

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. Dr. habil F. Sinowatz

**Funktionelle Morphologie des Nebenhodens
des Hundes (*Canis familiaris*)
unter besonderer Berücksichtigung
der Basalzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Evelyn Philipp
aus Ludwigsburg

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Sinowatz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Handler

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

Für meine Mutter und meinen Bruder

I NHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Nebenhoden (Epididymis).....	3
1.1.	Allgemeine Morphologie.....	3
1.2.	Nebenhodenkanälchen (Ductuli efferentes).....	6
1.3.	Nebenhodenkanal (Ductus epididymidis).....	9
2.	Glykohistochemie	18
2.1.	Oligosaccharid-bindende Lektine	22
2.2.	Galektine.....	25
3.	Immunzytochemie	30
3.1.	Cytokeratine	30
3.2.	Claudine.....	34
3.3.	Occludin	36
3.4.	Cyclooxygenase-1 (COX-1)	37
3.5.	Angiotensin II-Rezeptor (AGTR-II)	39
III.	MATERIAL UND METHODEN	41
1.	Untersuchungsmaterial.....	41
2.	Probenentnahme und Fixierung.....	42
2.1.	Probenentnahme	42
2.2.	Fixierung für lichtmikroskopische Untersuchungen.....	43
2.3.	Fixierung für elektronenmikroskopische Untersuchungen	44
3.	Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen	45
3.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	45
3.2.	Trichromfärbung nach Masson-Goldner	45
3.3.	Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus (PAS- Reaktion) mit und ohne Amylaseverdau	46
3.4.	Alcianblau-Färbung	46
4.	Glykohistochemische Färbungen	47

5.	Immunhistochemische Färbungen	50
6.	Transmissionselektronenmikroskopie.....	56
IV.	ERGEBNISSE	57
1.	Lichtmikroskopische Untersuchungen	57
1.1.	Ductuli efferentes	57
1.2.	Ductus epididymidis	61
1.2.1.	Caput epididymidis bzw. Initialsegment	61
1.2.2.	Corpus epididymidis bzw. Mittelsegment	63
1.2.3.	Cauda epididymidis bzw. Terminalsegment.....	65
2.	Glykohistochemische Untersuchungen.....	67
2.1.	Bindungsstellen für Maackia amurensis Agglutinin I (MAA I)	67
2.2.	Bindungsstellen für Sambucus nigra Agglutinin (SNA)....	67
2.3.	Bindungsstellen für Viscum album Agglutinin (VAA)	68
2.4.	Bindungsstellen für Galektin-1 (Gal-1)	72
2.5.	Bindungsstellen für Galektin-3 (Gal-3)	72
2.6.	Bindungsstellen für Galektin-8 (Gal-8)	73
2.7.	Bindungsstellen für Galektin-9 (Gal-9)	73
3.	Immunhistochemische Untersuchungen.....	80
3.1.	Nachweis von Pancytokeratin (PCK)	80
3.2.	Nachweis von Cytokeratin 5 (CK 5)	80
3.3.	Nachweis von Cytokeratin 8 (CK 8)	81
3.4.	Nachweis von Cytokeratin 14 (CK 14).....	81
3.5.	Nachweis von Cytokeratin 15 (CK 15).....	82
3.6.	Nachweis von Cytokeratin 18 (CK 18).....	82
3.7.	Nachweis von Cytokeratin 19 (CK 19).....	82
3.8.	Nachweis von Claudin 1	93
3.9.	Nachweis von Occludin	93
3.10.	Nachweis von Cyclooxygenase 1 (COX-1).....	97
3.11.	Nachweis des Angiotensin II-Rezeptors (AGTR-II)	97
4.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	102

4.1.	Ultrastruktur der Ductuli efferentes	102
4.2.	Ultrastruktur des Caput epididymidis	109
4.3.	Ultrastruktur des Corpus epididymidis.....	115
4.4.	Ultrastruktur der Cauda epididymidis.....	122
V.	DISKUSSION.....	129
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	143
VII.	SUMMARY	145
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	147
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	157
X.	TABELLENVERZEICHNIS.....	158
XI.	VERZEICHNIS DER BILDER	159
XII.	ANHANG.....	163
1.	Lichtmikroskopie	163
2.	Elektronenmikroskopie	165
3.	Ergänzung.....	166
XIII.	LEBENS LAUF	168
XIV.	DANKSAGUNG	169

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Arachidonsäure (Arachidonacid)
ACE	Angiotensin I-Converting-Enzym
AES	Apikaler Epithelsaum
AGTR-II	Angiotensin II-Rezeptor
AK	Antikörper
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Apikalzelle
AZP	Apikales Zytoplasma
BGE	Blutgefäß
BGW	Bindegewebe
BM	Basalmembran
BZ	Basalzelle
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium ²⁺
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cap	Caput epididymidis
Cau	Cauda epididymidis
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CK	Cytokeratin
Cl ⁻	Chlorid ⁻
cm	Zentimeter
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
Cor	Corpus epididymidis
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
De	Ductuli efferentes
F	Fibrozyt
FB	Fibroblast
Fuc	Fucose
G	Granula

GA	Golgi-Apparat
Gal	Galaktose
Gal-1	Galektin-1
Gal-3	Galektin-3
Gal-8	Galektin-8
Gal-9	Galektin-9
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GE	Gefäß
H ⁺	Wasserstoff-Ion
Ha	Halo-Zelle
HCK	High molecular weight Cytokeratins
HZ	Hauptzelle
KZ	Kinozilien
LAMP-1/2	Lysosomal-associated membrane protein 1/2
LCK	Low molecular weight Cytokeratins
LU	Lumen
LY	Lymphozyt
Man	Mannose
MAA I	Maackia amurensis Agglutinin I
MI	Mitochondrien
MPL	Membranphospholipid
MS	Muskelschicht
MTZ	Mastzelle
MV	Mikrovilli
MZ	Muskelzelle
N	Nukleus
Na	Narrow cell
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
NK	Nukleus der Kinozilien tragenden Zellen
NL	Nukleolus
NO	Stickstoff-Monoxid
NZ	Nucleus der zilienlosen Zellen
p.A.	pro Analysis (für analytische Zwecke)
PCK	Pancytokeratin

PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGR-2/4	Prostaglandin-Rezeptoren-2/4
PLA ₂	Phospholipase A ₂
RAS	Renin-Angiotensin-System
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
sGC	soluble Guanylate-Cyclase
SK	Spermienkopf
SMS	Spermienmittelstück
SNA	Sambucus nigra Agglutinin
SNZ	Subnukleäre Zone
SP	Spermien
SPGZ	Supranukleäre Golgi-Zone
STZ	Stereozilien
TIM-3	T-cell immunoglobulin mucin 3
u.a.	unter anderem
u.v.m.	und viele/vieles mehr
V-ATPase	vakuoläre ATPase
VA	Vakuolen
VAA	Viscum album Agglutinin
VE	Vesikel
Z	Zellen
ZP	Zytoplasma

I. EINLEITUNG

Die Reproduktionsmedizin beim Kleintier gewinnt in der tierärztlichen Praxis zunehmend an Bedeutung. Der Nebenhoden spielt dabei als ein Organ des männlichen Reproduktionstraktes eine große Rolle für die Fruchtbarkeit des adulten Rüden und steht auch vor allem bei Fortpflanzungsstörungen im besonderen Fokus der andrologischen Untersuchung.

Erst während der Passage des Ductus epididymidis erlangen die im Hoden noch unbeweglichen und befruchtungsunfähigen Spermien die Fähigkeit, eine Eizelle zu befruchten. Während der epididymalen Spermienreifung erfahren die Spermien verschiedene biochemische, physiologische und morphologische Veränderungen, durch die sie dann ihre volle Bewegungs- und Befruchtungsfähigkeit erlangen (KIRCHHOFF C. & IVELL R., 1995; BUSCH W. & HOLZMANN A., 2001; HERMO L. & ROBAIRE B., 2002). Durch aktive Sekretions- und Resorptionsprozesse wird in den einzelnen Gangabschnitten des Nebenhodens ein spezifisches Milieu im Lumen des Ductus epididymidis geschaffen, das für die funktionelle Ausreifung und Speicherung der männlichen Samenzellen unerlässlich ist (HEES H. & SINOWATZ F., 2000).

Welche Zellen und Mechanismen im Nebenhoden für die Bildung und Aufrechterhaltung dieses luminalen Milieus verantwortlich sind, steht daher schon lange im Interesse der Untersuchungen. Somit wurden schon früh verschiedene Untersuchungen am Nebenhoden zu seiner Ultrastruktur (CHANDLER J.A. et al., 1981; SCHIMMING B.C. & VICENTINI C.A., 2001), zur Histologie (ORSI A.M., 1983; SCHIMMING B.C. et al., 1997), zur Spermienreifung (AMANN R. et al., 1993; KIRCHHOFF C. & IVELL R., 1995) und zur Lokalisation von Glykosidasen, Lektinbindungsstellen und Cytokeratinen (SINOWATZ F. et al., 1979; WAKUI S., 1994; SCHICK B. et al., 2009) durchgeführt. Die genauen Mechanismen der epididymalen Spermienreifung sind aber trotz allem in vielen Details noch nicht geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Morphologie des kaninen Nebenhodens mit konventionellen lichtmikroskopischen, ultrastrukturellen, immun- und glykohistochemischen Methoden untersucht, wobei besonders die funktionelle Morphologie der Basalzellen berücksichtigt wurde, für die neue Arbeiten am Nebenhoden der Ratte eine wichtige Aufgabe bei der Regulation des Milieus im Ductus epididymidis angeben.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Nebenhoden (Epididymis)

1.1. Allgemeine Morphologie

Der Nebenhoden (Epididymis) ist ein paariges Organ und befindet sich zusammen mit dem Hoden (Testis) in den Hodenhüllen (BUSCH W. & HOLZMANN A., 2001).

Der hantelförmige Nebenhoden lagert sich charakteristischerweise der medialen Hodenlängskontur dicht an und ist an dessen Kontaktfläche, dem Margo epididymalis, durch das Gekröse (Mesepididymis) eng mit ihm verbunden bzw. verwachsen. Außerdem ist die Extremitas caudata des Hodens zusätzlich über ein derbsehniges Band, das Ligamentum testis proprium, fest mit dem Nebenhoden-Schwanz verankert (NICKEL R. et al., 1995).

Der Nebenhoden kann makroskopisch in den kranial liegenden Nebenhodenkopf (Caput epididymidis), den schlanken Körper (Corpus epididymidis) und den kugeligen Schwanz (Cauda epididymidis) unterteilt werden (BUSCH W. & HOLZMANN A., 2001). Als unmittelbare Fortsetzung des Nebenhodens folgt der Samenleiter (Ductus deferens) (NICKEL R. et al., 1995), der in den Anfangsteil der Harnröhre mündet (KÖNIG H.E. & LIEBICH H.-G., 2002).

Die mit dem Rete testis im Hoden beginnenden Samenwege finden ihre Fortsetzung in den Nebenhoden durch in Schlingen liegende Kanälchen, die Ductuli efferentes (KÜHNEL W., 2002). Diese durchbrechen am Kopfende des Hodens die derbe bindegewebige Tunica albuginea und gehen in den Nebenhodenkopf über (NICKEL R. et al., 1995). Die Ductuli efferentes vereinigen sich zum tierartig unterschiedlich langen Nebenhodenkanal, dem Ductus epididymidis, welcher beim Rüden nach Nickel et al. (1995) fünf bis acht Meter lang ist.

Der Nebenhodenkopf beherbergt zu großen Teilen die Ductuli efferentes und den Anfangsabschnitt des stark gewundenen Nebenhodenkanals, während im Nebenhodenkörper der mittlere Abschnitt und im Nebenhodenschwanz der Endabschnitt des Nebenhodenkanals zu liegen kommen (WROBEL K.-H., 1990).

Da die makroskopische Gliederung des Nebenhodens in Caput, Corpus und Cauda epididymidis für viele funktionelle Fragestellungen nicht ausreicht, wird der Ductus epididymidis bei den verschiedenen Tierarten nach histologischen, histochemischen und ultrastrukturellen Gesichtspunkten in eine unterschiedliche Anzahl von Segmenten unterteilt. Dieser Einteilung liegen histologische Kriterien, wie Epithelhöhe, Morphologie der Epithelzellen, Weite des Ganglumens sowie Höhe der Stereozilien und sekretorische Aktivität, zu Grunde (CHANDLER J.A. et al., 1981; SINOWATZ F. & WROBEL K.-H., 1985; SCHIMMING B.C. et al., 1997). Die Anzahl und Gliederung der einzelnen Segmente ist tierartlich unterschiedlich, wie in folgenden Beispielen dargestellt:

- Beim Kater wird der Nebenhodengang in 4 Regionen unterteilt (SÁNCHEZ B. et al., 1998).
- Für Hengst, Bulle und Schafbock werden 6 Segmente festgelegt (NICANDER L., 1958).
- In 8 Segmente wird der Ductus epididymidis beim Kaninchen (NICANDER L., 1957) untergliedert.

Auf der Basis von histologischen und zytologischen Merkmalen schlugen Glover und Nicander (GLOVER T.D. & NICANDER L., 1971) für verschiedene Säugetiere eine einheitliche Gliederung des Nebenhodengangs in drei Segmente vor: ein Initial-, ein Mittel- und ein Terminalsegment. Beim Hund bilden demnach die Ductuli efferentes und das Initialsegment den proximalen Hauptteil des Caput epididymidis. Das Mittelsegment kommt im distalen Caputanteil und dem gesamten Corpus epididymidis zu liegen, und das Terminalsegment umfasst die Cauda epididymidis. Diese vorgeschlagene Einteilung in drei Segmente wird von Orsi (ORSI A.M., 1983) und Chandler (CHANDLER J.A. et al., 1981) für den Hunde-Nebenhoden

unterstützt. Busch (BUSCH W. & HOLZMANN A., 2001) gibt für den Hund eine Einteilung in sechs Segmente an. Bei Schimming (SCHIMMING B.C. et al., 1997) hingegen wird beim Hund der Nebenhoden in fünf histologisch getrennte Zonen unterteilt: Im proximalen Caput epididymidis sind Zone I und II lokalisiert, Zone III stellt den distalen Caputanteil und den Corpus epididymidis dar, Zone IV und V befinden sich in der Cauda epididymidis.

Der Spermientransport vom Hoden in den Nebenhoden vollzieht sich zunächst auf der Grundlage des Flüssigkeitsstroms in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti und recti) und im Rete testis (BAMBERG E., 1975). In den Ductuli efferentes wird der Weitertransport von Spermien und Samenflüssigkeit dann zusätzlich durch den Kinozilenschlag der Epithelzellen unterstützt (KÜHNEL W., 2002).

Der Nebenhoden erfüllt als hochdifferenziertes Organ vielfältige Funktionen. Schon lange bekannt sind der Weitertransport und die Speicherung der Spermien. Da aber den Spermien, die den Hoden verlassen haben, noch die Fähigkeit zur gerichteten Vorwärtsbewegung und zur Bindung an die Zona pellucida der Eizelle und damit die Fähigkeit, eine normale Befruchtungskaskade anzustoßen, fehlt, ist der Nebenhoden auch für die Spermienreifung, die sogenannte epididymale oder posttestikuläre Spermienreifung, verantwortlich (KIRCHHOFF C. & IVELL R., 1995). Während der Passage durch den Nebenhoden erfahren die Spermien verschiedene biochemische, physiologische und morphologische Veränderungen, durch die sie dann ihre volle Bewegungs- und Befruchtungsfähigkeit erlangen (BUSCH W. & HOLZMANN A., 2001). Durch aktive Sekretions- und Resorptionsprozesse wird in den einzelnen Gangabschnitten ein spezifisches Milieu geschaffen, das für die funktionelle Ausreifung und Konzentrierung der männlichen Samenzellen unerlässlich ist (HEES H. & SINOWATZ F., 2000).

1.2. Nebenhodenkanälchen (Ductuli efferentes)

Lange Zeit gab es für die Terminologie dieser Kanälchen keine einheitliche Terminologie. Sie wurden zum Beispiel als Ductuli efferentes, Ductuli efferentes testis, Ductuli efferenti, Vasa efferentia, Vasa efferentes und Tubuli efferentes bezeichnet und entweder als Teil des Hodens oder als Teil des Nebenhodens angesehen. Teilweise wurden sie sogar als eigenständiges Organ bezeichnet. Laut der Nomina anatomica veterinaria (International Anatomical Nomenclature Committee, 1980) galten sie dann schließlich offiziell als Teil des Caput epididymidis und werden als Ductuli efferentes bezeichnet (ILIO K.Y. & HESS R.A., 1994).

Aus embryologischen Untersuchungen ist bekannt, dass die Ductuli efferentes umgebildete Urnierenkanälchen sind, die aus dem Rete testis entspringen, die Tunica albuginea durchbrechen und dann stark geschlängelt im Nebenhodenkopf zu liegen kommen (NICKEL R. et al., 1995). Beim Hund stellen laut Nickel, Busch und anderen Autoren 15 – 16 dieser Kanälchen von jeweils 10 bis 20 cm Länge die Verbindung zum Initialsegment des Ductus epididymidis dar (ILIO K.Y. & HESS R.A., 1994; NICKEL R. et al., 1995; BUSCH W. & HOLZMANN A., 2001). Abbildung 1 stellt die unterschiedlichen tierartspezifischen Anordnungen dar, in der die Ductuli efferentes in den Ductus epididymidis übergehen können. Bei Säugetieren gibt es zwei grundsätzliche Möglichkeiten, in welcher Formation die Ductuli efferentes in den Ductus epididymidis eintreten: Bei der ersten Variante laufen die Ductuli efferentes zunächst zu einem Kanal zusammen, welcher dann in den Ductus epididymidis übergeht, (siehe (a) in Abb. 1). Bei der zweiten Variante bilden parallel zueinander verlaufende Ductuli mehrere Eintrittspforten zum Ductus epididymidis, (siehe (b-e) in Abb. 1), wobei diese Mündungsbereiche wiederum tierartlich unterschiedlich gestaltet sind.

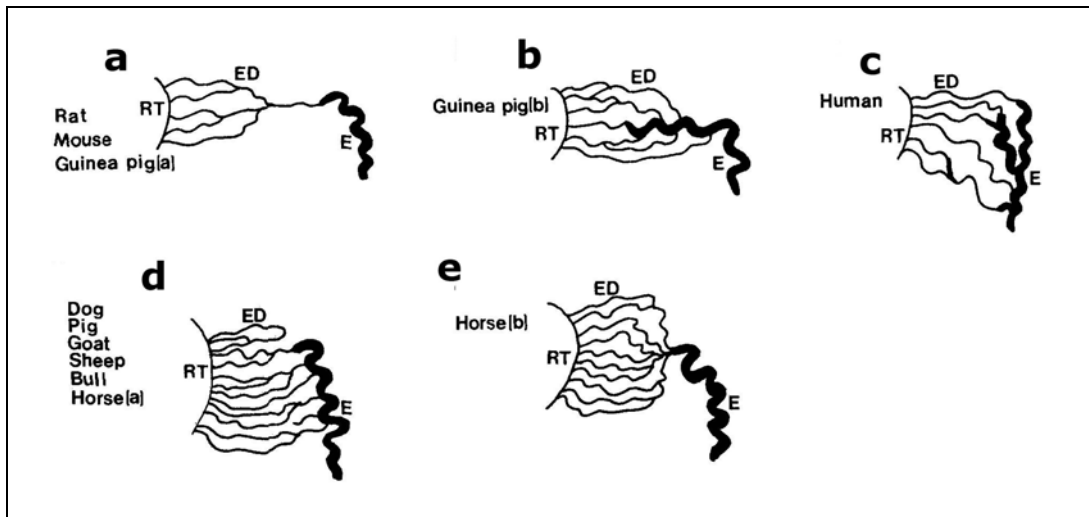


Abbildung 1: Schema des speziesspezifischen Übergangs des ausführenden Kanalsystems in den Ductus epididymidis (E) modifiziert nach Ilio und Hess (ILIO K.Y. & HESS R.A., 1994).

Ein oder zwei stark geknäuelte Ductuli efferentes werden durch Bindegewebe zu einem kegelförmigen Läppchen, einem Conus vasculosus, zusammengefasst. Das Lumen dieser Ductuli ist rund oder leicht gebuchtet, oft sogar sternförmig (WROBEL K.-H., 1990) und enthält typischerweise wenige oder gar keine Spermien (ILIO K.Y. & HESS R.A., 1994). Im Durchschnitt beträgt der Lumendurchmesser $78,7 \mu\text{m}$ ($\pm 25,7 \mu\text{m}$) (SCHICK B., 2006).

Das Epithel der Ductuli efferentes wird von den einzelnen Autoren unterschiedlich beschrieben. Dieses ist nach verschiedenen Angaben mehrreihig und unterschiedlich hoch (ILIO K.Y. & HESS R.A., 1994; HEES H. & SINOWATZ F., 2000; BUSCH W. & HOLZMANN A., 2001), in anderen Angaben wird es als einschichtig iso- bis hochprismatisch beschrieben (WROBEL K.-H., 1990). Immer enthält es aber zilien tragende und zilienlose, sekretorische Zellen. Manchmal wird auch das Vorkommen von Basalzellen erwähnt, bei denen es sich aber nach Ansicht der meisten Autoren um eingewanderte Lymphozyten handelt (HESS R.A., 2002). Außerdem kommen gelegentlich intraepithelial auch Lymphozyten und Makrophagen vor. Beim Hund gibt es relativ wenige Angaben zur Morphologie der Ductuli efferentes. Nach Schick (2006) ist es mehrreihig hochprismatisch und seine durchschnittliche Epithelhöhe beträgt $19 \mu\text{m}$ ($\pm 2,8 \mu\text{m}$) (SCHICK B., 2006).

Die Zilienzellen tragen aktiv bewegliche Kinozilien, besitzen aber im Vergleich zu den zilienlosen Hauptzellen weniger Zellorganellen im Zytoplasma und ihr längsovaler Zellkern befindet sich laut Hess (2002) charakteristischerweise im apikalen Zytoplasmabereich. Die zilienlosen Hauptzellen hingegen weisen an ihren luminalen Apices entweder einen dichten Bürstensaum oder nur einen spärlichen Mikrovillibesatz auf. Zum Teil wölben sich diese Apices auch mit großen Protrusionen in das Lumen vor. Abgeschnürte Protrusionen können teilweise auch im Lumen gefunden werden. Der oft eingekerbte Zellkern der zilienlosen Zellen befindet sich nahe der Basallamina.

Außerdem enthält das Zytoplasma der zilienlosen Zellen zahlreiche Zellorganellen sowie Vakuolen, Granula und Vesikel, was auf eine große Resorptions-Aktivität und auf regen intrazellulären Stoffabbau dieser Zellen schließen lässt (WROBEL K.-H., 1990; HESS R.A., 2002). Zudem dominiert bei diesen Zellen subapikal ein endozytotisches System aus tubulären Invaginationen des Plasmalemm, den sog. „coated vesicles“. In den Vakuolen findet ein Abbau ihres Inhaltes mittels lysosomaler Enzyme statt. Kondensierte Restprodukte dieses intrazellulären Verdauungsprozesses werden als dichte, lichtmikroskopisch PAS-positive Granula in wechselnder Menge und Größe erkennbar (WROBEL K.-H., 1990).

Aufgrund der großen histologischen Vielfalt, mit der die zilienlosen Hauptzellen mit Vakuolen und Granula ausgestattet sind, werden diese Zellen von manchen Autoren weiter unterteilt. So werden zum Beispiel bei Ilio und Hess beim Hund vier Grundtypen von zilienlosen Hauptzellen unterschieden: 1. Zellen mit sehr wenigen Granula und wenig apikalen Vakuolen, 2. Zellen mit basalen und/oder apikalen Granula sowie wenig apikalen Vakuolen, 3. Zellen mit basalen Granula und zahlreichen apikalen Vakuolen und 4. Zellen mit basalen Granula und apikalen Blasen (ILIO K.Y. & HESS R.A., 1994). Bei Wakui werden für den Hund drei Typen dieser Zellart unterschieden: Typ A-Zellen, die weder Granula noch Vakuolen im Zytoplasma enthalten, Typ B mit wenigen apikalen Vakuolen und zahlreichen großen Granula sowie zilienlose Zellen vom Typ C mit einigen apikalen Vakuolen und kleinen basalen Granula (WAKUI S., 1996).

Allgemein kommen im Anfangsabschnitt der Ductuli efferentes mehr zilienlose Hauptzellen vor und die Menge der zilientragenden Zellen nimmt dann in Richtung Ductus epididymidis immer mehr zu. Beschrieben wird aber generell ein Verhältnis von 1:3 bis 1:8 von Zilienzellen zu Hauptzellen (ILIO K.Y. & HESS R.A., 1994; HESS R.A., 2002). An die Basallamina der Ductuli efferentes schließt sich eine dünne Muskelschicht aus 3 bis 6 Zellschichten und eine lockere Bindegewebsschicht an (WROBEL K.-H., 1990; ILIO K.Y. & HESS R.A., 1994).

Funktionell erfüllen die Ductuli efferentes vielfältige Aufgaben. Einerseits spielen sie für den Weitertransport der Spermien eine wesentliche Rolle, zum anderen wird von ihnen zwischen 50 und 90% der testikulär gebildeten luminalen Flüssigkeit resorbiert, was zu einer außerordentlichen Konzentration der Spermien führt. Außerdem sind sie für die Abgabe einiger für die Spermienernährung wichtiger Proteine und Glykokonjugate verantwortlich. Weiter stellt die Phagozytose von Spermien, die Spermiophagie, eine wichtige Funktion der Ductuli efferentes dar, vor allem bei Obstruktionen des Nebenhodens oder auch bei Spermien-Abnormalitäten (HESS R.A., 2002).

1.3. Nebenhodenkanal (Ductus epididymidis)

Der Ductus epididymidis ist ein einzelner, sehr stark aufgeknaulter Kanal, der eingebettet und zusammengehalten von Bindegewebe, die Ductuli efferentes mit dem Samenleiter, dem Ductus deferens, verbindet. Die Länge dieses Kanals variiert zwischen den unterschiedlichen Tierarten und beträgt beim Hund laut Nickel fünf bis acht Meter (NICKEL R. et al., 1995). Die herausragende Bedeutung dieses Ganges wird deutlich aus der Tatsache, dass Spermien, welche den Hoden als unbewegliche Zellen verlassen, nicht im Stande sind, Eizellen zu befruchten. Erst nach der Passage des Nebenhodenkanals können sie als ausgereifte bewegliche Spermien eine Eizelle befruchten. Der Ductus epididymidis spielt somit für die Spermienreifung eine wesentliche Rolle, ist aber auch für den Transport, die

Konzentration, den Schutz und die Speicherung der Spermien verantwortlich (HERMO L. & ROBAIRE B., 2002).

Histologisch wird der Nebenhodenkanal vieler Säugetiere in ein Initial-, ein Mittel- und ein Terminalsegment unterteilt (GLOVER T.D. & NICANDER L., 1971). Diese vorgeschlagene Einteilung in drei Segmente wird von Orsi (ORSI A.M., 1983) und Chandler (CHANDLER J.A. et al., 1981) auch für den Hunde-Nebenhoden angegeben und diente bei meiner Arbeit als Einteilungsgrundlage. Die Ductuli efferentes und das Initialsegment stellen beim Hund somit den proximalen Hauptteil des Caput epididymidis dar. Der distale Caputanteil und das Corpus epididymidis bilden das Mittelsegment, und das Terminalsegment entspricht der Cauda epididymidis.

Die Epithelhöhe nimmt am Übergang der Ductuli efferentes zum Ductus epididymidis stark zu (CHANDLER J.A. et al., 1981). Der Nebenhodengang selbst wird durchgehend von einem zweireihig hochprismatischen Epithel ausgekleidet (BUSCH W. & HOLZMANN A., 2001; SCHICK B., 2006). Die einzelnen Segmente unterscheiden sich allerdings deutlich anhand vieler histologischer und zytologischer Kriterien, wie zum Beispiel der Epithelhöhe, der Stereozilien-Länge sowie der Häufigkeit bestimmter Epithelzelltypen und der Lage ihres Zellkernes.

Bei den verschiedenen Tierarten werden zahlreiche unterschiedliche Typen von Epithelzellen im Nebenhodengang beschrieben. Hermo und Robaire nennen generell Hauptzellen, Basalzellen, Apikalzellen, „Narrow cells“, „Clear cells“ und „Halo cells“ (HERMO L. & ROBAIRE B., 2002). Aber nicht alle dieser Epithelzellarten kommen in jedem Nebenhoden-Segment vor, und auch bei verschiedenen Tierarten, über die bislang Nebenhoden-Studien vorliegen, gibt es erhebliche Unterschiede. Selbst bei der gleichen Tierart gibt es unterschiedliche Klassifikationen der Epithelzelltypen. So beschreibt zum Beispiel Cornwall (2009) in der Ratten-Epididymis Hauptzellen, Basalzellen, Apikalzellen, „Clear cells“ und „Halo cells“ (CORNWALL G.A., 2009). Shum dagegen erwähnt für die Ratte neben Haupt- und Basalzellen, „Narrow cells“ und „Clear cells“ (SHUM W.W.C. et al., 2009).

Beim Hund bilden laut Schimming (2001) Hauptzellen, Basalzellen, Apikalzellen und „Clear cells“ das Epithel des Nebenhodenkanals und mit Ausnahme der „Clear cells“ findet man jede dieser Zellarten in allen drei Segmenten (SCHIMMING B.C. & VICENTINI C.A., 2001). Neben vielen anderen Autoren erwähnen Chandler et al. und Kawakami et al. in älteren Arbeiten über den Hunde-Nebenhoden lediglich Haupt- und Basalzellen (CHANDLER J.A. et al., 1981; KAWAKAMI, 1991). Außerdem können immer auch einige Makrophagen und Lymphozyten im Epithel und im Interstitium des Nebenhodens gefunden werden (HERMO L. & ROBAIRE B., 2002).

In der folgenden Abbildung sind alle Epithelzell-Arten, wie sie bei Hermo und Robaire (2002) beschrieben werden, schematisch dargestellt.

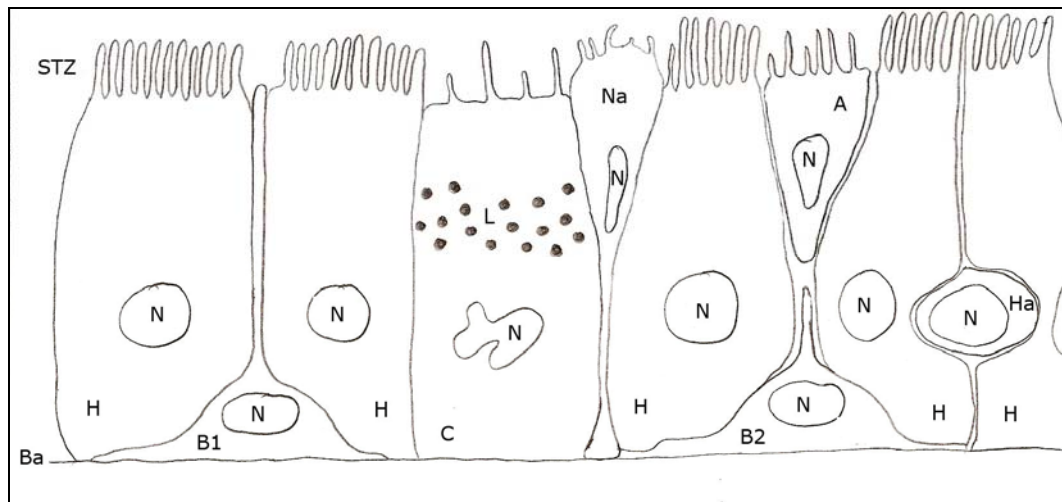


Abbildung 2: Schema der verschiedenen Epithelzell-Typen der Epididymis

N=Zellkern, Ba=Basalmembran, H=Hauptzelle, B1=Basalzelle mit Zytoplasma-Ausläufer zum Lumen, B2=Basalzelle ohne Kontakt zum Lumen, A=Apikalzelle, C=Clear cell, Na=Narrow cell, Ha=Halo-Zelle, L=Lysosomen, STZ=Stereozilien

Die Hauptzellen sind die dominierende Zellart des Nebenhoden-Epithels. Prozentual stellen sie 65-80% der gesamten Epithelzell-Population dar (HERMO L. & ROBAIRE B., 2002). Diese hochprismatischen, schlanken Zellen sitzen der Basalmembran auf und erreichen immer das Ganglumen. Außerdem tragen sie an ihrer apikalen Zelloberfläche zahlreiche Stereozilien, welche zum Teil zu Büscheln verklebt sind (SCHIMMING B.C. & VICENTINI C.A., 2001; SCHICK B., 2006). Ihr Zellkern ist je nach Segment rund oder längsoval und befindet sich im basalen oder mittleren Zytoplasmabereich. Die Hauptzellen unterscheiden sich histologisch zum Teil deutlich durch Unterschiede im Auftreten und der Ausdehnung verschiedener Zellbestandteile sowohl des sekretorischen Apparates, nämlich dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und sekretorischer Granula als auch des endozytotischen Apparates (coated pits, Endosomen, multivesicular Bodies, Lysosomen). Nahezu alle in das Lumen des Nebenhodenganges sezernierten Glykoproteine werden von den Hauptzellen synthetisiert. Ein kleinerer Teil gelangt durch Transsudation aus dem Blutgefäßsystem in das Lumen des Ganges. Neben der sekretorischen Funktion der Hauptzellen gehören auch die Endozytose und die spezifische epididymale Milieu-Regulation durch verschiedene Transport-Systeme zu den wichtigen Aufgaben dieser Zellen (HERMO L. & ROBAIRE B., 2002). Als Beispiel für die durch Hauptzellen exprimierten Transport-Systeme soll hier Aquaporin 9 genannt werden, und neben Phosphatester zählen auch einige Aminosäuren und Oligosacharide zu den von den Hauptzellen endozytierten Verbindungen (SINOWATZ F. & WROBEL K.-H., 1985; HERMO L. & ROBAIRE B., 2002). Vor allem aber die Synthese und anschließende Sekretion von Angiotensin I durch die Hauptzellen (SHUM W.W.C. et al., 2009) soll hier besonders erwähnt werden, um die komplexen Zusammenhänge der pH-Wert-Regulation durch die Interaktion verschiedener Epithelzell-Typen untereinander genauer zu beschreiben.

Die Basalzellen werden schon in frühen Studien über das Nebenhoden-Epithel bei allen Tierarten und in allen drei Segmenten beschrieben (BAMBERG E., 1975; ORSI A.M., 1983; LIEBICH H.-G., 1999; BUSCH W. & HOLZMANN A., 2001). Diese kleinen Zellen liegen der Basalmembran direkt und breit ausgedehnt auf. Ihr runder oder zum Teil länglicher Zellkern nimmt einen großen Teil der Zelle ein und ihr spärliches Zytoplasma enthält nur wenige Zellorganellen. Neben einem kleinen Golgi-Apparat sind einige Mitochondrien vom Cristae-Typ und verstreut angeordnete Zisternen des endoplasmatischen Retikulum zu sehen (SCHIMMING B.C. & VICENTINI C.A., 2001). Bislang wurde angenommen, dass die Basalzellen das Lumen des Nebenhodenkanals nicht erreichen, und auch die Aufgabe dieser Zellen war lange Zeit unklar. Die relativ weit verbreitete Hypothese, dass die Basalzellen Stammzell-Funktion besitzen, wurde aber mittlerweile widerlegt (YEUNG C.H. et al., 1994).

Shum et al. konnten 2008 erstmals an der Ratte mittels konfokaler 3D-Laser-Scanning-Mikroskopie nachweisen, dass Basalzellen lange schmale Zytoplasma-Ausläufer besitzen, welche das Lumen des Nebenhodenkanals erreichen. Durch die Expression eines Angiotensin II-Rezeptors an der Oberfläche dieses Ausläufers sollen sie an der luminalen pH-Wert-Regulation mitbeteiligt sein (SHUM W.W.C. et al., 2008; SHUM W.W.C. et al., 2009). Laut Shum et al. beeinflussen die Basalzellen das luminaire pH-Milieu wie folgt: Die Hauptzellen synthetisieren und sezernieren Angiotensin I (ANG I) in das Lumen des Nebenhodenganges. Das von den Spermien exprimierte Angiotensin I-Converting-Enzym (testikuläre ACE) wird ebenfalls in das Lumen abgegeben. Daraufhin wird durch das testikuläre ACE Angiotensin I zu Angiotensin II umgesetzt. Das sich somit nun im Luminalplasma befindliche Angiotensin II (ANG II) bindet an den Angiotensin II-Rezeptor (AGTR-II) der Basalzellen, welcher sich an deren Zytoplasmaausläufer befindet. Durch diese Rezeptor-Bindung kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Stickstoff-Monoxid (NO) in den Basalzellen, welches anschließend weiter in die „Clear cells“ diffundiert. Die NO-Diffusion in die „Clear cells“ führt weiterhin dazu, dass die lösliche Guanylatzyklase (= soluble guanylate cyclase = sGC) der

„Clear cells“ vermehrt cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) umsetzt. Das nun in erhöhtem Maße vorliegende cGMP induziert letztendlich innerhalb der „Clear cells“ eine gesteigerte Aktivität von V-ATPase an der Stereozilien tragenden apikalen Plasmamembran der „Clear cells“. Somit kommt es zu einer Protonen-Sekretion in das Luminalplasma der Epididymis (SHUM W.W.C. et al., 2008; SHUM W.W.C. et al., 2009).

In Abbildung 3 wird diese Interaktion zwischen Basalzellen und Clear cells nochmals schematisch verdeutlicht. Für den Hund wurde bisher kein Kontakt von Zytoplasma-Ausläufern der Basalzellen mit dem Lumen des Ductus epididymidis nachgewiesen. In dieser Arbeit wird dies allerdings spezifisch weiter untersucht.

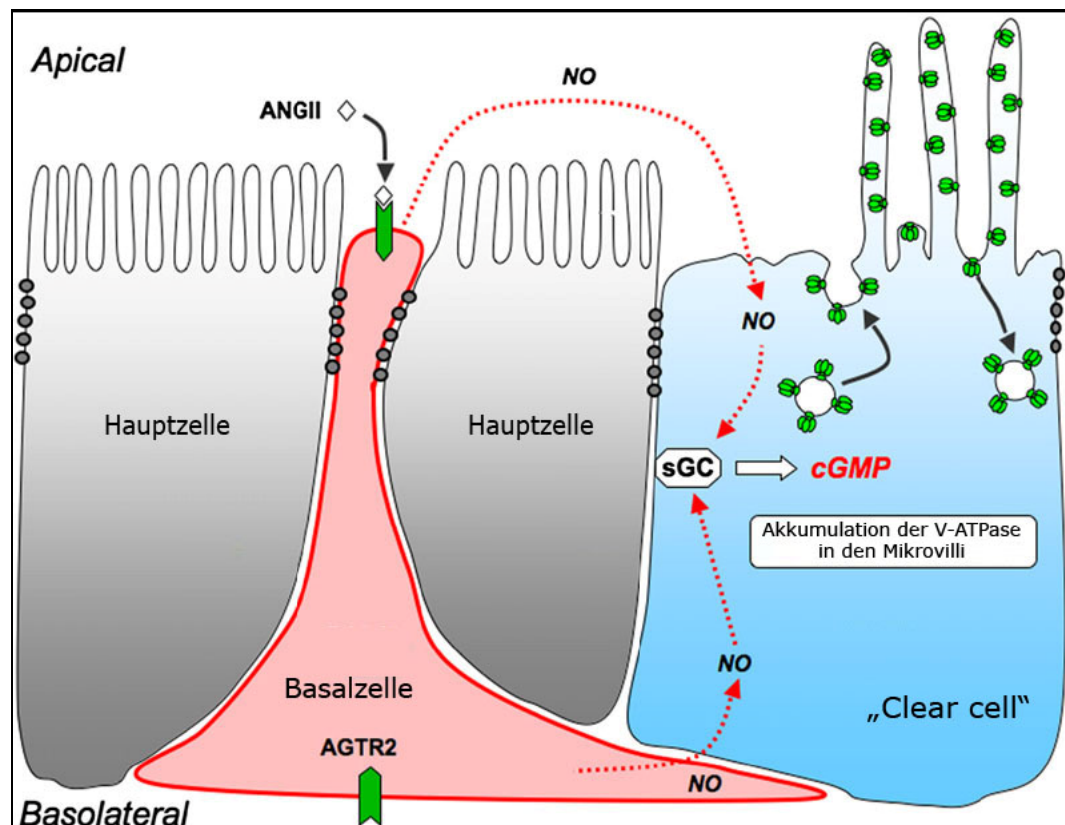


Abbildung 3: Schema der Zell-Interaktion zwischen Basalzelle und „Clear cell“ modifiziert nach Shum et al. (SHUM W.W.C. et al., 2008)

Die Apikalzellen haben ihren Namen aufgrund ihrer charakteristischen Lage in den supranukleären Epithelbereichen erhalten. Sie befinden sich immer in unmittelbarer Nähe zur lumennahen Epithelgrenze. Die Apikalzellen tragen ebenfalls Stereozilien an ihrer apikalen Plasma-

membran. Das besondere an diesen Zellen ist, dass sie wahrscheinlich die Basalmembran nicht berühren und einen auffällig hohen Gehalt an Mitochondrien aufweisen (PALACIOS J. et al., 1991; SCHIMMING B.C. & VICENTINI C.A., 2001). Laut Schimming lassen sich diese Zellen in allen drei Nebenhoden-Segmenten finden (SCHIMMING B.C. & VICENTINI C.A., 2001). Über die Funktion dieser Zellen ist bisher wenig bekannt, es wird aber eine Endozytose-Fähigkeit vermutet und es wurde nachgewiesen, dass sie einige proteolytische Enzyme enthalten (HERMO L. & ROBAIRE B., 2002).

Die „Clear cells“, oder auch „helle Zellen“ genannt, kommen laut Shum und Schimming bis auf das Initialsegment in allen Nebenhoden-Abschnitten vor. Auch im Anfangsteil des Ductus deferens sind sie zu finden (SCHIMMING B.C. & VICENTINI C.A., 2001; SHUM W.W.C. et al., 2009). Sie besitzen einen runden Zellkern und ihr Zytoplasma färbt sich bei verschiedenen Übersichtsfärbungen (Hämatoxylin-Eosin, Goldner) meist nur schwach an (DOMENICONI R.F. et al., 2007). Außerdem tragen „Clear cells“ deutlich weniger Stereozilien als die Hauptzellen (HERMO L. & ROBAIRE B., 2002). Histologisch auffällig bei diesen Zellen ist, dass sich im apikalen Zytoplasmabereich zahlreiche coated pits, Vesikel, Endosomen, multivesicular Bodies und Lysosomen verschiedener Größe befinden sowie unterschiedliche Mengen von Lipid-Tropfen zu erkennen sind. All dies wird als Anzeichen für eine intensive Endozytose-Aktivität der „Clear cells“ gewertet. Vor allem die Aufnahme des zytoplasmatischen Tropfens der Spermien wird von Schimming, Hermo und Cornwall als Aufgabe dieser Zellen genannt (SCHIMMING B.C. & VICENTINI C.A., 2001; HERMO L. & ROBAIRE B., 2002; CORNWALL G.A., 2009). Darüber hinaus exprimieren diese Zellen in hohem Maße das Enzym V-ATPase (Vakuoläre ATPase) an ihrer apikalen Zellmembran. Die V-ATPase stellt die dominante primäre Protonenpumpe vieler Plasmamembranen eukaryotischer Zellen dar, sie transportiert H^+ -Ionen unter ATP-Spaltung. Somit spielen diese „Clear cells“ eine wichtige Rolle für die Ansäuerung des luminalen Milieus in den distalen Nebenhoden-Abschnitten, welche für den Ruhezustand der Spermien während ihrer Ausreifung und weiteren Speicherung essentiell ist. Die Anzahl der „Clear cells“ im Epithel

nimmt von den proximalen zu den distalen Regionen des Nebenhodens bei verschiedenen Spezies signifikant zu, und am häufigsten kommen sie im Epithel des Terminalsegmentes vor. Hier dürften aber deutliche Speziesunterschiede bestehen. So lassen sich in der Cauda epididymidis des Rindes keine „Clear cells“ nachweisen. Bei Spezies mit vielen „Clear cells“ steigt ihr Beitrag zur luminalen Ansäuerung nach distal deutlich an. Zur Zeit wird folgendes Konzept diskutiert: Während die Hauptzellen in den vorderen Abschnitten des Nebenhodengangs durch Bicarbonat-Sekretion zunächst dafür sorgen, dass die Reifungs-Aktivität der Spermien gefördert wird, sind die weiter distal im Kanalsystem des Ductus epididymidis gelegenen „Clear cells“ dafür verantwortlich, den pH-Wert wieder zu senken, um den Ruhezustand der Spermien für die weitere Speicherung zu gewährleisten. Die pH-Wert-Regulierung durch die Aktivität der V-ATPase der „Clear cells“ wird zusätzlich durch die oben beschriebene Interaktion mit den Basalzellen unterstützt (SHUM W.W.C. et al., 2009).

Die „Narrow cells“ oder auch „Stiftchenzellen“ sind nach ihrer charakteristischen Form benannt. Diese allgemein schlanken Zellen sitzen nur über einen sehr dünnen Zytoplasma-Ausläufer zur Basalmembran dieser auf und werden erst lumenwärts etwas breiter. Alle Zellorganellen sowie der Zellkern befinden sich ausschließlich im apikalen Bereich; auffällig an diesen Zellen sind die zahlreichen kelchförmigen Vesikel, die im Apikalbereich auftreten. Diese Vesikel sind beteiligt an der Endozytose und Sekretion von H^+ -Ionen ins Lumen durch Recycling zur und weg von der apikalen Plasmamembran (HERMO L. & ROBAIRE B., 2002). Auch die „Narrow cells“ exprimieren wie die „Clear cells“ die Protonenpumpe V-ATPase. Somit nehmen auch diese Zellen Einfluss auf den pH-Wert und auf das spezifische Milieu der luminalen Nebenhoden-Flüssigkeit (SHUM W.W.C. et al., 2009). „Narrow cells“ werden zwar nicht bei Arbeiten über den Hunde-Epididymis erwähnt, dafür aber bei den Spezies Ratte, Maus, Hamster, Rind, Ameisenigel und dem Menschen beschrieben (HERMO L. & ROBAIRE B., 2002). Nach Shum treten sie bei der Ratte allgemein in recht geringer Menge und auch ausschließlich im Initialsegment auf

(SHUM W.W.C. et al., 2009).

Die Halo-Zellen (Halo cells) sind definiert als kleine runde Zellen mit einem schmalen Zytoplasma-Saum. Oft wurden sie als Lymphozyten oder Monozyten angesehen. Sie dürften verschiedene Lymphozyten-Populationen umfassen, wie T-Helfer-Zellen, zytotoxische T-Lymphozyten und eventuell auch Makrophagen (HERMO L. & ROBAIRE B., 2002). Cornwall beschreibt die Halo-Zellen als Vorläufer-Immune Zelle des Nebenhodens (CORNWALL G.A., 2009), jedoch werden diese Zellen bislang für das Nebenhoden-Epithel des Hundes nicht erwähnt.

Auf die Basallamina folgt nach außen hin eine dünne Lage von Bindegewebszellen und dann eine Schicht aus glatten Muskelzellen, welche je nach Segment eine unterschiedliche Anzahl an Lagen aufweist. Spontane peristaltische Kontraktionen dieser Muskelschicht sorgen für einen langsamen, aber gleichmäßigen Weitertransport der Spermien. Angefangen beim Initialsegment nach distal in Richtung Terminalsegment ändern sich bestimmte histologische Kriterien des Nebenhodenkanals wie folgt:

- Die Epithelhöhe nimmt kontinuierlich ab.
- Die Stereozilienlänge verringert sich deutlich.
- Im Lumen befinden sich immer mehr und immer dichter gepackte Spermien.
- Der Lumen-Durchmesser erweitert sich signifikant.
- Die sich an das Epithel außen anschließende Muskelschicht nimmt deutlich an Stärke zu.

Außen an die Muskelschicht folgt daraufhin noch lockeres Bindegewebe, in welches neben Blutgefäßen auch Nervenfasern und Lymphgefäße eingebettet sind (SCHICK B., 2006).

2. Glykohistochemie

Kohlenhydrate stellen bei einer Vielzahl von biologischen Erkennungsprozessen wichtige Signalmoleküle dar. Kovalent an Proteine, Lipide und andere biologische Komponenten gebunden, dienen sie in Form von Glykoproteinen, Glykolipiden, Proteoglykanen oder Phosphoinositolen als Bestandteil zellulärer Strukturelemente. So entstehen zum Beispiel räumlich zugängliche Zuckerantennen, die von einer Zelloberfläche in den extrazellulären Raum ragen, welche als Andockpunkte sowohl für wirtseigene als auch für pathogene Bindungspartner genutzt werden können. Aufgrund einer sehr großen Vielfalt möglicher Zuckerkonjugate, bildet sich auf diese Weise das individuelle Glykosylierungsmuster einer Zelle (FUKUDA M. & Vliegenthart J., 1999; LOHR M., 2005). Die Rezeptormoleküle, welche an diese Saccharidstrukturen binden können, lassen sich in 3 Gruppen unterteilen: 1. Enzyme, welche den katalytischen Umsatz von Zuckern und Glykokonjugaten vermitteln. 2. Antikörper, welche durch das Immunsystem beeinflusst an Kohlenhydratstrukturen binden und 3. Kohlenhydrat bindende Proteine, die weder immunogenen Ursprungs noch enzymatisch aktiv sind. Die Proteine der letztgenannten Gruppe werden als Lektine bezeichnet (BARONDES S.H., 1988). Nach Gabius müssen außerdem Sensor- bzw. Carrierproteine für freie Mono- und Oligosaccharide von den als Lektin definierten Proteinen unterschieden werden (GABIUS H.-J., 2009). Die ersten entdeckten Lektine waren pflanzlichen Ursprunges, doch im Laufe der Zeit ließen sich Lektine auch in Pilzen, Mikroorganismen und vielen Tierarten (Schwämme, Nematoden, Knochenfische, Amphibien, Reptilien, u. a.) nachweisen. Bei Pflanzen befinden sich die Lektine hauptsächlich in Speicherorganen wie Samen, Wurzeln, Knollen, Zwiebeln, aber auch in der Rinde und in Blättern (RÜDIGER H. & GABIUS H.-J., 2001; LOHR M., 2005; GABIUS H.-J., 2009).

Chemisch betrachtet sind die meisten Lektine Glykoproteine, die aus zwei bis acht Untereinheiten bestehen können. Alle Lektinmoleküle tragen charakteristischerweise mindestens zwei Bindungsstellen für Kohlenhydrateinheiten, wobei jede ihrer Untereinheiten in der Regel nur eine dieser Zuckerbindungsstellen besitzt. Das Vorhandensein der

zwei Zuckerbindungsstellen pro Lektinmolekül ist essentiell für die Fähigkeit zur Agglutination von Zellen. Fast alle Lektine gehören zu den Metalloproteinen, welche Calcium- und Manganionen binden können. Beim Fehlen dieser Ionen kommt es zum Verlust der kohlenhydratbindenden Aktivität (GOLDSTEIN I.J. & HAYES C.E., 1978; PÜHLER A. et al., 2000; SCHICK B., 2006). Aufgrund der Bindungsspezifität für verschiedene Kohlenhydrate wurden die Lektine 1986 von Goldstein und Poretz in sieben Gruppen eingeteilt (GOLDSTEIN I.J. & PORETZ R.D., 1986). Tabelle 1 zeigt diese verschiedenen Gruppen allerdings modifiziert nach Gabius mit einigen Beispielen. Nach neuesten Untersuchungen von Gabius et al. (2011) stellt sich die Zuckerspezifität der einzelnen Lektine aber deutlich komplexer dar und steht noch im Fokus aktuellster Untersuchungen, wodurch die hier angegebene Einteilung wahrscheinlich demnächst abgeändert werden wird (GABIUS H. et al., 2011)

Tabelle 1: Zuckerspezifität der Lektine nach Goldstein & Poretz (1986) modifiziert nach Gabius

Zuckerspezifität	Abkürzung	Herkunft
I. D-Mannose/D-Glukose bindende Lektine	Con A	<i>Canavalia ensiformis</i> (Schwertbohne)
	LCA	<i>Lens culinaris</i> (Speiselinse)
	PSA	<i>Pisum sativum</i> (Erbse)
II. D-Galaktose bindende Lektine	PNA	<i>Arachis hypogaea</i> (Erdnuß)
	GSA I	<i>Griffonia simplicifolia</i> (afrik.Schwarzbohne)
	RCA I und II	<i>Ricinus communis</i> (Rizinusbohne)
	ECA	<i>Erythrina cristagalli</i> (Korallenstrauch)
III. N-Acetyl-D-Galaktosamin bindende Lektine	LBA	<i>Phaseolus limensis</i> (Limabohne)
	SBA	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)
	HPA	<i>Helix pomatia</i> (Weinbergschnecke)
	BPA	<i>Bauhinia purpurea</i> (Orchideenbaum)

	MPA	<i>Maclura pomifera</i> (Milchorangenbaum)
	DBA	<i>Dolichos biflorus</i> (afrik. Pferdebohne)
	SJA	<i>Sophora japonica</i> (chin. Schnurbaum)
IV. N-Acetyl-D-Glukosamin bindende Lektine	WGA	<i>Triticum vulgare</i> (Weizen)
	UEA II	<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)
	GSA II	<i>Griffonia simplicifolia</i> (afrik. Schwarzbohne)
	LAA	<i>Laburnum alpinum</i> (Alpen-Goldregen)
	STA	<i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)
V. L-Fukose bindende Lektine	UEA I	<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)
	LTA	<i>Lotus tetragonolobus</i> (Rote Spargelerbse)
VI. Oligo-saccharid-bindende Lektine	MAA I	<i>Maackia amurensis</i> (Asiatisches Gelbholz)
	SNA	<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)
	VAA	<i>Viscum album</i> (Weißbeerige Mistel)
	PHA-E/-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Gartenbohne)

Da Lektine die Fähigkeit besitzen, spezifisch an membranständige und gelöste Kohlenhydratstrukturen zu binden, sind sie somit in der Lage, diese in Glykoproteinen und Glykolipiden vorkommenden Zuckerreste zu lokalisieren und zu identifizieren (GOLDSTEIN I.J. & HAYES C.E., 1978). Aufgrund dieser Eigenschaft werden Lektine als histochemische Reagentien eingesetzt, um das Glykosylierungsmuster verschiedener Zellen und Gewebe bestimmen zu können (RÜDIGER H. & GABIUS H.-J., 2001; GABIUS H.-J., 2009). Der Einsatz der Lektine spielt demnach heutzutage eine große Rolle in der Histochemie.

Ausgenommen der Oligosaccharid-spezifischen Lektine aus Gruppe VI. wurden 2009 von Schick schon 14 Lektine aller anderen Gruppen für Studien am Hunde-Nebenhoden verwendet und ausführlich beschrieben (SCHICK B. et al., 2009). In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Oligosaccharid-bindenden Lektine MAA I und SNA sowie VAA eingesetzt. In Kapitel 2.1 wird noch näher auf diese drei Vertreter der Pflanzen-Lektine eingegangen.

Die große Gruppe der tierischen Lektine wurde durch Vergleiche der Aminosäure-Sequenzen und der Topologie der Kohlenhydrat-bindenden Domäne („Carbohydrate Recognition Domain“ = CRD) in 5 Hauptgruppen unterteilt. Die Galektine stellen eine dieser fünf Familien dar.

In Tabelle 2 werden die Hauptfamilien der tierischen Lektine mit ihren jeweiligen Zucker-Bindungspartnern dargestellt (GABIUS H.-J., 2001).

Tabelle 2: Hauptfamilien der tierischen Lektine nach Gabius (2001)

Familie	Strukturmotiv	Kohlenhydrat-Ligand
C-Typ	Konservierte CRD mit Ca ²⁺ -Ionen	Variabel, u. a. Mannose, Galaktose, Fukose, Heparin-Tetrasaccharid
I-Typ	Immunglobulin-ähnliche CRD	Variabel, u. a. Man ₆ GlcNAc ₂ , HNK-1 Epitop, Hyaluronsäure, α2,3/α2,6-Sialyllaktose
Galektine (früher S-Typ)	Konservierte CRD	Galβ1,3(4)GlcNAc Basisstrukturen mit Spezies- und Galektintyp-abhängigen Affinitätsunterschieden für die Verlängerung zu den Blutgruppenepitopen A, B oder H; Affinität auch zu Poly-(N-Acetyllaktosamin)-Ketten
Pentraxine	Diskus ähnliche Aggregation zu Pentameren	4,6-Ringacetale von β-Galaktose, Galaktose, sulfatierte und phosphorylierte Monosaccharide
P-Typ	Konservierte CRD	Mannose-6-Phosphat-enthaltende Glykoproteine

CRD=Carbohydrate Recognition Domain

Neben dieser auf Strukturmotiven basierenden Einteilung kann man die tierischen Lektine auch nach ihren bisher bekannten Funktionen einteilen (LOHR M., 2005). Bei der hier vorliegenden Arbeit über den Hunde-Nebenhoden wurden vier verschiedene Vertreter der Galektine

verwendet. In Kapitel 2.2 wird noch speziell auf die Familie der Galektine eingegangen.

2.1. Oligosaccharid-bindende Lektine

Eine Gruppe aus den Pflanzenlektinen sind die Oligosaccharid-spezifischen Lektine. Einige Vertreter dieser Gruppe können als potenten Bindungspartner auch die Sialinsäure haben. Unter dem Begriff Sialinsäuren werden die mittlerweile mehr als 40 bekannten N- und O-Acetyl-derivate der Neuraminsäure zusammengefaßt. Die Neuraminsäure (systematischer Name: 5-Amino-3,5-Dideoxy-D-Glycero-D-Galakto-Nonulosonsäure) ist ein aus neun Kohlenstoffatomen bestehender saurer Aminozucker, der in der Natur allerdings nur in substituierter Form vorliegt. Dabei stellt die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) die einfachste und am häufigsten vorkommende Form der Sialinsäuren dar. Die große strukturelle Vielfalt entsteht durch die Substitution einer oder mehrerer Hydroxylgruppen bzw. des Acetylrestes an der Aminogruppe. Zu einer weiteren Steigerung der Strukturvielfalt kommt es durch Kombinationen der einzelnen Modifikationen sowie durch unterschiedliche Verknüpfungen der Sialinsäuren mit subterminalen Zuckern (POMMERENCKE J., 2000; BELICZEY J., 2003).

Die Sialinsäuren kommen als natürlicher Baustein in Gangliosiden (Glycosphingolipide) vor und bilden häufig die terminalen Enden an den Kohlenhydrat-Seitenketten von Glykoproteinen und Glykolipiden (LEHMANN F. et al., 2006; GABIUS H.-J., 2009). Aufgrund dieser exponierten terminalen Anordnung auf Zelloberflächen spielen sie oft eine zentrale Rolle als Liganden bei den verschiedensten Zellerkennungs- und Adhäsionsvorgängen. Neben den wirtseigenen Zellen werden die terminalen Sialinsäurereste sowohl von pathogenen als auch nicht-pathogenen Viren, Bakterien und Protozoen als Ligand genutzt (BELICZEY J., 2003; LEHMANN F. et al., 2006). Mit dem Einsatz von verschiedenen Lektinen, welche ganz spezifisch an bestimmte Sialinsäuren binden, ist man nun in der Lage, das Verteilungsmuster der Neuraminsäurederivate unterschiedlicher Zellen

und Gewebe zu identifizieren.

Unter den Pflanzenlektinen gehören SNA, MAA I und VAA zu den Vertretern, bei denen die Sialinsäure-Komponente als möglicher Bindungspartner untersucht wird. Das Sambucus nigra Agglutinin, mit der Abkürzung SNA, aus dem schwarzen Holunder bindet an Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc. Das Maackia amurensis I Leukoagglutinin, unter der jetzigen Abkürzung MAA-I (die früher benutzte Abkürzung war MAL-I), aus dem asiatischen Gelbholz bindet an Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc/Glc, und auch 3'-Sulfatierung wird toleriert. Das Viscum album Agglutinin, VAA abgekürzt, aus der weißbeerigen Mistel, welches an Gal β 2(3)Gal, Gal α 3(4)Gal, Gal β 3(4)GlcNAc ohne oder mit α 2,6-Sialylation und Fuc α 2Gal bindet (GABIUS H.-J., 2009). Die definitive Einordnung von VAA in eine Gruppe der oben dargestellten Tabelle 1 ist noch nicht geklärt. Nach aktuellster Meinung von Univ.-Prof. Dr. Gabius (Lehrstuhl für physiologische Chemie der LMU München) kann dieses Lektin auch in die Gruppe II. der D-Galaktose bindenden Lektine eingeordnet werden.

Der histochemische Einsatz dieser drei Lektine an Nebenhoden-Proben, ist bisher nur für den Menschen sowie für die Tierarten Ratte, Maus und Eber beschrieben, wobei nur bei der Maus auch VAA verwendet wurde. Die Ductuli efferentes reagierten dabei konstant negativ auf VAA. Positive Apikalzellen wurden in geringer Anzahl nur in Segmenten des Caput epididymidis gefunden. Bei den Hauptzellen des Nebenhoden-Epithels variierte die VAA-Reaktivität folgendermaßen: Negativ im ersten Caput-Segment, jedoch positive Ergebnisse der restlichen Caput-Segmente für das apikale und basale Zytoplasma sowie die Golgi-Zone. Die Hauptzellen des Corpus und der Cauda zeigen hingegen deutlich VAA-positive Stereozilien und eine VAA-negative Golgi-Zone. Die Spermien in Caput, Corpus und Cauda zeigen ebenfalls deutlich positive Reaktionen auf VAA. Auch die Basalzellen, mit Ausnahme derer im Cauda-Bereich, reagieren positiv (LOHR M. et al., 2010).

Die Ergebnisse für SNA am Nebenhoden unterscheiden sich deutlich zwischen den bisher untersuchten Tierarten. Für die Ductuli efferentes gibt es positive Reaktionen beim Menschen, jedoch gänzlich negative

Resultate bei der Maus; wohingegen bei Ratte und Eber die Ductuli efferentes überhaupt nicht untersucht wurden. Die Apikalzellen zeigen auch nur beim Menschen positive Reaktivität und werden sowohl bei der Maus als auch beim Eber als negativ beschrieben. Die Hauptzellen des Nebenhoden-Epithels reagieren hingegen bei allen dieser Spezies positiv in Caput, Corpus und Cauda, allerdings mit unterschiedlicher Intensität der einzelnen Zellareale. Intraluminal gelegene Spermien zeigen wiederum bei der Maus intensive positive SNA-Reaktivität, jedoch bei Mensch und Eber sind negative Ergebnisse zu verzeichnen. Bei den Basalzellen ließen sich bei Maus, Ratte und Eber nur negative Resultate feststellen, wobei beim Menschen die Basalzellen positiv auf SNA reagierten (ARENAS M.I. et al., 1998; UEDA T. et al., 1998a; CALVO A. et al., 2000; LOHR M. et al., 2010).

Die bisherigen Studien für MAA I der oben genannten Tierarten für die Epididymis zeigen ebenso variierende Ergebnisse. Die Ductuli efferentes sind wiederum für Ratte und Eber nicht untersucht, wohingegen bei der Maus positive und beim Menschen negative MAA I-Reaktivität beschrieben wird. Allerdings zeigen die Apikalzellen sowohl bei der Maus als auch beim Menschen Positivität in allen drei Nebenhoden-Segmenten, nur beim Eber gab es negative Ergebnisse für diese Zellart auf MAA I. Die Hauptzellen des Caput-Bereiches werden bei allen vier Spezies mit positiver Reaktion beschrieben, aber ab dem Corpus ließen sich positive Hauptzellen nur noch bei Ratte, Eber und Mensch finden, bei der Maus allerdings waren diese Zellen nur noch negativ bis hin zur Cauda. Die Basalzellen von Ratte und Eber zeigten positive Ergebnisse im Vergleich zu Maus und Mensch, bei denen nur negative Basalzellen zu finden sind. Unterschiedliche MAA I-Ergebnisse liegen auch für die im Lumen gelegenen Spermien vor, diese zeigen nämlich bei der Maus in allen drei Segmenten keine Reaktivität, bei Eber und Mensch sind sie wiederum positiv auf MAA I beschrieben (ARENAS M.I. et al., 1998; UEDA T. et al., 1998a; CALVO A. et al., 2000; LOHR M. et al., 2010).

2.2. Galektine

Die Galektine sind eine Gruppe der großen Familie von tierischen Lektinen, welche während der Evolution der Tiere hoch konserviert geblieben sind. Diese Gruppe besteht aus Ca^{2+} -unabhängigen, β -Galaktosid-spezifischen Lektinen mit einem „Sandwich“-Faltungsmuster für antiparallele β -Faltblätter. Nach ihrer Synthese, welche an Polyribosomen des Zytoplasmas und nicht an am endoplasmatischen Retikulum gebundenen Ribosomen stattfindet, werden sie über einen noch unbekanntem Sekretionsmechanismus aus der Zelle transportiert. Die Galektine teilen eine bemerkenswerte Ähnlichkeit der Sequenz für die Kohlenhydrat-Bindungsregion, der sogenannten „Carbohydrate Recognition Domain“ = CRD, miteinander. Sie sind im Tierreich weit verbreitet, und bis jetzt wurden bei den Säugetieren verschiedener Spezies sowie in einer großen Vielzahl von Geweben 14 Galektine identifiziert. Sie können auf Zelloberflächen, im Zytoplasma und sogar im Zellkern vorkommen. Durch Vergleiche von Sequenzen und Strukturmotiven der einzelnen Galektine untereinander wird deutlich, dass sie sich noch weiter in Untergruppen einteilen lassen. Die Art, wie die CRD´s angeordnet sind, stellt einen Schlüsselparameter für die Bildung von Untergruppen dieser Lektinfamilie dar. Es werden drei Untergruppen unterschieden, welche in Tabelle 3 aufgeführt sind (LIU F.-T. et al., 2002; LOHR M., 2005)

Tabelle 3: Galektin-Untergruppen nach Lohr (2005) und Liu (2002)

Gruppen-Typ	Zugehörige Galektine	Merkmale der Gruppe
Galektine vom Proto-Typ	Galektine 1,2,5,7, 10, 11, 13 und 14	Eine Domäne enthält die CRD; Sie können in einer oxidativen Umgebung unter Verlust ihrer Bindungsaktivität intramolekulare Disulfidbrücken bilden
Galektine vom Chimären-Typ	Galektin 3	Dieser Typ kann mit seinem N-terminalen Bereich kovalent mit anderen Galektin 3-Monomeren verknüpft werden, was als Voraussetzung für die Agglutination und Bindung an immobilisierte Glykoliganden wie IgE oder Laminin gilt; auffallend Prolin- und Glycinreiche Domäne
Galektine vom Tandem-repeat Typ	Galektine 4,6,8,9 und 12	Bei diesen wird anstelle einer nicht-kovalenten Dimerbildung ein Verbindungsprotein eingeführt, das kovalent zwei CRD´s miteinander verbindet

CRD=Carbohydrate Recognition Domain

Es wird für die Galektine eine Vielzahl an Funktionen beschrieben. Laut Gabius zählen zu diesen folgende (GABIUS H.-J., 2009):

- Brückenbildung zwischen Molekülen
- Induktion oder Suppression von Effektoren-Freisetzung z.B. H₂O₂, Cytokine, usw.
- Kontrolle des Zellwachstums und Induktion von Apoptose/Anoikis
- Zellwanderung und Routing

- Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Interaktionen
- Zusammenbau des Matrixnetzwerkes
- Intrazelluläre Wegweisung von Glykoproteinen und Vesikeln (Galektin 3 und 4)

Für einige Galektine ist genauer bekannt, dass sie eine bedeutende Rolle speziell bei Entzündungsprozessen und im Zusammenhang mit Immunreaktionen spielen, wie z.B. bei den Galektinen 1, 3 und 9. Als multivalente lösliche Moleküle können Galektine generell ihre Liganden auf verschiedenen Zellen quervernetzen und so Immunantworten auf parakrine oder autokrine Weise als funktionelle Mediatoren für Zell-Zell-Interaktionen modulieren, und sie können auf diese Weise ganze Signaltransduktions-Kaskaden induzieren. Sie fungieren als Adhäsions-Moleküle und sind durch die Netz-Bildung bestehend aus Galektinen und Glykokonjugaten somit in der Lage, die Glykocalyx verschiedener Zellen zu modifizieren. Durch diese Vernetzungs-Fähigkeit wird möglicherweise die laterale Mobilität von Oberflächen-Rezeptoren vermindert, wodurch wiederum die Reizschwelle einer Rezeptor-vermittelten Signalweiterleitung erniedrigt wird.

Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass Galektine auch an gewissen Schritten der Tumorentwicklung beteiligt sind, wie zum Beispiel bei der Immunmodulation, der Metastasen-Bildung und der Tumor induzierten Angiogenese. Da die Tumorentstehung oft von Entzündungsprozessen begleitet ist, könnte vor allem Galektin 3 mit seinen pro-inflammatorischen Funktionen zu dieser maßgeblich beitragen.

Eine herausragende Funktion der Galektine im Zusammenhang mit dem Immunsystem ist außerdem das Erkennen mikrobieller oder parasitärer Glykokonjugate, wodurch wiederum entweder eine positive oder negative Immunantwort herbeigeführt werden kann. Galektin 3 und 9 erkennen beispielsweise Kohlenhydratkomponenten von *Leishmania major*, und Galektin 1 und 3 stimulieren als zytotoxischen, antipathogenen Mechanismus den oxidativen Burst in neutrophilen Granulozyten (GABIUS H.-J., 2009).

In der hier vorliegenden Arbeit am Epididymis des Hundes wurden die Bindungsstellen der Galektine 1, 3, 8 und 9 näher untersucht. Bei der komplexen Interaktion zwischen Galektinen und ihren Kohlenhydrat-Liganden tragen mehrere Faktoren zu einer hohen Bindungs-Affinität bei. Dazu zählen die natürliche Multivalenz und der oligomere Zustand der Galektine sowie die Multivalenz ihrer natürlichen Kohlenhydrat-Liganden. Die einfachste β -Galaktosid-Struktur, welche von Galektinen erkannt wird, ist das Disaccharid Gal β 1-4GlcNAc (RAPOPORT E. et al., 2010). Bei diesen einfachen β -Galaktosiden ist jedoch die Bindungs-Affinität relativ gering. Im Gegensatz dazu liegt bei der Galektin-Bindung an natürliche komplexere Glykokonjugate auf Zelloberflächen oder der extrazellulären Matrix eine wesentlich höhere Affinität vor. Jede Galektin-CRD erkennt verschiedene Typen von Kohlenhydrat-Liganden und zeigt seine maximale Bindungs-Affinität an verschiedenen dieser Kohlenhydrat-Strukturen.

Galektin 3 beispielsweise bindet fest an Sequenzen mit sich wiederholenden [-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-]_n oder poly-N-Acetyllactosamin, welche mindestens drei bis vier dieser Einheiten enthalten. Hierbei ist jedoch das Vorhandensein einer terminalen β -Galaktose bedeutungslos. Galektin 1 hingegen bindet ebenfalls gut an lange poly-N-Acetyllactosamin-Ketten, aber in diesem Fall ist ein terminaler β -Galaktose-Rest dringend erforderlich. Desweiteren bindet Galektin 3 nur schwach an einzelne N-Acetyllactosamin-Einheiten. Die Bindungsaffinität an diese Einheiten wird aber massiv gesteigert, wenn der vorletzte Galaktose-Rest mit Gal β 1-3, GalNAc α 1-3 oder Fuc α 1-2 substituiert ist. Im Gegensatz dazu erniedrigen aber derartige Substitutionen die Bindung von Galektin 1 dramatisch. Galektin 8 besitzt zwei CRD's innerhalb eines Polypeptides, wobei die aminotermine CRD an einen unterschiedlichen Kohlenhydrat-Liganden als die carboxy-terminale CRD bindet (CUMMINGS R.D. L.F., 2009). Vor allem die Hydroxyl-Gruppen an C4 und C6 der Galaktose und an C3 und C4 des N-Acetylglucosamins spielen generell eine wichtige Rolle für die Galektin-Bindung (RAPOPORT E. et al., 2010).

Die wichtigsten Bindungspartner für Galektine stellen Liganden auf Zelloberflächen und der extrazellulären Matrix dar. Für Galektin 1 und 3 gehören Proteine der Basalmembran wie Laminin und Fibronectin, membranständige Rezeptoren wie die Integrine $\alpha 7\beta 1$ und $\alpha 1\beta 1$, die T-Zell-Glykoproteine CD43 und CD45 sowie Lysosomen-assoziierte Membranproteine wie LAMP-1 und LAMP-2 und Vitronectin zu den natürlichen Liganden. Galektin 8 zeigt eine große Bindungs-Affinität innerhalb der extrazellulären Matrix zu den Integrinen $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$ und zu einer CD44-Variante. Galektin 9 bindet an TIM-3, einem membrangebundenen T-Zell Immunglobulin ähnlichen Protein mit O-glykosidischer Bindung. Diese Interaktion trägt zur T-Helfer-Zell-Immuniät und zur Toleranz-Entwicklung bei (CUMMINGS R.D. L.F., 2009).

Über Galektin-Bindungsstellen im Nebenhoden ist bislang wenig bekannt.

3. Immunzytochemie

3.1. Cytokeratine

Alle eukaryotischen Zellen werden von einem feinfädigen Netzwerk, dem Zytoskelett durchzogen, welches sich als hochdynamisches System den zellulären Erfordernissen effizient anpassen kann. Das Zytoskelett kann aufgrund chemischer und morphologischer Kriterien in drei Komponenten unterteilt werden: Die Mikrotubuli, die Mikrofilamente und die Intermediärfilamente. Diese drei Zytoskelett-Komponenten spielen unter anderem bei der Aufrechterhaltung der Zellform, bei Bewegungsvorgängen der Zelle, bei Transportprozessen im Zytoplasma und bei der Zellteilung eine große Rolle. Eine wichtige Untergruppe der Intermediärfilamente stellen die Cytokeratine dar.

Die Intermediärfilamente bestehen aus faserigen Polypeptiden und haben einen Durchmesser von etwa 8-10 nm. Ihr Durchmesser liegt zwischen jenem der Mikrofilamente und dem der Mikrotubuli, weswegen sie als Intermediärfilamente bezeichnet werden. Intermediärfilamente sind die stabilste Komponente des Zytoskelettes und werden aufgrund chemischer Strukturunterschiede in fünf Klassen weiter unterteilt (HEES H. & SINOWATZ F., 2000).

In Tabelle 4 werden diese fünf Klassen aufgeführt (HEES H. & SINOWATZ F., 2000; PALLARI H.-M. & ERIKSSON J.E., 2006).

Tabelle 4: Klassifikation der Intermediärfilamente

Klasse	Protein	Vorkommen
I	Saure Keratine	Epithelzellen, Derivate der Epidermis
II	Basische Keratine	Epithelzellen
III	Vimentin Desmin Glial Fibrillary Acidic Protein	Mesenchymale Zellen Muskelzellen Astrozyten, andere Gliazellen
IV	Neurofilamentäres Tripletprotein (NF-L, NF-M, NF-H) Nestin Synemin	Nervenzellen Neuroepitheliale Stammzellen, Myoblasten Muskelzellen, ZNS-Entwicklung
V	Nukleäre Lamine	Zellkern

Die Cytokeratine, welche häufig auch nur als Keratine bezeichnet werden, sind von Moll (1982) aufgrund ihres Wanderungsverhaltens bei der Isoelektrischen Fokussierung und des SDS-PAGE-Verfahrens in zwei Klassen unterteilt worden (MOLL R. et al., 1982). Die Cytokeratine 1-8 werden zu der Gruppe der basischen bis neutralen Typ II-Keratine gezählt, während die Cytokeratine 9-19 als saure Typ I-Keratine bezeichnet werden. In den letzten Jahren wurden zunehmend immer mehr Cytokeratine bzw. ihre Gene entdeckt, welche nicht problemlos in das „Moll-System“ eingegliedert werden konnten. Im Jahr 2004 kam es dann zur Überarbeitung der Cytokeratin-Nomenklatur durch die „Human and Mouse Gene Nomenclature Committees“. Ab diesem Zeitpunkt wurden die 54 menschlichen Cytokeratine, katalogisiert anhand ihrer Gene, in drei Kategorien eingeteilt: 1. Epitheliale Keratine/Gene, 2. Haar-

Keratine/Gene und 3. Keratin-Pseudogene. Außerdem ist in diesem System eine vierte Kategorie für Keratine anderer Säugetiere vorgesehen, welche bis dahin unbekannt waren oder als Pseudogene im menschlichen Genom vorliegen. Nach wie vor werden aber in jeder dieser vier Kategorien weiterhin die Typ I- und Typ II-Keratine unterschieden. Tabelle 5 zeigt die Einteilung der Keratine nach der neuen Nomenklatur (SCHWEIZER J. et al., 2006; GU L.-H. & COULOMBE P.A., 2007).

Tabelle 5: Keratin-Kategorien nach neuer Nomenklatur

Kategorie	Keratin-/Gen-Nummer
Human Typ I Epithel-Keratine	9-28
Human Typ I Haar-Keratine	31-40
Nonhuman Typ I Epithel- und Haar-Keratine	41-70
Human Typ II Epithel-Keratine	1-8 und 71-80
Human Typ II Haar-Keratine	81-86
Nonhuman Typ II Epithel- und Haar-Keratine	87-120
Typ II Keratin-Pseudogene	121-220
Typ I Keratin-Pseudogene	221->

Alle Cytokeratin-Moleküle teilen eine dreigliedrige Grund-Struktur, bestehend aus einer hoch konservierten und zentralen α -Helix, einer variablen N-terminalen Kopf-Domäne sowie einer variablen C-terminalen Schwanz-Domäne. Die α -Helix besitzt konstante Länge, die Kopf- und Schwanz-Abschnitte variieren jedoch in Länge und Primärstruktur zwischen den einzelnen Cytokeratinen. Diese Cytokeratin-Monomere werden allerdings „in vivo“ nicht gefunden. Es muss grundsätzlich zur Bildung eines Heterodimers kommen, bestehend aus jeweils einem Typ I-Keratin und einem Typ II-Keratin (GU L.-H. & COULOMBE P.A., 2007; ORIOLO A.S. et al., 2007; ERIKSSON J.E. et al., 2009).

Funktionell stellen die Cytokeratine einen wichtigen Baustein des Zytoskelettes dar und gewährleisten so die Stabilität und Form der Zelle. Desweiteren wirken sie bei der Determination der Zellgröße, der Translation, der Proliferation, dem zellspezifischen Organellentransport und der malignen Transformation der Zellen mit. Außerdem können sie zahlreiche Signalkaskaden und metabolische Prozesse beeinflussen. Eine weitere bedeutende Funktion der Cytokeratine ist der Schutz gegenüber zellulärem Stress. Durch die gezielte Phosphorylierung bilden die Cytokeratine einen zytoprotektiven Puffer gegenüber Stress-induzierter Kinase-Aktivität. Dies wird deutlich an Vergleichs-Studien mit „Knock-Out“ Maus-Modellen (ERIKSSON J.E. et al., 2009), bei denen nach gezielten Mutationen die Cytokeratin-Phosphorylierung fehlt und es bei diesen Tieren daraufhin zu verschiedenen Gewebeschäden kommt. In der Histochemie spielen sie eine große Rolle als Marker für bestimmte Gewebe und können für die pathologische Diagnostik von großem Nutzen sein, um den Ursprungsort entarteter Zellen zu ermitteln (PALLARI H.-M. & ERIKSSON J.E., 2006; SCHWEIZER J. et al., 2006; GU L.-H. & COULOMBE P.A., 2007; MAGIN T.M. et al., 2007; ERIKSSON J.E. et al., 2009; LEE C.-H. & COULOMBE P.A., 2009).

Bisherige Untersuchungen zum Nachweis verschiedener Cytokeratine im männlichen Geschlechtsapparat liegen für die menschliche Prostata, den Nebenhoden des Menschen und für den Nebenhoden des Hundes vor (PALACIOS J. et al., 1993; WAKUI S., 1994; LEENDERS G.J.L.H.V. et al., 2001). Für den menschlichen Nebenhoden wurden die Antikörper-Kombination AE1/AE2 für die Cytokeratine (CKs) 1-8, 10, 13-15 und 19, Pancytokeratin-Antikörper für die CKs 5,6 und 8, die Antikörper-Kombination für die CKs 10 und 11 sowie Antikörper für Cytokeratin (CK) 19 verwendet. Negativ fielen die Ergebnisse für die CKs 10 und 11 bei allen drei Nebenhoden-Abschnitten und für alle beschriebenen Epithelzelltypen, nämlich die Hauptzellen, die Basalzellen und die Apikalzellen, aus. Die AE1/AE2- und die PanCK-Antikörper markierten dagegen alle diese Epithelzellen im Caput, Corpus und in der Cauda epididymidis als deutlich positiv. Positive Reaktivität auf CK 19 zeigte sich bei Hauptzellen der Cauda

epididymidis sowie bei Apikalzellen und Basalzellen aller drei Nebenhoden-Abschnitte (PALACIOS J. et al., 1993). Bei der Epididymis des Hundes wurden Antikörperkombinationen für „low molecular weight Cytokeratins“ (LCK) und „high molecular weight Cytokeratins“ (HCK) verwendet. LCK beinhaltet in dieser Studie die CKs 8, 18 und 19 und unter HCK wurden die CKs 1,5, 10 und 11 zusammengefasst. Die HCK-Antikörper-Kombination reagierte in nahezu allen Abschnitten und für fast alle beschriebenen Epithelzelltypen negativ. Nur die Basalzellen des Corpus epididymidis reagierten für HCK schwach positiv. Ganz im Gegensatz dazu zeigte sich auf die LCK-Antikörper eine deutlich positive Reaktivität bei Apikalzellen und Hauptzellen in allen drei Abschnitten des Ductus epididymidis. Außerdem waren die Basalzellen von Caput und Corpus epididymidis sowie die zilienträgenden Zellen der Ductuli efferentes positiv (WAKUI S., 1994). Beim Nachweis von Cytokeratinen in der Prostata des Menschen wurden Prostataproben von gesunden Patienten mit Proben von malignen Prostatatumoren verglichen. In dieser Studie zeigten sich die Basalzellen des gesunden Prostataepithels deutlich positiv auf CK 5 und 14 (LEENDERS G.J.L.H.V. et al., 2001).

3.2. Claudine

Die Claudine sind eine wichtige Gruppe von Transmembran-Proteinen, welche einen wesentlichen Bestandteil der „Tight junctions“ darstellen. Die physiologische epididymale Spermienreifung wird wahrscheinlich durch ein spezifisches luminales Mikromilieu ermöglicht. Die Bildung und Aufrechterhaltung des pH-Wertes dieses spezifischen Milieus im Lumen des Nebenhodens setzt eine intakte Blut-Nebenhoden-Schranke voraus, um den parazellulären Transport vom Blut zum Lumen des Ductus epididymidis zu regulieren. Diese Blut-Nebenhoden-Schranke wird gebildet aus „Tight junctions“ und „Adhering junctions“ zwischen benachbarten Epithelzellen des Nebenhodens. Bis heute konnten 20 Claudine in verschiedenen Geweben identifiziert werden. Oft findet man die Claudine in „Tight junctions“ mit Occludin, einem weiteren Transmembran-Protein, kolokalisiert, aber auch ein alleiniges Vorkommen von Claudin in „Tight junctions“ ist möglich (GREGORY M.

et al., 2001; GREGORY M. & CYR D.G., 2006; CYR D.G. et al., 2007b; DUFRESNE J. & CYR D.G., 2007; DUBÉ É. et al., 2010). Für Claudin 1 wurde außerdem das Vorkommen von Claudin auch außerhalb von „Tight junctions“ nachgewiesen. Dieses Claudin ist als Adhäsions-Molekül bei anderen Zell-Zell-Verbindungen beteiligt, da es immunhistochemisch an Zellgrenzen nachgewiesen werden kann, an denen keine „Tight junctions“ vorkommen (GREGORY M. et al., 2001; CYR D.G. et al., 2007a; DUFRESNE J. & CYR D.G., 2007).

Die immunhistochemischen Nachweise von Claudin 1 und anderen Claudinen im Nebenhoden liegen für die Spezies Mensch, Maus und Ratte vor (GREGORY M. et al., 2001; CYR D.G. et al., 2007b). Im Nebenhoden der Ratte reagieren die Ductuli efferentes negativ auf Claudin 1. Positive Reaktivität zeigt sich dagegen deutlich an den lateralen Plasmamembranen benachbarter Hauptzellen, an welchen sich die „Tight junctions“ befinden. Außerdem reagieren die Kontaktflächen zwischen Hauptzellen und Basalzellen intensiv positiv, und auch die basalen Areale der Zellmembran der Epithelzellen zeigen positive Reaktivität. Diese Ergebnisse lassen sich nicht mit dem Vorkommen von „Tight junctions“ vereinbaren. Bindegewebe, Muskelschichten und Lumeninhalt reagierten beim immunhistochemischen Nachweis von Claudin 1 negativ (GREGORY M. et al., 2001).

Am Nebenhoden des Menschen reagieren ebenfalls sowohl die Zellmembranen benachbarter Hauptzellen und die Kontaktflächen zwischen Haupt- und Basalzellen in allen drei Gangabschnitten positiv mit Antikörpern gegen die Claudine 1, 3 und 4 (CYR D.G. et al., 2007a). Obwohl die immunhistochemischen Ergebnisse zwischen den drei Epididymisabschnitten nahezu keine Intensitätsunterschiede zeigen, wird generell beschrieben, dass im Caput epididymidis die „Tight junctions“ einen komplexeren Aufbau besitzen als in den folgenden zwei Abschnitten (CYR D.G. et al., 2007a).

3.3. Occludin

Occludin ist ein weiteres Transmembran-Protein und war das erste Protein dieser Gruppe, welches in „Tight junctions“ identifiziert wurde. Auch dieses Protein ist als ein wichtiger Bestandteil von „Tight junctions“ an der Bildung der Blut-Nebenhoden-Schranke und damit an der Aufrechterhaltung des intraluminalen Flüssigkeitsmilieus im Nebenhodengang beteiligt. Occludin wurde außer im Nebenhoden in einer Vielzahl von weiteren Geweben nachgewiesen (CYR D.G. et al., 2002; CYR D.G. et al., 2007b).

Über den Occludinnachweis im Nebenhoden liegen Studien für die Tierarten Maus, Hase und Hund vor. Bei der Maus tritt Occludin beim immunhistochemischen Nachweis als punktförmige positive Reaktivität an den apikalen Plasmamembranen der Ductuli efferentes in Erscheinung. Außerdem reagieren im proximalen Initialsegment die Bereiche der „Narrow cells“ deutlich positiv. In den weiteren distalen Nebenhodensegmenten findet man positive Ergebnisse für Occludin an den apikalen Plasmamembranen der Hauptzellen und an den apikalen Grenzflächen zwischen den Hauptzellen. Basalzellen, Bindegewebe und intraluminale Spermien reagieren negativ (CYR D.G. et al., 1999). Beim Hund wird ausschließlich eine schwache Immunoreaktivität im apikalen Bereich an den lateralen Zellmembranen der Hauptzellen und im Zytoplasma der Hauptzellen für das Corpus epididymidis beschrieben (GYE M., 2004). Für den Nebenhoden des Hasen (*Lepus sinensis coreanus*) gibt es folgende Ergebnisse für den immunhistochemischen Nachweis von Occludin: Im Caput epididymidis reagieren die lateralen und apikalen Kontaktflächen zwischen den Hauptzellen positiv, ebenso zeigen im Corpus epididymidis das Zytoplasma der Hauptzellen sowie deren basolaterale und apikale Kontaktflächen positive Resultate. Die stärkste Immunfärbung zeigt sich im Bereich der Cauda epididymidis; hier ist das Zytoplasma der Hauptzellen sehr intensiv angefärbt. Zudem findet man in allen Abschnitten eine schwach positive Reaktion in der glatten Muskulatur des Nebenhodenganges (YOON S. et al., 2009).

3.4. Cyclooxygenase-1 (COX-1)

Die Cyclooxygenasen (COX) sind wesentliche Enzyme in der Kaskade der Prostaglandinsynthese. Es gibt die zwei Isoenzyme, COX-1 und COX-2, die sich durch ihren Genlocus, eine leicht unterschiedliche Struktur und ihr Vorkommen in verschiedenen Zelltypen unterscheiden. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Transport von Elektrolyten und Wasser durch das Epithel des Nebenhodens durch verschiedene Peptidhormone wie Angiotensin II, Lysylbradykinin, Endothelin und Vasopressin beeinflusst wird. Dieser Einfluss wird durch die Enzymaktivität der Cyclooxygenase-1 möglich, da diese von Epithelzellen des Nebenhodens exprimiert wird. Bei der Ratte war COX-1 in allen drei Nebenhodenabschnitten ausschließlich in den Basalzellen lokalisiert. Da kürzlich gezeigt werden konnte, dass auch Basalzellen bei der Ratte das Lumen des Ductus epididymidis erreichen können, wurde postuliert, dass Basalzellen eine wichtige Rolle bei der Regulation des intraluminalen Milieus spielen könnten (WONG P.Y.D. et al., 1999; WONG P.Y.D. et al., 2002; LEUNG G.P.H. et al., 2004; CHEUNG K.-H. et al., 2005). Verschiedene Peptidhormone binden an Rezeptoren, die von Basalzellen exprimiert werden. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂), diese führt zur Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus Membranphospholipiden (MPL). Diese Arachidonsäure wird durch COX-1 erst zu Prostaglandin G₂ (PGG₂) umgesetzt und anschließend durch eine Peroxydase zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) umgebaut. Durch eine spezifische Isomerase wird dann aus PGH₂ das Prostaglandin E₂ (PGE₂) gebildet. Das PGE₂ diffundiert daraufhin aus der Basalzelle und bindet an die Prostaglandin-Rezeptoren-2/4 (PGR-2/4) der basolateralen Membran der Hauptzellen. Aufgrund dieser Bindung kommt es in den Hauptzellen zu einer gesteigerten Produktion von cAMP (= cyclisches Adenosinmonophosphat), welches wiederum apikale Anionen-Kanäle, sogenannte CFTR-Kanäle (CFTR = Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), aktiviert. Somit kommt es durch die CFTR-Kanäle zu einer Cl⁻-Sekretion und sekundär zusätzlich zu einem Wassertransport in das Lumen des Nebenhodenganges (WONG P.Y.D. et al., 1999; WONG P.Y.D. et al., 2002; LEUNG G.P.H. et al., 2004; CHEUNG K.-H. et al., 2005).

In Abbildung 4 soll die Rolle von COX-1 für die Regulation der Anionen-Sekretion schematisch dargestellt werden. Diese Erkenntnisse sind ein weiterer Hinweis für die wichtige Funktion der Basalzellen in Bezug auf die Beeinflussung des spezifischen epididymalen Flüssigkeitsmilieus im Lumen.

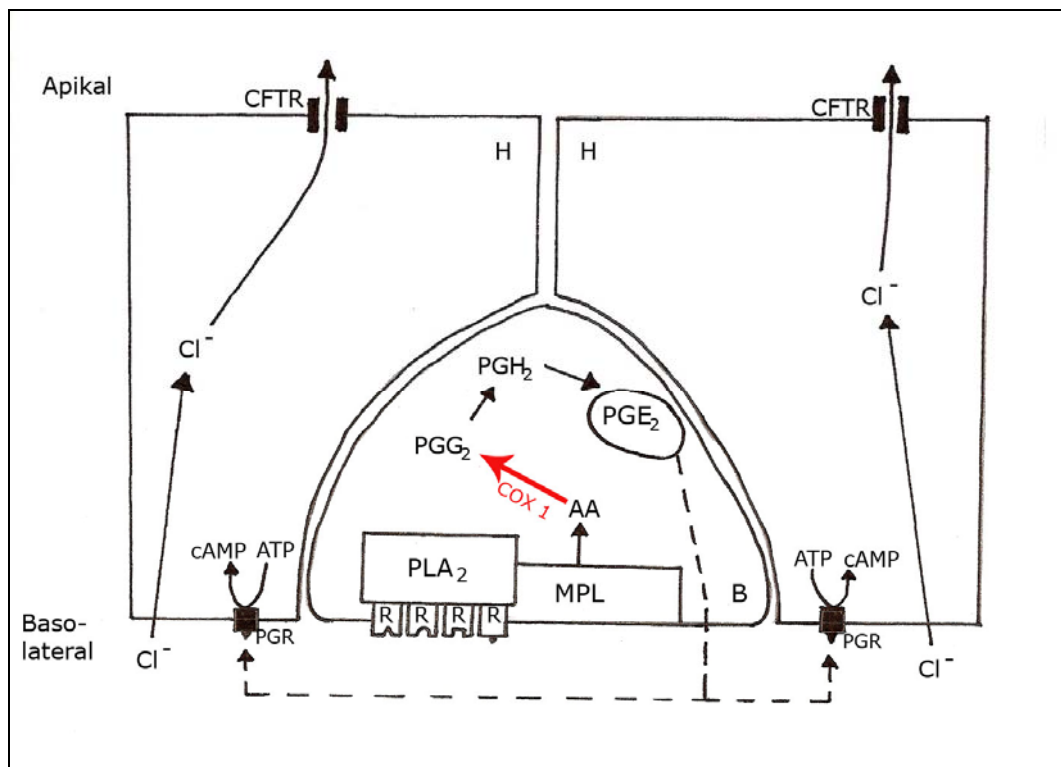


Abbildung 4: Regulation der Anionen-Sekretion mit COX-1 Beteiligung
 AA=Arachidonsäure, ATP=Adenosintriphosphat, B=Basalzelle, cAMP=cyclisches Adenosinmonophosphat, CFTR=Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, Cl⁻=Chlorid, COX-1=Cyclooxygenase-1, H=Hauptzelle, MPL=Membranphospholipid, PG(E₂,G₂,H₂)=Prostaglandin (E₂,G₂,H₂), PGR=Prostaglandin-Rezeptor, PLA₂=Phospholipase A₂, R=Rezeptor für verschiedene Peptidhormone

3.5. Angiotensin II-Rezeptor (AGTR-II)

Wie schon in den Kapiteln 1.3 und 3.4 erläutert, spielt das Hormon Angiotensin II eine wichtige Rolle bei der Regulation von Epithelzellen des Ductus epididymidis. Alle Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) kommen im Lumen des Nebenhodens vor und nehmen eine Schlüsselrolle für die männliche Fertilität ein. Dies wird unter anderem durch Studien an Spermien von ACE-„Knock out“-Mäusen deutlich, welche aufgrund fehlender testikulärer ACE nicht in der Lage sind, Eizellen zu befruchten (SHUM W.W.C. et al., 2008; SHUM W.W.C. et al., 2009).

Für die Bindung des Angiotensin II existieren zwei Rezeptor-Subtypen, AGTR-II Typ 1 und Typ 2, welche auch beide im Nebenhodenepithel nachgewiesen werden können. AGTR-II Subtyp 1 wurde bei der Ratte immunhistochemisch im basalen Bereich des Epithels gefunden, hierbei wurde jedoch die genaue Zellart, welche den Rezeptor exprimiert, nicht erwähnt. Zudem zeigten die Corpus- und Cauda-Abschnitte deutlich intensivere Ergebnisse als das nur schwach positive Caputsegment. Außerdem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Bindung von Angiotensin II an seinen Rezeptor in der basolateralen Zellmembran zu einer Aktivierung der Anionen-Sekretion in den Hauptzellen kommt (LEUNG P.S. et al., 1997). Der AGTR-II Subtyp 2 konnte von Leung et al. (1997) ebenfalls im basalen Bereich des Nebenhoden-Epithels identifiziert werden, aber auch in dieser Untersuchung wurde nicht erwähnt, in welcher Zellart der Rezeptor exprimiert wird. Bei diesem Subtyp reagierte vor allem der Caudabereich stark positiv (LEUNG P.S. et al., 1997).

Shum et al. konnten 2009 an der Ratte nachweisen, dass AGTR-II Subtyp 2 ausschließlich von den Basalzellen des Epididymis exprimiert wird. Dieser Rezeptortyp konnte außerdem an einem Zytoplasma-Ausläufer der Basalzelle identifiziert werden, welcher Kontakt zum Nebenhodenlumen aufweist. Damit konnte neben einer basolateralen Stimulation auch eine luminale Rezeptorbindung von Angiotensin II nachgewiesen werden. Durch die von den Spermien exprimierte testikuläre ACE wird Angiotensin I, welches von den Hauptzellen produziert wird, zu Angiotensin II umgesetzt. Das sich im

Luminalplasma befindliche Angiotensin II bindet daraufhin an den AGTR-II Subtyp 2 der Basalzell-Zytoplasmaausläufer. Durch diese Rezeptor-Bindung kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) in den Basalzellen, welches anschließend weiter in die „Clear cells“ diffundiert. Die NO-Diffusion in die „Clear cells“ führt dazu, dass die lösliche Guanylatzyklase (= soluble guanylate cyclase = sGC) der „Clear cells“ vermehrt cGMP (cyclisches Guanosin-monophosphat) umsetzt. Das nun in erhöhtem Maße vorliegende cGMP induziert letztendlich innerhalb der „Clear cell“ eine gesteigerte Aktivität von V-ATPase an der Stereozilien-tragenden apikalen Plasmamembran der „Clear cells“. Somit kommt es zu einer Protonen-Sekretion in das Luminalplasma der Epididymis (SHUM W.W.C. et al., 2008; SHUM W.W.C. et al., 2009). Somit leisten die Basalzellen einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung des luminalen pH-Milieus, welches für die physiologische Spermienreifung essentiell ist.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung dienten die Nebenhoden von 18 Hunden (*Canis familiaris*), die in der kurativen Praxis kastriert wurden. Alle Tiere waren klinisch gesund und sowohl die Hoden als auch die Nebenhoden erschienen makroskopisch unverändert. Die zur Untersuchung verwendeten Tiere wurden für diese Arbeit in drei Altersgruppen eingeteilt und pro Altersgruppe 6 Tiere untersucht. Innerhalb jeder dieser drei Altersgruppen sind die 6 Tiere außerdem in eine leichte und eine schwere Gewichtsklasse eingeordnet worden. Alle Tiere unter 10 kg Körpergewicht wurden in die leichte Gewichtsklasse eingeteilt und ab 10 kg Körpergewicht waren sie der schweren Gewichtsklasse zugeordnet.

Tabelle 6 liefert eine Übersicht über die zur Probenentnahme verwendeten Tiere.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Tiere

Altersgruppe 1: 0 bis jünger 1,5 Jahre

Nummer	Rasse	Alter	Gewicht
1	Jack Russel Mix	11 Monate	7,8 kg
2	Dackel - Mix	1 Jahr	9,7 kg
3	Jack Russel	1 Jahr	7,6 kg
4	Dobermann	8 Monate	24,5 kg
5	Labrador - Mix	11 Monate	17,0 kg
6	Golden Retriever	13 Monate	27 kg

Altersgruppe 2: 1,5 Jahre bis jünger 3 Jahre

Nummer	Rasse	Alter	Gewicht
7	Pinscher - Mix	1,5 Jahre	7,7 kg
8	Chihuahua	2 Jahre	3,0 kg
9	Zwergpinscher	2 Jahre	7,2 kg
10	Mischling	2 Jahre	18,0 kg
11	Mischling	2 Jahre	20,0 kg
12	Schnauzer - Mix	1 Jahr 10 Monate	12,5 kg

Altersgruppe 3: 3 Jahre und älter

Nummer	Rasse	Alter	Gewicht
13	Westhighland - Terrier	3,5 Jahre	7,0 kg
14	Yorkshire - Terrier	4 Jahre	2,0 kg
15	Jagdterrier	3 Jahre	6,0 kg
16	Labrador - Mix	3 Jahre	15,0 kg
17	Border Collie	4 Jahre	21,8 kg
18	Mischling	3 Jahre	30,5 kg

2. Probenentnahme und Fixierung

2.1. Probenentnahme

Unmittelbar nach dem Absetzen der Hoden und Nebenhoden durch die praktizierenden Tierärzte, erfolgte das vorsichtige Entfernen des Processus vaginalis mit einer sterilen scharfen Rasierklinge. Anschließend ist der Nebenhoden vollständig vom Hoden abpräpariert worden. Daraufhin wurde jeder Nebenhoden in die einzelnen Nebenhodenanteile Ductuli efferentes, Caput, Corpus und Cauda unterteilt und präpariert.

2.2. Fixierung für lichtmikroskopische Untersuchungen

Als Fixans für die Lichtmikroskopie (konventionelle routine-histologische Färbungen, Immun- und Glykohistochemie) wurden zwei verschiedene Lösungen verwendet. Von jedem Tier ist jeweils ein Teilstück aus jedem einzelnen Nebenhodenabschnitt sowohl in Bouin'scher Lösung, als auch in 4% gepuffertem Formalin fixiert worden (ROMEIS, 2010).

Fixierung in Bouin'scher Lösung:

Die Proben wurden bei Zimmertemperatur für 24 Stunden in Bouin'scher Lösung (gesättigte Pikrinsäure:Formalin:Eisessig wie 15:5:1) fixiert und anschließend im Abstand von 24 Stunden dreimal in 70%igen Alkohol verbracht, um die Pikrinsäure wieder aus dem Gewebe auszuwaschen.

Fixierung in Formalin:

Die Proben wurden bei Zimmertemperatur und auf dem Rüttler für mindestens 2 Tage in Formalin fixiert, welches wenige Stunden nach Probenentnahme und nach 24 Stunden gewechselt wurde. Vor der Weiterbehandlung wurden die Formalinproben am 3. Tag zunächst in demineralisiertem Wasser belassen, welches dreimal im zweistündigen Abstand gewechselt worden ist. Anschließend erfolgte über Nacht ihre Entwässerung in 70%igem Alkohol.

Danach wurden die Proben mittels eines Einbettungsautomaten (Shandon Duplex Processor der Firma Shandon, Frankfurt) in einer aufsteigenden Alkoholreihe über 24 Stunden dehydriert und mit flüssigem Paraplast® (Monoject Scientific Inc. Kildare, Irland) durchtränkt.

Die so präparierten Proben sind anschließend mit einem „Histostat Tissue Embedding Center“ der Firma Reichert-Jung, Wien, in kleine quadratische Paraplastschalen mit Rahmen gegossen worden. Diese standen zum Auskühlen eine Stunde auf einer Kühlplatte. Von jedem Block wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Firma Leitz, Typ 1516) 5 µm dicke und zum Teil auch 16 µm dicke Schnitte angefertigt und sowohl auf beschichtete (SupraFrostUltraPlus®adhäsiv) als auch auf unbeschichtete (SuperFrost®) Objektträger gezogen (beide Firma

Menzel-Gläser, Braunschweig), auf einem Wärmestrecktisch getrocknet und bis zur vollständigen Trocknung, mindestens 24 Stunden, bei 30-40°C im Wärmeschrank aufbewahrt.

Die Schnitte sind für die konventionellen, immunhistochemischen und glykohistochemischen Färbungen verwendet worden.

2.3. Fixierung für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Nebenhoden von 4 Hunden zwischen 13 Monaten und 4 Jahren präpariert. Dafür ist jeweils eine ca. 1 mm dicke Scheibe aus den Ductuli efferentes, dem Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz steril entnommen worden und sofort in Karnovsky-Lösung (2 % Paraformaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer, pH 7,2) fixiert worden. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C im Kühlschrank belassen. Daraufhin erfolgte das Abpipettieren der Karnovsky-Lösung und die Befüllung der Eppendorf-Gefäße mit Cacodylat-Puffer (0,1 M, pH 7,4). Der Cacodylat-Puffer wird mehrfach gewechselt. Weiter wurden die Proben in 1,5 %igem Kaliumferrocyanid und 1 %igem Osmiumtetroxid für 2 Stunden im Dunkeln bei 4°C kontrastiert, daraufhin folgte das dreimalige Waschen in 0,1 M Cacodylat-Puffer und die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Anschließend wurden die Proben schrittweise in Polyembed eingebettet (zweimal 15 Minuten in Propylenoxid (Merck, Darmstadt), 1 Stunde in Propylenoxid-Polyembed-Gemisch (2:1), über Nacht in Propylenoxid-Polyembed-Gemisch (1:1), 1 Stunde in Polyembed auf Rüttler). Es folgte die Kunstharzeinbettung der Proben in spezielle Flacheinbettungsformen (Polysciences, Warrington, USA) und Polymerisation bei 60°C für mindestens 24 Stunden im Wärmeschrank. Anschließend wurden an einem Ultramikrotom (Ultracut E, Firma Reichert-Jung, Wien) 1 µm dicke Semidünnschnitte zur Übersicht angefertigt und mit Methylblau nach Richardson gefärbt.

Nach lichtmikroskopischer Beurteilung wurden die passenden Areale für die Anfertigung von Ultradünnschnitten (Schnittdicke 40-60 nm) ausgewählt. Die Anfertigung der Ultradünnschnitte erfolgte gleichfalls

mit Ultracut E, der Firma Reichert-Jung, Wien. Sie wurden auf Kupfergrids (Meshweite: 200µm) aufgezogen und mit gesättigtem 2 %igem Uranylacetat und mit Bleicitratlösung (Reynolds, 1963) nachkontrastiert.

3. Konventionelle lichtmikroskopische Färbungen

Für die verschiedenen Übersichtsfärbungen wurden alle Schnitte zunächst mit Xylol zweimal zehn Minuten entparaffiniert, über eine absteigende Alkoholreihe bis hin zum Aqua dest. rehydriert, gefärbt und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit einem Tropfen Eukitt® (Riedel de Haen AG, Seelze) eingedeckelt.

Die Methodik der einzelnen, nach Romeis (2010) durchgeführten Färbungen, ist im Anhang aufgeführt.

3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Bei dieser Färbung stellen sich die Kerne blauviolett und das übrige Gewebe rosarot dar. Für die Kernfärbung wurde der Schnitt 20 Minuten in Hämalun belassen, kurz in Aqua dest. geschwenkt und anschließend zum Bläuen 20 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Danach wurde der Schnitt für 10 Minuten in Eosin verbracht.

3.2. Trichromfärbung nach Masson-Goldner

In dieser Übersichtsfärbung erscheinen die Kerne durch das Eisenhämatoxilin nach Weigert braunschwarz und das Zytoplasma ziegelrot. Erythrozyten färben sich orangegelb an. Besonders dargestellt werden die kollagenen Bindegewebsfasern (grün). Nach der Alkoholreihe kommen die Schnitte für 10 Minuten in Eisenhämatoxilin nach Weigert, werden danach unter fließendem Leitungswasser gut gespült und für 45 Minuten in Azophloxin verbracht. Im Folgenden wurden die Schnitte mit 1 %iger Essigsäure und destilliertem Wasser gespült und 3 Minuten in Phosphor-molybdänsäure-Orange belassen,

bevor nach einem weiteren Spülgang in 1 %iger Essigsäure eine Gegenfärbung mit Lichtgrün erfolgte (4,5 Minuten).

3.3. Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus (PAS-Reaktion) mit und ohne Amylaseverdau

Diese Färbung dient dem Nachweis von Aldehydgruppen, die durch die Oxidation von Glykolen mit Perjodsäure entstehen. Somit lassen sich kohlenhydratreiche Makromoleküle (Glykoproteine, Glykogen, Glykolipide und Mucopolysaccharide) identifizieren. Die Aldehydgruppen bilden mit der Schiff-Reagenz einen purpurroten Farbkomplex. PAS-positive Substanzen färben sich somit rosa bis violettrot an.

Die Schnitte werden anschließend in Xylol und in die absteigende Alkoholreihe verbracht. Daraufhin kommen sie für 5 Minuten in eine 0,5 %ige Lösung von Perjodsäure und nach Spülen in destilliertem Wasser für 15 Minuten in Schiff'sche Reagenz. Nach Waschen in Schwefeldioxid-Wasser und Aqua dest. erfolgt abschließend eine Kernfärbung in Hämalaun.

Eine PAS-Reaktion mit Amylaseverdau wird durchgeführt, um Glykogen zu identifizieren. Glykogen wird von Amylase verdaut. Bei den nach dieser Behandlung noch positiv reagierenden Substanzen handelt es sich deshalb nicht um Glykogen.

Bei der Färbung mit Amylaseverdau wurden in der feuchten Kammer jeweils 100 µl 0,5 %ige Amylase pipettiert und für 10 Minuten im Trockenschrank belassen.

3.4. Alcianblau-Färbung

In dieser Färbung stellen sich saure Mukosubstanzen leuchtend blau dar, die Kerne hellrot, und der Hintergrund färbt sich zartrosa. Um zwischen Karboxyl- und Sulfatgruppen differenzieren zu können, wird dieselbe Färbung bei einem pH-Wert von 2,5 und 1,0 durchgeführt. Bei pH 1,0 färben sich nur sulfatierte Mukosubstanzen an, bei pH 2,5 stellen sich zusätzlich noch karboxylierte Mukosubstanzen dar.

Zur Darstellung saurer Mukosubstanzen wird der Schnitt 3 Minuten in 3 %ige Essigsäure gegeben und 30 Minuten in Alcianblau (pH 2,5) gefärbt, mit Aqua dest. gespült und 5 Minuten in Kernechtrot gefärbt. Nach erneutem Spülen folgt das Durchlaufen der aufsteigenden Alkoholreihe.

Zur Darstellung sulfatierter Mukosubstanzen wird der Schnitt vor der Färbung mit Kernechtrot 3 Minuten in 0,1 N HCl gegeben, anschließend in Alcianblau (pH 1,0) gefärbt und erneut in HCl gespült.

Auswertung:

Die lichtmikroskopische Auswertung und Photodokumentation der konventionell gefärbten Schnitte erfolgte mit einem Mikroskop (Aristoplan®) der Firma Leitz, Wetzlar. An dieses war eine Kamera Lumenera USB Camera® Release 3.8 (Firma Lumenera Corporations, Ontario, Kanada) angeschlossen.

4. Glykohistochemische Färbungen

Zum Nachweis von Glykokonjugaten im Nebenhoden des Hundes wurden die drei Pflanzen-Lektine VAA, MAA I und SNA verwendet sowie die humanen Galektine 1, 3, 8 und 9. Alle diese verwendeten Lektine wurden mit Biotin konjugiert und stammen aus dem Lehrstuhl für Physiologische Chemie, Veterinärwissenschaftliches Department der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Hierfür wurden sowohl Bouin- als auch Formalin-fixierte 5µm dicke Schnitte verwendet. Für das Lektin SNA wurden zusätzlich 16µm dicke Formalin-fixierte Schnitte verwendet, um weitere Ergebnisse mittels konfokaler 3D-Laser-Scanning-Mikroskopie zu bekommen.

Der Glykokonjugat-Nachweis unter Verwendung von SNA, MAA I und VAA erfolgte nach der indirekten Methode. Bei dieser ist der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) an Streptavidin gekoppelt. Streptavidin dient hierbei als Ersatz für das ursprünglich verwendete Avidin, einem Glykoprotein aus Hühnereiweiß und wird nun als chemisch exakt definiertes Produkt auf biotechnologischem Weg aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert und entwickelt.

Streptavidin besitzt 4 Bindungsstellen und eine sehr hohe Bindungs-Affinität zu dem Vitamin Biotin. Das biotinylierte Lektin bindet somit an eine spezifische Kohlenhydrat-Struktur und die Reaktion wird sichtbar durch die Bindung des Streptavidin/FITC-Komplexes an das Biotin des Lektines. Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) dient der Färbung des Zellkernes, da dieser Farbstoff selektiv an DNA bindet. Das Aufbringen von Dako Protein Block Serum Free sorgt für eine Reduzierung der Hintergrundfarbe durch Blockung unspezifischer Bindungsstellen.

Die Untersuchungen mit den Pflanzen-Lektinen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol und Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest.
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Schnitte in einer feuchten Kammer mit Dako Protein Block Serum Free (Firma Dako, Hamburg) betropfen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 100µl PBS-gepuffertes biotinyliertes Lektin (Konzentration 10µg/ml) pro Schnitt auftragen und eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Schnitte mit Streptavidin/FITC in PBS-Puffer 1:500 verdünnt beschichten und 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Abschließend jeden Schnitt einzeln mit DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI H-1200, Vector Laboratories Inc, Burlingame) beschichten und sofort mit durchsichtigem Nagellack eindecken
- Schnitte abgedunkelt im Kühlschrank aufbewahren

Auswertung:

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung und Photodokumentation der SNA-, MAA I- und VAA-Untersuchungen erfolgte mit einem Mikroskop (Axiovert 200M®) der Firma Zeiss, Oberkochen. An dieses war eine Kamera Axioacam ICc 1® (Firma Zeiss, Oberkochen) angeschlossen.

Bei den Untersuchungen unter Verwendung der Galektine wurde die „Avidin-Biotin-Complex-Methode“ („ABC-Methode“) angewandt (HSU S. et al., 1981). Auch bei dieser macht man sich, wie oben bereits erwähnt, die hohe Bindungs-Affinität des Streptavidin zum Vitamin Biotin zunutze. Das biotinylierte Galektin wird an einen Komplex aus Streptavidin und Peroxidase gebunden und anschließend die Peroxidase-Aktivität durch das chromogene Substrat 3,3-Diaminobenzidin (DAB; von der Firma Biotrend, Köln) sichtbar gemacht. Die Peroxidase spaltet H_2O_2 in H_2O und O_2 , anschließend oxidiert das O_2 zunächst farbloses DAB. Die entstehenden braunen Farbprodukte machen so die Galektin-Bindung sichtbar. Die Behandlung der Schnitte mit Hydrogenperoxid bei Punkt 3 des nachfolgenden Protokolls dient der Hemmung der endogenen Peroxidase, um das spätere Bindungsergebnis nicht zu verfälschen.

Die Untersuchungen mit den Galektinen 1, 3, 8 und 9 wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol und Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest.
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Schnitte für 10 Minuten in 50 ml Hydrogenperoxid verdünnt in 150 ml Aqua dest. bei Raumtemperatur belassen
- Schnitte 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Schnitte in einer feuchten Kammer mit Dako Protein Block Serum Free (Firma Dako, Hamburg) betropfen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

- 50µl biotinyliertes Galektin in Dako Antibody Diluent (Konzentration 10µg/ml) pro Schnitt auftragen und über Nacht bei 6°C im Kühlschrank in der feuchten Kammer inkubieren
- Vor Weiterbehandlung die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur ruhen lassen
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Streptavidin-Biotin-Horseradish-Peroxidase-Complex (Firma Dako, Hamburg) auftropfen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- 8 Minuten in DAB-Hydrogenperoxidlösung belassen und direkt im Anschluss wenige Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- Zellkerne 30 Sekunden mit Hämalaun gegenfärben
- Schnitte 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- In einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässern
- Eindeckeln der Schnitte mit Eukitt®

Auswertung:

Die lichtmikroskopische Auswertung und Photodokumentation der Galektin-Untersuchungen erfolgte mit einem Mikroskop (Aristoplan®) der Firma Leitz, Wetzlar. An dieses war eine Kamera Lumenera USB Camera® Release 3.8 (Firma Lumenera Corporations, Ontario, Kanada) angeschlossen.

5. Immunhistochemische Färbungen

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen wurde ebenfalls die oben bereits erwähnte „Avidin-Biotin-Complex-Methode“ („ABC-Methode“) angewandt (HSU S. et al., 1981). Bei diesen Untersuchungen wird ein Primär-Antikörper durch einen biotinylierten Sekundär-Antikörper an den Komplex aus Streptavidin und Peroxidase

gebunden. Anschließend wird die Peroxidase-Aktivität auf dieselbe Art wie bei den Galektin-Untersuchungen durch das chromogene Substrat 3,3-Diaminobenzidin (DAB; von der Firma Biotrend, Köln) sichtbar gemacht. Die Peroxidase spaltet H_2O_2 in H_2O und O_2 , anschließend oxidiert das O_2 zunächst farbloses DAB. Die entstehenden braunen Farbprodukte machen so die Primär-Antikörper-Bindung an das gesuchte Substrat sichtbar. Die Behandlung der Schnitte mit Hydrogenperoxid bei Punkt 3 des nachfolgenden Protokolls dient der Hemmung der endogenen Peroxidase, um das spätere Bindungsergebnis nicht zu verfälschen. Das hier beschriebene Verfahren wurde für alle Cytokeratin-Untersuchungen verwendet. Hierfür wurden sowohl Bouin- als auch Formalin-fixierte $5\mu\text{m}$ dicke Schnitte verwendet. Für die Cytokeratine 5 und 14 wurden zusätzlich noch $16\mu\text{m}$ dicke Schnitte verwendet, welche nach demselben Protokoll, wie für Claudin, Occludin, AGTR-II und COX-1 nachfolgend beschrieben, behandelt wurden.

Für den immunhistologischen Nachweis von Claudin 1, Occludin, AGTR-II und COX-1 wurden neben den $5\mu\text{m}$ dicken zusätzlich $16\mu\text{m}$ dicke Formalin-fixierte Schnitte verwendet, um weitere Ergebnisse mittels konfokaler 3D-Laser-Scanning-Mikroskopie zu bekommen. Aus diesem Grund kam bei diesen Untersuchungen statt der „ABC-Methode“ wiederum Streptavidin/FITC zum Einsatz, um den biotinylierten Sekundär-Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff sichtbar zu machen. Dieses Verfahren ist bei der Pflanzen-Lektin-Verwendung oben bereits näher ausgeführt worden. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (AK).

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Primär-AK	AK-liefernde Tierart	Verdünnung und Inkubation	Firma des Primär-AK	Sekundär-AK mit Hersteller	Verdünnung und Inkubation
CK 5	Meerschweinchen	1:50 über Nacht 6°C	(a)	Anti-Meerschweinbiot. von der Ziege (b)	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
CK 8	Maus	1:500 über Nacht 6°C	(c)	Anti-Mausbiot. vom Kaninchen (d)	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
CK 14	Meerschweinchen	1:100 über Nacht 6°C	(a)	Anti-Meerschweinbiot. von der Ziege (b)	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
CK 15	Maus	1:100 über Nacht 6°C	(e)	Anti-Mausbiot. vom Kaninchen (d)	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
CK 18	Maus	1:20 über Nacht 6°C	(a)	Anti-Mausbiot. vom Kaninchen (d)	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
CK 19	Meerschweinchen	1:200 über Nacht 6°C	(a)	Anti-Meerschweinbiot. von der Ziege (b)	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
PanCK (CKs 8+18)	Maus	1:100 über Nacht 6°C	(f)	Anti-Mausbiot. vom Kaninchen (d)	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
Claudin1	Kaninchen	1:400 über Nacht 6°C	(g)	Anti-Kaninchenbiot. vom Schwein (d)	1:300 30 Minuten, Raumtemp.

Occludin	Kaninchen	1:800 über Nacht 6°C	(g)	Anti-Kaninchen biot. vom Schwein (d)	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
AGTR-II (Typ 2)	Kaninchen	1:500 über Nacht 6°C	(g)	Anti-Kaninchen biot. vom Schwein (d)	1:300 30 Minuten, Raumtemp.
COX-1	Kaninchen	1:250 über Nacht 6°C	(g)	Anti-Kaninchen biot. vom Schwein (d)	1:300 30 Minuten, Raumtemp.

Hersteller der verwendeten Antikörper

- (a) Firma Progen, Heidelberg
- (b) Firma Vector, Burlingame, USA
- (c) Firma Chemicon Vertrieb über Millipore, Schwalbach
- (d) Firma Dako, Hamburg
- (e) Firma Dianova, Hamburg
- (f) Firma Biocarta, Hamburg
- (g) Firma Abcam, Cambridge, UK

Die Cytokeratin-Untersuchungen der 5µm Schnitte wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol und Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest.
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Cytokeratin-spezifische Vorbehandlungen:
 - CK 8: 0,1 % Protease (Firma Sigma-Aldrich, Steinheim) für 10 Minuten bei Raumtemperatur

-CK 15: Citratpuffer (pH-Wert 6,0) dreimal 10 Minuten in der Mikrowelle und anschließend 20 Minuten abkühlen lassen

-PanCK : Trypsin (Firma Sigma-Aldrich, Steinheim) für 20 Minuten bei Raumtemperatur

Nach diesen Vorbehandlungen dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)

- Schnitte für 10 Minuten in 50 ml Hydrogenperoxid verdünnt in 150 ml Aqua dest. bei Raumtemperatur belassen
- Schnitte 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Schnitte in einer feuchten Kammer mit Dako Protein Block Serum Free (Firma Dako, Hamburg) betropfen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Primär-Antikörper verdünnt in Dako Antibody Diluent (Konzentration siehe Tabelle) auftragen und über Nacht bei 6°C im Kühlschrank in der feuchten Kammer inkubieren
- Vor Weiterbehandlung die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur ruhen lassen
- dreimal fünf Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Sekundär-Antikörper verdünnt in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4; Konzentration siehe Tabelle) aufbringen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Streptavidin-Biotin-Horseradish-Peroxidase-Complex (Firma Dako, Hamburg) auftropfen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- 8 Minuten in DAB-Hydrogenperoxidlösung belassen und direkt im Anschluss wenige Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen

- Zellkerne 30 Sekunden mit Hämalaun gegenfärben
- Schnitte 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- In einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässern
- Eindeckeln der Schnitte mit Eukitt®

Auswertung:

Die lichtmikroskopische Auswertung und Photodokumentation der Cytokeratin-Untersuchungen an 5 µm Schnitten erfolgte mit einem Mikroskop (Aristoplan®) der Firma Leitz, Wetzlar. An dieses war eine Kamera Lumenera USB Camera® Release 3.8 (Firma Lumenera Corporations, Ontario, Kanada) angeschlossen.

Die Cytokeratin-Untersuchungen der 16 µm Schnitte sowie Claudin, Occludin, AGTR-II und COX-1 mit 5 und 16 µm Schnitten wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol und Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest.
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Citratpuffer (pH-Wert 6,0) dreimal 10 Minuten in der Mikrowelle und anschließend 20 Minuten abkühlen lassen
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Schnitte in einer feuchten Kammer mit Dako Protein Block Serum Free (Firma Dako, Hamburg) betropfen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Primär-Antikörper verdünnt in Dako Antibody Diluent (Konzentration siehe Tabelle) auftragen und über Nacht bei 6°C im Kühlschrank in der feuchten Kammer inkubieren
- Vor Weiterbehandlung die Schnitte eine Stunde bei Raumtemperatur ruhen lassen
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)

- Sekundär-Antikörper verdünnt in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4; Konzentration siehe Tabelle) aufbringen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Schnitte mit Streptavidin/FITC in PBS-Puffer 1:500 verdünnt beschichten und 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubieren
- dreimal 5 Minuten Waschen in PBS-Puffer (pH-Wert 7,4)
- Abschließend jeden Schnitt einzeln mit DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI H-1200, Vector Laboratories Inc, Burlingame) beschichten und sofort mit durchsichtigem Nagellack eindeckeln
- Schnitte abgedunkelt im Kühlschrank aufbewahren

Auswertung:

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung und Photodokumentation der Cytokeratin-Untersuchungen mit 16 µm Schnitten sowie Claudin 1, Occludin, AGTR-II und COX-1 mit 5 und 16µm Schnitten erfolgte mit einem Mikroskop (Axiovert 200M®) der Firma Zeiss, Oberkochen. An dieses war eine Kamera AxioCam ICc 1® (Firma Zeiss, Oberkochen) angeschlossen.

6. Transmissionselektronenmikroskopie

Auswertung:

Die Ultradünnschnitte wurden an einem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 (Fa. Zeiss, Oberkochen) fotografiert und ausgewertet. Die Beschleunigungsspannung betrug 80 kV.

IV. ERGEBNISSE

1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Der Nebenhoden, welcher sowohl durch das Mesepididymis als auch das Ligamentum testis proprium fest mit dem Hoden verbunden ist, kann makroskopisch in drei Abschnitte unterteilt werden und zwar in den Nebenhodenkopf, Caput epididymidis, den Nebenhodenkörper, Corpus epididymidis und den Nebenhodenschwanz, Cauda epididymidis.

Mikroskopisch muß allerdings aufgrund der Beurteilung verschiedener Parameter wie Epithelhöhe, Oberflächenbesatz der Epithelzellen, Epithelzell-Typen, Lumendurchmesser des Nebenhodenganges, u.v.m., eine Gliederung in vier Nebenhoden-Abschnitte vorgenommen werden: Die Ductuli efferentes, das Initialsegment, das Mittelsegment und das Terminalsegment des Ductus epididymidis. In der Literatur wird jedoch auffallend häufig das Initialsegment nach wie vor mit dem Begriff Caput epididymidis bezeichnet, das Mittelsegment mit dem Begriff Corpus epididymidis und auch für das Terminalsegment wird der Ausdruck Cauda epididymidis benutzt. Da sich somit die mikroskopischen Begriffe Initial-, Mittel- und Terminalsegment nicht in der Fachliteratur durchsetzen konnten, werden auch in meiner Arbeit Caput, Corpus und Cauda epididymidis für die mikroskopischen Ergebnis-Beschreibungen verwendet, wobei aber nochmals speziell darauf hingewiesen werden soll, dass diese Begriffe nicht im makroskopischen Sinne zu verstehen sind.

1.1. Ductuli efferentes

Die aus dem Rete testis entspringenden Ductuli efferentes durchbrechen die Tunica albuginea des Hodens und kommen dann im Nebenhodenkopf zu liegen. Diese 15 - 16 stark aufgeknauelten Kanälchen stellen die Verbindung zum Ductus epididymidis dar. Ein oder zwei der Ductuli efferentes bilden, eingebettet von Bindegewebe, ein kegelförmiges Läppchen, einen Conus vasculosus.

Das Epithel der Ductuli efferentes ist mehrreihig und hochprismatisch. Mit durchschnittlich $19 \mu\text{m}$ ($\pm 2,8 \mu\text{m}$) ist es aber deutlich niedriger als das Epithel der anschließenden Abschnitte des Ductus epididymidis. Im Epithel der Ductuli efferentes lassen sich zwei Zellarten unterscheiden: Die zilientragenden Zellen und die zilienlosen sekretorischen Zellen (Bild 2). Den kleineren Anteil der Epithelzellen stellen die Zilienzellen dar, welche aktiv bewegliche und nur selten verklebte Kinozilien tragen. Ihr Zellkern ist meist von länglicher Form und befindet sich typischerweise im basalen Zellbereich. Ein dominanter Nukleolus und mehrere kleinere Nukleoli sind regelmäßig zu erkennen. Zum Teil kommen an der Kinozilienbasis auch kleine Körnchen, sogenannte Basalkörperchen vor. Die überwiegende zweite vorkommende Zellart sind die zilienlosen sekretorischen Zellen, welche an ihrer apikalen Oberfläche einen regelmäßigen Mikrovilli-Besatz, den sogenannten Bürstensaum tragen. Ihr Zellkern ist eher rund und meist in der Mitte des Zytoplasmas gelegen. Auch bei dieser Zellart ist ein deutlicher Nukleolus zu erkennen. Das Lumen der Ductuli efferentes hat oft ein sternförmiges Aussehen (Bild 1) und der mittlere Lumendurchmesser beträgt $78,7 \mu\text{m}$ ($\pm 25,7 \mu\text{m}$). Damit ist er deutlich geringer als in den folgenden drei Segmenten des Ductus epididymidis. Im Lumen befinden sich meist keine oder nur wenige Spermien oder Zellfragmente. Auf die kräftige Basallamina folgen nur zwei bis drei Lagen glatter Muskelzellen und lockeres gefäßreiches Bindegewebe. In der PAS-Färbung (mit und ohne Amylaseverdau) reagieren die Basallamina und der apikale Epithelsaum deutlich positiv (Bild 3). Außerdem lassen sich im Zytoplasma der zilienlosen Zellen zum Teil PAS-positive Granula erkennen. Bei der Alcianblau-Färbung pH 1 zeigen lediglich einzeln vorkommende Mastzellen im Bindegewebe eine positive Reaktion, wohingegen bei pH 2,5 auch die Kinozilien und der apikale Epithelsaum deutlich positiv sind (Bild 4). Teilweise sind auch im Zytoplasma der Zellen nur schwach Alcianblau-positive Granula zu erkennen.

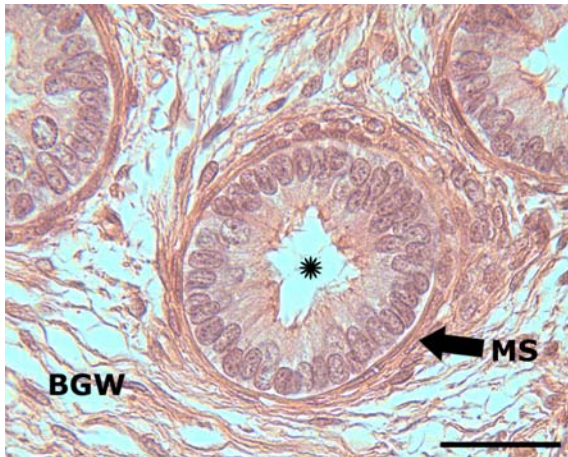


Bild 1: Ductuli efferentes, HE-Färbung, SB = 25 µm

Sternförmiges Lumen (Stern) der Ductuli efferentes, BGW = Bindegewebe, MS = Muskelzellschicht

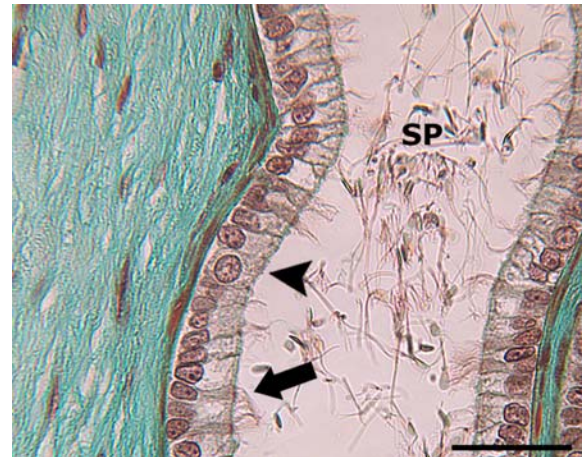


Bild 2: Ductuli efferentes, Goldner-Färbung, SB = 25 µm

Kinzilien-tragende Zellen mit basalem länglichen Zellkern (Pfeil), zilienlose Zellen mit Mikrovilli und rundem, eher zentralem Zellkern (Pfeilspitze), SP = Spermien



Bild 3: Ductuli efferentes, PAS-Färbung, SB = 40 µm

Die Basalmembran (BM) und der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) zeigen eine positive Reaktion



Bild 4: Ductuli efferentes, Alcianblau-Färbung pH 2,5, SB = 25 µm

Kinzilien und apikaler Epithelsaum (Pfeilspitze), sowie die Mastzelle (MTZ) im Bindegewebe reagieren deutlich positiv.

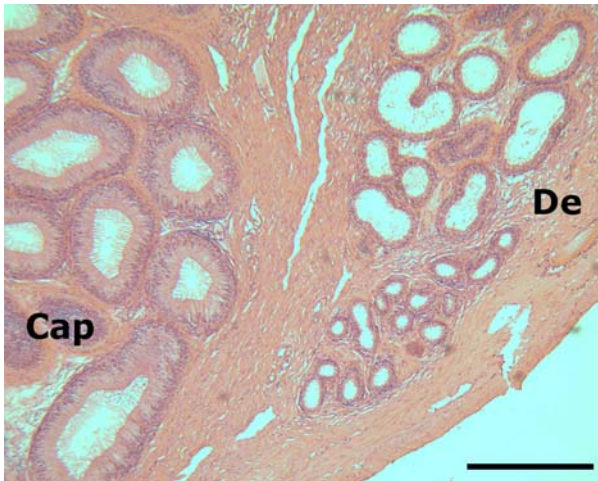


Bild 5: Ductuli efferentes und Caput bzw. Initialsegment, HE-Färbung, SB = 250 μ m

Übergang der Ductuli efferentes (De) in das erste Segment des Nebenhodenganges, das Caput epididymidis (Cap) bzw. das Initialsegment. Deutlich zu erkennen ist das wesentlich höhere Epithel des Caput epididymidis.

1.2. Ductus epididymidis

1.2.1. Caput epididymidis bzw. Initialsegment

Der Übergang von den Ductuli efferentes zum Caput epididymidis (bzw. Initialsegment) ist durch einen starken Anstieg der Epithelhöhe gekennzeichnet (Bild 5). Diese beträgt im Caput durchschnittlich 36,9 μm ($\pm 13,9 \mu\text{m}$), wodurch sich das Caput im histologischen Bild deutlich von den Ductuli efferentes unterscheiden lässt. Der Ductus epididymidis im Bereich des Caput wird von einem mehrreihigen hochprismatischen Epithel ausgekleidet, welches aus drei verschiedenen Epithelzell-Typen gebildet wird: den Haupt-, Basal- und Apikalzellen (Bild 7). Die schlanken Hauptzellen tragen an ihrer apikalen Oberfläche lange, weit ins Lumen reichende ($\pm 110,6 \mu\text{m}$) und zum Teil zu Büscheln verklebte Stereozilien (Bild 6). Ihr Zellkern ist in diesem Abschnitt meist rund mit deutlich erkennbarem Nukleolus und befindet sich im basalen Zytoplasmabereich. Die Apikalzellen zeichnen sich durch ihre charakteristische Lage in unmittelbarer Nähe der lumennahen Epithelgrenze aus. Ihr Zellkern ist meist langgestreckt und ebenfalls von lumennaher Lokalisation, ein bis zwei Nukleoli sind zu erkennen. Außerdem tragen diese Zellen ebenfalls Stereozilien an ihrer Oberfläche. Die Basalzellen liegen der Basallamina direkt an und ihr Zellkern ist ovoid, wobei seine Längsachse parallel zur Basalmembran verläuft, oder rundlich. Im Kern sind häufig ein großer Nukleolus und mehrere kleinere Nukleoli erkennbar. Der mittlere Lumendurchmesser des Ductus epididymidis im Bereich des Caput beträgt 126,9 μm ($\pm 23,2 \mu\text{m}$). Innerhalb des Lumens befinden sich meist nur wenige Spermien. Angrenzend an die Basallamina sind zwei bis drei Lagen glatter Muskelzellen und an diese anschließend Bindegewebe zu erkennen. Bei der PAS-Färbung (mit und ohne Amylaseverdau) zeigen die Stereozilien, der apikale Epithelsaum und die Basallamina eine positive Reaktion. Außerdem reagieren die Muskelzellschichten und das Blutgefäß-Endothel deutlich positiv (Bild 8). Bei der Alcianblau-Färbung bei pH 1 zeigen wiederum lediglich einzeln vorkommende Mastzellen im Bindegewebe eine stark positive Reaktion, wohingegen bei pH 2,5 auch die Stereozilien des Caputabschnittes deutlich positiv sind (Bild 9).

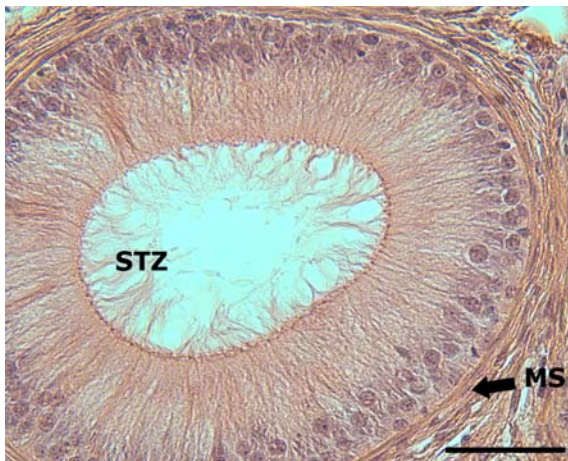


Bild 6: Caput epididymidis, HE-Färbung, SB = 40 μ m

Die Stereozilien (STZ) des Caputsegmentes ragen weit ins Lumen, MS = Muskelschicht

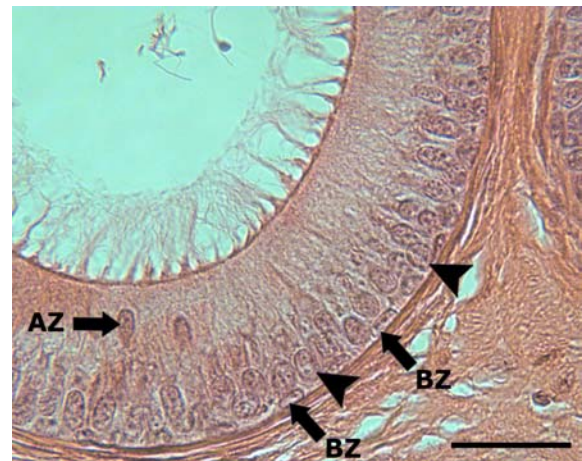


Bild 7: Caput epididymidis, HE-Färbung, SB = 25 μ m

Die Basalzellen (BZ) liegen direkt an der Basallamina, die runden Zellkerne der Hauptzellen (Pfeilspitzen) liegen im basalen Epithelbereich und die Apikalzellen (AZ) liegen nahe der Epitheloberfläche

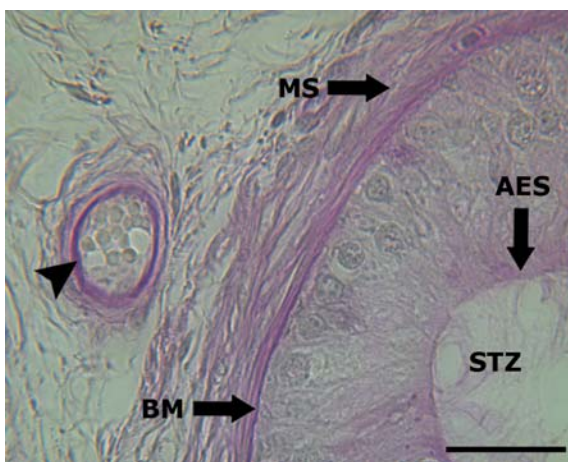


Bild 8: Caput epididymidis, PAS-Färbung, SB = 25 μ m

Die Basalmembran (BM), der apikale Epithelsaum (AES), die Stereozilien (STZ) und die Muskelschicht (MS) zeigen eine positive Reaktion. Außerdem reagiert das Gefäßendothel (Pfeilspitze) stark positiv

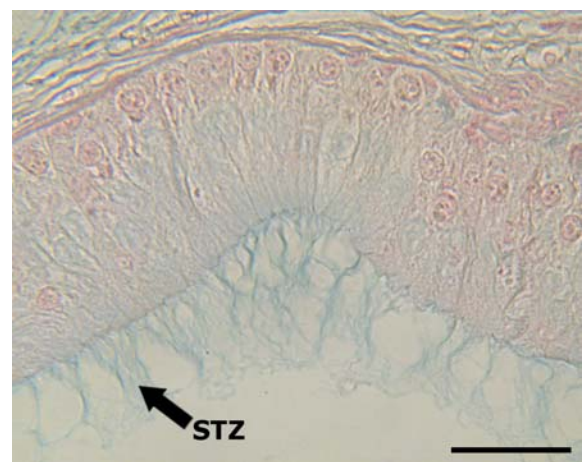


Bild 9: Caput epididymidis, Alcianblau-Färbung pH 2,5, SB = 25 μ m

Die Stereozilien (STZ) reagieren deutlich positiv.

1.2.2. Corpus epididymidis bzw. Mittelsegment

Das Epithel des Ductus epididymidis im Bereich des Corpus epididymidis (bzw. des Mittelsegmentes) ist mit durchschnittlich 45,8 μm ($\pm 4,1 \mu\text{m}$) im gesamten Nebenhodengang das höchste. Dieses mehrreihige hochprismatische Epithel besteht beim Hund in diesem Abschnitt laut Schimming (2001) aus vier verschiedenen Epithelzellarten: Die bereits im Caput vorkommenden Haupt-, Basal- und Apikalzellen sowie die sogenannten „Clear cells“. Die „Clear cells“ lassen sich allerdings mit den hier verwendeten lichtmikroskopischen Übersichtsfärbungen nicht eindeutig identifizieren. Die Zellkerne der Hauptzellen sind in diesem Gangsegment länglich und deutlich zentraler im Zytoplasma gelegen (Bild 11). Außerdem sind meist zwei größere Nukleoli erkennbar. Die Stereozilien reichen auch in diesem Segment weit ins Lumen, sind aber etwas kürzer ($\pm 102,4 \mu\text{m}$) als die des Caputbereiches, und zum Teil kommen Verklebungen zwischen den Stereozilien vor (Bild 10). Die Apikalzellen zeichnen sich wiederum durch einen meist langgestreckten und lumennahen Zellkern mit ein bis zwei deutlichen Nukleoli aus (Bild 12). Die Zellkerne der Basalzellen sind im Corpus epididymidis von ovoider, runder oder sogar teilweise dreieckiger Form und enthalten einen großen Nukleolus. Das Nebenhoden-Lumen beträgt in diesem Abschnitt im Mittel 119,8 μm ($\pm 19,8 \mu\text{m}$) und darin befinden sich viele Spermien sowie teilweise Zellfragmente. Auf die Basallamina folgen drei bis vier Muskelzell-Lagen, an die sich gefäßreiches Bindegewebe anschließt. Eine Besonderheit, die ab diesem Nebenhodenabschnitt beobachtet werden kann, ist das Auftreten von dunkelblau bis dunkellila gefärbter Granula, welche in regelmäßigen Ketten an der Basallamina oder vereinzelt im Epithel bzw. im Lumen zu sehen sind. Diese Granula sind sowohl bei der HE- als auch bei der PAS-Färbung zu erkennen (Bild 10 und 11). Die anderen Strukturen des Corpus epididymidis zeigen bei der PAS-Färbung und der Alcianblau-Färbung dasselbe Färbeverhalten wie im Caputbereich (Bild 13).

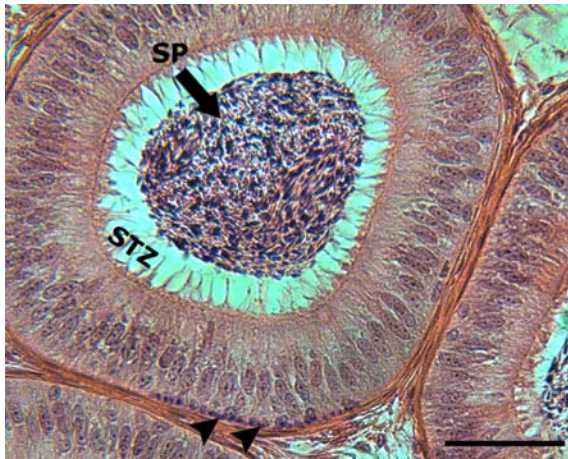


Bild 10: Corpus epididymidis, HE-Färbung, SB = 40 μm

Die Stereozilien (STZ) im Bereich des Corpus epididymidis sind teilweise verklebt und kürzer. Es befinden sich viele Spermien (SP) im Lumen und an der Basallamina liegen dunkle Granula (Pfeilspitzen)

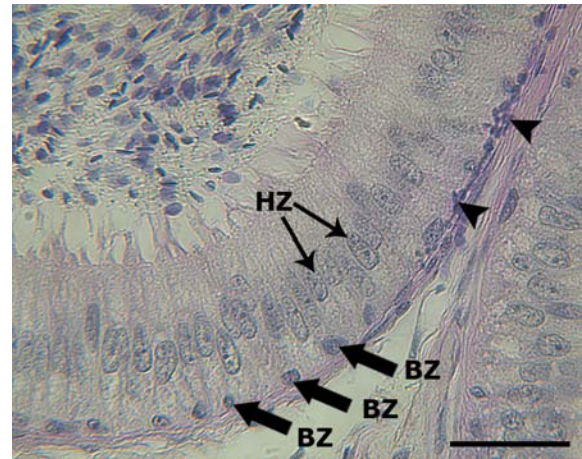


Bild 11: Corpus epididymidis, PAS-Färbung, SB = 25 μm

Die Basalzellen (BZ) liegen direkt an der Basallamina und die hier länglichen Zellkerne der Hauptzellen (HZ) liegen zentral im Epithel. An der Basallamina befinden sich mehrere dunkle Granula (Pfeilspitzen)



Bild 12: Corpus epididymidis, HE-Färbung, SB = 25 μm

Auch im Corpusegment sind Apikalzellen (AZ) zu erkennen. Diese zeichnen sich durch ihre lumennahe Lage und ihren meist länglichen Zellkern aus.

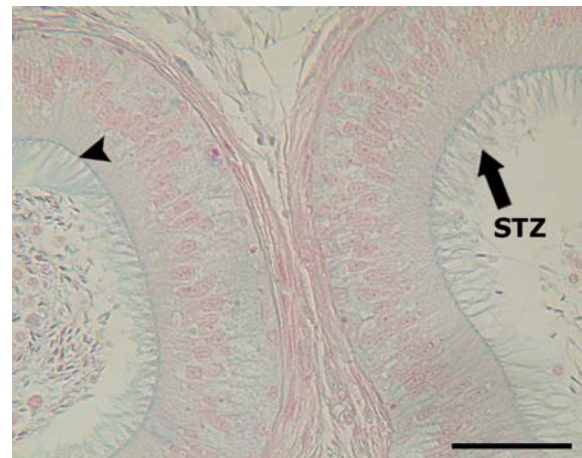


Bild 13: Corpus epididymidis, Alcianblau-Färbung pH 2,5, SB = 40 μm

Die Stereozilien (STZ) und der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) reagieren deutlich positiv.

1.2.3. Cauda epididymidis bzw. Terminalsegment

Das Epithel der Cauda epididymidis (bzw. des Terminalsegmentes) verändert sich im Verlauf des Nebenhodenkanals. Während es zu Beginn gebuchtet und relativ hoch (Bild 14) ausgebildet ist, kommen in den weiter distal gelegenen Abschnitten des Ductus epididymidis im Bereich der Cauda keine Ausbuchtungen mehr vor und die Epithelhöhe nimmt weiter ab (Bild 15). Im Vergleich zu den vorherigen Abschnitten des Ductus epididymidis ist die Epithelhöhe der Cauda mit durchschnittlich $30,9 \mu\text{m}$ ($\pm 5,2 \mu\text{m}$) generell am niedrigsten. Auch in diesem Nebenhodensegment kommen beim Hund laut Schimming (2001) folgende vier Epithelzell-Typen vor: Haupt-, Basal- und Apikalzellen sowie „Clear cells“. Wie schon bei der Beschreibung des Corpus epididymidis erwähnt, können die „Clear cells“ mit den hier verwendeten lichtmikroskopischen Färbungen nicht eindeutig identifiziert werden. Die Zellkerne der Hauptzellen sind in diesem Abschnitt deutlich unregelmäßiger im Epithel angeordnet und liegen meist nicht alle auf einer Höhe (Bild 17). Sie sind aber zum größten Teil von runder Form und lassen mehrere Nukleoli erkennen. Die Basalzellen haben wiederum einen ovalen bis runden Zellkern mit einem gut ausgebildeten Nukleolus. Sie liegen der Basallamina direkt an. Die Apikalzellen zeigen in diesem Nebenhodensegment einen runden Zellkern und liegen wieder nahe dem Lumen des Ganges. Die Stereozilien sind in der Cauda wesentlich kürzer ($\pm 67,1 \mu\text{m}$) als im Caput- und im Corpusbereich, aber meist nicht verklebt. Der Caudaabschnitt besitzt mit durchschnittlich $321,0 \mu\text{m}$ ($\pm 95,9 \mu\text{m}$) das weiteste Lumen des gesamten Ductus epididymidis. Darin sind massenhaft Spermien aber auch Zellen und Zelltrümmer zu finden. Außerdem ist eine deutliche Zunahme der Muskelschicht auf bis zu fünf Lagen glatter Muskelzellen gut erkennbar. Bei der PAS-Färbung (mit und ohne Amylaseverdau) reagieren die Stereozilien, der apikale Epithelsaum und das Gefäßendothel deutlich positiv. Außerdem befinden sich im Epithel und an der Stereozilienbasis stark PAS-positive kleine Granula (Bild 16). Wie schon im Corpus beschrieben, sind auch in der Cauda zahlreiche dunkellilafarbene größere Granula an der Basalmembran zu finden (Bild 16). Bei der Färbung mit Alcianblau

pH 2,5 reagieren die Stereozilien und der apikale Zytoplasmabereich positiv (Bild 17). Mastzellen sind nur selten und vereinzelt im Bindegewebe zu finden.

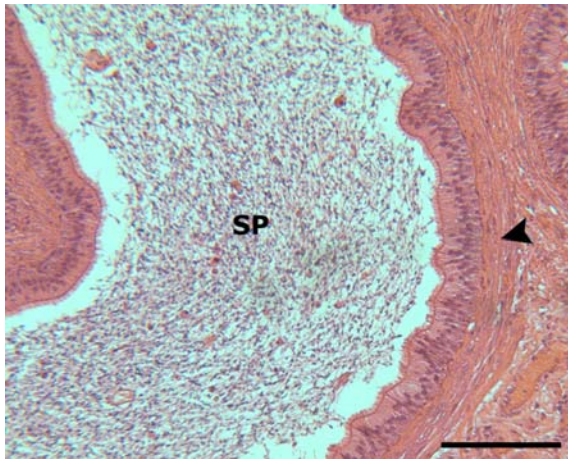


Bild 14: Cauda epididymidis, HE-Färbung, SB = 100 µm

Im Anfangsbereich der Cauda epididymidis ist das Epithel noch gebuchtet und relativ hoch, es befinden sich zahlreiche Spermien (SP) im Lumen. Weiter ist eine deutliche Zunahme der glatten Muskelzellen zu erkennen (Pfeilspitze).



Bild 15: Cauda epididymidis, HE-Färbung, SB = 40 µm

Weiter distal im Caudaabschnitt ist das Epithel sehr flach und nicht mehr gebuchtet. Die Muskelschicht (MS) besteht aus fünf und mehr Schichten. Die Stereozilien (STZ) sind deutlich kürzer als in den vorherigen Segmenten.

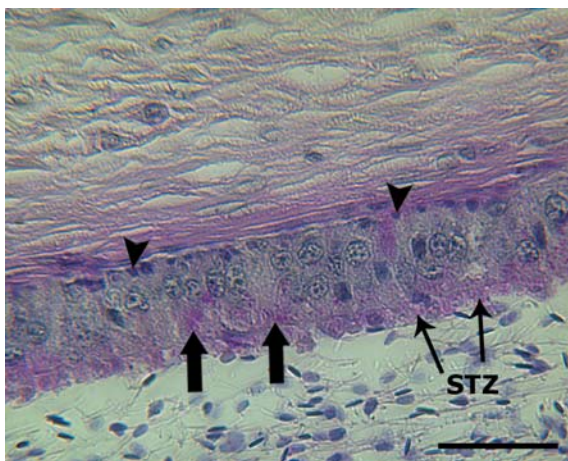


Bild 16: Cauda epididymidis, PAS-Färbung, SB = 25 µm

Auch in der Cauda sind dunkle Granula (Pfeilspitzen) an der Basallamina zu erkennen. Neben den Stereozilien (STZ) reagieren kleine Granula im Epithel (Pfeile) deutlich PAS-positiv.

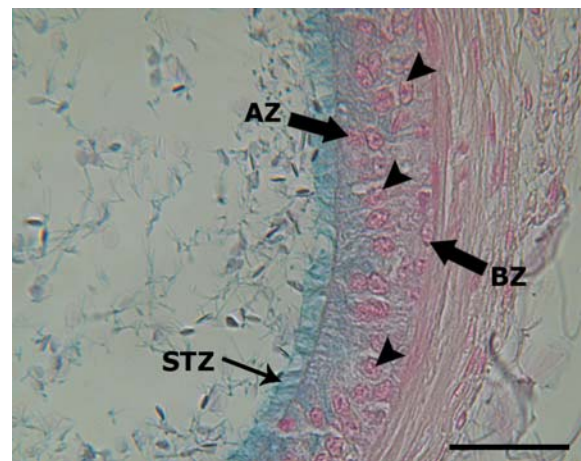


Bild 17: Cauda epididymidis, Alcianblau-Färbung pH 2,5, SB = 25 µm

Die Stereozilien (STZ) und das apikale Zytoplasma reagieren deutlich positiv. Die Zellkerne der Hauptzellen (Pfeilspitzen) liegen unregelmäßig im Epithel. BZ = Basalzelle, AZ = Apikalzelle

2. Glykohistochemische Untersuchungen

2.1. Bindungsstellen für Maackia amurensis Agglutinin I (MAA I)

Bei den Ductuli efferentes zeigt lediglich der apikale Epithelsaum eine deutlich positive Reaktion auf MAA I, das umliegende Bindegewebe hingegen ist nur schwach positiv. Dagegen zeigt sich in den folgenden drei Segmenten des Ductus epididymidis eine charakteristische starke und spezifische positive Reaktion der Apikalzellen (Bild 18). Im Caput reagieren neben den stark positiven Apikalzellen außerdem einige Basalzellen positiv, und auch die Basalmembran und die Stereozilien reagieren schwach positiv. Im Corpus sind neben den meist deutlich positiven Apikalzellen zudem einige Basalzellen stark positiv (Bild 20), was durch die Doppelfärbung mit DAPI in Bild 21 deutlich wird. In der Cauda epididymidis reagieren die Apikalzellen und die Stereozilien sowie der apikale Epithelsaum stark positiv (Bild 19), wohingegen das apikale Zytoplasma der Hauptzellen schwach positiv und die Basalzellen nicht eindeutig positiv reagieren.

2.2. Bindungsstellen für Sambucus nigra Agglutinin (SNA)

Bei Inkubation mit dem markierten SNA zeigt sich nur das Bindegewebe um die Ductuli efferentes positiv, ihr Epithel selbst ist negativ. Im Caput und im Corpus ist ein interessantes Reaktionsmuster zu beobachten, bei dem die Stereozilien lediglich büschelweise stark positiv reagieren (Bild 22 und 23). Zudem ist das apikale Zytoplasma unter diesen Büscheln zum Teil deutlich positiv. Bis auf schwach positives umliegendes Bindegewebe binden die übrigen Zell- und Gewebestrukturen in Caput und Corpus kein SNA. Im Caudaabschnitt lassen sich dann schwach positive Stereozilien erkennen, bei denen sich die Reaktion nicht nur spezifisch auf einzelne Büschel begrenzt. Außerdem reagieren das apikale und basale Zytoplasma sowie die Golgi-Zone der Hauptzellen schwach positiv und auch der Lumeninhalt ist punktuell stark positiv.

2.3. Bindungsstellen für *Viscum album* Agglutinin (VAA)

In den Ductuli efferentes ist zu erkennen, dass sich VAA stark an die Spermien bindet, und zwar spezifisch im Bereich des zytoplasmatischen Tröpfchens der Spermien direkt unterhalb des Spermienkopfes (Bild 24). Außerdem zeigt das Bindegewebe um die Ductuli efferentes deutliche Bindung von VAA. Im Caput epididymidis sind ebenfalls stark positive intraluminale Spermien zu erkennen, während die Basalzellen schwach bis fraglich positiv erscheinen. Im Corpusbereich sind lediglich die Spermien im Nebenhoden-Lumen deutlich VAA-positiv (Bild 25). Außerdem bindet das umliegende Bindegewebe von Caput und Corpus jeweils in geringem Maße das VAA. In der Cauda epididymidis lässt sich neben den Spermien auch eine positive VAA-Reaktion an den Stereozilien sowie am apikalen Zytoplasma und der Golgi-Zone der Hauptzellen erkennen. Zudem ist der apikale Epithelsaum, die Muskelschicht und das Bindegewebe schwach positiv.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse über die Untersuchungen mit den Lektinen MAA I, SNA und VAA in der Übersicht dargestellt.

Tabelle 8: Glykohistochemischer Nachweis der Lektine SNA, MAA I und VAA

Abschnitt	Zellart/Gewebeart	SNA	MAA I	VAA
Ductuli efferentes	Apikaler Epithelsaum	-	++	-
	KZ-tragende Z	-	-	-
	Zilienlose Z mit MV	-	-	-
	Spermien	-	-	++
	Bindegewebe	++	+/-	+
Caput epididymidis	Stereozilien	++ ^b	+/-	-
	Apikaler Epithelsaum	-	+/-	-
	Apikales ZP der HZ	Zum Teil ++	-	-
	Golgi-Zone der HZ	-	-	-
	Basales ZP der HZ	-	-	-

	Basalzellen	-	+ ^a	+/-
	Apikalzellen	-	++	-
	Basalmembran	-	+/-	-
	Spermien	-	-	++
	Bindegewebe	+/-	-	+
	Muskelschicht	-	-	-
Corpus epididymidis	Stereozilien	++ ^b	+/-	-
	Apikaler Epithelsaum	-	+/-	-
	Apikales ZP der HZ	Zum Teil ++	-	-
	Golgi-Zone der HZ	-	-	-
	Basales ZP der HZ	-	-	-
	Basalzellen	-	++ ^a	-
	Apikalzellen	-	++	-
	Basalmembran	-	-	-
	Spermien	-	-	++
	Bindegewebe	-	-	+
	Muskelschicht	-	-	-
Cauda epididymidis	Stereozilien	+/-	++	+
	Apikaler Epithelsaum	-	++	+/-
	Apikales ZP der HZ	+/-	+/-	+
	Golgi-Zone der HZ	+/-	-	+
	Basales ZP der HZ	+/-	-	-
	Basalzellen	-	-	-
	Apikalzellen	-	++	-
	Basalmembran	-	-	-
	Spermien	+	-	+
	Bindegewebe	-	-	+/-
	Muskelschicht	-	-	+/-

HZ=Hauptzellen, KZ=Kinozilien, MV=Mikrovilli, Z=Zellen, ZP=Zytoplasma
 ++ stark positiv, + positiv, +/- schwach bzw. undeutlich positiv, - negativ
 a = nicht bei allen Zellen dieses Typs zu erkennen, b = büschelweise

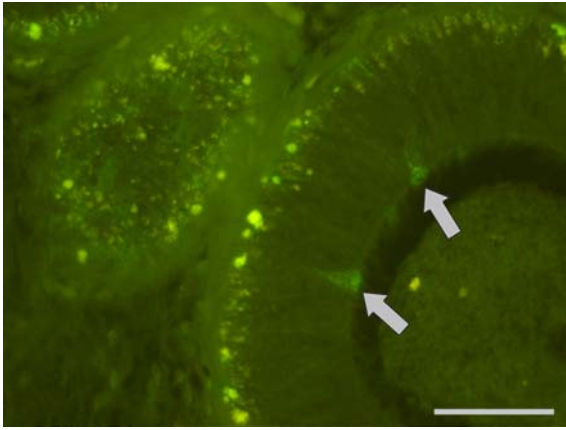


Bild 18: MAA I-Bindung im Corpus epididymidis, SB = 50 μm

Die Apikalzellen (Pfeile) reagieren deutlich positiv mit MAA I.

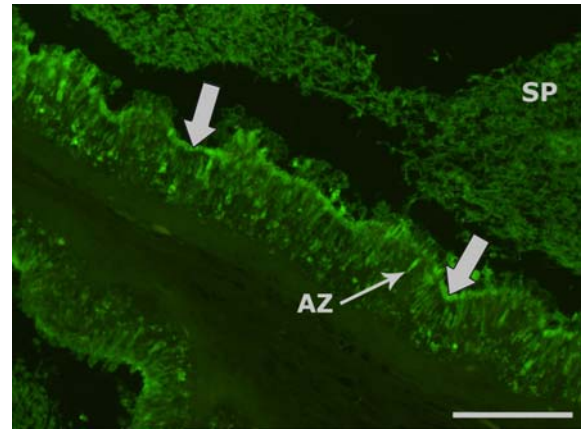


Bild 19: MAA I-Bindung in der Cauda epididymidis, SB = 50 μm

Hier reagiert neben den Apikalzellen (AZ) auch der apikale Epithelsaum (Pfeile) stark positiv. SP = Spermien

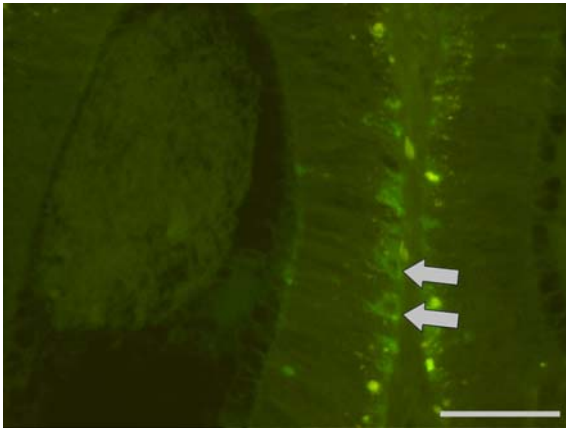


Bild 20: MAA I-Bindung im Corpus epididymidis, SB = 50 μm

Die Basalzellen (Pfeile) reagieren deutlich stark positiv mit MAA I.

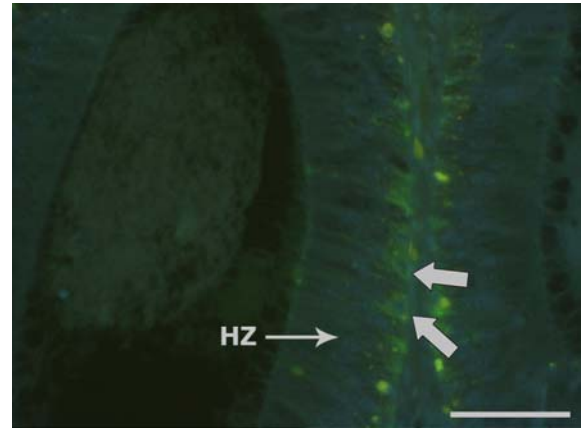


Bild 21: MAA I-Bindung im Corpus epididymidis, SB = 50 μm

In der Bildüberlagerung von FITC- und DAPI-Fluoreszenz werden die Reaktionsergebnisse verdeutlicht. Um die Zellkerne der Basalzellen (Pfeile) ist eine starke positive Reaktion zu erkennen, nicht aber um die Zellkerne der Hauptzellen (HZ).

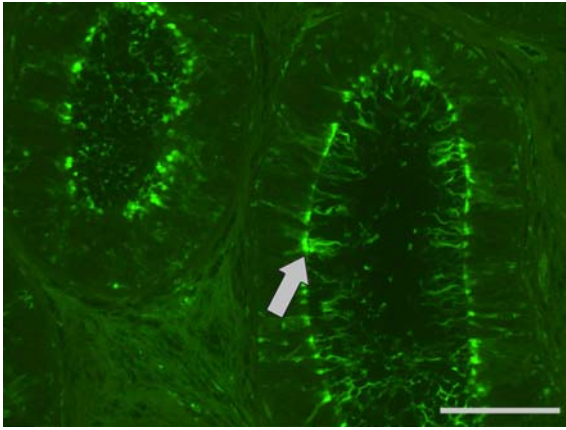


Bild 22: SNA-Bindung im Caput epididymidis, SB = 100 μ m

Mehrere Büschel von Stereozilien (Pfeil) binden intensiv das SNA. Unterhalb dieser Büschel zeigt sich auch das Zytoplasma positiv.

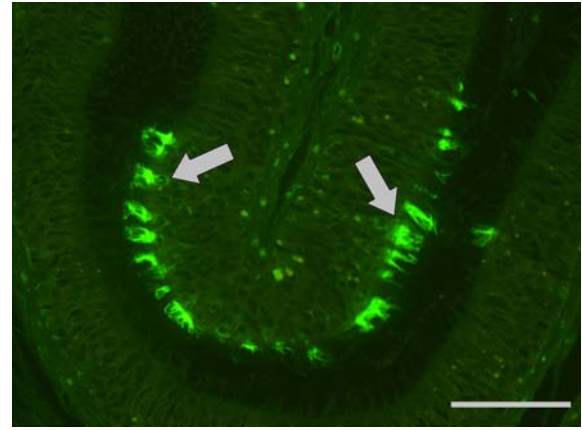


Bild 23: SNA-Bindung im Corpus epididymidis, SB = 50 μ m

Auch in diesem Segment reagieren mehrere Stereozilien-Büschel (Pfeile) stark positiv.

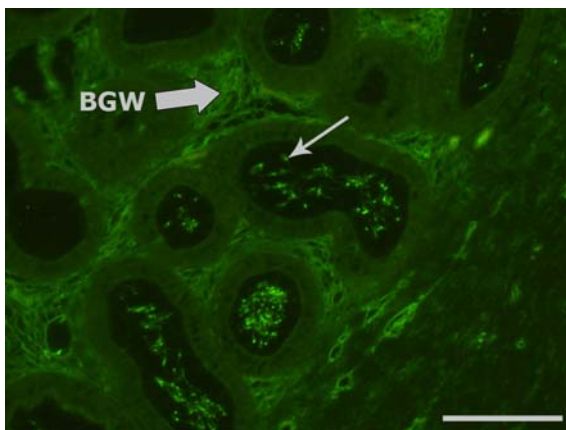


Bild 24: VAA-Bindung in den Ductuli efferentes, SB = 100 μ m

Die zytoplasmatischen Tröpfchen der Spermien, direkt unterhalb des Spermienkopfes (Pfeil) reagieren stark positiv auf VAA. Auch das umliegende Bindegewebe (BGW) zeigt sich positiv.

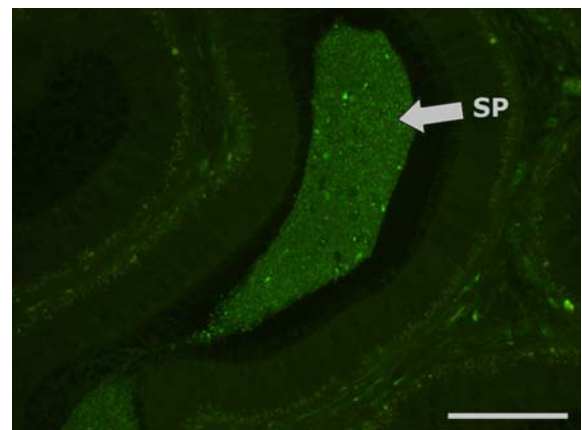


Bild 25: VAA-Bindung im Corpus epididymidis, SB = 100 μ m

Das Paket aus zahlreichen Spermien (SP) im Nebenhoden-Lumen zeigt starke VAA-Positivität.

2.4. Bindungsstellen für Galektin-1 (Gal-1)

In den Ductuli efferentes reagiert der apikale Epithelsaum stark positiv und auch das Zytoplasma sowohl der Kinozilien-tragenden als auch der zilienlosen Zellen ist positiv (Bild 26). Im Caput epididymidis zeigen sich die Stereozilien nur schwach bis undeutlich positiv, wohingegen auch in diesem Abschnitt der apikale Epithelsaum stark positiv (++) und das apikale Zytoplasma der Hauptzellen positiv (+) mit Gal-1 reagieren (Bild 27). Die restlichen Anteile der Hauptzellen und auch die anderen Epithelzell-Typen sind Gal-1-negativ. Beim Corpus epididymidis sind nun stark Gal-1-positive Stereozilien zu erkennen (Bild 28), aber das apikale Zytoplasma der Hauptzellen reagiert nur schwach bis undeutlich positiv. In der Cauda epididymidis besitzt der Ductus epididymidis eine deutlich Gal-1-positive Schicht glatter Muskelzellen (Bild 29), die Stereozilien reagieren allerdings nur schwach positiv. Außerdem sind in der Cauda der apikale Epithelsaum, alle Anteile der Hauptzellen, die Apikalzellen und auch die Basalzellen positiv auf das Galektin 1.

2.5. Bindungsstellen für Galektin-3 (Gal-3)

Mit Gal-3 reagiert zunächst lediglich das umliegende Bindegewebe der Ductuli efferentes deutlich positiv, das Epithel ist dagegen gänzlich negativ (Bild 30). Beim Ductus epididymidis im Bereich des Caput epididymidis reagieren die Stereozilien und der apikale Epithelsaum stark positiv (Bild 31), wohingegen die intraluminalen Spermien und das Bindegewebe um den Nebenhodenkanal nur schwach positiv sind. Die Epithelzellen des Ductus epididymidis im Bereich des Caput epididymidis binden, genau wie die Muskelschicht, kein Gal-3. Im Corpusabschnitt sind die Stereozilien nur noch schwach positiv, die Spermien im Nebenhoden-Lumen und das umliegende Bindegewebe wiederum deutlicher positiv (Bild 32). In der Cauda epididymidis bleiben die Stereozilien schwach Gal-3-positiv, genau wie die intraluminalen Spermien, das Bindegewebe und auch der apikale Epithelsaum (Bild 33). Alle übrigen Strukturen färben sich nicht mit Galektin 3 an.

2.6. Bindungsstellen für Galektin-8 (Gal-8)

Beim Nachweis von Bindungsstellen für das Galektin 8 reagiert in den Ductuli efferentes der apikale Epithelsaum stark positiv (Bild 34), während sich alle anderen Strukturen dieses Abschnitts negativ verhalten. Im Caputbereich zeigen die Stereozilien und die Golgi-Zone der Hauptzellen deutliche Galektin 8-Positivität (Bild 35). Das apikale Zytoplasma der Hauptzellen reagiert ebenfalls positiv und auch der apikale Epithelsaum des Caputepithels ist schwach positiv. Im Corpus epididymidis reagieren ebenfalls die Stereozilien stark positiv (Bild 36) und in der Golgi-Zone der Hauptzellen lässt sich auch schwache Positivität erkennen. Außerdem sind die Spermien im Nebenhoden-Lumen schwach Gal-8-positiv. Die Caudaregion stellt sich in den verschiedenen Abschnitten des Ductus epididymidis unterschiedlich dar. Das proximale, gebuchtete und noch hohe Cauda-Epithel zeigt positive Stereozilien und einen ebenfalls Gal-8-positiven Golgi-Bereich in den Hauptzellen (Bild 37). Im weiter distalen flachen Caudaabschnitt reagieren diese beiden Strukturen dann negativ. Aber in der gesamten Caudaregion zeigen die intraluminalen Spermien und das umliegende Bindegewebe eine schwach positive Reaktion auf das Galektin 8.

2.7. Bindungsstellen für Galektin-9 (Gal-9)

In den Ductuli efferentes zeigt sich eine starke positive Reaktion am apikalen Epithelsaum (Bild 38), wohingegen die restlichen Zellbereiche negativ sind. Im Caput reagieren im Ductus epididymidis sowohl die Stereozilien als auch die Golgi-Zone der Hauptzellen stark positiv mit Gal-9 (Bild 39). Zudem sind der apikale Epithelsaum und das apikale Zytoplasma der Hauptzellen positiv. Die Spermien im Lumen des Caput epididymidis reagieren aber nur schwach Gal-9-positiv. Auch im Corpus kommen stark positiv reagierende Stereozilien vor und der apikale Epithelsaum ist ebenfalls deutlich Gal-9-positiv. Außerdem binden die Spermien im Corpusegment in hohem Maße Gal-9 (Bild 40). Die Stereozilien und der apikale Epithelsaum der Cauda epididymidis zeigen ebenfalls eine stark positive Reaktion (Bild 41). Während sich die Golgi-Zone der Hauptzellen in diesem Segment nur schwach positiv zeigt, sind das apikale Zytoplasma der Hauptzellen

und die intraluminalen Spermien deutlicher positiv für Gal-9.

Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen mit den Galektinen 1, 3, 8 und 9 in der Übersicht.

Tabelle 9: Glykohistochemischer Nachweis der Galektine 1, 3, 8 und 9

Abschnitt	Zellart/Gewebeart	Galektin 1	Galektin 3	Galektin 8	Galektin 9
Ductuli efferentes	Apikaler Epithelsaum	++	-	++	++
	KZ-tragende Z	ZP +	-	-	-
	Zilienlose Z mit MV	ZP +	-	-	-
	Spermien	-	-	-	-
	Bindegewebe	-	+	-	-
Caput epididymidis	Stereozilien	+/-	++	++	++
	Apikaler Epithelsaum	++	++	+/-	+
	Apikales ZP der HZ	+	-	+	+
	Golgi-Zone der HZ	-	-	++	++
	Basales ZP der HZ	-	-	-	-
	Basalzellen	-	-	-	-
	Apikalzellen	-	-	-	-
	Basalmembran	-	-	-	-
	Spermien	-	+/-	-	+/-
	Bindegewebe	-	+/-	-	-
	Muskelschicht	-	-	-	-
Corpus epididymidis	Stereozilien	++	+/-	++	++
	Apikaler Epithelsaum	-	-	-	++
	Apikales ZP der HZ	+/-	-	-	-
	Golgi-Zone der HZ	-	-	+/-	-
	Basales ZP der HZ	-	-	-	-
	Basalzellen	-	-	-	-
	Apikalzellen	-	-	-	-

	Basalmembran	-	-	-	-
	Spermien	-	+	+/-	++
	Bindegewebe	-	+	-	-
	Muskelschicht	-	-	-	-
Cauda epididymidis	Stereozilien	+/-	+/-	+ ^a	++
	Apikaler Epithelsaum	+	-	-	++
	Apikales ZP der HZ	+	+/-	-	+
	Golgi-Zone der HZ	+	-	+ ^a	+/-
	Basales ZP der HZ	+	-	-	-
	Basalzellen	+	-	-	-
	Apikalzellen	+	-	-	-
	Basalmembran	-	-	-	-
	Spermien	-	+/-	+/-	+
	Bindegewebe	-	+/-	-	-
	Muskelschicht	++	-	-	-

HZ=Hauptzellen, KZ=Kinozilien, MV=Mikrovilli, Z=Zellen, ZP=Zytoplasma
 ++ stark positiv, + positiv, +/- schwach bzw. fraglich positiv, - negativ
 a = nur in der proximalen Cauda zu erkennen, wenn das Epithel noch hoch und gebuchtet ist

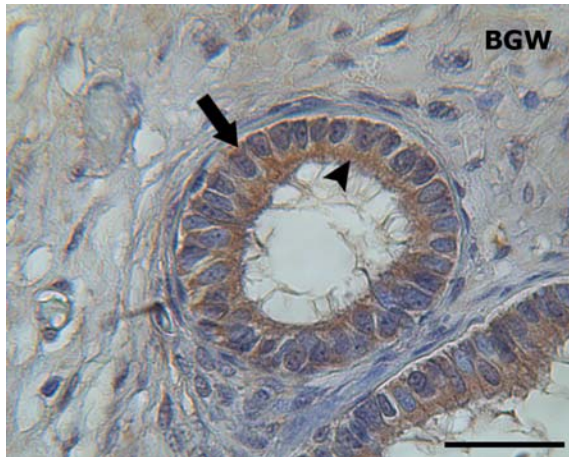


Bild 26: Galektin 1-Bindung in den Ductuli efferentes, SB = 25 μ m

Der apikale Epithelsaum und das apikale Zytoplasma (Pfeilspitze) reagieren deutlich positiv. Aber auch das basale Zytoplasma (Pfeil) ist positiv. BGW = Bindegewebe



Bild 27: Galektin 1-Bindung im Caput epididymidis, SB = 25 μ m

Während die Stereozilien (STZ) nur schwach positiv sind, reagieren das apikale Zytoplasma (Pfeil) und der apikale Epithelsaum deutlich positiv.



Bild 28: Galektin 1-Bindung im Corpus epididymidis, SB = 25 μ m

Die Stereozilien (STZ) des Corpus-segmentes reagieren stark positiv auf Galektin 1.

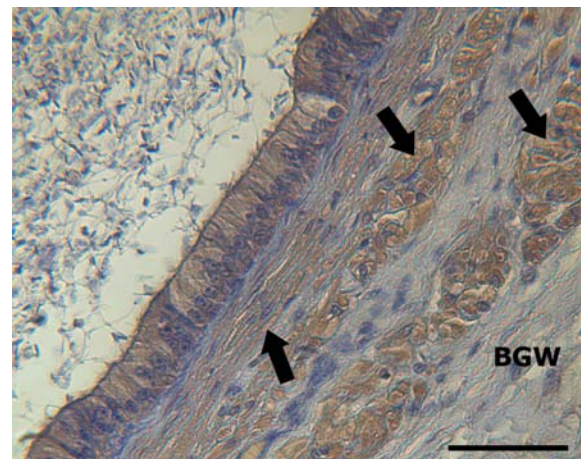


Bild 29: Galektin 1-Bindung in der Cauda epididymidis, SB = 40 μ m

Die verschiedenen Schichten glatter Muskelzellen (Pfeile) reagieren stark positiv, während sich das Epithel der Cauda deutlich schwächer positiv zeigt und das Bindegewebe (BGW) gänzlich negativ bleibt.

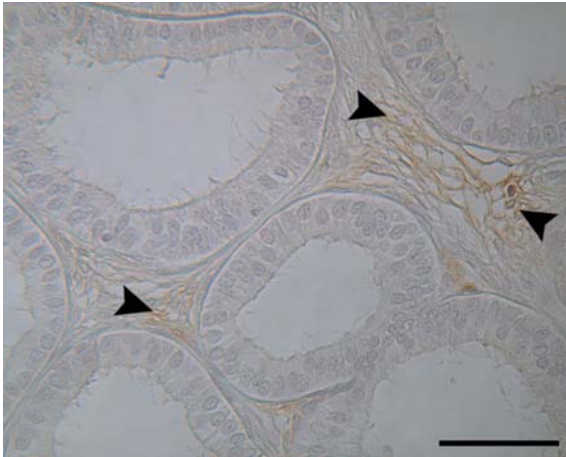


Bild 30: Galektin 3-Bindung in den Ductuli efferentes, SB = 40 μ m

Lediglich das Bindegewebe (Pfeilspitzen) reagiert positiv; das Epithel der Ductuli efferentes bleibt gänzlich negativ.

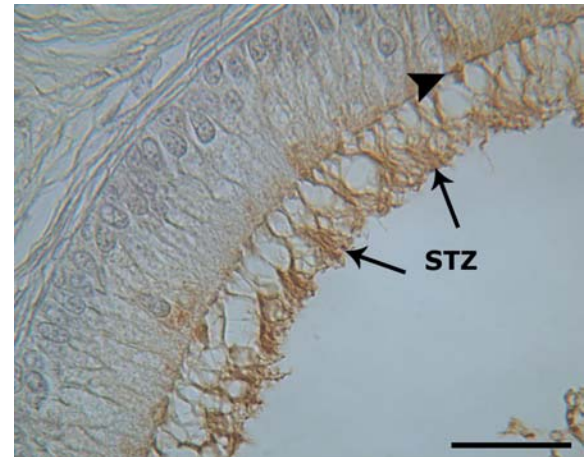


Bild 31: Galektin 3-Bindung im Caput epididymidis, SB = 25 μ m

Die Stereozilien (STZ) des Caputabschnittes reagieren stark positiv und auch der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) ist deutlich positiv.

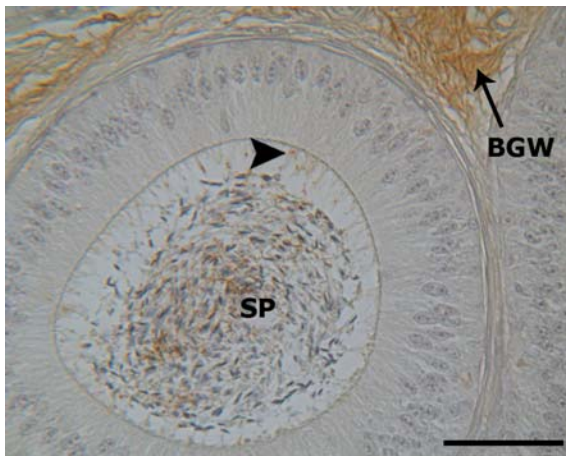


Bild 32: Galektin 3-Bindung im Corpus epididymidis, SB = 40 μ m

Die Stereozilien (Pfeilspitze) des Corpussegmentes reagieren nur undeutlich bis schwach positiv auf Galektin 3, wohingegen das Bindegewebe (BGW) und die Spermien (SP) im Lumen deutlich positiv sind.

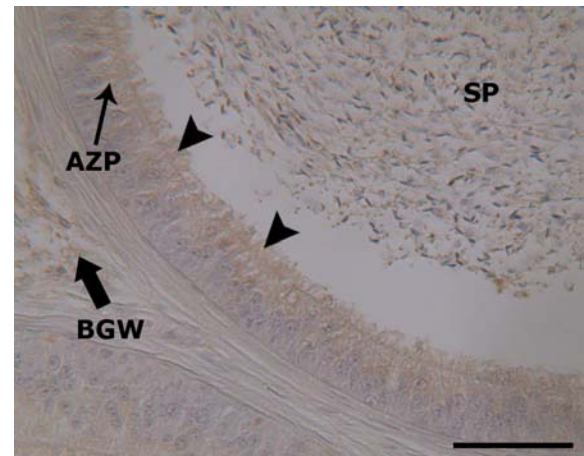


Bild 33: Galektin 3-Bindung in der Cauda epididymidis, SB = 40 μ m

In der Cauda reagieren die Stereozilien (Pfeilspitzen), das apikale Zytoplasma (AZP), das Bindegewebe (BGW) und auch die intraluminale Spermien schwach positiv mit Galektin 3.

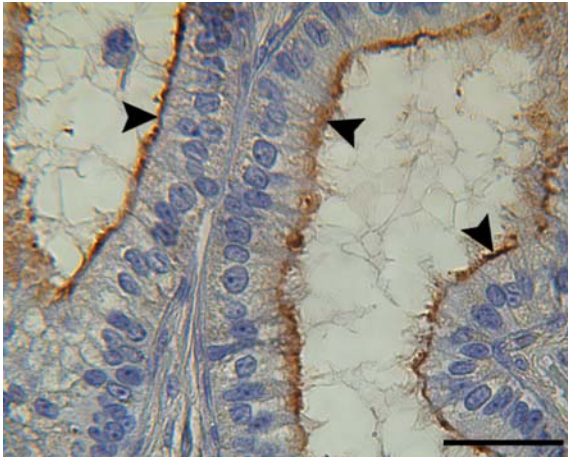


Bild 34: Galektin 8-Bindung in den Ductuli efferentes, SB = 25 μ m

In den Ductuli efferentes reagiert der apikale Epithelsaum (Pfeilspitzen) stark positiv.

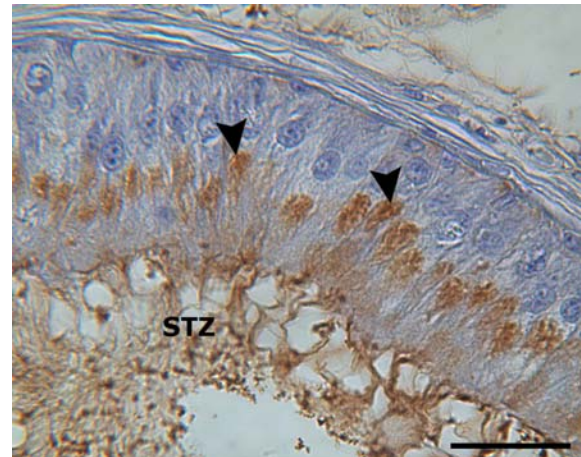


Bild 35: Galektin 8-Bindung im Caput epididymidis, SB = 25 μ m

Die Stereozilien (STZ) im Caput epididymidis reagieren deutlich positiv und auch die Golgi-Zone der Hauptzellen (Pfeilspitzen) ist stark positiv.

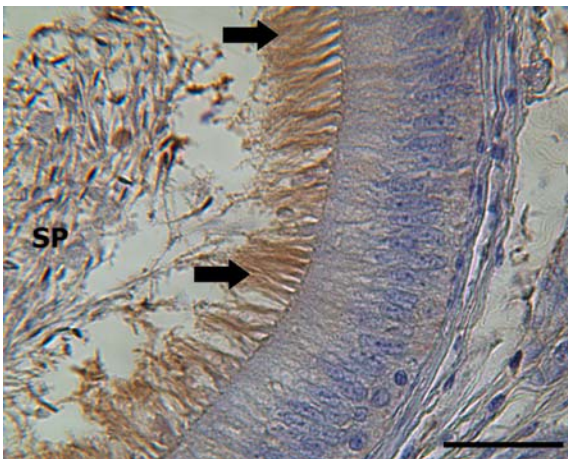


Bild 36: Galektin 8-Bindung im Corpus epididymidis, SB = 25 μ m

Die Stereozilien (Pfeile) des Corpus-segmentes reagieren stark positiv und auch die Spermien (SP) im Lumen zeigen eine schwache Galektin 8-Positivität.

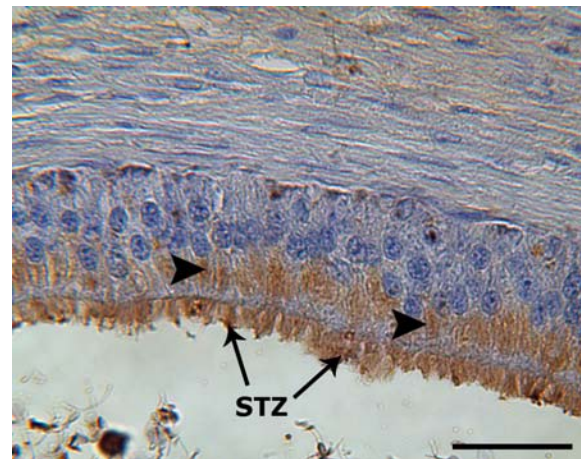


Bild 37: Galektin 8-Bindung in der Cauda epididymidis, SB = 25 μ m

In der Cauda epididymidis reagieren die Stereozilien (STZ) und wiederum die Golgi-Zone der Hauptzellen (Pfeilspitzen) stark positiv.



Bild 38: Galektin 9-Bindung in den Ductuli efferentes, SB = 25 μ m

Der apikale Epithelsaum (Pfeilspitzen) reagiert stark positiv, während die restlichen Strukturen gänzlich negativ bleiben. BGW = Bindegewebe

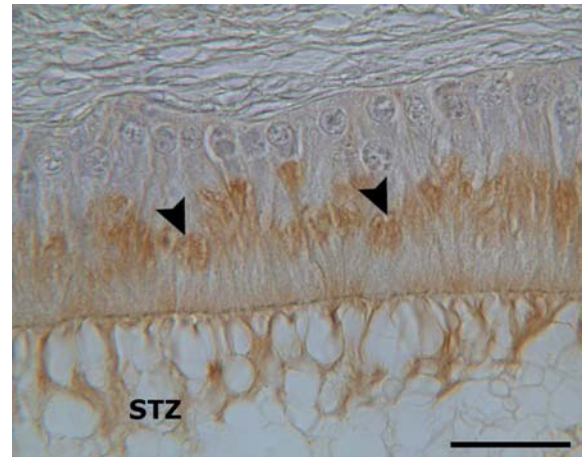


Bild 39: Galektin 9-Bindung im Caput epididymidis, SB = 25 μ m

Die Stereozilien (STZ) des Caputabschnittes reagieren deutlich positiv und auch die Golgi-Zone der Hauptzellen (Pfeilspitzen) ist stark positiv.



Bild 40: Galektin 9-Bindung im Corpus epididymidis, SB = 25 μ m

Die Stereozilien (STZ), die Spermien (SP) im Lumen und auch der apikale Epithelsaum (Pfeile) reagieren deutlich positiv auf Galektin 9.

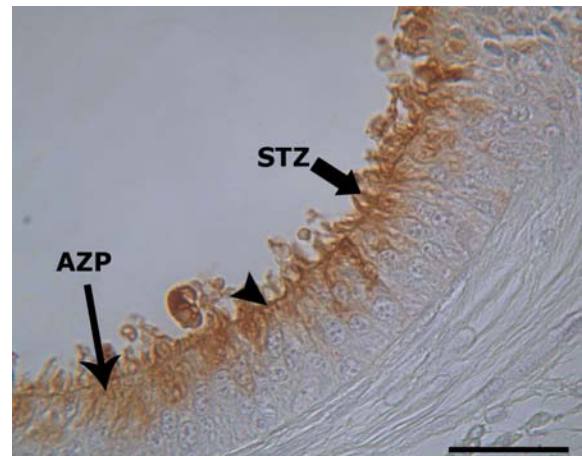


Bild 41: Galektin 9-Bindung in der Cauda epididymidis, SB = 25 μ m

In der Cauda reagieren die Stereozilien (STZ) und der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) stark positiv. Aber auch das apikale Zytoplasma (AZP) der Hauptzellen zeigt eine positive Reaktion.

3. Immunhistochemische Untersuchungen

3.1. Nachweis von Pancytokeratin (PCK)

In den Ductuli efferentes zeigen die Kinozilien-tragenden Zellen eine stark positive Reaktion im gesamten Zytoplasma (Bild 42). Die restlichen Gewebestrukturen in diesem Abschnitt sind negativ. Im Caput und Corpus epididymidis reagieren der apikale Epithelsaum und die Basalzellen deutlich positiv auf den Antikörper gegen Pancytokeratin (Bild 43 und 44). Auch im Caudabereich ist am apikalen Epithelsaum und den Basalzellen eine stark positive Reaktion zu erkennen (Bild 45). Außerdem zeigt das apikale und basale Zytoplasma der Hauptzellen in diesem Nebenhoden-Segment eine schwache PCK-Reaktion. Bindegewebe und glatte Muskelzellen verhalten sich beim Nachweis von PCK negativ.

3.2. Nachweis von Cytokeratin 5 (CK 5)

Beim Nachweis von Cytokeratin 5 reagieren nur die Kinozilien-tragenden Zellen der Ductuli efferentes deutlich positiv (Bild 46). In den folgenden drei Segmenten des Ductus epididymidis reagieren spezifisch die Basalzellen stark positiv (Bild 47, 48 und 49). Nur dieser Zelltyp färbt sich außergewöhnlich deutlich mit dem CK 5-Antikörper an und lässt sogar die genauen Zellform-Unterschiede dieser Epithelzellen in den verschiedenen Nebenhoden-Abschnitten erkennen. Die Basalzellen des Caputsegmentes sind rund, hochkant oval oder sogar dreieckig, während die im Corpus meist rund oder hochkant oval sind. In der Cauda liegen die Basalzellen sehr dicht nebeneinander und sitzen der Basallamina breitflächig auf. Außerdem lässt sich beim immunhistochemischen Nachweis von CK 5 deutlich erkennen, dass die Basalzellen Zytoplasma-Ausläufer in Richtung Lumen besitzen und diese zudem das Lumen erreichen können (Bild 50 und 51). Dies wird durch die intensiv braunen Farbprodukte an der Epitheloberfläche und zwischen den Hauptzellen deutlich, welche den Basalzellen zugeordnet werden können. Diese Zytoplasma-Ausläufer der Basalzellen sind sowohl im Caput als auch im Corpus des Nebenhodenkanals zu

erkennen. Zudem fällt auf, dass die Anzahl der Basalzellen im Caudabereich deutlich angestiegen ist im Vergleich zu den vorhergehenden Abschnitten. Die Basalzellen liegen in diesem Segment dicht nebeneinander.

3.3. Nachweis von Cytokeratin 8 (CK 8)

Bei diesem Antikörper-Nachweis zeigen die Zellkerne beider Epithelzell-Typen der Ductuli efferentes eine deutlich positive Reaktion (Bild 52). Außerdem reagieren die Zellkerne der glatten Muskelzellen und der Bindegewebs-Fibrozyten positiv (Bild 52). Auch die drei Abschnitte des Ductus epididymidis zeigen eine identische Immunreaktion beim CK 8-Nachweis. Die Zellkerne aller Epithelzell-typen und die Zellkerne der umliegenden Gewebezellen reagieren deutlich CK 8-positiv (Bild 53, 54 und 55). Im Caputbereich zeigt sich zudem noch eine starke positive Reaktion in der Golgi-Zone der Hauptzellen (Bild 53). Die Zellkerne der intraluminalen Spermien bleiben dagegen bei diesem immunhistochemischen Nachweis negativ.

3.4. Nachweis von Cytokeratin 14 (CK 14)

Auch beim Antikörpernachweis gegen CK 14 reagieren die Kinozilientragenden Zellen der Ductuli efferentes stark positiv, während die übrigen Zellstrukturen im Epithel, aber auch in den anderen Geweben (Bindegewebe, glatte Muskelzellen) negativ bleiben (Bild 56). Im Epithel des Ductus epididymidis zeigen allein die Basalzellen eine starke Reaktion (Bild 57, 58 und 59). Im Caput zeigt sich zudem das Zytoplasma der Apikalzellen schwach CK 14-positiv. Die Hauptzellen reagieren in Corpus und Cauda nur sehr schwach bis undeutlich positiv. Auch bei dieser immunhistochemischen Färbung ist zu erkennen, dass die Basalzellen zytoplasmatische Ausläufer in Richtung Nebenhodenlumen besitzen. Teilweise ist sogar das Erreichen des Lumens durch diese Ausläufer erkennbar. Außerdem fällt, wie bei Cytokeratin 5, die gesteigerte Anzahl der Basalzellen in der Cauda epididymidis auf. Desweiteren reagieren in der Cauda epididymidis die

angrenzenden Muskellagen positiv auf den Antikörper gegen Cytokeratin 14, die positive Reaktion ist aber deutlich schwächer als die der Basalzellen (Bild 59).

3.5. Nachweis von Cytokeratin 15 (CK 15)

Dieser Nachweis ist in dieser Arbeit für alle Strukturen in allen Nebenhoden-Abschnitten weitestgehend negativ. Lediglich die Kinozilien-tragenden Zellen der Ductuli efferentes und die Caput-Stereozilien reagieren fraglich oder schwach positiv.

3.6. Nachweis von Cytokeratin 18 (CK 18)

In den Ductuli efferentes reagieren wiederum die Kinozilien tragenden Zellen positiv auf den Antikörper gegen CK 18 (Bild 60), die übrigen Gewebeanteile verhalten sich negativ. Im Caput, Corpus und der Cauda epididymidis zeigt allein der apikale Epithelsaum eine deutlich positive Reaktion (Bild 61, 62 und 63).

3.7. Nachweis von Cytokeratin 19 (CK 19)

Auch beim Antikörper gegen CK 19 sind intensiv positive Kinozilien-tragende Zellen in den Ductuli efferentes zu erkennen (Bild 64). Im Ductus epididymidis sind die Basalzellen als einzige Epithelzellart in unterschiedlicher Stärke positiv. Am schwächsten färben sich die Basalzellen im Caputbereich an (Bild 65), während die positive Reaktion im Corpus deutlich intensiver ist (Bild 66). Am stärksten positiv reagieren die Basalzellen in der Cauda epididymidis (Bild 67). Außerdem ist in der Cauda auch ein schwach positiver apikaler Epithelsaum zu erkennen. Andere Epithelstrukturen und umliegende Gewebe zeigen keine Reaktion auf den Antikörper gegen CK 19.

In den Tabellen 10 und 11 sind die Ergebnisse der Cytokeratin-Untersuchungen in der Übersicht dargestellt.

Tabelle 10: Immunhistochemischer Nachweis der Cytokeratine 5, 8, 14 und Pancytokeratin

Abschnitt	Zellart/Gewebeart	PCK	CK 5	CK 8	CK 14
Ductuli efferentes	Apikaler Epithelsaum	-	-	-	-
	KZ-tragende Z	++	++	Zellkerne	++
	Zilienlose Z mit MV	-	-	Zellkerne	-
	Spermien	-	-	-	-
	Bindegewebe	-	-	Zellkerne	-
Caput epididymidis	Stereozilien	-	-	-	-
	Apikaler Epithelsaum	++	-	-	-
	Apikales ZP der HZ	-	-	-	-
	Golgi-Zone der HZ	-	-	++	-
	Zellkern der HZ	-	-	++	-
	Basales ZP der HZ	-	-	-	-
	Basalzellen	++	++	Zellkerne	++
	Apikalzellen	-	-	Zellkerne	ZP +/-
	Basalmembran	-	-	-	-
	Spermien	-	-	-	-
	Bindegewebe	-	-	Zellkerne	-
	Muskelschicht	-	-	Zellkerne	-
Corpus epididymidis	Stereozilien	-	-	-	-
	Apikaler Epithelsaum	++	-	-	-
	Apikales ZP der HZ	-	-	-	+/-
	Golgi-Zone der HZ	-	-	++	-
	Zellkern der HZ	-	-	++	-
	Basales ZP der HZ	-	-	-	+/-
	Basalzellen	++	++	Zellkerne	++
	Apikalzellen	-	-	Zellkerne	ZP +/-
	Basalmembran	-	-	-	-
	Spermien	-	-	-	-
	Bindegewebe	-	-	Zellkerne	-
	Muskelschicht	-	-	Zellkerne	-

Cauda epididymidis	Stereozilien	-	-	-	-
	Apikaler Epithelsaum	++	-	-	-
	Apikales ZP der HZ	+/-	-	-	+/-
	Golgi-Zone der HZ	-	-	++	-
	Zellkern der HZ			++	-
	Basales ZP der H	+/-	-	-	+/-
	Basalzellen	++	++	Zellkerne	++
	Apikalzellen	-	-	Zellkerne	ZP +/-
	Basalmembran	-	-	-	-
	Spermien	-	-	-	-
	Bindegewebe	-	-	Zellkerne	-
	Muskelschicht	-	-	Zellkerne	+

HZ=Hauptzellen, KZ=Kinozilien, MV=Mikrovilli, Z=Zellen, ZP=Zytoplasma
 ++ stark positiv, + positiv, +/- schwach bzw. undeutlich positiv, - negativ

Tabelle 11: Immunhistochemischer Nachweis der Cytokeratine 15, 18 und 19

Abschnitt	Zellart/Gewebeart	CK 15	CK 18	CK 19
Ductuli efferentes	Apikaler Epithelsaum	-	-	-
	KZ-tragende Z	+/-	+	++
	Zilienlose Z mit MV	-	-	-
	Spermien	-	-	-
	Bindegewebe	-	-	-
Caput epididymidis	Stereozilien	+/-	-	-
	Apikaler Epithelsaum	-	++	-
	Apikales ZP der HZ	-	-	-
	Golgi-Zone der HZ	-	-	-
	Zellkern der HZ	-	-	-
	Basales ZP der HZ	-	-	-
	Basalzellen	-	-	+
	Apikalzellen	-	-	-
	Basalmembran	-	-	-
	Spermien	-	-	-

	Bindegewebe	-	-	-
	Muskelschicht	-	-	-
Corpus epididymidis	Stereozilien	-	-	-
	Apikaler Epithelsaum	-	++	-
	Apikales ZP der HZ	-	-	-
	Golgi-Zone der HZ	-	-	-
	Zellkern der HZ	-	-	-
	Basales ZP der HZ	-	-	-
	Basalzellen	-	-	+
	Apikalzellen	-	-	-
	Basalmembran	-	-	-
	Spermien	-	-	-
	Bindegewebe	-	-	-
	Muskelschicht	-	-	-
Cauda epididymidis	Stereozilien	-	-	-
	Apikaler Epithelsaum	-	++	+/-
	Apikales ZP der HZ	-	-	-
	Golgi-Zone der HZ	-	-	-
	Zellkern der HZ		-	-
	Basales ZP der H	-	-	-
	Basalzellen	-	-	++
	Apikalzellen	-	-	-
	Basalmembran	-	-	-
	Spermien	-	-	-
	Bindegewebe	-	-	-
	Muskelschicht	-	-	-

HZ=Hauptzellen, KZ=Kinozilien, MV=Mikrovilli, Z=Zellen, ZP=Zytoplasma
 ++ stark positiv, + positiv, +/- schwach bzw. undeutlich positiv, - negativ

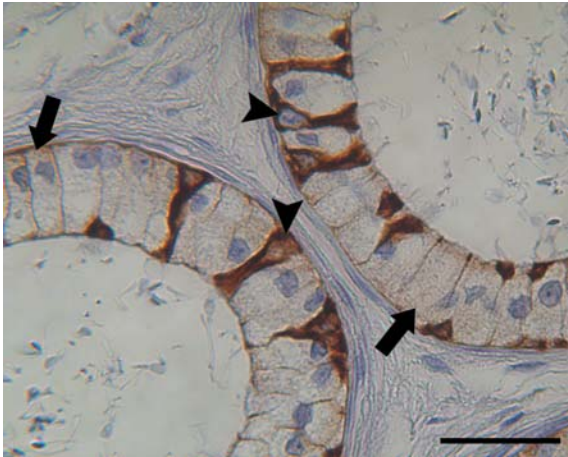


Bild 42: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von PCK, SB = 25 μ m
Die Kinozilien-tragenden Zellen (Pfeilspitzen) reagieren stark positiv, während die zilienlosen Zellen (Pfeile) negativ sind.

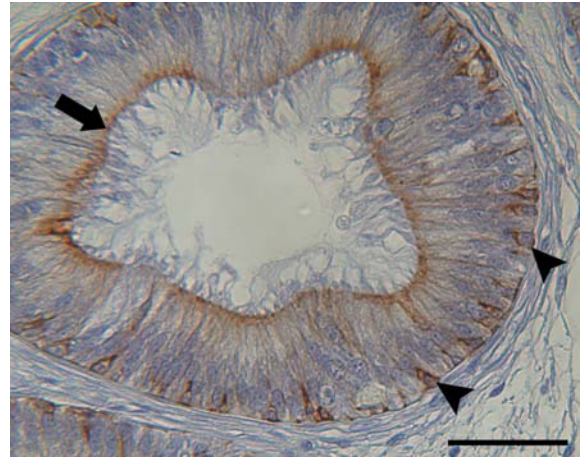


Bild 43: Caput epididymidis, immunhistologischer Nachweis von PCK, SB = 40 μ m

Die Basalzellen (Pfeilspitzen) reagieren stark positiv und auch der apikale Epithelsaum (Pfeil) zeigt sich positiv.

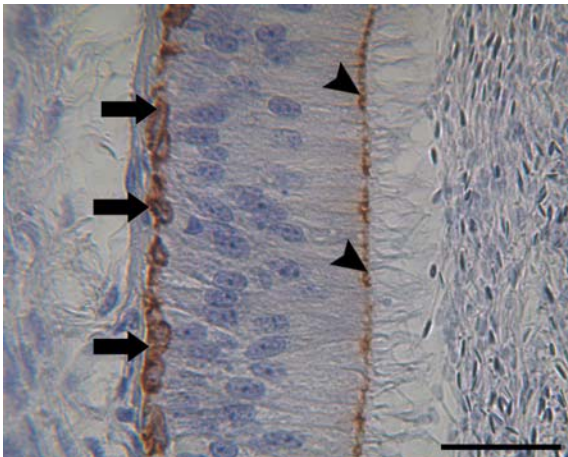


Bild 44: Corpus epididymidis, immunhistologischer Nachweis von PCK, SB = 25 μ m

Die Basalzellen (Pfeile) sind stark positiv und zudem reagiert der apikale Epithelsaum (Pfeilspitzen) positiv.

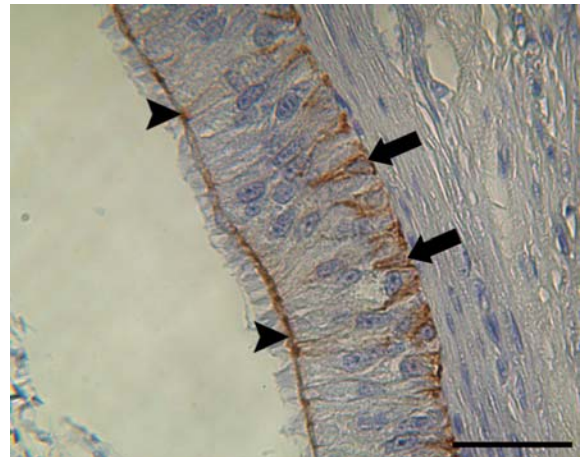


Bild 45: Cauda epididymidis, immunhistologischer Nachweis von PCK, SB = 25 μ m

Auch in der Cauda reagieren die Basalzellen (Pfeile) stark positiv. Der apikale Epithelsaum (Pfeilspitzen) zeigt zudem eine positive Reaktion.

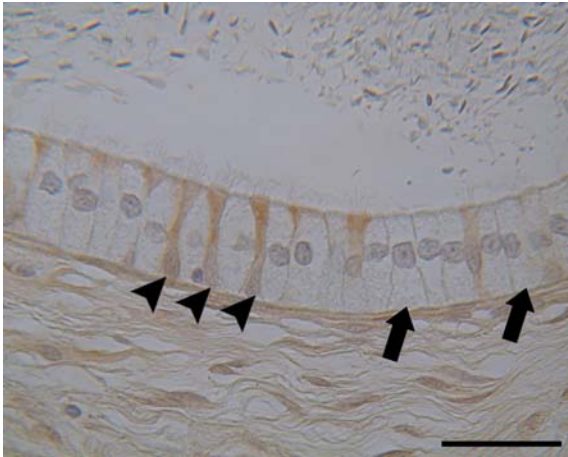


Bild 46: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von CK 5, SB = 25 µm

Die Kinozilien-tragenden Zellen (Pfeilspitzen) reagieren stark positiv, während ihre Kinozilien selbst genau wie die zilienlosen Zellen (Pfeile) negativ sind.

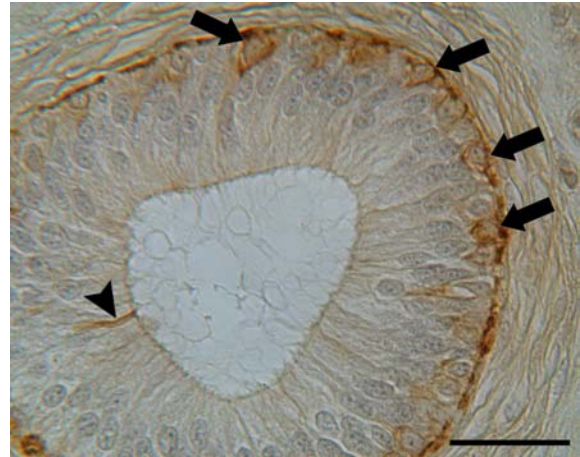


Bild 47: Caput epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 5, SB = 25 µm

Die Basalzellen (Pfeile) reagieren stark positiv und die Pfeilspitze zeigt eine positive Farbreaktion des Zytoplasma-Ausläufers einer Basalzelle.

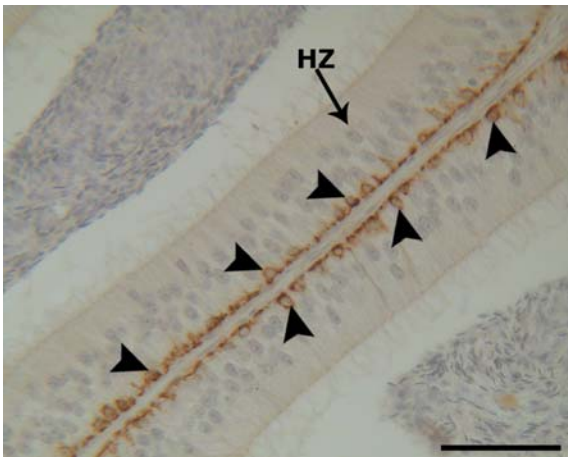


Bild 48: Corpus epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 5, SB = 40 µm

Die Basalzellen (Pfeilspitzen) sind stark positiv, wohingegen die Hauptzellen (HZ) und alle übrigen Strukturen gänzlich negativ sind.

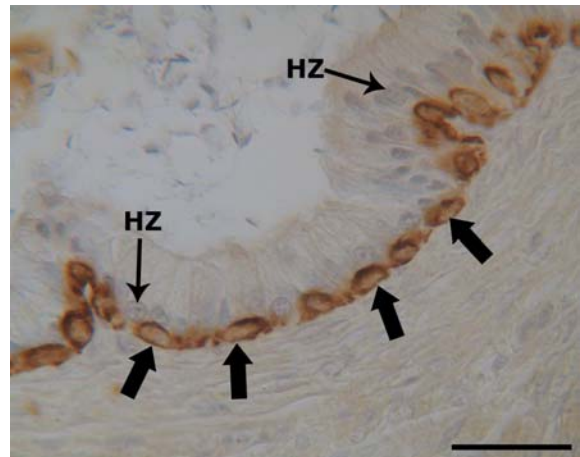


Bild 49: Cauda epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 5, SB = 25 µm

Auch in der Cauda reagieren die Basalzellen (Pfeile) stark positiv, aber die Hauptzellen (HZ) und alle restlichen Strukturen bleiben negativ.

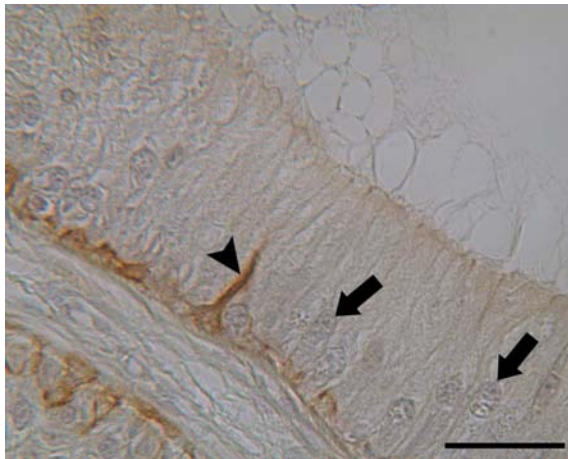


Bild 50: Caput epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 5, SB = 25 μ m

Allein die Basalzellen reagieren stark positiv und die Pfeilspitze zeigt eindeutig einen stark positiven Zytoplasma-Ausläufer einer Basalzelle, welcher sich in Richtung Lumen erstreckt. Die Hauptzellen (Pfeile) sind CK 5-negativ.

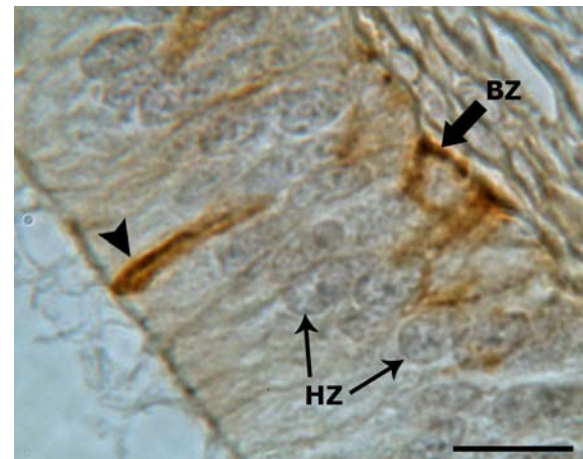


Bild 51: Cauda epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 5, SB = 10 μ m

Hier ist durch die Pfeilspitze deutlich zu erkennen, dass die stark positive Farbreaktion, welche spezifisch den Basalzellen (BZ) zuzuordnen ist, das Lumen erreicht. Somit erreichen die Zytoplasma-Ausläufer (Pfeilspitze) der Basalzellen das Lumen des Nebenhodenkanals. Die Hauptzellen (HZ) sind CK 5-negativ.

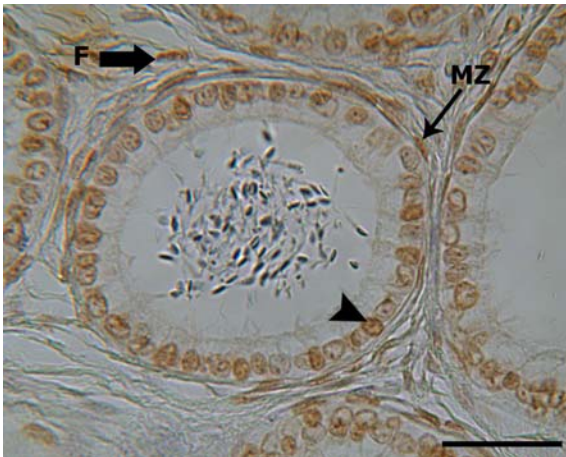


Bild 52: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von CK 8, SB = 25 μ m

Die Zellkerne der Epithelzellen (Pfeilspitze), die Zellkerne der Muskelzellen (MZ) und auch die Zellkerne der Fibrozyten (F) reagieren positiv mit dem Antikörper gegen CK 8.

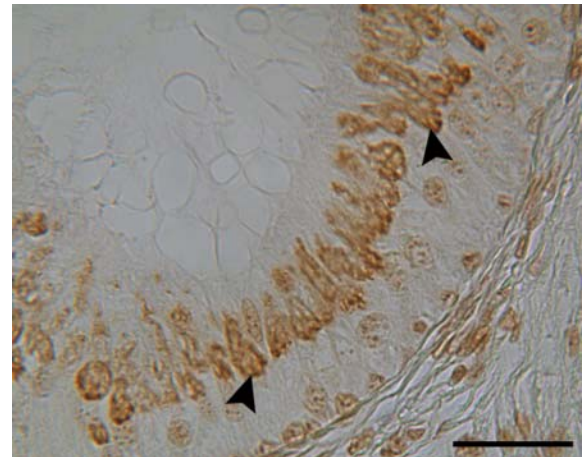


Bild 53: Caput epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 8, SB = 25 μ m

Im Caput reagieren neben den Zellkernen aller Epithelzelltypen die Golgi-Zone der Hauptzellen (Pfeilspitzen) stark positiv. Zudem zeigen auch die Muskelzellkerne und die Fibrozytenkerne eine positive Reaktion.

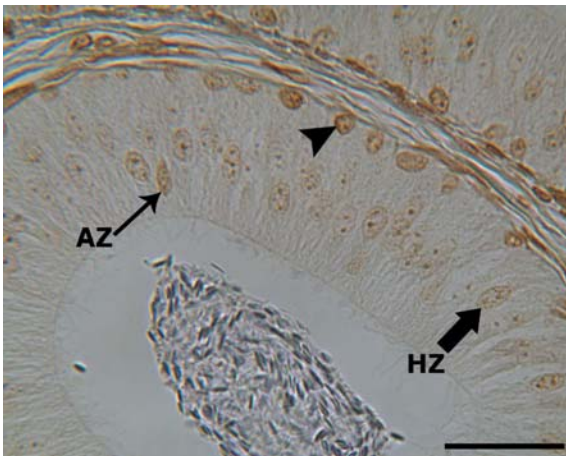


Bild 54: Corpus epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 8, SB = 25 μ m

Jeweils die Zellkerne der Basalzellen (Pfeilspitzen), der Hauptzellen (HZ) und der Apikalzellen (AZ) reagieren positiv, genau wie die Zellkerne der Muskelzellen und der Fibrozyten.

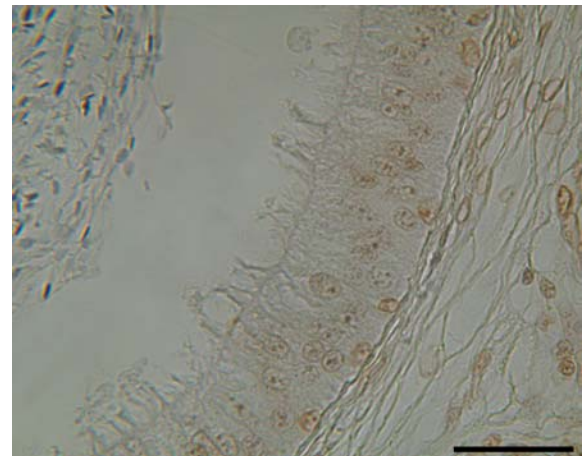


Bild 55: Cauda epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 8, SB = 25 μ m

Auch in der Cauda reagieren die Zellkerne aller Epithelzell-Typen und alle Zellkerne der umliegenden Gewebezellen positiv mit dem Antikörper gegen CK 8.

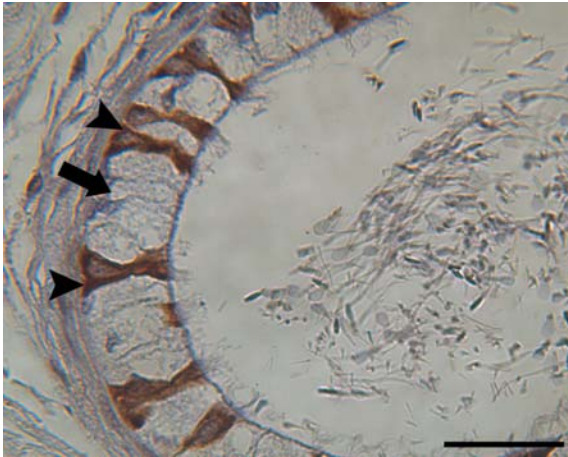


Bild 56: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von CK 14, SB = 25 μ m

Die Kinozilien-tragenden Zellen (Pfeilspitzen) reagieren stark positiv, während die zilienlosen Zellen mit Mikrovilli-Besatz (Pfeil) negativ bleiben.

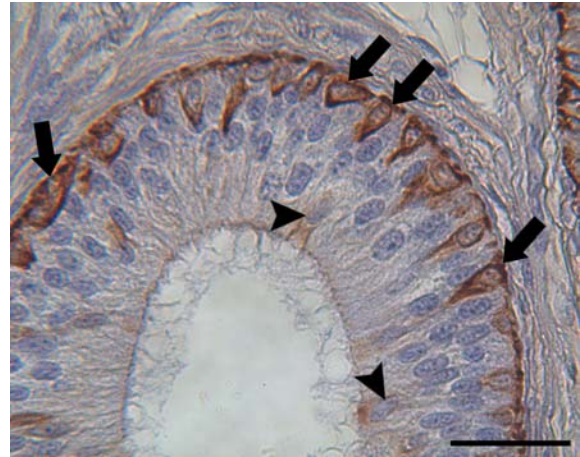


Bild 57: Caput epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 14, SB = 25 μ m

Im Caput zeigen die Basalzellen (Pfeile) eine stark positive Reaktion während das Zytoplasma der Apikalzellen (Pfeilspitzen) nur schwach positiv reagiert. Auch hier ist zu erkennen, dass Ausläufer der Basalzellen in Richtung Lumen ziehen.

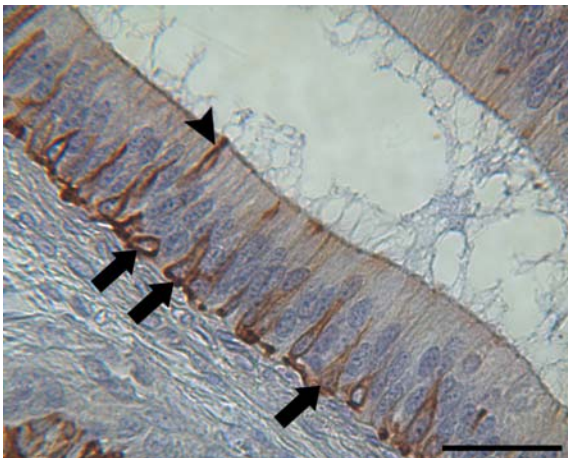


Bild 58: Corpus epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 14, SB = 25 μ m

Genau wie im Caput reagieren die Basalzellen (Pfeile) stark positiv und die Pfeilspitze weist auf einen Zytoplasma-Ausläufer einer Basalzelle hin. Das Zytoplasma der Hauptzellen zeigt nur eine sehr schwach positive Reaktion.

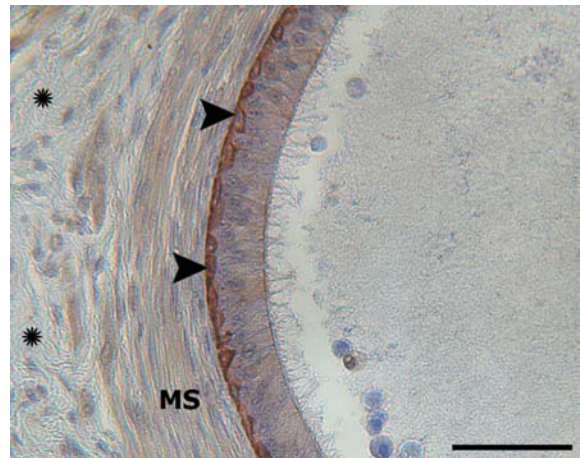


Bild 59: Cauda epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 14, SB = 40 μ m

Auch in der Cauda reagieren die Basalzellen (Pfeilspitzen) stark positiv. Das Zytoplasma der Hauptzellen zeigt sich nur schwach positiv. Zudem reagiert die umliegende Muskelschicht (MS) positiv, während das Bindegewebe (Sterne) negativ bleibt

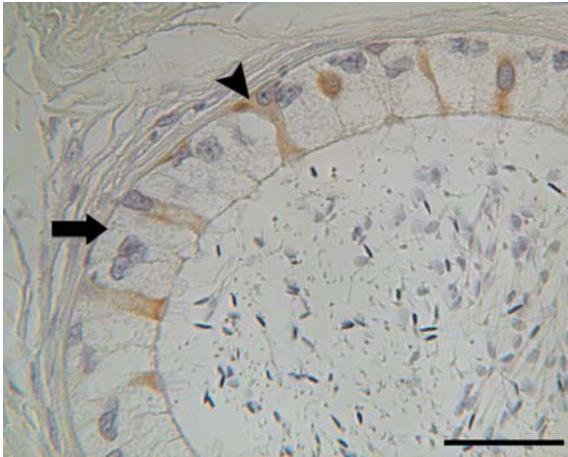


Bild 60: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von CK 18, SB = 25 μ m

Die Kinozilien-tragenden Zellen (Pfeilspitze) reagieren positiv, während die zilienlosen Zellen mit Mikrovilli-Besatz (Pfeil) negativ bleiben.

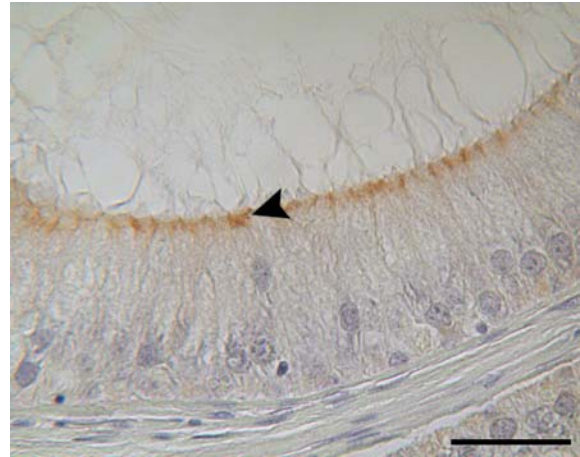


Bild 61: Caput epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 18, SB = 25 μ m

Der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) reagiert als einzige Struktur positiv auf den Antikörper gegen Cytokeratin 18.

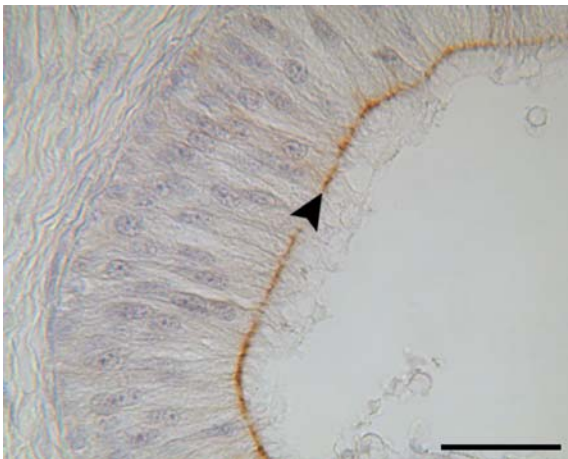


Bild 62: Corpus epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 18, SB = 25 μ m

Der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) zeigt eine positive CK 18-Reaktion.

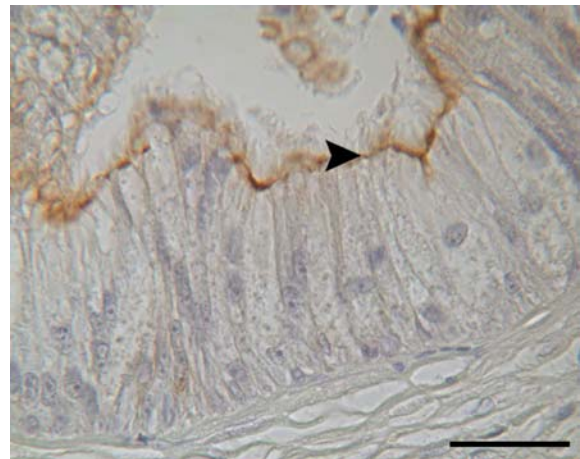


Bild 63: Cauda epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 18, SB = 25 μ m

Auch in der Cauda reagiert lediglich der apikale Epithelsaum (Pfeilspitze) positiv beim CK 18-Nachweis.

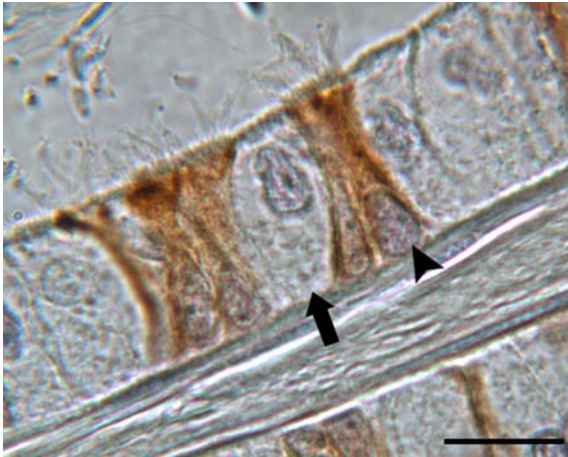


Bild 64: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von CK 19, SB = 10 μ m

Die Kinozilien-tragenden Zellen (Pfeilspitze) reagieren stark positiv, während die zilienlosen Zellen mit Mikrovilli-Besatz (Pfeil) negativ bleiben.

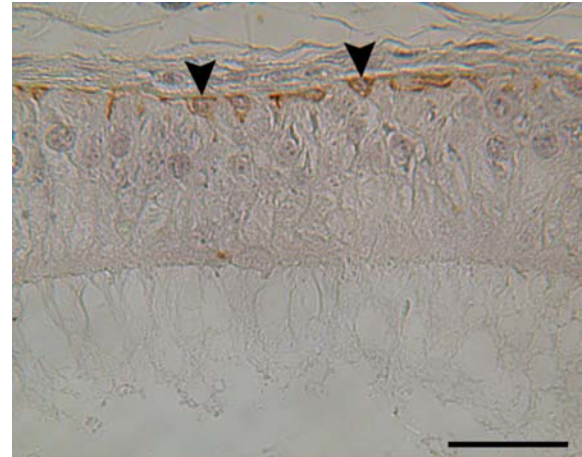


Bild 65: Caput epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 19, SB = 25 μ m

Im Caput zeigen die Basalzellen (Pfeilspitzen) eine positive Reaktion. Die restlichen Epithelzellarten zeigen keine CK 19-Reaktion.

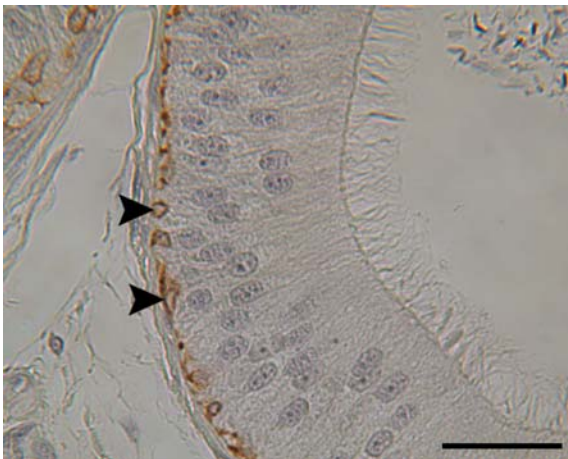


Bild 66: Corpus epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 19, SB = 25 μ m

Im Corpus ist die Reaktion der Basalzellen (Pfeilspitzen) noch deutlicher positiv, als im Caputbereich. Die Haupt- und Apikalzellen reagieren negativ.

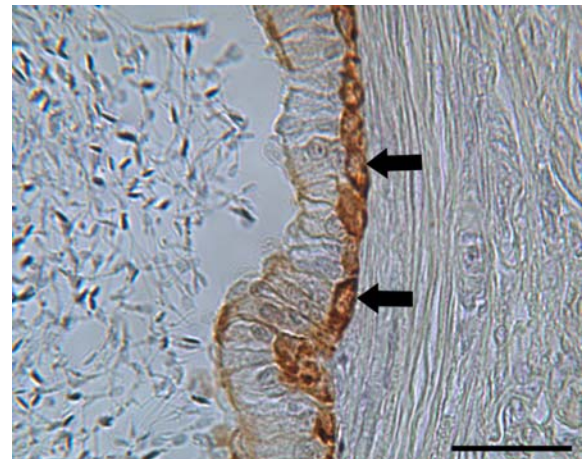


Bild 67: Cauda epididymidis, immunhistologischer Nachweis von CK 19, SB = 25 μ m

In der Cauda hingegen hat die positive Reaktion der Basalzellen (Pfeile) die stärkste Intensität. Zudem ist ein schwach positiver apikaler Epithelsaum zu erkennen. Das Zytoplasma der übrigen Epithelzelltypen zeigt sich negativ.

3.8. Nachweis von Claudin 1

In den Ductuli efferentes reagieren die lateralen Zellmembranen beider Epithelzell-Typen stark positiv auf den Antikörper gegen Claudin 1 (Bild 68). Die restlichen Zellstrukturen und andere Gewebearten sind in den Ductuli efferentes negativ. In Caput, Corpus und Cauda epididymidis reagieren die lateralen Zellmembranen der Hauptzellen und der Apikalzellen stark positiv. In allen drei Nebenhodenanteilen erscheinen die Zellmembranen der Basalzellen stark Claudin-positiv (Bild 69, 70 und 71). Dagegen bleiben Stereozilien, Spermien, Bindegewebe und auch die Muskelzellschichten beim immunhistochemischen Nachweis von Claudin 1 negativ.

3.9. Nachweis von Occludin

Bei den Ductuli efferentes zeigen das Zytoplasma der Kinozilientragenden Zellen und auch die lateralen Zellmembranen beider Epithelzell-Arten positive Occludin-Reaktivität (Bild 72). Außerdem reagieren die wenigen intraluminalen Spermien der Ductuli efferentes undeutlich bis schwach positiv. Das die Epithelkanälchen umgebende Bindegewebe bleibt gänzlich negativ. In den darauffolgenden drei Abschnitten des Ductus epididymidis ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die apikalen als auch die luminal gelegenen Anteile der lateralen Zellmembranen der Haupt- und Apikalzellen Occludin-positiv reagieren (Bild 73 und 75). Die Zellmembranen der Basalzellen sind dagegen beim Occludinnachweis negativ. Die Spermien sind im gesamten Ductus epididymidis undeutlich bis schwach positiv. Alle übrigen Gewebestrukturen geben keine Bindung des Occludin-Antikörpers. In der Fluoreszenzfärbung mit DAPI ist deutlich zu erkennen, dass die Zellkerne im Epithel des kaninen Ductus epididymidis Kerneinschlüsse aufweisen (Bild 74), welche sich nicht mit dem DNA-selektiven Farbstoff anfärben.

In Tabelle 12 sind die immunhistochemischen Ergebnisse für Claudin 1 und Occludin in der Übersicht dargestellt.

Tabelle 12: Immunhistochemischer Nachweis von Claudin 1 und Occludin

Abschnitt	Zellart/Gewebeart	Claudin 1	Occludin
Ductuli efferentes	Apikaler Epithelsaum	-	-
	KZ-tragende Z	Laterale Zellmembran ++	ZP + und laterale Zellmembran +
	Zilienlose Z mit MV	Laterale Zellmembran ++	Laterale Zellmembran +
	Spermien	-	+/-
	Bindegewebe	-	-
Caput epididymidis	Stereozilien	-	-
	Apikaler Epithelsaum	-	+
	Hauptzellen	Laterale Zellmembran ++	Apikale Zellmembran +
	Basalzellen	Zellmembran ++	-
	Apikalzellen	Laterale Zellmembran ++	Apikale Zellmembran +
	Basalmembran	-	-
	Spermien	-	-
	Bindegewebe	-	-
	Muskelschicht	-	-
Corpus epididymidis	Stereozilien	-	-
	Apikaler Epithelsaum	-	+
	Hauptzellen	Laterale Zellmembran ++	Apikale Zellmembran +
	Basalzellen	Zellmembran ++	-
	Apikalzellen	Laterale Zellmembran ++	Apikale Zellmembran +
	Basalmembran	-	-
	Spermien	-	-
	Bindegewebe	-	-
	Muskelschicht	-	-
Cauda epididymidis	Stereozilien	-	-
	Apikaler Epithelsaum	-	+
	Hauptzellen	Laterale Zellmembran ++	Apikale Zellmembran +
	Basalzellen	Zellmembran ++	-

	Apikalzellen	Laterale Zellmembran ++	Apikale Zellmembran +
	Basalmembran	-	-
	Spermien	-	-
	Bindegewebe	-	-
	Muskelschicht	-	-

HZ=Hauptzellen, KZ=Kinozilien, MV=Mikrovilli, Z=Zellen, ZP=Zytoplasma
 ++ stark positiv, + positiv, +/- schwach bzw. undeutlich positiv, - negativ

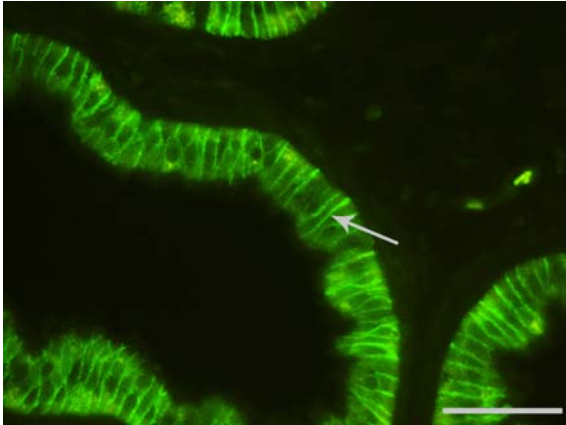


Bild 68: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von Claudin 1, SB = 50 µm

Die lateralen Zellmembranen (Pfeil) beider Epithelzell-Typen reagieren stark positiv.

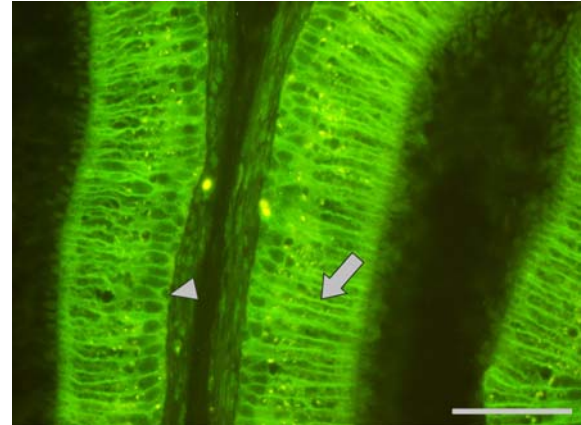


Bild 69: Caput epididymidis, immunhistologischer Nachweis von Claudin 1, SB = 50 µm

Im Caput reagieren die lateralen Zellmembranen (Pfeil) der Haupt- und Apikalzellen stark positiv. Außerdem ist zu erkennen, dass auch die Zellmembran der Basalzellen (Pfeilspitze) positiv reagiert.

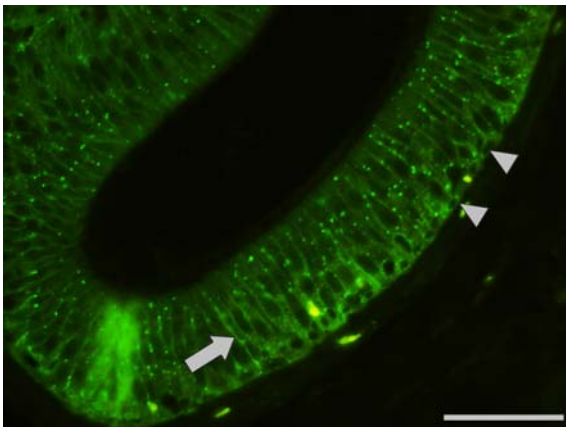


Bild 70: Corpus epididymidis, immunhistologischer Nachweis von Claudin 1, SB = 50 µm

Es reagieren die lateralen Zellmembranen (Pfeil) der Haupt- und Apikalzellen stark positiv und auch die Zellmembran der Basalzellen (Pfeilspitzen) sind positiv.

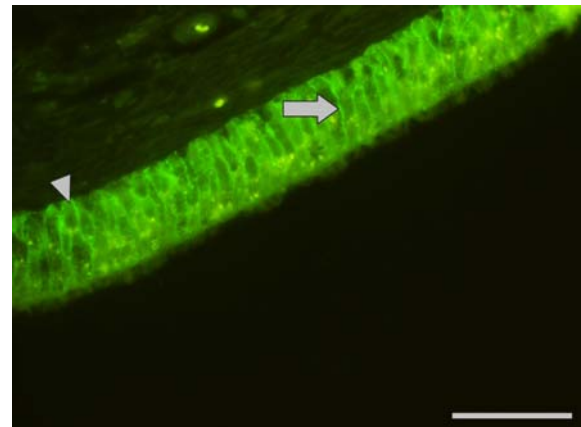


Bild 71: Cauda epididymidis, immunhistologischer Nachweis von Claudin 1, SB = 50 µm

Die lateralen Zellmembranen (Pfeil) der Haupt- und Apikalzellen reagieren stark positiv. Ebenso sind die Zellmembranen der Basalzellen (Pfeilspitze) positiv.

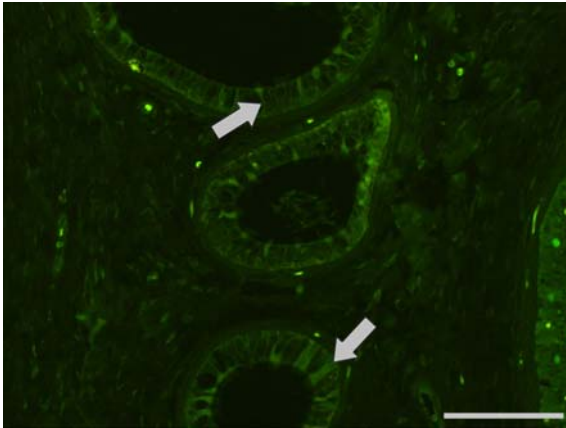


Bild 72: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von Occludin, SB = 100 μ m

Die Kinozilien-tragenden Zellen (Pfeile) und auch die lateralen Zellmembranen beider Zell-Typen reagieren positiv.

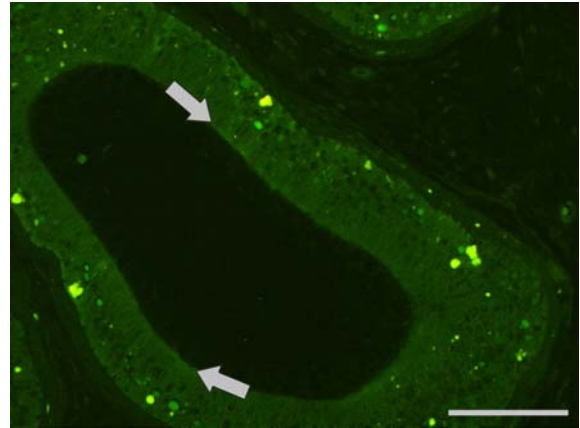


Bild 73: Caput epididymidis, immunhistologischer Nachweis von Occludin, SB = 100 μ m

Im Caput reagieren die apikalen Zellmembranen (Pfeile), sowie die ganz apikalen Bereiche der lateralen Zellmembranen der Haupt- und Apikalzellen positiv.

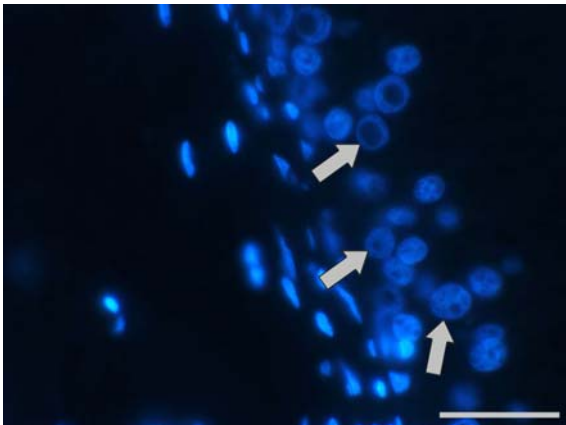


Bild 74: Caput epididymidis, DAPI-Fluoreszenz-Färbung zur Zellkern-darstellung, SB = 32 μ m

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zellkerne der Epithelzellen (Pfeile) im kaninen Ductus epididymidis Kern-einschlüsse besitzen, welche sich nicht mit dem DNA-selektiven Farbstoff anfärben.

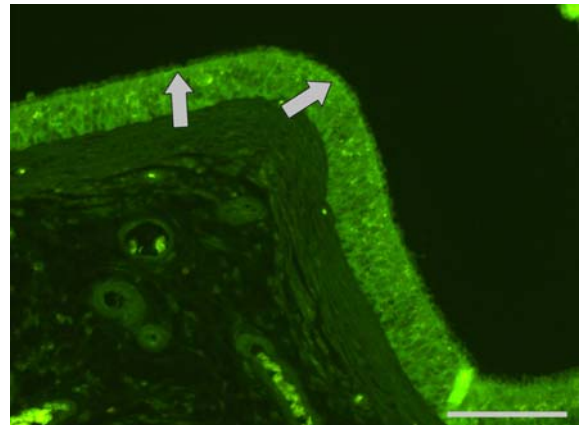


Bild 75: Cauda epididymidis, immunhistologischer Nachweis von Occludin, SB = 100 μ m

Die apikalen Zellmembranen (Pfeile) und die ganz luminalen Anteile der lateralen Zellmembranen von Haupt- und Apikalzellen sind Occludin-positiv.

3.10. Nachweis von Cyclooxygenase 1 (COX-1)

In den Ductuli efferentes reagiert bei einigen Epithelzellen beider Typen (Kinozilien-tragende und zilienlose Zellen) das apikale Zytoplasma positiv mit dem Cyclooxygenase-1-Antikörper (Bild 76). Im Caput- und Corpusbereich des Nebenhodenkanals zeigen sich die Basalzellen schwach COX-1-positiv (Bild 77 und 78), die übrigen Epithelbereiche und das umgebende Gewebe bleiben negativ. Im Caudaabschnitt reagieren ebenfalls die Basalzellen schwach positiv, und zudem ist in den weiter außen gelegenen glatten Muskelzellen eine deutlich positive perinukleäre Reaktion zu erkennen (Bild 79). Diese positive COX-1-Reaktion ist in den Muskelzellschichten, die sich an das Epithel anschließen, nicht zu beobachten.

3.11. Nachweis des Angiotensin II-Rezeptors (AGTR-II)

Beim Antikörper-Nachweis gegen den AGTR-II Subtyp 2 zeigen sich in den Ductuli efferentes einzelne Kinozilien-tragende Zellen, zilienlose Zellen und auch die wenigen im Lumen gelegenen Spermien schwach positiv (Bild 80). Im Caputbereich reagieren neben den Spermien der apikale Epithelsaum und die Basalzellen schwach positiv (Bild 81). Im Corpus epididymidis reagieren die Basalzellen im Vergleich zum Caput etwas intensiver positiv (Bild 82). Die Spermien im Lumen des Ductus epididymidis und der apikale Epithelsaum reagieren schwach positiv. Im Caudabereich des Ductus epididymidis reagieren wiederum die Basalzellen positiv und auch die umliegende Muskelschicht zeigt sich schwach positiv (Bild 83). Allerdings gibt es in diesem Abschnitt keine positive AGTR-II-Reaktion am apikalen Epithelsaum mehr.

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse für die immunhistochemischen Untersuchungen für AGTR-II und COX-1 nochmals in der Übersicht dargestellt.

Tabelle 13: Immunhistochemischer Nachweis von AGTR-II und COX-1

Abschnitt	Zellart/Gewebeart	AGTR-II (Typ 2)	COX-1
Ductuli efferentes	Apikaler Epithelsaum	-	-
	KZ-tragende Z	+/-	Teilweise apikales ZP +
	Zilienlose Z mit MV	+/-	Teilweise apikales ZP +
	Spermien	+/-	-
	Bindegewebe	-	-
Caput epididymidis	Stereozilien	-	-
	Apikaler Epithelsaum	+/-	-
	Hauptzellen	-	-
	Basalzellen	+/-	+/-
	Apikalzellen	-	-
	Basalmembran	-	-
	Spermien	+/-	-
	Bindegewebe	-	-
	Muskelschicht	-	-
Corpus epididymidis	Stereozilien	-	-
	Apikaler Epithelsaum	+/-	-
	Hauptzellen	-	-
	Basalzellen	+	+/-
	Apikalzellen	-	-
	Basalmembran	-	-
	Spermien	+/-	-
	Bindegewebe	-	-
	Muskelschicht	-	-
Cauda epididymidis	Stereozilien	-	-
	Apikaler Epithelsaum	-	-
	Hauptzellen	-	-
	Basalzellen	+	+/-
	Apikalzellen	-	-
	Basalmembran	-	-
	Spermien	-	-

	Bindegewebe	-	-
	Muskelschicht	+/-	Kernmembran der äußeren Muskelschichten ++

HZ=Hauptzellen, KZ=Kinozilien, MV=Mikrovilli, Z=Zellen, ZP=Zytoplasma
++ stark positiv, + positiv, +/- schwach bzw. undeutlich positiv, - negativ

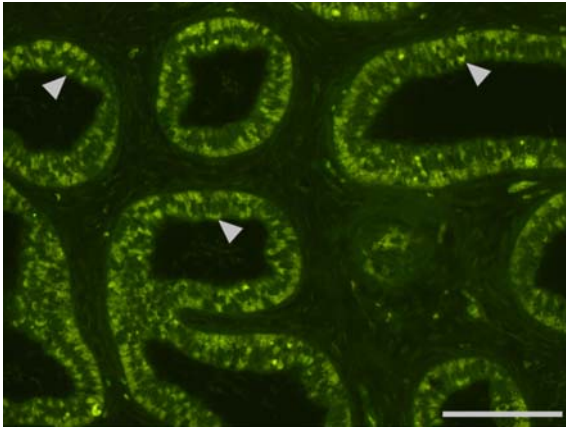


Bild 76: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von COX 1, SB = 100 μ m

Zum Teil reagiert das apikale Zytoplasma der Epithelzellen (Pfeilspitzen) positiv. Ansonsten ist im basalen Zellbereich dieser Zellen unspezifische gelbliche Fluoreszenz zu erkennen, die auf die dort gelegenen Restkörper des lysosomalen Abbaues zurückgeführt werden kann.

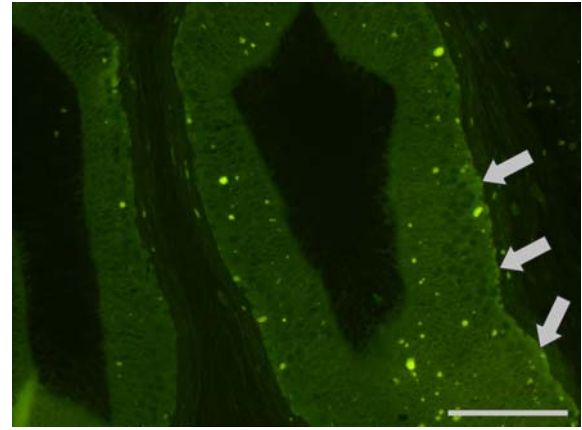


Bild 77: Caput epididymidis, immunhistologischer Nachweis von COX 1, SB = 100 μ m

Im Caput reagieren die Basalzellen (Pfeile) schwach positiv.

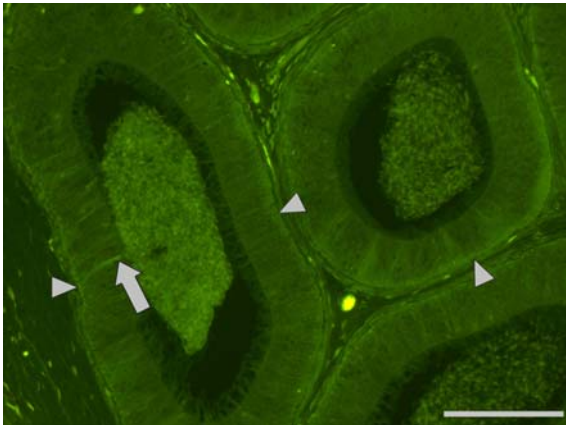


Bild 78: Corpus epididymidis, immunhistologischer Nachweis von COX 1, SB = 100 μ m

Die Basalzellen (Pfeilspitzen) reagieren schwach positiv. Der Pfeil zeigt eine schwach positive Reaktion, die zur Epitheloberfläche zieht. Dies ist ein Zytoplasma-Ausläufer einer Basalzelle.

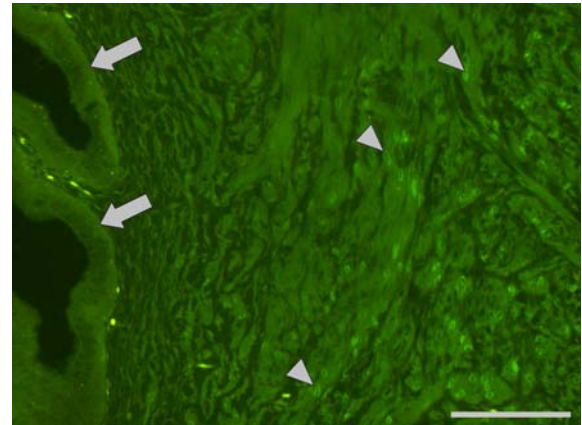


Bild 79: Cauda epididymidis, immunhistologischer Nachweis von COX 1, SB = 100 μ m

Die Basalzellen (Pfeile) sind schwach positiv. Außerdem reagieren die Zellkernmembranen (Pfeilspitzen) der Zellen der äußeren Muskelschichten deutlich positiv.

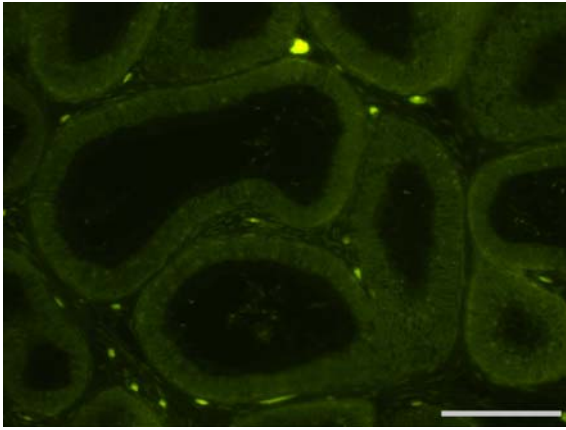


Bild 80: Ductuli efferentes, immun-histologischer Nachweis von AGTR-II, SB = 100 μ m

Die Epithelzellen der Ductuli efferentes reagieren nur undeutlich bis ganz schwach positiv. Auch die intraluminalen Spermien zeigen nur eine undeutliche bis sehr schwache positive Reaktion.

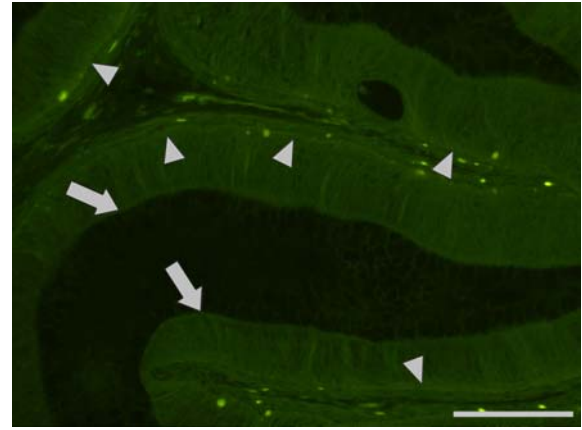


Bild 81: Caput epididymidis, immun-histologischer Nachweis von AGTR-II, SB = 100 μ m

Im Caput reagieren der apikale Epithelsaum (Pfeile) sowie die Basalzellen (Pfeilspitzen) schwach positiv auf den Antikörper gegen AGTR II.

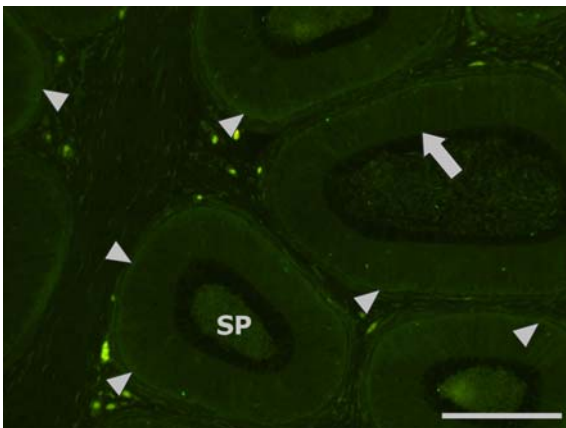


Bild 82: Corpus epididymidis, immun-histologischer Nachweis von AGTR-II, SB = 100 μ m

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Basalzellen (Pfeilspitzen) positiv reagieren. Auch der apikale Epithelsaum (Pfeil) und die intraluminalen Spermien (SP) zeigen sich schwach positiv.

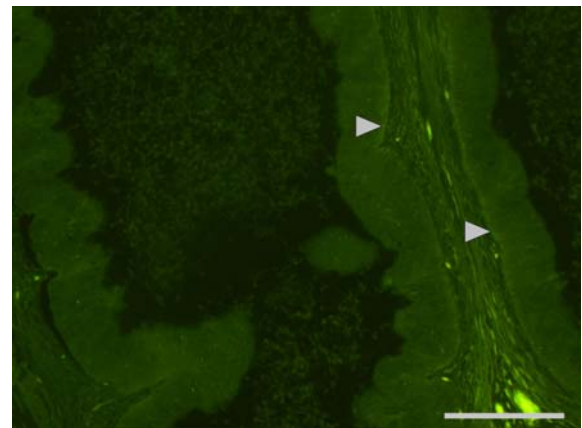


Bild 83: Cauda epididymidis, immun-histologischer Nachweis von AGTR-II, SB = 100 μ m

Die Basalzellen (Pfeilspitzen) sind AGTR-II-positiv. Außerdem reagiert die umliegende Muskelschicht schwach positiv.

4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

4.1. Ultrastruktur der Ductuli efferentes

Die Ductuli efferentes verbinden das Rete testis mit dem Ductus epididymidis. Das mehrreihige Epithel der Ductuli efferentes ist mit $19,0 \mu\text{m}$ ($\pm 2,8 \mu\text{m}$) deutlich niedriger als das der nachfolgenden Abschnitte des Ductus epididymidis. Dabei lassen sich im Epithel zwei Zelltypen unterscheiden: Kinozilien-tragende Zellen und zilienlose Zellen mit Mikrovilli-Besatz (Bild 84). Die Kinozilien-tragenden Zellen weisen meist einen mehr basal gelegenen länglichen Zellkern auf (Bild 85) und lassen zahlreiche längliche Mitochondrien im apikalen Zytoplasma erkennen (Bild 87). Selten kommen auch vereinzelte Mitochondrien im basalen Zytoplasmabereich dieser Zellen vor. Die Kinozilien lassen sich elektronenmikroskopisch durch ihre charakteristische „9x2+2 Struktur“ der Mikrotubuli-Anordnung (Bild 88) von den Mikrovilli, welche keine Mikrotubuli beinhalten, unterscheiden. Der Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum sind bei diesem Zelltyp spärlich ausgebildet. Die zilienlosen Zellen zeigen ultrastrukturell unterschiedliche Erscheinungsmuster und können in vier Typen unterteilt werden: Typ 1-Zellen enthalten nur sehr wenige Granula und sehr wenige Vakuolen im Zytoplasma. Die zilienlosen Zellen des Typ 2 beinhalten zahlreiche elektronendichte Granula. Die Typ 3-Zellen sind durch viele helle Vakuolen, welche nahezu das gesamte Zytoplasma ausfüllen, gekennzeichnet und die Zellen des 4. Typs enthalten sowohl apikal gelegene Vakuolen als auch basal gelegene dunkle Granula (Bild 84). Der oft gelappte Zellkern der zilienlosen Zellen ist meist zentral im Zytoplasma gelegen und rundlich. Im apikalen Zytoplasma dieser Zellen sind oft zahlreiche kleine Bläschen zu erkennen, welche sich zum Teil ins Lumen öffnen (Bild 88). Diese Bläschen, welche hauptsächlich bei Zellen des Typ 2 und 4 vorkommen, sind ein Hinweis auf aktive Sekretionsprozesse dieser Zellart. In den zilienlosen Zellen mit Mikrovilli-Besatz ist der Golgi-Apparat schwach entwickelt und es kommt wenig endoplasmatisches Retikulum vor.

Regelmäßig kommt im Zytoplasma aller Zellarten der Ductuli efferentes eingelagertes Glykogen vor, welches sich als stark elektronendichte kleine Granula darstellt (Bild 86). An die gleichmäßig verlaufende Basalmembran schließt sich nach außen eine sehr schmale Schicht lockeres Bindegewebe an. Darauf folgen ein bis zwei dünne Lagen glatter Muskelzellen und anschließend lockeres Bindegewebe, welches reich an Gefäßen und Nerven ist.

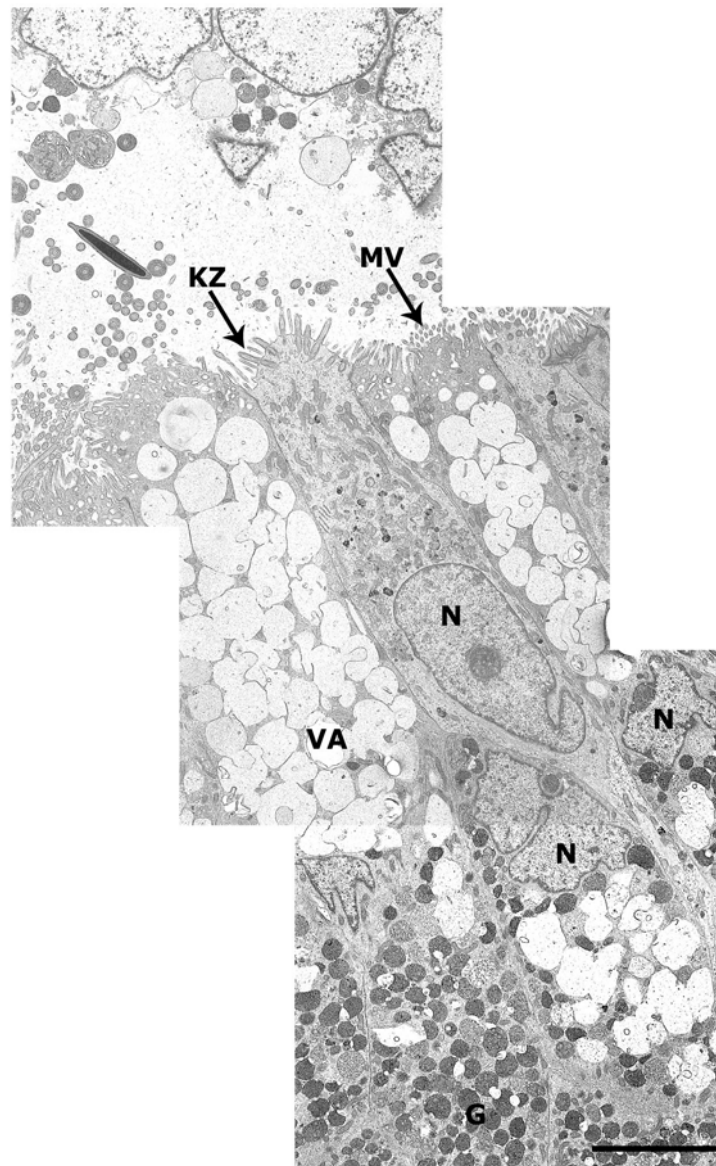


Bild 84: Übersicht über das mehrreihige Epithel der Ductuli efferentes, SB = 3 μ m

Neben den Kinozilien (KZ) tragenden Zellen kommen zilienlose Zellen mit Mikrovilli (MV)-Besatz vor. Die zilienlosen Zellen enthalten Vakuolen (VA) und/oder Granula (G) im Zytoplasma. N = Nucleus

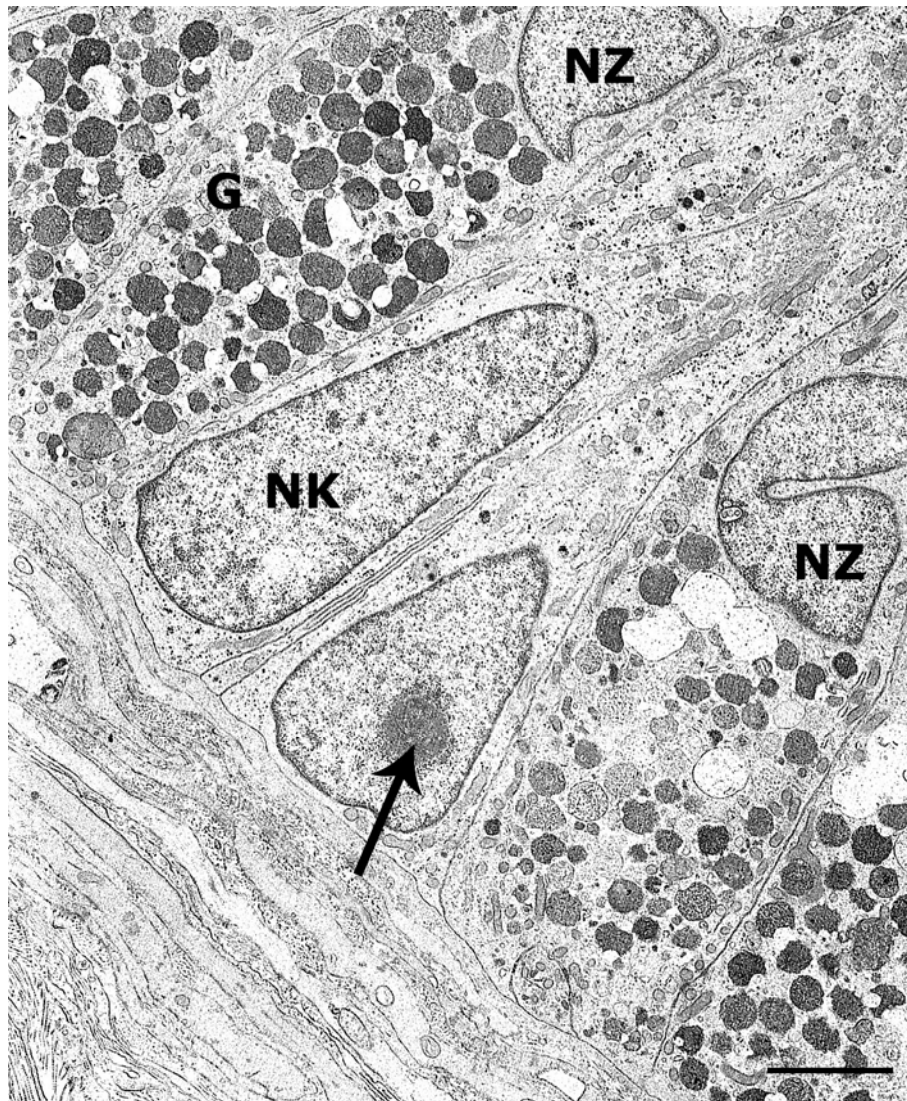


Bild 85: Basalbereich der Ductuli efferentes SB = 3 μ m

Im Epithel kommen Kinozilien-tragende Zellen vor, deren Zellkern (NK) im basalen Zytoplasmabereich liegt. Die Zellkerne der zilienlosen Zellen (NZ) liegen mehr zentral im Zytoplasma und es befinden sich zum Teil zahlreiche Granula (G) im Zytoplasma dieser Zellen. Pfeil = Nukleolus

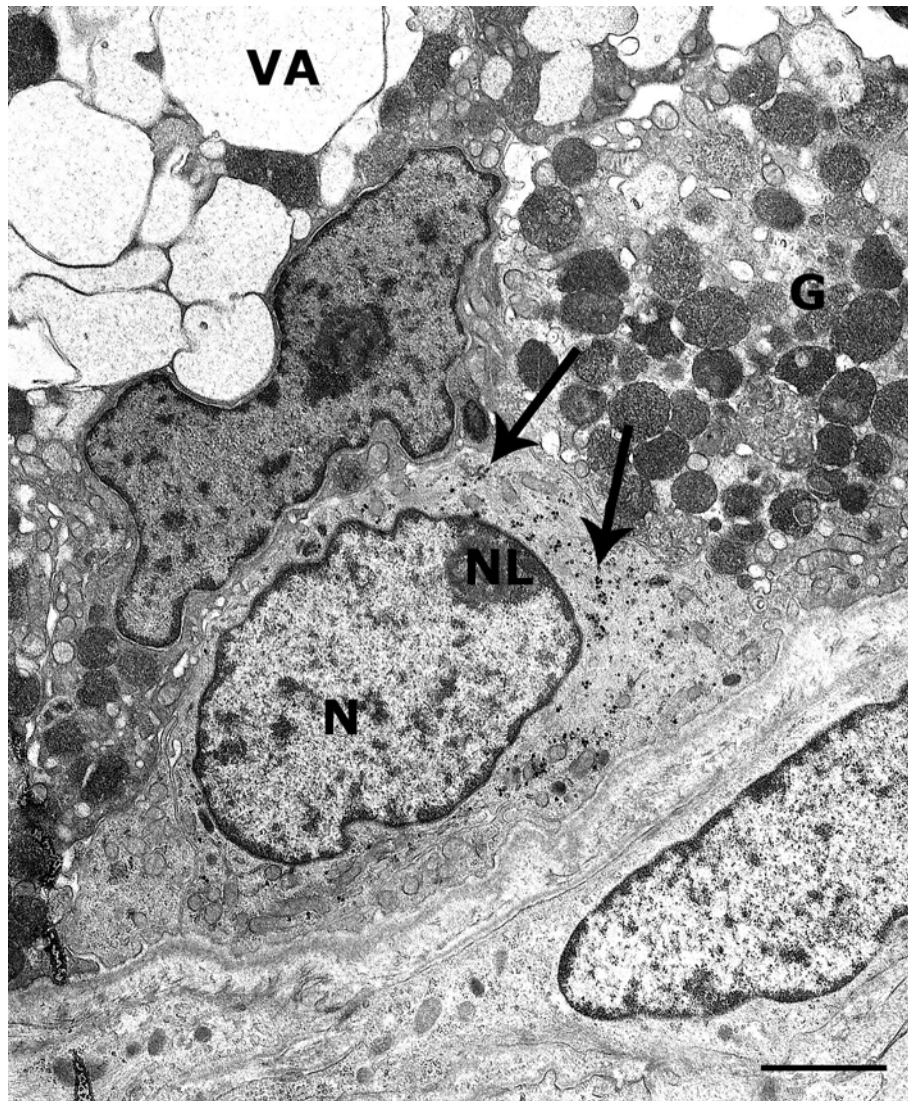


Bild 86: Basalbereich der Ductuli efferentes, SB = 2 μ m

Im Zytoplasma sind Glykogen-Ansammlungen (Pfeile) zu erkennen.

N = Nukleus, NL = Nukleolus, G = Granula, VA = Vakuolen

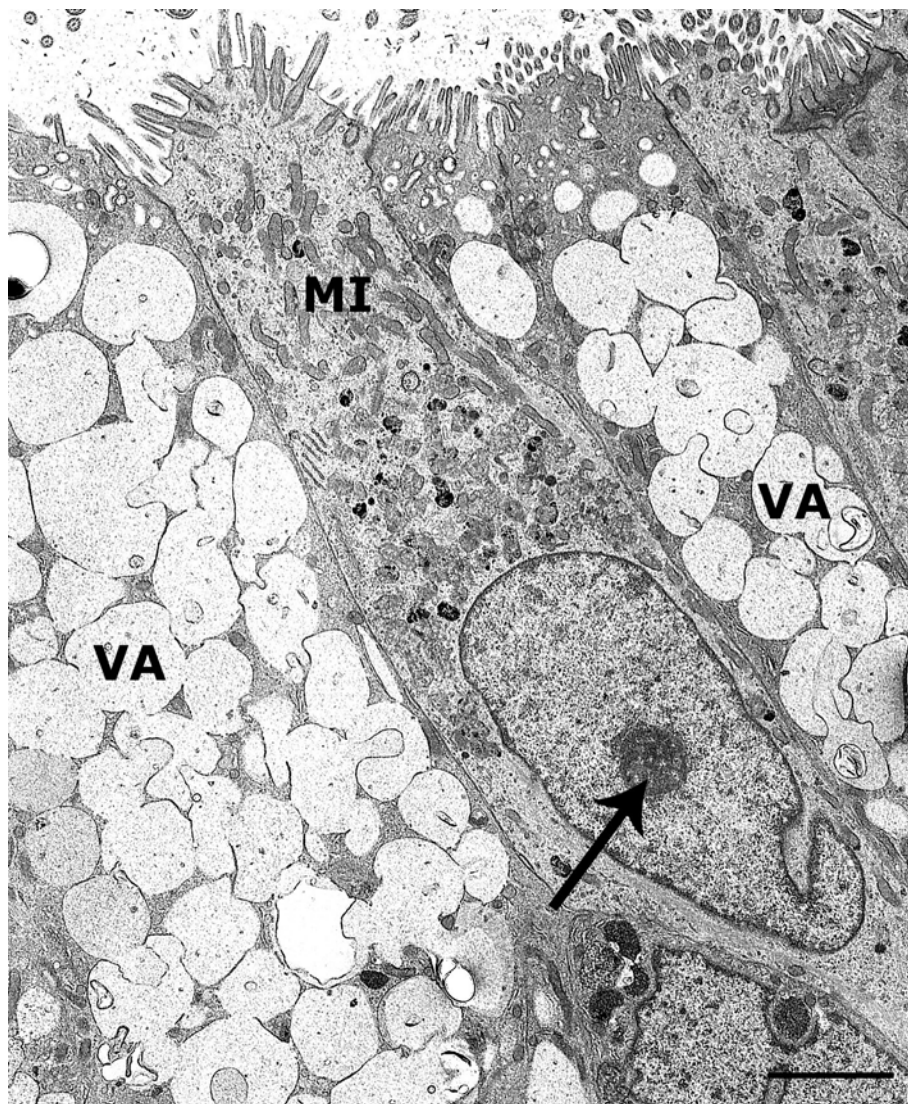


Bild 87: Apikalbereich der Ductuli efferentes, SB = 3 μ m

Im supranukleären Zytoplasma der Kinozilien-tragenden Zelle befinden sich zahlreiche Mitochondrien (MI), während sich im Zytoplasma der zilienlosen Zellen zum Teil viele dicht gepackte Vakuolen (VA) befinden. Pfeil = Nukleolus

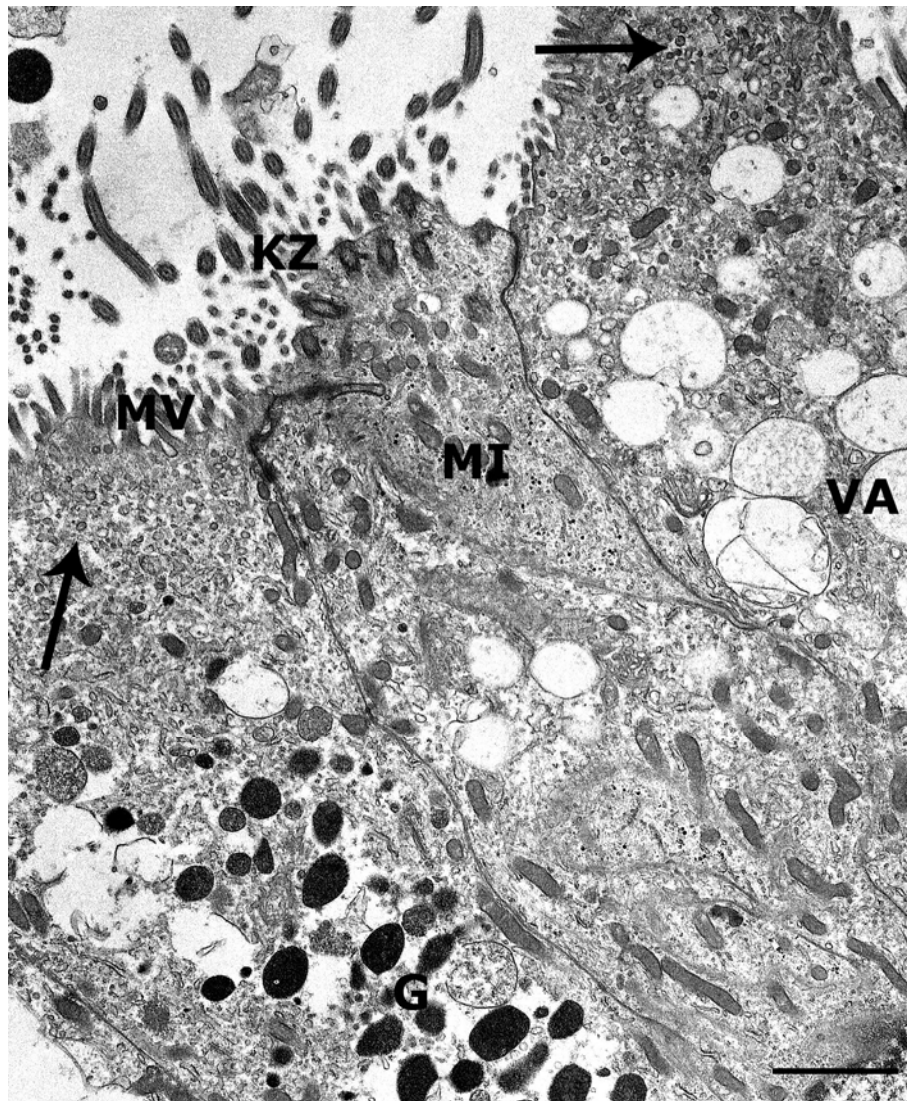


Bild 88: Apikalbereich der Ductuli efferentes, SB = 2 μ m

Im apikalen Zytoplasmabereich der zilienlosen Zellen sind die zahlreichen kleinen Bläschen (Pfeile) ein Hinweis auf aktive Mikropinozytose.

G = Granula, KZ = Kinozilien, MI = Mitochondrien, MV = Mikrovilli, VA = Vakuolen

4.2. Ultrastruktur des Caput epididymidis

Im Caput epididymidis besteht das Epithel aus Hauptzellen, Apikalzellen und Basalzellen. Die hochprismatischen Hauptzellen sowie die Apikalzellen tragen an ihrer Oberfläche weit ins Lumen reichende lange Stereozilien, und im Lumen des Nebenhodenganges befinden sich nur wenige Spermien sowie vereinzelt Zellen des Keimepithels. Benachbarte Epithelzellen werden apikal durch „Tight junctions“ und „Zonulae adhaerentes“, die zusammen „Junctional complexes“ bilden, fest miteinander verbunden (Bild 90).

Die Zellkerne der Hauptzellen befinden sich im Bereich des Caput epididymidis typischerweise im basalen Zytoplasmabereich und sind von runder Form (Bild 89 und 91). Außerdem können des Öfteren neben dem Nukleolus mäßig elektronendichte Einschlußkörperchen unterschiedlicher Größe und Anzahl im Zellkern beobachtet werden (Bild 91). Diese Kerneinschlüsse sind von runder Form und enthalten mehrere kleine elektronendichte Granula. Die Hauptzellen sind in der supranukleären Zone mit einem ausgeprägten Golgi-Apparat ausgestattet, und auch das endoplasmatische Retikulum stellt sich in dieser Zellart prominent dar (Bild 89, 90 und 91). Im apikalen Zytoplasmabereich befinden sich neben einigen Mitochondrien zahlreiche mäßig elektronendichte Vesikel unterschiedlicher Größe (Bild 89 und 90), die auf aktive Sekretions- und Resorptionsprozesse in diesem Abschnitt des Ductus epididymidis schließen lassen.

Zum Teil sind Zellen zu erkennen, die im apikalen Zytoplasma neben den Vesikeln eine auffallend große Anzahl von Mitochondrien enthalten und als Apikalzellen klassifiziert werden können. Die Basalzellen des Caput epididymidis sind überwiegend von dreieckiger bis polymorpher Form und besitzen einen eher länglichen Zellkern, der im zentralen Zytoplasmabereich zu liegen kommt (Bild 92). Der Zellkern weist zum großen Teil Einkerbungen auf und ist im Verhältnis zur Zytoplasmamenge relativ groß. Im spärlichen Zytoplasma dieser Zellart sind mehrere Mitochondrien zu erkennen, wohingegen die übrigen Zellorganellen nur in geringer Anzahl zu finden sind. Die Basalzellen liegen grundsätzlich mit ihrer basalen Zellmembran der Basallamina direkt an.

Im mittleren und basalen Epithelbereich stehen die benachbarten Zellen durch Invaginationen in Kontakt. An die dünne Basalmembran, welche meist wellenförmig verläuft und zum Teil regelrechte Falten bildet, schließen sich nach außen zunächst einige Fibroblasten und daraufhin wenige glatte Muskelzellen und gefäßreiches lockeres Bindegewebe an.

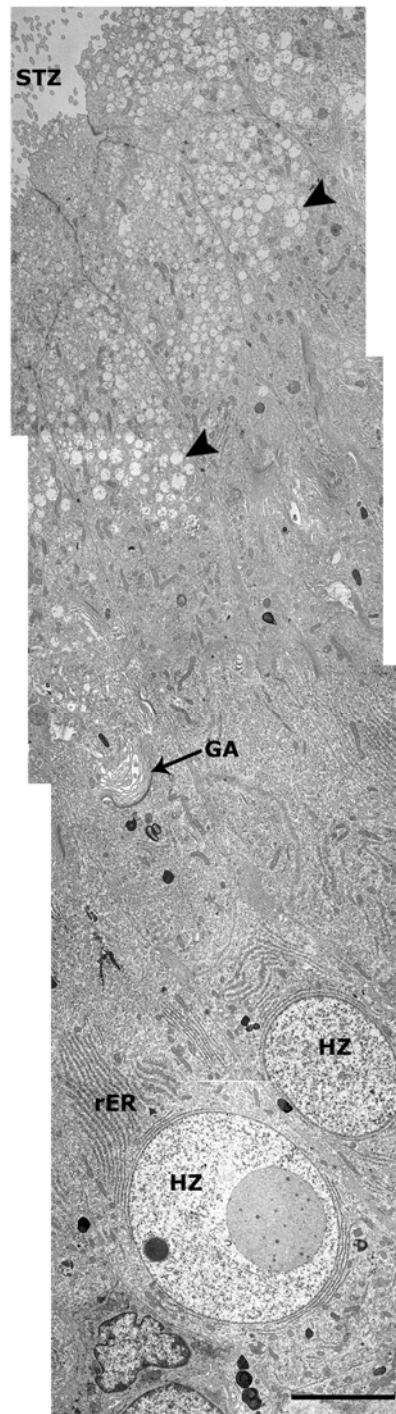


Bild 89: Epithelübersicht im Bereich des Caput epididymidis, SB = 3 μ m

Im apikalen Zytoplasmabereich der Haupt- und Apikalzellen befinden sich zahlreiche Vesikel (Pfeilspitzen) unterschiedlicher Größe. Die runden Zellkerne der Hauptzellen (HZ) liegen im basalen Zytoplasmabereich. Außerdem ist ein gut ausgebildeter Golgi-Apparat (GA) in den Hauptzellen zu erkennen. STZ = Stereozilien, rER = raues endoplasmatisches Retikulum

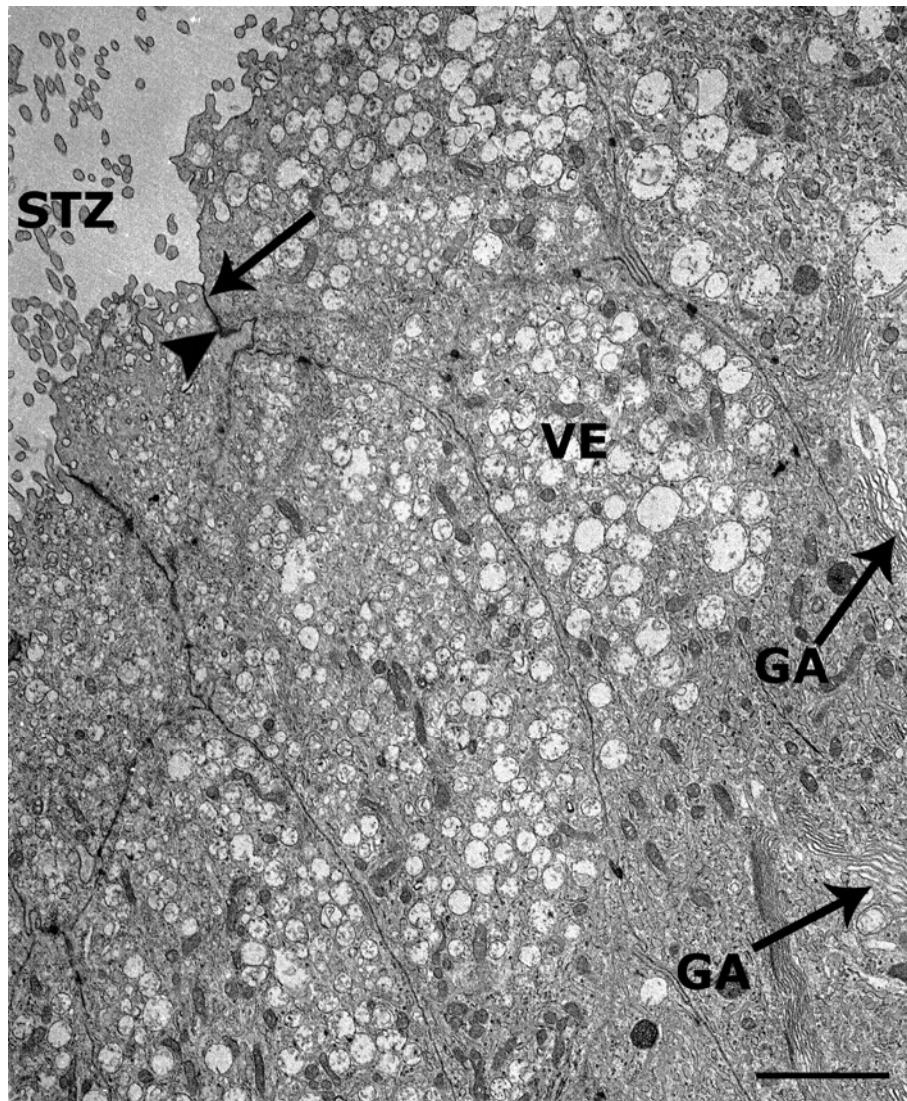


Bild 90: Apikalbereich des Caput epididymidis, SB = 3 μm

Die benachbarten Epithelzellen sind apikal durch „Tight junctions“ (Pfeil) und „Zonulae adhaerentes“ (Pfeilspitze), die zusammen „Junctional complexes“ bilden, fest miteinander verankert. Zahlreiche Vesikel (VE) von unterschiedlicher Größe im apikalen Zytoplasmabereich weisen auf aktive Resorptions- und Sekretionsprozesse hin. Außerdem ist ein besonders gut ausgebildeter Golgi-Apparat (GA) in den Hauptzellen zu erkennen. STZ = Stereozilien

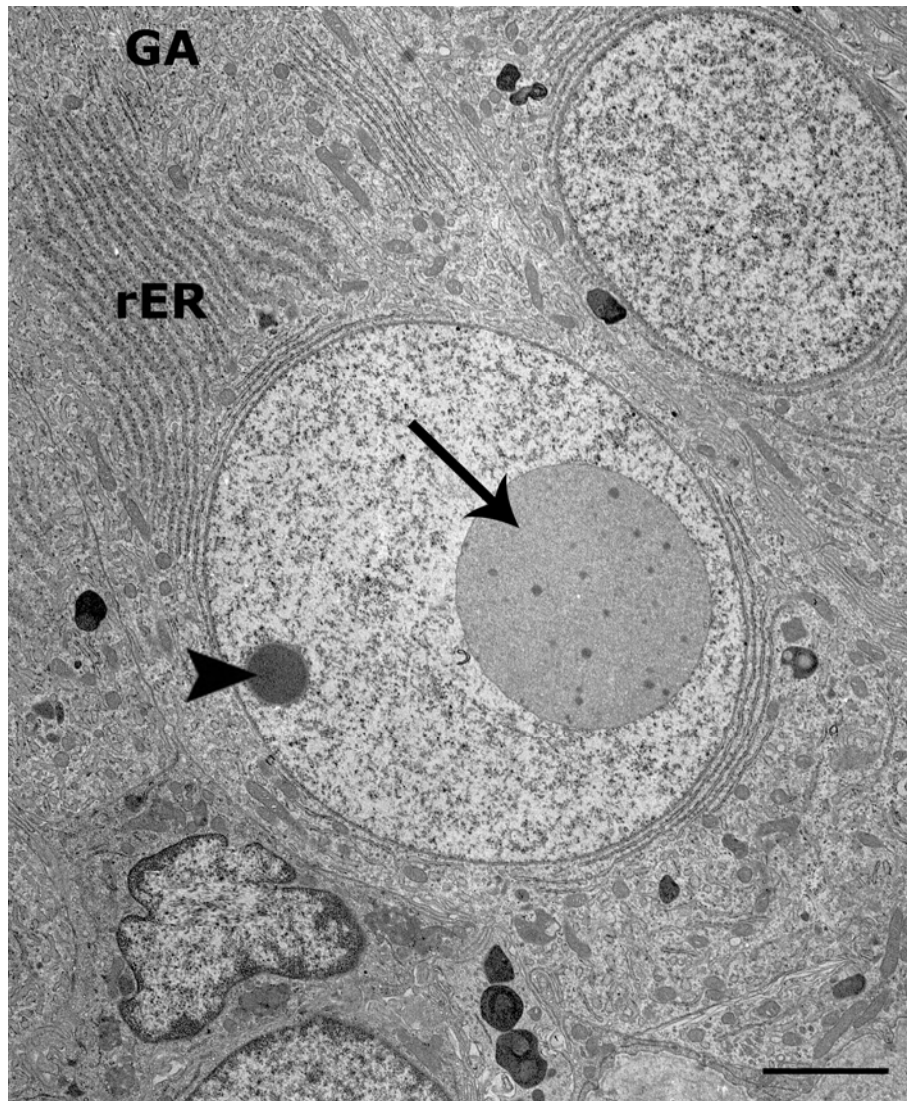


Bild 91: Darstellung der Hauptzellen im Caput epididymidis, SB = 2 μ m

Der runde Zellkern der Hauptzelle, welcher sich im basalen Zytoplasmabereich befindet, enthält neben dem Nukleolus (Pfeilspitze) einen großen Kerneinschluss (Pfeil). Das raue endoplasmatische Retikulum (rER) und der Golgi-Apparat (GA) sind in diesem Abschnitt stark ausgebildet.

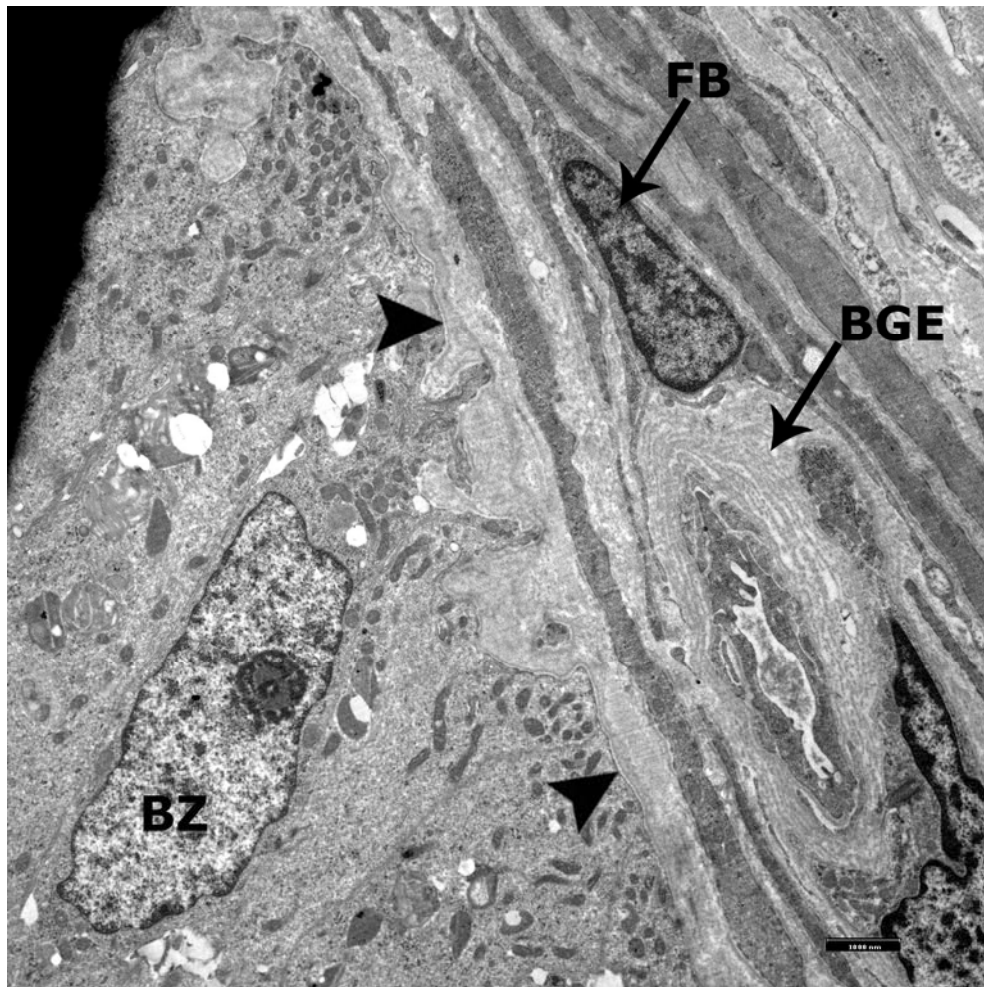


Bild 92: Basalbereich des Caput epididymidis, SB = 1 μ m

Die Basalzellen (BZ) des Caput epididymidis grenzen direkt an die wellenförmig verlaufende Basalmembran (Pfeilspitzen). Sie sind meist von dreieckiger Form und ihr länglicher Zellkern befindet sich in ihrem zentralen Zytoplasmabereich. An das Epithel schließen sich nach außen ein Fibroblast (FB) und glatte Muskelzellen an. BGE = Blutgefäß

4.3. Ultrastruktur des Corpus epididymidis

Im Bereich des Corpus epididymidis befinden sich zahlreiche Spermien im Lumen des Nebenhodenganges, vor allem auch zwischen den Stereozilien (Bild 93). Das Epithel des Ductus epididymidis besteht in diesem Abschnitt aus Hauptzellen, Apikalzellen, Basalzellen und „Clear cells“. Die letztgenannte Zellart konnte ich allerdings nur selten finden und eindeutig identifizieren. Die Apikal- und Hauptzellen werden im Corpus epididymidis apikal wiederum über „Junctional complexes“ fest miteinander verbunden (Bild 94). Im apikalen Zytoplasma lassen sich neben größeren Vakuolen zahlreiche kleine Vesikel erkennen, welche darauf hindeuten, dass in diesen Zellen aktive Mikropinozytose und/oder Sekretion stattfindet (Bild 94). Desweiteren sind auch in diesem Abschnitt des Nebenhodenganges Zellen zu finden, welche im apikalen Bereich reich an Mitochondrien sind und als Apikalzellen klassifiziert werden könnten.

Die Zellkerne der Hauptzellen sind im Corpus epididymidis von langgestreckter Form und sind meist im zentralen Zytoplasmabereich der Zelle gelegen (Bild 95). Auch im Corpusbereich sind Kern-einschlüsse in den Zellkernen der Hauptzellen zu finden, jedoch weniger häufig als im Caput epididymidis. Auch die Ausbildung des Golgi-Apparates im Zytoplasma dieser Zellen zeigt sich weniger prominent im Vergleich zu dem des Caputbereiches. Im basalen subnukleären Zytoplasmabereich sind neben einigen Zisternen des endoplasmatischen Retikulums und Mitochondrien, mehrere elektronendichte Lysosomen lokalisiert (Bild 95), welche auf intensive lysosomale Abbauprozesse hinweisen.

Die der Basalmembran unmittelbar anliegenden Basalzellen zeigen sich im Corpus epididymidis wiederum dreieckig bis polymorph. Ihr Zytoplasma stellt sich vergleichend mit dem der Hauptzellen heller dar (Bild 97) und lässt zum Teil einen Zytoplasma-Ausläufer erkennen, der zwischen den Hauptzellen in Richtung Epitheloberfläche zieht (Bild 96). Der Zellkern, der sich meist zentral im Zytoplasma befindet, ist von runder bis länglicher Form und weist Einkerbungen auf. In den mittleren und basalen Epithelbereichen stehen die Zellen wiederum über Invaginationen miteinander in Kontakt.

Die basale Zellmembran der Epithelzellen ist über Hemidesmosomen an der Basalmembran verankert (Bild 97). Im Corpusbereich schließen sich nach außen an das Epithel Fibroblasten sowie mehrere Schichten von glatten Muskelzellen an. Der Bereich zwischen den Anschnitten des Ductus epididymidis wird von lockerem Bindegewebe mit zahlreichen Gefäßen und Nerven eingenommen.

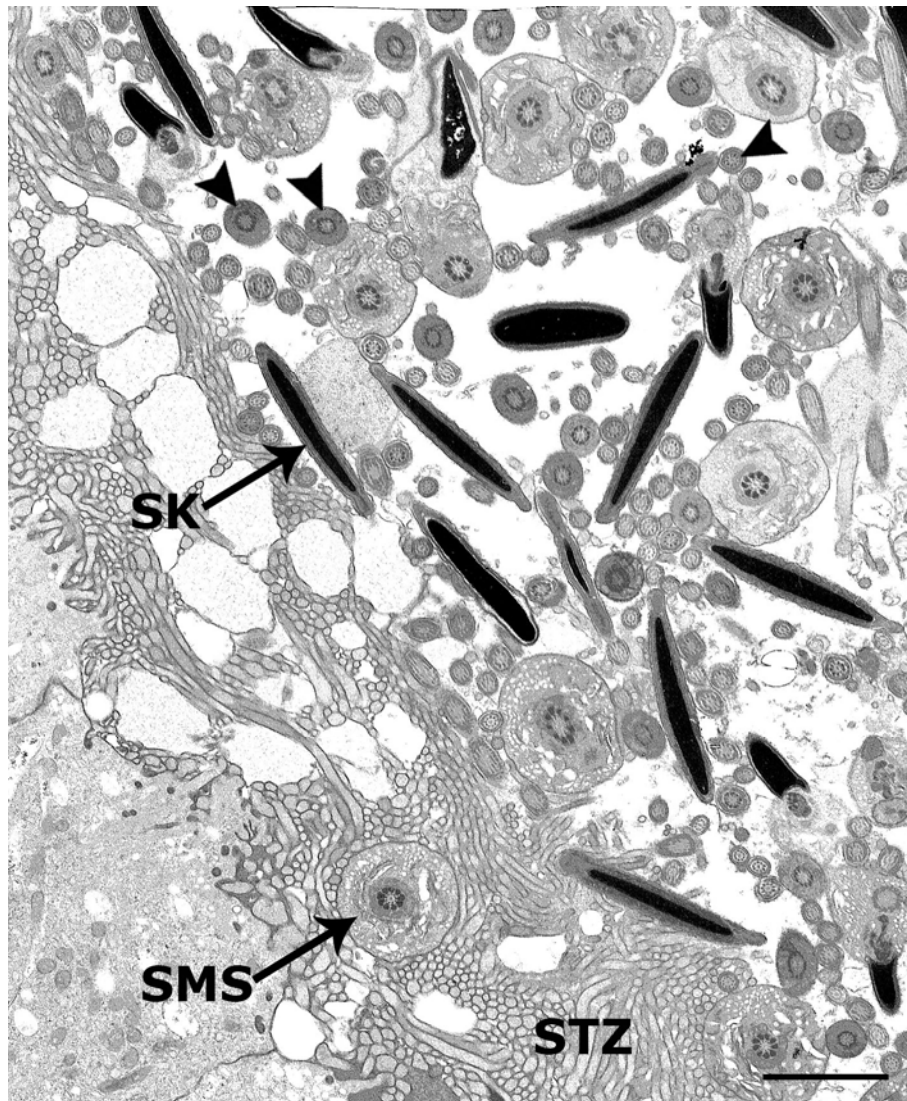


Bild 93: Lumeninhalt des Ductus epididymidis im Bereich des Corpus epididymidis, SB = 3 μ m

Im Lumen befinden sich zahlreiche Anschnitte von Spermienköpfen (SK), von Spermienmittelstücken (SMS) und Spermischwänzen (Pfeilspitzen). Die Spermien liegen teilweise zwischen den Stereozilien (STZ) oder frei im Lumen.

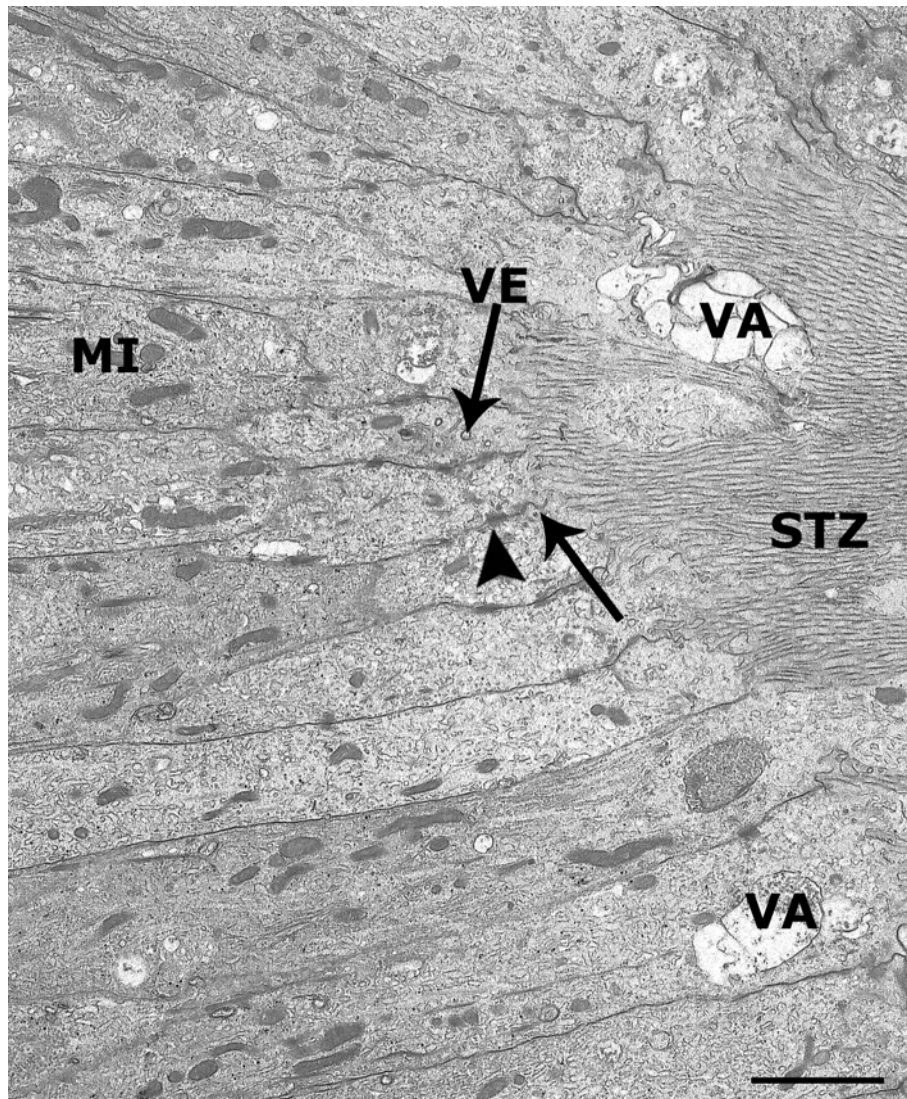


Bild 94: Apikalbereich des Corpus epididymidis, SB = 3 μm

Die Haupt- und Apikalzellen stehen apikal durch „Tight junctions“ (Pfeil) und „Zonulae adherentes“ (Pfeilspitze), die zusammen „Junctional complexes“ bilden, fest in Verbindung. Im apikalen Zytoplasmabereich sind viele kleine Vesikel (VE) ein Hinweis auf mikropinozytische und sekretorische Aktivität. Auch größere Vakuolen (VA) kommen häufig vor. MI = Mitochondrien, STZ = Stereozilien

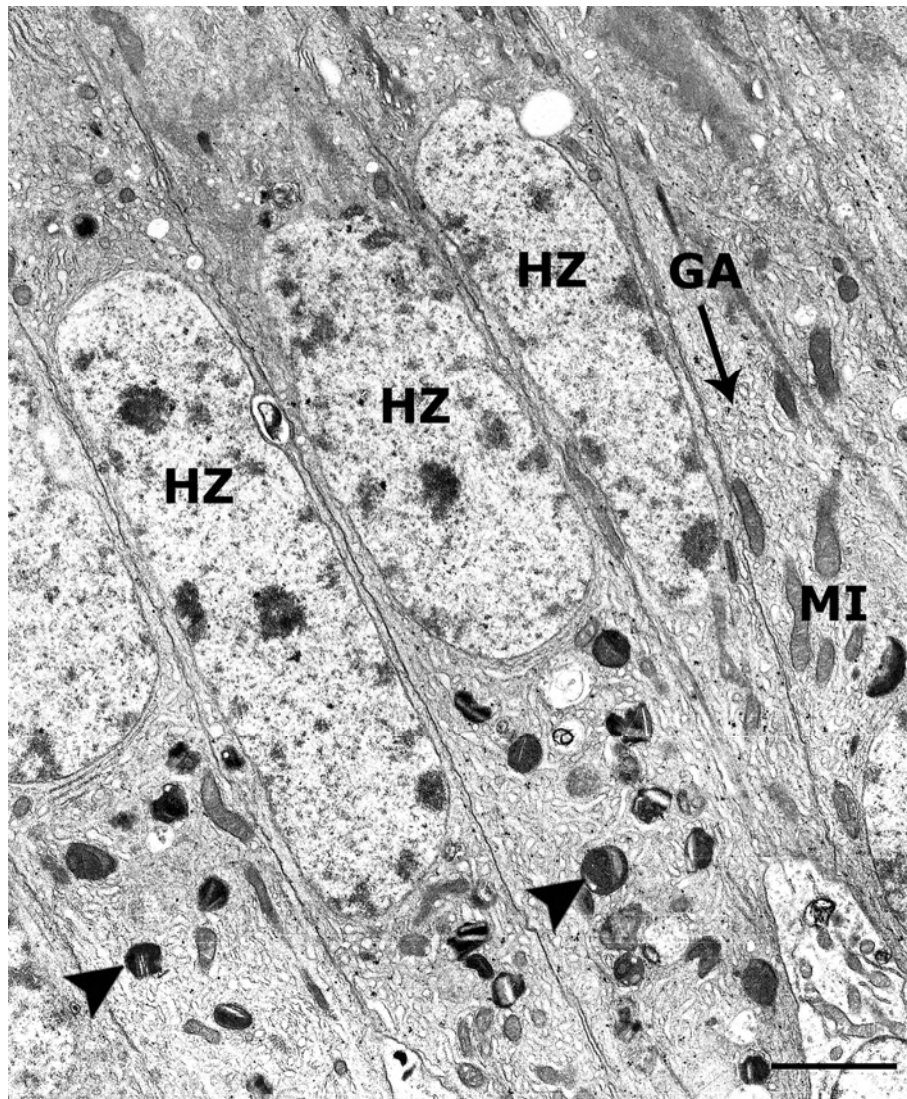


Bild 95: Darstellung der Hauptzellen im Corpus epididymidis, SB = 3 μ m

Die langgestreckten Zellkerne der Hauptzellen (HZ) des Corpus epididymidis befinden sich im zentralen Zytoplasmabereich und lassen mehrere Nukleoli erkennen. Im basalen Zytoplasmabereich der Hauptzellen befinden sich zahlreiche elektronendichte Heterolysosomen (Pfeilspitzen). GA = Golgi-Apparat, MI = Mitochondrien

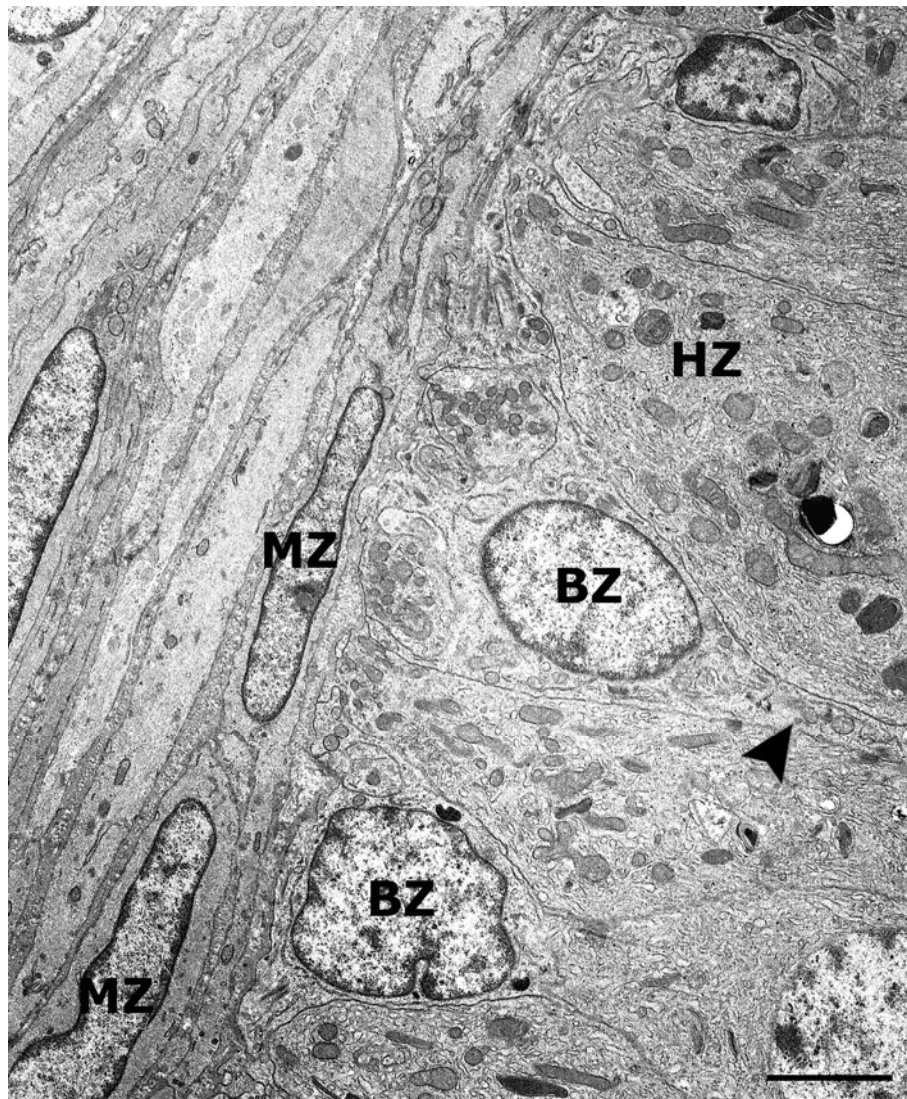


Bild 96: Basalbereich des Corpus epididymidis, SB = 3 μ m

Die Basalzellen (BZ) des Corpus epididymidis zeigen einen meist runden zentral im Zytoplasma gelegenen Zellkern und liegen der Basalmembran direkt auf. Zum Teil kann ein Zytoplasma-Ausläufer (Pfeilspitze) der Basalzellen, welcher sich in Richtung Epitheloberfläche zieht, zwischen den Hauptzellen (HZ) gefunden werden. MZ = Muskelzelle

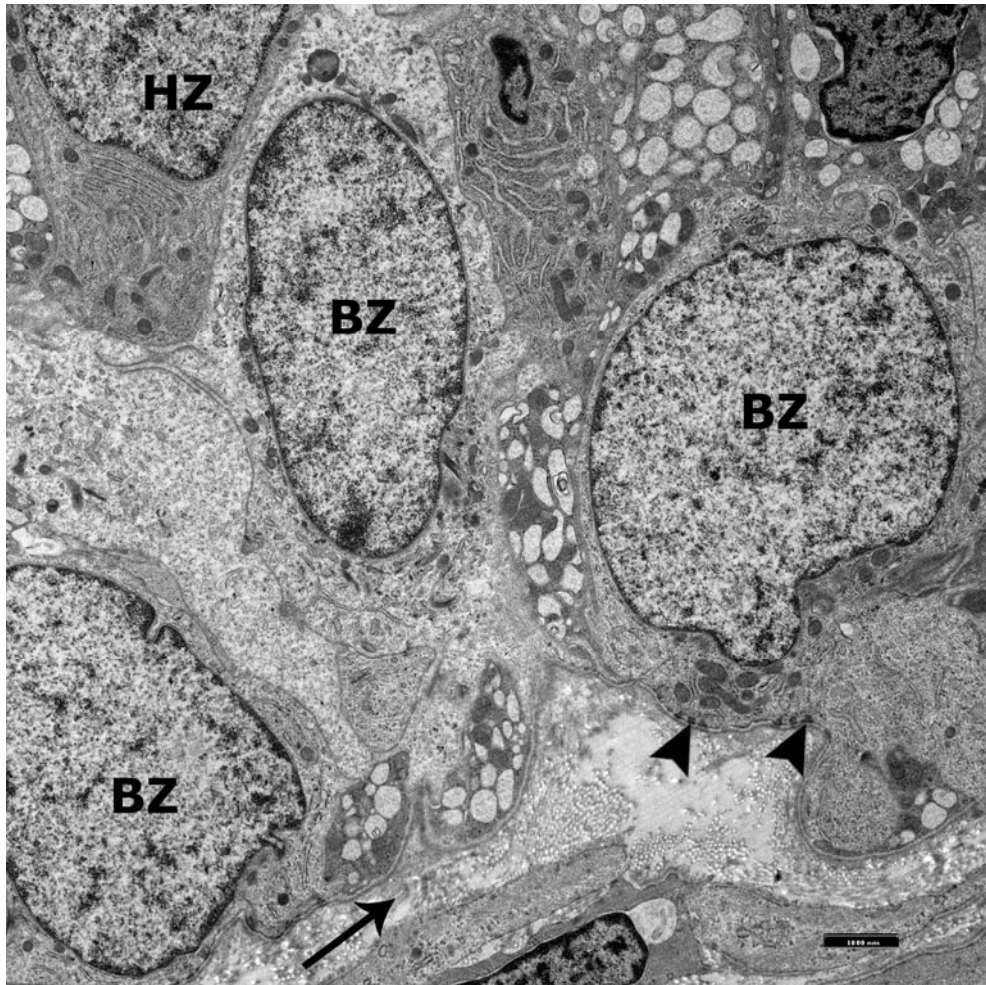


Bild 97: Basalbereich des Corpus epididymidis, SB = 1 μ m

Die basale Zellmembran der Basalzellen ist über zahlreiche Hemidesmosomen (Pfeilspitzen) mit der Basalmembran verbunden. BZ = Basalzelle, HZ = Hauptzelle, Pfeil = Spaltbildung

4.4. Ultrastruktur der Cauda epididymidis

In diesem Abschnitt des Ductus epididymidis befinden sich massenhaft Spermien. Der Stereozilienbesatz des Epithels ist hier deutlich kürzer als in den vorhergehenden Segmenten. Das Epithel der Cauda epididymidis verfügt über dieselbe Zellausstattung wie das des Corpus epididymidis, wobei die „Clear cells“ ebenfalls nur selten zu finden sind. Wiederum sind die „Junctional complexes“, durch die die apikal gelegenen Epithelzellen fest miteinander verankert sind, deutlich zu erkennen (Bild 98). Auch in der Cauda epididymidis kommen Zellen vor, die im apikalen Zytoplasmabereich auffällig viele Mitochondrien enthalten (Bild 98). Diese Zellen sind Apikalzellen, welche aber ohne Zellkern-Anschnitt nicht eindeutig als solche identifiziert werden können. Die Anzahl an kleinen Vesikeln im apikalen Zytoplasma, welche auf aktive Mikropinozytose und Sekretionsprozesse hinweisen, hat in diesem Nebenhoden-Abschnitt abgenommen.

Die Zellkerne der Hauptzellen sind im Caudabereich rund und auf unterschiedlicher Höhe im Zytoplasma gelegen (Bild 99). Einschlußkörperchen sind nicht zu erkennen. Das endoplasmatische Retikulum ist auffallend gut ausgebildet und auch Mitochondrien sind häufig im Zytoplasma der Hauptzellen zu erkennen (Bild 99 und 100). Der Golgi-Apparat hingegen ist nur schwach ausgebildet und es sind nur vereinzelt Lysosomen im basalen Zytoplasma zu beobachten.

Die Basalzellen der Cauda epididymidis zeigen eine runde oder längsovale Zellform und liegen der Basalmembran breitflächig auf. Der Zellkern ist ebenfalls längsoval, parallel zur Basalmembran und liegt im basalen Zytoplasma (Bild 101). Das spärliche Zytoplasma stellt sich im Vergleich zum Zytoplasma der Hauptzellen heller dar und enthält nur wenige Zellorganellen (Bild 100). Neben einigen Mitochondrien sind ab diesem Abschnitt des Ductus epididymidis auch mehrere Glykogen-Ansammlungen im Zytoplasma der Basalzellen zu erkennen (Bild 101).

Im mittleren und basalen Epithelbereich stehen die Zellen über zahlreiche Invaginationen miteinander in Kontakt (Bild 99, 100 und 101). Die Basalmembran zeigt sich im Caudabereich wiederum gewellt, aber im Vergleich zu den vorhergehenden Abschnitten des Ductus

epididymidis weniger ausgeprägt und es kommt kaum noch zur Faltenbildung. Vereinzelt liegen intraepitheliale Lymphozyten nahe der Basalmembran (Bild 100). An die Basalmembran schließt sich zunächst eine dünne Bindegewebsschicht an und daraufhin mehrere kräftige Schichten von glatten Muskelzellen. Das sich anschließende Nebenhoden-Stroma besteht aus lockerem Bindegewebe und glatten Muskelzellen. Die glatten Muskelzellen sind gekennzeichnet durch das sogenannte Endoplasma, eine dreieckige Zone beidseits an den Zellkern-Polen. In dieser Zone liegen die Zellorganellen besonders dicht und sie ist frei von Myofilamenten. Die Fibrozyten hingegen zeigen ein weitflächigeres Zytoplasma, in dem die Zellorganellen großräumig verteilt liegen (Bild 102). Neben den zahlreichen Kollagen-Fasern sind im Stroma auch mehrere Gefäße und Nerven zu erkennen.

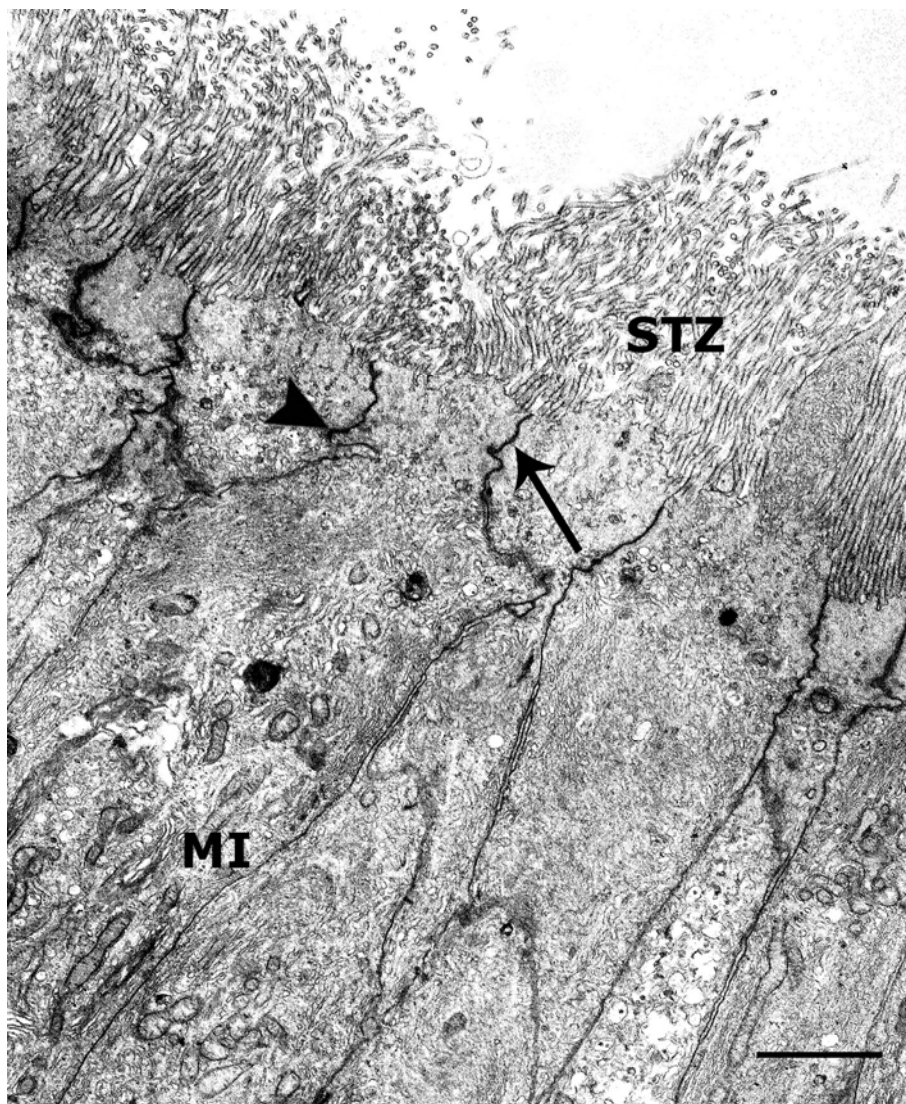


Bild 98: Apikalbereich der Cauda epididymidis, SB = 3 μ m

Die Epithelzellen stehen apikal durch „Junctional complexes“ (Pfeil = Tight junctions, Pfeilspitze = Zonulae adhaerentes) in festem Kontakt. Die Stereozilien (STZ) der Cauda epididymidis sind kürzer im Vergleich zu den vorhergehenden Abschnitten des Ductus epididymidis. Außerdem sind zum Teil mehrere Mitochondrien (MI) im apikalen Zytoplasmabereich einzelner Zellen zu erkennen. Diese Zellen sind vermutlich Apikalzellen.

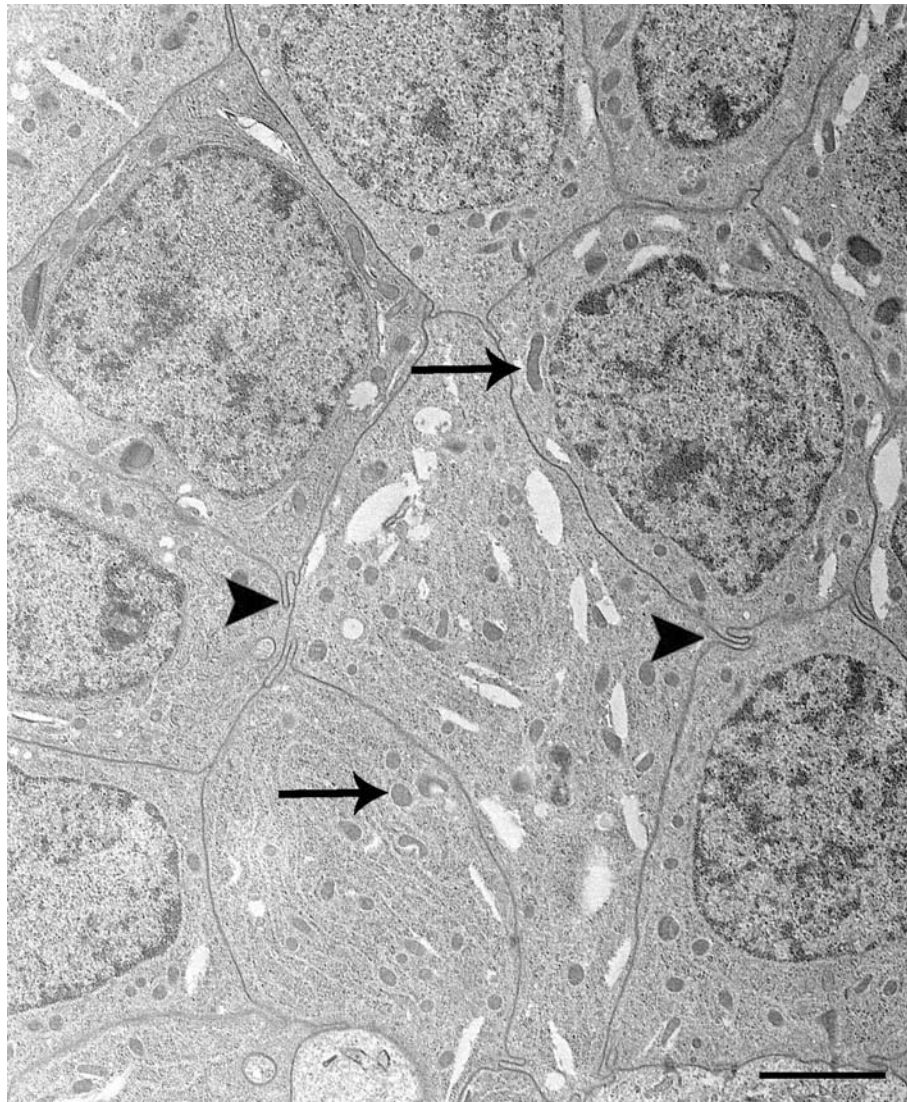


Bild 99: Darstellung der Hauptzellen in der Cauda epididymidis, SB = 3 μm

Die Hauptzellen der Cauda epididymidis besitzen meist runde Zellkerne, die einen mäßigen Gehalt an Heterochromatin aufweisen. Die benachbarten Zellen stehen durch Invaginationen (Pfeilspitzen) in Kontakt. Pfeile = Mitochondrien in rundem oder länglichem Anschnitt

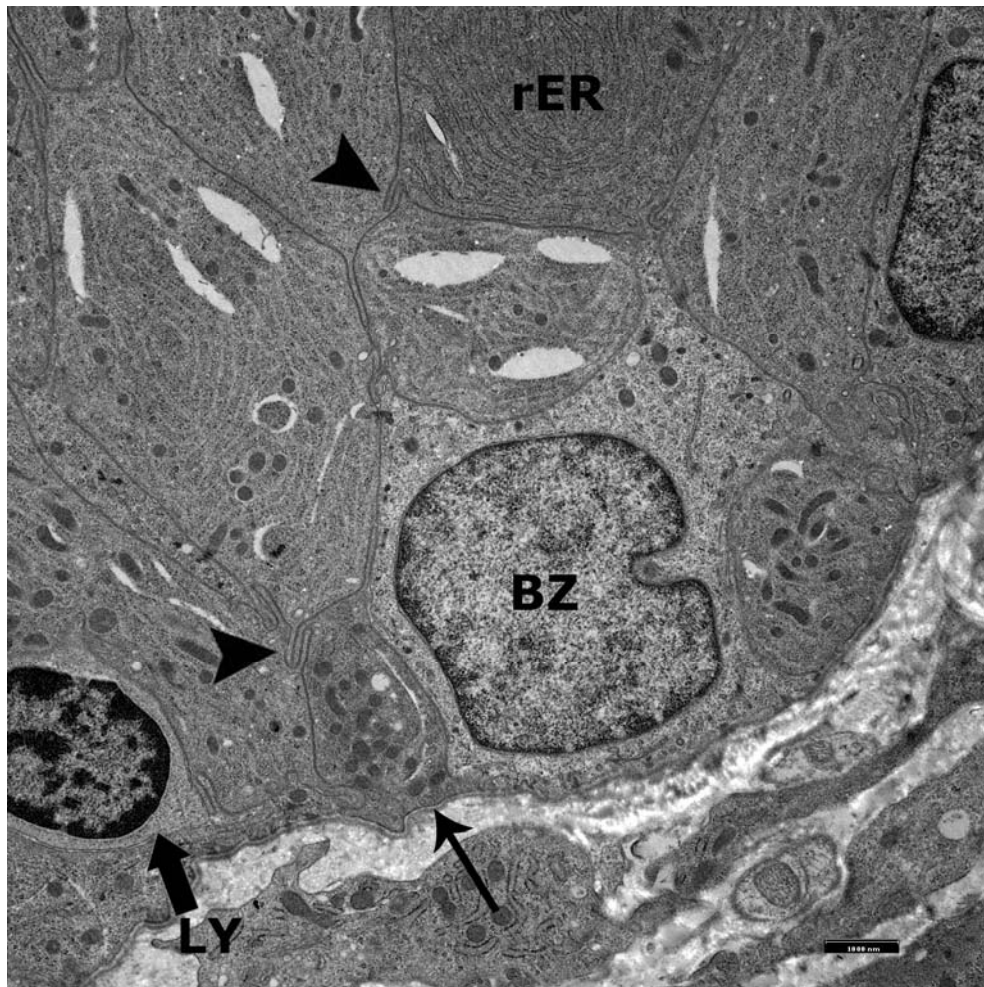


Bild 100: Basalbereich der Cauda epididymidis, SB = 1 μ m

Die Basalzelle (BZ) liegt der Basalmembran (Pfeil) breitflächig auf. Ihr spärliches Zytoplasma erscheint heller als das der umliegenden Hauptzellen und enthält nur wenig Zellorganellen. Die benachbarten Epithelzellen stehen im basalen Epithelbereich über Invaginationen (Pfeilspitzen) in Kontakt. Außerdem sind zum Teil Lymphozyten (LY) zwischen den Epithelzellen zu finden. rER = raues endoplasmatisches Retikulum

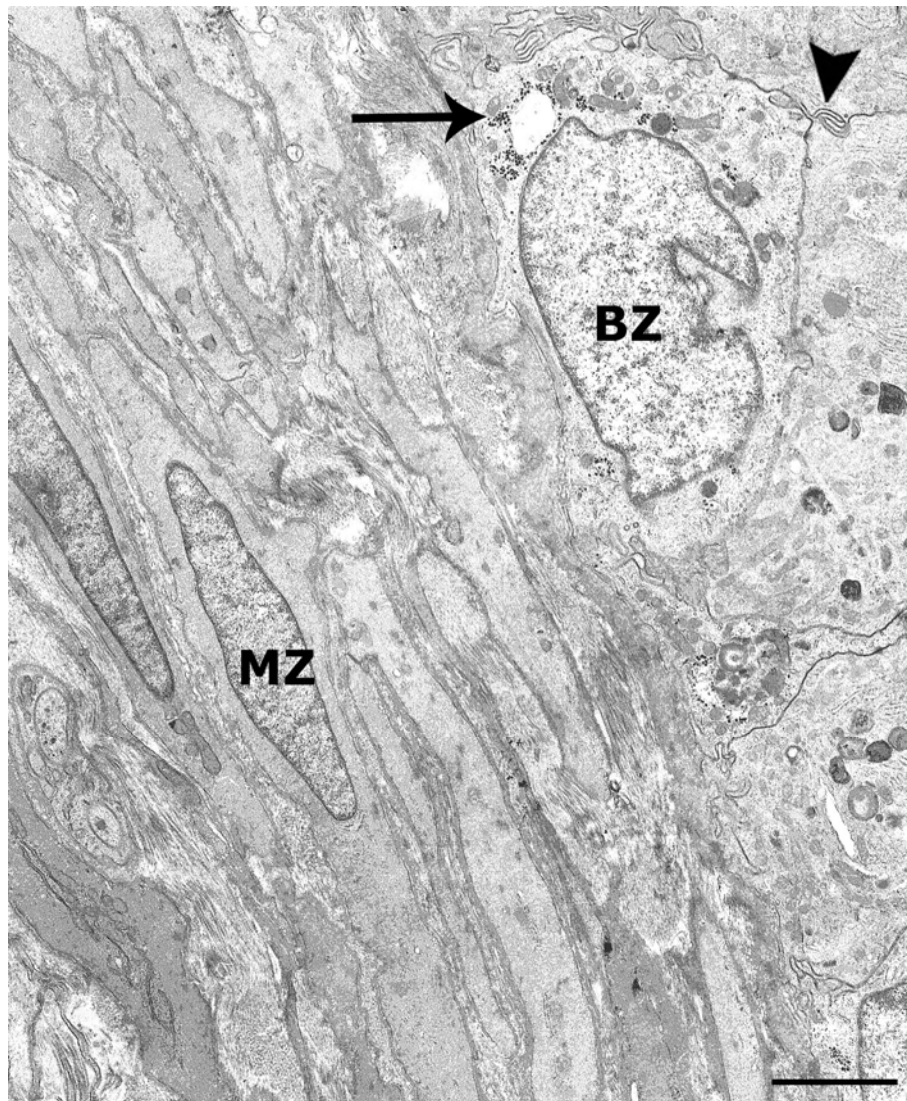


Bild 101: Basalbereich der Cauda epididymidis, SB = 3 μm

Die Basalzelle (BZ) liegt der Basalmembran breitflächig auf und auch ihr Zellkern ist längsoval. Die Zelle steht mit den benachbarten Hauptzellen durch Invaginationen (Pfeilspitze) in Kontakt. Im spärlichen Zytoplasma befinden sich neben den wenigen Zellorganellen deutliche Glykogen-Ansammlungen (Pfeil). Die Anzahl der außen angrenzenden Schichten von glatten Muskelzellen (MZ) nehmen im Caudabereich zu.

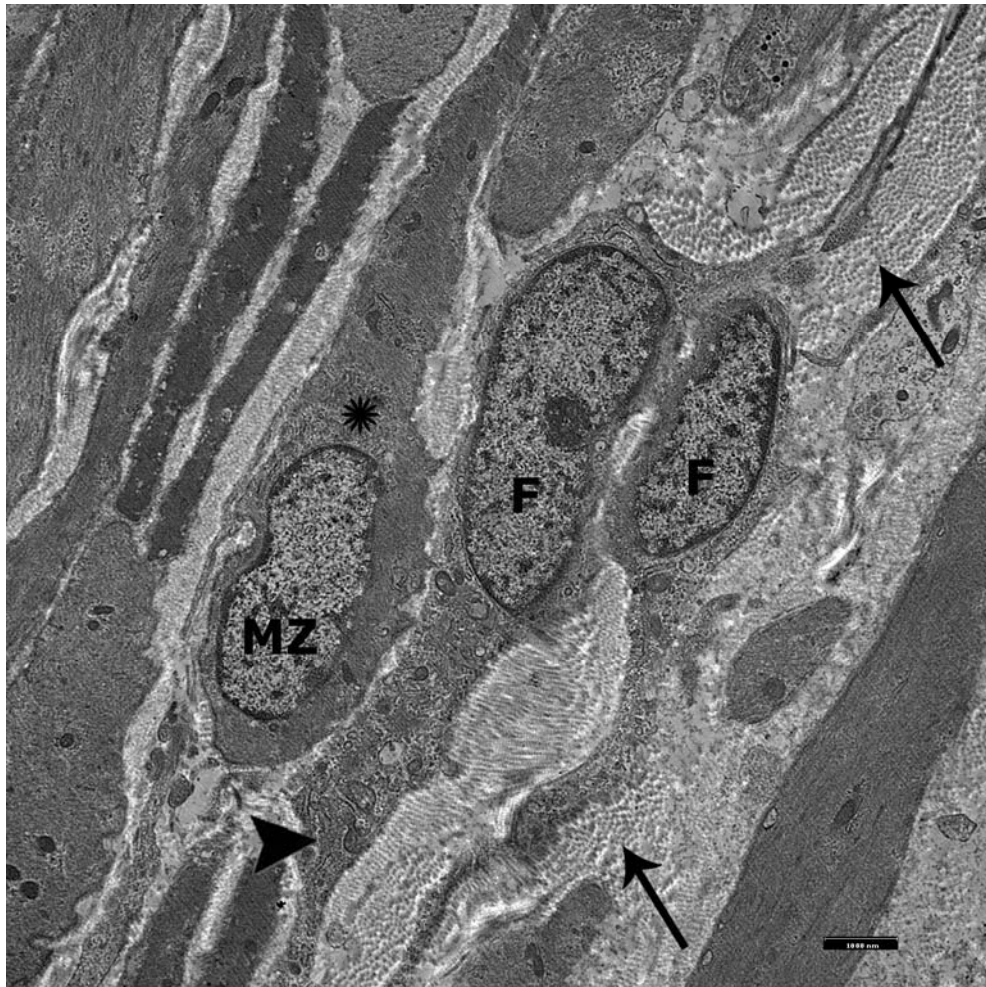


Bild 102: Stroma im Bereich der Cauda epididymidis, SB = 1 μm

Das Stroma besteht aus glatten Muskelzellen und lockerem Bindegewebe. Die Muskelzellen (MZ) sind gekennzeichnet durch eine dreieckige Zone an den Polen des Nukleus, dem sogenannten Endoplasma (Stern). Bei den Fibrozyten (F) hingegen ist ein weitflächigeres Zellorganellen-reiches Zytoplasma (Pfeilspitze) zu erkennen. Außerdem sind zahlreiche Kollagenfasern im Querschnitt (Pfeile) zu sehen.

V. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem histologischen und ultrastrukturellen Aufbau sowie den glyko- und immunhistochemischen Untersuchungen an der Epididymis des Hundes. Besondere Aufmerksamkeit wurde den Basalzellen des Nebenhodenepithels gewidmet, da neue Untersuchungen am Nebenhoden der Ratte für diese Zellart eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung des intraluminalen Milieus im Ductus epididymidis postulieren (SHUM W.W.C. et al., 2008; SHUM W.W.C. et al., 2009).

Die in meiner Arbeit untersuchten Hunde wiesen unterschiedliches Alter auf und wurden von mir in folgende Gruppen eingeordnet: Die Tiere der Gruppe 1 wiesen ein Alter zwischen 8 Monaten und 1,5 Jahren auf. Die der zweiten Altersgruppe waren zwischen 1,5 Jahren und jünger als 3 Jahre und die Tiere der dritten Gruppe waren 3 Jahre und älter. Bei sämtlichen Untersuchungen zeigten sich jedoch keinerlei Unterschiede zwischen den drei Altersgruppen. Somit sind die mikroskopischen Strukturen des kaninen Nebenhodens bei den untersuchten Rassen bereits ab einem Alter von 8 Monaten vollständig entwickelt.

Der hantelförmige Nebenhoden liegt der medialen Hodenlängskontur eng an und wird durch das Mesepididymis und das Ligamentum testis proprium fest mit dem Hoden verankert. Makroskopisch lässt sich der Nebenhoden in die drei Abschnitte Caput, Corpus und Cauda epididymidis unterteilen. Der Nebenhodenschwanz, die Cauda epididymidis, entlässt abschließend den Samenleiter, der in den Anfangsteil der Harnröhre mündet. Da mit der makroskopischen Nebenhodeneinteilung in drei Abschnitte jedoch die strukturellen und funktionellen Besonderheiten des Ductus epididymidis nicht zufriedenstellend berücksichtigt werden, wird hinsichtlich histologischer, ultrastruktureller und histochemischer Gesichtspunkte eine andere Segment-Einteilung vorgenommen. Dieser mikroskopischen Einteilung liegen Parameter wie Epithelhöhe, Oberflächenbesatz der Epithelzellen, Epithelzelltypen, Lumendurchmesser des Ductus epi-

didymidis, und vieles mehr zugrunde. Den ersten Abschnitt der mikroskopischen Einteilung bilden die Ductuli efferentes, welche mittlerweile definitiv dem Nebenhoden und nicht mehr dem Hoden zugeordnet werden. Beim darauffolgenden Nebenhodengang, dem Ductus epididymidis, werden in der Literatur für die verschiedenen Tierarten unterschiedliche Segmenteinteilungen genannt. Selbst für ein und dieselbe Tierart werden meist unterschiedliche Einteilungen für die Anzahl der Segmente angegeben. Sanchez et al. (1998) schlagen für die Katze eine Einteilung in vier Regionen vor. Für Hengst, Schafbock und Bulle gibt Nicander (1958) eine Einteilung in sechs Segmente an. Beim Kaninchen wird der Ductus epididymidis laut Nicander (1957) sogar in acht Segmente untergliedert. Für den Hund liegen folgende neuere Vorschläge zur Segmenteinteilung des Ductus epididymidis vor: Busch et al. (2001) schlägt eine Einteilung in sechs Segmente vor. Von Schimming et al. (1997) wird eine Segmentierung in fünf histologische Zonen vorgeschlagen. Die Ergebnisse meiner Arbeit bestätigen allerdings die von Glover und Nicander (1971) vorgeschlagene und von Chandler et al. (1981) und Orsi (1983) sowie Schick et al. (2009) unterstützte Einteilung des kaninen Ductus epididymidis in drei Segmente: dem Initial-, dem Mittel- und dem Terminalsegment. Die Ductuli efferentes und das Initialsegment sind im makroskopischen Caput beherbergt, während das Mittelsegment dem Corpus und das Terminalsegment der Cauda epididymidis entspricht.

Es fällt allerdings auf, dass in der aktuellen Fachliteratur zu mikroskopischen Untersuchungen am Nebenhoden vieler Tierarten nahezu immer die makroskopische Begriffsbezeichnung für die mikroskopischen Segmente verwendet wird. Dementsprechend wird das Initialsegment mit dem Begriff Caput epididymidis, das Mittelsegment mit dem Begriff Corpus epididymidis und auch das Terminalsegment mit dem Begriff Cauda epididymidis bezeichnet. Somit wird deutlich, dass sich die mikroskopischen Begriffsbezeichnungen Initial-, Mittel- und Terminalsegment in der Fachliteratur nicht durchsetzen konnten. Aus diesem Grund werden auch in meiner Arbeit die Begriffe Caput, Corpus und Cauda epididymidis für die mikroskopische Ergebnisbeschreibung verwendet, wobei nochmals speziell darauf hingewiesen

werden soll, dass diese Begriffe nicht im makroskopischen Sinne zu verstehen sind.

Die Ductuli efferentes, welche aus dem Rete testis entspringen, kommen nach Durchbrechen der Tunica albuginea im Nebenhodenkopf zu liegen. Diese in sich stark aufgekäuerten Kanälchen stellen speziesspezifisch die Verbindung zu dem ersten Abschnitt des Ductus epididymidis her. Laut Nickel et al. (1995), Busch & Holzmann (2001) sowie anderen Autoren kommen beim Hund 15 – 16 dieser Kanälchen von jeweils 10 bis 20 cm Länge vor. Das Epithel der Ductuli efferentes ist mehrreihig und setzt sich aus zwei Zelltypen zusammen: den Kinozilien-tragenden Zellen und den zilienlosen Zellen mit Mikrovilli-Besatz. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Hess (2002) und Wakui (1996) überein. Chandler et al. (1981) fanden in den kaninen Ductuli efferentes außerdem Zellen, die sowohl Mikrovilli als auch Kinozilien an ihrer Apikalmembran besitzen. Zellen mit diesen beiden Oberflächenstrukturen in Kombination konnte ich allerdings in meinen Untersuchungen nicht finden. Die von Chandler et al. (1981) für den Hund beschriebenen Basalzellen als dritten Zelltyp der Ductuli efferentes, konnte ich in meinen Untersuchungen ebenfalls nicht nachweisen und auch Hess (2002) beschreibt keine Basalzellen im Epithel der Ductuli efferentes.

Die zilienlosen Zellen mit Mikrovilli-Besatz lassen sich elektronenmikroskopisch in vier unterschiedliche Subtypen einteilen: Die Typ 1-Zellen enthalten nur sehr wenige Granula und sehr wenige Vakuolen im Zytoplasma. Die zilienlosen Zellen des Typ 2 beinhalten zahlreiche elektronendichte zytoplasmatische Granula. Die Typ 3-Zellen sind durch viele helle Vakuolen, welche nahezu das gesamte Zytoplasma ausfüllen, gekennzeichnet und die Zellen des 4. Typs enthalten sowohl apikal gelegene Vakuolen als auch basal gelegene dunkle Granula. Diese ultrastrukturellen Ergebnisse meiner Arbeit unterscheiden sich von der Einteilung nach Wakui (1996), bei der diese Zellart lediglich in drei Typen unterteilt wird: Typ A-Zellen, die im Zytoplasma weder Granula noch Vakuolen enthalten, Typ B-Zellen mit wenigen apikalen Vakuolen und zahlreichen großen Granula, sowie Zellen vom Typ C mit einigen apikalen Vakuolen und kleinen basalen Granula. Auch Ilio und

Hess (1994) nennen eine abweichende Einteilung der zilienlosen Zellen. In deren Arbeit werden folgende vier Grundtypen unterschieden: 1. Zellen mit sehr wenigen Granula und wenig apikalen Vakuolen, 2. Zellen mit basalen und/oder apikalen Granula sowie wenig apikalen Vakuolen, 3. Zellen mit basalen Granula und zahlreichen apikalen Vakuolen und 4. Zellen mit basalen Granula und apikalen Blasen. Möglicherweise handelt es sich aber nicht um verschiedene Zelltypen, sondern um verschiedene Funktionszustände des gleichen Zelltyps.

Die Kinozilien-tragenden Zellen und zilienlosen Hauptzellen der Ductuli efferentes zeigen in den immunhistochemischen Färbungen ein unterschiedliches Reaktionsmuster. So reagieren beispielsweise in den Untersuchungen zum Nachweis von Pancytokeratin und den Cytokeratinen 5, 14, 18 und 19 die Kinozilien-tragenden Zellen positiv, die zilienlosen Zellen bleiben hingegen negativ. Diese Ergebnisse stimmen mit den Pancytokeratin-Untersuchungen von Schick (2006) überein. Dieses unterschiedliche Färbeverhalten unterstreicht, dass diese beiden Zellarten unterschiedliche Funktionen erfüllen.

Die Kinozilien-tragenden Zellen transportieren mit ihren aktiv beweglichen Kinozilien, die in diesem Bereich der abführenden Samenwege noch immotilen Spermien aus dem Hoden in den Ductus epididymidis. Die zilienlosen Hauptzellen besitzen hingegen große Resorptionsaktivität und zeigen regen intrazellulären Stoffabbau, was durch die kondensierten Restprodukte des intrazellulären Verdauungsprozesses als zum Teil lichtmikroskopisch erkennbare PAS-positive Granula deutlich wird. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Wrobel (1990), welcher ebenfalls PAS-positive Granula in den zilienlosen Zellen nachweisen konnte. Außerdem sind im Zytoplasma der zilienlosen Hauptzellen, wie oben bereits erwähnt, zahlreiche elektronenmikroskopisch erkennbare Vakuolen, Vesikel und Granula zu sehen, welche gleichfalls die außerordentliche Resorptionstätigkeit dieser Zellen belegen. Diese Ergebnisse stimmen ebenfalls mit den Ergebnissen von Hess (2002) und Wrobel (1990) überein. Auch die fluoreszenzmikroskopisch erkennbaren gelben Restkörper im basalen Zytoplasmabereich der zilienlosen Zellen können auf den regen

lysosomalen Stoffabbau in dieser Zellart zurückgeführt werden. Abweichend von den Ergebnissen von Hess (2002) und Schick (2006) ist in meiner Arbeit zu erkennen, dass der Zellkern der Kinozilientragenden Zellen im basalen Zytoplasmabereich lokalisiert ist.

Der Übergang von den Ductuli efferentes zum ersten Abschnitt des Ductus epididymidis, dem Caput epididymidis, ist im mikroskopischen Bild gut zu erkennen, da ein erheblicher Anstieg der Epithelhöhe und eine deutliche Zunahme des Lumendurchmessers zu beobachten ist. Das Caput epididymidis zeichnet sich durch seine langen, weit ins Lumen ragenden Stereozilien und die basal gelegenen runden Zellkerne der Hauptzellen aus. Im Gegensatz dazu ist das zweite Segment des Ductus epididymidis, das Corpus epididymidis, durch mehr zentral im Zytoplasma gelegene langgestreckte Zellkerne der Hauptzellen und etwas kürzere Stereozilien charakterisiert. Typisches mikroskopisches Bild des letzten Gangabschnittes, der Cauda epididymidis, ist der weite Lumendurchmesser, welcher mit zahlreichen Spermien gefüllt ist. Außerdem zeigt sich im letzten Abschnitt des Ductus epididymidis ein wieder flacher gewordenes Epithel mit kurzen Stereozilien, bei dem die Zellkerne der Hauptzellen unregelmäßiger im Epithel angeordnet sind und meist nicht alle auf gleicher Höhe liegen. Desweiteren ist eine deutliche Zunahme der umgebenden Lagen von glatten Muskelzellen im Caudasegment zu beobachten.

Das Epithel des Ductus epididymidis ist in seiner gesamten Länge mehrreihig und hochprismatisch. Die Epithelhöhe nimmt allerdings im Verlauf des Ductus epididymidis von proximal nach distal deutlich ab. Das Epithel besteht jedoch, je nach Segmentabschnitt, aus verschiedenen Zelltypen. Beim Hund lassen sich laut Schimming (2001) in allen drei Abschnitten des Nebenhodenganges Hauptzellen, Apikalzellen und Basalzellen finden. Dies deckt sich mit den Untersuchungen meiner Arbeit. In Corpus und Cauda epididymidis werden bei Schimming (2001) außerdem „Clear cells“ im Nebenhodenepithel des Hundes beschrieben, welche dort elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnten. Diese vierte Zellart konnte in meiner Arbeit lichtmikroskopisch nicht eindeutig identifiziert werden. Nach Shum et al. (2008 und 2009) und Cornwall et al. (2009) kann diese Zellart

allerdings mit dem immunhistochemischen Nachweis der V-ATPase nachgewiesen werden. Anhand der elektronenmikroskopischen Untersuchungen meiner Arbeit kann aber das vereinzelte Vorkommen der „Clear cells“ im Corpus und in der Cauda epididymidis des Hundes ebenfalls bestätigt werden.

Die hochprismatischen Hauptzellen stellen die überwiegende Zellart des Epithels der Epididymis dar. Sie unterscheiden sich allerdings morphologisch im Verlauf der einzelnen Abschnitte des Ductus epididymidis. Im Caput epididymidis tragen diese Zellen lange Stereozilien und ihr runder Zellkern befindet sich im basalen Zytoplasmabereich. Im Corpus epididymidis hingegen zeigt sich ein langgestreckter Zellkern, der zentral im Zytoplasma der Zelle liegt, und die Stereozilien sind etwas kürzer. In der Cauda epididymidis ist nun eine deutliche Abnahme der Epithelhöhe zu beobachten. Außerdem liegen die Zellkerne der Hauptzellen nicht wie in den vorhergehenden Abschnitten des Nebenhodenganges auf gleicher Höhe, sondern sind unregelmäßig im Epithel angeordnet. Die Zellkerne sind aber wiederum von rundem Aussehen, während die Stereozilienlänge weiter deutlich abgenommen hat.

Elektronenmikroskopisch lässt sich außerdem erkennen, dass das Vorkommen und die Anzahl von Vesikeln im apikalen Zytoplasmabereich der Hauptzellen im Verlauf des Ductus epididymidis nach distal hin abnimmt, was für die Verringerung der Sekretions- und Resorptionsprozesse von proximal nach distal spricht. Dies deckt sich mit den Ergebnissen am Nebenhoden des Rindes von Sinowatz (1981) und unterstützt die Hypothese, dass die Cauda epididymidis in ihrer Hauptfunktion für die Speicherung der Spermien verantwortlich ist und Resorptionsvorgänge hier nur noch in geringem Maße ablaufen. In den Hauptzellen zeigt sich bei den glykohochemischen Untersuchungen mit Einsatz der Galektine ein auffälliges Reaktionsmuster. Die Golgi-Zone dieser Zellen, welche sich unmittelbar oberhalb des Zellkernes befindet, reagiert bei den Galektinen 8 und 9 deutlich positiv. Der Golgi-Apparat setzt sich aus mehreren Dictyosomen zusammen, bei dem jedes Dictyosom aus einem Stapel glattwandiger Zisternen und damit assoziierten Vesikeln unterschiedlicher Größe besteht. Die

topographische Anordnung der Zisternen innerhalb eines Dictyosoms ist genau festgelegt. Man kann dadurch am Dictyosom eine cis-Seite, die immer den Membranen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) gegenüberliegt und eine trans-Seite, an der die sekretorischen Vesikel abgegeben werden, unterscheiden. Die cis-Seite dient als Aufnahmeseite, welche die Transportvesikel, die sich vom rER abschnüren, aufnimmt. Innerhalb der Zisternen des Dictyosoms werden die Oligosaccharidseitenketten der im rER synthetisierten sekretorischen Proteine oder Membranproteine, bei denen es sich zumeist um Glykoproteine handelt, verändert. Sie werden durch verschiedene Modifikationen, wie dem enzymatischen Abspalten und Ankoppeln verschiedener Zuckerreste, in ihre endgültige Form gebracht. Die Zuckerreste werden durch sequentiell in den Zisternenstapeln angeordnete Glykosyltransferasen an die Oligosaccharidseitenketten des Glykoproteins angeknüpft, wobei das Glykoprotein allmählich von der cis- zur trans-Seite transportiert wird. Von der trans-Seite des Dictyosoms erfolgt dann die Abgabe der Sekret- und Membranproteine in entsprechende Vesikel. So passieren eine Vielzahl von Molekülen, wie Glykoproteine, Proteoglykane, Glykolipide und lysosomale Enzyme zu einem bestimmten Zeitpunkt ihrer Entwicklung die Zisternen des Golgi-Apparates und gelangen erst nach den entsprechenden Modifikationen, in Golgi-Material verpackt, zu ihren jeweiligen Zielorten (HEES H. & SINOWATZ F., 2000). Da die verschiedenen Kohlenhydratreste, welche im Golgi-Apparat an das jeweilige Glykokonjugat angeknüpft werden, an Galektin 8 und 9 binden können, lässt sich das positive Reaktionsergebnis der Golgi-Zone der Hauptzellen gut erklären. Vor allem das Caput epididymidis, welches eine stark positive Golgi-Zonen-Reaktion zeigt, lässt ultrastrukturell einen besonders ausgeprägten Golgi-Apparat erkennen. Auch bei Schimming (2001) wird das Vorkommen einer umfangreichen und gut ausgebildeten supranukleären Golgi-Zone bestätigt.

Das raue endoplasmatische Retikulum stellt sich in den Hauptzellen aller drei Abschnitte klar dar, aber vor allem im Caput und der Cauda epididymidis ist es besonders gut ausgeprägt, wie auch von Schick (2006) schon beschrieben wurde. Diese große Anzahl an Zisternen

deutet auf eine gesteigerte Proteinbiosynthese in diesen Segmenten hin. Abweichend von Chandler et al. (1981) konnte ich allerdings in meinen Untersuchungen glattes endoplasmatisches Retikulum nicht eindeutig nachweisen.

Die Apikalzellen sind charakterisiert durch ihre Lage in unmittelbarer Nähe zur luminalen Epithelgrenze. Ihr Zellkern zeigt sich im lichtmikroskopischen Bild deutlich oberhalb derer der Hauptzellen. Somit decken sich meine Ergebnisse mit denen von Hermo und Robaire (2002) sowie von Schimming (2001). Diese Zellart ist in allen drei Abschnitten des kaninen Ductus epididymidis zu finden (Schimming, 2001). Laut Palacios (1991) und Schimming (2001) sind die Apikalzellen charakterisiert durch einen besonders hohen Gehalt an Mitochondrien im apikalen Zytoplasma. Elektronenmikroskopisch sind auch in meiner Arbeit Zellen mit auffällig vielen Mitochondrien im apikalen Zytoplasma zu finden. Diese Zellen sind vermutlich Apikalzellen, da aber die zugehörigen Zellkerne nur selten angeschnitten waren, konnte ich sie oft nicht eindeutig als diese Zellart identifizieren. Genau wie bei Lohr et al. (2010) war eine deutlich positive Reaktion beim Nachweis von MAA I in den Apikalzellen auch in meinen Untersuchungen zu beobachten. Dies könnte ein weiterer Hinweis für die Vermutungen von Hermo und Robaire (2002) sein, dass diese Zellen eine Endozytose-Fähigkeit besitzen, da endozytierte Glykokonjugate das MAA I binden.

Die Basalzellen werden im Epithel des Ductus epididymidis schon in frühen Studien bei verschiedenen Tierarten in allen Gangabschnitten beschrieben. Diese kleinen Zellen liegen der Basalmembran direkt auf und besitzen meist nur wenig Zytoplasma. Außerdem ist ihr Zellkern im Verhältnis zur Gesamzellgröße auffallend groß. Die Basalzellen zeigen in meiner Arbeit im Verlauf des kaninen Ductus epididymidis von proximal nach distal eine variierende Morphologie. Abweichend dazu wird bei Sinowatz (1981) und Arrighi et al. (1993) für die Nebenhoden von Rind und Pferd von einer nahezu gleichbleibenden Form der Basalzellen berichtet (SINOWATZ F., 1981; ARRIGHI S. et al., 1993). Während die Basalzellen des Hundes im Caput und Corpus epididymidis eine dreieckige bis polymorphe Zellform mit zentral im

Zytoplasma gelegentlich rundlich oder hochkant ovalem Zellkern zeigen, sind die Basalzellen der Cauda epididymidis von längsovaler Form mit einem ebenfalls längsovalen weit basal im Zytoplasma gelegenen Zellkern. Die Zellen liegen der Basalmembran im Caudabereich ausgesprochen breitflächig auf. Elektronenmikroskopisch lassen sich übereinstimmend mit den Ergebnissen von Schimming (2001) nur wenige Zellorganellen im Zytoplasma der Basalzellen erkennen. Sie enthalten in allen drei Abschnitten des Ductus epididymidis einen kleinen Golgi-Apparat, wenige Mitochondrien und nur vereinzelt Vakuolen. Häufig ist das Zytoplasma der Basalzellen weit weniger elektronendicht als das der Hauptzellen, wodurch diese beiden Zellarten deutlich voneinander abzugrenzen sind. In den Basalzellen von Caput und Corpus epididymidis zeigt sich eine dreieckige Zellform und das Zytoplasma zeigt zum Teil Ausläufer, die sich nach apikal zwischen die Hauptzellen schieben. Diese elektronenmikroskopisch erkennbaren Zytoplasmafortsätze zwischen den Hauptzellen werden gleichwohl von Schick (2006) für den kaninen Nebenhoden beschrieben. Ebenfalls übereinstimmend mit den Ergebnissen von Schick (2006) sind die nur in den Basalzellen der Cauda epididymidis vorkommenden Glykogenansammlungen im basalen Zytoplasma-bereich. Dieses Glykogen dient in tierischen Zellen als energiereiche Speicherform der Glukose.

Die Funktion der Basalzellen wird bis heute kontrovers diskutiert und ist nach wie vor noch nicht eindeutig geklärt. Lange Zeit wurde diesen Zellen eine Stammzellfunktion, welche mittlerweile allerdings widerlegt wurde (YEUNG C.H. et al., 1994), und eine Beteiligung an basolateralen Signaltransduktions-Prozessen zugesprochen (SHUM W.W.C. et al., 2008). Andere Hypothesen wie die Annahme, dass diese Zellen Vorläuferzellen der Hauptzellen wären oder eine Stützfunktion für das Epithel hätten, wurden als unzutreffend bezeichnet (SCHICK B., 2006). In den meisten früheren Untersuchungen wurde angenommen, dass die Basalzellen das Lumen des Nebenhodenganges grundsätzlich nicht erreichen. Somit wurde für diese Zellen auch keine Beteiligung an der Bildung und der Aufrechterhaltung des für die physiologische epididymale Spermienreifung notwendigen Mikromilieus angenommen.

Shum et al. (2008 und 2009) konnten nun erstmals am Nebenhoden der Ratte mithilfe der 3D-Laser-Scanning-Mikroskopie schmale Zytoplasma-Ausläufer der Basalzellen, welche das Lumen des Nebenhodenganges erreichen, darstellen und auch eine Mitbeteiligung dieser Zellen an der luminalen pH-Wert-Regulation nachweisen. Sie benutzten hierfür fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen COX-1 und Claudin 1 als Basalzellmarker. Mit dem konfokalen Mikroskop konnten optische Serienschnitte von 16 µm-Dicke angefertigt werden, durch die man die Ausbildung von apikalen Fortsätzen an den Basalzellen, die bis zum Lumen des Nebenhodenganges ziehen, erstmals nachweisen konnte.

In meiner Arbeit zeigte sich Claudin 1 abweichend von den Ergebnissen von Shum et al. nicht als spezifischer Basalzellmarker. Die Basalzellen zeigten sich, wie von Shum et al. bei der Ratte beschrieben auch beim Hund COX-1-positiv. Die Tatsache, dass die Basalzellen aber auch beim kaninen Ductus epididymidis schmale Zytoplasma-Ausläufer besitzen, welche das Lumen des Nebenhodenganges erreichen, konnte ich in meiner Arbeit erstmals an 5 µm dicken Schnitten mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises der Cytokeratine 5 und 14 nachweisen. Entsprechend den Untersuchungen von Shum et al. konnte ich ebenfalls die Expression des Angiotensin II – Rezeptors Typ 2 (AGTR-II) bei den Basalzellen nachweisen. Die positive AGTR-II-Reaktion am apikalen Epithelsaum lässt die Vermutung zu, dass es sich hierbei um die Expression dieses Rezeptors an den Zytoplasma-Ausläufern der Basalzellen, welche die Epitheloberfläche erreichen, handelt. Aufgrund der vielen übereinstimmenden Ergebnisse zwischen den Untersuchungen von Shum et al. (2008 und 2009) bei der Ratte und meiner Arbeit am kaninen Nebenhoden liegt die Vermutung nahe, dass die Basalzellen im Nebenhodenepithel, wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, an der pH-Wert-Regulierung des Luminalplasmas beteiligt sind. Außerdem zeigte sich in meinen Untersuchungen, abweichend von den Studien von Lohr et al. (2010), auch eine intensive MAA I-Reaktion der Basalzellen. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass auch beim Hund den Basalzellen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Milieus im Ductus epididymidis zukommen

könnte.

Die Ergebnisse meiner Arbeit zum Nachweis von Claudin 1 stimmen mit den Studien von Cyr et al. (2007) und Gregory et al. (2001) überein, bei denen sowohl die lateralen Zellmembranen als auch die Kontaktflächen zwischen Basalzellen und deren Nachbarzellen positiv reagieren. Diese positive Reaktion von Claudin 1 an Kontaktflächen zwischen Basalzellen und deren benachbarten Zellen bestätigt die Annahme dieser Autoren, dass Claudin 1 auch an Zellverbindungen beteiligt ist, an denen keine „Tight junctions“ vorkommen. Allerdings zeigte sich Claudin 1 in meiner Arbeit im Gegensatz zu den Beobachtungen von Shum et al. (2008 und 2009) beim Hund nicht als spezifischer Basalzellmarker.

Bei den Zellkernen der Epithelzellen sind in der Fluoreszenzfärbung mit dem DNA-spezifischen Farbstoff DAPI deutliche Kerneinschlüsse zu beobachten. Diese Einschlüsse sind offensichtlich DNA-frei, da sie sich nicht anfärben. Die Kerneinschlüsse werden auch in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen regelmäßig sowohl im Caput als auch im Corpus epididymidis beobachtet. In der Cauda epididymidis konnte ich die Kerneinschlüsse elektronenmikroskopisch allerdings nicht nachweisen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Schick (2006), in denen die Kerneinschlüsse ebenfalls im Caput- und Corpusbereich des kaninen Ductus epididymidis beschrieben wurden. Ihre Funktion und ihr Ursprung sind bislang aber unklar. Beim immunhistochemischen Nachweis von Cytokeratin 8 reagieren die Zellkerne aller Epithelzellen und auch die Zellkerne der umliegenden Muskelzellen und Fibrozyten positiv. Direkt unter der zweiblättrigen Kernhülle, der sogenannten Karyotheca, liegt eine Schicht aus Faserproteinen, die wahrscheinlich für die Kernform von Bedeutung sind. Sie besteht aus den netzartig verbundenen Proteinen Lamin A, B und C (HEES H. & SINOWATZ F., 2000). Das Reaktionsergebnis beim immunhistochemischen Cytokeratin 8-Nachweis ist ein Hinweis dafür, dass sich auch dieses Cytokeratin als faseriges Polypeptid in dieser Schicht befindet und als Komponente des Zytoskelettes mitbeteiligt ist, den Zellkern in seiner Lage und Form zu stabilisieren.

In das Lumen des gesamten Ductus epididymidis ragen Stereozilien unterschiedlicher Länge. Sowohl die Hauptzellen als auch die Apikalzellen tragen an ihrer apikalen Zellmembran Stereozilien. Laut Hermo und Robaire (2002) sowie Shum (2008 und 2009) tragen die „Clear cells“ ebenfalls Stereozilien an ihrer Zelloberfläche. Während im Caput epididymidis die Stereozilien am längsten sind und weit ins Lumen ragen, nimmt die Stereozilienlänge in den weiter distal gelegenen Abschnitten des Nebenhodenganges kontinuierlich ab. Bei den glykohistochemischen Untersuchungen mit dem Lektin SNA zeigte sich in meiner Arbeit ein interessantes Reaktionsmuster an den Stereozilien in Caput und Corpus epididymidis. Die Stereozilien reagieren lediglich büschelweise stark positiv, was sich von den Ergebnissen am Epididymis der Maus von Lohr et al. (2010) unterscheidet, da in dieser Studie die Stereozilien zwar SNA-positiv beschrieben werden, jedoch ein büschelweises Reaktionsmuster nicht erwähnt wird. In den Arbeiten von Arenas et al. (1998), Calvo et al. (2000) und Ueda et al. (1998a) über die Nebenhoden von Mensch, Eber und Ratte werden keine Ergebnisse für die Lektinbindung an die Stereozilien angegeben. Durch die Stereozilien wird die Epitheloberfläche des Ductus epididymidis stark vergrößert, wodurch sie an Resorptions- und Sekretionsprozessen wesentlich beteiligt sind (HEES H. & SINOWATZ F., 2000). Wie bereits von Bamberg im Jahr 1975 publiziert wurde, findet die deutlichste Resorption und der maximale Austausch zwischen Nebenhodenplasma und Nebenhodenepithel im Bereich von Caput und Corpus epididymidis statt. Daraus erklärt sich die Längenabnahme der Stereozilien im Verlauf des Ductus epididymidis nach distal.

Interessante Ergebnisse hinsichtlich der Stereozilien zeigen sich auch bei den Galektin-Untersuchungen. Während es sich bei den Galektinen 1 und 3 um eine segmentspezifische Bindung, speziell in Corpus bzw. Caput epididymidis, zu handeln scheint, zeigt sich bei den Galektinen 8 und 9 eine nicht segmentspezifische Bindung. Bei diesen färben sich nämlich die Stereozilien aller drei Abschnitte des Ductus epididymidis an. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in Caput und Corpus epididymidis bestimmte Glykokonjugate, die Galactose enthalten,

resorbiert werden.

Bei den intraluminal gelegenen Spermien ist eine deutlich VAA-positive Reaktion am zytoplasmatischen Tröpfchen, welches direkt unterhalb des Spermienkopfes liegt, zu beobachten. Bei der Entwicklung der Spermienzelle aus den Spermatiden wird der Rest des Zytoplasmas in Form des Zytoplasmatröpfchens am Halsbereich der Spermienzelle abgelagert. Während der Nebenhodenpassage wandert dieses Tröpfchen das Mittelstück des Spermiums entlang und wird zumeist noch vor der Ejakulation abgelöst. Das zytoplasmatische Tröpfchen, das während der epididymalen Spermienreifung von den Spermien abgelöst wird, enthält verschiedene Hydrolasen wie saure Phosphatase, β -Glucuronidase oder β -N-Acetylglucosaminidase (BAMBERG E., 1975). Es erscheint möglich, dass Gal β 2(3)Gal-, Gal α 3(4)Gal-, oder Gal β 3(4)GlcNAc-Reste dieser Glykoproteine, die in dem zytoplasmatischen Tröpfchen enthalten sind, VAA als Bindungspartner dienen und so für die histochemisch beobachtete Anfärbung des Zytoplasmatröpfchens verantwortlich sind. Bei den Untersuchungen von Lohr et al. (2010) wird zwar von einer VAA-positiven Reaktion in Lumen bzw. der Spermien bei der Maus berichtet, der genaue Bindungsort wird aber nicht spezifiziert.

Die Anzahl der Schichten von glatten Muskelzellen, welche sich nach außen an das Epithel des Ductus epididymidis anschließen, nehmen von proximal nach distal hin kontinuierlich zu. Während um die Ductuli efferentes und das Caput epididymidis nur zwei bis drei dünne Lagen zu erkennen sind, wird die Cauda epididymidis von bis zu fünf kräftigen Muskelzelllagen umgeben. Zudem ist im letzten Abschnitt des Nebenhodenganges zu beobachten, dass sich neben den drei bis fünf Muskelzellschichten, welche die Wand des Ductus epididymidis bilden, auch im interductalen Bindegewebe mehrere Lagen von glatten Muskelzellen liegen, deren immunhistochemisches Verhalten von denen der Wandmuskulatur abweicht. Beim immunhistochemischen Nachweis von COX-1 zeigen sie ein interessantes Reaktionsmuster. Ihr perinukleärer Bereich reagiert deutlich positiv auf COX-1. Eine solche positive COX-1-Reaktion wird allerdings bei den Untersuchungen von Shum et al. (2008 und 2009) für die Epididymis der Ratte nicht

beschrieben.

Die unterschiedliche Expression von COX-1 im proximalen und distalen Bereich des Ductus epididymidis könnte auch funktionelle Bedeutung haben. Während sich die Muskulatur von Caput und Corpus epididymidis laut Wrobel (1990) weitgehend autonom auf Dehnungsreize kontrahiert, kommt es in der Cauda epididymidis zur reflektorischen Kontraktion während der Ejakulation. Dieses unterschiedliche Kontraktionsverhalten könnte möglicherweise mit dem unterschiedlichen Expressionsmuster von COX-1 in den proximalen (Caput und Corpus epididymidis) bzw. distalen Abschnitten in Verbindung stehen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Nebenhoden von 18 klinisch gesunden Hunden unterschiedlicher Rassen, eingeteilt in drei Altersgruppen, mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden untersucht. Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde neben den klassischen Übersichtsfärbungen auch eine Palette von verschiedenen immunhistochemischen und glykohistochemischen Untersuchungen zur näheren Charakterisierung des kaninen Nebenhodenepithels durchgeführt. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den drei Altersgruppen. Somit sind die mikroskopischen Strukturen des kaninen Nebenhodens bei den untersuchten Rassen bereits ab einem Alter von 8 Monaten vollständig entwickelt.

Der kanine Nebenhoden entspricht im makroskopischen Aufbau mit Kopf-, Körper- und Schwanzbereich grundsätzlich dem der anderen Säugetiere. Unter Berücksichtigung histologischer und zytologischer Kriterien wird er in vier verschiedene Abschnitte unterteilt: Den Ductuli efferentes sowie den drei Abschnitten des Ductus epididymidis, bestehend aus dem Caput epididymidis (Initialsegment), dem Corpus epididymidis (Mittelsegment) und der Cauda epididymidis (Terminalsegment).

Das Epithel der Ductuli efferentes besteht aus Kinozilien-tragenden Zellen und zilienlosen Zellen mit Mikrovilli-Besatz. Die zilienlosen Zellen lassen sich elektronenmikroskopisch in vier Subtypen unterteilen. Typ 1-Zellen enthalten nur sehr wenige Granula und sehr wenige Vakuolen im Zytoplasma. Typ 2-Zellen beinhalten zahlreiche elektronendichte Granula. Typ 3-Zellen sind durch viele helle Vakuolen, welche nahezu das gesamte Zytoplasma ausfüllen, gekennzeichnet und die Zellen des 4. Typs enthalten sowohl apikal gelegene Vakuolen als auch basal gelegene dunkle Granula. Das Epithel des Ductus epididymidis besteht beim Hund mit Ausnahme des Caput epididymidis aus vier Zellarten: Haupt-, Apikal- und Basalzellen sowie „Clear cells“, welche allerdings nur in Corpus und Cauda epididymidis zu finden sind.

Die histochemische Untersuchung zur Verteilung von Kohlenhydratgruppen im Nebenhoden wurde mit drei pflanzlichen Lektinen (MAA I, SNA und VAA) und mit vier humanen Galektinen (Gal-1, -3, -8 und -9) durchgeführt. Die Ductuli efferentes und die sich anschließenden drei Abschnitte des Ductus epididymidis wiesen für alle untersuchten Lektine ein charakteristisches Bindungsmuster auf.

Die Cytokeratine 5, 8, 14, 15, 18, 19 sowie Claudin 1, Occludin, der Rezeptor AGTR-II und das Enzym COX-1 wurden im Nebenhoden mit immunhistochemischen Methoden lokalisiert. Alle dazu verwendeten Antikörper ergaben, mit Ausnahme des Antikörpers gegen Cytokeratin 15, ein charakteristisches Verteilungsmuster. Besonders interessant zeigten sich die positiven Immunreaktionen auf Cytokeratin 5 und 14 sowie AGTR II und COX-1. Durch diese konnte nachgewiesen werden, dass die Basalzellen des kaninen Ductus epididymidis durch die Ausbildung dünner Zytoplasmaausläufer das Lumen des Nebenhodenganges erreichen. Weiter konnte die Expression von AGTR II und COX-1 den Basalzellen zugeordnet werden.

VII. SUMMARY

Functional morphology of the canine epididymis (*canis familiaris*) with special focus on the basal cells

In my thesis the functional morphology of the canine epididymis has been studied using histological, glycohistochemical, immunohistochemical and electron microscopical techniques. For this study the epididymides of eighteen clinically healthy dogs of different breeds and age were used.

Macroscopically, the canine epididymis is usually divided into caput, corpus and cauda epididymidis. Using histologic and cytologic criteria, it can be separated into four segments: the ductuli efferentes and the initial-, middle- and terminal-segment of the ductus epididymidis.

The epithelium of the efferent ductules consists of ciliated cells and nonciliated cells with microvilli. The nonciliated cells can be classified by electronmicroscopic criteria into four subtypes: Type 1 cells contain very few granules and vacuols in their cytoplasm. Type 2 cells show numerous granules of high electron density. Type 3 cells are characterized by a high number of moderately electron dense vacuols, which occupy almost the entire cytoplasm. Type 4 cells contain apically localized vacuols and dark granules in their basal areas. The epithelium of the canine ductus epididymidis consists of four cell types: Principal cells, apical cells, basal cells and clear cells, which can only be discerned in the corpus epididymidis and the cauda epididymidis.

The examination of the distribution of sugar residues in the canine epididymidis have been performed using three labeled plant-lectines (Maackia amurensis agglutinin I, Sambucus nigra agglutinin and Viscum album agglutinin) and the human galectines -1, -3, -8 and -9. The efferent ductules and the subsequent three segments of the ductus epididymidis showed a characteristic pattern of binding sites for all examined lectines.

Using immunohistochemistry, the localization of cytokeratines (CK) (CK 5, CK 8, CK 14, CK 15, CK 18, CK 19), claudin 1, occludin, the angiotensin II type 2 receptor (AGTR-II) and the enzyme cyclooxygenase 1 (COX 1) has been studied. An especial interesting pattern of immunoreactivity was found with antibodies against CK 5, CK 14, AGTR-II and COX-1. My results convincingly demonstrated for the first time, that in the canine epididymis the so called "basal cells" can reach the lumen of the duct by thin cytoplasmic processes. As in the rat, basal cells may therefore significantly contribute to the regulation of the intraluminal milieu of the duct, which is important for the epididymal sperm maturation.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Amann R., Hammerstedt R., Veeramachaneni D., (1993), The epididymis and sperm maturation: a perspective, *Reproduction, Fertility and Development*, 5: 361-381.

Arenas M.I., Madrid J.F., Bethencourt F.R., Fraile B., Paniagua R., (1998), Identification of n- and o-linked oligosaccharides in the human epididymis, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 46: 1185-1188.

Arrighi S., Romanello M.G., Domeneghini C., (1993), Ultrastructure of epididymal epithelium in equus caballus, *Annals of Anatomy*, 175: 1-9.

Bamberg E., (1975), Untersuchungen über die Spermienreifung im Nebenhoden, Habilitationsschrift, Tierärztliche Hochschule Wien.

Barondes S.H., (1988), Bifunctional properties of lectins: lectins redefined, *Trends in Biochemical Sciences*, 13: 480-482.

Beliczey J., (2003), Reaktionstechnische Untersuchungen zur präparativen enzymatischen Synthese und Aktivierung der Neuraminsäurederivate 3-Fluorneuraminsäure und Glycolyneuraminsäure, Inaugural-Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Busch W., Holzmann A., (2001), *Veterinärmedizinische Andrologie*, Schattauer, Stuttgart.

Calvo A., Pastor L., Bonet S., Pinart E., Ventura M., (2000), Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis, *Journal of Reproduction and Fertility*, 120: 325-335.

Chandler J.A., Sinowatz F., Pierrepoint C.G., (1981), The ultrastructure

of dog epididymis, *Urological Research*, 9: 33-44.

Cheung K.-h., Leung G.P.H., Leung M.C.T., Shum W.W.C., Zhou W.-l., Wong P.Y.D., (2005), Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat, *The Journal of General Physiology*, 125: 443-454.

Cornwall G.A., (2009), New insights into epididymal biology and function, *Human Reproduction Update*, 15: 213-227.

Cummings R.D. L.F., (2009), Galectins In: *Essentials of glycobiology*, 2. Varki A. C.R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi C.R.: CSH Press, New York.

Cyr D.G., Finnon K., Dufresne J., Gregory M., (2002), Cellular interactions and the blood-epididymal-barrier. In: *The epididymis, from molecules to clinical practice*. Robaire B., Hinton B.T.: Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.

Cyr D.G., Gregory M., Dube E., Dufresne J., Chan P.T.K., Hermo L., (2007a), Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans, *Asian Journal of Andrology*, 9: 463-475.

Cyr D.G., Gregory M., Dube E., Dufresne J., Chan P.T.K., Hermo L., (2007b), Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans, *Asian Journal of Andrology*, 9: 463-475.

Cyr D.G., Hermo L., Egenberger N., Mertineit C., Trasler J.M., Laird D.W., (1999), Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis, *Endocrinology*, 140: 3815-3825.

Domeniconi R.F., Orsi A.M., Beu C.C.L., Felisbino S.L., (2007), Morphological features of the epididymal epithelium of gerbil, *Meriones unguiculatus*, *Tissue and Cell*, 39: 47-57.

Dubé É., Dufresne J., Chan P.T.K., Hermo L., Cyr D.G., (2010), Assessing the role of claudins in maintaining the integrity of epididymal tight junctions using novel human epididymal cell lines, *Biology of Reproduction*, 82: 1119-1128.

Dufresne J., Cyr D.G., (2007), Activation of an sp binding site is crucial for the expression of claudin 1 in rat epididymal principal cells, *Biology of Reproduction*, 76: 825-832.

Eriksson J.E., Dechat T., Grin B., Helfand B., Mendez M., Pallari H.-M., Goldman R.D., (2009), Introducing intermediate filaments: from discovery to disease, *The Journal of Clinical Investigation*, 119: 1763-1771.

Fukuda M., Vliegenthart J., (1999), Structure and biosynthesis of glycoproteins, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1473: 1-3.

Gabius H.-J., (2001), *Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins*, *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 30: 3-31.

Gabius H.-J., (2009), *The Sugar Code*, Wiley-Blackwell, Weinheim.

Gabius H.-J., André S., Jiménez-Barbero J., Romero A., Solis D., (2011), From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code, *Trends Biochem Sci*, 36: 298-313.

Glover T.D., Nicander L., (1971), Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis, *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 13, 13: 39-50.

Goldstein I.J., Hayes C.E., (1978), The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 35: 127-340.

Goldstein I.J., Poretz R.D., (1986), Isolation, physiochemical characterization and carbohydrate binding specificity of lectins. In: *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*. Liener I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J.: Academic Press, New York, London.

Gregory M., Cyr D.G., (2006), Identification of multiple claudins in the rat epididymis, *Molecular Reproduction and Development*, 73: 580-588.

Gregory M., Dufresne J., Hermo L., Cyr D.G., (2001), Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis, *Endocrinology*, 142: 854-863.

Gu L.-H., Coulombe P.A., (2007), Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades, *Current Opinion in Cell Biology*, 19: 13-23.

Gye M., (2004), Expression of occludin in canine testis and epididymis, *Reproduction in Domestic Animals*, 39: 43-47.

Hees H., Sinowatz F., (2000), *Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*, Deutscher Ärzteverlag, Köln.

Herme L., Robaire B., (2002), Epididymal cell types and their functions. In: *The epididymis: from molecules to clinical practice*. Robaire B., Hinton B.T.: Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Hess R.A., (2002), The efferent ductules: structure and functions. In:

The epididymidis: from molecules to clinical practice. Robaire B., Hinton B.T.: Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.

Hsu S., Raine L., Fanger H., (1981), Use of avidin-biotin-peroxidase complex (abc) in immunoperoxidase techniques: a comparison between abc and unlabeled antibody (pap) procedures, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 29: 577-580.

Ilio K.Y., Hess R.A., (1994), Structure and function of the ductuli efferentes: a review, *Microscopy Research and Technique*, 29: 432-467.

Kawakami, (1991), Histological observations of the reproductive organs of the male dog from birth to sexual maturity, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 53 241-248.

Kirchhoff C., Ivell R., (1995), Molekulare Aspekte der Spermienreifung im Nebenhoden, *Fertilität*, 11: 167-174.

König H.E., Liebich H.-G., (2002), Männliche Geschlechtsorgane. In: *Anatomie der Haussäugetiere, Band II Organe, Kreislauf- und Nervensystem*. König H.E., Liebich H.-G.: Schattauer, Stuttgart.

Kühnel W., (2002), *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*, Thieme Verlag, Stuttgart.

Lee C.-H., Coulombe P.A., (2009), Self-organization of keratin intermediate filaments into cross-linked networks, *The Journal of Cell Biology*, 186: 409-421.

Leenders G.J.L.H.v., Aalders T.W., Kaa C.A.H.-v.d., Ruiter D.J., Schalken J.A., (2001), Expression of basal cell keratins in human prostate cancer metastases and cell lines, *The Journal of Pathology*, 195: 563-570.

Lehmann F., Tiralongo E., Tiralongo J., (2006), Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 1331-1354.

Leung G.P.H., Cheung K.H., Leung C.T., Tsang M.W., Wong P.Y.D., (2004), Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (trp) proteins and cyclooxygenase-1 (cox-1), *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216: 5-13.

Leung P.S., Chan H.C., Fu L.X.M., Zhou W.L., Wong P.Y.D., (1997), Angiotensin II receptors, at1 and at2 in the rat epididymis: immunocytochemical and electrophysiological studies, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1357: 65-72.

Liebich H.-G., (1999), Männliche Geschlechtsorgane. In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Liebich H.-G.: Schattauer, Stuttgart, 262-275.

Liu F.-T., Patterson R.J., Wang J.L., (2002), Intracellular functions of galectins, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1572: 263-273.

Lohr M., (2005), Vorkommen von Galektinen in den Gonaden der Maus - Untersuchungen unter Einbeziehung eines funktionellen Knock-out Modells für Galektin-3, Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Lohr M., Kaltner H., Schwartz-Albiez R., Sinowatz F., Gabius H.-J., (2010), Towards functional glycomics by lectin histochemistry: strategic probe selection to monitor core and branch-end substitutions and detection of cell-type and regional selectivity in adult mouse testis and epididymis, *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 39: 481-493.

Magin T.M., Vijayaraj P., Leube R.E., (2007), Structural and regulatory

functions of keratins, *Experimental Cell Research*, 313: 2021-2032.

Moll R., Franke W.W., Schiller D.L., Geiger B., Krepler R., (1982), The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells, *Cell*, 31: 11-24.

Nicander L., (1957), On the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in rabbits, *Acta Morphologica Neerlando-Scandinavica*, 2: 99-118.

Nicander L., (1958), Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in stallions, rams and bulls, *Acta Morphologica Neerlando-Scandinavica*, 4: 337-362.

Nickel R., Schummer A., Seiferle E., (1995), Männliche Geschlechtsorgane. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 2 Eingeweide*. Habermehl K.H., Vollmerhaus B., Wilkens H.: Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin-Wien.

Oriolo A.S., Wald F.A., Ramsauer V.P., Salas P.J.I., (2007), Intermediate filaments: a role in epithelial polarity, *Experimental Cell Research*, 313: 2255-2264.

Orsi A.M., (1983), Regional histology of the epididymidis of the dog, *Anatomischer Anzeiger*, 153: 441-445.

Palacios J., Regadera J., Nistal M., Paniagua R., (1991), Apical mitochondria-rich cells in the human epididymis: An ultrastructural, enzymohistochemical, and immunohistochemical study, *The Anatomical Record*, 231: 82-88.

Palacios J., Regadera J., Paniagua R., Gamallo C., Nistal M., (1993), Immunohistochemistry of the human ductus epididymis, *The Anatomical Record*, 235: 560-566.

Pallari H.-M., Eriksson J.E., (2006), Intermediate filaments as signaling platforms, *Science's STKE*, 2006: pe53-.

Pommerencke J., (2000), Untersuchungen zur O-Acetylierung der Sialinsäuren im Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* 21701, Inaugural-Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel.

Pühler A., Regitz M., Schmid R., (2000), *Lexikon Biochemie und Molekularbiologie*, Thieme Verlag, Stuttgart.

Rapoport E., Pochechueva T., Kurmyshkina O., Pazynina G., Severov V., Gordeeva E., Belyanchikov I., André S., Gabius H.-J., Bovin N., (2010), Solid-phase assays for study of carbohydrate specificity of galectins, *Biochemistry (Moscow)*, 75: 310-319.

Romeis, (2010), *Mikroskopische Technik*, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg.

Rüdiger H., Gabius H.-J., (2001), Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications, *Glycoconjugate Journal*, 18: 589-613.

Sánchez B., Flores J.M., Pizarro M., García P., (1998), Histological and immunohistochemical study of the cat epididymis, *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 27: 135-140.

Schick B., (2006), Immunhistochemische, ultrastrukturelle und glyko-histochemische Untersuchungen am Nebenhoden des Hundes (*Canis familiaris*), Inauguraldissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Schick B., Habermann F., Sinowatz F., (2009), Histochemical detection of glycoconjugates in the canine epididymis, *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 38: 122-127.

Schimming B.C., Vicentini C.A., (2001), Ultrastructural features in the epididymis of the dog (*canis familiaris*), *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 30: 327-332.

Schimming B.C., Vicentini C.A., Orsi A.M., (1997), Regional histology of the ductus epididymidis of the dog (*canis familiaris*, l.), *Revista Chilena de Anatomia*, 15: 5-12.

Schweizer J., Bowden P.E., Coulombe P.A., Langbein L., Lane E.B., Magin T.M., Maltais L., Omary M.B., Parry D.A.D., Rogers M.A., Wright M.W., (2006), New consensus nomenclature for mammalian keratins, *The Journal of Cell Biology*, 174: 169-174.

Shum W.W.C., Da Silva N., Brown D., Breton S., (2009), Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk, *The Journal of Experimental Biology*, 212: 1753-1761.

Shum W.W.C., Da Silva N., McKee M., Smith P.J.S., Brown D., Breton S., (2008), Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia, *Cell*, 135: 1108-1117.

Sinowatz F., (1981), *Ultrastrukturelle und enzymhistochemische Untersuchungen am Ductus epididymidis des Rindes*, Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg.

Sinowatz F., Fischer M., Skolek-Winnisch R., Chandler J., (1979), Histochemical localization of glycosidases in dog epididymis, *The Histochemical Journal*, 11: 103-109.

Sinowatz F., Wrobel K.-H., (1985), Zur Histochemie und Zytochemie des Nebenhodens von Säugetieren, *Acta Histochemica*, 31, Supplementband 0567-7556: 151-158.

Ueda T., Fujimori O., Tsukise A., Yamada K., (1998a), Histochemical

analysis of sialic acids in the epididymis of the rat, *Histochemistry and Cell Biology*, 109: 399-407.

Wakui S., (1994), Coexpression of different cytokeratins, vimentin and desmin in the rete testis and epididymis in the dog, *Journal of Anatomy*, 184: 147-151.

Wakui S., (1996), Lectin histochemical evaluation of glycoconjugates in dog efferent ductules, *Journal of Anatomy*, 188: 541-546.

Wong P.Y.D., Chan H.C., Leung P.S., Chung Y.W., Wong Y.L., Lee W.M., Ng V., Dun N.J., (1999), Regulation of anion secretion by cyclooxygenase and prostanoids in cultured epididymal epithelia from the rat, *The Journal of Physiology*, 514: 809-820.

Wong P.Y.D., Gong X.D., Leung G.P.H., Cheuk B.L.Y., (2002), Formation of the epididymal fluid microenvironment. In: *The epididymis: from molecules to clinical practice*. Robaire B., Hinton B.T.: Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.

Wrobel K.-H., (1990), Männliche Geschlechtsorgane. In: *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. Mosimann W., Kohler T.: Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

Yeung C.H., Nashan D., Sorg C., Oberpenning F., Schulze H., Nieschlag E., Cooper T.G., (1994), Basal cells of the human epididymis - antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages, *Biology of Reproduction*, 50: 917-926.

Yoon S., Park C., Nah W., Gye M., (2009), Expression of occludin in testis and epididymis of wild rabbits (*Lepus sinensis coreanus*), *Reproduction in Domestic Animals*, 44: 745-750.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schema des speziesspezifischen Übergangs des ausführenden Kanalsystems in den Ductus epididymidis (E) modifiziert nach Ilio und Hess (ILIO K.Y. & HESS R.A.,1994).	7
Abbildung 2: Schema der verschiedenen Epithelzell-Typen der Epididymis	11
Abbildung 3: Schema der Zell-Interaktion zwischen Basalzelle und „Clear cell“ modifiziert nach Shum et al. (SHUM W.W. C. et al., 2008)	14
Abbildung 4: Regulation der Anionen-Sekretion mit COX-1 Beteiligung	38

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zuckerspezifität der Lektine nach Goldstein & Poretz (1986) modifiziert nach Gabius	19
Tabelle 2: Hauptfamilien der tierischen Lektine nach Gabius (2001)..	21
Tabelle 3: Galektin-Untergruppen nach Lohr (2005) und Liu (2002)..	26
Tabelle 4: Klassifikation der Intermediärfilamente	31
Tabelle 5: Keratin-Kategorien nach neuer Nomenklatur.....	32
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Tiere	41
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Antikörper	52
Tabelle 8: Glykohistochemischer Nachweis der Lektine SNA, MAA I und VAA	68
Tabelle 9: Glykohistochemischer Nachweis der Galektine 1, 3, 8 und 9	74
Tabelle 10: Immunhistochemischer Nachweis der Cytokeratine 5, 8, 14 und Pancytokeratin	83
Tabelle 11: Immunhistochemischer Nachweis der Cytokeratine 15, 18 und 19	84
Tabelle 12: Immunhistochemischer Nachweis von Claudin 1 und Occludin	94
Tabelle 13: Immunhistochemischer Nachweis von AGTR-II und COX-1	98
Tabelle 14: Hersteller der Chemikalien im Methodikteil	166

XI. VERZEICHNIS DER BILDER

Bild 1: Ductuli efferentes, HE-Färbung	59
Bild 2: Ductuli efferentes, Goldner-Färbung.....	59
Bild 3: Ductuli efferentes, PAS-Färbung.....	59
Bild 4: Ductuli efferentes, Alcianblau-Färbung pH 2,5.....	59
Bild 5: Ductuli efferentes und Caput	60
Bild 6: Caput, HE-Färbung.....	62
Bild 7: Caput, HE-Färbung.....	62
Bild 8: Caput, PAS-Färbung.....	62
Bild 9: Caput, Alcianblau-Färbung pH 2,5.....	62
Bild 10: Corpus, HE-Färbung.....	64
Bild 11: Corpus, PAS-Färbung.....	64
Bild 12: Corpus, HE-Färbung.....	64
Bild 13: Corpus, Alcianblau-Färbung pH 2,5.....	64
Bild 14: Cauda, HE-Färbung.....	66
Bild 15: Cauda, HE-Färbung.....	66
Bild 16: Cauda, PAS-Färbung.....	66
Bild 17: Cauda, Alcianblau-Färbung pH 2,5.....	66
Bild 18: MAA I-Bindung im Corpus.....	70
Bild 19: MAA I-Bindung in der Cauda.....	70
Bild 20: MAA I-Bindung im Corpus.....	70
Bild 21: MAA I-Bindung im Corpus und DAPI-Kernfärbung.....	70
Bild 22: SNA-Bindung im Caput.....	71
Bild 23: SNA-Bindung im Corpus.....	71
Bild 24: VAA-Bindung in den Ductuli efferentes.....	71
Bild 25: VAA-Bindung im Corpus.....	71
Bild 26: Galektin 1-Bindung in den Ductuli efferentes.....	76
Bild 27: Galektin 1-Bindung im Caput.....	76
Bild 28: Galektin 1-Bindung im Corpus.....	76
Bild 29: Galektin 1-Bindung in der Cauda.....	76
Bild 30: Galektin 3-Bindung in den Ductuli efferentes.....	77
Bild 31: Galektin 3-Bindung im Caput.....	77
Bild 32: Galektin 3-Bindung im Corpus.....	77
Bild 33: Galektin 3-Bindung in der Cauda.....	77

Bild 34: Galektin 8-Bindung in den Ductuli efferentes.....	78
Bild 35: Galektin 8-Bindung im Caput.....	78
Bild 36: Galektin 8-Bindung im Corpus.....	78
Bild 37: Galektin 8-Bindung in der Cauda.....	78
Bild 38: Galektin 9-Bindung in den Ductuli efferentes.....	79
Bild 39: Galektin 9-Bindung im Caput.....	79
Bild 40: Galektin 9-Bindung im Corpus.....	79
Bild 41: Galektin 9-Bindung in der Cauda.....	79
Bild 42: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von PanCK	86
Bild 43: Caput, immunhistologischer Nachweis von PanCK.....	86
Bild 44: Corpus, immunhistologischer Nachweis von PanCK.....	86
Bild 45: Cauda, immunhistologischer Nachweis von PanCK.....	86
Bild 46: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von CK5.....	87
Bild 47: Caput, immunhistologischer Nachweis von CK5.....	87
Bild 48: Corpus, immunhistologischer Nachweis von CK5.....	87
Bild 49: Cauda, immunhistologischer Nachweis von CK5.....	87
Bild 50: Caput, immunhistologischer Nachweis von CK5.....	88
Bild 51: Cauda, immunhistologischer Nachweis von CK5.....	88
Bild 52: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von CK8.....	89
Bild 53: Caput, immunhistologischer Nachweis von CK8.....	89
Bild 54: Corpus, immunhistologischer Nachweis von CK8.....	89
Bild 55: Cauda, immunhistologischer Nachweis von CK8.....	89
Bild 56: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von CK14.....	90
Bild 57: Caput, immunhistologischer Nachweis von CK14.....	90
Bild 58: Corpus, immunhistologischer Nachweis von CK14.....	90
Bild 59: Cauda, immunhistologischer Nachweis von CK14.....	90
Bild 60: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von CK18.....	91
Bild 61: Caput, immunhistologischer Nachweis von CK18.....	91
Bild 62: Corpus, immunhistologischer Nachweis von CK18.....	91
Bild 63: Cauda, immunhistologischer Nachweis von CK18.....	91
Bild 64: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis	

von CK19.....	92
Bild 65: Caput, immunhistologischer Nachweis von CK19.....	92
Bild 66: Corpus, immunhistologischer Nachweis von CK19.....	92
Bild 67: Cauda, immunhistologischer Nachweis von CK19.....	92
Bild 68: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von Claudin 1.....	95
Bild 69: Caput, immunhistologischer Nachweis von Claudin 1.....	95
Bild 70: Corpus, immunhistologischer Nachweis von Claudin 1.....	95
Bild 71: Cauda, immunhistologischer Nachweis von Claudin 1.....	95
Bild 72: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von Occludin.....	96
Bild 73: Caput, immunhistologischer Nachweis von Occludin.....	96
Bild 74: Caput, Kernfärbung mit DAPI.....	96
Bild 75: Cauda, immunhistologischer Nachweis von Occludin.....	96
Bild 76: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von COX 1.....	100
Bild 77: Caput, immunhistologischer Nachweis von COX 1.....	100
Bild 78: Corpus, immunhistologischer Nachweis von COX 1.....	100
Bild 79: Cauda, immunhistologischer Nachweis von COX 1.....	100
Bild 80: Ductuli efferentes, immunhistologischer Nachweis von AGTR II.....	101
Bild 81: Caput, immunhistologischer Nachweis von AGTR II.....	101
Bild 82: Corpus, immunhistologischer Nachweis von AGTR II.....	101
Bild 83: Cauda, immunhistologischer Nachweis von AGTR II.....	101
Bild 84: Übersicht über das mehrreihige Epithel der Ductuli efferentes.....	104
Bild 85: Basalbereich der Ductuli efferentes.....	105
Bild 86: Basalbereich der Ductuli efferentes.....	106
Bild 87: Apikalbereich der Ductuli efferentes.....	107
Bild 88: Apikalbereich der Ductuli efferentes.....	108
Bild 89: Epithelübersicht im Bereich des Caput epididymidis.....	111
Bild 90: Apikalbereich des Caput epididymidis.....	112
Bild 91: Darstellung der Hauptzellen im Caput epididymidis.....	113
Bild 92: Basalbereich des Caput epididymidis.....	114
Bild 93: Lumeninhalt des Ductus epididymidis im Bereich des Corpus epididymidis.....	117

Bild 94: Apikalbereich des Corpus epididymidis.....	118
Bild 95: Darstellung der Hauptzellen im Corpus epididymidis.....	119
Bild 96: Basalbereich des Corpus epididymidis.....	120
Bild 97: Basalbereich des Corpus epididymidis.....	121
Bild 98: Apikalbereich der Cauda epididymidis.....	124
Bild 99: Darstellung der Hauptzellen in der Cauda epididymidis.....	125
Bild 100: Basalbereich der Cauda epididymidis.....	126
Bild 101: Basalbereich der Cauda epididymidis.....	127
Bild 102: Stroma im Bereich der Cauda epididymidis.....	128

XII. ANHANG

Methodik

1. Lichtmikroskopie

Fixierung:

- Bouin´sche Lösung: 750 ml gesättigte wässrige Pikrinsäure
250 ml Formaldehyd 37%
50 ml Eisessig
- Formalin: Formaldehyd 37% 1:10 mit PBS Puffer verdünnen

Puffer:

- PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,4:
42,50 g NaCl (Natriumchlorid)
6,35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Di-Na-Hydrogenphosphat-Dihydrat)
1,95 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Na-Dihydrogenphosphat-1-Hydrat)
Aqua dest. ad 5 Liter
- Citratpuffer pH 6,0:
Stammlösung A = 21,01 g Citrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$) und Aqua dest. ad 1 Liter
Stammlösung B = 29,42 g Natriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) und Aqua dest. ad 1 Liter
Gebrauchslösung = 9 ml Lösung A + 41 ml Lösung B und Aqua dest. ad 500 ml

Lösungen:

- Hämalan:
2,0 g Hämatoxylin
0,4 g Natriumjodat
100 g Kalialaun p.A.
100 g Chloralhydrat
2,0 g kristalline Zitronensäure
Aqua dest. ad 2000 ml
- Eosin:
Stammlösung = 2,0 g Eosin und 198ml Aqua dest (zur Haltbarkeitsteigerung)

einige Tropfen Formol zusetzen)

Gebrauchslösung = 60 ml Stamm-
lösung plus 8 Tropfen Eisessig und
600 ml Aqua dest.

- Eisenhämatoxylin nach Weigert:

Lösung A = 1,0 g Hämatoxylin in 100
ml 96% Alkohol lösen

Lösung B = 2,48 g Eisen(III)chlorid in
100 ml Aqua dest. lösen und 1 ml
konzentrierte Salzsäure (HCl 37%) zu-
geben

Gebrauchslösung = Lösung A und
Lösung B im Verhältnis 1:1 mischen

- Azophloxin:

0,5 g Azophloxin

100 ml Aqua dest.

0,2 ml Eisessig

- Phosphormolybdänsäure-Orange:

3-5 g Phosphormolybdänsäure oder
besser Phosphorwolframsäure

100 ml Aqua dest.

2,0 g Orange G

- Lichtgrün:

0,1-0,2 g Lichtgrün

100 ml Aqua dest.

0,2 ml Eisessig

- Essigsäure 1%/3%:

10/30 ml Eisessig

1000 ml Aqua dest.

- 0,5% wässrige Lösung von Perjodsäure:

0,5 g Perjodsäure

100 ml Aqua dest.

- SO₂(Schwefeldioxid)-Wasser:

200 ml Leitungswasser

10 ml Kalium-Pyrosulfit-Lösung

10 ml n-Salzsäure (100 ml konz.
Salzsäure und 900 ml Aqua dest.)

- Alcianblau pH 1,0:

1 g Alcianblau 8 GX in 100 ml 0,1 N-
Salzsäure lösen. Auf pH 1,0 einstellen
und Thymolkristall zusetzen.

- Alcianblau pH 2,5:

1 g Alcianblau 8 GX in 100 ml 3%

Essigsäure lösen. Auf pH 2,5 einstellen und Thymolkristall zusetzen.

- DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)-Wasserstoffperoxid-Lösung:

Stammlösung = 5 ml PBS-Puffer und 15 µl 30% H₂O₂

Gebrauchslösung = 6 DAB-Tabletten in 60 ml Aqua dest. auflösen und dann 400 µl Stammlösung dazugeben

- „ABC“-Lösung:

5 ml PBS-Puffer

1 Tropfen StreptABComplex-Lsg. A

1 Tropfen StreptABComplex-Lsg. B

2. Elektronenmikroskopie

Puffer:

- Natriumcacodylat: Stammlösung = 8,56 g Natriumcacodylat (Na(CH₃)₂AsO₂·3H₂O) in 200 ml Aqua dest. lösen
0,2M-Lösung = 50 ml Stammlösung plus tropfenweise 0,2M HCl bis pH 7,2. Anschließend Aqua dest. ad 100 ml
0,1M-Lösung = 50 ml 0,2M-Lösung und 50 ml Aqua dest.

Lösungen:

- Fixierlösung nach Karnovsky:
 - 10% Paraformaldehyd-Lösung = 10 g Paraformaldehyd in 100 ml Aqua dest. lösen, dann 1-2 Tropfen 1N NaOH dazu
 - Stammlösung = 20 ml Paraformaldehyd-Lösung (10%) plus 50 ml 0,2M-Natriumcacodylatpuffer plus 0,05 g Kalziumchlorid (CaCl₂)
 - Gebrauchslösung = 10 ml Stammlösung und 1,37 ml 25% Glutaraldehyd
- Kontrastierungslösung:
 - 2% Osmiumtetroxid-Lösung = 2 ml 4% Osmiumtetroxid und 2 ml 0,1M-Natriumcacodylatpuffer
 - 3% Kaliumferrocyanid-Lösung = 0,3 g Kaliumferrocyanid und 0,1M-Natriumcacodylatpuffer ad 10 ml

- Osmiumtetroxid (1%) - Kaliumferrocyanid (1,5%) in 0,1M-Natriumcacodylatpuffer = 4 ml 2% Osmiumtetroxid-Lösung und 4 ml 3% Kaliumferrocyanid-Lösung
- Bleicitrat-Lösung nach Reynolds (pH ~12):
 - 0,266 g Bleinitrat ($(\text{Pb}(\text{NO}_3)_2)$)
 - 0,352 g Natriumcitrat ($\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 2\text{H}_2\text{O}$)
 - 6 ml Aqua dest.
 - ca. 1,6 ml 1N NaOH für pH
 - Uranylacetat: Uranylacetat in Aqua dest. bis zur gesättigten Lösung
 - Methylenblau nach Richardson:
 - Stammlösung = 1% Methylenblau mit 1% Borax (Natriumtetraboratdecahydrat p.A.) im Verhältnis 1:1 mischen
 - Gebrauchslösung = 1 % Azur II mit Stammlösung im Verhältnis 1:1 mischen
 - Polyembed-Einbettung: 20 ml Poly/Bed 812
 - 16 ml DDSA
 - 10 ml NMA
 - 1,4 ml BDMA

3. Ergänzung

Tabelle 14: Hersteller der Chemikalien im Methodikteil

Pikrinsäure	Firma Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37%	Firma Merck, Darmstadt
Eisessig	Firma Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Firma Merck, Darmstadt
Di-Na-Hydrogenphosphat-Dihydrat	Firma Merck, Darmstadt
Na-Dihydrogenphosphat-1-Hydrat	Firma Merck, Darmstadt
Citrat	Firma Merck, Darmstadt

Natriumcitrat	Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Alcianblau 8 GX	Firma Merck, Darmstadt
DAB	Firma Dako, Hamburg
StreptABComplex-Lösungen	Firma Dako, Hamburg
Natriumcacodylat	Firma Polysciences, Warrington, USA
HCl 1N / 0,1N	Firma Merck, Darmstadt / Firma Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Firma Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Firma Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd 25%	Firma Polysciences, Warrington, USA
Osmiumtetroxid 4%	Firma Polysciences, Warrington, USA
Kaliumferrocyanid	Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaOH 1N	Firma Carl Roth, Karlsruhe
Bleinitrat	Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Uranylacetat	Firma Scientific LTD, Stansted, UK
Methylenblau	Firma Merck, Darmstadt
Borax	Firma Serva, Heidelberg
Azur II	Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & CO, Münster
Poly/Bed 812	Firma Polysciences, Warrington, USA

XIV. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. habil. F. Sinowatz für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die jederzeitige, geduldige und freundliche Betreuung sehr herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. Barbara Schick, die beste Betreuerin, die man sich überhaupt wünschen kann. Ich danke Dir für Deine großartige Unterstützung bei allen fachlichen und freundschaftlichen Themen, bei großen und kleinen Problemen und für Deine Hilfe vor, während und über diese Doktorarbeit hinaus!...und dafür, dass Du sogar zu Zeiten immer für mich da gewesen bist, in denen Du eigentlich hauptberuflich Mama warst.

Bei Frau Dr. Kenngott und Frau Ebach bedanke ich mich vielmals, für ihre große Hilfe und Unterstützung zu jeder Zeit. Frau Dr. Rodler danke ich herzlich für die Hilfe bei allen Fragen rund um die Histologie und für die kleinen Frischluft-Pausen zwischendurch.

Bei Frau Rußmeier, Frau Settles und Herrn Gök bedanke ich mich für die Einarbeitung und Hilfe bei den lichtmikroskopischen, glyko- und immunhistochemischen Techniken. Frau Neumüller und Frau Scholz danke ich für ihren engagierten Einsatz bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Frau Kazior danke ich für die Hilfe bezüglich aller organisatorischen Fragen.

Frau Dr. M. Böhm danke ich für ihre liebe Hilfe bei der Probensammlung und die tolle Möglichkeit, den Spaß an der Kleintierpraxis nicht aus den Augen zu verlieren.

Herrn Felix Müller danke ich vielmals für seine große Hilfe bei der Probensammlung ...lieber Felix durch Dich hab ich meinen allerletzten Rüden gefunden, den ich ein Jahr lang gesucht habe. Vielen vielen Dank dafür!

Ich bedanke mich auch von ganzem Herzen bei meinen Freunden, die immer für mich da sind! Danke, dass Ihr vor allem in meiner Krisenzeit immer an mich geglaubt habt und mich so großartig unterstützt habt!

Meinem Bruder Alexander danke ich sehr für seine geduldige Hilfe bei allen PC-Problemen und dass er einfach immer für seine kleine Schwester da ist.

Mama, Dir danke ich ganz besonders! Ich kann mit Worten nur schwer ausdrücken, wie sehr ich Dir von ganzem Herzen für Deine Hilfe, Deine Liebe, Dein Vertrauen in mich und vor allem dafür danke, dass Du mir diesen Traum ermöglicht hast! Ich bin so dankbar, dass ich so eine großartige Mutter habe.