

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller	Land
Acrylamid/ BIS	Acrylamid/ BIS 30%	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Alkohol 96%	Ethanol 96% (vergällt mit Petrolether)	Alkohol Handels Kontor	Deutschland
Alkohol 99%	Ethanol entwässert (vergällt)	Alkohol Handels Kontor	Deutschland
Ammoniumpersulfat	Ammoniumpersulfat	Sigma diagnostics	USA
anti-Kaninchen Sekundärantikörper	EnVision-HRP Kaninchen	DakoCytomation GmbH	Deutschland
anti-Maus Sekundärantikörper	EnVision-HRP Maus	DakoCytomation GmbH	Deutschland
Beschleuniger	DMP30	Serva Feinbiochemica	Deutschland
Bleizitrat	Bleizitrat	Serva Feinbiochemica	Deutschland
BSA	Albumin Fraktion V aus Rinderserum	Merck KGaA	Deutschland
Chloroform	Trichlormethan/Chloroform Rotipuran	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
DDSA	Dodecenylnbernsteinsäure	Serva Feinbiochemica	Deutschland
Diaminobenzidin	DAB Plus Substrate	DakoCytomation GmbH	Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Dioxan	1,4 Dioxan reinst	Merck KGaA	Deutschland
DMP 30	2, 4, 6- Tris (dimethylaminomethyl) phenol	Serva Feinbiochemica	Deutschland
DOC	Desoxycholat	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
DTT	1,4-Dithiothreit	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
ECL Advance	ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences	England
Eindeckmedium	Roti Histokitt	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Eisessig	Rotipuran Eisessig 100% p.a.	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Elektrophoresemarker	Prestained standard broad range	BioRad	USA
Eosin	Eosin gelblich	Merck KGaA	Deutschland
Epon	Glycidether 100	Serva Feinbiochemica	Deutschland
Formaldehyd 37%	Formaldehyd 37% zur Synthese	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Gelatine	Gelatine 7040	Merck KGaA	Deutschland
Glutaraldehyd	Glutaraldehyd 25%	Serva Feinbiochemica	Deutschland
Glyzin	Glyzin	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Hämatoxylin	Hämatoxylin	Merck KGaA	Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Kaninchen anti-Human-TGFβ1 Antikörper	TGFβ1 (V)	Santa Cruz Biotechnologies	USA
Kaninchen anti-Bovin-aFGF Antikörper	RDI-BFGFAabr	Research Diagnostics, Inc.	USA
Kaninchen anti-Human-„Von Willebrand-Faktor“ Antikörper	Polyclonal Rabbit anti-Human-„Von Willebrand-Factor“	DakoCytomation GmbH	Deutschland
Kaninchen anti-Human-TGFβ3 Antikörper	TGFβ3 (V)	Santa Cruz Biotechnologies	USA
Kaninchen-IgG	Rabbit Immunoglobulin fraction	DakoCytomation GmbH	Deutschland
Maus anti-Human-VEGF Antikörper	RDI-VEGFabm-12	Research Diagnostics, Inc.	USA

Bezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller	Land
Maus-IgG	Mouse IgG1 negative control	DakoCytomation GmbH	Deutschland
Methanol	Rotipuran Methanol	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Natriumacit	Sodiumacit	Sigma diagnostics	USA
Natriumchlorid	Natriumchlorid	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Natriumcitrat	Sodiumcitrat	Sigma diagnostics	USA
Osmiumtetroxid	Osmiumtertoxid	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Paraffin	Paraplast plus	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Perjodsäure	Perjodsäure 0,5% wässrig	Merck KGaA	Deutschland
Pikrinsäure	Pikrinsäure	Merck KGaA	Deutschland
Poly-L-Lysin	Poly-L-Lysin solution	Sigma diagnostics	USA
Propylenoxid	Propylenoxid	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Schiff'sches Reagenz	Schiff's Reagenz	Merck KGaA	Deutschland
Sodiumdodecylsulfat	Sodiumdodecylsulfat	Sigma diagnostics	USA
Toluidinblau	Toluidine blue O	Sigma diagnostics	USA
TRIS	Pufferan TRIS	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Tween 20	Tween 20 p.a.	Merck KGaA	Deutschland
Uranylacetat	Uranylacetat	Serva Feinbiochemica	Deutschland
Wasserstoffperoxid	Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Xylol	Xylol Isomere für die Histologie	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Ziege anti-Kaninchen- POD	Anti-Rabbit IgG from goat	Sigma diagnostics	USA
Ziege anti-Maus-POD	Anti-Mouse-IgG from goat	Sigma diagnostics	USA
Ziegennormalserum	Goat serum (Normal)	DakoCytomation GmbH	Deutschland
Zitronensäure	Citric acid	Sigma diagnostics	USA

4.2 Laborgeräte

Bezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller	Land
Einbettautomat	DDM-P800	Medim GmbH	Deutschland
Gießstation	Histoembedder	Leica Instruments GmbH	Deutschland
Mikrotom	2065 Supercut	Leica Instruments GmbH	Deutschland
Paraffinstreckbad	TFB 35	Mesite Medizintechnik	Deutschland
Reinstwasseranlage	Obtilab Standard	Membrapure	Deutschland
Paraffinspender	Histoembedder	Leica Instruments GmbH	Deutschland
Lichtmikroskop	Leica DMLB	Leica Microsystems GmbH	Deutschland
Mikroskopkamera	DC Viewer	Leica Instruments GmbH	Deutschland
Bilddatenbank	DHS BilddatenbankV6.0C	Dietermann und Heuser Solution GmbH	Deutschland
Elektronenmikroskop	TEM 902 A	Zeiss	Deutschland
Ultramikrotom	Ultracut S	Leica Instruments GmbH	
Trimmvorrichtung	Ultrimm	Leica Instruments GmbH	
Gelelektrophorese	Mini-Protean II	Biorad	Deutschland
Blottingapparatur	Nova Blot	Pharmacia Biotech	Schweden
Mikroliterpipetten (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl, 5000µl)	Pipetman	Gilson	Frankreich
Vortexer	Vortex Genie 2	Ika Labortechnik	Deutschland
Feinwaage	91015	Chyo Balance Corp.	Japan
Tischzentrifuge	Tischzentrifuge	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland

Bezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller	Land
Zentrifuge	GS-15R Centrifuge	Beckmann	Deutschland
Wasserbad	Water Bath SWBD	Dunn Labortechnik	Deutschland
Wärmeschrank	Kelvitron t	Heraeus Instruments	Deutschland
Magnetrührer/ Heizplatte	IKAMAG RH	Ika Labortechnik	Deutschland

4.3 Verbrauchsmaterialien:

Bezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller	Land
Blotting-Papier	Extra thick Blotting Paper	BioRad	USA
Deckgläser	Deckgläser Nr.1 18x18mm	Merck KGaA	Deutschland
Einbettkassetten	Rotilabo	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Objektträger	Marienfeld Superior	Marienfeld	Deutschland
PAP-Pen	DAKO Pen	DakoCytomation GmbH	Deutschland
Parafilm	Parafilm M	American National Can	USA
Pipettenspitzen 1-200µl	Universalspitzen 1-200µl	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Pipettenspitzen 0,5-10µl	Pipettenspitzen kurz kristall	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Pipettenspitzen 1000µl	Pipettenspitzen blau	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Pipettenspitzen 5000µl	Diamond D 5000	Gilson	Frankreich
PVDF-Membran	PVDF-Membrane 8,4x7cm	BioRad	USA
Reaktionsgefäße	Safe lock Tubes	Eppendorf	Deutschland
Silanisierte Objektträger	Superfrost Objektträger	Carl Roth GmbH und Co.	Deutschland
Röntgenfilm	Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech	England

4.4 Lösungen

4.4.1 Puffer

Bezeichnung im Text	Methode	Zusammensetzung
Antikörper-Verdünnungs-Puffer	Immunhistochemie	PBS (A) 1% Tween 20 0,1%BSA
Blockierlösung	RLF-Nachweis	PBS (A) 0,1%Tween 20 3% BSA 0,1% Natriumcit
Blockierlösung	Immunhistochemie	PBS (A) mit 5% BSA
Elektrodenpuffer	Gelelektrophorese	6,0g TRIS 28,8g Glyzin 10ml SDS (10%); ad 1000ml a. bidest. pH 8,3 einstellen
Gelpuffer A	für das Trenngel, Gelelektrophorese	1,5 M TRIS-Puffer pH 8,8
Gelpuffer B	für das Sammelgel, Gelelektrophorese	0,5 M TRIS-Puffer pH 6,8
Lämmli-Probenpuffer, 4fach konzentriert	Western Blot	1M TRIS-Puffer pH 6,8 2,5ml 10% SDS 10ml Glycerol 10ml DTT 1,93g Bromphenolblau 0,1% 3-10 Tropfen; ad 25 ml a. bidest.
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung PBS (A)	Lichtmikroskopie	Stammlösung: 160 g NaCL 29,25 g NaH ₂ PO ₄ 4,9 g K ₂ HPO ₄ ad 1000 ml a. bidest. auf pH 7,4 einstellen 50 ml Stammlösung ad 1000ml a. bidest.
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung PBS (B)	Elektronenmikroskopie	PBS nach Sörensen (pH 7,2)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)-Gelatine	Elektronenmikroskopie	0,2% Gelatine bei 40°C in PBS (B) lösen, nach dem Abkühlen 0,5% BSA zusetzen

Bezeichnung im Text	Methode	Zusammensetzung
RIPA Puffer	Western Blot	50mM TRIS Puffer pH 8,0 150mM NaCl 1% Tween 20 0,5% DOC 0,1% SDS dazu jedes mal frisch Proteinaseinhibitoren Aprotinin Neupetin Pepstatin je 1µl pro 500µl Puffer
Transfer-Puffer	Western Blot	3,03g TRIS 14,4g Glyzin 200 ml Methanol ad 1000 ml a. bidest.
TRIS Puffer	Antigendemaskierung, Immunhistochemie	10mM TRIS-Puffer pH 10
Zitratpuffer	Antigendemaskierung, Immunhistochemie	10 mM Zitratpuffer pH 6

4.4.2 Fixierlösungen

Bezeichnung im Text	Methode	Zusammensetzung
Bouin'sche Lösung	Lichtmikroskopie	15 ml gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung 5ml Formaldehyd 1ml Eisessig
Glutaraldehyd-Formaldehyd-Gemisch nach Karnovsky	Elektronenmikroskopie	25 ml Paraformaldehydlösung 8% 10 ml Glutaraldehyd 25% 15 ml PBS (A) Vor Gebrauch 1:2 mit PBS (A) verdünnen

4.4.3 Einbettmedium für die Elektronenmikroskopie

Epon A	62ml Glycidäther 100 100ml Dodecylbernsteinsäureanhydrid (DDSA)	Epon A und Epon B mischen (Verhältnis 2:3),
Epon B	100ml Glycidäther 100 89ml Methyladicanhydrid	2% Beschleuniger (DMP 30) hinzufügen

4.4.4 Lösungen für die histologischen Färbungen

Bezeichnung im Text	Zusammensetzung
Eosin	0,1% Eosin gelblich in a. bidest. Wenige Tropfen Eisessig bis zum Farbumschlag hinzufügen
Hämalaun	Saures Hämalaun nach Mayer
Toluidinblau	1% Toluidinblau in a. bidest.

4.5 Tiere

Alle Proben stammten von adulten Rehböcken der IZW-Feldforschungsstation Niederfinow. Die Böcke wurden 2 - 4 Monate vor der Probennahme in Einzelgehege verbracht. Diese Gehege verfügten über eine Grundfläche von 45 m², einen Liege- und einen Futterplatz. Die Fütterung erfolgte in der Vegetationsperiode mit Kälberpellets ad libitum und 800 g Luzerne. Außerhalb der Vegetationsperiode wurden Kälberpellets und Heu ad libitum angeboten. Wasser war ebenfalls ad libitum vorhanden.

4.6 Probengewinnung

Um Untersuchungen zur Saisonalität der Spermatogenese des Rehbockes durchführen zu können, war es notwendig, Proben des Testisparenchyms über den gesamten Jahresverlauf zu gewinnen und histologisch und ultrahistologisch aufzuarbeiten. Über den Zeitraum eines Jahres wurden jeden 2. Monat 3 Rehböcke kastriert (Stichprobenanzahl $n = 6 \times 3 = 18$). So wurden Proben gesammelt aus den Monaten Dezember (Ruhephase), Februar (Vorbereitungsphase), April (proliferative Phase), Juni (aktive Spermatogenese), August (späte Brunftphase) und Oktober (Involutionsphase).

4.6.1 Präparation der Hoden

Zunächst wurden das Peritoneum und die Bänder von der Hodenkapsel entfernt. Der Hoden wurde mit einer Rasierklinge sagittal in 2 Hälften geschnitten und das Rete testis vorsichtig entfernt. Mit der Rasierklinge wurden aus verschiedenen Bereichen des Hodens Parenchymblöcke von maximal 0,5 cm Seitenlänge herauspräpariert und in Bouin'scher Lösung fixiert. Die Proben für die Elektronenmikroskopie wurden zunächst 5 min in Glutaraldehyd-Formaldehyd-Gemisch nach Karnovsky vorfixiert und danach in Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 1 mm geschnitten und weiter fixiert. Mehrere Parenchymstücke, u.a. für die Western Blots zur Antikörper-Charakterisierung, wurden bei -80°C gelagert oder sofort in flüssigen Stickstoff überführt.

4.7 Histologische Aufarbeitung

4.7.1 Lichtmikroskopie

Die Parenchymblöcke wurden über Nacht im Kühlschrank fixiert, in Einbettkassetten gelegt und in 70%igen Alkohol verbracht. Die weitere Einbettung erfolgte mittels eines Einbettautomaten mit Tauchprinzip nach folgendem Programm:

- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (2 x 70%, 2 x 96%, 2 x 99%; je erst 2, dann 1,5 h)
- Chloroform als Intermedium (drei frische Bäder; 1 x 2 h, 2 x 3 h Einwirkungszeit)
- Durchtränken mit Paraffin (3 Behälter; Einwirkungszeit je Bad: 3 h, 2 h, 1 h)

Danach wurden die Proben in einen Paraffinspender überführt und auf die Einbettkassetten aufgeblickt.

Die kalten Blöcke (mindestens 3 h bei -15°C gekühlt) wurden mit einem Mikrotom in Schichtdicken von 2 μm geschnitten. Nach dem Strecken der Schnitte im Wasserbad wurden sie je nach Verwendungszweck auf verschiedene Objektträger gezogen. Für die Immunhistochemie wurden silanierte Objektträger verwendet, um ein Abschwimmen des Gewebes, z.B. während des Kochvorganges zur Antigendemaskierung, zu verhindern. Diese mussten dann auch zur langfristigen Lagerung nach dem Trocknen der Schnitte (ca. 1 h bei 37°C) bei -80°C aufbewahrt werden, da nach längerer Lagerung bei Raumtemperatur die Färbbarkeit in einigen immunhistochemischen Nachweisverfahren deutlich nachließ. Für andere histologische Färbungen wurden die Schnitte auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger gebracht.

4.7.1.1 Histologische Färbungen

Von den Präparaten wurden Hämalaun / Eosin- und PAS / Hämalaun-Färbungen nach den folgenden Protokollen angefertigt:

Xylol	2x	5 min
Alkohol 99%	2x	3 min
Alkohol 96%		3 min
Alkohol 80%		3 min
Alkohol 70 %		3 min
Alkohol 50%		3 min
Waschen aqua bidest.	2x	3 min
Hämalaun nach Mayer		5 min
Bläuen Leitungswasser (fließend)		10 min
Eosin		10 min
Waschen Leitungswasser		1 min
Differenzieren in Alkohol 80%		
Alkohol 96%		2 min
Alkohol 99%	2x	2 min
Xylol	2x	5 min
Eindecken		

Protokoll 1: Hämalaun / Eosin-Färbung
(nach Romeis)

Xylol	2x	5 min
Alkohol 99%	2x	3 min
Alkohol 96%		3 min
Alkohol 80%		3 min
Alkohol 70%		3 min
Alkohol 50%		3 min
Waschen aqua bidest.	2x	3 min
Perjodsäure		5 min
Waschen Leitungswasser		3 min
Spülen in aqua bidest.		
Schiff'sches Reagenz		30 min
Waschen Leitungswasser		3 min
Spülen in aqua bidest.		
Hämalaun nach Mayer		5 min
Bläuen Leitungswasser (fließend)		3 min
Spülen in aqua bidest.		
Alkohol 70%		1 min
Alkohol 80%		1 min
Alkohol 96%		1 min
Alkohol 99%	2x	1 min
Xylol	2x	5 min
Eindecken		

Protokoll 2: PAS / Hämalaun-Färbung
(nach Hersteller, modifiziert)

4.7.2 Elektronenmikroskopie

Die Aufarbeitung der Proben für die Elektronenmikroskopie wurde wie folgt vorgenommen:

Fixation:	Lösung nach Karnovsky	12 h	4°C
Spülen:	PBS	3x	5 min
Nachfixation:	Osmiumtetroxid	1,5 h	4°C
Dehydrieren:	aufsteigende Alkoholreihe		
	30%		15 min
	50%		30 min
	70%	2x	15 min
	96%	2x	15 min
	99%	3x	20 min
Intermedium:	Propylenoxid	2x	7,5 min
Infiltration:	Propylenoxid-Epon (1:2)		45 min
	Epon		1 h

Protokoll 3: Aufarbeitung der Proben für die Elektronenmikroskopie

Die durchtränkten Proben wurden in Kautschukformen gesetzt und blasenfrei mit Epon umgossen. Die Polymerisation erfolgte bei 60°C, 12 h.

4.7.2.1 Trimmen und Schneiden

Zunächst wurden die Blöcke mit einer Trimmvorrichtung angeschnitten, danach mit einem Ultramikrotom Semidünnschnitte (0,9 µm) angefertigt, diese auf Objektträger gezogen und durch Auftropfen von Toluidinblau eingefärbt. Der Farbstoff wurde mit a. bidest. abgespült, anschließend erfolgte das Eindecken mit Glyzeringelatine. Nun wurden die für die Untersuchung interessanten Bereiche des Schnittes skizziert. Anhand dieser Skizzen konnte der Block durch erneutes Trimmen auf die relevanten Bereiche reduziert werden. Daraufhin wurden Ultradünnschnitte (9 nm) angefertigt und auf Kupfernetzen positioniert, diese Schnitte mit Uranylacetat (5 min) und Bleizitrat nach Reynolds kontrastiert und in einer Transmissionselektronenmikroskopeinheit (TEM 902 A) betrachtet und fotografiert.

4.8 Bestimmung der Spermatogenesestadien

Die Spermatogenese ist beim Rehbock nur kurz vor der Brunft in vollem Umfang aktiv, weshalb die Stadienbestimmung an Schnitten der im Juni kastrierten Tiere vorgenommen wurde. Einteilungskriterien waren die Entwicklung und Lokalisation der Spermatozyten und die damit verbundenen Zelloassoziationen, die es bei vielen Tierarten möglich machen, vergleichbare 8-Stadien-Schemata zu erhalten.

Einteilungskriterien:

Stadium	Anzahl Spermatozyten- generationen	Lokalisation elongierte Spermatozyten	Entwicklung der runden Spermatozyten
I	2	basal, Mitte	Neue runde Spermatozytengeneration erscheint.
II	2	Mitte	Akrosomales Vesikel wird sichtbar.
III	2	Mitte, luminal	Akrosomales Vesikel liegt dem Kern an und stülpt sich langsam darüber.
IV	2	Saum am Lumen	Spermiation; der Kern der runden Spermatozyten ist vom Akrosom fast zur Hälfte bedeckt.
V	1	-	Postspermiation; der Kern ist über die Hälfte mit dem Akrosom bedeckt.
VI	1	-	Die Spermatozyten drehen sich in Richtung Basalmembran und elongieren.
VII	1	basal	Spermatozyten sind elongiert.
VIII	1	basal	Meiosestadium; sekundäre Spermatozyten und/oder neue runde Spermatozyten im Tubulus.

In mehreren PAS-gefärbten Gewebeschnitten aller 3 Tiere des Monats Juni wurden runde Anschnitte der Tubuli seminiferi ausgewählt und entsprechend der oben beschriebenen Einteilungskriterien beurteilt. Die Zellassoziation der Stadien wurde dann anhand der Chromatinstruktur bestimmt, skizziert und die einzelnen Zelltypen zur besseren Anschaulichkeit bei 4000facher Vergrößerung mit dem Transelektronenmikroskop aufgenommen. Die bildlichen Darstellungen der Zellkerne wurden zu einer schematischen Tabelle zusammengestellt. Die Stadien wurden auch in Toluidinblau gefärbten Semidünnschnittpräparaten bestimmt und dokumentiert.

4.9 Morphometrie

4.9.1 Bestimmung der Durchmesser der Tubuli seminiferi

In Gewebeschnitten aus unterschiedlichen Hodenbereichen wurden pro Tier 20 annähernd kreisförmige Tubulusanschnitte ausgewählt und mit der Mikroskopkamera bei 200facher Vergrößerung aufgenommen, mittels computergestützter Bildanalyse zweimal diagonal ausgemessen und der Mittelwert der Messungen errechnet.

4.9.2 Bestimmung der Gewebezusammensetzung

Zunächst wurde nach Aufnahme mit der Mikroskopkamera die Fläche eines 400fach vergrößerten Bildausschnittes mit der Bildanalyse vermessen. Dieser Bildausschnitt entsprach dem rechteckigen mittleren Teil des im Mikroskop sichtbaren runden Gesichtsfeldes. Dieser auf dem Bildschirm abgebildete Bereich wird im Folgenden synonym mit dem Begriff „Gesichtfeld“ (GF), dem 400fach vergrößerten mikroskopischen Ausschnitt, verwendet.

Pro Tier wurden von 5 PAS-gefärbten Gewebeschnitten aus unterschiedlichen Bereichen des Hodens Bilderserien angefertigt. In angrenzenden Gesichtsfeldern wurden die breitesten Stellen der Schnitte durchmikroskopiert und so pro Tier 35 - 65 GF aufgenommen.

Mit Hilfe der Bildanalyse konnte die Fläche des tubulären Kompartimentes bestimmt werden, indem auf dem Bildschirm alle Tubulusanschnitte markiert wurden. Die Fläche des interstitiellen Kompartimentes konnte man durch Subtraktion der Tubulusfläche von der Gesamtfläche des GF ermitteln.

4.9.3 Zellzählung zur Bestimmung der zellulären Komposition der Tubuli seminiferi

Es wurden pro Tier wiederum 20 kreisrunde, quer angeschnittene Tubuli ausgewählt und deren Gehalt an Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatischen und Sertolizellen ausgezählt. Um die so erhaltenen Zahlen (Zellanzahl pro Tubulusquerschnitt) wegen der großen Veränderungen der Tubulusdurchmesser im Jahresverlauf auf eine Fläche von 1 mm² zu normieren und so auch die Zelldichten (Zellanzahl pro Flächeneinheit) der einzelnen Zelltypen zu erfassen, wurden die monatlichen Mittelwerte (aus den jeweils 20 Zählungen) der einzelnen Tiere mit der Anzahl der Tubuli pro mm² Hodenschnittfläche multipliziert. Die Anzahl der Tubuli pro mm² Hodenschnittfläche errechnete sich nach folgender Formel:

$$n / \text{mm}^2 = k_{\text{tub}} / F_{\text{Tub}}$$

k_{tub} = mittlerer Flächenanteil des tubulären Kompartiments der drei Tiere eines Probenmonats (von gesamt = 1)

F_{Tub} = mittlere Fläche eines Tubulus für diesen Monat (in mm²)

4.9.3.1 Mathematisches Modell für die Auswirkungen geometrischer Veränderungen auf die Sertolizellanzahl

Wie sich allein die saisonalen Veränderungen der Tubulusflächen auf die Zelldichte einer konstanten Sertolizellpopulation auswirken, wurde wie folgt berechnet:

Annahme:

- Gesamtanzahl Sertolizellen pro Testis konstant

Bekannt:

- Anzahl der Tubuli seminiferi konstant
- Fläche der Tubuli seminiferi variabel
- Zelldichte (Anzahl Sertolizellen pro mm²) ändert sich umgekehrt proportional der Flächenausdehnung der Tubuli seminiferi

Daraus ergibt sich folgendes Verhältnis von Sertolizellanzahl pro mm² und Tubulusfläche für zwei verschiedene Monate:

$$Z_{S1} / Z_{S2} = F_{\text{Tub}2} / F_{\text{Tub}1}$$

Z_S = Anzahl Sertolizellen pro mm²

F_{Tub} = mittlere Fläche eines Tubulus (ermittelt für diesen Monat)

1 = Ausgangsmonat, 2 = zu berechnender Monat

Dies erlaubt die Berechnung der hypothetischen (theoretischen) Sertolizellanzahl für einen bestimmten Zeitpunkt bei Kenntnis der Sertolizellanzahl und der Tubulusfläche eines anderen Zeitpunktes:

$$Z_{S2} = Z_{S1} F_{Tub1} / F_{Tub2}$$

Die morphometrisch erhobenen Werte (Fläche der Tubuli seminiferi und Zahl der Sertolizellen) jedes Probenmonats wurden je einmal als Ausgangswert genommen. Aus ihnen konnten die Sertolizellanzahlen der jeweils anderen 5 Monate berechnet und aus den resultierenden 6 Werten je Probenmonat ein Mittelwert +/- SEM ermittelt werden.

4.10 Western Blot zur Spezifitätskontrolle der Antikörper für die Immunhistochemie

4.10.1 Proteinisolierung aus dem Gewebe

Je 0,5 g Hodengewebe eines Rehbockes oder 0,5 g Hodengewebe eines Bullen aus dem Monat August wurde in flüssigem Stickstoff (-196°C) zermörsert, in RIPA Puffer aufgenommen und 30 min auf Eis lysiert. Die Lysate wurde 15 min bei 4°C und 12480 G zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nochmals zentrifugiert. Der Proteingehalt dieses Überstandes betrug in beiden Fällen etwa 30 mg/ml (Proteinbestimmung nach Smith et al. 1985).

4.10.2 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Von der so gewonnenen Probe wurden 2 µl in eine SDS-PAGE Gelelektrophorese nach Lämmli (Laemmli 1970) eingesetzt (Sammegel 4% SDS, Trenngel 15% SDS). Als Standard diente ein „prestained SDS-PAGE standard, broad range“ der Firma Biorad.

4.10.3 Western Blot und Immunodetektion

Für die Überführung der Proteine auf eine PVDF Membran kam eine „semi-dry blotting“ Apparatur zum Einsatz. Der Blot sowie die anschließende Immunodetektion der verschiedenen Wachstumsfaktoren wurde nach folgendem Protokoll ausgeführt:

PVDF-Membran in 100% Methanol		einige Sekunden
Transfer-Puffer		3 Minuten
Blotten (2 mA/cm ²)		1 h 15 min
aqua bidest.	3x	5 min
Blockierlösung (ECL-Advance)		über Nacht, 4°C
PBS-T	3x	5 min
Primärantikörper in Blockierlösung		
• Kaninchen anti-Human-TGFβ ₁ :	0,2 µg/ml	1 h, RT
• Kaninchen anti-Human-TGFβ ₃ :	0,2 µg/ml	1 h, RT
• Maus anti-Human-VEGF:	0,02 µg/ml	5 h, 4°C
• Kaninchen anti-Bovin-aFGF	0,1 µg/ml	5 h, 4°C
PBS-T	3x	15 min
Sekundärantikörper in Blockierlösung		
• Ziege anti-Kaninchen- POD 1:50.000		1 h, RT
• Ziege anti-Maus-POD 1:100.000		1 h, RT
PBS-T	3x	15 min
Detektion mit ECL Advance		

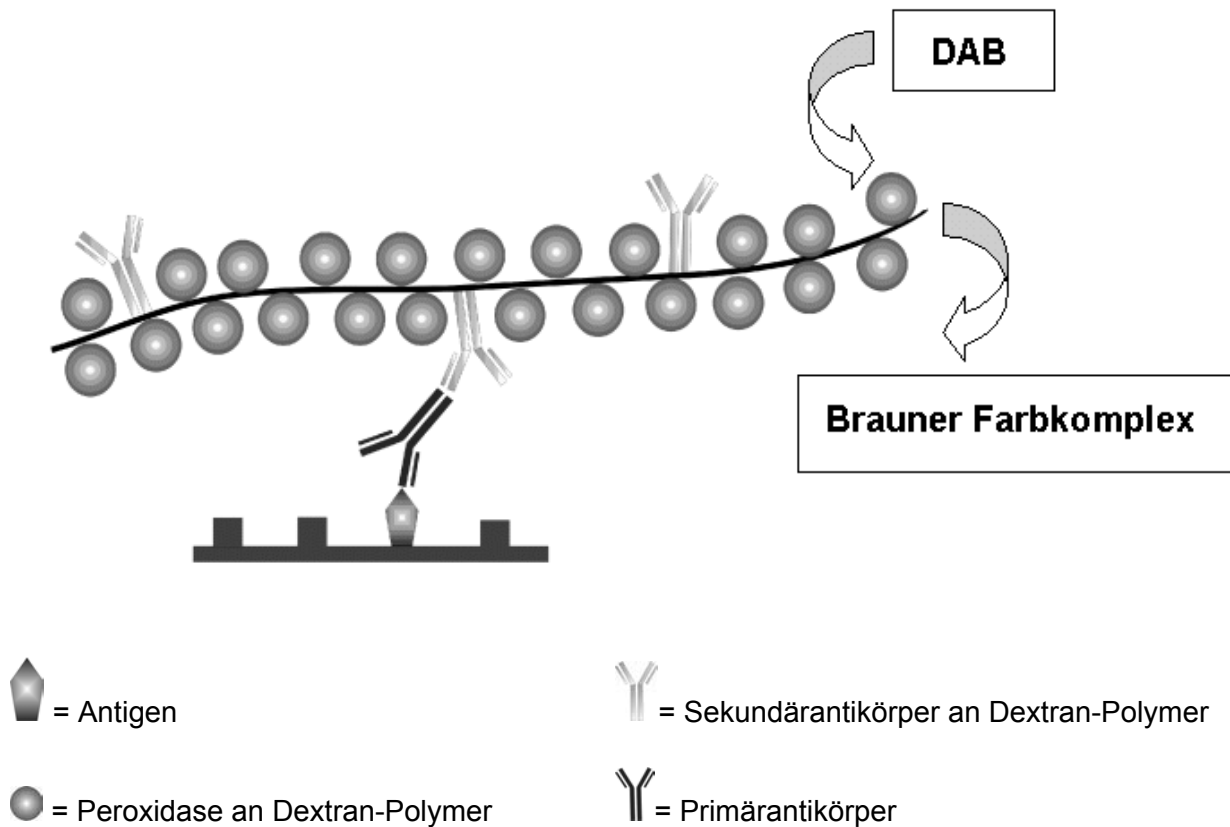
Protokoll 4: Western Blot und Immunodetektion der Wachstumsfaktoren TGFβ₁, TGFβ₃, VEGF, aFGF

4.11 Immunhistochemie

In allen durchgeführten Nachweisen (außer RLF, s.u.) kamen käuflich erworbene Antikörper zum Einsatz. Es wurde mit einem 2-Schritt-Detektionssystem gearbeitet, das sehr sensitiv auch kleine Antigenmengen nachweist. Als Primärantikörper diente der, jeweils gegen das zu detektierende Antigen gerichtete, Antikörper aus dem Kaninchen oder der Maus. Es wurden ausschließlich polyklonale Antikörper verwendet. Zur Markierung der gebundenen Primärantikörper fanden Polymere Verwendung, die Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus- oder Kaninchen-IgG) und Enzymmoleküle tragen. Im Detektionsschritt setzten diese Enzymmoleküle (Meerrettich-Peroxidase) das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem braunen Endprodukt um, das in organischen Lösungsmitteln unlöslich ist.

Abbildung 4 stellt schematisch den Vorgang der Antigen-detektion dar.

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Antigendetektion



4.11.1 Markierung der Leydigzellen mittels Immunhistochemie gegen den „relaxin-like factor“ (RLF)

Die immunhistochemische Markierung des RLF in Paraffinschnitten wurde von Dr. Sabine Hombach-Klonisch und Dr. Thomas Klonisch an der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg durchgeführt. Hierfür setzten sie einen von ihnen selbst hergestellten polyklonalen Antikörper gegen caprines RLF ein.

Als Primärantikörper wurde das unaufgereinigte Kaninchenantiserum in einer Verdünnung von 1:800 in Blockierlösung verwendet. Der Sekundärantikörper war in diesem Fall nicht an ein Polymer gekoppelt, sondern POD-markiertes Ziege anti-Kaninchen-IgG in einer Verdünnung von 1:500 in Blockierlösung. Das Protokoll entspricht weitgehend dem der anderen Wachstumsfaktor-Nachweise (Protokoll 6, Seite 47). Es wurde keine Antigendemaskierung durchgeführt. Die Blockierung erfolgte mit 10% Ziegennormalserum in Blockierlösung.

4.11.1.1 Bestimmung der interstitiellen Gesamtzellanzahl und der Leydigzellanzahl

In den immunhistochemisch gegen den RLF markierten Schnitten wurden bei 400facher Vergrößerung 10 Gesichtsfelder pro Tier zufällig ausgewählt. In diesen Gesichtsfeldern wurde die Fläche des interstitiellen Kompartimentes ermittelt und in dieser Fläche sowohl die Gesamtzellzahl bestimmt als auch die Anzahl der RLF-positiven Leydigzellen ausgezählt. Die so ermittelten Zahlen wurden auf eine Interstitiumsfläche von einheitlich 1 mm^2 / Tier normiert.

4.11.1.2 Mathematisches Modell für die Auswirkungen geometrischer Veränderungen auf die Anzahl interstitieller Zellen

Es wurde – in Analogie zu den Sertolizellen – berechnet, wie sich allein die Veränderungen von Tubulusdurchmesser bzw. -flächenausdehnung auf die Anzahl der interstitiellen Zellen pro mm^2 Interstitiumsfläche auswirken. Dazu muss zunächst wiederum von einer konstanten Anzahl interstitieller Zellen ausgegangen werden. Für die Berechnung muss allerdings ein wichtiger Unterschied zwischen den somatischen Zellen beider Kompartimente berücksichtigt werden: Sertolizellen können direkt auf die messbaren Einzel- und Gesamttubulusquerschnittsflächen bezogen werden und hängen nicht von der Ausdehnung des zweiten, interstitiellen Kompartimentes ab. Im Gegensatz dazu ist das Interstitium ein zusammenhängendes Kompartiment, dass sich im Schnittpräparat auch nur als Gesamtfläche unterschiedlicher Ausdehnung erfassen lässt und von der Ausdehnung des tubulären Kompartimentes abhängt.

Nach folgender Formel (Streich, unveröffentlicht) wurde berechnet, wie sich allein die Veränderungen der Tubulusdurchmesser sowie der Gewebeanteile auf die Zelldichte einer konstanten interstitiellen Zellpopulation auswirken.

Annahme:

- Zellanzahl im Interstitium konstant

Bekannt:

- Anzahl der Zellen pro Flächeneinheit ändert sich umgekehrt proportional zur Flächenausdehnung des Gewebes
- Zahl der Tubuli konstant, Fläche der Tubuli variabel
- Querschnittsfläche gesamt des Hodens variabel

Wenn gilt: $F_{In1} / F_{In2} = Z_{In2} / Z_{In1}$ dann ist: $Z_{In2} = Z_{In1} F_{In1} / F_{In2}$

F_{In1} / F_{In2} errechnet sich wie folgt*:

$$F_{In1} / F_{In2} = k_{In1} (1 - k_{In2}) r_1^2 / k_{In2} (1 - k_{In1}) r_2^2$$

*Die Ableitung der Formel (Streich, unveröffentlicht) zeigt Tabelle 2

$F = F_{In} + n F_{Tub}$	
$F_1 = F_{In1} + n F_{Tub1}$	$F_2 = F_{In2} + n F_{Tub2}$
$F_{In1} = k_{In1} F_1; F_1 = F_{In1} / k_{In1}$	$F_{In2} = k_{In2} F_2; F_2 = F_{In2} / k_{In2}$
$F_{In1} / k_{In1} = F_{In1} + n F_{Tub1};$	$F_{In2} / k_{In2} = F_{In2} + n F_{Tub2}$
$F_{In1} = k_{In1} F_{In1} + k_{In1} n F_{Tub1};$	$F_{In2} = k_{In2} F_{In2} + k_{In2} n F_{Tub2}$
$F_{In1} - k_{In1} F_{In1} = k_{In1} n F_{Tub1}$	$F_{In2} - k_{In2} F_{In2} = k_{In2} n F_{Tub2}$
$F_{In1} (1 - k_{In1}) = k_{In1} n F_{Tub1}$	$F_{In2} (1 - k_{In2}) = k_{In2} n F_{Tub2}$
$F_{In1} = (k_{In1} n F_{Tub1}) / (1 - k_{In1})$	$F_{In2} = (k_{In2} n F_{Tub2}) / (1 - k_{In2})$
$F_{In1} / F_{In2} = [k_{In1} (1 - k_{In2}) n F_{Tub1}] / [(1 - k_{In1}) k_{In2} n F_{Tub2}]$	
$F_{In1} / F_{In2} = k_{In1} (1 - k_{In2}) F_{Tub1} / (1 - k_{In1}) k_{In2} F_{Tub2}$	
$= k_{In1} (1 - k_{In2}) \pi r_1^2 / (1 - k_{In1}) k_{In2} \pi r_2^2$	
Abkürzungen:	
F = Hodenfläche gesamt	
F_{In} = Interstitiumsfläche ($F - k_{Tub} F_{Tub}$)	
n = Anzahl der Tubuli	
F_{Tub} = Tubulusfläche (πr^2)	
k_{Tub} = mittlerer Flächenanteil F_{Tub} der drei Tiere des Probenmonats (von Gesamt = 1)	
k_{In} = mittlerer Flächenanteil F_{In} der drei Tiere des Probenmonats (von Gesamt = 1)	
r = mittlerer Radius der Tubuli seminiferi der drei Tiere des Probenmonats	
Z_{In} = Interstitielle Zellanzahl pro Flächeneinheit	
1 = Ausgangsmonat, 2 = zu berechnender Monat	

Tabelle 2: Ableitung der Formel für die Auswirkungen der Veränderungen der Tubulusdurchmesser sowie der Gewebeanteile auf die Zelldichte einer konstanten interstitiellen Zellpopulation

Die morphometrisch erhobenen Werte (der Radius der Tubuli seminiferi, der mittlere Anteil der Interstitiumsfläche sowie die Anzahl der interstitiellen Zellen / mm^2) jedes Probenmonats wurden je einmal als Ausgangswert angenommen und in die oben stehende Formel eingesetzt. So wurden die Werte der anderen 5 Monate berechnet und aus diesen 6 Werten je Probenmonat Mittelwerte +/- SEM ermittelt.

4.11.2 Immunhistochemische Markierung der Gefäßendothelien

Da nicht alle Blutgefäße (vor allem Kapillaren) sicher in PAS gefärbten Gewebeschnitten erkannt werden konnten, wurde eine immunhistochemische Markierung der Endothelzellen durchgeführt. Hierzu wurden polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen den menschlichen „Von-Willebrand-Faktor“ verwendet und von jedem Tier erneut 5 Gewebeschnitte aus unterschiedlichen Hodenbereichen nach folgendem Protokoll gefärbt:

Xylol	2x	15 min
Alkohol 99%	2x	5 min
Alkohol 96%		5 min
Alkohol 80%		5 min
Alkohol 70%		5 min
Alkohol 50%		5 min
Waschen in aqua bidest.	2x	5 min
Waschen in PBS	3x	10 min
H ₂ O ₂ -Methanol (3%)	2x	15 min
Waschen in PBS	3x	10 min
Blockieren mit 5% BSA, 5% Ziegennormalserum in PBS		1 h
Blockierlösung abnehmen		
Kaninchen anti-Human-„Von-Willebrand-Faktor“ 2µg / ml		30 min, RT
Spülen mit PBS-T (0,1%), Spritzflasche		
Waschen in PBS-T (0,1%)	2x	15 min
Waschen mit PBS		15 min
Sekundäntikörper anti-Kaninchen		30 min, RT
Spülen mit PBS-T (0,1%), Spritzflasche		
Waschen mit PBS-T (0,1%)	2x	15 min
Waschen mit PBS		15 min
Detektion mit DAB		unter Sichtkontrolle
Spülen mit PBS, Spritzflasche		
Waschen mit PBS	2x	10 min
Waschen in aqua bidest.		5 min
Gegenfärben mit Hämalaun nach Mayer		10 s
Bläuen in Leitungswasser fließend		5 min
Waschen in aqua bidest	2x	5 min
Alkohol 50%		1 min
Alkohol 70%		1 min
Alkohol 80%		1 min
Alkohol 96%		1 min
Alkohol 99%	2x	1 min
Xylol	2x	5 min
Eindecken		

Protokoll 5: Immunhistochemische Detektion des „Von-Willebrand-Faktors“ im Hodengewebe des Rehbockes

Von den so gefärbten 5 Gewebeschnitten aus unterschiedlichen Hodenarealen wurden mit 400facher Vergrößerung Bilderserien angefertigt, die in angrenzenden Gesichtsfeldern durch die breiteste Stelle der Schnitte führten. In den so aufgenommenen Gesichtsfeldern (30-60 pro Tier) konnte Fläche und Anzahl der Gefäße (Arteriolen, Kapillaren, Venolen) bestimmt werden. Hierbei wurde die Fläche der Gefäße durch Markierung der Zellgrenzen mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse gemessen.

Darüber hinaus wurde – analog zu Sertoli- und interstitiellen Zellen - berechnet, wie sich allein die saisonalen Veränderungen von Tubulusdurchmesser bzw. -flächenausdehnung auf die Anzahl der Kapillaranschnitte pro mm^2 Interstitiumsfläche auswirken. Dazu muss zunächst wiederum von einer konstanten Anzahl Kapillaranschnitte ausgegangen werden. Es wurde die Ableitung für die interstitiellen Zellen verwendet (siehe 4.11.1.2, Seite 43-44). Anstelle der Anzahl interstitieller Zellen pro mm^2 ist die Zahl der Kapillaranschnitte pro mm^2 einzusetzen.

4.11.3 Nachweis der Wachstumsfaktoren

Für alle Nachweise von Wachstumsfaktoren wurden die Gewebeschnitte bei -80°C gelagert, da ihre Anfärbbarkeit nach längerer Lagerung bei Raumtemperatur deutlich nachließ. Auf jedem Objektträger wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, wobei der erste Antikörper durch die gleiche Konzentration Maus- bzw. Kaninchen-IgG ersetzt wurde. Zum besseren Entparaffinieren wurden die Schnitte vor der Färbung für mindestens eine Stunde im Wärmeschrank bei 60°C angeschmolzen.

Das Protokoll auf Seite 47 zeigt die Methode des immunhistochemischen Nachweises von TGF β 1, TGF β 3, VEGF und aFGF.

Xylol	2x	15 min
Alkohol 99%	2x	5 min
Alkohol 96%		5 min
Alkohol 80%		5 min
Alkohol 70%		5 min
Alkohol 50%		5 min
Waschen in aqua bidest. (2x)		5 min
Antigendemaskierung		
• Kochen Citratpuffer pH 6 (TGFβ1, aFGF)		2 min
• Kochen TRIS-HCL pH 10 (VEGF)		10 min
• Keine Antigendemaskierung (TGFβ3)		
Abkühlen		20 min
Waschen in PBS	3x	10 min
H ₂ O ₂ -Methanol (3%)	2x	15 min
Waschen in PBS	3x	10 min
Blockieren mit 5% BSA in PBS		1 h, 37°C
Blockierlösung absaugen (Filterpapier)		
Primärantikörper		über Nacht, 4°C
• Rabbit anti-Human-TGFβ1 0,1µg / ml		↓
• Rabbit anti-Human-TGFβ3 1 µg / ml		
• Mouse anti-Human-VEGF 0,5 µg / ml		
• Rabbit anti-Bovine-aFGF 2 µg / ml		
Spülen mit PBS-T (0,1%), Spritzflasche		
Waschen in PBS-T (0,1%)	2x	10 min
Waschen mit PBS		10 min
Sekundärantikörper anti-Kaninchen/ anti-Maus		30 min, RT
Spülen mit PBS-T (0,1%), Spritzflasche		
Waschen in PBS-T (0,1%)	2x	10 min
Waschen mit PBS		10 min
Detektion mit DAB		unter Sichtkontrolle
Spülen mit PBS-T, Spritzflasche		
Waschen mit PBS	2x	10 min
Waschen in aqua bidest.		5 min
Gegenfärben mit Hämatoxylin nach Mayer		10 s
Bläuen in Leitungswasser fließend		5 min
Waschen in aqua bidest		5 min
Alkohol 50%		1 min
Alkohol 70%		1 min
Alkohol 80%		1 min
Alkohol 96%		1 min
Alkohol 99%	2x	1 min
Xylol	2x	5 min
Eindecken		

Protokoll 6: Immunhistochemische Detektion der Wachstumsfaktoren TGFβ1, TGFβ3, aFGF und VEGF

4.12 Statistische Analyse

Die histomorphometrischen Daten wurden wie folgt statistisch ausgewertet:

- **Durchmesser der Tubuli seminiferi:** Mittelwerte der 20 Zählungen pro Tier und Monat, Standardfehler des Mittelwertes
- **Gewebezusammensetzung:** Mittelwert der Messungen der 3 Tiere pro Monat, Standardfehler des Mittelwertes
- **Anzahl der verschiedenen tubulären Zelltypen pro Tubulusquerschnitt:** Mittelwerte der 20 Zählungen pro Tier und Monat, Standardfehler des Mittelwertes.
- **Anzahl der verschiedenen tubulären Zelltypen pro mm^2 Tubulusfläche:** Mittelwerte der auf 1mm^2 Tubulusfläche normierten Anzahlen tubulärer Zelltypen der 3 Tiere eines Monats
- **Auswirkung der geometrischen Veränderungen auf die Anzahl der Sertolizellen / mm^2 Tubulusfläche:** Mittelwerte der je 6 berechneten Sertolizellanzahlen eines Monats, Standardfehler des Mittelwertes
- **Anzahl der interstitiellen Zellen und der Kapillaranschnitte pro mm^2 Interstitiumsfläche, Anteil Blutgefäße an der Gesamtinterstitiumsfläche:** Mittelwerte der Messungen der 3 Tiere eines Monats, Standardfehler des Mittelwertes
- **Auswirkung der geometrischen Veränderungen auf die Anzahl der interstitiellen Zellen und der Kapillaranschnitte / mm^2 Interstitiumsfläche:** Mittelwerte der je 6 berechneten Anzahlen eines Monats, Standardfehler des Mittelwertes