

Veränderungen der peritubulären Muskulatur im Hoden bei Polysialyltransferase-defizienten Mäusen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hachem, Nadim Elias
aus Düsseldorf

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Anatomie und Zellbiologie

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Middendorff

Gutachterin: Prof. Dr. Anne Schänzer

Tag der Disputation: 16.11.2023

Für

Amo Georges

Dem größten *Genie* der Familie...

bis dato

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die männlichen Reproduktionsorgane.....	1
1.1.1	Der anatomische und physiologische Aufbau des Hodens.....	3
1.1.2	Peritubuläre Muskelzellen.....	6
1.1.3	Spermatogenese und ihre hormonelle Steuerung.....	8
1.1.4	Infertilität bei Männern.....	9
1.1.5	Therapie der Infertilität.....	12
1.1.6	Behandlung der männlichen Infertilität durch assistierte Fertilisationsverfahren.....	14
1.2	Glykosylierung.....	14
1.2.1	Polysialinsäuren.....	17
1.2.2	Synthese von PolySia – Polysialyltransferasen.....	20
1.3	Mausmodell.....	21
1.4	Zielsetzung.....	22
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Herkunft und Auswahl des Untersuchungsmaterials.....	23
2.1.1	Vorbereitung der Paraffinschnitte.....	25
2.2	Geräte.....	25
2.3	Programme.....	25
2.4	Chemikalien.....	26
2.5	Herstellung von Lösungen und Puffer.....	27
2.6	Färbungen.....	28
2.6.1	Azan-Färbung nach Heidenhain.....	28
2.6.2	Immunhistochemische Färbungen.....	29
2.6.3	Immunfluoreszenz.....	30

2.7	Aufnahmen am Mikroskop.....	31
2.8	Zellproliferation.....	31
2.8.1	Proliferation in der peritubulären Muskelzellschicht.....	31
2.8.2	Zusammenfügen der Bilder und Auszählung der PCNA-positiven peritubulären Muskelzellen	32
2.8.3	Messung der Fläche	34
2.8.4	Rohdaten der ausgezählten proliferierenden peritubulären Muskelzellen, der Fläche und des resultierenden Quotienten.....	36
2.8.5	Fragestellung Signifikanztest	38
2.8.6	Rohdaten der Fläche des interstitiellen Raumes	42
2.8.7	Interstitieller Raum der drei Gruppen	45
2.8.8	Fragestellung Signifikanztest	45
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Übersichtsfärbung zur Beurteilung der Morphologie der drei Gruppen	49
3.2	PolySia-positive peritubuläre Areale in postnatalen Mäusehoden	50
3.3	Untersuchungen der peritubulären Muskulatur durch Färbemethoden	52
3.3.1	Immunhistochemische SMA-Färbung	52
3.3.2	Immunfluoreszenz-Färbung mit SMA und Kollagen-1	54
3.3.3	Immunhistochemische Calponin-Färbung	56
3.3.4	Immunhistochemische PKG I-Färbung.....	58
3.4	Auswertungen zur Proliferation der peritubulären Muskelzellen	60
3.5	Auswertungen zum interstitiellen Raum.....	66
4	Diskussion	69
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	69
4.2	Peritubuläre PolySia-Expression und Veränderungen durch den partiellen und kompletten Knockout der Polysialyltransferasen.....	70
4.3	Die Proliferationen der peritubulären Muskelzellen.....	74
4.4	Muskeldifferenzierung	78
5	Zusammenfassung	81
6	Summary	83

7	Abkürzungsverzeichnis	84
8	Abbildungsverzeichnis	86
9	Tabellenverzeichnis	88
10	Literaturverzeichnis	89
11	Publikationsverzeichnis	104
12	Erklärung zur Dissertation	108
13	Danksagung	109
14	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Die männlichen Reproduktionsorgane

Der Reproduktionstrakt des Mannes wird in äußere und innere Geschlechtsorgane unterteilt, wobei zu ersteren der Penis und das Skrotum und zu letzteren der Hoden, Nebenhoden, Samenleiter, Prostata und die akzessorischen Geschlechtsdrüsen gehören. Ein übergeordnetes Ziel all dieser Organe ist die Produktion, Reifung, Optimierung und der Transport fertiler Spermien, um eine Eizelle zu befruchten. Am Beginn dieses Prozesses steht das im Hoden befindliche Keimepithel der Tubuli seminiferi, in denen sich die Keimzellen und Sertoli-Zellen befinden. Aus den Keimzellen entstehen innerhalb von 74 Tagen (Holstein 2008) fertige Spermien, welche über die Tubuli seminiferi recti durch das Rete testis in die Ductuli efferentes zum Nebenhoden gelangen. Ein Rückstrom der Spermien wird durch die lippenartig vorgewölbten terminalen Anteile der Tubuli seminiferi in das Rete testis verhindert. Durch das einschichtige isoprismatische Epithel kommt es zusätzlich durch Sekretions- und Resorptionsvorgänge zur Veränderung der die Spermien umgebenden Flüssigkeit. Die in den Nebenhoden mündenden Ductuli efferentes sorgen durch die Resorption von Flüssigkeit für eine höhere Konzentration der Spermien pro Volumen und durch kinezilientragende Zellen für deren Transport Richtung Nebenhoden. Dieser ist paarig angelegt, wird in Caput, Corpus und Cauda epididymidis eingeteilt. Der Nebenhodengang als Hauptbestandteil des Nebenhodens ist 6m lang, jedoch durch seine starken Windungen auf eine Länge von 4-5cm komprimiert. Das Epithel und die damit verbundenen Stoffwechsellleistungen, wie die Ausreifung der Spermien, sind im Caput besonders hoch. Des Weiteren wird vor allem im Caput die im Hoden gebildete Flüssigkeit resorbiert. Im Verlauf des Ductus epididymidis nimmt die Höhe des Epithels stetig ab und die Anzahl an Muskelschichten sowie die Größe des Lumens zu. Dadurch können die Spermien in ausreichender Anzahl in der Cauda gespeichert und bei einer Ejakulation ausgeworfen werden. Die Transportzeit der Spermien durch den Nebenhoden beträgt 8-17 Tage (Holstein 2008). Während der Ejakulation passieren die Spermien samt Flüssigkeit den 35-40cm langen Ductus deferens und erhalten über den Ductus excretorius aus der Bläschendrüse ein leicht alkalisches (pH 7,2-7,6), gelartiges Sekret, welches insgesamt 50-80% (Holstein 2008) des Ejakulats ausmacht.

In diesem befinden sich u.a. Fructose und Glucose, die zur Energiegewinnung der Spermien bereit stehen, Prostaglandine, um die Muskulatur des weiblichen Genitaltraktes zu dilatieren und dadurch die Wanderung der Spermien bis zum Uterus zu vereinfachen, und Semenogelin, ein Protein, welches das Ejakulat in der Struktur gelartig verändert und dadurch die Spermien sowohl einschließt als auch unbeweglich macht (Holstein 2008). Die Sekretion der Drüse findet in Abhängigkeit von Testosteron statt. Nach Vereinigung des Ductus deferens und Ductus excretorius zum Ductus ejaculatorius verläuft dieser durch die Prostata und mündet in die Urethra. Über separate Ausführungsgänge wird auch das Sekret der Prostata selbst in die Urethra abgegeben. Das Prostatasekret ist im Gegensatz zur Bläschendrüse leicht saurer (pH 6,4) und dünnflüssig und macht 15-30% (Holstein 2008) des Ejakulats aus. Bestandteile sind zum einen die Prostata-spezifische saure Phosphatase, deren Funktion bisher noch ungeklärt ist und zum anderen das Prostata-spezifische Antigen (PSA), welches die viskositätserhöhende Funktion des Semenogelins antagonisiert und somit zu einer Verflüssigung des Ejakulats führt. Dadurch können die zuvor unbeweglichen Spermien nach Ejakulation und Eindringen in die Vagina zur Oozyte gelangen, um diese zu befruchten. Bei sexueller Erregung wird aus den Glandulae bulbourethrales ein klares und schleimhaltiges Sekret in die Harnröhre abgegeben, um ein Eindringen des Penis in die Vagina zu erleichtern (Holstein 2008).

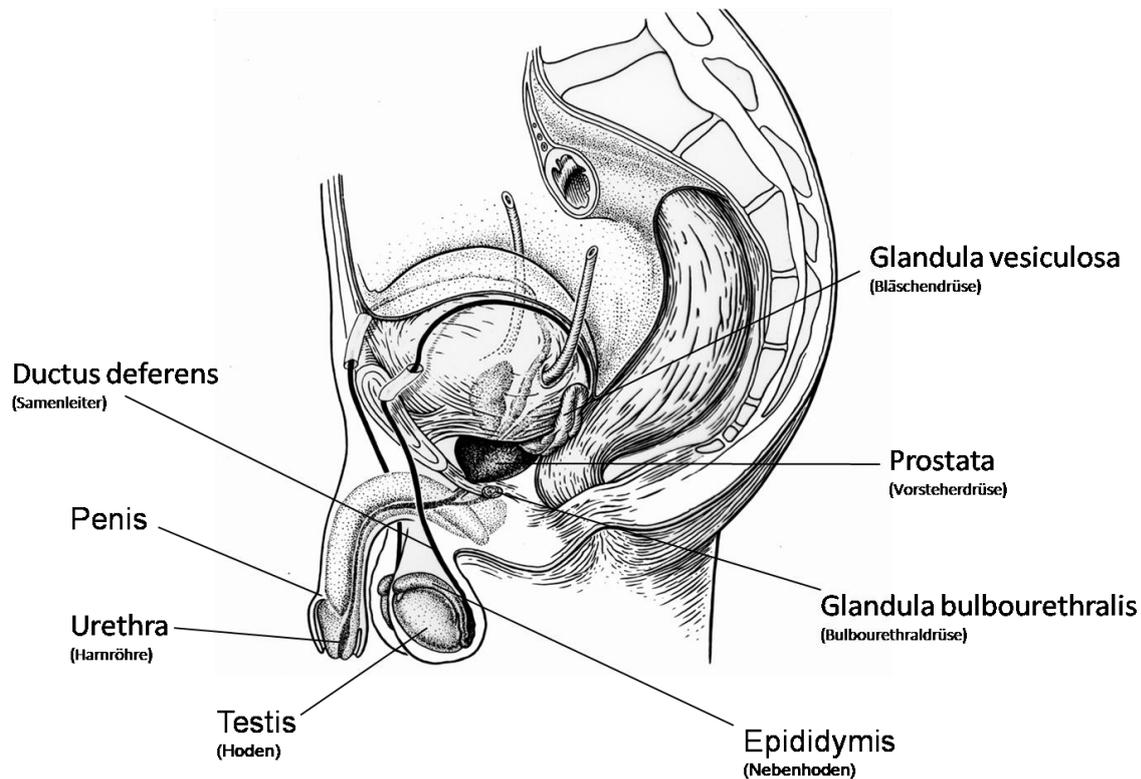


Abbildung 1: Eine schematische Darstellung der männlichen Reproduktionsorgane im Sagittalschnitt

Testis, Epididymis, Ductus deferens, Glandula vesiculosa, Glandula bulbourethralis (alle paarig angelegt), Prostata, Urethra und Penis bilden die essentiellen Organe für die Reproduktion des Mannes. Modifiziert nach (Holstein 2008).

1.1.1 Der anatomische und physiologische Aufbau des Hodens

Der Hoden ist ein Teil des männlichen Reproduktionstrakts, in dem u.a. die Bildung und Reifung der Spermien stattfinden. Bereits vor der Befruchtung steht das zukünftige Geschlecht des Fetus fest, da das eindringende Spermium entweder mit einem X- oder einem Y-Chromosom ausgestattet ist. Im Falle eines vorhandenen Y-Chromosoms kommt es durch das SRY-Gen (sex-determining region of the Y chromosome) zur Kodierung des Transkriptionsfaktors TDF (testis-determining factor), welcher die Differenzierung der Hodenstränge ermöglicht. Die zwischen den Tubuli seminiferi befindlichen Leydig-Zellen produzieren Testosteron, wodurch sich die Urnierengänge (Wolff-Gänge) zu den Nebenhodengängen, den Ductus deferens und den Ductus

ejaculatorius entwickeln und sich zusätzlich die äußeren Genitalien bilden. Auch die Sertoli-Zellen leisten ihren Beitrag zur Ausbildung des männlichen Geschlechtes, in dem sie das Anti-Müller-Hormon (AMH) produzieren und dadurch die Entwicklung der Müller-Gänge (späterer Uterus und Tuba uterina) inhibieren (Moore et al. 2013).

Der paarig angelegte Hoden liegt im Skrotum, welcher sich pränatal nach dem Descensus testis außerhalb der Bauchhöhle befindet, um eine stets 2°C niedrigere Temperatur gewährleisten zu können, die für die Spermienreifung essentiell ist. Der Hoden des Menschen ist eiförmig, hat einen Längsdurchmesser von 40-45mm und einen Querdurchmesser von 30mm (Holstein 2008). Er wird von der straffen Tunica albuginea umgeben, welche in der äußeren Zone hauptsächlich aus faserigem Bindegewebe, Myofibroblasten, Fibroblasten und zu geringen Anteilen glatten Muskelzellen und in der inneren Zone überwiegend aus glatten Muskelzellen sowie Blutgefäßen besteht (Middendorff et al. 2002). Zu ihren Aufgaben zählen die Aufrechterhaltung des Innendrucks im Hoden, die Kontrolle des Blutflusses innerhalb des Hodens und die Förderung des Transportes der noch unbeweglichen Spermatozoen (Setchell et al. 1994). Bindegewebige Septen (Septula testis) durchziehen samt Nerven, Arterien, Venen und Lymphgefäßen das Hodengewebe und teilen es so in ca. 370 Hodenläppchen (Lobuli testis) ein und enden im Rete testis. Innerhalb der Lobuli testis, liegen jeweils 2-4 Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti), welche zum Teil die funktionellen Untereinheiten des Hodens bilden. Die Tubuli haben einen Durchmesser von 180-280µm. In diesen befindet sich das Keimepithel, bestehend aus den Keimzellen, die durch ihre Zellteilung für eine stetige Bildung neuer Spermien sorgen, und den Sertoli-Zellen, die neben der Stützfunktion für die Keimzellen eine Vielzahl an Aufgaben übernehmen. So bilden sie über Verschlusskontakte (Tight junctions; Zonula occludentes) einen Zellverband, der das Keimepithel in eine basale und eine lumenale Abteilung unterteilt (Dym und Fawcett 1970). Im basalen Kompartiment befinden sich die Spermatogonien und Spermatozyten I im Präleptotänstadium, im luminalen Kompartiment die weiter differenzierten Spermatozyten I und II sowie die Spermatozoen. Diese für die Produktion funktionsfähiger Spermien essentielle räumliche Trennung wird als Blut-Hoden-Schranke bezeichnet (Holstein 2008). Da es während der Meiose zum Austausch von DNA-Segmenten (Crossing over) kommt und die neu gebildeten (neu arrangierten) Chromosomen sich genetisch von den Ursprungs-Chromosomen unterscheiden, ist eine undurchlässige Blut-Hoden-Schranke von enormer Wichtigkeit (Cheng und Mruk 2012). Sollte diese undicht sein, kommt es zur Einwanderung von Immunzellen und es

werden Antikörper gegen Keimzellantigene gebildet, die eine Autoimmunreaktion zur Folge haben (Meinhardt und Hedger 2011; Meng et al. 2011).

Eine weitere Aufgabe der Sertoli-Zellen ist die Versorgung der Keimzellen mit Nährstoffen, die eine Differenzierung und Transformation der Keimzellen zu funktionsfähigen Spermien erst ermöglicht (Sharpe et al. 2003). Die in Anzahl und Größe hervorragenden Zellen des Interstitiums sind die Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen. Neben diesen kommen im interstitiellen Raum Immunzellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten (Pöllänen und Niemi 1987) sowie Mastzellen vor (Hedger 1997; Albrecht et al. 2005), deren Anzahl und Aktivität bei männlicher Infertilität steigen (Meineke et al. 2000; Frungieri et al. 2002).

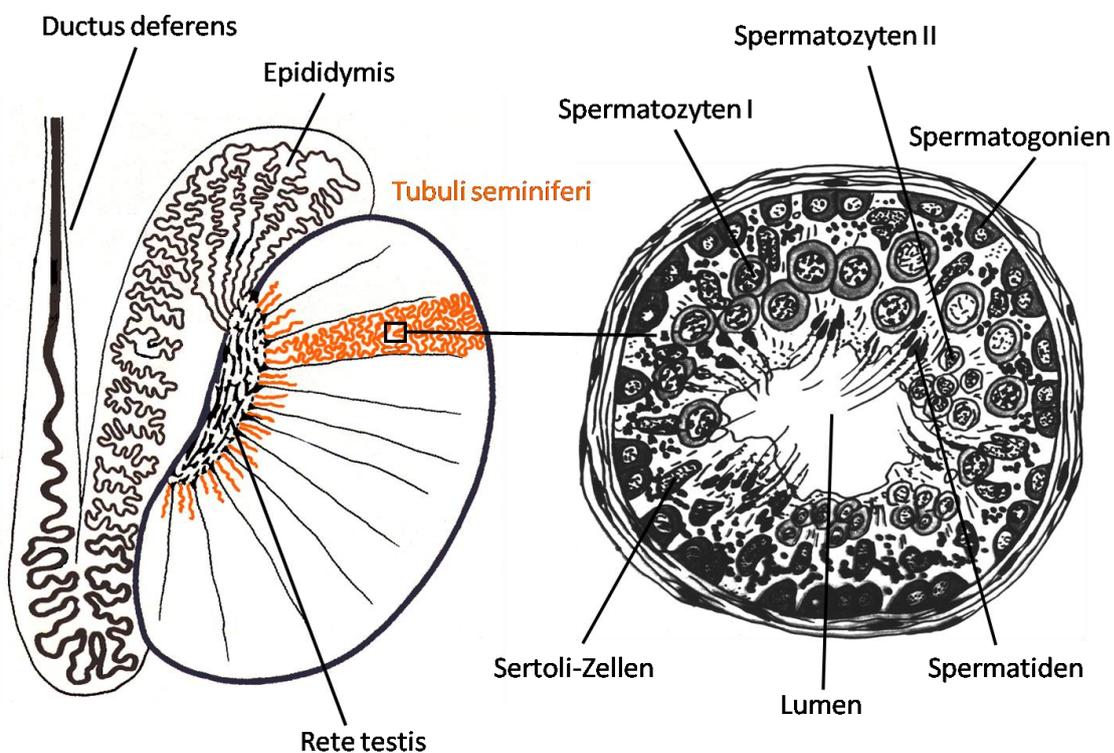


Abbildung 2: Übersichtsbild des Testis mit Epididymis und Ductus deferens sowie ein vergrößerter Querschnitt eines menschlichen Tubulus seminiferus mit Keimepithel. Modifiziert nach (Holstein 2008).

Die Tubuli seminiferi stellen die wesentlichen funktionellen Anteile des Hodens dar. In ihnen findet die Entwicklung zu den Spermatiden statt, die nach Abgabe in das Lumen Spermatozoen genannt werden. Diese gelangen vom Tubulussystem über das Rete testis in den Nebenhoden. Dort reifen sie weiter und werden am distalen Pol, der

Cauda epididymidis gespeichert. Bei einer Ejakulation werden die Spermien explosionsartig über den Ductus deferens und die Urethra nach außen befördert.

1.1.2 Peritubuläre Muskelzellen

Das Keimepithel wird, getrennt durch eine Basalmembran, von der Lamina propria umgeben. Beim Menschen besteht diese aus 5-7 Lagen von Myofibroblasten, eine Zellart, die sowohl muskuläre Proteine wie smooth muscle actin (SMA), Pan-actin, Desmin, GB 42 und smooth muscle myosin als auch für Bindegewebszellen charakteristische Proteine wie Vimentin exprimieren (Holstein und Davidoff 1996; Albrecht 2009). Dabei ist eine Ko-Lokalisation von Desmin und Vimentin in den inneren 3-4 Schichten zu sehen, in den äußeren befinden sich hauptsächlich Vimentin-positive Zellen der Lamina propria. Zwischen den einzelnen Zellschichten befinden sich mikroskopisch gut sichtbare Kollagenfasern. Bei eingeschränkter Spermatogenese kommt es sehr häufig zu einer Verdickung der Lamina propria (Fibrosierung) primär durch Zunahme der Extrazellulärmatrix (Davidoff et al. 1990; Volkmann et al. 2011).

Im Gegensatz zur vielschichtigen Lamina propria der humanen Tubuli seminiferi, besitzen Mäuse lediglich eine einzige Schicht von häufig als Myoid-Zellen bezeichneten Zellen, die glattmuskuläre Charakteristika besitzen (Christl 1990; Maekawa et al. 1996)

Neben den oben genannten Proteinen wird von den peritubulären Muskelzellen Calponin, ein für die Kontraktion glatter Muskelzellen elementares Protein, exprimiert. Bezogen auf das Muskelgewebe kommt Calponin ausschließlich in glatten Muskelzellen, nicht aber in Skelletmuskelfasern oder Herzmuskelzellen vor (Duband et al. 1993). Es wird bereits während der embryonalen Entwicklung gebildet, jedoch später als z.B. Desmin, Tropomyosin und α -smooth muscle actin, so dass die Expression von Calponin auch als Reifungszeichen für glatte Muskulatur gilt, was zur experimentellen Nutzung von Calponin als Differenzierungsmarker geführt hat (Duband et al. 1993; El-Mezgueldi 1996; Rozenblum und Gimona 2008).

Ein Schlüsselprotein in der Relaxation von glatten Muskelzellen ist die zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP)-abhängige Proteinkinase I (PKG I). Die Fähigkeit zur Relaxation ist durch die zwei Isoformen I α und I β zu gleichen Anteilen, jedoch durch

unterschiedliche Mechanismen gegeben (Wernet et al. 1989; Wolfe et al. 1989). Wie auch für Calponin konnte ein Verlust der Expression von PKG I in Patienten mit gestörter Spermatogenese beobachtet werden (Welter et al. 2013). Weiter hat eine Inaktivierung von PKG I in einem Mausmodell zu schwerwiegenden vaskulären und intestinalen Dysfunktionen (Pfeifer et al. 1998) sowie nach 6 Wochen zum Tod der meisten Mäuse geführt (Weber et al. 2007). Dies zeigt die essentielle Rolle von PKG I sowohl im Reproduktionstrakt als auch in anderen Organen.

Die aus Kollagen I, IV, XVIII, Fibronectin, Laminin und Osteonectin [auch genannt: secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC)] bestehende Extrazellulärmatrix wird ebenfalls von den peritubulären Muskelzellen synthetisiert (Albrecht 2009). Zusätzlich werden zum einen Chemokine wie das monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) exprimiert, welches eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung der Monozyten bzw. Makrophagen hat und zum anderen pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 produziert (Schell et al. 2008; Deshmane et al. 2009), die zur Aktivierung der B- und T-Lymphozyten beitragen und eine Differenzierung der rekrutierten Makrophagen initiieren (Kamimura et al. 2003). Einen inhibitorischen Effekt auf das IL-6 und damit eine antiinflammatorische Wirkung hat TGF- β (O'Bryan et al. 2005), welches ebenfalls von peritubulären Muskelzellen exprimiert wird (Skinner und Moses 1989; Holstein und Davidoff 1996). Darüber hinaus ist TGF- β für die Umwandlung von Fibroblasten zu aktiven Myofibroblasten verantwortlich (Powell et al. 1999; Tomasek et al. 2002; Volkmann et al. 2011).

Die Myofibroblasten der Lamina propria ermöglichen durch ihre kontraktile Eigenschaften den Transport der Spermien vom Keimepithel zum Rete testis (Holstein 2008). Die Funktion der Myofibroblasten wird u.a. von den im interstitiellen Raum befindlichen Leydig-Zellen durch die Sekretion von Testosteron beeinflusst. Eine solche Interaktion wird durch die Expression der Androgen-Rezeptoren (AR) in den Myofibroblasten ermöglicht. Kommt es zu einem Verlust der Rezeptoren resultiert eine komplett eingeschränkte Spermienproduktion und damit eine reduzierte Anzahl an Keimzellen (Welsh et al. 2009; Zhou et al. 2019).

Einen ebenfalls kontraktionssteigernden Effekt auf die peritubulären Muskelzellen, gezeigt hauptsächlich am Rattenhoden, haben Endothelin-1 und Angiotensin II (Santemma et al. 1996; Rossi et al. 2002). Als Gegenspieler agieren NO und CO, die eine relaxierende Wirkung auf die Myofibroblasten und somit auch einen Einfluss auf die Peristaltik der Tubuli seminiferi und den Spermientransport haben (Setchell et al. 1994; Middendorff et al. 1997; Middendorff et al. 2000). Die NO- und CO-induzierte

Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase führt zu einer erhöhten cGMP-Produktion und somit zu einer erhöhten Proteinkinase G-Aktivität, wodurch vermehrt Calcium-Ionen im sarkoplasmatischen Retikulum verbleiben. Die so entstandenen Relaxationen können durch cGMP-abbauende Phosphodiesterasen gestoppt werden. Des Weiteren nehmen die peritubulären Muskelzellen eine Funktion als Mediatorzellen ein, indem sie durch das Testosteron der Leydig-Zellen aktiviert werden, daraufhin den parakrin wirkenden Faktor P-Mod-S produzieren, welcher die Sertoli-Zellen stimuliert, welche ihrerseits vermehrt das androgenbindende Protein (ABP) sezernieren um mehr Testosteron zu den Keimzellen zu transportieren und damit die Spermatogenese zu fördern (Skinner et al. 1988; Gnessi et al. 1997; Zhou et al. 2019).

1.1.3 Spermatogenese und ihre hormonelle Steuerung

Die Spermatogenese beschreibt den Prozess, bei dem aus undifferenzierten Spermatogonien befruchtungsfähige Spermien entstehen (Holstein 2008; Zhou et al. 2019). Pränatal wandern Urkeimzellen in den Hoden ein, wodurch sie ab diesem Zeitpunkt Spermatogonien genannt werden und verbleiben dort bis zur Pubertät in einem inaktiven Stadium. Durch die erstmalige Ausschüttung des hypothalamischen Hormons GnRH (Gonadotropin-Releasing-Hormon) beginnt die Pubertät und es kommt zur Sekretion von LH und FSH aus der Hypophyse (Brämwig und Dübbers 2009). Ersteres stimuliert die Leydig-Zellen und somit die Testosteron-Produktion, wodurch es zur Entwicklung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale kommt. Letzteres stimuliert die Sertoli-Zellen, wodurch die Spermienbildung und die Abgabe reifer Spermatozoen gefördert werden. Durch das von den Sertoli-Zellen gebildete Inhibin wird die FSH-Ausschüttung durch einen negativen Feedbackmechanismus gehemmt (Cheng und Mruk 2010).

Am Beginn der Spermatogenese stehen die spermatogonalen Stammzellen, welche sich an der Basalmembran befinden und sich in Typ A- und Typ B-Spermatogonien aufteilen. Die Spermatogonien Typ A verbleiben als Vorrat, wohingegen die Spermatogonien vom Typ B, die wie ihre Nachfolgerzellen Klone bilden und nach Weiterentwicklung zu Spermatozyten I im Präleptotänstadium durch die Blut-Hoden-Schranke in das lumenale Kompartiment gelangen. Diese Spermatozyten I ($2n2c$) gehen in die erste meiotische Teilung über und es entstehen Spermatozyten II ($2n1c$).

Nach der zweiten meiotischen Teilung der Spermatozyten II entstehen die Spermatiden (1n1c), die noch eine Differenzierung durchlaufen müssen. Dieser als Spermiogenese bezeichnete Reifungsprozess sorgt für eine Kernkondensation, so dass sich das Volumen auf 10% der ursprünglichen Größe verringert. Weiter bildet sich das Akrosom, welches ein Eindringen in die Zona pellucida der Eizelle durch den Einsatz von Acrosin, einem proteolytisch wirksamen Enzym, ermöglicht. Zudem ist für die Eigenbeweglichkeit der Spermien die Entwicklung der Geißeln essentiell. Nun können sie als befruchtungsfähige Spermatozoen in das Lumen der Tubuli seminiferi abgegeben (Spermiatio) und zum Nebenhoden transportiert werden, wo es zur Speicherung dieser kommt. Funktionsunfähige Spermatozyten und Spermatiden werden von Sertoli-Zellen phagozytiert (Holstein 2008; Zhou et al. 2019).

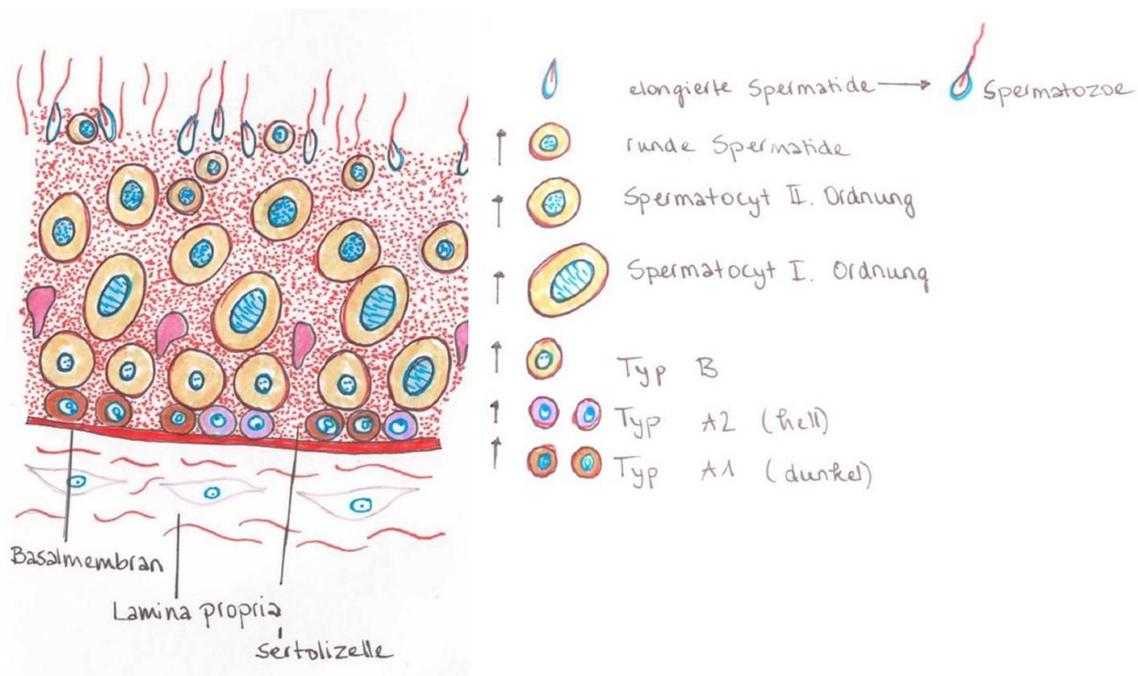


Abbildung 3: Schematischer Ausschnitt eines Tubulus seminiferus und Entwicklungsstadien der Keimzellen. Modifiziert nach (Lüllmann-Rauch 2009).

1.1.4 Infertilität bei Männern

Es wird von Infertilität gesprochen, wenn ein Paar über den Zeitraum eines Jahres regelmäßigen, ungeschützten Geschlechtsverkehr praktiziert und es dabei zu keiner Schwangerschaft kommt (Nieschlag 2009). Hier kann weiter in eine primäre und eine

sekundäre Form eingeteilt werden, bei der es entweder noch nie zu einer Schwangerschaft kam (primär) oder es bereits Schwangerschaften gegeben hat (sekundär), jedoch nun keine mehr induziert werden kann. Bei einem kinderlosen Paar kann die Infertilität beim Mann (20%), bei der Frau (39%) oder bei beiden (26%) begründet sein, in einigen Fällen ist die Störung jedoch nicht erkennbar (15%). Ca. 7% der Männer in Deutschland sind mit dem Problem der Zeugungsunfähigkeit konfrontiert (Nieschlag 2009). Es gibt keine eindeutigen Hinweise, dass sich die Rate an infertilen Männern in den letzten Jahren erhöht hat. Die Arbeitsgruppe um Elisabeth Carlsen kam in einer Metaanalyse von 61 Studien zu dem Ergebnis, dass sich die durchschnittliche Spermiedichte und das Samenvolumen innerhalb der letzten 50 Jahre verringert haben (Carlsen et al. 1992). Es gab jedoch deutliche Kritik, da in den Studien keine standardisierten Untersuchungstechniken eingesetzt wurden und damit die Studien nicht miteinander verglichen werden konnten (Nieschlag 2013). In einer weiteren Metaanalyse wurden 35 Studien zu diesem Thema bearbeitet, von denen 21 keine veränderten oder sogar verbesserte Spermienqualitäten festgestellt haben, 6 Studien keine eindeutigen Ergebnissen und 8 Studien eine Verschlechterung der Spermienqualität zeigten (Fisch und Braun 2013).

Um einen männlichen Patienten bezüglich seiner Infertilität zu therapieren ist die Untersuchung des Ejakulates von essentieller Bedeutung. Begutachtet wird dabei das makroskopische Aussehen samt Farbe, Menge und Viskosität. Durch Blutbeimengungen kann das Ejakulat rot-bräunlich erscheinen, eine gelbliche Färbung kann auf eine Infektion deuten. Des Weiteren wird der pH-Wert ermittelt, der bei Werten über 8 für eine Infektion spricht und bei Werten unter 7 mit Azoospermie und Verschlüssen von Nebenhoden oder weiteren gangartigen Strukturen des männlichen Reproduktionstraktes in Verbindung stehen kann. Durch mikroskopische Untersuchungen kann die Spermienmotilität überprüft werden, wobei die progressive Motilität, die nichtprogressive Motilität und die Immotilität unterschieden werden. Erstere beinhaltet alle raumgewinnenden Bewegungen, zweitere Bewegungen auf der Stelle oder in kleinem Kreis und letztere keine Bewegungen der Spermien. Darüber hinaus wird die Gesamtspermienzahl pro Ejakulat bestimmt, die aus der Multiplikation der Spermienkonzentration und des Ejakulatvolumens ermittelt wird. Diese Standard ejakulatanalyse wird durch die morphologische Beurteilung der Spermien komplettiert. Krankheiten verschiedenster Ätiologie können sich auf diese Ejakulatparameter auswirken und so zu einem mit männlicher Infertilität in Verbindung stehenden Oligoasthenoteratozoospermie-Syndrom (OAT-Syndrom) führen (Cooper 2009). Dabei sind die Gesamtspermienzahlen bzw. Spermienkonzentrationen (≤ 39

Mio. Spermatozoen pro Ejakulat bzw. ≤ 15 Mio. Spermatozoen/ml), der prozentuale Anteil progressiv motiler ($\leq 32\%$) und morphologisch normal aussehender Spermien ($\leq 4\%$) erniedrigt (World Health Organization 2010).

Es gibt eine Vielzahl an Ursachen männlicher Infertilität, hierzu gehören Infektionen, wie eine akute oder chronische Orchitis und Epididymitis (Schuppe et al. 2008), direkte Traumen und Hodentorsionen sowie testikuläre Tumore, von denen die malignen Keimzelltumore mit 95% den Hauptteil ausmachen. Sie sind auch die häufigsten malignen Erkrankungen des Mannes zwischen 25-40 Jahren (Nieschlag et al. 2009). Ein Zeitraum, in dem ein Großteil der Männer versucht Nachkommen zu zeugen. Maligne Keimzelltumore gehen oft mit verminderter Spermatogenese einher (Hansen et al. 1989; Petersen et al. 1999). Des Weiteren spielen die Therapien von Malignomen, also Chemotherapien und Bestrahlungen eine große Rolle. Medikamente wie Vinblastin und Procarbazin, die beim Hodgkin-Lymphom, Cisplatin beim Bronchialkarzinom (SCLC und NSCLC) und Osteosarkom sowie Cyclophosphamid beim Hodgkin-Lymphom, Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) und der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) haben einen gonadotoxischen Effekt (Howell und Shalet 2005). Ebenso in der Rheumatologie eingesetzte Medikamente wie Sulfasalazin und in selteneren Fällen auch Methotrexat, führen zu Oligo- und Azoospermie. Zusätzlich kommt es vermehrt bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) zu verminderter Libido und erektiler Dysfunktion (Østensen 2004). Für einen großen Anteil an infertilen Männern sorgen Lageanomalien wie u.a. der Maldescensus testis, der obendrein mit malignen Keimzelltumoren vergesellschaftet sein kann (Toppari und Kaleva 1999; Lee 2005). Hereditäre Erkrankungen wie das Klinefelter-Syndrom (47, XXY) führen zu einem Hypogonadismus. Mutationen des CFTR-Gens, die im Vollbild zur zystischen Fibrose oder als Minimalform zur isolierten kongenitalen beidseitigen Aplasie des Vas deferens (CBAVD) führen, stehen in Verbindung mit einer Obstruktion der ableitenden Samenwege (Behre et al. 2009).

Grundsätzlich sind Männer im höheren Alter fähig Nachkommen zu produzieren. Erschwerende Bedingungen kommen aber hinzu. Dazu gehören verzögerte Erregungs- und Plateauphasen, abgeschwächte Samenexpulsionen, längere Refraktärzeiten und vermehrt erektile Dysfunktionen (Rolf et al. 2009). Weiter haben Komorbiditäten mit kardiovaskulären, rheumatologischen und muskuloskelettalen Erkrankungen des Mannes aber auch der Partnerin einen großen Einfluss auf das Sexualverhalten (Sartorius und Handelsman 2009). Unzählige Umwelttoxene tragen auch zur Infertilität bei, wobei hier nur gängige Noxen wie das Zigarettenrauchen, der exzessive Alkoholenuss und der Missbrauch von Drogen erwähnt werden. Der

Konsum von Zigaretten führt zu einer verminderten Spermienzahl und Spermienbeweglichkeit (Richthoff et al. 2008). Zusätzlich führt Rauchen in der Schwangerschaft bei männlichen Nachkommen zu einer erhöhten Rate an Kryptorchismus (Jensen et al. 2007) sowie zu einer verminderten Testisgröße, Spermienkonzentration und -zahl (Jensen et al. 2004). Letzten Endes existiert noch ein hoher Anteil an Infertilität unklarer Genese (idiopathische Infertilität). In der Andrologie wird von idiopathischer Infertilität gesprochen, wenn ein pathologischer Befund in der Histologie gesichert wurde, jedoch keine eindeutige Ursache für die Zeugungsunfähigkeit gefunden werden kann. Im Gegensatz dazu wird in der Gynäkologie von idiopathischer Infertilität gesprochen, wenn nach der Diagnostik kein pathologischer Befund festgestellt wird, der eine Unfruchtbarkeit erklären könnte.

Die Arbeitsgruppe um Welter et al. haben 2013 Untersuchungen durchgeführt, bei denen Hodengewebe von Patienten mit eingeschränkter Spermatogenese und gesunde Patienten miteinander verglichen wurden. Dabei wurde durch den Gebrauch gängiger Muskelmarker analysiert, ob Unterschiede in den Tubuli seminiferi, also dem Ort der Spermatogenese, vorhanden sind. Es konnte ein partieller Verlust der kontraktiven Marker wie MYH11, Calponin und PKG I in der Gruppe mit eingeschränkter Spermatogenese festgestellt werden, was einen Einfluss der peritubulären Muskulatur auf die Spermatogenese vermuten lässt.

1.1.5 Therapie der Infertilität

Die Therapie der Infertilität richtet sich nach der jeweiligen Ursache. So ist es sinnvoll bakterielle Infektionen der Hoden und Nebenhoden antibiotisch zu therapieren, bei chronischen Allgemeinerkrankungen wie Diabetes mellitus oder kardiovaskulären Erkrankungen diese grundlegend, also z.B. mit sportlicher Betätigung, ausgewogener Ernährung sowie antidiabetischer Medikation bzw. Thrombozytenaggregationshemmung, zu behandeln, oder bei erektilen Dysfunktionen eine Kombination aus psychosexuellen Beratungen und PDE-5-Hemmern zu versuchen. Des Weiteren sollten schädigende Noxen wie Drogen, Toxine oder gonadotoxische Medikamente vermieden werden. Es konnten für eine Vielzahl an Erkrankungen kausale Therapien entwickelt werden. Die größte Gruppe der Männer, die eine Fertilitätssprechstunde aufsuchen haben eine idiopathische Infertilität

(Nieschlag und Kamischke 2009). Aus diesem Grund ist eine kausale Therapie nicht möglich und so wurden Jahrzehnte lang, oft ohne wirkliche Evidenz, empirische Therapien durchgeführt. Patienten mit hypogonadotropem Hypogonadismus konnten erfolgreich mit hCG (humanes Choriongonadotropin) therapiert werden, so dass es jahrelang bei normogonadotropen idiopathisch infertilen Männern erprobt wurde. Es konnte in dieser Gruppe jedoch kein Unterschied zur Kontrollgruppe gefunden werden (Knuth et al. 1987). Ähnliche, unbefriedigende Ergebnisse wurden bei der Verwendung von pulsatilen GnRH-Gaben (Bals-Pratsch et al. 1989), dem Einsatz von Androgenen wie z.B. Mesterolone (World Health Organization 1989) und einer Vielzahl von weiteren Wirkstoffen, unter anderem Kallikrein (Keck et al. 1994), gesehen, obwohl vielversprechende *in vitro* Untersuchungen durchgeführt wurden, die eine Erhöhung der Spermienmotilität zeigten (Sato 1980). Zwar führte der Versuch, idiopathisch infertile Männer mit hochgereinigtem und rekombinantem FSH zu therapieren zu einem minimalen, jedoch nur teils signifikanten Erfolg (Attia et al. 2007; Attia et al. 2013). So kamen die Autoren im aktuellen Cochrane Review von 2013 aufgrund von vielen nicht-systematisch durchgeführten Studien zu keinem positiven Ergebnis für eine Therapie mit FSH. Es zeigt sich, dass alle hier erwähnten und aufgrund der besseren Übersichtlichkeit nicht erwähnten Therapien, keinen signifikanten Erfolg in der Behandlung der idiopathischen Infertilität des Mannes haben. Deutlich höhere Erfolgsraten, vor allem bei männlicher und weiblicher idiopathischer Infertilität, bieten die assistierten Fertilisationsverfahren (Quaas und Dokras 2008). Jahr für Jahr nehmen die In-vitro-Fertilisationen (IVF) zu. Wurden 1997 in Deutschland 6.577 Kinder aus einer assistierten Fertilisation geboren, so stieg die Zahl 2019 auf 21.588 an (Deutsches IVF-Register 2020, <https://www.deutsches-ivf-register.de/perch/resources/dirjb2020de.pdf>). Kontinuierlich steigt der prozentuale Anteil der erfolgreichen Befruchtungen, mit niedrigeren Komplikationsraten und Aborten. Die stetig fortschreitende Technik und Verfügbarkeit führt jedoch auch zu einer späteren Inanspruchnahme der Verfahren. 1997 betrug das durchschnittliche Alter einer hilfeschuchenden Frau 32,6 Jahre, das eines Mannes 35,2. Die aktuellen Daten von 2020 zeigen ein durchschnittliches Alter der Frauen von 35,6 Jahren und der Männer von 38,5 Jahren. Des Weiteren korrelieren das Alter der Frau negativ mit einer erfolgreichen Infertilitätsbehandlung und damit auch der Baby-take-home-Rate (Deutsches IVF-Register 2020, <https://www.deutsches-ivf-register.de/perch/resources/dir-jahrbuch-2020-sonderausgabe-fuer-paare.pdf>).

1.1.6 Behandlung der männlichen Infertilität durch assistierte Fertilisationsverfahren

So lange motile Spermien im Ejakulat zu finden sind, ist eine intrauterine Insemination (IUI) und eine IVF möglich. Diese beiden Verfahren setzen eine gewisse Restfunktionalität der Spermien voraus. Bei einer obstruktiven Azoospermie, wie sie postentzündlich oder durch eine CBAVD entstehen kann, sind keine Spermien für eine Befruchtung verfügbar. Kann die Durchgängigkeit im Rahmen einer Refertilisierungsoperation nicht wiederhergestellt werden, ist eine mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration (MESA) oder testikuläre Spermienextraktion (TESE) indiziert. Hierbei werden Spermien aus den Nebenhoden oder Hoden entnommen und stehen somit für eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) bereit. Da bei den obstruktiven Störungen die Spermatogenese intakt ist, stellt die Therapie mittels TESE/MESA und ICSI ein geringeres Problem dar als bei den nicht-obstruktiven Störungen. Auch bei einer nicht-obstruktiven Azoospermie, die einer geschädigten Spermatogenese zur Grunde liegt, können Extraktionen von Spermien und eine anschließende künstliche Befruchtung erfolgreich durchgeführt werden (Silber et al. 1996; Zitzmann et al. 2006) wie sie bei einem vorherrschenden Sertoli-Cell-Only-Syndrom (SCO) oder auch bei Klinefelter-Patienten angewendet wurden (Lanfranco et al. 2004; Schiff et al. 2005).

1.2 Glykosylierung

Die Glykosylierung ist ein komplexer, in allen pro- und eukaryontischen Zellen vorkommender biochemischer Prozess, bei dem Proteine oder Lipide mit Zuckerresten modifiziert werden. Bei Proteinen kann diese posttranslationale Modifikation z.B. zu veränderten Proteinstrukturen führen, die essentiell für deren Funktion ist. An der Oberfläche einer jeden Zelle bilden die glykosylierten Proteine aber auch Glykolipide die Glykokalyx. Sie ist maßgeblich in zahlreichen zellulären Prozessen involviert, wie die Modulation von Interaktion- und Kommunikationsmechanismen. Ein prominentes Beispiel ist das Rollen von Leukozyten. Die Interaktion zwischen den Leukozyten und

den Endothelzellen wird dabei über Zuckerstrukturen auf Leukozyten vermittelt, die von Selektinen der Endothelzellen binden. Weitere, sehr bedeutende Beispiele für Glykosylierungen finden sich beim AB0-System, den Gerinnungsfaktoren und dem Komplementsystem. Die prominentesten eukaryontischen Formen der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen mit Zuckerresten sind die O- und die N-Glykane. Die O-Glykosylierung findet hauptsächlich im Golgi-Apparat statt, während die N-Glykosylierung während eines komplexen Prozesses im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat durchgeführt wird. Bei ersterer werden Glykosylreste an Hydroxylgruppen von Seryl- oder Threonylresten angehängen und bei letzterer werden Glykosylreste an Aminogruppen von Asparaginyresten angehängen. Dabei können unter anderem Zuckerstrukturen entstehen, die aus Monosacchariden wie Glucose, Fucose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalaktosamin, Mannose und Sialinsäuren bestehen. Dies wird durch Glykosyltransferasen bewerkstelligt (Varki 2017).

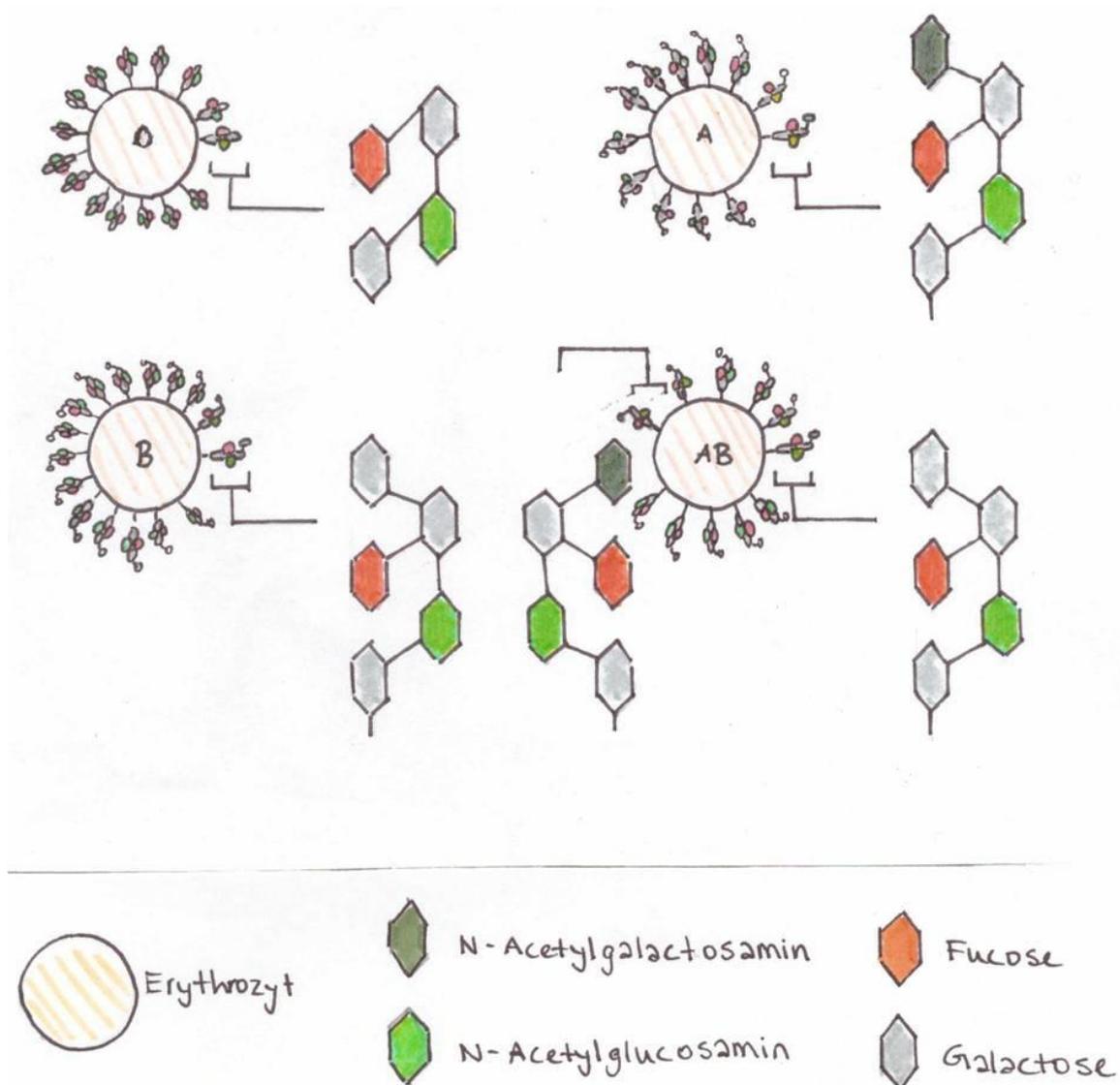


Abbildung 4: Beispiel für Glykosylierung anhand des ABO-Systems

Die Grundstruktur des Blutgruppensystems ist die Blutgruppe 0. Diese enthält ein Grundgerüst aus Fucose, Galactose und N-Acetylglucosamin, welches als H-Antigen bekannt ist. Das Anheften von N-Acetylgalactosamin führt zur Entstehung der Blutgruppe A, ein Anheften von Galactose zu B. Die Blutgruppe AB hat folglich sowohl die eine als auch die andere Zuckerkette. Die Verknüpfung der Zucker erfolgt durch Glykosyltransferasen. Abbildung erstellt unter Vorlage von (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ABO_blood_group_diagram.svg.)

1.2.1 Polysialinsäuren

Sialinsäuren gehören zu der Gruppe der sauren Monosaccharide und kommen hauptsächlich als Monosialylreste an Glykoproteinen und Glykolipiden vor. Die drei häufigsten Formen der Sialinsäuren sind die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), die N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) und die Deaminoneuraminsäure (KDN) (Galuska et al. 2017). Über glykosidische Verbindungen können terminale Sialinsäurereste mit weiteren Sialinsäuren modifiziert werden. So können lineare Oligosialinsäuren (drei bis sieben) oder Polysialinsäuren (mindestens acht) gebildet werden. Letztere werden durch die beiden Polysialyltransferasen *st8sia2* und *st8sia4* ermöglicht. Die dadurch resultierende α -2,8-Struktur der Polysialinsäure bringt eine immer höhere Anzahl an Carboxylgruppen mit sich, was konsequent zu einer stärkeren negativen Ladung des Moleküls führt. Zu dem am häufigsten untersuchten polysialylierten Protein gehört das *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) (Galuska et al., 2017).

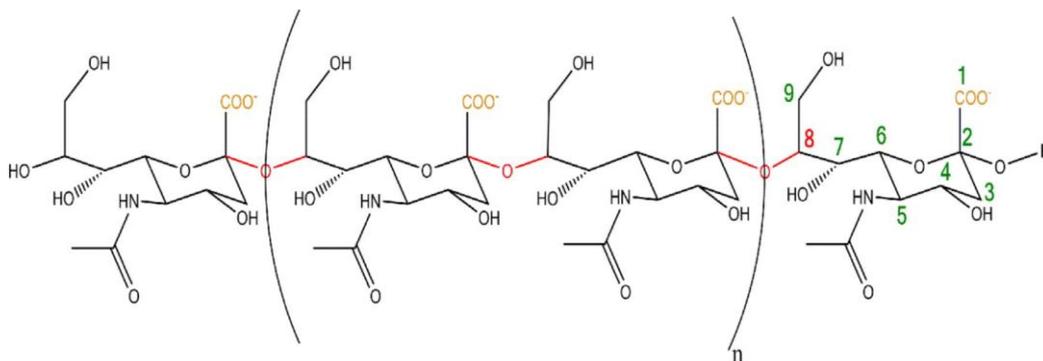


Abbildung 5: Die chemische Struktur von α 2,8-PolySia

In Säugetieren besteht PolySia aus α 2,8-verbundenen N-Acetylneuraminsäuren, was bedeutet, dass die Hydroxylgruppen an C2 und C8 miteinander reagiert haben (in rot markiert). Neu5Ac ist eine α -Ketosäure mit einem Gerüst aus neun Kohlenstoffatomen (in grün markiert), die unter physiologischen Bedingungen Carboxylat-Anionen tragen (in orange markiert). Je nach Anzahl (n) der verknüpften Neu5Ac verlängert sich das Molekül (zwischen 8 und >200). R: N-Glykan oder O-Glykan. Abbildung aus (Galuska et al., 2017); CC BY.

Es konnte festgestellt werden, dass Polysialylierungen von NCAM zu einem vergrößerten Zell-Zell-Abstand von 10-15 nm führen (Yang et al. 1992). Dies kann zum einen durch die Abstoßung der negativen Ladungen und zum anderen durch das Aufheben der adhäsiven Eigenschaften von Cadherinen erklärt werden (Johnson et al. 2005). Eine weitere Eigenschaft von polysialyliertem NCAM, welche im Zusammenhang mit der abnehmenden Zelladhäsion steht, ist das Wachstum von Axonen. Zum einen wurde dies nach Läsionen im peripheren Nervensystem und zum anderen während der Verzweigungen von Motorneuronen zum Innervationsgebiet bestimmter Muskeln gefunden (Kleene und Schachner 2004; Rutishauser 2008). Ein weiterer Aspekt ist die Migration neuronaler Zellen aus Clustern von proliferierenden Zellen, welche im adulten Hippocampus gefunden wurden, wodurch ein wichtiger Beitrag zur neuronalen Entwicklung resultiert (Burgess et al. 2008). Es kann angenommen werden, dass PolySia einerseits durch eine anti-adhäsive Eigenschaft die (Vorläufer)-Zellen zur Migration anregt und andererseits die Differenzierung dieser Zellen hemmt, bis sie am Zielort angekommen sind. So konnte an Hühnern gezeigt werden, dass Axone von retinalen Ganglienzellen bei Vorhandensein von PolySia das Tectum regelrecht innervierten. Bei Abwesenheit von PolySia bildeten die Axone synapsenähnliche Verbindungen und es kam zu Abweichungen auf dem Weg zum Zielorgan (El Maarouf und Rutishauser 2003; Rutishauser 2008). Ferner wurden eine erhöhte Expression von st8sia2, st8sia4 und somit polysialyliertem NCAM auf Pankreaskarzinomzellen detektiert, wodurch die E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion verringert und gleichzeitig die Migration der Karzinomzellen erhöht wurde (Schreiber et al. 2008; Tezel et al. 2001). Doch nicht nur beim Pankreaskarzinom, sondern auch in zahlreichen anderen bösartigen Tumoren wie dem SCLC und NSCLC, dem Glioblastom, dem Neuroblastom und dem Nephroblastom wurden polysialyliertes NCAM und damit einer erhöhte Wahrscheinlichkeit der Metastasierung entdeckt (Komminoth et al. 1991; Tanaka et al. 2000; Suzuki et al. 2005; Glüer et al. 1998; Roth et al. 1988).

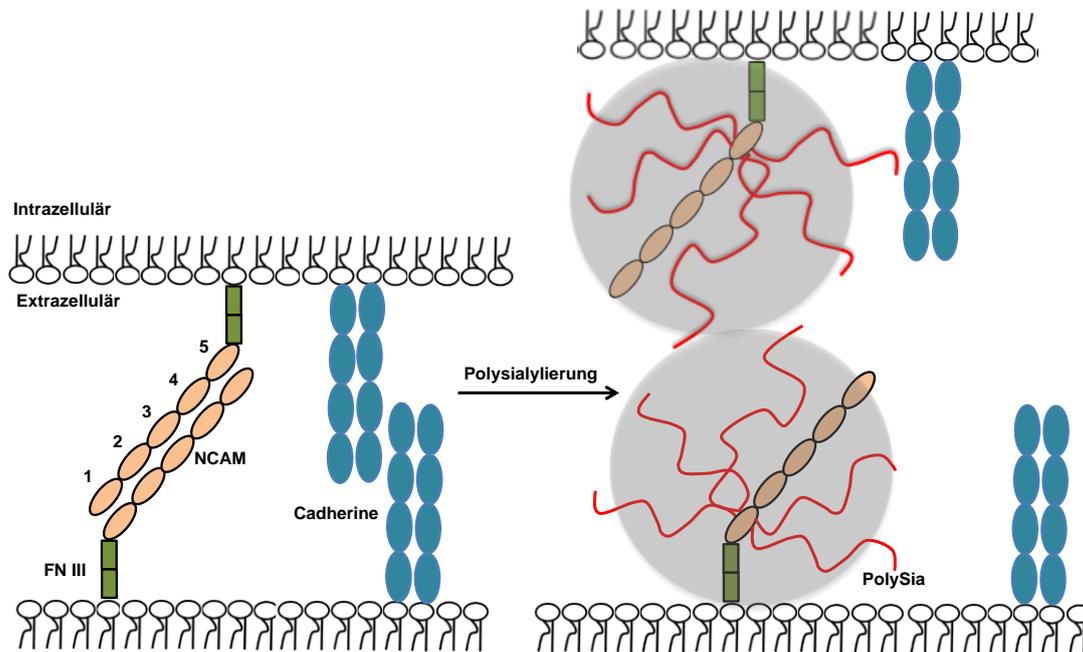


Abbildung 6: Die Wechselwirkungen von polysialyliertem NCAM

Zu sehen sind zwei gegenüberliegende Zellmembranen, die auf ihrer extrazellulären Seite NCAM tragen. Dies ist eine beispielhafte Interaktionsmöglichkeit von NCAM, zahlreiche weitere sind möglich. Die Polysialylierung führt zur Anheftung stark negativ geladener Ketten und somit zu elektrostatischen Abstoßungen, wodurch die NCAM-NCAM-Wechselwirkungen aufgehoben sind. Zusätzlich führt die räumliche Trennung der beiden Zellmembranen zu einer Beeinträchtigung der Adhäsionsfähigkeit von Cadherinen. Erstellt nach (Johnson et al. 2005).

Neben NCAM wurden weitere polysialylierte Proteine in Säugetieren gefunden, allen voran das *Synaptic Cell Adhesion Molecule* (SynCAM 1) auf multipotenten Polydendrozyten (Galuska et al. 2010). Es gehört wie NCAM zur Superfamilie der Immunglobuline und eine Polysialylierung inhibiert ebenfalls die homophile Verbindung der Adhäsionsmoleküle. Als erstes gelang der Nachweis von polysialyliertem SynCAM1 auf NG2-Zellen von perinatalen Gehirnen in Mäusen. Diese Zellen dienen als multipotente Vorläuferzellen für Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten und machen 5-10% der Gliazellen aus (Galuska et al. 2010; Trotter et al. 2010). Unabhängig von der Polysialylierung hat SynCAM1 einen Einfluss auf die Synapsenformierung indem es mit SynCAM2 durch homo- und heterophile Verbindungen am synaptischen Spalt zwei Nervenzellen in Kontakt bringt (Biederer et

al. 2002; Galuska et al. 2010; Mühlenhoff et al. 2013). Untersuchungen konnten zeigen, dass sowohl st8sia2 als auch st8sia4 SynCAM1 *in vitro* polysialylieren können, was jedoch nur durch st8sia2 möglich war (Galuska et al. 2010; Rollenhagen et al. 2012). Daneben können auch Mikroglia polysialyliertes SynCAM 1 bilden (Werneburg et al. 2015). Weitere polysialylierte Proteine in Säugern sind das in humaner und muriner Milch vorkommende CD 36 (Yabe et al. 2003), das Neuropilin-2 auf humanen dendritischen Zellen (Curreli et al. 2007) und ein spannungsabhängiger Natriumkanal in adulten Rattengehirnen (Zuber et al. 1992). Das letzte identifizierte polysialylierte Protein ist das E-Selectin ligand-1 in Mikroglia (Werneburg et al. 2016).

1.2.2 Synthese von PolySia – Polysialyltransferasen

Die beiden einzigen Enzyme, die in der Lage sind PolySia zu synthetisieren sind die Polysialyltransferasen st8sia2 und st8sia4 (Kean 1991; Harduin-Lepers et al. 2008). Erstere wird hauptsächlich während der Entwicklung, letztere überwiegend in adulten exprimiert (Kleene und Schachner 2004). Dennoch konnten *in vivo* synergistische Eigenschaften festgestellt werden, wobei sich Unterschiede in der synthetisierten Menge an PolySia und in der Kettenlänge zeigten. Die Gesamtmenge an PolySia ändert sich durch Abwesenheit von st8sia4 nicht, jedoch gibt es eine Reduktion von 39% beim Verlust der st8sia2-Aktivität (Galuska et al. 2006). Dadurch ändert sich auch der Gehalt an polysialylierten NCAM, welcher bei st8sia2-defizienten Mäusen 55% beträgt, wobei das Vorhandensein eines Alleles diese Menge auf 94% ansteigt lässt. Analog dazu führt ein aktives Allel von st8sia4 zu einem polysialylierten NCAM Gehalt von nur 29%. Diese Knockout-Versuche der beiden Polysialyltransferasen konnten zeigen, dass st8sia2 eine deutlich höhere Kompensationsfähigkeit besitzt als st8sia4 (Galuska et al. 2006). Analysen an Mäusegehirnen während der embryonalen und postnatalen Entwicklung konnte zeigen, dass die maximale Expression von PolySia an Tag 1 nach der Geburt stattfindet (Kurosawa et al. 1997; Oltmann-Norden et al. 2008). *In vitro* wurde zuvor ein synergistischer Effekt der beiden Polysialyltransferasen und die Fähigkeit längere PolySia-Ketten durch st8sia4 zu bilden entdeckt (Angata et al. 2002).

Eine verminderte Expression von polysialylierten NCAM im Hippocampus konnte an Patienten mit diagnostizierter Schizophrenie festgestellt werden, in dem die Gehirne

post-mortem mit denen einer Kontrollgruppe verglichen wurden. Weitere Untersuchungen konnten Korrelationen zwischen einer gestörten st8sia2-Aktivität und psychischen Erkrankungen zeigen (Barbeau et al. 1995; Isomura et al. 2011).

1.3 Mausmodell

In dieser Arbeit wurde ein Mausmodell, bei welchem die beiden bekannten Polysialyltransferasen (st8sia2 und st8sia4) ausgeknockt worden waren, verwendet. Die Mäuse stammten aus der Medizinischen Hochschule Hannover. Unsere Arbeitsgruppe erhielt dabei nach Bouin-Fixierung Teile des männlichen Reproduktionstraktes in Alkohol, die anschließend in Paraffin einbettet wurden.

Bei all unseren Betrachtungen der eingebetteten Hoden wurden stets die drei Gruppen Wildtypen, Heterozygote und Knockouts verglichen. Bei den in hiesiger Arbeit verwendeten Heterozygoten handelt es sich um einen Genotyp der Polysialyltransferasen, bei dem die Transferase st8sia2 noch über ein intaktes Allel verfügt und st8sia4 komplett ausgeknockt wurde (Weinhold et al. 2005).

Die ersten Ergebnisse mit diesem speziellen Mausmodell wurden 2005 von Weinhold et al. publiziert. Dabei wurde festgestellt, dass die Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen deutlich kleiner waren, motorische Defizite aufwiesen, Malformationen der Commissura anterior und des Tractus corticospinalis zeigten und an einem Hydrocephalus litten, woran die meisten Tiere nach vier Wochen starben. Diese Beobachtungen konnten jedoch durch einen weiteren Knockout, und zwar dem von NCAM, größtenteils rückgängig gemacht werden. Dies erbrachte die Erkenntnis, dass PolySia für die Funktionen von NCAM verantwortlich ist. Es wurden durch weitere histologische Färbungen keine Abnormalitäten in Herz, Lungen, Magen, Pankreas, Darm, Leber, Milz und Nieren gefunden (Weinhold et al. 2005). Der männliche Reproduktionstrakt wurde bisher nicht untersucht.

1.4 Zielsetzung

Durch vorangegangene Arbeiten wissen wir, dass Strukturen wie die Muskulatur des Nebenhodens, des Ductus deferens, der Tunica albuginea, aber auch die peritubulären Strukturen der Tubuli seminiferi PolySia-positiv sind (Simon et al. 2015). Der Fokus dieser Arbeit wurde auf die letztgenannten Bereiche gelegt, mit der Arbeitshypothese, dass es zu Effekten durch das Fehlen von PolySia im Hoden von st8sia2- und st8sia4-defizienten Mäusen kommt. Dabei waren folgende Punkte im Fokus:

1. Herausarbeiten von eventuellen strukturellen Unterschieden im Hoden von genveränderten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp unter Nutzung pathologischer Routinefärbungen
2. Untersuchung von Expressionsunterschieden gängiger Struktur-, Differenzierungs- und Funktionsmarker in muskulären Anteilen des Hodens
3. Überprüfung des Proliferationsverhaltens der peritubulären Muskelzellen in den zu untersuchenden Mausgruppen

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft und Auswahl des Untersuchungsmaterials

Das zu untersuchende Hodengewebe stammte von Mäusen aus der Medizinischen Hochschule Hannover, die in dem dortigen Tierstall unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten wurden. Es wurden Hoden von fünf 9,5 Tage alten Wildtypen (*st8sia2^{+/+}*; *st8sia4^{+/+}*), fünf 9,5 Tage alten Polysialyltransferase-defizienten (*st8sia2^{-/-}*; *st8sia4^{-/-}*) und drei 9,5 Tage alten heterozygoten (*st8sia2^{+/-}*; *st8sia4^{+/-}*) Mäusen untersucht. Die Rückkreuzung erfolgte mit C57BL/6J Mäusen. Detaillierte Informationen über die genetischen Verfahren, die zur Deaktivierung der jeweiligen Gene eingesetzt wurden, sind in den dazugehörigen Originalarbeiten zu finden (Eckhardt et al. 2000; Angata et al. 2002; Weinhold et al. 2005)

Wir erhielten die männlichen Reproduktionsorgane, die in Hannover unmittelbar nach der Tötung der Tiere entnommen und in Bouin fixiert wurden (siehe 2.1.1). Alle Tiernutzungsprotokolle entsprechen dem deutschen Tierschutzgesetz und sind von den örtlichen Behörden genehmigt (33.12-42502-04-18/2932). Zudem wurde Gewebe von Tag 1 und Tag 10 alten Wildtyp-Mäusen (C57Bl/6J), die an der Justus-Liebig-Universität gehalten wurden, verwendet. Unterbringung, Tierpflege und alle weiteren Vorgänge wurden nach den Richtlinien der Tierhaltung an der Justus-Liebig-Universität durchgeführt (A38/2011_V54- 19c2015(1)GI20/23 und A29/2009_V54-19c20/15cGI20/23).

Genotyp	Bezeichnung der Tiere	Alter	Verwendung	Anzahl der Schnitte	Größe der Region
st8sia2 ^{+/+} st8sia4 ^{+/+}	12 21-2 13 21-2 14 21-1 15 21-1 16 21-1	9,5 Tage	Azan-Färbung, Immunhistochemie (SMA, Calponin, PKG I), Immunfluoreszenz (SMA/Kollagen-1), Proliferationsanalyse der peritubulären Muskelzellen, Vergleich des Interstitiums	Pro Färbung (Immunhistochemie und Immunfluoreszenz), Auswertung der Proliferation peritubulärer Muskelzellen, Auswertung des Interstitiums: 3	Gesamter Hodenschnitt
st8sia2 ^{-/-} st8sia4 ^{-/-}	695 696 697	9,5 Tage	Azan-Färbung, Immunhistochemie (SMA, Calponin, PKG I), Immunfluoreszenz (SMA/Kollagen-1), Proliferationsanalyse der peritubulären Muskelzellen, Vergleich des Interstitiums	Pro Färbung (Immunhistochemie und Immunfluoreszenz), Auswertung der Proliferation peritubulärer Muskelzellen, Auswertung des Interstitiums: 3	Gesamter Hodenschnitt
st8sia2 ^{-/-} st8sia4 ^{-/-}	700 701 702 706 16 21-1	9,5 Tage	Azan-Färbung, Immunhistochemie (SMA, Calponin, PKG I), Immunfluoreszenz (SMA/Kollagen-1), Proliferationsanalyse der peritubulären Muskelzellen, Vergleich des Interstitiums	Pro Färbung (Immunhistochemie und Immunfluoreszenz), Auswertung der Proliferation peritubulärer Muskelzellen, Auswertung des Interstitiums: 3	Gesamter Hodenschnitt
Wildtyp	45/11	1 Tag	Immunhistochemie (PolySia-Färbung)	3	Gesamter Hodenschnitt
Wildtyp	10/11	10 Tage	Immunhistochemie (PolySia-Färbung)	3	Gesamter Hodenschnitt

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Tiere

2.1.1 Vorbereitung der Paraffinschnitte

Das Gewebe wurde mit einer Bouischen Lösung fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dann erfolgte die Einbettung in Paraffin. Anschließend wurden 5 µm dicke Schnitte mittels Mikrotom (Leica RM 2255, Wetzlar, Deutschland) angefertigt, auf Objektträger angebracht (Super Frost® Plus, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) und bei Raumtemperatur gelagert.

2.2 Geräte

Mikrotom Leica RM 2255 (Leica, Wetzlar, Deutschland)

Wärmeschrank B5042 (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Mikroskop Axioskop 2 plus (Carl Zeiss Vision, München, Deutschland)

Kamera AxioCam MRc (Carl Zeiss Vision, München, Deutschland)

Mikroskop Axiostar plus (Carl Zeiss Micro Imaging, Göttingen, Deutschland)

Taumler gyro-rocker SSL3 (Stuart, Staffordshire, UK)

Zentrifuge (NeoLab Migge, Heidelberg, Deutschland)

2.3 Programme

AxioVision Software (Carl Zeiss Vision, München, Deutschland)

ImageJ 1.50e (public domain software, NIH, Bethesda, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>)

Die Graphen wurden mit OriginPro 8G SR2, OriginLab Corporation, Northampton, MA 01060 USA erstellt.

2.4 Chemikalien

Ammoniumchlorid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Anilinblau (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Anilin (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA)

Azokarmin (Merck, Darmstadt, Deutschland)

BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

DAB (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Essigsäure (Ethansäure) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Ethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Eukitt® Quick-hardening mounting medium (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Glucose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Glycerol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Isopropanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Methanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Natriumazid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Nickelsulfat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Normal Goat Serum (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Normal Horse Serum (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Orange G (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Peroxidase-markierte Polymer (EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit/Mouse, Dako, Hamburg, Deutschland)

Salzsäure (Chlorwasserstoffsäure) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Super Frost® Plus, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik (Emmendingen, Deutschland)

Wasserstoffperoxid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Wolframatophosphorsäure (Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland)

Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.5 Herstellung von Lösungen und Puffer

PBS (0,136 M NaCl, 0,05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, mit HCl auf pH 7,4 eingestellt)

Es werden 39,7 g NaCl zu 44,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ auf 5 Liter Aqua dest. gegeben und mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

PB

Stammlösung A: 13,61 g KH_2PO_4 auf 1 l Aqua dest.

Stammlösung B: 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ auf 1 l Aqua dest

Stammlösung A und Stammlösung B werden im Verhältnis 1:4 vermischt; dies ergibt eine 0,1 M Lösung (eingestellt auf pH 7,4)

Die Herstellung der **Azokarminlösung** erfolgt durch Zugabe von 0,1 g Azokarmin G auf 100 ml Aqua dest., welche aufgeschwemmt, aufgeköcht und abfiltriert wird. Zu je 100 ml Filtrat wird 1 ml Essigsäure hinzugegeben.

Die Herstellung des **Anilinblau-Orange-Gemisches** erfolgt durch Zugabe von 0,5 g Anilinblau und 2 g Orange G in 100 ml Aqua dest. und 8 ml Essigsäure.

2.6 Färbungen

2.6.1 Azan-Färbung nach Heidenhain

Die vorbereiteten Objektträger wurden im ersten Arbeitsschritt durch Xylol (dreimal für 5 Minuten, Roth, Karlsruhe, Deutschland), 100%igem, 96%igem und 70%igem Ethanol (jeweils 5 Minuten, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) entparaffiniert und dann in Wasser gespült. Während dieser Behandlung wurde die Azokarminlösung im Wärmeschrank (B5042, Heraeus, Hanau, Deutschland) auf eine Temperatur von 56°C gebracht. Die Herstellung der Azokarminlösung erfolgte durch Zugabe von 0,1 g Azokarmin G auf 100 ml Aqua dest., welche aufgeschwemmt, aufgeköcht und abfiltriert wurde. Zu je 100 ml Filtrat wurde 1ml Essigsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben. Im zweiten Arbeitsschritt hat die Kernfärbung stattgefunden, indem die Schnitte zuerst durch Anilinalkohol (Ethanol zu Anilinblau hinzugegeben; Merck, Darmstadt, Deutschland) für 5 Minuten differenziert, dann in dem erwärmten Azokarmin (je nach gewünschter Intensität der Rotfärbung 10-15 Minuten) gefärbt und in Wasser (5 Minuten) gegeben wurden. Im Anschluss wurden die Schnitte bei zufriedenstellender Färbung mit Aqua dest. gespült. Im dritten Arbeitsschritt erfolgte das Entfärben und Beizen des Bindegewebes durch 5%ige Wolframatophosphorsäure (für 2 Stunden, Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland). Nach erneuter Spülung mit Aqua dest. wurden die Schnitte in ein Anilinblau-Orange-Gemisch zur Färbung des kollagenen und retikulären Bindegewebes gegeben (je nach gewünschter Intensität der Blaufärbung 1-2 Stunden). Die Herstellung des Anilinblau-Orange-Gemisches erfolgte durch Zugabe von 0,5 g Anilinblau und 2 g Orange G (Orange G Merck) in 100ml Aqua dest. und 8 ml Essigsäure. Durch Differenzierung mit 96%igem Ethanol traten die Gewebekomponenten deutlicher hervor. Im vierten und letzten Arbeitsschritt wurden die Schnitte mit Isopropanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Xylol dehydriert und im Anschluss ein Aushärtungsmedium (Eukitt® Quick-hardening mounting medium, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) hinzugegeben und mit Deckgläsern (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) eingedeckt.

2.6.2 Immunhistochemische Färbungen

Die Paraffinschnitte wurden zu Beginn mit Xylol (dreimal 5 Minuten) und einer absteigenden Ethanolreihe mit 100%, 96%, 70% (jeweils 5 Minuten) behandelt. Zwischen dem 100%igen und dem 96%igen Ethanol wurden die Präparate in Methanol/H₂O₂ (50 ml Methanol + 2 ml H₂O₂ 30%ig, für 30 Minuten; Methanol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; Wasserstoffperoxid, Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben. Anschließend wurde mit Aqua dest. gespült (5 Minuten) und die Schnitte in PBS (siehe oben) gelegt (5 Minuten). Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit folgenden Primärantikörpern durchgeführt:

- -Monoklonaler Antikörper Anti- α -smooth muscle actin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland; Maus, 1:1000)
- -Monoklonaler Antikörper Anti-Calponin (Abcam, Cambridge, UK; Kaninchen, 1:500)
- -Monoklonaler Antikörper Anti-PCNA (Abcam, Cambridge, UK; Kaninchen, 1:500)
- -Polyklonaler Antikörper Anti-PKG I (Enzo, Lausen, Switzerland; Kaninchen, 1:500)
- -Monoklonaler Antikörper Anti-PolySia 735

Die Antikörper wurden im jeweiligen Verhältnis zu dem Verdünnungspuffer aus PBS, 0,2% bovinem Serumalbumin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 0,1% NaN₃ gegeben. Die Negativkontrollen wurden nur mit dem Verdünnungspuffer behandelt. Nach Applikation der Primärantikörper und der Puffer wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Schnitte mit PBS gewaschen (dreimal für 5 Minuten) und auf einen Taumler zur besseren Durchmischung gelegt. Danach wurde das Peroxidase-markierte Polymer (EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit/Mouse, Dako, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten hinzugegeben und im Anschluss wieder mit PBS und mit PB (siehe oben) für jeweils 10 Minuten gewaschen. Als nächstes erfolgte die Entwicklung der Peroxidase-Aktivität, indem 180 ml PB, 4 ml 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (22,5 mg/ml), Ammoniumchlorid (72mg /400 μ l Aqua dest.), 3,6 ml Nickelsulfat (0,05 M) und 3,6 ml 10%ige Glucose in eine Küvette gegeben wurden. Nach Rühren und Filtrieren wurde zum Start der Reaktion Glucose-Oxidase (Typ VII aus *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich, München, Deutschland 0,72 mg/600 μ l) hinzugegeben. Je nach Primärantikörper betragen die Entwicklungszeiten zwischen 4

und 8 Minuten. Nach visuell kontrollierter erfolgreicher Entwicklung wurden die Schnitte mit PB und H₂O für jeweils 10 Minuten gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 96%, 100%, jeweils 5 Minuten) sowie in Xylol (dreimal 5 Minuten) dehydriert. Abschließend wurden die Schnitte eingedeckt.

2.6.3 Immunfluoreszenz

Auch hier wurden die Paraffinschnitte zu Beginn in Xylol (dreimal für 5 Minuten) und einer absteigenden Ethanolreihe mit 100%igem, 96%igem und 70%igem Ethanol entparaffiniert und dann mit Wasser (5 Minuten) gespült. Danach wurden sie dreimal in PBS gewaschen (für 10 Minuten). Daraufhin erfolgte eine Blockung mit 2% Normalem Ziegenserum (bei Anwendung des Primärantikörpers Kollagen-1 muss eine Blockung mit Normalem Pferdeserum stattfinden) für 1 Stunde, wobei 40 ml Serum mit 1960 ml PBS als Puffer verwendet wurden. Die Immunfluoreszenzen wurden mit folgenden Primärantikörpern durchgeführt:

- Monoklonaler Antikörper Anti- α - smooth muscle Actin FITC (Sigma-Aldrich, München, Deutschland; Maus, 1:500)
- Polyklonaler Antikörper Anti-Kollagen-1 (Novusbio, Littleton, CO, USA; Kaninchen, 1:50)

Diese Primärantikörper wurden, wie auch bei den immunhistochemischen Färbungen, mit einem Puffer aus PBS, 0,2% BSA und 0,1% NaN₃ verdünnt. Wurde eine Einfachfärbung durchgeführt, so wurden die Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Negativkontrollen wurden mit dem Verdünnungspuffer behandelt. Für Doppelfärbungen wurde nach dem Auftragen des ersten Primärantikörpers und Inkubation über Nacht, am nächsten Tag nach Waschung mit PBS der zweite Primärantikörper hinzugegeben und ebenfalls unter gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit PBS (zweimal für 10 Minuten) gewaschen. Als nächstes wurden die Sekundärantikörper, welche mit PBS verdünnt und 5 Minuten zentrifugiert wurden, auf die Schnitte aufgetragen und bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Es wurde folgender Sekundärantikörper benutzt:

- Cy3 550 nm Ziege-anti-Kaninchen, Roche, Basel, Schweiz

Die Schnitte wurden mit PBS (zweimal für 10 Minuten), dann mit 4% PFA (10 Minuten) und dann erneut mit PBS (zweimal 10 Minuten) behandelt. Zuletzt wurden sie mit der Zugabe von Glycerol (Roth) eingedeckt und bei 4°C und unter Lichtschutz aufbewahrt.

2.7 Aufnahmen am Mikroskop

Die in dieser Dissertation gezeigten Bilder der histologischen Präparate mit Immunhistochemie- und Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit der Kamera AxioCam MRc (Carl Zeiss Vision, München, Deutschland) am Mikroskop Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss Vision, München, Deutschland) aufgenommen.

2.8 Zellproliferation

Die Proliferation der Zellen wurde unter Verwendung von Anti-PCNA mittels Immunhistochemie untersucht.

2.8.1 Proliferation in der peritubulären Muskelzellschicht

Die vorliegenden Bilder zeigen einen partiellen bzw. kompletten Verlust der peritubulären Färbung in der Heterozygoten- bzw. Knockout-Gruppe. Im Gegensatz dazu steht die einwandfreie Färbung der Wildtyp-Gruppe. Diese klar sichtbaren Unterschiede führten zu der Fragestellung, ob die peritubulären Muskelzellen proliferieren oder die Proliferation eingestellt haben.

Für die Auswertung der Zellproliferation in der peritubulären Muskelzellschicht wurden PCNA-immunreaktive Zellen ausgezählt (siehe 2.8.2).

Für die Untersuchung von Proliferationsunterschieden zwischen den untersuchten Mausgruppen wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

H_1 = Es besteht ein Unterschied zwischen den drei Gruppen (WTs/HTs/KOs) bezüglich der Proliferation der peritubulären Muskelzellen.

H_0 = Es besteht kein Unterschied zwischen den drei Gruppen (WTs/HTs/KOs) bezüglich der Proliferation der peritubulären Muskelzellen.

Dafür wurden pro Schnitt die PCNA-positiven peritubulären Muskelzellen (C) gezählt und durch die Fläche der Tubuli (A) geteilt. Der hieraus errechnete Quotient n ist also größer, je mehr proliferierende Zellen gezählt wurden. Die Zählung der Zellen fand nicht am Mikroskop statt, sondern an den davon angefertigten Fotos.

2.8.2 Zusammenfügen der Bilder und Auszählung der PCNA-positiven peritubulären Muskelzellen

Da die Übersichtsaufnahmen (x4) der Hoden keine sichere Unterscheidung zwischen PCNA-positiven und –negativen peritubulären Muskelzellen erbrachte, musste jede Aufnahme des Hodens in höherer (x20) Vergrößerung aufgenommen werden, wodurch jedes Einzelbild eine hohe Auflösung hatte. Die je nach Größe des Hodenschnittes 15-35 Einzelbilder wurden dann mittels „Stitching“, einem Tool aus ImageJ, zusammengefügt und ergaben ein großes und hochauflösendes Bild, mit dem zum einen die Auszählung an sich möglich war, zum anderen aber die Unterscheidung zwischen PCNA-positiven und –negativen peritubulären Muskelzellen (Abbildung 7) gewährleistet werden konnte.

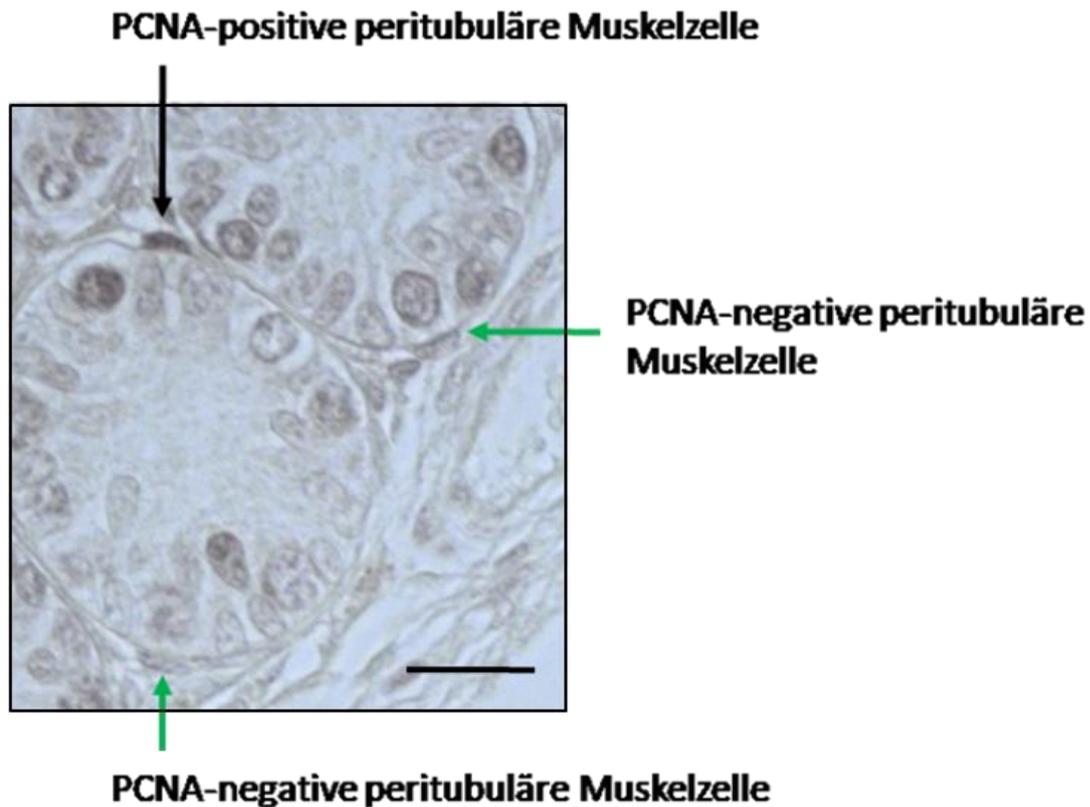


Abbildung 7: Unterscheidung von proliferierenden und nicht proliferierenden peritubulären Muskelzellen

Um das Keimepithel herum befinden sich die peritubulären Muskelzellen. Durch eine immunhistochemische Färbung mit einem anti-PCNA-Antikörper lassen sich die proliferierenden (schwarzer Pfeil) von den nicht proliferierenden Zellen (grüne Pfeile) unterscheiden. Des Weiteren sind auch die Keimzellen angefärbt. Größenbalken; 20 µm.

Die optisch vom Untersucher als positiv gewerteten peritubulären Muskelzellen wurden mit dem „cell counter“, einem weiteren Tool von ImageJ, gezählt.

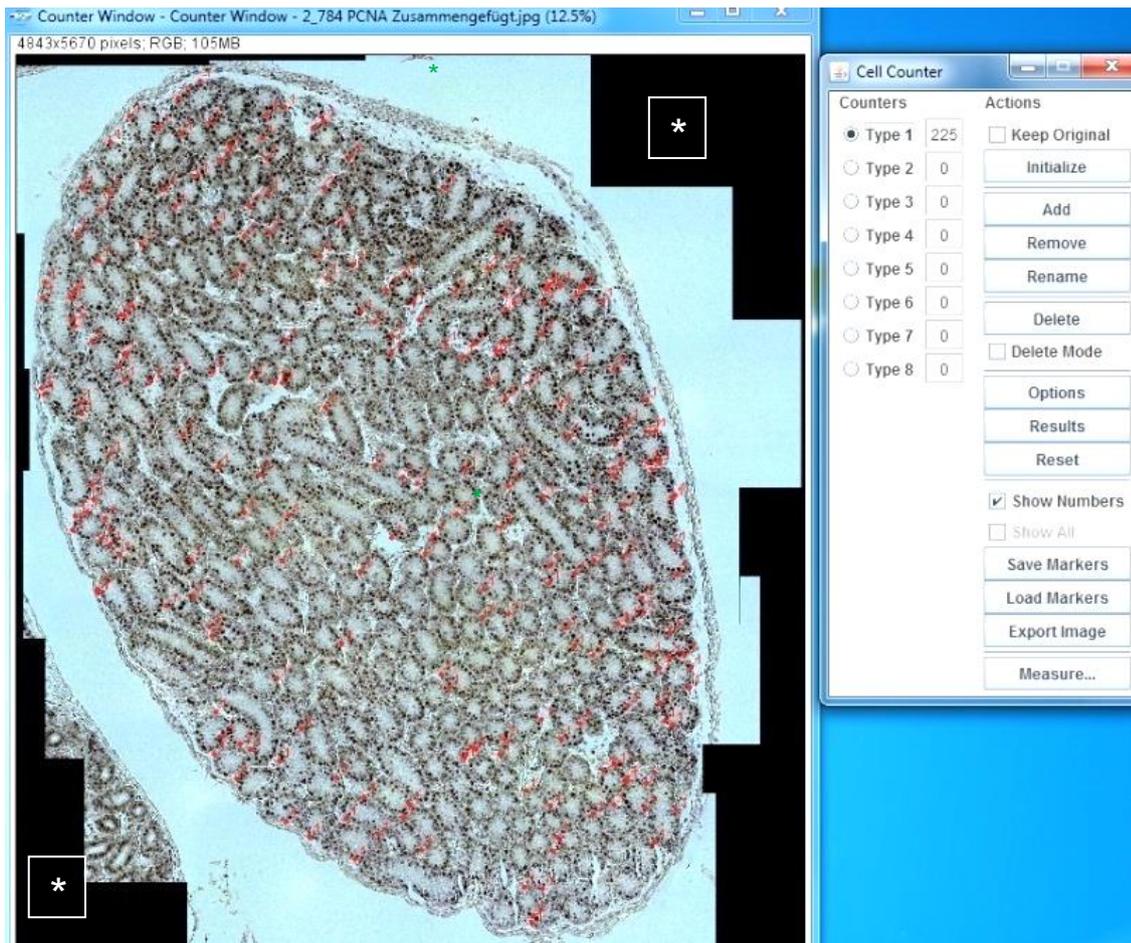


Abbildung 8: Übersichtsbild einer Auszählung von proliferierenden peritubulären Muskelzellen

Die zuvor durch „Stitching“ zusammengesetzten Bilder wurden zu einem hochauflösenden Bild zusammengefügt. Da nur diejenigen Abschnitte fotografiert wurden, die Hodengewebe enthalten, sind im zusammengesetzten Bild Bereiche ohne Bildinformationen (weiße Sterne) zu sehen. Am rechten oberen Bildrand ist die Anzahl der ausgezählten Zellen (225) zu sehen.

2.8.3 Messung der Fläche

Die Messung der Fläche erfolgte mit einem Tool aus dem Programm „AxioVision“. Dieses Programm wurde bei der Aufnahme der Hodenschnitte verwendet. Hierbei wurde zuerst die Gesamtfläche (A_{Gesamt}) bestimmt, welche nicht an der Außenseite der

Tunica albuginea gemessen wurde, sondern entlang der äußeren (der Tunica zugewandten) Ränder der Tubuli seminiferi. Weiter wurde der intertubuläre Raum, das Interstitium ($A_{\text{Interstitium}}$), von der Gesamtfläche abgezogen. Sowohl die Fläche zwischen den Außenwänden der äußeren Tubuli seminiferi und der Tunica albuginea als auch das Interstitium beinhalten per se keine peritubulären Muskelzellen und müssen deswegen aus der Ermittlung der auszuwertenden Fläche, der Tubulusfläche, abgezogen werden. Je größer der mitberücksichtigte Anteil ohne Tubuli ist, desto kleiner wird der Quotient n , was zu einer Verfälschung des Ergebnisses führt.

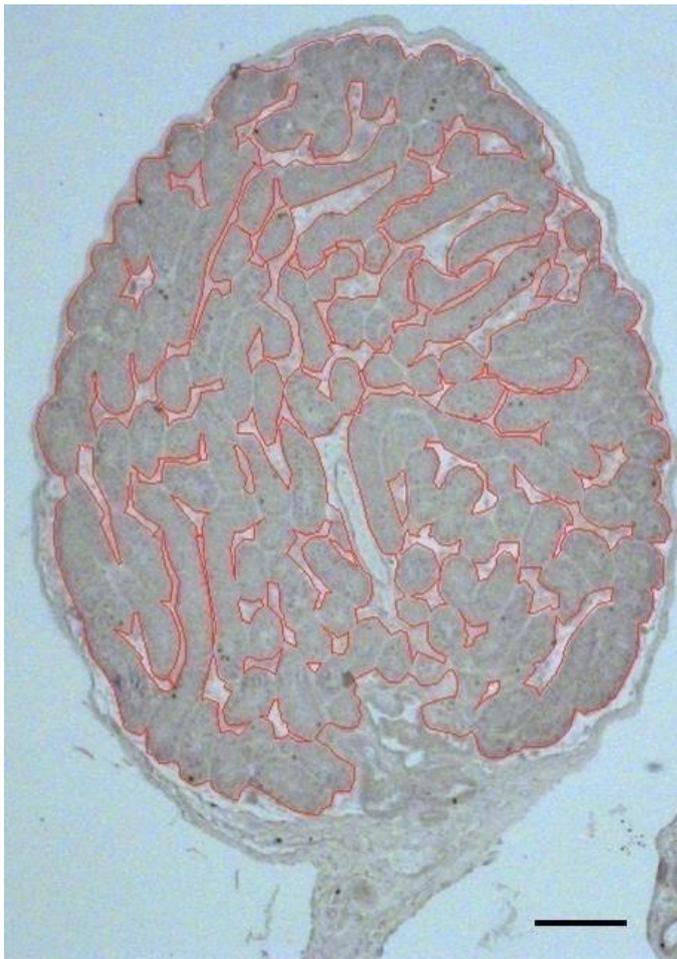


Abbildung 9: Übersichtsaufnahme eines Hodenanschnittes zur Ermittlung der Gesamt-Tubulusfläche

Um die Fläche der gesamten Tubuli seminiferi zu bestimmen, muss von der Gesamtfläche des Hodens der interstitielle Raum abgezogen werden. Dieser wurde manuell umrandet (rot markiert). Somit ergibt sich folgende Rechnung:

$A_{\text{Gesamt}} - A_{\text{Interstitium}} = A_{\text{Tubulusfläche}}$. Größenbalken; 100 μm .

2.8.4 Rohdaten der ausgezählten proliferierenden peritubulären Muskelzellen, der Fläche und des resultierenden Quotienten

Genotyp	Bezeichnung der Tiere	Zellen [n]	Fläche A[μm^2]	Quotient n/A
st8sia2 ^{+/+} st8sia4 ^{+/+}	12 21-2 Nr. 31	51	1.273.418	$4,005 \times 10^{-5}$
1.	12 21-2 Nr. 36	35	1.446.776	$2,4192 \times 10^{-5}$
	12 21-2 Nr. 39	54	1.480.733	$3,6468 \times 10^{-5}$
2.	13 21-2 Nr. 33	42	1.013.225	$4,145 \times 10^{-5}$
	13 21-2 Nr. 36	65	1.060.872	$6,127 \times 10^{-5}$
	13 21-2 Nr. 41	36	1.154.304	$3,1188 \times 10^{-5}$
3.	14 21-1 Nr. 31	32	1.347.978	$2,3739 \times 10^{-5}$
	14 21-1 Nr. 35	56	1.437.306	$3,8962 \times 10^{-5}$
	14 21-1 Nr. 37	75	1.512.601	$4,9583 \times 10^{-5}$
4.	15 21-1 Nr. 31	85	1.238.439	$6,8635 \times 10^{-5}$
	15 21-1 Nr. 35	64	1.375.253	$4,6537 \times 10^{-5}$
	15 21-1 Nr. 39	28	1.453.023	$1,9270 \times 10^{-5}$
5.	16 21-1 Nr. 91	50	1.566.454	$3,1919 \times 10^{-5}$
	16 21-1 Nr. 94	44	1.511.583	$2,9109 \times 10^{-5}$
	16 21-1 Nr. 98	62	1.384.298	$4,4788 \times 10^{-5}$
st8sia2 ^{+/+} st8sia4 ^{-/-}	695_1	161	1.850.721	$8,6993 \times 10^{-5}$
1.	695_2	130	1.875.583	$6,9312 \times 10^{-5}$
	695_3	152	2.005.145	$7,580 \times 10^{-5}$

2.	696_1	88	929.927	$9,4631 \times 10^{-5}$
	696_2	82	1.052.794	$7,7888 \times 10^{-5}$
	696_3	100	1.094.380	$9,1376 \times 10^{-5}$
3.	697_1	102	1.648.987	$6,1856 \times 10^{-5}$
	697_2	117	1.955.943	$5,9818 \times 10^{-5}$
	697_3	139	1.964.231	$7,0766 \times 10^{-5}$
st8sia2 ^{-/-} st8sia4 ^{-/-}	700_1	139	879.232	$1,5809 \times 10^{-4}$
1.	700_2	262	728.218	$3,5978 \times 10^{-4}$
	700_3	153	725.530	$2,1088 \times 10^{-4}$
2.	701_1	266	990.452	$2,6856 \times 10^{-4}$
	701_2	300	1.062.426	$2,8237 \times 10^{-4}$
	701_3	181	1.031.118	$1,7554 \times 10^{-4}$

3.	702_1	146	818.334	$1,7841 \times 10^{-4}$
	702_2	156	573.321	$2,7210 \times 10^{-4}$
	702_3	145	683.123	$2,1226 \times 10^{-4}$
4.	706_1	205	1.047.867	$1,9564 \times 10^{-4}$
	706_2	156	1.072.231	$1,4549 \times 10^{-4}$
	706_3	110	839.413	$1,3104 \times 10^{-4}$
5.	16 21-1 Nr. 91	79	1.205.131	$6,5553 \times 10^{-5}$
	16 21-1 Nr. 94	87	1.027.730	$8,4653 \times 10^{-5}$
	16 21-1 Nr. 98	52	979.298	$5,3099 \times 10^{-5}$

Tabelle 2: Rohdaten der peritubulären Muskelzellen

2.8.5 Fragestellung Signifikanztest

Können signifikante Unterschiede bezüglich der Maßzahl (durchschnittliche Proliferation n) zwischen den drei Gruppen festgestellt werden?

Unter der Voraussetzung, dass die drei Gruppen normalverteilt sind, bietet sich die Varianzanalyse (ANOVA) mit dem T-Test an. Um den T-Test anwenden zu können, muss eine Varianzhomogenität zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Um die

Varianzhomogenität zu testen wird der **Bartlett-Test** (Hartung et al. 2005) verwendet. Auch hier wird die Normalverteilung der Grundgesamtheiten angenommen.

Hypothesen:

H_0 = Es liegt Varianzhomogenität vor

H_1 = Es liegt keine Varianzhomogenität vor

Zuerst werden die Varianzen der drei Gruppen gebildet:

$$S^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Es ergeben sich: $S_{\text{Wildtyp}}^2 = 1,6014 \times 10^{-9}$

$S_{\text{Heterozygot}}^2 = 1,3776 \times 10^{-10}$

$S_{\text{Knockout}}^2 = 6,87637 \times 10^{-9}$

Nachdem die Varianzen der drei Gruppen ermittelt wurden, werden diese in folgende Gleichung eingesetzt:

$S^2 = \frac{1}{N-p} \sum_{i=1}^p (n_i - 1) s_i^2$ wobei s_i^2 die Varianzen der einzelnen Gruppen sind.

$$S^2 = \frac{1}{39-3} [14 * S_{\text{Wildtyp}}^2 + 8 * S_{\text{Heterozygot}}^2 + 14 * S_{\text{Knockout}}^2] = 3,3275 \times 10^{-9}$$

Gilt nun mit dem vorgegebenen Niveau γ

$$\frac{1}{c} [(N - p) \ln s^2 - \sum_{i=1}^p (n_i - 1) \ln s_i^2] > \chi_{2;0,95}^2$$

wobei $c = \frac{1}{p(p-1)} [\sum_{i=1}^p \frac{1}{n_i-1} - \frac{1}{N-p}] + 1 = 1,04$

Für $c= 1,04$; $N=39$ (Anzahl aller ausgewerteten Schnitte); $p=3$ (drei Gruppen); s_i^2 = die jeweiligen Varianzen der Gruppen ergibt sich:

=24,571 > 5,991 somit wird H_1 angenommen (Quantile $\chi_{n;\gamma}^2$ der χ^2 -Verteilung) (Hartung et al. 2005)

Damit ist die Hypothese H_0 = Varianzhomogenität zugunsten der Gegenhypothese H_1 widerlegt, so dass der F-Test nicht angewendet werden kann. Aufgrund dessen musste zur Analyse zweier Gruppen das **Behrens-Fisher-Problem** (Hartung et al. 2005) angewendet werden.

$$\hat{t} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Zudem muss bei einer unterschiedlichen Anzahl von Stichproben unter den drei zu vergleichenden Gruppen (zweimal 15 und einmal 12) der jeweilige Freiheitsgrad ν mittels folgender Formel berechnet werden:

$$\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2 / (n_1 - 1) + \left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2 / (n_2 - 1)}$$

Somit ergibt sich beim Vergleich der WT und HT sowie HT und KO ein Freiheitsgrad von 17 und für WT und KO ein Freiheitsgrad von 20 (ν wird stets abgerundet) (Hartung et al. 2005).

Wildtyp: $n_1 = 15$; $\bar{x}_1 = 3,9144 \times 10^{-5}$; $S_1^2 = 1,6014 \times 10^{-9}$

Heterozygot: $n_2 = 9$; $\bar{x}_2 = 7,6494 \times 10^{-5}$; $S_2^2 = 1,3776 \times 10^{-10}$

Knockout: $n_3 = 15$; $\bar{x}_3 = 1,86 \times 10^{-4}$; $S_3^2 = 6,8763 \times 10^{-9}$

Wildtyp und Heterozygot:

$$\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}} = 1,105 \times 10^{-5}$$

$$t = \frac{|3,9144 \times 10^{-5} - 7,6494 \times 10^{-5}|}{1,105 \times 10^{-5}} = 3,381 \quad \text{df} = 17;$$

3,381 > 1,740 somit Signifikanz auf dem 0,95-Niveau (Quantile $t_{n,y}$ der t-Verteilung) (Hartung et al. 2005) zwischen den Wildtypen und Heterozygoten.

Wildtyp und Knockouts:

$$\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_3^2}{n_3}} = 2,377 \times 10^{-5}$$

$$t = \frac{|3,9144 \times 10^{-5} - 1,86 \times 10^{-4}|}{2,377 \times 10^{-5}} = 6,177 \quad \text{df} = 20;$$

6,177 > 1,725 somit Signifikanz auf dem 0,95-Niveau (Quantile $t_{n,y}$ der t-Verteilung) (Hartung et al. 2005) zwischen den Wildtypen und Knockouts.

Heterozygot und Knockouts:

$$\sqrt{\frac{S_2^2}{n_2} + \frac{S_3^2}{n_3}} = 2,177 \times 10^{-5}$$

$$t = \frac{|7,6494 \times 10^{-5} - 1,86 \times 10^{-4}|}{2,177 \times 10^{-5}} = 5,030 \quad \text{df} = 17;$$

5,030 > 1,740 somit Signifikanz auf dem 0,95-Niveau (Quantile $t_{n,y}$ der t-Verteilung) (Hartung et al. 2005) zwischen den Heterozygoten und Knockouts.

Damit wird die Alternativhypothese der unterschiedlichen Mittelwerte der Gruppen mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,95 angenommen. Die theoretisch abgeleitete Hypothese, dass ein Unterschied innerhalb der drei Gruppen (WTs/HTs/KOs) bezüglich der Proliferation besteht wird somit statistisch bestätigt.

2.8.6 Rohdaten der Fläche des interstitiellen Raumes

Genotyp	Bezeichnung der Tiere	Interstitium [μm]	Fläche A[μm^2]	Anteil [%]
st8sia2 ^{+/+} st8sia4 ^{+/+}	12 21-2 Nr. 41	67.576	1.759.951	3,84
	12 21-2 Nr. 42	81.488	1.692.836	4,81
	12 21-2 Nr. 43	82.700	1.683.493	4,91
	13 21-2 Nr. 30	40.865	1.053.319	3,88
	13 21-2 Nr. 31	43.327	1.051.830	4,12
	13 21-2 Nr. 32	46.684	1.096.209	4,26
	14 21-1 Nr. 41	61.676	1.903.286	3,24
	14 21-1 Nr. 42	142.475	1.941.676	7,34
	14 21-1 Nr. 43	108.547	1.805.105	6,01
	15 21-1 Nr. 41	120.292	1.741.644	6,91
	15 21-1 Nr. 42	98.573	1.764.974	5,58

	15 21-1 Nr. 43	128.488	1.794.008	7,16
	16 21-1 Nr. 37	153.171	1.849.694	8,28
	16 21-1 Nr. 38	158.391	1.846.156	8,58
	16 21-1 Nr. 41	182.692	1.900.694	9,61
st8sia2 ^{+/-} st8sia4 ^{+/-}	695_1	164.030	2.157.478	7,60
	695_2	220.249	2.238.834	9,84
	695_3	166.444	2.257.425	7,37
	696_1	58.658	1.234.345	4,75
	696_2	156.788	1.409.325	11,13
	696_3	154.324	1.436.626	10,74
	697_1	224.779	2.336.366	9,62
	697_2	174.009	2.343.310	7,43
	697_3	180.107	2.388.728	7,54
st8sia2 ^{+/-} st8sia4 ^{+/-}	700_1	195.995	1.075.118	18,32
	700_2	205.292	933.511	21,99
	700_3	181.227	906.757	19,99

	701_1	33.896	1.024.348	3,31
	701_2	104.152	1.166.578	8,93
	701_3	106.640	1.137.758	9,37
	702_1	117.416	935.751	12,55
	702_2	91.086	664.408	13,71
	702_3	62.491	745.614	8,38
	706_1	44.348	1.092.215	4,06
	706_2	77.871	1.149.356	6,78
	706_3	25.384	864.798	2,94
	16 21-1 Nr. 41	68.961	1.928.346	3,58
	16 21-1 Nr. 42	70.997	1.913.890	3,71
	16 21-1 Nr. 43	129.537	1.961.822	6,60

Tabelle 3: Rohdaten der Fläche des Interstitiums

2.8.7 Interstitieller Raum der drei Gruppen

Wie in Abbildung 9 zu sehen, wurde für die Ermittlung der reinen Tubulusfläche die Gesamtfläche eines Hodenschnittes bestimmt und der interstitielle Raum subtrahiert. Der prozentuale Anteil des Interstitiums der drei Gruppen wurde auf signifikante Unterschiede untersucht, da in Abbildung 10 in der Knockout-Gruppe ein vergrößertes Interstitium festgestellt werden konnte.

Hypothesen:

H_1 = Es besteht ein Unterschied beim Vergleich von jeweils zwei Gruppen bezüglich des interstitiellen Raumes.

H_0 = Es besteht kein Unterschied beim Vergleich von jeweils zwei Gruppen bezüglich des interstitiellen Raumes.

Dafür wurden die Mittelwerte der Flächen des interstitiellen Raumes der drei Gruppen miteinander verglichen.

2.8.8 Fragestellung Signifikanztest

Wie auch in den vorherigen Fällen, wurden zuerst die Varianzen auf Homogenität bzw. Heterogenität untersucht.

Hypothesen:

H_0 = Es liegt Varianzhomogenität vor

H_1 = Es liegt keine Varianzhomogenität vor

Nach Bestimmung der Varianzen und Durchführung des Bartlett-Tests (wie bereits oben ausführlich aufgeführt), erbrachte diese eine Varianzinhomogenität. Aufgrund

dessen musste zur Analyse zweier Gruppen das **Behrens-Fisher-Problem** (Hartung et al. 2005) angewendet werden.

$$\hat{t} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Wildtyp: $n_1 = 15$; $\bar{x}_1 = 5,903$; $S_1^2 = 3,655$

Heterozygot: $n_2 = 9$; $\bar{x}_2 = 8,447$; $S_2^2 = 3,682$

Knockout: $n_3 = 15$; $\bar{x}_3 = 9,608$; $S_3^2 = 37,740$

Wildtyp und Heterozygot:

$$\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}} = 0,808$$

$$t = \frac{15,903 - 8,447}{0,808} = 3,149 \quad \text{df} = 17;$$

$3,149 > 1,740$ somit Signifikanz auf dem 0,95-Niveau (Quantile $t_{n;\gamma}$ der t-Verteilung) (Hartung et al. 2005) zwischen den Wildtypen und Heterozygoten.

Wildtyp und Knockouts:

$$\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_3^2}{n_3}} = 1,661$$

$$t = \frac{15,903 - 9,608}{1,661} = 2,231 \quad \text{df} = 20;$$

2,231 > 1,725 somit Signifikanz auf dem 0,95-Niveau (Quantile $t_{n,y}$ der t-Verteilung) (Hartung et al. 2005) zwischen den Wildtypen und Knockouts.

Heterozygot und Knockouts:

$$\sqrt{\frac{s_2^2}{n_2} + \frac{s_3^2}{n_3}} = 1,710$$

$$t = \frac{|8,447 - 9,608|}{1,710} = 0,679 \quad df = 17;$$

0,679 < 1,740 somit nicht signifikant auf dem 0,95-Niveau (Quantile $t_{n,y}$ der t-Verteilung) (Hartung et al. 2005) zwischen den Heterozygoten und Knockouts.

Somit trifft H_1 für den Vergleich zwischen WT und HT sowie WT und KO zu, für den Vergleich von HT und KO trifft H_0 zu.

3 Ergebnisse

Vorangegangene Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass in der postnatalen Entwicklung von Mäusenebenhoden polysialyliertes NCAM im Epithel und in der Muskulatur zu finden sind (Simon et al. 2015). Die Versuche wurden an Mäusen unterschiedlichen Alters (postnatale Tage 1, 4, 7, 10, 15, 20 und 25) durchgeführt. Des Weiteren konnte durch immunhistochemische Färbungen und Western Blot-Untersuchungen gezeigt werden, dass unmittelbar postnatal, also an Tag 1, die maximale Expression von PolySia und den beiden Polysialyltransferasen *st8sia2* und *st8sia4* stattfinden (Simon et al. 2015).

Ähnliche Ergebnisse konnten auch im Hoden festgestellt werden (Simon 2015). Wie auch im Nebenhoden wurden die größten Mengen an PolySia an Tag 1 detektiert. Sowohl im Nebenhoden als auch im Hoden fand eine kontinuierliche Abnahme der PolySia-Expression statt. Des Weiteren konnten in der Tunica albuginea PolySia-positive Signale nachgewiesen werden (Simon et al. 2015).

In dieser Arbeit wurden die zusätzlich entdeckten PolySia-positiven peritubulären Areale genauer untersucht. Dabei wurde sich eines Mausmodells bedient, in dem die beiden Polysialyltransferasen komplett (*st8sia2^{-/-}*; *st8sia4^{-/-}*) oder zum Teil (*st8sia2^{+/-}*; *st8sia4^{-/-}*) ausgeknockt worden waren. Die drei Mausgruppen sind alle 9,5 Tage alt. Im Folgenden werden diese durch die „drei Gruppen“ bzw. WTs, HTs und KOs abgekürzt.

3.1 Übersichtsfärbung zur Beurteilung der Morphologie der drei Gruppen

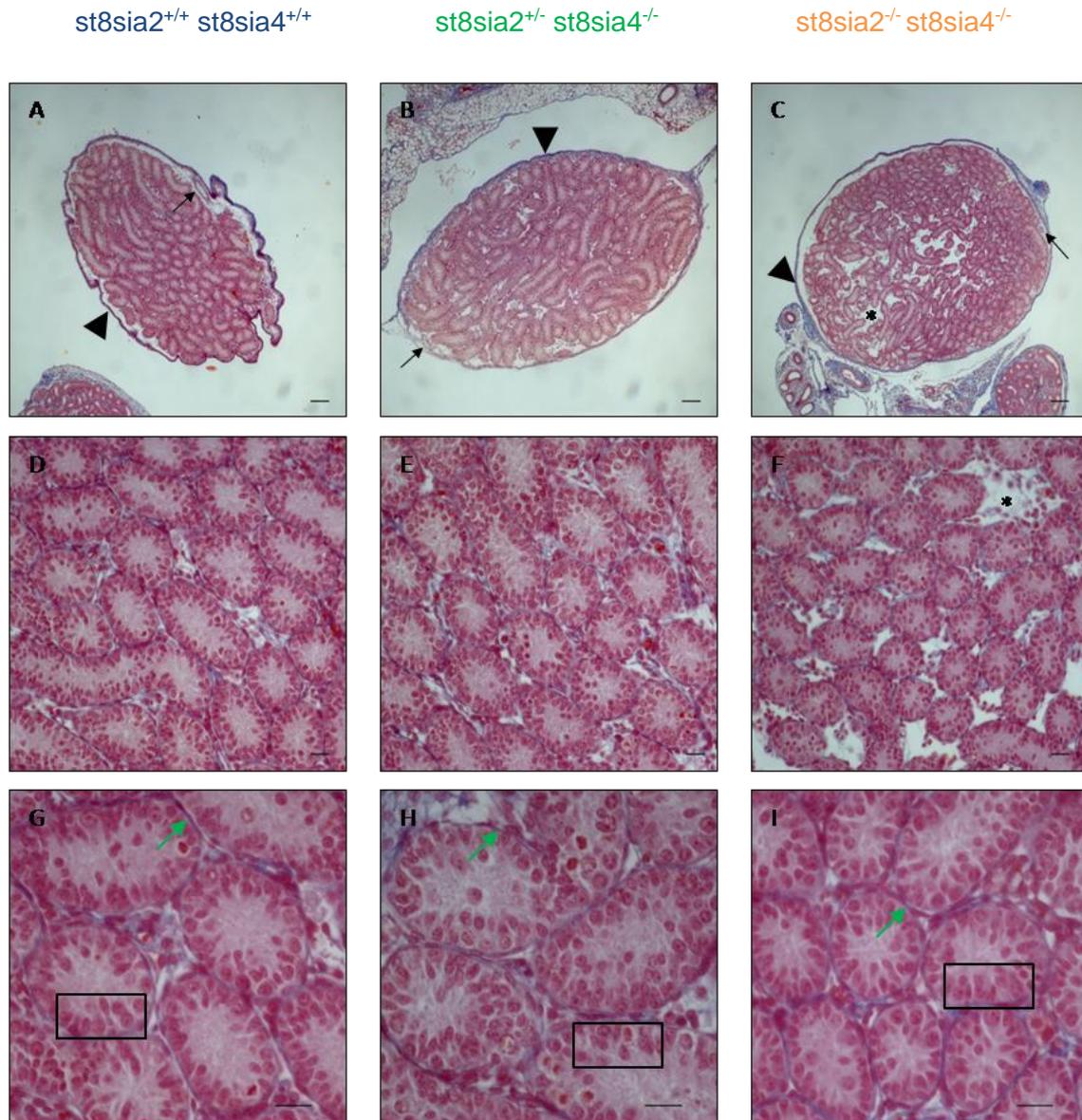


Abbildung 10: Keine auffälligen strukturellen Unterschiede zwischen den drei Gruppen

Zur Beurteilung der Hodenschnitte wurde eine Azan-Färbung nach Heidenhain durchgeführt. Die Tunica albuginea ist überall intakt (A, B, C; Pfeilkopf). Das Keimepithel (schwarzer Kasten) und die darum befindliche Lamina propria (grüne Pfeile) zeigen zwischen den drei Gruppen keine Unterschiede (G, H, I). Ebenfalls zeigen sich regelhafte Blutgefäße (A, B, C; schwarzer Pfeil). Die einzige Auffälligkeit ist der verbreiterte interstitielle Raum in der KO-Gruppe (C, F; Stern). Außerhalb des

Hodens sind Anteile des Nebenhodens und Fettgewebe zu sehen (A, B, C). Größenbalken A-C; 100 µm, D-I; 20 µm.

Diese Übersichtsfärbung ermöglicht eine erste Beurteilung der morphologischen Eigenschaften der Wildtypen, Heterozygoten und Knockouts. Auffälligkeiten der Tunica albuginea, der Blutgefäße, der Tubuli seminiferi samt Keimepithel sowie des interstitiellen Raumes konnten dadurch festgestellt oder ausgeschlossen werden. Die drei Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Morphologie nicht voneinander (Abbildung 10). Jedoch konnte vor allem in der Knockout-Gruppe ein verbreiteter interstitieller Raum detektiert werden (Abbildung 10 C, F). Dieser könnte auf ein vermehrtes Flüssigkeitsangebot in diesem Raum hinweisen. Aus diesem Grund wurde an anderer Stelle eine statistische Auswertung des Interstitiums in den drei Gruppen vorgenommen, welche in Abbildung 19 zu sehen ist.

3.2 PolySia-positive peritubuläre Areale in postnatalen Mäusehoden

Es konnte durch immunhistochemische Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper mAK 735 gezeigt werden, dass PolySia im postnatalen Hoden exprimiert wird (Abbildung 11) (Hachem et al. 2021). Sehr deutlich war die PolySia-Färbung an 1 Tag alten Mäusen zu sehen, was durch Western Blot-Untersuchungen außerhalb dieser Doktorarbeit, bestätigt werden konnte (Simon 2015; Hachem et al. 2021). So nimmt die Expression von PolySia kontinuierlich ab, wodurch auch immunhistochemisch an Tag 10 kaum noch PolySia-positive Areale auszumachen sind (Abbildung 11 C). Vorarbeiten von Peter Simon, dass PolySia im postnatalen Nebenhoden insbesondere in der Muskulatur des Nebenhodenganges sowie auch in der Muskulatur des Ductus deferens zu finden war (Simon et al. 2015), führten dazu, dass der Fokus bei den hier vorgestellten Untersuchungen des postnatalen Hodens auf die Muskulatur der Tubuli seminiferi, also die peritubulären Muskelzellen, gelegt wurde.

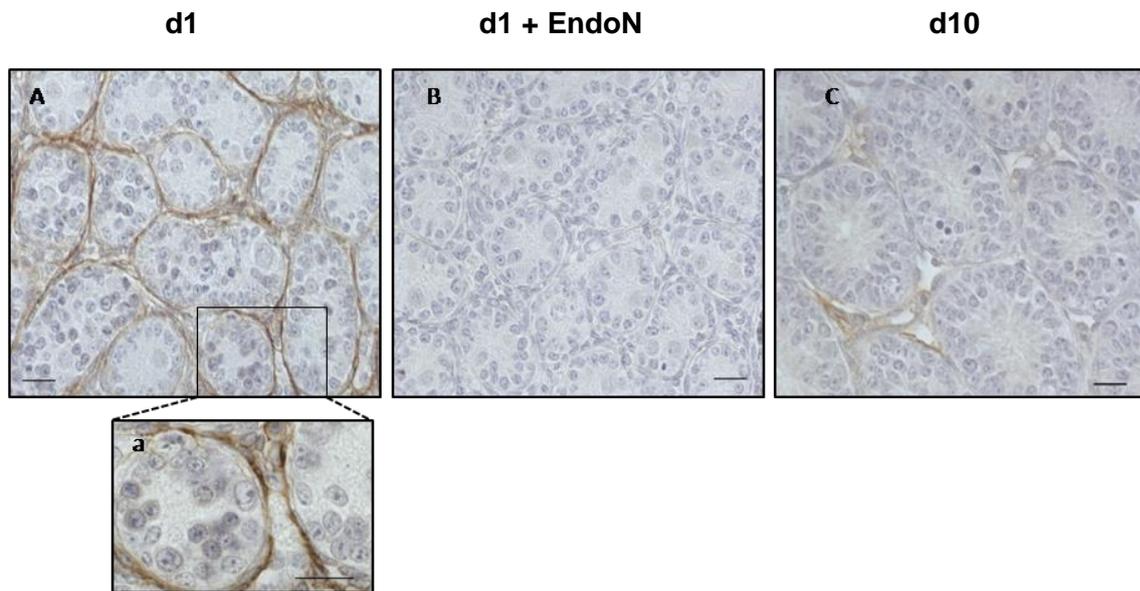


Abbildung 11: PolySia ist um die Tubuli seminiferi in postnatalen Mäusehoden präsent

Immunhistochemische Färbungen von 1 und 10 Tage alten Mäusehoden mit einem Antikörper gegen PolySia (mAK 735). Peritubulär lassen sich in (A) PolySia-positive Zellen ausmachen (braune Färbung). Das Inset (a) zeigt die genaue Lokalisation der spezifischen Färbung. Der zusätzliche Einsatz von EndoN, das PolySia degradiert, diente als Negativkontrolle (B). Bei den 10 Tage alten Tieren konnten nur marginale Mengen PolySia gefunden werden (C). Größenbalken; 20 μm . Abbildung modifiziert nach (Hachem et al. 2021).

Aufgrund der Lokalisation von PolySia in peritubulären Bereichen wurde die ringförmig um das Keimepithel gelegene („peritubuläre“) Muskulatur der Wildtypen mit der von Heterozygoten und Knockouts verglichen. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen mit einem der gängigsten Muskelmarker, dem smooth muscle actin (SMA), durchgeführt.

3.3 Untersuchungen der peritubulären Muskulatur durch Färbemethoden

3.3.1 Immunhistochemische SMA-Färbung

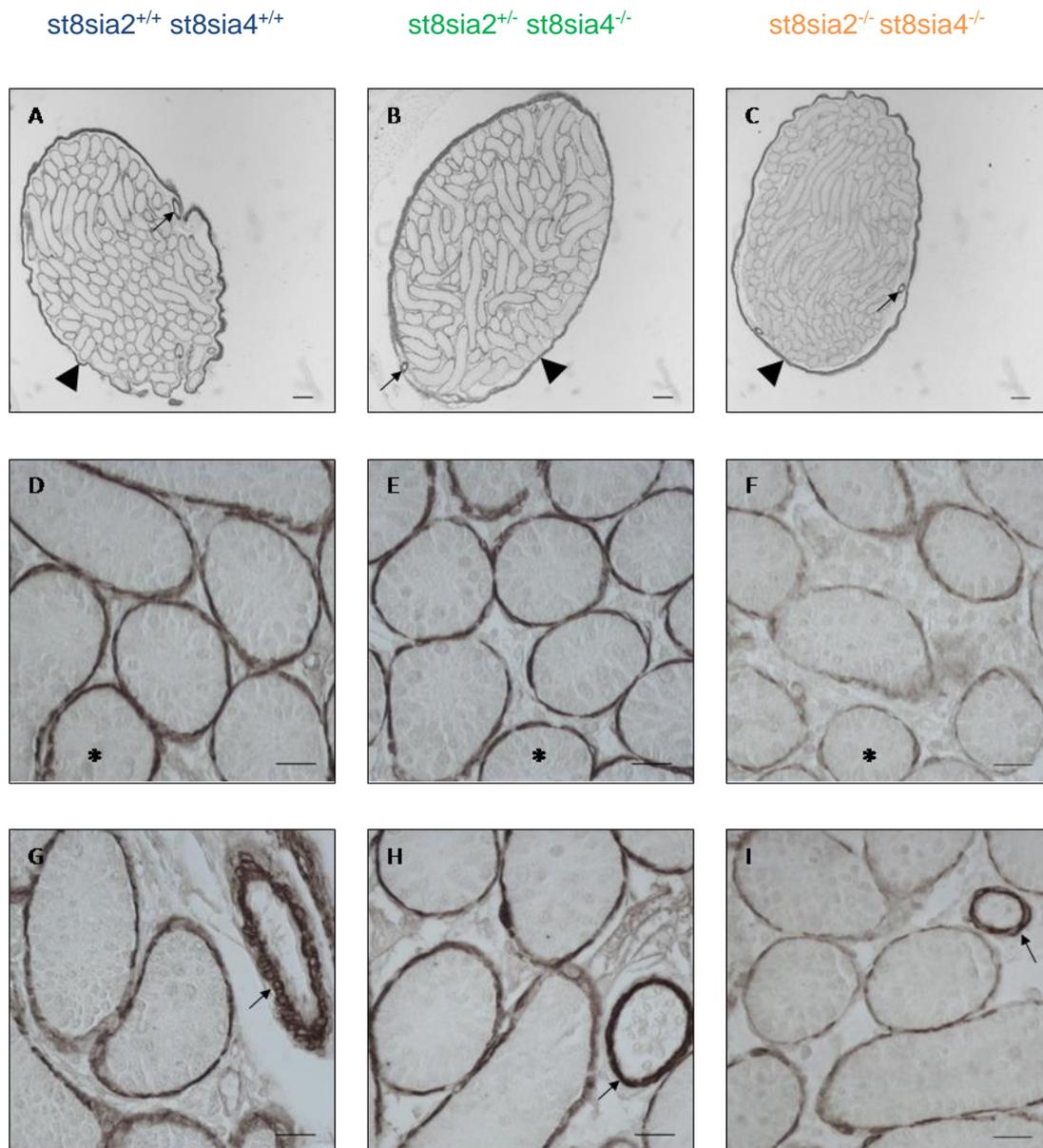


Abbildung 12: Untersuchungen der glatten Muskulatur und Vergleich der drei Gruppen bezüglich der SMA-Expression

Bei dem hier genutzten Nickel-Glucoseoxidase-Detektionssystem ist die gesamte SMA-markierte Muskulatur schwarz gefärbt. A-C: Die Übersichtsfärbung zeigt keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen in der Tunica albuginea (Pfeilspitze) und den

Blutgefäßen (Pfeile). D-I: Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man eine schwächere Anfärbung der peritubulären Muskulatur der Knockouts (F, I) als bei den Wildtypen und Heterozygoten. Die Blutgefäße (Pfeil) sind bei den drei Mausgruppen unverändert stark gefärbt (G-I). Letztere dienten gleichzeitig als positive interne Kontrolle. Die SMA-Expression in den peritubulären Muskelzellen ist in den WTs und HTs gleichmäßig stark, eine minimal schwächere Färbung ist in den KOs zu sehen. In den Übersichtsvergrößerungen (A, B, C) wurden exemplarisch jeweils Blutgefäße (Pfeil) und die Tunica albuginea (Pfeilkopf) markiert. In den höheren Vergrößerungen (D, E, F) wurde jeweils ein Tubulus seminiferus (Stern) und jeweils ein Blutgefäß (G, H, I) markiert (Pfeil). Größenbalken A-C; 100 µm, D-I; 20 µm. Abbildung modifiziert aus (Hachem et al. 2021).

Wie bereits anhand der Azan-Färbung festgestellt, zeigen sich in den Übersichtsaufnahmen der SMA-Färbung (Abbildung 12 A-C) ebenfalls keine morphologischen Unterschiede. Hinsichtlich der Muskulatur lassen sich zwischen den WTs und den HTs keine Unterschiede in der Intensität der Färbung ausmachen (Abbildung 12 A-C). Vergleicht man nun die Muskulatur der KOs mit denen der WTs und HTs, so fällt eine leicht schwächere Färbung in den Tubuli seminiferi auf. Dies wird durch die Vergrößerungen (Abbildung 12 D-I) bestätigt. Jedoch beschränkt sich das Ergebnis ausschließlich auf die Tubuli seminiferi; die Tunica albuginea und die Blutgefäße sind in allen Gruppen gleich stark gefärbt (Abbildung 12 A-C, G-I).

3.3.2 Immunfluoreszenz-Färbung mit SMA und Kollagen-1

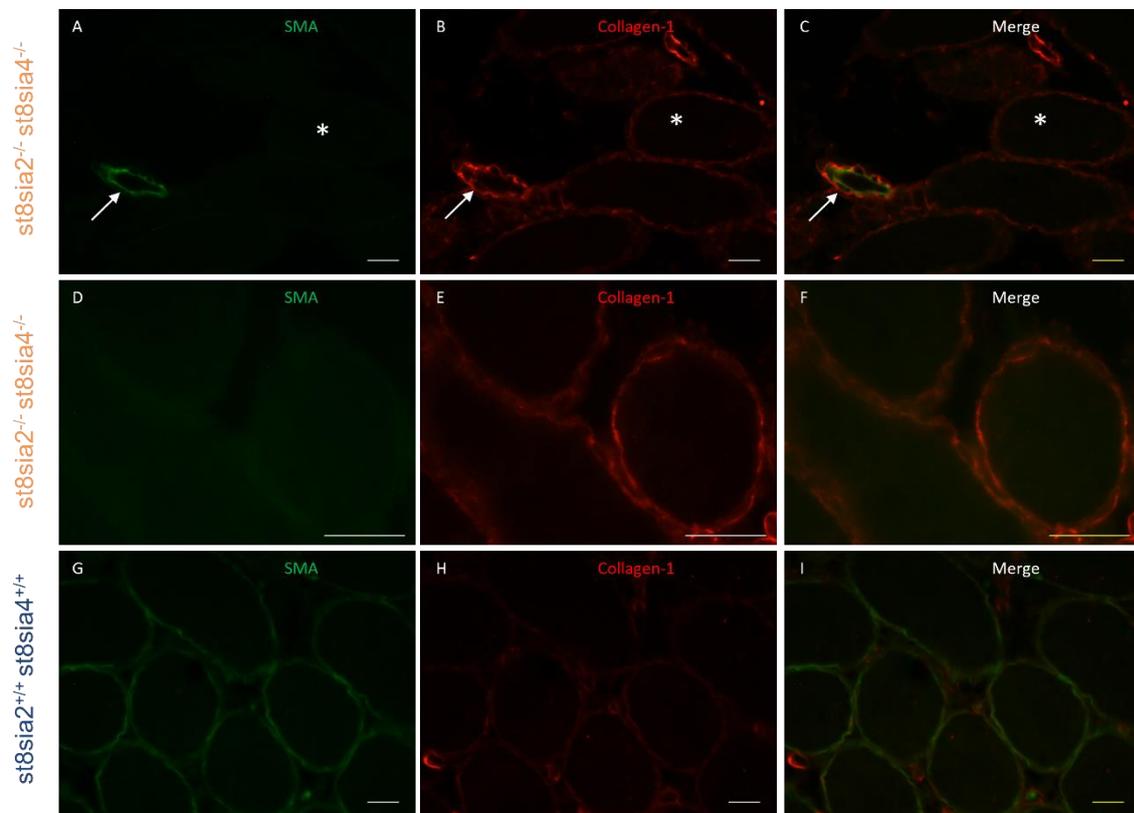


Abbildung 13: Deutlich verringerte Expression von SMA in KO-Mäusen

Die ebenfalls durchgeführte Immunfluoreszenz mit einem weiteren SMA-Antikörper (zusammen mit Kollagen-1-Nachweis) konnte die Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout klarer darstellen (Abbildung 13 A, G). Als positive interne Kontrolle dienten die Blutgefäße (Pfeil), die eine eindeutige Färbung zeigten. Kollagen-1 wird sowohl in den Tubuli seminiferi als auch in den Blutgefäßen exprimiert (B, E, H). In den zusammengesetzten Bildern (C, F) überwiegt eindeutig die in Rot markierte Kollagen-1 Färbung. Eine SMA-Aktivität lässt sich nur im Blutgefäß eindeutig ausmachen. Im Gegensatz dazu sieht man in der Wildtyp-Gruppe eine eindeutige Färbung der glatten Muskulatur in den Tubuli seminiferi (G). Im Verhältnis zur SMA-Färbung der Wildtypen und zu den Kollagen-1 Färbungen der KOs, wirkt die Kollagen-1 Färbung der Wildtypen (H) schwächer. Auch das zusammengesetzte Bild des Wildtypes zeigt ein Überwiegen der SMA-Expression (I). Exemplarisch ist ein Tubulus seminiferus markiert (Stern). Größenbalken; 20 μ m.

Durch die Immunfluoreszenz-Färbung ließ sich der Unterschied in der SMA-Expression zwischen Wildtyp und Knockout noch stärker darstellen (Abbildung 13 A, G). Bei den Blutgefäßen der Knockout-Mäuse war die SMA-Färbung im Unterschied zu den Tubuli deutlich erkennbar. Neben SMA wurde bei der Immunfluoreszenz gleichzeitig ein Antikörper gegen Kollagen-1 verwendet. Mit diesem konnte eine etwas stärkere Färbung in der Knockout-Gruppe festgestellt werden. Die Heterozygoten verhielten sich bezüglich der SMA- und Kollagen-1-Expression wie die Wildtypen (nicht gezeigt).

Da die circa neun Tage alten Mäuse in ihrer postnatalen Entwicklung weit fortgeschritten sind, war die Frage nach der Differenzierung der peritubulären Muskelzellen von Interesse. Aus diesem Grund wurde Calponin, ein als Muskeldifferenzierungsmarker bekanntes Protein in glatter Muskulatur, für weitere immunhistochemische Untersuchungen verwendet.

3.3.3 Immunhistochemische Calponin-Färbung

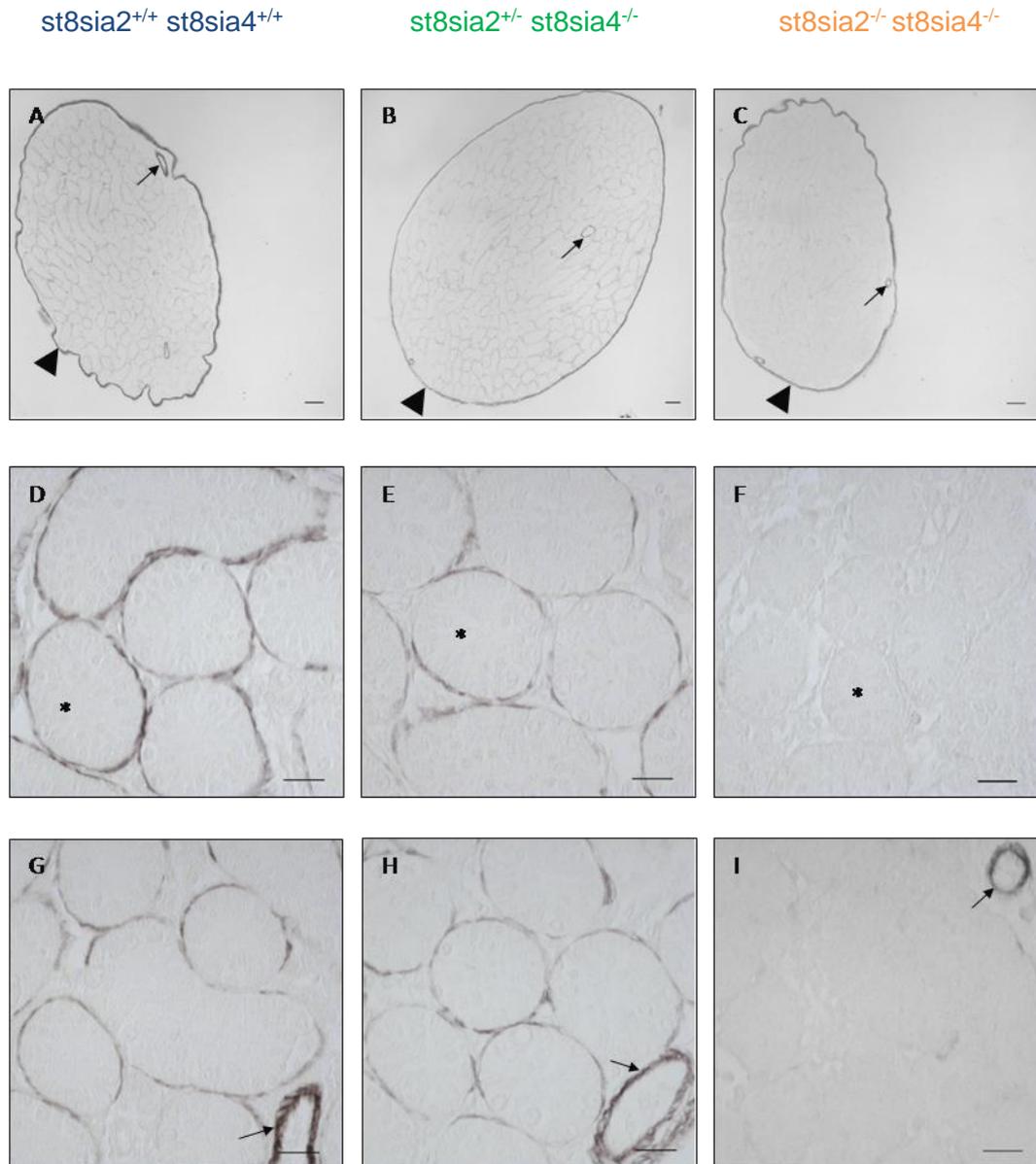


Abbildung 14: Untersuchungen der glatten Muskulatur und Vergleich der drei Gruppen bezüglich der Calponin-Expression

In den Übersichtsvergrößerungen (A, B, C) wurden exemplarisch jeweils Blutgefäße (Pfeil) und die Tunica albuginea (Pfeilkopf) markiert. In den höheren Vergrößerungen (D, E, F) wurde jeweils ein Tubulus seminiferus (Stern) und jeweils ein Blutgefäß (G, H, I) markiert (Pfeil). Die immunhistochemische Färbung der glatten Muskelzellen (schwarz) erfolgte durch den Einsatz eines anti-Calponin-Antikörpers. Dabei wurden gleich starke Färbungen in der Tunica albuginea (Pfeilkopf) und den Blutgefäßen (Pfeil) aller Gruppen detektiert (A-C). Letztere dienen gleichzeitig als positive interne

Kontrolle. Die peritubulären Muskelzellen der Wildtypen und Heterozygoten zeigten eine gleichmäßig starke Calponin Färbung. Im Gegensatz dazu ist ein kompletter Verlust der Calponin-Expression in den Knockout-Mäusen zu sehen (F, I). Größenbalken A-C; 100 µm, D-I; 20 µm. Abbildung modifiziert aus (Hachem et al. 2021).

Der in Abbildung 14 dargestellte Vergleich zeigt das fast komplette Fehlen der Calponin-Expression in den Tubuli seminiferi der Knockout-Gruppe (Abbildung 14 F, I). Im Gegensatz dazu konnte kein Unterschied zwischen den Wildtypen und Heterozygoten detektiert werden (Abbildung 14 D, E, G, H). In allen Gruppen waren die Tunica albuginea (Abbildung 14) und Blutgefäße (G-I) stets angefärbt, so dass in jedem der Hodenschnitte von einer gelungenen spezifischen Calponin-Färbung ausgegangen werden kann.

Die bisherigen Färbungen zeigten Unterschiede der glatten Muskulatur bzw. der Tubuli seminiferi in den drei Gruppen. Dabei wurden diese hinsichtlich des Strukturproteins SMA und des Muskeldifferenzierungsmarkes Calponin untersucht. Es können also Aussagen über den Phänotyp und den Entwicklungsstand der Muskulatur getroffen werden. Bisher wurden allerdings keine Proteine, die in Kontraktion bzw. Relaxation involviert sind, untersucht. So ist es denkbar, dass die herausgefundenen Unterschiede zu keinerlei Funktionsverlust der Muskulatur führen. Um dieser Problematik nachzugehen, wurde die folgende immunhistochemische Färbung gegen PKG I durchgeführt. Als eines der wichtigsten Proteine für die Relaxation der glatten Muskulatur ist PKG I ein ausgezeichneter Marker für die Funktionalität dieser.

3.3.4 Immunhistochemische PKG I-Färbung

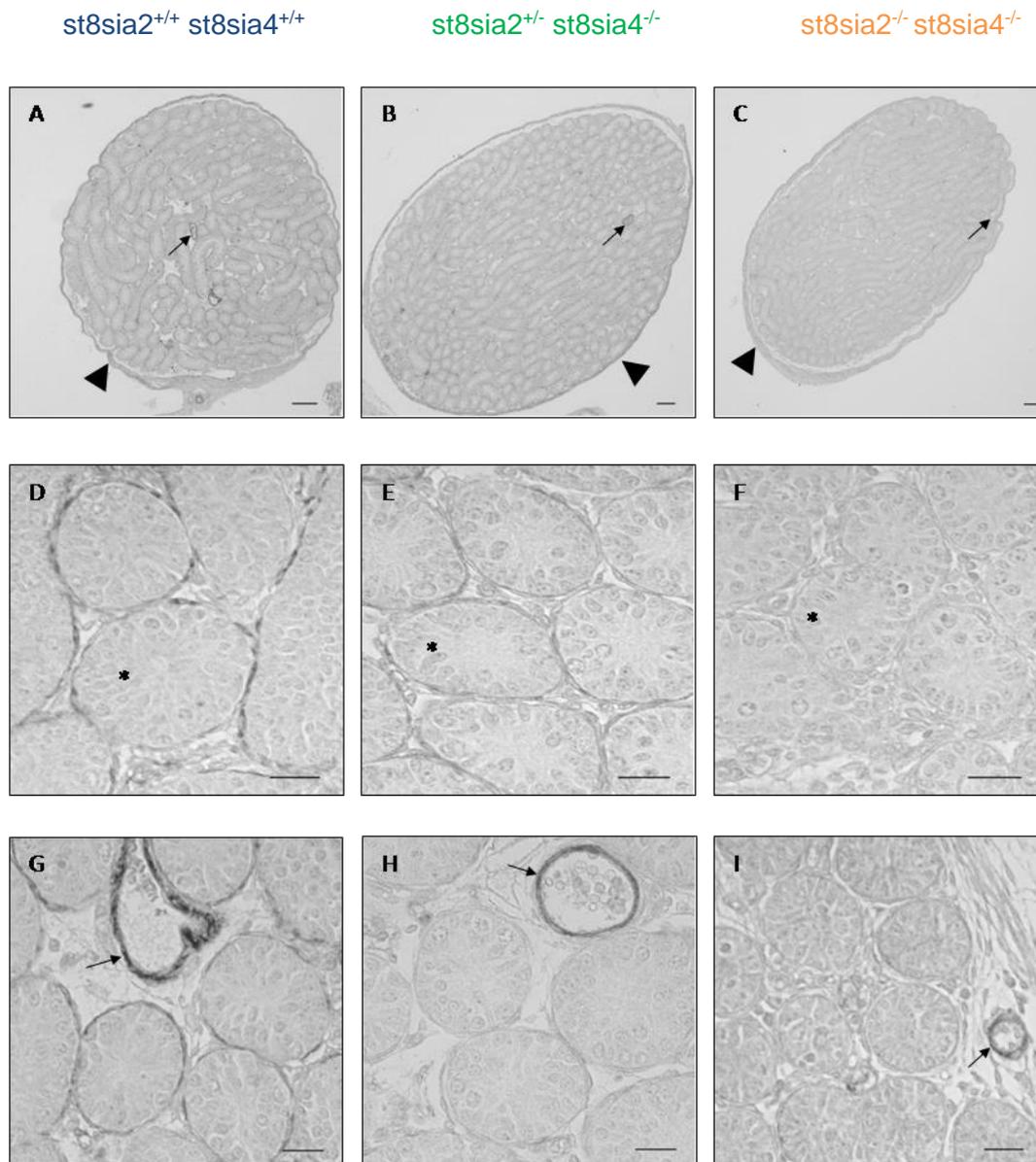


Abbildung 15: Untersuchungen der glatten Muskulatur und Vergleich der drei Gruppen bezüglich der PKG I-Expression

In den Übersichtsvergrößerungen (A-C) wurden exemplarisch jeweils Blutgefäße (Pfeil) und die Tunica albuginea (Pfeilkopf) markiert. In den höheren Vergrößerungen (D-F) wurde jeweils ein Tubulus seminiferus (Stern) und jeweils ein Blutgefäß (G-I) markiert (Pfeil). Die immunhistochemische Färbung der glatten Muskelzellen (schwarz) erfolgte durch den Einsatz eines anti-PKG I-Antikörpers. Dabei wurden unterschiedlich starke Färbungen der glatten Muskulatur der Blutgefäße detektiert. Die stärkste Färbung ist in der Wildtyp-Gruppe zu sehen, wobei die Heterozygoten und Knockouts ähnlich

schwächer waren. Dennoch dienten die Blutgefäße als positive interne Kontrolle. Die Tunica albuginea der Wildtypen ist eindeutig PKG I-positiv, wobei die der Heterozygoten und Knockouts PKG I-negativ sind. Die peritubulären Muskelzellen der Wildtypen sind überwiegend PKG I-positiv. Im Gegensatz dazu ist ein kompletter Verlust der PKG I-Expression in den Heterozygoten- und Knockout-Mäusen zu erkennen (E, F, H, I). Größenbalken A-C; 100 µm, D-I; 20 µm. Abbildung modifiziert aus (Hachem et al. 2021).

Die bisherigen Immunhistochemie- und Immunfluoreszenz-Färbungen konnten keine Unterschiede der glatten Muskulatur zwischen den Wildtypen und Heterozygoten zeigen. Durch die PKG I-Färbung war dies das erste Mal möglich (Abbildung 15). Auch wenn die vorherigen Calponin- und SMA-Färbungen der Wildtypen deutlich kräftiger als die PKG I-Expression der Wildtypen sind, so können trotzdem PKG I-positiv peritubuläre Muskelzellen gesichtet werden (Abbildung 15 D, G). In der Heterozygoten-Gruppe lassen sich vereinzelt ein paar PKG I-positiv peritubuläre Zellen ausmachen (Abbildung 15 E), jedoch stehen diese in keinem Vergleich zu den Wildtypen. Die peritubulären Muskelzellen der KOs exprimieren kein PKG I (Abbildung 15 F, I). Weiter ist ebenfalls in der Tunica albuginea der beiden genveränderten Gruppen keine Expression von PKG I zu sehen (Abbildung 15 B, C). Lediglich die glatte Muskulatur der Blutgefäße zeigt PKG I-Positivität (Abbildung 15 B-C, H-I). Vergleicht man sie jedoch mit den Blutgefäßen der Wildtyp-Gruppe (Abbildung 15 A, G) sind sie deutlich schwächer gefärbt. Es konnte also gezeigt werden, dass nicht nur das Strukturprotein SMA, der Muskeldifferenzierungsmarker Calponin, sondern auch ein für die Funktionalität der glatten Muskulatur elementares Protein, die PKG I, deutlich schwächer in der Knockout-Gruppe exprimiert wird. Hinsichtlich des Relaxationsmarkers PKG I waren diese Ergebnisse auch in der Heterozygoten-Gruppe detektiert worden.

3.4 Auswertungen zur Proliferation der peritubulären Muskelzellen

Die durchgeführten Färbungen brachten neue Erkenntnisse über das Expressionsverhalten der peritubulären Muskulatur von Polysialyltransferase-defizienten Mäusen. Aufgrund des teilweisen bzw. kompletten Verlustes der Muskelmarker stellte sich die Frage, ob diese Situation eine temporäre oder dauerhafte sein könnte. In dem einen möglichen Szenario könnte die Fähigkeit der Teilung und eventuell auch der Differenzierung von peritubulären Muskelzellen eingeschränkt sein, so dass keine neuen Zellen dieser Art entstehen. Ebenso denkbar ist eine kompensatorisch gesteigerte Proliferation der minderexprimierenden Muskelzellen, um den Verlust an funktionsfähigen Zellen auszugleichen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden an den drei Gruppen Färbungen durchgeführt, die proliferierende Zellen markieren. Einen ersten Überblick liefert Abbildung 16.

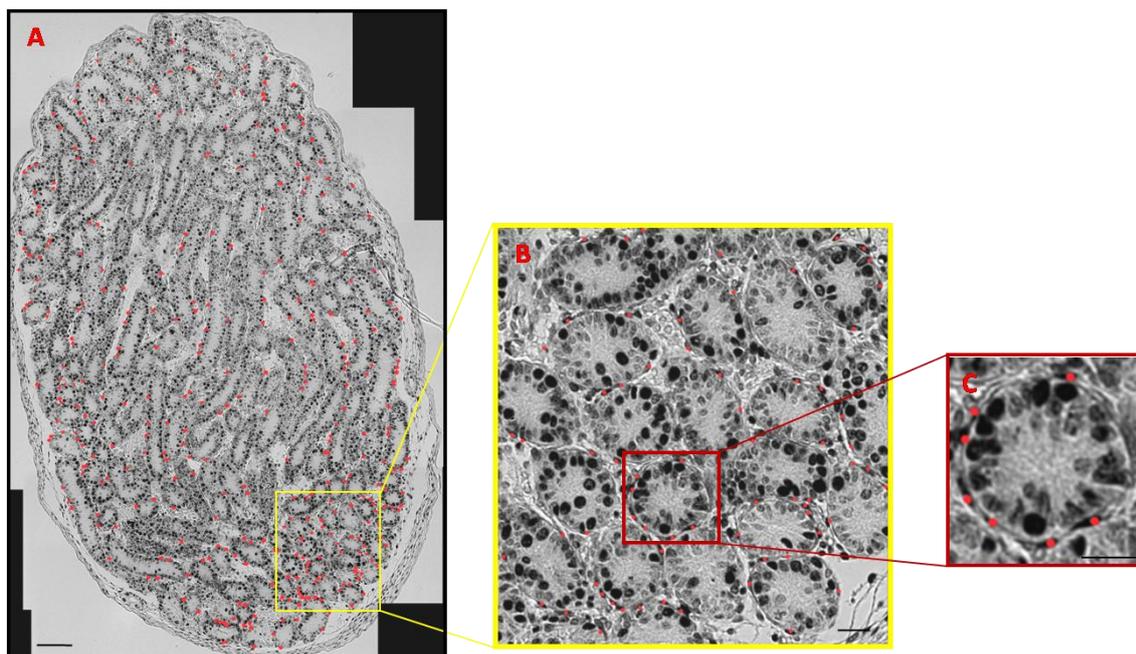


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung der proliferierenden peritubulären Muskelzellen im Hodenanschnitt einer Knockout-Maus

In der Gesamtübersicht (A) des Hodenanschnittes sieht man die proliferierenden Zellen durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen das proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in schwarz gefärbt. Die proliferierenden, PCNA-positiven peritubulären Muskelzellen sind mit einem roten Punkt versehen. Die Vergrößerungen (B und C) zeigen Tubuli seminiferi im Querschnitt. Deren Wand besteht aus einer einzelnen

Zellschicht, die aus peritubulären Muskelzellen gebildet wird. Auch hier sieht man die proliferierenden Muskelzellen mit einem roten Punkt. Durch die starke Vergrößerung in C erkennt man die typische Morphologie der Muskelzellen. Bei allen drei Vergrößerungen erkennt man auch eine große Zahl von PCNA-positiven Zellen innerhalb des Keimepithels. Größenbalken; A=100 µm, B und C=20 µm. Abbildung modifiziert aus (Hachem et al. 2021).

Anhand von morphologischen und topographischen Kriterien wurden die zu untersuchenden Zelltypen, die peritubulären Muskelzellen, identifiziert. Da die Wand der Tubuli seminiferi von Mäusen aus einer einzigen Schicht Muskelzellen besteht, konnten nur diejenigen Zellen in Betracht kommen, die sich direkt um das Keimepithel befinden. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass nur Zellen ausgewählt werden, die ein typisches zigarrenförmiges Aussehen besitzen. Abweichungen dieses Phänotyps sind jedoch unvermeidbar und lassen sich durch die 5µm dicken Präparate des Hodengewebes erklären. So kann ein und dieselbe Zelle auf zwei aufeinander folgenden Schnitten zu sehen sein. Folglich kann die typische Morphologie dieser Zelle nicht erhalten bleiben.

Die Mäuse der WT, HT und KO waren allesamt 9,5 Tage alt. In diesem postnatalen Stadium ist eine hohe Anzahl von proliferierenden Zellen selbstverständlich, was in der Abbildung 16 unschwer zu erkennen ist. Bei gründlicherer Betrachtung, vor allem im Vergleich der drei Gruppen, lassen sich genauere Aussagen bezüglich der Proliferation treffen. In der nachfolgenden Abbildung sollte das Hauptaugenmerk auf die peritubulären Muskelzellen gelegt werden (Abbildung 17).

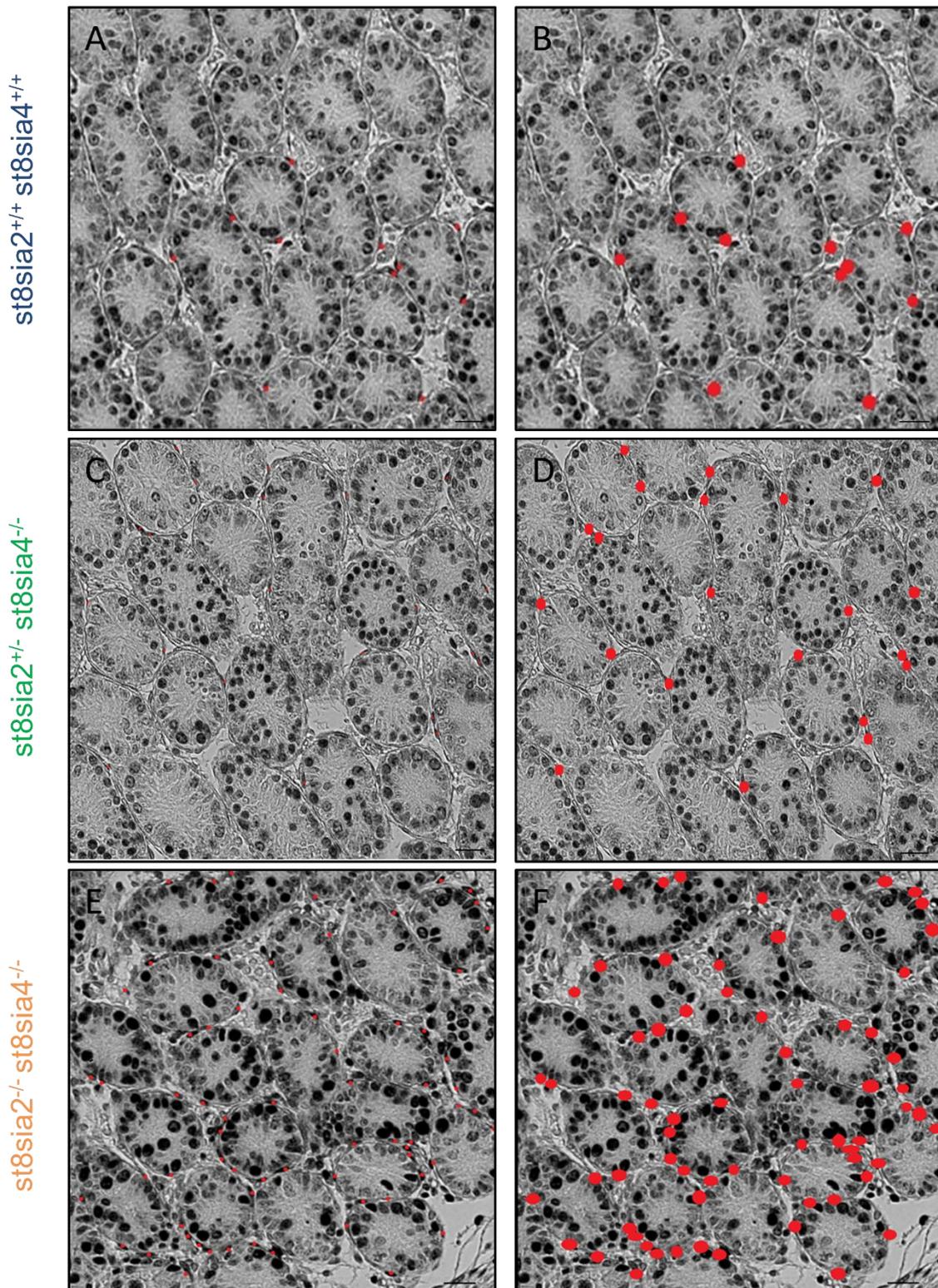


Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der proliferierenden peritubulären Muskelzellen in den drei Gruppen

Proliferierende Zellen wurden mit einem Antikörper gegen PCNA sichtbar gemacht. Ausgewertet wurden in dieser Untersuchung ausschließlich die peritubulären Muskelzellen. Diese sind unter den kleinen roten Punkten noch eindeutig zu erkennen

(A, C, E). Um den visuellen Effekt der unterschiedlich starken Proliferation zwischen den Mauslinien zu verdeutlichen, wurden die PCNA-positiven peritubulären Muskelzellen mit größeren roten Punkten markiert (B, D, F). Die Gruppe der Wildtypen haben die niedrigste Proliferation, in der Mitte befinden sich die Heterozygoten und die Gruppe der KOs haben eine deutlich höhere Proliferation als die beiden anderen Gruppen. Größenbalken; 20 μm . Abbildung modifiziert aus (Hachem et al. 2021).

Die Abbildung 17 zeigt eindrücklich, dass die Gesamtheit aller Zellen der Wildtypen erwartungsgemäß stark proliferierte. Ein Vergleich mit den HTs zeigte, dass diese mehr proliferierende peritubuläre Muskelzellen aufweisen als die WT. Zusätzlich, jedoch ohne visuelle Bestätigung via roter Punkte, wirken die Keimzellen der HTs schwächer gefärbt als die der WT und KOs. Vergleicht man nun die PCNA-positiven peritubulären Muskelzellen der WT und HTs mit denen der KOs, so ist ebenfalls klar zu erkennen, dass die Knockout-Gruppe stärker proliferierte. Diesem optischen Eindruck wurde mit einer statischen Auswertung Nachdruck verliehen (Abbildung 18).

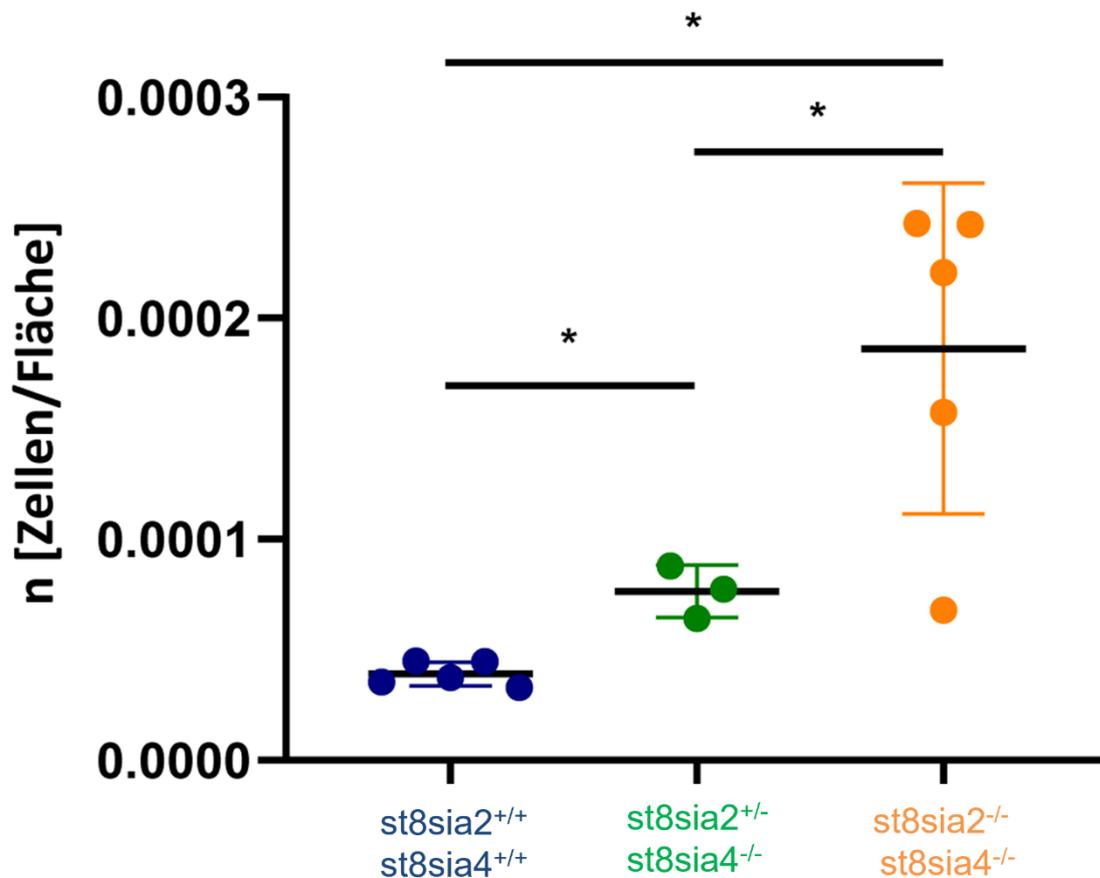


Abbildung 18: Statistische Auswertung der proliferierenden peritubulären Muskelzellen

Wie bereits im Material- und Methoden- Teil ausführlich beschrieben, wurden die PCNA-positiven peritubulären Muskelzellen eines Schnittes ausgezählt und durch die Tubulusfläche geteilt. Somit ergab sich für jeden Schnitt eine bestimmte Zahl proliferierender Zellen pro Fläche in μm^2 (n), was in der Y-Achse zu sehen ist. Es wurden 15 Schnitte der WTs (st8sia2^{+/+}; st8sia4^{+/+}) und 15 Schnitte der KOs (st8sia2^{-/-}; st8sia4^{-/-}) sowie 9 Schnitte der HTs (st8sia2^{+/-}; st8sia4^{-/-}) statistisch ausgewertet. Die höchste Proliferation hatten die Knockout-Mäuse, gefolgt von den Heterozygoten. Die schwächste Proliferation hatten die Wildtypen. Das Ergebnis der statistischen Auswertung ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen drei Gruppen. *, P<0.05. Diagramm modifiziert aus (Hachem et al. 2021).

Sowohl der visuelle Eindruck als auch die statistische Auswertung zeigten eine eindeutig höhere Proliferation der peritubulären Muskelzellen in der Knockout-Gruppe gegenüber der Wildtyp- und Heterozygoten-Gruppe. Möchte man nun das Ergebnis der statistischen Auswertung einfacher beschreiben, so kann man die Proliferation der WTs auf 1 (100%) setzen. Im Verhältnis dazu proliferieren die KOs 4,75-mal so viel, also 475% und die HTs 1,95-mal so viel, also 195%. Die Knockouts proliferieren zudem 2,43-mal mehr als die Heterozygoten, also 243%. Die prozentualen Angaben wurden aus den durchschnittlichen Proliferationen n (Zellen/Fläche in μm^2) der einzelnen Gruppen bestimmt (Für die WTs: 0,0000391441; für die HTs: 0,0000764938; Für die KOs: 0,000186). Die drei Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich der proliferierenden peritubulären Muskelzellen signifikant voneinander.

3.5 Auswertungen zum interstitiellen Raum

Aufgrund der Beobachtungen in Kapitel 3.1, bei denen in der Knockout-Gruppe ein vergrößerter interstitieller Raum festgestellt werden konnte, wurde eine statistische Auswertung dieser Flächen durchgeführt. Für die „Auswertungen zur Proliferation der peritubulären Muskelzellen“ (Kapitel 3.4) wurden ohnehin diese Flächen bestimmt (Kapitel 2.8.3). Denn um die reinen Tubulusflächen zu erhalten, welche für die Auswertungen der Proliferation notwendig waren, mussten von den Gesamtflächen eines jeden Hodenschnittes die interstitiellen Flächen abgezogen werden. Diese angefallenen Daten konnten nun für eine statistische Auswertung genutzt werden. In Abbildung 9 ist eine exakte Messung des intertubulären bzw. interstitiellen Raums zu sehen. Die statistische Auswertung ist in Abbildung 19 als Graph dargestellt.

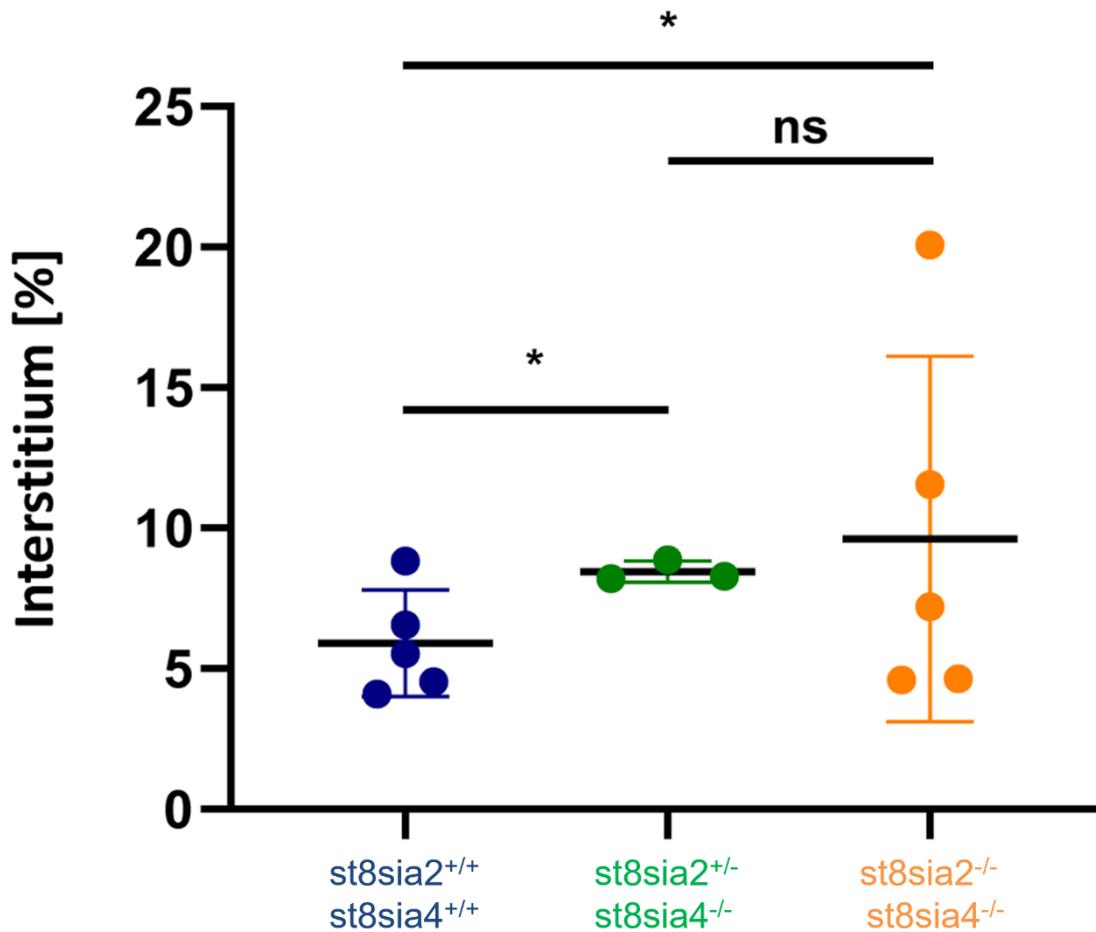


Abbildung 19: Statistische Auswertung des interstitiellen Raumes

Es wurden die interstitiellen Flächen von 15 WT, 9 HTs und 15 KOs bestimmt und deren Mittelwerte miteinander verglichen. Auf der Y-Achse sieht man den prozentualen Anteil des Interstitiums am Hodenschnitt. Den geringsten Anteil, also die höchste Dichte an tubulären Strukturen haben die WT. Ein prozentual größeres Interstitium hat die Gruppe der HTs. Noch größer ist das Interstitium der KOs. Sowohl KO als auch HT unterscheiden sich signifikant von den WT; zwischen den KOs und HTs gibt es keinen signifikanten Unterschied. *, $P < 0.05$.

Der eingangs in der Azan-Färbung beobachtete verbreiterte interstitielle Raum in der Knockout-Gruppe konnte durch statistische Auswertung bestätigt werden. Es ergab sich für den prozentualen Anteil des Interstitiums an der Gesamtfläche einen signifikanten Unterschied zur Wildtypen-Gruppe. Des Weiteren konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Heterozygoten und den Wildtypen festgestellt werden,

welcher optisch nicht erkennbar war. So lässt sich zusammenfassen, dass sowohl die partiell als auch die komplett Polysialyltransferase-defizienten Mäuse ein vergrößertes Interstitium im Vergleich zu den Wildtypen besitzen.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit testikulären Veränderungen in Polysialyltransferase-defizienten Mäusen. Im Speziellen wurde auf die peritubulären Bereiche eingegangen, da in einem ersten Ergebnis dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass diese bis zum zehnten postnatalen Tag PolySia exprimieren. Eine Übersichtsaufnahme zeigte bis auf eine leichte Erweiterung des interstitiellen Raumes in der Knockout-Gruppe keine strukturellen Unterschiede des Hodengewebes. Durch immunhistochemische Färbungen sowie Immunfluoreszenzuntersuchungen ließen sich deutliche Unterschiede in den peritubulären Muskelzellen der Heterozygoten und Knockouts im Vergleich zu den Wildtypen zeigen. So konnte eine geringgradig schwächere SMA-Färbung in der Knockout-Gruppe im Vergleich zur gleich starken SMA-Expression der Wildtypen und Heterozygoten detektiert werden. Durch weitere Immunfluoreszenz-Färbungen ließ sich dieser Unterscheid deutlicher darstellen. Färbungen mit dem Muskeldifferenzierungsmarker Calponin zeigten die eindrucklichsten Ergebnisse dieser Muskeluntersuchungen. Während die Wildtypen und Heterozygoten gleichermaßen starke Calponin-Expressionen zeigten, hatten die Knockouts einen erheblichen Verlust des Muskelmarkers zu verzeichnen. Ähnlich beeindruckend zeigten sich die Ergebnisse der PKG I-Färbung, bei der ausschließlich die Wildtypen eine positive Immunreaktion in den Tubuli seminiferi zeigten. Sowohl die Heterozygoten als auch die Wildtypen zeigten dort kein positives Signal. Da bei allen drei Gruppen und Antikörpern die glatten Muskelzellen der Blutgefäße ebenfalls gefärbt waren, dienten diese stets als positive interne Kontrolle. Somit lässt sich die Aussage treffen, dass das Abhandensein von PolySia die normale peritubuläre, aber nicht die vaskuläre, Muskelzellentwicklung beeinträchtigt. Weniger ausgeprägt sind die peritubulären Ergebnisse, wenn noch ein Allel der Polysialyltransferase *st8sia2* vorhanden ist. Ebenfalls führte der Verlust von PolySia zu einem veränderten Proliferationsverhalten der peritubulären Muskelzellen. Es konnte mit statistischer Signifikanz eine deutlich höhere Proliferation der peritubulären Muskelzellen der Knockouts und der Heterozygoten im Vergleich zu den Wildtypen-Mäusen festgestellt werden. Abschließend konnte gezeigt werden, dass der verbreiterte interstitielle Raum in den Knockouts und Heterozygoten signifikant größer als in der Wildtyp-Gruppe war.

Ebenfalls zeigte sich ein prozentual größerer Anteil des Interstitiums an der Gesamtfläche in den Heterozygoten verglichen mit den Wildtypen.

4.2 Peritubuläre PolySia-Expression und Veränderungen durch den partiellen und kompletten Knockout der Polysialyltransferasen

In einer Vorgängerarbeit konnte gezeigt werden, dass die SMA-positive Muskulatur des murinen Nebenhodens ebenfalls PolySia exprimiert (Simon et al. 2015). Durch immunhistochemische und Western Blot-Untersuchungen wurde die stärkste PolySia-Aktivität direkt postnatal (Tag 1) detektiert und eine kontinuierliche Abnahme dieser bis zum postnatalen Tag 25 festgestellt. Immunhistochemisch war ab Tag 10 PolySia nur noch in wenigen Bereichen eines Hodenquerschnittes nachweisbar (siehe Abbildung 11), so dass man schon hier von einer Herunterregulierung der Polysialyltransferase-Aktivität ausgehen kann. Das hier untersuchte Mausmodell beinhaltete Tiere etwa in diesem Alter. Durch Weinhold et al. (2005) wurden erstmals Versuche und Ergebnisse mit Polysialyltransferase-defizienten Mäusen publiziert. Am ersten postnatalen Tag zeigten sich bezüglich der Größe und des Gewichts keine signifikanten Unterschiede zwischen den Knockouts und den Heterozygoten bzw. Wildtypen. Im Laufe der darauffolgenden Lebenswochen wuchs die Diskrepanz der Gruppen, so dass signifikant leichtere und deutlich kleinere Mäuse in den Knockouts zu verzeichnen waren (Weinhold et al. 2005). Diese generelle Wachstums- und Gedeihstörung konnte mittels histologischer Untersuchungen des Hodenparenchyms um den postnatalen Tag 10 nicht bestätigt werden. Es zeigten sich keine strukturellen Unterschiede im Hinblick auf die Tubuli seminiferi.

In den Polysialyltransferase-defizienten Mäusen wurden von Weinhold et al. deutlich verbreiterte dritte und vierte Hirnventrikel entdeckt. Dieses Mehrangebot an Flüssigkeit, sei es durch eine verstärkte Produktion oder einen verminderten Abtransport, führte zu dem Bild eines Hydrocephalus, welcher einen möglichen Grund für den Tod der Tiere darstellte. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass in der vorliegenden Arbeit bei einem Fehlen von PolySia ein vergrößerter interstitieller Raum im Hoden zu finden war. Dies war an histologischen Schnitten sichtbar und ließ sich auch statistisch bestätigen. Es ist gut denkbar, dass es sich auch hier um ein Mehrangebot an Flüssigkeit handelt.

Bezogen auf zerebrale Veränderungen konnten auch beim Menschen in einer Gruppe von Schizophrenie-Patienten zwei *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs, Einzel-Nukleotid-Polymorphismus) in der kodierenden Region von ST8Siall gefunden werden, die mit einer Reduzierung der Enzymaktivität einhergehen. Die mutierte Version von ST8Siall synthetisiert sowohl eine geringere Anzahl an PolySia-Ketten als auch kürzere Ketten. Auch ST8Siall-Knock-Out-Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie Schizophrenie-Patienten (Kröcher et al. 2015). Ob die Patienten mit solchen SNPs auch eine veränderte Fertilität aufweisen, ist jedoch bisher nicht bekannt. Ebenso wäre es von großem Interesse die Fertilität der unterschiedlichen Polysialyltransferase-Knock-Out-Mäuse im Detail zu untersuchen.

In der Arbeit von Weinhold et al. (2005) wurden bis auf eine reduzierte Gliedmaßenmuskulatur (Skelettmuskulatur) keine Einschränkungen in der restlichen Muskulatur festgestellt. Dabei wurden u.a. Herz und Darm, die über eine stark ausgeprägte Herz- bzw. glatte Muskulatur verfügen, untersucht. Dabei konnten keinerlei Unterschiede zu den gesunden detektiert werden. Somit konnte die vorliegende Arbeit erstmals Defizite der glatten Muskulatur in Polysialyltransferase-defizienten Mäusen zeigen. Diese zeigte sich in der Wand der Tubuli seminiferi, welche von den peritubulären Muskelzellen gebildet wird.

Eine solche Reduzierung bzw. Verlust von Muskelzellmarkern in den peritubulären Muskelzellen zeigte sich auch bei Patienten mit einer „Mixed Atrophy“, also Menschen mit eingeschränkter Spermatogenese bzw. Infertilität jeglicher Ursache (Welter et al. 2013). Somit ist es möglich, dass die in der Arbeit verwendeten Polysialyltransferase-defizienten Mäuse (Heterozygote und Knockouts) durch die Minderexpression bzw. den kompletten Verlust von essentiell wichtigen Muskelzellproteinen wie SMA, Calponin und PKG I eine eingeschränkte Fertilität besitzen.

Beim Menschen ist Infertilität bei gestörter Spermatogenese sehr häufig auch mit einer Verdickung der peritubulären Lamina propria verbunden, die im Wesentlichen auch kontraktile Zellen enthält (Volkman et al. 2011; Welter et al. 2013). Dabei ist bisher unklar, ob die gestörte Spermatogenese sekundär zu einer Veränderung der Lamina propria führt, oder ob es auch Fälle gibt, bei denen eine Fibrosierung der Lamina propria zu gestörter Spermatogenese führt. Da PolySia selbst nicht in den Keimzellen zu finden ist, sondern nur in der peritubulären Muskulatur, ist der Nachweis einer geringeren Keimzellproliferation (eigene, noch nicht gezeigte Ergebnisse) bei der PolySia-Knockout-Maus ein erster wichtiger Beleg dafür, dass die Keimzellveränderung auch durch die peritubuläre Muskulatur bedingt sein kann. Bei

der pathologischen Bewertung infertiler Patienten bedeutet dies, dass auch eine Dedifferenzierung der peritubulären Muskulatur Ursache sein kann für eine sichtbare Spermatogenesestörung. Dies ist somit auch ein für die pathologische Diagnostik wichtiger Befund.

Als ein möglicher Kompensationsmechanismus der defizitären peritubulären Muskelzellschicht könnte die Proliferationszunahme der peritubulären Muskelzellen in der Gruppe der Knockouts zu werten sein. So könnte angenommen werden, dass eine reduzierte Funktion der peritubulären Muskulatur durch eine Mehrproduktion intakter Muskelzellen ausgeglichen werden soll. Ein vergleichbarer Mechanismus im Hoden existiert z.B. im Zusammenhang mit Hodentumoren, wie dem Seminom. So findet sich bei dem durch den Tumor zerstörten Keimepithel eine Zunahme der Leydigzellzahl (Schulze 1984), womit (vergeblich) versucht werden soll über ein Mehr an Testosteron die Keimzellbildung wieder anzuregen.

Als eines der wichtigsten Strukturproteine der glatten Muskulatur gilt SMA (Jaslove und Nelson 2018). Dieses wird in der Gruppe der Knockouts im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen nur leicht vermindert exprimiert, so dass hinsichtlich der Struktur der Tubuli seminiferi von keinen nennenswerten Unterschieden gesprochen werden kann. Anders verhält es sich bei der Untersuchung der Muskulatur mit Calponin. Das als Muskeldifferenzierungsmarker bekannte Protein (Duband et al. 1993; Gomez und Owens 2012; Tang et al. 2012) findet sich in den Wildtypen und Heterozygoten gleichmäßig stark exprimiert, während in der Knockout-Gruppe ein deutlicher Verlust zu erkennen ist (siehe Abbildung 14). Folglich bedeutet es, dass sich die Entwicklung der peritubulären Muskulatur in der Heterozygoten-Gruppe nicht (zu diesem Zeitpunkt nicht; eventuell treten die Unterschiede davor oder danach auf) von der Entwicklung der Wildtyp-Gruppe unterscheidet. Eine deutliche Muskeldifferenzierungsverzögerung lässt sich aber in den Knockouts erkennen. Interessanterweise beschränkt sich dieses Ergebnis ausschließlich auf die peritubulären Bereiche, wobei die Muskulatur der Tunica albuginea und der Blutgefäße davon nicht betroffen ist. Auch könnte der retardierte Entwicklungsstand der peritubulären Muskulatur der Grund für die stärkere Proliferation bei den Knockouts sein. Die unreifere und weniger differenzierte Muskulatur würde somit verständlicherweise deutlich stärker proliferieren als die weiterentwickelte und ausgereifere Muskulatur bei den Heterozygoten und Wildtypen.

Bezüglich der PKG I-Färbungen fanden sich im Unterschied zu den vorangegangenen Untersuchungen erstmalig vergleichbare Färbemuster bei Heterozygoten und

Knockouts, die sich deutlich von den Wildtypen unterscheiden. Das für die Relaxation der glatten Muskulatur bedeutende Protein (Wernet et al. 1989; Pfeifer et al. 1999) war in den Tubuli seminiferi der beiden genveränderten Mäuse-Gruppen nicht sichtbar (siehe Abbildung 15). Ebenfalls erstmalig ist eine Mitbeteiligung anderer muskulärer Strukturen als die bei den Tubuli seminiferi, nämlich in der Tunica albuginea. Hier ist PKG I im Wildtyp vorhanden, in den Heterozygoten und Knockouts jedoch nicht. Auch bei den Gefäßen gab es deutliche Unterschiede innerhalb der drei Gruppen, bei den Knockouts gab es sogar Tiere ohne jede PKG I-Färbung.

Es kann vermutet werden, dass das Fehlen von PKG I zu den oben erwähnten Verbreiterungen des interstitiellen Raumes in den Polysialyltransferase-defizienten Mäusen beiträgt.

Bisher unveröffentlichte, außerhalb dieser Dissertation entstandene Ergebnisse könnten die Vergrößerung des interstitiellen Raumes im Hoden in einem größeren Zusammenhang erscheinen lassen. So fand sich das Fehlen des für die Relaxation essentiellen Proteins PKG I bei den Knockouts auch im muskelstärkeren Nebenhodengang, was zu einer Tonuserhöhung des Ganges und einem gestörten Weitertransport der Nebenhodenflüssigkeit führen dürfte. Somit ist denkbar, dass diese Nebenhodenflüssigkeit sich bis ins Rete testis zurückstaut und dort ebenfalls zu einer Erweiterung führt. Bei gleichzeitig anzunehmender Tonuserhöhung auch der Tubuli seminiferi kann man sich gut vorstellen, dass eine vermehrte Flüssigkeitsmenge im Verbindungsglied zwischen Hoden und Nebenhoden, dem Rete testis, von diesem in das testikuläre Interstitium gelangt und zu der dort nachgewiesenen Erweiterung führt. Aktuell finden zu dieser Thematik weiterführende Arbeiten statt (nicht gezeigt).

Stärken und Limitationen der Methoden

Alle Untersuchungen und Ergebnisse der Muskulatur in den Polysialyltransferase-defizienten Mäusen wurden an ca. 9 Tage alten Tieren durchgeführt. Somit kann in dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob der Zustand der verringerten Expression sämtlicher Muskelmarker auch im höheren Lebensalter bestehen bleibt oder ob es zu einer verspäteten Normalisierung der Expression kommt, da keine Zeitreihe mit verschiedenen alten Mäusen durchgeführt werden konnte. Diese Limitation ist zum einen der frühen Sterblichkeit der Knockouts (Weinhold et al. 2005) und zum anderen der generell geringen Zahl an zur Verfügung stehenden Tieren geschuldet. Dadurch

konnten auch keine quantitativen Expressionsanalysen, z.B. Western Blot oder q-PCR, sowie funktionelle Studien durchgeführt werden. Es standen nur geringe Mengen an in Paraffin eingebetteten Material zu Verfügung. Durch die gute Etablierung der angewandten Methoden wurde ein unnötiger Verbrauch des Gewebes verhindert, so dass auch unter diesen Bedingungen valide Ergebnisse erzielt werden konnten.

4.3 Die Proliferationen der peritubulären Muskelzellen

Durch die Auswertungen der proliferierenden peritubulären Muskelzellen pro Fläche in den drei Gruppen konnte festgestellt werden, dass die Knockouts deutlich stärker proliferieren als die Wildtypen. So könnte man annehmen, dass die fehlenden Polysialyltransferasen *st8sia2* und *st8sia4* in diesem Mausmodell und damit das Fehlen von PolySia zu einer stärkeren Proliferation der peritubulären Muskelzellen führt. Berücksichtigt man die teilweisen bzw. kompletten Verluste der Muskelmarker SMA, Calponin und PKG I, so könnte man von einem möglichen Kompensationsversuch in Anbetracht der unreifen Muskulatur ausgehen. Eine solche Proliferationszunahme von peritubulären Zellen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe konnte in gängigen Kastrationsmodellen gesehen werden, bei denen FSH verabreicht oder Hemikastrationen durchgeführt wurden (Nurmio et al. 2012). In den dort untersuchten Ratten wurden am postnatalen Tag 5 die proliferierenden peritubulären Zellen pro Fläche bei FSH-behandelten, hemikastrierten und der Kontrolltieren verglichen, wobei die beiden behandelten Gruppen stärker proliferierten. Über die Proliferation der peritubulären Muskelzellen gibt es nur wenig Literatur. Es konnte allerdings an Rattenhoden gezeigt werden, dass die stärkste Proliferation der peritubulären Muskelzellen pränatal stattfindet und sich diese unmittelbar postnatal verringert. Dabei wurde an den frühen postnatalen Tagen (5, 10 und 15) deutlich mehr Proliferation detektiert als an Tag 23 und 30 (Palombi et al. 1992). Da jüngere, unreifere peritubuläre Muskelzellen deutlich mehr proliferieren und die fehlende bzw. niedrigere Expression von Calponin ebenfalls zu einem unreifen Muskelstatus passt, könnte man einen retardierten peritubulären Muskelzustand der Knockout-Gruppe annehmen. Da PolySia mit Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise bFGF (*basic fibroblast growth factor*) und BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), interagiert und deren biologische Aktivität beeinflusst, könnte hier ein möglicher Grund für die

veränderte Proliferationsrate in den Knockout-Mäusen liegen. Ein Wachstumsfaktor der sowohl peritubuläre Zellen als auch die Spermatogenese beeinflusst ist TGF- β (Skinner und Moses 1989; Holstein und Davidoff 1996). Das von den peritubulären Zellen exprimierte TGF- β könnte als autokriner Stimulus für die zelleigene Proliferation dieser Zellen dienen und gleichzeitig die Proliferation der Keimzellen beeinflussen. Die in der Knockout-Gruppe erhöhte Proliferation der peritubulären Muskelzellen könnte mit einer erhöhten TGF- β -Expression zusammenhängen, welches wiederum eine hemmende Wirkung auf die Spermatogenese hat (Mullaney und Skinner 1993).

Ein weiteres, jedoch keinesfalls beweisendes Zeichen für eine eingeschränkte Spermatogenese könnte die geringere Proliferation der Keimzellen in der Knockout-Gruppe sein (nicht gezeigt). So würden sich Untersuchungen bezüglich des Expressionsverhaltens von TGF- β , aber auch anderen Wachstumsfaktoren wie Inhibin B, in den drei Gruppen lohnen. Es konnte nämlich eine Korrelation zwischen dem Grad der Spermatogeneseschäden und niedrigen Inhibin B-Werten festgestellt werden (Meachem et al. 2001). Bisher völlig außer Acht gelassen sind physiologische Einflüsse auf die Spermatogenese von den hier aufgeführten Wachstumsfaktoren sowie verschiedenen Hormonen, die sich peripubertär verändern. Da sich die untersuchten Tiere noch vor der Pubertät befanden, lassen sich generelle Aussagen bezüglich der Fertilität durch die hier erbrachten Ergebnisse nur schwer treffen. Es konnte jedoch eindeutig ausgeschlossen werden, dass die Polysialyltransferase-defizienten Mäuse eine komplett eingeschränkte Proliferation der Keimzellen zu dem präpubertärem Untersuchungszeitpunkt haben (nicht gezeigt). Die Knockouts proliferieren aber weniger als die Wildtypen.

Stärken und Limitation der Methoden

Durch immunhistochemische Vorversuche konnten die richtigen Antikörperkonzentrationen und Entwicklungszeiten von Anti-PCNA ermittelt werden. Dadurch ließen sich, wie auch in den immunhistochemischen Untersuchungen der Muskulatur, sowohl Material als auch Zeit einsparen und valide Ergebnisse erzielen. Die fotografierten Hodenschnitte konnten mit AxioVision aufgenommen und die Flächen dieser manuell ausgemessen werden. Die von der Gesamtfläche abgezogene interstitielle Fläche wurde ebenfalls manuell bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass mit

steigender Vergrößerung des Bildes, vor allem die interstitiellen Flächen genauer ausgemessen werden können. Es konnte festgestellt werden, dass eine Vergrößerung des Bildes um den Faktor 2 zwar zu marginal genaueren Messungen führte, sich die Bearbeitungszeit aber dafür verdoppelte. Eine Limitation des Computerprogrammes konnte zwischen zwei dicht anliegenden Tubuli seminiferi entdeckt werden. Wollte man die Fläche eines Areals bestimmen, so musste man mit dem Cursor an einer Stelle beginnen und die zu messende Kontur durch weitere Mausklicke umfahren. Bei nur spaltförmigen intertubulären Räumen (Abbildung 20, schwarze Pfeile) führten Umrandungen nicht zu messbaren Flächen, sondern zur Darstellung einer Linie. Diese kleinsten Flächen konnten deswegen nicht berücksichtigt werden.

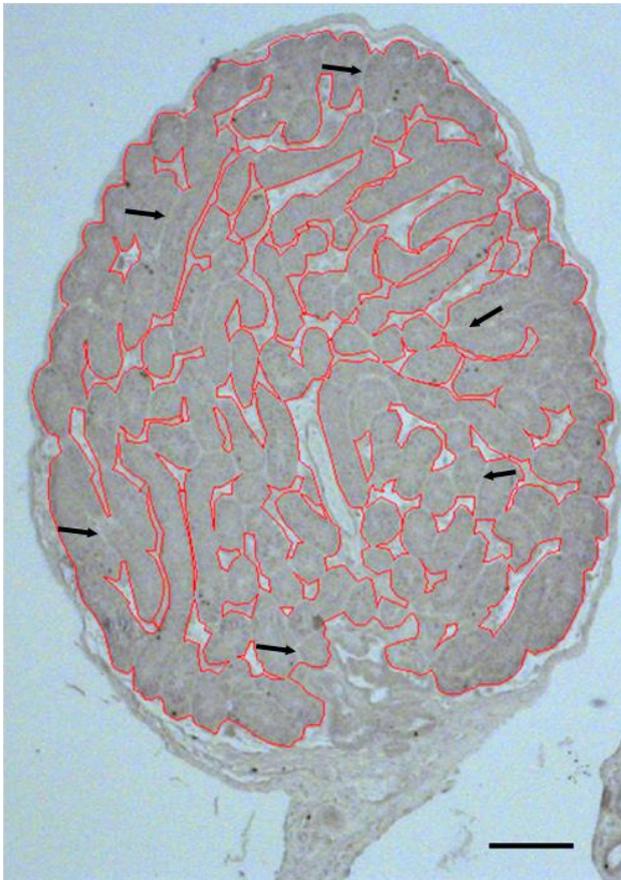


Abbildung 20: Übersichtsaufnahme eines Hodenanschnittes zur Ermittlung der Tubulusfläche mit Limitationen der Messung

In einer Modifikation der Abbildung 9 im Methodenteil, wo dieses Bild zur Veranschaulichung der ausgemessenen Tubulusfläche diente, wurden hier mit schwarzen Pfeilen beispielhaft intertubuläre Spalträume markiert, deren Umrandung trotz Nutzung der kleinstmöglichen Strichdicke keine messbare Fläche, sondern nur

eine nicht bewertbare Linie gezeigt hätte. Deswegen wurde auf die rote Markierung dieser kleinsten Spalträume verzichtet. Größenbalken; 100 μm .

So ist die in dieser Arbeit ermittelte interstitielle Fläche etwas zu gering und die reine Tubulusfläche etwas zu groß. Diese Fehlerquelle tritt jedoch bei allen ausgewerteten Hodenschnitten aller Gruppen auf, so dass diese vernachlässigt wurde.

4.4 Muskeldifferenzierung

Die in dieser Arbeit gezeigte Proliferationszunahme der peritubulären Muskelzellen könnte, wie bereits erwähnt, Folge eines unreifen und rückständigen Muskelzustands sein. Es ist gut denkbar, dass sich die glatten Muskelzellen der Tubuli seminiferi ähnlich verhalten wie die von Blutgefäßen und sich in einen hochproliferativen, migrationsstarken und nicht-kontraktilen Phänotyp oder einen kontraktilen Typ mit schwacher Proliferation und Migration einteilen lassen (Ayoubi et al. 2017). Dabei wird nahezu einheitlich in der Literatur von einer Dedifferenzierung des muskulären in einen eher kontraktionsschwächeren, synthetischen Typ, gesprochen (Wang et al. 2015). Marker wie SMA, Calponin, smooth muscle protein 22 alpha (SM22 α), myosin light chain (MLC), Caldesmon, Desmin und einige weitere werden während der Differenzierung der glatten Muskulatur von Blutgefäßen hochreguliert. Dabei sind smooth muscle heavy chain (SM-MHC) und Smoothelin die spezifischsten Marker für kontraktile glatte Muskelzellen (Gomez und Owens 2012; Ayoubi et al. 2017; Zhang et al. 2017).

Die untersuchten Knockouts zeigen deutliche Defizite in der Expression sämtlicher Muskelmarker. Vor dem Hintergrund der verbreiterten interstitiellen Räume und den neuen Expressionsdaten beim Nebenhodengang (siehe 4.2) kann auch eine Schwächung der Kontraktilität der Tubuli seminiferi vermutet werden. Zusammen mit einem Shift zu einem kontraktionsschwächeren Muskelzelltyp in Richtung eines synthetischen.

Einen ersten Hinweis dieser Hypothese könnte die aus Abbildung 13 bekannte Grafik erbringen.

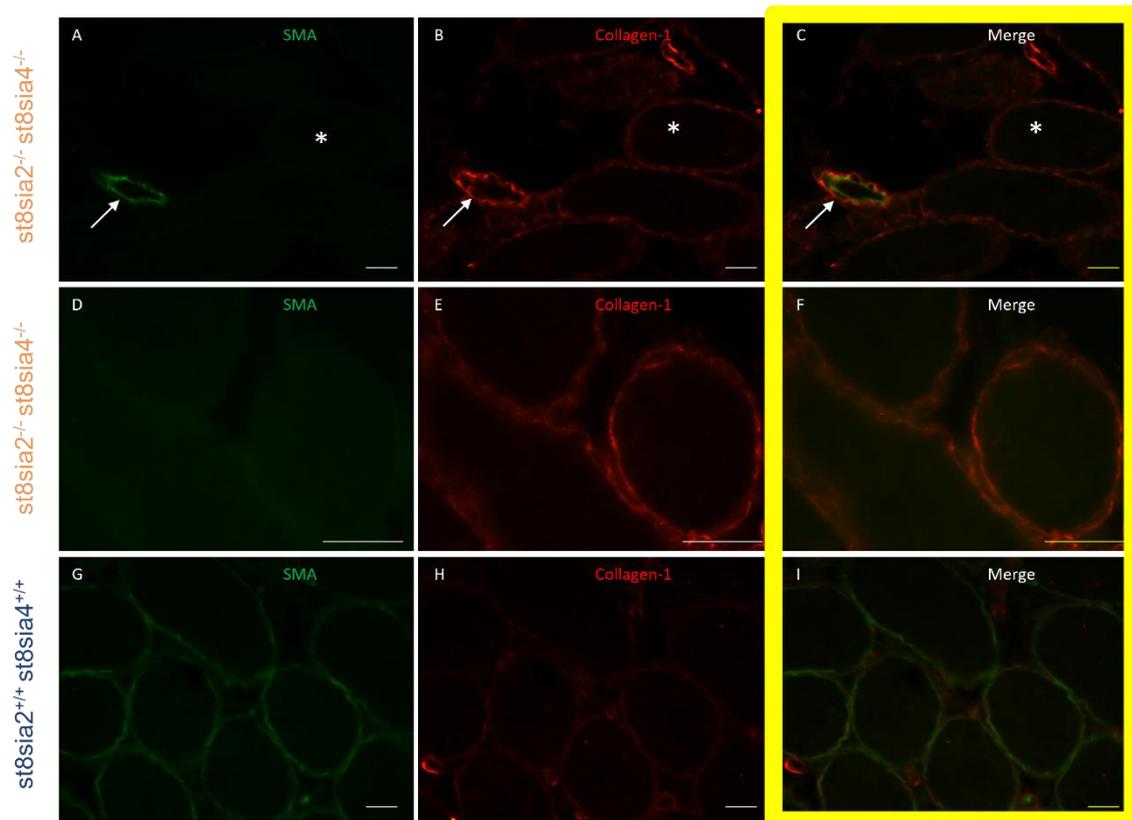


Abbildung 21: Deutlich verringerte SMA-Expression und stärkere Kollagen-1-Expression in den Knockouts

Dies ist eine leicht modifizierte Version von Abbildung 13 aus dem Ergebnisteil. Man sieht eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit SMA und Kollagen-1 an Paraffinschnitten. Die gelb umrandete Merge-Darstellung (C, F, I) soll untermauern, dass die Gruppe der Wildtypen einen eher muskulären Phänotyp der peritubulären Muskelzellen darstellen, wobei die Knockouts einen eher bindegewebigen Charakter mit stärkerer Expression von Kollagen-1 und schwächerer Expression von SMA aufweisen. Als positive interne Kontrolle dienten die Blutgefäße (Pfeil), die den Unterschied der muskulären Media von der bindegewebigen äußeren Adventitia zeigen. Exemplarisch ist ein Tubulus seminiferus bei den Knockouts markiert (Stern). Größenbalken; 20 µm.

Der in Abbildung 21 gezeigte Vergleich unterschiedlicher Expressionsmuster in den Wildtypen und Knockouts bezüglich SMA und Kollagen-1 unterstützt die Hypothese

eines kontraktile Phänotyps bei den Wildtypen und eines (synthetischen) Myofibroblastentyps bei den Knockouts. Dennoch müssten weitere Versuche dieser Art und zusätzlich quantitative Untersuchungen folgen, um diese ersten Hinweise zu bestätigen.

In der hier vorliegenden Studie kann nicht sicher entschieden werden, ob dieser anzunehmende synthetische bzw. Myofibroblastentyp bei den Knockouts auf einen Entwicklungsrückstand oder eine Dedifferenzierung der peritubulären Muskelzellen hinweist. Es gibt jedoch neben dem Dogma der Dedifferenzierung glatter Muskelzellen von einem in den anderen Typ eine konträre Theorie. Tang et al. (2012) postulierten in der Gefäßmuskulatur die Existenz multipotenter vaskulärer glatter Muskelzellen (MVSCs) mit Stammzeleigenschaften, welche für den Nachschub der glatten Muskelzellen im Gewebeverband verantwortlich sind. Dabei sprechen die Autoren der größten Zahl vaskulärer Muskelzellen die Proliferationsfähigkeit *in vivo* ab. Es wird also bestritten, dass alle glatten Muskelzellen einen Switch zwischen kontraktile und synthetische (proliferative) Phänotyp vornehmen können. Diese Theorie wird kontrovers diskutiert (Nguyen et al. 2013). In der Untersuchung von Tang und Kollegen waren die MVSCs dabei stets SM-MHC-negativ. Von anderen Autoren wurden diese Zellen, die kein smooth muscle myosin heavy chain exprimierten, als synthetischer bzw. proliferativer glatter Muskelzelltyp beschrieben und definiert (Churchman und Siow 2009).

Die Untersuchungen von Tang et al. (2012) zeigten, dass exakt dieser Zelltyp (MVSC) sich im weiteren Verlauf zu SMA- und Calponin-positiven Zellen entwickeln konnte. Auch hatten diese SM-MHC-negativen Zellen die Fähigkeit zu Schwann-Zellen, periphere Nervenzellen, Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren, so wie es mesenchymale Stammzellen (MSC) auch können. Sobald die SM-MHC-negativen Zellen diese Fähigkeit verloren, konnten sie sich dafür spontan zu kontraktile glatten Muskelzellen mit Expressionen von SM-MHC und Calponin differenzieren.

Für die vorliegende Arbeit könnten die Erkenntnisse von Tang et al. bedeuten, dass eine mögliche Subgruppe spezieller glatter Muskelzellen zur Proliferation angeregt wurde.

Es sei an dieser Stelle noch einmal angemerkt, dass es sich in all diesen Modellen um die Proliferation und Differenzierung von vaskulären glatten Muskelzellen handelt. Ob und inwieweit auf die glatten Muskelzellen der Tubuli seminiferi geschlossen werden kann, ist noch unklar.

5 Zusammenfassung

In Strukturen des männlichen Reproduktionstraktes kommen Polysialylierungen während der fetalen und postnatalen Entwicklung vor und beeinflussen diese.

Die primär aus unserer Arbeitsgruppe hervorgegangen Erkenntnisse führten zum gesteigerten Interesse an den in dieser Arbeit untersuchten postnatalen Polysialyltransferase-defizienten ($st8sia2^{-/-}$; $st8sia4^{-/-}$ und $st8sia2^{+/-}$; $st8sia4^{-/-}$) Mäusen (Tag 9,5). Durch hauptsächlich immunhistochemische Untersuchungen konnten erstmals testikuläre Veränderungen der Muskulatur aufgrund des Verlustes von PolySia gezeigt werden.

Bezüglich der Expression des generellen Muskelstrukturproteins SMA zeigte sich in der Knockout-Gruppe (KO) im Vergleich zu den Wildtypen (WTs) und Heterozygoten (HTs) nur eine geringgradig schwächere Intensität der peritubulären Muskelzellen. Deutlich ausgeprägter war der Unterschied zwischen den Knockouts einerseits und den Wildtypen sowie Heterozygoten andererseits bei der Nutzung von Antikörpern gegen Calponin, einem als Muskeldifferenzierungsmarker bekanntem Protein. Bei einer weiteren immunhistochemischen Färbung unter Verwendung von Antikörpern gegen das relaxationsrelevante Protein PKG I, zeigte sich ein kompletter Verlust der PKG I-Färbung in den peritubulären Muskelzellen der Knockouts sowie eine stark abgeschwächte Färbung bei den Heterozygoten.

Es zeigten sich keine morphologischen Unterschiede in den drei Gruppen; lediglich ein verbreitertes Interstitium konnte in den Knockouts (führend) und Heterozygoten festgestellt werden. Dies ist wahrscheinlich auf das Fehlen von PKG I zurückzuführen.

Im Unterschied zu den peritubulären Muskelzellen zeigten die glatten Muskelzellen der Blutgefäße eine starke Immunreaktion für alle Muskelzellmarker sowohl bei den WTs, HTs als auch KOs.

Statistische Auswertungen der Proliferation der peritubulären Muskelzellen ließen eine signifikant stärkere Proliferation in der Knockout-Gruppe im Vergleich zu den Wildtypen erkennen. Insgesamt zeigten die Ergebnisse eine geringere Muskelzelldifferenzierung in der frühen postnatalen Entwicklung bei fehlendem PolySia selektiv bei den peritubulären Muskelzellen im Unterschied zu den Gefäßmuskelzellen. Zusammen mit der erhöhten Proliferationsrate der peritubulären Muskelzellen spricht dies für einen synthetischen Muskelzelltyp beim Knockout im Unterschied zu einem kontraktiven

Muskelzelltyp beim Wildtyp. Eine so stark erhöhte Proliferation der peritubulären Muskelzellen in der Knockout-Gruppe im Vergleich zum Wildtyp kann als Hinweis auf eine eingeschränkte Spermatogenese während der weiteren Entwicklung hindeuten.

Die beim Menschen auftretende pathologisch veränderte peritubuläre Muskelschicht in Zusammenhang mit Spermatogenesestörungen und Infertilität wird allgemein für einen unbedeutenden sekundären Effekt gehalten. In der aktuellen Arbeit finden sich Argumente dafür, dass die gestörte Muskelzellschicht auch ursächlich für die Keimzellstörung sein kann.

6 Summary

In the male reproductive system polysialylation takes place during fetal and postnatal development.

These findings, which were partly based on the investigations of our working group, led to a heightened interest on the polysialyltransferase-deficient mice (*st8sia2^{-/-}*; *st8sia4^{-/-}* and *st8sia2^{+/-}*; *st8sia4^{-/-}*) that were used in this thesis. By using immunohistochemical analyses we could present for the first time testicular changes in the muscles because of a partial or complete loss of polysia. The decreased expression of the structural protein SMA, the muscle differentiation marker Calponin and an important protein for relaxation PKG I in the knockout mice showed the extensive influence of polysia on the peritubular cells.

Furthermore, the evaluation of the proliferation experiments on peritubular cells showed that the knockouts clearly proliferate more than the wild types. That could indicate a possible compensation of the immature peritubular muscle cells. Additionally, this immaturity is affirmed by the loss of Calponin, which is known as a muscle differentiation marker. No major morphological differences were found between the three groups. Only the enlarged interstitial space was noticeable in the knockouts and heterozygous, which may be associated with the loss of PKG I expression in both groups.

Whether the expression of the above-mentioned muscle markers or the proliferation of the peritubular muscle cells would have normalized in the further course cannot be clarified in this dissertation.

All results obtained in this thesis show the significant impact of polysia on the development of the reproductive tract and a possible restriction of the spermatogenesis and at the same time the high potential of further investigations becomes apparent.

Disturbances of the peritubular smooth muscle cell layer in the human testis together with defects of spermatogenesis are generally thought to be a secondary effect. In the present study there are arguments that a disturbed muscle cell layer could also be the cause of germ cell disorders.

7 Abkürzungsverzeichnis

ABP	Androgen-bindendes Protein
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AMH	Anti-Müller-Hormon
ANOVA	Analysis of variance; Varianzanalyse
AR	Androgen-Rezeptor
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serumalbumin
CBAVD	Congenital bilateral aplasia of vas deferens; Kongenitale bilaterale Aplasie des Ductus deferens
CD 36	Cluster of differentiation 36
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate; Zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EndoN	Endoneuraminidase
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HT	Heterozygot
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IL-6	Interleukin-6
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	In-vitro-Fertilisation
KDN	Deaminoneuraminsäure
KO	Knockout
LH	Luteinisierendes Hormon
mAK	Monoklonaler Antikörper
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
MESA	Mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration
MLC	Myosin light chain
MSC	Mesenchymal stem cells; Mesenchymale Stammzellen

MVSC	Multipotent vascular stem cells
MYH11	Smooth muscle myosin heavy chain
NCAM	Neural cell adhesion molecule
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glykolyneuraminsäure
NG2	Neuronal/glial antigen 2
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NSCLC	Non small cell lung carcinoma
NO	Stickstoffmonoxid
OAT	Oligoasthenoteratozoospermie
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate-buffered saline; Phospatgepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDE	Phosphodiesterase
PKG I	cGMP-abhängige Proteinkinase I
P-Mod-S	Peritubular factor that modulates Sertoli cell function
PolySia	Polysialinsäure
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
SCLC	Small cell lung cancer
SCO	Sertoli-cell-only-Syndrome
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SM22 α	Smooth muscle 22 α
SMA	Smooth muscle actin
SM-MHC	Smooth muscle myosin heavy chain
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine
SRY	Sex-determining region of the Y chromosome
SynCAM 1	Synaptic cell adhesion molecule
TDF	Testis-determining factor
TESE	Testikuläre Spermienextraktion
TGF- β	Transforming growth factor β
WT	Wildtyp

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Eine schematische Darstellung der männlichen Reproduktionsorgane im Sagittalschnitt.....	3
Abbildung 2: Übersichtsbild des Testis mit Epididymis und Ductus deferens sowie ein vergrößerter Querschnitt eines menschlichen Tubulus seminiferus mit Keimepithel.....	5
Abbildung 3: Schematischer Ausschnitt eines Tubulus seminiferus und Entwicklungsstadien der Keimzellen.....	9
Abbildung 4: Beispiel für Glykosylierung anhand des ABO-Systems.....	16
Abbildung 5: Die chemische Struktur von α 2,8-PolySia	17
Abbildung 6: Die Wechselwirkungen von polysialyliertem NCAM	19
Abbildung 7: Unterscheidung von proliferierenden und nicht proliferierenden peritubulären Muskelzellen.....	33
Abbildung 8: Übersichtsbild einer Auszählung von proliferierenden peritubulären Muskelzellen	34
Abbildung 9: Übersichtsaufnahme eines Hodenanschnittes zur Ermittlung der Gesamt-Tubulusfläche.....	35
Abbildung 10: Keine auffälligen strukturellen Unterschiede zwischen den drei Gruppen	49
Abbildung 11: PolySia ist um die Tubuli seminiferi in postnatalen Mäusehoden präsent	51
Abbildung 12: Untersuchungen der glatten Muskulatur und Vergleich der drei Gruppen bezüglich der SMA-Expression.....	52
Abbildung 13: Deutlich verringerte Expression von SMA in KO-Mäusen	54
Abbildung 14: Untersuchungen der glatten Muskulatur und Vergleich der drei Gruppen bezüglich der Calponin-Expression	56
Abbildung 15: Untersuchungen der glatten Muskulatur und Vergleich der drei Gruppen bezüglich der PKG I-Expression.....	58

Abbildung 16: Exemplarische Darstellung der proliferierenden peritubulären Muskelzellen im Hodenanschnitt einer Knockout-Maus	60
Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der proliferierenden peritubulären Muskelzellen in den drei Gruppen	62
Abbildung 18: Statistische Auswertung der proliferierenden peritubulären Muskelzellen	64
Abbildung 19: Statistische Auswertung des interstitiellen Raumes	67
Abbildung 20: Übersichtsaufnahme eines Hodenanschnittes zur Ermittlung der Tubulusfläche mit Limitationen der Messung.....	76
Abbildung 21: Deutlich verringerte SMA-Expression und stärkere Kollagen-1-Expression in den Knockouts	79

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Tiere.....	24
Tabelle 2: Rohdaten der peritubulären Muskelzellen	38
Tabelle 3: Rohdaten der Fläche des Interstitiums.....	44

10 Literaturverzeichnis

Albrecht, Martin (2009): Insights into the nature of human testicular peritubular cells. In: *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 191 (6), S. 532–540. DOI: 10.1016/j.aanat.2009.08.002.

Albrecht, Martin; Frungieri, Monica B.; Gonzalez-Calvar, Silvia; Meineke, Viktor; Köhn, Frank M.; Mayerhofer, Artur (2005): Evidence for a histaminergic system in the human testis. In: *Fertility and sterility* 83 (4), S. 1060–1063. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.12.002.

Angata, Kiyohiko; Suzuki, Misa; Fukuda, Minoru (2002): ST8Sia II and ST8Sia IV polysialyltransferases exhibit marked differences in utilizing various acceptors containing oligosialic acid and short polysialic acid. The basis for cooperative polysialylation by two enzymes. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (39), S. 36808–36817. DOI: 10.1074/jbc.M204632200.

Attia, A. M.; Al-Inany, H. G.; Farquhar, C.; Proctor, M. (2007): Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (4), CD005071. DOI: 10.1002/14651858.CD005071.pub3.

Attia, Abdelhamid M.; Abou-Setta, Ahmed M.; Al-Inany, Hesham G. (2013): Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (8), CD005071. DOI: 10.1002/14651858.CD005071.pub4.

Ayoubi, Sohrab; Sheikh, Søren P.; Eskildsen, Tilde V. (2017): Human induced pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle cells: differentiation and therapeutic potential. In: *Cardiovascular research* 113 (11), S. 1282–1293. DOI: 10.1093/cvr/cvx125.

Bals-Pratsch, M.; Knuth, U. A.; Hönigl, W.; Klein, H. M.; Bergmann, M.; Nieschlag, E. (1989): Pulsatile GnRH-therapy in oligozoospermic men does not improve seminal parameters despite decreased FSH levels. In: *Clinical endocrinology* 30 (5), S. 549–560. DOI: 10.1111/j.1365-2265.1989.tb01427.x.

Barbeau, D.; Liang, J. J.; Robitalille, Y.; Quirion, R.; Srivastava, L. K. (1995): Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in

- schizophrenic brains. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (7), S. 2785–2789. DOI: 10.1073/pnas.92.7.2785.
- Behre, H. M.; Nieschlag, E.; Weidner, W.; Wieacker, P. (2009): Störungen im Bereich der ableitenden Samenwege und akzessorischen Geschlechtsdrüsen. In: Eberhard Nieschlag, H. M. Behre und S. Nieschlag (Hg.): *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 3. Aufl. s.l.: Springer-Verlag, S. 267–280.
- Biederer, Thomas; Sara, Yildirim; Mozhayeva, Marina; Atasoy, Deniz; Liu, Xinran; Kavalali, Ege T.; Südhof, Thomas C. (2002): SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. In: *Science (New York, N.Y.)* 297 (5586), S. 1525–1531. DOI: 10.1126/science.1072356.
- Brämswig, Jürgen; Dübbers, Angelika (2009): Disorders of pubertal development. In: *Deutsches Arzteblatt international* 106 (17), 295-303; quiz 304. DOI: 10.3238/arztebl.2009.0295.
- Burgess, Alison; Wainwright, Steven R.; Shihabuddin, Lamya S.; Rutishauser, Urs; Seki, Tatsunori; Aubert, Isabelle (2008): Polysialic acid regulates the clustering, migration, and neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. In: *Developmental neurobiology* 68 (14), S. 1580–1590. DOI: 10.1002/dneu.20681.
- Carlsen, E.; Giwercman, A.; Keiding, N.; Skakkebaek, N. E. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 305 (6854), S. 609–613. DOI: 10.1136/bmj.305.6854.609.
- Cheng, C. Yan; Mruk, Dolores D. (2010): A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. In: *Nature reviews. Endocrinology* 6 (7), S. 380–395. DOI: 10.1038/nrendo.2010.71.
- Cheng, C. Yan; Mruk, Dolores D. (2012): The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. In: *Pharmacol Rev* 64 (1), S. 16–64. DOI: 10.1124/pr.110.002790.
- Christl, H. W. (1990): The lamina propria of vertebrate seminiferous tubules: a comparative light and electron microscopic investigation. In: *Andrologia* 22 (1), S. 85–94. DOI: 10.1111/j.1439-0272.1990.tb01946.x.
- Churchman, Adrian T.; Siow, Richard C. M. (2009): Isolation, culture and characterisation of vascular smooth muscle cells. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 467, S. 127–138. DOI: 10.1007/978-1-59745-241-0_7.

- Cooper, T. G. (2009): Untersuchung des Ejakulates. In: Eberhard Nieschlag, H. M. Behre und S. Nieschlag (Hg.): *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 3. Aufl. s.l.: Springer-Verlag, S. 131–144.
- Curreli, Sabrina; Arany, Zita; Gerardy-Schahn, Rita; Mann, Dean; Stamatou, Nicholas M. (2007): Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (42), S. 30346–30356. DOI: 10.1074/jbc.M702965200.
- Davidoff, M. S.; Breucker, H.; Holstein, A. F.; Seidl, K. (1990): Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. In: *Cell and Tissue Research* (262), S. 253–261. DOI: 10.1007/bf00309880.
- Deshmane, Satish L.; Kremlev, Sergey; Amini, Shohreh; Sawaya, Bassel E. (2009): Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. In: *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29 (6), S. 313–326. DOI: 10.1089/jir.2008.0027.
- Duband, Jean-Loup; Gimona, Mario; Scatena, Marta; Sartore, Saverio; Small, J. Victor (1993): Calponin and SM22 as differentiation markers of smooth muscle: spatiotemporal distribution during avian embryonic development. In: *Differentiation* 55 (1), S. 1–11. DOI: 10.1111/j.1432-0436.1993.tb00027.x.
- Dym, M.; Fawcett, D. W. (1970): The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. In: *Biology of reproduction* 3 (3), S. 308–326. DOI: 10.1093/biolreprod/3.3.308.
- Eckhardt, M.; Bukalo, O.; Chazal, G.; Wang, L.; Goridis, C.; Schachner, M.; Gerardy-Schahn, R.; Cremer, H.; Dityatev, A. (2000): Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SialIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20 (14), S. 5234–5244. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-14-05234.2000.
- El Maarouf, Abderrahman; Rutishauser, Urs (2003): Removal of polysialic acid induces aberrant pathways, synaptic vesicle distribution, and terminal arborization of retinotectal axons. In: *The Journal of comparative neurology* 460 (2), S. 203–211. DOI: 10.1002/cne.10635.
- El-Mezgueldi, Mohammed (1996): Calponin. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 28 (11), S. 1185–1189. DOI: 10.1016/S1357-2725(96)00085-4.

Fisch, Harry; Braun, Stephen R. (2013): Trends in global semen parameter values. In: *Asian journal of andrology* 15 (2), S. 169–173. DOI: 10.1038/aja.2012.143.

Frungieri, Mónica B.; Calandra, Ricardo S.; Lustig, Livia; Meineke, Viktor; Köhn, Frank M.; Vogt, Hermann Josef; Mayerhofer, Artur (2002): Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. In: *Fertility and sterility* 78 (2), S. 298–306. DOI: 10.1016/s0015-0282(02)03206-5.

Galuska, Christina E.; Lütteke, Thomas; Galuska, Sebastian P. (2017): Is Polysialylated NCAM Not Only a Regulator during Brain Development But also during the Formation of Other Organs? In: *Biology* 6 (2). DOI: 10.3390/biology6020027.

Galuska, Sebastian P.; Oltmann-Norden, Imke; Geyer, Hildegard; Weinhold, Birgit; Kuchelmeister, Klaus; Hildebrandt, Herbert; Gerardy-Schahn, Rita; Geyer, Rudolf; Mühlenhoff, Martina (2006): Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (42), S. 31605–31615. DOI: 10.1074/jbc.M606516200.

Galuska, Sebastian P.; Rollenhagen, Manuela; Kaup, Moritz; Eggers, Katinka; Oltmann-Norden, Imke; Schiff, Miriam; Hartmann, Maike; Weinhold, Birgit; Hildebrandt, Herbert; Geyer, Rudolf; Mühlenhoff, Martina; Geyer, Hildegard (2010): Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (22), S. 10250–10255. DOI: 10.1073/pnas.0912103107.

Glüer, S.; Zense, M.; Radtke, E.; Schweinitz, D. von (1998): Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood ganglioneuroma and neuroblastoma of different histological grade and clinical stage. In: *Langenbeck's archives of surgery* 383 (5), S. 340–344.

Gnessi, L.; Fabbri, A.; Spera, G. (1997): Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. In: *Endocrine reviews* 18 (4), S. 541–609. DOI: 10.1210/edrv.18.4.0310.

Gomez, Delphine; Owens, Gary K. (2012): Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. In: *Cardiovascular research* 95 (2), S. 156–164. DOI: 10.1093/cvr/cvs115.

Hachem, Nadim E.; Humpfle, Luisa; Simon, Peter; Kaese, Miriam; Weinhold, Birgit; Günther, Juliane; Galuska, Sebastian P.; Middendorff, Ralf (2021): The Loss of

Polysialic Acid Impairs the Contractile Phenotype of Peritubular Smooth Muscle Cells in the Postnatal Testis. In: *Cells* 10 (6). DOI: 10.3390/cells10061347.

Hansen, Peter Vejby; Trykker, Henrik; Andersen, Jørn; Helkjær, Poul Erik (1989): Germ cell function and hormonal status in patients with testicular cancer. In: *Cancer* 64 (4), S. 956–961. DOI: 10.1002/1097-0142(19890815)64:4<956::AID-CNCR2820640431>3.0.CO;2-3.

Harduin-Lepers, Anne; Petit, Daniel; Mollicone, Rosella; Delannoy, Philippe; Petit, Jean-Michel; Oriol, Rafael (2008): Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes. In: *BMC evolutionary biology* 8, S. 258. DOI: 10.1186/1471-2148-8-258.

Hartung, Joachim; Elpelt, Bärbel; Klösener, Karl-Heinz (2005): Statistik. Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik; mit zahlreichen, vollständig durchgerechneten Beispielen. 14., unwesentlich veränd. Aufl. München, Wien: Oldenbourg.

Hedger, M. (1997): Testicular leukocytes: what are they doing? In: *Reviews of Reproduction* 2 (1), S. 38–47. DOI: 10.1530/revreprod/2.1.38.

Holstein, A. F. (2008): Kapitel 8.5 Männliche Geschlechtsorgane. In: Detlev Drenckhahn (Hg.): Anatomie, makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie., Bd. 1. 17. Aufl. 1 Band. München: Elsevier Urban & Fischer, S. 799–837.

Holstein, A. F.; Davidoff, M. S. (1996): Myofibroblasts in the lamina propria of human semi-iferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. In: *Archives of histology and cytology* (59), S. 109–125.

Howell, S. J.; Shalet, S. M. (2005): Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. In: *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* (34), S. 12–17. DOI: 10.1093/jncimonographs/lgi003.

Isomura, Ryo; Kitajima, Ken; Sato, Chihiro (2011): Structural and functional impairments of polysialic acid by a mutated polysialyltransferase found in schizophrenia. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (24), S. 21535–21545. DOI: 10.1074/jbc.M111.221143.

Jaslove, Jacob M.; Nelson, Celeste M. (2018): Smooth muscle: a stiff sculptor of epithelial shapes. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 373 (1759). DOI: 10.1098/rstb.2017.0318.

Jensen, Morten Søndergaard; Toft, Gunnar; Thulstrup, Ane Marie; Bonde, Jens Peter; Olsen, Jørn (2007): Cryptorchidism according to maternal gestational smoking. In:

Epidemiology (Cambridge, Mass.) 18 (2), S. 220–225. DOI:
10.1097/01.ede.0000254061.90686.9f.

Jensen, Tina Kold; Jørgensen, Niels; Punab, Margus; Haugen, Trine B.; Suominen, Jyrki; Zilaitiene, Birute; Horte, Antero; Andersen, Anne-Grethe; Carlsen, Elisabeth; Magnus, Øystein; Matulevicius, Valentinas; Nermoen, Ingrid; Vierula, Matti; Keiding, Niels; Toppari, Jorma; Skakkebaek, Niels E. (2004): Association of in utero exposure to maternal smoking with reduced semen quality and testis size in adulthood: a cross-sectional study of 1,770 young men from the general population in five European countries. In: *American journal of epidemiology* 159 (1), S. 49–58. DOI:
10.1093/aje/kwh002.

Johnson, Colin P.; Fujimoto, Ichiro; Rutishauser, Urs; Leckband, Deborah E. (2005): Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (1), S. 137–145. DOI: 10.1074/jbc.M410216200.

Kamimura, D.; Ishihara, K.; Hirano, T. (2003): IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 149, S. 1–38. DOI: 10.1007/s10254-003-0012-2.

Kean, E. L. (1991): Sialic acid activation. In: *Glycobiology* 1 (5), S. 441–447. DOI: 10.1093/glycob/1.5.441.

Keck, C.; Behre, H. M.; Jockenhövel, F.; Nieschlag, E. (1994): Ineffectiveness of kallikrein in treatment of idiopathic male infertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 9 (2), S. 325–329. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138501.

Kleene, Ralf; Schachner, Melitta (2004): Glycans and neural cell interactions. In: *Nature reviews. Neuroscience* 5 (3), S. 195–208. DOI: 10.1038/nrn1349.

Knuth, U. A.; Hönigl, W.; Bals-Pratsch, M.; Schleicher, G.; Nieschlag, E. (1987): Treatment of severe oligospermia with human chorionic gonadotropin/human menopausal gonadotropin: a placebo-controlled, double blind trial. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 65 (6), S. 1081–1087. DOI: 10.1210/jcem-65-6-1081.

Komminoth, P.; Roth, J.; Lackie, P. M.; Bitter-Suermann, D.; Heitz, P. U. (1991): Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule distinguishes small cell lung carcinoma from carcinoids. In: *The American Journal of Pathology* 139 (2), S. 297–304.

Kröcher, Tim; Malinovskaja, Kristina; Jürgenson, Monika; Aonurm-Helm, Anu; Zharkovskaya, Tamara; Kalda, Anti; Röckle, Iris; Schiff, Miriam; Weinhold, Birgit; Gerardy-Schahn, Rita; Hildebrandt, Herbert; Zharkovsky, Alexander (2015): Schizophrenia-like phenotype of polysialyltransferase ST8SIA2-deficient mice. In: *Brain structure & function* 220 (1), S. 71–83. DOI: 10.1007/s00429-013-0638-z.

Kurosawa, N.; Yoshida, Y.; Kojima, N.; Tsuji, S. (1997): Polysialic acid synthase (ST8Sia II/STX) mRNA expression in the developing mouse central nervous system. In: *Journal of neurochemistry* 69 (2), S. 494–503. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69020494.x.

Lanfranco, Fabio; Kamischke, Axel; Zitzmann, Michael; Nieschlag, Eberhard (2004): Klinefelter's syndrome. In: *The Lancet* 364 (9430), S. 273–283. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16678-6.

Lee, Peter A. (2005): Fertility after cryptorchidism: epidemiology and other outcome studies. In: *Urology* 66 (2), S. 427–431. DOI: 10.1016/j.urology.2005.01.017.

Lüllmann-Rauch, Renate (2009): Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Taschenlehrbuch). Online verfügbar unter <https://eref.thieme.de/ebooks/2100625>.

Maekawa, M.; Kamimura, K.; Nagano, T. (1996): Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. In: *Archives of histology and cytology* 59 (1), S. 1–13.

Meachem, S. J.; Nieschlag, E.; Simoni, M. (2001): Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. In: *European journal of endocrinology* 145 (5), S. 561–571. DOI: 10.1530/eje.0.1450561.

Meineke, Viktor; Frungieri, Monica B.; Jessberger, Berthold; Vogt, Hermann-Josef; Mayerhofer, Artur (2000): Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. In: *Fertility and sterility* 74 (2), S. 239–244. DOI: 10.1016/S0015-0282(00)00626-9.

Meinhardt, Andreas; Hedger, Mark P. (2011): Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. In: *Molecular and cellular endocrinology* 335 (1), S. 60–68. DOI: 10.1016/j.mce.2010.03.022.

Meng, Jing; Greenlee, Anne R.; Taub, Chloe J.; Braun, Robert E. (2011): Sertoli cell-specific deletion of the androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice. In: *Biology of reproduction* 85 (2), S. 254–260. DOI: 10.1095/biolreprod.110.090621.

Middendorff, R.; Holstein, A. F.; Davidoff, M. S. (2002): The Tunica Albuginea of the Human Testis Is Characterized by Complex Contraction and Relaxation Activities Regulated by Cyclic GMP. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (87), S. 3486–3499. DOI: 10.1210/jcem.87.7.8696.

Middendorff, R.; Kumm, M.; Davidoff, M. S.; Holstein, A. F.; Müller, Dieter (2000): Generation of Cyclic Guanosine Monophosphate by Heme Oxygenases in the Human Testis—A Regulatory Role for Carbon Monoxide in Sertoli Cells? In: *Biology of reproduction* (63), S. 651–657.

Middendorff, R.; Müller, D.; Wichers, S.; Holstein, A. F.; Davidoff, M. S. (1997): Evidence for production and functional activity of nitric oxide in seminiferous tubules and blood vessels of the human testis. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82 (12), S. 4154–4161. DOI: 10.1210/jcem.82.12.4432.

Moore, Keith L.; Persaud, Trivedi V. N.; Torchia, Mark G. (2013): Embryologie. Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik. 6. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer.

Mühlenhoff, Martina; Rollenhagen, Manuela; Werneburg, Sebastian; Gerardy-Schahn, Rita; Hildebrandt, Herbert (2013): Polysialic acid: versatile modification of NCAM, SynCAM 1 and neuropilin-2. In: *Neurochemical research* 38 (6), S. 1134–1143. DOI: 10.1007/s11064-013-0979-2.

Mullaney, B. P.; Skinner, M. K. (1993): Transforming growth factor-beta (beta 1, beta 2, and beta 3) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 7 (1), S. 67–76. DOI: 10.1210/mend.7.1.8446109.

Nguyen, Anh T.; Gomez, Delphine; Bell, Robert D.; Campbell, Julie H.; Clowes, Alexander W.; Gabbiani, Giulio; Giachelli, Cecilia M.; Parmacek, Michael S.; Raines, Elaine W.; Rusch, Nancy J.; Speer, Mei Y.; Sturek, Michael; Thyberg, Johan; Towler, Dwight A.; Weiser-Evans, Mary C.; Yan, Chen; Miano, Joseph M.; Owens, Gary K. (2013): Smooth muscle cell plasticity: fact or fiction? In: *Circulation research* 112 (1), S. 17–22. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.281048.

Nieschlag, E. (2009): Aufgaben und Ziele der Andrologie. In: Eberhard Nieschlag, H. M. Behre und S. Nieschlag (Hg.): Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. 3. Aufl. s.l.: Springer-Verlag, S. 3–12.

- Nieschlag, E. (2013): Infertilität bei Männern : Aktuelle Entwicklungen. In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 56 (12), S. 1619–1627. DOI: 10.1007/s00103-013-1859-2.
- Nieschlag, E.; Behre, H. M.; Wieacker, P.; Meschede, D.; Kamischke, A.; Kliesch, S. (2009): Störungen im Bereich der Testes. In: Eberhard Nieschlag, H. M. Behre und S. Nieschlag (Hg.): *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 3. Aufl. s.l.: Springer-Verlag, S. 199–238.
- Nieschlag, E.; Kamischke, A. (2009): Therapieversuche bei idiopathischer Infertilität. In: Eberhard Nieschlag, H. M. Behre und S. Nieschlag (Hg.): *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 3. Aufl. s.l.: Springer-Verlag, S. 466–473.
- Nurmio, Mirja; Kallio, Jenny; Adam, Marion; Mayerhofer, Artur; Toppari, Jorma; Jahnukainen, Kirsi (2012): Peritubular myoid cells have a role in postnatal testicular growth. In: *Spermatogenesis* 2 (2), S. 79–87. DOI: 10.4161/spmg.20067.
- O'Bryan, Moira K.; Gerdprasert, Orapin; Nikolic-Paterson, David J.; Meinhardt, Andreas; Muir, Julie A.; Foulds, Lynda M.; Phillips, David J.; Kretser, David M. de; Hedger, Mark P. (2005): Cytokine profiles in the testes of rats treated with lipopolysaccharide reveal localized suppression of inflammatory responses. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288 (6), R1744-55. DOI: 10.1152/ajpregu.00651.2004.
- Oltmann-Norden, Imke; Galuska, Sebastian P.; Hildebrandt, Herbert; Geyer, Rudolf; Gerardy-Schahn, Rita; Geyer, Hildegard; Mühlenhoff, Martina (2008): Impact of the polysialyltransferases ST8SialII and ST8SialIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (3), S. 1463–1471. DOI: 10.1074/jbc.M708463200.
- Østensen, Monika (2004): New insights into sexual functioning and fertility in rheumatic diseases. In: *Best practice & research. Clinical rheumatology* 18 (2), S. 219–232. DOI: 10.1016/j.berh.2004.01.002.
- Palombi, F.; Farini, D.; Salanova, M.; Grossi, S. de; Stefanini, M. (1992): Development and cytodifferentiation of peritubular myoid cells in the rat testis. In: *The Anatomical record* 233 (1), S. 32–40. DOI: 10.1002/ar.1092330106.
- Petersen, P. M.; Skakkebaek, N. E.; Vistisen, K.; Rørth, M.; Giwercman, A. (1999): Semen quality and reproductive hormones before orchiectomy in men with testicular

cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 17 (3), S. 941–947. DOI: 10.1200/JCO.1999.17.3.941.

Pfeifer, A.; Klatt, P.; Massberg, S.; Ny, L.; Sausbier, M.; Hirneiss, C.; Wang, G. X.; Korth, M.; Aszódi, A.; Andersson, K. E.; Krombach, F.; Mayerhofer, A.; Ruth, P.; Fässler, R.; Hofmann, F. (1998): Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. In: *The EMBO journal* 17 (11), S. 3045–3051. DOI: 10.1093/emboj/17.11.3045.

Pfeifer, A.; Ruth, P.; Dostmann, W.; Sausbier, M.; Klatt, P.; Hofmann, F. (1999): Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 135, S. 105–149. DOI: 10.1007/BFb0033671.

Pöllänen, P.; Niemi, M. (1987): Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. In: *Int J Androl* 10 (1), S. 37–42. DOI: 10.1111/j.1365-2605.1987.tb00163.x.

Powell, D. W.; Mifflin, R. C.; Valentich, J. D.; Crowe, S. E.; Saada, J. I.; West, A. B. (1999): Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. In: *The American journal of physiology* 277 (1), C1-9. DOI: 10.1152/ajpcell.1999.277.1.C1.

Quaas, Alexander; Dokras, Anuja (2008): Diagnosis and Treatment of Unexplained Infertility. In: *Reviews in Obstetrics and Gynecology* 1 (2), S. 69–76.

Richthoff, Jonas; Elzanaty, Saad; Rylander, Lars; Hagmar, Lars; Giwercman, Aleksander (2008): Association between tobacco exposure and reproductive parameters in adolescent males. In: *International journal of andrology* 31 (1), S. 31–39. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2007.00752.x.

Rolf, C.; Zitzmann, M.; Nieschlag, E. (2009): Seneszenz und Altershypogonadismus. In: Eberhard Nieschlag, H. M. Behre und S. Nieschlag (Hg.): *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 3. Aufl. s.l.: Springer-Verlag, S. 245–263.

Rollenhagen, Manuela; Kuckuck, Sarah; Ulm, Christina; Hartmann, Maïke; Galuska, Sebastian P.; Geyer, Rudolf; Geyer, Hildegard; Mühlenhoff, Martina (2012): Polysialylation of the synaptic cell adhesion molecule 1 (SynCAM 1) depends exclusively on the polysialyltransferase ST8Siall in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (42), S. 35170–35180. DOI: 10.1074/jbc.M112.375642.

Rossi, F.; Ferraresi, A.; Romagni, P.; Silvestroni, L.; Santemma, V. (2002): Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells in vitro. In: *Endocrinology* 143 (8), S. 3096–3104. DOI: 10.1210/endo.143.8.8955.

Roth, J.; Zuber, C.; Wagner, P.; Taatjes, D. J.; Weisgerber, C.; Heitz, P. U.; Goridis, C.; Bitter-Suermann, D. (1988): Reexpression of poly(sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (9), S. 2999–3003. DOI: 10.1073/pnas.85.9.2999.

Rozenblum, Guido T.; Gimona, Mario (2008): Calponins: adaptable modular regulators of the actin cytoskeleton. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (10), S. 1990–1995. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.07.010.

Rutishauser, Urs (2008): Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. In: *Nature reviews. Neuroscience* 9 (1), S. 26–35. DOI: 10.1038/nrn2285.

Santiemma, V.; Beligotti, F.; Magnanti, M.; Palleschi, S.; Silvestroni, L.; Fabbrini, A. (1996): Endothelin-1 stimulates deoxyribonucleic acid synthesis and contraction in testicular peritubular myoid cells. In: *Biology of reproduction* 54 (3), S. 583–590. DOI: 10.1095/biolreprod54.3.583.

Sartorius, G. A.; Handelsman, D. J. (2009): Hypogonadismus und Infertilität bei systemischen Erkrankungen. In: Eberhard Nieschlag, H. M. Behre und S. Nieschlag (Hg.): *Andrologie. Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 3. Aufl. s.l.: Springer-Verlag, S. 339–357.

Sato, H. (1980): Studies on the components of kallikrein-kinin system and treatment of male infertility. In: *The Keio journal of medicine* 29 (1), S. 19–38. DOI: 10.2302/kjm.29.19.

Schell, Christoph; Albrecht, Martin; Mayer, Christine; Schwarzer, J. Ullrich; Frungieri, Monica B.; Mayerhofer, Artur (2008): Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor-alpha. In: *Endocrinology* 149 (4), S. 1678–1686. DOI: 10.1210/en.2007-1064.

Schiff, Jonathan D.; Palermo, Gianpiero D.; Veeck, Lucinda L.; Goldstein, Marc; Rosenwaks, Zev; Schlegel, Peter N. (2005): Success of testicular sperm extraction corrected and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90 (11), S. 6263–6267. DOI: 10.1210/jc.2004-2322.

Schreiber, Susanne C.; Giehl, Klaudia; Kastilan, Caroline; Hasel, Cornelia; Mühlenhoff, Martina; Adler, Guido; Wedlich, Doris; Menke, Andre (2008): Polysialylated NCAM

represses E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic tumor cells. In: *Gastroenterology* 134 (5), S. 1555–1566. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.02.023.

Schulze, C. (1984): Sertoli cells and Leydig cells in man. In: *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 88, S. 1–104. DOI: 10.1007/978-3-642-69869-9.

Schuppe, H-C; Meinhardt, A.; Allam, J. P.; Bergmann, M.; Weidner, W.; Haidl, G. (2008): Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? In: *Andrologia* 40 (2), S. 84–91. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2008.00837.x.

Setchell, Brian P.; Maddocks, S.; Brooks, D. E. (1994): Anatomy, Vasculature, Innervation, and Fluids oder the Male Reproductive Tract. In: Ernst Knobil und Jimmy D. Neill (Hg.): *The physiology of reproduction*. 2. ed. New York: Raven Press, S. 1063–1175.

Sharpe, Richard M.; McKinnell, Chris; Kivlin, Catrina; Fisher, Jane S. (2003): Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. In: *Reproduction (Cambridge, England)* 125 (6), S. 769–784.

Silber, Sherman J.; van Steirteghem, Andre; Nagy, Zsolt; Liu, Jiaen; Tournaye, Herman; Devroey, Paul (1996): Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. In: *Fertility and sterility* 66 (1), S. 110–117. DOI: 10.1016/S0015-0282(16)58396-4.

Simon, Peter (2015): Nachweis, Lokalisation sowie quantitative Untersuchungen vom polysialylierten Neuralen Zelladhäsionsmolekül NCAM im männlichen Reproduktionstrakt.

Simon, Peter; Feuerstacke, Caroline; Kaese, Miriam; Saboor, Farhan; Middendorff, Ralf; Galuska, Sebastian P. (2015): Polysialylation of NCAM characterizes the proliferation period of contractile elements during postnatal development of the epididymis. In: *PloS one* 10 (3), e0123960. DOI: 10.1371/journal.pone.0123960.

Skinner, M. K.; Fetterolf, P. M.; Anthony, C. T. (1988): Purification of a paracrine factor, P-Mod-S, produced by testicular peritubular cells that modulates Sertoli cell function. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (6), S. 2884–2890.

Skinner, M. K.; Moses, H. L. (1989): Transforming growth factor beta gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 3 (4), S. 625–634. DOI: 10.1210/mend-3-4-625.

Suzuki, Masami; Suzuki, Misa; Nakayama, Jun; Suzuki, Atsushi; Angata, Kiyohiko; Chen, Shihao; Sakai, Keiichi; Hagihara, Kazuki; Yamaguchi, Yu; Fukuda, Minoru (2005): Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. In: *Glycobiology* 15 (9), S. 887–894. DOI: 10.1093/glycob/cwi071.

Tanaka, F.; Otake, Y.; Nakagawa, T.; Kawano, Y.; Miyahara, R.; Li, M.; Yanagihara, K.; Nakayama, J.; Fujimoto, I.; Ikenaka, K.; Wada, H. (2000): Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. In: *Cancer research* 60 (11), S. 3072–3080.

Tang, Zhenyu; Wang, Aijun; Yuan, Falei; Yan, Zhiqiang; Liu, Bo; Chu, Julia S.; Helms, Jill A.; Li, Song (2012): Differentiation of Multipotent Vascular Stem Cells Contributes to Vascular Diseases. In: *Nature communications* 3, S. 875. DOI: 10.1038/ncomms1867.

Tezel, E.; Kawase, Y.; Takeda, S.; Oshima, K.; Nakao, A. (2001): Expression of neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer. In: *Pancreas* 22 (2), S. 122–125. DOI: 10.1097/00006676-200103000-00003.

Tomasek, James J.; Gabbiani, Giulio; Hinz, Boris; Chaponnier, Christine; Brown, Robert A. (2002): Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (5), S. 349–363. DOI: 10.1038/nrm809.

Toppari, J.; Kaleva, M. (1999): Maldescendus testis. In: *Hormone research* 51 (6), S. 261–269. DOI: 10.1159/000023412.

Trotter, Jacqueline; Karram, Khalad; Nishiyama, Akiko (2010): NG2 cells: Properties, progeny and origin. In: *Brain research reviews* 63 (1-2), S. 72–82. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2009.12.006.

Varki, Ajit (2017): Biological roles of glycans. In: *Glycobiology* 27 (1), S. 3–49. DOI: 10.1093/glycob/cww086.

Volkman, J.; Müller, D.; Feuerstacke, C.; Kliesch, S.; Bergmann, M.; Mühlfeld, C.; Middendorff, R. (2011): Disturbed spermatogenesis associated with thickened lamina propria of seminiferous tubules is not caused by dedifferentiation of myofibroblasts. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 26 (6), S. 1450–1461. DOI: 10.1093/humrep/der077.

Wang, Gang; Jacquet, Laureen; Karamariti, Eirini; Xu, Qingbo (2015): Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. In: *The Journal of physiology* 593 (14), S. 3013–3030. DOI: 10.1113/JP270033.

Weber, Silke; Bernhard, Dominik; Lukowski, Robert; Weinmeister, Pascal; Wörner, René; Wegener, Jörg W.; Valtcheva, Nadejda; Feil, Susanne; Schlossmann, Jens; Hofmann, Franz; Feil, Robert (2007): Rescue of cGMP kinase I knockout mice by smooth muscle specific expression of either isozyme. In: *Circulation research* 101 (11), S. 1096–1103. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.154351.

Weinhold, Birgit; Seidenfaden, Ralph; Röckle, Iris; Mühlenhoff, Martina; Schertzinger, Frank; Conzelmann, Sidonie; Marth, Jamey D.; Gerardy-Schahn, Rita; Hildebrandt, Herbert (2005): Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (52), S. 42971–42977. DOI: 10.1074/jbc.M511097200.

Welsh, Michelle; Saunders, Philippa T. K.; Atanassova, Nina; Sharpe, Richard M.; Smith, Lee B. (2009): Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (12), S. 4218–4230. DOI: 10.1096/fj.09-138347.

Welter, H.; Kampfer, C.; Lauf, S.; Feil, R.; Schwarzer, J. U.; Köhn, F-M; Mayerhofer, A. (2013): Partial loss of contractile marker proteins in human testicular peritubular cells in infertility patients. In: *Andrology* 1 (2), S. 318–324. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2012.00030.x.

Werneburg, Sebastian; Buettner, Falk F. R.; Erben, Larissa; Mathews, Mona; Neumann, Harald; Mühlenhoff, Martina; Hildebrandt, Herbert (2016): Polysialylation and lipopolysaccharide-induced shedding of E-selectin ligand-1 and neuropilin-2 by microglia and THP-1 macrophages. In: *Glia* 64 (8), S. 1314–1330. DOI: 10.1002/glia.23004.

Werneburg, Sebastian; Mühlenhoff, Martina; Stangel, Martin; Hildebrandt, Herbert (2015): Polysialic acid on SynCAM 1 in NG2 cells and on neuropilin-2 in microglia is confined to intracellular pools that are rapidly depleted upon stimulation. In: *Glia* 63 (7), S. 1240–1255. DOI: 10.1002/glia.22815.

Wernet, W.; Flockerzi, V.; Hofmann, F. (1989): The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. In: *FEBS Letters* 251 (1-2), S. 191–196. DOI: 10.1016/0014-5793(89)81453-X.

Wolfe, L.; Corbin, J. D.; Francis, S. H. (1989): Characterization of a novel isozyme of cGMP-dependent protein kinase from bovine aorta. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (13), S. 7734–7741.

World Health Organization (1989): Mesterolone and idiopathic male infertility: a double-blind study. World Health Organization Task Force on the Diagnosis and Treatment of Infertility. In: *Int J Androl* 12 (4), S. 254–264.

World Health Organization (2010): WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva: World Health Organization (Nonserial Publications). Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=684674>.

Yabe, Uichiro; Sato, Chihiro; Matsuda, Tsukasa; Kitajima, Ken (2003): Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (16), S. 13875–13880. DOI: 10.1074/jbc.M300458200.

Yang, P.; Yin, X.; Rutishauser, U. (1992): Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. In: *The Journal of cell biology* 116 (6), S. 1487–1496. DOI: 10.1083/jcb.116.6.1487.

Zhang, Xiaoqing; Bendeck, Michelle P.; Simmons, Craig A.; Santerre, J. Paul (2017): Deriving vascular smooth muscle cells from mesenchymal stromal cells: Evolving differentiation strategies and current understanding of their mechanisms. In: *Biomaterials* 145, S. 9–22. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.08.028.

Zhou, Rui; Wu, Jingrouzi; Liu, Bang; Jiang, Yiqun; Chen, Wei; Li, Jian; He, Quanyuan; He, Zuping (2019): The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 76 (14), S. 2681–2695. DOI: 10.1007/s00018-019-03101-9.

Zitzmann, Michael; Nordhoff, Verena; Schönfeld, Victoria von; Nordsiek-Mengede, Annette; Kliesch, Sabine; Schüring, Andreas N.; Luetjens, Craig Marc; Kamischke, Axel; Cooper, Trevor; Simoni, Manuela; Nieschlag, Eberhard (2006): Elevated follicle-stimulating hormone levels and the chances for azoospermic men to become fathers after retrieval of elongated spermatids from cryopreserved testicular tissue. In: *Fertility and sterility* 86 (2), S. 339–347. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.12.058.

Zuber, C.; Lackie, P. M.; Catterall, W. A.; Roth, J. (1992): Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (14), S. 9965–9971.

11 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Hachem, Nadim E.; Humpfle, Luisa; Simon, Peter; Kaese, Miriam; Weinhold, Birgit; Günther, Juliane; Galuska, Sebastian P.; Middendorff, Ralf (2021): The Loss of Polysialic Acid Impairs the Contractile Phenotype of Peritubular Smooth Muscle Cells in the Postnatal Testis. In: *Cells* 10 (6). DOI: 10.3390/cells10061347.

Humpfle, Luisa; **Hachem, Nadim E.**; Simon, Peter; Weinhold, Birgit; Galuska, Sebastian P.; Middendorff, Ralf (2023): Knockout of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV leads to a dilatation of rete testis during postnatal development. In: *Front. Physiol.* 14, Artikel 1240296. DOI: 10.3389/fphys.2023.1240296.

Poster

Nadim E. Hachem, Luisa Humpfle, Peter Simon, Birgit Weinhold, Sebastian P. Galuska, Ralf Middendorff

„The loss of polysialic acid shows an impaired contractile phenotype of smooth muscle cells in the epididymal duct linked with a dilated rete testis“

Won the Best Poster Award at the Von Behring-Röntgen-Symposium 2022 – The Epididymis, 4.-7. September 2022 in Giessen, Germany

Article

The Loss of Polysialic Acid Impairs the Contractile Phenotype of Peritubular Smooth Muscle Cells in the Postnatal Testis

Nadim E. Hachem ¹, Luisa Humpfle ¹, Peter Simon ², Miriam Kaese ², Birgit Weinhold ³, Juliane Günther ⁴ , Sebastian P. Galuska ^{2,4,*} and Ralf Middendorff ^{1,*}

- ¹ Department of Anatomy and Cell Biology, Medical Faculty, Justus-Liebig-University, Aulweg 123, 35385 Giessen, Germany; nadim_hachem@hotmail.de (N.E.H.); luisa.humpfle@med.uni-giessen.de (L.H.)
² Institute of Biochemistry, Medical Faculty, Justus-Liebig-University, Friedrichstr. 24, 35392 Giessen, Germany; peter-simon@live.de (P.S.); miriam.kaese@gmx.de (M.K.)
³ Institute of Clinical Biochemistry, OE 4340, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Str. 1, D-30625 Hannover, Germany; Weinhold.Birgit@mh-hannover.de
⁴ Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany; guenther.juliane@fhn-dummerstorf.de
* Correspondence: galuska.sebastian@fhn-dummerstorf.de (S.P.G.); ralf.middendorff@anatomie.med.uni-giessen.de (R.M.); Tel: +49-38208-68-769 (S.P.G.); +49-641-99-47160 (R.M.)



Citation: Hachem, N.E.; Humpfle, L.; Simon, P.; Kaese, M.; Weinhold, B.; Günther, J.; Galuska, S.P.; Middendorff, R. The Loss of Polysialic Acid Impairs the Contractile Phenotype of Peritubular Smooth Muscle Cells in the Postnatal Testis. *Cells* 2021, 10, 1347. <https://doi.org/10.3390/cells10061347>

Academic Editor: Artur Mayerhofer

Received: 19 November 2020

Accepted: 17 May 2021

Published: 29 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract In the testis, the germinal epithelium of seminiferous tubules is surrounded by contractile peritubular cells, which are involved in sperm transport. Interestingly, in postnatal testis, polysialic acid (polySia), which is also an essential player for the development of the brain, was observed around the tubules. Western blotting revealed a massive decrease of polySia from postnatal day 1 towards puberty, together with a fundamental reduction of the net-like intertubular polySia. Using polysialyltransferase knockout mice, we investigated the consequences of the loss of polySia in the postnatal testis. Compared to postnatal wild-type animals, polySia knockouts showed slightly reduced smooth muscle actin (SMA) immunostaining of peritubular smooth muscle cells (SMCs), while calponin, marking more differentiated SMCs, dramatically decreased. In contrast, testicular SMA and calponin immunostaining remained unchanged in vascular SMCs in all genotypes. In addition, the cGMP-dependent protein kinase PKG I, a key enzyme of SMC relaxation, was nearly undetectable in the peritubular SMCs. Cell proliferation in the peritubular layer increased significantly in the knockouts, as shown by proliferating cell nuclear anti (PCNA) staining. Taken together, in postnatal testis, the absence of polySia resulted in an impaired differentiation of peritubular, but not vascular, SMCs to a more synthetic phenotype. Thus, polySia might influence the maintenance of a differentiated phenotype of non-vascular SMCs.

Keywords: polysialic acid; testis; smooth muscle cells; postnatal development

1. Introduction

The testis is responsible for the production of male germ cells and testosterone [1]. The major components of the testis are the seminiferous tubules, with their germinal epithelium [1] and the surrounding peritubular lamina propria [2–4]. In rodents, this structure consists only of a single layer of contractile (myoid) cells. These cells are suggested to affect both transport of spermatozoa and germ cell maturation, in addition to further paracrine and immunological functions [3,4]. Among seminiferous tubules, the so-called interstitial tissue is visible, which includes the testosterone-producing Leydig cells, blood vessels, immune cell populations and connective tissue components [5]. The entirety of the tubules is surrounded by the capsular tunica albuginea, which also comprises contractile cells [6,7].

Interestingly, during postnatal development, the contractile areas of the testis exhibit high amounts of polysialic acid (polySia) [8], which is an essential biomolecule for the development of the brain [9–12]. This linear polymer consists of sialic acid residues,



OPEN ACCESS

EDITED BY
Alexandre Rodrigues Silva,
Federal University Rural Semi-Arid, BrazilREVIEWED BY
Alejandro Bileli,
University of the Republic, Uruguay
Sandro Sonnino,
University of Milan, Italy

*CORRESPONDENCE

Sebastian P. Galuska
✉ galuska.sebastian@fhn-
dummerstorf.de
Ralf Middendorff
✉ ralf.middendorff@anatomie.med.uni-
giessen.de*These authors have contributed equally
to this work

RECEIVED 14 June 2023

ACCEPTED 05 July 2023

PUBLISHED 14 July 2023

CITATION

Humpfle L, Hachem NE, Simon P,
Weinhold B, Galuska SP and
Middendorff R (2023), Knockout of the
polysialyltransferases ST8SialI and
ST8SialIV leads to a dilatation of rete testis
during postnatal development.
Front. Physiol. 14:1240296.
doi: 10.3389/fphys.2023.1240296

COPYRIGHT

© 2023 Humpfle, Hachem, Simon,
Weinhold, Galuska and Middendorff. This
is an open-access article distributed
under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
The use, distribution or reproduction in
other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Knockout of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV leads to a dilatation of rete testis during postnatal development

Luisa Humpfle^{1†}, Nadim E. Hachem^{1†}, Peter Simon^{1,2},
Birgit Weinhold³, Sebastian P. Galuska^{4*} and Ralf Middendorff^{1*}¹Institute of Anatomy and Cell Biology, Medical Faculty, Julius-Liebig-University, Giessen, Germany, ²Institute of Biochemistry, Medical Faculty, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany, ³Institute of Cellular Chemistry, Hannover Medical School, Hannover, Germany, ⁴Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany

Polysialic acid (polySia) is a carbohydrate polymer that modulates several cellular processes, such as migration, proliferation and differentiation processes. In the brain, its essential impact during postnatal development is well known. However, in most other polySia positive organs, only its localization has been described so far. For instance, in the murine epididymis, smooth muscle cells of the epididymal duct are polysialylated during the first 2 weeks of postnatal development. To understand the role of polySia during the development of the epididymis, the consequences of its loss were investigated in postnatal polySia knockout mice. As expected, no polysialylation was visible in the absence of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV. Interestingly, cGMP-dependent protein kinase I (PKG1), which is essentially involved in smooth muscle cell relaxation, was not detectable in peritubular smooth muscle cells when tissue sections of polySia knockout mice were analyzed by immunohistochemistry. In contrast to this signaling molecule, the structural proteins smooth muscle actin (SMA) and calponin were expressed. As shown before, in the duct system of the testis, even the expression of these structural proteins was impaired due to the loss of polySia. We now found that the rete testis, connecting the duct system of the testis and epididymis, was extensively dilated. The obtained data suggest that loss differentiated smooth muscle cells of the testis and epididymis result in disturbed contractility and thus, fluid transport within the duct system visible in the enlarged rete testis.

KEYWORDS

polysialic acid, rete testis, testis, epididymis, smooth muscle cells, postnatal development

1 Introduction

All cells, both pro- and eukaryotic cells, are surrounded by a glycocalyx (Varbi, 2017; Awofiminye et al., 2022). These glycoconjugates are essential for interaction and communication processes between cells, such as the recognition of endogenous and exogenous cells by immune cells. Receptors of immune cells can distinguish between glycan-based pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), danger-associated molecular patterns (DAMPs) and self-associated molecular patterns (SAMPs) (Gagneux et al., 2015; Tiede and Gagneux, 2015; Springer and Gagneux, 2016; Bornhoff et al., 2018;

The loss of polysialic acid shows an impaired contractile phenotype of smooth muscle cells in the epididymal duct linked with a dilated rete testis

Nadim E. Hachem¹, Luisa Humpfle¹, Peter Simon², Birgit Weinhold³, Sebastian P. Galuska^{2,3}, Ralf Middendorff¹

JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN

¹Institute of Anatomy and Cell Biology JLU Giessen - Signal Transduction Group, Aufweg 123, 35392 Giessen
²Institute of Biochemistry JLU Giessen, Friedrichstr. 24, 35392 Giessen
³Institute of Reproductive Biology, Institute for Farm Animal Science (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 35116 Dummerstorf
Correspondence: nadim.hachem@tmail.de, luisa.humpfle@med.uni-giessen.de



Introduction:

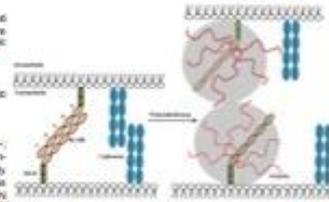
Polysialic acid is a homopolymer of α 2,8-linked sialic acid, which is known to be essential for the development of the brain, for example. The chains can be synthesized by polysialyltransferases, STS1 and STS2. Previous studies showed neuronal damage and a progressive hydrocephalus in polysialic mice. Mice were smaller and 80% of them died within the first four weeks after birth (Weinhold et al. 2005). During postnatal development, the contractile phenotype of the testis (Hachem et al. 2021) and epididymis (Simon et al. 2015) exhibit high amounts of polysialic acid.

Aims:

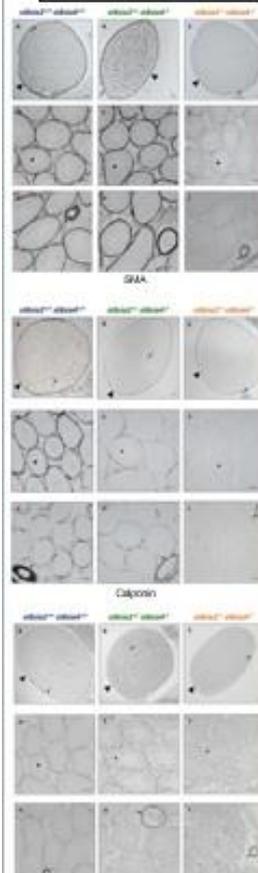
We now investigated contractile cells in the testis and epididymis of polysialyltransferase-deficient mice (sts1^{-/-}; sts2^{-/-} and sts1^{-/-}; sts2^{+/-}) in comparison to wildtype mice (sts1^{+/-}; sts2^{+/-}) at postnatal days 7.5-45 in terms of phenotypical changes.

Materials & Methods:

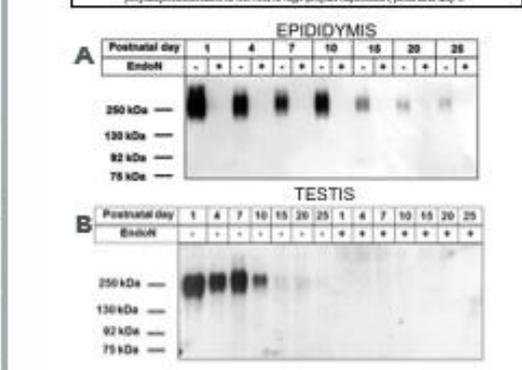
For the knockout studies, tissues from 5 wildtype (sts1^{+/-}; sts2^{+/-}), 5 heterozygous (sts1^{+/-}; sts2^{+/-}) (sts1^{-/-}; sts2^{+/-}) and 5 heterozygous (sts1^{+/-}; sts2^{-/-}) mice of age 4-5 days as well as 5 heterozygous (sts1^{+/-}; sts2^{+/-}) mice of 7.5 days were investigated. For immunohistochemistry of paraffin-embedded tissue, we used mouse anti-α-smooth muscle actin (SMA) monoclonal antibody, rabbit anti-caldesmon (Calponin), rabbit anti-PDG polymerase antibody (PDG), fluorochrome. Azun was used for the purpose of general connective staining. For developmental studies ICP-MS from murine epididymis and testis homogenates were obtained from wildtype mice of different ages (postnatal days 1, 4, 7, 10, 15, 20 and 25) and assessed by SEC-PAGE with or without endoh proteolysis. Immunostaining was performed with an anti-polySialic acid antibody.



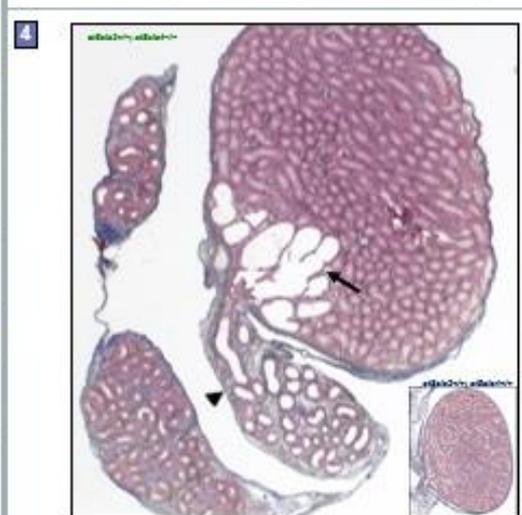
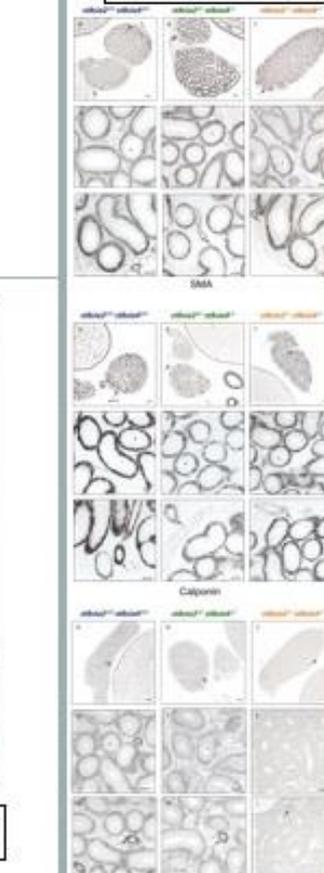
2 Epididymal tissue sections of postnatal wildtype, heterozygous and knockout mice were used to investigate common smooth muscle cell (SMC) markers. SMA and Calponin stainings showed a partial loss in peritubular muscle cells of knockout mice. Furthermore, a complete loss of PDG could be detected in knockout mice, indicating a less differentiated ('synthetic') phenotype of peritubular SMCs when losing polysialic acid in vascular SMCs.



1 Murine wildtype postnatal epididymis (A) and testis (B) samples showed high amounts of polysialic acid at postnatal days 7-10, but polysialic levels are decreased afterwards. Therefore, it was of interest to know the extent of molecular changes in mice lacking both polysialyltransferases at the end of high actin reposition, postnatal day 9.



3 Epididymal tissue sections of postnatal wildtype, heterozygous and knockout mice were used to investigate common SMC markers. The staining SMA and Calponin immunostaining of peritubular SMCs in wildtype was unchanged in heterozygous mice. SMA, however, showed a partial loss of peritubular SMCs in vascular SMCs in heterozygous mice and a complete loss in endothelial cells, suggesting an impaired ability to contract and relax the epididymal duct.



Azun staining of epididymal and epididymal tissue taken from a heterozygous mouse at postnatal day 7.5. The image shows a dilated rete testis (arrow) and the enlarged epididymal tubule (triangle) containing a thick mass of luminal fluid towards the rete testis.

Conclusions:

- In postnatal murine testis and epididymis, polysialic acid is present until postnatal day 10.
- The loss of polysialic acid leads to a loss of SMC markers and in consequence to a less differentiated ('synthetic') phenotype of SMCs.
- Even a partial loss of one polysialyltransferase leads to a drastic phenotypical change.
- The rete testis of heterozygous and knockout mice is dilated.

We suggest that disturbed contractility of the epididymal duct in polysialic knockout mice might result in a back pressure of luminal fluid towards the rete testis.



12 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Middendorff. Die unzähligen Stunden voller harter Arbeit und sprießender Ideen haben mir unheimlichen Spaß bereitet. Auch danke ich dir für die stetige Unterstützung während meines Studiums und dein Verständnis in all meinen Lebenslagen. Ebenfalls bedanke ich mich bei PD Dr. Sebastian Peter Galuska für die Überlassung des Themas und die durchweg schnelle und konstruktive Kritik. Du hast mir immer das Gefühl gegeben, dass dieses Projekt ein Erfolg wird. Ganz herzlich möchte ich mich bei der gesamten AG Signaltransduktion bedanken, namentlich erwähnt aufgrund der hervorragenden Einarbeitung seien Daniela Beyer und Thorben Hau und aufgrund der erfolgreichen Bewältigung aller Krisen, Sabine Tasch.

Ohne Dr. Bernd Miebach säße ich wahrscheinlich heute noch an der statistischen Auswertung meiner Daten. Es war mir eine große Freude von dir zu lernen.

Meiner künstlerisch äußerst begabten Cousine, Tamara Rahil, verdanke ich die Zeichnungen meiner Abbildungen.

Ich danke all meinen Freunden in Gießen, die mir vom ersten Tag des Medizinstudiums und Beginn der Doktorarbeit zur Seite standen.

Ein großer Dank geht nach Düsseldorf an Katya und Daniel für alle spontanen mitternächtlichen Kaffee-Dates. Ich danke meiner gesamten Familie, die mich unentwegt unterstützt und motiviert hat.

Mit Abstand am meisten Freud und Leid wegen meiner Doktorarbeit hast du, Steffi, mitbekommen. Bei jeder Niederlage hast du mich aufgefangen und mir neuen Mut gegeben, um mein Ziel zu erreichen.

Gewidmet habe ich meine Dissertation Amo Georges, einem der brilliantesten Menschen den ich kannte, liebe und bewundere. Du bist ein Vorbild für uns und ich bin sehr glücklich, dass du uns so stark geprägt hast.

Als letztes danke ich meinem Papa. Du hast mich zu einem Menschen geformt, der nie aufgibt und all seine Ziele mit breiter Brust und bis zum Ende verfolgt.

Und wie du siehst, es hat funktioniert.