

**Immunhistochemische Detektion von Komponenten des
Gewebs-Kallikrein-Kinin-Systems
in Testis und Epididymis verschiedener Spezies**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Catia M. Loddo
aus Brilon

Gießen, 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter:
Prof. Dr. Dr. med. habil. W.-B. Schill

Gutachter: PD Dr. rer. nat. T. K. Monsees, Dresden

Gutachter: Prof. Dr. rer. physiol. A. Meinhardt

Tag der Disputation: 22.01.2007

Publikationsliste

Folgende Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Monsees TK, Blöcher S, Loddo C, Steger K , Schill WB. Tissue kallikrein and bradykinin B₂-receptors in the reproductive tract of the male rat. *Andrologia* 2003; 35, pp. 24-31

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Einleitung	13
1.1 Einführung in die Andrologie.....	13
1.2 Anatomie und Physiologie des Testis.....	15
1.2.1 Hormonelle Steuerung der Hodenfunktion	17
1.2.2 Spermatogenese.....	18
1.2.3 Stadien der Spermatogenese.....	22
1.3 Anatomie und Physiologie des Epididymis.....	24
1.4 Kallikrein-Kinin-System	27
1.4.1 Komponenten des Gewebs-Kallikrein-Kinin-Systems	27
1.4.2 Kininogene	31
1.4.3 Gewebs-Kallikrein	32
1.4.4 Kinine	33
1.4.5 Rezeptoren.....	34
1.4.6 Kininabbauende Enzyme.....	36
1.4.7 Lokalisation und Wirkung des Kallikreins auf den männlichen Reproduktionstrakt	38
1.4.8 Kallikrein als Medikament?	42
1.5 Ziele dieser Dissertation	45
1.6 Angewandte Methode: Immunhistochemie.....	46
2 Material und Methoden	48
2.1 Material.....	48
2.1.1 Chemikalien	48
2.1.2 Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper, Antigene, Normalseren	49
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	50
2.1.4 Geräte	51
2.1.5 Medien und Pufferlösungen	52
2.1.6 Humanes Gewebe und Versuchstiere.....	54
2.2 Dot Blot Test	55
2.2.1 Antikörper-Wiedererkennungstest	56
2.2.2 Nativer-Antigen-Wiedererkennungstest.....	58
2.3 Methoden	59
2.3.1 Fixation und Einbettung des Gewebes	59
2.3.2 Schneiden am Mikrotom	60
2.3.3 Immunhistochemische Färbung am Beispiel der PAP-Methode	60

2.3.4	Versuchsansätze	62
2.3.4.1	Testis, Epididymis und Niere der Ratte	63
2.3.4.2	Testis und Niere des humanen Systems.....	64
2.3.4.3	Testis vom Bullen	68
2.3.4.4	Hitzedemaskierung:	69
2.3.4.5	Proteinase K demaskiert	70
3	Ergebnisse.....	71
3.1	Ergebnisse des Dot Blot Test.....	71
3.1.1	Antikörper-Wiedererkennungstest	71
3.1.2	Nativer-Antigen-Wiedererkennungstest.....	72
3.2	Immunhistologische Ergebnisse	73
3.2.1	Ratte	73
3.2.1.1	Testis der adulten Ratte - Nachweis von Gewebs-Kallikrein	73
3.2.1.2	Niere der adulten Ratte - Nachweis von Gewebs-Kallikrein.....	77
3.2.1.3	Testis der juvenilen Ratte - Nachweis von Gewebs-Kallikrein	80
3.2.1.4	Epididymis der adulten Ratte - Nachweis von Gewebs-Kallikrein	82
3.2.1.4.1	Caput epididymis	82
3.2.1.4.2	Corpus epididymis	84
3.2.1.4.3	Cauda epididymis	86
3.2.1.4.4	Ductus deferens.....	89
3.2.1.5	Epididymis der pubertären Ratte - Nachweis von Gewebs-Kallikrein.....	92
3.2.1.5.1	Caput epididymis	92
3.2.1.5.2	Corpus epididymis	94
3.2.1.5.3	Cauda epididymis	96
3.2.1.6	Epididymis der spätpubertären Ratte - Nachweis von Gewebs-Kallikrein	97
3.2.1.6.1	Caput epididymis	97
3.2.1.6.2	Corpus epididymis	99
3.2.1.6.3	Cauda epididymis	102
3.2.2	Mensch	105
3.2.2.1	Humaner Testis - Nachweis von Gewebs-Kallikrein.....	105
3.2.2.1.1	Humaner Testis (Bouin-fixiert) - Nachweis von Gewebs-Kallikrein	105
3.2.2.1.2	Humaner Testis (Methacarn-fixiert) - Nachweis von Gewebs-Kallikrein.	108
3.2.2.2	Humaner Testis - Nachweis von LMW - Kininogen	116
3.2.2.2.1	Humaner Testis (Bouin-fixiert) - Nachweis von LMW-Kininogen	116
3.2.2.2.2	Humaner Testis (Methacarn-fixiert) - Nachweis von LMW-Kininogen ...	118

3.2.2.3	Humaner Testis - Nachweis der Neutralen Metalloendopeptidase (NEP).....	120
3.2.2.3.1	Humaner Testis (Methacarn-fixiert) - Nachweis der NEP	120
3.2.2.3.2	Humaner Testis (Bouin-fixiert) - Nachweis von NEP 24.11	122
3.2.3	Bulle	122
3.2.3.1	Bullentestis - Nachweis von Gewebs-Kallikrein	122
3.2.3.2	Bullentestis - Nachweis von LMW-Kininogen.....	126
3.2.3.3	Bullentestis - Nachweis der Neutralen Metalloendopeptidase (NEP 24.11) ..	128
4	Diskussion.....	130
4.1	Das Gewebs-Kallikrein-Kinin-System im männlichen Reproduktionstrakt	130
4.2	Fehlerquellen / Optimierungsversuche.....	130
4.3	Diskussion im thematischen Kontext	135
4.3.1	Ergebnisse an histologischen Schnitten des Reproduktionstraktes von Ratten .	135
4.3.2	Ergebnisse an histologischen Schnitten der humanen Spezies	143
4.3.3	Ergebnisse an histologischen Schnitten des bovinen Testis.....	147
4.4	Ausblick.....	150
5	Zusammenfassung	152
6	Summary	152
7	Literaturverzeichnis	156
8	Abkürzungen.....	167
9	Erklärung	169
10	Danksagung.....	170
11	Curriculum Vitae.....	172

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Tubulus seminiferus contortus	15
Abb. 2: Schematische Darstellung der Spermatogenese beim Mann	18
Abb. 3: Schematische Darstellung der Differenzierung einer Spermatide zum Spermatozoon im humanen Testis	21
Abb. 4: Stadien der Spermatogenese bei der Ratte	23
Abb. 5: Stadien der Spermatogenese am humanen System	24
Abb. 6: Halbschematische Zeichnung von Hoden und Nebenhoden mit seinen verschiedenen Abschnitten.....	26
Abb. 7: Schematische Darstellung der enzymatischen Kaskade des Gewebs-Kallikrein-Kinin- Systems.....	30
Abb. 8: Dot Blot Test Variante 2 B: Antikörper CALLA Clone J5 (NEP 24.11)	71
Abb. 9: Dot Blot Test Variante 2 B: Antikörper Kaninchen-anti-Maus	72
Abb. 10: Dot Blot Test Variante 2 B: Antikörper Anti-LWM-Kininogen.....	72
Abb. 11: Dot Blot Test Variante 3 A: Antikörper Anti-LMW-Kininogen	73
Abb. 12A: Kallikrein-Nachweis: Rattentestis (90 Tage). PAP-Methode	74
Abb. 12B: Kallikrein-Nachweis: Rattentestis (90 Tage). PAP-Methode.....	74
Abb. 12C: Kallikrein-Nachweis: Rattentestis (90 Tage). PAP-Methode.....	75
Abb. 12D: Kallikrein-Nachweis: Rattentestis (90 Tage). PAP-Methode	75
Abb. 12E: Negativ-Kontrolle: Rattenhoden (90 Tage). PAP-Methode	76
Abb. 13A: Kallikrein-Nachweis: Rattenniere (90 Tage). PAP-Methode.....	77
Abb. 13B: Kallikrein-Nachweis: Rattenniere (90 Tage). PAP-Methode.....	78
Abb. 13C: Kallikrein-Nachweis: Rattenniere (90 Tage). PAP-Methode.....	78
Abb. 13D: Kallikrein-Nachweis: Rattenniere (90 Tage). PAP-Methode.....	79
Abb. 13E: Negativ-Kontrolle: Rattenniere (90 Tage). PAP-Methode	79
Abb. 14A: Kallikrein-Nachweis: Rattentestis (32 Tage). PAP-Methode.	80
Abb. 14B: Kallikrein-Nachweis: Rattentestis (32 Tage). PAP-Methode.....	81
Abb. 14C: Negativ-Kontrolle: Rattentestis (32 Tage). PAP-Methode.....	81
Abb. 15A: Kallikrein-Nachweis: Caput epididymis der Ratte (90 Tage). PAP-Methode	82
Abb. 15B: Kallikrein-Nachweis: Caput epididymis der Ratte (90 Tage). PAP-Methode	83
Abb. 15C: Negativ-Kontrolle: Caput epididymis der Ratte (90 Tage). PAP-Methode	83
Abb. 16A: Kallikrein-Nachweis: Corpus epididymis der Ratte (90 Tage). PAP-Methode.	84
Abb. 16B: Kallikrein-Nachweis: Corpus epididymis der Ratte (90 Tage). PAP-Methode.	85

Abb. 16C: Kallikrein-Nachweis: Corpus epididymis der Ratte (90 Tage). PAP-Methode.	85
Abb. 17A: Kallikrein-Nachweis: Ductus epididymis der Ratte (90 Tage). PAP-Methode	86
Abb. 17B: Kallikrein-Nachweis: Cauda epididymis der Ratte (90 Tage). PAP-Methode.....	87
Abb. 17C: Kallikrein-Nachweis: Cauda epididymis (90 Tage). PAP-Methode.	87
Abb. 17D: Kallikrein-Nachweis: Cauda epididymis (90 Tage). PAP-Methode.	88
Abb. 17E: Kallikrein-Nachweis: interstitielle GefäÙe im Nebenhoden der Ratte (90 Tage). PAP-Methode	88
Abb. 17F: Negativ-Kontrolle: Corpus und Cauda epididymis der Ratte (90 Tage). PAP- Methode.....	89
Abb. 18A: Kallikrein-Nachweis: Epididymis - Ductus deferens der Ratte (90 Tage). PAP- Methode.....	90
Abb. 18B: Kallikrein-Nachweis: Epididymis - Ductus deferens der Ratte (90 Tage). PAP- Methode.....	90
Abb. 18C: Kallikrein-Nachweis: Epididymis - Ductus deferens der Ratte (90 Tage). PAP- Methode.....	91
Abb. 18D: Kallikrein-Nachweis: Epididymis - Ductus deferens der Ratte (90 Tage). PAP- Methode.....	91
Abb. 18E: Negativ-Kontrolle: Epididymis - Ductus deferens der Ratte (90 Tage). PAP- Methode.....	92
Abb. 19A: Kallikrein-Nachweis: Ductuli efferentes der Ratte (32 Tage). PAP-Methode.....	93
Abb. 19B: Negativ-Kontrolle: Caput epididymis der Ratte (32Tage). PAP-Methode.	93
Abb. 20A: Kallikrein-Nachweis: Corpus epididymis der Ratte (32 Tage). PAP-Methode.	94
Abb. 20B: Kallikrein-Nachweis: Corpus epididymis der Ratte (32 Tage). PAP-Methode.	95
Abb. 20C: Negativ-Kontrolle: Corpus epididymis der Ratte (32 Tage). PAP-Methode.	95
Abb. 21A: Kallikrein-Nachweis: Cauda epididymis der Ratte (32 Tage). PAP-Methode.	96
Abb. 21B: Negativ-Kontrolle: Cauda epididymis der Ratte (32 Tage). PAP-Methode.....	96
Abb. 22A: Kallikrein-Nachweis: Caput epididymis der Ratte (38 Tage), PAP-Methode.	97
Abb. 22B: Negativ-Kontrolle: Caput epididymis der Ratte (38 Tage). PAP-Methode.	98
Abb. 23A: Kallikrein-Nachweis: Corpus epididymis der Ratte (38 Tage). PAP-Methode	99
Abb. 23B: Kallikrein-Nachweis: Corpus epididymis der Ratte (38 Tage). PAP-Methode. ...	100
Abb. 23C: Kallikrein-Nachweis: Corpus epididymis der Ratte (38 Tage). PAP-Methode.	100
Abb. 23D: Kallikrein-Nachweis: Corpus epididymis der Ratte (38 Tage). PAP-Methode.	101
Abb. 23E: Negativ-Kontrolle: Corpus epididymis der Ratte (38 Tage). PAP-Methode.....	101
Abb. 24A: Kallikrein-Nachweis: Cauda epididymis der Ratte (38 Tage). PAP-Methode	102

Abb. 24B: Kallikrein-Nachweis: Cauda epididymis der Ratte (38 Tage). PAP-Methode.....	103
Abb. 24C: Kallikrein-Nachweis: Ductus epididymis der Ratte (38 Tage). PAP-Methode.....	103
Abb. 24D: Negativ-Kontrolle: Cauda epididymis der Ratte (38 Tage). PAP-Methode	104
Abb. 24E: Negativ-Kontrolle: Cauda epididymis der Ratte (38 Tage). PAP-Methode	104
Abb. 25A: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Bouin-fixiert). PAP-Methode.	106
Abb. 25B: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Bouin-fixiert). PAP-Methode.....	106
Abb. 25C: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Bouin-fixiert). PAP-Methode.....	107
Abb. 25D: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Bouin-fixiert). PAP-Methode.	107
Abb. 25E: Negativ Kontrolle: humaner Hoden (Bouin-fixiert). PAP-Methode.	108
Abb. 26A: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Methacarn-fixiert). PAP-Methode.	109
Abb. 26B: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Methacarn-fixiert). PAP-Methode.	109
Abb. 26C: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Methacarn-fixiert). PAP-Methode	110
Abb. 26D: Negativ-Kontrolle: humaner Hoden (Methacarn-fixiert). PAP-Methode.	110
Abb. 27A: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Methacarn-fixiert). Mikrowellen- Vorbehandlung, PAP-Methode.	111
Abb. 27B: Negativ-Kontrolle: humaner Hoden (Methacarn-fixiert). Mikrowellen- Vorbehandlung, PAP-Methode.	112
Abb. 28A: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Methacarn-fixiert). Vorbehandlung mit Proteinase K, PAP-Methode.	112
Abb. 28B: Negativ-Kontrolle: humaner Hoden (Methacarn-fixiert). Vorbehandlung mit Proteinase K, PAP-Methode.	113
Abb. 29A: Kallikrein Nachweis: humane Niere (Methacarn-fixiert). PAP-Methode.....	114
Abb. 29B: Kallikrein-Nachweis: humane Niere (Methacarn-fixiert). PAP-Methode.....	115
Abb. 29C: Negativ-Kontrolle: humane Niere (Methacarn-fixiert). PAP-Methode.	115
Abb. 30A: LMW-Kininogen-Nachweis: humaner Testis (Bouin-fixiert), PAP-Methode.....	116
Abb. 30B: LMW-Kininogen-Nachweis: humaner Testis (Bouin-fixiert), PAP-Methode.....	117
Abb. 30C: Negativ-Kontrolle: humaner Testis (Bouin-fixiert), PAP-Methode.....	117
Abb. 31A: LMW-Kininogen-Nachweis: humaner Testis (Methacarn-fixiert). HRP-Methode	118
Abb. 31B: LMW-Kininogen-Nachweis: humaner Testis (Methacarn-fixiert). HRP-Methode	119
Abb. 31C: Negativ-Kontrolle: humaner Testis (Methacarn-fixiert). HRP-Methode	119
Abb. 32A: NEP 24.11-Nachweis: humaner Testis (Methacarn-fixiert). HRP-Methode.	120
Abb. 32B: NEP 24.11-Nachweis: humaner Testis (Methacarn-fixiert). HRP-Methode.....	121
Abb. 32C: Negativ-Kontrolle: humaner Testis (Methacarn-fixiert). HRP-Methode.....	121

Abb. 33A: Kallikrein-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert). PAP-Methode	
– humaner AK	123
Abb. 33B: Kallikrein-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert). PAP-Methode	
- humaner AK.....	123
Abb. 33C: Kallikrein-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert). PAP-Methode	
- humaner AK.....	124
Abb. 33D: Kallikrein-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert). PAP-Methode	
- humaner AK.....	124
Abb. 33E: Negativ-Kontrolle: Bullentestis (Methacarn-fixiert). PAP-Methode.	125
Abb. 34A: LMW-Kininogen-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert). PAP-Methode	
– humaner AK.....	126
Abb. 34B: LMW-Kininogen-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert). PAP-Methode	
– humaner AK.....	127
Abb. 34C: LWM-Kininogen-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert). PAP-Methode	
– humaner AK.....	127
Abb. 34D: Negativ-Kontrolle: Bullentestis (Methacarn-fixiert). PAP-Methode.....	128
Abb. 35A: NEP 24.11-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert). HRP-Methode	
– humaner AK.....	129
Abb. 35B: Negativ-Kontrolle: Bullentestis (Methacarn-fixiert). HRP-Methode.....	129

Tabellenverzeichnis	Seite
Tabelle 1: Aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydratisierung	59
Tabelle 2: Fixation	59
Tabelle 3: Übersichtstabelle über die variierenden Faktoren in den immunhistologischen Untersuchungen.....	63
Tabelle 4: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Gewebs- Kallikrein an Testis und Epididymis der Ratte mittels PAP-Technik.....	64
Tabelle 5: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Gewebs- Kallikrein am humanen Testis mittels PAP-Technik.....	64
Tabelle 6: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Gewebs- Kallikrein am humanen Testis über die indirekte Methode	64
Tabelle 7: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von NEP 24.11 am humanen Testis mittels PAP-Methode	65
Tabelle 8: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von NEP 24.11 am humanen Testis über die indirekte Methode	65
Tabelle 9: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von NEP 24.11 am humanen Testis über die En-vision™ Methode	66
Tabelle 10: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von LMW- Kininogen am humanen Testis mittels PAP-Technik	66
Tabelle 11: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von LMW- Kininogen am humanen Testis mittels indirekter Technik	67
Tabelle 12: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von LMW- Kininogen am humanen Testis mittels indirekter Technik	67
Tabelle 13: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kreuzreaktionen des humanen Gewebs-Kallikreins am Testis des Bullens mittels PAP-Technik	68
Tabelle 14: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kreuzreaktionen des Gewebs-Kallikreins der Ratte am Testis des Bullens mittels PAP-Technik	68
Tabelle 15: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kreuzreaktionen des humanen J5-CALLA-Antikörpers (gegen NEP 24.11) am Bullen über die indirekte Methode.....	68

Tabelle 16: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kreuzreaktionen des humanen LMW-Kininogen-Antikörpers am Testis des Bullens über die indirekte Methode	69
Tabelle 17: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kreuzreaktionen des humanen LMW-Kininogen-Antikörpers am Testis des Bullens mittels PAP-Technik	69
Tabelle 18: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kallikrein an humanem Testis und humaner Niere mittels PAP-Technik	70
Tabelle 19: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kallikrein an humanem Testis und humaner Niere sowie Testis und Epididymis des Bullens mittels PAP-Technik.....	70

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Andrologie

Andrologie heißt übersetzt Männerheilkunde. Als Fachgebiet der Medizin beschäftigt sie sich mit der Physiologie und Pathophysiologie der männlichen Fertilität, einschließlich der erektilen Dysfunktion und Seneszenz (Altern) des Mannes. Eine andrologische Untersuchung umfasst Sexualanamnese, Beurteilung der androgenen Physionomie, klinische und funktionelle Untersuchungen der Genitalorgane, Bestimmung der Basiswerte von Testosteron, LH und FSH, Spermauntersuchungen (Ejakulatvolumen, Spermiedichte, -motilität, -morphologie etc.) sowie bei Bedarf dynamische Hormontests, Karyogramm (Darstellung des Chromosomenbestandes einer Zelle/eines Gewebes/eines Individuums) mit Bestimmung des Kerngeschlechts und Hodenbiopsie mit histologischer Untersuchung. Fertilitätsstörungen sind, abgesehen von psychischen Problemen, häufig in einer dysfunktionalen Spermatogenese, einer gestörten Ausreifung der Spermatozoen, reduzierter oder fehlender Motilität der Spermien sowie in einer Gameteninteraktionsstörung mit der weiblichen Eizelle zu suchen. Bei den gynäkologischen Faktoren sind ovarielle (Ovarialinsuffizienz etc.), tubare (Tubenverschluß nach Salpingitis, Endometriose etc.), zervikale (Zervizitis, anatomische Veränderungen etc.), vaginale (Kolpitis etc.) sowie extragenitale Störungen (Fettsucht, Diabetes mellitus etc.) zu berücksichtigen. Als weitere Ursache für eine beeinträchtigte Fortpflanzungsfähigkeit kommt eine dysfunktionale humorale Regulation in Betracht, inklusive der hormonellen (z. B. Schilddrüsenfunktion, Hypophyse) und immunologischen (z.B. [Auto]-Antikörper gegen Spermien-Antigene) Störungen.

Die Andrologie war bis vor kurzem noch keine eigenständige Disziplin wie die Gynäkologie, sondern wurde interdisziplinär von Dermatologen, Urologen und Endokrinologen ausgeübt. In der Muster-Weiterbildungsordnung der Bundesärztekammer, die 2005 verabschiedet wurde, ist die Anerkennung der „Andrologie“ als offizielle Zusatzbezeichnung aufgeführt. Aufgrund der Progredienz der Infertilität in den letzten Jahren, die sich an der großen Zahl unfreiwillig kinderloser Paare (bis zu 1/3 der Ehen) äußert, kommt diesem Fachgebiet eine wachsende Bedeutung zu. In früheren Jahren herrschte die Meinung vor, Unfruchtbarkeit sei allein ein Problem der Frauen. Heutige Erkenntnisse zeigen jedoch, dass Unfruchtbarkeit nur zu ca. 39 % der Frau, zu 20 % dem Mann und zu 26 % beiden Partnern zuzuschreiben ist (WHO, 1987; WHO, 1999).

Diese Arbeit ist im Zentrum für Dermatologie und Andrologie des Universitätsklinikums Gießen entstanden. Sie befasst sich mit der Grundlagenforschung der männlichen Spermatogenese und deren lokale Regulation im Testis.

1.2 Anatomie und Physiologie des Testis

Der humane Hoden hat ein Volumen von rund 20-25 ml. Er wird von einer derben Bindegewebskapsel, der *Tunica albuginea* umgeben. Von dieser ziehen zarte Bindegewebssepten nach zentral und unterteilen das Hodengewebe in 200-300 Läppchen, die jeweils aus 1-3 stark aufgeknaulten Samenkanälchen, den *Tubuli seminiferi contorti*, bestehen (Bergmann, 1998).

Der Hoden lässt sich grob in 2 Kompartimente gliedern, in das *tubuläre* (Abb. 1) und das *interstitielle* Kompartiment.

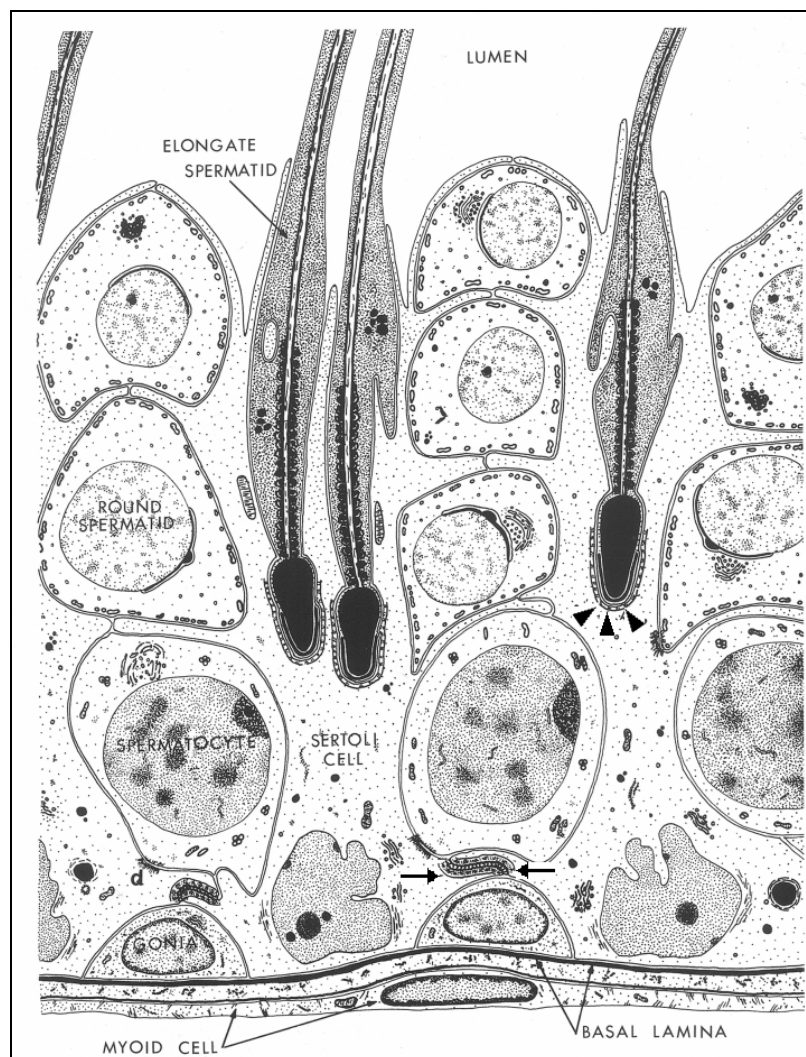


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines *Tubulus seminiferus contortus* (Russel et al., 1990).

Unterhalb der Basallamina lagert sich *peritubulär* eine Schicht aus Muskelzellen an. Der Basallamina sitzen Spermatogonien und Sertoli-Zellen auf. Im *basolateralen* Teil der Sertoli-Zelle, oberhalb der Spermatogonien, bilden sich die *Zonulae occludentes* zu den benachbarten Sertoli-Zellen aus, diese bilden die Blut-Hoden-Schranke (→). Den Sertoli-Zellen sukzessiv nach *luminal* aufsteigend lagern sich Spermatocyten, runde und elongierte Spermatiden an. Die Sertoli-Zellen reichen von der Basallamina bis hin zum Lumen, stehen mit allen Germinalzellen in Kontakt und sind verantwortlich für deren Ernährung. Zwischen den Sertoli-Zellen und den meisten Keimzell-Typen bilden sich Desmosomen ähnliche Verbindungen aus (d). Ektoplasmatische Verbindungen (▲) gehen von den Sertoli-Zellen aus und binden an den Kopf der Spermatiden, um diese im Epithelverband zu halten.

Im *tubulären Kompartiment*, das aus den Samenkanälchen besteht und vorwiegend der Spermatogenese dient (Abb. 1), finden sich die germinativen Zellen. Basal im Keimepithel liegen die Spermatogonien, die sich durch Mitose teilen und sich von der primären Spermatozyte durch Meiose I und II zur runden Spermatide entwickeln, aus der dann durch Elongation die elongierten Spermatiden hervorgehen (Holstein & Roosen-Runge, 1981). Der Zyklus der Gametogenese benötigt beim Menschen einen Zeitraum von ca. 74 Tagen (d. h. ca. 62 Tage Entwicklung im Testis und anschließend ca. 12 Tage Reifung im Nebenhoden), bei einer täglichen Produktion von 200-300 Millionen Spermien (Holstein, 1994; Bergmann, 1998).

Es lassen sich zwei somatische Zelltypen, die *Peritubulär-Zellen* und die Sertoli-Zellen unterscheiden. Die peritubulären Zellen, auch Myofibroblasten genannt, bilden zusammen mit der Basalmembran und einer Kollagenfaserschicht die *Lamina propria*, welche die Samenkanälchen umscheidet. Diese Myofibroblasten werden durch das Hormon Oxytozin reguliert und sind zu spontanen Kontraktionen befähigt. Sie dienen mit großer Wahrscheinlichkeit dem Transport der ausdifferenzierten Samenfäden in Richtung des *Rete testis* und des Nebenhodens (Bergmann, 1998).

Die Sertoli-Zellen, auch als "Ammenzellen" bezeichnet, sitzen der Basalmembran auf und reichen mit dicht verzweigten Fortsätzen bis zum Lumen der Samenkanälchen. Sie bilden das Stützgerüst des Keimepithels und koordinieren topographisch sowie funktionell den Ablauf der Spermatogenese. Durch ihre Produktivität und Sekretionsfähigkeit sind sie essentiell für die Entwicklung der sich ihr anlagernden Keimzellen. Zu ihren Syntheseprodukten gehören u. a. Zytokine, Wachstumsfaktoren, Opioide, Steroide, Prostaglandine und Modulatoren der Zellteilung (Weinbauer *et al.*, 2000). Da eine Sertoli-Zelle nur mit einer bestimmten Anzahl von Spermien in Kontakt steht (beim Menschen 1:4, bei der Ratte 1:10) sind sie entscheidend für Spermienproduktion und Hodengröße mitverantwortlich (Weinbauer *et al.*, 2000). Durch die ausgedehnten Kontaktzonen, die *Tight junctions*, zu benachbarten Sertoli-Zellen wird die so genannte Blut-Hoden-Schranke ausgebildet. Diese wirkt als Barriere für den Stofftransport vom interzellulären Raum zu den im *adluminalen* Kompartiment gelegenen Keimzellen. Somit werden die in der Meiose befindlichen Keimzellen und die heranreifenden Spermatiden z. B. vor mutagenen Substanzen oder autoaggressiven, die Spermatozoen angreifenden Antikörpern, geschützt. Die Sertoli-Zelle nimmt auch an dieser Stelle eine entscheidende Position ein, da durch sie ein kontrollierter transzellulärer Stofftransport von der Basalmembran bis hin zum Lumen des Samenkanälchens gewährleistet wird (Setchell, 1999).

Das interstitielle Kompartiment, das sich zwischen den Samenkanälchen erstreckt, dient der Steroidogenese. Als wesentliche Zellgruppe seien hier die Leydig-Zellen genannt, deren Hauptaufgabe in der Produktion und Sekretion von Testosteron liegt. Sie entstehen aus mesenchymalen und Fibroblasten ähnlichen Zellen. Ihre Proliferationsrate ist eher gering und steht ebenso wie ihre Differenzierung unter dem Einfluss des luteinisierenden Hormons (LH) (Bergmann, 1998; Weinbauer *et al.*, 2000).

Des Weiteren finden sich hier Zellen des Immunsystems, z. B. Makrophagen und Lymphozyten, aber auch lockeres Bindegewebe, Blutgefäße, Nerven und Lymphgefäße (Bergmann, 1998).

1.2.1 Hormonelle Steuerung der Hodenfunktion

Die Vermehrung, Reifung und Differenzierung der Keimzellen in den Samenkanälchen wird von Hormonen des Hypothalamus, der Hypophyse und des Hodens gesteuert. Hemmung und Förderung der Hormonsekretion unterliegen einem Regelkreis.

Im Hypothalamus wird das *Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)* gebildet. Dieses bewirkt nach Abgabe in das hypophysäre Pfortadersystem die Ausschüttung des in der Adenohypophyse produzierten *luteinisierenden Hormons (LH)* und des *follikelstimulierenden Hormons (FSH)*.

Das LH stimuliert die *Leydig-Zellen*, die an ihrer Oberfläche Rezeptoren für LH besitzen, zur Synthese von Testosteron und anderen Androgenen. Der Testosteronspiegel im Blut, der bei Männern im physiologischen Konzentrationsbereich zwischen 3 und 12 ng/ml liegt, wird vom Hypothalamus-Hypophysen-System über einen so genannten Feedback-Mechanismus kontrolliert und reguliert. Hohe Serumtestosteronspiegel inhibieren dabei die LH-Sekretion, niedrige fördern die LH-Ausschüttung aus dem Hypophysenhinterlappen und damit die Testosteronsynthese in den Leydig-Zellen.

Das FSH dagegen stimuliert die *Sertoli-Zellen* und fördert auf diese Weise die Samenbildung. Gleichzeitig erhöht FSH die Anzahl der LH-Rezeptoren auf den Leydig-Zellen und begünstigt somit die Testosteronproduktion. Analog zum LH wird auch die FSH-Ausschüttung durch einen hohen Testosteronspiegel vermindert, da Testosteron die Produktion des GnRH vermindert. Zusätzlich hemmt ein von den Sertoli-Zellen gebildetes Hormon, das Inhibin-B, die Freisetzung des gonadotropen Hormons (FSH) im Hypophysenvorderlappen. Somit ermöglicht Inhibin-B die negative Rückkopplung vom Keimepithel zum Hypothalamo-Hypophysären-System (Holstein & Roosen-Runge, 1981; Holstein, 1994).

1.2.2 Spermatogenese

Die Spermatogenese bezeichnet einen gerichteten Prozess im Keimepithel, der die Proliferation und Differenzierung der männlichen Keimzellen in sich vereint. Hierbei entstehen aus diploiden Spermatogonien haploide, zur Befruchtung fähige, Spermatozoen (Abb. 2).

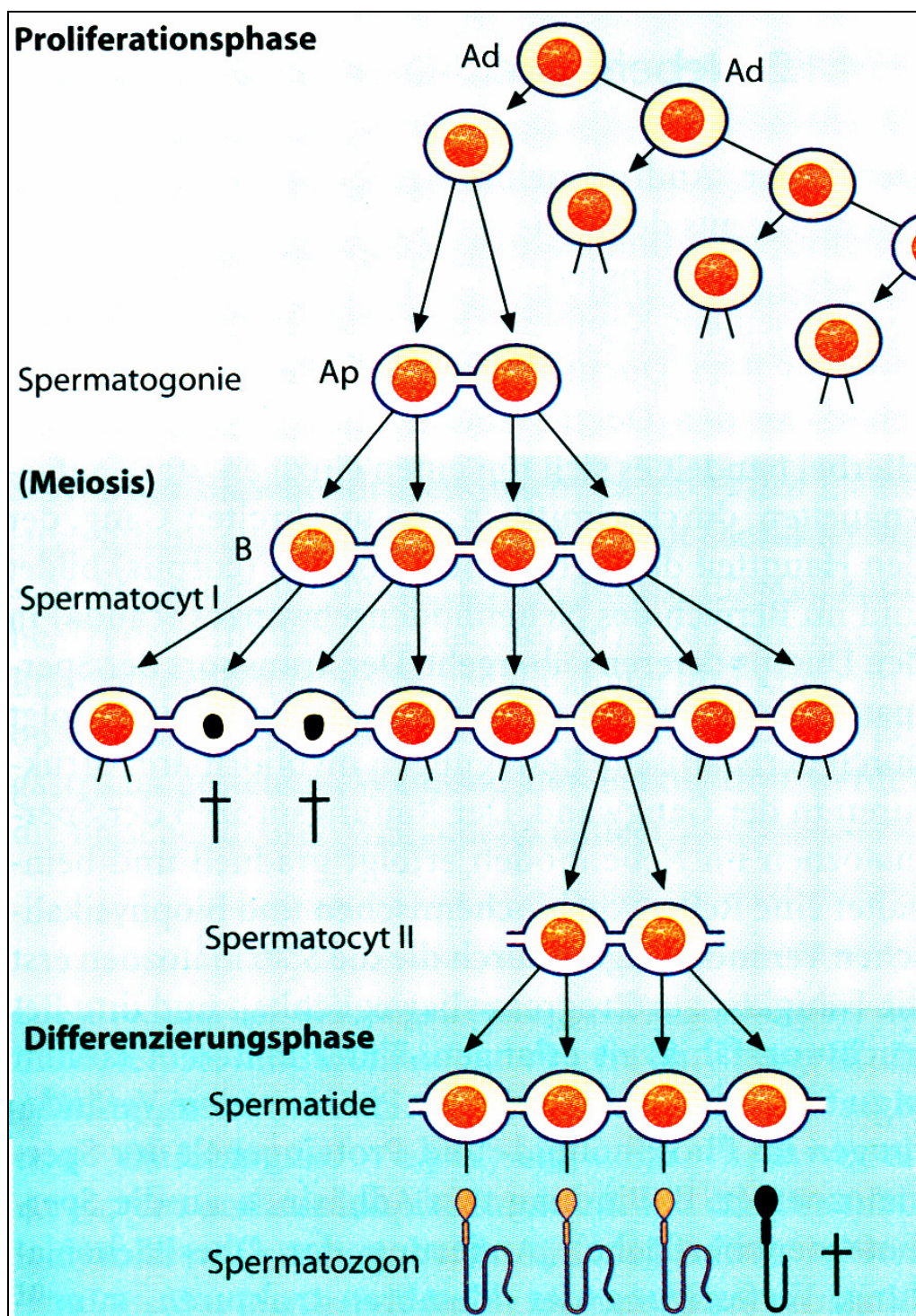


Abb. 2: Schematische Darstellung der Spermatogenese beim Mann (nach Nieschlag & Behre, 2000)

Der Prozess der Spermatogenese, d. h. die Entwicklung von der Spermatogonie bis zum reifen Spermium, verläuft in vier zu unterscheidenden Phasen:

1. Mitose: Proliferationsphase der Spermatogonien (diploide Keimzellen):

Basal im Keimepithel liegen die Spermatogonien, die sich in Typ A und Typ B unterteilen lassen. Die Spermatogonien Typ A werden entsprechend ihrer physiologischen und zytologischen (Anfärbbarkeit) Eigenschaften differenziert in Typ Ad (= dark) und Ap (= pale). Dabei bildet der Typ Ad die eigentlichen Stammzellen, die bei Verlust von Spermatogonien Typ Ap (z.B. durch Bestrahlung) proliferieren und diese ersetzen. Dagegen sind die blass gefärbten Spermatogonien Typ Ap teilungsaktiv, aus ihnen gehen durch Mitose zwei Tochterzellen hervor, von denen sich nur eine zur Spermatogonie Typ B entwickelt. Diese löst sich von der Basallamina ab und tritt als primäre Spermatozyte (Spermatozyte I. Ordnung) in die Meiose ein (Bergmann, 1998; Weinbauer *et al.*, 2000).

2. Meiose I: erste Teilungsphase der Spermatozyten (tetraploide Keimzellen):

Die Spermatozyten I. Ordnung besitzen einen diploiden Chromosomensatz ($2n$ DNA), bestehend aus 2×22 Autosomen und 2 Gonosomen (= Geschlechtschromosomen). Zu Beginn der Meiose, im Präleptotänstadium, d. h. kurz vor Eintritt in die Prophase I, verdoppeln sie ihren Chromosomensatz (tetraploide Keimzellen, $4n$ DNA). Während dieser Phase durchwandern sie die Blut-Hoden-Schranke und setzen nun im lumenseitigen Keimepithel ihre Entwicklung fort. Es folgt eine Paarung der homologen Chromosomen mit Austausch des genetischen Materials und einem anschließenden Auseinanderweichen. Am Ende der I. Reifeteilung gehen 2 Spermatozyten II. Ordnung hervor.

3. Meiose II: zweite Teilungsphase der Spermatozyten (haploide Keimzellen):

Nach der Entwicklung zur sekundären Spermatozyte (Spermatozyte II. Ordnung), diese besitzen einen haploiden aber noch doppelten Chromosomensatz ($2n$ DNA), erfolgt die 2. meiotische Teilung. Aus dieser gehen ohne vorausgegangene DNA-Reduplikation die haploiden Spermatisen mit einfachem Chromosomensatz ($1n$ DNA) hervor. Am Ende der Reifeteilung liegen 4 haploide (= einfacher Chromosomensatz) Spermatisen vor, die noch durch Zellbrücken miteinander in Verbindung stehen (Holstein & Roosen-Runge, 1981).

4. Spermiogenese: Differenzierungsphase der Spermatiden (haploide Keimzellen):

Die Entwicklungsvorgänge der runden, teilungsinaktiven Spermatide (haploide Keimzelle) zum Spermatozoon laufen im oberen Bereich des Keimepithels ab. Die Differenzierung beinhaltet 4 wesentliche Veränderungen, die parallel in der Spermatide ablaufen (Abb. 3):

- *Golgi-Phase*: Bildung des Akrosombläschens vom Golgi-Apparat.
- *Kappenphase*: Abflachung des akrosomalen Bläschens und Ausbreitung über zwei Drittel der Kernoberfläche.
- *Akrosomphase*: das Zytoplasma des Kerns wird auf 1/10 seines Volumens verdichtet, fortschreitende Elongation, so dass der Spermatidenkern eine ovale Gestalt annimmt. Das Flagellum ist nun ausgebildet.
- *Reifungsphase*: der größte Teil des Zytoplasmas schnürt sich ab, der Zytoplasmarest wird von der elongierten Spermatide abgestoßen und als Residualkörper, ebenso wie degenerierte Spermatozyten und Spermatiden von den Sertoli-Zellen phagozytiert (Weinbauer *et al.*, 2000). Elongierte Spermatiden bzw. die Residualkörper wirken auf die sekretorische Funktion der Sertoli-Zelle ein (Produktion von *Tubulusflüssigkeit*, Inhibin, androgenbindendem Protein, Interleukin) (Jégou & Sharpe, 1993).

Sind Kern, Akrosom und Geißel ausgebildet, wird die Spermatide aus dem Keimzellverband freigesetzt, dieser Prozess wird als Spermiation bezeichnet, die Spermatiden *post liberationem* heißen Spermatozoen (Holstein & Roosen-Runge, 1981).

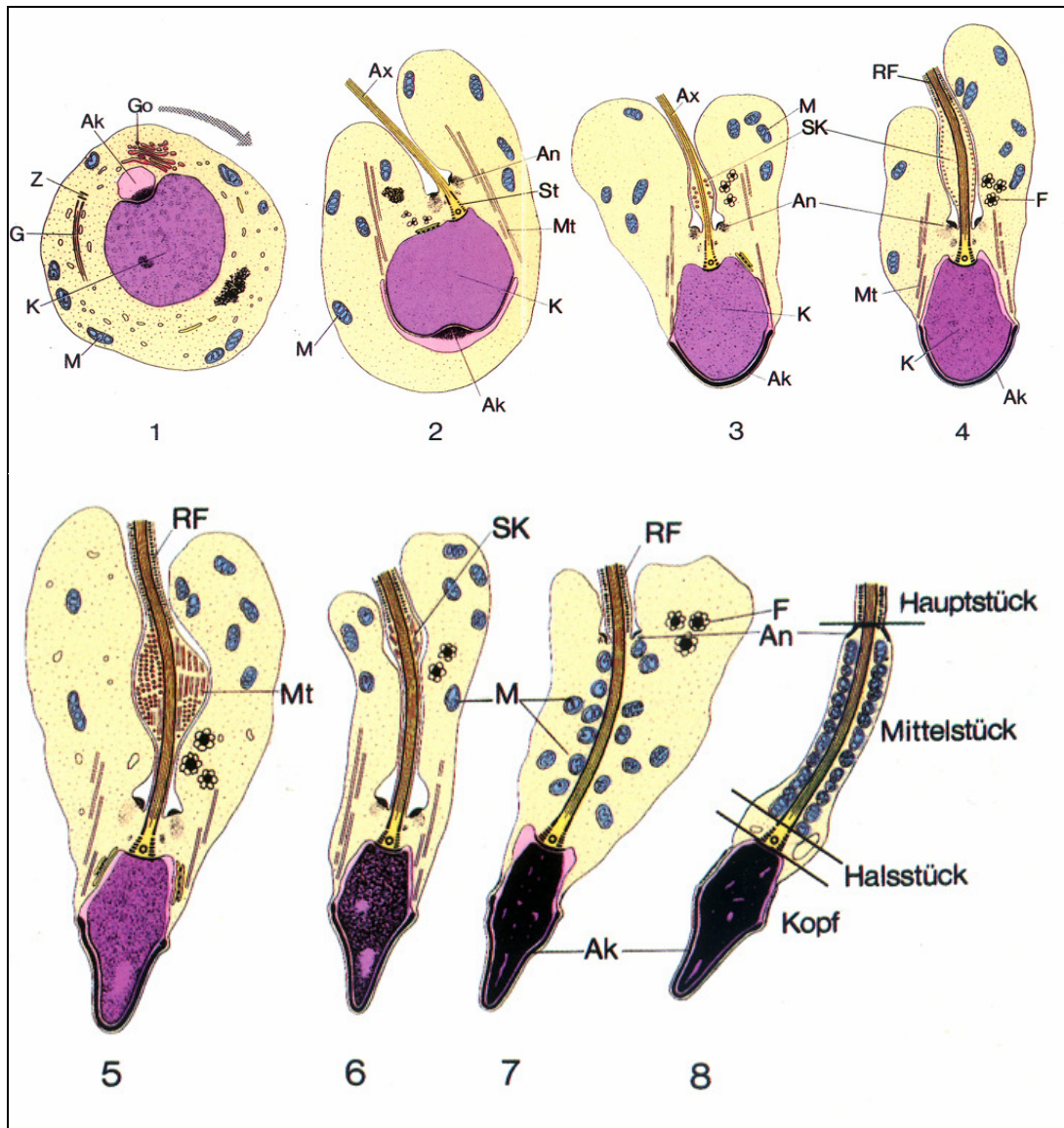


Abb. 3: Schematische Darstellung der Differenzierung einer Spermatide zum Spermatozoon im humanen Testis (Darstellung aus Holstein & Roosen-Runge, 1981)

- 1) Frühe Spermatide mit rundlichem Kern (K), Akrosombläschen (Ak), Zentriol (Z), Mitochondrien (M). Das Akrosombläschen wurde aus dem Golgi-Apparat abgeschnürt (Go). Im Verlauf der Entwicklung rotieren Kern und Akrosomenbläschen (→), so dass sich die Geißelanlage (G) am Akrosom entgegengesetzten Kernpol anheftet.
- 2) Das Akrosombläschen (Ak) breitet sich an der Oberfläche des Kerns (K) aus. Von seinem caudalen Rand ziehen Mikrotubuli (Mt) in das Zytoplasma. Im Bereich der Zentriole bildet sich der Streifenkörper (St). Das distale Zentriol entwickelt sich zum Axonema (Ax), welches von dem Anulus (An) umschieden ist.
- 3) In die akrosomale Blase lagern sich akrosomale Substanzen ein. Am Axonema entwickelt sich ein spindelförmiger Körper (SK).
- 4) Der Spermatidenkern verdichtet sich und ist oval. Am Ende haben sich Ringfasern (RF) gebildet, die das Axonema umgeben. Im Zytoplasma finden sich bläschenförmige Strukturen (F).
- 5) Der spindelförmige Körper enthält Mikrotubuli. Das Karyoplasma ist grob-granulär.
- 6) Der Spermatidenkern ist stark verdichtet, der spindelförmige Körper zeigt eine Volumenreduktion.
- 7) Das Karyoplasma ist stark kondensiert. Die Mitochondrien gruppieren sich um das Axonema und bilden die Mitochondrienscheide des Mittelstückes. Der Anulus ist nach distal gewandert und markiert den Beginn des Hauptstückes der Geißel.
- 8) Reife Spermatide mit dem kondensierten, haploiden Nukleus und dem kappenförmigen Akrosom (Holstein, 1994).

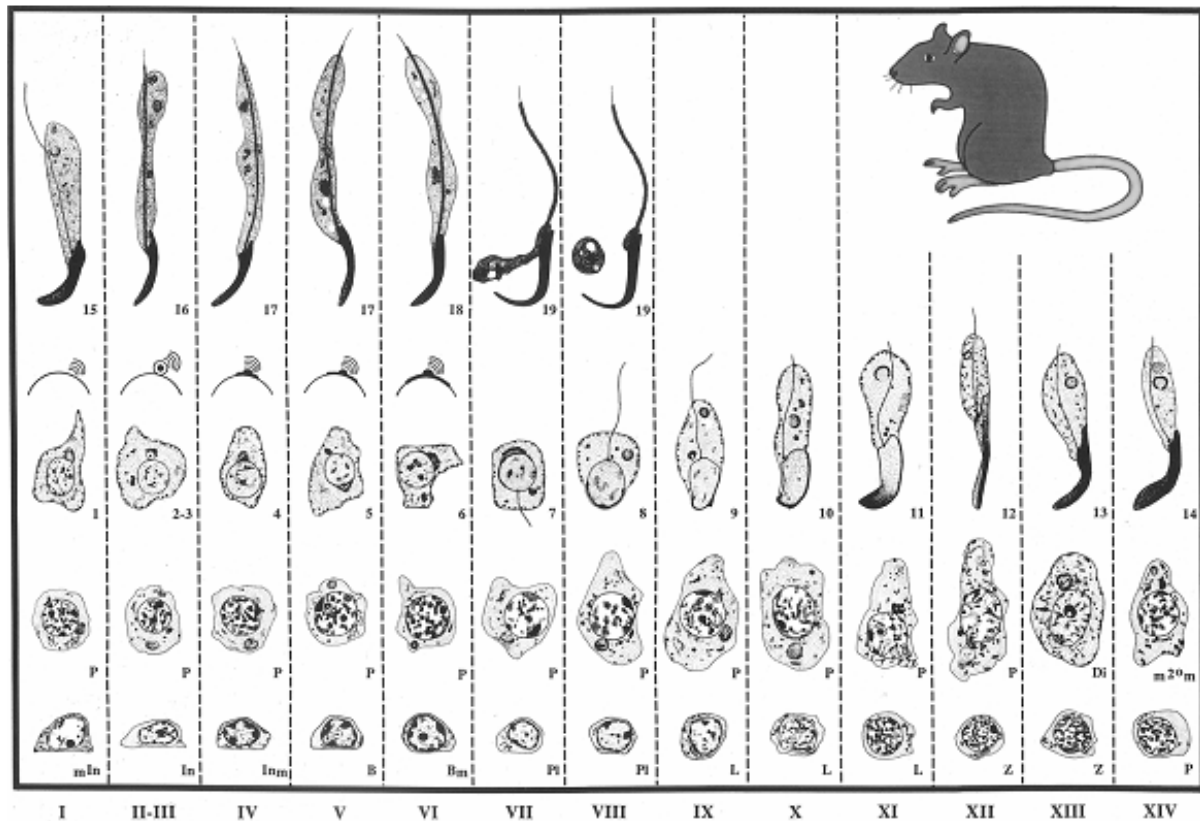
1.2.3 Stadien der Spermatogenese

Im Querschnitt durch einen *Tubulus seminiferus contortus* zeigt sich, dass verschieden differenzierte Zellen immer wieder zusammen auftreten. Diese Zellassoziationen bezeichnet man als Stadien. Die Germinalzellen durchlaufen während ihrer Entwicklung mehrere Stadien. Die Anzahl der Spermatogenesestadien variiert stark zwischen den einzelnen Spezies, so werden beim Mann sechs Stadien (I-VI), bei der Ratte 14 Stadien (I-XIV) und beim Bullen acht Stadien (I-VIII) beschrieben (Russel *et al.*, 1990; Bergmann, 1998).

Die Spermatogenese verläuft zudem in Zyklen. Ein Zyklus bezeichnet die zeitliche Abfolge der Stadien und schwankt sehr stark zwischen den verschiedenen Spezies. Die Zyklusdauer wird beim humanen System mit 16 Tagen angegeben, bei anderen Spezies ist dieser Zeitraum deutlich kürzer und dauert zwischen 8 und 12,5 Tagen (Weinbauer *et al.*, 2000), für die Sprague-Dawley-Ratte wird die Dauer mit 12,9 Tagen angegeben, für den Bullen mit 13,5 Tagen (Russel *et al.*, 1990).

Die Entwicklung und Differenzierung eines Spermatogoniums zu einem reifen Spermatozoon benötigt mindestens vier spermatogenetische Zyklen. Daraus ergibt sich eine Gesamtdauer der Spermatogenese beim Mann von mindestens 64 Tagen (Weinbauer *et al.*, 2000). Einige Autoren bzw. Forschungsgruppen geben die Dauer der Gametogenese mit 74 Tagen an, wobei sie von 4,5 bzw. 4,6 spermatogenetischen Zyklen ausgehen (Holstein, 1994; Bergmann, 1998). Die differierende Angabe von Zyklenzahl und die damit verbundene Spermatogenesedauer basiert auf einer Berechnung ausgehend von unterschiedlichen Anfangspunkten: Wird erst vom Zeitpunkt der proliferierenden Spermatogonie ausgehend gerechnet, so benötigt die Spermatogenese 4 Zyklen (= 64 Tage). Alternativ kann der Startpunkt für die Berechnung der Zeitpunkt sein, zu dem die Spermatogonie noch ruht, dann ergibt sich eine Dauer von 4,5 Zyklen (= 74 Tage) (Russel, *et al.*, 1990).

Neben der geordneten zeitlichen Abfolge nimmt die Spermatogenese auch eine räumliche Gliederung im *Tubulus seminiferus contortus* ein. Während bei der Ratte pro *Tubulus* nur eine Stadienform zu finden ist (Abb. 4), in den angrenzenden *Tubuli* in spezifischer Reihenfolge die anderen Stadien anzutreffen sind und somit von einer wellenförmigen Spermatogenese gesprochen wird, findet man im humanen Testis pro *Tubulus*querschnitt mehrere Stadien (Abb. 5). Die Spermatogeneseabfolge entspricht beim Menschen einer helikalen Anordnung, d. h. gegeneinander versetzte Spiralen, an deren Basis Spermatogonien und *apikal* die elongierten Spermatisden sitzen (Schulze & Rehder, 1984).



STAGES OF THE CYCLE

Abb. 4: Stadien der Spermatogenese bei der Ratte nach Leblond & Clermond, 1952 (Darstellung aus Russel, *et al.*, 1990).

Die Germinalzellen durchlaufen in ihrer Entwicklung verschiedene Stadien, die durch das Auftreten typischer Zellverbände charakterisiert sind. Bei der Ratte sind 14 Stadien beschrieben worden. Innerhalb eines Querschnitts durch einen *Tubulus seminiferus contortus* findet sich immer eine der 14 Keimzellentwicklungsstadien, in angrenzenden *Tubuli* findet sich immer das entsprechend folgende Stadium, d. h. neben Stadium I immer das Stadium II, neben Stadium III immer Stadium IV usw., was auch als „Welle der Spermatogenese“ bezeichnet wird. Das Durchlaufen aller Stadien wird als Zyklus bezeichnet und dauert bei der Sprague-Dawley-Ratte 12,9 Tage. Die Differenzierung von der Spermatogonie B bis zum Spermatozoon dauert mindestens 4 Zyklen. Nicht dargestellt der erste Zyklus mit der mitotischen Teilung der Spermatogonien. In den unteren beiden Reihen sind die Zyklusrunden 2 und 3 dargestellt mit der Entwicklung von dem Spermatogonium bis zum Ende der Meiose. Die Buchstaben klassifizieren die Spermatogonien, intermediäre Spermatogonie A (= In), Spermatogonie (= B) und die einzelnen Meiosestadien: Präleptotän (= Pl), Leptotän (= L), Zygotän (= Z), Pachytän (= P) und Diplotän (= Di). Daraus geht die sekundäre Spermatozyte (= $m2^o$ m) hervor.

In der 3. Reihe, entsprechend den 4 Zyklen, hat sich die Keimzelle zur runden Spermatozyte differenziert (arabische Zahlen kennzeichnen die Entwicklungsstufe der Spermatozyte). Es folgen die Stadien der Spermiozytogenese (= 1-19), in deren letztem Schritt (Schritt 19) sich der größte Teil des Zytoplasmas vom Spermatozytenkopf abschnürt und als Residualkörperchen abgestoßen wird.

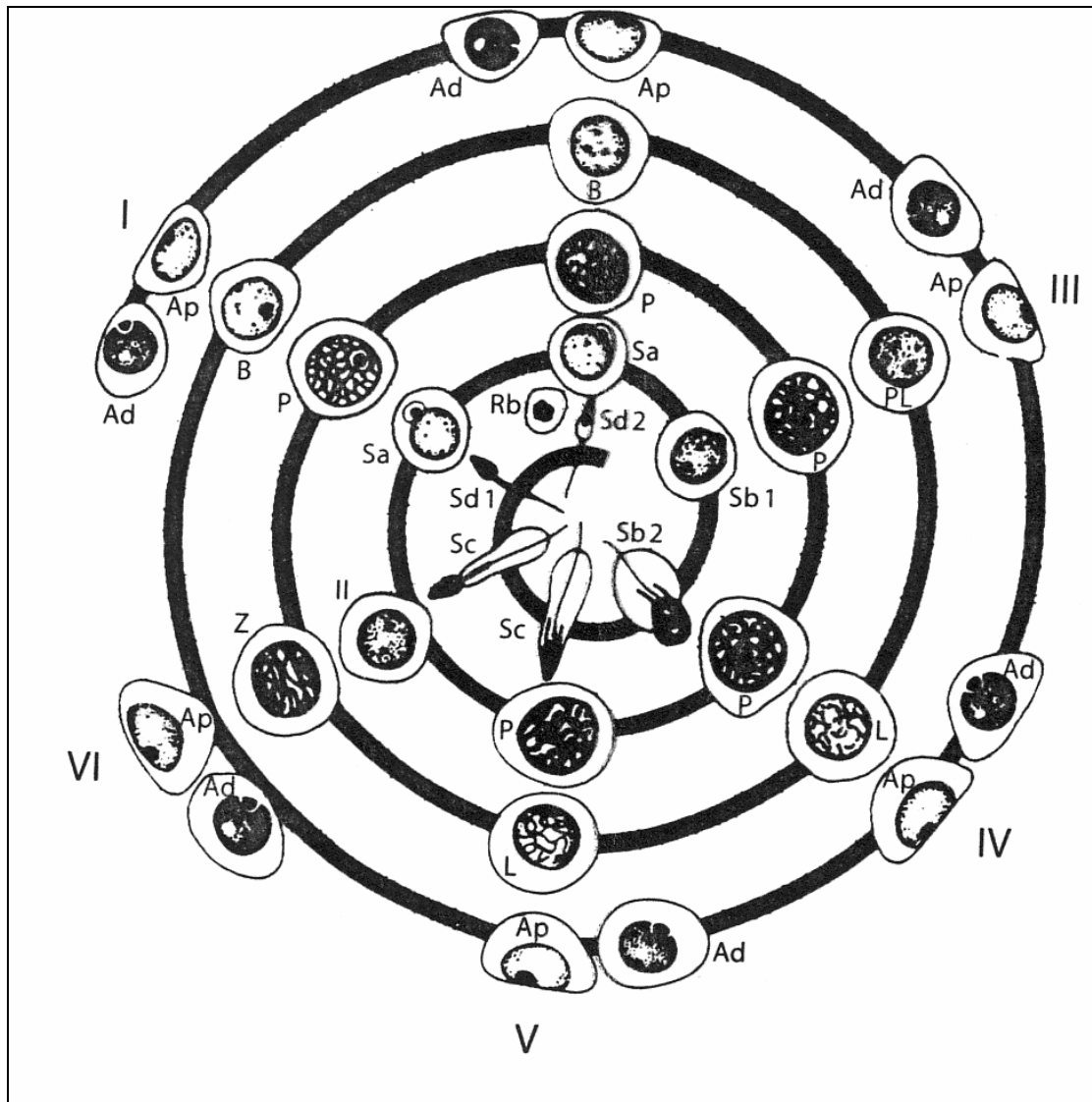


Abb. 5: Stadien der Spermatogenese am humanen System nach Schulze und Rehder, 1984 (Darstellung aus Nieschlag & Behre, 2000).

Schematische Darstellung der menschlichen Spermatogenese bestehend aus 6 Stadien (I-VI). Diese zeigen im Tubulussystem eine helikale Anordnung aus mehreren versetzt gegeneinander verlaufende Spiralen. Basal liegen die frühen Keimzellen, Spermatogonien Typ Ad (= dark) und Ap (= pale), während sich nach *luminal* hin die am weitesten entwickelten Keimzellen befinden. Die Spermatogonien Typ B treten in die Meiose I ein und durchlaufen folgende Stadien: Präleptotän (= Pl), Leptotän (= L), Zygotän (= Z) und Pachytän (= P). Sekundäre Spermatozyte (= II). Anschließend folgen die Stadien der Spermiozytose (= Sa, Sb1, Sb2, Sc, Sd1, Sd2), in deren letztem Schritt sich der größte Teil des Zytoplasmas vom Spermatischen Kopf abschnürt und als Residualkörperchen (= Rb) abgestoßen wird.

1.3 Anatomie und Physiologie des Epididymis

Der Nebenhoden, *Epididymis*, besteht aus einem 4 - 6 m langen, aufgeknäulten Schlauchsystem, welches, von einer dünnen Bindegewebshülle umgeben, sich dem Hoden von dessen dorsaler Seite anlagert (Abb. 6). Dabei lässt sich der *Epididymis* grob makroskopisch in drei Teile gliedern, dem Nebenhodenkopf (*Caput*) (Abb. 6, Abschnitt 1+2),

der dem oberen Hodenpol aufliegt, dem Mittelstück (*Corpus*) (Abb. 6, Abschnitt 3) und dem Nebenhodenschweif (*Cauda*) (Abb. 6, Abschnitt 4) auf der Höhe des unteren Hodenpols (Holstein, 1994).

Die Spermatozoen verlassen die *Tubuli seminiferi contorti* und gelangen durch das *Rete testis* in die 12-18 *Ductuli efferentes* mit einer Länge von 10 - 12 cm (Holstein, 1994). Diese bilden den größten Teil des Nebenhodenkopfes und münden in den *Ductus epididymidis*, der mit einer Länge von 5 - 6 m *Corpus* und *Cauda* des Nebenhodens bildet. Die Nebenhodenpassage der Spermien nimmt beim Menschen einen Zeitraum von etwa 12 Tagen in Anspruch. In dieser Zeit durchlaufen die Spermien einen funktionellen Reifungsprozess. Von großer Bedeutung sind dafür die in der Nebenhodenflüssigkeit in hoher Konzentration enthaltenen Substanzen Glycerophosphorylcholin (→ Reifung der Spermatozoen), Glykopolysaccharide (→ bilden vermutlich einen Überzug auf der Spermatozoenzellmembran) und Inositol, die vom Nebenhodenepithel selbst produziert und sezerniert werden sowie Carnitin (→ biochemischer Co-Faktor, notwendig zur Ausreifung des für den Bewegungsstoffwechsel notwendigen chemischen Apparates). Diese werden aktiv aus dem Blut in das Lumen transportiert. Aber auch die geringe Konzentration an Steroiden nimmt einen wesentlichen Einfluss auf die Reifung und den Stoffwechsel der Spermien. Die reifen Spermien werden dann in den distalen Bereichen der *Cauda epididymidis* gespeichert. Im Regelfall werden die überalterten und überschüssigen Samenzellen durch Abgabe in den Urin entfernt und somit ein kontinuierlicher Umsatz gewährleistet (Cooper & Yeung, 2000).

Auch auf *Epididymis*-Ebene bestehen ähnlich wie beim *Testis* protektive Mechanismen, welche die Spermatozoen vor autoaggressiven Zellen des Immunsystems schützen sollen. So limitieren die *Tight junctions* einen Transport immunkompetenter Zellen in das Lumen des Nebenhodenganges, jedoch ist ihre Funktion weniger suffizient im Vergleich zur *Zonula occludens*, der Blut-Hoden-Schranke des Testis. Als weiterer Schutzmechanismus ist das Fehlen von MHC I / II-Antigenen auf der Oberfläche der Spermatozoen zu werten, welche die Lymphozyten (CD 4 und CD 8), die auch unter physiologischen Bedingungen in geringer Zahl im Nebenhodenepithel vorkommen, zur Antigen-Reaktion benötigen. Auch Bestandteile des Komplementsystems lassen sich nachweisen. Sie sind im Lumen des Nebenhodenganges aber nur in sehr geringer Konzentration vorhanden. Zusätzlich werden noch Komplement-Inhibitoren freigesetzt (Cooper & Yeung, 2000).

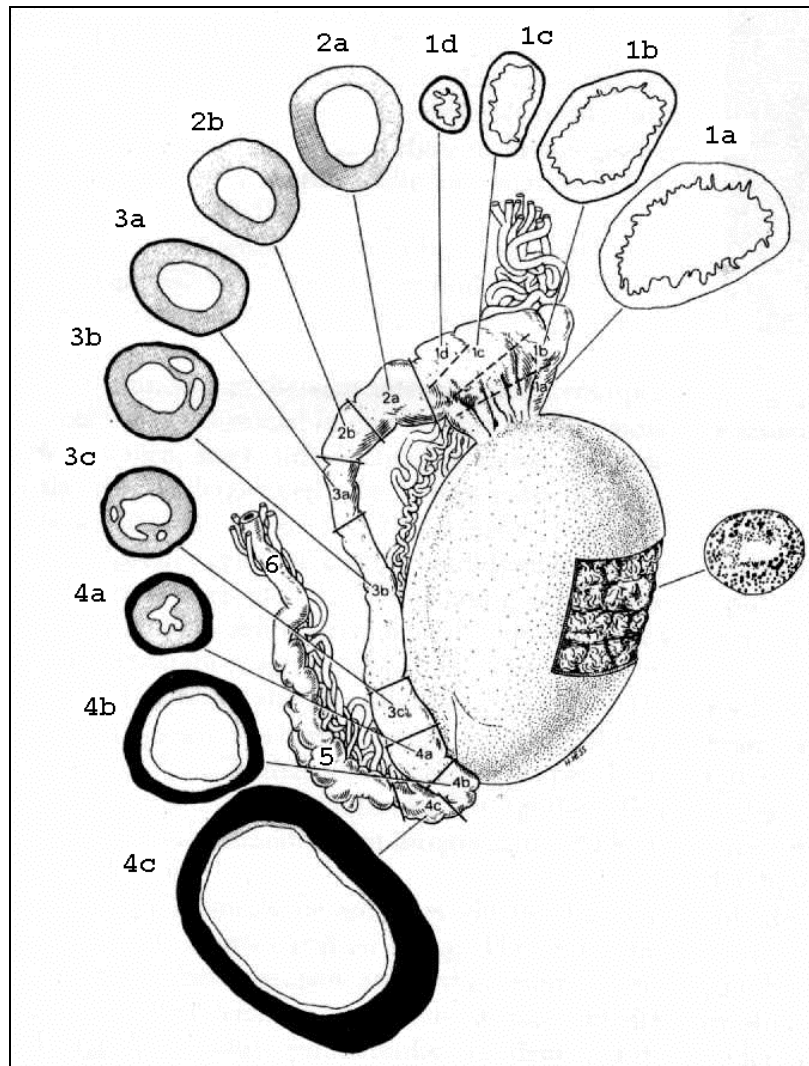


Abb. 6: Halbschematische Zeichnung von Hoden und Nebenhoden mit seinen verschiedenen Abschnitten (modifiziert nach Holstein, 1985, Darstellung aus Holstein, 1994).

Die Querschnitte der jeweiligen Nebenhodenabschnitte berücksichtigen die Epithelverhältnisse (grau) und die von *proximal* nach *caudal* zunehmende Dicke der Muskelwand (schwarz).

Der Caput epididymis besteht vorwiegend aus den Ductuli efferentes (1a-d). Ihre Wand besteht aus einem mehrreihigen Epithel mit hochprismatischen Zellen (*Mikrovilli* sowie *Kinozilien* an der Oberfläche) und mehreren Lagen gering differenzierter, dünner, glatter Muskelzellen. Die Lichtung hat eine sägeblattartige Kontur. Im Nebenhodenkopf treten auch die ersten Windungen des Ductus epididymidis mit den Einmündungen der Ductuli efferentes (2a-b) auf. Die Lichtung des Ductus epididymidis ist glatt begrenzt. Die Wand besteht aus den der Basalmembran aufsitzenden Basalzellen und einem zweireihigen hochprismatischen Epithel (mit *Sterozilien* an der Oberfläche). Im Bereich des Corpus epididymidis (3a-c) nimmt das Lumen des Ductus zunehmend ab, ebenso die Höhe des Epithels. Die Zahl der Lagen glatter Muskelzellen nimmt zu. Am Übergang zum Cauda epididymidis (4a) ist das Lumen am engsten und die Wand des Ductus zeigt längsgestellte Schleimhautfalten. Die Muskelwand wird durch von außen aufgelagerte dicke, glatte Muskelzellen verstärkt. In den weiteren Abschnitten des Nebenhodenschwanzes (4b-c) erweitert sich das Lumen. Das Epithel ist relativ flach. Es zeigt sich ein kräftig entwickelter Mantel aus glatten Muskelzellen. Hier findet vorerst die Speicherung der Spermatozoen statt. Die Abschnitte 5 und 6 bezeichnen den Ductus deferens (*pars epididymica* und *libera*). Die Wand besteht aus dicken, glatten Muskelzellen, die in 3 zirkulären Schichten verlaufen.

1.4 Kallikrein-Kinin-System

Bei Säugern existieren zwei voneinander unabhängige Kallikrein-Kinin-Systeme (KKS), ein lokales Gewebs-KKS und ein Plasma-KKS, welches seine Rolle in der Blutgerinnung einnimmt. Das lokale Gewebs-KKS wird im Folgenden näher charakterisiert.

1.4.1 Komponenten des Gewebs-Kallikrein-Kinin-Systems

Das Gewebs-KKS (t-KKS) ist eine enzymatische Kaskade (Abb. 7), deren zentraler Punkt (als Fokus dieser Dissertation) das Gewebs-Kallikrein als proteolytische Kininogenase bildet. Die von ihr umgesetzten Substrate, niedermolekulare Kininogene, werden zu Kininen gespalten. Sie wirken als spezifische Effektoren auf Rezeptoren. Durch Kininasen, abbauende Enzyme, werden die Kinine schnell wieder in inaktive Peptide gespalten (Schill & Miska, 1992). Diese t-KKS-Enzymkaskade hat einen Verstärkungseffekt zur Folge. Somit ist trotz einer geringen Kininogen Ausgangsmenge eine ausreichende Signaltransduktion gewährleistet.

Die Familie der Kallikreine besteht neben dem echten Gewebs-Kallikrein noch aus zahlreichen weiteren Proteinen. Da diese untereinander eine ausgeprägte Homologie aufweisen, konnten sie mit klassisch biochemischen Methoden nicht näher analysiert werden. Das molekulare Kloning der Gene war notwendig, um Anzahl und Expression der Kallikrein-Familienmitglieder zu ermitteln (Wines *et al.*, 1989).

In der Literatur finden sich variierende Angaben über die Anzahl der für die Kallikrein-Familie codierenden Gene. Während Diamandis & Yousef sowie Petraki im humanen System 15 Gene, bezeichnet als hKLK1 – hKLK15, beschrieben (die von ihnen codierten Proteine werden entsprechend als hK1 – hK15, also humane Kallikreine 1 - 15 bezeichnet; Diamandis & Yousef, 2001; Petraki *et al.*, 2003), gingen Gan und Mitarbeiter von 13 Serin-Protease-Genen und weiteren 5 Pseudogenen aus. Pseudogen bedeutet, dass nur ein Teil der Serin-Protease codierenden Region enthalten ist und die Introns fehlen (Gan *et al.*, 2000).

Auch bei der Ratte lassen sich in der Literatur verschiedene Angaben über die Anzahl der identifizierten Mitglieder der Kallikrein-Familie finden. Ältere Quellen von Wines *et al.* (1989) zeigten die Existenz von 17 Genen auf rKLK1 – rKLK17, während Clements *et al.* (1992) von 20 Genen sprachen. Dabei codierte rKLK1 für das „wahre“ Gewebs-Kallikrein („true tissue kallikrein“).

Trotz der ausgeprägten Sequenzhomologie innerhalb der Kallikrein-Familie, die die Identifikation der einzelnen Proteine sehr erschwert hat, unterscheiden sich die einzelnen Mitglieder durch eine stark ausgeprägte Substratspezifität.

Das t-KKS und damit die Protease Gewebs-Kallikrein sind nahezu ubiquitär im Organismus vorhanden und konnte in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden.

Mittels Northern blot gelang der Nachweis des Gewebs-Kallikrein-Gens (KLK1) in Speicheldrüsen, Niere und Pankreas von Ratte und Mensch (Clements *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1993), außerdem im Gastrointestinaltrakt, genauer gesagt in Magen, Duodenum und Colon von Ratten (Fuller *et al.*, 1989) sowie im Gehirn und dabei vor allem in der Hypophyse (=Hirnanhangsdrüse) (Clements & Fuller, 1990) und Epiphyse (= Zirbeldrüse) (Kitagawa, 1991).

Ein positiver Nachweis der enzymatischen Aktivität des Gewebs-Kallikreins gelang ebenfalls in Herz- und Gefäßmuskelzellen von Ratte und Mensch (Nolly *et al.*, 1981), auf neutrophilen Granulozyten (Figuroa *et al.*, 1988; Figuroa & Bhoola, 1989), der humanen Plazenta (Malofiejew, 1973), im Tumorgewebe (Jones *et al.*, 1990; Rehbock *et al.*, 1995) sowie in einer Vielzahl von Drüsengeweben wie Schweißdrüsen (Poblete *et al.*, 1991), Speicheldrüsen (Simson & Chao, 1994), Nasenschleimhautdrüsen (Christiansen, 1987, Baumgarten *et al.*, 1989), Brustdrüsengewebe und submuköse Drüsen der Lunge des humanen Organismus (Christiansen, 1987; Baumgarten *et al.*, 1989).

Weitere Studien konnten durch die äußerst sensitive Reverse-Transcriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) die Expression von KLK1 im Reproduktionstrakt nachweisen, dazu gehörten Brustdrüse der Maus, Ovarien, Uterus und Testis der Ratte sowie Myometrium und Endometrium des humanen Uterus (Clements *et al.*, 1992, 1994, Valdes *et al.*, 1993, Jahnke *et al.*, 1994). Auch konnte mit dieser Methode der Kallikrein-Nachweis in Hypophysentumoren geführt werden (Clements *et al.*, 1996).

Mittels immunhistologischer Verfahren gelang weiterhin der Nachweis von Gewebs-Kallikrein im Brustdrüsengewebe (Rehbock *et al.*, 1995) sowie im Drüsenepithel von Prostata, Nebenhoden und in den Sertoli-Zellen des humanen *Testis* (Saitoh *et al.*, 1987).

Die Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe, die bislang den immunhistochemischen Gewebs-Kallikrein-Nachweis im Rattenhoden erbracht haben, zeigen die Protease im Bereich der runden und elongierten Spermatozyten (Monsees *et al.*, 1999, 2003). Eine Kallikrein-positive Reaktion in den Sertoli-Zellen konnte nicht erbracht werden. Weiterhin blieb der Nachweis der Protease in Leydig-Zellen, *Peritubulär*-Zellen, Spermatozyten und Spermatozoen (Monsees *et al.*, 1999) negativ. Nicht zuletzt konnte auch t-KKS in verschiedenen Sekreten des Menschen nachgewiesen werden, dazu gehörten neben Schweiß (Poblete *et al.*, 1991), Amnionflüssigkeit (Malofiejew, 1973) und Synovialflüssigkeit bei Gelenkarthritis (Bhoola & Dieppe, 1991) auch Seminalplasma (Fink *et al.*, 1985).

Das Gewebs-Kallikrein ist über die Wirkung von Kallidin bzw. Bradykinin in eine Vielzahl von Prozessen im Organismus involviert, die sowohl auf physiologischen als auch auf pathologischen Mechanismen beruhen. Je nach Art des Zielgewebes konnten unterschiedliche Zellantworten beobachtet werden:

- Regulation des lokalen Blutflusses und des Blutdrucks (Mills, 1979; Saitoh & Kumamoto, 1988; Margolius, 1995)
- Permeabilitätssteigerung der Gefäßwände → Ödembildung (Naidoo & Bhoola, 1997)
- Einfluss auf Natrium- und Glukose- Transport (Clements, 1997)
- Zellproliferation, Zelldifferenzierung (Rixon & Whitfield, 1973)
- Kontraktion der glatten Muskulatur, z. B. Uterus, Ileum, Bronchien (Collier *et al.*, 1960)
- Schmerzentstehung, stärkster natürlicher Schmerzereger auf Peptidbasis (Steranka *et al.*, 1988)
- Entzündungsreaktionen mit seinen Kardinalsymptomen (calor, rubor, dolor tumor) (Lewis, 1970)
- Zellwanderung zum Ort der Entzündung (z. B. Rheuma, Arthritis) (Bhoola & Dieppe, 1991)
- Modulation der renalen Funktion (McGiff *et al.*, 1976)

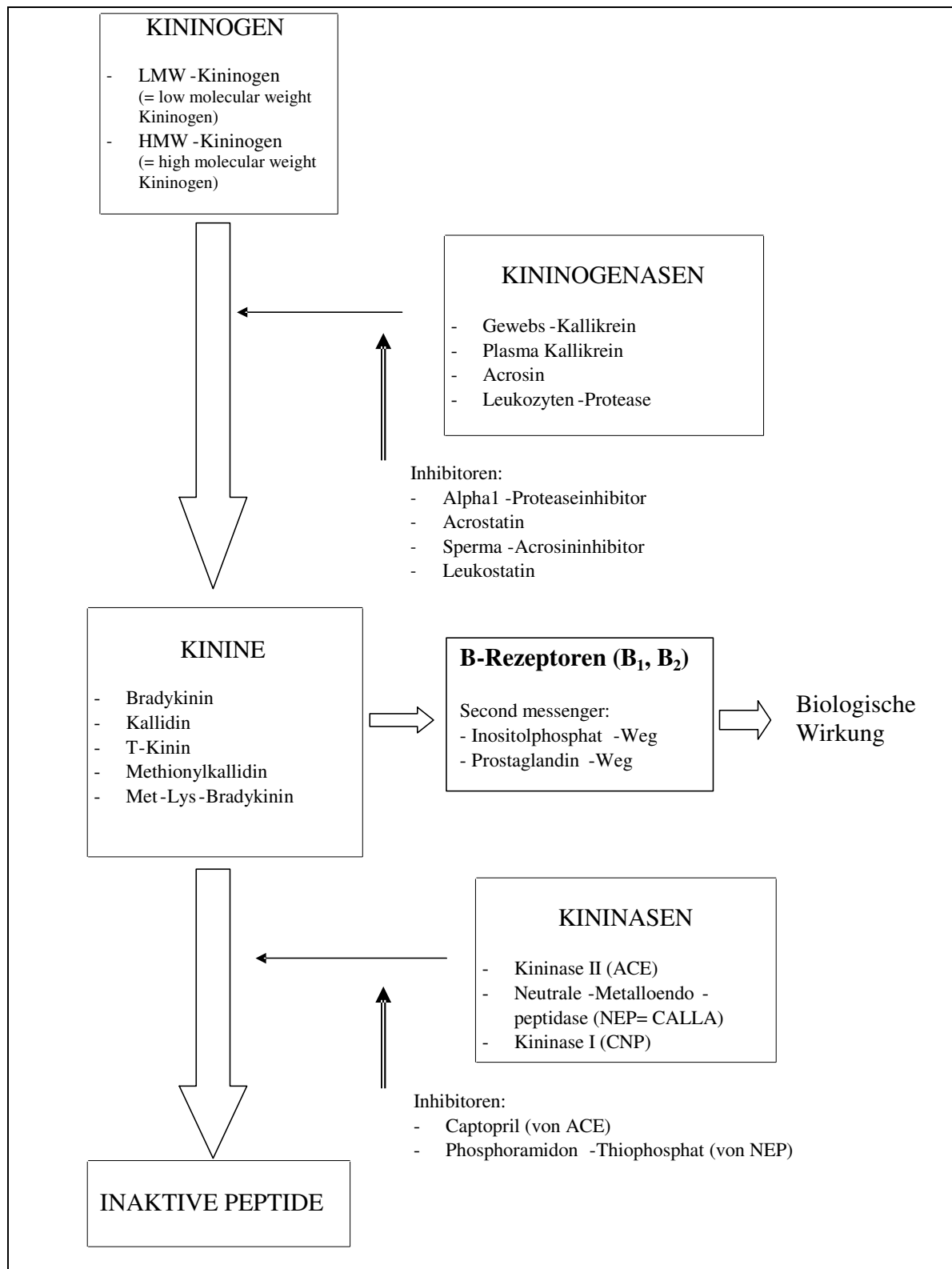


Abb. 7: Schematische Darstellung der enzymatischen Kaskade des Gewebs-Kallikrein-Kinin-Systems (modifiziert nach Schill & Miska, 1992)

1.4.2 Kininogene

Kininogene sind die endogenen Substrate sowohl für das Gewebs- als auch für das Plasma-Kallikrein. Sie bestehen aus einem Einzelstrang-Glykoprotein. Zu unterscheiden sind hier zum einen das Low-molecular-weight-Kininogen (LMW-Kininogen), bestehend aus 409 Aminosäuren und einem Molekulargewicht zwischen 50 und 68 kDa und das High-molecular-weight-Kininogen (HMW-Kininogen) mit 626 Aminosäuren und 88 bis 120 kDa. Die für sie codierenden Gene, auch als K-Gene bezeichnet, sind auf dem Chromosom 3q26 lokalisiert (Margolius, 1996). Bei der Ratte ließ sich zusätzlich noch das Trypsin-sensitive-Gen (T-Gen) identifizieren, welches für T-Kininogen codiert. Dieses Gen scheint aus einer Genduplikation entstanden zu sein (Margolius, 1996) und ist das wichtigste Akute-Phase-Protein dieser Spezies (Müller-Esterl, 1993).

Die Kininogene sind Mosaikgene, die während der Evolution durch die Fusion einzelner genetischer Komponenten entstanden sind. Aus diesem Grunde kann ihre Aminosäuresequenz in Domänen eingeteilt werden, denen jeweils eine spezifische Bedeutung zukommt. Die Kininsequenz, die 1-2 % des Molekulargewichts ausmacht, ist die 4. Domäne. Domäne 1 dient der Bindung von Metallionen wie Calcium, Domäne 2+3 sind verantwortlich für die Inhibition von Cysteinproteasen, sowie die Domäne 3 zusätzlich für das Andocken von Thrombozyten. Bei dem LMW-Kininogen ist die Funktion der 5. Domäne unbekannt, bei dem HMW-Kininogen ist sie verantwortlich für die Bindung an Oberflächen von Subendothelien. Das HMW-Kininogen besteht zusätzlich noch aus einer 6. Domäne, sie dient der Komplexierung von Gerinnungsfaktoren. Das Kallikrein spaltet nun das Kininogen an zwei Bindungsstellen innerhalb der 4. Domäne und setzt so die Kinine frei (Müller-Esterl *et al.*, 1986).

Die Kininogene werden durch Proteolyse aus den Präkininogenen synthetisiert, in Leber (Müller-Esterl *et al.*, 1986) und Niere (Takano *et al.*, 1997) freigesetzt, ins Plasma sezerniert und mit dem Blutstrom in die Peripherie transportiert (Müller-Esterl *et al.*, 1986). LMW-Kininogen wird zusätzlich noch in Nebenniere, Gehirn, Rückenmark, Hoden, Lunge, Herz und Haut exprimiert. Die Regulation dieser Genexpression unterliegt dem Einfluss von Hormonen und Stressfaktoren (Margolius, 1996). Nach akuten Entzündungen steigt die Menge an Kininogen in der Leber, aber auch im Plasma, sehr stark an, während es in anderen Geweben (Azinuszellen und Granularzellen der Speicheldrüse, in den Sammelrohren der Niere) zu keiner diesbezüglichen Veränderung kommt (Chao *et al.*, 1988).

1.4.3 Gewebs-Kallikrein

Das echte Gewebs-Kallikrein ist ein thermolabiles, saures Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 24 und 45 kDa (das unterschiedliche Gewicht ist bedingt durch variable Glykolysierungen) und einem isoelektrischen Punkt zwischen 3,5 und 4,4 (Margolius, 1996). Es gehört zu den Serin-Proteasen. Die Proteasen werden nach ihren Reaktionsmechanismen klassifiziert, so ist z. B. bei den Serin-Proteasen ein Serin-Rest im Enzym für die katalytische Aktivität verantwortlich. Der Einschluss der Aminosäure-Triade Histidin-Asparagin-Serin ist für die katalytische Aktivität von elementarer Bedeutung (Neurath, 1989). In der Erfüllung seiner Aufgabe als Protease ist das Gewebs-Kallikrein sehr substratspezifisch. Das von ihr primär gespaltene Substrat ist das Low-molecular-weight-Kininogen (LMW-Kininogen); die Proteolyse von High-molecular-weight-Kininogen (HMW-Kininogen) obliegt dem Plasma-Kallikrein.

Das „wahre“ Gewebs-Kallikrein (true tissue kallikrein) kommt vor allem an der Oberfläche von exokrinen Drüsenzellen vor, daher rührt sein historischer Name Drüsen-Kallikrein (glandular kallikrein) (MacDonald *et al.*, 1988). Weiterhin befindet es sich an der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und in biologischen Flüssigkeiten (Naidoo & Bhoola, 1997).

Die Regulation der Kallikrein-Wirkung erfolgt hauptsächlich durch den potenten Inhibitor *basic pancreatic trypsin inhibitor* (BPTI) (Müller-Esterl, 1993).

Das Kallikrein liegt zunächst als Präproenzym vor (Swift *et al.*, 1982). Der Präpeptidanteil erfüllt die Aufgabe eines Sekretionspeptids, während das Propeptid zur Aktivierung dient. Das endogene Enzym, welches die proteolytische Spaltung des Kallikreins aus dem Präkallikrein bewirkt, ist jedoch noch nicht gefunden (Clements, 1997).

Das Gen, das für das humane Kallikrein codiert, liegt auf dem Chromosom 19q13 und wird als hKLLK1 bezeichnet (Margolius, 1996). Auf diesem Chromosomenabschnitt sind noch weitere Serin-Protease-Gene lokalisiert (Diamandis & Yousef, 2001; Diamandis, 2002; Gan *et al.*, 2000). Eine große Ähnlichkeit der enzymatischen Aktivität dieser hier codierten Proteasen und die sehr hohe Sequenzhomologie bedingt durch die Konservierung der Primär- und Tertiärstruktur lässt vermuten, dass die Serin-Proteasen auf einen gemeinsamen Ursprung zurückgehen und in der Evolution durch Gen- oder Chromosomenduplikation entstanden sind (Gan *et al.*, 2000). Dieser konservative Erhalt von Struktur und Organisation der Kallikrein-Gen-Familie wird auch belegt durch identische Exon- und Intronorganisation bei Ratten-, Maus- und humanen Genen (Wines *et al.*, 1989).

1.4.4 Kinine

Kinine werden als integrale Bestandteile von hochmolekularen Vorstufen, den Kininogenen mittels limitierter Proteolyse durch Kallikrein freigesetzt (Müller-Esterl *et al.*, 1986; Bhoola *et al.*, 1992). Sie haben evolutionär gesehen eine hoch konservierte Aminosäuresequenz, die sich mit geringer Modifikation in allen Vertebraten-Klassen wieder findet. Prototyp der Kinine ist das Nonapeptid Bradykinin (BK). Weiterhin gibt es noch aminoterminal verlängerte Bradykininformen, das Kallidin (KD = Lysin-BK), ein Dekapeptid, sowie das t-Kinin (Ile-Serin-BK) und das Methionylkallidin (Met KD = Methionin-Lysin-BK) (Müller-Esterl, 1993). Eine vorwiegend lokale Wirkung der Kinine wird durch ihre lokale Freisetzung, dem effizienten Abbau und einer extrem kurzen biologischen Halbwertszeit mit 30 Sekunden gewährleistet (Soubrier *et al.*, 1988).

Nach heutigem Wissensstand üben die Kinine ihre Wirkung hauptsächlich über die Bindung an spezifische Rezeptoren aus, die daraufhin innerhalb der Zelle eine *Second-messenger*-Antwort auslösen. Diese *Second messenger* lassen sich hier in 2 Gruppen teilen: die erste führt zu biologisch aktiven Peptiden, z. B. Prostaglandinen, die zweite Gruppe bewirkt die Aktivierung des Ca²⁺-sensitiven Systems (Schill & Miska, 1992; Blaukat, 2003).

Eine erwähnenswerte Rolle nehmen auch die neutrophilen Granulozyten ein. Diese stellen eine Art „wandelndes Kinin-System“ dar, da sie auf ihrer Oberfläche Bindungsstellen sowohl für Kininogen als auch für Kallikrein besitzen und somit zur Kinin-Produktion befähigt sind (Figueora *et al.*, 1992; Naidoo, 1997).

Kinine kommen physiologischerweise auch in den Sekreten wie Speichel, Schweiß, Ejakulat und Urin vor (Margolius, 1996), sie besitzen aber zudem eine mitogene Potenz und wirken somit evtl. als parakriner Proliferationsstimulus auf einige Tumorzellarten (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993).

Dysregulation oder Schädigung, die zu einem Kinin-Mangel oder Kinin-Rezeptordefekt führen und dadurch eine Organdysfunktion oder Krankheit hervorrufen, können nicht durch andere Systeme kompensiert werden. Zu derartigen Manifestationsformen werden z. B. arterieller Hypertonus sowie Reduktion der Quantität und Motilität von Spermatozoen gezählt (Schill & Miska, 1992).

1.4.5 Rezeptoren

Die Kinine üben ihre Wirkung auf die Zielzelle über spezifische Rezeptoren aus. Es werden zwei Rezeptortypen unterschieden, der Bradykinin-B₁- und der Bradykinin-B₂-Rezeptor (Regoli & Barabe, 1980). Bei den B₁- und B₂-Rezeptoren handelt es sich um G-Proteingekoppelte-Rezeptoren. Das bedeutet, dass die Signaltransduktion von der Rezeptorbindung bis zur Auslösung eines biologischen Effekts über eine kaskadenartige Reihe von Mediatoren und Botenstoffen geleitet wird. Der Bradykinin-Rezeptor ist an den Inositolphosphat-Stoffwechselweg gekoppelt, kann aber auch alternativ den Prostaglandin-Weg nutzen. Auf diese Weise ist die Vielfältigkeit der Kinin-Wirkung zu erklären, denn je nach Zielzelle werden unterschiedliche G-Proteine aktiviert und somit kommt es zu den verschiedenen Signaltransduktionen (Müller-Esterl, 1993).

Eine Modulation der Kinin-Wirkung wird auf Rezeptor-Ebene erzielt, indem nach einmaliger Kinin-Stimulation des Liganden zunächst eine Phase der Desensibilisierung folgt, d. h. für eine gewisse Latenzzeit ist der Rezeptor für Kinine unempfindlich. Zudem werden Rezeptor gebundene Kinine internalisiert, d. h. ins Zellinnere aufgenommen. Der Rezeptor wird intrazellulär recycelt und dann wieder auf der Zelloberfläche präsentiert (Lamb *et al.*, 2001).

Die Expression des Kinin-Rezeptors erfolgt auf einem ziemlich niedrigen Niveau, so besitzt z.B. ein Fibroblast lediglich 5×10^4 Kinin-Rezeptor-Moleküle, welches die Problematik der proteinchemischen Isolierung erklärt (Faußner *et al.*, 1991).

Bradykinin- B₁-Rezeptor

Die aus 353 Aminosäuren aufgebauten B₁-Rezeptoren (Regoli *et al.*, 1997) weisen nur eine geringe Sequenzhomologie zu den B₂-Rezeptoren auf (Hess *et al.*, 1992, 1996). Die Aktivierung des B₁-Rezeptors erfolgt durch Arg⁹BK, dem Abbauprodukt des Bradykinin (Figuroa *et al.*, 1995; Müller-Esterl, 1993). Von Regoli *et al.* (1997) werden zusätzlich eine Aktivierung durch desArg¹⁰BK, dem Abbauprodukt des Kallidin beschrieben. Es handelt sich bei diesem Rezeptor nicht um einen konstitutiven, sondern um einen induzierbaren Rezeptor (Regoli & Barabe, 1980; Tokumasu *et al.*, 1995). Der Rezeptor bzw. seine Funktion, konnte bisher nur unter pathologischen Voraussetzungen wie Traumen oder Entzündungen nachgewiesen werden. Eine Rezeptor-Induktion kann z. B. durch Interleukin 1b, Wachstumsfaktoren und Bakterien-Toxine wie Lipopolysaccharid (LPS) hervorgerufen werden (Regoli *et al.*, 1997).

Zu den vom B₁-Rezeptor vermittelten Reaktionen gehören: Vasokonstriktion, Vasodilatation, Venenkonstriktion, Stimulation des sensorischen Nervensystems (Schmerzauslösung) und der glatten Muskulatur sowie die Aktivierung verschiedener Zellen, z. B. zur Kollagensynthese (Regoli *et al.*, 1997).

Bradykinin-B₂-Rezeptor

Der B₂-Rezeptor, aus 364 Aminosäuren bestehend (Regoli *et al.*, 1997), ist ein integrales Membranprotein mit sieben die Membran durchspannenden Regionen, den so genannten Transmembrandomänen. Sowohl ihre Aminosäuresequenz als auch die entsprechenden Gene sind für Ratte, Maus und Mensch schon weitgehend identifiziert (McEachern *et al.*, 1991; Hess *et al.*, 1992; Eggerickx *et al.*, 1992; Hess *et al.*, 1993; McIntyre *et al.*, 1993; Pesquero *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Kammerer *et al.*, 1995). Allen drei Spezies ist gemein, dass das Gen für den B₂-Rezeptor aus drei Exons und zwei Introns besteht und die kodierende Region innerhalb des dritten Exons lokalisiert ist.

Die Effektoren der B₂-Rezeptoren sind BK (beim Mensch) und KD (bei der Ratte). Binden diese Moleküle an den Rezeptor wird innerhalb der Zelle eine G-Protein gekoppelte *Second messenger* Reaktion ausgelöst. Als *Second messenger* können verschiedene Substanzen aktiviert werden:

- über die Aktivierung der Phospholipase C ($G_{\beta/11}$ gekoppelt) werden Inositolphosphat, Diacylglycerol und/oder Calcium-Ionen freigesetzt (Nishizuka, 1992).
- durch Stimulation von Phospholipase A₂ und D, ebenso wie von Spingosinkinase, kommt es zum intrazellulären Anstieg der *Second messenger* Arachidonsäure (und damit Prostaglandinen), Phosphatidsäure oder Spingosin-I-Phosphat (Burch & Axelrod, 1987).
- durch GDP/GTP-Stimulation entstehen ($G_{\alpha_{12,13}}$ gekoppelt) „small G-Proteins“ (Roh, CDc42) oder (G_{α_1} und G_{α_s} gekoppelt) wird der intrazelluläre cAMP-Level moduliert, der wiederum die Proteinkinase A aktiviert (Gohla *et al.*, 1999; Graness *et al.*, 1997).

Entsprechend den freigesetzten Botenstoffen werden unterschiedliche zelluläre Reaktionen ausgelöst wie Hypertonie, Ödembildung etc. (Farmer & Burch, 1992; Blaukat, 2003).

Im Gegensatz zu dem B₁-Rezeptor handelt es bei dem B₂-Typ um einen konstitutiven Rezeptor. Er gehört zu der Gruppe der rhodopsinähnlichen Proteine, welche auch die Signalübertragung bei Sehvorgängen, Riechprozessen und Hormonwirkung leisten (McEachern *et al.*, 1991; Ni *et al.*, 1998).

Mittels *Northern blot* konnte die *messenger-RNA* des B₂-Rezeptors sowohl im Testis-Homogenat als auch im Sertoli-Zellextrakt von Ratten nachgewiesen werden (Monsees *et al.*,

1999). Zuvor gelang Mc Eachern und Mitarbeiter mit gleicher Methodik der Nachweis u. a. im Herzmuskel und in Gefäßen, in der Lunge, im Gehirn, in der Niere, im Testis und im Uterus der Ratte (Mc Eachern *et al.*, 1991).

Entgegen der vorläufigen Annahme konnte in neueren Studien kein B₂-Rezeptor auf ejakulierten Spermatozoen detektiert werden, somit ist der Mechanismus mit dem Bradykinin seinen antriebssteigernden Effekt auf die Spermatozoenmotilität ausübt weiterhin ungeklärt (Siems *et al.*, 2003). Monsees *et al.* konnten bei *in situ* Experimenten mit Rattentestisschnitten eine deutliche Expression des B₂-Rezeptors an Spermienvorstufen, den pachytänen Spermatozyten sowie den runden und elongierten Spermatiden in den *Tubuli seminiferi contorti* nachweisen (Monsees *et al.*, 2002, 2003).

1.4.6 Kininabbauende Enzyme

Maßgeblich für die Limitierung der Kinin-Wirkung sind Kininasen. Dies sind kininabbauende Proteasen, die nahezu ubiquitär in biologischen Geweben und Sekreten vorkommen. Von besonderer Bedeutung ist die membrangebundene Kininase II, auch Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) genannt. Von dieser gibt es zwei Isoformen, somatisches ACE und testikuläres ACE. Beide Isoformen werden durch dasselbe Gen kodiert (Ehlers *et al.*, 1989). Ihre Transkription wird durch zwei unterschiedliche Promoter reguliert (Hubert *et al.*, 1991). Das somatische ACE wird auf verschiedenen Geweben und Zelltypen demonstriert z. B. Epithelzellen diverser Drüsen, Niere, *Epididymis*, Zellen des Immunsystems (Sibony *et al.*, 1993), aber auch auf Leydig-Zellen und testikulären Endothelzellen (Franke *et al.*, 1996). Das testikuläre ACE ist auf die post-meiotischen Keimzellen beschränkt und wird auf der Oberfläche von Spermatiden und Spermatozoen adulter Männer bzw. geschlechtsreifer Säugerspezies gefunden (Langford *et al.*, 1993; Sibony *et al.*, 1993, 1994). ACE wurde an Leydig-Zellen von Mensch, Ratte und Rhesusaffe gefunden, so dass eine regulatorische Wirkung von ACE bei der Modulation der parakrinen Leydig-Zellfunktion diskutiert werden muss (Schill & Miska, 1992). Weiterhin konnte es von Monsees *et al.*, (1996 a) auch an der Sertoli-Zell-Membran von Ratten nachgewiesen werden. ACE ist außerdem ein Schlüsselenzym im Renin-Angiotensin-System (u. a. in der Niere lokalisiert) und bildet somit eine Verbindung zwischen diesem und dem KKS (Müller-Esterl, 1993).

Weitere Kininasen sind die Neutrale Metalloendopeptidase (NEP) und die Kininase I, auch als Carboxypeptidase N (CPN) bezeichnet, zu deren Synthetisierung und Sekretion sowohl

die *Peritubulär*-Zellen als auch die Sertoli-Zellen des Hodens befähigt sind. Ebenso wie ACE handelt es sich auch bei NEP um eine an der Membran von Sertoli-Zellen lokalisierte zinkhaltige Metalloprotease (Monsees *et al.*, 1996 a). Anhand von Versuchsreihen an Sertoli-Zell-Kulturen konnte die Hauptverantwortlichkeit des NEP 24.11 für die schnelle Inaktivierung des Bradykinin herausgestellt werden (Monsees *et al.*, 1996 b, Monsees *et al.*, 1998). Im Seminalplasma stellen ACE, das zu 70 % aus der Prostata stammt (Schill & Miska, 1992) und NEP, welche vor allem in *Epididymis* und Prostata gebildet werden, die Hauptkininasen dar (Erdös *et al.*, 1985; Schill & Miska, 1992). Die Neutrale Metalloendopeptidase (NEP) 24.11, auch Enkephalinase genannt, ist nach mRNA-Sequenz-Analyse identisch mit dem human common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA, clone 5; Letarte *et al.*, 1988) und wird daher bevorzugt zur Lokalisierung von NEP in Mensch und Ratte verwendet.

Das Antigen wird bei verschiedenen Non-Hodgin-Lymphomen gefunden, auf einer geringen Anzahl normaler Knochenmarkszellen und einigen normalen Granulozyten, aber auch im normalen *Tubulus*- und Glomerulaepithel der Niere, Myoepithelzellen der Brust sowie der fetalen Leber (Ritz *et al.*, 1981; Cossmann *et al.*, 1983).

Des Weiteren sind noch die Aminopeptidase P sowie das Post-proline-cleaving-enzyme zu erwähnen, bei denen es sich ebenfalls um membrangebundene kininabbauende Enzyme handelt (Monsees *et al.*, 1996 b).

1.4.7 Lokalisation und Wirkung des Kallikreins auf den männlichen Reproduktionstrakt

Das Gewebs-KKS übt vermutlich einen Einfluss auf den männlichen Genitaltrakt mit seiner reproduktiven Funktion aus. So ist es auf testikulärem Niveau möglicherweise an der lokalen Regulation der Spermatogenese beteiligt und in den distalen Bereichen in die Regulation und Erhaltung der Spermatozoenmotilität involviert (Schill & Miska, 1992). Der immunhistologische Nachweis von Gewebs-Kallikrein im humanen Reproduktionstrakt gelang in Sertoli-Zellen, den Drüsenzellen der Prostata sowie in den Epithelzellen von *Corpus* und *Cauda* des Nebenhodens, negativ stellten sich dagegen Leydig-Zellen, Keimzellen, Nebenhodenkopf, Samenbläschen und Vas deferens dar (Saitoh *et al.*, 1987). Monsees *et al.* konnten mit spezifischen immunologischen Färbungen bei Ratten das Gewebs-Kallikrein in den runden und den elongierten Spermatischen nachweisen, wobei sich Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen, *Peritubulär*-Zellen, Spermatogonien und Spermatozyten negativ darstellten (Monsees *et al.*, 1996 c, Monsees *et al.*, 1999).

Ebenso lassen sich die meisten Komponenten des KKS (der B₁- und B₂-Rezeptor blieben bei der Analyse unberücksichtigt) in den Sekreten des humanen männlichen Genitaltrakts nachweisen (Schill & Miska, 1992). Die Konzentration des Gewebs-Kallikreins ist im Samen 10-mal so hoch wie im Blut. Das Kallikrein kommt in der Samenflüssigkeit nicht frei, sondern in gebundener Form vor und bildet eine hochmolekulare Komponente (Saitoh *et al.*, 1987). Der wesentliche Inhibitor des Kallikreins im Samen ist der α 1-Proteinase-Inhibitor. Er wirkt als progressiver Inhibitor, der nicht zu einer unmittelbaren Inaktivierung des Enzyms führt (Schill & Miska, 1992).

Der Einfluss des Gewebs-Kallikreins bzw. der Kininogene auf testikulärer Ebene und damit auch auf die Spermatogenesefähigkeit des männlichen Reproduktionstraktes, treten besonders deutlich nach deren systemischen Applikation hervor. Verschiedene Autoren beschreiben bei Mensch und Ratte nach systemischer Kallikreingabe folgende Effekte auf das reproduktive Gewebe:

- Steigerung der Spermatozoenanzahl (Schill & Miska, 1992) evtl. über einen indirekten Effekt der verbesserten Spermienfreisetzung, z. B. durch Einwirkung auf die kontraktile Elemente im *Rete testis* und in den *Ductuli efferentes* (Schill *et al.*, 1988).

- Aktivierung der Sertoli-Zell-Funktion, dies führt bei Ratten zu einer Beschleunigung der Spermatogenese um 1-2 Tage (normal 20 Tage), einer Zunahme der Sertoli-Zellzahl sowie zu einer Vasodilatation im testikulären Gewebe (Saitoh *et al.*, 1988).
- Früheres Auftreten der Spermatogonien bei pubertierenden Ratten (Rohen & Stuttmann, 1977).
- Steigerung des Glukosetransportes, ermöglicht durch erhöhte Membranpermeabilität und gesteigertem testikulären Blutfluss (Schill *et al.*, 1988).
- Erhöhte Thymidin-Aufnahme in das testikuläre Gewebe und dessen Einbau in die DNA (Schill *et al.*, 1988), was auf eine gesteigerte Proliferationsrate testikulärer Zellen deutet.
- Stimulierender Einfluss auf die sekretorische Aktivität von Bläschendrüse und Prostata mit konsekutiver Gewichtszunahme (Werle *et al.*, 1964).
- Förderung der *Epididymis*aktivität (Schill *et al.*, 1988).
- Interferenzen auf der Hypophysen-Gonaden-Achse. So wurde mittels Radioimmunologie ein Anstieg von LH, Prolaktin und Testosteron bei konstanten FSH-Werten beobachtet (Schill & Miska, 1992). Andere Autoren konnten dieses Ergebnis nicht reproduzieren (Török *et al.*, 1978).
- Im Tierexperiment stellt sich eine lokale Kallikrein-Anreicherung im *Ductus epididymidis* dar, nicht aber im Keimepithel (Blasini *et al.*, 1980).

Anhand von *in vitro* Studien mit testikulären Organkulturen der Ratte (4 - 5 Tag) zeigte sich nach Applikation von Bradykinin eine signifikante Zunahme der Prä-spermatogonien (Atanassova, 2003).

In den Sekreten des männlichen Genitaltraktes gibt es neben dem Gewebs-Kallikrein noch zwei weitere Kinin freisetzende Enzyme, zum einen das Akrosin, welches das Spermium im Akrosom trägt und als Penetrationsenzym zur Gametenfusion benötigen soll, zum anderen die Leukozyten-Proteinase (Schill & Miska, 1992).

Von großer Bedeutung sind neben diesen freisetzenden Enzymen auch deren Hemmstoffe, die Proteinase-Inhibitoren. Diese haben eine protektive Funktion, sie vermeiden freie proteolytische Aktivität im männlichen Genitaltrakt, welche sonst schwere Entzündungen nach sich ziehen würde. Zu den Proteinase-Inhibitoren gehört das Acrostatin (HUSI-II),

welches Akrosin hemmt, das Leukostatin (HUSI-I), das die Leukozyten-Proteinase beeinflusst sowie der α 1-Proteinase-Inhibitor, der seine Wirkung nicht unmittelbar durch Kallikrein-Inaktivierung ausübt, sondern als *progressiver* Kallikrein-Inhibitor (Schill & Miska, 1992) fungiert.

Ein weiterer Regulationsmechanismus setzt auf der Kininseite an. Inaktivatoren dieser rezeptorwirksamen Peptide wie Bradykinin sind die Kininase II (ACE) und die Neutrale-Metalloendopeptidase (NEP) (Schill & Miska, 1992).

Anhand von Sertoli-Zellkulturen, denen Bradykinin im Überschuss zugesetzt wurde, konnte mittels HPLC (high-performance liquid chromatographie) ein Bradykininverbrauch erfasst werden, der somit die Präsenz von NEP, ACE und Kininase Typ I (Metallo-carboxypeptidase) unterstreicht (Monsees *et al.*, 1999).

Die Beeinflussung von Spermatozoen durch Gewebs-Kallikrein bzw. Kinine ist an frischem Ejakulat nach vorausgegangener systemischer Applikation getestet worden und wird wie folgt beschrieben:

- Zunahme der Spermatozoenzahl und Geschwindigkeitszunahme der Spermien. Die Ursache wurde in einer direkten Beeinflussung des Spermienmetabolismus und einer indirekten Einflussnahme durch Sertoli-Zellstimulation mit gesteigerter Spermatogenese sowie einem verbesserten Spermienaustritt gesehen (Schroeder-Finckh *et al.*, 1986).
- Signifikanter Zuwachs der Spermienanzahl mit guter Motilität (Schirren *et al.*, 1974).
- Reduktion der Zahl an Spermatozoen mit abnormer Morphologie (Schirren *et al.*, 1974).
- Signifikanter Anstieg der Zervikalmukus-Penetrationsfähigkeit (Wallner *et al.*, 1975).
- Zunahme der Akrosomenreaktionen (Saitoh *et al.*, 1987).
- Leicht verbesserte Überlebensfähigkeit der Spermatozoen (in frischem und eingefrorenem Ejakulat) (Schill & Haberland, 1975).
- Steigerung des Spermienmetabolismus, erhöhte Glukose- und Fruktose-Aufnahme/Verbrauch, erhöhter Sauerstoff-Verbrauch, Produktion von Milchsäure und Kohlendioxid sowie ein geringer Anstieg von intrazellulärem cAMP (Leidl *et al.*, 1975; Schill & Miska, 1992).

In vitro Studien zeigen verschiedene positive Effekte auf die Spermatozoen. So wird durch Kallikreinzugabe zu Ejakulat der Spermienmetabolismus stimuliert (Leidl *et al.*, 1975; Schill,

1978). Ebenso konnte eine leicht verbesserte Vitalität der Spermien (Leidl *et al.*, 1975) sowie eine bessere Mukuspenetrationsfähigkeit (Steiner *et al.*, 1981) nachgewiesen werden. Eine gesteigerte Motilität von Säugerspermatozoen nach Kallikreinzugabe zu frischem Ejakulat ist in mehreren Studien herausgestellt worden (Sato, 1980; Miska & Schill, 1990; Mueller *et al.*, 1991). Der gleiche positive Effekt zeigte sich auch an kryokonservierten humanen Spermatozoen und stellte somit eine Möglichkeit der Qualitätsverbesserung gefrorenen Spermas in Aussicht (Schill *et al.*, 1979). Aufgrund der Ergebnisse dieser *in vitro* Studien wurde die Kallikreingabe zum ejakulierten Samen vor der Befruchtung propagiert (Schill & Littich, 1981).

Sato & Schill (1987) stellten einen temperaturabhängigen Effekt von Kallikrein und Bradykinin auf die Spermien heraus. Deren Motilität und Geschwindigkeit konnten mit Kallikrein bei 22°C signifikant gesteigert werden, bei 37°C war nur in Kombination mit dem spezifischen ACE-Inhibitor Captopril eine positive Beeinflussung nachzuweisen.

Untersuchungen an frisch gewonnenem, ungewaschenem, bei 25° bzw. 37°C inkubiertem Ejakulat haben eine kontinuierliche, temperaturabhängige Kinin-Freisetzung niedriger Konzentration über einen Zeitraum von mindestens 6 - 7 Stunden gezeigt (Schill *et al.*, 1988).

Anhand von *in vitro* Studien mit gewaschenen Spermatozoen, denen *post ejakulationem* Bradykinin (unterschiedlicher Konzentration) zugesetzt worden ist, konnte eine deutliche Motilitätssteigerung beobachtet werden (Schill *et al.*, 1988; Siems *et al.*, 2003). Mit zunehmender Bradykininkonzentration nimmt dieser Effekt den Verlauf einer Sättigungskurve an (Schill *et al.*, 1988). Dieses Ergebnis unterstützt zunächst die These, dass die Bradykininbindung über einen spezifischen, in die Plasmamembran der Spermatozoen eingelassenen Bradykinin-Rezeptor zustande kommt (Schill *et al.*, 1988). Dieser Kinin-Rezeptor konnte aber bis heute nicht nachgewiesen werden, zudem zeigen neue Arbeiten, dass der positive Einfluss von Bradykinin auf Spermatozoen nicht rezeptorvermittelt ist, der genaue Wirkmechanismus ist bislang aber weiterhin unbekannt (Miska & Schill, 1994; Siems *et al.*, 2003).

Darüberhinaus konnten Siems *et al.* (2003) den motilitätssteigernden Effekt von Bradykinin auf die Spermatozoen durch Suppression der Bradykinin-Hydrolyse im Samen (zusätzliche Zugabe von Lisinopril und Phosphoramidon) über einen längeren Zeitraum effektiv aufrechterhalten. Bradykinin unterliegt sonst der schnellen Spaltung durch ACE oder NEP an

der Spermienoberfläche, die die Kinin-Wirkung effektiv limitieren. Bradykinin-Spaltprodukte haben keinen Effekt auf die Spermatozoen.

Schill stellte zur Diskussion, dass Kallikrein einen aktivierenden Effekt auf den Spermatozoenmetabolismus ausübt, da bei Kallikreinapplikation zu frischem Ejakulat sich ein gesteigerter Fruktoseverbrauch zeigte, der über den physiologischen Verbrauch weit hinausreicht (Schill, 1975).

1.4.8 Kallikrein als Medikament?

Die Fertilität des Mannes ist einer Vielzahl von beeinflussenden Faktoren unterworfen, eine Grundvoraussetzung bildet die Homöostase von Hormonen und Enzymen. Ein Ungleichgewicht in diesem empfindlichen System oder Mangel einer bzw. mehrerer Faktoren korreliert häufig mit Fertilitätsstörungen. Aus diesem Grund können viele Enzyme im Ejakulat als Marker für die Spermatogenesefähigkeit und die Motilität der Spermien herangezogen werden. Zudem geben sie wertvolle Hinweise für Diagnostik und Therapiemöglichkeiten infertiler Männer (Saitoh *et al.*, 1987).

In Bezug auf Gewebs-Kallikrein, das ebenfalls zu den die Fertilität beeinflussenden Enzymen gehören dürfte, zeigt sich folgender Aspekt: in der Samenflüssigkeit infertiler Männer steigt mit abnehmender Spermatozoenzahl die Kallikreinkonzentration an. Die ermittelten Werte liegen signifikant über der durchschnittlichen Konzentration im Seminalplasma der gesunden Kontrollgruppe (Saitoh *et al.*, 1987). Saitoh *et al.* meinten in ihrer Studie, das Kallikrein würde verbraucht. Da Kallikrein als Enzym in seiner biologischen Funktionsfähigkeit jedoch keinem Verbrauch unterliegt, ist Saitohs Spekulation eher unwahrscheinlich. Konstatieren lässt sich, dass die Anzahl der Spermien in einem reziproken Verhältnis zur Konzentration des Kallikreins steht. Daraus lässt sich folgern, dass Spermatozoen die Fähigkeit besitzen, entsprechend ihrer Konzentration eine Rückkopplung auf den Kallikreingehalt auszuüben. Denkbar wäre auch ein unabhängiger Faktor, der sowohl die Anzahl der Spermatozoen, als auch die Menge des produzierten Kallikreins beeinflusst. Weniger Spermatozoen könnten somit einem Regelkreis unterliegen, der vermittelt Kallikrein die Reifung und die bessere Mobilität weiterer Spermatozoen zu fördern versucht (vgl. die in den Arbeiten von Schroeder-Finckh *et al.*, 1986; Schirren *et al.*, 1974; Saitoh *et al.*, 1987; Schill & Haberland, 1975; Leidl *et al.*, 1975; Schill *et al.*, 1988; beschriebenen Funktionen).

Kallikrein stellt einen der Ansätze zur Behandlung männlicher Fertilitätsstörungen dar. Klinische Studien zeigen, dass die systemische Kallikrein-Therapie bei Patienten mit verminderter Fertilität zu einem Anstieg der Spermatozoenmotilität und -zahl sowie zu einer Steigerung der morphologisch normalen Spermatozoen führen kann. Weiterhin wurde eine erhöhte Konzeptionsrate beschrieben (Hofmann, 1975; Schill, 1979; Izzo *et al.*, 1984; Micic, 1985; Berzin *et al.*, 1987; Schill & Miska, 1992). Als Indikation für diese Therapie kommen in Betracht: Oligozoospermie (eine verminderte Anzahl von Spermatozoen im Ejakulat); Asthenozoospermie (eine verminderte Beweglichkeit der Spermien); auch bei subfertilen Männern mit Varikozele ist eine Verbesserung der Spermienparameter beobachtet worden (Schroeder-Finckh *et al.*, 1986). Als Kontraindikationen werden chronische Orchitis, genitale Infektionen und klinisch stumme Infektionen gezählt, da eine systemische Kallikreinapplikation den Entzündungsprozess triggern würde und bei diesen Patienten zur Azoospermie führen kann (Schill *et al.*, 1988). Der therapeutische Erfolg ist aber nicht vorhersagbar und wird daher in der Literatur kontrovers diskutiert. Neuere Doppel-Blind und Placebo kontrollierte *in vivo*-Studien konnten im Gegensatz zu älteren Arbeiten einen signifikanten therapeutischen Effekt im humanen System nicht nachweisen (Glezerman *et al.*, 1993, Keck *et al.*, 1994). Als bedeutendes Problem wird das hohe Molekulargewicht von oral verabreichtem Kallikrein (42 kDa) gesehen, da die Blut-Hoden-Schranke kaum überwunden werden kann. Somit kann die Spermatogenese nur minimal beeinflusst werden (Miska & Schill, 1991).

Eine Einflussnahme des oral verabreichten Kallikreins auf die Spermatozoen im Nebenhoden ist denkbar, da auf Ebene des Nebenhodens zwar ein limitierter bzw. selektiver Stofftransport durch die bestehenden *Tight junctions* besteht, jedoch ist dieser Mechanismus weniger effektiv verglichen mit der Blut-Hoden-Schranke des Testis. Blasini *et al.* (1980) konnten an Ratten nach 10-tägiger systemischer Kallikreinapplikation mittels indirektem Fluoreszenztest eine Anreicherung der Kininogenase im Epithel des *Ductus epididymidis*, nicht aber im Keimepithel nachweisen. Dies lässt eine besondere Wirkung des Kallikreins auf den *posttubulären* Bereich, und damit einen zentralen Aspekt in der Spermatozoenreifung vermuten, da Motilitätsdefekte häufig auf Störung der Spermatozoenausreifung im Nebenhoden zurückzuführen sind. In Anbetracht dieser Tatsachen muss weiterhin bedacht werden, dass die verabreichte Kallikrein-Dosis von 600 IU pro Tag zu niedrig gewesen sein könnte (Miska & Schill, 1991). Schließlich wurden in Studien über die Kallikreinwirkung auf das kardiale System Tagesdosen um die 4500 IU eingesetzt, um eine Wirkung, in diesem Fall eine Blutdrucksenkung, sicher nachweisen zu können (Hoffmann, 1990).

Weitere *in vivo* Studien beschäftigen sich mit dem Abbau von Kallikrein bzw. mit dem verzögerten Abbau durch Gabe von Hemmstoffen. So zeigte eine Studie an Patienten mit Oligo- oder Asthenozoospermie, dass durch Inhibition der Kininase II mittels eines ACE-Hemmers, z. B. Captopril, eine Zunahme der Spermienzahl hervorgerufen werden konnte (dies beruht auf einer direkten Stimulation der *tubulären* Funktion), während kein Einfluss auf die Motilität genommen worden ist (Schill & Miska, 1992; Schill *et al.*, 1994). Allerdings ist die Verwendung von ACE-Hemmern als Therapeutikum von Fertilitätsstörungen sehr begrenzt.

Aufgrund der z. T. sehr konträren Resultate ist die Indikation von Kallikrein als Medikament zur Therapie von männlichen Fertilitätsstörungen umstritten und wird nur noch von wenigen favorisiert. Das Medikament Padutin 100[®] von Bayropharm (Leverkusen, Germany) mit der Hauptwirkstoffkomponente porcine pancreatic kallikrein (PPK) steht deshalb heute auf der Negativliste und wird von den Krankenkassen nicht mehr bezahlt.

1.5 Ziele dieser Dissertation

Dem Kallikrein-Kinin-System wird eine bedeutende Rolle in Bezug auf die Spermatogenese und den *posttestikulären* Spermienreifungsprozess zugeschrieben. Ein Mangel oder Fehlen an testikulärem Gewebs-Kallikrein wird mit einer negativen Beeinflussung der Fertilität assoziiert.

Die Existenz von Gewebs-Kallikrein in den Reproduktionsorganen verschiedener Säugetierspezies, darunter Mensch, Ratte, Maus wurde beschrieben (siehe Kapitel 1.4.2). Auch liegen die Ergebnisse einiger Forschungsgruppen mit *in vitro* als auch *in vivo* Versuchen vor (siehe Kapitel 1.4.3), jedoch sind bisher nur kleine Teilaspekte über dieses komplexe System bekannt.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet Grundlagenforschung mit dem zentralen Ziel, mittels Immunhistologie die Lokalisation von Gewebs-Kallikrein und weiterer Komponenten des tKKS im männlichen Reproduktionstrakt, insbesondere in Hoden und Nebenhoden, zu detektieren. Hierbei sollte der Bezug einzelner Komponenten dieses komplexen Enzymsystems zu histoanatomischen Strukturen hergestellt werden. Diese Untersuchungen sollten vergleichend an verschiedenen Säugerspezies vollzogen werden: Mensch, Ratte und Bulle. Dabei wurde bezüglich der Ratte versucht, die erlangten Ergebnisse in Bezug zum Alter und damit zum geschlechtlichen Entwicklungsstand zu setzen.

Weiterhin wurde die Kreuzreaktivität zwischen bovinem Gewebe und Antikörpern gegen Rattenantigene bzw. humane Antigene getestet.

Dieses Basiswissen bezüglich Lokalisation des Enzymsystems und topographischer Zuordnung im Reproduktionstrakt ist Voraussetzung, um die Wirkung des KKS besser verstehen zu können und weitere Kenntnisse über eine mögliche Beeinflussung, vor allem im Hinblick auf neue Therapieansätze männlicher Infertilität zu erlangen.

1.6 Angewandte Methode: Immunhistochemie

Um die Expression von Gewebs-Kallikrein und anderen Proteinbestandteilen des t-KKS in Bezug auf die histoanatomischen Strukturen unter Berücksichtigung der organotopographischen Verhältnisse im männlichen Reproduktionstrakt von Mensch, Ratte und Bulle darzustellen, wurden die immunhistochemischen Methoden gewählt. Dabei sind drei verschiedene Methoden zum Einsatz gekommen: die indirekte Methode, die PAP-Methode, sowie die En-visionTM-Methode (Bourne, 1997; Naish, 1997; Noll & Schaub-Kuhnen, 2000). Diese Verfahren basieren auf dem Grundprinzip der Immunologie. Praktisch bedeutet das ein bestimmtes Antigen zu lokalisieren, indem spezifische, gegen das Epitop gerichtete Antikörper, benutzt werden.

- Indirekte Methode

Bei dieser Technik bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter Peroxidase-konjugierter Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers (jetzt als Antigen zu betrachten) gerichtet ist, aufgetragen. Danach folgt die Substrat-Chromogenreaktion. Stammt der Primärantikörper aus dem Kaninchen oder der Maus, so muss der 2. Antikörper gegen Kaninchen- bzw. Maus gerichtet sein.

Bei dieser Zweischritt-Methode kommt es zu einer Signalverstärkung, da mehrere Zweitantikörper mit den verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren können. Nachteilig ist bei dieser Methode, dass unspezifische Reaktionen auftreten können, wenn der sekundäre Antikörper mit endogenen Immunglobulinen in der Probe kreuzreagiert. Die indirekte Methode zeigt eine höhere Sensitivität gegenüber der direkten Methode, letztere kam in dieser Arbeit nicht zur Anwendung.

- PAP-Methode

Bei dieser Methode kommen Primärantikörper, Sekundärantikörper und der Peroxidase-anti-Peroxidase-(PAP)-Komplex, bestehend aus dem Enzym Peroxidase und einem Antikörper gegen Peroxidase, zum Einsatz. Der Primärantikörper ist spezifisch gegen das Antigen gerichtet. Der Sekundär- oder Brückenantikörper kann sowohl an den Primärantikörper als auch an den PAP-Komplex binden, da beide in derselben Tierart hergestellt wurden. Der Brückenantikörper wird im Überschuss zugefügt, dadurch bindet nur eine Hälfte seines Fab-Fragments an den Primärantikörper, die andere Hälfte bleibt frei für die Bindung an den

Antikörper des PAP-Komplexes. Das Enzym Peroxidase wird durch eine Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht.

Bei der Dreischritt-Methode wird durch die Verwendung von drei verschiedenen Antikörpern eine stärkere Signalamplifikation erreicht; dies ist besonders hilfreich, wenn Antigene, die nur wenige Epitope besitzen, dargestellt werden sollen. Weiterer Vorteil ist, dass eine höhere Verdünnung des Primärantikörpers möglich ist, es damit zu einer Reduzierung des Hintergrundes und somit zu besseren Ergebnissen kommt. Nachteilig ist der höhere Zeitaufwand.

- En-vision™

Bei diesem Verfahren kommt zunächst der spezifische Primärantikörper zum Einsatz. Anschließend wird ein Konjugat aus Sekundärantikörper (Anti-Maus-Ig oder Anti-Kaninchen-Ig), der entsprechend gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist und eine hohe Anzahl von Enzymmolekülen (Peroxidase oder alkalische Phosphatase), mit denen eine Verstärkung der anschließenden Farbreaktion erreicht wird, zugegeben. Diese Moleküle sind in großer Anzahl an ein gemeinsames Dextran-Trägermolekül gekoppelt. Nach Herstellerangaben wird dieser Methode eine erhöhte Nachweissensitivität zu den herkömmlichen Verfahren zugesprochen. Darüber hinaus wird die Anzahl der Arbeitsschritte reduziert und die Lösung liegt gebrauchsfertig vor.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit nicht explizit erwähnt, in der höchsten erhältlichen Qualität eingesetzt (pro analysi oder biochemisch rein).

- Rinderserumalbumin 10 %ig (= BSA-c) [Aurion Immuno Gold Reagents & Accessories, The Netherlands]
- Chloroform [Riedel-de Haen, Seelze]
- 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Tetrahydrochlorid Tablette – 10 mg [Sigma, Missouri, USA]
→ DAB ergibt ein braunes Farbprodukt, ist in organischen Lösungsmitteln unlöslich und kann die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol durchlaufen und mit Eukitt eingedeckelt werden (Gegenfärbung: Hämatoxylin) (Noll & Schaub-Kuhnen, 2000)
- Dinatriummonohydrogenphosphat (Na_2HPO_4 141,96 = 1 mol/l) [Merck, Darmstadt]
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) [Merck]
- Eisessig [Merck]
- Ethanol [Riedel-de Haen]
- Haematoxylin-Harris, Solution modified 7,5 g/l (Cat. No. HHS-16) [Serva Electrophoresis GmbH, Frankfurt]
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 141,96 = 1 mol/l) [Merck]
- Magnesiumchlorid 1 N(MgCl_2)[Merck]
- Methanol [Riedel-de Haen]
- Mikrokitt [Hausapotheke des Justus Liebig Klinikums, Gießen]
- Natronlauge (NaOH) [Merck]
- Natriumchlorid (NaCl 58,44 g = 1 mol/l) [Riedel-de Haen]
- Non-fat-Dried Milk from Bovine (Product No. M7409) [Dako GmbH, Hamburg]
- HistoComp®, Paraffin-ähnliches Einbettmittel [Vogel, Gießen]
- Phosphat buffered saline (Lot 94824-061) [Oxoid LTDI, Basingstoke, Hampshire, England]
- Proteinase K [Sigma]
- Salzsäure (HCl) 1molar, 1N [Merck]
- Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid 121,1 g = 1 mol/l) [Merck]

- Triton X-100 pure (Cat. No. 37240) [Serva Electrophoresis GmbH]
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) [Merck]
- Xylol [Merck]
- Zitronensäuremonohydrat [Merck]

Das mit A. dest. bezeichnete Wasser entspricht solchem, welches mit der Reinwasseranlage Milli-RO 10 Plus-Vorreinigungsanlage verbunden mit einer Milli Q UF-Plus-Anlage [Millipore S.A., Molsheim, France] aufbereitet worden ist.

2.1.2 Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper, Antigene, Normalseren

Primärantikörper

- Anti-Human-LMW-Kininogen von Kaninchen (Produkt No. 06-0061) [RD Laboratorien für biologische Forschung GmbH, Diessen]
Polyklonaler Antikörper gegen Human-LMW-Kininogen. Minimale Kreuzreaktionen mit anderen humanen Proteinen, 20 % Kreuzreaktionen mit HMW-Kininogen.
- Anti-Human-LMW-Kininogen von Kaninchen (Cat.No. 5575-6007) [BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln]
Polyklonales Antiserum gegen Human-LMW-Kininogen.
- Anti-Kallikrein, Human Urine (Kaninchen) (Cat.No. 420304) [Calbiochem, Darmstadt]
Polyklonales Antiserum, das monospezifisch für Kallikrein des humanen Urins ist. Es erkennt aktives und passives humanes urinary Kallikrein. Keine Kreuzreaktionen mit Ratten- oder Meerschweinchenurin-Kallikrein oder mit bovinen Trypsin.
- Anti-Kallikrein, Rat Urine (Kaninchen) (Cat.No. 420308) [Calbiochem]
Polyklonales Antiserum, das monospezifisch für Kallikrein des Rattenurins ist. Es erkennt aktives und passives Rattenurin-Kallikrein. Keine Kreuzreaktionen mit humanem- oder Kaninchenurin-Kallikrein.
- CALLA Clone J5 = NEP 24.11 [Coulter Immunology, Florida, USA]
Monoklonaler Antikörper gegen humanes Common acute lymphoblastic leukaemia antigen.

Sekundärantikörper:

- Anti-Kaninchen-Immunglobuline vom Schwein (Code No. Z 196) [Dako GmbH]
- Anti-Maus-Immunglobuline von Kaninchen (Code No. Z 259) [Dako GmbH]
- En-Vision™, Peroxidase-Anti-Maus von Ziegen (Code No. K 4000) [Dako GmbH]
- Meerrettich-Peroxidase konjugierte-Anti-Kaninchen-Immunglobuline vom Schwein (Code No. P0217) [Dako GmbH]
- Meerrettich-Peroxidase konjugierte-Anti-Maus-Immunglobuline vom Kaninchen (Code No. P0260) [BIOTREND Chemikalien GmbH]
- PAP-Kaninchen, polyklonal (Code No. Z0113) [Dako GmbH]
- PAP-Maus, polyklonal (Code No. B650) [Dako GmbH]

Antigene

- Kallikrein, Human Urine (Cat. No. 420313) [Calbiochem]
- Human LMW-Kininogen (Produkt No. 03-0021) [RD Laboratorien für biologische Forschung GmbH]
- Ratten Gewebs-Kallikrein (Produkt No. 03-0033) [RD Laboratorien für biologische Forschung GmbH]

Normalseren:

- Kaninchen-Normalserum (Code No. X 0902) [Dako GmbH]
- Maus-Normalserum (Code No. X 0910) [Dako GmbH]

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

- AGFA-Film [AGFA, Köln]
- Deckgläser [Menzel-Gläser, Braunschweig]
- Dot Blot Test [Aurion Immuno Gold Reagents & Accessories]
- Einmalspritzen [Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium]
- Falconröhrchen: Blue Max™ 15 ml und 50 ml [Becton Dickinson Labware; France, England, USA]
- Micro Tubes 1,5 ml [Roth, Karlsruhe]
- Millex-GS 0.22 µm Filter Unit [Millipore S.A.]
- Objektträger [Menzel-Gläser]
- PAP-Pen [BIOTREND, Chemikalien GmbH, Köln; Brod Hygiene Service, Hanau]

- Pipettenspitzen [Sarstedt, Nümbrecht]
- Stahlgewebebehälter = Tissue teck base mold [Miles Inc, Elkhart, IN, USA]
- sterile Einmalkanülen 20G x 1½ (0,9 mm x 40) [Terumo Europe N.V.]
- sterile Gewebekultur-Petrischalen [Becton Dickinson Labware]
- steriles Skalpell [Feather Safety Razor Co., Japan]
- Trägerelement aus Plastik = Tissue teck [Miles Inc]

2.1.4 Geräte

- Analysenwaage
Typ: L420S-D2; Bereich: maximal 424 Gramm minimal 0,5 Gramm [Sartorius AG, Göttingen]
Typ: R 180D-D1; Bereich: maximal 35 Gramm, minimal 0,05 Gramm [Sartorius AG]
- Lichtmikroskop, Typ: Axioskop [Zeiss, Göttingen] in Kombination mit Kammerasystem: Typ: KYF 75 U [JVC, Yokohama] und dem Bearbeitungsprogramm: Diskus 4.50 Fire Wire [Technisches Büro Hilgers, Königswinter]
- Lichtmikroskop, Typ: Orthoplan [Leitz, Wetzlar] in Kombination mit Kammerasystem für die automatische Mikrophotographie, Typ: Orthoma E [Leitz]
- Mikroprozessor-pH-Meter, Typ: pH 537 [Wissenschaftlich technische Werkstätten, Gießen]
- Pipetten: 0,5-10 µl; 12-200 µl; 200-1000 µl; 320-5000 µl [Eppendorf, Deutschland]
- Mikrotom Nr. 1212 mit einem Feather-Schneidemesser [Leitz]
- Milli-RO 10 Plus-Vorreinigungsanlage (Reinwasseranlage) verbunden mit einer Milli Q UF-Plus-Anlage [Millipore S.A.]

2.1.5 Medien und Pufferlösungen

- **Tris – HCl-Puffer 0,05 M, pH 7,41**

Tris-HCl 50 mM	6,1 g
Aqua dest.	~ 1000 ml
HCl (1 N) zur pH-Werteinstellung	~ 37 ml

- **Tris buffered saline (TBS) Puffer, pH 7,41**

Tris-HCl 50 mM	6,10 g
NaCl 150 mM	8,89 g
HCl (1 N) zur pH-Werteinstellung	~ 37 ml
Aqua dest.	~ 1000 ml
Triton X-100 3%ig	3 ml

- **BSA-c-Blockierungsmedium (5 %ig)**

BSA-c 5 %ig in	50 mg
TBS	1 ml

- **BSA-c-AK-Medium (1 %ig)**

BSA-c 1 %ig in	10 mg
TBS	1 ml

- **Citratpuffer 0,01 M pH 6,0**

Zitronensäuremonohydrat	2,1 g
Aqua dest.	1000 ml
NaOH (1 N) zur pH-Werteinstellung	~ 13 ml

- **DAB-Färbelösung**

DAB-Tablette	0,050%	1 Tablette à 10 mg
Tris-HCl-Puffer (0,05 M, pH 7,41)	99,035 %	15 ml
H ₂ O ₂ (30 %ige Lösung)	0,015 %	12 µl

→ muss kurz vor Gebrauch frisch hergestellt werden

- **Methanol-Wasserstoffperoxid-Bad**

Methanol 97 %	180 ml
H ₂ O ₂ (3 %ig)	20 ml

- **Methacarn Fixierlösung**

Methanol 60 % v/v	300 ml
Chloroform 30 % v/v	150 ml
Eisessig 10 % v/v	50 ml

- **MgCl₂-Lösung (1M)**

MgCl ₂	81,4 g
Aqua dest.	400 ml

- **Milchpulver-Blockierungsmedium (5 %ig)**

Non-fat-Dried Milk from Bovine	50 µg	75 µg
TBS-Puffer	1ml	1,5 ml

- **Milchpulver-AK-Medium (1 %ig)**

Non-fat-Dried Milk from Bovine	10 µg	50 µg
TBS-Puffer	1ml	5 ml

- **Phosphat-buffered-saline-(PBSM)-Puffer**

PBS	1 Tablette
Aqua dest	200 ml
MgCl ₂ -Lösung 1 M	1 ml

- **Proteinase K - Stammlösung**

Proteinase K	10 mg
EDTA 0,5 M	100 µl
PBSM-Puffer	900 µl

→20 µl Aliquots abfüllen (200 µg Proteinase K)

- **Proteinase K – Gebrauchs-Lösung**

Proteinase K – Stammlösung	200 µg
PBSM	10 ml

2.1.6 Humanes Gewebe und Versuchstiere

Für die Histologie von *Testis* und *Epididymis* wurden entsprechende Organe von 32, 38, 53, 90 und 158 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten (Fa. Harlan-Winkelmann, Borcheln) verwendet (von den 90 Tage alten Ratten wurden vier, von den anderen Altersstufen jeweils ein Tier verwendet). Die Ratten wurden jeweils unmittelbar vor der Präparation geliefert. Die Versuche wurden beim Regierungspräsidium/Regierungspräsidenten Gießen unter dem Geschäftszeichen II 25.3-19c20-15(1)-Gi 20/13 gemäß § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz angezeigt. Die Bullentestes kamen vom Schlachthof in Gießen (3 verschiedene Tiere).

Das humane Gewebe stammte aus dem Rechtsmedizinischen Institut der Universitätsklinik Düsseldorf (Prof. Dr. Bartz) (Hoden und Nieren von 3 Männern im reproduktiven Alter), sowie von der Universidad de la Frontera, Temuco aus Chile (Prof. Dr. R. Sánchez und Dr. P. Pena) (Hoden eines jungen Mannes im reproduktiven Alter). Die Hodenbiopsien stammten aus Archivbeständen des Instituts für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen (Prof. Dr. Dr. med. habil. W. B. Schill) (Hodenbiopsien von 6 Männern, ohne nähere Angaben in Bezug auf Alter oder Fertilität) sowie aus dem Zentrum für Dermatologie der Universitätsklinik Düsseldorf (Dr. Schuppe) (Hodenbiopsie von einem Mann) sowie Autopsiematerial aus dem Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (eine Niere). Dabei wird zwischen Methacarn-fixiertem Material aus der Rechtsmedizin in Düsseldorf, aus Chile und der Dermatologie in Gießen sowie einem mit Bouin-fixierten Biopsat der Düsseldorfer Dermatologie bzw. einem Formalin-fixierten Nierenpräparat aus der Pathologie Gießen unterschieden.

2.2 Dot Blot Test

Während die Immunhistologie am humanen Gewebe zunächst wenig verwertbare Ergebnisse erbrachte, zeigten die Versuchsreihen mit den bovinen *Testes* einen erfolgreichen Einsatz der humanen Antikörper. Eine Überlegung war, ob die Reaktivität des Antikörpers bzw. eher die Unfähigkeit des Antikörpers, das Antigen, gegen das er gerichtet ist, zu detektieren als entscheidender Faktor für negative Resultate der Antigen-Antikörperreaktion anzusehen ist. Um auszuschließen, dass der Antikörper nicht in der Lage ist das Antigen zu erkennen, erfolgte die Antikörpertestung.

Zur Anwendung kam der so genannte *Dot Blot Test*. Die Ergebnisse dieses Tests sind von der Reaktivität und Qualität des Antikörpers und dem Grad der Wiedererkennung des Antigens abhängig. So können negative Ergebnisse aus niedriger oder fehlender Reaktivität des Antikörpers oder aus Mangel, Veränderung oder Maskierung des Antigens resultieren.

Für den Dot Blot Test verwendete Pufferlösungen:

- 10 mM Phosphat –Puffer, pH 7,4:
Ansatz a: 1 mol/l Na_2HPO_4 mit A. dest ansetzen
Ansatz b: 1 mol/l KH_2PO_4 mit A. dest. ansetzen
→ Ansatz b solange zu Ansatz a zugeben, bis ein pH-Wert von 7,4 erreicht ist
→ die Lösungsmenge quantifizieren und NaCl zugeben, bis eine 150 mM Salzlösung erreicht wird
- Dot-Blot-Puffer, pH 7,4:
PBS-Puffer mit
50 $\mu\text{g/ml}$ Rinderserumalbumin (Fraktion 5)
- Protein-Block-Puffer, pH 7,4:
PBS-Puffer mit
5 % Rinderserumalbumin (Fraktion 5)
- BSA-c-Puffer für AK-Ansatz, pH 7,4:
PBS-Puffer mit
0,1 % Rinderserumalbumin (BSA-c)
gegebenenfalls mit 0,1 M HCl Lösung auf den entsprechenden pH-Wert titrieren

- BSA-c-Puffer als Wasch-Puffer, pH 7,4:
PBS-Puffer mit
0,01 % Rinderserumalbumin (BSA-c)
gegebenenfalls mit 0,1 M HCl Lösung auf den entsprechenden pH-Wert titrieren

2.2.1 Antikörper-Wiedererkennungstest

In diesem Test wird überprüft, ob der als Antigen fungierende Primärantikörper von dem Sekundärantikörper erkannt wird. Die Vorgehensweise entspricht der Methode 2 B der Produktbeschreibung des Dot Blot Tests „Antikörper-Wiedererkennungstest – Reaktivität zwischen Immunglobulin oder primär Antikörper und Immunogoldreagenz“ (Van de Plas, 1997)

1. Ansatz der Verdünnungsreihen des Primärantikörpers (ausgehend von einer Konz. 1mg/ml) 1000 → 333 → 100 → 33 → 10 → 3,3 → 1 → 0,33 → 0,1 → 0,033 (Antikörpermenge pro Blot in μng)
2. 1 μl jedes Ansatzes wird dann auf den Nitro-Cellulose-Streifen (NC) aufgetropft, beginnend mit der höchsten Verdünnung
3. Warten bis der Tropfen getrocknet ist
4. Kurzes Waschen in PBS
5. Abblocken mit Protein-Block-Puffer für 30 min
6. Waschen in BSA-c-Puffer für 5 min
7. Inkubieren mit dem Sekundär-AK, verdünnt in BSA-c-Puffer (AK-Ansatz) für 120 min
8. Waschen in BSA-c-Waschpuffer 3x10 min
9. Waschen in PBS-Puffer 3x5 min
10. Waschen in Tris-HCl-Puffer 3x5 min
11. Inkubieren mit DAB 3 min
12. Kurz in A. dest. waschen
13. NC-Streifen an der Luft trocknen lassen

1. Versuch:

Antigen:	CALLA Clone J5 (NEP 24.11)
Primärantikörper:	Kaninchen-anti-Maus HRP

→ Der Antikörper CALLA Clone J5 wird als Antigen von dem Antikörper Kaninchen-anti-Maus HRP erkannt.

2. Versuch:

Antigen:	Kaninchen-anti-Maus
Primärantikörper:	PAP-Maus

→ Der Antikörper Kaninchen-anti-Maus wird als Antigen von dem Antikörper PAP-Maus erkannt.

3. Versuch:

Antigen:	Anti-LMW-Kininogen
Primärantikörper:	Ziege-anti-Kaninchen-HRP

→ Der Antikörper Anti-LMW-Kininogen wird als Antigen von dem Antikörper Ziege-anti-Kaninchen-HRP erkannt.

2.2.2 Nativer-Antigen-Wiedererkennungstest

In diesem Test wird geprüft, ob der Primärantikörper das entsprechende Antigen wieder erkennt und in welcher Konzentration dieses ungefähr vorliegen muss. Die Vorgehensweise entspricht der Methode 3 A der Produktbeschreibung des Dot Blot Tests „Antigen-Wiedererkennungstest – Reaktivität zwischen (fixiertem) Antigen und primären Antikörper“ (Van de Plas, 1997).

- a) Ansatz der Verdünnungsreihen des Antigens (ausgehend von einer Konz. 1 mg/ml)
1000 → 333 → 100 → 33 → 10 → 3,3 → 1 → 0,33 → 0,1 → 0,033 (Antikörpermenge pro Blot in μng)
 - b) 1 μl jedes Ansatzes wird dann auf den Nitro-Cellulose-Streifen (NC) aufgetropft, beginnend mit der höchsten Verdünnung
 - c) Warten bis der Tropfen getrocknet ist
 - d) Kurzes Waschen in PBS
 - e) Abblocken mit Protein-Block-Puffer für 30 min
 - f) Waschen in BSA-c-Puffer für 5 min
 - g) Inkubieren mit dem Primär-AK, verdünnt in BSA-c-Puffer (AK-Ansatz) für 120 min
- Weitere Schritte entsprechen der oben (unter 2.2.1) beschriebenen Anleitung, weiter mit Schritt 6.

4. Versuch:

Antigen:	LMW-Kininogen
Primärantikörper:	Anti-LMW-Kininogen
Sekundärantikörper:	Ziege-Anti-Kaninchen

→ Das Protein LMW-Kininogen wird als Antigen von dem Antikörper Anti-LMW-Kininogen erkannt.

2.3 Methoden

2.3.1 Fixation und Einbettung des Gewebes

Nach der Entnahme von *Testis* und *Epididymis* (Ratte) bzw. Autopsiematerial (Mensch) wurde das frisch gewonnene Material in ca. 1,5 x 1,5 x 0,5 cm große Stücke geschnitten und in ein mit Methacarn gefülltes Falconröhrchen überführt. Für ca. 24 Stunden wurde das Gewebe bei Raumtemperatur in dem Medium unter ständigem Rollen des Gefäßes fixiert. Anschließend wurden die Organteile in kleinere Stücke geschnitten, mit einer Injektionsnadel multipel eingestochen, um eine vollständige Fixation zu gewährleisten und weitere 24 Stunden im frisch angesetzten Methacarn fixiert.

Vor der Einbettung wurden die fixierten Gewebestücke bei Zimmertemperatur in einer Ethanol-Xylol-Reihe nach dem folgenden Schema entwässert:

Tabelle 1: Aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydratisierung

Medium	Zeiteinheit
Ethanol 96 % I	30 min
Ethanol 96 % II	30 min
Ethanol 99,6 % I	30 min
Ethanol 99,6 % II	30 min
Ethanol-Xylol (1:1)	60 min
Xylol I	30 min
Xylol II	30 min

Von diesem Punkt an vollzogen sich die restlichen Schritte in einem auf 60°C vorgeheizten Wärmeschrank; anstelle der Falconröhrchen aus Kunststoff wurden nun Petrischalen aus Glas verwendet:

Tabelle 2: Fixation

Medium	Zeiteinheit
Xylol-Paraffin Wachs (1:1)	60 min
Paraffin Wachs I	60 min
Paraffin Wachs II	60 min

Zu diesem Zeitpunkt wurden spezielle Metallförmchen auf einer Heizplatte erwärmt, in diese das Gewebestück aus dem Paraffin-Wachs II überführt und mit flüssigem Paraffin-Wachs aus dem Wärmeschrank in der Form ausgegossen. Anschließend wurde eine Kunststoff-Halterung

aufgelegt und mit leichtem Druck angedrückt. Nach dem Erkalten und Aushärten des Gewebe-Paraffin-Blocks konnte dieser aus der Metallform herausgelöst werden.

2.3.2 Schneiden am Mikrotom

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 4 – 6 µm dicke Schnitte von dem Gewebe-Paraffin-Block hergestellt. Diese wurden mit Hilfe eines Pinsels in ein auf 50°C erwärmtes Wasserbad mit A. dest. zum Glätten überführt. Anschließend wurde der Schnitt mit Hilfe eines Objektträgers (Superfrost) aufgefischt, in eine Glasküvette gestellt und zum Trocknen für einen Tag im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt.

2.3.3 Immunhistochemische Färbung am Beispiel der PAP-Methode

Die auf Objektträger angehefteten Paraffinschnitte wurden zunächst durch zwei Xylol-Bäder (je 5 Minuten) entparaffiniert. Anschließend wurden sie schonend hydratisiert, indem die Objektträger durch eine absteigende Alkoholreihe geführt wurden, welche ein jeweils 5 minütiges Bad in Alkohol mit den Konzentrationen 100 %, 96 %, 70 %, 50% beinhalteten. Nach kurzem Spülen in deionisiertem Wasser wurden die Schnitte für dreimal 10 Minuten in Tris-Puffer gestellt. Zur Inhibierung der endogenen Peroxidaseaktivität in den Geweben erfolgte eine 20-minütige Inkubation in einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Lösung. Nach erneuten Waschschritten in Tris-Puffer für dreimal 10 Minuten wurden die Schnitte 30 Minuten mit einem 1%igen Milchpulver-Blockierungsmedium in einer feuchten Kammer präinkubiert. Dadurch sollten unspezifische Antikörperbindungen an Proteine verhindert werden. Die bisher aufgeführten Schritte wurden ausschließlich bei Raumtemperatur durchgeführt.

Anschließend wurden die Primärantikörper bzw. für die Negativ-Kontrolle das entsprechende Normalserum, in der jeweils zuvor festgelegten Konzentration (siehe folgende Pipettierschema; Tab. 3 - 18) auf die Gewebsschnitte pipettiert. Die folgende Inkubation vollzog sich bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer.

Am darauf folgenden Tag wurden die Antikörper bzw. Normalseren zunächst mit TBS-Puffer abgespült. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte mit TBS-Puffer für jeweils 10 Minuten wurde der Zweitantikörper aufgetragen. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Antikörperlösung mit TBS-Puffer entfernt und die Objektträger erneut für 30 Minuten drei Waschschritten unterzogen. Als nächstes wurde nun der PAP-

Antikörper auf die Gewebsschnitte pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 35 Minuten bei Raumtemperatur auf die herkömmliche Weise entfernt. Nach zwei 10-minütigen Waschschritten in TBS-Puffer erfolgte noch ein weiterer Waschgang in Tris-HCl-Puffer für 10 Minuten. Hieran anschließend erfolgte die Färbung mit DAB-Lösung, die vor Gebrauch durch einen Millipore-Filter von ungelösten Überresten gereinigt wurde. DAB (3,3 Diaminobenzidin) ist ein Chromogen und wird von dem Enzym Peroxidase in ein wasserunlösliches, bräunlich sichtbares Farbprodukt umgewandelt. Nach einer 3 minütigen Reaktionszeit wird die Färbelösung mit A. dest. abgespült.

Eine Gegenfärbung konnte zu diesem Zeitpunkt erfolgen (Kernfärbung mit Hämatoxylin). Für ca. 1 Minute wurden die zuvor behandelten Gewebeschnitte in ein Hämatoxylin-Bad gestellt, dann zum Bläuen für 10 Minuten in Leitungswasser und anschließend noch einmal kurz in A. dest. abgespült.

Es schloss sich die Dehydratisierung in der aufsteigenden Alkoholreihe an. Mit einer Verweildauer von jeweils 5 Minuten durchliefen die Gewebsschnitte Alkoholbäder in der Konzentration 50 %, 70 %, 96 %, 100 %, 100 %. Abschließend folgten noch zwei Xylol-Bäder für 5 und 10 Minuten. Noch feucht wurden die gefärbten Schnitte mit Mikro-Kitt und Deckgläschen eingedeckelt.

Dieses war die Ausgangsversion der Immunhistochemischen-Detektion, an der sich zahlreiche Variationen anschlossen, um ein bestmögliches Färbeergebnis für die jeweilige Spezies bzw. den jeweiligen Primärantikörper, zu erzielen.

Vor dem Einsatz einiger Antikörper sind spezielle Vorbehandlungen der Schnitte notwendig, damit der Antikörper das spezifische Antigen/Epitop im Gewebe finden kann. Durch die vorausgegangene Fixierung, meistens mit Formalin, entstehen Aldehydvernetzungen, die die Bindung des Antikörpers verhindern. Zudem kann durch die Fixierung die dreidimensionale Struktur verändert werden, die somit die Antigen-Antikörper-Reaktion unterbindet. Um die so maskierten Antigene zu enttarnen, gibt es verschiedene Demaskierungsverfahren.

Hitzeinduzierte Demaskierung in der Mikrowelle:

Die entparaffinierten Schnitte (Prozedere s. o.) wurden in eine Plastikkuvette gestellt, die mit Citratpuffer, pH 6,0, gefüllt ist. Diese wurden dann in der Mikrowelle für 3 x 5 Minuten bei 600-800 Watt gekocht, zwischendurch wurde die Menge an verkochtem Puffer wieder ersetzt. Die Schnitte blieben anschließend für ca. 30 Minuten in der Küvette stehen um, langsam abzukühlen. Die Schnitte wurden dreimal mit Waschpuffer (Tris-Puffer) gewaschen. Der nächste Schritt war die Blockierung der endogenen Peroxidase im Methanol-

Wasserstoffperoxid-Bad für 20 Minuten. Die sich daran anschließenden Schritte entsprachen denen im Grundmodell.

Enzymatische Demaskierung mit Proteinase K

Die enzymatische Vorbehandlung erfolgte im Anschluss an die Entparaffinierung. Die Schnitte wurden mit 0,1 % Proteinase K für 15 – 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit frischem Tris-Puffer (am effektivsten mit eiskaltem Puffer) gespült, um die proteolytische Wirkung des Enzyms zu beenden. Es folgte der Schritt der endogenen Peroxidase-Blockierung und anschließend wurde mit entsprechender immunhistochemischer Technik fortgefahren.

2.3.4 Versuchsansätze

Im Folgenden sollten die verschiedenen Versuchsreihen bezüglich der verschiedenen Spezies und Gewebe, der differierenden AK, der unterschiedlichen histochemischen Nachweismethoden sowie den AK- und Blockierungsmedien mit den veränderten AK-Konzentrationen, aufgezeigt werden. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die variierenden Faktoren in den immunhistochemischen Versuchen. Die entsprechend veränderten Parameter in den einzelnen Untersuchungen sind den unten aufgeführten Protokollen (Tabelle 4 – 19) zu entnehmen. Die meisten Versuche erfolgten ohne spezielle Gewebsvorbehandlung. Bei vorangegangener enzymatischer oder hitzeinduzierter Demaskierung wird dieses gesondert kenntlich gemacht.

Für jeden Versuch wurde das gleiche Basismedium für die Antikörperverdünnung und für das Blockierungsmedium verwendet. Das Basismedium wurde entsprechend verdünnt, so dass als Antikörpermedium eine 1%ige Konzentration vorlag und als Blockierungsmedium eine 5%ige Konzentration. Das in den einzelnen Versuchen verwandte Basismedium ist den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Tabelle 3: Übersichtstabelle über die variierenden Faktoren in den immunhistochemischen Untersuchungen

Spezies	Ratte	Human	Bulle
Gewebe	- Hoden (32, 38, 53, 90, 158 d) - Nebenhoden (32, 38, 53, 90, 158 d) - Niere (32, 38, 90 d)	- Hoden (adult) - Niere (adult)	- Hoden (adult)
Fixierung	- Methacarn	- Methacarn - Bouin - Formalin	- Methacarn
Vorbehandlung	- keine	- keine - Proteinase K - Mikrowelle	- keine - Proteinase K
Antikörper u. Konzentration	- Anti-Gewebs-Kallikrein(1:200)	- Anti-Gewebs-Kallikrein (1:20 – 1:200) - CALLA (1:10 – 1:100) - LMW-Kininogen (1:25 – 1:200)	- Anti-Gewebs-Kallikrein (Ratte/human) (1:100 – 1:200) - CALLA (1:50) - LMW-Kininogen (1:50 – 1:200)
Methode	- PAP	- PAP - HRP - EnVision	- PAP - HRP
Ak-/ Blockierungs- Medium	Milchpulver	- Milchpulver - BSA-c	- Milchpulver - BSA-c

2.3.4.1 Testis, Epididymis und Niere der Ratte

Nachweis von Gewebs-Kallikrein:

1. Antikörper: Anti-Gewebs-Kallikrein Ratte
2. Antikörper: Schwein-anti-Kaninchen
3. Antikörper: PAP-Kaninchen

Negativ-Kontrolle: Kaninchen-Normalserum

Tabelle 4: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Gewebs-Kallikrein an *Testis*, *Epididymis* und Niere der Ratte unter optimierten Bedingungen mit der PAP-Technik

1. Antikörper	2. Antikörper	3. Antikörper	Blockierungs-/ AK-Medium
1:200	1:100	1:100	Milchpulver

2.3.4.2 Testis und Niere des humanen Systems

Nachweis von Gewebs-Kallikrein:

1. Antikörper : Anti-Kallikrein human
2. Antikörper : Schwein-anti-Kaninchen
3. Antikörper : PAP-Kaninchen

Negativ-Kontrolle : Kaninchen-Normalserum

Tabelle 5: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Gewebs-Kallikrein am humanen *Testis* und Niere mittels PAP-Technik bei Variation der Konzentrationen des Primärantikörpers, der Zweit- und Drittantikörper

1.Antikörper	2. Antikörper	3. Antikörper	Blockier-/AK-Medium
1: 200	1:100	1:100	Milchpulver
1:50	1:100	1:100	Milchpulver
1:20	1:50	1:50	Milchpulver

Nachweis von Gewebs-Kallikrein:

1. Antikörper: Anti-Kallikrein human
2. Antikörper: Schwein-anti-Kaninchen-HRP

Negativ-Kontrolle: Kaninchen-Normalserum

Tabelle 6: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Gewebs-Kallikrein am humanen *Testis* über die indirekte Methode bei Variation der Konzentrationen des Primär- und des Zweitantikörpers

1. Antikörper	2.Antikörper	Blockier-/AK-Medium
1:25	1:50	Milchpulver
1:25	1:100	Milchpulver
1:50	1:50	Milchpulver
1:50	1:100	Milchpulver
1:100	1:50	Milchpulver
1:100	1:100	Milchpulver
1:200	1:50	Milchpulver
1:200	1:100	Milchpulver

Nachweis der Neutralen Metalloendopeptidase:

1. Antikörper: CALLA, Clon J5
2. Antikörper: Kaninchen-anti-Maus
3. Antikörper: PAP-Maus

Negativ-Kontrolle: Maus-Normalserum

Tabelle 7: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von NEP 24.11 am humanen *Testis* mittels PAP-Methode bei Variation der Konzentrationen des Primärantikörpers, der Zweit- und Drittantikörper sowie des Blockierungs-/AK-Mediums

1. Antikörper	2. Antikörper	3. Antikörper	Blockierungs-/AK-Medium
1:10	1:25	1:250	BSA-c
1:25	1:50	1:250	BSA-c
1:50	1:25	1:250	BSA-c
1:50	1:50	1:250	BSA-c
1:50	1:50	1:250	Milchpulver
1:50	1:50	1:400	BSA-c
1:50	1:100	1:250	BSA-c
1:50	1:100	1:400	BSA-c
1:100	1:25	1:250	Milchpulver
1:100	1:50	1:250	Milchpulver

Nachweis der Neutralen Metalloendopeptidase:

1. Antikörper: CALLA, Clon J5
2. Antikörper: Kaninchen-anti-Maus- HRP

Negativ-Kontrolle: Kaninchen-Normalserum

Tabelle 8: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von NEP 24.11 am humanen *Testis* über die indirekte Methode bei Variation der Konzentrationen des Primär- und des Zweitantikörpers

1. Antikörper	2. Antikörper	Blockierungs-/ AK-Medium
1:10	1:100	BSA-c
1:25	1:50	BSA-c
1:25	1:100	BSA-c
1:25	1:200	BSA-c
1:50	1:50	BSA-c
1:50	1:100	BSA-c
1:50	1:200	BSA-c
1:100	1:200	BSA-c

Nachweis der Neutralen Metalloendopeptidase:

1. Antikörper: CALLA, Clon J5
2. Antikörper: En-Vision™

Negativ-Kontrolle: Maus-Normalserum

Tabelle 9: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von NEP 24.11 am humanen *Testis* über die En-vision™ Methode bei Variation des Primärantikörpers und des Blockierungs-/AK-Mediums

1. Antikörper	2. Antikörper	Blockierungs-/ AK-Medium
1:25	pur	BSA-c
1:25	pur	Milchpulver
1:50	pur	BSA-c
1:50	pur	Milchpulver

Nachweis von LMW-Kininogen:

1. Antikörper: Anti-LMW-Kininogen
2. Antikörper: Schwein-anti-Kaninchen
3. PAP-Kaninchen

Negativ-Kontrolle: Kaninchen-Normalserum

Tabelle 10: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von LMW-Kininogen am humanen *Testis* mittels PAP-Technik bei Variation der Konzentrationen des Primärantikörpers, der Zweit- und Drittantikörper sowie des Blockierungs-/AK-Mediums

1. Antikörper	2. Antikörper	3. Antikörper	Blockierungs-/ AK-Medium
1:25	1:50	1:100	BSA-c
1:25	1:50	1:100	Milchpulver
1:50	1:50	1:100	BSA-c
1:50	1:50	1:100	Milchpulver
1:50	1:100	1:100	BSA-c
1:50	1:100	1:100	Milchpulver
1:50	1:100	1:200	BSA-c
1:100	1:50	1:50	BSA-c
1:100	1:50	1:100	BSA-c
1:100	1:100	1:100	BSA-c
1:100	1:100	1:100	Milchpulver

Nachweis von LMW-Kininogen:

1. Antikörper: Anti-LMW-Kininogen human
2. Antikörper: Ziege-anti-Kaninchen-HRP

Negativ-Kontrolle: Kaninchen-Normalserum

Tabelle 11: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von LMW-Kininogen am humanen *Testis* mittels indirekter Technik bei Variation der Konzentrationen des Primär- und des Zweitantikörpers sowie des Blockierungs-/AK-Mediums

1. Antikörper	2. Antikörper	Blockierungs-/ AK-Medium
1:25	1:50	BSA-c
1:50	1:50	BSA-c
1:50	1:100	BSA-c
1:50	1:200	BSA-c
1:100	1:50	BSA-c
1:100	1:50	Milchpulver
1:100	1:100	BSA-c
1:100	1:100	Milchpulver
1:100	1:150	BSA-c
1:200	1:50	BSA-c

Nachweis von LMW-Kininogen:

1. Antikörper: Anti-LMW-Kininogen human
2. Antikörper: Schwein-anti-Kaninchen-HRP

Negativ-Kontrolle: LMW-Kininogen human

Tabelle 12: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von LMW-Kininogen am humanen *Testis* mittels indirekter Technik bei Variation der Konzentrationen des Primär- und des Zweitantikörpers

1. Antikörper	2. Antikörper	Blockierungs-/ AK-Medium
1:100	1:50	Milchpulver
1:100	1:100	Milchpulver

2.3.4.3 Testis vom Bullen

Nachweis von Gewebs-Kallikrein:

1. Antikörper: Anti-Kallikrein human
2. Antikörper: Schwein-anti-Kaninchen
3. Antikörper: PAP-Kaninchen

Negativ-Kontrolle: Kaninchen-Normalserum

Tabelle 13: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kreuzreaktionen des humanen Gewebs-Kallikreins am *Testis* des Bullens mittels PAP-Technik bei Variation der Konzentration des Primärantikörpers

1. Antikörper	2. Antikörper	3. Antikörper	Blockierungs-/ AK-
1:100	1:100	1:100	Milchpulver
1:200	1:100	1:100	Milchpulver

Nachweis von Gewebs-Kallikrein:

1. Antikörper : Anti-Kallikrein Ratte
2. Antikörper : Schwein-anti-Kaninchen
3. Antikörper: PAP-Kaninchen

Negativ-Kontrolle: Kaninchen-Normalserum

Tabelle 14: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kreuzreaktionen des Gewebs-Kallikreins der Ratte am *Testis* des Bullens mittels PAP-Technik bei Variation der Konzentration des Primärantikörpers

1. Antikörper	2. Antikörper	3. Antikörper	Blockierungs-/ AK-
1:100	1:100	1:100	Milchpulver
1:200	1:100	1:100	Milchpulver

Nachweis der Neutralen Metalloendopeptidase:

1. Antikörper: CALLA, J5
2. Antikörper: Kaninchen-anti-Maus HRP

Negativ-Kontrolle: Maus-Normalserum

Tabelle 15: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kreuzreaktionen des humanen J5-CALLA-Antikörpers am Bullen über die indirekte Methode

1. Antikörper	2. Antikörper	Blockierungs-/ AK-Medium
1:50	1:100	BSA-c

Nachweis von LMW-Kininogen:

1. Antikörper: Anti-LMW-Kininogen human
2. Antikörper: Ziege-anti-Kaninchen HRP

Negativ-Kontrolle: Kaninchen-Normalserum

Tabelle 16: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kreuzreaktionen des humanen LMW-Kininogen-AKs am *Testis* des Bullens über die indirekte Methode bei Variation der Konzentration des Primärantikörpers

1. Antikörper	2. Antikörper	Blockierungs-/ AK-Medium
1:50	1:100	BSA-c
1:100	1:100	BSA-c

Nachweis von LMW-Kininogen:

1. Antikörper: Anti-LMW-Kininogen human
2. Antikörper: Schwein-anti-Kaninchen
3. Antikörper: PAP-Kaninchen

Negativ-Kontrolle: Kaninchen-Normalserum

Tabelle 17: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kreuzreaktionen des humanen LMW-Kininogen-AKs am *Testis* des Bullens mittels PAP-Technik bei Variation der Konzentration des Primärantikörpers

1. Antikörper	2. Antikörper	3. Antikörper	Blockierungs-/AK-
1:100	1:100	1:100	Milchpulver
1:200	1:100	1:100	Milchpulver

2.3.4.4 Hitzedemaskierung:Nachweis von Anti-Kallikrein human:

1. Antikörper: Anti-Kallikrein human
2. Antikörper: Schwein-anti-Kaninchen
3. Antikörper: PAP-Kaninchen

Negativ-Kontrolle: Kaninchen-Normalserum

Tabelle 18: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kallikrein an humanem *Testis* und Niere mittels PAP-Technik bei Variation der Konzentration des Primärantikörpers nach Mikrowellenvorbehandlung

Spezies	Gewebeart	1. Antikörper	2. Antikörper	3. Antikörper	Blockierungs-/
Human	Hoden	1:100	1:100	1:100	BSA-c
		1:200	1:100	1:100	BSA-c
Human	Niere	1:20	1:100	1:100	BSA-c
		1:50	1:100	1:100	BSA-c
		1:100	1:100	1:100	BSA-c
		1:200	1:100	1:100	BSA-c
		1:500	1:100	1:100	BSA-c
		1:1000	1:100	1:100	BSA-c
		1:2500	1:100	1:100	BSA-c
		1:5000	1:100	1:100	BSA-c
Positiv Kontrolle Ratte	Niere	1:50 Anti-smooth- muscle-actin	1:100 Kaninchen- anti-Maus	1:250 PAP-Maus	BSA-c

2.3.4.5 Proteinase K-Demaskierung

Nachweis von Kallikrein human:

1. Antikörper: Anti-Kallikrein human
2. Antikörper: Schwein-anti-Kaninchen
3. Antikörper: PAP-Kaninchen

Negativ-Kontrolle: Kaninchen Normalserum

Tabelle 19: Protokoll der AK-Verdünnung zum immunhistologischen Nachweis von Kallikrein an humanem *Testis* und humaner Niere sowie am Testis des Bullens mittels PAP-Technik bei Variation der Konzentration des Primärantikörpers nach Vorbehandlung mit Proteinase K

Spezies	Gewebeart	1. Antikörper	2. Antikörper	3. Antikörper	Blockierungs-/
Human	Hoden	1:100	1:100	1:100	BSA-c
		1:100	1:100	1:100	Milchpulver
		1:200	1:100	1:100	BSA-c
	Niere	1:50	1:100	1:100	BSA-c
		1:100	1:100	1:100	BSA-c
Bulle	Hoden	1:100	1:100	1:100	BSA-c
		1:200	1:100	1:100	BSA-c

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des Dot Blot Tests

Anfänglich überwogen unzureichende oder unbefriedigende Ergebnisse der immunhistochemischen Versuche am humanen System. Mit den Dot Blot Tests wurde gezeigt, dass der entsprechende Antikörper sein Antigen erkennt. Somit konnte das Nichterkennen des Antigens durch den Antikörper als eine Fehlerquelle für negative Ergebnisse ausgeschlossen werden. Humanes Kallikrein und humane Neutrale Metalloendopeptidase sind im Handel nicht erhältlich. Die Testreihen zum Beleg der Fähigkeit des Primärantikörpers sein Antigen zu erkennen, konnten entfallen, da sich nachfolgend durch Versuche an bovinem Gewebe überzeugende Belege für die Reaktivität des Kallikrein-Antikörpers fanden. Die Dot Blot Tests zeigten folgende Ergebnisse:

3.1.1 Antikörper-Wiedererkennungstest

1. Versuch:

Austestung des Antikörpers CALLA Clone J5, von links nach rechts in abnehmender Konzentration. Die drei stärksten Verdünnungen bilden sich nicht mehr auf dem NC-Streifen ab, werden also nicht mehr von dem Sekundärantikörper detektiert.

Der Antikörper CALLA wird von den in den folgenden Testreihen verwendeten (Sekundär-) Antikörper Kaninchen-anti-Maus HRP als Antigen eindeutig erkannt. Erst bei niedriger Antigen-Konzentration (weniger als 1,0 ng) zeigt der Antikörper eine zu geringe Sensitivität.

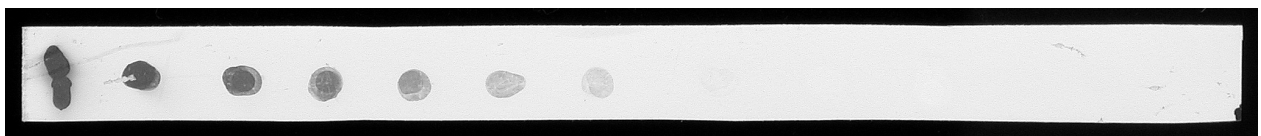


Abb. 8: Dot Blot Test Variante 2 B: Antikörper CALLA Clone J5 (NEP 24.11)

2. Versuch:

Austestung des Antikörpers Kaninchen-anti-Maus, von links nach rechts in abnehmender Konzentration. Die beiden stärksten Verdünnungen bilden sich nicht mehr auf dem NC-Streifen ab, werden also nicht mehr von dem (Tertiär-) Antikörper PAP-Maus detektiert.

Der Antikörper Kaninchen-anti-Maus wird zuverlässig von dem verwendeten (Tertiär-) Antikörper PAP-Maus als Antigen erkannt. Für Antigen-Konzentrationen unter 0,33 ng ist die Antigen-Antikörper-Reaktion des Antikörpers in dem Testverfahren nicht mehr nachweisbar.

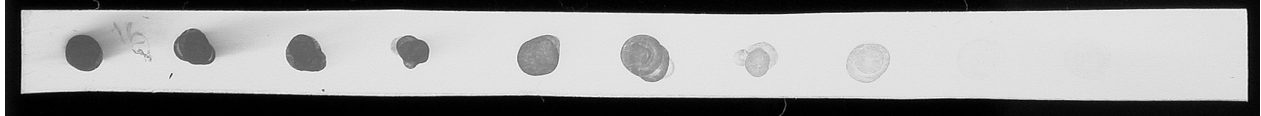


Abb. 9: Dot Blot Test Variante 2 B: Antikörper Kaninchen-anti-Maus

3. Versuch:

Austestung des Antikörpers Anti-LMW-Kininogen, von links nach rechts in abnehmender Konzentration. Auch in der schwächsten Konzentration (0,033 ng) bindet der (Sekundär-) Antikörper sicher an das Antigen. Der Antikörper Anti-LMW-Kininogen wird zuverlässig von dem verwendeten (Sekundär-) Antikörper Ziege-anti-Kaninchen HRP als Antigen erkannt. Der Antikörper zeigt eine hohe Sensitivität.

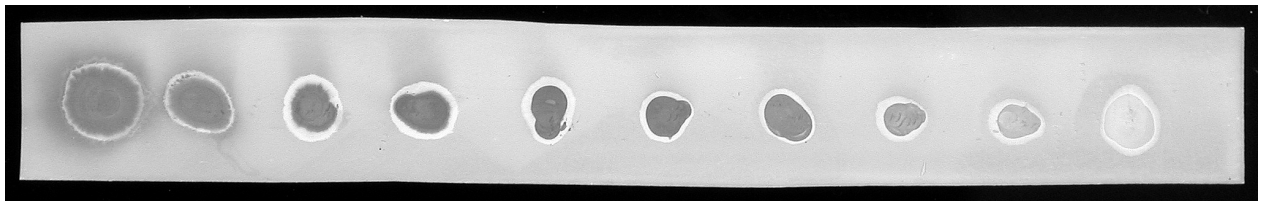


Abb. 10: Dot Blot Test Variante 2 B: Antikörper Anti-LWM-Kininogen

3.1.2 Nativer-Antigen-Wiedererkennungstest

4. Versuch:

Austestung des Antikörpers Anti-LMW-Kininogen, von links nach rechts in abnehmender Konzentration. Die beiden stärksten Verdünnungen bilden sich nur noch sehr schwach auf dem NC-Streifen ab, das LMW-Kininogen wird in dieser schwachen Konzentration also nicht mehr von dem Antikörper Anti-LMW-Kininogen detektiert.

Der Antikörper Anti-LMW-Kininogen erkennt zuverlässig das Protein LMW-Kininogen als Antigen. Erst bei einer sehr geringen Konzentration an LMW-Kininogen (0,1 - 0,033 ng) zeigt der Antikörper eine unzureichende Sensitivität.

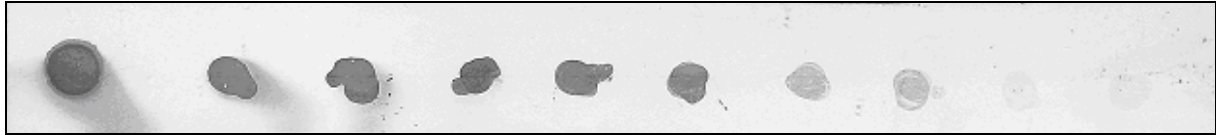


Abb. 11: Dot Blot Test Variante 3 A: Antikörper Anti-LMW-Kininogen

3.2 Immunhistologische Ergebnisse

Im Nachfolgenden werden, bezugnehmend auf die histoanatomischen Strukturen, die Ergebnisse der immunhistologischen Versuchsreihen zur Lokalisation von Gewebs-Kallikrein und weiterer Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems im männlichen Reproduktionstrakt aufgezeigt. Diese Versuche wurden vergleichend mit unterschiedlichen immunhistochemischen Methoden und z. T. parallel an verschiedenen Säugerspezies durchgeführt.

3.2.1 Ratte

3.2.1.1 Testis der adulten Ratte - Nachweis von Gewebs-Kallikrein

An Methacarn-fixierten *Testis*schnitten adulter Sprague-Dawley-Ratten (53, 90, 158 Tage) wurde Gewebs-Kallikrein mittels der PAP-Methode nachgewiesen. Innerhalb der *Tubuli seminiferi contorti* zeigte sich die spezifische Färbung an runden (\uparrow) und elongierten (\blacktriangle) Spermatiden im Bereich des Akrosoms bzw. der sich entwickelnden Akrosomenkappe in Form eines zunächst punktförmigen Farbsignals, in älteren Entwicklungsstadien der Keimzellen als schmaler membranständiger, durch DAB braun imponierender Saum (Abb. 12 A-D).

Spermatogonien und Spermatozyten sowie die Spermatozoen (\uparrow_2) im *Tubulus*lumen zeigten keine Kallikrein-Expression, so dass von einer stadienspezifischen Expression auszugehen ist (Abb. 12 A). Die glatten Muskelzellen der Blutgefäßwandung (\uparrow_1) im Hoden zeigten eine zytoplasmatische Gewebs-Kallikrein-Expression und dienten in den Versuchen als interne Positiv-Kontrolle (Abb. 12 A+B).

In der Negativ-Kontrolle konnte unter Verwendung des festphasenabsorbierten Kaninchen-Normalserums statt des 1. Antikörpers keine spezifische Färbung detektiert werden (Abb. 12 E).

In den Abbildungen sind die Resultate am *Testis* der 90 Tage alten Ratten dokumentiert. Identische Ergebnisse zeigten sich an der ebenfalls adulten Ratte mit 53 Tagen sowie an der 158 Tage alten Ratte, wenn auch bei letztgenannter in Form einer weniger intensiven Farbreaktion. Inwiefern diese Beobachtung Zufallsbefund ist oder Rückschlüsse auf erste

Veränderungen, im Sinne einer Alterungserscheinung zulässt, ist anhand eines Versuchstieres der entsprechenden Alterstufe nicht zu klären.

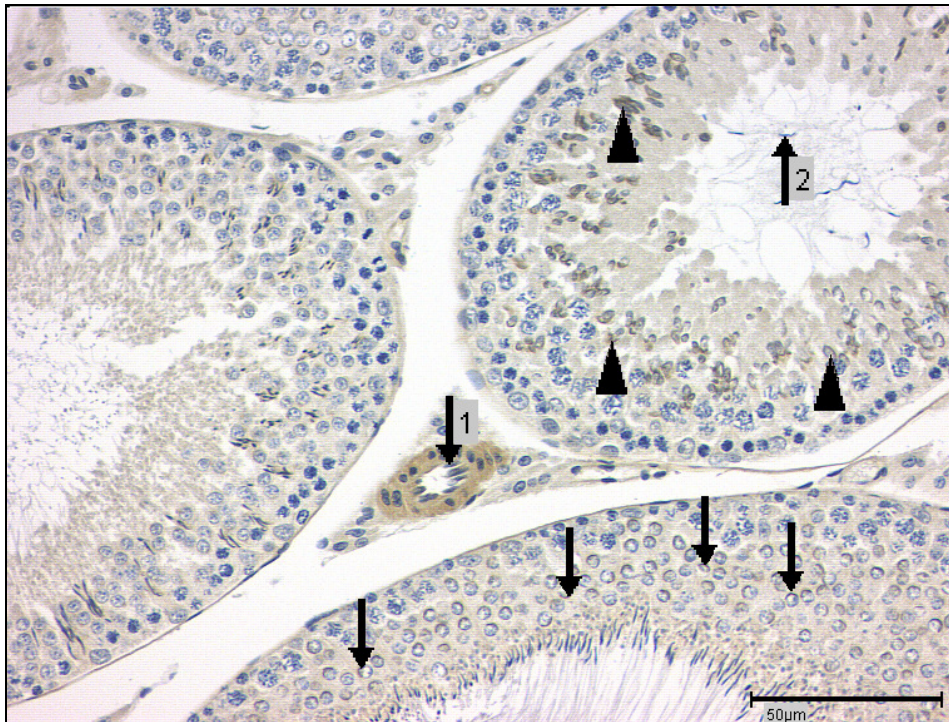


Abb. 12A: Kallikrein-Nachweis: Rattentestis (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 µm. In der Übersichtsaufnahme ein dezenter Hintergrund. Kallikrein-Expression an den runden (\uparrow) und den elongierten Spermatischen (\blacktriangle) im Bereich der Akrosomenkappe sowie zytoplasmatisch in den zirkulär verlaufenden Muskelzellen der Gefäßwände (\uparrow_1). Kein Kallikrein-Nachweis an den Spermatozoen (\uparrow_2) im Tubuluslumen.

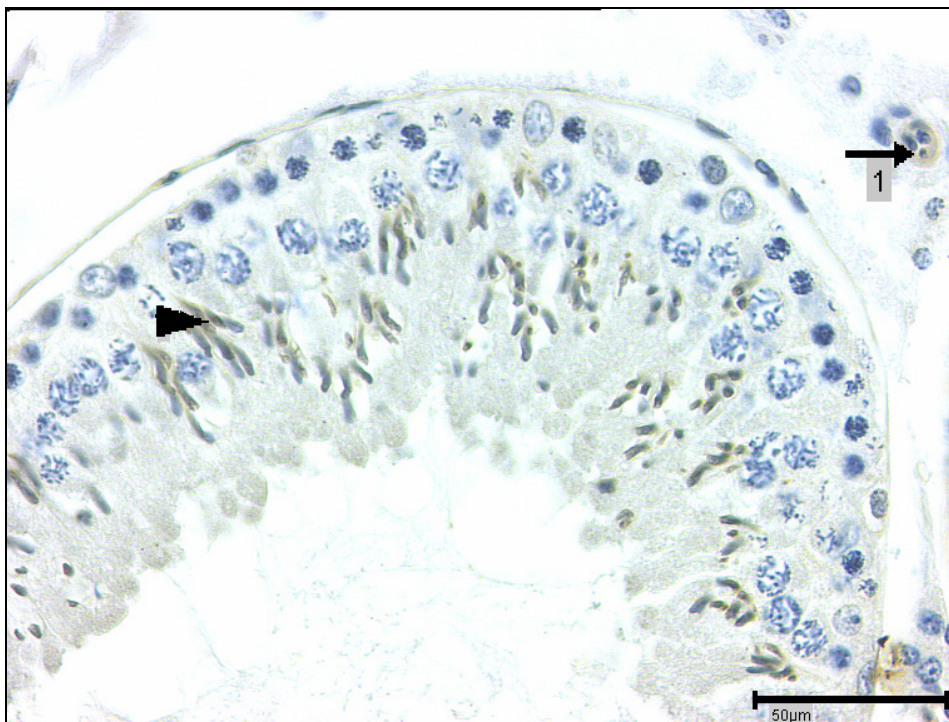


Abb. 12B: Kallikrein-Nachweis: Rattentestis (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 µm. Deutliche Kallikrein-Expression an der akrosomalen Kappe der sich elongierenden Spermatische (\blacktriangle) sowie dezenter in den muskulären Zellen der Gefäßwand (\uparrow_1).

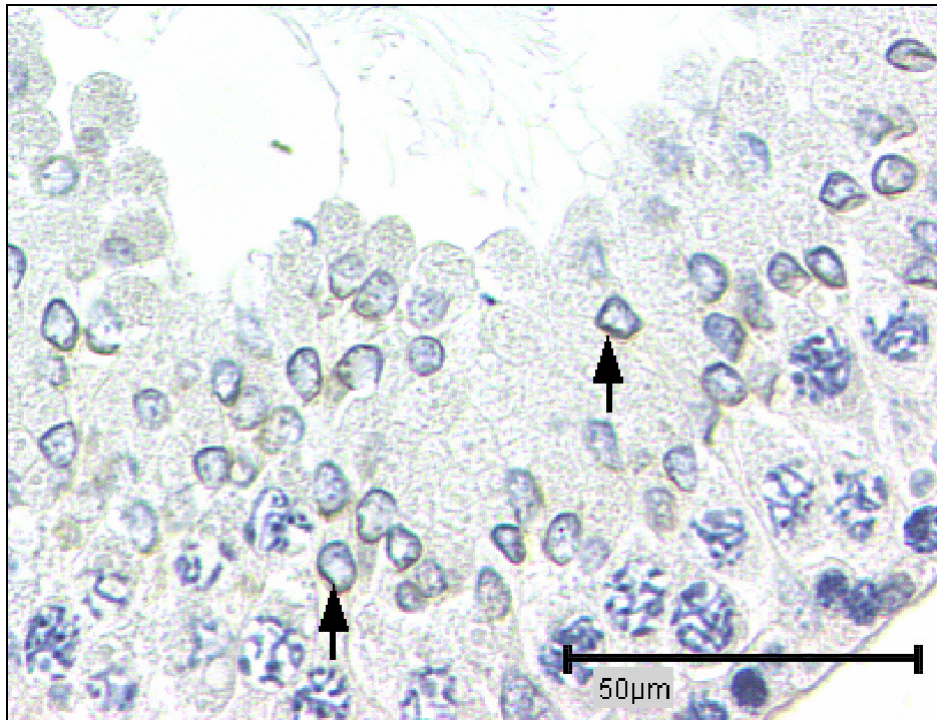


Abb. 12C: Kallikrein-Nachweis: Rattentestis (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . Nachweis der Kallikrein-Expression an der sich ausdifferenzierenden akrosomalen Kappe der runden Spermatide (\uparrow). Dezenter Hintergrund.

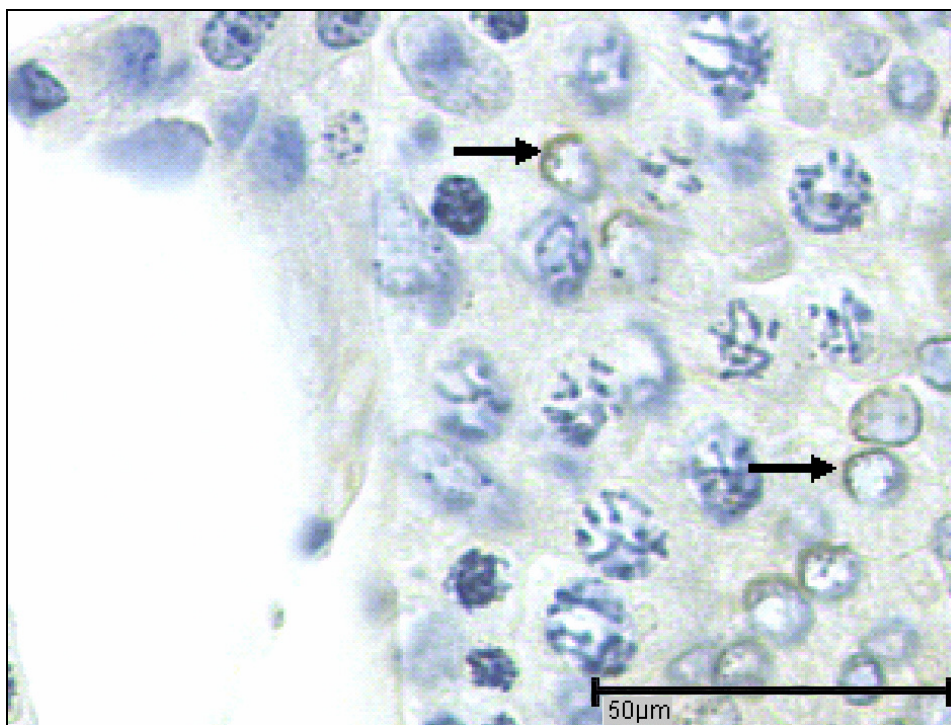


Abb. 12D: Kallikrein-Nachweis: Rattentestis (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . In der Detailaufnahme Nachweis der Kallikrein-Expression an der sich ausdifferenzierenden akrosomalen Kappe der runden Spermatide (\uparrow). Leichter Hintergrund.

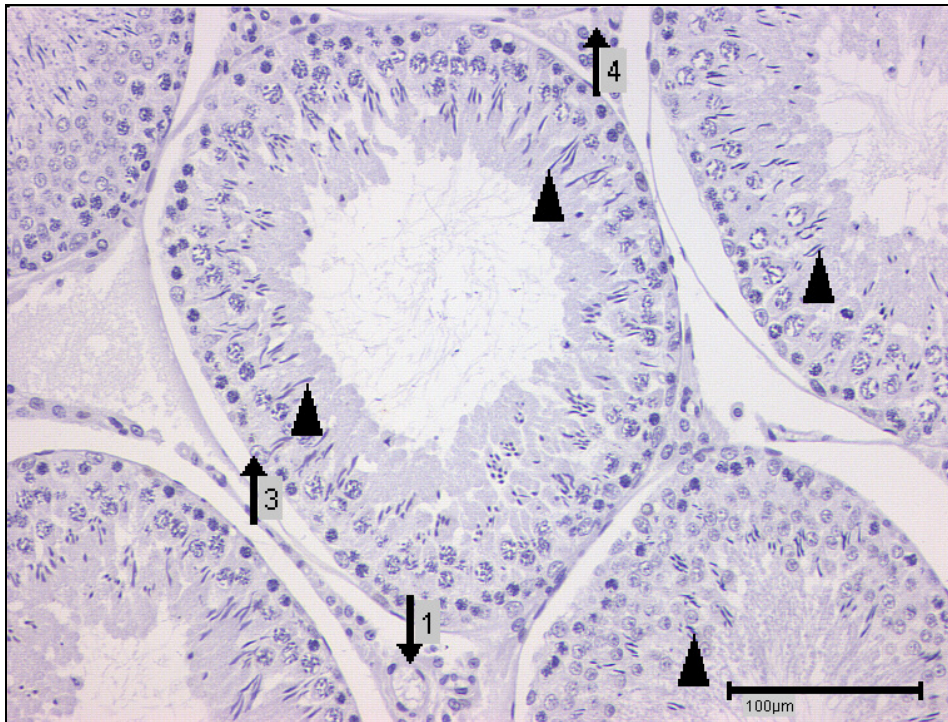


Abb. 12E: Negativ-Kontrolle: Rattenhoden (90 Tage), PAP-Methode.

Maßstab entspricht 100 μm . Übersichtaufnahme: Kein Nachweis einer spezifischen Färbung. *Interstitielles Stroma* mit Gefäß (\uparrow_1) und Leydig-Zellen (\uparrow_2). Elongierte Spermatiden (\blacktriangle), basal im Keimepithel die Sertoli-Zelle (\uparrow_3).

3.2.1.2 Niere der adulten Ratte - Nachweis von Gewebs-Kallikrein

Als externe positive Kontrolle diente Methacarn-fixierte Rattenniere, da hier ein eindeutiger Nachweis von Gewebs-Kallikrein bereits beschrieben wurde (Figuroa *et al.*, 1984). Eine spezifische Anfärbung zeigte sich im Nierentubulusapparat. In den *Tubulusepithelzellen* der Mittelstücke (\uparrow in Abb. 13 A-C) konnte Kallikrein membrangebunden im *luminal* gerichteten Zellanteil nachgewiesen werden sowie zytoplasmatisch in den Mesangienzellen (\uparrow_1) der Glomerula (Abb. 13 A+C). Eine deutliche Kallikrein-Expression zeigt sich in den Gefäßmuskulzellen, dabei ausgeprägter in den muskelstarken Gefäßwänden (\blacktriangle) größerer Gefäße (Abb. 13 A+D), weniger intensiv in den kleinen Gefäßen (Abb. 13 B+C). Weder in den Hauptstücken (\times in Abb. 13 A+C), noch in den Sammelrohren des Nierentubulus-systems zeigt sich eine positive Färbung. Das Endothel der Gefäße stellt sich negativ dar (Abb. 13 D).

Die mit Kaninchen-Normalserum behandelte Negativ-Kontrolle zeigt keine spezifische Färbung (Abb. 13 E).

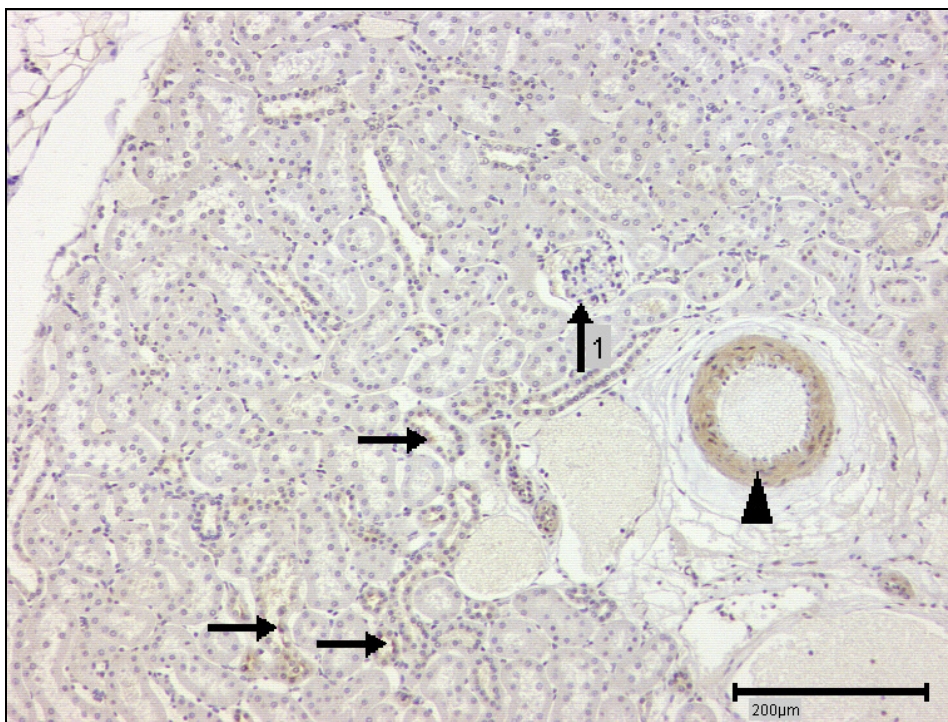


Abb. 13A: Kallikrein-Nachweis: Rattenniere (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Übersichtsaufnahme. Glomerulum (\uparrow_1), muskuläre Gefäßwand (\blacktriangle), Mittelstück des Nierentubulussystem (\uparrow).

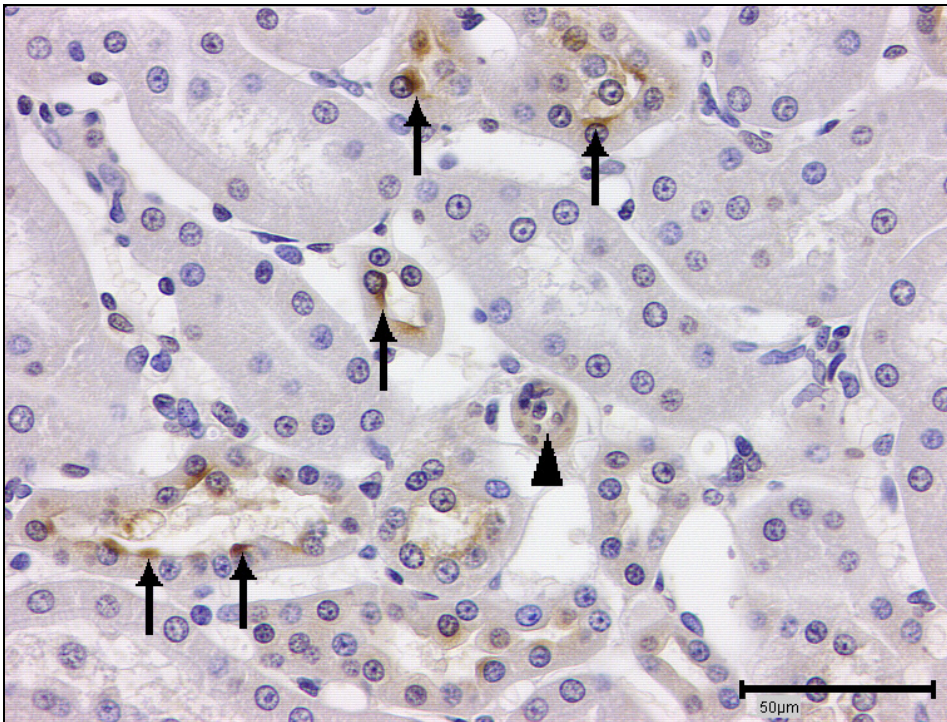


Abb. 13B: Kallikrein-Nachweis: Rattenniere (90 Tage alte Ratte), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 µm. In den *Tubuluszellen* der Mittelstücke (↑) membrangebunden, nach *luminal* hin eine deutliche Kallikrein-Expression. Muskulärer Anteil der Gefäßwand mit geringerer Farbreaktion (▲).

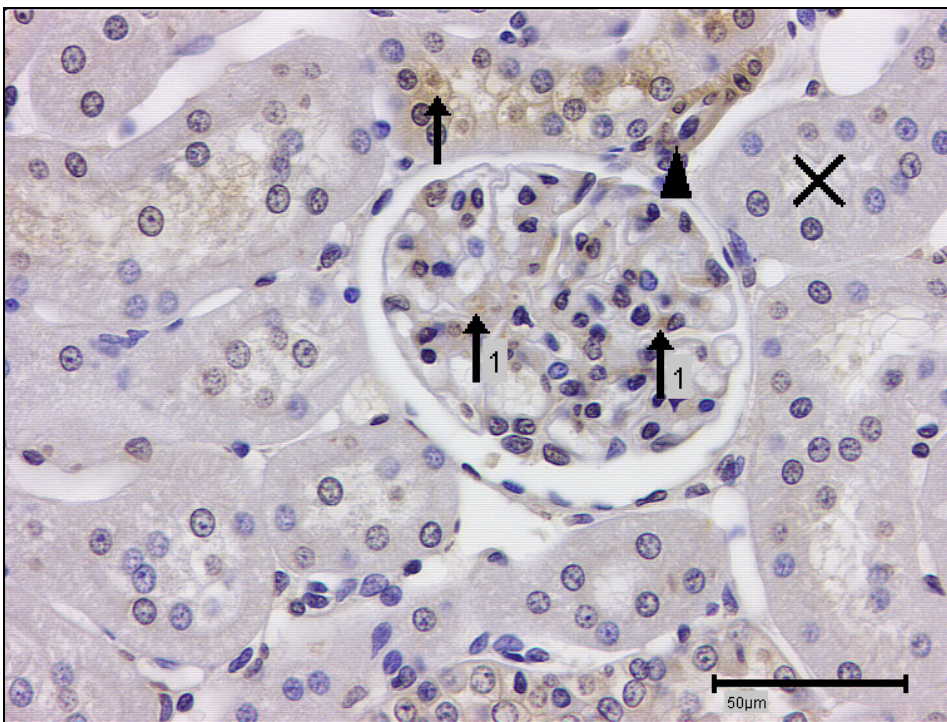


Abb. 13C: Kallikrein-Nachweis: Rattenniere (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 µm. Kallikrein-Expression teilweise in den Mesangienzellen des Glomerulum (↑₁), zytoplasmatisch in den Muskelzellen der Gefäßwand (▲) und in den Mittelstückzellen (↑) des Nierentubulussystems. Die Zellen der Hauptstücke (×) ohne Kallikrein-Nachweis.

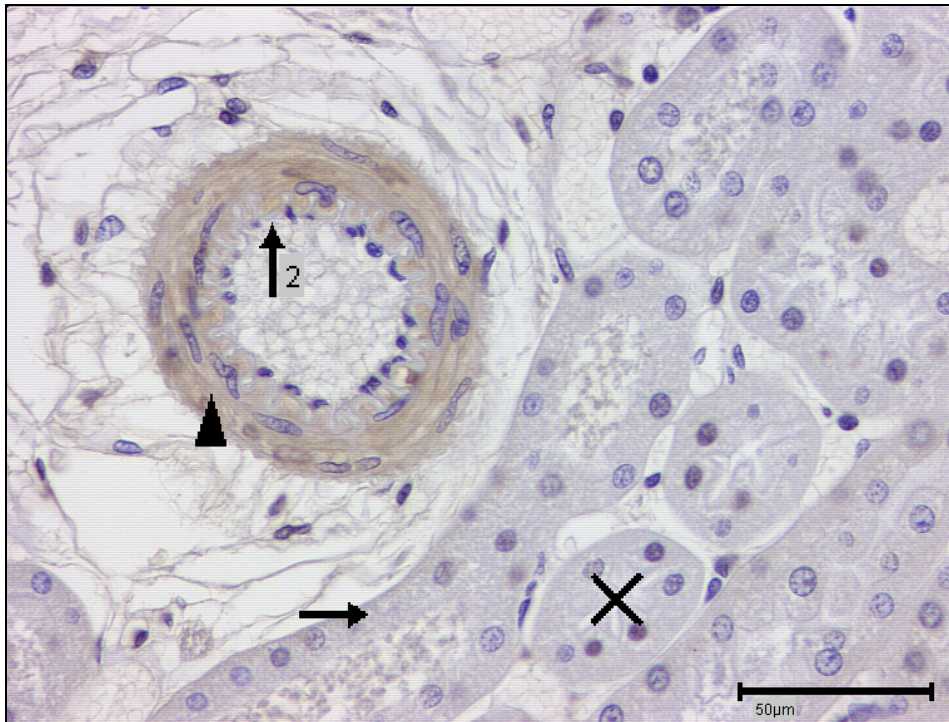


Abb. 13D: Kallikrein-Nachweis: Rattenniere (90 Tage alte Ratte), PAP-Methode.

Maßstab entspricht 50 μm . Detailaufnahme mit deutlicher Kallikrein-Expression zytoplasmatisch in den zirkulär verlaufenden Gefäßmuskelzellen (\blacktriangle), die Elastica interna der Gefäßwand (\uparrow_2) ohne Farbreaktion. Der Nierentubulusapparat ohne Kallikrein-Nachweis, hier im Bild zwischen Hauptstück (\times) und Gefäß ein Anteil des Mittelstücks (\uparrow).

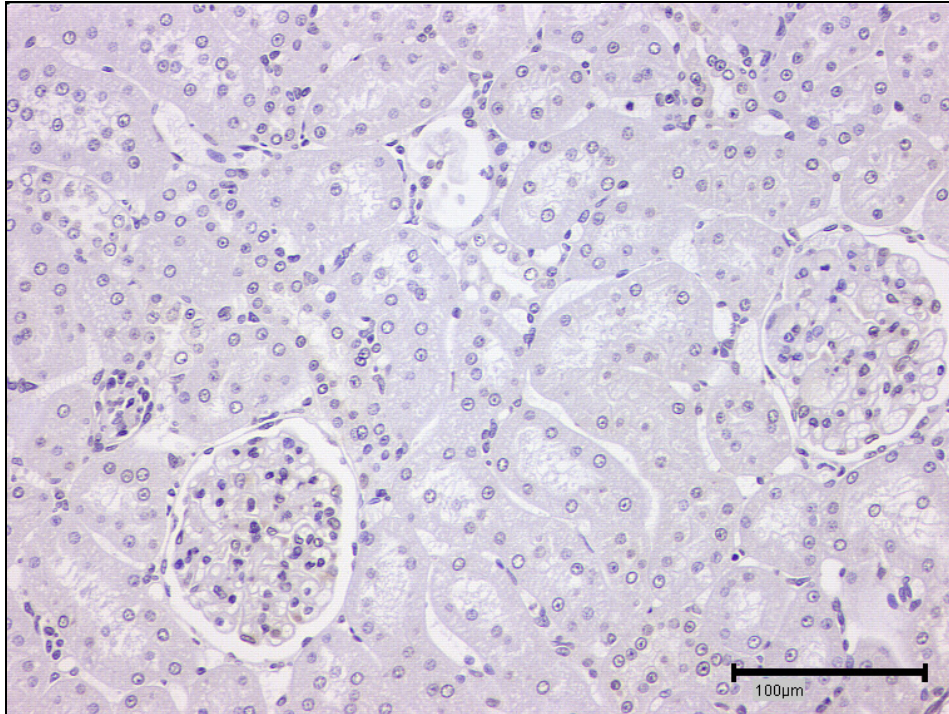


Abb. 13E: Negativ-Kontrolle: Rattenniere (90 Tage), PAP-Methode.

Maßstab entspricht 100 μm

3.2.1.3 Testis der juvenilen Ratte - Nachweis von Gewebs-Kallikrein

Weitere Versuche erfolgten an *Testis*schnitten pubertierender Ratten im Alter von 32 Tagen. Der erste Zyklus der Spermatogenese befindet sich in der Entwicklungsstufe 9-10 (siehe auch Abb. 4). Folglich sind noch keine Spermatozoen im *Tubulus*lumen nachweisbar. Das Gewebs-Kallikrein lässt sich an den runden Spermatiden (▲) (Abb. 14 B) sowie an den sich beginnend elongierenden Spermatiden (↑) (Entwicklungsstufe 10) (Abb. 14 A) im Bereich der sich ausdifferenzierenden Akrosomenkappe nachweisen. Im Bereich der Gefäßmuskelzellen (↑₁) zeigt sich lediglich eine dezente zytoplasmatische Färbung (Abb. 14 A).

In der Negativ-Kontrolle (Abb. 14 C) kein Anhalt für eine spezifische oder unspezifische Färbereaktion.

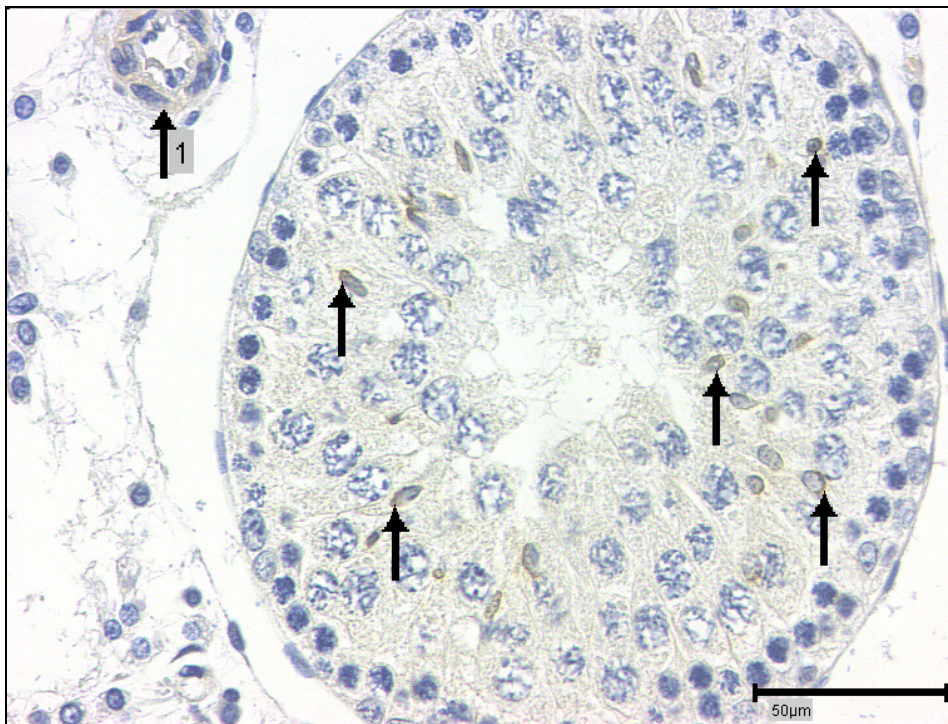


Abb. 14A: Kallikrein-Nachweis: Rattentestis (32 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . Kallikrein-Expression an der akrosomalen Kappe der sich elongierenden Spermatide (↑) sowie dezente zytoplasmatische Färbung im Bereich der Gefäßmuskelzellen (↑₁).

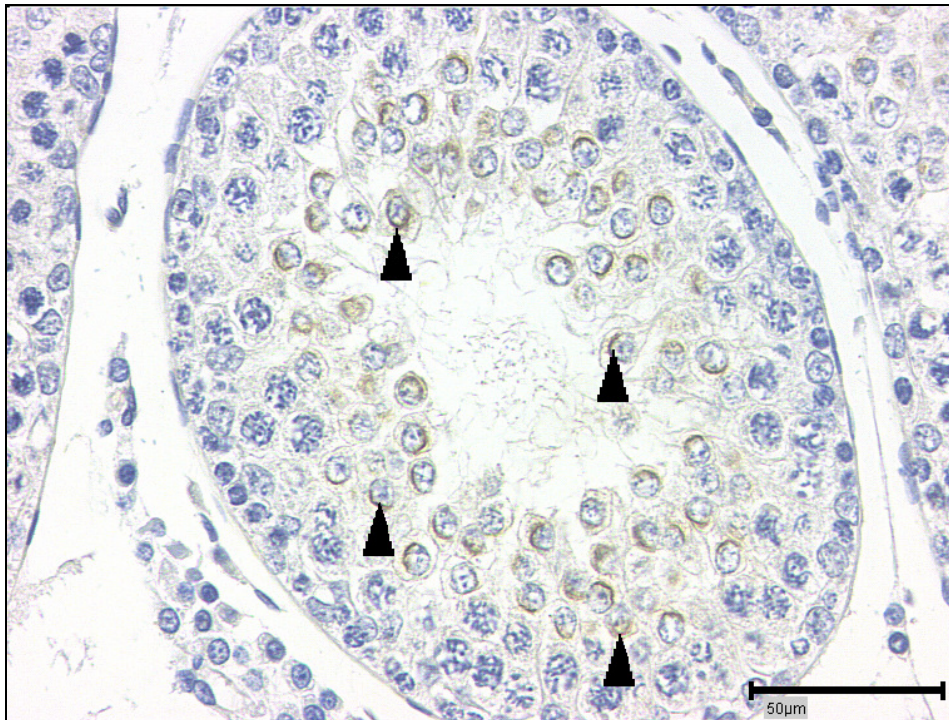


Abb. 14B: Kallikrein-Nachweis: Rattentestis (32 Tage), PAP-Methode.
Maßstab entspricht 50 µm. Deutlicher Kallikrein-Nachweis an der sich ausbildenden akrosomalen Kappe der runden Spermatozoen (▲).

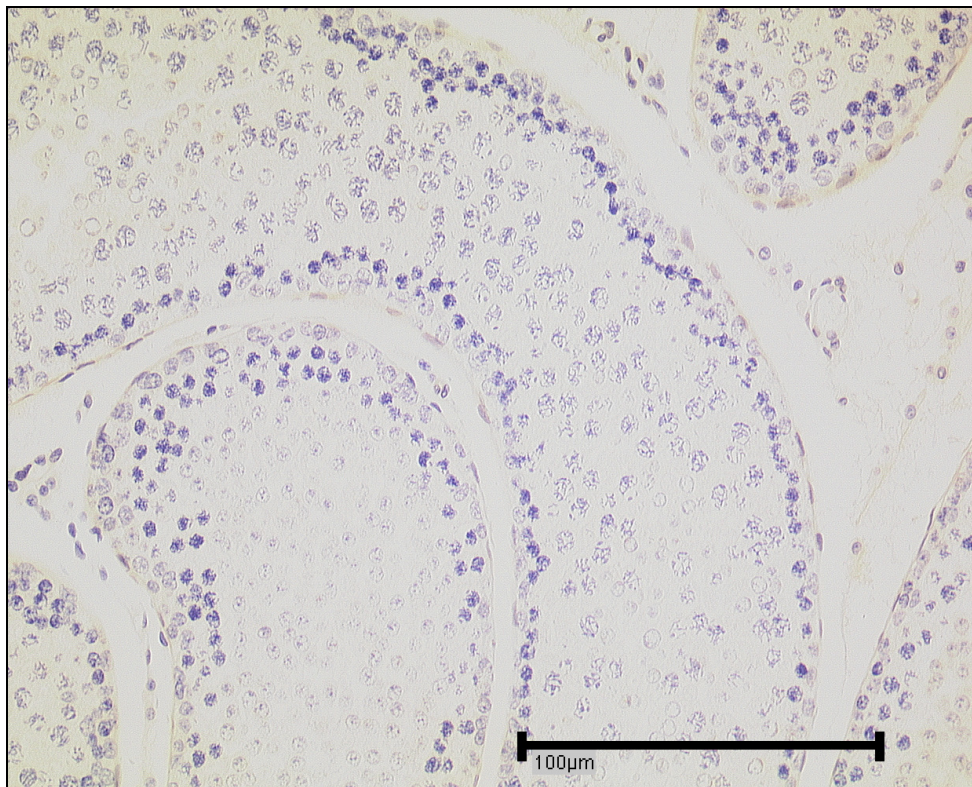


Abb. 14C: Negativ-Kontrolle: Rattentestis (32 Tage), PAP-Methode.
Maßstab entspricht 100 µm.

3.2.1.4 Epididymis der adulten Ratte - Nachweis von Gewebs-Kallikrein

3.2.1.4.1 Caput epididymis

An Methacarn-fixierten *Epididymis*schnitten von adulten Sprague-Dawley-Ratten (53, 90 und 158 Tage) zeigte sich nach organotopographischer Unterteilung in *Caput*, *Corpus* und *Cauda* ein unterschiedliches Verteilungsmuster des Gewebs-Kallikreins.

Im *Caput epididymidis*, der vornehmlich aus den *Ductuli efferentes* besteht, konnte keine Kallikrein-Expression detektiert werden (Abb. 15 A+B). Vereinzelt zeigte sich in den *Nukleoli* der Epithelzellen (\uparrow_2) eine braune Färbung, die aber als unspezifische Reaktion anzusehen war, da Positiv-Probe und Negativ-Kontrolle (Abb. 15 C) nur ein unwesentlich voneinander divergierendes Färbeverhalten zeigten. In den Gefäßwänden (\uparrow_1) zeigte sich teilweise ein dezentes Farbsignal (Abb. 15 A).

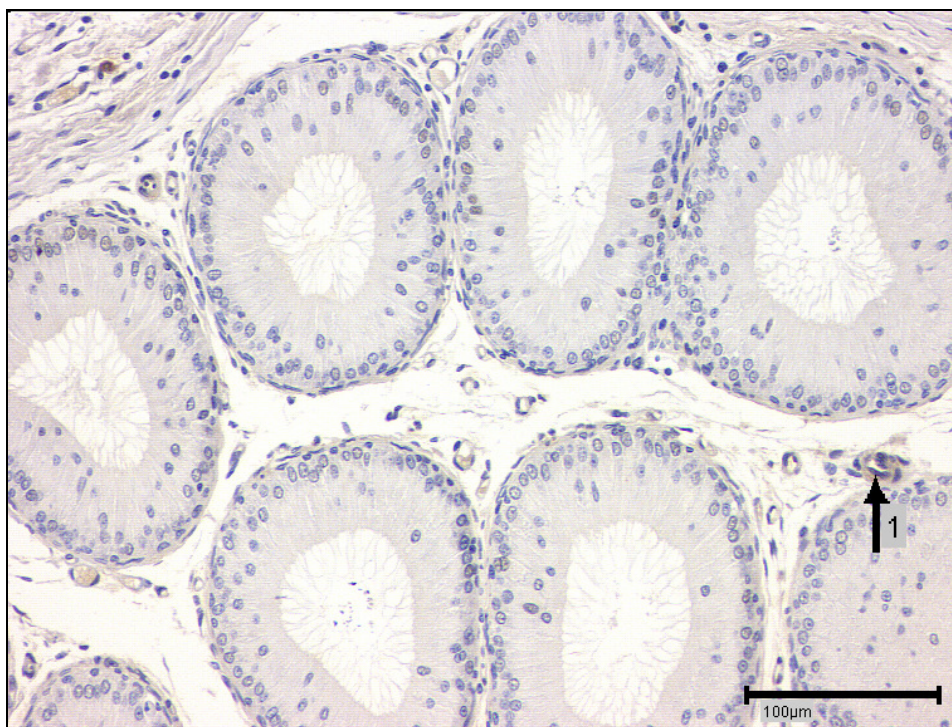


Abb. 15A: Kallikrein-Nachweis: *Caput epididymis* (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Keine spezifische Färbung in den *Ductuli efferentes* des *Caput epididymis*. Im muskulären Anteil der Gefäßwand (\uparrow_1) eine leichte Kallikrein-Expression.

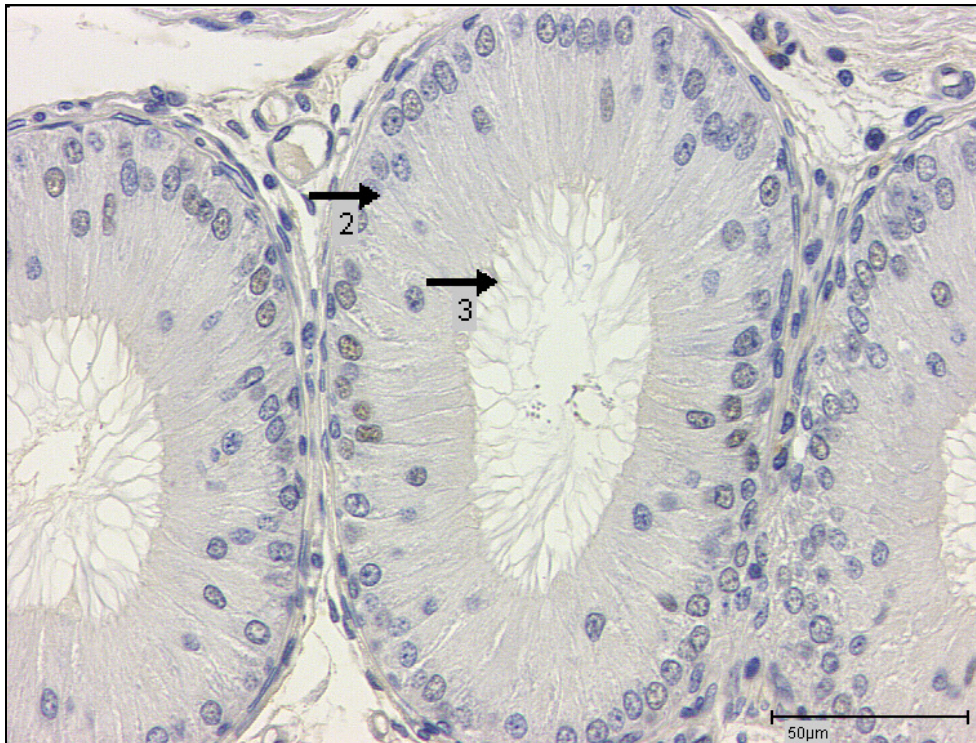


Abb. 15B: Kallikrein-Nachweis: *Caput epididymis* (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . Kein Kallikrein-Nachweis in den *Ductuli efferentes*. Die dezente bräunliche Färbung der Zellkerne der Epithelzellen (\uparrow_2) ist eher als unspezifische Färbereaktion zu werten. Kinozilien (\uparrow_3).



Abb. 15C: Negativ-Kontrolle: *Caput epididymis* (90 Tage), PAP-Methode. Keine spezifische Färbung, zu den Positiv-Proben ein nahezu identisches Ergebnis. Gefäßwandung (\uparrow_1).

3.2.1.4.2 Corpus epididymis

Im *Corpus epididymidis* zeigten die hochprismatischen Epithelzellen des *Ductus epididymidis* eine spezifische zytoplasmatische Kallikrein-Expression, teilweise im basalen Zellbereich (\uparrow_1 in Abb. 16 B), somit basal des *Nukleolus* und teilweise im *apikalen* Epithelzellanteil (\uparrow_2 in Abb. 16 B+C). Die spezifische Expression war immer in einzelnen Zellen bzw. Zellverbänden des entsprechenden Ganganschnittes zu detektieren. Auch in den umgebenden *Ductuli* präsentierte sich nur in einzelnen Epithelzellen eine positive Reaktion. Im Bereich der *Sterozilien* waren vesikuläre Strukturen (\uparrow_3 in Abb. 16 B+C) mit partieller Kallikrein-Expression nachzuweisen. Die *Myozyten* der Wandung des *Ductus epididymidis* (\uparrow_4) zeigten dagegen eine homogene, zytoplasmatische Färbung auf. Die Spermatozoen im Lumen des Nebenhodenganges (\uparrow_6) wiesen keine Kallikrein-Expression auf (Abb. 16 C). Auch das *Stroma* (\uparrow_5) stellte sich negativ dar (Abb. 16 C).

Die mit Kaninchen-Normalserum präinkubierten Negativ-Kontrollen der entsprechenden Schnitte des Rattenepididymidis und des partiell miterfassten *Ductus deferens* (Abb. 17 F) zeigten keine spezifische Färbung in den beschriebenen Lokalisationen. Bei ihnen zeigte sich nur eine sehr geringe allgemeine Hintergrundreaktion.

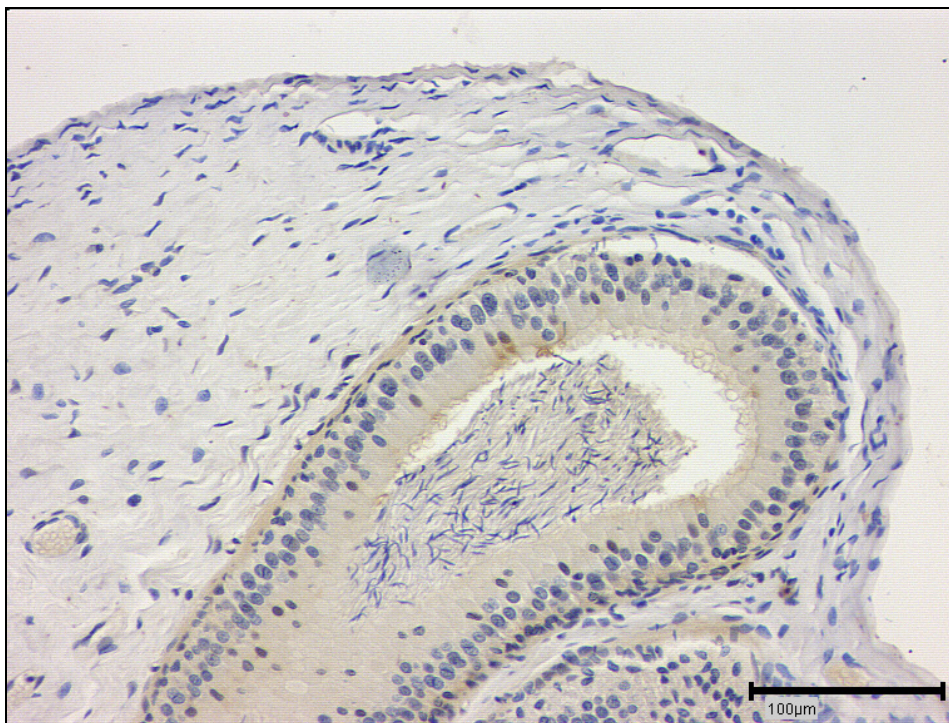


Abb. 16A: Kallikrein-Nachweis: *Corpus epididymidis* der Ratte (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Kallikrein-Expression im *apikalen* bzw. *luminalen* Zellanteil und als vesikuläre Abschnürungen im *Sterozilien*besatz der Epithelzellen.

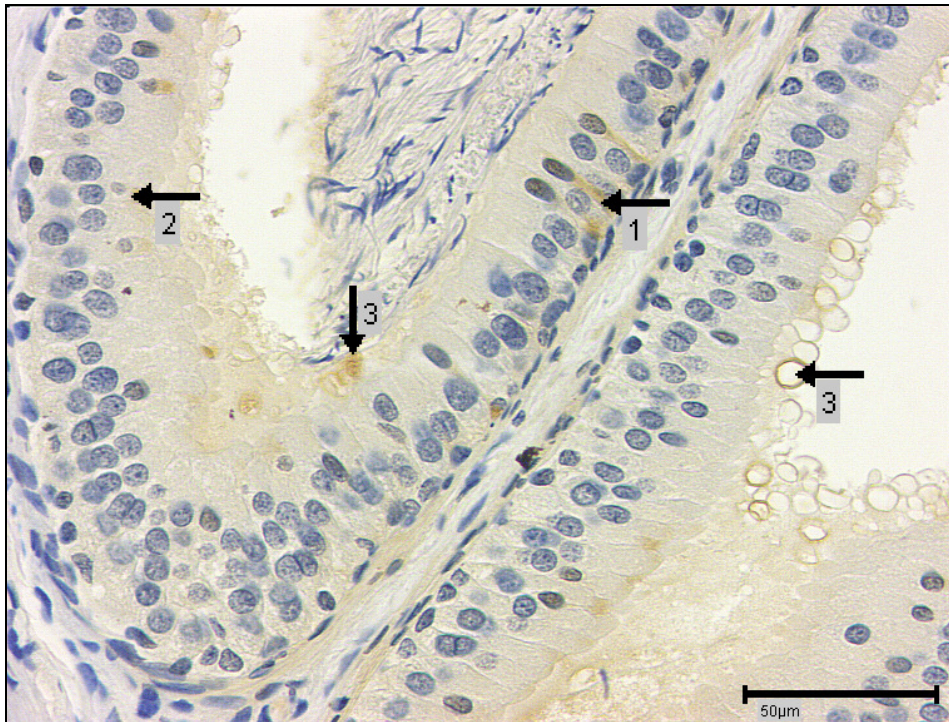


Abb. 16B: Kallikrein-Nachweis: *Corpus epididymis* der Ratte (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 µm. Kallikrein-Expression sowohl im basalen Anteil der Epithelzelle, d. h. basal des Zellkerns (↑₁) als auch im apikalen bzw. luminalen Zellanteil (↑₂) und in Form vesikulärer Abschnürungen (↑₃) im Sterozilienbesatz der Epithelzellen.

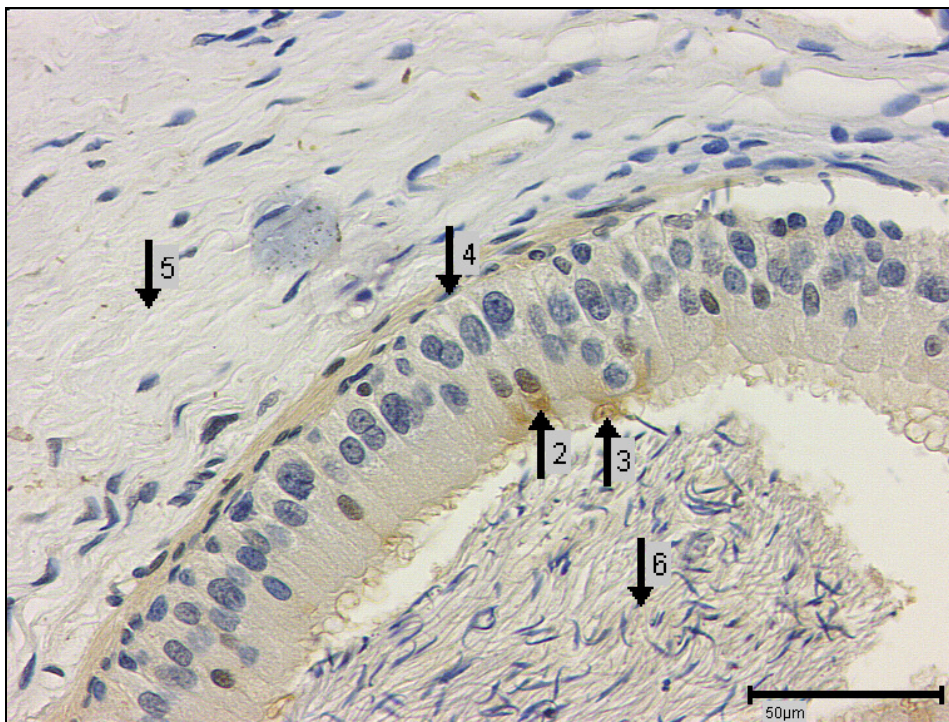


Abb. 16C: Kallikrein-Nachweis: *Corpus epididymis* der Ratte (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 µm. Kallikrein-Expression sowohl apikal in der Epithelzelle (↑₂), als auch in den vesikulären Abschnürungen (↑₃) im Bereich der stereozilienbesetzten Epithelzellen. Dezentler Kallikrein-Nachweis in den Muskelzellen (↑₄) der Wandung des *Ductus epididymis*. Das *Stroma* (↑₅) und der Spermatozoen im Lumen (↑₆) ohne Kallikrein-Expression.

3.2.1.4.3 Cauda epididymis

Im Bereich der *Cauda epididymidis* konnte reproduzierbar regional eine markante, *intrazelluläre* Anfärbung im Epithel des *Ductus epididymidis* dargestellt werden (Abb. 17 A-D). Die Kallikrein-Expression stellte sich ausgeprägt im basalen Teil der Epithelzellen, basal des *Nukleolus* (▲ in Abb. 17 A-D) dar, fokal aber auch in den *luminalen* Anteilen (↑ in Abb. 17 B+C). Es zeigte sich hierbei ein inhomogenes Verteilungsmuster innerhalb des *Tubulus* mit einer fokalen, multizentrischen Anfärbung. Wie schon im *Corpus epididymidis* zeigten die muskulären Wandanteile (↑₁ in Abb. 17 A+D+E) des Nebenhodenganges eine homogene, zytoplasmatische Farbreaktion. Die im Lumen befindlichen Spermatozoen (↑₃ in Abb. 17 B+D) zeigten keine spezifische Färbung, ebenso konnte im *Interstitium* keine oder lediglich eine leichte unspezifische „Hintergrundreaktion“ dargestellt werden.

In den *interstitiellen* Gefäßen zeigte sich in den zirkulär verlaufenden glatten Muskelzellen (↑₄ in Abb. 17 B+E) eine homogene Kallikrein positive Färbung, die Lymphgefäße wiesen keine spezifische Färbung auf (↑₂ Abb. 17 B).

Die Negativ-Kontrolle wurde mit Kaninchen-Normalserum präinkubiert, hier zeigte sich weder eine spezifische Farbreaktion noch ein unspezifischer Hintergrund (Abb. 17 F).



Abb. 17A: Kallikrein-Nachweis: *Ductus epididymidis* der Ratte (90 Tage), PAP-Methode
Maßstab entspricht 500 μm . Deutliche Kallikrein-Expression im Epithel des *Ductus epididymidis* (▲) und in den zirkulär verlaufenden Muskelfasern des Nebenhodenganges (↑₁).

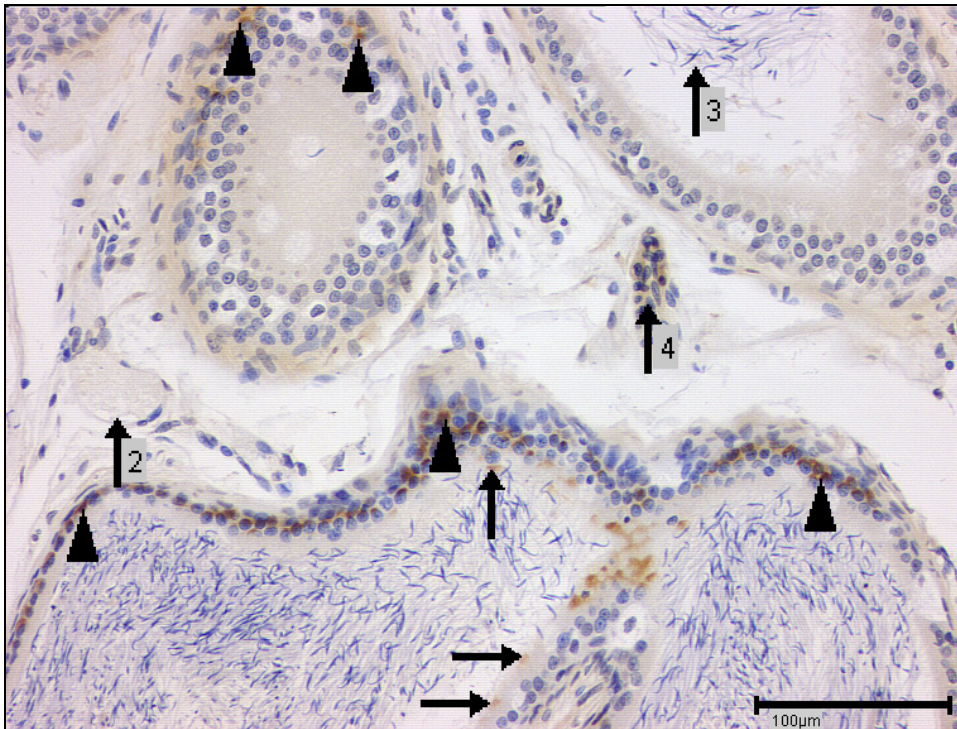


Abb. 17B: Kallikrein-Nachweis: *Cauda epididymis* der Ratte (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Im *Ductus epididymis* Kallikrein-Expression basal (▲) und teilweise *apikal* in den Epithelzellen (↑). Die Gefäßwandung mit dezenter Braunfärbung (↑₄), das Lymphgefäß (↑₂) und die Spermatozoen (↑₃) im Nebenhodengang ohne Kallikrein-Nachweis.

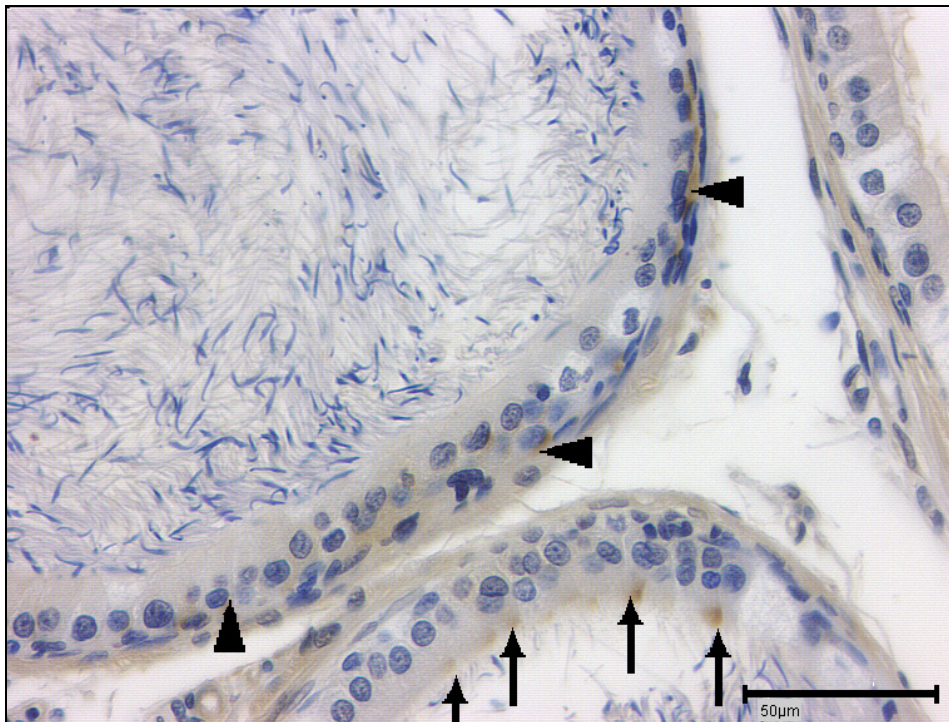


Abb. 17C: Kallikrein-Nachweis: *Cauda epididymis* (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . Deutliche Kallikrein-Expression membranständig sowohl im basalen Anteil der Epithelzelle (▲) als auch im *luminalen* Teil der epithelialen Zellen (↑).

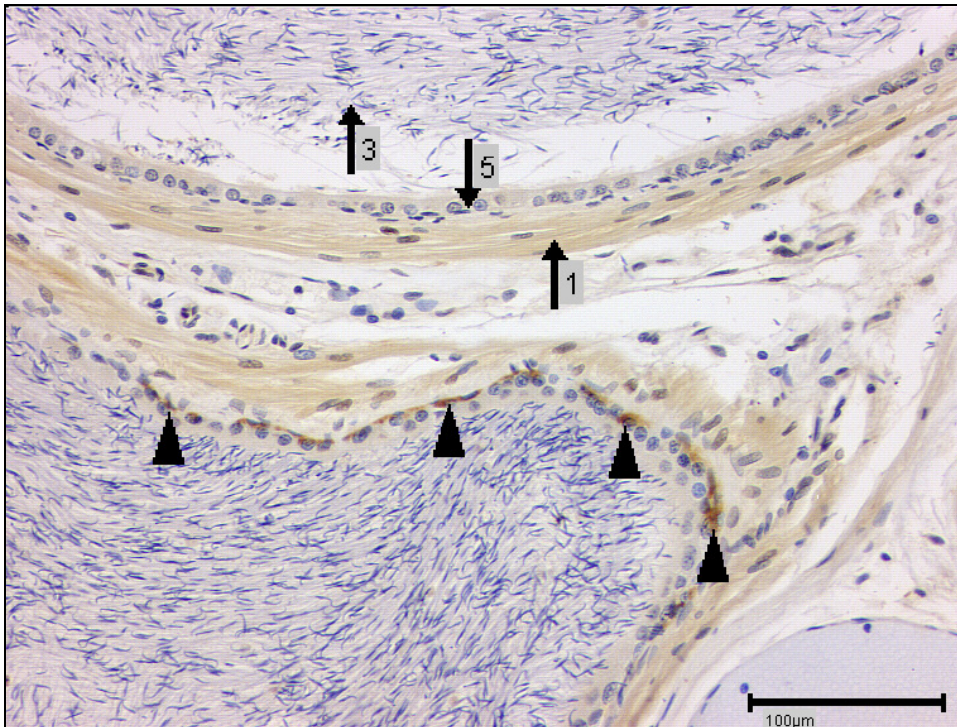


Abb. 17D: Kallikrein-Nachweis: *Cauda epididymis* (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Deutliche Kallikrein-Expression im Epithel des *Ductus epididymis*, membrangebunden basal des Zellkerns (\blacktriangle) sowie zytoplasmatisch in den zirkulär verlaufenden Muskelfasern (\uparrow_1) des Nebenhodenganges. Das Epithel flach (\uparrow_5) mit einem Besatz aus *Sterozilien*, im Lumen reichlich Spermatozoen (\uparrow_3), kein Kallikrein-positives Ergebnis.

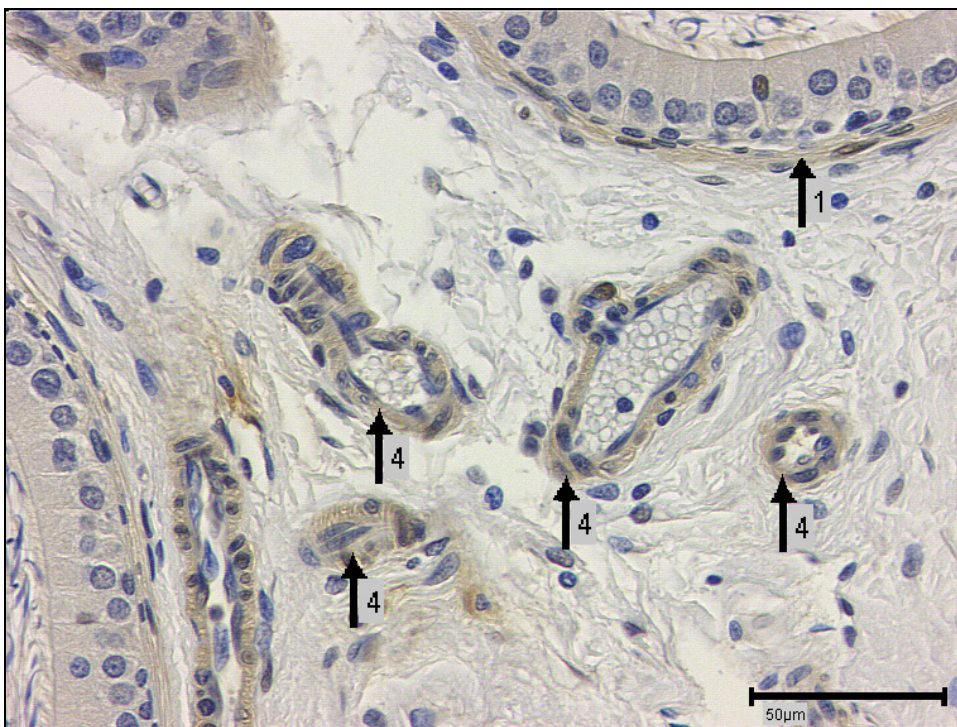


Abb. 17E: Kallikrein-Nachweis: *interstitielle* Gefäße im Nebenhoden der Ratte (90 Tage) PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . Kallikrein-Expression zytoplasmatisch in den *Myozyten* der Gefäßwände (\uparrow_4) und ebenso in den *peritubulären Myozyten* (\uparrow_1).

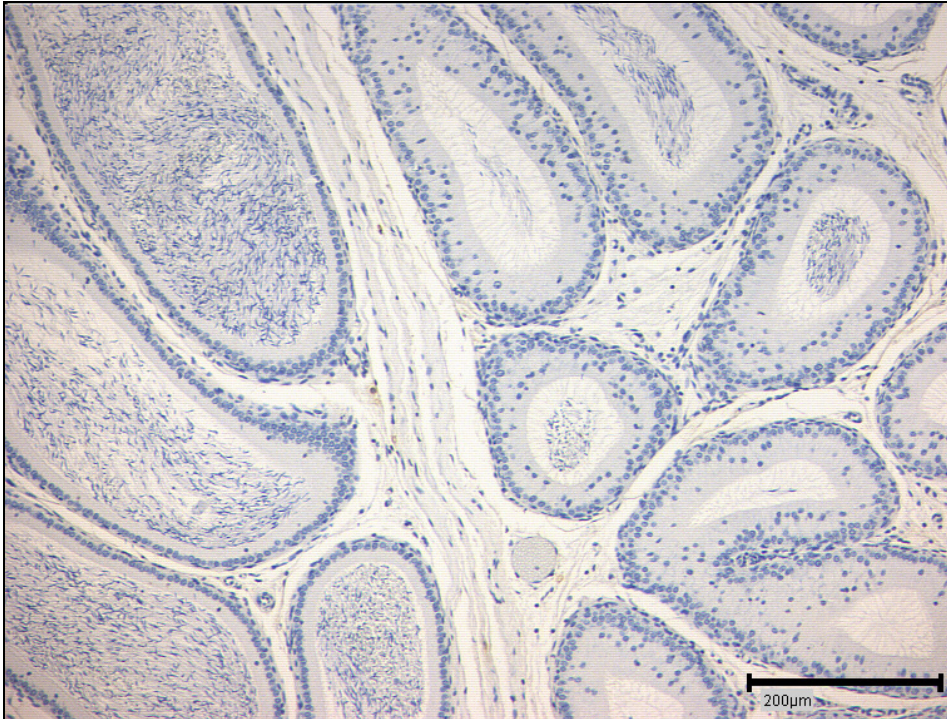


Abb. 17F: Negativ-Kontrolle: *Corpus* und *Cauda epididymis* der Ratte (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Keine spezifische oder unspezifische Färbung in den Ganganschnitten des Nebenhodens. Im linken Bildteil Anteile des *Cauda*, im rechten Bildanteil *Ductus*-Querschnitte aus dem Bereich des *Corpus epididymis*.

3.2.1.4.4 Ductus deferens

In den Nebenhodenschnitten, in denen zusätzlich der *Ductus deferens* miterfasst worden war (Abb. 18 A-D), zeigte sich in diesem Bereich eine zytoplasmatische Kallikrein-Expression mit homogenem Verteilungsmuster in den konzentrisch verlaufenden Muskelschichten des Samenleiters (\blacktriangle in Abb. 18 A-D). Im Epithel des *Ductus deferens* zeigte sich multifokal im basalen Epithelzellanteil Kallikrein (\uparrow_1 in Abb. 18 C). Die Spermatozoen im Lumen zeigten keine spezifische Färbung (\times in Abb. 18 A und \uparrow_3 in Abb. 18 D).

In der Negativ-Kontrolle keine Färbung, keine Hintergrundreaktion (Abb. 18 E).

Als externe Positiv-Kontrolle diente wie zuvor beschrieben (siehe oben) Methacarn-fixierte Rattenniere bzw. Rattenhoden (Abb. 13 bzw. Abb. 12).

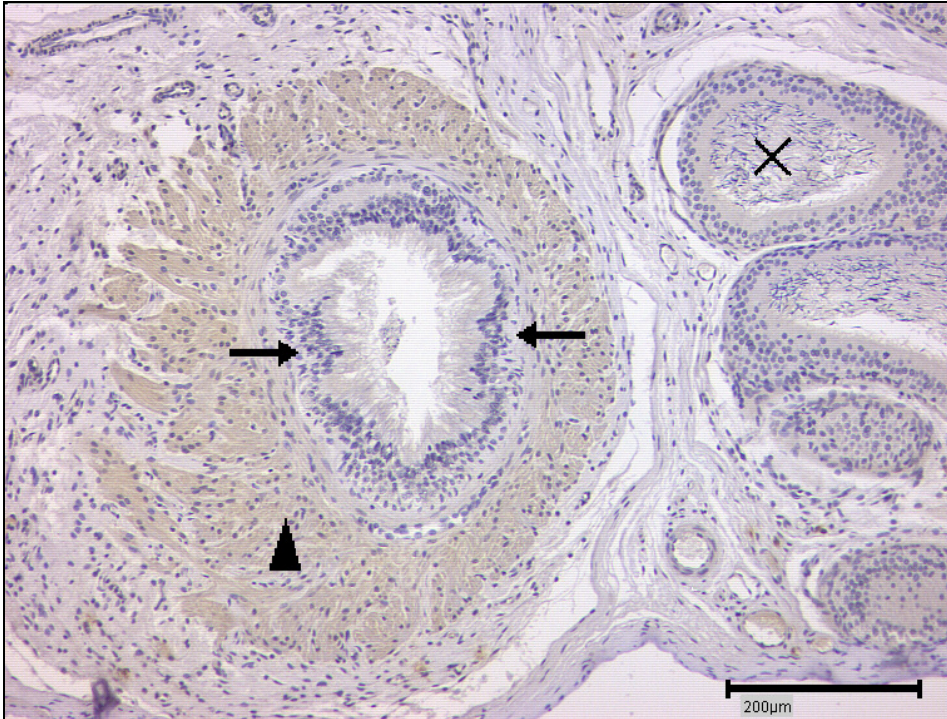


Abb. 18A: Kallikrein-Nachweis: *Epididymis - Ductus deferens* der Ratte (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Deutliche Kallikrein-Expression zytoplasmatisch in den *Myozyten* (\blacktriangle) der muskelstarken Wandung des *Ductus deferens*. Epithel (\uparrow) des Samenleiters. Angrenzend Anteile des *Ductus epididymis* mit Spermatozoen (\times) im Lumen.

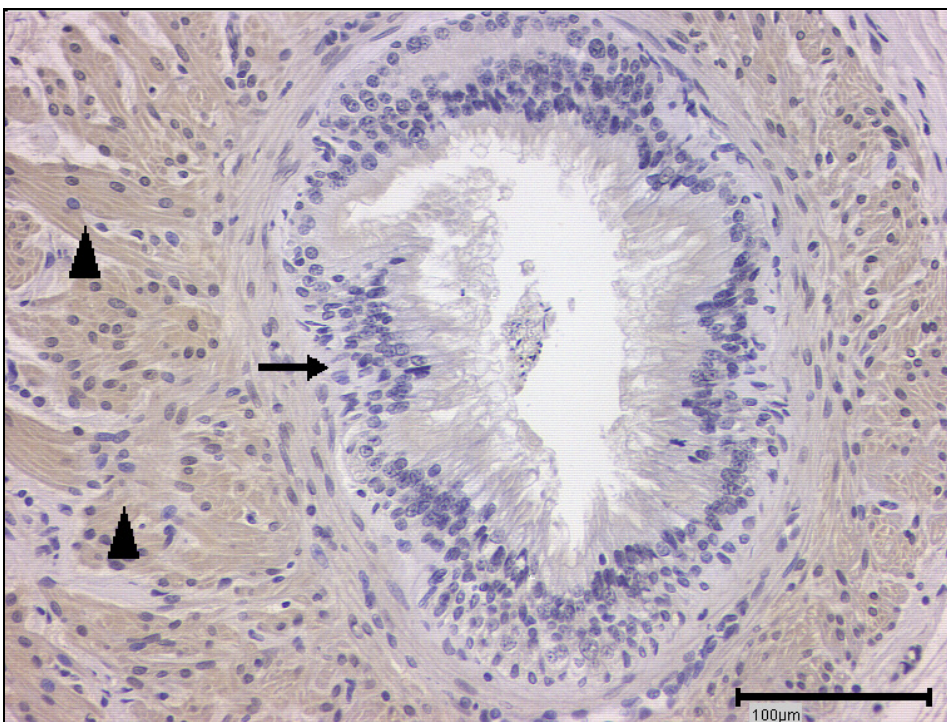


Abb. 18B: Kallikrein-Nachweis: *Epididymis - Ductus deferens* der Ratte (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Deutliche zytoplasmatische Kallikrein-Expression in den *Myozyten* (\blacktriangle) der muskelstarken Wandung des *Ductus deferens*. Epithel (\uparrow) des Samenleiters. Im Lumen ausgereifte Spermatozoen ohne spezifische Färbung.

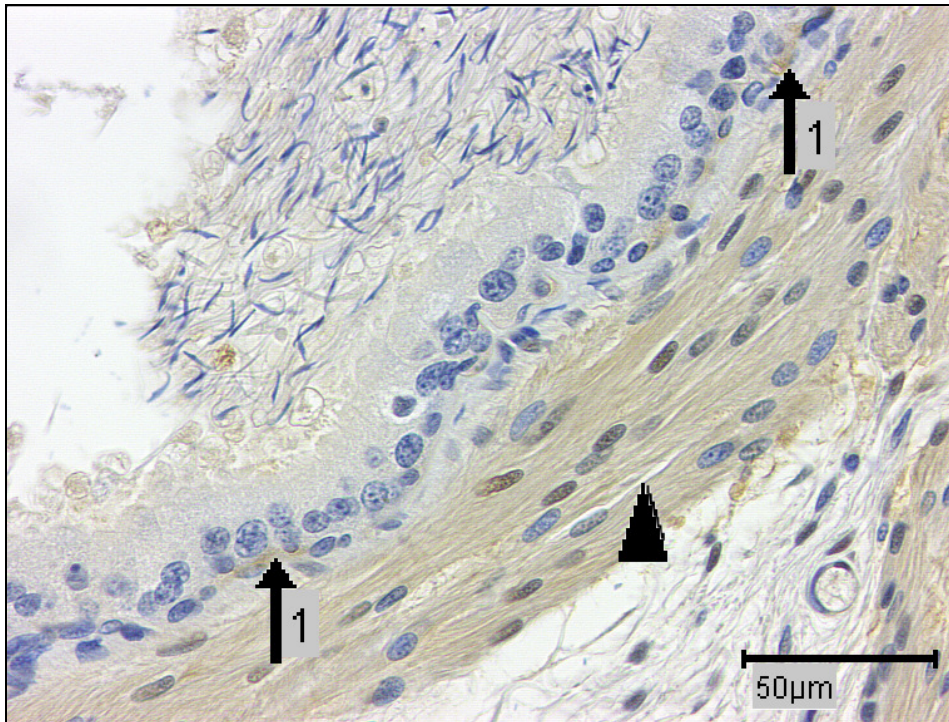


Abb. 18C: Kallikrein-Nachweis: *Epididymis - Ductus deferens* der Ratte (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . Deutliche zytoplasmatische Kallikrein-Expression in den *Myozyten*wandung (\blacktriangle) des *Ductus deferens*. In den basalen Epithelzellen (\uparrow_1) des Samenleiters zeigt sich ein Kallikrein-Nachweis. Im Lumen befinden sich ausgereifte Spermatozoen ohne spezifische Färbung.

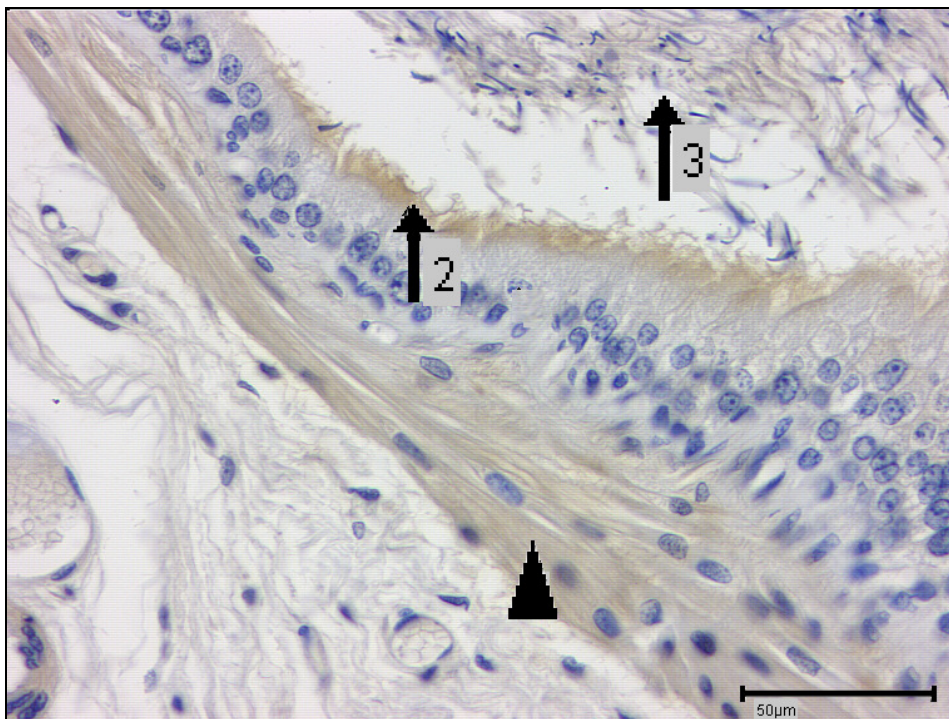


Abb. 18D: Kallikrein-Nachweis: *Epididymis - Ductus deferens* der Ratte (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . *Myozyten* (\blacktriangle) der muskulären Wandung des *Ductus deferens* und im *Sterozilien*besatz des Epithels (\uparrow_2) Kallikrein-Nachweis. Im Lumen ausgereifte Spermatozoen (\uparrow_3), auch diese ohne spezifische Färbung.

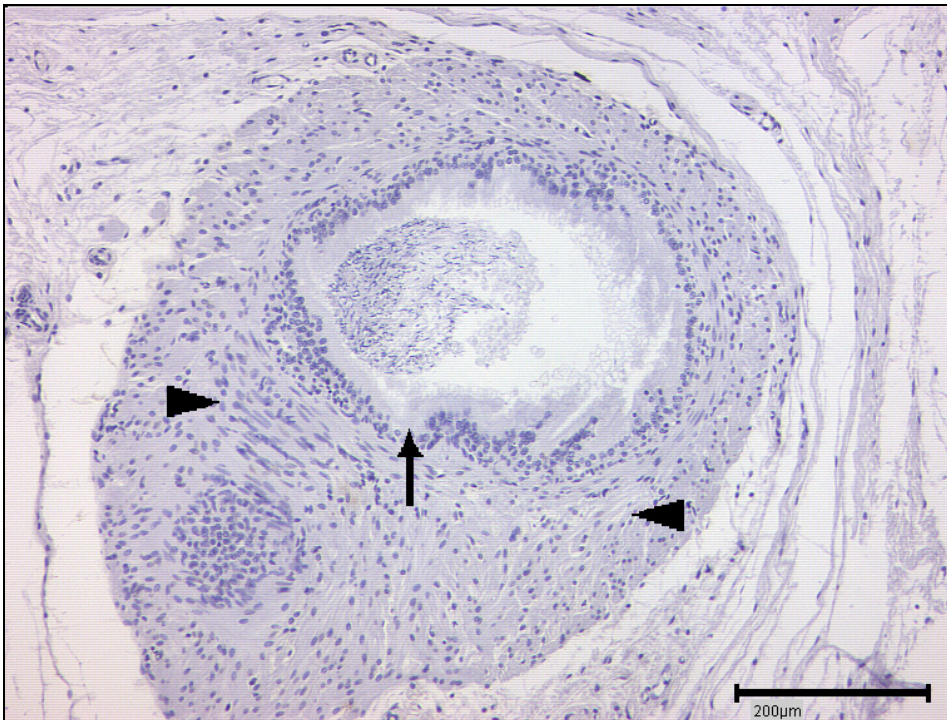


Abb. 18E: Negativ-Kontrolle: *Epididymis - Ductus deferens* der Ratte (90 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Epithel (\blacktriangle) und muskuläre Wandung (\uparrow) des *Ductus deferens*.

3.2.1.5 Epididymis der pubertären Ratte - Nachweis von Gewebs-Kallikrein

3.2.1.5.1 Caput epididymis

Es folgten weitere Versuche an Nebenhodenschnitten von pubertierenden Ratten der Altersstufe 32 Tage. In den *Ductuli efferentes* des *Caput epididymis* konnten bei der 32 Tage (Abb. 19 A) alten Ratte kein Kallikrein-Nachweis erbracht werden. Das war identisch zu den Ergebnissen an adulten Rattennebenhoden (Abb. 15). Da sich sowohl bei der Positiv-Probe, (Abb. 19 A) als auch bei der Negativ-Kontrolle (Abb. 19 B), im Bereich der *periductulären* Zellen (\uparrow) eine leichte, gleichförmige Braunfärbung zeigte, kann diese nicht als unspezifische Färbung gewertet werden.

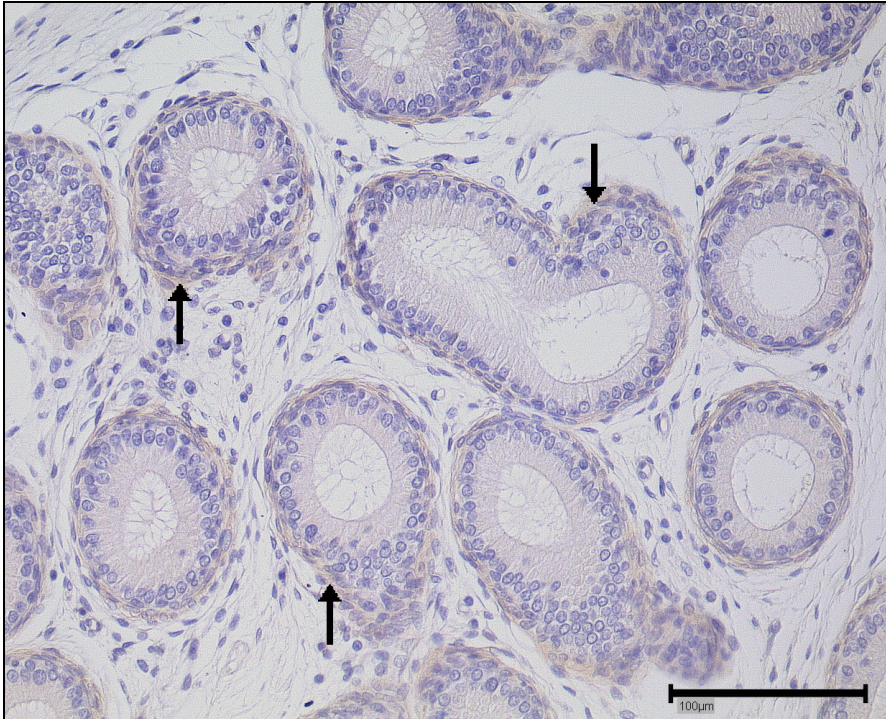


Abb. 19A: Kallikrein-Nachweis: *Ductuli efferentes* der Ratte (32 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Kein Nachweis einer Kallikrein-Expression in den *Ductuli efferentes*. Unspezifische Braunfärbung der *periductulären Myozyten* (\uparrow).

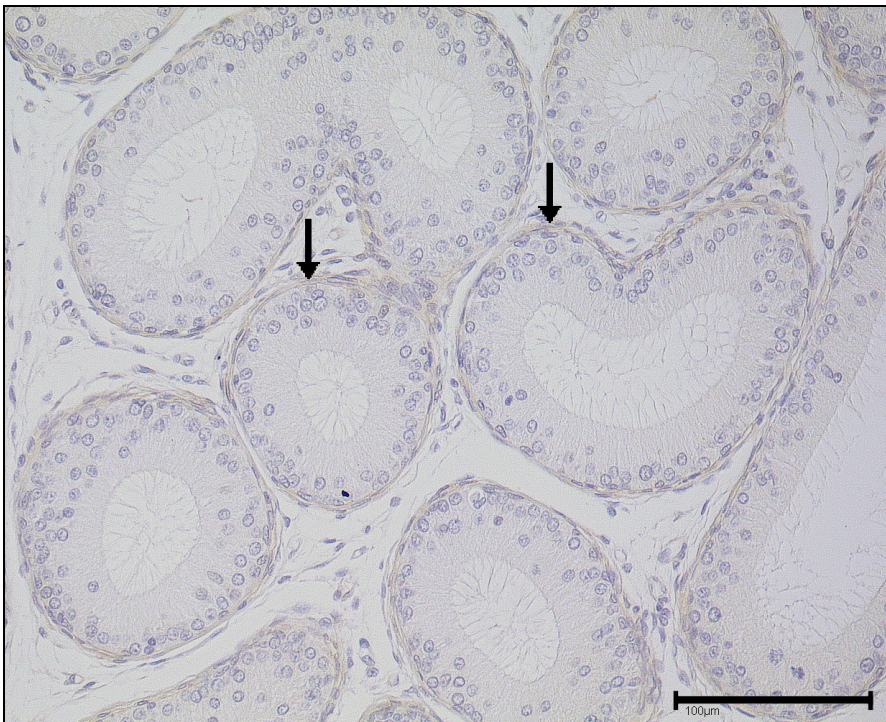


Abb. 19B: Negativ-Kontrolle: *Caput epididymis* der Ratte (32Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Kein Nachweis einer Kallikrein-Expression in den *Ductuli efferentes*. *Periductuläre Myozyten* (\uparrow).

3.2.1.5.2 Corpus epididymis

Im Bereich des *Ductus epididymis* des Nebenhodenkörpers konnte bei der pubertären Ratte im Alter von 32 Tagen (Abb. 20 A+B) kein positiver Kallikrein-Nachweis geführt werden. Positiv und Negativ-Kontrolle stellten sich nahezu identisch dar. Auch hier dezente unspezifische Braunfärbung der *periductulären Myozyten* (↑), die sich auch in der Negativ-Kontrolle mit Kaninchen-Normalserum darstellt.

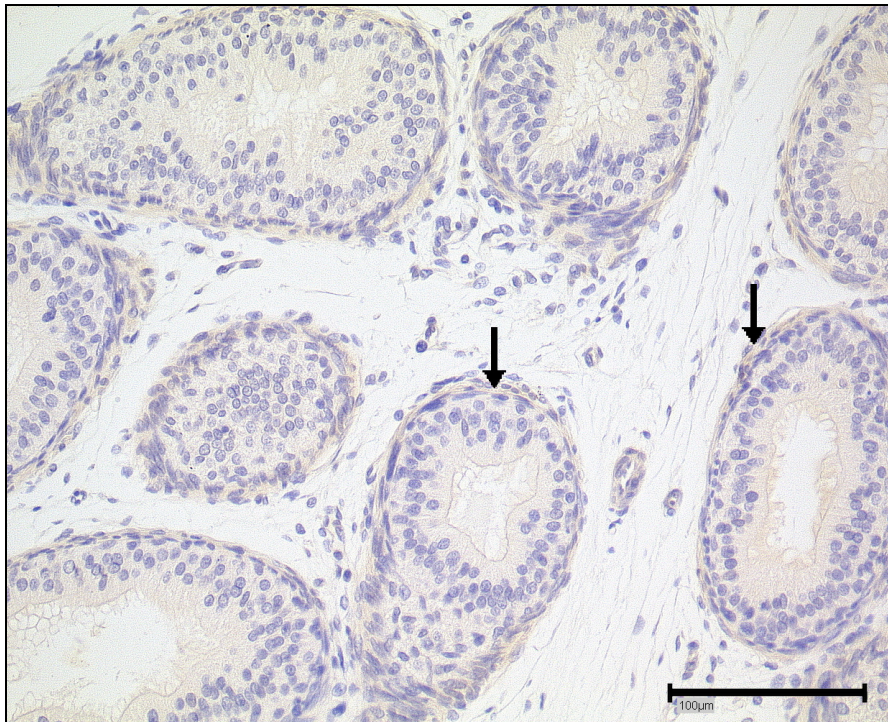


Abb. 20A: Kallikrein-Nachweis: *Corpus epididymis* der Ratte (32 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Kein Nachweis einer spezifischen Färbung. *Periductuläre Myozytenschicht* (↑).

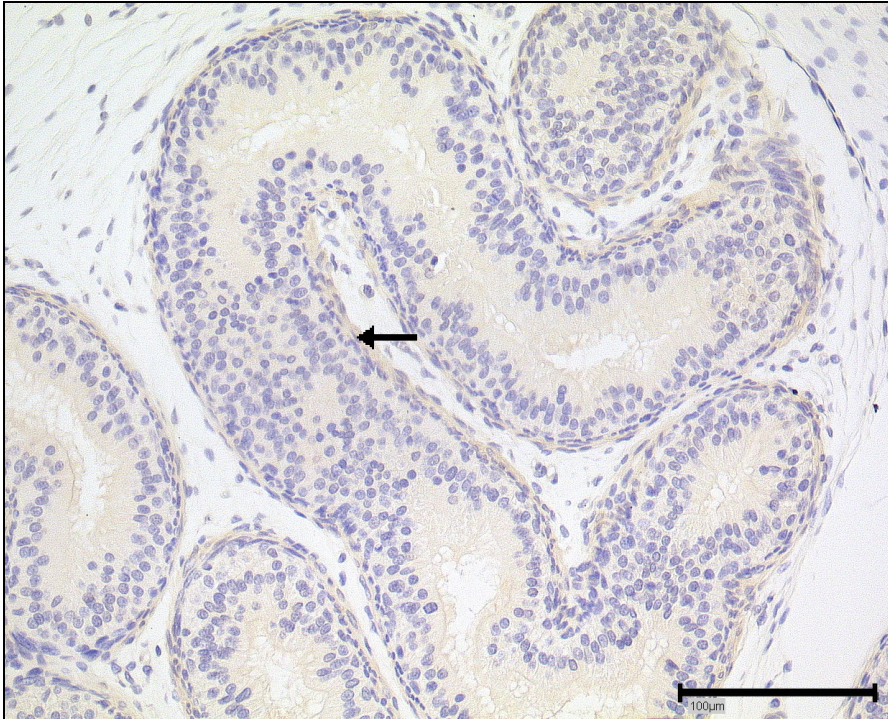


Abb. 20B: Kallikrein-Nachweis: *Corpus epididymis* der Ratte (32 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Kein Nachweis einer Kallikrein-Expression im *Ductus epididymis*. Die *periductuläre* Myozytenschicht (\uparrow) mit dezenter, unspezifischer Braunfärbung.

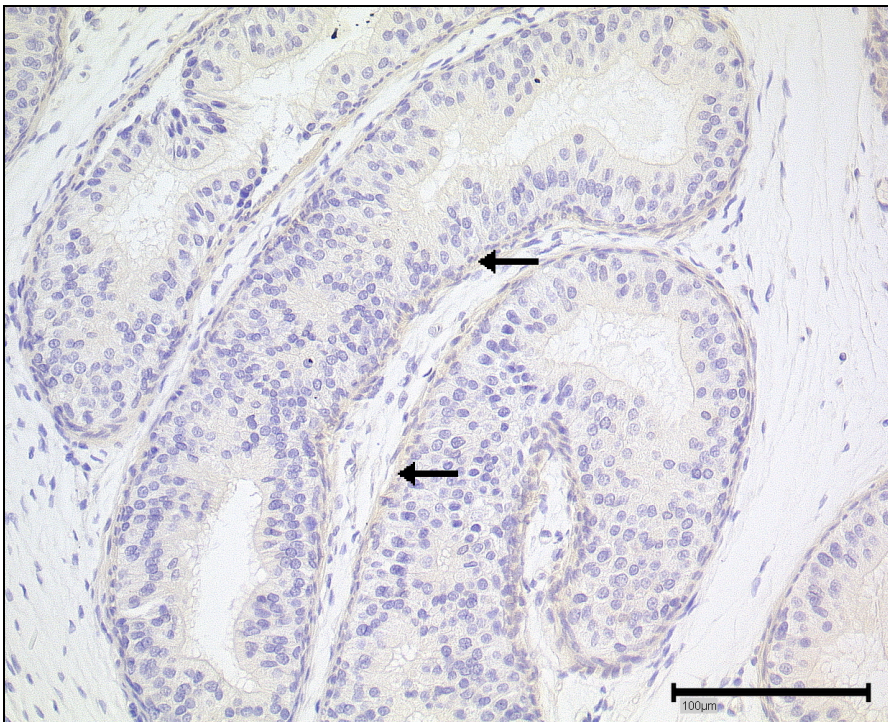


Abb. 20C: Negativ-Kontrolle: *Corpus epididymis* der Ratte (32 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Kein Nachweis einer spezifischen Färbung. *Periductuläre* Myozyten (\uparrow).

3.2.1.5.3 Cauda epididymis

Ebenso wie in den vorgeschalteten Abschnitten des Nebenhodens, konnte auch auf Ebene des *Cauda epididymis* bei der 32 Tage alten Ratte keine Kallikrein-Expression (Abb. 21) im Epithel des Nebenhodenganges nachgewiesen werden.

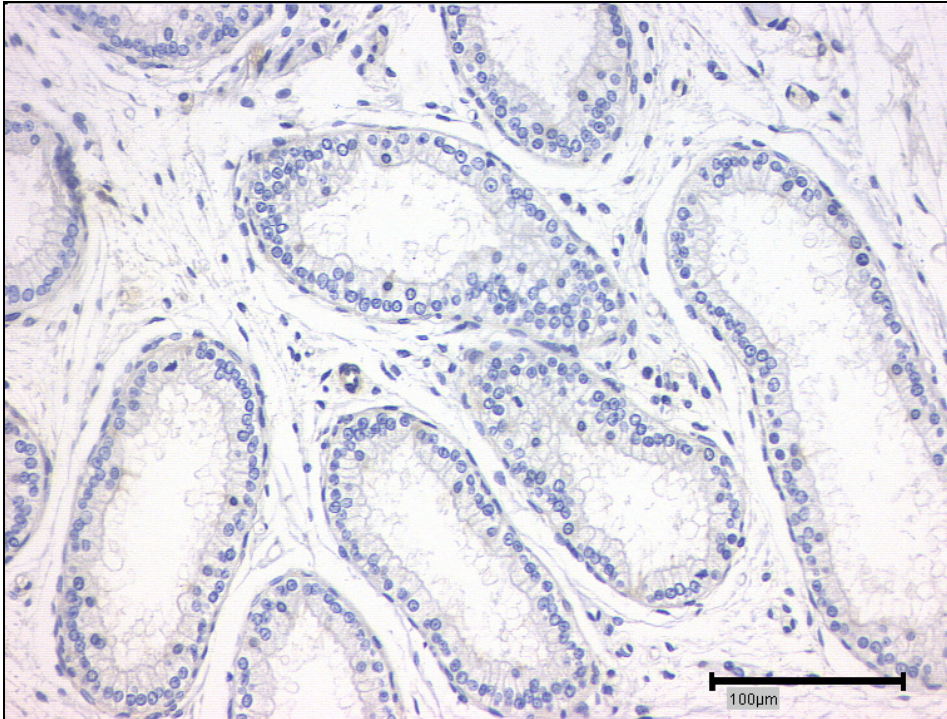


Abb. 21A: Kallikrein-Nachweis: *Cauda epididymis* der Ratte (32 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 µm. Im Bereich des Epithels des *Ductus epididymis* kein Kallikrein-Nachweis.

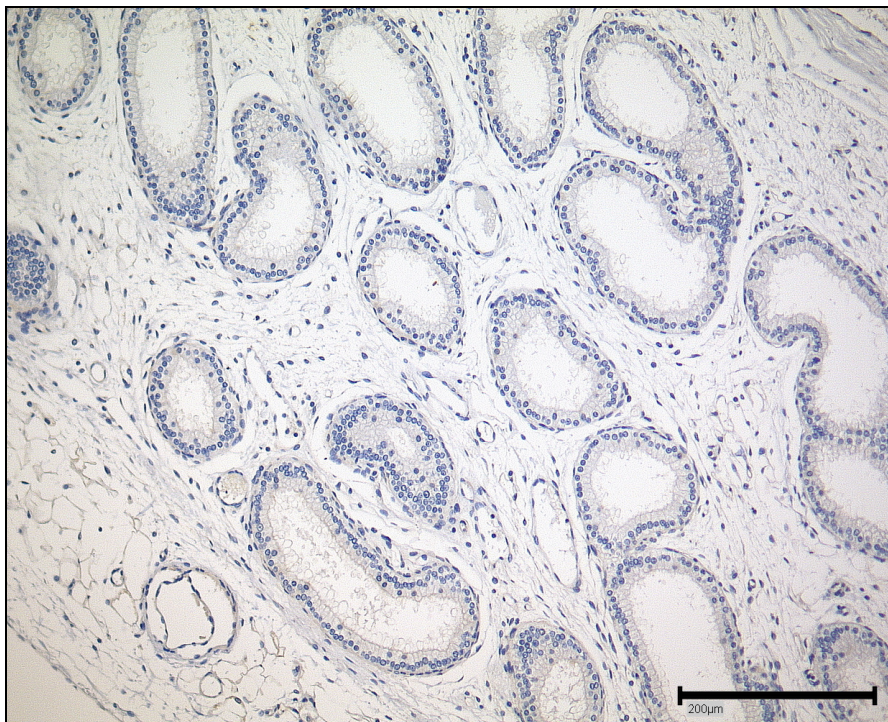


Abb. 21B: Negativ-Kontrolle: *Cauda epididymis* der Ratte (32 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 µm. Keine spezifische oder unspezifische Hintergrundreaktion.

3.2.1.6 Epididymis der spätpubertären Ratte - Nachweis von Gewebs-Kallikrein

3.2.1.6.1 Caput epididymis

Am Nebenhoden der 38 Tage alten Ratte konnte auf Ebene des *Caput epididymis* keine Kallikrein-Expression nachgewiesen werden (Abb. 22 A). Zwischen Positiv- und Negativkontrolle (Abb. 22 B) zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Auch hier zeigte sich im Bereich der *periductulären* Zellen (↑) eine dezente bräunliche Färbung, die sich in der Positiv-Probe und in der Negativ-Kontrolle identisch verhielt, und somit als unspezifisch gewertet wurde.

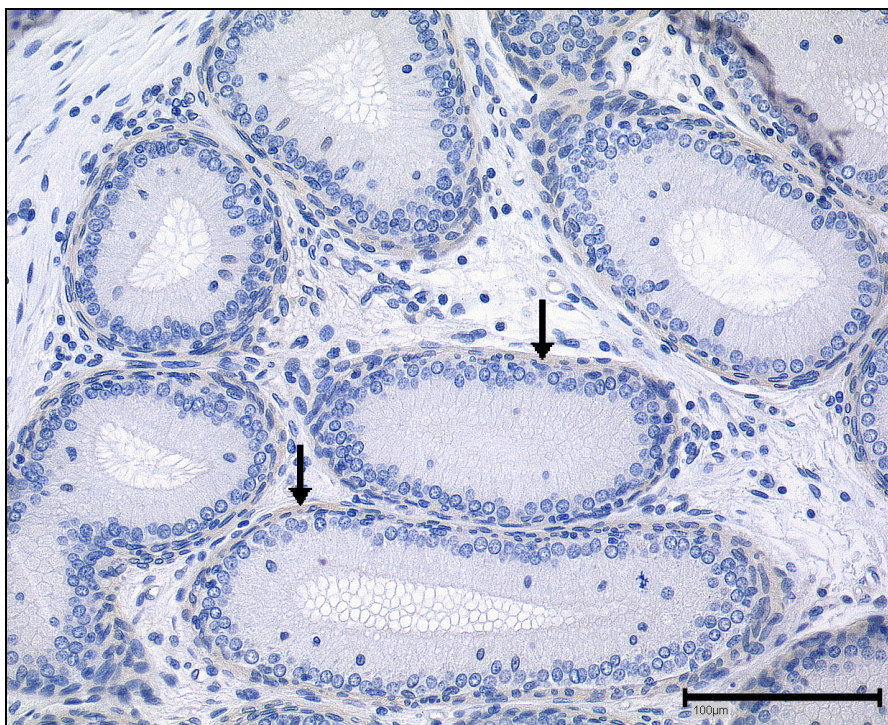


Abb. 22A: Kallikrein-Nachweis: *Caput epididymis* der Ratte (38 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Kein Nachweis einer Kallikrein-Expression in den *Ductuli efferentes*. *Periductuläre Myozyten* (↑).

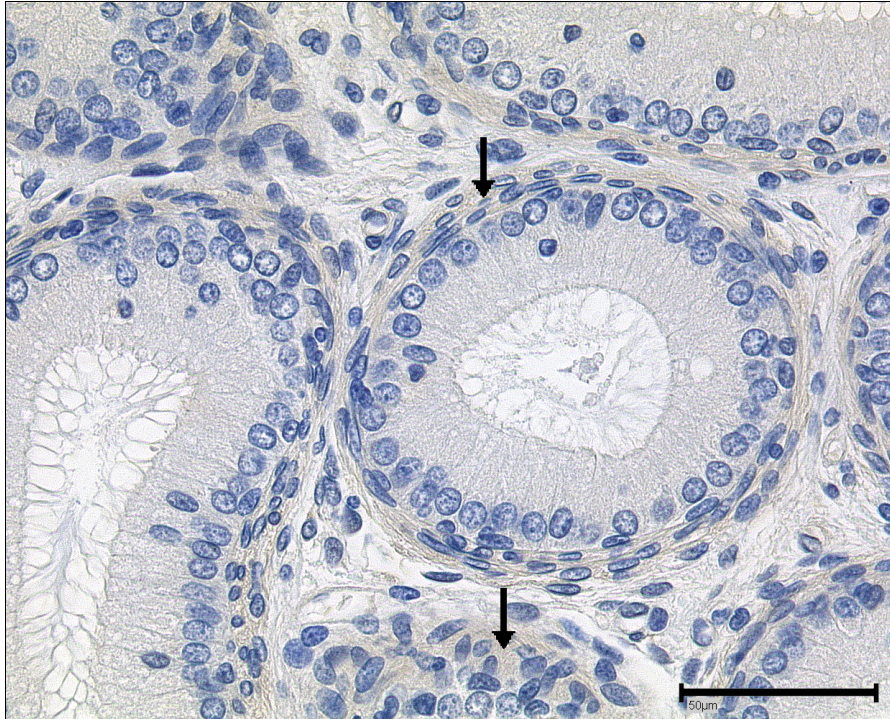


Abb. 22B: Negativ-Kontrolle: *Caput epididymis* der Ratte (38 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . Kein Nachweis einer Kallikrein-Expression in den *Caput epididymis* der 38 Tage alten Ratte. *Periductuläre Myozyten* (\uparrow)

3.2.1.6.2 Corpus epididymis

Im Nebenhodenkörper der 38 Tage alten Ratte zeigte sich eine deutliche, reproduzierbare Färbung, sowohl basal (\blacktriangle in Abb. 23 A+C) als auch *apikal* (\uparrow in Abb. 23 A+D), im Epithel des *Ductus epididymis*. In den Vesikeln (\uparrow_2 in Abb. 23 A+B+D), *apikal* an den Epithelzellkuppen, war eine Braufärbung zu detektieren, die einer Kallikrein-Expression entspricht. Die zytoplasmatische Färbung der *periductulären* Muskelzellen (\uparrow_1 in Abb. 23 A-C) ist als unspezifische Reaktion zu werten, da sie sich auch in der Negativ-Kontrolle (Abb. 23 E) zeigte.

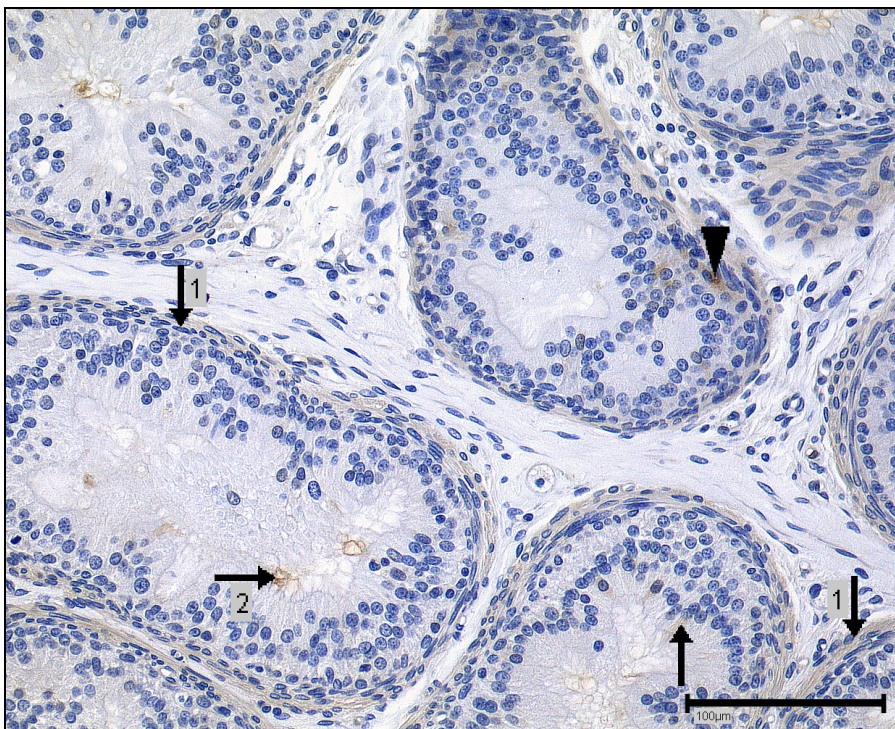


Abb. 23A: Kallikrein-Nachweis: *Corpus epididymis* der Ratte (38 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Im Bereich des Nebenhodenkörpers eine spezifische Färbung *apikal* (\uparrow) und basal (\blacktriangle) im Epithel des *Ductus epididymis* sowie in den vesikulären Formationen *apikal* an den Epithelzellkuppen (\uparrow_2). *Periductuläre Myozyten* (\uparrow_1).

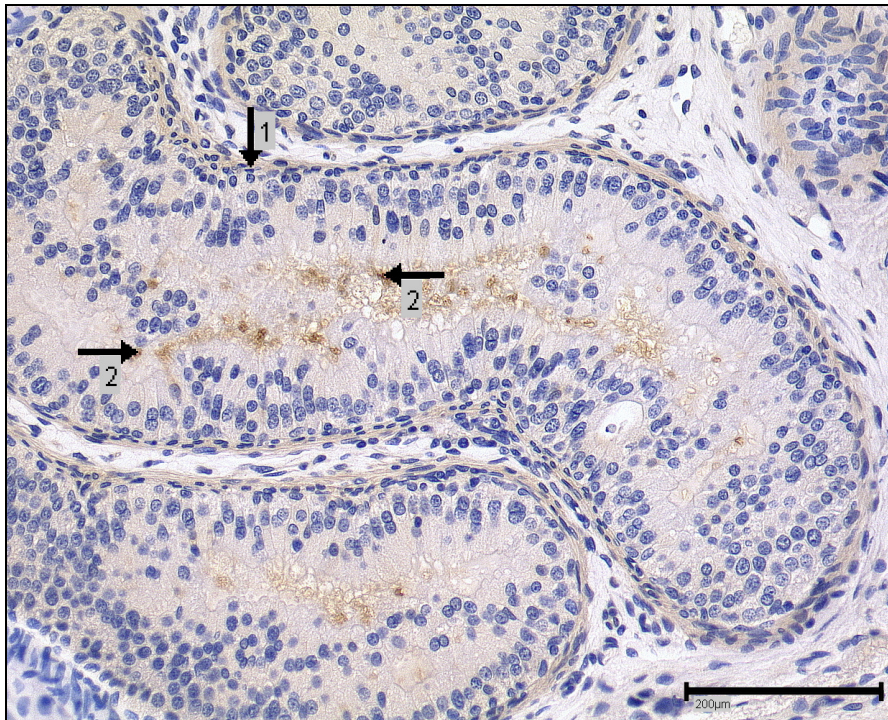


Abb. 23B: Kallikrein-Nachweis: *Corpus epididymis* der Ratte (38 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Deutliche Färbung der vesikulären Strukturen (\uparrow_2) im *Ductus epididymis* des Nebenhodenkörpers. *Periductuläre* Muskelzellschicht (\uparrow_1).

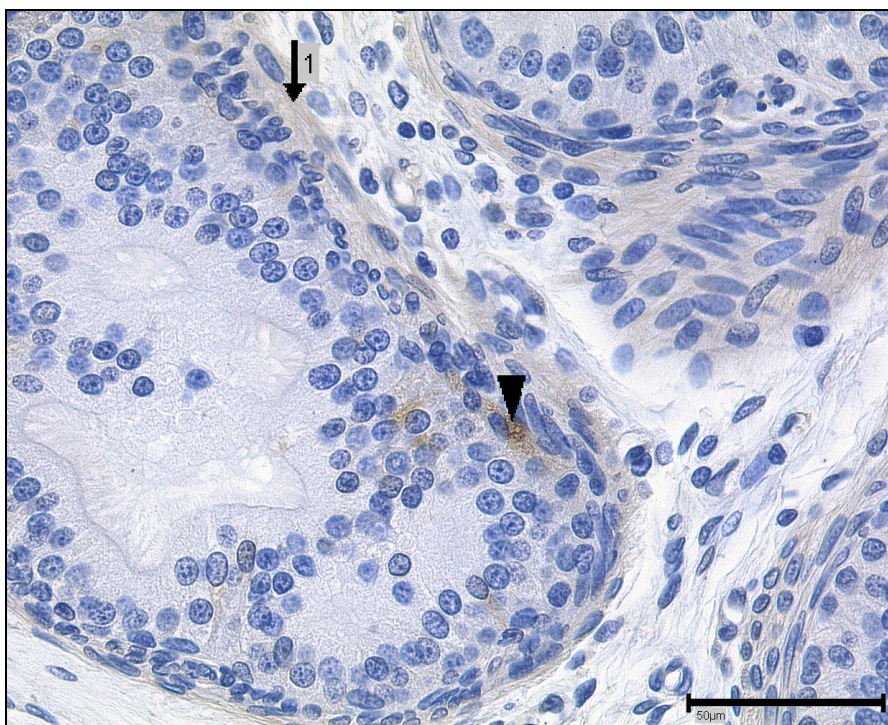


Abb. 23C: Kallikrein-Nachweis: *Corpus epididymis* der Ratte (38 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . Im *Ductus epididymis* eine Kallikrein-Expression basal im Epithel (\blacktriangle). Zusätzlich weniger intensive, unspezifische Braunfärbung im Bereich der *periductulären* Muskelzellen (\uparrow_1).

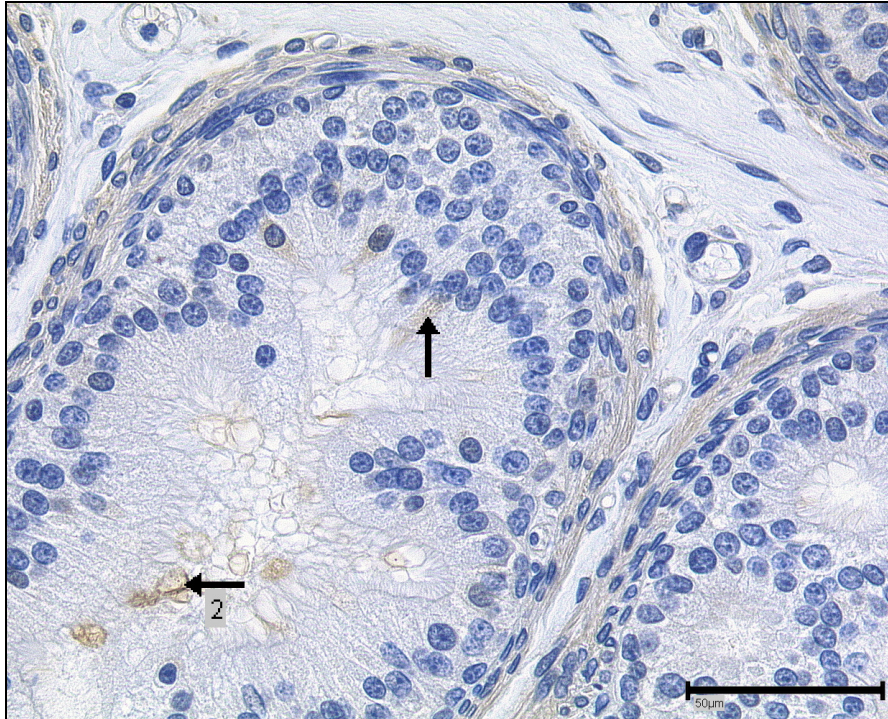


Abb. 23D: Kallikrein-Nachweis: *Corpus epididymis* der Ratte (38 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 µm. Apikal in den Epithelzellen des *Ductus epididymis* (↑) und in den vesikulären Abschnürungen *luminal* an den Epithelzellen (↓₂) ein deutlicher Kallikrein-Nachweis.

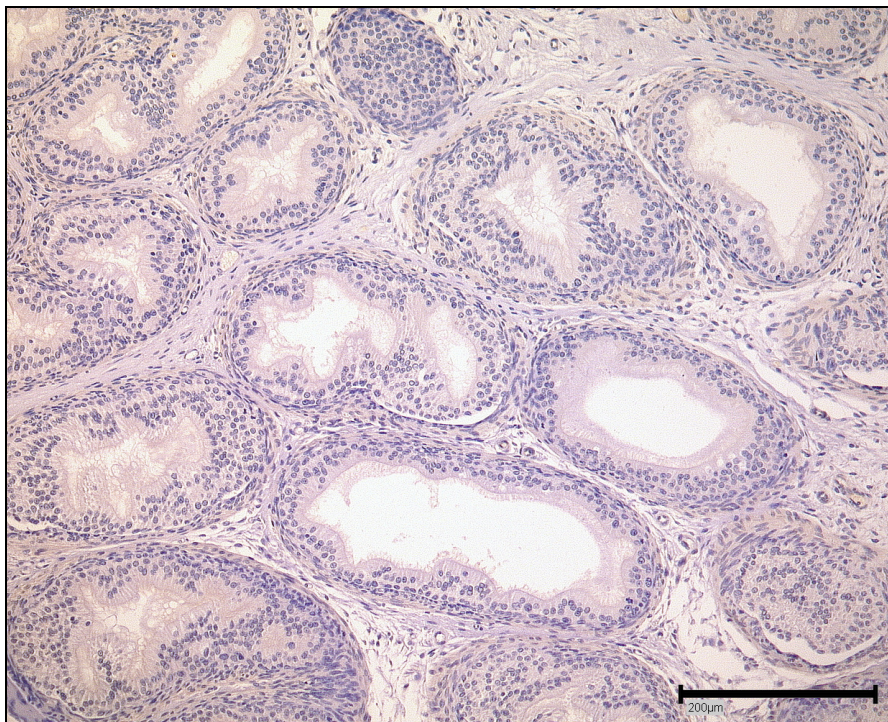


Abb. 23E: Negativ-Kontrolle: *Corpus epididymis* der Ratte (38 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 µm. Kein Nachweis einer spezifischen Färbung oder unspezifischen Hintergrundreaktion.

3.2.1.6.3 Cauda epididymis

Im Nebenhodenschwanz gelang ein reproduzierbarer Kallikrein-Nachweis im Epithel des *Ductus epididymis*. Fokal zeigte sich eine spezifische Färbung mit dem AK gegen Ratten-Kallikrein in den vesikulären Strukturen (\uparrow_2 in Abb. 24 A-C) am *luminal*gerichteten Epithel. Im Bereich der *periductulären* Muskelzellen (\uparrow_1 in Abb. 24 A-C) zeigte sich eine dezente homogene Braunfärbung, diese wird als unspezifisch gewertet, da sie im Positiv als auch in der Negativ-Kontrolle (Abb. 24 D+E) nahezu identisch vorkommt.

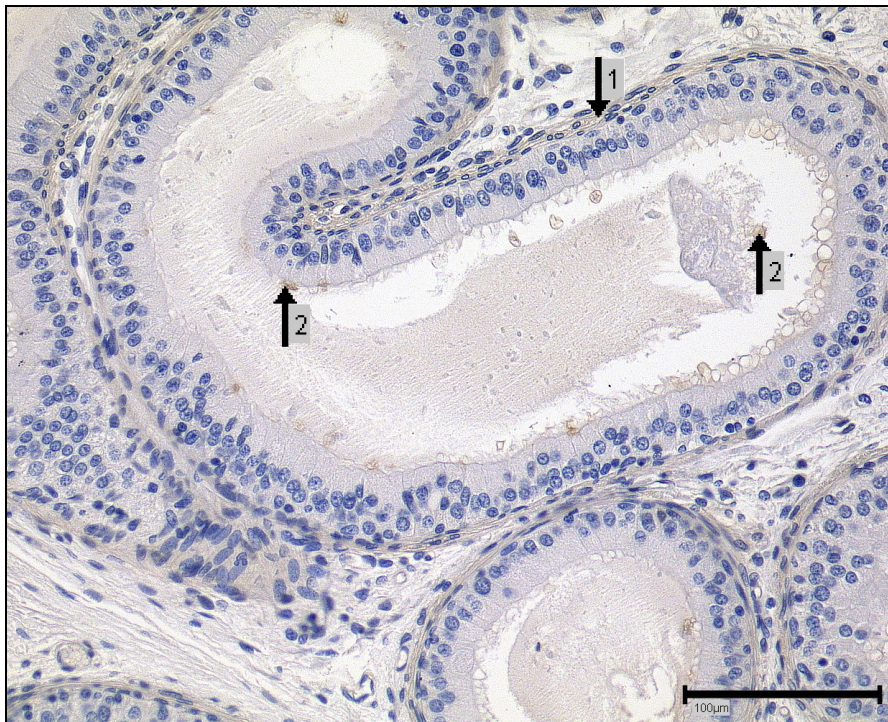


Abb. 24A: Kallikrein-Nachweis: *Cauda epididymis* der Ratte (38 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . Kallikrein-Expression in den vesikulären Strukturen (\uparrow_2) lumenseitig dem Epithel anlagernd. Die *periductulären Myozyten* (\uparrow_1) braun tingiert.

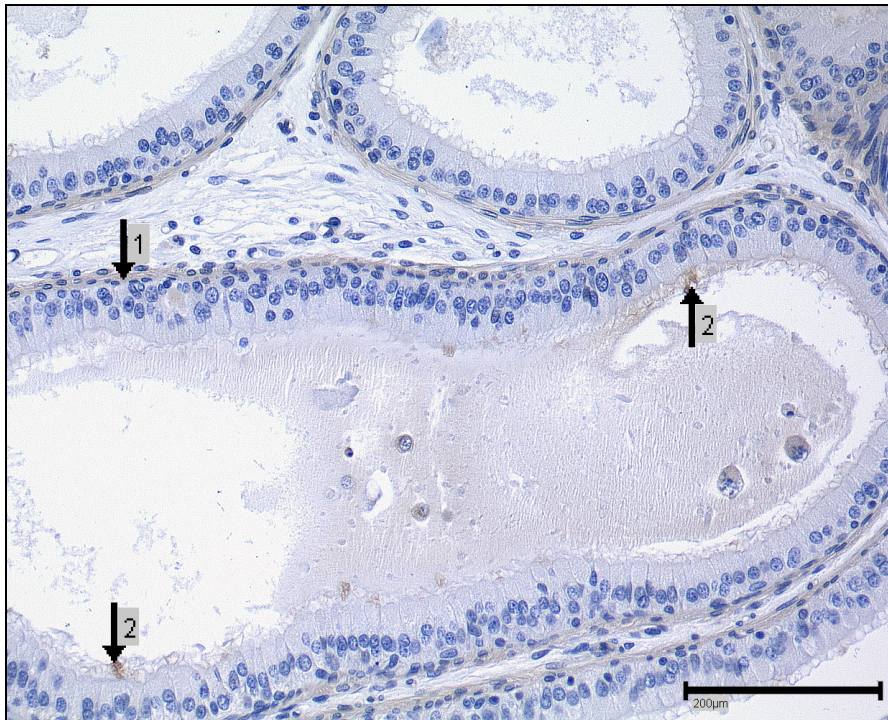


Abb. 24B: Kallikrein-Nachweis: *Cauda epididymis* der Ratte (38 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Kallikrein-Expression in den vesikulären Strukturen (\uparrow_2) lumenseitig dem Epithel anlagernd. Die *periductulären Myozyten* (\uparrow_1).

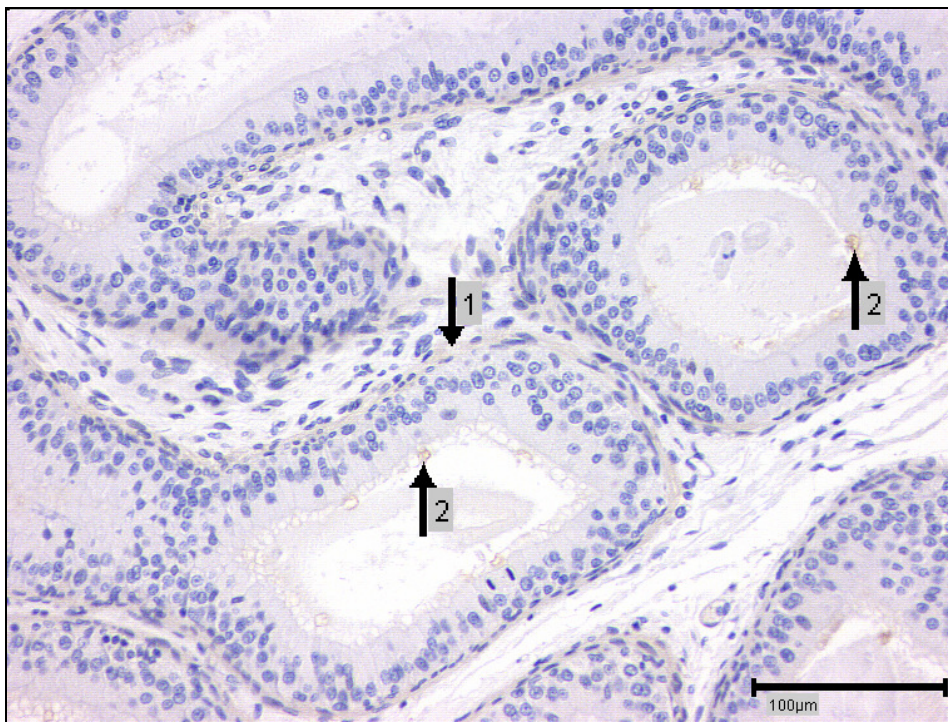


Abb. 24C : Kallikrein-Nachweis: *Ductus epididymis* der Ratte (38 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Kallikrein-Expression in den vesikulärer Formationen im Bereich der *sterozilienbesetzten Epithelzellen* (\uparrow_2) sowie in den *Myozyten* der Wandung (\uparrow_1) des *Ductus epididymis*.



Abb. 24D: Negativ-Kontrolle: *Cauda epididymis* der Ratte (38 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Kein Nachweis einer spezifischen Färbung. *Periductuläre Myozyten* (\uparrow_1) zeigen eine unspezifische Farbreaktion.

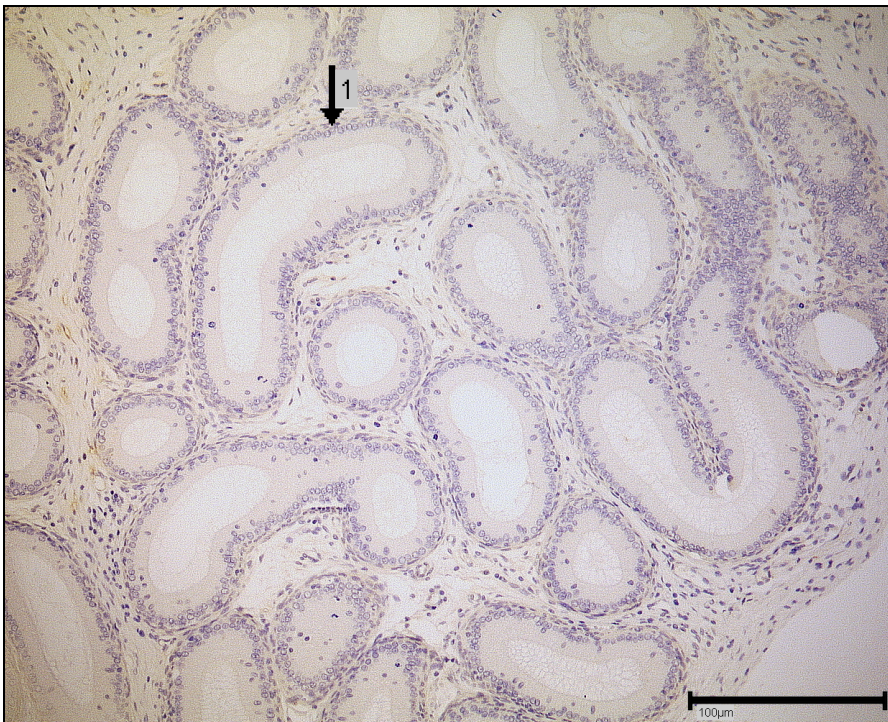


Abb. 24E: Negativ-Kontrolle: *Cauda epididymis* der Ratte (38 Tage), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Keine spezifischen Farbreaktionen. *Periductuläre Myozyten* (\uparrow_1).

3.2.2 Mensch

3.2.2.1 Humaner Testis - Nachweis von Gewebs-Kallikrein

An histologischen Schnitten von humanen testikulären Gewebeproben wurde der polyklonale, gegen humanes Urin-Kallikrein gerichtete Antikörper eingesetzt. Dieses Kallikrein ist mit dem „wahren“ Gewebs-Kallikrein identisch. Bei dem verwendeten Hodenmaterial handelte es sich um Methacarn-fixierte Biopsien aus dem Institut für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen, Hodenresektate von der Universidad de la Frontera, Temuco aus Chile (die beiden Hoden von einem Mann) sowie um Autopsiematerial aus dem Rechtsmedizinischen Institut der Universitätsklinik Düsseldorf. Weiterhin lag Bouin-fixiertes Biopsiematerial aus dem Zentrum für Dermatologie der Universitätsklinik Düsseldorf vor.

Das Gewebs-Kallikrein wurde mit der PAP- und der HRP-Methode vergleichend detektiert, ohne dass Unterschiede in den Resultaten verifiziert werden konnten.

In einigen Versuchen kam abweichend von der Standardmethode die Vorbehandlung mit Proteinase K oder die Hitzedemaskierung in Kombination mit der PAP-Methode zur Anwendung, um maskierte AG besser freizulegen, ein eindeutigeres Ergebnis zu erreichen und falsch negative Resultate effektiv vorzubeugen.

3.2.2.1.1 Humaner Testis (Bouin-fixiert) - Nachweis von Gewebs-Kallikrein

Am Bouin-fixierten Hodengewebe (Abb. 25 A-D) zeigten sowohl Keimepithel als auch *Interstitium* eine wenig intensive, diffuse Hintergrundfärbung. Ausgeprägter zeigte sich eine Braunfärbung im Keimepithel der *Tubuli seminiferi contorti* im Bereich des *luminalen* Keimepithels / der Anhaftungsebene der Spermatozoen an den Sertoli-Zellen (▲ in Abb. 25 B). Im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Abb. 25 E) spricht dieses Resultat für eine Kallikrein-Expression. Im Bereich der sich entwickelnden Akrosomenkappe der runden Spermatozoen (†₅ in Abb. 25 D) zeigte sich ein dezent stärkeres Färbesignal. Bei dem vorliegenden Ergebnis handelt es sich wahrscheinlich um eine schwache, aber dennoch spezifische Kallikrein-Expression, am vorliegenden Material nicht eindeutig beweisend. Die *Peritubulär*-Zellen (†₃ in Abb. 25 C) sowie die reifen Spermatozoen kurz vor der Spermiation (†₁ in Abb. 25 B) zeigten keine spezifische Farbreaktion. Die Färbung der Leydig-Zellen (†₂ in Abb. 25 B) und der Spermatozyten (†₄ in Abb. 25 C) war nicht reproduzierbar und ist somit als unspezifisch zu werten.

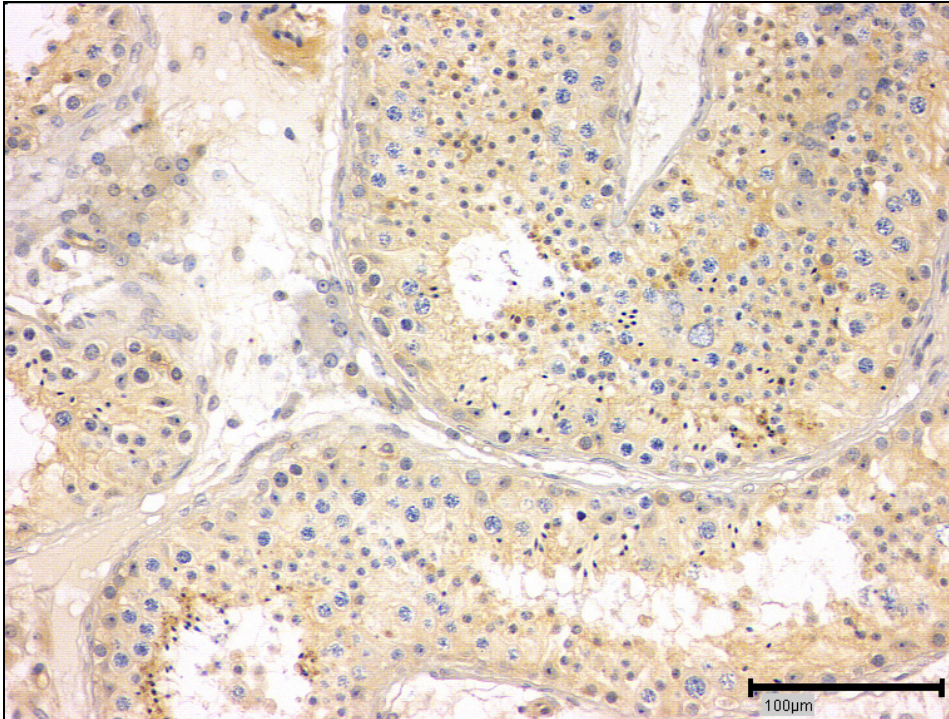


Abb. 25A: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Bouin-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 µm. In der Übersicht eine diffuse Hintergrundfärbung sowohl im Keimepithel als auch im *interstitiellen Stroma*.

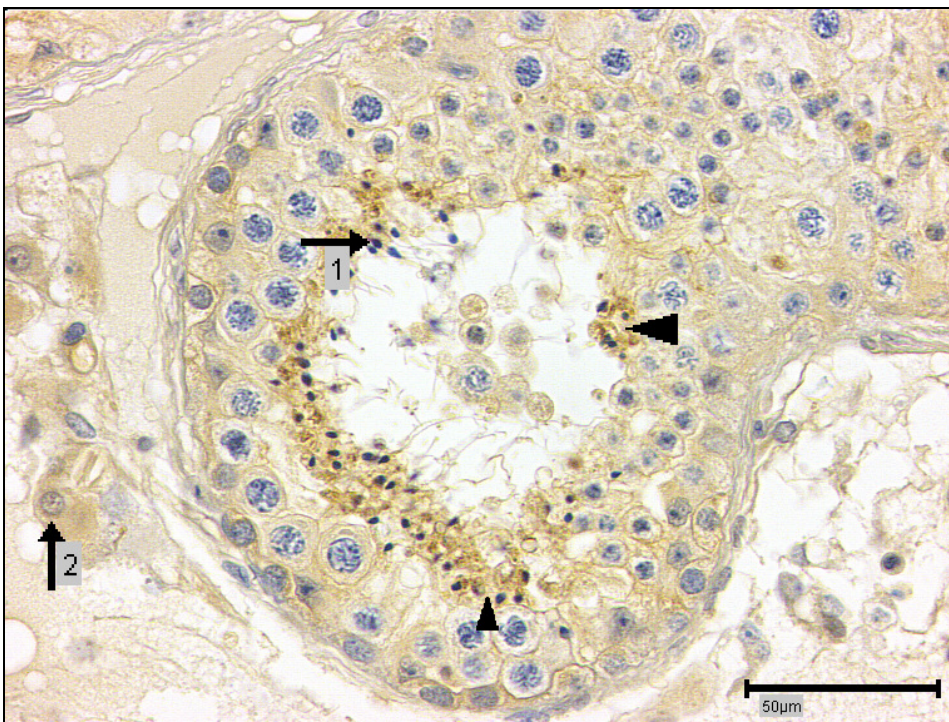


Abb. 25B: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Bouin-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 µm. Deutliche Färbung im Bereich des *luminalen* Keimepithels (▲). Die reifen Spermatiden kurz vor der Spermiation (↑₁). Leydig-Zellen (↑₂) im *Interstitium* mit dezenter Färbung.

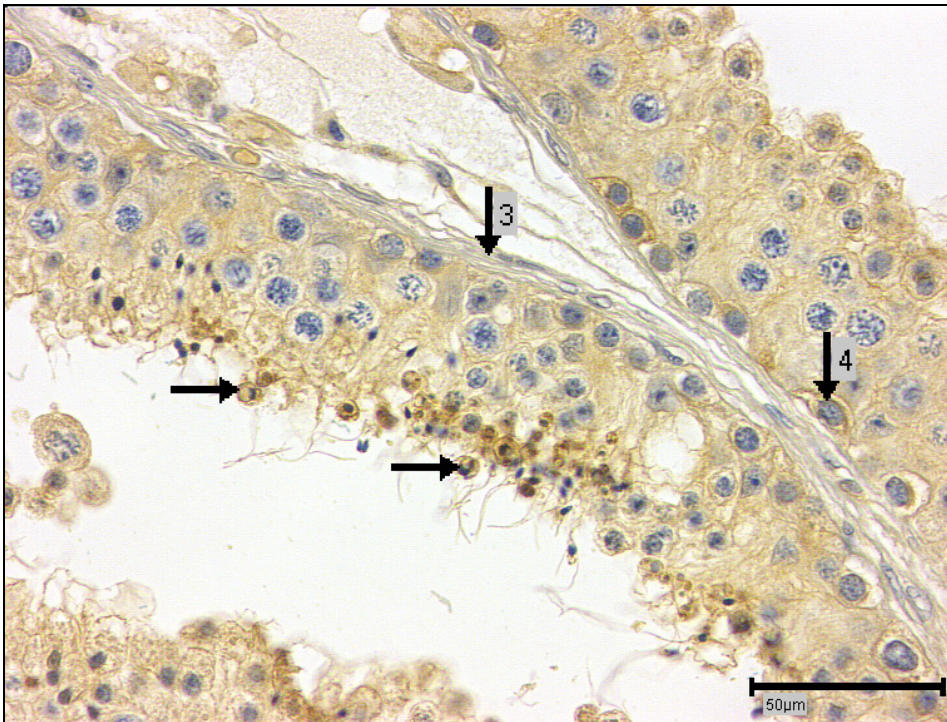


Abb. 25C: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Bouin-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 µm. Ausschnitt aus einem *Tubulus seminiferus contortus*. Peritubulär-Zellen (↑₃), Spermatogonien (↑₄). Teilweise aus dem Keimzellverband gelöste Zellen mit einer evtl. künstlich stärkeren Anfärbung (↑).

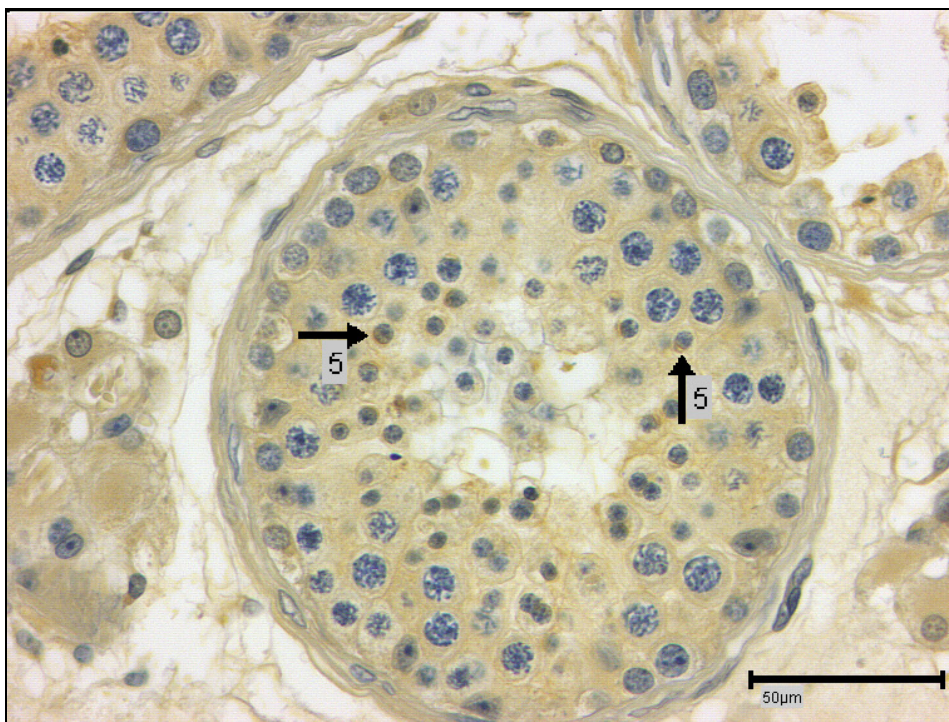


Abb. 25D: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Bouin-fixiert), PAP-Methode. Im Bereich der sich entwickelnden Akrosomenkappe der runden Spermatide (↑₅) mit spezifisch anmutendem Färbesignal. Deutlicher Hintergrund.

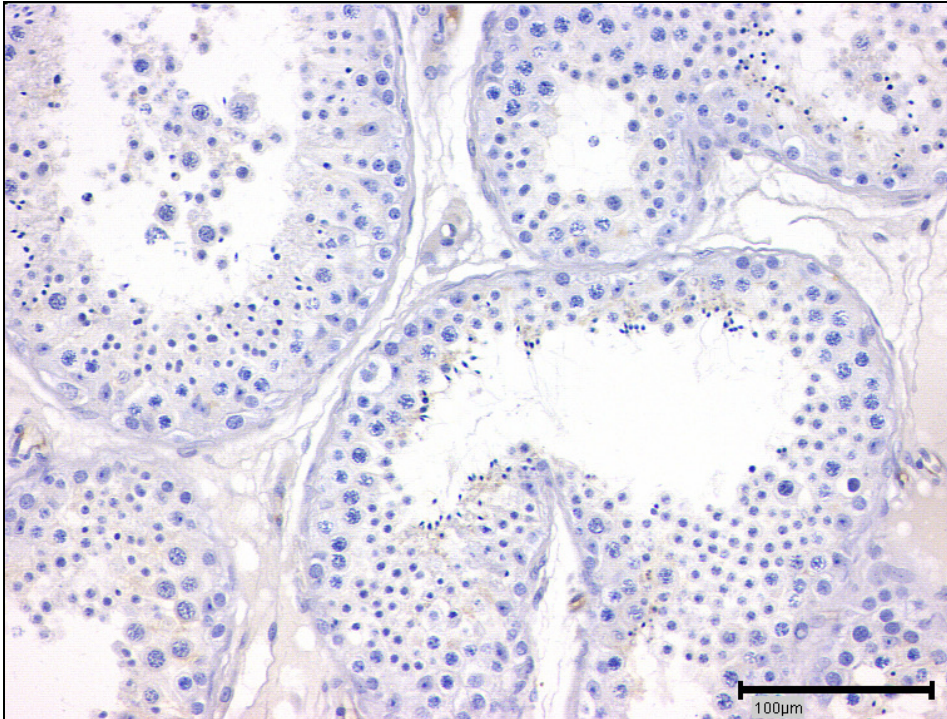


Abb. 25E: Negativ-Kontrolle: humaner Hoden (Bouin-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm .

3.2.2.1.2 Humaner Testis (Methacarn-fixiert) - Nachweis von Gewebs-Kallikrein

In dem Methacarn-fixierten, nicht vorbehandelten Testisgewebe zeigte sich, unabhängig von der PAP- oder HRP-Methode, im Bereich von *Tubuli seminiferi contorti* und *interstitiellem Stroma*, eine dezente homogene Hintergrundfärbung, ohne Hinweis auf eine spezifische Farbreaktion (Abb. 26 A+B). In einzelnen Schnittpräparaten des Methacarn-fixierten *Testis* zeigten die Muskelschichten der Gefäße (\uparrow_1 in Abb. 26 C) eine Kallikrein-Expression.

Die als Negativ-Kontrolle verwendeten Schnitte des humanen *Testis* wurden anstatt mit dem Primärantikörper, mit Kaninchen-Normalserum behandelt. Sie zeigten in den ersten Versuchen noch ausgeprägte Hintergrundreaktionen. Nach weiterer Optimierung der Methodik wiesen sie nur noch eine dezente Hintergrundreaktion auf, jedoch ohne Anhalt auf Spezifität (Abb. 26 D).

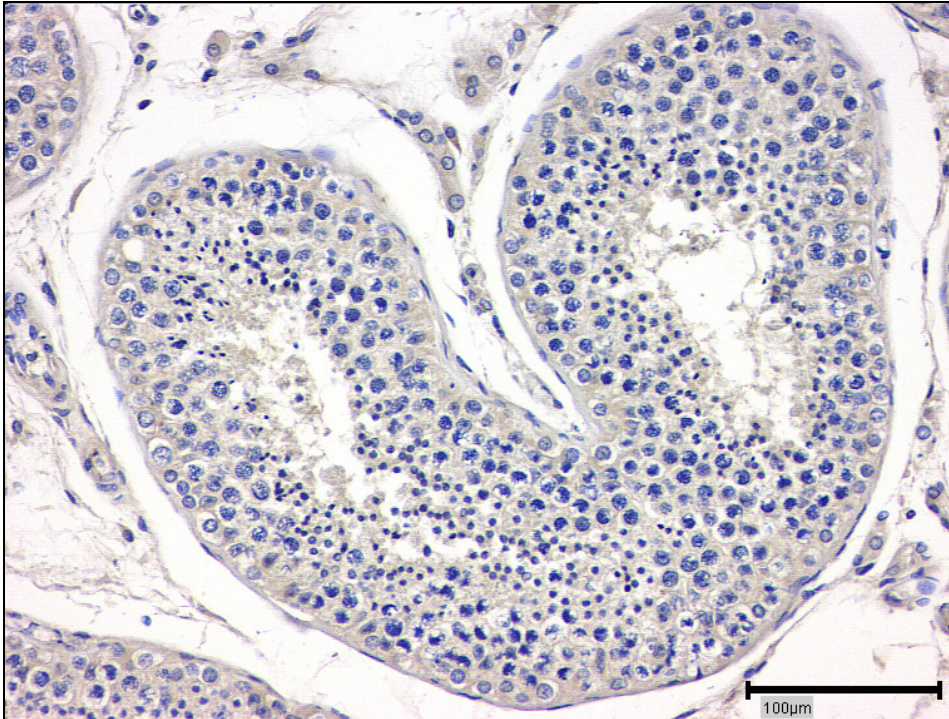


Abb. 26A: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Methacarn-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Weder im *Interstitium* noch in den *Tubuli seminiferi contorti* ein spezifischer Kallikrein-Nachweis.

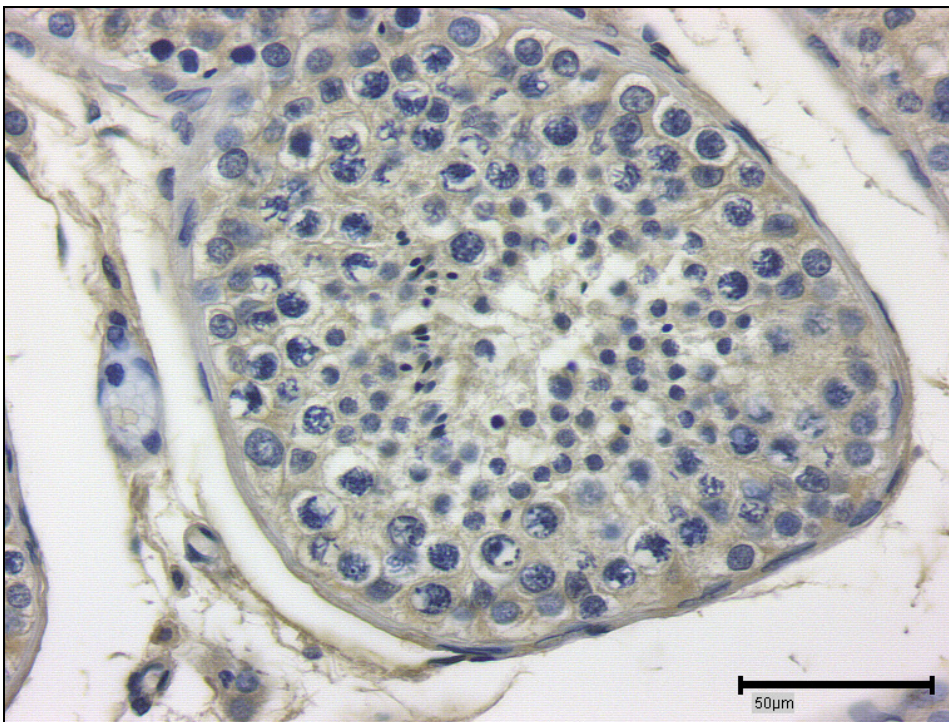


Abb. 26B: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Methacarn-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . Kein Nachweis einer Kallikrein-Expression im *Tubulus seminiferus contortus*, allenfalls eine dezente unspezifische Hintergrundreaktion.

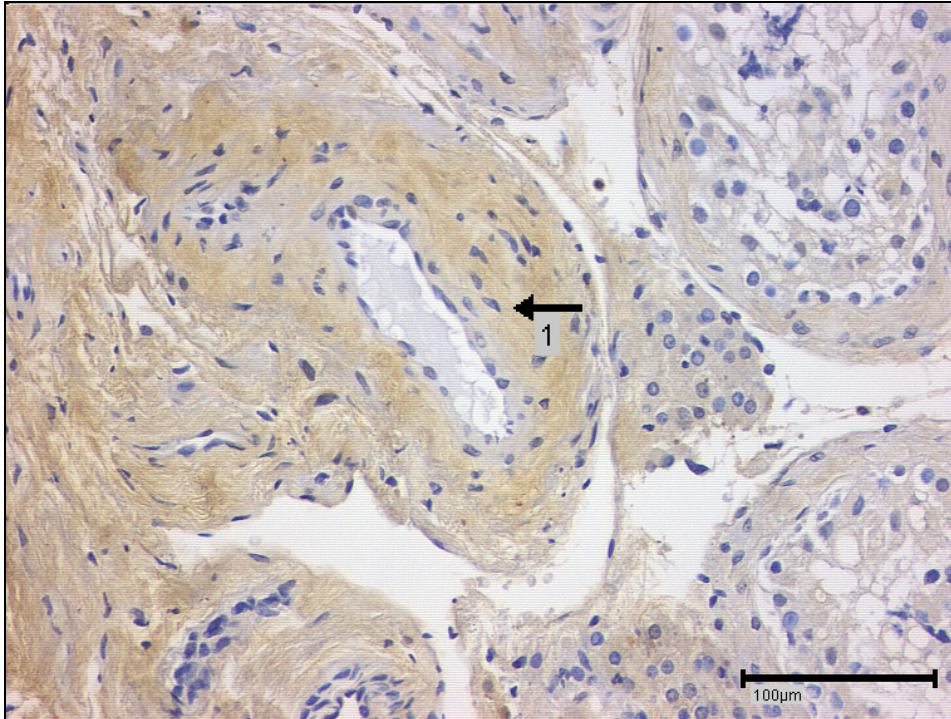


Abb. 26C: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Methacarn-fixiert). PAP-Methode
Maßstab entspricht 100 µm. Deutlich Kallikrein-positives Färbesignal im Bereich der
Muskelfaserschichten in der Gefäßwand (↑₁). Unspezifische Hintergrundfärbung.

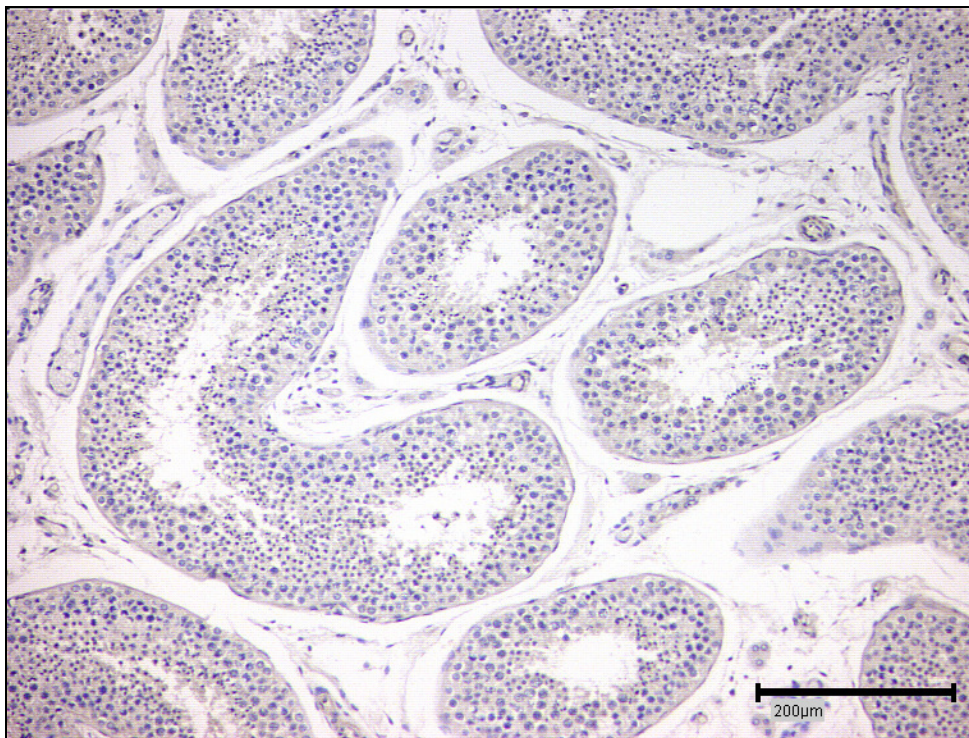


Abb. 26D: Negativ-Kontrolle: humaner Hoden (Methacarn-fixiert), PAP-Methode.
Maßstab entspricht 200 µm. Allenfalls dezente Hintergrundreaktion.

Auch die Vorbehandlung der Methacarn-fixierten Hodenschnitte mittels Hitzedemaskierung (Abb. 27 A+B) oder Proteinase K (Abb. 28 A+B) zeitigte weder neue Resultate, noch wies sie größere Aussagekraft auf. Die stärkere Gewebsdestruktion wirkte sich jedoch hindernd aus. Sowohl in den *Tubuli seminiferi contorti* als auch im *Interstitium* zeigte sich eine dezente unspezifische Färbereaktion. Damit erwies sich, dass eine Mikrowellen-Vorbehandlung ebenso wie die enzymatische Behandlung mit Proteinase K, im Rahmen dieser Arbeit, nicht zu einer Optimierung der Qualität des histologischen Ergebnisses beigetragen hat.

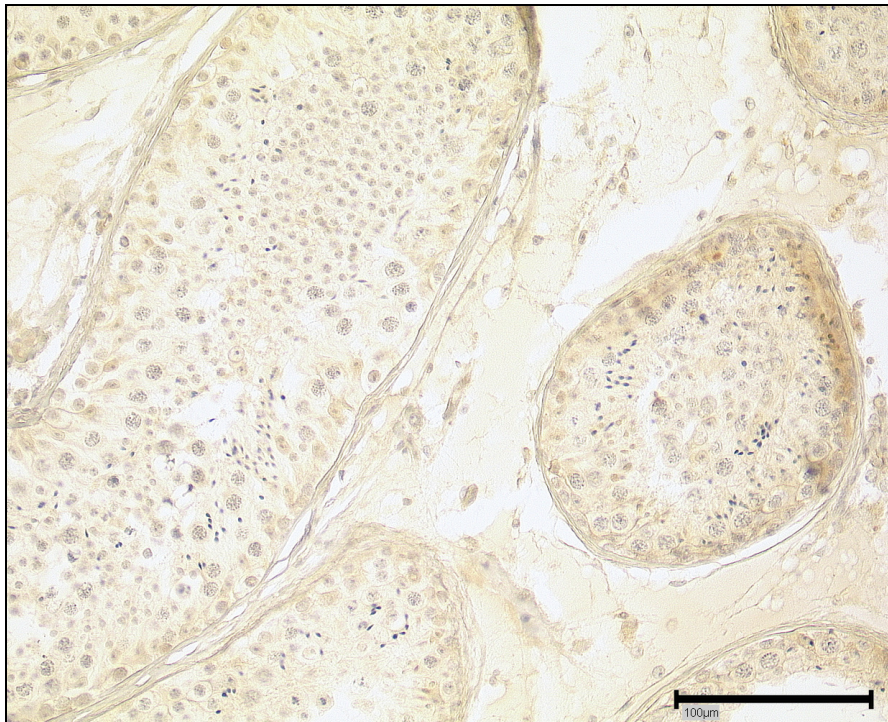


Abb. 27A: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Methacarn-fixiert), Mikrowellen-Vorbehandlung, PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . In den *Tubuli seminiferi contorti* und im *Interstitium* dezente, unspezifische Hintergrundreaktion, kein Nachweis einer Kallikrein-Expression. Gewebsdissoziation.



Abb. 27B: Negativ-Kontrolle: humaner Hoden (Methacarn-fixiert), Mikrowellen-Vorbehandlung, PAP-Methode.

Maßstab entspricht 100 μm . In den *Tubuli seminiferi contorti* und im *Interstitium* eine dezente, unspezifische Hintergrundreaktion. Gewebsdissoziation.

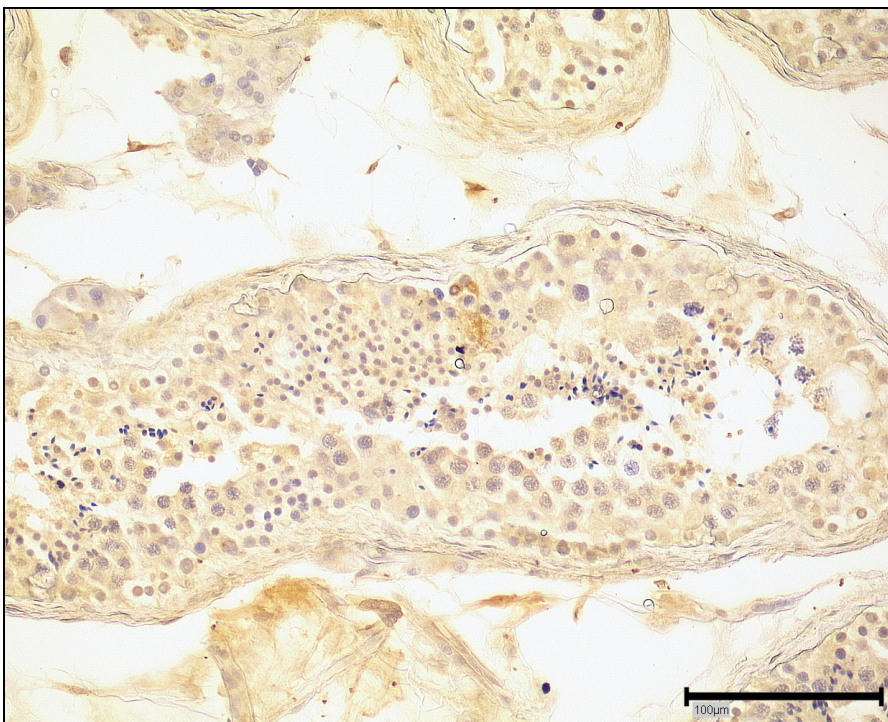


Abb. 28A: Kallikrein-Nachweis: humaner Hoden (Methacarn-fixiert), Vorbehandlung mit Proteinase K, PAP-Methode.

Maßstab entspricht 100 μm . In den *Tubuli seminiferi contorti* und im *Interstitium* ist eine spezifische Färbung nicht eindeutig nachweisbar. Gewebsdissoziation.

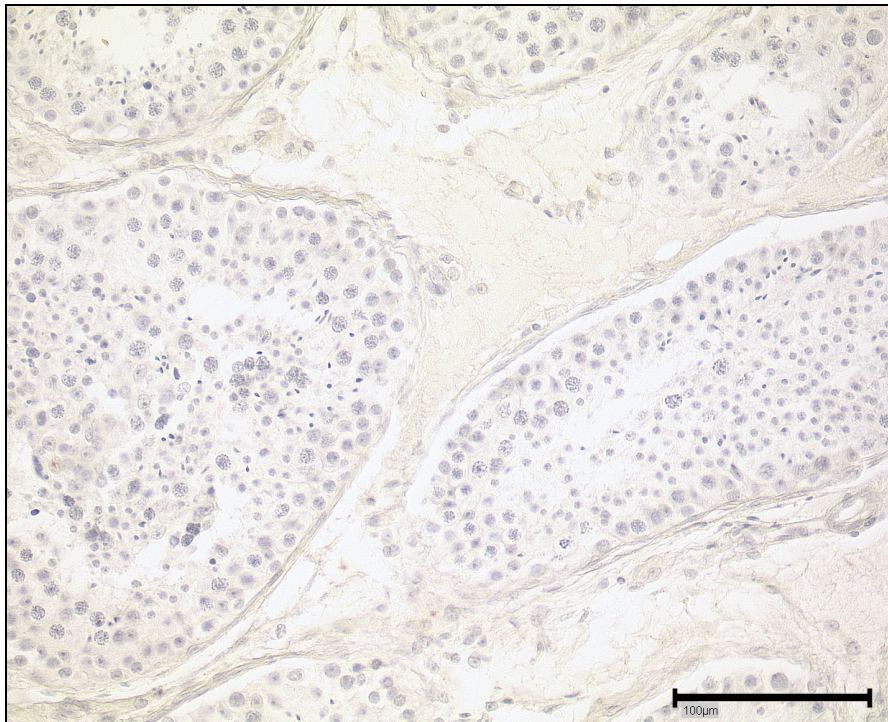


Abb. 28B: Negativ-Kontrolle: humaner Hoden (Methacarn-fixiert), Vorbehandlung mit Proteinase K, PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Keine unspezifischen Farbreaktionen. Gewebdissoziation.

Als externe Positiv-Kontrolle diente Material einer humanen Niere (Formalin-fixiert) (Abb. 29). Hier konnte der Kallikrein-Nachweis zytoplasmatisch in den Mesangienzellen der Glomerula (\blacktriangle in Abb. 29 A) sowie in der muskulären Wandung von Blutgefäßen (\uparrow_1 in Abb. 29 A+B) geführt werden. Eine dezente spezifische Färbung im Nierentubulussystem war im Bereich der Mittelstücke (\uparrow_2 in Abb. 29 A) nachzuweisen, während sich die Zellen der Hauptstücke (\times in Abb. 25 A) negativ darstellen.

Als Negativ-Kontrolle diente humane Niere, die anstatt des Primärantikörpers mit Kaninchen-Normalserum inkubiert wurde. Hier konnte weder eine spezifische noch eine unspezifische Farbreaktion erbracht werden (Abb. 29 C).

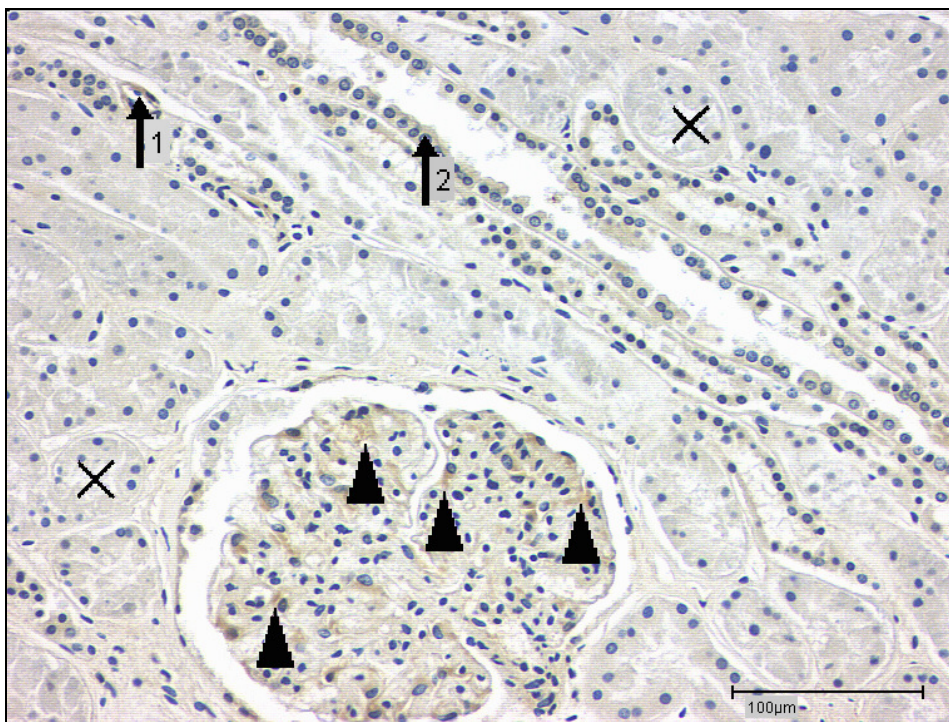


Abb. 29A: Kallikrein Nachweis: humane Niere (Methacarn-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Teilweise deutlich Kallikrein-positives Signal der Mesangienzellen des Glomerulums (\blacktriangle) und der Wandung eines kleinen Gefäßes (\uparrow_1), schwache Kallikrein-Expression in den Mittelstückzellen (\uparrow_2) des Nierentubulussystems, negative Darstellung der Zellen der Hauptstücke (\times).

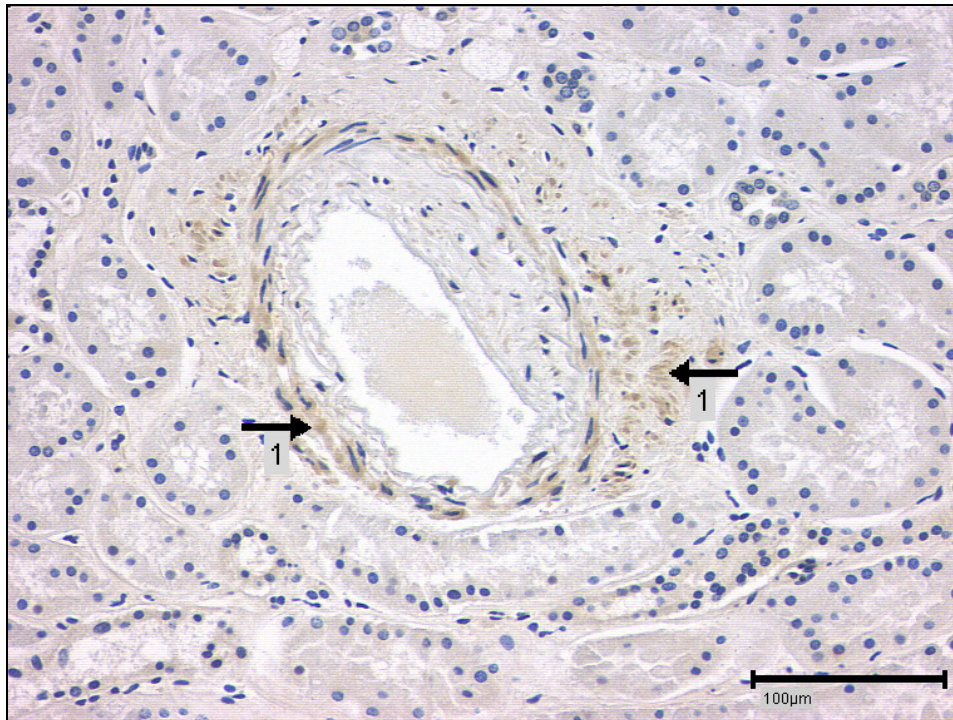


Abb. 29B: Kallikrein-Nachweis: humane Niere (Methacarn-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Deutliche Kallikrein-Expression einzelner Muskelfasern der Gefäßwandung (\uparrow_1).

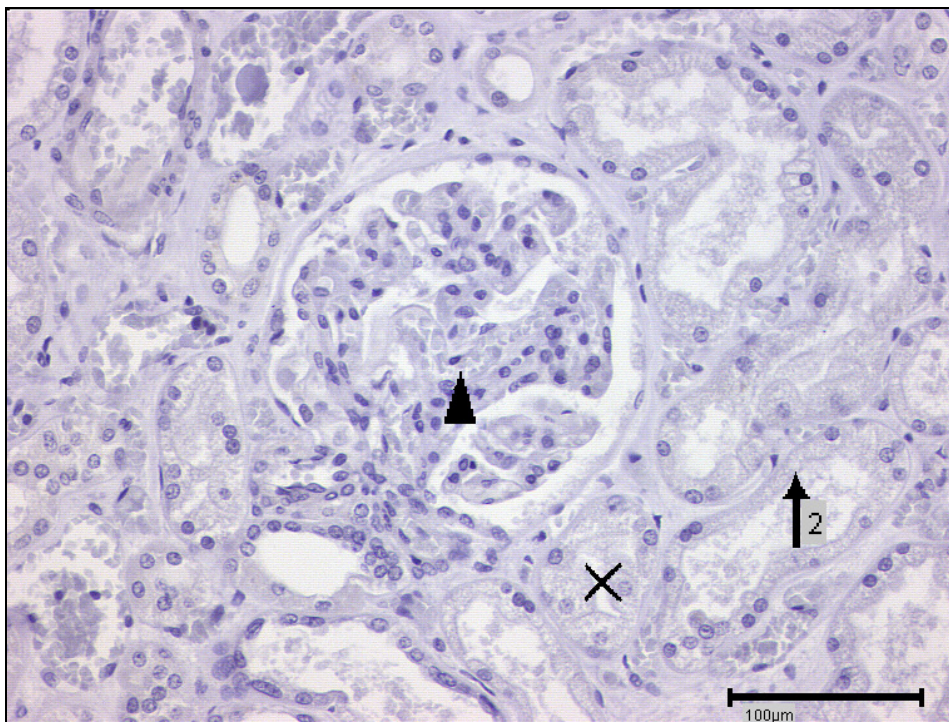


Abb. 29C: Negativ-Kontrolle: humane Niere (Methacarn-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Kein Nachweis einer spezifischen Färbung oder einer unspezifischen Hintergrundreaktion im *Tubulussystem* der Niere mit Hauptstück (\times), Mittelstück (\uparrow_2) und Glomerulum (\blacktriangle).

3.2.2.2 Humaner Testis - Nachweis von LMW - Kininogen

An humanen *Testis*schnitten wurde mit einem *polyklonalen*, im Kaninchen produzierten Antikörper gegen humanes LMW-Kininogen gearbeitet. Dieser zeigte ein unterschiedliches Reaktionsverhalten in Bezug auf das Fixiermedium des Gewebes bei Unabhängigkeit von PAP- oder HRP-Methode.

3.2.2.2.1 Humaner Testis (Bouin-fixiert) - Nachweis von LMW-Kininogen

Bouin-fixierter Hoden zeigte eine intensive Expression von LMW-Kininogen im *interstitiellen Stroma* (Abb. 30 A). Zusätzlich zeigte sich in den *Tubuli seminiferi contorti* an runden und elongierten Spermatischen im Bereich der sich entwickelnden Akrosomenkappe eine membranständige Färbung (▲ in Abb. 30 B), die als spezifisch zu werten ist. Teilweise zeigten auch die zellulären Bestandteile im Gefäßlumen eine starke Farbreaktion (× in Abb. 30 A). Spermato gonien und Spermatozyten, ausgereifte Spermatischen (↑₁ in Abb. 30 B) sowie die Spermatozoen im *Tubulus*lumen, zeigten keine Expression von LMW-Kininogen, so dass von einer stadienspezifischen Expression auszugehen ist. Ebenso stellten sich Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und *Peritubulär*-Zellen negativ dar. Kein Kallikrein-Nachweis im Bereich der muskulären Gefäßwandung (↑₂ in Abb. 30 A).

In der Negativ-Kontrolle konnte keine positive Farbreaktion erzeugt werden (Abb. 30 C).

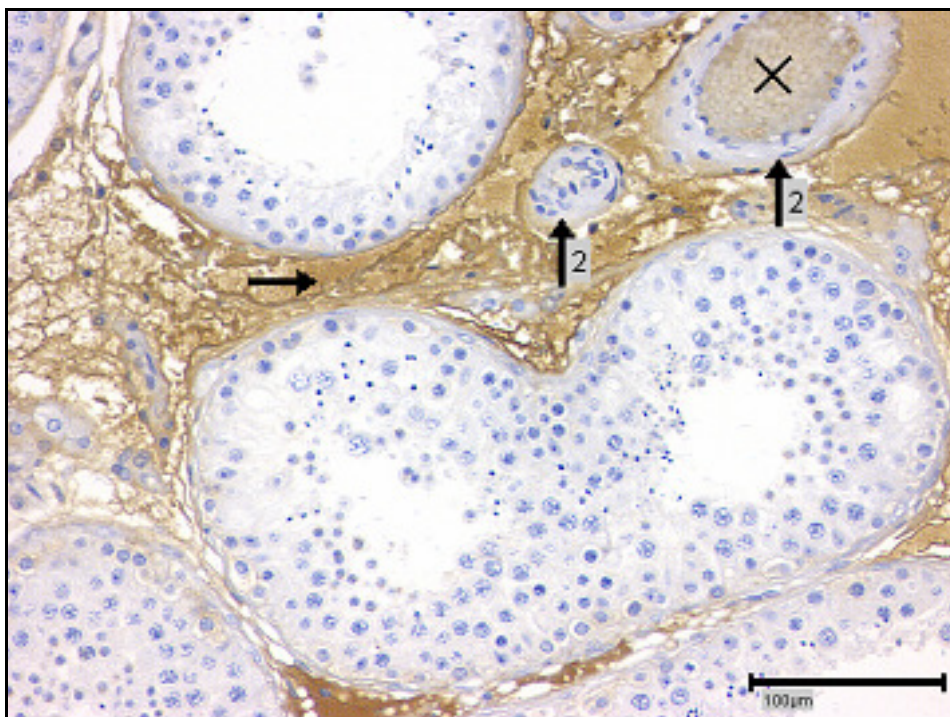


Abb. 30A: LMW-Kininogen-Nachweis: humaner *Testis* (Bouin-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Starke LMW-Kininogen-Expression im *interstitiellen* Gewebe (▲), auch deutlich positive Farbreaktion der zellulären Bestandteile innerhalb des Gefäßlumens (×), keine Detektion von LMW-Kininogen im Bereich der Gefäßwände (↑₂).

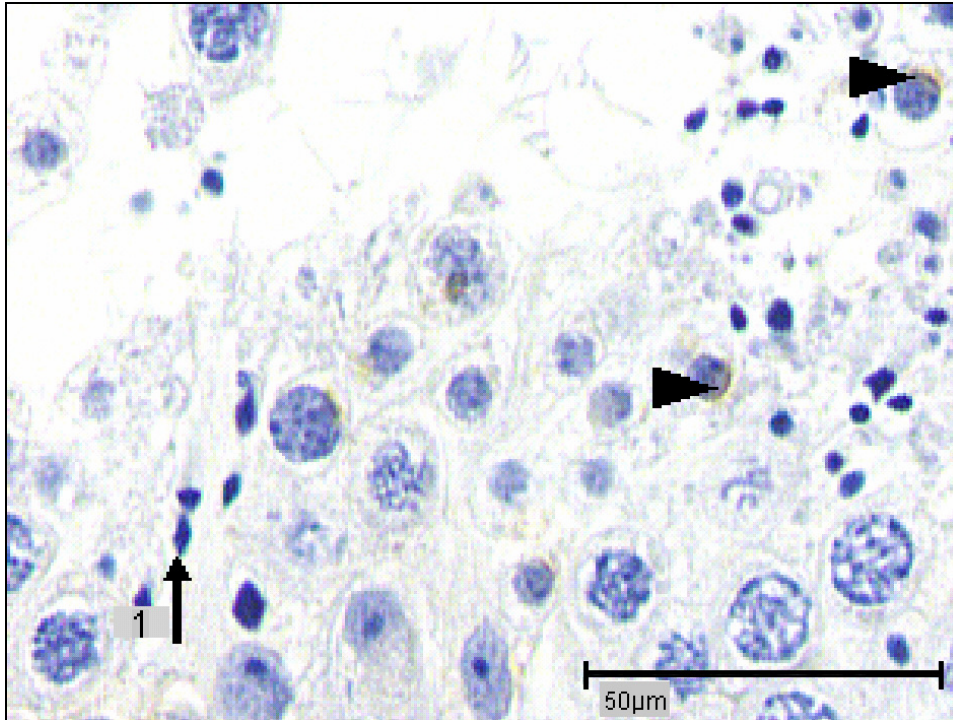


Abb. 30B: LMW-Kininogen-Nachweis: humaner *Testis* (Bouin-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 µm. In der Detailaufnahme leichte LMW-Kininogen-Expression im Bereich der sich ausbildenden Akrosomenkappe runder Spermatiden (▲). Keine Detektion von LMW-Kininogen in reifen Spermatiden (↑₁).

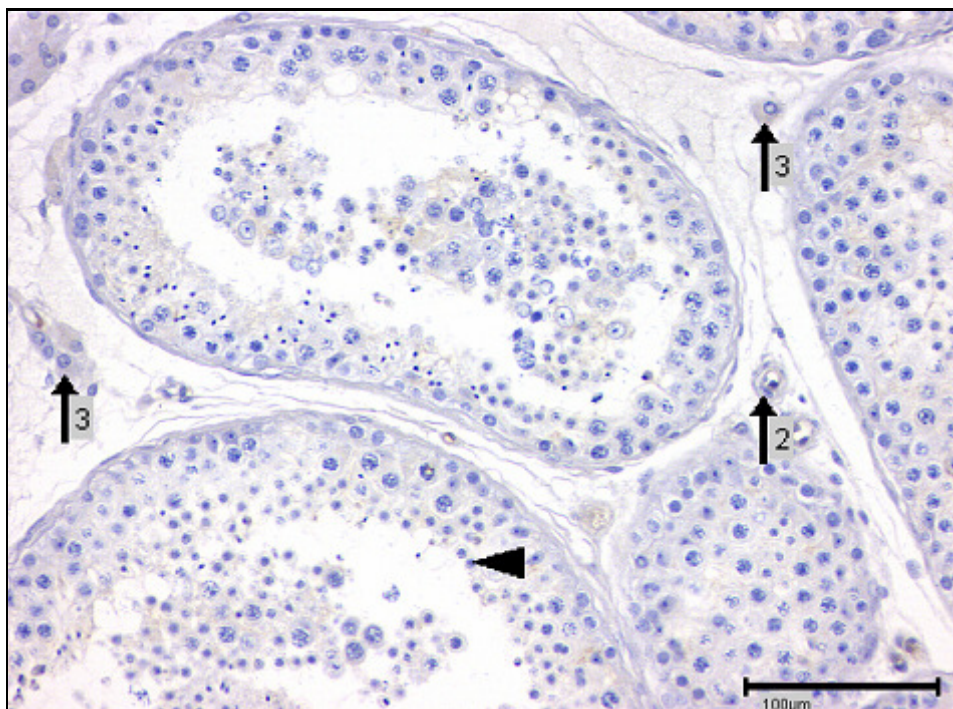


Abb. 30C: Negativ-Kontrolle: humaner *Testis* (Bouin-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 µm. In der Detailaufnahme keine spezifische Farbreaktion. *Interstitielles Stroma* mit Leydig-Zellen (↑₃), Gefäß (↑₂), runde Spermatiden (▲) im Keimepithel.

3.2.2.2 Humaner Testis (Methacarn-fixiert) - Nachweis von LMW-Kininogen

Das Methacarn-fixierte Hodengewebe zeigte ebenfalls in der immunhistologischen Färbung eine Betonung der Akrosomenkappe der runden Spermatozoen (\blacktriangle in Abb. 31 B). Das *interstitielle Stromagewebe* war deutlich gefärbt, gleichzeitig zeigte sich jedoch ein diffuser Hintergrund, der sich in den *Tubuli seminiferi contorti* und im *interstitiellen Stromagewebe* sehr ähnlich verhielt (Abb. 31 A+B). Trotz Beeinträchtigung durch starke Zerfaserung mit ausgeprägten Kontinuitätsunterbrechungen des Gewebes konnte eine Auswertung der Ergebnisse vorgenommen werden.

Auch die *Peritubulär-Zellen* (\uparrow_1 in Abb. 31 B) wiesen z. T. eine stärkere Anfärbung auf. Die Deutung als eine spezifische Färbung erschien fraglich, da auch im Vergleich mit den bouin-fixierten *Testis* letztgenannte in diesem Bereich keine LMW-Kininogen-Expression zeigten. Somit musste es als Färbeartefakt bei Inkohärenz des Gewebes gewertet werden (Abb. 31 A+B).

Als Negativ-Kontrolle wurde Hodengewebe desselben Individuums, anstelle des Primärantikörpers, mit Kaninchen-Normalserum oder mit dem Überstand des mit einem Überschuss aus humanen LMW-Kininogen präinkubierten ersten Antikörpers inkubiert. Unabhängig von der Wahl des Inkubationsmediums zeigte sich ein gleichförmiges negatives Ergebnis (Abb. 31 C).

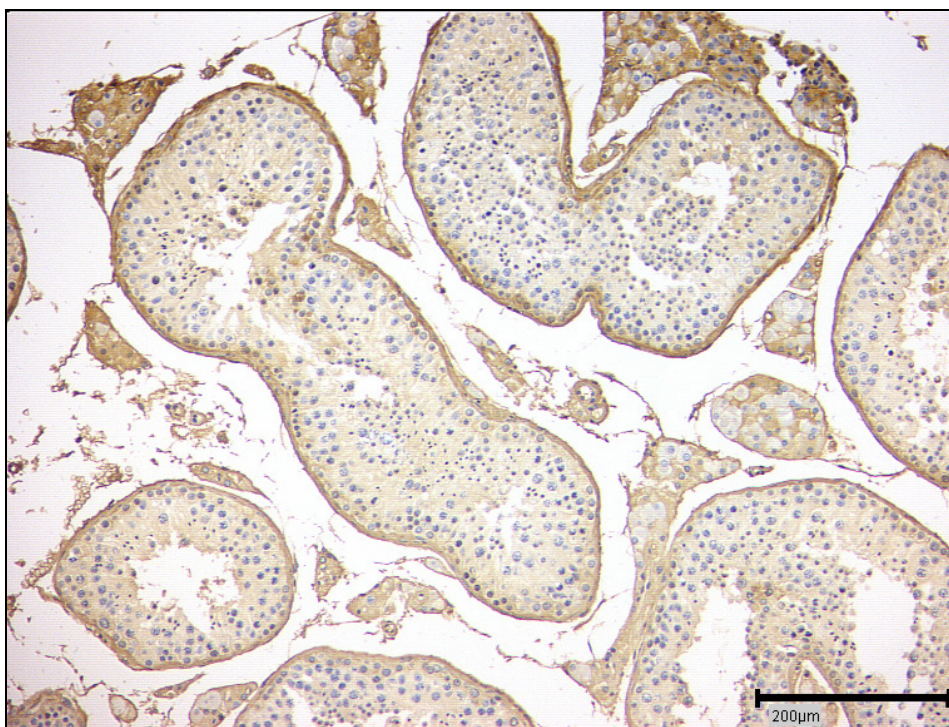


Abb. 31A: LMW-Kininogen-Nachweis: humaner *Testis* (Methacarn-fixiert), HRP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . In der Übersicht zeigt sich sowohl im *interstitiellen* Gewebe als auch im Keimepithel eine intensive Färbung, die eher den Charakter eines unspezifischen Hintergrundes hat. Gewebszerfaserung.

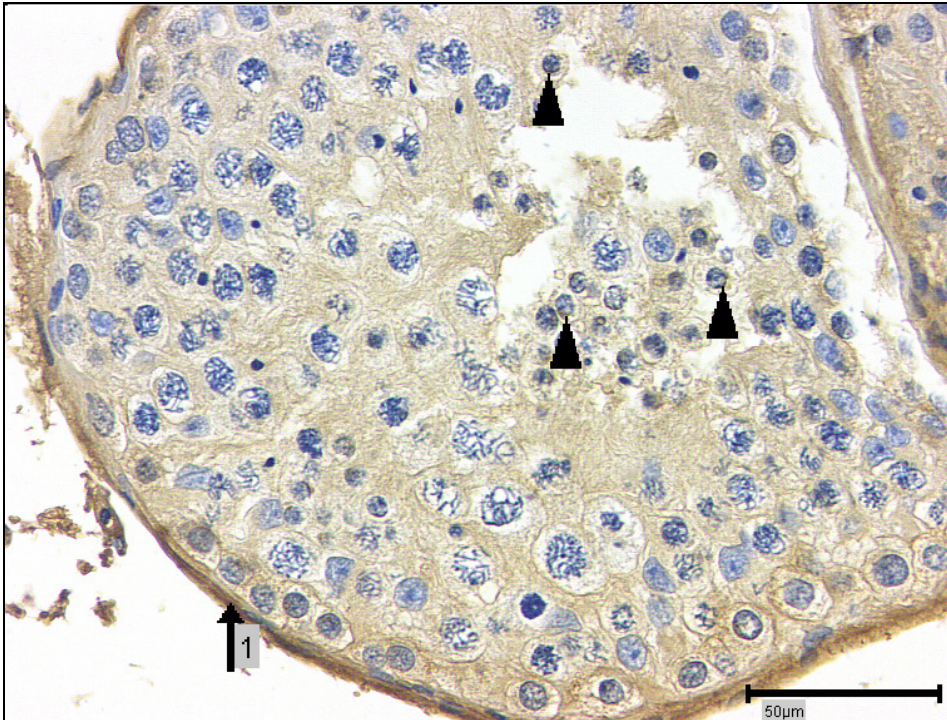


Abb. 31B: LMW-Kininogen-Nachweis: humanen *Testis* (Methacarn-fixiert), HRP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . In der Detailaufnahme spezifisch anmutende Farbreaktion, vergleichbar mit der bouin-fixierten Hodenbiopsie im Bereich der sich entwickelnden akrosomalen Kappe der runden Spermatiden (▲); stärkere Anfärbung auch der *Peritubulär*-Zellen (↑₁).

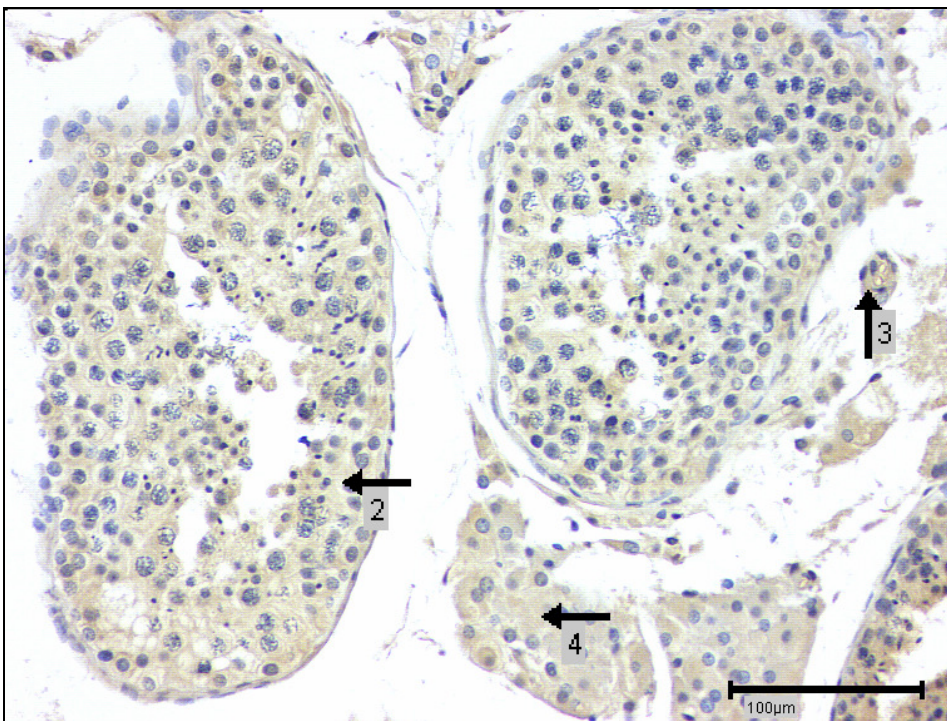


Abb. 31C: Negativ-Kontrolle: humaner *Testis* (Methacarn-fixiert), HRP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Leichte unspezifische Hintergrundfärbung. Keimepithel (↑₂), Gefäße (↑₃) und *Stroma* mit Leydig-Zellen (↑₄), evtl. auch Anteile zerfaserten Keimepithels.

3.2.2.3 Humaner Testis - Nachweis der Neutralen Metalloendopeptidase (NEP)

Mit Hilfe eines Antikörpers gegen die humane Neutrale Metalloendopeptidase 24.11 (auch als CALLA, common acute lymphoblastic leukaemia antigen bekannt), stellte sich eine spezifische Färbung im humanen *Testis* wie folgt dar.

3.2.2.3.1 Humaner Testis (Methacarn-fixiert) - Nachweis der NEP

So zeigten sich an den Methacarn-fixierten Hodengewebsschnitten (Abb. 32) unbeeinflusst von der Anwendung der immunhistologischen Verfahren PAP, HRP oder En Vision[®] im Bereich der Gefäße sowie im *Interstitium*, einzelne stark gefärbte Zellen (▲ in Abb. 32 A+B), die wahrscheinlich dem reticulohistiozytären System angehören und am ehesten Makrophagen sind. Eine unspezifische Hintergrundfärbung kam nicht zur Darstellung. Die Ergebnisse waren im Sinne einer Expression der Neutralen Metalloendopeptidase zu werten. In der Negativ-Kontrolle konnte an entsprechender Lokalisation keine braune DAB-Färbung detektiert werden. Das Keimepithel (↑₁ in Abb. 32 A), das *interstitielles Stroma* (↑₃ in Abb. 32 A) und die Gefäße (↑₂ in Abb. 32 A) zeigen keinen Nachweis der NEP.

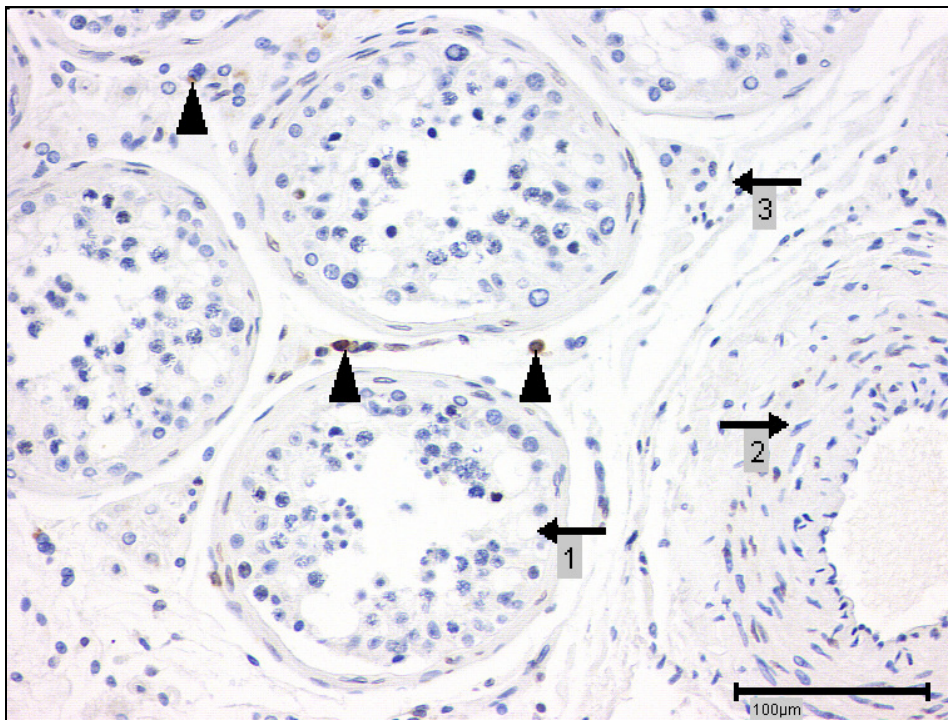


Abb. 32A: NEP 24.11-Nachweis: humaner *Testis* (Methacarn-fixiert), HRP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . *Tubulus seminiferus contortus* (↑₁), Gefäß (↑₂), *interstitielles Stroma* (↑₃), zelluläre Expression von NEP 24.11 (▲).

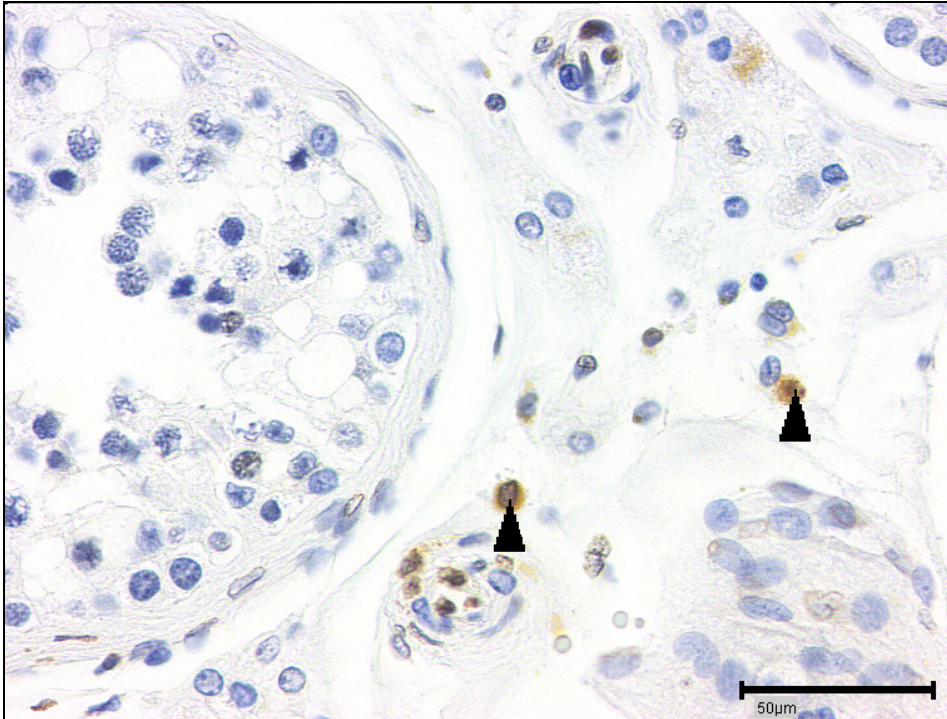


Abb. 32B: NEP 24.11-Nachweis: humaner *Testis* (Methacarn-fixiert), HRP-Methode. Maßstab entspricht 50 μm . In der Detailaufnahme zeigt sich im *interstitiellen* Gewebe des Hodens ein positiver Nachweis der Peptidase in Zellen, wahrscheinlich des reticulohistiozytären Systems, am ehesten Makrophagen (\blacktriangle).

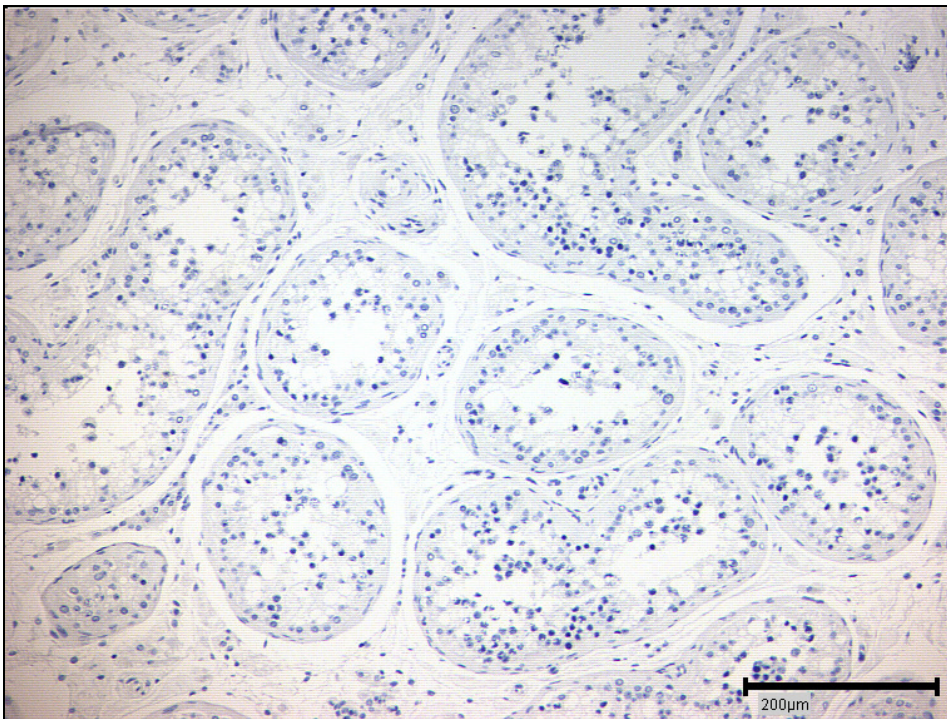


Abb. 32C: Negativ-Kontrolle: humaner *Testis* (Methacarn-fixiert), HRP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Kein Nachweis einer spezifischen Färbung.

3.2.2.3.2 Humaner Testis (Bouin-fixiert) - Nachweis von NEP 24.11

Aus Mangel an Bouin-fixiertem Hodengewebe konnte diese Versuchsreihe mit dem Nachweis der Neutralen Metallopeptidase 24.11 mit Hilfe des Antikörpers CALLA nicht parallel an Bouin- und Methacarn-fixierten *Testis*schnitten erfolgen.

3.2.3 Bulle

3.2.3.1 Bullentestis - Nachweis von Gewebs-Kallikrein

Bovines Methacarn-fixiertes testikuläres Gewebe wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen Kallikrein aus humanem Urin inkubiert. Es zeigte sich eine deutliche Kreuzreaktion des bovinen Gewebes mit dem humanen Antikörper (Abb.33).

Die Kallikrein-Expression war innerhalb der *Tubuli seminiferi contorti* im Bereich des Akrosoms bzw. der sich ausbildenden Akrosomenkappe von runden (\blacktriangle in Abb. 33 B) und elongierten (\uparrow_2 in Abb. 33 C) Spermatischen lokalisiert. Spermatozoen (\uparrow_5 in Abb. 33 D), Spermatozoen sowie in das Lumen abgegebene Spermatozoen (\uparrow_3 in Abb. 33 D) zeigten keine immunhistologische Färbereaktion, so dass auch hier eine stadienspezifische Expression von Kallikrein gegeben war. Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen, *Peritubulär*-Zellen (\uparrow_4 in Abb. 33 D) sowie das *Interstitium* erbrachten ebenfalls keinen Kallikrein-Nachweis.

Die Muskelzellen der *interstitiellen* Gefäße (in Abb 33 A und \uparrow_1 in Abb. 33 C) zeigten eine deutliche zytoplasmatische Kallikrein-Positivität auf und dienten als interne Positiv-Kontrolle.

Als Negativ-Kontrolle fungierte der mit Kaninchen-Normalserum (statt Kallikrein-Antikörper) vorbehandelte Bullenhoden. Es zeigten sich weder eine spezifische Färbung, noch Färbeartefakte in Form eines unspezifischen Hintergrundes (Abb. 33 E).

Versuchsweise wurde bovines Hodengewebe auch mit einem Kallikrein-Antikörper aus Rattenuurin inkubiert. Ein kreuzreaktiver Kallikrein-Nachweis konnte in der Immunhistologie nicht erbracht werden. Auf eine Darstellung der Ergebnisse konnte daher verzichtet werden.

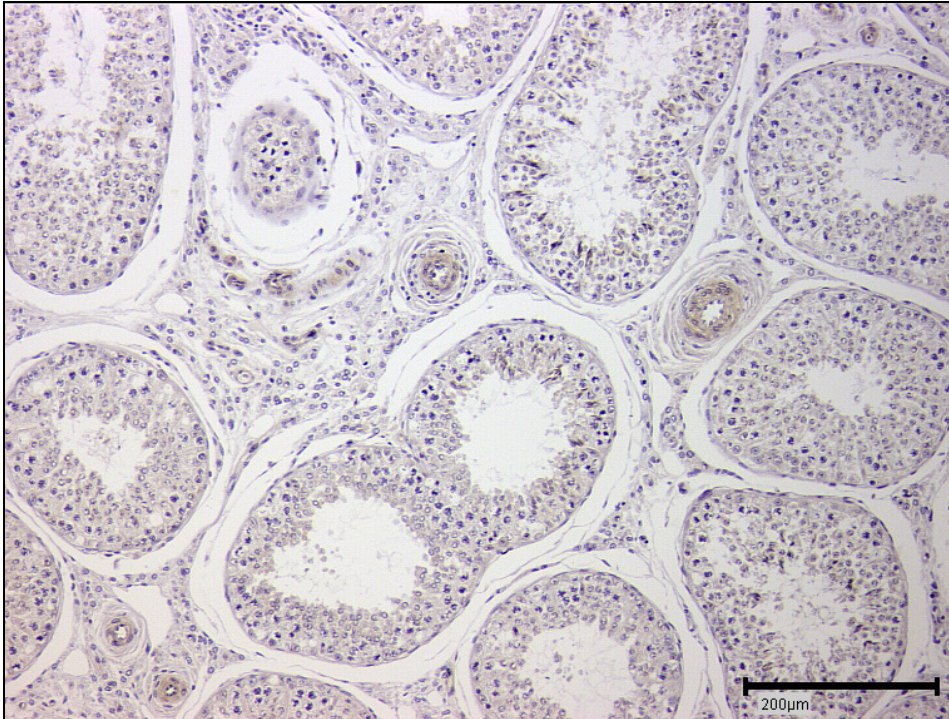


Abb. 33A: Kallikrein-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert), humaner AK – PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μ m. In der Übersichtsaufnahme deutliche Kreuzreaktion im bovinen Testis mit dem humanen Antikörper gegen Kallikrein.

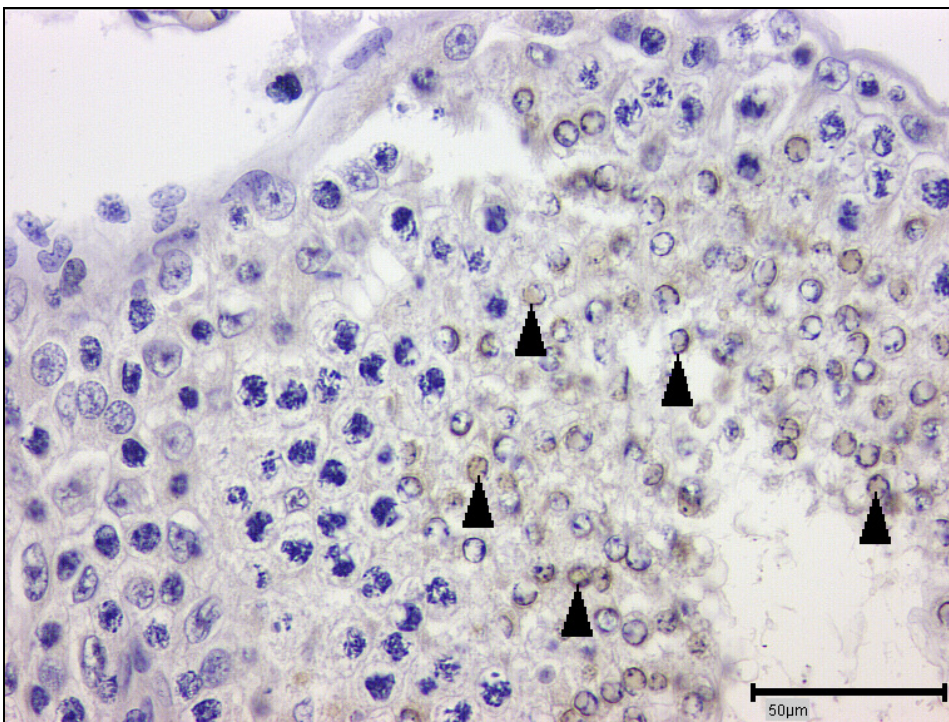


Abb. 33B: Kallikrein-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert), humaner AK – PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μ m. Deutliche Kallikrein-Expression im Bereich der sich entwickelnden Akrosomenkappe der runden Spermatiden (\blacktriangle).

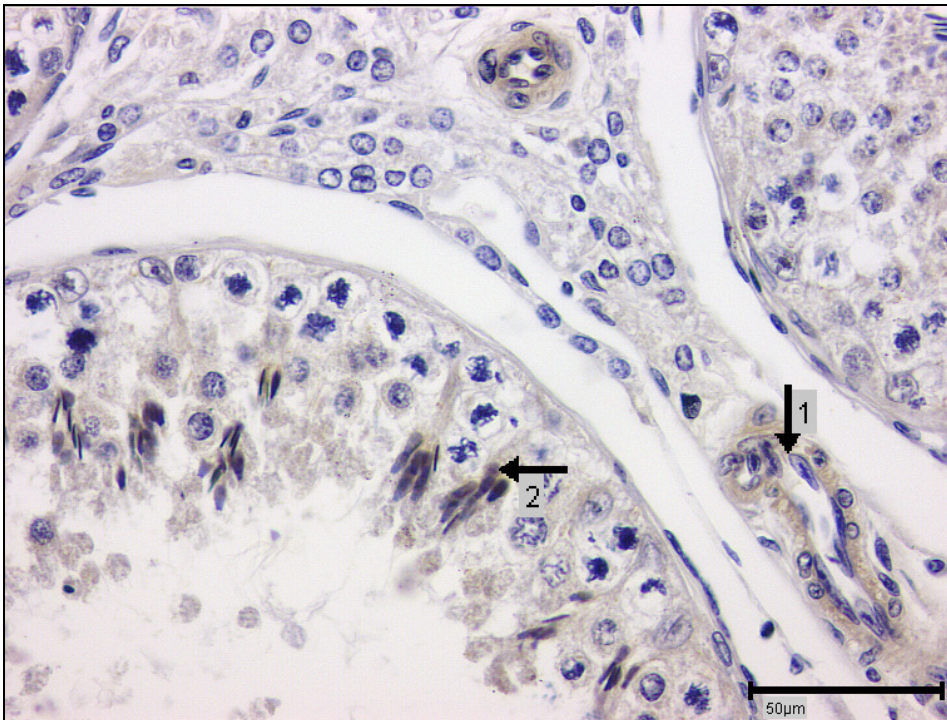


Abb. 33C: Kallikrein-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert), humaner AK – PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μ m. Spermatiden elongiert (\uparrow_2) mit schwach Kallikrein-positivem Signal im Bereich der Akrosomenkappe; positiver Nachweis des Kallikreins der Muskelwandung der Gefäße (\uparrow_1).

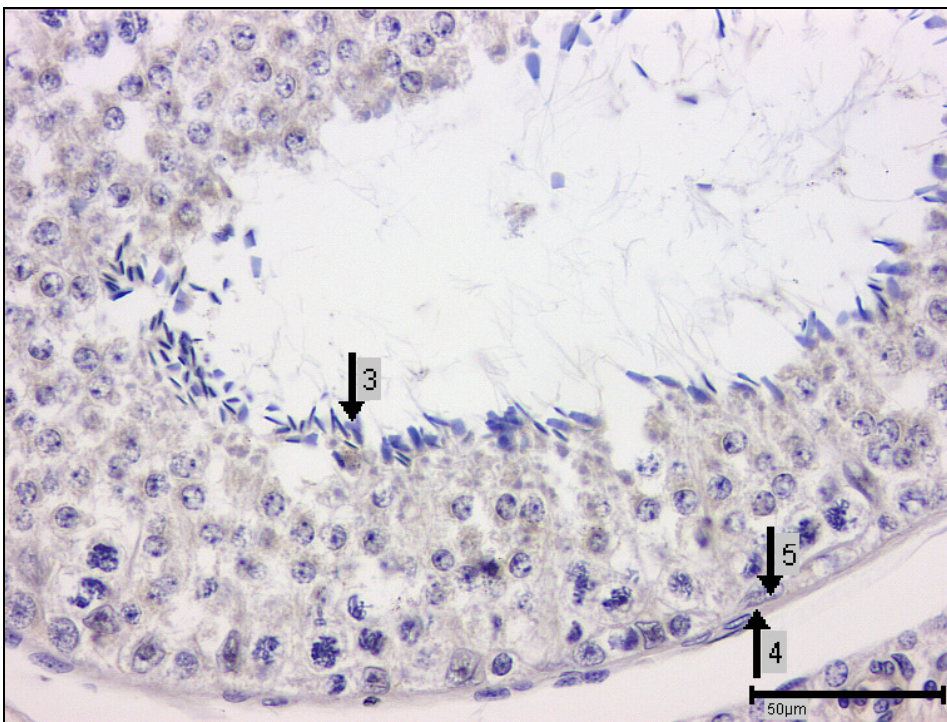


Abb. 33D: Kallikrein-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert), humaner AK – PAP-Methode. Maßstab entspricht 50 μ m. Keine Detektion einer Kallikrein-Expression im Bereich der reifen Spermatiden (\uparrow_3) kurz vor der Spermiation. Peritubulär-Zellen (\uparrow_4) und Spermatogonie (\uparrow_5) ebenfalls negativ dargestellt.

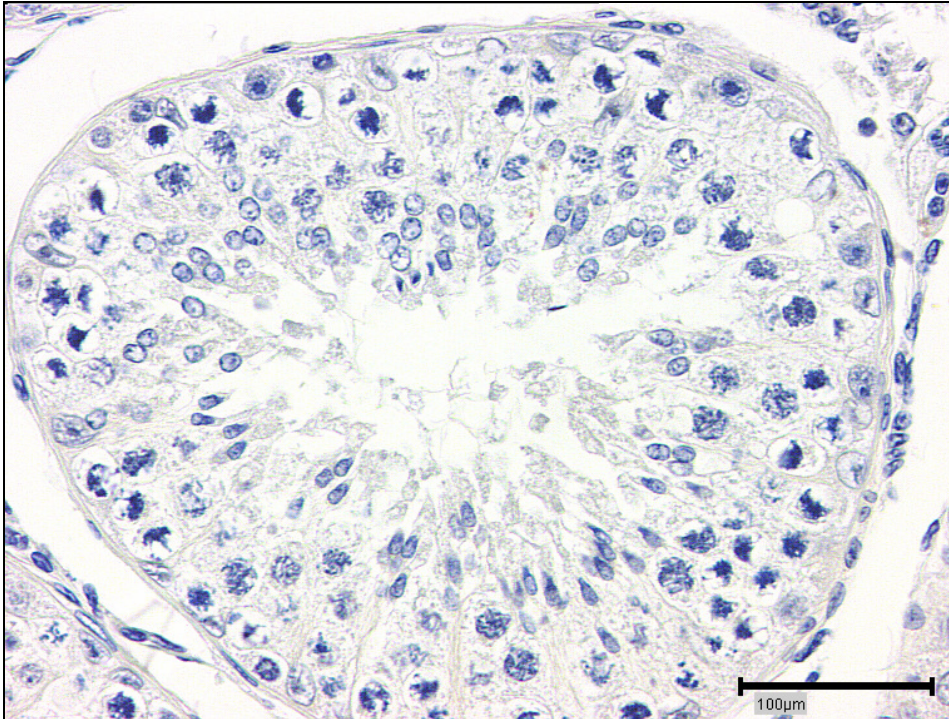


Abb. 33E: Negativ-Kontrolle: Bullentestis (Methacarn-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 μm . Keine spezifische Färbung in der Detailaufnahme.

3.2.3.2 Bullentestis - Nachweis von LMW-Kininogen

An Methacarn-fixiertem, bovinem Hoden wurde mit dem entsprechenden humanen Antikörper das Protein LMW-Kininogen detektiert. Die Ergebnisse blieben unbeeinflusst von der Wahl der immunhistologischen Verfahren PAP- oder HRP-Methode. Es zeigte sich in beiden Fällen eine deutliche Kreuzreaktion des gegen das humane LMW-Kininogen gerichteten Antikörpers mit dem entsprechenden bovinen Antigen.

Das LMW-Kininogen war im Keimepithel an den runden (\blacktriangle in Abb. 34 B+C) und elongierten (\uparrow_2 in Abb. 34 B) Spermatiden lokalisiert, topographisch im Bereich der sich entwickelnden Akrosomenkappe bei Negativität von Spermatogonien und Spermatozyten sowie Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen, *Peritubulär*-Zellen und Spermatozoen im *Tubuluslumen*. Im *interstitiellen Stromagewebe* war eine deutliche immunhistologische Färbung vorhanden (\uparrow_1 in Abb. 34 A+B) zudem zeigten vielfach die *Peritubulär*-Zellen (\uparrow Abb. 34 A+B) ein deutliches Farbsignal.

Die Muskelzellen der Gefäße im *interstitiellen* Gewebe zeigten einen ebenso deutlichen LMW-Kininogen-Nachweis (\uparrow_3 in Abb. 34 C).

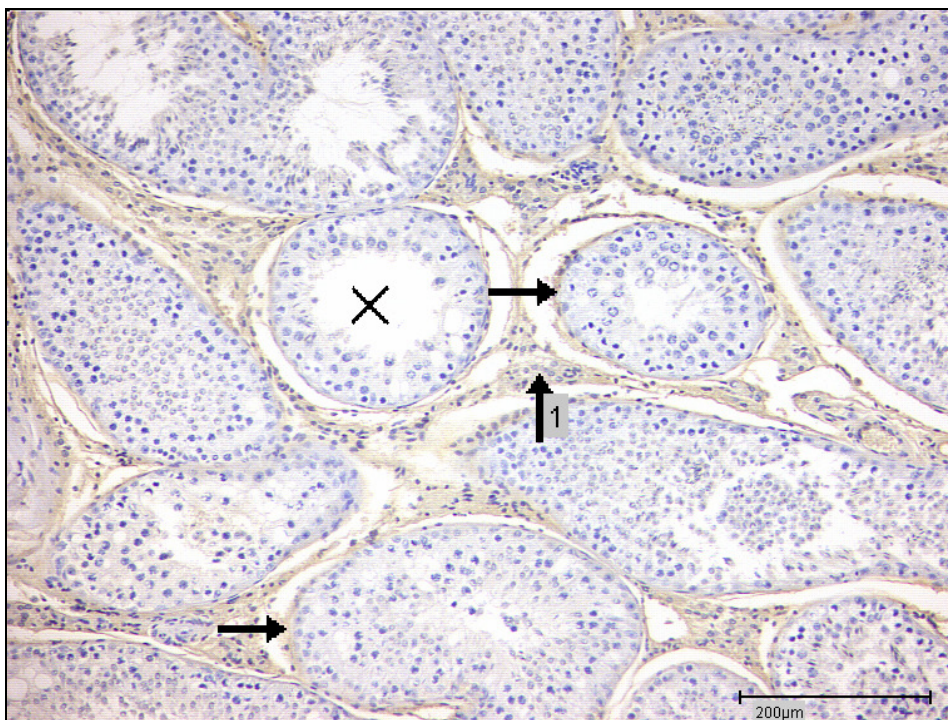


Abb. 34A: LMW-Kininogen-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert), humaner AK – PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . In der Übersicht zeigt sich eine deutliche Färbung im Bereich des *interstitiellen Stromas* (\uparrow_1) und der *peritubulären Myozyten* (\uparrow). *Tubulus seminiferus contortus* (\times).

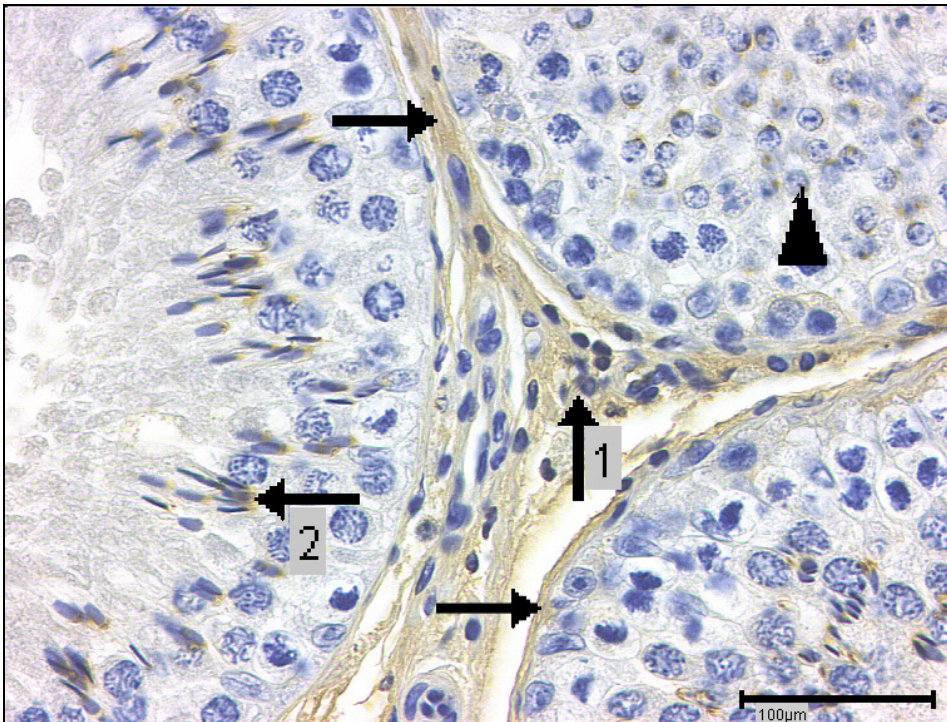


Abb. 34B: LMW-Kininogen-Nachweis: *Bullentestis* (Methacarn-fixiert), humaner AK – PAP-Methode. Maßstab entspricht 100 µm. Im Bild Anschnitte von 3 *Tubuli seminiferi contorti*; Kallikrein-Nachweis an elongierten Spermatiden (↑₂) im Akrosomenkappenbereich, punktförmig in der sich entwickelnden Akrosomenkappe runder Spermatiden (▲) sowie im *interstitiellen Stroma* (↑₁). *Peritubuläre Myozyten* (↑) stellen sich positiv dar.

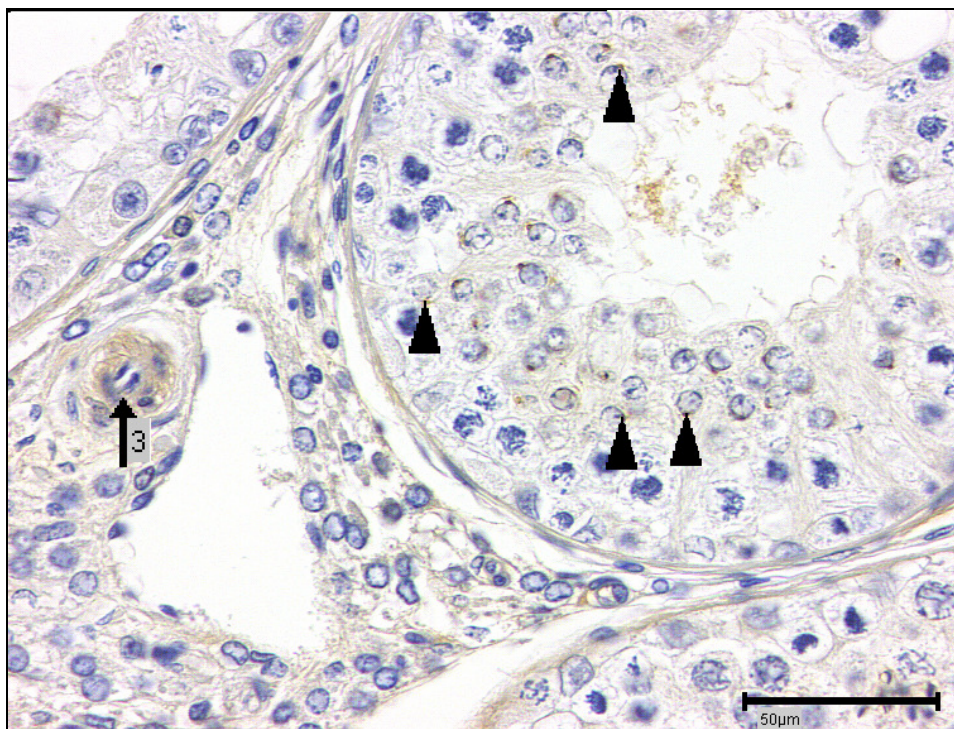


Abb. 34C: LWM-Kininogen-Nachweis: *Bullentestis* (Methacarn-fixiert), humaner AK – PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 µm. Kallikrein-Expression in den muskulären Schichten der Gefäßwandung (↑₃) sowie im *Tubulus seminiferus contortus* im Bereich der Akrosomanlage runder Spermatiden (▲).

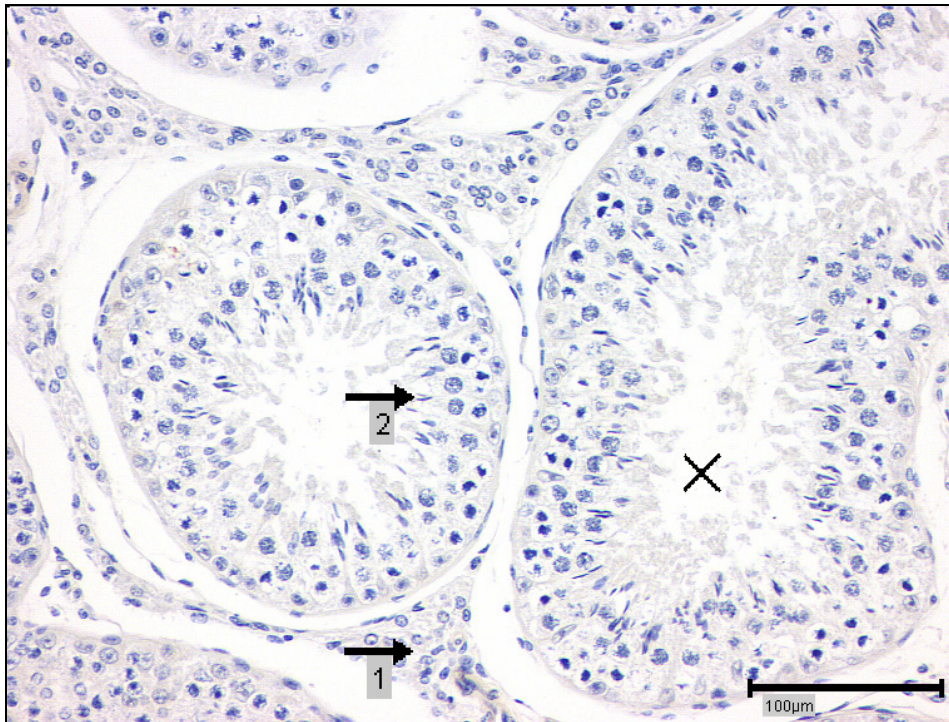


Abb. 34D: Negativ-Kontrolle: Bullentestis (Methacarn-fixiert), PAP-Methode. Maßstab entspricht 200 μm . Detailaufnahme: Keine spezifische Färbung. *Tubulus seminiferus contortus* (X) und *interstitielles Stroma* (\uparrow_1), elongierte Spermatozoen (\uparrow_2).

3.2.3.3 Bullentestis - Nachweis der Neutralen Metalloendopeptidase (NEP 24.11)

Der Einsatz des humanen Antikörpers gegen die Neutrale Metalloendopeptidase 24.11 (CALLA Clon J 5) an Methacarn-fixierten bovinen *Testisschnitten* blieb ohne immunhistologischen Nachweis. Positiv- und Negativ-Kontrollen erbrachten ein nahezu identisches Bild (Abb. 35 A+B) mit fehlender spezifischer Färbung. Möglicherweise bestehen zwischen dem humanen und dem bovinen Enzym (NEP 24.11) größere Unterschiede, so dass hier keine Kreuzreaktion zu beobachten war.

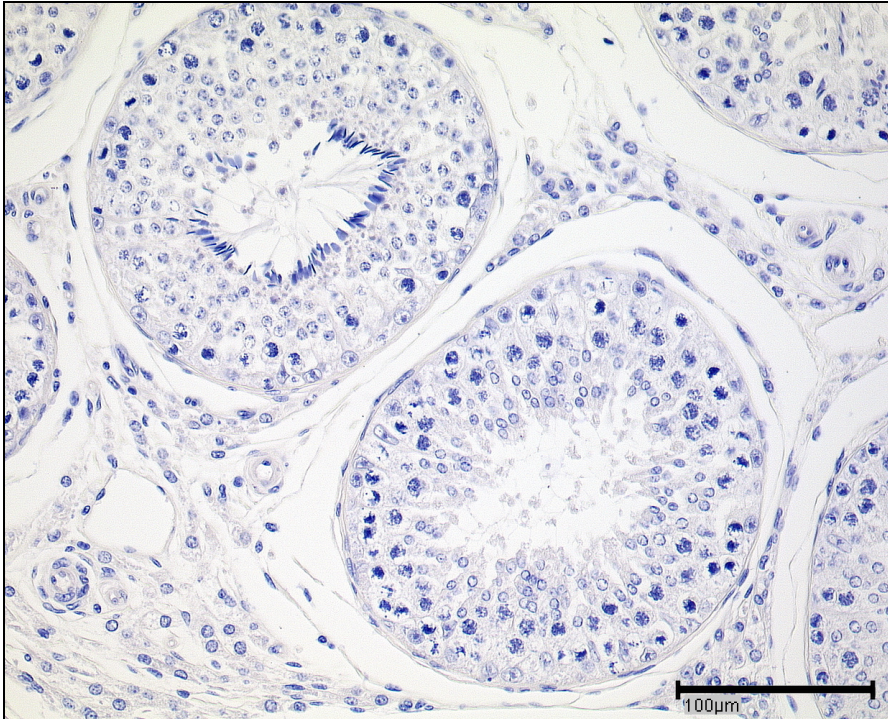


Abb. 35A: NEP 24.11-Nachweis: Bullentestis (Methacarn-fixiert), humaner AK – HRP-Methode. Maßstab entspricht 100 µm. Im *Tubulus seminiferus contortus* keine spezifische Färbung.

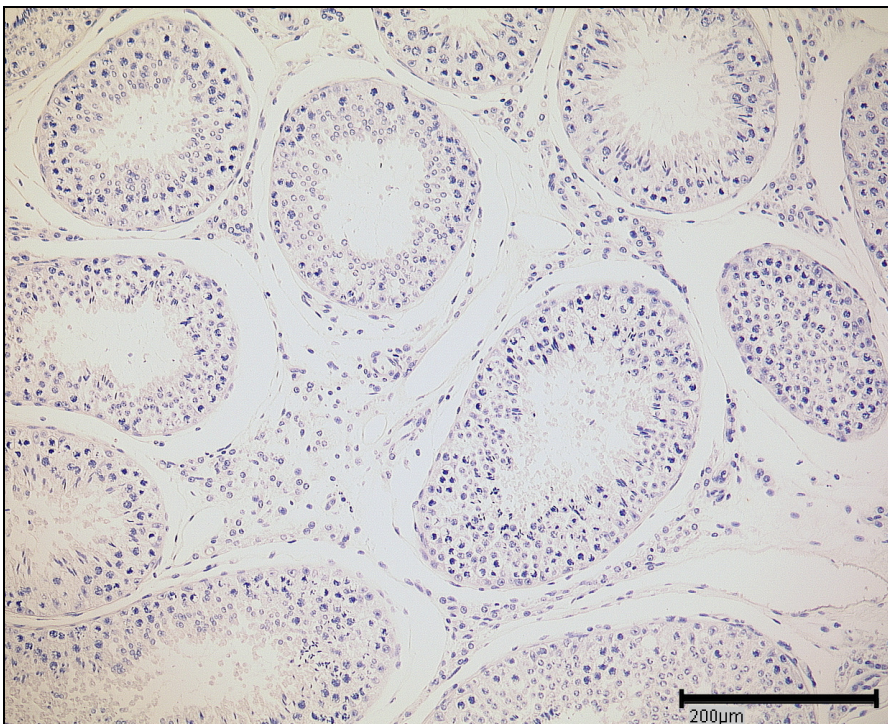


Abb. 35B: Negativ-Kontrolle: Bullentestis (Methacarn-fixiert), HRP-Methode. Maßstab entspricht 200 µm. Keine spezifische Färbung im testikulären Gewebe des Bullens.

4 Diskussion

4.1 Das Gewebs-Kallikrein-Kinin-System im männlichen Reproduktionstrakt

Die in der Literatur aufgeführten Belege zeigen neben dem Plasma-Kallikrein-Kinin-System die Existenz einer gewebspezifischen Variante auf. Diese kommt nahezu ubiquitär im Körper vor, ist in einer Vielzahl von Organen nachgewiesen worden und wird auch im männlichen Reproduktionstrakt beschrieben. Unter Verwendung verschiedener Untersuchungsmethoden gelang mehreren Forschungsgruppen der Nachweis von Gewebs-Kallikrein bzw. diesem System zugehörigen Komponenten im Hoden, Nebenhoden, Prostata, dem weiblichen Genitaltrakt und in Organen, unabhängig vom Reproduktionstrakt. Es lässt sich auch in Sekreten wie Urin, Speichel oder Ejakulat nachweisen.

Im Nachfolgenden sollen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit den Erkenntnissen in der Literatur verglichen und diskutiert werden.

4.2 Fehlerquellen / Optimierungsversuche

Wie schon teilweise in den einzelnen Kapiteln dargestellt, bestand ein Großteil der Arbeit in der Versuchsoptimierung.

Varianten zur Hintergrundoptimierung

Das anfängliche Hauptproblem lag in einer sehr ausgeprägten Hintergrundreaktion, für die es unterschiedliche Gründe und damit verbundene Variationsmöglichkeiten gegeben hat.

Die **PAP-Methode** hat im Gegensatz zu der direkten Methode den Vorteil, dass aufgrund der höheren Empfindlichkeit eine stärkere Verdünnung des Primärantikörpers möglich ist und es somit zu einer Reduktion des Hintergrundes kommt (Noll & Schaub-Kuhnen, 2000). Von der anfänglich häufig angewandten HRP-Methode wurde somit zur PAP-Methode gewechselt.

Das Blockieren mit Normalseren (die keine spezifischen Antikörper gegen die zu detektierenden Antigene enthalten) oder Rinderserumalbumin (BSA) dient der Absättigung elektrostatischer Ladungen der Proteine im zu untersuchenden Gewebe. Vor allem die spezifische Bindung des nachfolgenden Primärantikörpers wird gefördert und somit die unspezifische Hintergrundfärbung reduziert. Das Normalserum sollte aber nur in einer Konzentration von 1 % bis 5 % angewandt werden, da es sonst seinerseits durch die beinhalteten Immunglobuline zu unerwünschten Hintergrundfärbungen kommen kann.

Eine weitere Möglichkeit unspezifische Reaktionen zu blockieren war die Verwendung eines **potenteren Blockiermediums** statt des Rinderserumalbumin. So wurde nach anfänglichem Einsatz von **BSA-c** entfettetes **Magermilchpulver**, in den Konzentrationen 2 % und 4 %, dem Verdünnungsmedium zugesetzt (Noll & Schaub-Kuhnen, 2000).

Wesentlich ist die vollständige **Inhibition der endogenen Peroxidase** im Gewebe z. B. durch Inkubation des Präparates mit 3 %igem Wasserstoffperoxid, um Mitreaktionen bei der Farbentwicklung und somit falsch positive Reaktionen zu verhindern (Noll & Schaub-Kuhnen, 2000). Aus diesem Grund wurde von der laborinternen Optimierung abgewichen und auf die klassische, in der Literatur beschriebene Methode der endogenen Peroxidase-Blockierung, dem Gemisch aus Wasserstoffperoxid und Methanol, zurückgegriffen. Hierdurch konnten akzeptable Ergebnisse mit einer deutlichen Hintergrundreduktion erzielt werden.

Die Verwendung des jeweiligen Antikörpers bedarf in der Diskussion klärender Anmerkungen. Für die Versuche wurden humane **polyklonale** Kallikrein-Antikörper eingesetzt, da spezifische **monoklonale** Antikörper nicht vorhanden waren. Polyklonalen Antikörpern sind allerdings auch verschiedene Vorteile inne. Einerseits werden mehrere (von verschiedenen B-Zellen im Tier gebildet) Antigen-Determinanten erkannt. Sie sind so weniger störanfällig, reagieren weniger stark auf pH-Wert-Schwankungen und sind billiger. Andererseits beinhalten sie auch Nachteile. So kann es aufgrund der Antikörper-Variabilität zu unerwünschten Reaktionen mit ähnlichen Antigen-Strukturen kommen. Zudem kann durch unerwünschte Serumproteine ein Hintergrund entstehen, dessen Abpufferung mit Normalserum (BSA), aber auch mit Milchpulver, häufig nicht möglich ist. Die Möglichkeit einen monoklonalen Antikörper zu nutzen bestand bei den hier durchgeführten Untersuchungen leider nicht.

Weitere Variationsmöglichkeiten zur Reduktion unerwünschter Hintergrundfärbungen bezogen sich auf die zeitliche **Ausdehnung der Waschzeiten**. Diese wurden ausreichend lange gewählt, um einen unnötig störenden Hintergrund zu vermeiden. Spezifische Bindungen waren zudem durch zu langes Waschen nicht lösbar. Vorteilhaft ist auch die hier verwendete Kombination von Tris in Kochsalzlösung [1:10]. Tris-Puffer bekommt durch den Zusatz von Kochsalz eine höhere Salzkonzentration, dadurch lassen sich unspezifische Bindungen und unerwünschte Hintergrundfärbungen effektiv reduzieren (Noll & Schaub-Kuhnen, 2000).

Dies trug zur Optimierung der in der vorliegenden Untersuchung dargestellten Forschungen bei.

Falsch negative und nur schwach positive Ergebnisse

Falsch negative Ergebnisse am humanen *Testis* stellten eine Herausforderung für die korrekte Lokalisierung des Kallikreins bzw. des Kallikrein-Kinin-Systems im männlichen Reproduktionstrakt dar. In den vorausgegangenen Kapiteln wurden bereits zugehörige Ursachen dargestellt.

Viele der im Zentrum für Dermatologie und Andrologie vorliegenden Präparate wiesen eine gestörte oder fehlende Spermatogenese mit teilweise ausgeprägten Gewebsveränderungen auf. Sie waren für Grundlagenforschung mit dem Schwerpunkt der Identifikation der Kallikrein-Lokalisation im männlichen Reproduktionstrakt entsprechend ungeeignet. Die **Verfügbarkeit geeigneten humanen Materials** gestaltete sich somit schwierig.

Eine solche basis- bzw. grundlagenorientierte Forschung war notwendig, um Kenntnisse über physiologische Verhältnisse zu erlangen. Erst im Weiteren war es möglich, davon pathologische Veränderungen abgrenzen und deuten zu können. Gerade dem Kallikrein-Kinin-System wird eine Beteiligung an Spermatogenese und Fertilität des Mannes zugeschrieben. Zwischen einem abnormen Auftreten, einem Mangel oder einem Fehlen testikulären Kallikreins (bzw. eines funktionell intakten Kallikrein-Kinin-Systems) und einer gestörten Fertilität, könnte eine Assoziation bestehen. Somit waren diese Präparate erst in weiterführenden Versuchsreihen, in denen eine Detektion pathologischer Veränderungen auf enzymatischer Ebene Ziel der Untersuchung war, sinnvoll einzusetzen. Aus diesem Grund wurde ein Teil der Proben aus einem Pathologischen und einem Rechtsmedizinischen Institut bezogen. Es handelte sich um gesunde Männer im reproduktiven Alter. Dieses Probenmaterial barg allerdings auch eine Problematik. Bei den Komponenten des KKS handelt es sich um Proteinbestandteile, die *post mortem* durch die kurze Latenzzeit von wenigen Stunden aufgrund autolytischer Veränderungen möglicherweise nur sehr begrenzt oder nicht mehr nachweisbar sind. Kinine unterliegen zudem einem effizienten Abbau mit einer biologischen Halbwertszeit von 30 Sekunden (Soubrier *et al.*, 1988). Ein Kallikrein-Nachweis Stunden bis Tage *post mortem* war daher unwahrscheinlich. Solches Gewebe war für die immunhistologische Forschung nur noch von eingeschränkter Beurteilbarkeit und deshalb von zweifelhaftem Wert.

Eine weitere Problematik lag in der Wahl der **Gewebsfixierung**. Testikuläres Gewebe ist ein ausgesprochen empfindliches Material. Während für die meisten Gewebeproben Methacarn

(eine aus Methanol, Eisessig und Chloroform bestehende Lösung) das Fixans der Wahl ist, so wird in der Literatur zur Fixierung von Hodengewebe, vor allem in Hinblick auf nachfolgende immunhistochemische Versuche, die Verwendung von Stieve-, Bouin- (ein Gemisch aus gesättigter wässriger Pikrinsäure, Formalin und Eisessig) oder Carnoy empfohlen. Die Versuchsergebnisse bestätigen die Vorteile der Bouin-Fixierung am humanen testikulären Gewebe.

Die histologischen Schnitte wurden von der zur Arbeitsgruppe gehörenden Medizinisch Technischen Assistentin angefertigt. Bei den Untersuchungen wurde vorwiegend Methacarn-fixiertes *Testis*gewebe verwendet. Es wurde auch auf vorhandene Bestände zurückgegriffen und Schwierigkeiten der Arbeitsgruppe bei der Verwendung anderer Fixiermedien in vorausgegangenen Versuchsreihen berücksichtigt. Zum Teil lagen erhebliche Gewebszerstörungen bzw. Artefakte vor. Gute Ergebnisse zeigten sich an Methacarn-fixierten Rattentestes und Bullenhoden.

Ein Aspekt der zu negativen Ergebnissen führen kann liegt in der Gewebsfixierung. So kann durch zu langes oder zu starkes Fixieren die Proteinstruktur zu stark vernetzt und damit die Epitope verdeckt werden. Typisch sind dafür z. B. die Aldehydvernetzungen bei Formalinfixierung. Für den Einsatz einiger Antikörper ist deshalb eine antigendemaskierende Vorbehandlung notwendig. Diese kann auf verschiedene Weise erfolgen. Die enzymatische Demaskierung, die in dieser Arbeit mit Proteinase K ihre Anwendung fand, erfolgte im Anschluss an die Entparaffinierung und Dehydratisierung. Eine dabei aufgetretene Fehlerquelle war, dass die Zellstruktur durch die proteolytische Aktivität, infolge einer zu langen Proteaseinkubationszeit, zerstört bzw. sehr stark geschädigt wurde. Auch der Verbesserungsvorschlag, mehrmaliges kurzes Abspülen mit frischem, eiskaltem Tris-Puffer, um die proteolytische Wirkung des Enzyms aufzuheben (nach Noll & Schaub-Kuhnen, 2000), zeigte sich in diesem Fall nur wenig effektiv. Sowohl enzymatische, als auch Hitze-Demaskierung kamen zum Einsatz, zeigten aber in den vorliegenden Versuchen keine weiterführenden Erkenntnisse.

Ein zu berücksichtigender Punkt war weiter, dass es sich bei den verwendeten Organanteilen um fixiertes Material und nicht um natives Gewebe (Kryoschnitte) handelte. Viele Oberflächenantigene werden jedoch durch Paraffineinbettung oder die Behandlung mit

quervernetzenden Fixativa zerstört und können nur in Gefrierschnitten lokalisiert werden (Bourne, 1997; Naish, 1997). Die Möglichkeit der Kryoschnitt-Technik bestand nicht.

Der Primärantikörper sollte so hoch wie möglich verdünnt werden, um zu hohe Proteinkonzentrationen zu vermeiden. Der Brücken-Antikörper bindet mit beiden Fab-Stücken an das Fc-Stück des Primärantikörpers. Bei zu hoher Konzentration des 1. Antikörpers hat der Brückenantikörper keine Bindungsstellen für weitere Komplexe frei und bedingt somit ein falsch negatives Ergebnis (Noll & Schaub-Kuhnen, 2000). Aus diesem Grund wurde der Primärantikörper in Konzentrationen zwischen 1: 10 und 1: 200 ausgetestet.

Weitere Optimierungsversuche:

In den Versuchsreihen zur Detektion der NEP 24.11 (ein in der Maus produzierter Antikörper) an humanen und bovinen *Testis* wurde für die Negativ-Kontrolle das untersuchte Gewebe mit Maus-Normalserum behandelt. Bei den anfänglichen Versuchen zeigten sich unbefriedigende Ergebnisse, da es durch unspezifische Antikörper im Maus-Normalserum zu ausgeprägten Färbereaktionen in der Negativ-Kontrolle gekommen war. Diese unterschieden sich deutlich von den spezifischen und reproduzierbaren Färbeergebnissen mit den Antikörpern gegen NEP, waren aber aus zuvor beschriebenem Grund ungeeignet für die weiteren Versuchsreihen. Statt des Maus-Normalserums wurde wahlweise auf Maus-anti-Kaninchen-Antikörper bzw. auf das pure Antikörper-Medium ausgewichen. Damit zeigten sich entsprechend negative Kontrollen.

4.3 Diskussion im thematischen Kontext

4.3.1 Ergebnisse an histologischen Schnitten des Reproduktionstraktes von Ratten

Die Präsenz der Serin-Protease Kallikrein wurde immunhistologisch zunächst an Rattentestes mit einem polyklonalen Antikörper gegen Gewebs-Kallikrein detektiert. Bei dem verwendeten Antikörper handelte es sich um einen monospezifischen, gegen aktives und inaktives Kallikrein gerichteten Antikörper aus Rattenurin, der in Kaninchen gewonnen worden ist. Dieser zeigt keine Kreuzreaktionen zu humanem Kallikrein.

In den Versuchen zeigte sich eine spezifische Färbung des Keimepithels an den runden und elongierten Spermatiden im Bereich der sich ausdifferenzierenden Akrosomenkappe. An den runden Spermatiden konnte Gewebs-Kallikrein in einer punktförmigen Struktur am *luminal* gerichteten Pol nachgewiesen werden, dieses entsprach der anatomischen Struktur der Akrosomanlage. Bei weiter in der Entwicklung fortgeschrittenen Spermatiden zeigte sich nach der Rotation der Keimzellen, die sich am basalen Pol ausdifferenzierende Akrosomenkappe, zunächst noch punktförmig, später als schmaler, den Spermatidenkopf überziehender Saum. Spermatogonien und Spermatozyten sowie die Spermatozoen im *Tubulus*lumen zeigten keine Kallikrein-Expression, ebenso stellten sich Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und *Peritubulär*-Zellen negativ dar.

Neben den Versuchen an adulten Ratten (158, 90 und 53 Tage) wurde zum Vergleich der Kallikrein-Nachweis auch bei pubertierenden Ratten geführt. Bei den 32 Tage alten Ratten befindet sich der erste Zyklus der Spermatogenese in der Entwicklungsstufe 9 - 10 (Abb. 5). Das Gewebs-Kallikrein ließ sich deutlich an den runden Spermatiden sowie in der sich ausdifferenzierenden Akrosomenkappe an den beginnend elongierenden Spermatiden (Entwicklungsstufe 10) nachweisen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Kallikrein-Nachweise am adulten Rattentestis verhielten sich analog zu den zuvor in der eigenen Arbeitsgruppe erhaltenen vorläufigen Resultaten (Monsees *et al.*, 1996 c; 1999; 2003).

Ergänzend zu den eigenen Ergebnissen wird an dieser Stelle auf die Resultate vorangegangener Versuchsreihen der eigenen Arbeitsgruppe verwiesen. Dabei wurde der Fokus auf die Präsenz bzw. das Neuauftreten der Protease Kallikrein unter dem Aspekt der sexuellen Maturation gerichtet. So wurde der Kallikrein-Nachweis an Hodengewebe

verschiedener Altersstufen geführt, neben den adulten Ratten (53, 90, 158 Tage) wurden die Versuche am testikulären Gewebe von 38, 32, 28, 18 und 4 Tage alten Ratten durchgeführt. An *Testisschnitten* der spätpubertären Ratten mit einem Alter von 38 Tagen entsprachen die am weitesten in der Entwicklung fortgeschrittenen Keimzellen der Stufe 17 (Abb. 5: Stadien der Spermatogenese bei der Ratte): Der erste Zyklus der Spermatogenese ist fast am Ende, aber noch kein Nachweis von Spermatozoen im Lumen. Die Kallikrein-Expression konnte hier an runden und elongierten Spermatiden nachgewiesen werden, membranassoziiert in der sich entwickelnden Akrosomenkappe. Die Resultate waren ähnlich den Ergebnissen am adulten Rattenhoden mit der Ausnahme, dass sich in dieser Alterstufe noch keine Spermatozoen im Lumen der *Tubuli seminiferi* nachweisen ließen. Bei den 32 Tage alten Ratten zeigten sich identische Ergebnisse, wie in den eigenen Ergebnissen (siehe oben) beschrieben. Bei den 28 Tage alten, frühpubertären Ratten zeigten sich vereinzelt runde Spermatiden (Entwicklungsstufe 4-8). Ein erster Kallikrein-Nachweis war an dieser Stelle möglich. In präpubertären Entwicklungsstufen jüngerer, 18 und 4 Tage alter Ratten konnte, kein Kallikrein-Nachweis im Keimepithel geführt werden (Blöcher *et al.*, 2000).

Die Ergebnisse belegen das Vorliegen einer stadienspezifischen Kallikrein-Expression, die sowohl an adulten als auch an pubertierenden Rattenhoden nachvollzogen wurde. Kallikrein scheint nach Untersuchungen von Rohen & Stuttmann (1977), Saitoh *et al.* (1988), Schill *et al.* (1988) sowie Schill & Miska (1992) (siehe S. 36/37), an spezifischen Entwicklungsprozessen in der Spermatogenese beteiligt zu sein, vor allem bei den runden und elongierten Spermatiden. Damit ist auch die von Schill & Miska (1992) beschriebene wesentliche Einflussnahme des Gewebs-Kallikreins auf die parakrine Regulation der Spermatogenese in Einklang zu bringen.

Die Abhängigkeit bzw. der enge Zusammenhang zur sexuellen Maturation wird auch in Verbindung mit den Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe deutlich. Es bleibt allerdings spekulativ, ob das Kallikrein auch eine Funktion als Liberationsenzym bei der Ablösung von reifen Spermatiden aus dem Keimzellverband, d.h. von den Sertoli-Zellen, hat. In diesem Sinne lässt sich die deutliche Kallikrein-Expression an der Akrosomenkappe der Spermatiden *prä liberationem* nur als ein diese Annahme klar stützendes Argument auffassen, während bei den frei im Lumen befindlichen Spermatozoen kein Kallikrein-Nachweis mehr erbracht werden konnte. Zudem konnte an den Bouin-fixierten humanen *Testisschnitten* eine

Kallikrein-Expression im Bereich der Anhaftungsebene der Spermatiden an den Sertoli-Zellen detektiert werden (Abb. 25 A-D).

Als externe Positiv-Kontrolle diente Methacarn-fixierte Rattenniere. Kallikrein wurde membranassoziiert, *luminal* an den *Tubulusepithelien* der Mittelstücke und zytoplasmatisch in den Mesangienzellen der Glomerula nachgewiesen.

In der Literatur wurde in der Rattenniere eine KLK1-Expression in den *luminalen* Zellen der distalen (convolutet) Tubuli detektiert. Mittels Elektronenmikroskop konnte immunoreaktives Gewebs-Kallikrein an der *apikalen* bzw. *luminalen* und *basolateralen* Membran der *kortikalen distalen Tubuluszellen* nachgewiesen werden. Eine Einflussnahme des Kallikreins kann durch Sekretion nach *luminal* in den Urin und nach *basolateral* mit Wirkung auf das renal-vaskuläre System erfolgen (Figuroa *et al.*, 1984).

Ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt lag auf dem lokalen Kallikrein-Nachweis in den histoanatomischen Strukturen im Nebenhoden der Ratte, jeweils unter Berücksichtigung der organotopographischen Verhältnisse. An adulten, 53, 90 und 158 Tage alten Ratten zeigte sich der immunhistochemische Nachweis von Kallikrein im Nebenhoden spezifisch und reproduzierbar in bestimmten Regionen des *Ductus epididymis*. In den *Ductuli efferentes*, die den *Caput epididymidis* bilden, war eine Kallikrein-Expression nicht nachweisbar.

Im *Ductus epididymidis* von *Corpus* und *Cauda epididymidis* konnte dagegen zweifelsfrei und reproduzierbar Gewebs-Kallikrein nachgewiesen werden. In den Epithelzellen des Nebenhodenganges präsentierte sich vor allem im basalen Zellbereich, basal des *Nukleolus*, eine spezifische zytoplasmatische Färbung, diese war aber auch im *apikalen* Epithelzellanteil nachweisbar. Die Expression der Protease war in Form einer intermittierenden, nicht zirkulär verlaufenden, multizentrischen Braunfärbung nur in einzelnen Zellen des entsprechenden Ganganschnittes zu detektieren. Diese stellte sich in den angrenzenden bzw. umgebenden *Ductuli* ebenfalls nur fokal und kleinherdig dar. Die Zellkuppen wiesen bevorzugt im Bereich des *Corpus epididymis* vesikuläre, zytoplasmatisch deutlich Kallikrein-positive Zellabschnürungen auf. Diese waren als Zeichen der funktionellen Tätigkeit des Nebenhodenepithels im Sinne von Synthese und Sekretion zu werten. Die im Lumen befindlichen Spermatozoen zeigten keine spezifische Färbung.

In der Literatur beschrieb Saitoh *et al.* (1987) am humanen Nebenhoden die Präsenz von Kallikrein im Bereich von *Corpus* und *Cauda epididymidis*. Ein Kallikrein-Nachweis im

Nebenhodenkopf gelang danach nicht. Somit kristallisieren sich analoge Ergebnisse der Kallikrein-Expression im Nebenhoden von Ratte (im Rahmen dieser Arbeit erzielte Ergebnisse) und Mensch (Saitoh, 1987) heraus. Die fehlende Kallikrein-Expression im *Caput epididymis* der Ratte, die zuvor in der Literatur von Saitoh (1987) beim Mann beschrieben wurde, scheint darauf zurückzuführen, dass die Kallikrein-Sekretion in den distalen Nebenhodensegmenten stattfindet. Über 90% der testikulären Flüssigkeit werden in den *Ductuli efferentes* des *Caput epididymis* resorbiert. Dieses konnte sowohl beim Bullen und Eber (Carbo, 1965), als auch bei der Ratte (Turner, 1984) herausgestellt werden. In früheren Untersuchungen ließ sich eine unspezifische resorptive Aktivität im *Caput epididymis* und eine selektive Resorption im initialen Segment sowie im distalen *Cauda epididymis* beweisen (Nicander & Ploen, 1979). Durch die resorptive Aktivität wird die Zusammensetzung der Komponenten im *Ductuslumen* beeinflusst. Die Konzentration an Spermatozoen und wichtigen sezernierten Komponenten steigt an (Turner, 1984; Setchell & Hinton, 1981).

Die Maturation der Spermatozoen während der Nebenhodenpassage ist abhängig von der sequentiellen Interaktion mit Nebenhodensekreten, die in den verschiedenen Regionen akkumulieren, z.B. Carnitin im *Caput*, vor allem Glycerophosphorylcholin im *Corpus* und Glucosidase in der *Cauda* des Nebenhodens (Cooper *et al.*, 1988). Der im Rahmen dieser Arbeit erbrachte Kallikrein-Nachweis im Epithel von *Corpus* und *Cauda epididymis* steht im Einklang mit den Forschungsergebnissen von Blasini *et al.* (1980). Dieser hat bei Ratten nach systemischer Kallikreingabe eine Anreicherung der Protease im Epithel des *Ductus epididymis* beschrieben, nicht aber im Hodengewebe selbst. Somit scheint das Kallikrein seine besondere Wirkung auf den *posttubulären* Bereich und damit eine zentrale Rolle in der Spermatozoenreifung zu übernehmen. Kallikrein kann *in vivo* wie auch *in vitro* die Spermienmotilität fördern (Schirren *et al.*, 1974; Schroeder-Finckh *et al.*, 1986; Sato & Schill, 1987; Sato, 1980; Miska & Schill, 1990; Mueller *et al.*, 1991). Im Umkehrschluss gehen Motilitätsstörungen der Spermatozoen häufig auf Reifungsstörungen im Nebenhoden zurück.

In klinischen Studien zur Wirksamkeit der systemischen Kallikrein-Therapie wurden konträre Ergebnisse erzielt. So konnten mehrere Forschungsgruppen einen Anstieg der Spermatozoenmotilität und -zahl, sowie eine Steigerung der morphologisch normalen Spermatozoen nachweisen (Hofmann, 1975; Schill, 1979; Izzo *et al.*, 1984; Micic, 1985; Berzin *et al.*, 1987; Schill & Miska, 1992), während Glezerman *et al.* (1993) und Keck *et al.* (1994) in neueren *in vivo*-Studien keinen signifikanten therapeutischen Effekt im humanen

System aufzeigen konnten. Kritisch wurde das hohe Molekulargewicht von oral verabreichtem Kallikrein (42 kDa) gesehen, da die Überwindung der Blut-Hoden-Schranke kaum möglich und die Beeinflussung der Spermatogenese dementsprechend gering sei (Miska & Schill, 1991). Auf der Ebene des Nebenhodens ist ein selektiver Stofftransport durch die *Tight junctions* und somit eine Beeinflussung der Spermatozoendifferenzierung denkbar. Wie zuvor beschrieben, ist eine Einflussnahme des Gewebs-Kallikreins auf die Spermatozoen in *Caput* und *Cauda epididymis* am wahrscheinlichsten, so dass die systemische Kallikrein-Therapie bei entsprechender Indikation (Ausreifungsstörungen der Spermatozoen) sinnvoll erscheint. Eine Variation der Dosierung könnte zu einem signifikanteren Ergebnis führen. So wurden in Studien über die Kallikreinwirkung auf das kardiale System Tagesdosen von 4500 IU eingesetzt, um eine Wirkung zu erzielen (Hoffmann, 1990). Im Vergleich dazu waren die Dosen in Studien am reproduktiven System mit 600 IU sehr gering.

Das sehr inkonstante und unregelmäßige Vorkommen der Kallikrein-Expression im Nebenhodengang lässt sich am ehesten im Sinne eines divergierenden Aktivitätsniveaus der Epithelzellen in den einzelnen *Tubulus*abschnitten erklären. Zudem muss eine apokrine Sekretion des Kallikreins mit Bildung der Protease in basalen Zellanteilen, Verlagerung in *apikale* Zellabschnitte und schließlich Abgabe kallikreinhaltiger, zytoplasmatischer Abschnürungen in das *Tubulus*lumen diskutiert werden. Durch die apokrine Sekretion von Kallikrein könnte sowohl indirekt als auch direkt eine Einflussnahme auf die Ausreifung der Spermatozoen im *Tubulus*lumen erzielt werden. In diesen Kontext fügen sich am ehesten auch die eigenen Ergebnisse am *Ductus deferens* in Form vesikulärer Kallikrein-positiver Abschnürungen an den *apikalen* Endothelzellen ein. Ein solcher Proteintransport mit anschließender Sekretion durch zytoplasmatische Abschnürung im Bereich von Nebenhoden und *Ductus deferens* ist ein durchaus geläufiger Prozess (Holstein, 1994).

Es gibt zahlreiche zytologische Hinweise auf die Stoffwechselaktivität des Nebenhodenepithels, vor allem im proximalen Anteil des *Ductus epididymis*, die bevorzugt auf die Ausreifung der Spermatozoen ausgerichtet sind (Holstein, 1994). Zudem zeigen Forschungsergebnisse, dass die testikulären Spermatozoen nur in geringem Maße befruchtungsfähig bzw. infertil sind (Cooper & Orgebin-Crist, 1975). Während der Nebenhodenpassage durchlaufen die Spermatozoen einen Reifungsprozess, sowohl auf morphologischer, biochemischer als auch auf physiologischer Ebene. Hierzu gehören z. B. die Aquirierung der Motilität und das Ausreifen des Bewegungsmusters. Durch

Membranveränderungen der Spermatozoen werden die Voraussetzungen für die Fertilisation durch die Interaktion des Spermiums mit der Eizelle und einer zeitlich angepassten Akrosomenreaktion gewährleistet sowie eine Hyperaktivität, die zu einer vorzeitigen Kapazitation führen würde, verhindert (Weinbauer *et al.*, 2000). So wurde auf der Ebene des *Epididymis* das Überziehen der Spermatozoenzellmembran mit Glycopolysacchariden (Holstein, 1994) und die Einlagerung von Phospholipiden in die Plasmamembran (Cooper & Yeung, 2000) beschrieben. Letztendlich ist jedoch bis heute die Auswirkung der Nebenhodenpassage auf die Spermienreifung nicht vollständig geklärt. Unbestritten bleibt jedoch die Speicherfunktion des *Epididymis* (Holstein, 1994).

In den *periductulären Myozyten* von *Corpus* und *Cauda epididymis* der erwachsenen Ratte sowie in der muskulären Wandung des miterfassten *Ductus deferens*, zeigte sich eine reproduzierbare, intensive Braunfärbung, die sich in der Negativ-Kontrolle nicht darstellen ließ. Somit ließ sich auch in diesem Bereich ein spezifischer Kallikrein-Nachweis führen. Aber auch in den zirkulär verlaufenden Muskelzügen der Gefäßwände konnte die Präsenz der Protease Kallikrein deutlich nachgewiesen werden. Diese Resultate entsprechen den Beobachtungen verschiedener Forschungsgruppen, denen der Nachweis der enzymatischen Aktivität des t-KKS u. a. in den Gefäßmuskelzellen von Ratte und Mensch gelang. Saed *et al.* (1990) konnte mittels Slot-blot-Analyse Kallikrein in Arterien und Venen der Ratte sowie die mRNA der Protease in der glatten Gefäßmuskulatur nachweisen. Wolf *et al.* (1999) konnten in einer umfassenden Studie Kallikrein mittels Immunhistologie in den Gefäßendothelien, sowie in den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen darstellen. Mittels spezifischer Farbreagenzien im Immunostaining konnten sie einen deutlichen Nachweis der Protease in den Endothelien erbringen, und durch *in situ*-Hybridisierung die mRNA dieser Protease in Endothelzellen und glatten Muskelzellen von normalen Gefäßen detektieren. Weiterhin gelang der Kallikrein-Nachweis mittels Immunoassay im Homogenat größerer Arterien und Venen sowie mit RT-PCR und der Southern blot-Methode in humanen Gefäßen (Wolf *et al.*, 1999). Abweichend von diesen Ergebnissen konnte in den eigenen Versuchen kein Kallikrein-Nachweis in den Gefäßendothelien erbracht werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Endothelzellen sehr empfindlich sind und in den vorliegenden Schnitten nur noch fraglich intakt bzw. unversehrt waren.

Entsprechende Untersuchungen zum immunhistochemischen Nachweis von Kallikrein in den adulten Tieren (53, 90, 158 Tage) wurden parallel am Hoden und Nebenhoden pubertierender

Ratten im Alter von 32 und 38 Tagen unternommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden im Vergleich der pubertierenden mit den adulten Ratten ausgewertet. Bei den spätpubertären Ratten im Alter von 38 Tagen mit annähernd ausgereiften Spermatozoen kurz vor der Spermiation, welche die maximale Reife der Spermatogenese der Stufe 17 zeigten, stellte sich ein deutlicher Nachweis von Kallikrein ein. Analog zu den Resultaten am adulten Nebenhoden waren auch die Ergebnisse am *Epididymis* der spätpubertären Ratte. Im Bereich des *Caput epididymis* konnte keine Kallikrein-Expression detektiert werden. Im *Ductus epididymidis* von *Corpus* und *Cauda epididymis* konnte die Protease als fokal vorkommend in den Epithelzellen des Nebenhodenganges nachgewiesen werden. Identisch zu den Erkenntnissen im Nebenhoden adulter Ratten präsentierte sich eine deutliche Kallikrein-Expression in den Vesikeln, *apikal* an den Epithelzellkuppen.

Am Nebenhoden der 32 Tage alten Ratte konnte weder in den *Ductuli efferentes* des *Caput epididymis* noch im *Ductus epididymis* von Nebenhodenkörper und –schwanz ein Kallikrein-Nachweis erbracht werden. Das Hodengewebe der entsprechenden Altersstufe zeigte dagegen eine deutliche und spezifische Kallikrein-positive Reaktion im Bereich der runden und beginnend elongierenden Spermatozoen und diente somit als Positiv-Kontrolle. Abgesehen von der zunehmenden Schwierigkeit der makroskopischen Differenzierung konnte am Nebenhodengewebe der 32 Tage alten Ratte noch kein eindeutiger Kallikrein-Nachweis erbracht werden. Ein Fehlen der Protease in dieser Altersstufe ist insofern gut nachvollziehbar, da bei den 32 Tage alten Ratten mit noch fehlenden Spermatozoen im *Tubuluslumen* und einer maximalen Keimzellreifung auf der Entwicklungsstufe 9 – 10, das Epithel im Nebenhoden noch weitgehend im Ruhezustand ist.

Problematisch bei den Versuchsreihen an pubertierenden Ratten war die dezente Braunfärbung im Bereich der *periductulären Myozyten* des Nebenhodens. Diese Färbung verhielt sich in der Positiv- wie Negativ-Kontrolle gleich und konnte somit nicht als spezifische Färbung gewertet werden, während die *periductulären* Muskelzellen bei adulten Ratten einen eindeutig positiven Kallikrein-Nachweis zeigten.

Am Hodengewebe ist ein fokaler Kallikrein-Nachweis noch an 28 Tage alten Ratten im Bereich der ersten runden Spermatozoen gelungen (Monsees *et al.*, 2003).

Versuche am Nebenhodengewebe präpubertärer Ratten erfolgten in der vorliegenden Promotionsarbeit nicht, da bereits ab dem Alter von 32 Tagen kein Kallikrein-Nachweis im Nebenhoden mehr zu erbringen ist.

Die gewonnenen Erkenntnisse sind aufgrund der nachweisbaren Altersabhängigkeit der Kallikrein-Expression in den männlichen Reproduktionsorganen vor allem während der Pubertät hinsichtlich des Beitrags des Kallikreins auf die Anzahl und Funktionsfähigkeit der Spermien für die Reproduktion von Interesse. Clements *et al.* (1990) beschrieben in Abhängigkeit von dem untersuchten Organ mit der veränderten Sexualhormonkonzentrationen in der Pubertät eine Einflussnahme des Alters auf die Expression der mRNA des Gewebs-Kallikreins. So konnte diese Arbeitsgruppe das Auftreten des „wahren“ Gewebs-Kallikreins geschlechtsunabhängig in der Niere und der Submandibulardrüse *neonataler* Ratten detektieren. Im Hypophysenvorderlappen der weiblichen Ratte konnte der Kallikrein-Nachweis erst nach Eintritt der Pubertät erbracht werden. Er reflektiert die Östrogenabhängigkeit der Kallikrein-Expression in diesem Gewebe. Clements *et al.* (1992) wiesen mittels RT-PCR und *in situ* Hybridisierung die Expression von Gewebs-Kallikrein (rKLK1) bzw. der Protease verwandte Gene (rKLK 3, rKLK 8, rKLK 9, rKLK 12) in den Keimzellen der Ratte nach. Der rKLK1-Nachweis im *Testis* gelang erst an pubertären Ratten und zeigte eine gesteigerte Expression des Kallikrein-Gens bei zunehmender sexueller Reifung (ca. 80-100 Tage) (Clements *et al.*, 1992). Die Expression des eigentlichen KLK1-Gens ist nicht androgenabhängig, während die dem testikulären KLK1 ähnlichen Gene eine Androgenabhängigkeit zeigten (Clements, 1989; Clements *et al.*, 1992). Diese Resultate am Rattentestis weisen Parallelen zu den eigenen Ergebnissen am Rattennebenhoden auf. Auch hier konnte mit zunehmender sexueller Reife ein intensiverer histologischer Kallikrein-Nachweis im *Ductus epididymis* geführt werden.

MacDonald *et al.* (1996) wiesen mittels spezifischer Gen-Sonden und der RT-PCR bzw. Southern Blot das „wahre“ Gewebs-Kallikrein codierende Gen in *Testis* und Prostata der Ratte nach und entsprachen damit teilweise den erwähnten Ergebnissen von Clements *et al.*, 1992.

Bascands *et al.* (1996) konnten an Rattennieren einen stetigen Aktivitätsanstieg des Gewebs-Kallikreins von der Geburt bis etwa zur 12. Lebenswoche aufzeigen. Bei älteren Tieren waren die gemessenen renalen Kallikrein-Mengen abnehmend. Somit scheint Kallikrein einen wesentlichen Einfluss auf die *postnatale* Entwicklung der Niere auszuüben. Ein analoges Resultat konnte in eigenen Versuchen am Hoden der 158 Tage alten Ratte erzielt werden,

auch hier zeigte sich die Kallikrein-Expression im Vergleich zur 90 Tage alten Ratte rückläufig. In wieweit dies ein Zufallsbefund ist oder die Erkenntnisse von Bascands *et al.* weiter untermauert, lässt sich bei Verwendung von nur einem Versuchstier nicht abschließend klären.

Die bisher besprochenen Ergebnisse dieser Untersuchung lassen die berechnete Einschätzung zu, dass weitere wissenschaftliche Versuche mit verschiedenen Antikörpern aus der KKS-Kaskade wie z. B. dem LMW-Kininogen sehr aussichtsreich sind und einen strukturell abgerundeteren Einblick sowohl an humanem, als auch bovinem Gewebe eröffnen würden. Die Verfügbarkeit solcher Ratten-Antikörper könnte aussichtsreiche Impulse für weitere Forschung geben. Die eigene Herstellung entsprechender Antikörper trüge ebenfalls zur Lösung der aufgeworfenen Problematik bei.

4.3.2 Ergebnisse an histologischen Schnitten der humanen Spezies

Parallel zu den Forschungsaktivitäten am Rattenhoden erfolgten vergleichende Versuche am humanen *Testis*. Die Versuche wurden bis auf ein Bouin-fixiertes Hodengewebspräparat an Methacarn-fixierten *Testes* vorgenommen.

Am humanen Gewebe kam ein polyklonaler, gegen **humanes Gewebs-Kallikrein** gerichteter Primärantikörper, der in Kaninchen gewonnen wurde, zum Einsatz. Sowohl die HRP- als auch die PAP-Methode wurden angewandt. Die Blockierung erfolgte wahlweise mit Milchpulver oder BSA-c. Verwandt wurden die unter ‚Material & Methoden‘ beschriebene Versuchsschema, der bereits beschriebene Antikörper gegen Gewebs-Kallikrein und das vorliegende humane testikuläre Gewebe. Ein zweifelsfreier Kallikrein-Nachweis gelang nicht.

An den Methacarn-fixierten Hodenschnitten zeigte sich insgesamt ein homogener Hintergrund. Zwischen der Positiv-Probe und Negativ-Kontrolle bestand eine weitgehende Übereinstimmung mit nur minimalen Abweichungen, die nicht als spezifische Färbung im Sinne eines Nachweises des Gewebs-Kallikreins gewertet werden konnten.

Am Bouin-fixierten Hodengewebe konnte reproduzierbar eine als Kallikrein-Expression zu wertende Farbreaktion im *luminalen* Keimepithel detektiert werden. Ein spezifischer Nachweis gelang jedoch nicht zweifelsfrei. In den *Tubuli seminiferi contorti* zeigte sich im

Bereich der Anhaftungsebene der Spermatiden an den Sertoli-Zellen eine positive Farbreaktion. Fokal wies die sich entwickelnde Akrosomenkappe der runden Spermatiden ein dezent stärkeres Färbesignal auf. Das übrige Keimepithel sowie das *Interstitium* zeigten z. T. eine weniger intensive, diffuse Hintergrundfärbung. Jedoch wurde auch bei einem Teil der Negativ-Kontrollen an beschriebener Lokalisation eine, wenngleich auch weniger intensive, Färbereaktion deutlich. Fraglich ist vor allem die Spezifität der an dieser Stelle beobachteten Farbreaktion beim Kallikrein-Nachweis, die sich am Bouin-fixierten Hoden im Bereich der Kontaktstelle zwischen Sertoli-Zelle und Spermatide zeigte.

Bei dem vorliegenden Ergebnis handelt es sich wahrscheinlich um eine schwache, aber dennoch spezifische Kallikrein-Expression, am vorliegenden Material aber nicht eindeutig beweisend.

Von großem Interesse sind diesbezüglich auch die Untersuchungen von Saitoh *et al.* (1987), der die Lokalisation von Gewebs-Kallikrein im humanen männlichen Genitaltrakt immunhistologisch untersucht hat. Er beschrieb den Nachweis von Kallikrein in den Sertoli-Zellen des *Testis* sowie in den Epithelzellen von *Corpus* und *Cauda epididymidis*, und in den Drüsenzellen der Prostata mit einem monoklonalen Kallikrein-Antikörper aus humanem Urin und der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode. Eine fehlende Nachweisreaktion wurde in den Keimzellen, den Leydig-Zellen, dem *Caput epididymidis*, der Samenblase und dem *Vas deferens* beschrieben. Mit dem Nachweis von Kallikrein in den Sertoli-Zellen stützte er seine These von der direkten Einflussnahme endogenen Kallikreins auf den Prozess der Spermatogenese. Diese wurde zudem von seinen Testergebnissen mit systemischer Kallikreingabe an Ratten untermauert, die zu einer deutlichen Zunahme der Sertoli-Zellzahl sowie zu einer Aktivierung der Sertoli-Zell-Funktion mit einer Beschleunigung der Spermatogenese um ein bis zwei Tage im Vergleich zur unbehandelten Ratte führte (Saitoh *et al.*, 1987). Weiterhin stellte Saitoh eine aktive Kallikreinsekretion von *Epididymis* und Prostata zur Diskussion (Saitoh *et al.*, 1987).

Konträr zu den Ergebnissen von Saitoh *et al.* (1987) stellten sich die eigenen Ergebnisse am humanen Hodengewebe und am Rattentestis sowie die der eigenen Arbeitsgruppe (Monsees *et al.*, 1999; 2003) dar, die bislang den immunhistochemischen Gewebs-Kallikrein-Nachweis am Rattenhoden erbracht hat. So zeigte sich die Protease im Keimepithel an den runden und elongierten Spermatiden, eine Kallikrein-positive Reaktion in den Sertoli-Zellen aber konnte nicht erbracht werden.

In der Literatur beschrieb Saitoh *et al.* (1987) die Kallikrein-Expression am humanen *Testis* im Bereich der Sertoli-Zellen, während sich die Spermatozoen negativ darstellten. Ähnlich, aber von fraglicher Spezifität, waren die eigenen Resultate am Bouin-fixierten Hoden. Hier zeigte sich eine Färbereaktion an der Anhaftungsebene der Spermatozoen an der Sertoli-Zelle. Identisch zu den Ergebnissen von Saitoh stellten auch die eigenen Resultate eine fehlende Kallikrein-Expression im Bereich von Spermatozoen, Spermatozoen und Leydig-Zellen fest.

In der Gesamtschau blieb das in dieser Arbeit erbrachte Ergebnis des Kallikrein-Nachweises im humanen *Testis* doch eher fraglich, zumal in den eigenen Versuchen, die parallel an den Spezies Ratte und Bulle verliefen, Gewebs-Kallikrein zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Dort zeigte sich ein positives Ergebnis mit einem spezifischen und reproduzierbaren Farbsignal, das einer stadienspezifischen Kallikrein-Expression innerhalb des Keimepithels entsprach, die Sertoli-Zellen aber nicht betraf.

Weiterhin war auffällig, dass der Kallikrein-Antikörper am humanen *Testis* keine Kallikrein-Expression im Bereich der *Myozyten* der Gefäßwand detektierte, die sowohl in den eigenen Versuchen an bovinen Hoden mit demselben humanen Antikörper und bei der Ratte mit dem rattenspezifischen Antikörper nachzuweisen waren. Auch in der Literatur wurde der Kallikrein-Nachweis in Gefäßmuskelzellen und teilweise im Gefäßendothel von humanen Arterien und Venen nachgewiesen (Saed *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 1990). In diesem Rahmen wäre die Verwendung eines weiteren, gegen humanes Gewebs-Kallikrein gerichteten Antikörpers, von größerer Bedeutung gewesen, jedoch war ein entsprechender Antikörper nicht erhältlich.

In der humanen Methacarn-fixierten Niere, die als Positiv-Kontrolle diente, konnte der Kallikrein-Nachweis im Bereich der Mittelstücke des Nierentubulussystems, der Mesangienzellen der Glomerula sowie der muskulären Gefäßwandung erbracht werden. Dies entsprach den eigenen Ergebnissen, die bereits an der Rattenniere gewonnen wurden. Allerdings zeigte sich am humanen Gewebe nur eine sehr schwache Farbreaktion. Auch dieses Ergebnis unterstreicht die Notwendigkeit der Verwendung eines anderen humanen Kallikrein-Antikörpers. In der Literatur wurde der Nachweis von Kallikrein in der humanen Niere mit immunoreaktiven Gewebs-Kallikrein aufgezeigt, dieser war beschränkt auf einzelne Zellen der Verbindungstübli (Figuroa *et al.*, 1988). Eine Expression der m-RNA des

Gewebs-Kallikreins wurde im Bereich der distalen Tubuli, der Sammelrohre, der Henle-Schleife und in geringerer Ausprägung in den Juxtaglomerularzellen beschrieben (Chen *et al.*, 1995).

Im Fokus dieser Arbeit standen am humanen System neben dem Nachweis des „wahren“ Gewebs-Kallikreins auch die Detektion weiterer Reaktionsschritte der KKS-Enzymkaskade mittels immunhistologischer Untersuchungen, um funktionelle Abläufe in begrenztem Maße zu visualisieren bzw. besser verständlich in Bezug auf ihre topographischen Abläufe machen zu können. So wurde in weiteren Versuchen das LMW-Kininogen als Substrat für das Kallikrein und die Neutrale Metalloendopeptidase (mit dem AK CALLA, der beim Menschen identisch mit NEP 24.11 ist) als Kininase detektiert.

Zum Nachweis von **Low-Molecular-Weight-Kininogen** im männlichen Reproduktionstrakt wurde mit dem Anti-Serum gegen humanes LMW-Kininogen (Kaninchen als Wirt) gearbeitet. Dieses zeigte nur minimale Reaktionen mit anderen humanen Serumproteinen, jedoch in 20 % der Fälle Kreuzreaktionen mit HMW-Kininogen. Es wurde die HRP- und PAP-Methode angewandt. Dabei ergaben sich keine divergierenden Resultate in den Versuchen.

An dem Bouin-fixierten humanen Hoden präsentierte sich reproduzierbar eine intensive homogene Färbung des *interstitiellen* Gewebes, sowie in den *Tubuli* eine weniger starke, dennoch spezifische Färbung der runden und elongierten Spermatozoen im Bereich der sich ausbildenden Akrosomenkappe.

Am Methacarn-fixierten Hoden konnte an identischer Lokalisation im Vergleich zu den Bouin-fixierten Proben eine ähnliche Farbreaktion detektiert werden. Zusätzlich stellten sich hier auch die *Peritubulär*-Zellen gefärbt dar, was bei starker Gewebszerfaserung eher als Färbeartefakt zu werten ist. Bei der erwähnten, stark ausgeprägten Inkohärenz des Methacarn-fixierten Gewebes kann den Ergebnissen am Bouin-fixierten Hoden eine wesentlich stärkere Aussagekraft beigemessen werden. Ebenso wie bei den Versuchen bzgl. des Gewebs-Kallikreins an Ratte und Bulle zeigte auch das LMW-Kininogen beim Menschen eine stadienspezifische Expression. Zusätzlich stellte sich das *Interstitium* intensiv LMW-Kininogen-positiv dar.

In der Literatur wird das Vorkommen von LMW-Kininogen im Plasma, in der Niere, in den Parenchymzellen der Leber und in den Azinus- und Granularzellen der submandibularen

Speicheldrüsen beschrieben (Müller-Esterl *et al.*, 1986; Chao *et al.*, 1988; Takano *et al.*, 1997). LMW-Kininogen wird zusätzlich noch in Nebenniere, Gehirn, Rückenmark, Hoden, Lunge, Herz und Haut exprimiert (Margolius, 1996).

Die **Neutrale Metalloendopeptidase (NEP) 24.11**, auch Enkephalinase genannt, ist nach mRNA-Sequenz-Analyse identisch mit dem human common acute lymphoblastic leukaemia antigen (**CALLA**, Clone J5) (Letarte *et al.*, 1988) und wird daher bevorzugt zur Lokalisierung von NEP in Mensch und Ratte verwendet. Mit dem monoklonalen, aus Mausserum gewonnenen Antikörper gegen human common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA, Clon J5), sollte mittels HRP, PAP- und En-Vision™-Methode die Lokalisation des Enzyms im humanen männlichen Genitaltrakt detektiert werden.

Eine spezifische und reproduzierbare Färbung zeigte sich mit dem NEP 24.11-Antikörper im *Testis* an einzelnen Zellen in den *Tubuli seminiferi contorti*, in der Wandung von Gefäßen sowie im *interstitiellen* Bindegewebe. Wahrscheinlich handelte es sich hier um Zellen des retikulohistiozytären Systems, am ehesten Makrophagen. Es ließen sich jedoch keine eindeutigen testikulären Strukturen als positiv detektieren. In der Literatur wurde das Antigen, an dem der Antikörper CALLA bindet, an einigen normalen Granulozyten und einer geringen Anzahl normaler Knochenmarkszellen, an Myoepithelzellen der Brust, Tumorzellen und Geweben außerhalb des Reproduktionstraktes gefunden (Ritz *et al.*, 1981, Cossmann *et al.*, 1983). Monsees *et al.* wiesen biochemisch das Vorkommen von NEP-Aktivitäten an der Oberflächenmembran von Sertoli-Zellen (1996 a) nach. Schill & Miska beschrieben die Präsenz von NEP im Seminalplasma und verwiesen auf die Produktion im Nebenhoden und in der Prostata (1992).

4.3.3 Ergebnisse an histologischen Schnitten des bovinen Testis

Anhand von bovinen Methacarn-fixierten Testisschnitten wurden die Kreuzreaktivität mit dem Antikörper gegen **Ratten-Kallikrein** getestet. Dabei wurde der Kallikrein-Antikörper, wie oben beschrieben, als Primärantikörper eingesetzt. Eine spezifische Färbung war in dieser Versuchsreihe nicht zu detektieren, lediglich eine unspezifische Hintergrundreaktion, so dass hier von einer fehlenden Kreuzreaktion zwischen bovinem Gewebe und Ratten-AK auszugehen ist.

Im Weiteren wurde die Kreuzreaktivität des **humanen Kallikrein-Antikörpers** mit dem bovinen Gewebe getestet. Histologische Schnitte von Methacarn-fixiertem Bullenhoden

wurden mit dem humanen gegen Kallikrein gerichteten AK inkubiert. Die hierbei erzielten Ergebnisse zeigten einen reproduzierbaren, stadienspezifischen Kallikrein-Nachweis, lokalisiert an den runden und elongierten Spermatiden im Bereich der sich entwickelnden Akrosomenkappe, bei Negativität von Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen, *Peritubulär*-Zellen, Spermatogonien, Spermatozyten sowie Spermatozoen *post liberationem*. Deutlich ließen sich die Entwicklungsvorgänge der Spermatidendifferenzierung erkennen. Zunächst war das Gewebs-Kallikrein in der Akrosomenanlage nachweisbar, diese stellt sich als ein rundes, vom Golgi-Apparat gebildetes Bläschen dar, das sich dem Spermatidenkern anlagerte. Im weiteren Entwicklungsverlauf kommt es zur Rotation von Kern und Akrosombläschen. Das erklärt, warum der Kallikrein-Nachweis zunächst am *luminal* gerichteten Pol und später im Bereich des basalen Pols deutlich wurde. Im Weiteren vergrößert sich das Akrosom und breitet sich über zwei Drittel der Kernoberfläche in Form einer Kappe aus. Der Kallikrein-Nachweis stellte sich dann in der DAB-Färbung als schmaler, brauner, membranassoziierter Saum dar.

Die am bovinen Hodengewebe erzielten Resultate waren identisch mit den eigenen, im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen am Rattenhoden. So zeigte sich bei beiden Spezies eine stadienspezifische Kallikrein-Expression in identischer Lokalisation und entsprach den vorbeschriebenen Resultaten der eigenen Arbeitsgruppe am Rattenhoden (Monsees *et al.*, 1999, 2003).

Weiterhin wurde die Kreuzreaktivität des **humanen Antikörpers gegen LMW-Kininogen** am Bullenhoden getestet. Das LMW-Kininogen war im Bereich der sich entwickelnden Akrosomenkappe von runden und elongierten Spermatiden lokalisiert, bei Negativität der Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatozoen sowie der Leydig-Zellen und Sertoli-Zellen. Auch hier war eine stadienabhängige Expression gegeben. Zusätzlich zeigte sich eine deutliche immunhistologische Färbung des *interstitiellen Stromagewebes* sowie der *Peritubulär*-Zellen. Weiterhin konnte in den Muskelzellen der Gefäßwände im *interstitiellen* Gewebe ein deutlicher zytoplasmatischer LMW-Kininogen-Nachweis erbracht werden, ähnlich dem Nachweis von Gewebs-Kallikrein. Die am bovinen *Testis* erzielten Ergebnisse mit dem humanen AK gegen LMW-Kininogen entsprachen den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Resultaten am humanen (Bouin-fixierten) Hoden mit demselben AK.

Am bovinen *Testis* wurde auch die Kreuzreaktivität des **humanen Antikörpers gegen CALLA (NEP 24.11)** ausgetestet. Hierbei konnte keine Protein-Expression der neutralen

Metallo-Endopeptidase (NEP) detektiert werden. Die Ursache hierfür kann vielschichtig sein, z. B. aufgrund der fehlenden Kreuzreaktion des humanen Antikörpers mit dem bovinen Antigen oder der fehlenden Antigene im Hodengewebe. Letztgenanntes ist aber auszuschließen, da Erdös *et al.* (1985) große Mengen NEP 24.11 in *Testis* und *Epididymis* des Menschen nachweisen konnte. Zudem wurden im Rattenhoden-Homogenat Isoformen der Metalloproteinase, NEP 24.15 (Orlowski *et al.*, 1989) und NEP 24.16 (Rodd & Hersh, 1995) gefunden. Zu berücksichtigen ist, dass auch am humanen Hoden unbefriedigende Ergebnisse erzielt wurden und die Kallikrein-exprimierenden Zellen wahrscheinlich dem retikulohistiozytären System angehören.

Mit diesen Versuchsreihen, ausgenommen letztgenannte, konnte neben dem Nachweis einzelner Komponenten des KKS im Reproduktionsgewebe des Bullens, auch deren enge Verwandtschaft zum humanen System dokumentiert werden. Die Kreuzreaktivität des humanen Antikörpers mit dem bovinen Gewebe ist auf die stammesgeschichtliche Entwicklung zurückzuführen. Die Proteinverwandtschaft zwischen humanem und bovinem System wird anhand der Eiweißausfällung im Blutserum ermittelt und liegt bei 30%. Zugleich bestätigten sie die anfangs beschriebenen Forschungsergebnisse der extrem hohen Konservativität der Kallikrein-Protein-Struktur (Gan *et al.*, 2000), die diese Kreuzreaktivität des humanen Antikörpers mit dem bovinen Antigen ermöglichen bzw. begünstigen. Durch die eigenen Ergebnisse lässt sich die stammesgeschichtlich engere verwandtschaftliche Beziehung zwischen Mensch und Bulle als zwischen Ratte und Bulle nachvollziehen.

Trotz unbefriedigender Ergebnisse am humanen Gewebe ist die spezifische Färbung des bovinen Hodens mit dem humanen Antikörper gegen Kallikrein ein Indiz, dass der Antikörper sein Antigen erkennt. Ein Grund für den wenig spezifischen Kallikrein-Nachweis im menschlichen Reproduktionstrakt könnte an eine zu geringe Konzentration des Gewebs-Kallikreins im humanen *Testis* liegen, die mit der immunhistologischen Methode nur unzureichend nachweisbar ist und einer sensitiveren Nachweismethode bedarf. So gelang Clements *et al.* (1992) mittels RT-PCR, einer weitaus sensitiveren Nachweismethode im Vergleich zur Immunhistologie, der Nachweis von Gewebs-Kallikrein mRNA im *Testis* der adulten Ratte.

Naheliegender ist auch die Verwendung eines potenteren Antikörpers, der eine höhere Sensitivität auf dem Gebiet der Immunhistologie aufweist, aber für die hier aufgezeigten Versuchsreihen nicht zur Verfügung stand.

Zudem wurden die Antikörper gegen LMW-Kininogen und NEP durch Dot Blot Tests auf ihre Reagibilität mit dem Brücken-AK untersucht und getestet, ob das Antiserum gegen LMW-Kininogen seine Antigene erkennt. Ein fehlender Antikörper-Nachweis aufgrund Inkompatibilität oder Areaktivität der Antikörper wurde ausgeschlossen. Die Austestungen der Kompatibilität von Primärantikörper und Antigen waren bei Kallikrein und NEP nicht möglich, da humane Proteine dem kommerziellen Markt nicht zur Verfügung standen.

4.4 Ausblick

Das Kallikrein-Kinin-System scheint nach Forschungen von Rohen & Stuttmann, 1977, Saitoh, *et al.*, 1988, Schill *et al.* 1988, Schill & Miska, 1992 (siehe S. 36/37) an wesentlichen Entwicklungsprozessen in der Spermatogenese beteiligt zu sein. Ihm wird daher eine wichtige Einflussnahme auf die männliche Fertilität zugeschrieben.

In richtungsweisenden histologischen Arbeiten wurde vor allem im *proximalen* Anteil des *Ductus epididymis* eine bevorzugt auf die Ausreifung der Spermatozoen ausgerichtete Stoffwechselaktivität des Nebenhodenepithels nachgewiesen (Holstein, 1994). Zudem zeigen Forschungsergebnisse, dass testikuläre Spermatozoen infertil bzw. nur in geringem Maße befruchtungsfähig sind (Cooper & Orgebin-Crist, 1975).

Kallikrein konnte im *Ductus epididymis* von *Corpus* und *Cauda* des Nebenhodens nachgewiesen werden und scheint seine besondere Wirkung auf den Spermatozoen im *posttubulären* Bereich zu entfalten.

Verschiedene Arbeitsgruppen belegten einen positiven Einfluss von Kallikrein bzw. Bradykinin auf die Spermatozoen im Sinne einer Verbesserung der Fertilität wie z.B. die Steigerung der Spermienmotilität *in vivo* als auch *in vitro* (Schroeder-Finckh *et al.*, 1986; Schirren *et al.*, 1974; Steiner *et al.*, 1981; Wallner *et al.*, 1975; Saitoh *et al.*, 1987; Schill & Haberland, 1975; Leidl *et al.*, 1975).

In klinischen Studien zur Wirksamkeit einer systemischen Kallikrein-Therapie wurden konträre Ergebnisse erzielt. Während mehrere Forschungsgruppen eine fertilitätssteigernde Wirkung nachwiesen (Hofmann, 1975; Schill, 1979; Izzo *et al.*, 1984; Micic *et al.*, 1985; Berzin *et al.*, 1987; Schill & Miska, 1992), konnten in neueren *in vivo*-Studien kein

signifikanter therapeutischer Effekt im humanen System aufgezeigt werden (Glezerman *et al.*, 1993; Keck *et al.*, 1994).

Eine exaktere Festlegung von Ausschlusskriterien und Indikationen (Ausreifungsstörungen der Spermatozoen) für eine systemische Kallikrein-Therapie sowie eine Variation mit einer höheren Dosis, könnte zu einem signifikanteren Ergebnis führen. In Studien über die Kallikreinwirkung auf das kardiale System wurden Tagesdosen von 4500 IU eingesetzt, um eine Wirkung zu erzielen (Hoffmann, 1990). Im Vergleich dazu waren die Dosen in Studien am reproduktiven System mit 600 IU sehr gering. Das Resultat könnte eine Diskussion über einen therapeutischen Einsatz von Kallikrein wieder lohnenswert erscheinen lassen.

Am humanen Reproduktionssystem wären neben erneuten Versuchen mit einem anderen, gegen humanes Kallikrein gerichteten, Antikörper auch Versuche an testikulärem Gewebe von Patienten aus der andrologischen Sprechstunde sinnvoll, um bei einschlägigen Krankheitsbildern ein von der Norm abweichendes Verteilungsmuster des Kallikreins, bis hin zum Fehlen der Protease, nachzuweisen.

Die am Nebenhoden gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit lassen detaillierte Studien mit den am humanen und bovinen Hoden verwendeten Antikörpern am Nebenhodengewebe der gleichen Spezies notwendig und sinnvoll erscheinen. Am Reproduktionstrakt der Ratte wären weitere Untersuchungen, unter Verwendung der beschriebenen Antikörper aus den verschiedenen Ebenen der Kallikrein-Kinin-Kaskade, von Interesse, um die bisherigen Ergebnisse zu vervollständigen.

5 Zusammenfassung

Neben dem systemischen Plasma-Kallikrein-Kinin-System kommt nahezu ubiquitär eine gewebspezifische Variante vor, die physiologische und pathologische Prozesse im Körper von Säugetieren beeinflusst. Aus inaktiven Vorläuferproteinen (Kininogenen) setzt Gewebs-Kallikrein das Peptidhormon Bradykinin frei, welches über spezifische membranständige Rezeptoren seine physiologische Funktion ausübt.

Primäres Ziel dieser Dissertation war die genaue topographische und zellspezifische Lokalisierung der Protease Gewebs-Kallikrein im männlichen Reproduktionstrakt verschiedener Säugerspezies mit Hilfe immunhistochemischer Techniken.

Im Rattentestis wurde Gewebs-Kallikrein stadienspezifisch an der akrosomalen Kappe runder und elongierter Spermatiden nachgewiesen, nicht jedoch an Spermien im Lumen von Hoden oder Nebenhoden. Möglicherweise übt diese Protease hier – neben seiner klassischen Rolle im KKS - auch eine Funktion beim Ablösen der Spermien von den Sertoli-Zellen (Spermiation) aus. Gewebs-Kallikrein im Hoden des Bullen zeigte im Wesentlichen die gleiche Lokalisation. Leider gelang beim humanen Testis trotz vielfältiger Variation der Methode kein eindeutiger Nachweis von Gewebs-Kallikrein.

Im Nebenhoden der Ratte wurde Gewebs-Kallikrein im Bereich des *Corpus* und *Cauda* sowie im *Ductus deferens* detektiert. Das sehr inhomogene Verteilungsmuster entspricht wahrscheinlich dem unterschiedlichen Aktivitätsniveau der Epithelzellen im Sinne einer Sekretion dieser Protease. Möglicherweise wird Gewebs-Kallikrein hier zunächst basal des *Nukleus* produziert, danach in den apikalen Bereich der Epithelzelle verlagert und dann als vesikuläre Abschnürung sezerniert. Apikale Abschnürungen an Epithelzellen von Nebenhodengang und *Ductus deferens* zeigten ebenfalls eine positive Färbung für Gewebs-Kallikrein. Kallikrein zeigte sich weiterhin zytoplasmatisch in den Muskelzellen der Wandung des *Ductus epididymis* bzw. *Ductus deferens* und der Gefäße. Im *Epididymis* könnte daher Gewebs-Kallikrein bzw. das KKS bei der Reifung der Spermatozoen eine Rolle spielen. Anhand von Gewebeschnitten, die aus Ratten unterschiedlicher Altersstufen angefertigt wurden, zeigte sich eine ausgeprägte Abhängigkeit des Auftretens von Gewebs-Kallikrein vom sexuellen Entwicklungsstand des Tieres. Im Testis trat diese Protease erst mit Beginn der Pubertät und dem damit verbundenen erstmaligen Durchlaufen des Spermatogeneszyklus mit der Bildung von zunächst runden und zeitlich später elongierten Spermatiden auf. Im Nebenhoden erfolgte die Produktion und Sekretion von Gewebs-Kallikrein in Epithelzellen

erstmals mit dem Auftreten von Spermien im *Tubulussystem* kurz nach der ersten Spermiation.

LMW-Kininogen, als Substrat des Gewebs-Kallikreins, wurde an der sich entwickelnden Akrosomenkappe runder und elongierter Spermatiden von Mensch und Bulle nachgewiesen, nicht jedoch an ins Lumen liberierten Spermatozoen. Auch im *interstitiellen Stroma* zeigte sich eine spezifische Färbung.

Der Antikörper gegen die Neutrale Metalloendopeptidase (CALLA) erbrachte am humanen und bovinen Reproduktionsgewebe keinen positiven Nachweis. In humanem Gewebe zeigten dagegen einzelne Zellen des retikulohistiozytären Systems eine positive Farbreaktion.

Die hier gezeigte selektive, stadienspezifische (*Testis*) und entwicklungsabhängige (*Testis*, *Epididymis*) Expression der Protease Gewebs-Kallikrein in bestimmten Zelltypen sowie Regionen (*Epididymis*) deutet auf eine Beteiligung des Gewebs-KKS am Prozeß der Differenzierung und Reifung von Spermatozoen.

6 Summary

Local production of kinins occurs in many tissues by the action of tissue kallikrein on the precursor low-molecular weight kininogen. The various physiological and pathological functions of kinins are mediated by specific membrane-bound receptors. Several lines of evidence point to a possible involvement of the tissue kallikrein-kinin system in male reproduction.

In this thesis, the exact topographic and cellular localization of the protease tissue kallikrein (tK) in male reproductive organs of different species was investigated using immune histochemistry.

Within the seminiferous tubules of mature rat and bull *testes*, tissue kallikrein was solely detected in round and elongated spermatids, where it was associated with the acrosomal cap. In contrast, liberated spermatozoa within the lumen did not show positive staining for tK. Tissue kallikrein was expressed in all tubules, but the staining pattern was dependent on the developmental stage of the spermatogenic cycle. In the *interstitium*, tK was present in endothelial and muscle cells of blood vessels, but not in Leydig cells.

In the rat, tK showed a development-dependent expression. Within the *testes*, it was first detected with the onset of spermatogenesis on step 5 spermatids at day 28 after birth: in the *epididymis* it first occurred shortly after spermiation at day 38.

Tissue kallikrein showed an inhomogeneous distribution in the epithelial cells of the rat *epididymis* located in the different areas of the *corpus* and *cauda epididymis*, as well the *ductus deferens*. The observed variations in the expression level may mirror the functional state of the epithelium. Tissue kallikrein seems to be produced in the basal compartment of the epithelial cells and then relocated to the apical part. Thereafter, apocrine secretion of tK within cytoplasmatic constrictions towards the lumen was detected. Tissue kallikrein was also localized in muscle cells of the vascular walls of the *ductus epididymis* and *ductus deferens* and blood vessels.

LMW kininogen, the inactive precursor tK, was detected in the acrosomal cap of round and elongated spermatids in human and bovine *testes*, but not in liberated spermatozoa within the lumen. Peritubular and muscle cells as well as stroma were positive for kininogen.

The antibody against the neutral metalloendopeptidase (CALLA) did not succeed at the human and bovine reproductive tissue. In the human tissue were only cells of the reticulohistiocytic system positiv for CALLA.

The stage- and developmental expression of tissue kallikrein in developing germ cells and the epithelial cells of the *epididymis* suggests a potential role of the tissue kallikrein-kinin system in the local regulation of spermatogenesis and sperm maturation.

7 Literaturverzeichnis

- Atanassova NN. B₂ bradykinin receptor mediates the stimulatory effect of bradykinin on rat germ cell proliferation in vitro. *Andrologia* 2003; 35, pp. 13-16
- Bascands JL, Marin Castano ME, Bompard G, Pecher C, Gaucher M, Girolami JP. Postnatal maturation of the Kallikrein-kinin system in the rat kidney: from enzyme activity to receptor gene expression. *J Am Soc Nephrol.* 1996; 7(1), pp. 81-9.
- Baumgarten CR, Swarting R, Kunkel G. Localization of glandular kallikrein in nasal mucosa of allergic and nonallergic individuals. *Adv Exp Med Biol* 1989; 247, B, pp. 523-528
- Bergmann. Spermatogenese. *Andrologie*, 3. Auflage. Krause W. Weidner D (eds). Erike Verlag 1998; pp. 9-14
- Berzin M, Bilgeri YR, Zanzinger A, Wing J, Kalk WJ, Mendelsohn D. The effect of kallikrein on spermatozoa ATP and other semen parameters. *Andrologia* 1987; 19, pp. 273-277
- Bhoola KD, Dieppe PA. Kinins: Inflammation-signalling peptides in joint disease. *Eur J Rheumatol Inflamm* 1991; 11, pp. 66-75
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol Rev* 1992; 44, pp. 1-80
- Blasini R, Schmeller ML, Pfeiffer C, Wriedt-Lübbe I, Huber P, Blümel G. Experimentelle Untersuchungen über die organspezifische Anreicherung von Kininogenasen im Hoden- Nebenhodenbereich, *Andrologia* 1980; 12 (3), pp. 199-205
- Blaukat A. Structure and signalling pathways of kinin receptors. *Andrologia* 2003; 35, pp. 17-23
- Blöcher S, Miska W, Schill WB, Monsees TK. Development-dependent changes in the expression of tissue kallikrein and bradykinin B₂ receptor in rat seminiferous tubules. *Reprod Dom Anim* 2000; pp. 35
- Bourne, JA. Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden. DAKO Corporation 1997; 3. Auflage
- Burch RM & Axelrod J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of Phospholipase A₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84, pp. 6374-6378
- Carbo B. Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars. In: The epididymis, sperm maturation and fertilisation. TG Cooper (eds.). *Acta Vet Scand* 1965; 6 (5). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1986
- Chao J, Swain C, Chao S, Xiong W, Chao L. Tissue distribution and kininogen gene expression after acute-phase inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1988; 964, pp. 329-339

- Chen LM, Song Q, Chao L, Chao J. Cellular localization of tissue kallikrein and kallistatin mRNAs in human kidney. *Kidney Int* 1995; 48, pp. 690-697
- Clements JA. The glandular kallikrein family of enzymes: Tissue-specific expression and hormonal regulation. *Endocr rev* 1989; 10, pp. 393-419
- Clements JA, Fuller PJ. Tissue kallikrein in the pituitary and brain. *Front Neuroendocrinol* 1990; 1, pp. 38-51
- Clements JA, Matheson BA, Funder JW. Tissue-specific developmental expression of the kallikrein gene family in the rat. *J Biol Chem* 1990; 265, pp. 1077-1081
- Clements JA, Mukhtar A, Ehrlich A, Fuller PJ. A re-evaluation of the tissue-specific pattern of expression of the rat kallikrein gene family. In: *Recent Progress on Kinins*. Fritz H, Müller-Esterl M, Jochum M, Roscher A, Luppertz K (eds.), Birkhauser-Verlag, Basel 1992; 8 (1), pp. 34-41.
- Clements JA, Mukhtar A, Ehrlich A, Yap B. Glandular kallikrein gene expression in the human uterus. *Brat. J Med Biol Res* 1994; 27, pp. 1855-1863
- Clements JA, Mukhtar A, Verity K, Pullar M, McNeill P, Cummins J, Fuller PJ. Kallikrein gene expression in human pituitary tissues. *Clin Endocrinol* 1996; 44, pp. 223-231
- Clements JA. The molecular biology of the kallikreins and their roles in Inflammation. In: *The Kinin System* 1997; pp. 72-87
- Collier HOJ, Holgate JA, Schachter M, Shorley PG. The bronchoconstrictor action of bradykinin in the guinea pig. *Br J Pharmacol* 1960; 15, pp. 290-297
- Cooper TG, Orgebin-Crist MC. The effect of epididymal and testicular fluids on the fertilising capacity of testicular and epididymal spermatozoa. *Andrologia* 1975; 7(2), pp. 85-92
- Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Nieschlag E. Epididymal markers in human infertility. *J Androl* 1988; 9, pp. 91-101
- Cooper TG, Yeung CH. Physiologie der Spermienreifung und Fertilisation. In: *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Nieschlag E, Behre HM (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2000; 2. Auflage
- Cossman J, Neckers LM, Leonard WJ, Greene WC. Polymorphonuclear neutrophils express the common acute lymphoblastic leukemia antigen. *J Exp Med* 1983; 157, p. 1064
- Diamandis EP, Yousef GM. Human tissue kallikrein gene family: a rich source of novel disease biomarkers. *Expert Rev Mol Diagn* 2001; 1(2), pp. 182-90
- Diamandis EP, Yousef GM. Human tissue kallikreins: A family of new cancer biomarkers. *Clin Chem* 2002; 48(8), pp. 1198-1205
- Eggerickx D, Raspe E, Bertrand D, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of a human bradykinin B₂ receptor gene. *Biochem Biophys Res Com* 1992; 187, 3, pp. 1306-1313

- Ehlers MR, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: The testis isoenzyme is identical to the C-terminal half of endothelial testicular angiotensin-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86, pp. 7741-7745
- Erdös EG, Schulz WW, Gafford JT, Defendini R. Neutral Metalloendopeptidase in human male genital tract. Comparison to angiotensin I-converting enzyme. *Lab invest* 1985; 52, pp. 437-447
- Farmer SG, Burch RM. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; 32, pp. 511-536
- Faußner A, Heinz-Erian P, Klier C, Roscher AA. Solubilization and characterization of B₂ bradykinin receptors from cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1991; 266, pp. 9442-9446
- Figueroa CD, Caorsi L, Subiabre J, Vio CP. Immunoreactive kallikrein localization in the rat kidney: an immuno-electron-microscopic study. *J Histochem Cytochem* 1984; 32, pp. 117-121
- Figueroa CD, Mac Iver AG, Mackenzie JC, Bhoola KD. Identification of a tissue kallikrein polymorphonuclear leucocytes. *Br J Haematol* 1988; 72, pp. 321-328
- Figueroa CD, Bhoola KD. Leucocyte tissue kallikrein; an acute phase signal for inflammation. In: *The Kallikrein-Kinin System in Health and Disease*. Fritz H, Schmidt I, Dietze G (eds.). Limbach Verlag Braunschweig, 1989; pp 311-320.
- Figueroa CD, Henderson LM, Kaufmann J, De La Cadena RA, Colman RW, Müller-Esterl W, Bhoola KD. Immunovisualization of high (HK) and low (LK) molecular weight kininogens on isolated human neutrophils. *Blood* 1992; 79, pp. 754-759
- Figueroa CD, Gonzalez CB, Grigoriev S, Alla SA, Hassemann M, Jarnagin K, Müller-Esterl W. Probing for the Bradykinin B₂ receptor in rat kidney by anti-peptide and anti-ligand antibodies. *J Histochem Cytochem* 1995; 43 (2), pp. 137-148
- Fink E, Schill WB, Fiedler F, Krassnigg F, Geiger R, Shimamoto. Tissue kallikrein of human seminal plasma is secreted by prostate gland. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1985; 366, pp. 917-924
- Franke FA, Reuter SS, Metzger R, Towbin H, Danilov SM, Bohle RM. Cellular localization of angiotensin-converting enzyme. *Tissue Antigens* 1996; 48, pp. 416
- Fuller PJ, Verity K, Matheson BA, Clements JA. Kallikrein-gene expression in the rat gastrointestinal tract. *Biochem J* 1989; 264, pp. 133-136
- Gan L, Lee I, Smith R, Argonza-Barrett R, Lei H, McCuaig J, Moss P, Paeper B, Wang K. Sequencing and expression analysis of serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region. *Gene* 2000; 257, pp. 119-130
- Glezerman M, Huleihel M, Lunenfeld E, Soffer Y, Potashnik G, Segal S. Efficacy of kallikrein in the treatment of oligozoospermia and asthenozoospermia: a double-blind trial. *Fertil Steril* 1993; 60, pp. 1052-1056

- Gohla A, Offermanns S, Wilkie TM, Schultz G. Differential involvement of $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* 1999; 247, pp. 17901-17907
- Graness A, Adomeit A, Ludwig B, Muller WD, Kaufmann R, Liebmann C. Novel Bradykinin signalling events in PC-12 cells: stimulation of the cAMP pathway leads to cAMP-mediated translocation of protein kinase Cepsilon. *Biochem J* 1997; 327, pp. 147-154
- Hess JF, Borkowski JA, Young GY, Strader CD, Ramson RW. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK_2) receptor. *Biochem Biophys Res Com* 1992; 184, 1, pp. 260-268
- Hess JF, Borkowski JA, Mc Neil T, Stonesifer GY, Strader CD, Ramson RW. Differential pharmacology of cloned human and mouse B_2 bradykinin receptors. *Mol Pharmacol* 1993; 45, pp. 1-8
- Hess JF, Derrick AW, MacNeil T, Borkowski JA. The agonist selectivity of a mouse B_1 bradykinin receptor differs from human and rabbit B_1 receptors. *Immunopharmacology* 1996; 33, pp. 1-8
- Hoffmann J. Antihypertensive Wirkung oraler Therapie mit Kallikrein. *Zentralbl Hautkr* 1990; 50, pp. 1003-1012
- Hofmann N, Schönberger A, and Gall H. Untersuchungen zur Kallikrein-Behandlung männlicher Fertilitätsstörungen. *Zentralbl Hautkr* 1975; 50, pp. 1003-1012
- Holstein AF, Roosen-Runge EC. Atlas of human Spermatogenesis. Grosse, Berlin 1981
- Holstein AF. Männliche Geschlechtsorgane. In: Benninghoff Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Drenckhahn D, Zenker W (eds.) Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1994; 15. Auflage, pp. 69-100
- Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991; 266 (23), pp. 15377-83
- Izzo PL, Canale D, Bianchi B, Meschini P, Esposito G, Menchini Fabris GF, Fasani R, Ohnmeiss H. The treatment of the male subfertility with kallikrein. *Andrologia* 1984; 16(2), pp. 156-61
- Jahnke GD, Chao J, Walker MP, Diaugustine RP. Detection of kallikrein in the mouse lactating mammary gland – a possible processing enzyme for the epidermal growth factor precursor. *Endocrinology* 1994; 135, pp. 2022-2029
- Jégou B, Sharpe RM. Paracrine mechanisms in testicular control. In: Kretser DM (eds) Molecular biology of the male reproductive system. Academic Press, New York 1993; pp 271-310
- Jones TH, Figueroa CD, Smith C, Cullen DR, Bhoola KD. Characterization of a tissue kallikrein in human prolactin-secreting adenomas. *J Endocrinol* 1990; 124, pp. 327-331

- Kammerer S, Braun A, Arnold N, Roscher AA. The human bradykinin B₂ receptor gene: full length cDNA, genomic organization and identification of the regulatory region. *Biochem Biophys Res Com* 1995; 211 (1), pp. 226-233
- Keck C, Behre HM, Jockenhövel F, Nieschlag E. Ineffectiveness of kallikrein in treatment of idiopathic male infertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hum Reprod* 1994; 9, pp. 325-329
- Kitagawa A, Kizuki K, Moriya H, Kudo M, Noguchi T. Localization of kallikrein in rat pineal gland. *Endocrinol Jpn* 1991; 38, pp. 109-112
- Lamb ME, De Weerd WF, Leeb-Lundberg LM. Agonist-promoted trafficking of human bradykinin receptors: arrestin- and dynamin-independent sequestration of the B₂ receptor and bradykinin in HEK 293 cells. *Biochem J* 2001; 355 (3), pp. 741-750
- Langford KG, Zhou J, Russel LD, Wilcox, JN, Bernstein KE. Regulated expression of testis angiotensin converting enzyme during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod* 1993; 48, pp. 1210-1218
- Leidl W, Prinzen R, Schill WB, Fritz H. The effect of kallikrein in motility and metabolism of spermatozoa in vitro. In: *Kininogenases. Kallikrein 2*. Haberland GL, Rohen JW, Schirren C, Huber P (eds). Schattauer Stuttgart 1975; pp. 33-40
- Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JBL, Onizuka RJ, Quackenbush EJ, Jongeneel CV, Mc Innes RR. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med* 1988; 168, pp. 1247-1253
- Lewis GP. Kinins in inflammation and tissue injury. *Handb Exp Pharmacol* 1970; 25, pp. 516-530
- Lin FK, Lin CH, Chou CC, Chen K, Lu HS, Bacheller W, Herrera C, Jones T, Chao J, Chao L. Molecular cloning and sequence analysis of the monkey and human tissue kallikrein genes. *Biochem Biophys* 1993; *Acta* 1173, pp. 325-328
- MacDonald RJ, Margolius HS, Erdös EG. Molecular biology of tissue kallikrein. *Biochem J* 1988; 253, pp. 313-321
- MacDonald RJ, Southard-Smith EM, Kroon E. Disparate tissue-specific expression of members of the tissue kallikrein multigene family of the rat. *J Biol Chem* 1996; 271 (23), pp. 13684-13690
- Malofiejew M. Kallikrein-like activity in human myometrium, placenta and amniotic fluid. *Biochem Pharmacol* 1973; 22, pp. 123-127
- Margolius HS. Kallikreins and kinins - some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. *Hypertension* 1995; 26, pp. 221-229
- Margolius HS. Kallikrein and kinins – Molecular characteristics and cellular and tissue responses. *Diabetes* 1996; 45, pp.14-19

- McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernote R, Bach C, Zuppan P, Fujisaki J, Aldrich RW, Jarnagin K. Expression cloning of a rat B₂ bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1991; 88, pp. 7724-7728
- McGiff JC, Istkovitz HD, Terragno NA, Wong PYK. Modulation and mediation of the action of the renal kallikrein-kinin system by prostaglandins. *Fed Proc* 1976; 35, pp. 175-180
- Mc Intyre P, Phillips E, Skidmore E, Brown M, Webb M. Cloned murine bradykinin receptor exhibits a mixed B₁ and B₂ pharmacological selectivity. *Mol Pharmacol* 1993; 44, pp. 346-355
- Micic S, Bila S, Ilic V and Sulovic V. Treatment of men with oligoasthenozoospermia and asthenozoospermia with kallikrein. *Acta Aur Fertil* 1985; 16, pp. 51-54
- Mills IH. Kallikrein, kininogen and kinin in control of blood pressure. *Nephron* 1979; 23, pp. 61-71
- Miska W, Schill WB. Enhancement of sperm motility by bradykinin and kinin analogs. *Arch Androl* 1990; 25, pp. 63-67
- Miska W, Schill WB. Resorptionsstudie mit Schweinepankreas-Kallikrein am Menschen. *Arzneimittelforschung* 1991; 41 pp. 1061-1064
- Miska W, Schill WB. Influence of bradykinin antagonists on the motility of human spermatozoa enhanced by bradykinin. *Arch Androl* 1994; 33, pp. 1-5
- Monsees T, Miska W, Jung A, Schill WB. Charakterisierung von Kininasen in Sertoli-Zellkulturen. *Fertilität* 1996a; 12, pp. 41-45
- Monsees T, Miska W, Schill WB. Enzymatic digestion of bradykinin by rat sertoli cell cultures. *J Androl* 1996b; 17, pp. 375-381
- Monsees TK, Pena P, Schill WB, Miska W. Localisation of kallikrein in rat testis and epididymis. *Reprod Dom Anim* 1996c; 30, pp. 403
- Monsees TK, Görnig M, Schill WB, Miska W. Possible involvement of proteases in the regulation of spermatogenesis. *Andologia* 1998; 30, pp.185-191
- Monsees TK, Miska W, Blöcher S, Schill WB, Winkler A, Siems WE. Elements of the kallikrein-kinin system are present in seminiferous epithelium. *Immunopharmacology* 1999; 45 (1-3), pp. 107-14
- Monsees TK, Blöcher S, Heidorn F, Winkler A, Siems WE, Müller-Esterl, Hayatpour J, Miska W, Schill WB. Expression and location of the bradykinin B₂-receptor in rat testis. *Biol Reprod* 2002; 67, pp. 1832-1839
- Monsees TK, Blöcher S, Loddo C, Steger K, Schill WB. Tissue kallikrein and bradykinin B₂-receptors in the reproductive tract of the male rat. *Andrologia* 2003; 35, pp. 24-31
- Müller-Esterl W, Iwanga S, Nakanishi S. Kininogens revisited. *Trends Biochem Sci* 1986; 11, pp. 336-339
-

- Müller-Esterl W. Kinine, Kallikrein und Kaskadensysteme. *Biologie in unserer Zeit* 1993; 23(3), pp.184-191
- Mueller K, Heder G, Nehring H, Siems WE, Wolf R. Investigations of the influence of bradykinin upon motility of ram spermatozoa. *Andrologia* 1991; 23, pp.357-362
- Naidoo Y, Bhoola K. The kinin system and neutrophils. 1997; pp. 187-196
- Naish SJ. Handbuch II immunchemischer Färbemethoden. DAKO Corporation 1997; 3. Auflage
- Neurath H. The diversity of proteolytic enzymes. In *Proteolytic Ezymes – A partial proach*. Beynon RJ, Bond JS (eds.). Oxford University Press 1989; pp. 1-13
- Ni A, Chai KX, Chao L, Chao J. Molecular cloning and expression of rat bradykinin B₁ receptor. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1442, pp. 177-185
- Nicander L, Ploen L. Studies on regional fine structure and function in the rabbit epididymis. *Int J Androl* 1979; 2, pp. 463-481
- Nieschlag E, Behre HM (eds.). *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2000; 2. Auflage
- Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992; 258, pp. 607-614
- Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. Urban & Fischer-Verlag München Jena 2000
- Nolly H, De Vito, Carrerra R, Koninckx A. Kinin-realising enzyme in cardiac tissue. In: *Hypertension*. Villareal H (eds.). John Wiley and Sons, New York 1981; pp. 75-84
- Orlowski M, Reznik S, Ayala J, Pierotti AR. Endopeptidase 24.15 from rat testes. *Biochem J* 1989; 261, pp. 951-958
- Pesquero JB, Lindsey CJ, Zeh K, Paiva ACM, Ganten D, Bader M. Molecular structure and expression of rat bradykinin B₂ receptors gene. Evidence for alternative splicing. *J Biol Chem* 1994; 43, pp.26920-26925
- Petraki CD, Karavana VN, Diamandis EP. Human kallikrein 13 expression in normal tissues: An immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 2003; Vol. 51, pp. 493-501
- Poblete MT, Reynolds NJ, Figueroa CD, Burton JL, Müller-Esterl W, Bhoola KD. Tissue kallikrein and kininogen in human sweat glands and psoriatic skin. *Br J Dermatol*. 1991; 124, pp. 236-241
- Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 1980; 32(1), pp. 1-46
- Regoli D, Rizzi A, Calo G, Nsa Allogho S, Gobeil F. B₁ and B₂ kinin receptors in various species. *Immunopharmacology* 1997; 36, pp.143-147
-

- Rehbock J, Buchinger P, Hermann A, Figueroa CD. Identification of immunoreactive tissue kallikrein in human ductal breast carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; 121, pp. 64-68
- Rixon RH, Whitfield JF. Kallikrein, kinin and cell proliferation. In: *Kininogenases. Kallikrein*. Haberland GL & Rohen JW (eds.). Schattauer, Stuttgart 1973; pp. 131-145
- Ritz J, Nadler LM, Bhan AJ, Notis-McConarty J, Pesando JM, Schlossmann SF. Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) by lymphomas of B-cell and T-cell lineage. *Blood* 1981; pp. 48, 648
- Rodd D, Hersh LB. Endopeptidase 24.16B. A new variant of endopeptidase 24.16. *J Biol Chem* 1995; 270, pp. 100056-100061
- Rohen JW, Stuttmann R. The early postnatal development of the germinative epithelium of the testis in the albino rat under the influence of kallikrein. In: *Kininogenases. Kallikrein*. Haberland GL, Rohen JW, Suzuki T (eds). Schattauer, Stuttgart, New York 1977; 4, pp. 217-223
- Russel LD, Ettl RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Histological und histopathological evaluation of the testis. Cache River Press 1990; Clearwater
- Saed GM, Carretero OA, MacDonald RJ, Scicli AG. Kallikrein messenger RNA in rat arteries and veins. *Cir Res* 1990; 67, pp. 510-516
- Saitoh S, Kumamoto Y, Shimamoto K, Iimura O. Kallikrein in the male reproductive system. *Arch Androl* 1987; 19, pp. 133-147
- Saitoh S, Kumamoto Y. Effect of kallikrein on testicular blood circulation. *Arch Androl* 1988; 20, pp. 51-65
- Sato H. Studies on the components of kallikrein-kinin system and treatment of male infertility. *Keio J Med* 1980; 29, pp. 19-38
- Sato H, Schill WB. Temperature-dependent effects of the components of kallikrein-kinin system on sperm motility in vitro. *Fertil Steril* 1987; 47(4), pp. 684-688
- Schill WB. Increased fructolysis of kallikrein-stimulated human spermatozoa. *Andrologia* 1975; 7(3), pp. 105-107
- Schill WB. Kallikrein im Doppelblindversuch bei idiopathischer Oligozoospermie, *Hautarzt* 1978; 29, pp. 319-322
- Schill WB. Treatment of idiopathic oligozoospermia by kallikrein: results of a double blind study: *Arch Androl* 1979; 2(2), pp.163-170
- Schill WB, Haberland GL. Effects of different components of the kallikrein-kinin system on sperm motility in vitro (in German). *Klin Wochenschr* 1975; 53 pp.73-79
- Schill WB, Littich M. Split ejaculate insemination with and without the addition of kallikrein. *Andrologia* 1981;13, pp.121-126
-

- Schill WB, Miska W, Parsch EM, Fink E. Significance of the kallikrein-kinin system in andrology. In: The Kallikrein-Kinin system in health and disease. Schmidt I, Dietze G (eds). Braunschweig: Limbach 1988,; pp.171-203
- Schill WB, Miska W. Possible effects of the kallikrein-kinin system on male reproductive functions. *Andrologia* 1992; 24 pp.69-75
- Schill WB, Parsch EM, Miska W. Inhibition of angiotensin converting enzyme - a new concept of medical treatment of male infertility? *Fertil Steril* 1994; 61(6), pp. 1123-1128
- Schill WB, Pritsch W, Preissler G. Effect of caffeine and kallikrein on cryo-preserved human spermatozoa. *Int J Fertil* 1979; 24(1), pp. 27-32
- Schirren C, Schill WB, Hofmann N. The influence of kallikrein on semen parameters of subfertile patients. In: *Kininogenese-Kallikrein*, Stuttgart, New York: Schattauer 1974; Vol. 2., pp. 11-127
- Schroeder-Finckh R, Hofmann N, Hartmann R. Kallikrein – ein Beitrag zur andrologischen Krankheitslehre und –therapie. *Fertilität* 1986; 2, pp. 171-178
- Schulze W, Rehder U. Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. *Cell Tiss Res* 1984; 237, pp. 395-407
- Setchell BP, Hinton BT. The effects on the spermatozoa of changes in the composition of luminal fluid as it passes along the epididymis. In: *Epididymis and Fertility: Biology and Pathology*. Zollack C & Karger S (eds.), London. *Prog Reprod Biol* 1981; 8, pp 58-66
- Setchell BP. Blood-Testis barrier. *Encyclopedia of Reproduction* 1999; 1, pp. 375-381
- Sibony M, Gasc JM, Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* 1993; 21, pp. 827-835
- Sibony M, Segretain D, Gasc JM. Angiotensin-Converting enzyme in murine testis: Step-specific expression of the germinal isoform during spermatogenesis. *Biol Reprod* 1994; 50, pp. 1015-1026
- Siems WE, Maul B, Wiesner B, Becker M, Walther T, Rothe L, Winkler A. Effects of kinins on mammalian spermatozoa and the impact of peptidolytic enzymes. *Andrologia* 2003; 35, pp. 54
- Simson JAV, Chao J. Subcellular distribution of tissue kallikrein and Na, K-ATPase α -subunit in rat parotid striated duct cells. *Cell Tiss Res* 1994; 275, pp. 407-417
- Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allergrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85, pp. 9376-9390

- Steiner R, Hofmann N, Hartmann R and Kaufmann R. Kallikrein-enhanced human sperm motility in different media and cervical mucus measured by Laser-Doppler-spectroscopy. In: Kininogenases. Kallikrein 5. Haberland GL and Rohen J (eds). Schattauer Stuttgart 1981; pp. 17-26
- Steranka LR, Manning DC, DeHaas CJ, Ferkany JW, Borosky AS, Connor JR, Vavrek RJ, Stewart JM, Snyder SH. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons and antagonists have analgesic actions. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85, pp. 3245-3249
- Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian SM, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. Annu Rev Cell Biol 1993; 9, pp. 541-574
- Swift GH, Dagorn JC, Ashley PL, Cummings SW, MacDonald RJ. Rat pancreatic kallikrein mRNA: Nucleotide sequence and amino acid sequence of the encoded preproenzyme. PNAS USA 1982; 79, pp. 7263-7267
- Takano M, Kondo J, Yayama K, Otani M, Sano K, Okamoto H. Molecular cloning of cDNA for mouse low molecular weight and high-molecular-weight prekininogens. BBA 1997; 1352, pp. 222-230
- Tokumasu T, Veno A, Oh-ishi S. A hypotensive response induced by des-Arg⁹-bradykinin in young Brown/Norway rats pretreated with endotoxin. Eur J Pharmacol 1995; 274, pp. 225-228
- Török L, Morvay J, Sas M. Untersuchungen über Serum-FSH, LH und Testosteron bei der Behandlung subfertiler Männer mit Kallikrein. Forsch Androl 1978; 6, pp. 84-87
- Turner TT. Resorption versus secretion in the rat epididymis. J Reprod Fert 1984; 72, pp. 509-514
- Valdes G, Corthorn J, Scicli GA, Gaete V, Soto J, Ortiz ME, Foradori A, Saed G. Uterine kallikrein in the early pregnant rat. Biol Reprod 1993; 49, pp. 802-808
- Van de Plas P. The Dot Spot Test a simple method to monitor immunoreagent reactivity and influence of fixation on antigen recognition. Aurion Newsletter Nr 4, Product Information. The Netherlands 1997
- Wang DZ, Ma JX, Chao L, Chao J. Molecular cloning and sequence analysis of rat bradykinin B₂ receptor gene. BBA 1994; 1219, pp. 171-174
- Wallner O, Schill WB, Grösser A, Fritz H. Participation of the kallikrein-kinin system in sperm penetration through cervical mucus: in vitro studies. In: Kininogenases. Kallikrein 2. Haberland GL, Rohen JW, Schirren C, Huber P (eds). Schattauer, Stuttgart, New York, 1975; pp. 63-70
- Weinbauer GF, Gromoll J, Simoni E, Nieschlag E. Physiologie der Hodenfunktion. In: Andrologie Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. Nieschlag E, Behre HM (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2000; 2. Auflage

- Werle E, Vogel R, Rüdell G. Zur Frage der Wachstumseinwirkung von Kallikrein bei Ratten. Arch Int Pharmacodyn 1964; 149, pp.119-125
- WHO. Task force on the diagnosis and the treatment of infertility : Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. Int J Androl 1987; Suppl 7
- WHO. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Fourth Edt. WHO. Cambridge University Press 1999
- Wines DR, Brady JM, Pritchett DB, Roberts JL, MacDonald RJ. Organization and expression of rat kallikrein gene family. J Biol Chem 1989; 264 (13), pp. 7653-7662
- Wolf WC, Harley RA, Sluce D, Chao L, Chao J. Localization and expression of tissue kallikrein and kallistatin in human blood vessels. J Histochem Cytochem 1999; 47 (2), pp. 221-228

8 Abkürzungen

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
A. dest.	Aqua destillatum = destilliertes Wasser
AG	Antigen
AK	Antikörper
AS	Antiserum
BSA	bovines Serumalbumin
BK	Bradykinin
B _{1/2} -Rezeptor	Bradykinin-B _{1/2} -Rezeptor
Ca ²⁺	Kalziumionen
CALLA	human common acute lymphoblastic leukemia antigen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cat. No	Catalog Number = Katalognummer
CD	cluster of differentiation = internationales System für die Bezeichnung von Differenzierungsantigenen
CD4	T-Helferzellen
CD8	T-Suppressorzellen
CPN	Carboxypeptidase N
DAB	3,3'Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
desArg	desArginin
DNA	Deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GDP	Guanosindiphosphat
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
G-Protein	Guanin-Nucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HMW-Kininogen	High-Molecular-Weight-Kininogen
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase
HUSI-I	Leukostatin
HUSI-II	Acrostatin
HVL	Hypophysenvorderlappen
IHC	Immunhistochemie

IU	International Units
Kb	Kilobasenpaare
KD	Kallidin
KDa	Kilodalton
KKS	Kallikrein-Kinin-System
KLK 1/.....	Gewebs-Kallikrein-Gen 1 /....
LH	Luteinisierendes Hormon
LMW-Kininogen	Low-Molecular-Weight-Kininogen
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major histocompatibility complex = Haupthistokompatibilitätskomplex, dessen Gene die Proteine codieren, welche die Immunität des Menschen ausmachen
mRNA	messenger RNA
NCP	Nitro-Cellulose-Streifen
NEP	Neutrale Metalloendopeptidase
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	Phosphat buffered saline = Phosphat gepufferte Salzlösung
PBSM	Phosphat gepufferte, salzige Magnesiumchloridlösung
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
Rho	Rhodopsin
RNA	Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
TBS	Tris buffered saline =Tris gepufferte Salzlösung
t-KKS	tissue (=Gewebs)-Kallikrein-Kinin-System
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
WHO	World Health Organisation = Weltgesundheitsorganisation

9 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation,

„Immunhistochemische Detektion von Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems in Testis und Epididymis verschiedener Spezies“,

selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Brilon, den.....

10 Danksagung

Dem Direktor des Zentrums für Dermatologie und Andrologie, Herrn Prof. Dr. Dr. med. habil. W. Schill danke ich für die Bereitstellung von Laborräumen und Equipment.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. T. Monsees, der diese Arbeit als Projektleiter und Betreuer im Zentrum für Dermatologie und Andrologie der JLU Gießen initiiert hat. Seine Anregungen, die von ihm vorgeschlagene Themenwahl und seine freundliche Unterstützung regten mich wesentlich in der Gestaltung dieser Arbeit an.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Henkel, der durch ein nicht selbstverständliches Engagement auch kurzfristig bereit war, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen und durch seine konstruktive Kritik und seine unverzichtbare und kritische Unterstützung, vor allem in der Endphase dieser Arbeit, unterstützt hat.

Ich möchte mich persönlich an dieser Stelle auch bei Herrn Prof. Dr. A. Schulz bedanken, der mir fachlich kompetente Beratung gewährte und ermöglichte, die vorhandenen technischen Ausrüstungen am Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität zu nutzen und wissenschaftliche Untersuchungen mit wichtigen theoretischen und praktischen Anregungen unterstützte.

Über ihre Tätigkeiten als Medizinisch Technische Assistentin hinaus hat Frau G. Thiele durchdachte praktische Hinweise gegeben und eine nicht selbstverständliche Hilfestellung bei der Anfertigung histologischer Schnitte gezeigt.

Die Fotografin Frau Jurat zeigte mir, wie Fotografien von histologischen Präparaten in wissenschaftlich verwertbarer Qualität angefertigt werden. Den Medizinisch Technischen Assistentinnen aus dem Eingangs- und dem immunhistochemischen Labor des Instituts für Pathologie möchte ich für ihre Unterstützung und ihre Anregungen zur Optimierung des immunhistologischen Verfahrens danken.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Rechtsmedizinischen Instituts der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (kommis. Direktor: Prof. Dr. med. J. Barz) bedanken, durch deren freundliche Hilfsbereitschaft ich weitere Gewebeproben erlangen konnte.

Meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für Aufmunterung und Motivation und eine stets freundliche und humorvolle Begleitung und Zusammenarbeit. Vor allem in der Einarbeitungsphase standen sie mit hilfreichen Vorschlägen und Tipps zur Seite. Mein Dank gilt vor allem Frau Dr. S. Blöcher und Frau A. Hanschke. Besonders möchte ich an dieser Stelle bei Frau Dr. Ch. Baldauf bedanken. Sie ist nicht nur Kollegin und Mitbewohnerin, sondern auch eine gute Freundin, mit der ich mich durch fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen aber auch persönlich verbunden fühle..

Herr Dr. med. L. Hermeler gab durch seine psychiatrisch-psychotherapeutische Perspektive wichtige Anregungen für die stilistische Ausgestaltung und Aussagerichtung der Arbeit.

Meinen Freundinnen Ariane Lonke, Petra Hillebrand, Sonja Müller und Maren Strack möchte ich für ihre unermüdliche Bereitschaft meinen Klagen und emotionalen Ausbrüchen verständnisvoll zu begegnen, mich zu motivieren und aufzuheitern, danken.

Ein herzlicher Dank gilt meinem Freund Thomas Sievert, der mir Verständnis und Geduld in allen Phasen meiner Dissertation entgegenbrachte, mich unterstützte und ermuntert hat.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, meinen Eltern Hedi und Nino Loddo für ihre Aufopferung und ihren Rückhalt und meinem Bruder Guido Loddo, für intellektuelle Anregungen, technisches Know-how sowie kreative Gestaltungsideen, die wichtige Impulse für die Ausgestaltung der Arbeit gaben.

11 Curriculum Vitae

Name:	Loddo	
Vorname:	Catia Mariantonia	
Geburtsdatum:	19.10.1975	
Geburtsort:	Brilon	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Familienstand:	ledig	
Schulbesuch:	1982 - 1986	St. Engelbert-Grundschule, Brilon
	1986 - 1992	Marien-Realschule, Brilon
	1992 - 1995	Mauritius-Gymnasium, Büren Abschluss: Allg. Hochschulreife (Abitur) 06 / 1995
Studium:	10 / 1995 – Ende 2002	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Giessen
Ärztin im Praktikum:	01 / 2003 – 12 / 2003 01 / 2004 – 30.06.2004	Institut für Pathologie, Gießen WZFP Lippstadt-Eickelborn
Assistenzärztin:	seit dem 01.07.2004	WZFP Lippstadt-Eickelborn