebens im gesunden Hoden relativ konstant. Das bedeutet, dass fehlerhafte oder absterbende (abgenutzte) Levdigzellen ständig durch eine Transformation (nicht durch Zellteilung) von Progenitorzellen ersetzt werden (Davidoff et al. 2004). Dieser Vorgang scheint auch für die Leydigzellen des menschlichen Hodens gültig zu sein. Die Regulationsmechanismen der Aufrechterhaltung der Anzahl der Leydigzellen sind im Allgemeinen unbekannt. Es scheint jedoch möglich, dass bestimmte Faktoren, die zum Teil von den Sertoli-Zellen oder den Leydigzellen selbst produziert und in ihre Umgebung abgesondert werden, eine wichtige Rolle bei ihrer Vermehrung und dabei bei der Aufrechterhaltung der Anzahl der Leydigzellen beim erwachsenen Individuum spielen (Sharpe 1994; Davidoff et al. 2004).

1.2. Hyperplasie und Tumore der Leydigzellen

Unter bestimmten, zum großen Teil unbekannten Bedingungen werden im Hoden einiger Tiere und des Menschen größere Ansammlungen von Leydigzellen gebildet, die in der Regel als benigne (gutartige) Hyperplasien und Tumore bezeichnet werden (Prentice and Meikle 1995; Cook et al. 1999). Die Ansammlungen der Leydigzellen kommen in Form von unterschiedlich großen Aggregaten oder Plaques, die von einigen Forschern "Micronoduli" genannt werden, vor (Holm et al. 2003). Es ist seit Langem bekannt, dass eine Leydigzellhyperplasie physiologisch während der frühen embryonalen Entwicklung des Hodens vorkommt (Murray et al. 2000). Aber auch weitere Zustände sind durch Hyperplasie Leydigzellen gekennzeichnet, zum Beispiel Kryptorhydismus, der Hodenatrophie, Klinefelter-Syndrom, Androgeninsensitivitäts-Syndrom, testikuläre

Feminisierung, einige Formen der gestörten Spermatogenese, erhaltene Spermatogenese mit erhöhten Werten des FSH, bis auf dem "Sertoli-cell-only"-Syndrom und bei Frühformen der intratubulären Tumorzellen (Gotoh et al. 1984; Gondos 1987; Holm et al. 2003; Piolat et al. 2003). Dirami et al. (1996), Cook et al. (1999) und Holm et al. (2003) vermuten, dass die Hyperplasie der Leydigzellen einen Vortumorzustand darstellt, da sich hyperplastische Plaques allmählich zu Tumoren differenzieren können. Die hyper- und neoplastischen Leydigzellen zeigen eine gestörte Exprimierung von Steroidhormonrezeptoren und intermediären Filamenten (Düe et al. 1989).

Die Mechanismen der Entstehung von Leydigzellhyperplasien und Tumoren sind zum großen Teil unbekannt. Experimentelle Untersuchungen bei Tieren und Einzelnuntersuchungen beim Menschen haben gezeigt, dass es eine Reihe von Stoffen gibt, die, wenn sie in bestimmten Mengen verabreicht werden, zu Hyperplasien oder Tumoren der testikulären Leydigzellen führen (Prentice and Meikle 1995; Cook et al. 1999). Zu diesen Faktoren gehören z.B. Hormone wie hCG/LH, Prolaktin, Estrogene, Testosteron (Maddock and Nelson 1952; Lamano-Carvalho et al. 1987; Leon et al. 1987; Prahalada et al. 1994; Prentice and Meikle 1995; Dirami et al. 1996; Cook et al. 1999; Widmark et al. 1987; Maddocks and Sharpe 1989, Schultz et al. 2001) sowie Wachstumsfaktoren (TNF) (Mazzocchi et al. 1990), Katecholamine (Dopamin) (Dirami et al. 1996), toxische Stoffe wie Di(n-butyl) Phthalat (Akingbemi et al. 2004; Mahood et al. 2005). Einige dieser Stoffe führen zur Blockierung von Membran-Rezeptoren oder einigen Stufen der biosynthetischen Vorgänge der Leydigzellen, was sich auf die Produktion der Androgene der Leydigzellen (Testosteron, Dehydrotestosteron) auswirkt und zur Erhöhung der Blutkonzentration der von der Hypophyse freigesetzten Gonadotrope-Hormone (z.B. LH) führt (Prahalada et al. 1994; Clegg et al. 1997). Das LH/hCG kann seinerseits zu Vermehrung der Anzahl der Leydigzellen (Hyperplasie) führen (Lamano-Carvalho et al. 1987). Dazu ist im Gegensatz bei der Behandlung von Mäusen Diethylstilbestrol, ein Agonist von Östrogen, in der Lage die Bildung eines Leydigzell-Tumors zu induzieren, ohne dabei zu einer erhöhten LH-Konzentration zu führen (Huseby and Samuels 1977; Huseby 1980; Navickis et al. 1981). Diese Behandlung kann zu einer Erhöhung der Östrogenrezeptoren in den Leydigzellen führen, die dann durch Östrogene zur verstärkten Bildung von hyperplastischen Leydigzellen stimuliert werden (Düe et al. 1989).

Allerdings zeigen die Ergebnisse speziesbedingte Besonderheiten (Navickis et al. 1981). Die Unterschiede bei der experimentellen und spontanen Tumorentstehung im Hoden sind

gut dokumentiert. Murakami et al. (1995) haben deutliche Unterschiede zwischen der Ratte und der Maus nach Gabe von Procymidon, ein Stimulator der LH Produktion, festgestellt. Bei der Ratte entwickelt sich ein Vorgang, der zuerst mit Bildung einer chronischen Hyperplasie der Leydigzellen einhergeht und später in eine benigne Tumorbildung übergeht. Bei der Maus kommt es weder zur Hyperplasie noch zur Tumorbildung. Auch konnte keine Erhöhung der Testosteronkonzentration bei der Maus registriert werden. Wesentliche Unterschiede bei der Entstehung der Hyperplasie und der Tumore der Leydigzellen existieren zwischen den experimentellen Tieren und dem Menschen (Prentice and Meikle 1995). Die letzteren Autoren betonen die allgemeine Auffassung, dass der Übergang von Leydigzellhyperplasie zum Leydigzelltumor einen Teil eines kontinuierlichen Spektrums von Veränderungen charakterisiert.

Es konnte dabei festgestellt werden, dass zwischen den Experimentaltieren und dem Menschen wesentliche Unterschiede existieren, so dass beim Menschen andere Mechanismen zur Entstehung der Hyperplasien bzw. Tumore vorkommen müssen. Ein wesentlicher Unterschied ist z.B. das Fehlen bzw. die sehr geringe Exprimierung von Rezeptoren für hCG und LH im Hoden des Menschen. Dies bedeutet, dass die Hormone, die bei der Ratte eine deutliche Wirkung zeigen, im menschlichen Hoden keine oder nur geringe Veränderungen hervorrufen (Prentice and Meikle 1995; Cook et al. 1999).

Bezüglich der Zunahme der Leydigzellmasse im intertubulären Raum gibt es in der Literatur widersprüchliche Vorstellungen. So behaupten einige Autoren, dass es sich bei diesen Vorgängen um eine Hypertrophie (Heller and Leach 1971; Tash et al. 2002) der Leydigzellen handelt. Andere betonen, dass es sich um Hyperplasien (Maddock and Nelson 1952; Chemes et al. 1976; Christensen and Peacock 1980) handelt, während eine dritte Gruppe eine Kombination von beiden festgestellt hat (Lamano-Carvalho et al. 1987; Dirami et al. 1996). Diese unterschiedlichen Ansichten können unterschiedliche Ursachen haben. Entweder sind für diese Diskrepanzen methodische Ursachen verantwortlich oder die Untersuchungen von Hodenbiopsien, die nur ein kleines Areal des tatsächlichen Hodengewebes zeigen, sind nicht in der Lage, die reale Situation wiederzuspiegeln. Es kann sich allerdings auch um reale Ergebnisse handeln, die durch unterschiedliche physiologische, pathologische oder experimentelle Zustände des untersuchten Hodenmaterials entstehen können. So haben z.B. Christensen und Peacock (1980) festgestellt, dass bei einer chronischen Behandlung von erwachsenen Ratten mit hCG

vermehrt größere Leydigzell-Aggregate gebildet werden. Diese Autoren zeigen, dass für die Vergrößerung der Aggregate der Leydigzellen die Hyperplasie eine wichtigere Rolle als die Hypertrophie der Leydigzellen spielt. Die 4.7-fache Vergrößerung des Volumens der Leydigzellaggregate in der 5. Woche der Behandlung besteht aus einer 3-fachen Vermehrung der Zahl der Leydigzellen und nur aus einer 1.6-fachen Vergrößerung der Levdigzellen. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass bei diesen Veränderungen sowohl eine Hyperplasie als auch eine Hypertrophie der Leydigzellen erfolgt. Es muss betont werden, dass die anderen Strukturkomponenten des Rattenhodens keine wesentlichen Veränderungen aufweisen. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit früheren Resultaten, die bei Menschen (Heller und Leach 1971) und bei Klipp- oder Wüstenschliefer (Neaves 1973) erzielt wurden, überein. In diesen Untersuchungen konnten die Autoren keine Veränderung der Zahl, jedoch eine Vergrößerung der Leydigzellen feststellen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können Ursachen haben, die speziesbedingt, hormonkonzentrationsbedingt oder methodischen Ursprungs sind. Christensen und Peacock (1980) fanden dabei eine interessante Gesetzmäßigkeit. Bei denen mit hCG-behandelten Leydigzellen kommt es trotz einer Herunterregulierung ihrer hCG/LH-Rezeptoren nicht zu einer Verminderung der gesamten Testosteronproduktion. Die Aufrechterhaltung der Testosteronproduktion von den schwächer stimulierbaren Leydigzellen wird laut Christensen und Peacock (1980) wahrscheinlich durch die Erhöhung der Zellzahl kompensiert.

Dirami et al. (1996) haben mit der Nahrung ein Dopaminagonist (Mesulegrine) an acht Wochen alte Sprague-Dawley-Ratten verabreicht und studierten die frühen (bis zur 5. Woche nach der Behandlung) und die späten (bis zur 57. Woche nach der Behandlung) Veränderungen des Hodens. Diese Autoren konnten feststellen, dass es in den frühen Stadien (bis zu 5 Wochen) zu einer Hypertrophie, im Laufe von 2 Jahren zu einer Hyperplasie der Leydigzellen kommt und danach im Intervall von 1 bis 2 Jahren nach dem Beginn der Behandlung Leydigzell-Adenome entstehen. Der Effekt dieses Dopamin-Agonists erfolgt höchstwahrscheinlich durch die Erhöhung der LH-Konzentration im Blut der Ratten (Prentice and Meikle 1995). Ein sehr interessanter Befund dieser Untersuchung ist die Beobachtung, dass im intertubulären Raum des Hodens der 57 Wochen lang behandelten Arteriolen Ratten vermehrt dickwandige vorkamen. ln diesem Zusammenhang wurden in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen der menschlichen Gebärmutter-Arterien funktionierende Rezeptoren für hCG/LH gefunden (Toth et al. 1994).

Die funktionelle Bedeutung der Rezeptoren wird bei den glatten Muskelzellen für die Relaxation, Hypertrophie und Hyperplasie (Angiogenese) während der Schwangerschaft und bei den Endothellzellen für die Angiogenese und der erhöhten Gefäßpermeabilität vermutet.

Es scheint, dass sich die Leydigzellen während der Entwicklung etwas anders als die Leydigzellen von erwachsenen Tieren verhalten. Mahood et al. (2005) studieren die Wirkung von Di (n-Butyl) Phthalate an männlichen Ratten während der Fetalentwicklung (13.5 – 20.5 Tag) und erzeugen damit eine Hyperplasie von intratubulären Leydigzellen, die sich mit Sertoli-Zellen vermischen und damit ein Zustand, der als testikuläres disgenetisches Syndrom (TDS) bekannt ist, hervorrufen. Interessant dabei ist, dass die Aggregation der Leydigzellen in der Mitte des Hodens erfolgt. Außerdem ist die Expression von Cyt P450scc in diesen Leydigzellen stark vermindert, dagegen sind aber keine Veränderungen in der Expression der 3ß-HSD festzustellen. Diese disgenetischen Tubuli zeigen bei der erwachsenen Ratte eine Struktur, die für das Sertoli-cell-only-Syndrom typisch ist. Die Anwendung von DBP oder anderen Phthalate führt zur großen Inzidenz von Veränderungen wie Kryptorchidismus, Hypospadia und Infertilität, die zusammen eine große Ähnlichkeit mit dem gleichen Syndrom (TDS) beim Menschen haben (Skakkebaek et al. 2001). Eigentlich kommt es nach DBP-Behandlung zu einer Verminderung der Anzahl der Leydigzell-Aggregate die gleichzeitig größer werden. Diese Vergrößerung der Leydigzell-Aggregate wird von Mahood et al. (2005) mit einer veränderten Migration und nicht mit einer erhöhten Proliferation der Leydigzellen in Verbindung gebracht. In diesem Zusammenhang haben Akingbemi et al. (2004) Ratten mit di(2-ethylhexyl) Phtalat (DEHP) chronisch behandelt und stellten eine gesteigerte Proliferationsaktivität der Leydigzellen durch erhöhte Expression von Proteinen des Zellzyklus mit Hilfe von RT-PCR fest. Die Anzahl der Leydigzellen im Hoden der DEHPbehandelten Ratten war 40 – 60% höher als in den Kontrollratten, was auf eine typische Hyperplasie der Leydigzellen hinweist. Diese Hyperplasie wird von einer Erhöhung der Serumkonzentration von LH und Testosteron begleitet. Eine gestörte Spermatogenese und Hyperplasie der Leydigzellen sowie die Bildung von Tumoren konnte auch bei weiblichen Tieren (transgene Mäuse) mit Überexpression von hCG beschrieben werden (Rulli et al. 2002; Matzuk et al. 2003). Andererseits konnten gestörte Wechselbeziehungen zwischen den Sertoli-Zellen und den Leydigzellen, verursacht durch Verlust von Keimzellen und testikulärer Atrophie, begleitet von einer Verminderung der

Testosteronproduktion, als Ursache für die Entstehung von Hyperplasie der fetalen Leydigzellen nach Behandlung männlicher Ratten mit Phthalat vermutet werden (Foster et al. (2001). Was die hyperplastischen Leydigzellen betrifft haben die letzten Autoren festgestellt, dass sie unverändert Androgenrezeptoren und 3ß-HSD produzieren.

Unter dem Begriff Leydigzelltumor werden in der internationalen Literatur sowohl benigne als auch maligne Tumorformen subsumiert (Ulbright et al. 2002; Al-Agha and Axiotis 2007). Dabei ist die Abgrenzung zwischen benignen und malignen Tumoren extrem schwierig oder unmöglich. Zytologische und histologische Zeichen für Malignität sind unsicher, lediglich das Auftreten invasiven Wachstums z.B. durch die Tunica albuginea des Hodens in den Samenstrang hinein, oder das Einwachsen in Blut- und Lymphgefäße gelten als sichere Zeichen der Malignität. Die Dokumentation solcher Fälle in der Literatur ist dürftig, da sie extrem selten vorkommen.

Der Begriff Neoplasie von Leydigzellen wird in der Literatur unter der Vorstellung, dass in einem Leydigzelltumor die Leydigzellen proliferieren, verwendet. Diese Vorstellung ist jedoch für den menschlichen Hoden nicht haltbar. In Leydigzelltumoren konnte eine mitotische Aktivität der als postmitotisch bekannten Leydigzellen nicht gefunden werden. Die wenigen Mitosen (Mati et al 2002; Mooney et al 1999), die in einzelnen Mitteilungen gezeigt wurden, waren keine Teilungsfiguren von Leydigzellen, sondern entweder von Mesenchymzellen, Fibroblasten oder, wie wir heute wissen, von Perizyten, der adulten Stammzellen der Leydigzellen (Davidoff et al 2004).

Die vorliegende Arbeit behandelt ausschließlich den Leydizelltumor in der benignen Form.

1.3. Proliferation der Leydigzellen

Während der ersten drei Wochen nach der Behandlung von Ratten mit hCG zeigen die Leydigzellen keine Teilungsfiguren (Christensen and Peacock 1980). Vereinzelt ließen sich Mitosen während der vierten und fünften Woche nach der hCG-Applikation beobachten. Es ist allerdings fraglich, ob es sich dabei um Mitosen von Leydigzellen handelt, da die Autoren keine spezifischen Marker für ihre Identifizierung benutzt haben.

In einer neuen Arbeit mit 156 Biopsien von 95 Patienten mit gestörter Spermatogenese, die begleitet wurde von einem vermindertem Verhältnis zwischen der Konzentration von Testosteron und LH, haben Holm et al. (2003) eine Vermehrung der Mikroknötchen ("micronodules", Plagues, hyperplastische Leydigzellgruppen) festgestellt. Als "micronodules" bezeichnen diese Autoren Gruppen (Aggregate), die aus mehr als 15 Leydigzellen bestehen. Solche Knötchen kommen vermehrt in Fällen mit dem "Sertoli-cellonly"-Syndrom (SCO), gemischte Situationen mit gestörter Spermatogenese oder Hoden mit erhaltener Spermatogenese in Kombination mit erhöhten FSH-Werten vor. Diese Autoren stellten einen klaren Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Proportion der Leydigzellen und der verminderten Spermatogenesekapazität im menschlichen Hoden fest. Dabei wurde die Vergrößerung des Volumens der Leydigzellen hervorgehoben.

Tash et al. (2002) stellten fest, dass Männer mit einer nichtobstruktiven Azoospermie und solche mit normaler Spermatogenese die gleiche Zahl von Leydigzellen besitzen. Diese Leydigzellen sind aber hypertrophisch und besetzen größere Anteile des totalen Hodenvolumens bei Männern mit nichtobstruktiver Azoospermie. Deswegen zeigen Patienten mit beeinträchtigter Spermatogenese eine Hypertrophie und keine Hyperplasie.

1.4. Leydigzelltumore bei Menschen

Bei Menschen kann eine Hyperplasie der Leydigzellen zwischen der 13. und der 19. Woche der fetalen Entwicklung festgestellt werden (Murray et al. 2000). Die Hyperplasie der fetalen Leydigzellen ist charakterisiert durch eine erhöhte Zahl von proliferierenden Leydigzellen und eine erhöhte Expression von steroidogenen Enzymen. Diese Hyperplasie ist physiologisch und funktionell bedingt.

Die Inzidenz der Leydigzelltumore des Hodens beträgt 1% von allen Tumoren bei Männern. Palpable Tumore sind selten und umfassen 1% bis 3% aller testikulären Neoplasmen (Prentice and Meikle 1995). Für den Mann berichten Clegg et al. (1997) und Cook et al. (1999) über eine Inzidenz von 0,4 pro Million (0.00004%), während bei der Ratte eine Variation zwischen 76% bei F344- und 5.3% bei Sprague-Dawley-Ratten festgestellt wurde. Die Ursachen der Entstehung von Leydigzelltumoren beim Menschen sind unbekannt, obwohl der Kryptorchismus gewisse Voraussetzungen dafür geben kann.

Den Gonadotropinen wurde eine große Bedeutung zugesprochen besonders bei den Fällen mit dem Klinefelter-Syndrom. Dieses Syndrom kommt in 1 von 500 Männern vor und ist charakterisiert durch erhöhte Werte von LH und niedrige Testosteronkonzentrationen. Eine Hyperplasie der Leydigzellen ist bei diesen Patienten häufig, während Leydigzelltumore selten beobachtet werden können.

Folgende wesentliche Unterschiede zwischen Ratte und Mensch wurden beschrieben (Prentice and Meikle 1995; Clegg et al. 1997; Cook et al. 1999):

- 1. Spontane oder durch Xenobiotika-induzierte Leydigzelltumore sind häufiger bei der Ratte zu finden, während sie beim Menschen nur selten vorkommen.
- 2. Ein wesentlicher Unterschied besteht in der Expression von LH- und LHRH-Rezeptoren. Die Zahl der LH-Rezeptoren per einzelne Leydigzelle bei der Ratte ist 14 Mal größer als beim Menschen (es handelt sich dabei um Leydigzellen, die von älteren Männern bei Orchiektomien wegen Prostatacarcinom isoliert wurden; dabei kann auch der Vorgang der Isolierung zum Verlust von LH-Rezeptoren bei den menschlichen Leydigzellen führen). Ferner wurden nur bei der Ratte LHRH-Rezeptoren nachgewiesen. So können die Leydigzellen der Ratte direkt sowohl vom LHRH aus dem Hypothalamus als auch von den Sertoli-Zellen beeinflusst werden oder indirekt durch LHRH des Hypothalamus, welches die Freisetzung von LH aus der Hypophyse steuert. Chronische Erhöhungen der Gonadotropinkonzentration führen bei der Ratte zur Stimulierung der Leydigzellen, die ihrerseits proliferieren und Tumore bilden. Dies bedeutet. dass die Ratte im Unterschied zum Mann über komplexere Kontrollmechanismen verfügt, was ihre Leydigzellen überempfindlich gegenüber trophischen Stimuli macht.
- 3. Die Leydigzellen der Ratte haben Prolaktin-Rezeptoren, während die des Menschen keine oder nur eine geringe Menge solcher Rezeptoren besitzen. Beim Menschen ist eine Modulation der LH-Rezeptoren durch Prolaktin nicht vorhanden.
- 4. Die Ratten haben kein sexualhormonbindendes Globulin (SHBG).
- 5. Exogenes hCG führt bei der Ratte zur Hyperplasie, während es beim Menschen zur

Hypertrophie der Leydigzellen führt.

- 6. Differenzen in den Kontrollmechanismen zwischen Mann und Ratte sind auch im Verlaufe der Entstehung der spontanen oder induzierten Tumore beschrieben worden.
- 7. Leydigzelltumore entstehen vor allem bei erwachsenen Ratten, während sie beim Menschen in unterschiedlichem Alter vorkommen können. Die altersbedingte Reduktion der Plasmagonadotropine und des Testosterons treten nicht bei Männern auf und scheinen spezifisch für die Ratte zu sein.

Diese wichtigen Unterschiede sowie der besondere endokrine Status und die Epidemiologie des Menschen erlauben keinen direkten Vergleich bei der Interpretation von Ursache, Entstehung, Pathogenese und Differenzierung der Hyperplasie und der Tumore der Leydigzellen bei Ratte und Mensch (Cook et al. 1999).

Zusammenfassend lassen sich aus den vorhandenen Literaturangaben einige Lücken bei der Erforschung der Hyperplasien und Tumoren der Leydigzellen feststellen:

- Obwohl über das Phänomen der Leydigzellhyperplasie und Tumorbildung viele Arbeiten veröffentlicht wurden, fehlen feste Kriterien, die eine exakte Abgrenzung der Hyperplasie der Leydigzellen von den Leydigzelltumoren ermöglichen (Prentice and Meikle 1995; Cook et al. 1999).
- Unzureichend ist die Frage über die Wechselbeziehungen zwischen der Hyperplasie der Leydigzellen und dem Zustand der Spermatogenese in den benachbarten Hodenkanälchen geklärt.
- Auch die Frage über die Art der Vermehrung der Leydigzellen bei den hyperplastischen Vorgängen benötigt eine genauere Klärung, da es in der Literatur diesbezüglich widersprüchliche Angaben gibt.
- Es ist noch nicht endgültig geklärt, ob es sich bei diesen Vorgängen um eine Hypertrophie (Vergrößerung der vorhandenen Leydigzellen), eine Hyperplasie (Zunahme der Zahl der Leydigzellen) oder eine Kombination aus beiden handelt.
- Bis zum jetzigen Zeitpunkt fehlen Angaben über das Vorkommen und die möglichen Veränderungen der neuroendokrinen Eigenschaften der hyperplastischen Leydigzellen und der Zellen der Leydigzelltumore.

 Die Tatsache, dass bei der Entstehung der Hyperplasien/Tumore der Leydigzellen wesentliche speziesbedingte Variationen existieren, erlaubt keine direkte Übertragung der Ergebnisse vom Tier auf den Menschen. Dies ist ein wichtiger Grund für die Durchführung einer gezielten Studie über die Besonderheiten der Hyperplasie der Leydigzellen im menschlichen Hoden.

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Studie haben besteht darin, die strukturellen und immunhistochemischen Besonderheiten der Leydigzellen des menschlichen Hodens bei einer genügenden Anzahl von Patienten mit Hyperplasien und zum Vergleich bei einigen Fällen mit Leydigzelltumoren zu erforschen. Diese Untersuchung soll auch den neuroendokrinen Status der hyperplastischen und tumorösen Leydigzellen überprüfen.

Um dieses Ziel zu erreichen, haben wir uns folgende Aufgaben gestellt:

- In geeigneten Arealen des menschlichen Hodens werden an Paraffin-, Semidünn- und Ultradünn-Schnitten die strukturellen Besonderheiten der Leydigzellen ermittelt. Dabei werden Areale mit normal strukturierten Leydigzellen mit Arealen, die Leydigzellhyperplasie oder Leydigzell-Adenome enthalten, verglichen.
- 2. Zu überprüfen, ob die hyperplastischen Leydigzellen und die Zellen der Leydigzell-Adenome eine Abhängigkeit vom Zustand der Spermatogenese der benachbarten Hodenkanälchen aufweisen. Diese Untersuchung soll Hinweise auf die Bedeutung von lokalen Faktoren auf die Entstehung der Hyperplasien und Tumoren des Hodens geben.
- 3. Eine detaillierte immunhistochemische Untersuchung über das Verhalten der Leydigzellen bezüglich deren neuroendokrinen Eigenschaften in Arealen mit Hyperplasie und Adenomen durchzuführen.
- 4. Zu überprüfen, ob es in den hyperplastischen und Tumor-Arealen Zeichen einer Proliferation der Leydigzellen gibt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Untersuchungsgut

Das in dieser Untersuchung benutzte Hodenmaterial stammte aus dem Präparatenfundus des Anatomischen Instituts der Universität Hamburg. Es konnte in den Jahren 1973 bis 2001 in Zusammenarbeit mit urologischen Kliniken gewonnen werden. Beteiligt war die Urologische Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Direktor Prof. Dr. H. Huland, die Urologische Abteilung des Allgemeinen Krankenhaus St. Georg, Direktor Prof. Dr. R. Hubmann, die Urologische Abteilung des Bundeswehrkrankenhauses Wandsbek, Direktor Prof. Dr. Körner und die Abteilung der Urologie des Allgemeinen Krankenhaus Barmbek, Direktor Prof. Dr. R. Tauber. Das Material stammte von 35 Patienten im Alter von 57 bis 80 Jahre, die anlässlich eines Prostatakarzinoms als Therapiemaßnahme eine Orchiektomie erhielten. Bis auf wenige Ausnahmen waren die Patienten mit keiner antiandrogenen Therapie vorbehandelt. Das Untersuchungsgut von vorbehandelten Patienten, wurde separat betrachtet und als solches gekennzeichnet.

Für die wissenschaftliche Untersuchung der Gewebeproben lagen die Zustimmungen der Patienten und der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg vor. Außerdem standen aus den gleichen Kliniken aus der Zeit von 1990 bis 2001 Hodenbiopsien zur Verfügung, die zur Diagnostik angeschaut wurden und für deren wissenschaftliche Bearbeitung ebenfalls Genehmigungen vorlagen.

3.1.2. Geräte

Paraffineinbettungsautomat	Shandon
Paraffinmikrotom	Leica
Analysewaage	Mettler
Feinwaage	Mettler
Lichtmikroskop mit Fotoeinrichtung	Zeiss, Axiomat
Mikro-Dismembrator	Braun Biotech International
Homogenisator	Braun Biotech International
Elisa-Reader	Dynex Technologies MAX 002
Zentrifuge	Heraeus
Elektrophorese und Western-Blotting Apparatur	Hoefer
Elektronenmikroskop	Philipps EM 300
Ultramikrotom Supercut 2050	Reichert&Jung

3.1.3. Puffer und Lösungen

3.1.3.1. Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie

Fixierungslösung für das Paraffinverfahren:

Bouin'sche Lösung:

150 ml gesättigte Pikrinsäurelösung (Merck)

50 ml Formaldehyd (37%, Merck)

10 ml Eisessigsäure (Riedel de Haen)

Lösungen zur Demaskierung von Antigenen in Paraffinschnitten:

```
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /Methanol-Lösung:
2,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Merck) auf
50 ml Methanol (Merck)
```

Puffer und Färbelösungen für die immunhistochemische Färbemethode:

```
Kochsalz Phosphatpuffer (PBS):

17,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)

16 g NaCl (Merck)

ad 2000 ml Aqua dest., pH 7,4
```

Inkubationslösung für den primären Antikörper.

```
PBS-Puffer mit Rinderserum-Albumin (BSA):
```

100 ml PBS 0,2% BSA (Sigma)

0,1% NaN₃ (Merck)

Phosphatpuffer (PB):

4,03 g KH₂PO₄ (Merck)

17,08 g Na₂HPO₄ (Merck)

ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,4

Enzymsubstratlösung für die Entwicklung der Peroxidase-Aktivität bei der PAP/ABC-Kombinationsmethode (Nickel-Glukoseoxidase-Methode, nach Záborszky und Léránth (1985):

45 ml Phosphatpuffer

22,5 mg DAB (3,3'-Diaminobenzidin HCl, Sigma)

18 mg Ammoniumchlorid (Sigma)

900 µl Nickelsulfat 0,05M (Nickel(2)-sulfat-Hexahydrat, Sigma)

```
(130 mg in 10 ml AD)
900 µl Glukose 10% (Sigma)
150 µl Glukoseoxidase (= 0,12 mg) (1,2 mg/ml Aqua dest., Sigma)
```

3.1.3.2. Puffer für die Proteinpräparation aus Gewebe (Homogenisieren)

Homogenisierungspuffer (25 mM NaH2PO4/Na2HPO4-Puffer, pH 7,2, 5 mM EGTA):

0,1 mM DTT (Dithiothreitol, Sigma) 1,0mM PMSF (87 mg PMSF in 5 ml Ethanol (0,1M))

311,33 mg NaH₂PO₄

103,49 mg Na₂HPO₄

234,15 mg EGTA

1,5 mg DTT (Dithiothreitol, Sigma)

auf 100 ml Aqua dest.

ad 1 ml PMSF (Phenylmethylsulphonylfluoride)

3.1.3.3. Lösungen für die Proteinbestimmung aus Homogenaten

BCA-Proteinbestimmung:

BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce) bestehend aus:

Lösung A: 1 g BCA (Bicinchoninsäure)

1,7 g Na₂CO₃

0,16 g Na-Tartrat

0,4 g NaOH

0,95 g NaHCO₃

H₂O auf 100 ml; pH 11,25 mit NaOH

Lösung B: 2 g CuSO₄

H₂O auf 50 ml

BSA: 2 mg Bovine Serum Albumin

in 1 ml 0,9% NaCl und 0,05% NaN₃

3.1.3.4. Puffer und Lösungen für die Elektrophorese und Western-Blot-Analyse

Puffer und Lösungen zur Herstellung der Trenn- und Sammelgele:

Acrylamidlösung 30%:

150 g Acrylamid (Serva)

4 g Bisacrylamid (Serva)

Aqua dest. auf 500 ml

10 g Ionenaustauscher AG501-X8 (Bio-Rad Laboratories) zugeben

und 30 min rühren

Filtrieren

Lagerung lichtgeschützt bei 4°C

Vierfach-Trenngelpuffer: (1,5M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% (W/v) SDS):

181,5 g Tris-base (Life Technologies)

Einstellen auf pH 8,8 mit HCI (Merck)

Aqua dest. auf 1000 ml

1,0 g SDS (Sodium dodecylsulfat, Sigma)

Vierfach-Sammelgelpuffer: (0,5M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS):

30,0 g Tris-base (Life Technologies)

Aqua dest. auf 500 ml

Einstellen auf pH 6,8 mit HCl (Merck)

0,5 g SDS (Sodium dodecylsulfat, Sigma)

Ammoniumpersulfat 10% (APS):

0,1 g APS (INC Biomedical)

Aqua dest. auf 1,0 ml

Puffer und Lösungen für die Elektrophorese:

PAGE-Puffer : (0,025M Tris-HCl, pH 8,4; 0,192M Glycin, 0,1% SDS):

15,1 g Tris-Base (Life Technologies)

72,0 g Glycin (Merck)

5,0 g SDS (Sodium dodecylsulfat, Sigma)

Aqua dest. auf 5000 ml, pH ca. 8,3 (nicht einstellen)

Dreifach-Stopmix-Lösung:

7,5 ml Tris-HCl, pH 6,8 (Life Technologies)

4,0 ml DTT (Dithiothreitol, Sigma)

4,0 ml Glycerin (Sigma)

ad 2,0 ml Aqua dest.

3 g SDS (Sodium dodecylsulfat, Sigma)

Lösen, eventuell erwärmen

Aqua dest. auf 20 ml

12 mg BPB (Bromphenolblau, Sigma)

In 50 ml Röhre schütteln, aliquotieren und

bei -20° C aufbewahren

Molecular Weight Standard (Life Technologies):

250 µl hergestellter MW Standard in folgendem Puffer:

50 mM Tris-HCI (pH 6,8)

5 mM EDTA

10 mM DTT

1% (w/v) SDS

10% (w/v) Glycerol

Puffer und Lösungen für das Western-Blotting:

Transferpuffer: (100 mM Tris, 193 mM Glycin):

60,4 g Tris-Base (Merck)

72,0 g Glycin

Aqua dest. auf 5000 ml, pH ca. 8,3

Zehnfach-TBS (10 X Tris buffer NaCl): 200 mM Tris; 1,37 M NaCl):

24,23 g Tris-Base (Merck)

80 g NaCl (J.T. Baker)

Einstellen auf pH 7,6 mit 1N HCI (Merck)

Aqua dest. auf 1000 ml

TBST (Tris buffer-NaCl-Tween 20):

100 ml Zehnfach-TBS

500 µl Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurate, Sigma)

Aqua dest. auf 1000 ml

Blockierungspuffer für Nitrocellulose (NC)-Membrane:

(0,1M Maleinsäure/NaOH pH 7,5; 0,15M NaCl; 1% Amersham Blocking-Reagenz; 0,005% Thimerosal):

5,805 g Maleinsäure (Sigma)

4,383 g NaCl (J.T. Baker)

Aqua dest. auf 400 ml,

pH auf 7,5 mit NaOH-Plätzchen einstellen

5 g Amersham Blocking-Reagenz lösen und auf 40°C erwärmen

Aqua dest. auf 500 ml

500 µl Thimerosal (Sigma)

Blockierungspuffer für Polyvinyldifluorid (PVDF)-Membrane:

5 g fettarmes Trockenmilchpulver in 100 ml TBST lösen

Ponceau-Rot:

20 ml Farbe (Sigma) Aqua dest. auf 200 ml

Inkubationpuffer für Primär- und Sekundärantikörper:

90 ml TBST

10 ml Blockierungspuffer

100 µl Thimerosal (von 5% Stammlösung) (Sigma)

3.1.4. Antikörper und Färbekomplexe

3.1.4.1. Antikörper und Färbekomplexe für die Immunhistochemie

Primärantikörper.

Primärantikörper Firma, Nr	Herkunft	Spezifität	Verdünnung	Inkubationszeit
----------------------------	----------	------------	------------	-----------------

Neuronale Marker

Anti-GAP 43	Sigma	Monoklonal	Ein Epitop, in	1:1000	10 min
	G-9264	aus Maus	allen 3		
			Isoformen		
			nach-		
			weisbar		
Anti-Substanz	Incstar	Polyklonal	Substanz P	1:1000	20 min
Р	X 38580	aus			
		Kaninchen			
Anti-NSE	Chemicon	Monoklonal	Gamma-	1:200	15 min
	MAB314	aus Maus	gamma Enolase		
Anti-Nestin	Chemicon	Polyklonal	Nestin	1:200	12 min
	AB5922	aus			
		Kaninchen			
Anti-NOS I	Trans-	Monoklonal	Proteinfrag-	1:100	20 min
	duction	aus Maus	ment 155 kDa		
	Laborato-				
	ries				
	N31030				
Anti-NF 160	Sigma	Monoklonal	Neurofilament	1:40	15 min
	N-5264	aus Maus	160kDa		
Anti-NF 200	Bioproducts	Polyklonal	Neurofilament	1:200	20 min
	BMS 426	aus	200kDa		
		Kaninchen			

Neurotrophe Faktoren und Zytokine mit neurotropher Wirkung

Anti-FGF-beta	Sigma	Polyklonal	FGF-beta	1:500	15 min
	F-3393	aus			
		Kaninchen			
Anti-NT 3	Chemicon	Polyklonal	NT 3	1:100	17 min
	AB 1532P	aus			
		Kaninchen			
Anti-NT 4	Santa Cruz	Polyklonal	NT 4 (BDNF)	1:100	12 min
	sc-545	aus			
		Kaninchen			
Anti-BMP 6	Novocastra	Monoklonal	BMP 6	1:200	12 min
	Laboratories	aus Maus			
	10F7				
Anti-Trk A	Santa Cruz	Polyklonal	Trk A	1:100	12 min
	sc-118	aus	(Trk gp 140)		
		Kaninchen			
Anti-Trk B	Santa Cruz	Polyklonal	Trk B gp 145	1:100	12 min
	sc-12	aus			
		Kaninchen			
Anti-Trk C	Santa Cruz	Polyklonal	Trk C gp 140	1:100	12 min
	sc-117	aus			
		Kaninchen			
Anti-NGFRp75	DAKO	Monoklonal	75kDa NGF	1:50	15 min
	M3507	aus Maus	Rezeptor		
			p75NGFR		
Anti-Inhibin alfa	Peninsula	Polyklonal	Inhibin	1:1000	18 min
	Laboratories	aus	Untereinheit		
	ICH 7281	Kaninchen	1-32		
Anti-GDNFR	Transduction	Monoklonal	GDNFR alfa	1:2000	25 min
alfa	Laboratories	aus Maus			
	G55620				
			1		1

Enzyme der Katecholaminsynthese

Anti-TH	Eugene	Polyklonal	TH	1:1000	23 min
	Tech.	aus			
	TE101	Kaninchen			
Anti-AADC	Eugene	Polyklonal	AADC	1:500	14 min
	Tech.	aus			
	TE102	Kaninchen			
Anti-DBH	Biotrend DZ	Polyklonal	DBH	1:500	15 min
	1020	aus			
		Kaninchen			
Anti-PNMT	Eugene	Polyklonal	PNMT	1:500	13 min
	Tech.	aus			
	TE104	Kaninchen			

Calciumbindende Proteine

Anti-S 100	Sigma S-	Polyklonal	S 100	1:200	28 min
	2644	aus			
		Kaninchen			
Anti-Calmodulin	Boehringer	Monoklonal	Alfa	1:1000	25 min
	1481 703	aus Maus	Untereinheit		
			der CaM		
			Kinase II		

Synaptische Vesikelproteine

Anti-SNAP 25	Biotrend SL	Polyklonal	SNAP 25	1:500	20 min
	3730	aus	25kDa		
		Kaninchen			
Anti-	Sigma S-	Monoklonal	Synapto-	1:400	17 min
Synaptophysin	5768	aus Maus	physin		

Zelladhäsionsmoleküle

Anti-N CAM	Sigma (C-	Monoklonal	A/ N CAM	1:120	15 min
	9672		aus Maus	180		
				B/ N CAM		
				190		

Gliazellantigene

Anti-GFAP	Sigma	Monoklonal	GFAP	1:1000	20 min
	C3893	aus Maus			
Anti-CNPase	Sigma	Monoklonal	CNP1 und	1:400	16 min
	C5922	aus Maus	CNP2		
Anti-O4	Bioproducts	Monoklonal	Oligodentro	1:5	32 min
	BMS4273	aus Maus	zyten-		
			Marker O4		
Anti-Galc	Boehringer	Monoklonal	Galactocere	1:40	16 min
	1351 621	aus Maus	broside		
Anti-A2B5	Boehringer	Monoklonal	Ein Epitop	1:200	14 min
	1300 016	aus Maus	der Plasma-		
			membran		
			von		
			Neuronen		

Enzyme der Steroidsynthese

Anti-	Chemicon,	Polyklonal	Cytochrom	1:300	12 min
Cytochrom	AB1244	aus	P450 side		
P450		Kaninchen	chain		
			cleavage		
Anti-LDL	Amersham	Monoklonal	LDL	1:300	10 min
	RPN.537	aus Maus			

Sekundärantikörper.

Anti-Maus IgG-Biotin:

Kaninchen-anti-Maus-IgG-Biotin (DAKO A/S, Glostrup, Dänemark) Spezifisch für Maus-IgG-Subklassen und Maus-IgM Verdünnung 1:250

Anti-Kaninchen IgG-Biotin:

Schwein-anti-Kaninchen-IgG-Biotin (DAKO A/S, Glostrup, Dänemark)
Spezifisch für Kaninchen-IgG-Subklassen
Verdünnung 1:250

Komplexe zur Markierung der Antigen-Antikörperkomplexe:

Maus-PAP-Komplex:

Maus-Peroxydase-anti-Peroxydase-Komplex (DAKO A/S, Glostrup, Dänemark) Verdünnung 1:250

ABC-Komplex:

Avidin-Biotin-Peroxydase-Komplex Vectastain Elite ABC Kit (Vector Labs., USA) Verdünnung 1:250

Entwicklung der Peroxidase-Aktivität:

Nickel-Glukoseoxidase-Methode (nach Záborszky und Léránth (1985)

3.1.4.2. Antikörper und Färbekomplexe für die Western-Blot-Analyse

Primärantikörper aus der Maus (monoklonale Antikörper):

Anti-GFAP

GFAP, Sigma, Clone G-A-5 Spezifität für GFAP (50kDa) Verdünnung 1:1000

Anti-CNPase

CNPase, Sigma, C5922 Spezifität für CNP1 (46kDa) und CNP2 (48kDa) Verdünnung 1:500

Anti-O4

O4, Bioproducts, BMS4273 Spezifität für Oligodendrozytenmarker O4 (63kDa) Verdünnung 1:200

Anti-GDNFR-α

GDNFR-α, Transduction, G55620 Spezifität für GDNFR-α (46-60kDa) Verdünnung 1:5000

Anti-NF 200

Neurofilament 200 kDa, Biotrend, Clone SMI 38 Spezifität für Neurofilament (200kDa) Verdünnung 1:500

Anti-Nestin

Nestin, Chemicon, MAB353 Spezifität für Nestin in Maus und Ratte (400kDa) Verdünnung 1:2500

Primärantikörper aus dem Kaninchen (polyklonale Antikörper):

Anti-Nestin

Nestin, Chemicon, AB5922 Spezifität für Nestin in Human (400kDa) Verdünnung 1:2000

Anti-Cytochrome P450

Cytochrome P450, Chemicon, AB1244 Spezifität für Cytochrome P450 (48-50kDa) Verdünnung 1:1000

Sekundärantikörper.

Anti-Maus IgG-Peroxidase:

Goat-anti-Mouse-Peroxidase (Pierce, 31432) Spezifisch für Maus-IgG-Subklassen und Maus-IgM Verdünnung 1:2000

Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase:

Donkey-anti-Rabbit-Peroxydase (Pierce, 31458)
Spezifisch für Kaninchen IgG-Subklassen und Kaninchen-IgM
Verdünnung 1: 5000

3.1.5. Lösung zur Visualisierung der Peroxidase

ECL und ECL-Plus Reagenz (Amersham, England)

3.1.6. Röntgen- (X-Ray) Film

Fuji (Japan)

3.2. Methoden

3.2.1. Paraffinschnitt

Hodenscheiben, 3-5 mm dick, wurden am Tag der Orchiektomie 24 Stunden bei Raumtemperatur in der Bouin'schen Lösung fixiert. Die fixierten Hodenscheiben wurden am nächsten Tag über zwei Tage bei mehrfachen Wechsel in 70%igem Ethanol gespült. Die Entwässerung erfolgte im Paraffineinbettungsautomat in einer aufsteigenden Alkoholreihe beginnend mit 80% Ethanol für 2 Stunden, 96% Ethanol für 1 Stunde und schließlich 5-mal für je 1 Stunde in 100% Ethanol. Danach wurde das Material in Methylbenzoat (3 mal 2 Stunden, Merck) überführt, gefolgt von Paraffin/Histowax (Reichert & Jung), in dem das Gewebe zunächst für 2 Stunden und dann für weitere 8 Stunden getränkt wurde. Letztendlich erfolgte die Einbettung in Paraffin.

Von den 50 Paraffinblöcken wurden mit Hilfe eines Paraffinmikrotoms 6 µm dicke Schnitte hergestellt. Die einzelnen Schnitte wurden mit Hilfe von 2 Pinseln zunächst in einem Gefäß mit kaltem destilliertem Wasser aufgetragen und danach in einem Wasserbad bei 40°C gestreckt. Es folgte die Montierung der Schnitte auf Superfrost-Objekträger und ihre Lagerung in einem Wärmeschrank über Nacht bei 51°C.

3.2.1.1. Hämalaun-Eosin-Färbung

Die 6 µm dicken Paraffinschnitte wurden vor der Färbung mit einem Xylolersatz (Histoclear XEM-200, Medizin Technik und Elektronik Vogel) drei mal jeweils 5 Minuten entparaffiniert. Es folgte ihre Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70% Ethanol) und schließlich in destilliertem Wasser für jeweils 5 Minuten. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun (Merck) für 5-8 Minuten gefärbt. Die Hämalaun-Färbung wurde mit dem Eintauchen der Schnitte für einige Sekunden in 1%iger Essigsäure gestoppt. Die Differenzierung der blauen Farbe erfolgte für 10 Minuten unter fließendem Wasser. Anschließend wurde das Zytoplasma der Zellen mit einer 0,5%igen Eosin-Lösung (Merck) in 96%igen Ethanol für 3-5 Minuten gefärbt. Nach einer Spülung für 1 Minute in 96%igen Ethanol und zwei mal 3 Minuten in 100%igen Ethanol wurden die Schnitte zur Klärung in Histoclear für drei mal 5 Minuten behandelt und schließlich mit Eukitt (O.Kindler GmbH & Co.) eingedeckt.

3.2.1.2. Immunhistochemischer Nachweis von Antigenen

Für die immunhistochemische Visualisierung der untersuchten Substanzen haben wir sowohl monoklonale, als auch polyklonale Antikörper bzw. Antiseren angewandt. Da sich bei der Anwendung von einigen polyklonalen Antiseren eine stärkere Hintergrundfärbung entwickelt, haben wir vor der Inkubation mit den primären Antiseren zur Hemmung der endogenen Peroxidase die Schnitte in einem H_2O_2 /Methanol-Gemisch für 30 Minuten inkubiert. Durch diese Vorbehandlung wurden auch die gesuchten Epitope demaskiert.

Wir haben das folgende Protokoll angewandt:

Alle Schnitte, unabhängig ob mit monoklonalem oder polyklonalem Antikörper behandelt, wurden zunächst für drei mal 5 Minuten in Xylolersatz (Histoclear XEM-200, Medizin Technik und Elektronik Vogel) entparaffiniert. Der Entparaffinierung angeschlossen erfolgte die Rehydrierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe. Jeweils 5 Minuten wurden die Schnitte in 100%, 96%, 80% und 70% Ethanol belassen. Während die Schnitte, die einem Nachweis mit monoklonalen Antikörpern unterzogen werden sollten, diese absteigende Alkoholreihe ununterbrochen durchliefen, wurde bei Schnitten, die mit

polyklonalen Antikörpern behandelt werden sollten, diese Reihe kurz unterbrochen. Nach der Einwirkung von 100% Ethanol für 5 Minuten wurden diese Schnitte für 30 Minuten in ein 1,2% H₂O₂ /Methanol-Gemisch getaucht. Die Alkoholreihe wurde dann nach dieser Inkubationszeit bei 96%igen Ethanol fortgesetzt.

Nach der Alkoholreihe folgte die Spülung in destilliertem Wasser für 5 Minuten.

Als Methode der Wahl zum spezifischen immunhistochemischen Nachweis von Antigenen hat sich die Kombination der PAP- (Peroxidase-anti-Peroxidase)- und der ABC-(Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex)-Methode nach Davidoff und Schulze (1990) erwiesen. Diese Verstärkungs (Amplification)-Methode ermöglicht den Nachweis geringster Mengen von Antigenen.

Zur Durchführung der Immunhistochemie wurden die rehydrierten und in destilliertem Wasser gespülten Schnitte für drei mal 5 Minuten in PBS gespült. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Schnitte folgte ihre Inkubation mit normalem Kaninchen- bzw. Schweineserum. Bei Schnitten, bei denen monoklonale Antikörper angewandt wurden, wurde 2%iges Kaninchenserum (NRS, Sigma) zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen benutzt. Die Schnitte, bei welchen polyklonale Antiseren angewandt wurden, erfolgte die Blockierung mit 2%igem Schweineserum (NSS, Sigma). Die Inkubation dauerte 30 Minuten. Dabei wurden die Schnitte mit jeweils 100 µl Serum betropft.

Nach 30 Minuten wurde das Serum mit einem soften Papiertuch bis auf den Schnittrand abgewischt und der jeweilige, mit dem Inkubationspuffer optimal verdünnte Primärantikörper, wurde aufgetragen. Dabei war darauf zu achten, dass zwischen dem Abwischen und erneuten Betropfen nicht viel Zeit verstreicht, damit die Schnitte zwischenzeitlich nicht austrocknen. Die Inkubation mit den Primärantikörpern dauerte 18-24 Stunden in einer Feuchtkammer im Kühlschrank bei 4°C.

Nach dieser Inkubation mit den Primärantikörpern wurden die Schnitte dreimal für je 10 Minuten in PBS gespült, um dann je nach Primärantikörper mit den Sekundärantikörpern (Anti-Maus IgG Biotin aus Kaninchen bei monoklonalen Antikörpern oder Anti-Kaninchen IgG Biotin aus Schwein bei polyklonalen Antiseren) inkubiert zu werden. Die Sekündarantikörper wurden für diesen Zweck 1:250 in PBS verdünnt (10 µl Antikörper in

2,5 ml PBS). Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten in der Feuchtkammer bei 4°C.

Nach zweimaligen Spülen der Schnitte in PBS für jeweils 10 Minuten folgte die Inkubation der Schnitte mit in PBS verdünntem Maus- (10 μ I PAP in 1 ml PBS) bzw. Kaninchen (10 μ I PAP in 2 ml PBS) PAP-Komplex für 30 Minuten.

Der erneuten Spülung mit PBS für 2 mal 10 Minuten schloss sich die Inkubation der Schnitte mit ABC-Komplex an, welcher in PBS gelöst war. Wichtig war das Ansetzen des Komplexes 30 Minuten vor Ingebrauchnahme, damit die Entstehung des Komplexes bereits vor dem Auftropfen erfolgen konnte. Der Inkubation des ABC-Komplexes für 30 Minuten schloss sich die Spülung der Schnitte mit PBS für 10 Minuten an und darauffolgend die erneute Spülung mit Phosphatpuffer, die ebenfalls 10 Minuten andauerte.

Die Visualisierung der Peroxidaseaktivität wurde mit Hilfe der Enzymsubstratlösung verwirklicht. Je nach Expressionskraft des Antikörpers dauerte die Entwicklung zwischen 5 und 30 Minuten an. Während dieser Zeit wurde die Entwicklung unter dem Mikroskop beobachtet. Das Stoppen der Entwicklungsreaktion wurde mit dem Spülen der Schnitte in PBS (3x5 Minuten) erreicht. Nach dieser Spülung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten 70%, 80%, 96%, 2x100%) dehydriert, um dann in Histoclear für 3x5 Minuten geklärt zu werden. Schließlich wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

Als Negativkontrolle dienten Parallelschnitte derselben Hodenblöcke, bei denen der Primärantikörper durch PBS ersetzt wurde. Es wurde nur die Peroxidaseaktivität nachgewiesen oder, anstatt des spezifischen Antikörpers, normales Kaninchenserum in einer Konzentration von 0.01% bis 0,1% angewandt. Für einige Kontrollen wurden die optimal verdünnten primären Antiseren (Antikörper) für 24 Std. mit den entsprechenden Antigenen in einer Konzentration von 1 µg bis 50µg/ml präabsorbiert.

3.2.2. Elektronenmikroskopie

Ein Teil des frischen Hodenmaterials wurde in kleine Blöcke zerkleinert, die mit einer Lösung von 5.5% Glutaraldehyd in 0.05M Phosphatpuffer (pH 7.2, 820 mOsm) für 2 Std bei 4°C fixiert wurden. Nach Behandlung mit einer 1% Osmiumsäurelösung wurde das Material in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Gelatinekapseln ausgefüllt mit Epon 812-Mischung eingebettet. Zur Polymerisation des Epoxydharzes wurden die Kapseln in ein Thermostat gelegt.

Mit Hilfe eines Ultramikrotoms wurden auf Kupfernetze dünne Schnitte angefertigt, die nach zusätzlicher Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleizitrat unter dem Pillips-EM 300 beobachtet wurden. Die elektronenmikroskopischen Bilder stammen aus dem Fundus des Instituts für Anatomie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Toluidinblau-Azur II Färbung für Semidünnschnitte von in EPON eingebettetes Material:

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 1 bis 2µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, die freischwimmend mit Toluidinblau/Pyronin G (Ito and Winchester 1963) angefärbt und auf Objektträger montiert und eingedeckt wurden. Diese Schnitte dienten der detaillierten Betrachtung der Hodenstruktur.

3.2.3. Proteinpräparation aus Geweben

Für die Western-Blot Untersuchungen wurden Proteinhomogenate hergestellt. Das Hodenmaterial wurde von 5 Patienten, bei denen eine Leydigzellhyperplasie vorher histologisch nachgewiesen wurde, gewonnen. Als Positivkontrolle bei den Western-Blot Versuchen dienten Homogenate von Mäuse- und Rattenhirnen.

Für die Herstellung der Homogenate haben wir zuerst frische Hodenblöcke in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Anwendung bei -80°C in Alufolie umwickelt aufbewahrt. Diese Blöcke wurden dann mit einem Hammer zerschlagen. Die Organpartikel wurden

anschießend gemeinsam mit einer Mahlkugel in ein vorgekühltes Schüttelgefäß überführt und erneut mit Stickstoff gekühlt. Nach der Kühlung, die einige Minuten andauerte, wurde das Gefäß in den Mikro-Dismembrator gespannt und das Gewebe 1 Minute bei einer Schwingungsfrequenz von 1200 rpm pulverisiert. Das pulverisierte Gewebe wurde anschließend in einem Porter-Elvheyem Glashomogenisator überführt und mit 20 ml Homogenisierungspuffer bei 3-5 Druckbewegungen homogenisiert. Zelltrümmer und Zellkerne wurden in der Zentrifuge (Hettich) bei 3000 G und 4°C für 8 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde dann abpipetiert und für 45 Minuten bei 5000 G und 4°C nochmals zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand, der die zytosolische Proteinfraktion darstellt, wurde wiederum abpipetiert und aliquotiert. Die so hergestellten Homogenate wurden bei -25°C aufbewahrt und jeweils einige Minuten vor der Western-Blot Verarbeitung aufgetaut.

3.2.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration der Homogenate

Die Proteinkonzentration der Homogenate wurde mit dem "Micro BCA-Protein Assay Reagent Kit gemessen. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Lowry-Proteinbestimmungs-Methode, die im Gegensatz zur Lowry-Methode unempfindlicher gegenüber Störfaktoren ist.

In beiden Methoden reagieren Proteine mit Cu²⁺-lonen im alkalischen System zu einem farbigen Komplex (Buiret-Reaktion). Bei der BCA-Methode wird der farbige Komplex mit Bicincholinsäure verstärkt. Im Unterschied zur Verstärkung mit Folin-Ciocalteus-Reagenz (Lowry-Methode) zeigt die BCA-Methode einen Cu¹⁺-BCA-Komplex, der eine höhere Stabilität und Farbintensität mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 550 nm aufweist.

Die Messung der Proteinkonzentration der hergestellten Homogenaten erfolgte in einer Mikrotiterplatte.

Von den Proben wurden jeweils 10µl in jedes Well pipetiert. Eine Verdünnungsreihe der Proben diente dabei der genaueren Bestimmung der Konzentration. Dabei wurde mit Homogenisierungspuffer eine 1:10 und 1:5 Verdünnung parallel zur Messung der reinen Probe mitbestimmt, um somit die Genauigkeit der Messung zu verstärken.

Als Eichreihe diente eine BSA (Bovine Serum Albumin)-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 2000 μ g/ml, 1500 μ g/ml, 1000 μ g/ml, 750 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml und 125 μ g/ml. Auch hier wurden die Wells mit jeweils 10 μ l bestückt.

Für den Leerwert wurde jeweils 10 µl Homogenisierungspuffer in die Wells pipetiert.

Jede Wellbestückung wurde doppelt angelegt, um dadurch den Mittelwert der Konzentration zu bestimmen.

Die BCA Lösung zur Proteinmessung wurde anschließend den bestückten Wells zupipetiert. Dafür wurden zunächst 50 Teile der Lösung A mit 1 Teil der Lösung B gemischt. Von dieser hergestellten Lösung C wurden jeweils 200µl in jedes zu untersuchende Well pipetiert und der Inhalt gut gemischt.

Die Proben der fertig bestückten Mikrotiterplatte wurden dann bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

Nach der Inkubationszeit und einer kurzen Abkühlzeit von wenigen Minuten wurde die Proteinkonzentration in der bestückten Mikrotiterplatte am Elisa-Reader (BCA-Programm mit DYNEX REVELATION G 3.2) bei 550nm gemessen.

3.2.4. Elektrophorese und Western-Blot

3.2.4.1. Herstellung der Trenn- und Sammelgele

Die untersuchten Proteine besaßen ein Molekulargewicht von 46-400 kDa. Um diese Proteine adäquat nachzuweisen, war es nötig, Trenngele unterschiedlicher Zusammensetzung zu benutzen. Für die Proteine mit hohem Molekulargewicht wie Nestin (400kDa) und NF 200 (200kDa) wurde ein 6%iges Trenngel verwendet. Für die übrigen Proteine verwendeten wir ein 8%iges.

Für zwei 6%ige Trenngele à 1 mm Dicke wurde 5 ml Vierfach-Trenngelpuffer mit 4 ml Acrylamid 30% und 11 Aqua dest. gemischt. Für zwei 8%ige Trenngele à 1 mm Dicke wurde 5 ml Trenngelpuffer mit 5,4 ml Acryamid und 9,7 ml Aqua dest. gemischt. Beiden Gemischen wurden 100 μl Ammoniumpersulfat 10% und 20 μl TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin, Sigma) zugemischt. Die gießfertigen Gellösungen wurden zügig und sorgfältig in die Gelkassetten gegossen, um eine frühzeitige Polymerisierung des Gels außerhalb der Kassetten zu verhindern. Dabei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstehen, die das Laufen der Proteinbanden behindern könnten. Die Gellösung in den Gelkassetten wurde mit 400 μl Butanol (Sigma) beschichtet. Die Auspolymerisierung der Gele erfolgte über Nacht.

Am nächsten Tag wurde das Butanol entfernt, und das Sammelgel wurde hergestellt. Für zwei Sammelgele à 1mm wurden 2,5 ml Vierfach-Sammelgelpuffer mit 1,4 ml Acrylamid 30% und 6,2 ml Aqua dest. vermischt. Der angesetzten Lösung wurde 50 μl Ammoniumpersulfat 10% und 12,5 μl TEMED zugesetzt. Die Gellösung wurde in die mit einem "Kamm" vorbereiteten Gelkassetten gegossen. Dabei diente der "Kamm" der Auspolymerisierung der Probentaschen.

Nach erfolgter Auspolymerisierung des Sammelgels wurde der "Kamm" nach einer Stunde entfernt und die Probentaschen für 60 Minuten mit PAGE-Puffer gefüllt.

3.2.4.2. Durchführung der Elektrophorese und des Western-Blots

Nach der Auspolymerisierung der Trenn- und Sammelgele und der Einwirkzeit des PAGE-Puffers waren die Probentaschen zur Befüllung bereit. Dafür wurden die zu untersuchenden Homogenate und der Proteinstandard (Benchmark Prestained Protein Ladder, Life Technologies) mit Dreifach-Stop-Mix versehen (1 Teil Dreifach-Stop-Mix auf 2 Teile Homogenat bzw. Proteinstandart) für 2 Minuten in einem Wasserbad von 100°C erhitzt, dann für 20 Sekunden auf Eis abgekühlt und schließlich kurz zentrifugiert.

Mit einer speziellen Kanüle wurden die fertig hergestellten Proben in die Probentaschen durch Unterschichtung des PAGE-Puffers gefüllt (maximal 60 µl Probe pro Tasche). Nach Befüllung Elektrophoresekammer mit PAGE-Puffer und Spannungsgerätes an die Kammer erfolgte zunächst eine Elektrophorese für 1 Stunde bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA. Beim Übergang der Banden vom Sammel- ins Trenngel (ca. nach 1 Stunde) wurde die Stromstärke auf 60 mA erhöht, und ca. 3 Stunden abgewartet, bis die Proteinbande den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte. Nach dieser Zeit wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten abgehoben. Das Sammelgel wurde dabei verworfen. Auf die Rückseite des Gels wurde dann die vorbehandelte und markierte Membran gelegt, auf die die Proteine geblottet werden sollten. Beim Nachweis der Cytochrome P450 Bande wurde hierbei eine PVDF-Membran (Amersham) gewählt, die 10 Sekunden mit Methanol, 5 Minuten mit Aqua dest. und weitere 10 Minuten mit vorbehandelt Transferpuffer war. Die restlichen Proteine wurden auf Nitrocellulosemembrane (Schleicher & Schuell) übertragen. Diese Membrane wurden zuerst 10 Minuten in Aqua dest. und dann 2 Minuten in Transferpuffer vorbehandelt.

Das Gel und die Membran wurden zwischen zwei in Transferpuffer getränkte Filterpapierblätter und dann in jeweils eine Gitterkassette gelegt. Diese Gitterkassetten wurden unter Berücksichtigung der Blottrichtung in das mit Transferpuffer gefüllte Transfer-Gerät gespannt und an die Spannungsquelle angeschlossen. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 14 V.

Am nächsten Tag wurden Gel und Membran voneinander getrennt. Das Gel wurde verworfen. Die Membran wurde für 10 Minuten in Ponceau-Rot gefärbt, um die geblotteten Proteinbanden sichtbar zu machen. Eine kurze Spülung der Membran in Aqua dest. erlaubte durch die Visualisierung die Abtrennung des Proteinstandards, der für die später benötigten Ausmessungen aufgehoben wurde. Die Membran wurde nun für 120 Minuten in die Blockierungslösung gelegt. Nach einer 5 Minuten andauernden Spülung der Membran in TBST erfolgte die Inkubation mit dem in Inkubationspuffer verdünnten primären Antikörper für 1 Stunde. Der nicht gebundene Antikörperanteil wurde durch dreimaliges Spülen in TBST für jeweils 5 Minuten ausgewaschen, um dann mit dem in Inkubationspuffer verdünnten Sekundärantikörper die Membran für 1 Stunde zu benetzen. Nach dem Spülen mit TBST für 2x 5 Minuten und 1x 10 Minuten folgte eine kurze Waschung der Membran mit Aqua dest. für 2 Minuten. Die Entwicklung der Membran erfolgte mit dem ECL- bzw. ECL-Plus-Detektionssystem. Für eine Nitrocellulose-Membran wurden 10 ml ECL1 mit 10 ml ECL2 (Amersham) vermischt und die Membran für 45 Sekunden in dieser Lösung inkubiert. Die PVDF- Membran wurde mit 10 ml ECL-A und 250 µl ECL-B benetzt und für 5 Minuten in dieser Lösung belassen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Membranen abgetropft und in Folie eingeschweißt. Mit der Proteinseite nach oben wurden die eingeschweißten Folien dann in eine Röntgenkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm in der Dunkelkammer bedeckt. Die Expositionszeit betrug zur groben Orientierung bei der ersten Entwicklung 60 Sekunden. Je nach Intensität der Röntgenbildschwärzung wurde sie dann variabel nach oben oder unten korrigiert. Zur Entwicklung des Röntgenfilmes wurde Kodak LX 24, 1:4 mit Leitungswasser verdünnt, benutzt. Der anschließenden Fixierung diente Kodak AL4; 1:4 mit Leitungswasser verdünnt. In beiden Lösungen wurde der Röntgenfilm jeweils 60 Sekunden inkubiert. Nach einer kurzen Spülung in Leitungswasser wurden die Röntgenfilme dann über Nacht im Trockenschrank luftgetrocknet.

4. Ergebnisse

4.1. Paraffinschnitt-, Semidünnschnitt-Histologie und Elektronenmikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde die normale Struktur der Leydigzellen und der Stand der Spermatogenese sowie ausgewählte Fälle von unterschiedlich fortgeschrittener Leydigzellhyperplasie und Tumore mittels der klassischen histologischen Hämalaun-Eosin Färbung an Paraffinschnitten und der Toluidinblau-Pyroninfärbung an Semidünnschnitten untersucht. Für diesen Zweck wurde Material von 35 Patienten (über 50 Paraffin- und Epoxyharzblöcke) bewertet.

Der Status der Spermatogenese (Score count; Sc) wurde nach Behre et al. (2000) bestimmt. Hoden mit einer größeren Anzahl von Tubuli mit erhaltener Spermatogenese wurden von uns als "Kontrollhoden" (Sc 10, 9) bezeichnet. Solche, bei denen die Zahl der Tubuli mit erhaltener Spermatogenese kleiner war, haben wir als Hoden "mit restlicher Spermatogenese" (Sc 8, 7) eingestuft.

An histologischen Schnitten von Kontrollhoden des Menschen kann man das typische Hodenparenchym, welches von einer dicken bindegewebigen Kapsel, der Tunica albuginea umgeben ist und zusätzlich zu den Fibrozyten eine unterschiedliche Zahl von Myofibroblasten und glatten Muskelzellen enthält, erkennen. Das Hodenparenchym besteht aus den stark gewundenen Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) und dem intertubulären Raum (interstitieller Raum oder Interstitium). Die Samenkanälchen sind von einer 7-10 µm dicken, mehrlagigen (5 bis 7 Lagen) Bindegewebsschicht umgeben, der Lamina propria, die aus miteinander verbundenen, konzentrisch angeordneten flachen Zelllagen, die mit Kollagenfaserlagen alternieren, aufgebaut ist (Abb. 1). In den inneren Lagen der Lamina propria befinden sich vorwiegend Myofibroblasten. Im Gegensatz dazu besteht die äußerste Zelllage der Lamina propria, die den Tubulus vom Interstitium trennt, aus typischen Bindegewebszellen. Allerdings verlieren die Myofibroblasten mit zunehmendem Alter ihre Muskeleigenschaften und behalten nur die Merkmale von Bindegewebszellen (Davidoff et al. 1990).

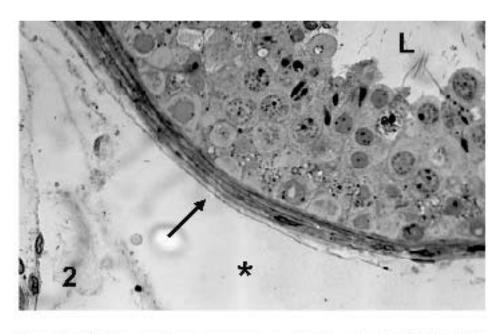
In den Hodentubuli (30-70 cm lang; Durchmesser von 180-280µm) befindet sich das

Keimepithel, das aus den typischen Keimzellen und die sie kompartmentalisierenden und unterstützenden Sertoli-Zellen besteht. Im Tubulus zeigen die Keimzellen eine charakteristische Verteilung, die mit dem Prozess der Spermatogenese in Zusammenhang steht (Abb. 1 bis 3). Auf der Basalmembran liegen die Spermatogonien (A-pale, A-dark und B-Spermatogonien). Zum Lumen hin (apikalwärts) folgen Spermatozyten I in unterschiedlichen Stadien der Meiose, Spermatozyten II, runde Spermatiden, elongierte Spermatiden und im Lumen abgegebene freiliegende Spermatozoen. Der Vorgang der Spermatogenese wird in zwei Grundstadien gegliedert: Spermatozytogenese (umfasst die Vorgänge bis zur Bildung der runden Spermatiden) und Spermiogenese (umfasst die Prozesse der Umwandlung der runden Spermatiden in Spermatozoen). In den Kontrollhoden konnten wir Areale mit gut erhaltener Spermatogenese neben solchen mit gestörter Spermatogenese beobachten. Dabei war ein Zusammenhang zwischen der Erhaltung der Spermatogenese und dem Alter des Patienten in den meisten Fällen nicht möglich. Fast in jedem Hoden konnten wir Areale mit gestörter Spermatogenese auf dem Niveau der runden Spermatiden (Abb. 4; Sc 9, 8), der Spermatogonien (Abb. 5; Sc 3), der Spermatozyten (Sc 4, 5) bis hin zum Vorkommen von lediglich Sertoli-Zellen ("Seroli-cellonly-Syndrome"; Sc 2) oder Tubulussklerose (Tubulusschatten; Sc 1) beobachten (Abb. 6).

Der zwischen den Samenkanälchen liegende intertubuläre Raum wird von einer besonderen bindegewebsähnlichen Zellart (Co-Zellen; Holstein and Davidoff 1997) in unterschiedlich große Kompartimente gegliedert. In diesem Raum konnten wir Bindegewebszellen, umgeben von der extrazellulären Matrix, Blutgefäße, wenig Makrophagen, gelegentlich Monozyten oder Lymphozyten und vor allem unterschiedlich große Aggregate oder Stränge von inter- oder peritubulär liegenden Leydigzellen sehen. Die Leydigzellen, die Androgene (männliche Geschlechtshormone) produzieren, umkreisen sehr häufig Gefäße der Mikrozirkulation des Hodens (Abb. 7, 8, 9). Sowohl im Paraffinschnitt als auch im Semidünnschnitt beobachten wir eine deutliche Heterogenität der Leydigzellen (Abb. 10, 11, 12). Sie besitzen eine unterschiedliche Größe und variable Form (polygonal, rund, oval, verzweigt mit unterschiedlich langen Fortsätzen und variable histologische Färbeintensität). Die meisten Leydigzellen besitzen einen großen, häufig exzentrisch gelegenen Zellkern, der ein oder mehrere Nucleoli und an der Peripherie angehäuftes Chromatin besitzt. Das Zytoplasma der Leydigzellen ist unterschiedlich stark angefärbt (helle und dunkle Zellen), variabel vakuolisiert und weist eine unterschiedliche



Abb. 1. Hoden – Mensch. Semidünnschnitt. Ausschnitt eines gewundenen Tubulus. Der Tubulus ist umgeben von der mehrschichtigen Lamina propria. Auf der Basalmembran liegen die verschiedenen Spermatogonien (SG). Über die Spermatogonien befinden sich Sertoli-Zellen, dessen Kern ein prominenter Nucleolus besitzt (kurzer Pfeil). In den Schichten darauf sind primäre Spermatozyten in unterschiedlichen Phasen der Meiose verteilt (langer Pfeil). Zum Lumen hin folgen runde und elongierte Spermatiden. Gesamtvergrößerung X 740



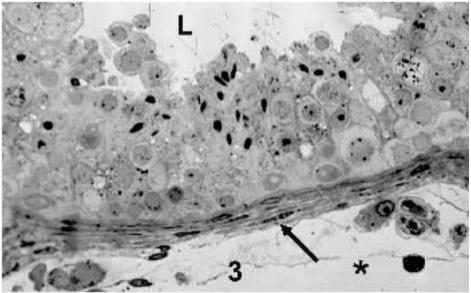
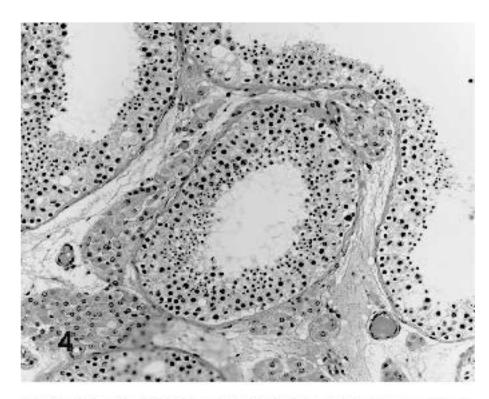


Abb. 2 und 3. Semidünnschnitte. Ausschnitte von zwei Tubuli seminiferi, die eine erhaltene Spermatogenese bis zu elongierten Spermatiden zeigen. L – Lumen der Tubuli. Die Pfeile weisen auf die Lamina propria. Die Sterne markieren den intertubulären Raum. X 630



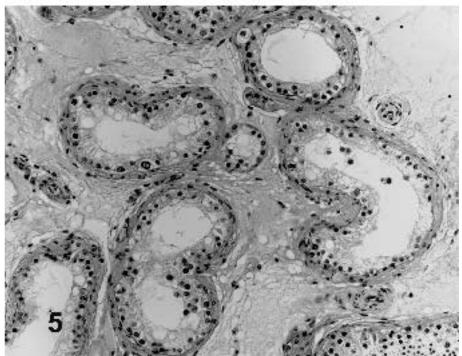


Abb. 4 und 5. Paraffinschnitte. Hämalaun/Eosin.

Areale des menschlichen Hodens mit 4. gestörter

Spermatogenese auf der Höhe der Spermatiden und 5. gestörter

Spermatogenese auf der Höhe der Spermatogonien. X 20

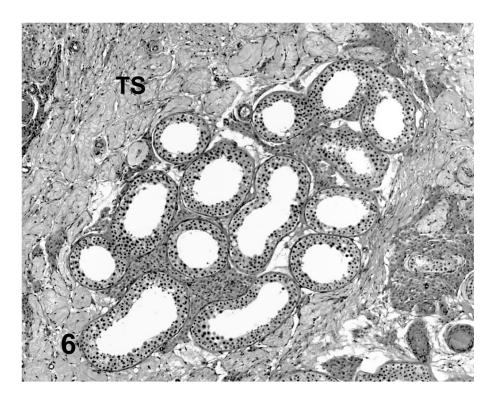
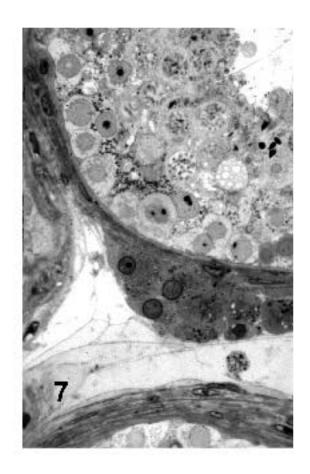


Abb. 6. Paraffinschnitt. Areal des menschlichen Hodens mit gestörter Spermatogenese auf der Stufe der Spermatozyten, umgeben von einer Zone mit Tubulusschatten (TS). Hämalaun/Eosin. X 10



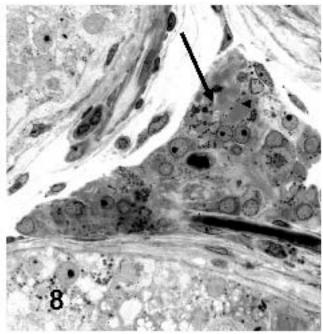
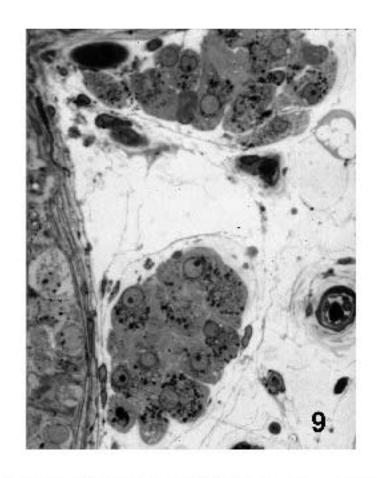


Abb. 7 und 8. Semidünnschnitte. Zwei Leydigzell-Aggregate von normaler Größe in unmittelbarer Nähe zu Tubuli mit erhaltener Spermatogenese. Die Leydigzellen sind unterschiedlich groß, zeigen eine variable Dichte der Anfärbung und einen unterschiedlichen Organellengehalt. Der schwarze Balken im unteren Abschnitt in Abb. 8 ist eine Kapillare, dessen Lumen mit Erythrozyten ausgefüllt ist. Der Pfeil zeigt auf eine Anhäufung von Reinke-Kristallen. Abb. 7 X 580; Abb. 8 X 590



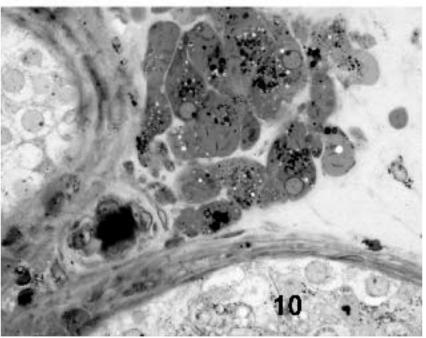
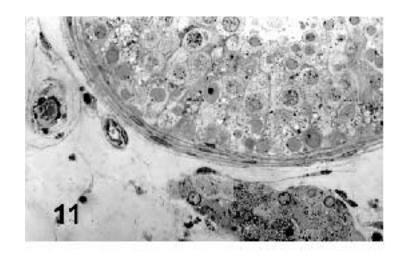


Abb. 9 und 10. Semidünnschnitte.

Abb. 9. Zwei kleine Aggregate von Leydigzellen in der Nähe eines Tubulus. Die Leydigzellen besitzen eine Heterogenität im Hinblick auf ihre Größe, Form und Organelleninhalt. X 580

Abb. 10. Ein Leydigzell-Aggregat in der Nähe eines Gefäßes. Die Leydigzellen sind schwach vakuolisiert. X 580



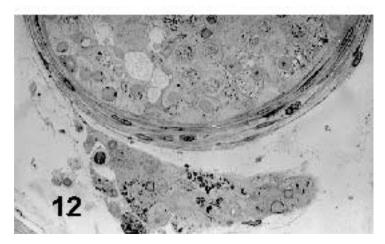


Abb. 11 und 12. Semidünnschnitte. Leydigzellgruppen in der Nähe von Tubuli. In beiden Gruppen ist eine deutliche Heterogenität der Leydigzellen zu sehen. In einigen Zellen hat sich dichtes granuliertes Material angehäuft. X 500

Anzahl von dunkel angefärbten Zellorganellen auf. Auch elektronenmikroskopisch waren wir in der Lage die typischen strukturellen Merkmale der Leydigzellen zu sehen. Besonders auffallend ist das Vorkommen des glatten endoplasmatischen Retikulums, der vielen Mitochondrien, des stark entwickelten Golgi-Apparates, verschiedene Zytoskelett-Filamente und eine Vielfalt von hellen und granulierten zytoplasmatischen Vesikeln (Abb. 13, 14). Im Zytoplasma einiger Leydigzellen konnten wir die typisch für den menschlichen Hoden vorkommenden Reinke Kristalle beobachten (Abb. 14). Unter dem Elektronenmikroskop sieht man Leydigzellen von unterschiedlicher Elektronendichte (helle und dunkle Zellen; Abb. 15).

4.2. Hyperplasie und Tumore der Leydigzellen

Bezüglich der Morphologie und der Menge der Leydigzellen lassen sich wesentliche Unterschiede im Hoden eines Individuums und zwischen den Hoden verschiedener Patienten feststellen. Prinzipiell konnten wir vereinzelt Areale mit Leydigzellhyperplasie auch in den von uns untersuchten Kontrollhoden feststellen. Bei den Fällen mit einer Leydigzellhyperplasie konnten wir neben Schnitte, die nur eine gering ausgeprägte Leydigzellhyperplasie zeigten, Präparate mit einer stark ausgeprägten Hyperplasie oder gar Leydigzell-Tumore beobachten. Um den Zusammenhang zwischen der Hyperplasie der Leydigzellen und dem Zustand der Spermatogenese zu überprüfen, haben wir in allen Schnitten besonders auf den Stand der Spermatogenese der Tubuli geachtet, die an Leydigzell-Plaques oder Tumore grenzen.

4.2.1. Leichte Hyperplasie

Bei der Betrachtung der Präparate, die lediglich eine leichte Leydigzellhyperplasie aufwiesen, fiel die gute Strukturerhaltung der Tubuli seminiferi auf. Nur ca. 5% der Tubuli wiesen eine starke Atrophie des Keimepithels mit Stillstand der Spermatogenese auf Höhe der Spermatogonien oder Spermatozyten auf (Abb. 16). Auch Areale mit Tubulusschatten waren in diesen Schnitten kaum nachweisbar. Im Vergleich zu den "Kontrollschnitten" fiel bei den Präparaten mit einer leichten Leydigzellhyperplasie eine gestörte Produktion der

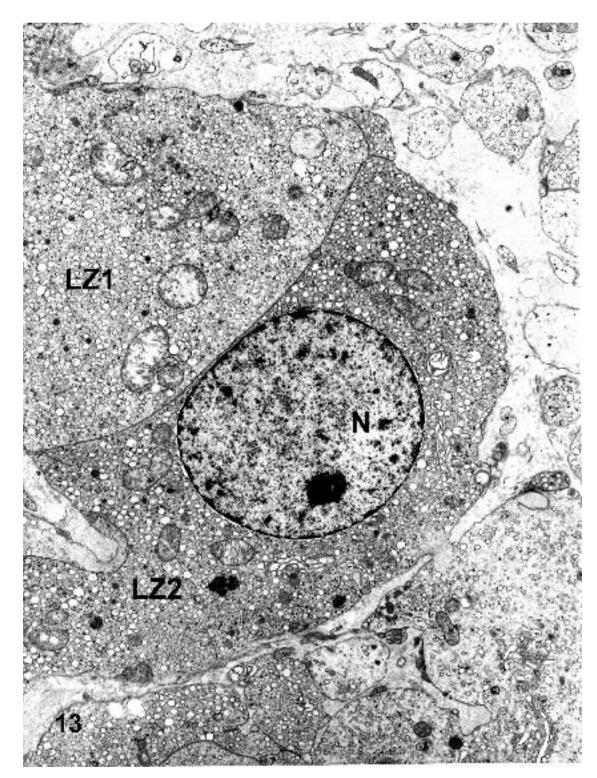


Abb. 13. Elektronenmikroskopische Darstellung eines Areals des menschlichen Hodens. Zwei Leydigzellen (LZ1 und LZ2) sind angeschnitten. Die LZ2 hat ein elektronendichtes Zytoplasma. Im Kern (N) ist ein prominenter Nucleolus sichtbar. Beide Leydigzellen besitzen für diese Zellen typische Organellen. Kennzeichnend für steroidhormonbildende Zellen ist das reichlich vorhandene zum Teil vakuolisierte glatte endoplasmatische Retikulum. Um die Leydigzellen sind viele Profile von Leydigzellfortsätzen verteilt, die unterschiedliche Organellen enthalten. X 9350

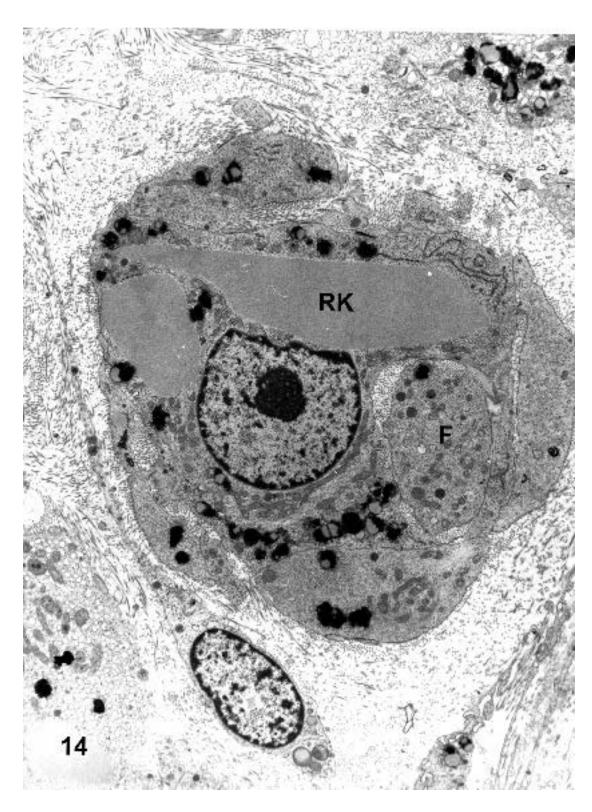


Abb. 14. Elektronenmikroskopische Darstellung einer Leydigzelle, die im Zytoplasma große Reinke-Kristalle (RK) sowie zahlreiche dichte Einschlüsse besitzt. Diese Leydigzelle umfasst einen Fortsatz (F) einer benachbarten Leydigzelle. X 8460

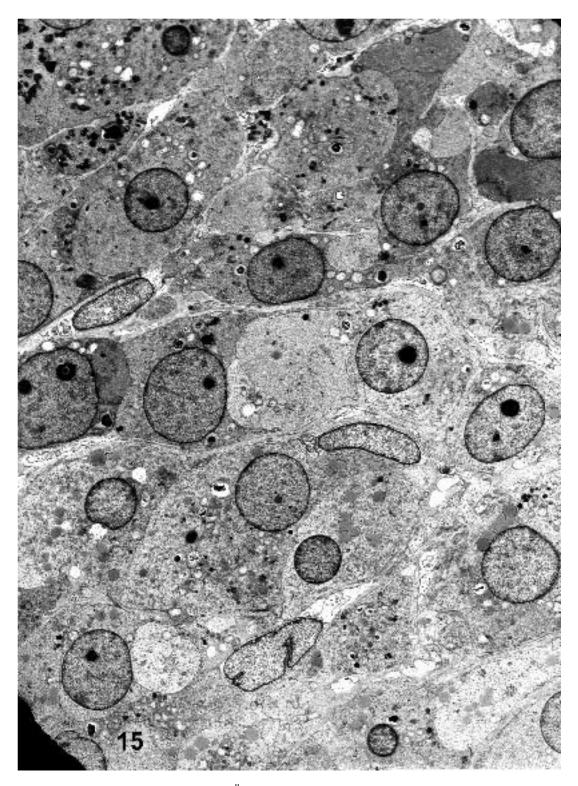
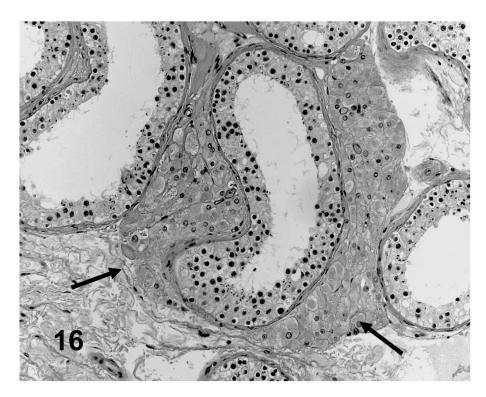


Abb. 15. Elektronenmikroskopischer Übersichtsausschnitt einer hyperplastischen Leydigzell-Plaque. Eine deutliche Heterogenität der Leydigzellen ist sichtbar. X 2010



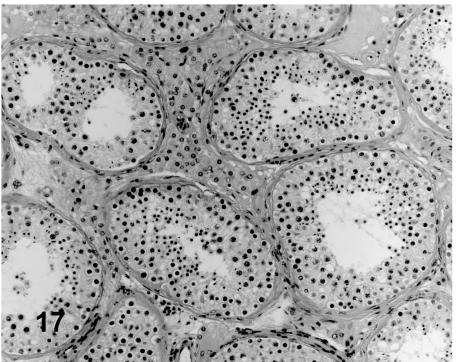


Abb. 16 und 17. Paraffinschnitte. Hämalaun/Eosin.
Abb. 16. Ein Areal mit hyperplastischen Leydigzellen (Pfeile).
In ihrer Umgebung liegen Tubuli mit gestörter Spermatogenese auf der Stufe von Spermatozyten. X 20
Abb. 17. Ein hyperplastisches Leydigzellareal zwischen Tubuli mit erhaltener restlicher Spermatogenese. X 20

elongierten Spermatiden auf. In der Nähe der hyperplastischen Areale konnten auch Tubuli mit erhaltener Restspermatogenese beobachten werden (Abb. 17). So konnte eine direkte Beziehung zwischen atrophischen Tubuli und hyperplastischen Leydigzell-Plaques nicht festgestellt werden.

4.2.2. Starke Hyperplasie

Auch bei Präparaten mit einer stärker ausgeprägten Leydigzellhyperplasie konnten wir einen Stillstand der Spermatogenese auf Höhe der runden Spermatiden feststellen (Abb. 18 und 19). Im Vergleich zur leichten Hyperplasie fiel eine Vermehrung der stärker atrophierten Tubuli auf, deren Spermatogenese einen Stillstand auf Höhe der Spermatozyten oder sogar Spermatogonien zeigte. Die atrophischen Tubuli befanden sich auch hier nicht zwangsläufig in der Nähe der hyperplastischen Leydigzellareale. Sie waren vorwiegend sporadisch im gesamten Präparat verteilt. Im Vergleich zu Präparaten mit leichter Leydigzellhyperplasie konnten bei Präparaten mit starker Hyperplasie zusätzlich auch Tubulusschatten (Abb. 20) sowie deren Vorstufe, die Sertoli-cell-only-Syndrom Tubuli, gesehen werden (Abb. 21). Leydigzell-Plaques, die jedoch zwischen mehreren Tubulusschatten lokalisiert waren, zeigten keine so stark ausgeprägte Hyperplasie (Abb. 22). Vielmehr beobachteten wir eine kleinere Plaquegröße innerhalb der Tubulusschatten (Abb. 23, 24). Es scheint, dass es sich hier um einen Vorgang handelt, der zur Degeneration von Leydigzell-Plaques führt. Andererseits konnten wir mitten in großen Tubulusschattenarealen breite hyperplastische Leydigzell-Plaques sehen, die keine Zeichen einer Degeneration aufwiesen. Eine Gesetzmäßigkeit war, dass hyperplastische Leydigzellen häufiger neben atrophischen Tubuli lagen, bei welchen mindestens Sertoli-Zellen vorhanden waren.

4.2.3. Leydigzelltumore

Die Untersuchung der Spermatogenese bei vorhandenen soliden Leydigzelltumoren ergab im Vergleich zur Hyperplasie eine starke Beeinträchtigung der Samenproduktion mit einer frühen Atrophie der Tubuli. Bei der Betrachtung dieser Präparate fiel der frühe Stillstand

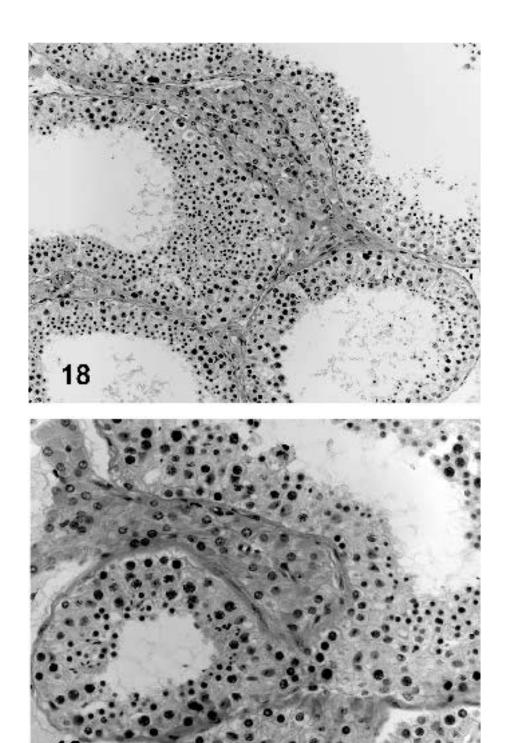
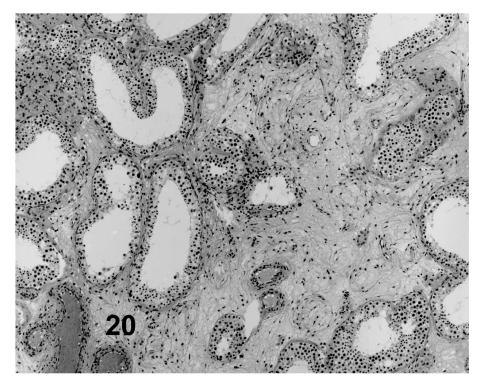


Abb. 18 und 19. Paraffinschnitte. Hämalaun/Eosin.

Abb. 18. Hodenareal mit Hyperplasie der Leydigzellen. Die benachbarten Tubuli zeigen Spermatogenese auf der Stufe der runden Spermatiden. X 20 Abb. 19. Eine hyperplastische Plaque zwischen Tubuli mit gestörter Spermatogenese auf der Stufe von runden Spermatiden. X 40



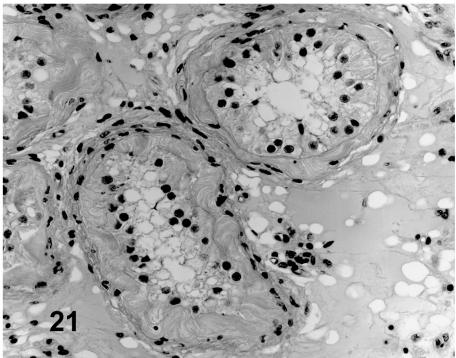


Abb. 20 und 21. Paraffinschnitte. Hämalaun/Eosin.

Abb. 20. Hodenareal mit hyperplastischer Plaque, in welcher Umgebung Tubuli mit gestörter Spermatogenese liegen. In der Mitte des Bildes sieht man ein homogenes Feld mit Tubulusschatten, in welchem die Leydigzellhyperplasie an Größe abnimmt. Im Zentrum des Tubulusschattenareals sind keine Leydigzellen vorhanden. X 10 Abb. 21. Das Hodenareal enthält Tubuli mit "Sertoli-cell-only-syndrome". X 40

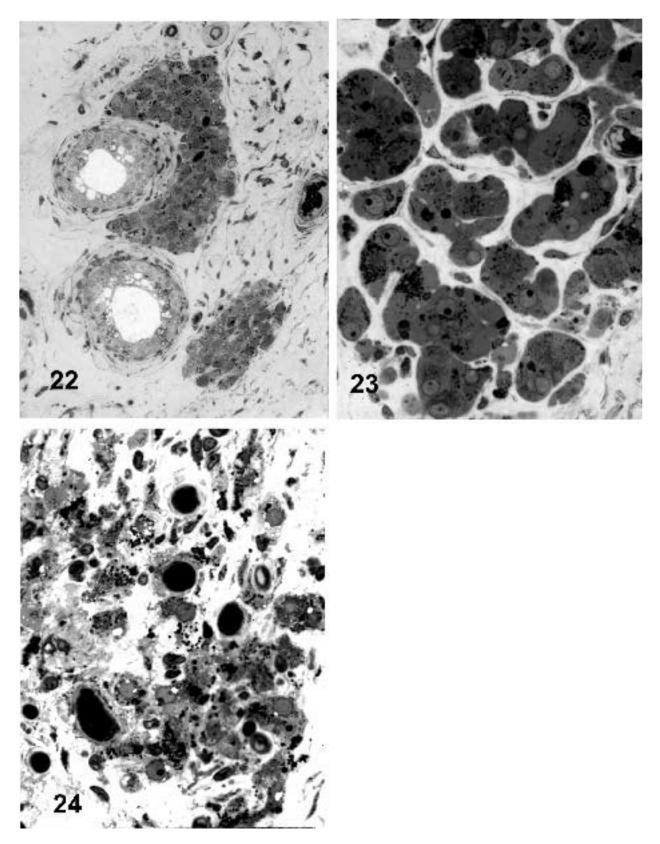


Abb. 22, 23 und 24. Semidünnschnitte, die unterschiedliche Phasen der Desintegration und Destruktion der Leydigzellen eines Tubulusschattenareals zeigen.
Abb. 22. Zwei hyperplastische Plaque in der Nähe von Tubuli mit geschädigter Spermatogenese. X 135; Abb. 23. Segregation einer Leydigzell-Plaque in kleineren Gruppen durch spindelförmigen Co-Zellen. X 420; Abb. 24. Degeneration der kleineren Leydigzellgruppen trotz dem Vorhandensein von vielen Blutgefäßen. (schwarzes Lumen). X 420

der Spermatogenese auf Höhe der Spermatozyten (Abb. 25) und Spermatogonien auf. Tubuli mit einer Atrophie auf dieser Höhe machten in etwa einen Anteil von 60% des Präparates aus (Abb. 26, 27). Beim Auftreten von Leydigzelltumoren konnten in allen von uns untersuchten Fällen Tubulusschatten oder Tubuli, die nur Sertoli-Zellen beinhalten nachgewiesen werden (Abb. 28, 29). In der Mehrzahl der Fälle waren die Tumore in diesen Arealen lokalisiert. Nur ein geringer Teil der Tubuli seminiferi wiesen eine Spermatogenese auf, die in Ansätzen eine intakte Spermatozoenproduktion zeigte. Leydigzelltumoren kamen jedoch auch in der unmittelbaren Umgebung von Tubuli mit erhaltener Spermatogenese vor (Abb. 30). Das Auftreten von Leydigzelltumoren, die sich zwischen benachbarten Tubuli ausbreiten, erschwerte die Differentialdiagnose, ob es sich hier um einen Tumor oder eine Hyperplasie handelt. Um dieses Problem zu klären, haben wir zusätzlich Serienschnitte und immunhistochemische Präparate untersucht.

Die hier ausgewerteten Präparate zeigten schlussfolgernd, dass die Spermatogenese bei leichter Hyperplasie kaum und nur zu einem geringen Maße eingeschränkt ist. Eine Gesetzmäßigkeit war, dass hyperplastische Leydigzellen häufiger neben atrophischen Tubuli lagen, bei welchen mindestens Sertoli-Zellen vorhanden waren. Eine Hemmung der Produktion von Samenzellen konnte deutlich beim Auftreten von Leydigzelltumoren erkannt werden. Eine vom Alter der Patienten abhängige Beeinträchtigung der Spermatogenese konnte nur bedingt festgestellt werden. Dabei war das Ausmaß der Beeinträchtigung nur schwer ermittelbar, da auch bei jüngeren Patienten ein sehr buntes Bild beobachtet werden konnte. Außerdem war die Spermatogenese in einer Anzahl der älteren Patienten besser ausgeprägt als bei jüngeren Männern.

Ein kleiner Teil der untersuchten Hoden stammte von Patienten, die einer antiandrogenen Therapie unterzogen wurden. In diesen Präparaten konnten wir abhängig von der Dauer der Therapie eine zunehmende Atrophie der Tubuli, die von einem vermehrten Schwund der Leydigzellen begleitet war, beobachten. In diesen Schnitten dominierten Tubuli mit einer Atrophie auf Höhe der Spermatogonien und Tubuli, die lediglich aus Sertoli-Zellen bestanden, um dann letztendlich in Tubulusschatten überzugehen.

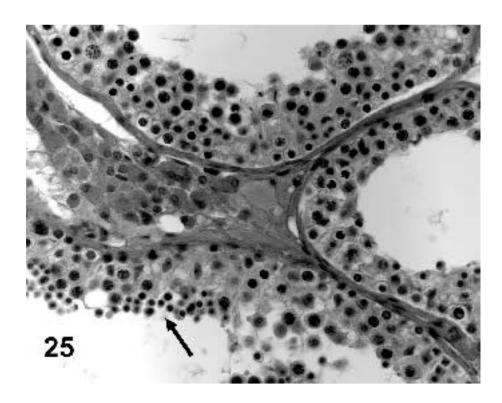
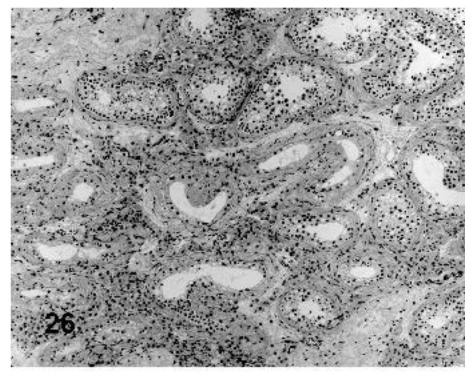


Abb. 25. Paraffinschnitt. Hämalaun/Eosin. Ein Leydigzell-Tumorareal (LZ-Adenom). In der Nachbarschaft der Tumorzellen liegen Tubuli mit einem Spermatogenesestopp auf der Stufe der Spermatozyten und stellenweise runden Spermatiden (Pfeil). X 40



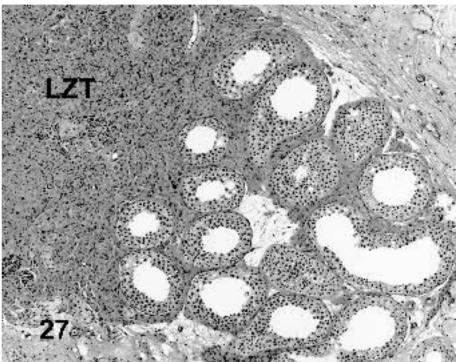
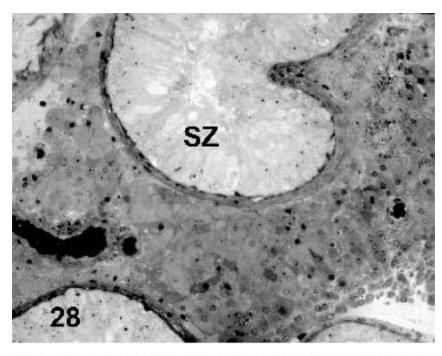


Abb. 26 und 27. Paraffinschnitte. Hämalaun/Eosin.

Abb. 26. Ein Tumorareal von Leydigzellen. Die benachbarten
Tubuli zeigen unterschiedliche Stufen der Atrophie. X 10

Abb. 27. Neben einer großen Tumorzellmasse (LZT) liegt ein
Tubulusareal mit atrophierenden Tubuli. X 10



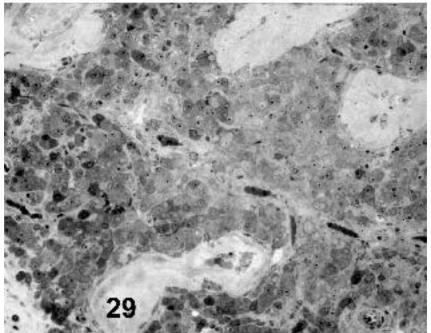


Abb. 28 und 29. Semidünnschnitte.

Abb. 28. Ausschnitt eines großen Areals von einem Leydigzelltumor. In den benachbarten Tubuli sind ausschließlich Sertoli-Zellen (SZ) vorhanden. X 180 Abb. 29. In einer großen Tumormasse sind mehrere Tubulusschatten (atrophische Tubuli) eingebettet. X 180

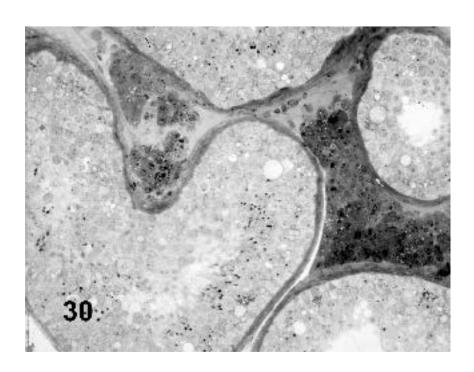


Abb. 30. Semidünnschnitt. Teil eines Leydigzelltumors. Die benachbarten Tubuli zeigen eine erhaltene Spermatogenese. X 185

4.3. Immunhistochemie der Leydigzellen des menschlichen Hodens

Um möglichst repräsentative Ergebnisse zu erzielen, haben wir eine breite Palette von Antigenen in normalen und unterschiedlich stark beschädigten Hodenarealen untersucht.

Folgende Areale wurden berücksichtigt:

1. Areale mit gut erhaltener Struktur und Spermatogenese; 2. Areale mit beginnender Atrophie von Tubuli in unmittelbarer Nachbarschaft zu Tubuli mit erhaltener Spermatogenese; 3. Areale, die hauptsächlich aus Tubulusschatten bestehen. Diese drei unterschiedlichen Areale konnten in einem Hodenschnitt direkt nebeneinander liegen.

Des Weiteren wurden nicht nur die immunhistochemischen Intensitätsunterschiede der Leydigzellen bezüglich ihrer Lokalisation betrachtet, sondern auch die Unterschiede in der Intensität der Antigennachweise in Verbindung mit der Größe der Leydigzell-Aggregate. Als Maßstab zur Definition diente der Durchmesser eines normalen Tubulusquerschnittes von ca. 250 µm.

Neben kleineren oder größeren Leydigzellansammlungen, die wir bei den Kontrollhoden beobachtet konnten, wurden solche gesehen, die die Größe eines Tubulusquerschnittes hatten und als hyperplastische Leydigzell-Plaques bezeichnet wurden. Leydigzell-Plaques, die die Größe eines Tubulusquerschnittes überschritten, wurden als Leydigzelltumore definiert und konnten vereinzelt in einigen der von uns untersuchten Fälle festgestellt werden.

Die von uns untersuchten Antigene (Substanzen) wurden in acht Gruppen zusammengefasst:

- 1. Neuronale und neuroendokrine Markersubstanzen
- 2. Neurotrophe Faktoren
- 3. Zytokine mit neurotropher Wirkung
- 4. Enzyme der Katecholaminsynthese
- 5. Calciumbindende Proteine
- 6. Proteine der synaptischen Vesikel
- 7. Zelladhäsionsmoleküle

8. Typische Gliazellantigene.

Bei der Beschreibung der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung haben wir vor allem auf die Leydigzellen geachtet, aber soweit wichtig für die Erklärung von Wechselwirkungen, wurden auch weitere testikuläre Strukturen (Sertoli-Zellen, Keimzellen und peritubulären Zellen der Lamina propria der Samenkanälchen) berücksichtigt. Die Beschreibung der Ergebnisse bezieht sich hier vor allem auf die Leydigzellen.

Um zu beweisen, dass eine Zelle tatsächlich Leydigzelle ist, haben wir parallel ein Markerenzym der Steroidsynthese, nämlich die Cytochrom p450scc nachgewiesen.

Plaquegröße der	Normale Plaque-	Hyperplastische	Tumore
Leydigzellen	Größe	Plaques	
GAP 43	1-111	1-111	1-111
Substanz P	I-II	1-11	I
NSE	11-111	11-111	11-111
Nestin	III-IV	III-IV	III-IV
NOS I	I-II	1-11	1-11
NF 160	11-111	II	1-11
NF 200	II	II	1-11
FGF-beta	11-111	11-111	11-111
NT 3	II	1-11	I
NT 4	II	1-11	I
BMP 6	11-111	11-111	11-111
	<u> </u>		
Trk A	II-III (IV)	II-III (IV)	11-111
Trk B	I	I	I
Trk C	I-II	1-11	I
NGFRp75	I-II	1-11	1-11
Inhibin alfa	I-II	I-II	1-11

GDNFR alfa	I	I	I	
		<u>, </u>	<u>'</u>	
TH	II	II	II	
AADC	II	II	I-II	
DBH	III	11-111	I-II	
PNMT	1-11	I-II	I-II	
S 100	III	<u> </u>	 I	
Calmodulin	11-111	II	1-11	
SNAP 25	li li	li li	li li	
Synaptophysin	I-II	- -	- -	
N CAM	I-II	I-II	I-II	
GFAP	II-IV	II-IV	II-IV	
CNPase	11-111	III	III	
O4	11-111	11-111	II-III	
Galactocerebroside	III	II	II	
A2B5	11-111	11-111	11-111	
Cytochrom P 450	III-IV	III-IV		
LDL	I-II	I-II	-II	

Legende: Intensität der Färbereaktion: I = schwach, II = schwach-mäßig, III = mäßig-stark, IV = stark

Leydigzelllokalisation	Erhaltenes	Atrophiertes	Schattenareal
	Material	Material	
GAP 43	 -	I-II	1-11
Substanz P	-	-	

NSE	11-111	11-111	-
Nestin	III	III	IV
NOS I	I-II	1-11	1-11
NF 160	II	II	11-111
NF 200	l	II	II
FGF-beta	li li	<u> </u>	 III
NT 3	I-II	I-II	- -
NT 4	I-II	I-II	I-II
BMP 6	1-11	II	11-111
		T	T
Trk A	II-III (IV)	II-III (IV)	II-III (IV)
Trk B	II	II	l
Trk C	1-11	I-II	I-II
NGFRp75	I-II	I-II	I-II
Inhibin alfa	I-II	I-II	I-II
GDNFR alfa	l	I	l
TH	II	II	II
AADC	I-II	II	11-111
DBH	II	II	III
PNMT	1-11	I-II	I-II
S 100	ĺ		-
Calmodulin	l	II	11-111
SNAP 25	II	II	II
Synaptophysin	I-II	- -	- -
N CAM	<u> </u>	-	 -
GFAP	III-IV	III	li l
CNPase	III	III	

O4	11-111	11-111	11-111
Galactocerebroside	III	11-111	II
A2B5	II-III	11-111	11-111
		1	
Cytochrom P 450	III-IV	III-IV	III-IV
LDL	I	II	II

Legende: Intensität der Färbereaktion: I = schwach, II = schwach-mäßig,

III = mäßig-stark, IV = stark

4.3.1. Neuronale und neuroendokrine Markersubstanzen

Eine schwache bis mäßige Intensität der Immunnachweise konnten wir in den Leydigzellen für folgende Antigene beobachten: GAP 43, Substanz P, NOS I und NF 200. Dabei zeigte die Leydigzellaktivität für GAP 43 (Abb. 31) und NOS I keine Lokalisationsabhängigkeit. In allen Arealen war hier die gleiche Leydigzellaktivität nachweisbar. GAP 43 fiel durch eine Besonderheit auf. Die Plaques zeigten, stärker als bei anderen Antikörpern, häufigere Unterschiede der Immunreaktivität. Diese Plaques verschiedener Färbeintensitäten folgten jedoch keiner Gesetzmäßigkeit gemäß Größe oder Lokalisation, sondern traten sporadisch im gesamten Schnitt verteilt auf.

Die Substanz P-Immunreaktivität war unterschiedlich stark. Wir konnten eine Abhängigkeit der Intensität von der Lage der Leydigzellen feststellen. Während die Immunpositivität der Leydigzellen in den Kontroll-Arealen und in den Arealen mit beginnender Tubulusatrophie schwach bis mäßig ausgeprägt war, imponierten in den Arealen mit Tubulusschatten Leydigzell-Plaques von sehr schwacher Immunreaktivität.

Beim Nachweis von NF 200 zeigten sich andere Aktivitätsverhältnisse. Die Leydigzellen besaßen hier eine stärkere Intensität in den Arealen mit Tubulusatrophie und Tubulusschatten. In den Gebieten mit gut erhaltener Tubulusstruktur und Spermatogenese konnte eine schwächere Positivität nachgewiesen werden. In den großen hyperplastischen Plaques und bei soliden Leydigzelltumoren beobachtete man eine stärkere Intensität der Immunreaktion in den Zellen, die in der Peripherie lokalisiert waren (Abb. 32).

Die weiteren Vertreter dieser Gruppe (Nestin, NSE und NF 160) besaßen eine mäßig bis starke Aktivität in den Leydigzellen. Während die NSE (Abb. 33, 34) in allen drei Hodenarealen eine konstante Leydigzellanfärbung zeigte, konnte bei den anderen

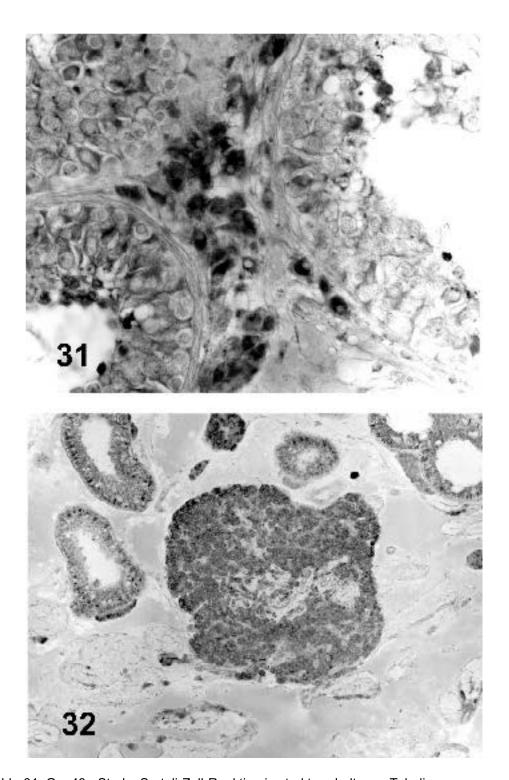
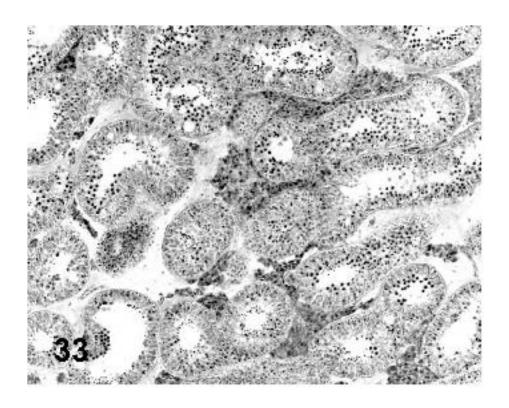


Abb. 31. Gap43 - Starke Sertoli-Zell-Reaktion in strukturerhaltenen Tubuli nahe einer Leydigzell-Plaque mit starker Immunreaktion. X 40
 Abb. 32. NF 200 - Leydigzelltumor in unmittelbarer Umgebung von Tubulusschatten und Tubuli mit beginnender Atrophie. Peripher liegende Leydigzellen des Tumors zeigen eine erhöhte Aktivität als zentral liegende Zellen. X 10



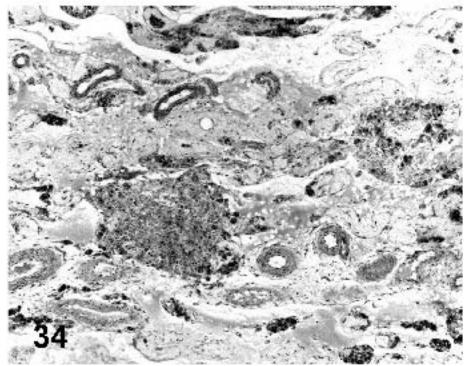


Abb. 33. NSE - Leydigzellhyperplasie in der Umgebung weitgehend strukturerhaltener Tubuli. Immunreaktivität ist nachweisbar in den Leydigzellen und in den Sertoli-Zellen. X 10

Abb. 34. NSE - Leydigzellplaque im Areal mit Tubulusschatten und atrophierenden Tubuli. Ihre Immunreaktivität ist im Vergleich zu der Immunreaktivität der Leydigzellen in der Nähe von intakten Tubuli konstant geblieben. X 10

Antikörpern lokalisationsabhängige Unterschiede der Immunreaktivität nachgewiesen werden. Ähnlich wie bei NF 200 zeigten auch die Leydigzellen bei NF 160 und Nestin eine Intensitätssteigerung zum Schattenareal hin. Diese Zunahme der Immunreaktivität war jedoch erst in den Arealen mit Tubulusschatten und nicht wie beim NF 200-Nachweis bereits in den Arealen mit atrophischen Tubuli nachweisbar.

Die stärkste Intensität dieser Antigengruppe war beim Nestin nachweisbar. Im erhaltenen Areal und im Gebiet atrophischer Tubuli konnte eine mäßige Intensität beobachtet werden (Abb. 35), wobei im Tubulusschattenareal eine Intensitätszunahme zu verzeichnen war (Abb. 36). Diese äußerte sich nicht nur in der stärkeren Färbung der Leydigzellen, sondern auch in der Zunahme der Anzahl der nestinaktiven Leydigzellen innerhalb einer Plaque.

Alle Vertreter dieser Gruppe zeigten eine zytoplasmatische Anfärbung mit Aussparung der Zellkerne. Dabei war das Reaktionsprodukt gleichmäßig im Zytoplasma der Leydigzellen verteilt.

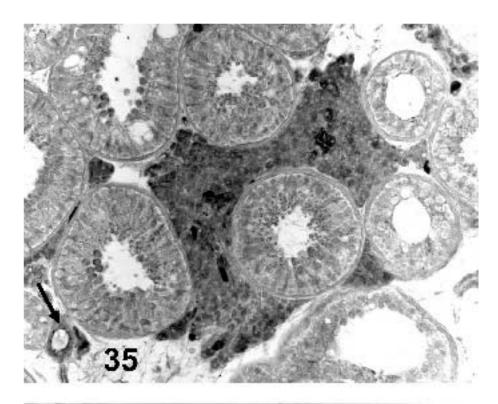
Bei NF 160 und NF 200 (Abb. 32) fiel auf, dass die Zellaktivität einer bestimmten Anordnung folgte. Besonders bei Leydigzellansammlungen in Größe eines Tumors war die Zellaktivität in den Randgebieten des Tumors erheblich ausgeprägter, als die der zentral liegenden Leydigzellen. Diese intensivere Anfärbung der Leydigzellen im peripheren Randgebiet der Plaque war lokalisationsunabhängig nachweisbar.

Eine Immunreaktivität konnte in den Sertoli-Zellen für NF 160 und NF 200 (Abb. 37) nachgewiesen werden. Bei diesen Nachweisen wurde eine stärkere Anhäufung des Reaktionsmaterials in Sertoli-Zellen von Tubuli gesehen, die in der Nähe von Leydigzell-Plaques mit auffallend niedriger Aktivität lokalisiert waren.

Die Sertoli-Zellen waren auch für GAP 43 positiv (Abb. 31) und auch hier abhängig von umgebenden Strukturen. In der Nähe von hyperplastischen Leydigzell-Plaques war die Immuaktivität stärker ausgeprägt.

Eine gleichmäßig verteilte Immunreaktivität besaßen die Sertoli-Zellen für die Substanz P. Hier war vor allem das basale Zytoplasma der Sertoli-Zellen markiert (Abb. 38).

Eine Sertoli-Zell-Aktivität konnte ebenfalls für NOS I und für Nestin (Abb. 35) nachgewiesen werden.



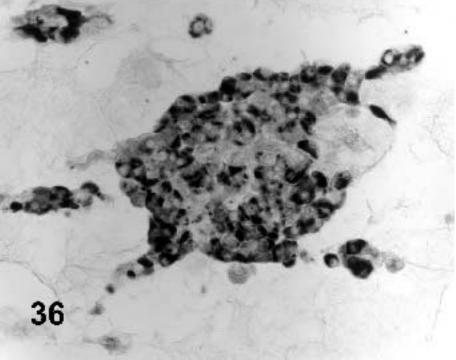


Abb. 35. Nestin - Mäßige Leydigzell-Immunreaktion nahe Tubuli mit erhaltener Spermatogenese bzw. beginnender Atrophie.

Nestinpositiv stellen sich hier auch die Sertoli-Zellen dar. Markierung von Endothelzellen der Gefäße (Pfeil).

X 20

Abb. 36. Nestin - Starke Immunreaktion bei Leydigzellen, die sich im Tubulusschattenareal befinden. Starke Immunreaktion in den ab- und zuführenden Gefäßen. X 40

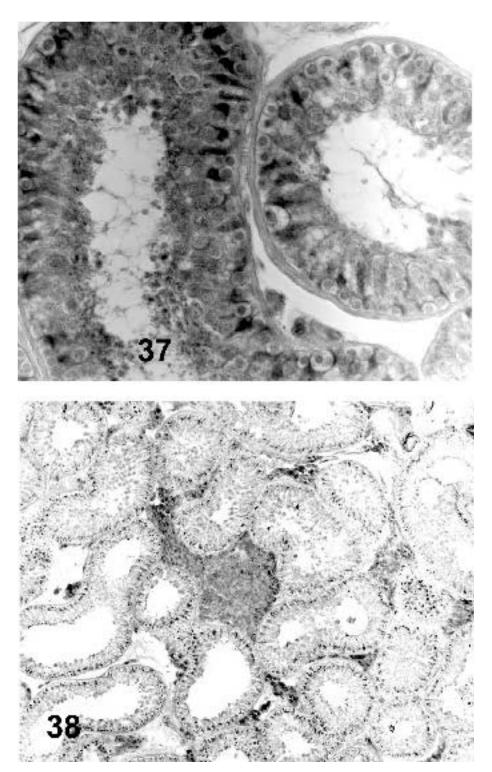


Abb. 37. NF 200 - Strukturerhaltene Tubuli mit starker Immunpositivität in den Sertoli-Zellen. X 40

Abb. 38. Substanz P - Leydigzell-Plaque im Areal mit weitgehend strukturerhaltenen Tubuli. Eine Markierung des basalen Zytoplasmas der Sertoli-Zellen ist in allen Tubuli ersichtlich. X 10

Weitere Strukturen, die eine Immunreaktivität für die untersuchten Antigene zeigten, waren glatte Muskelzellen und Endothelzellen der Hodengefäße, die sich besonders beim Nestinnachweis positiv hervorhebten (Abb. 39). Des Weiteren fanden wir auch GAP 43-und Substanz P-positive glatte Muskelzellen.

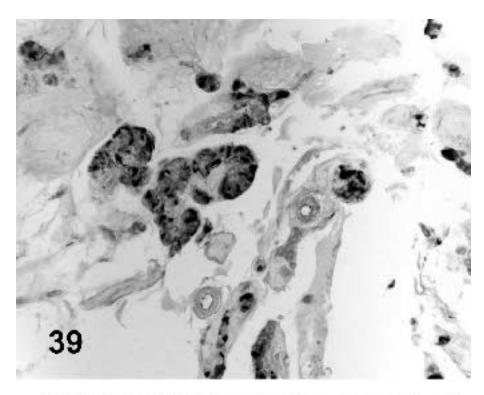
Bezüglich der Größe der Leydigzell-Plaques konnte beobachtet werden, dass hyperplastische Plaques und Tumore beim NF 160- (Abb. 40), NF 200- und Substanz P-Nachweis eine geringere Immunreaktivität aufwiesen.

4.3.2. Neurotrophe Faktoren und Zytokine mit neurotropher Wirkung

Die Neurotrophine FGF-beta, NT-3, NT-4 und BMP 6 konnten im Zytoplasma der Leydigzellen nachgewiesen werden und zeigten eine schwache bis mäßig ausgeprägte Intensität der Immunreaktion. Während beim NT-3- und NT-4-Nachweis die Immunreaktivität in allen drei von uns untersuchten Arealen vorhanden und konstant war, konnten wir in den Leydigzellen eine Zunahme der FGF-beta- und BMP 6- Intensität (Abb. 41) zum Areal mit Tubulusschatten hin beobachten. Im erhaltenen Areal und im Areal beginnender Atrophie wurde eine schwächere Immunaktivität nachgewiesen als im Schattenareal.

Entgegengesetzt zur vergleichbaren Aktivität in allen drei untersuchten Arealen zeigten die NT-3 (Abb. 42) und NT-4 immunreaktiven Leydigzellen eine von der Größe der Aggregate abhängige Aktivität. Während nicht hyperplasierte Leydigzellen und leicht hyperplastische Plaques eine mäßig bis schwache Immunintensität hatten, beobachteten wir in den Zellen der Tumore eine Aktivitätsabnahme. Diese größenabhängige Aktivitätsminderung konnte bei BMP 6 und FGF-beta nicht nachgewiesen werden. Vielmehr war hier eine konstante Aktivität erkennbar.

Innerhalb einer Plaque zeigte sich in den meisten Fällen eine diffuse Verteilung der immunpositiven Leydigzellen. Die Ausnahme bildeten FGF-beta- (Abb. 43) und BMP 6-positive Plaques und Tumore (Abb. 44). Hier beobachtete man eine Anhäufung des Reaktionsprodukts in der Peripherie der hyperplastischen Plaques und Tumore. Diese Randlokalisation der stark positiven Leydigzellen erleichterte wesentlich die Abgrenzung eines intertubulär lokalisierten Tumors.



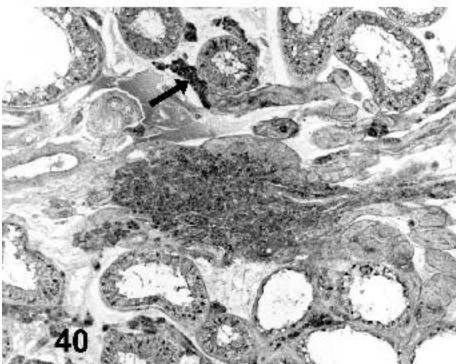


Abb. 39. Nestinpositive Leydigzell-Plaque sind diffus verteilt im Tubulusschattenareal. Dazwischen 2 quer und 4 längs angeschnittene Blutgefäße. Im Gefäßendothel kann Nestin nachgewiesen werden. X 20

Abb. 40. NF 160 - Leydigzelltumor umgeben von atrophierten Tubuli und Tubulusschatten. Im Vergleich zum Tumor fällt eine deutliche Aktivitätssteigerung in kleineren Plaque auf (Pfeil).

Als Nebenbefund sieht man immunpositive Sertoli-Zellen.

X 10

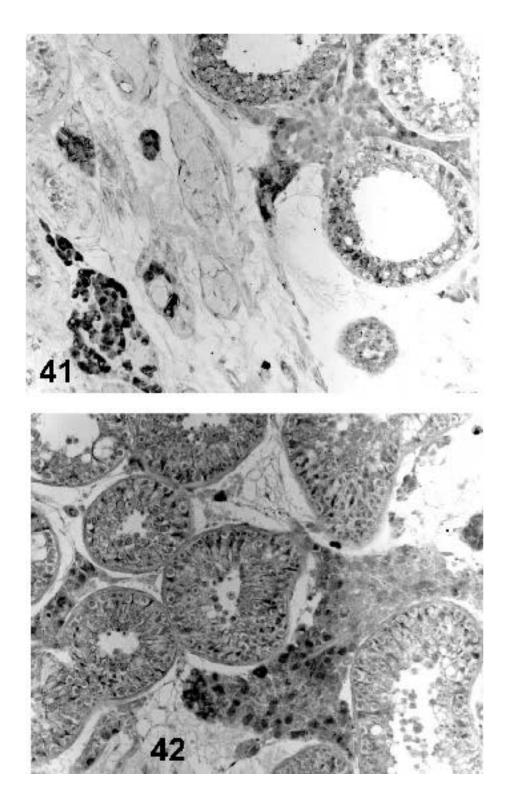
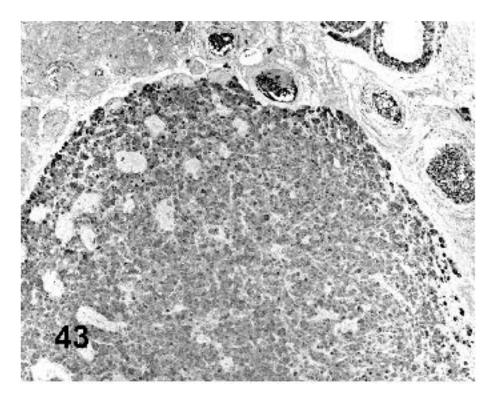


Abb. 41. BMP6 - Grenze zwischen atrophierten Tubulusschattenareal und Tubuli mit beginnender Atrophie. Leydigzell-Plaque im Gebiet des Schattenareals zeigen eine deutliche Aktivitätssteigerung als welche, die sich in der Umgebung beginnender Atrophie befinden. Innerhalb der Tubuli kann eine Positivität der Sertoli-Zellen gezeigt werden. X 20

Abb. 42. NT-3 - Weitgehend erhaltene Tubulusstruktur. Mittig liegende immunpositive Leydigzell-Plaque. Deutliche Immunpositivität der Sertoli-Zellen. X 40



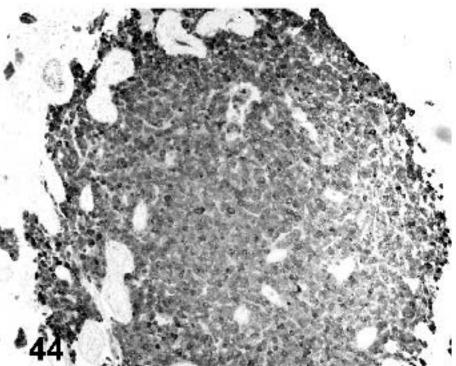


Abb. 43. FGF - Ausschnitt eines Tumors im Tubulusschattenareal. Eine Aktivitätssteigerung der peripher liegenden Leydigzellen im Vergleich zu den zentral liegenden Leydigzellen ist ersichtlich. X 10

Abb. 44. BMP 6 - Tumor im Tubulusschattenareal. Eine Aktivitätssteigerung der peripher liegenden Leydigzellen im Vergleich zu den zentral liegenden Leydigzellen ist ersichtlich. X10

Der BMP 6-Nachweis gelang ebenfalls in den Sertoli-Zellen. Wobei hier besonders das basale Zytoplasma der Sertoli-Zellen eine Immunpositivität zeigte (Abb. 45).

Auch FGF (Abb. 46) und NT-3 (Abb. 42) konnte in den Sertoli-Zellen nachgewiesen werden. Eine weitere Struktur, bei der der Nachweis von FGF gelang, waren die Keimzellen der Tubuli seminiferi (Abb. 46).

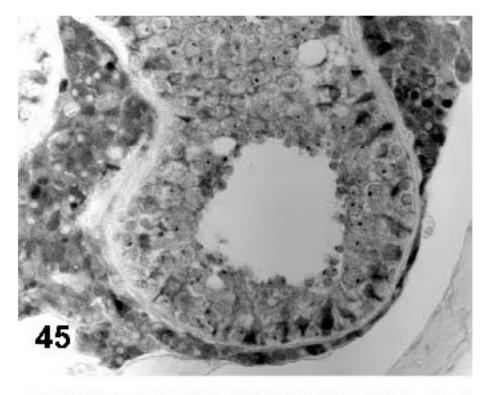
Immunreaktivität für NT-4 (Abb. 47), NT-3, BMP 6 und FGF konnte auch in den glatten Muskelzellen einiger Gefäße beobachtet werden.

Die für die Neurotrophine spezifischen Rezeptoren Trk A, Trk B und Trk C (Abb. 48) zeigten in den Leydigzellen unterschiedlich starke Reaktionsintensitäten. Während Trk A eine mäßige bis starke Immunreaktivität hatte, war die Positivität der Leydigzellen für Trk B nur schwach ausgeprägt. Trk C wurde schwach bis mäßig exprimiert. Dabei zeigten die Trk A und Trk C-Nachweise keine lokalisationsabhängige Aktivitätsunterschiede. Bei Trk B konnte eine schwächere Immunreaktivität im Tubulusschattenareal nachgewiesen werden (Abb. 49). Größenabhängige Intensitätsdifferenzen waren nur bei Trk A und Trk C ersichtlich. Die Leydigzell-Tumore zeigten eine schwächere Intensität für diese Antigene. Trk A zeigte des Weiteren eine leichte Intensitätszunahme peripher gelegener Leydigzellen innerhalb einer Plaque (Abb. 50).

Bei NGFRp75 konnten keine lokalisations- oder größenspezifische Intensitätsunterschiede nachgewiesen werden. Der Nachweis von NGFRp75 gelang im Zytoplasma der Leydigzellen sowie in den Myofibroblasten der Lamina propria (Abb. 51).

Der Nachweis der Immunreaktivität in Sertoli-Zellen gelang für Trk A (Abb. 52) und Trk C (Abb. 48). Bei Trk B konnte neben einer Leydigzellpositivität eine, in diesem Ausmaß bei keinem anderen Antigen beobachtete, Bindegewebe und Tubulusschatten-Immunaktivität im Bereich des intertubulären Raumes nachgewiesen werden. Neben dieser starken Bindegewebsanfärbung konnte bei Trk B wie bei Trk A eine Immunreaktivität in den glatten Gefäß-Muskelzellen nachgewiesen werden. Trk A war ferner in den Endothelzellen der Gefäße darstellbar (Abb. 53).

GDNFR-alfa und Inhibin-alfa zeigten in den Leydigzellen als Zytokine mit neurotropher Wirkung keine größen- oder lokalisationsabhängigen Besonderheiten. GDNFR-alfa konnte in den Sertoli-Zellen nachgewiesen werden, sowohl in Tubuli mit gut erhaltener Struktur



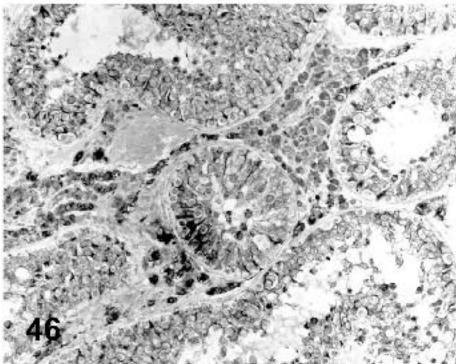


Abb. 45. BMP6 - Weitgehend strukturerhaltener Tubulus umhüllt von Leydigzell-Plaque. Innerhalb des Tubulus wird eine starke Aktivität in den basalen Abschnitten der Sertoli-Zellen ersichtlich. X 40

Abb. 46. FGF - Weitgehend erhaltene Tubulusstruktur. Mittig liegende immunpositive Leydigzellplaque. Deutliche Immunpositivität der Sertoli-Zellen und der Keimzellen. X 10

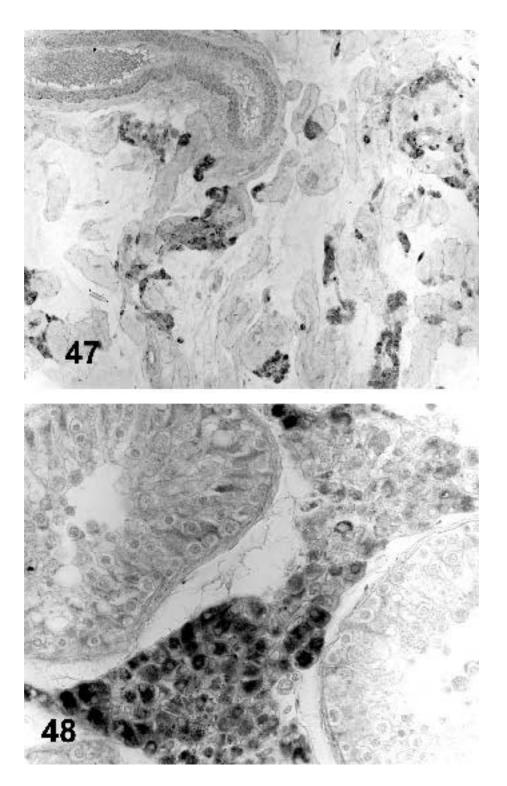
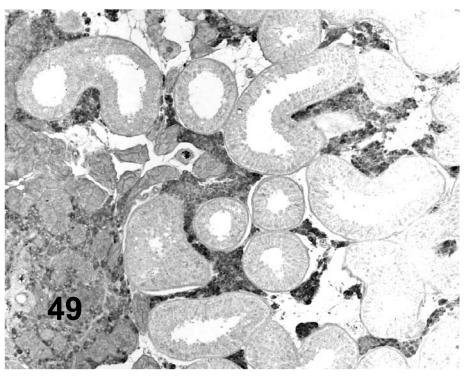


Abb. 47. NT-4 - Mehrere kleine immunpositive Leydigzell-Plaque im Tubulusschattenareal. Oben li. Gefäßquerschnitt mit immunpositiven Muskelzellen. X 10

Abb. 48. Trk C - Leydigzell-Plaque in unmittelbarer Umgebung strukturerhaltener Tubuli. Neben der Immunpositivität der Leydigzellen kann eine leichte Immunreaktivität der Sertoli-Zellen gezeigt werden. X 40



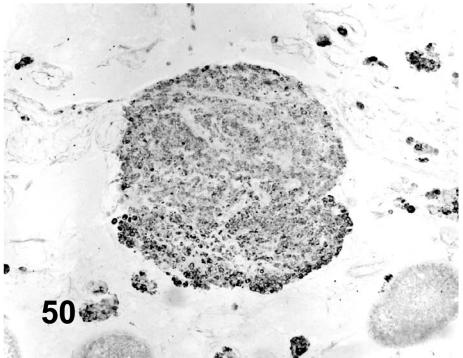


Abb. 49. Trk B - Grenze zwischen atrophierten Tubulusschattenareal und Tubuli mit beginnender Atrophie (links im Bild). Leydigzell-Plaque im Gebiet des Schattenareals zeigen eine deutliche Aktivitätsabnahme als welche, die sich in der Umgebung beginnender Atrophie befinden. X 10

Abb. 50. Trk A - Tumor im Tubulusschattenareal. Eine Aktivitätssteigerung der peripher liegenden Leydigzellen im Vergleich zu den zentral liegenden Leydigzellen ist ersichtlich. X 10

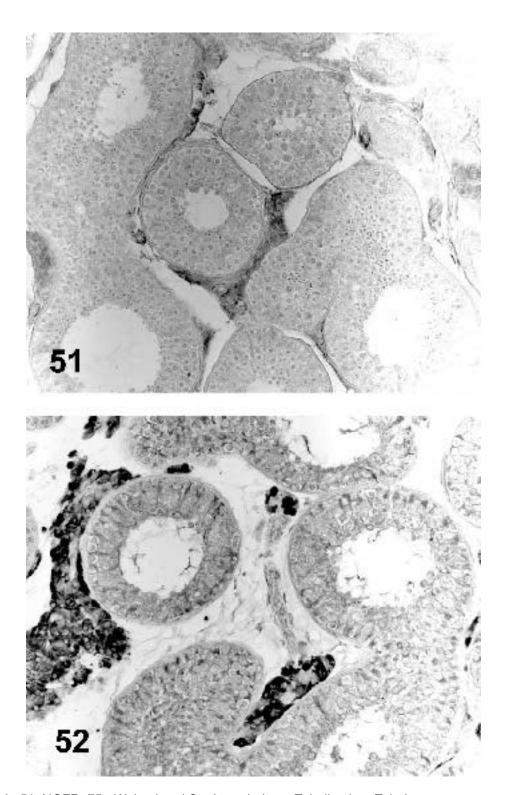


Abb. 51. NGFRp75 - Weitgehend Strukturerhaltene Tubuli neben Tubulusschatten. Immunpositivität in den Leydigzellen und in den Myofibrobasten der Lamina propria. X 20

Abb. 52. Trk A - Weitgehend erhaltene Tubulusstruktur. Sich um den Tubulus liegende immunpositive Leydigzellplaque. Deutliche Immunpositivität der Sertoli-Zellen. X 20

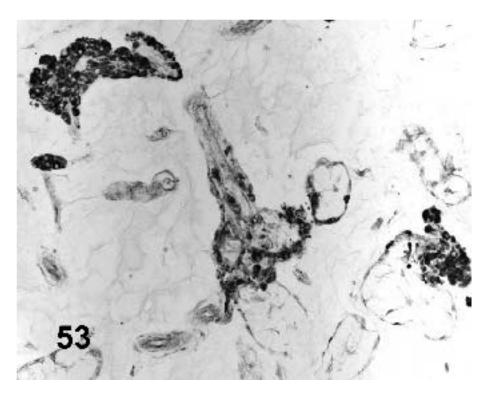


Abb. 53. TrkA - Tubulusschattenareal. Endothel und die glatten Muskelzellen in Gefäßen zeigen neben den immunpositiven Leydigzellen ebenfalls eine Immunreaktion. X 20

(Abb. 54), als auch in Sertoli-Zellen von degenerierten Tubuli (Abb. 55).

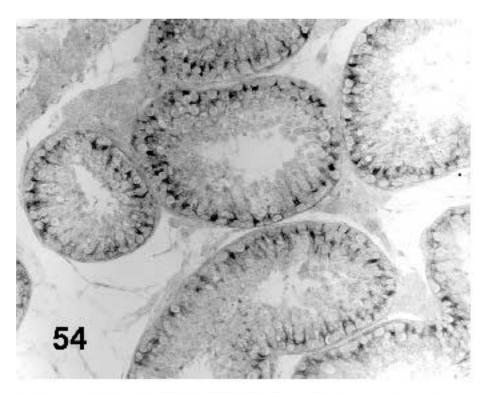
4.3.3. Enzyme der Katecholaminsynthese

Die Enzyme der Katecholaminsynthese (TH, AADC, DBH und PNMT) konnten im Zytoplasma der Leydigzellen nachgewiesen werden. Die Immunreaktivität für TH und **PNMT** Abhängigkeit Größe zeiate keine von der und Lokalisation Leydigzellanhäufungen, während bei AADC (Abb. 56) und DBH eine lokalisations- und größenabhängige Immunaktivität beobachtet wurde. Die letztgenannten Enzyme zeigten eine Steigerung der Immunreaktivität in den Arealen mit Tubulusschatten sowie eine Abnahme der Färbeintensität bei stark hyperplastischen Leydigzellen oder Tumoren. DBH wurde dabei stärker in den peripher liegenden Leydigzellen eines Tumors exprimiert (Abb. 57). PNMT- (Abb. 58) und AADC-Immunreaktivität (Abb. 59) konnte auch in den Sertoli-Zellen beobachtet werden.

4.3.4. Calciumbindende Proteine

Die calciumbindenden Proteine S-100 und Calmodulin wiesen eine ähnliche Immunreaktivität auf. Beide Proteine zeigten im erhaltenen Hodenmaterial (Abb. 60) eine geringere Aktivität als im Areal mit Tubulusschatten (Abb. 61) oder im Gebiet atrophischer Tubuli. In Bezug auf die unterschiedlichen Plaquegrößen glichen sich die beiden Proteine in ihrem Verhalten ebenfalls. Eine stärkere Immunreaktivität war bei normal großen Leydigzellansammlungen sowie bei leichten Hyperplasien zu beobachten. Die Leydigzell-Tumore zeigten dagegen kaum noch eine Aktivität der calciumbindenden Proteine. Beim S-100-Nachweis waren die Zellen in der Peripherie des Tumors stärker positiv. Diese Immunaktivitätssteigerung der peripher liegenden Leydigzellen konnte hier jedoch nicht nur bei Tumoren festgestelt werden. Sie war auch bei kleinen Leydigzell-Aggregaten nachweisbar (Abb. 62).

Immunpositivität für beide Proteine war auch in den Sertoli-Zellen sichtbar. Während bei S-100 die Intensität der Reaktion eher keine Besonderheiten aufwies, erkannte man bei Calmodulin eine sich wiederholende Gesetzmäßigkeit. Die Intensität der Sertoli-Zell-



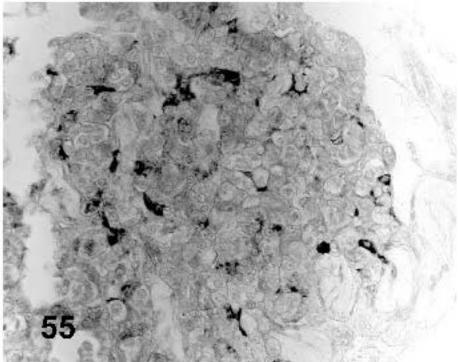
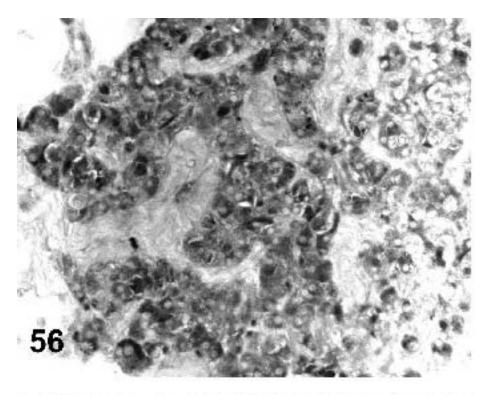


Abb. 54. GDNFR alfa - Weitgehend strukturerhaltene Tubuli mit starker Sertoli-Zell-Immunpositivität. Leydigzellen zeigen nur eine schwache Immunreaktion. X 20

Abb. 55. GDNFR alfa - Atrophierte Tubuli, umhüllt von Leydigzellen, die kaum immunreaktiv sind. Noch immunreaktive Sertoli-Zellen sind genau zu erkennen. X 40



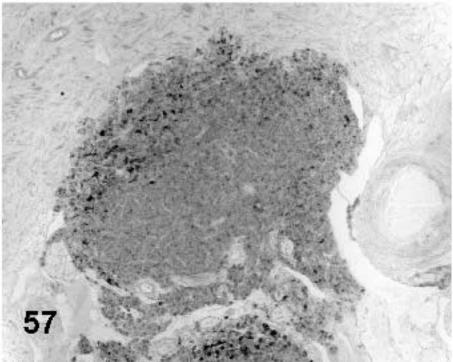
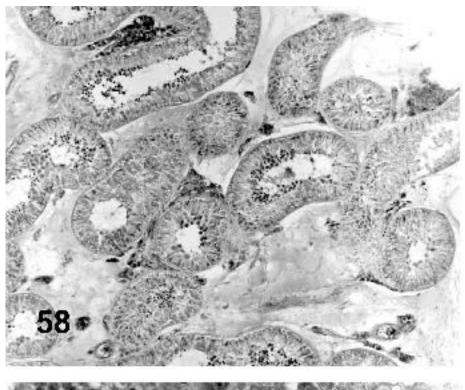


Abb. 56. AADC - Leydigzellanhäufungen im atrophierten Tubulusschattenareal. Deutlich wird die starke Immunpositivität der Leydigzellen. X 40

Abb. 57. DBH - Leydigzelltumor im Gebiet atrophierter Tubulusschatten. Die peripher liegenden Leydigzellen des Tumors zeigen eine deutliche Aktivitätssteigerung als die zentral liegenden. X 10



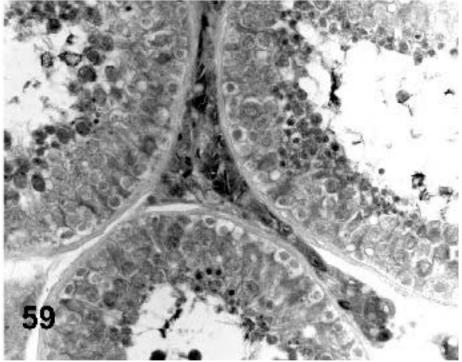
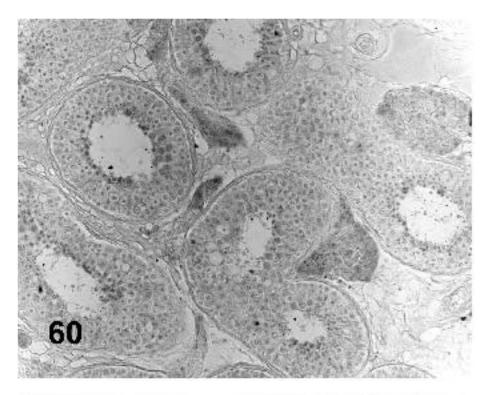


Abb. 58. PNMT - Leydigzellansammlung bei Tubuli mit beginnender Atrophie. Sichtbar wird eine Immunaktivität der Sertoli-Zellen. X 10 Abb. 59. AADC - Weitgehend Strukturerhaltene Tubuli mit Leydigzellansammlung. Eine dezente Immunpositivität der Sertoli-Zellen kann deutlich gemacht werden. X 40



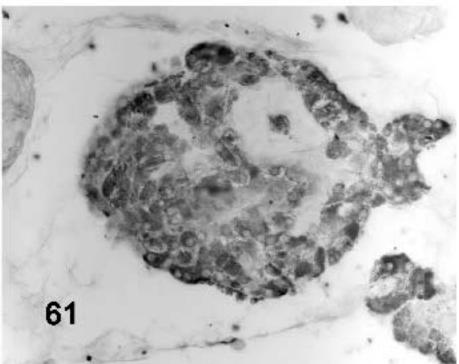
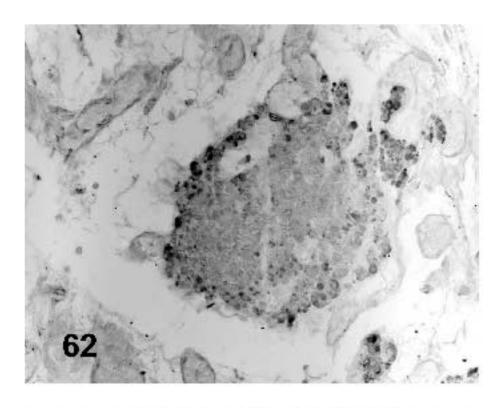


Abb. 60. S100 - Weitgehend strukturerhaltene Tubuli mit Leydigzellansammlungen. Man erkennt die schwache Immunreaktion der Leydigzellen. X 20

Abb. 61. S100 - Leydigzell-Plaque im atrophierten Schattenareal. Im Vergleich zu der geringen Immunaktivität der Leydigzellen im erhaltenen Tubulusareal, ist hier eine deutliche Intensitätssteigerung ersichtlich. X 40



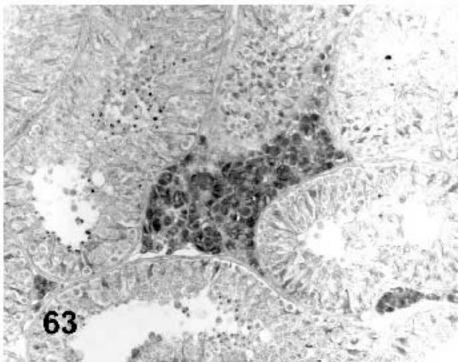


Abb. 62. S100 - Leydigzell-Plaque im atrophierten Schattenareal. Eine Intensitätssteigerung der peripher liegenden Leydigzellen ist auch bei dieser leichten Hyperplasie erkennbar. X 20

Abb. 63. Calmodulin - Leydigzell-Plaque zwischen strukturerhaltener Tubuli. Die Leydigzellen zeigen eine starke Immunpositivität. Die Sertoli-Zellen in der Umgebung dieser stark immunpositiven Plaque zeigen im Vergleich zu Sertolizellen neben Immunschwächeren Plaque eine schwächere Immunaktivität. X 20

Positivität hing von der Immunaktivität der umgebenen Leydigzell-Plaques ab. Sertoli-Zellen nahe Plaques von hoher Aktivität (Abb. 63) zeigten eine geringere Intensität der Immunreaktion als solche, die in der Nähe schwach aktiver Plaques (Abb. 64) vorkamen. Des Weiteren zeigten die Myozyten der Blutgefäße eine Immunpositivität für Calmodulin.

4.3.5. Proteine der synaptischen Vesikel

Beide Proteine SNAP 25 und Synaptophysin (Abb. 65) zeigten eine schwache bis mäßige Immunreaktion, die weder lokalisationsabhängig noch von der Größe der Leydigzellansammlung abhängig war. Eine leichte Aktivitätssteigerung der Leydigzellen konnte bei Synaptophysin in der Plaqueperipherie gesehen werden. Des Weiteren zeigte Synaptophysin eine leichte Sertoli-Zell-Immunreaktivität.

4.3.6. Zelladhäsionsmoleküle

Für das Zelladhäsionsmolekül N-CAM konnten wir eine schwache bis mäßige Immunreaktion im Zytoplasma der Leydigzellen beobachten (Abb. 66). Auffällig war eine Intensitätssteigerung im Areal mit atrophischen Tubuli sowie im Areal mit Tubulusschatten. Eine Abhängigkeit der Intensität von der Größe der Leydigzellansammlung konnte nicht festgestellt werden. N-CAM kann des Weiteren in den Gefäßwänden nachgewiesen werden (Abb. 67).

4.3.7. Antigene der Gliazellen

Die Immunreaktivität der Leydigzell-Plaques für die Gliazellantigene GFAP, CNPase und Galactocerebrosid zeigte Unterschiede in den untersuchten Hodenarealen. Eine mäßige bis starke Positivität besaßen die Leydigzellen in den Arealen mit erhaltener Struktur und Spermatogenese, während in den Arealen mit Tubulusschatten Leydigzellen schwächerer Immunreaktivität lokalisiert waren (Abb. 68). Besonders deutlich konnte diese

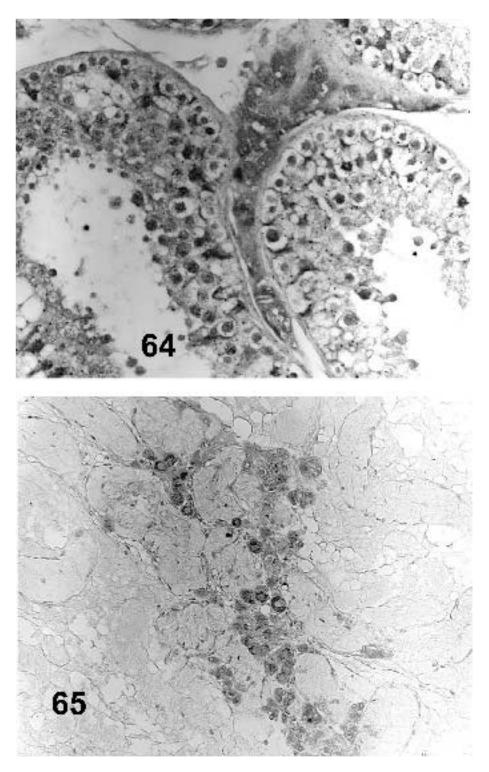
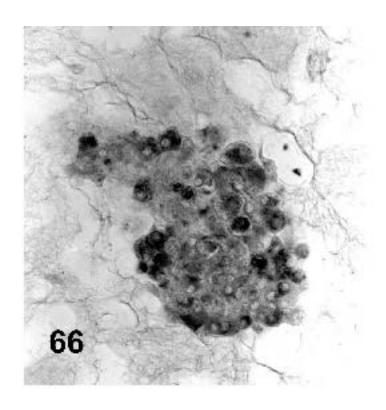


Abb. 64. Calmodulin - Leydigzell-Plaque zwischen strukturerhaltener Tubuli. Die Leydigzellen zeigen eine schwache Immunpositivität. Die Sertoli-Zellen in der Umgebung dieser schwach immunpositiven Plaque zeigen im Vergleich zu Sertoli-Zellen neben immunstärkeren Plaque eine stärkere Immunaktivität. X 40

Abb. 65. Synaptophysin - Leydigzell-Plaque im Tubulusschattenareal. Eine dezente Immunreaktivität kann in den Leydigzellen nachgewiesen werden. X 20



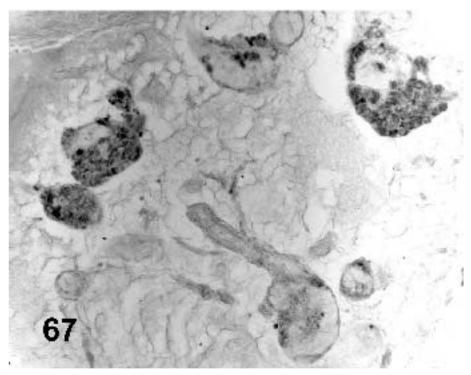
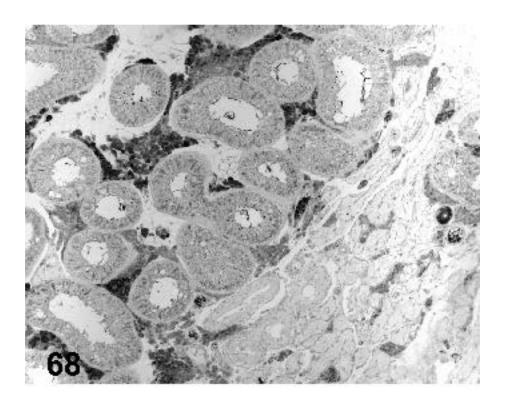


Abb. 66. N-CAM - Leydigzell-Plaque im atrophierten Tubulusschattenareal. Deutlich wird eine starke Immunpositivität der Leydigzellen. X 40

Abb. 67. N-CAM - Leydigzell-Plaque im atrophierten Tubulusschattenareal. Neben der Leydigzell-Immunpositivität fällt eine Immunreaktivität der Gefäßwände auf. X 20



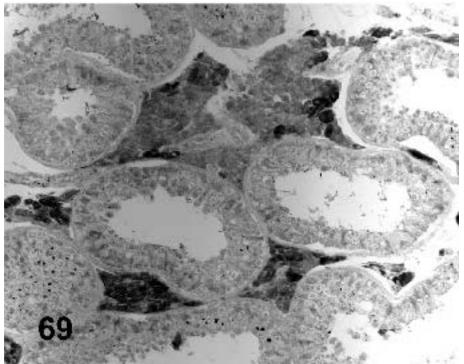


Abb. 68. GFAP - Grenze zwischen atrophierten Tubulusschattenareal und Tubuli mit beginnender Atrophie. Leydigzell-Plaque im Gebiet des Schattenareals zeigen eine deutliche Aktivitätsabnahme im Vergleich zu denen, die sich in der Umgebung beginnender Atrophie befinden. Innerhalb der Tubuli kann eine Sertoli-Zell-Aktivität nachgewiesen werden. X 10

Abb.69. GFAP - Leydigzell-Plaque zwischen strukturerhaltenen Tubuli.
Innerhalb dieser Plaque sind die Leydigzellen, die
unmittelbar an ein Tubulus angrenzen stärker immunpositiv als
die Zellen, die sich im Zentrum dieser Plaque befinden. X 20

Abhängigkeit der Leydigzell-Aktivität von den benachbarten Tubuli bei GFAP hervorgehoben werden. Hier konnte man neben der stärkeren Immunpositivität von Leydigzell-Plaques im erhaltenen Hodengewebe auch eine weitere Besonderheit beobachten. Innerhalb einer Leydigzell-Plaque waren die Leydigzellen, die unmittelbar an die Tubuli angrenzten immunaktiver als diejenigen, die sich im Zentrum der Plaque befanden (Abb. 69).

Die weiteren Antigene (O4 und A2B5) zeigten keine lokalisationsabhängigen Intensitätsunterschiede. Sie wiesen in allen drei Arealen eine mäßige Aktivität auf. Beim O4- (Abb. 70) und CNPase-Nachweis konnten wir eine Zunahme der Immunreaktivität der in der Peripherie der Plaque gelegenen Leydigzellen sehen. Bei den restlichen Antigenen beobachteten wir eine diffuse Verteilung der unterschiedlich stark aktiven Leydigzellen innerhalb einer Plaque.

Eine Abhängigkeit der Aktivität von der Größe der Leydigzell-Plaques konnte nur beim CNPase- und Galactocerebrosid-Nachweis nachgewiesen werden. Dabei war die CNPase-Positivität in Tumor-Leydigzellen etwas stärker als in den normalen Leydigzellen. Bei Galactocerebrosid dagegen kam es zu einer leichten Abnahme der Reaktionsintensität im Tumor und in den hyperplastischen Plaques.

Immunreaktivität für CNPase (Abb. 71), GFAP, Galactocerebrosid (Abb. 72) und A2B5 (Abb. 73) konnte auch in den Sertoli-Zellen festgestellt werden. Dabei erkannte man eine Abhängigkeit der Sertoli-Zell-Aktivität von der Aktivität der Leydigzell-Plaques. Beim CNPase-Nachweis fiel eine geringer intensive Immunreaktion der Sertoli-Zellen nahe Plaques mit hoher Aktivität auf (Abb. 74). Die GFAP-Immunreaktivität war schwach in den Sertoli-Zellen ausgeprägt. Jedoch konnten wir eine Intensitätssteigerung bei Sertoli-Zellen beobachten, die nicht in ummittelbarer Umgebung von Leydigzellen lokalisiert waren. Die Galactocerebrosid-Immunreaktivität (Abb. 72) zeigte in den Sertoli-Zellen ein anderes Bild. Hier stieg die Immunpositivität der Sertoli-Zellen proportional zu der der Leydigzellen.

Die A2B5-Immunreaktivität der Sertoli-Zellen war gleichmäßig verteilt, und ihre Intensität zeigte keine Abhängigkeit von der Immunreaktivität der benachbarten Leydigzellen.

Eine A2B5-Anfärbung der glatten Muskelzellen in der Wand größerer Gefäße konnte ebenfalls gesehen werden (Abb. 75).

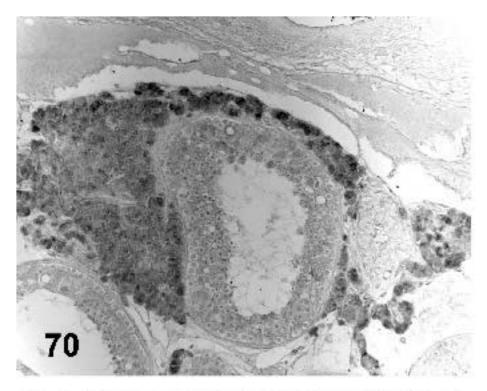
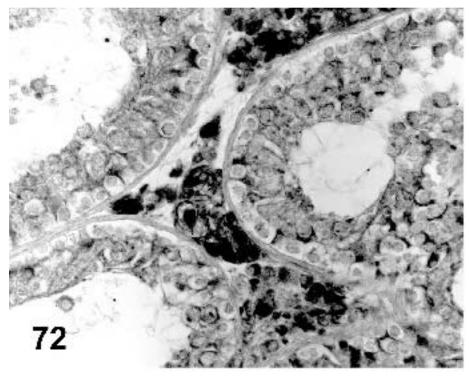




Abb. 70. O4 - Leydigzelltumor angrenzend an einen weitgehend strukturerhaltenen Tubulus, einen Tubulus mit fortgeschrittener Atrophie und einem Tubulusschatten. Die peripher liegenden Leydigzellen zeigen im Vergleich zu den zentral liegenden eine Intensitätssteigerung. X 20

Abb. 71. CNPase - Immunschwache Leydigzell-Plaque in der Umgebung atrophierter Tubuli. Innerhalb der Tubuli kann eine starke Sertoli-Zell-Aktivität nachgewiesen werden. X 20



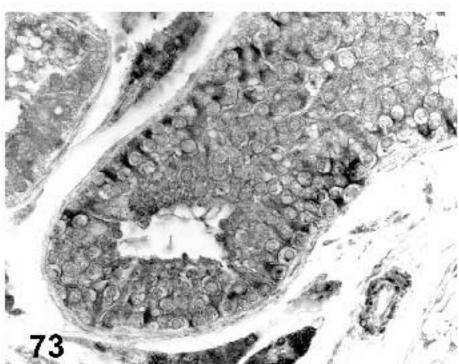
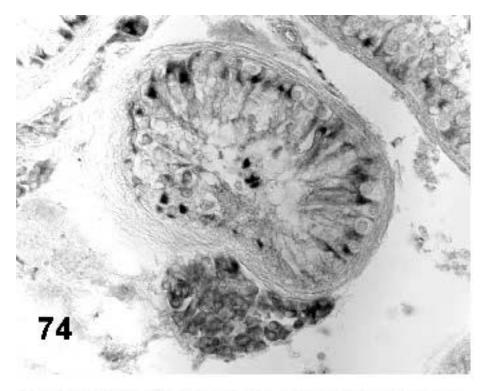


Abb. 72. GalC - Weitgehend strukturerhaltene Tubuli nahe Leydigzell-Plaque mit starker Aktivität. Eine Immunpositivität der Sertoli-Zellen kann beobachtet werden. X 40

Abb. 73. A2B5 - Weitgehend strukturerhaltene Tubuli mit starker Sertoli-Zell-Aktivität. X 40



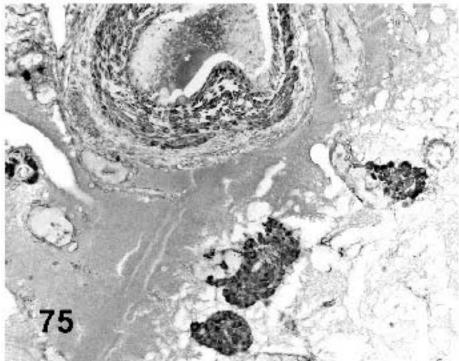


Abb. 74. CNPase - Immunstarke Leydizell-Plaque in unmittelbarer Umgebung eines atrophierten Tubulus. Die innerhalb des Tubulus stattfindende Sertoli-Zell-Reaktion ist abhängig von der angrenzenden Plaque. Sertoli-Zellen nahe der Plaque sind schwächer immunaktiv als solche, die der Plaque weggerichtet sind. X 40

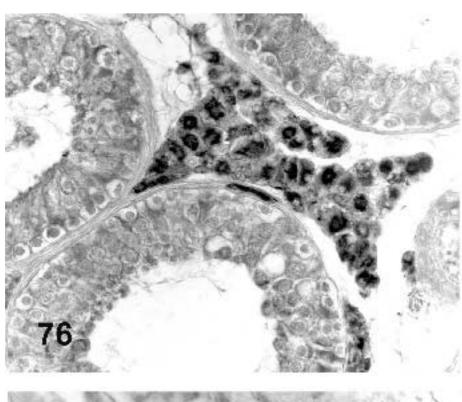
Abb. 75. A2B5 - Atrophiertes Tubulusschattenareal mit vereinzelten Leydigzell-Plaque und einem Blutgefäß. Man erkennt die Positivität der Myozyten des Blutgefäßes. X 20

4.3.8. Substanzen der Steroidogenese

Die Immunreaktivität für Cytochrom P450scc war in den Leydigzellen mäßig bis stark. Cytochrom P450scc konnte in allen drei von uns untersuchten Hodenarealen nachgewiesen werden. Die Reaktion war im Zytoplasma der Leydigzellen in Form von kleinen Granula verteilt (Abb. 76 und 77). Eine leichte Abnahme der Intensität der Leydigzell-Positivität konnte bei stark hyperplastischen Plaques und bei Tumoren festgestellt werden.

Die Immunreaktivität für LDL zeigte eine leichte Abhängigkeit von der topographischen Lage der Leydigzellen. In den atrophischen Arealen und den Arealen mit Tubulusschatten konnten wir in den Leydigzellen eine leichte Zunahme der Immunreaktivität beobachten. Die Größe der Leydigzell-Aggregate hatte keinen Einfluss auf die Intensität der Immunreaktionen. Bei Leydigzell-Tumoren konnte eine Aktivitätssteigerung der peripher liegenden Leydigzellen deutlich beobachtet werden, die gerade bei intertubulär liegenden Tumoren eine Aussage über die Größe der Leydigzellansammlung lieferte. Kleinere, einzelne Leydigzellansammlungen konnten somit von einem zusammenhängenden Tumor differenziert werden (Abb. 78).

LDL zeigte eine Positivität in den Sertoli-Zellen, die jedoch keine Intensitätsänderung bezüglich der Leydigzellplaqueaktivität bot (Abb. 79).



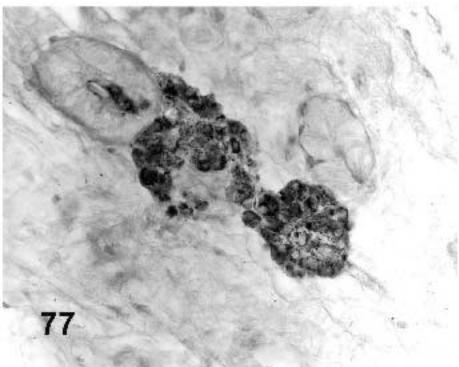
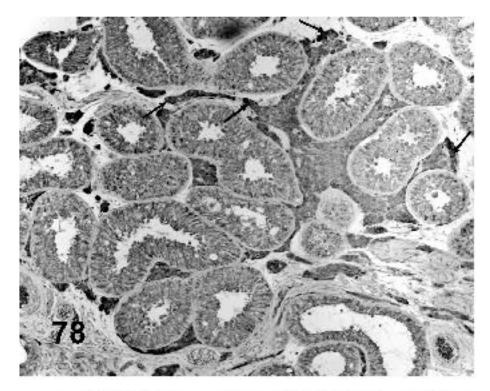


Abb. 76 und 77. Cyt P450 in einer Leydigzell-Plaque (76) umgeben von Tubulusanschnitten mit gestörter Spermatogenese und einer Leydigzellplaque (77) im atrophierten Schattenareal.

Man erkennt die zytoplasmatische Reaktion. Das Reaktionsprodukt der Leydigzellen präsentiert sich in Form von kleinen Granula. X 40



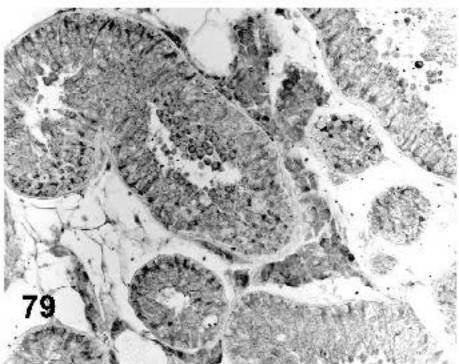


Abb. 78. LDL - Intertubulär liegende Leydigzellanhäufungen in einem Areal strukturerhaltener Tubuli. Die Tatsache, dass es sich hierbei um einen Leydigzelltumor handelt und nicht um mehrere nicht miteinander kommunizierende Plaque, zeigt die Aktivitätssteigerung der in diesem Tumor peripher liegenden Leydigzellen (Pfeile). Eine Sertoli-Zell-Aktivität wird ebenfalls deutlich. X 10

Abb. 79. LDL - Leydigzell-Plaque in der Umgebung von Tubuli mit beginnender Atrophie. Neben der Positivität der Leydigzellen kann eine Immunpositivität der Sertoli-Zellen nachgewiesen werden. X 20

4.4. Western-Blot Analysen

Um die Expression einiger der immunhistochemisch nachgewiesenen Antigene auf Proteinebene im Hodengewebe zu bestätigen, wurden Western-Blot Untersuchungen an Hodenhomogenaten durchgeführt. Dabei haben wir Material von den Hoden untersucht, die bereits zur Untersuchung mit den immunhistochemischen Verfahren benutzt wurden.

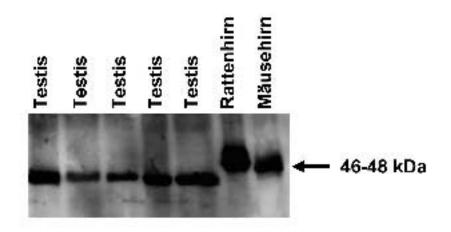
Folgende Antigene wurden in den Homogenaten nachgewiesen:
CNPase (46/48kDa), Cytochrome P450 (50kDa), GDNFR-alfa (60kDa) (Abb. 80),
GFAP (50 kDa), Nestin (240 kDa) (Abb. 81),
NF 200 (200kDa) und Antigen O4 (60kDa) (Abb. 82).

Die Kontrolle der Nestinerfassung erforderte wegen der Spezifität des Antikörpers gegen humanes Gewebe eine gesonderte Untersuchung. Auch hier fanden Mäuse- und Rattenhirn- Homogenate als Kontrolle Verwendung. Als Antikörper fungierte hier jedoch ein zweiter Antikörper, der gegen Nestin in Maus und Rattengewebe gerichtet war. Beide Western-Blot Untersuchungen lieferten bei diesem Vorgehen eine Proteinbande, die jeweils auf derselben Höhe lokalisiert war.

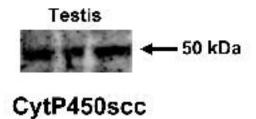
Für alle oben aufgezählten Antigene (außer Nestin) konnte eine Proteinbande bei dem zu erwartenden Molekulargewicht nachgewiesen werden.

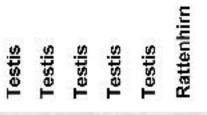
Beim Nachweis von Nestin konnte in wiederholten Untersuchungen ein Spaltprodukt dieses Proteins mit dem Molekulargewicht von 240 kDa nachgewiesen werden. Dieses Spaltprodukt zeigte sich sowohl in der Untersuchung des humanen Homogenates sowie in der Kontrolle.

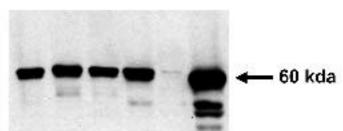
Die Tatsache, dass zur Erkennung der Proteinbanden unterschiedliche Homogenatmengen verwendet werden mussten, zeigte deutlich die unterschiedliche Konzentration der Antigene in den erstellten Homogenaten. Die höchste Konzentration fand man bei GDNFR-alfa, gefolgt von O4 und CNPase. Zur Erkennung der Proteinbande von NF 200 und GFAP benötigte man eine deutlich größere Menge an Homogenat. Das Antigen jedoch mit der geringsten Konzentration im Hodenhomogenat war Nestin.



CNPase

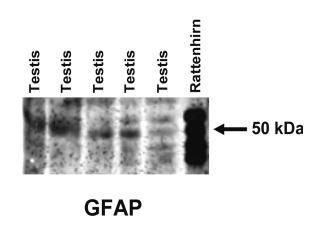






GDNFR-alpha

Abb. 80. Western Blots für CNPase, CytP450scc und GDNFR-alpha zeigen Immunreaktivität in Proteinbanden mit entsprechenden Molekularmassen 46-48 kDa, 50 kDa und 60 kDa, respektiv.





Nestin

Abb. 81. Western Blots für GFAP und Nestin. Die Immunreaktion hat sich positiviert in den Proteinbanden mit einer Molekularmasse von 50kDa und 240 kDa, respektiv.



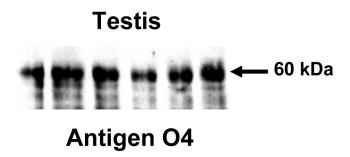


Abb. 82. Western Blots für NF-200 und Antigen O4. Immunpositive Proteinbanden mit einer Molekularmasse von 200 kDa und 60 kDa, respektiv, können gesehen werden.

5. Diskussion

5.1. Die normalen-, die hyperplastischen- und neoplastischen Leydigzellen

5.1.1. Vorteile bei der Untersuchung von großen Hodenarealen in Paraffinschnitten und Semidünnschnitten im Vergleich zu Hodenbiopsien

Die meisten Untersuchungen der Hyperplasie der Leydigzellen sind beim Menschen an Hodenbiopsien durchgeführt worden (Holm et al. 2003). Die Untersuchung von Hodenbiopsien hat mehrere Nachteile. Vor allem ist die untersuchte Flächengröße der Schnitte zu klein und erlaubt keine reale Vorstellung über die Vielfältigkeit der strukturellen Besonderheiten des gesamten Hodens. Außerdem ist die Strukturerhaltung des Materials bei Hodenbiopsien verhältnismäßig schlecht, wobei dafür mechanische Artefakte als auch Probleme der Fixierung einen Beitrag leisten.

Diese Nachteile haben wir durch die Herstellung und Beobachtung großflächiger Paraffinund Semidünnschnitte von optimal fixiertem Material überwunden. Dieses Verfahren erlaubt die Gewinnung einer genaueren Übersicht und detaillierte Ergebnisse. Dadurch ist es uns gelungen eine stark ausgeprägte Vielfältigkeit der Leydigzellen im Hoden eines Individuums und eines histologischen Schnittes zu beweisen. Zum ersten Mal werden auch Ergebnisse einer systematischen Untersuchung über die Hyperplasie und die Adenome der Leydigzellen mit Hilfe der Immunhistochemie präsentiert.

5.1.2. Tierische versus menschliche Leydigzell-Hyperplasien und -Tumore

Die Ergebnisse über die Leydigzell-Hyperplasien und -Tumore im menschlichen Hoden unterscheiden sich wesentlich von denen des tierischen Hodens (Prentice and Meikle 1995; Clegg et al. 1997; Cook et al. 1999). Das betrifft auch die Mechanismen der Entstehung der hyperplastischen Plaques und der Leydigzell-Tumore. Die Unterschiede sind so groß, dass es unmöglich ist, Ergebnisse, die bei tierischen Experimenten erzielt worden sind, auf den Menschen zu übertragen (Prentice and Meikle 1995; Cook et al. 1999). Die für die Tiere sehr locker definierten Größenunterschiede zwischen den

hyperplastischen Plaques und der Adenome sind für den menschlichen Hoden irrelevant, so dass beim Menschen diesbezüglich immer noch eine große Subjektivität der Bestimmung zu verzeichnen ist. Von Bedeutung ist hier hauptsächlich die eigene Erfahrung der Forscher bei der Bestimmung dieser Parameter. Ein wesentlicher Punkt ist, dass die Häufigkeit der Adenome bei Menschen viel geringer als z. B. bei der Ratte ist. Es bestehen allerdings deutlich ausgeprägte speziesbedingte Variationen (Murakami et al. 1995; Cook et al. 1999). Die Hodentumore stellen etwa 1% aller Tumore beim Menschen, und von den Hodentumoren sind ca. 1% Leydigzell-Adenome (Clegg et al. 1997). In Wirklichkeit müssen diese Tumore einen größeren Anteil haben, weil sie beim lebenden Menschen nur sporadisch betastet und diagnostiziert werden können. Außerdem ist es möglich, bei experimentellen Tieren Hyperplasien und Adenome durch die Einwirkung unterschiedlicher Stoffen hervorzurufen, was beim Menschen fast unmöglich ist. Es scheint, dass der Mensch keine so große Empfindlichkeit gegenüber solchen Stoffen hat, wofür die geringe Häufigkeit der Neubildungen spricht (Cook et al. 1999; siehe auch "Einleitung").

5.1.3. Die Leydigzellen: eine heterogene Zellpopulation im Hoden

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung (histologisch, elektronenmikroskopisch immunhistochemisch) und über die strukturellen und immunhistochemischen Eigenschaften der Leydigzellen der Norm sowie auch andere Komponenten des menschlichen Hodens bestätigen früher veröffentlichten Resultate (Schulze 1984; Kerr et al. 1986; Pudney et al. 1996; Chemes 1996; Russell 1996). Obwohl in einem Teil dieser Studien auch auf die Heterogenität der Leydigzellen hingewiesen wird, wurde bis heute dieser Tatsache keine große Aufmerksamkeit gewidmet. Unsere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Leydigzellen des menschlichen Hodens eine stark ausgeprägte Heterogenität besitzen. Dies betrifft vor allem ihre allgemeine Morphologie (Form, Größe, Anzahl, Fortsatzbestand, Kerngestalt, Organellenbestand, Färbeintensität), Ontogenese, Biochemie, Regulationsmechanismen, Immunhistochemie und Funktionen, sowohl in der Norm als auch bei der Hyperplasie und den Leydigzell-Tumoren (Christensen et al. 1965; Schulze 1984; Purvis et al. 1979; Clayton and Huhtaniemi 1982; Simpson et al. 1987; Pudney et al. 1996; Chemes 1996; Russell 1996; Ge et al. 1996; Davidoff et al 1996). Diese Tatsache erschwert die Möglichkeit der detaillierten Typisierung und Zuordnung der

Leydigzellen zu den verschiedenen Grundkategorien, nämlich Norm, Hyperplasie und Tumore. In jedem von uns untersuchten menschlichen Hoden konnten wir die charakteristische Vielfältigkeit der Leydigzellen beobachten. Diese Variationen der Erscheinung der Leydigzellen sind durch mehrere Faktoren bedingt wie z.B. dem Fortschritt ihrer Differenzierung (ihr Alter), ihre Stoffwechsel- und Funktions-Zustände, die Zusammensetzung der Faktoren der Umgebung, die auf die Leydigzellen wirken sowie hormonelle oder andere funktionelle oder krankhafte Veränderungen des gesamten Organismus, die Wirkung exogener schädlichen Agenten (Toxine) und andere Umweltfaktoren. Wichtig ist zu betonen, dass unabhängig vom Alter (Honore 1978), im Hoden der untersuchten Patienten gleichzeitig normale, altersbedingte und pathologisch veränderte Strukturen in benachbarten Hodenarealen, sogar eines histologischen Schnittes, beobachtet werden konnten.

5.1.4. Wechselwirkungen zwischen der Leydigzellhyperplasie und dem Zustand der Spermatogenese

Es besteht eine direkte Beziehung zwischen dem Zustand der Spermatogenese und der Hyperplasie bzw. Adenome der Leydigzellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung haben gezeigt, dass zwischen der Hyperplasie (Tumore) der Leydigzellen und dem Zustand der Spermatogenese vielfältige Wechselwirkungen existieren. An erster Stelle konnte bei vielen Fällen eine direkte Abhängigkeit zwischen dem Ausmaß der Leydigzellhyperplasie und einer beeinträchtigten (gestörten) Spermatogenese festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Resultaten der Literatur überein (Clegg et al. 1997; Holm et al. 2003). Allerdings konnten Nieschlag et al. (1979) bei infertilen Männern keine Veränderungen der Leydigzellen feststellen.

Die Tendenz zu einer Hyperplasie der Leydigzellen war sichtbar in Fällen, bei welchen in den Hodentubuli die Keimzellen fehlten, aber Sertoli-Zellen immer noch vorhanden waren. Wechselwirkungen der Leydigzellen und der Sertoli-Zellen sind in der Literatur mehrfach beschrieben worden (Sharpe 1994; Russell et al. 2001). Unsere Untersuchung zeigt, dass die Leydigzellen und die Sertoli-Zellen während der gesamten Ontogenese des Hodens voneinander abhängig sind. Beweis dafür liefert die Tatsache, dass Veränderungen der Morphologie und Biochemie der Leydigzellen immer noch festzustellen sind bei jenen, die

nahe den Tubuli liegen, die eine gestörte Spermatogenese bis auf mindestens Sertoli-Zellen aufweisen. In den Arealen mit Tubulusschatten kann dagegen häufig eine Degeneration der Leydigzellen beobachtet werden. Frühe Untersuchungen haben gezeigt, dass die Sertoli-Zellen während der Entwicklung die Zahl der Leydigzellen regulieren (Sharpe 1994). Andererseits produzieren die Leydigzellen Faktoren, die die Zahl der Sertoli-Zellen bestimmen (Sharpe 1994). In den Arealen mit Tubulusschatten (Endstadium der Tubulusatrophie) haben wir neben einer Abnahme der Immunreaktivität für viele von uns untersuchte Antigene in den meisten Fällen eine erhöhte Immunreaktivität beobachten können. Diese erhöhte Immunreaktivität kann folgendermaßen erklärt werden. Vor Degeneration der Leydigzellen kommt es zu einer funktionellen Hyperaktivität dieser Zellen, die dann durch die erhöhte Immunreaktivität deutlich wird. Des Weiteren werden beim Zerfall von degenerativen Leydigzellen mehrerer Antigendeterminanten freigesetzt, wodurch eine Bindung von Antikörpern an diesen Rezeptoren ermöglicht und erleichtert wird. In diesem Zusammenhang sei eine Besonderheit der Leydigzelltumore zu erwähnen. Immunhistochemisch befinden sich in der peripheren Zone dieser Tumoren Zellen mit stärkerer Immunreaktivität, als in den zentralen Arealen. Eine ähnliche Verteilung der Immunreaktivität für Relaxin, das als Leydigzellmarker benutzt wird (Ivell et al. 1997), wurde früher in Leydigzellneoplasien des menschlichen Hodens von Klonisch et al. (1999) berichtet. Diese Autoren erklären die Abnahme der Relaxin-Immunreaktivität der zentral gelegenen Leydig-Tumorzellen mit ihrer Dedifferenzierung. Die Ergebnisse unserer Studie sprechen jedoch viel mehr für eine Inaktivierung der Leydigzellen im Zentrum der Adenome. Diese Aktivitätsabnahme entsteht höchstwahrscheinlich durch die Tatsache, dass die zentral gelegenen Tumorzellen von dem Einfluss der umgebenden Strukturen abgeschirmt sind. Das ist nicht der Fall bei den peripher liegenden Zellen, die im Gegenteil eine deutlich stärkere Immunreaktivität für die meisten Stoffe zeigen. Gleichzeitig soll aber betont werden, dass wir in vielen Fällen Abweichungen von dieser Regel gesehen haben.

5.1.5. Hyperplasie oder Hypertrophie der Leydigzellen?

Eine Frage, die in der Literatur immer noch diskutiert wird, ist die Frage, ob es sich bei den größeren Leydigzell-Aggregaten um eine Hypertrophie (Vergrößerung) oder eine Hyperplasie (Vermehrung, Zunahme der Anzahl) der Leydigzellen handelt. In einigen Publikationen wird betont, dass es sich um eine reine Hypertrophie handelt (Heller and

Leach 1971; Neaves 1973; Verma et al. 1993; Tash et al. 2002; Holm et al. 2003), während andere im Gegenteil nur eine echte Hyperplasie feststellen (Murray et al. 2000, im pränatalen Hoden des Menschen (13. bis 19. Woche); Christensen 1965, bei der Ratte; Foster et al. 2001; Akingbemi et al. 2004, in Ratten nach langfristiger Behandlung mit Di-(2-ethylhexyl) Phthalat; Mahood et al. 2005, nach Behandlung der Ratten mit Di (n-Butyl) Phthalat). Es gibt allerdings wenige Untersuchungen, die beides, Hypertrophie (in den Anfangsstufen) und Hyperplasie (in den Folgestadien), beschreiben (Christensen and Peacock 1980, nach Stimulation adulter Ratten mit hCG; Dirami et al. 1996, nach Behandlung von Ratten mit einem Dopamin-Agonist). Ein Problem bei der Beurteilung der Veränderungen der Leydigzellen ist die Tatsache, dass bei diesen Prozessen (Hyperplasie, Tumorgenesis), mit wenigen Ausnahmen, keine Teilung (Proliferation) der Leydigzellen beobachtet werden konnte oder wie bei den Leydigzell-Tumoren nur eine geringe Zellteilung beobachtet werden konnte (Düe et al. 1989; Christensen and Paecock 1980; Mahood et al. 2005) was die Entscheidung, dass es sich um eine echte Hyperplasie handelt, wesentlich erschwerte (Holm et al. 2003; Prentice and Meikle 1995; Cook et al. 1999). Im Gegenteil, haben Mylchreest et al. (2002) nach Behandlung von fetalen Ratten mit DBP eine ungewöhnliche Proliferation von Leydigzellen mit Hilfe der Immunhistochemie für PCNA festgestellt. Diese Ergebnisse sollen mit Zurückhaltung betrachtet werden, da bei der Anwendung von Antiseren gegen PCNA oder Ki-67 nicht nur Zellen in der Mitose markiert werden. Das gleiche gilt für die Feststellung einer Erhöhung der Expression von Proteinen des Zellzyklus mit Hilfe von RT-PCR (Akingbemi et al. 2004). Außerdem kann es sich bei den markierten Zellen um proliferierende Progenitorzellen handeln, die von den Autoren nicht erkannt wurden, da sie keinen parallelen Nachweis von steroidogenen Enzymen durchgeführt haben (Murray et al. 2000). Eine Hyperplasie von Leydigzellen wurde bei Transgene Mäusen festgestellt, bei welchen erhöhte hCG Dimere exprimiert wurden (Matzuk et al. 2003). Auch eine verstärkte Expression des Tumorsuppressorgens Smad4 in Transgene Mäuse führt zu einer geringen Erhöhung der Zahl der Leydigzellen (Narula et al. 2002). Eine Verabreichung von hohen Dosen des Inhibitors der 5α-Reduktase führt bei Mäusen sowohl zur Bildung von Hyperplasie als auch von Leydigzell-Tumoren, bei gleichzeitiger Erhöhung der LH-Konzentration im Serum (Prahalada et al. 1994). Dieses Ergebnis zeigt möglicherweise, dass die Hyperplasie und die Bildung von Adenomen der Leydigzellen zwei Phasen eines gemeinsamen neoplastischen Vorgangs darstellen.

5.1.6. Hyperplasie der Leydigzellen ohne Zellteilung?

In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass neue Untersuchungen bei erwachsenen Tieren gezeigt haben, dass die Vermehrung der Leydigzellen in den Anfangsstadien ohne Zellteilung erfolgt, sondern dass die neuen Leydigzellen durch Umwandlung (Transdifferenzierung) von im Hoden vorhandenen nestinhaltigen, stammzellähnlichen Vorläuferzellen entstehen (Davidoff et al. 2004). Auf Grund dieser Ergebnisse und der Resultate der vorliegenden Arbeit über das Vorkommen des Intermediärfilamentproteins Nestin in den Leydigzellen aller von uns untersuchten Patientengruppen können wir annehmen, dass eine Vermehrung (Hyperplasie) der Leydigzellen des menschlichen Hodens nicht durch Zellteilung, sondern durch Transdifferenzierung der Leydig-Progenitorzellen, die in der Wand der Mikrovaskulatur des Hodens liegen, zu Stande kommt. Eine Bestätigung dieser Möglichkeit liefern die Ergebnisse von Dirami et al. (1996), die bei der Entwicklung von Hyperplasie der Leydigzellen von Sprague-Dawley Ratten nach ihrer Behandlung mit einem Dopamin-Agonist eine Verdickung der Wände von Arteriolen im Hodeninterstitium beobachten konnten. Ob die Hyperplasie von einer Hypertrophie der Leydigzellen begleitet wird, ist im menschlichen Hoden wegen der starken Heterogenität der Leydigzellen schon in der Norm sehr schwer zu beurteilen, kann aber nicht ausgeschlossen werden (Christensen and Peacock 1980).

Die Anzahl der Leydigzellen im normalen Hoden, aber auch bei infertilen Männern mit normaler oder erhöhten FSH Konzentration und dem Klinefelter-Syndrom scheint konstant zu sein (Holm et al. 2003). Die dafür verantwortlichen Regulationsmechanismen sind ungenügend erforscht. Leydigzellen, obwohl postmitotisch (Orth 1982, für die Ratte; Davidoff et al. 1996), sterben im Laufe des Lebens auf Grund physiologischer oder pathologischer Ursachen. Ihre Reste werden von Makrophagen beseitigt (Kerr et al. 1986). Es scheint, dass die Hauptwege des Absterbens der Leydigzellen die Apoptose oder die Zelldegeneration sind. Bilder, die solche Vorgänge andeuten, konnten wir vor allem in den Arealen mit Tubulusschatten beobachten. Da die zugrunde gegangenen Leydigzellen ersetzt werden sollten, kommt es anscheinend zu einer ausgleichenden Hyperplasie der Leydigzellen in benachbarten Arealen mit Tubuli, die eine erhaltene oder gestörte Spermatogenese aufweisen. Sehr wahrscheinlich sind lokale Faktoren für die Vermehrung der Leydigzellen in diesen Arealen verantwortlich. Diese Faktoren werden möglicherweise

von den Zellen der Hodenkanälchen produziert und in die Umgebung abgegeben. Das Vorkommen von Leydigzell-Aggregaten in einigen größeren Tubulusschattenarealen spricht für die Möglichkeit, dass die Leydigzellen auch über eigene Regulationsmechanismen verfügen und zur Erhaltung eines Restbestandes beitragen. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich mit der Tatsache verbunden, dass die Leydigzellen nicht nur für die Erhaltung der Spermatogenese im Hoden des erwachsenen Organismus verantwortlich sind, sondern auch für die normale Funktion anderer Organe eine entscheidende Bedeutung haben (Middendorff et al. 1993). Es gibt also einzelne Untersuchungen, die andeuten, dass Makrophagen für die Entstehung von Leydigzell-Tumoren mitverantwortlich sein können (Dirami et al. 1996).

5.2. Herkunft der normalen Leydigzellen und ihre Ähnlichkeit mit den hyperplastischen Formen und den Tumoren

Es gibt zahlreiche Beweise, dass die fetalen und die adulten Leydigzellen, trotz gewisser Unterschiede, eine gemeinsame Abstammung haben (Davidoff et al. 1996; 2002; 2004; Ge et al. 1996). Diese Ansicht kann auch auf die hyperplastischen Leydigzellen und die Levdig-Tumorzellen übertragen werden. Die große Vielfalt der Levdigzellen basiert auf den variablen Eigenschaften von Zellen, die sich in einem unterschiedlichen Entwicklungsstadium, Stoffwechselzustand oder pathologischen Prozess befinden. Alle normalen und pathologischen Leydigzellen haben die gleiche Herkunft, eine pluripotente Stammzelle, die die Eigenschaften einer endokrinen, neuronalen und glialen Zelle besitzt und im adulten Hoden ein Entwicklungsstadium erreicht hat, das sie als eine amitotische, aber trotzdem pluripotente Zellart auszeichnet. Dafür sprechen die Ergebnisse des immunhistochemischen Teils dieser Untersuchung. Wir waren in der Lage die wichtigsten Markersubstanzen bei allen Leydigzell-Typen zu lokalisieren. Gewisse Unterschiede betreffen die Intensität ihrer Expression, die mit Besonderheiten der lokalen Regulationsmechanismen erklärt werden können.

5.3. Immunhistochemie der Leydigzellen des menschlichen Hodens

5.3.1. Neuronale und neuroendokrine Markersubstanzen

Den ersten Nachweis für den Neurotransmitter Substanz P im menschlichen Hoden erbrachte Schulze et al. (1987). Dem folgend wurde Substanz P im Hamsterhoden während der Entwicklung beobachtet (Angelova und Davidoff 1989). Mittels PCR konnte Substanz P mRNA im Hoden des Menschen, der Maus und des Rindes nachgewiesen werden (Chiwakata et al. 1991).

Obwohl Tahri-Joutei et al. (1988) keinen Einfluss von Substanz P auf die Testosteronproduktion beobachtete, konnte eine inhibitorische Wirkung von Substanz P auf die durch LH stimulierte Testosteronproduktion in Leydigzellen von Angelova et al. (1991) an Leydigzellkulturen des Hamsters und Angelova et al, (1996) an Hoden von Hamstern, die unter photoperiodischen Bedingungen gehalten wurden, sichtbar gemacht werden. Hamster, die unter den gleichen Bedingungen gehalten wurden, zeigten einen reduzierenden Einfluss von Substanz P auf die LH-Rezeptordichte (Kanchev et al. 1995).

Die von Middendorff et al. (1993, 1995) beobachtete Abnahme der Immunreaktivität in Leydigzelltumoren (nicht Leydigzellhyperplasien) konnte in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Wir konnten außerdem eine Abnahme der Substanz P-Expression in Leydigzellen, die sich im atrophierten Tubulusschattenareal befanden, feststellen. Im Gegensatz zu Schulze et al. (1987) und Middendorff et al. (1993) konnten wir eine Substanz P-Immunreaktion in den Sertoli-Zellen des menschlichen Hodens sehen. Besonders intensiv war dabei die Anfärbung der basalen Abschnitte der Sertoli-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden im Hoden von Marmosetten beobachtet (Kulkarni et al. 1992). Zusätzlich haben Kulkarni et al (1992) Substanz P in den Spermatogonien dieser Spezies nachgewiesen. Die Diskrepanz zwischen den hier vorliegenden Ergebnissen für die Sertoli-Zellen und den Ergebnissen von Schulze et al. (1987) und Middendorff et al. (1993) können mit den Besonderheiten der Hyperplasie oder mit speziesbedingten Besonderheiten erklärt werden.

Die hier beobachtete GAP 43-Immunreaktion in den humanen Leydigzellen bestätigt die Ergebnisse von Davidoff et al. (1996). In dieser Arbeit konnte weitergehend beobachtet

werden, dass die Immunreaktion unabhängig von der Größe der Leydigzell-Plaques und der Lokalisation konstant bleibt. Wir bestätigen die von Davidoff et al. (1996) erwähnte Immunreaktivität der Sertoli-Zellen.

Die neuronalen Marker NF-160 und NF-200 zeigten vergleichend zu physiologischen Leydigzellansammlungen in den Leydigzelltumoren eine geringere Immunpositivität. Diese Beobachtung wurde bereits für NF-200 von Middendorff et al. (1993, 1995) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zusätzlich zeigen, dass die schwächere Immunaktivität der Leydigzelltumore besonders bei den zentral liegenden Leydigzellen einer Plaque zu beobachten war. Die peripher liegenden Zellen zeigten vergleichend eine stärkere Immunreaktivität.

Die hier beobachtete Expression in den Sertoli-Zellen wurde bereits von Davidoff et al. (1999) im normalen menschlichen Hoden beschrieben. Die beobachtete Abhängigkeit der Sertoli-Zell-Immunreaktivität und der Expressionsintensität der benachbarten Leydigzell-Plaques kann mit der von uns festgestellten Beeinträchtigung der Spermatogenese bei Hodentumoren erklärt werden (Davidoff et al. 1999).

Den Beweis für die Expression für NSE bei tierischen Leydigzellen (Meerschweinchen, Goldhamster, Ratte) lieferte Angelova et al. (1991). Bereits 1988 wurde der Nachweis für die Immunaktivität von Leydig- und Sertoli-Zellen beim Menschen erbracht. Ein im Ovar befindlicher, seltener Sertoli-Leydigzelltumor zeigte eine NSE-positive Immunaktivität (Arai et al. 1988). Die hier dargestellte NSE-Immunaktivität in den Leydigzellen des Menschen zeigte eine konstante Anfärbung, die weder größen- noch lokalisationsabhängig war. Individuelle Intensitätsunterschiede zwischen Leydigzellen einer Plaque konnten hier wie bei Schulze et al. (1991) gezeigt werden. Eine von Middendorf et al. (1993; 1995) beschriebene NSE-Immunaktivitätsänderung bei Leydigzelltumoren konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Ebenfalls konnten wir eine von Davidoff et al. (1996) beschriebene Sertoli-Zell-Anfärbung nicht beobachten. Diese Diskrepanzen können mit den unterschiedlichen Qualitäten der benutzten Antiseren erklärt werden.

Das Intermediärprotein Nestin konnte in den Leydig- und Sertoli-Zellen des menschlichen Hodens nachgewiesen werden. Untersuchungen des Rattenhodens zeigten eine Immunpositivität von Leydig- und Sertoli-Zellen (Fröjdmann et al. 1997). Die bei Fröjdmann et al. 1997 beobachteten Nestinnachweise im Endothel und der glatten

Muskelatur der Gefäßwand konnten in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Ein Nachweis für die Expression von Nestin in menschlichen Leydig- und Sertoli-Zellen sowie Endothelzellen der Gefäße wurde von Lobo et al. (2004) erbracht. Den vergleichbaren Nachweis bei der Ratte und beim Menschen lieferte Davidoff et al. (2004). Dabei gelang es Davidoff et al. (2004) mit Hilfe von einem Nestin-Nachweis, die stammzellähnlichen Progenitorzellen der Leydigzellen zu markieren. In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Expression von Nestin in Leydigzell-Plaques, die sich im atrophierten Tubulusschattenareal befinden, signifikant stärker ausfällt. Dieses Ergebnis kann für eine Neubildung und Differenzierung der Leydigzellen in solchen Arealen sprechen.

In Übereinstimmung mit den Resultaten für den menschlichen Hoden (Davidoff et al. 1995; Middendorff et al. 1997) und der Ratte (Lissbrant et al. 1997) konnte in der vorliegenden Arbeit die neuronale Stickstoffoxidsynthase (NOS I) im Zytoplasma der Leydigzellen nachgewiesen werden. Ein Nachweis in den Sertoli-Zellen sowie im Endothel oder in der glatten Muskulatur einiger Gefäße konnte hier nicht erbracht werden. Diese Diskrepanz mag auf methodische oder durch Spermatogenese bedingte Besonderheiten der Funktion der Sertoli-Zellen zurückzuführen sein.

5.3.2. Neurotrophe Faktoren und Zytokine mit neurotropher Wirkung

Die spezifischen Rezeptoren der neurotrophen Faktoren Trk A, Trk B und Trk C sowie NGFRp75 zeigten eine weitgehend konstant bleibende Anfärbung der Leydigzellen.

Der Nachweis von NGFRp75 gelang bereits bei vorherigen Studien an verschiedenen Tierspezies. So konnten Seidl und Holstein (1990) NGFRp75 im menschlichen Hoden nachweisen. Studien an der Ratte während der Entwicklung (Persson et al. 1990, Parvinen et al. 1992, Djakiew et al. 1994, Müller et al. 1997, Levine et al. 2000) lieferten ähnliche Resultate. Diese Ergebnisse wurden von Wrobel et al. (1996) am Rind, Seidl et al. (1996) bei der Maus während der Entwicklung und Ayer-LeLievre et al. (1988) bei der adulten Maus und Ratte bestätigt. Der von Wrobel et al. (1996) erbrachte Nachweis von NGFRp75 in Myofibroblasten der Lamina propria konnte in unserer Untersuchung wie bei Seidl und Holstein (1990 beim Menschen) festgestellt werden. Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich eine NGFRp75-Positivität in den Leydigzellen beobachtet.

Die bei Wrobel et al. (1996) beobachtete Expression des Antigens in den Spermatogonien konnten wir nicht bestätigen. Diese Diskrepanz kann durch speziesbedingte Unterschiede erklärt werden.

Die Expression von NGFRp75 in den Sertoli-Zellen der Ratte und von NGF in den Keimzellen wurde bereits nachgewiesen (Persson et al. 1990; Parvinen et al. 1992). Dabei wurde die Vermutung geäußert, dass auf diese Weise NGF bei der Regulation der Spermatogenese beteiligt sein kann. Die vorliegende Arbeit vergleicht erstmalig die Abhängigkeit der Expression dieser Rezeptoren von der Lage und Größe der hyperplastischen Leydigzell-Plaques. Hierbei konnte unabhängig von Größe der Plaques und ihrer Lokalisation eine weitgehend beständige Immunreaktivität in den Leydigzellen beobachtet werden. Eine geringe Abnahme der Immunaktivität von Trk A und Trk C konnte lediglich bei Leydigzelltumoren beobachtet werden. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, dass die Leydigzellen eine Zellpopulation im Hoden darstellen, die selbstregulierende Aktivitäten aufweist und möglicherweise keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Prozesse der Spermatogenese ausüben kann (Müller et al 2006). Vielmehr kann das gleichzeitige Vorhandensein von NGF und seine Rezeptoren in den adulten Leydigzellen als Ausdruck eines Regelmechanismus der Testosteronproduktion betrachtet werden. Erste Ergebnisse über eine stimuliernde Wirkung von NGF auf die Testosteronproduktion von einer Leydig-Tumorzell-Linie (MA-10 Zellen) wurden von Müller et al. (2006) veröffentlicht.

Der Nachweis von Neurotrophinen (NT-3, NT-4 und ihrer Rezeptoren) gelang bereits in fetalen Strukturen des Hodens (Robinson et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte eine von der Plaquegröße abhängige Immunaktivität nachgewiesen werden. Wie bei den spezifischen Rezeptoren der neurotrophen Faktoren konnten wir bei den Leydigzelltumoren eine schwächere Immunreaktivität beobachten. Ein Nachweis für NT-3 wurde früher von Cupp et al. (2000) im Rattenhoden gezeigt. Eine vergleichbare Studie, die die Expression der Neurotrophine in Leydigzellen bezogen auf Größe und Lokalisation der Leydigzell-Plaques beschreibt, ist in der Literatur nicht vorhanden.

Die Neurotrophine FGF-beta und BMP 6 zeigten im Vergleich zu den anderen Neurotrophinen keine von der Plaquegröße abhängige Aktivitätsänderung. Vielmehr konnte hier eine Aktivitätssteigerung in den Leydigzellen beobachtet werden, die von

atrophierten Tubuli seminiferi umgeben waren. Neben dieser lokalisationsabhängigen Aktivitätsänderung konnte innerhalb der Leydigzell-Plaques eine unterschiedliche Leydigzellfärbeintensität nachgewiesen werden. Besonders expressionsaktiv stellten sich die Zellen in der Peripherie einer Plague dar. Dieses Phänomen konnte besonders bei Leydigzelltumoren beobachtet werden und fand bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Erwähnung in der vorherrschenden Literatur. Bereits 1994 konnte durch Koike et al. an der entwickelnden Ratte der Nachweis für eine FGF-Expression in Leydigzellen gezeigt werden. Die dort beobachtete Positivität der Keimzellen konnte in unserer Untersuchung nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz kann durch die spezies- und altersbedingten Unterschiede erklärt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass Leydigzellen des menschlichen Hodens FGF exprimieren. Im tierischen Hoden (Schwein) wurde eine Wirkung von FGF der Leydigzellen auf die Testosteronproduktion des Hodens bereits nachgewiesen (Sordoillet et al. (1988; 1992) und Saez et al. (1988)). Die Wirkung von FGF erfolgte direkt über einen zellgebundenen Rezeptor (Zheng et al. 1990, Murono et al. 1992). FGF kann allerdings an LH-Rezeptoren binden und auch auf diesem Wege zusätzlich die Steroidhormonproduktion beeinflussen (Chatelain et al. 1987). Die von uns festgestellte stärkere Immunpositivität von FGF in den Leydigzellen der atrophischen Areale entsteht möglicherweise durch die parakrinen Regulationsmechanismen im Hoden, FGF Mitbeteiligung welchen dem eine beim Gewebewachstum und Zelldifferenzierung während der Hodenentwicklung zugesprochen wird (Skinner et al. 1991, Mullaney et al. 1991).

In diesem Zusammenhang bestehen Beweise, dass einige von den Sertoli-Zellen produzierte Substanzen durch den FGF der Leydigzellen stimuliert werden (Naville et al. 1990, Liu et al. 1996).

Für die Zytokine mit neurotropher Wirkung (Davidoff et al. 2001; Koeva 2002) konnte keine lokalisations- oder größenabhängige Besonderheit festgestellt werden.

5.3.3. Enzyme der Katecholaminsynthese

Der hier beobachtete zytoplasmatische Nachweis von Enzymen der Katecholaminsynthese in humanen Leydigzellen konnte von Davidoff et al. (1993, 2004) erstmalig erbracht werden. Die damals bereits aufgefallene unterschiedlich starke Immunreaktion in den verschiedenen Zellen einer Leydigzell-Plaque konnte in der

vorliegenden Untersuchung ebenfalls nachgewiesen werden und wurde von Romeo et al. (2004) für die Enzyme TH und DBH bereits beschrieben.

Erstmalig konnten wir eine Gesetzmäßigkeit für die DBH-Aktivität bei Tumoren und stark hyperplastischen Zellen feststellen, nähmlich eine verstärkte Noradrenalinproduktion der in der Peripherie einer Plaque liegenden Leydigzellen.

Bei einigen Enzymen der Katecholaminsynthese konnten wir eine Abhängigkeit der Immunreaktivität der Leydigzellen von der Größe und Lokalisation der Plaques nachweisen. Dabei konnten wir eine deutliche Abnahme der AADC- und DBH-Immunreaktivität in hyperplastischen- und neoplastischen- Leydigzellen feststellen. Dieses Ergebnis bestätigt die Resultate von Middendorff et al. (1993; 1995). Die TH-katalysierte Umwandlung von p-Tyrosin zu Dopa und die PNMT-katalysierte Reaktion von Noradrenalin zu Adrenalin entzog sich dieser Beobachtung. Hier wurde eine konstantbleibende Immunreaktion beobachtet, die weder von Größe noch von Lokalisation der Leydigzell-Plaques abhängig war. Die Leydigzelltumore zeigen somit eine verminderte Dopamin- und Noradrenalin-Produktion. Lageabhängig konnte erstmalig eine verstärkte AADC- und DBH-Immunreaktivität der Leydigzellen in atrophierten Hodenarealen nachgewiesen werden.

5.3.4. Calciumbindende Proteine

Die vorliegende Arbeit liefert den Beweis für das Vorkommen von S-100 und Calmodulin in Leydigzellen des Menschen, und bestätigt die Ergebnisse von Kagi et al. (1988 für die Ratte). Die von Kagi et al. (1988) nachgewiesene Calmodulinaktivität in Spermatozyten und Spermatiden konnten wir allerdings nicht bestätigen. Speziesbedingte Variationen sowie Unterschiede in der angewandten Methodik können diese Differenzen erklären. Dagegen konnten wir eine Calmodulinreaktivität in den Sertoli-Zellen nachweisen. Auch hier können speziesbedingte Variationen der Grund sein. Ein Nachweis für S-100 in menschlichen Leydigzellen wurde von Davidoff et al. (1993) und Middendorff et al. (1993) beschrieben. Ein weiterer Nachweis für das Vorkommen von S-100 in Leydigzelltumoren beim Menschen wurde von McLaren et al. (1989), Ekfords et al. (1992) und Tanaka et al. (2002) beschrieben. Die in diesen Studien beobachtete Immunpositivität der Sertoli-Zellen für S-100 konnten wir bestätigen. Wir haben ferner wie Tanaka et al. (2002) keine Immunpositivität im Keimepithel beobachtet. Über eine S-100-Immunaktivität in Leydigzell-

Seminomen der Ratte haben Kerlin et al. (1998) berichtet. S-100-Expression wurde ebenso bei Sertoli- und Leydigzelltumoren beobachtet (Iczkowski et al. 1998). Wir waren aber nicht in der Lage, die von Amselgruber et al. (1992) beim Rind, Holash et al. (1993) bei der Ratte und Czykier et al. (2000) bei der Wühlmaus beobachtete S-100-Positivität von Endothelzellen der Kapillare und der Lymphgefäße zu bestätigen, was mit den Ergebnissen von Cruzana et al. (2000) übereinstimmt. Die von Czykier et al. (2000) beobachtete Myozytenanfärbung konnte von uns auch bestätigt werden. Unsere Ergebnisse bezüglich der schwächeren S-100-Aktivität in Leydigzell-Tumoren stimmen mit denen von Middendorff et al. (1993) überein. Die reduzierte Immunreaktivität konnte hier sowohl für die Leydigzell-Tumoren als auch für die Leydigzell-Hyperplasien gezeigt werden und umfasst die beiden hier getesteten calciumbindenden Proteine. Erstmalig konnte in der vorliegenden Arbeit eine Besonderheit in der Expressionsaktivität von S-100 innerhalb einer Leydigzell-Plaque beobachtet werden, nämlich dass die peripher liegenden Leydigzellen eine stärkere Aktivität aufweisen, wobei in diesem Fall die Größe der Plaques keine Rolle spielt. Funktionel wurde früher eine fördernde Wirkung von Calmodulin auf die Testosteronproduktion und somit eine Beeinflussung der Spermatogenese nachgewiesen (Hall et al. 1981 an der Ratte und Kilgore et al. 1990 an der Maus). Dabei wurde ein stimulierender Einfluss von Calmodulin auf den Transport von Cholesterin in das Mitochondrium gezeigt. Die dafür ebenfalls wichtige Calciumpresens haben Cooke et al. (1986) und Hall et al. (1981) festgestellt. Weiterhin wurde die aktivierende Wirkung von den calciumbindenden Proteinen auf die Testosteronproduktion durch Hemmversuche bestätigt (Hall et al. 1981; Sullivan et al. 1983, 1985 an der Ratte; Fatima et al. 1988; Mukhopadhyay et al. 1989; Nagy et al. 1990; Chen et al. 2005 an der Maus).

Auch an Leydig-Tumorzellen wurden verschiedene Calmodulinantagonisten angewandt (Melner et al. 1983). Nach Anwendung von Trifluoperazinen in geringen Dosen wurde eine Hemmung der Testosteronproduktion festgestellt, die jedoch bei der Anwendung höherer Dosen nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Vielmehr wurde bei der Verabreichung höheren Trifluoperazinmengen eine Stimulation der Testosteronsynthese beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde bei der Verabreichung des Calmodulinantagonisten Chlorpromazine der gegenläufige Effekt erzielt. Diese kontroversen Ergebnisse lassen sich mit den veränderten Calmodulinexpressionen, die in der vorliegenden Untersuchung Leydigzelltumoren beobachtet wurden, erklären. Die starke Abnahme Calmodulinkonzentration in tumorösen Leydigzellen führt zu einer Veränderung der

physiologisch vorherrschenden Regulationsmechanismen.

Abgesehen von der Größe der Leydigzell-Plaques konnte in unserer Untersuchung gezeigt werden, dass die Expression der calciumbindenden Proteine auch von dem umgebenden Gewebe abhängig ist. Plaques im intakten Hodenareal mit einer intakten Spermatogenese zeigten eine geringere Expression als solche, die im atrophierten Tubulusschattenareal lokalisiert waren. Verantwortlich für diese Beobachtung ist möglicherweise die Beteiligung der calciumbindenden Proteine an der Regulation der Spermatogenese. Vergleichbare Studien existieren in der Literatur bis zu diesen Zeitpunkt nicht.

Die Regulation der Spermatogenese kann des Weiteren durch die hier erstmalig beschriebenen Beobachtungen an den Sertoli-Zellen eruiert werden. Es konnte gezeigt werden, das eine starke Calmodulinexpression in den Leydigzellen zu einer Hemmung der Sertoli-Zell-Aktivität führt und das Sertoli-Zellen nahe Leydigzelltumoren eine erhöhte Calmodulinimmunreaktivität aufweisen.

5.3.5. Proteine der synaptischen Bläschen

Unsere Untersuchung bringt den ersten Beweis für eine SNAP 25-Immunreaktivität in den Leydigzellen des menschlichen Hodens. Ein Nachweis für die Expression von Synaptophysin in normalen Sertoli- und Leydigzellen wurde von Davidoff et al. (1993, 1995), Middendorff et al. (1993) und Iczkowski et al. (1998) erbracht. Iczkowski et al. (1998) zeigten das Vorkommen von Synatophysin in Sertoli-Zell- und Leydigzelltumoren. Die von Middendorff et al. (1993) und Davidoff et al. (1995) beschriebene verminderte Synaptophysinexpression in Leydigzelltumoren des Menschen konnte hier nicht völlig bestätigt werden. In unserem Material haben wir eine verstärkte Positivität in den peripher liegenden Leydigzellen der einzelnen Plaques beobachtet.

5.3.6. Zelladhäsionsmoleküle

Den Nachweis für das Zelladhasionmolekül N-CAM erbrachte Davidoff et al. (1993) beim Menschen und Denduchis et al. (1996) bei Leydigzellkulturen der Ratte. Die Untersuchung an der sich entwickelnden Maus und Ratte (Mayerhofer et al. 1996) zeigte eine starke Abhängigkeit der N-CAM-Expression von der Leydigzellentwicklung und Differenzierung. Die in der vorliegenden Untersuchung beobachtete Zunahme der Expression des N-CAM im atrophierten Tubulusschattenareal lässt auf eine erhöhte Leydigzellentwicklungs- und Differenzierungsrate schließen.

5.3.7. Antigene der Gliazellen

Die von uns erzielten Ergebnisse bestätigen die von Davidoff et al. (1996, 1997, 2002) am Menschen und von Maunoury et al. (1991) für das GFAP am Hamster erbrachten Befunde. Die zytoplasmatische Immunpositivität der Leydigzellen wurde von einer Immunpositivität der Sertoli-Zellen begleitet (Davidoff et al. 2002). Diese Sertoli-Zellreaktion konnten wir auch für A2B5 nachwiesen.

Während für O4 und A2B5 eine konstante Immunexpression beobachtet werden konnte, zeigte sich eine größen- und lokalisationsbedingte Expressionsabhängigkeit bei den restlichen Gliazellantigenen. Galactocerebrosid zeigte im Unterschied zu CNPase eine geringere Expression in tumorösen Leydigzellen. Eine geringere Expression konnte weiterhin für Galactocerebrosid, CNPase und GFAP in Tubulusschattenareal befindlichen Leydigzellen gezeigt werden.

Unsere Western Blot Ergebnisse für die Antigene der Gliazellen bestätigen die Resultate von Davidoff et al. (2002).

5.3.8. Enzyme der Steroidsynthese

In dieser Arbeit bedarf es keiner detaillierten Diskussion über die Expression der Enzyme der Steroidsynthese von den Leydigzellen, da sie in vielen Publikationen zu finden ist und mit denen übereinstimmen. Vielmehr benutzten wir diese Nachweise als Marker für die

Leydigzellen und zur Einstufung der Hormon-Syntheseleistung der Leydigzelltumore bzw. der hyperplastischen Leydigzell-Plaques, die von atrophiertem Gewebe umgeben sind. Die von uns erzielten Ergebnisse zeigen eine Zunahme der LDL-Expression in Leydigzellen, die von atrophierten Tubulusschattenarealen umgeben sind. Diese Besonderheit konnte beim Nachweis von Cytochrom P450 nicht beobachtet werden. Hier konnte eine geringere Expression in den Leydigzelltumoren beobachtet werden.

5.4. Schlußfolgerungen

- 1. Abgesehen von kleinen Schwankungen weisen die Leydigzellen in der Norm sowie Leydigzellen in hyperplastischen Plaques und in Tumorarealen die gleichen immunhistochemischen Besonderheiten auf. Zeichen für Proliferation von Leydigzellen konnten in unserem Untersuchungsgut nicht festgestellt werden.
- 2. Die neuralen (neuroendokrinen) Eigenschaften der Leydigzellen differenzieren sich direkt nach der Umwandlung (Transdifferenzierung) ihrer Progenitorzellen und verbleiben während des ganzen Lebens der Leydigzellen sowohl in den hyperplastischen Formen als auch in den Zellen der Tumore.
- 3. Leydigzellen, die in der Peripherie von Leydigzell-Plaques oder Tumormassen liegen, zeigen immunhistochemisch eine stärkere Intensität der Reaktion für viele neuroaktive Substanzen als die Leydigzellen, die im Innern dieser Formationen liegen. Es ist höchstwahrscheinlich, dass für diese Besonderheit lokale Faktoren und die Nähe der peripheren Leydigzellen zu den Hodenkanälchen verantwortlich sind. Die Zellen der zentralen Areale der Tumore und der Plaques sind von diesen Einflüssen isoliert und zeigen eine geringere Aktivität.
- 4. Veränderungen der Spermatogenese in den Samenkanälchen haben einen gewissen Einfluss auf die Hyperplasie der Leydigzellen. Allerdings spielen auch weitere unbekannte lokale Faktoren eine wesentliche Rolle, da gehäuft hyperplastische Leydigzell-Plaques neben Hodenkanälchen mit intakter Spermatogenese vorkommen.
- 5. Die Leydigzellen des menschlichen Hodens haben eine einheitliche Herkunft. Sie

entstehen aus multipotenten, stammzellähnlichen Progenitorzellen, die gleichzeitig mehrere biologische und funktionelle Eigenschaften besitzen: endokrine Zellen, neuroendokrine Zellen, neurale Zellen (mit Besonderheiten von Nerven- und Gliazellen; undifferenzierte oder nur teildifferenzierte pluripotente Zellen). Die große Vielfalt der Leydigzellen (fetale, intermediäre, adulte, hyperplastische und neoplastische Leydigzellen) ist eine Folge ihrer individuellen Entwicklung, ihres Funktionszustand und des Einfluss der inneren und äußeren (epigenetischen) Faktoren.

- 6. Das Vorkommen von Hyperplasie im Hoden des Menschen, ohne Teilung (Mitose) der Leydigzellen, ist mit der Tatsache zu erklären, dass die Leydigzellen durch die Transdifferenzierung der im Hoden vorhandenen Vorläuferzellen entstehen.
- 7. In hyperplastischen Aggregaten von Leydigzellen können auch hypertrophierte Leydigzellen in unterschiedlicher Anzahl beobachtet werden, so dass Hyperplasie und Hypertrophie der Leydigzellen gleichzeitig vorkommen können.

6. Zusammenfassung

Die Leydigzellen des menschlichen Hodens sind Zellen, die für die Produktion der männlichen Geschlechtshormone verantwortlich sind. Hiermit regulieren sie den Ablauf und die Erhaltung der Spermatogenese, tragen zur Entstehung der männlichen Geschlechtsmerkmale bei und bestimmen das männliche Verhalten.

Durch die Produktion verschiedener bioaktiver Substanzen stehen sie in ständiger Wechselwirkung mit weiteren Strukturen des Hodens und regulieren somit seine Funktion. Leydigzellhyperplasien stellen größere Ansammlungen dieser Zellen dar, die in der Regel als benigne Gebilde zu betrachten sind, sich aber zu benignen oder malignen Leydigzell-Tumoren differenzieren können.

Eine detaillierte Untersuchung über die strukturelle und immunhistochemische Beschaffenheit der hyperplastischen und tumorösen Leydigzellen sowie deren Abhängigkeit vom Zustand der Spermatogenese steht bis zum jetzigen Zeitpunkt aus. Ungenügend geklärt ist gegenwärtig auch die Herkunft der hyperplastischen und tumorösen Leydigzellen.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine gezielte Untersuchung der hyperplastischen Leydigzellen im menschlichen Hoden im Hinblick auf ihre Struktur, ihre Sekretion bioaktiver Substanzen, ihre Abhängigkeit vom Zustand der Spermatogenese und auf ihre Herkunft. Dabei wurden Vergleiche zu normalen sowie zu tumorösen Leydigzellen herangezogen.

Anhand von Paraffin-, Semidünn- und Ultradünnschnitten konnte in dieser Arbeit die starke Heterogenität der Leydigzellen des menschlichen Hodens nachgewiesen werden. Diese betrifft nicht nur die Morphologie der Leydigzellen, sondern spiegelt sich auch in ihrem Funktionszustand wieder, was mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen festgestellt werden konnte. Dabei wurde erstmalig das Alter der Patienten mit den strukturellen und funktionellen Beschaffenheiten der Leydigzellen in Beziehung gesetzt.

Mittels der Immunhistochemie und des Western-Blots als zusätzliche Bestätigung konnte eine große Anzahl verschiedener bioaktiver Substanzen wie z.B. neuronale und neuroendokrine Markersubstanzen, neurotrophe Faktoren, Zytokine mit neurotropher

Wirkung, Enzyme der Katecholaminsynthese, Calciumbindende Proteine, Proteine der synaptischen Vesikel, Zelladhäsionsmoleküle und typische Gliazellantigene in den normalen, hyperplastischen und neoplastischen Leydigzellen nachgewiesen werden. Dabei wurde erstmals die Immunreaktivität dieser Antigene im Hinblick auf den morphologischen Zustand der hyperplastischen Leydigzellen sowie die Abhängigkeit der Expression vom Zustand der Spermatogenese der Hodenkanälchen bestimmt. Die Immunhistochemie sowie die Western-Blot Analyse lieferte des Weiteren den Beweis für die Herkunft und für den Enstehungsmechanismus der hyperplastischen Leydigzellen.

Die von uns durchgeführte Untersuchung lieferte folgende neue Erkenntnisse:

- 1. Die hyperplastischen Leydigzellen und die Leydigzelltumore sind wie die normalen Leydigzellen gekennzeichnet durch ihre deutliche Heterogenität. Dabei ist das Alter der Patienten für die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Leydigzellen von geringer Bedeutung.
- 2. Hyperplastische Leydigzellen und Leydigzelltumore gleichen sich in ihrer immunhistochemischen Beschaffenheit und besitzen kaum Unterschiede zu den normalen Leydigzellen. Bis auf wenige Ausnahmen ist die Expression bioaktiver Substanzen vergleichbar. Leydigzellen, die in der Peripherie von Adenomen liegen, bestechen durch eine weitere Besonderheit. Sie zeigen eine stärkere Expression der bioaktiven Substanzen, was auf Wechselwirkungen mit den umgebenden Strukturen zurückzuführen ist.
- 3. Der Zustand der Spermatogenese hat einen erkennbaren Einfluss auf die Leydigzellhyperplasie. So werden hyper- bzw. tumuröse Leydigzellen vermehrt in der Umgebung von Tubuli mit gestörter Spermatogenese beobachtet. Kommt es zu einer Unterbrechung der Wechselwirkung zwischen Tubuluszellen und Leydigzellen, wie im Tubulusschattenareal, degenerieren Leydigzellen. Auch Leydigzellen, die in der Peripherie von Tumoren liegen, zeigen eine stärkere Expression der Substanzen, was auf Wechselwirkungen mit den umgebenden Strukturen zurückzuführen ist. Neben dem Einfluss der Spermatogenese spielen aber auch lokale Faktoren eine Rolle, da Leydigzellhyperplasien auch in der Nähe von Tubuli mit intakter Spermatogenese vorkommen.

4. Hyperplastische Leydigzellen und Leydigzelltumore haben dieselbe Herkunft wie normale Leydigzellen. Sie entstehen durch Transdifferenzierung aus gemeinsamen Progenitorzellen, die in der Wand der Mikrovaskulatur des Hodens in Form von Perizyten und glatten Muskelzellen liegen. Der Nachweis des Intermediärfilamentproteins Nestin in vielen Leydigzelltypen unterstützt diese Aussage und erlaubt die Vermutung, dass beim Menschen neue Leydigzellen im Verlauf des ganzen Lebens gebildet werden. Es soll ausdrücklich betont werden, dass die adulten Leydigzellen nicht durch Zellteilung, sondern durch direkte Umwandlung der nestinhaltigen Progenitorzellen entstehen.

7. Literaturverzeichnis

- Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP (2004) Phtalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. Proc Natl Acad Sci USA 101: 775-780
- Al-Agha OM, Axiotis CA (2007) An in-depth look at Leydig cell tumor of the testis.

 Arch Pathol Lab Med 131: 311-317
- Amselgruber W, Sinowatz F, Schams D, Lehmann M (1992) S-100 protein immunoreactivity in bovine testis. Andrologia. 24: 231-235
- Angelova P, Davidoff M (1989) Immunocytochemical demonstration of substance P in hamster Leydig cells during ontogenesis. Z Mikrosk Anat Forsch. 103: 560-566
- Angelova PA, Davidoff MS, Kanchev LN (1991) Substance P-induced inhibition of Leydig cell steroidgenesis in primary culture. Andrologia. 23: 325-327
- Angelova P, Davidoff M, Baleva K, Staykova M (1991) Substance P- and neuron-specific enolase-like immunoreactivity of rodent Leydig cells in tissue section and cell culture. Acta Histochem. 91: 131-139
- Angelova P, Davidoff MS, Bakalska M, Kanchev L (1996) In vitro effects of substance P and arginine-vasopressin on testosterone production in Leydig cells of short and long photo-periodic hamsters. Andrologia. 28: 321-326
- Arai N, Misugi K, Kamiya T, Shima S (1988) An ovarian Sertoli-Leydig cell tumor with heterologous mucinous gland and NSE-immunoreactive-cell.

 Arch Gynecol Obstet 43: 55-60
- Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC, Hales DB, Mason JI (2000) Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. Biol reprod 63: 165-171
- Ayer-LeLievre C, Olson L, Ebendal T, Hallbook F, Persson H (1988) Nerve growth factor mRNA and protein in the testis and epididymis of mouse and rat. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 2628-2632
- Behre HM, Yeung CH, Holstein AF, Weinbauer GF, Gassner P, Nieschlag E (2000) Diagnosis of male infertility and hypogonadism. In: Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction, 2nd ed, (Nieschlag E and Behre HM,

- eds) Springer Berlin, Heidelberg, New York, pp 89-124
- Benton L, Shan L-X, Hardy MP (1995) Differentiation of adult Leydig cells. J Steroid Biochem Mol Biol 53: 61-68
- Brennan J, Capel B (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that Underlie testis versus ovary development. Nature Rev Gen 5: 509-521
- Chatelain P, Perrard-Sapori MH, Jaillard C, Naville D, Ruitton A, Saez J (1987)

 Somatomedin-C/insulin-like growth factor 1: a differentiating factor of testicular function. Int J Rad Appl Instrum B 14: 617-622
- Chemes HE (1996) Leydig cell development in humans. In: The Leydig Cell,
 AH Payne, MP Hardy, LD Russell, edts, Cache River Press, Vienna IL,
 175-201
- Chemes HE, Rivarola MA, Bergadá C (1976) Effects of hCG on the interstitial cells and androgen production in the immature testis. J Steroid Biochem 13: 185-190
- Chen YC, Huang YL, Huang BM (2005) Cordyceps sinensis mycelium activates PKA and PKC signal pathways to stimulate steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Int J Biochem Cell Biol 37: 214-223
- Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R (1991)

 Tachykinin (Substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. Endocrinology 128: 2441-2448
- Christensen AK, Mason NR (1965) Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testis to synthesize androgens from progesterone-4-14C in vitro. Endocrinology 76: 646-656
- Christensen AK, Peacock KC (1980) Increase in Leydig cell number in testes of adult rats treated chronically with an excess of human chorionic gonadotropin. Biol Reprod 22: 383-391
- Clayton RN, Huhtamiemi IP (1982) Absence of gonadotropin releasing hormone receptors in human gonadal tissues. Nature 299: 56-59
- Clegg ED, Cook JC, Chapin RE, Foster PMD, Daston GP (1997) Leydig cell hyperplasia and adenoma formation: mechanisms and relevance to humans. Reprod Toxicol 11: 107-121
- Cook JC, Klinefelter GR, Hardisty JF, Sharpe RM, Foster PMD (1999) Rodent Leydig cell tumorigenesis: a review of the physiology, pathology, mechanisms, and relevance to humans. Crit Rev Toxicol 29: 169-261

- Cooke BA, Sullivan MH (1986) Modulation and role of Ca2+ in LH and LHRH agonist action in rat Leydig cells. Med Biol. 63: 259-63
- Cruzana BC, Hondo E, Kitamura N, Matsuzaki S, Nakagawa M, Yamada J (2000) Differential localization of immunoreactive alpha- and beta-subunits of S-100 protein in feline testis. Anat Histol Embryol 29: 83-86
- Cupp AS, Kim GH, Skinner MK (2000) Expression and action of neurotropin-3 and nerve growth factor in embryonic and early postnatal rat testis development. Biol Reprod 63: 1617-1628
- Czykier E, Sawicki B, Zabel M (2000) S-100 protein immunoreactivity in mammalian testis and epididymis. Folia Histochem Cytobiol. 38: 163-166
- Davidoff MS, Schulze W, Middendorff R, Holstein AF (1993) The Leydig cell of the human testis—a new member of the diffuse neuroendocrine system.

 Cell Tissue Res 271: 429-439
- Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, Holstein AF (1995) Nitric oxide synthase (NOS-I) in Leydig cells of the human testis. Arch Histol Cytol. 58: 17-30
- Davidoff MS, Middendorff R, Holstein AF (1996) Dual nature of Leydig cells of the human testis. Biomedical Reviews 6: 11-41
- Davidoff MS, Middendorff R, Muller D, Kofuncu E, Holstein AF (1997)

 Immunoreactivity for glial cell markers in the human testis. Adv Exp Med

 Biol. 424: 151-152
- Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, deVente J, Koesling D, Holstein AF (1997) Nitric oxide/cGMP pathway components in the Leydig cells of the human testis. Cell Tissue Res 287: 161-170
- Davidoff MS, Middendorff R, Pusch W, Muller D, Wichers S, Holstein AF (1999) Sertoli and Leydig cells of the human testis express neurofilament triplet proteins. Histochem Cell Biol 111: 173-187
- Davidoff MS, Middendorff R, Koeva Y, Pusch W, Jezek D, Muller D (2001)

 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptors

 GFRalpha-1 and GFRalpha-2 in the human testis. Ital J Anat Embryol

 106: 173-180
- Davidoff MS, Middendorff R, Kofuncu E, Muller D, Jezek D, Holstein AF (2002) Leydig cells of the human testis possess astrocyte and oligodendrocyte marker molecules. Acta Histochem. 104: 39-49

- Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, Muller D (2004) Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. J Cell Biol. 167: 935-944
- Denduchis B, Schteingart H, Cigorraga S, Vianello SE, Casanova MB, Lustig L (1996) Immunodetection of cell adhesion molecules and extracellular matrix proteins in rat Leydig cell cultures. Int J Androl. 19: 353-361
- Dirami G, Teerds KJ, Cooke BA (1996) Effect of a dopamine agonist on the development of Leydig cell hyperplasia in Spraque-Dawley rats. Toxicol Appl Pharmacol 141: 169-177
- Djakiew D, Pflug B, Dionne C, Onoda M (1994) Postnatal expression of nerve growth factor receptors in the rat testis. Biol Reprod 51: 214-221
- Düe W, Dieckmann K-P, Loy V, Stein H (1989) Immunohistological determination of oestrogen receptor, progesterone receptor, and intermediate filaments in Leydig cell tumours, Leydig cell hyperplasia, and normal Leydig cells of the human testis. J Pathol 157: 225-234
- Ekfors TO, Martikainen P, Kuopio T, Malmi R, Nurmi MJ (1992) Ultrastructure and immunohistochemistry of a fetal-type Leydig cell tumor. Ultrastruct Pathol. 16: 651-658
- Fatima N, Ahmad W, Khanum A, Ahmad R, Qazi MH (1988) Effect of anticalmodulin drugs on testosterone synthesis in hCG stimulated mouse Leydig cells. Endocrinol Invest. 11: 1-6
- Foster PMD, Mylchreest E, Gaido KW, Sar M (2001) Effects of phthalate esters on developing reproductive tract of male rats. Hum Reprod Update 7: 231-238
- Fröjdmann K, Pelliniemi LJ, Lendahl U, Virtanen I, Eriksson JE (1997) The intermediate Filament protein nestin occurs transiently in differentiating testis of rat and mouse. Differentiation. 61: 243-249
- Ge RS, Shan LX, Hardy MP (1996) Pubertal development of Leydig cells. In:
 The Leydig Cell. AH Payne, MP Hardy and LD Russell, editors, Cache
 River Press, Vienna IL, 159-173
- Gondos B (1987) Development of the testis and associated dislity. In: Gondos B and Riddick DH (eds) Pathology of Infertility. Clinical Correlation in the male and female. Thieme, Stuttgart, pp 219-241
- Gotoh M, Miyake K, Mitsuya H (1984) Leydig cell hyperplasia in cryptorchid

- patients: quantitative evaluation of Leydig cells in undescended and contralateral scrotal testes. Urol Res 12: 159-164
- Habert R, Lejeune H, Saez JM (2001) Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. Mol Cell Endocrinol 179: 47-74
- Haider SG (2004) Cell Biology of Leydig cells in the testis. Internat Rev Cytol 223: 181-241
- Haider SG, Servos G (1998) Ultracytochemistry of 3ß-hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. Anat Embryol 198: 101-110
- Haider SG, Laue D, Schwochau G, Hilscher B (1995) Morphological studies on the origin of adult-type Leydig cells in rat testis. Ital J Anat Embryol 100 (Suppl 1): 535-541
- Hall PF, Osawa S, Mrotek J (1981) The influence of calmodulin on steroid synthesis in leydig cells from rat testis. Endocrinology. 109: 1677-1682
- 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
- Heller CG, Leach DR (1971) Quantification of Leydig cells and measurement of Leydig-cell size following administration of human chorionic gonadotropin to normal men. J Reprod Fert 25: 185-192
- Holash JA, Harik SI, Perry G, Stewart PA (1993) Barrier properties of testis microvessels. Proc Natl Acad Sci USA 90: 11069-11073
- Holm M, Rajpert-De Meyts E, Andersson A-M, Skakkebaek N (2003) Leydig cell micronodules are a common finding in testicular biopsies from men with impaired spermatogenesis and are associated with decreased testosterone/LH ratio. J Pathol 199: 378-386
- Holstein AF, Davidoff MS (1997) Organization of the intertubular tissue of the human testis. In: PM Motta, ed, Recent Advances in Microscopy of Cells, Tissues and Organs, Antonio Delfino Editore, Rome, pp 569-577
- Honore LH (1978) Ageing changes in the human testis: a light-microscopic study. Gerontology 24: 58-65
- Huseby RA (1980) Demonstration of a direct carcinogenic effect of estradiol on Leydig cells of the mouse. Cancer Res 40: 1006-1013
- Huseby RA, Samuels LT (1977) Lack of influence of hypophysectomy on

- estrogen-induced DNA synthesis in Leydig cells of BALB/c mice. J Natl Cancer Inst 58: 1047-1049
- Iczkowski KA, Bostwick DG, Roche PC, Cheville JC (1998) Inhibin A is a sensitive and specific marker for testicular sex cord-stromal tumors. Mod Pathol 11: 774-779.
- Ivell R, Balvers M, Domagalski R, Ungefroren H, Hunt N, Schulze W (1997)

 Relaxin-like factor: a highly specific and constitutive new marker for

 Leydig cells in the human testis. Mol Hum Reprod 3: 459-466
- Kagi U, Chafouleas JG, Norman AW, Heizmann CW (1988) Developmental appearance of the Ca2+binding proteins parvalbumin, calbindin D-28K, S-100 proteins and calmodulin during testicular development in the rat. Cell Tissue Res 252: 359-365
- Kanchev LN, Konakchieva R, Angelova PA, Davidoff MS (1995) Substance P modulating effect on the binding capacity of hamster Leydig cell LH receptors. Life Sci 56: 1631-1637
- Kerlin RL, Roesler AR, Jakowski AB, Boucher GG, Krull DL, Appel WH (1998) A poorly differentiated germ cell tumor (seminoma) in a Long Evans rat. Toxicol Pathol 26: 691-694
- Kerr JB, Sharpe RM (1986) Effects and interactions of LH and LHRH agonist on testicular morphology and function in hypophysectomized rats. J Reprod Fertil 76: 175-192
- Kilgore MW, Rommerts FF, Writz KW, Stocco DM (1990) Regulation of steroidogenesis in subclones of the MA-10 mouse Leydig tumor cell line.

 Mol Cell Endocrinol 69: 9-16
- Klonisch T, Ivell R, Balvers M, Kliesch S, Fischer B, Bergmann M, Steger K (1999) Expression of relaxin-like factor is down-regulated in human testicular Leydig cell neoplasia. Mol Human Reprod 5: 104-108
- Koeva YA (2002) Immunolocalisation of neurotrophic factors and their receptors in the Leydig cells of rat during postnatal development. Folia Med. 44: 27-31
- Koike S, Noumura T (1994) Cell- and stage-specific expression of basic FGF in the developing rat gonads. Growth Regul. 4: 77-81
- Kulkarni SA, Garde SV, Sheth AR (1992) Immunocytochemical localization of bioregulatory peptides in marmoset testes. Arch Androl 29: 87-102

- Lamano-Carvalho TL, Favaretto ALV, Silva AAMR, Antunes-Rodrigues J (1987) Leydig cell hypertrophy and hyperplasia in adult rats treated with an excess of human chorionic gonadotrophin (hCG). Gegenbaurs Morphol Jahrb 133: 297-309
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell 60: 585-595
- Leon MD, Chiauzzi VA, Calvo JV, Charreau EH, Chemes HE (1987) Acute hCG administration induces seminiferous tubule damage in the adult rat. Acta Physiol Pharmacol Latinoam 37: 277-288
- Levine E, Cupp AS, Skinner MK (2000) Role of neurotropins in rat embryonic testis morphogenesis (cord formation). Biol Reprod. 62: 132-142
- Lissbrant E, Löfmark U, Collin O, Bergh A (1997) Is nitric oxide involved in the regulation of the rat testicular vasculature?. Biol Reprod. 56:1221-1227
- Liu Y, Du Q, Zhou H, Liu K, Hu Z (1996) Regulation of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured rat Sertoli and Leydig cells. Sci China C Life Sci 39: 37-44
- Lobo MV, Arenas MI, Alonso FJ, Gomez G, Bazan E, Paino CL, Fernandez E, Fraile B, Paniagua R, Moyano A, Caso E (2004) Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in Leydig cells of the human testis and in some specific cell types from human testicular tumours. Cell Tissue Res. 316: 369-376
- Maddock WO, Nelson WO (1952) The effect of chronic gonadotropin in adult men: Increased oestrogen and 17-ketosteroid excretion, gynecomastia, Leydig cell stimulation and seminiferous tubule damage. J Clin Endocrinol Metab 12: 985-1014
- Maddocks S, Sharpe RM (1989) Interstitial fluid volume in the rat testis: androgen-dependent regulation by the seminiferous tubules? J Endocrinol 120: 215-222
- Mahood IK, Hallmark N, McKinnell C, Walker M, Fisher JS, Sharpe RM (2005) Abnormal Leydig cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis.

 Endocrinology 146: 613-623
- Mati W, Lam G, Dahl C, Andersen JT, Balslev E (2002) Leydig cell tumor A rare

- testicular tumor. Int Urol Nephrol 33: 103-105
- Matzuk MM, DeMayo FJ, Hadsell LA, Kumar TR (2003) Overexpression of human chorionic gonadotropin causes multiple reproductive defects in transgenic mice. Biol Reprod 69: 338-346
- Maunoury R, Portier MM, Leonard N, McCormick D (1991) Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in adrenocortical and Leydig cells of the Syrian golden hamster (Mesocricetus auratus). Neuroimmunol. 35: 119-129
- Mayerhofer A, Lahr G, Seidl K, Eusterschulte B, Christoph A, Gratzl M (1996)

 The neural cell adhesion molecule (NCAM) provides clues to the development of testicular Leydig cells. J Androl 17: 223-230
- Mazzocchi G, Malendowicz LK, Rebuffat P, Kasparzak A, Nussdorfer GG (1990) Effects of acute and chronic treatments with atrial natriuretic factor (ANF) on the Leydig cells of the rat testis. Endocr Res 16: 323-331
- McLaren K, Thomson D (1989) Localization of S-100 protein in a Leydig and Sertoli cell tumour of testis. Histopathology 15: 649-652
- Melner MH, Zimniski SJ, Puett D (1983) Divergent effects of phenothiazines on Leydig tumor cell steroidogenesis and adenylate cyclase activity. J Steroid Biochem 19: 1111-1117
- Mendis-Handagama SMLC, Ariyaratne HBS (2001) Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. Biol Reprod 65: 660-671
- Middendorff R, Davidoff M, Holstein AF (1993) Neuroendocrine marker substances in human Leydig cells-changes by disturbances of testicular function. Andrologia 25: 257-262
- Middendorff R, Davidoff MS, Mayer B, Holstein AF (1995) Neuroendocrine characteristics of human Leydig cell tumours. Andrologia. 27: 351-355
- Middendorff R, Müller D, Paust HJ, Holstein AF, Davidoff MS (1997) New aspects of Leydig cell function. Adv Exp Med Biol 424: 125-138
- Middendorff R, Müller D, Wichers S, Holstein AF, Davidoff MS (1997)

 Evidence for production and functional activity of nitric oxide in seminiferous tubules and blood vessels of the human testis. J Clin Endocrinol Metab 82: 4154-4161
- Mooney EE, Man Y-G, Bartthauer GL, Tvassoli FA (1999) Evidence that Leydig cells in Sertoli-Leydig cell tumors have a reactive rather than a neoplastic profile. Cancer 86: 2312-2319

- Mori H, Christensen AK (1980) Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. J Cell Biol 84: 340-354
- Müller D, Paust HJ, Middendorff R, Davidoff MS (1997) Nerve growth factor (NGF) receptors in male reproductive organs. Adv Exp Med Biol 424: 157-158
- Müller D, Davidoff MS, Bargheer O, Paust J-J, Pusch W, Koeva Y, Ježek D, Holstein AF, Middendorff R (2006) The expression of neurotrophins and their receptors in the prenatal and adult human testis: evidence for functions in Leydig cells. Histochem Cell Biol 26: 199-211
- Mukhopadhyay AK, Helbing J, Leidenberger FA (1989) The role of Ca2+ and calmodulin in the regulation of atrial natriuretic peptide-stimulated guanosine 3`,5`-cyclic monophosphate accumulation by isolated mouse Leydig cells. Endocrinology 125: 686-692
- Mullaney BP, Skinner MK (1991) Growth factors as mediators of testicular cellcell interactions. Baillieres Clin Endocrinol Metab 5: 771-90
- Murakami M, Hosokawa S, Yamada T, Harakawa M, Ito M, Koyama Y, Kimura J, Yoshitake A, Yamada H (1995) Species-specific mechanism in rat Leydig cell tumorigenesis by procymidone. Toxicol Appl Pharmacol 131: 244-252
- Murono EP, Washburn AL, Goforth DP, Wu N (1992) Evidence for basic fibroblast growth factor receptors in cultured immature Leydig cells. Mol Cell Endocrinol 88: 39-45
- Murray TJ, Fowler PA, Abramovich DR, Haites N, Lea RG (2000) Human fetal testis: second trimester proliferative and steroidogenic capacities. J Clin Endocrinol Metab 85: 4812-4817
- Mylchreest E, Sar M, Wallace DG, Foster PM (2002) Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. Reprod Toxicol 16: 19-28
- Nagy L, Freeman DA (1990) Effect of cholesterol transport inhibitors on steroidgenesis and plasma membrane cholesterol transport in cultured MA-10 Leydig tumor cells. Endocrinology 126: 2267-2276
- Narula A, Kilen S, Ma E, Kroeger J, Goldberg E, Woodruff TK (2002) Smad4 overexpression causes germ cell ablation and Leydig cell hyperplasia in transgenic mice. Am J Pathol 161: 1723-1734

- Navickis RJ, Shimkin MB, Hsueh AJ (1981) Increase in testis luteinizing hormone receptor by estrogen in mice susceptible to Leydig cell tumors.

 Cancer Research 41: 1646-1651
- Naville D, Chatelain PG, Avallet O, Saez JM (1990) Control of production of insulin-like growth factor I by pig Leydig and Sertoli cells cultured alone or together. Cell-cell interactions. Mol Cell Endocrinol 70: 217-224
- Neaves WB (1973) Changes in testicular Leydig cells and in plasma testosterone levels among seasonally breeding rock hyrax, Biol Reprod 8: 451-466
- Nieschlag E, Wickings EJ, Mauss J (1979) Endocrine testicular function in vivo and in vitro in infertile men. Acta Endocrinol. 90: 544-551
- Nistal M, Paniagua R, Regadera J, Santamaria L, Amat P (1986) A quantitative morphological study of human Leydig cells from birth to adulthood. Cell Tissue Res 246: 229-236
- Orth JM (1982) Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. Anat Rec 203: 485-492
- Parvinen M, Pelto-Huikko M, Soder O, Schultz R, Kaipia A, Mali P, Toppari J, Hakovirta H, Lonnerberg P, Ritzen EM, et al. (1992) Expression of betanerve growth factor and its receptor in rat seminiferous epithelium: specific function at the onset of meiosis. J Cell Biol 117: 629-641
- Pelliniemi LJ, Kuopio T, Fröjdmann K (1996) The cell biology and function of the fetal Leydig cells. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds) The Leydig cell. Cache River Press, Vienna, IL, pp 143-158
- Persson H, Ayer-Le Lievre C, Soder O, Villar MJ, Metsis M, Olson L, Ritzen M, Hokfelt T (1990) Expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in Sertoli cells downregulated by testosterone. Science 247: 704-707
- Piolat C, Dyon JF, Chavanis N, Jaxquier C, Durant C, Pasquier D (2003)

 Testicular Leydig cell hyperplasia in children. Prog Urol 13: 110-114
- Prahalada S, Majka JA, Soper KA, Nett TM, Bagdon WJ, Peter CP, Burek CP, MacDonald JS, van Zwieten MJ (1994) Leydig cell Hyperplasia and adenomas in mice treated with finasteride, a 5α-reductase inhibitor; a possible mechanism. Fund Appl Toxicol 22: 211-219
- Prentice DE, Meikle AW (1995) A review of drug-induced Leydig cell hyperplasia and neoplasia in the rat and some comparisons with man.

- Human Exp Toxicol 14: 562-572
- Prince FP (2001) The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. J Endocrinol 168: 213-216
- Pudney J (1996) Comparative cytology of the Leydig cell, In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds) The Leydig Cell. Cache River Press, Vienna IL, pp 97-142
- Purvis K, Clausen OPF, Ulvil NM, Hansson V (1979) Functional and morphological characteristics of rat Leydig cells: effects of prepubertal and postpubertal structure and function. In: Sternberger A, Sternberger E, editors, Testicular Development. Raven Press, New York, pp 212-215
- Robinson LLL, Townsend J, Anderson RA (2003) The human fetal testis is a site of expression of neurotrophins and their receptors: Regulation of the germ cell and peritubular cell population. J Clin Endocrinol Metab 88: 3943-3951
- Romeo R, Pellitteri R, Russo A, Marcello MF (2004) Catecholaminergic phenotype of human Leydig cells. Ital J Anat Embryol 109: 45-54
- Rulli SB, Kuorelahti A, Öznur K, Pelliniemi LJ, Poutanen M, Huhtaniemi I (2002) Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. Endocrinology 143: 4084-4095
- Russell LD (1996) Mammalian Leydig cell structure. In: The Leydig cell. Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds), Cache River Press, Vienna IL, pp 43-96
- Russell LD, Warren J, Debeljuk L, Richardson LL, Mahar PL, Waymire KG, Amy SP, Ross AJ, MacGregor GR (2001) Spermatogenesis in Bclw-deficient mice. Biol Reprod 65: 318-332
- Saez JM, Chatelain PG, Perrard-Sapori MH, Jaillard C, Naville D (1988)

 Differentiating effects of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and insulin on Leydig and Sertoli cell functions. Reprod Nutr Dev. 28: 989-1008
- Sahlgren CM, Mikhailov A, Hellman J, Chou Y-H, Lendahl U, Goldman RD, Ericsson JE (2001) Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. J Biol Chem 276: 16456-16463
- Schultz R, Metsis M, Hokfelt T, Parvinen M, Pelto-Huikko M (2001)

 Expression of neurotrophin receptors in rat testis. Upregulation of TrkA

- mRNA with hCG treatment. Mol Cell Endocrinol 182:121-127
- Schulze C (1984) Sertoli cells and Leydig cells in man. Adv Anat Embryol Cell Biol 88: 101-104
- Schulze W, Davidoff MS, Holstein AF (1987) Are Leydig cells of neural origin?

 Substance P-like immunoreactivity in human testicular tissue. Acta

 Endocrinol (Copenh) 115: 373-377
- Schulze W, Davidoff MS, Holstein AF, Schirren C (1987) Processing of testicular biopsies—fixed in Stieve's solution—for visualization of substance P- and methionine-enkephalin-like immunoreactivity in Leydig cells. Andrologia. 19: 419-422
- Schulze W, Davidoff MS, Ivell R, Holstein AF (1991) Neuron-specific enolaselike immunoreactivity in human Leydig cells. Andrologia. 23: 279-283
- Seidl K, Holstein AF (1990) Evidence for the presence of nerve growth factor (NGF) and NGF receptors in human testis. Cell Tissue Res 261: 549-554
- Seidl K, Holstein AF (1990) Organ culture of human seminiferous tubules: a useful tool to study the role of nerve growth factor in the testis. Cell Tissue Res 261: 539-547
- Seidl K, Buchberger A, Erck C (1996) Expression of nerve growth factor and neurotrophin receptors in testicular cells suggest novel roles for neurotrophins outside the nervous system. Reprod Fertil Dev 8: 1075-1087
- Sharpe RM (1994) Regulation of spermatogenesis. In: E Knobil and JD Neil, Eds, The Physiology of Reproduction, Second edition, Raven Press Ltd, New York, pp 1363-1434
- Simpson BJB, Wu FCW, Sharpe RM (1987) Isolation of human Leydig cells which are highly responsive to human chorionic gonadotropin. J Clin Endocrinol Metab 65: 415-422
- Skakkebaek NE, De Meyts ER, Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrom: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum Reprod 16: 972-978
- Skinner MK, Norton JN, Mullaney BP, Rosselli M, Whaley PD, Anthony CT (1991) Cell-cell interactions and the regulation of testis function. Ann N Y Acad Sci 637: 354-363
- Sordoillet C, Chauvin MA, Revol A, Morera AM, Benahmed M (1988)

 Fibroblast growth factor is a regulator of testosterone secretion in cultured

- immature Leydig cells. Mol Cell Endocrinol. 58: 283-286
- Sordoillet C, Savona C, Chauvin MA, de Peretti E, Feige JJ, Morera AM,
 Benahmed M (1992) Basic fibroblast growth factor enhances testosterone
 secretion in cultured porcine Leydig cells: site(s) of action. Mol Cell
 Endocrinol 89: 163-171
- Sullivan MH, Cooke BA (1983) Stimulation of cholesterol side-chain cleavage by a luteinizing-hormone-releasing hormone (luliberin) agonist (ICI 118630) in rat Leydig cells. Biochem J 216: 747-752
- Sullivan MH, Cooke BA (1985) Effects of calmodulin and lipoxygenase inhibitors on LH (lutropin)- and LHRH (luliberin)-agonist-stimulated steroidogenesis in rat Leydig cells. Biochem J 232: 55-59
- Tahri-Joutei A, Pointis G (1988) Time-related effects of arginine vasopressin on steroidogenesis in cultured mouse Leydig cells. J Reprod Fertil 82: 247-254
- Tanaka Y, Carney JA, Ijiri R, Kato K, Miyake T, Nakatani Y, Misugi K (2002)

 Utility of immunostaining for S-100 protein subunits in gonadal sex cordstromal tumors, with emphasis on the large-cell calcifying Sertoli cell
 tumor of the testis. Hum Pathol 33: 285-289
- Tash JA, McCallum S, Hardy MP, Knudsen B, Schlegel PN (2002) Men with nonobstructive azoospermia have Leydig cell hypertrophy but not hyperplasia. J Urol 168: 1068-1070
- Teerds KJ, de Rooij DG, Rommerts FFG, Van Der Tweel L, Wensing GJG (1989) Turnover time of Leydig cells and other interstitial cells in testes of adult rats. Arch Androl 23: 105-111
- Toth P, Li X, Rao CV, Lincoln SR, Sanfilippo JS, Spinnato JA II, Yussman MA (1994) Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. J Clin Endocrinol Metab 79: 307-315
- Ulbright TM, Sriglev JR, Hatzianastassiou DK, Young RH (2002) Leydig tumors of the testis with unusual features: adipose differentiation, calcification with ossification, and spindle-shaped tumor cells. Am J Surg pathol 26: 1424-1433
- Vergouwen RPFA, Jacobs SGPM, Huiskamp P, Davids JAG, de Rooij DG (1991) Proliferative activity of gonocytes, Seroli cells and interstitial cells during testicular development in mice. J reprod Fertil 93: 233-243

- Verma AK, Basu D, Jayaram G (1993) Testicular cytology in azoospermia.

 Diagn Cytopathol 9: 37-42
- Widmark A, Damber JE, Bergh A (1987) Effect of oestradiol 17ß on testicular microcirculation in rats. j Endocrinol 115: 489-495
- Wrobel KH, Bickel D, Schimmel M, Kujat R (1996) Immunohistochemical demonstration of nerve growth factor receptor in bovine testis. Cell Tissue Res 285: 189-197
- Zheng WX, Butwell TJ, Heckert L, Griswold MD, Bellve AR (1990) Pleiotypic actions of the seminiferous growth factor on two testicular cell lines: comparisons with acidic and basic fibroblast growth factors. Growth Factors. 3: 73-82

8. Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. M. S. Davidoff für die Bereitstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit und für die Betreuung während der gesamten Jahre. Ihm allein verdanke ich durch seinen Lob und Tadel, durch seine Kritik und Anregungen die Fertigstellung dieser Arbeit. Seiner liebevollen, fürsorglichen, intensiven und stets geduldigen Betreuung schulde ich meinen größten Respekt und Dank. Ich danke Ihnen Herr Prof. Davidoff von ganzem Herzen.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau M. Köhler, Frau C. Knies und Frau A. Salewski für die Unterstützung und Einarbeitung in die komplexen Versuchsmethoden und für die umfangreiche Hilfe, die sie mir schenkten, bedanken.

Dem Institut Anatomie II, Experimentelle Morphologie, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. U. Schumacher danke ich für die freundliche und liebevolle Hilfe bei Problemen jeglicher Art.

Mein großer Dank gilt weiter Herrn J. Giermann. Auch wenn er nie mein Lehrer war, war er doch der Lehrer, der mich am meisten lehrte.

Meiner Mutter Frau Mounira Lüdtke-Salma und meinem Onkel Herrn Munir Salma danke ich von tiefstem Herzen für die Ermöglichung des Studiums der Humanmedizin und für die große Unterstützung und Hilfe bei allen Sorgen und Zweifeln.

Meinen Freunden Alireza Behfar, Lena Plambeck und Katrin Adler sowie meiner Schwester Zena-Laial Lüdtke möchte ich auf diesem Wege für ihre Liebe, Freundschaft, Unterstützung und Treue danken.

Nicki und Nima danke für Euer Lächeln.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ranja Lüdtke

Geburtsdaten: 23.07.1978 in Lübeck

Mutter: Mounira Lüdtke geb. Salma Vater: Dr. med. Lars-Detlef Lüdtke

Schwester: Zena-Laial Lüdtke

Schulbildung

1985-1989 Grundschule Schimmelmannstraße

1989-1994 Gymnasium Marienthal

1994-1998 Charlotte-Paulsen Gymnasium 1998 Allgemeine Hochschulreife

1999-2000 Lehranstalt für technische Assistenten in der Medizin-

Radiologie. AK St. Georg

Studium

03/00 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

03/02 Physikum

03/03 1. Staatsexamen 03/05 2. Staatsexamen 06/06 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

04/05-08/05 Innere Medizin / AK Wandsbek

08/05-10/05 Chirurgie / AK Wandsbek

10/05-12/05 Chirurgie / American University Hospital of Beirut / Lebanon

12/05-03/06 Gynäkologie / AK Altona

Weiterbildung

seit 08/06 Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und

Geburtshilfe unter der Leitung von Dr. U. Heilenkötter / Klinikum

Itzehoe

10. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.